TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemisch-technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie

Eine neuartige Fluoreszenzmethode zur Bestimmung von Glutathion in Lunge und Bronchialepithel der Styrol-exponierten Maus – Bedeutung des Glutathionstatus für die Zellproliferation

Nadine Richter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	UnivProf. Dr. W. Schwab	
Prüfer der Dissertation:	1. UnivProf. Dr. Dr. h.c. H. Parlar (i.R.)	
	2. apl. Prof. Dr. J.G. Filser	
	3. UnivProf. Dr. R. Schopf	

Die Dissertation wurde am 21.03.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 31.08.2012 angenommen.

Diese Arbeit wurde im Institut für Toxikologie am Helmholtz Zentrum München angefertigt und dort von Prof. Dr. Johannes G. Filser betreut. Teile dieser Arbeit wurden präsentiert:

Richter N., Klein D., Li Q., Filser J.G. (2010). A novel method for the determination of glutathione in lung epithelium by fluorescence microscopy exemplified in the mouse. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 381 (Suppl. 1), Abstract 282. (ausgezeichnet mit dem Preis der Deuschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. für das beste Poster aus dem Bereich Toxikologie 2010)

Richter N., Klein D., Filser J.G. (2011). Effect of inhaled styrene on glutathione status and cell proliferation in the mouse lung. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 383 (Suppl. 1), Abstract 374.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLE	ITUNG	1
1.1	Problemstellung		1
1.2	Die Ma	auslunge	2
	1.2.1	Anatomie	2
	1.2.2	Physiologie	6
	1.2.3	Fremdstoffinduzierte Clarazell-Toxizität	7
1.3	Styrol		7
	1.3.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	7
	1.3.2	Vorkommen und Exposition	8
	1.3.3	Metabolismus	9
	1.3.4	Toxizität und Kanzerogenität nach inhalativer Exposition	12
	1.3.5	Genotoxizität und Mutagenität	15
	1.3.6	Mechanismen der Kanzerogenität	16
1.4	Glutathion		18
	1.4.1	Funktion und Homöostase	19
	1.4.2	Folgen einer Störung der Glutathion-Homöostase	21
	1.4.3	Methoden zur Glutathion-Bestimmung	23
1.5	Ziele der Arbeit		26

2	MATER	IALIEN UND METHODEN	27
2.1	Geräte, Chemikalien und Laborwaren		27
2.2	2 Behandlungen und Expositionen der Tiere		30
	2.2.1	Behandlungen mit L-Buthioninsulfoximin und Diethylmaleat	30
	2.2.2	Behandlungen mit Bromdesoxyuridin	31
	2.2.3	Expositionen gegen Styrol	31

i

2.3	In-situ-Inflation der Mauslunge mit Monochlorbiman und Gewebe-		
	aufbereitung		34
	2.3.1	Herstellung von Homogenat	36
	2.3.2	Herstellung von Cytosol	36
	2.3.3	Anfertigung von Gefrierschnitten	37
2.4	2.4 Fluorometrische Bestimmung von Glutathion im Homogenat und		
	Cytosol	der Mauslunge	37
2.5	Bestimmung von Glutathion im Gefrierschnitt der Mauslunge 39		
2.6	Bestimmung der Zellproliferation im Gefrierschnitt der Mauslunge 46		
2.7	2.7 Etablierte analytische Verfahren		50
	2.7.1	Gaschromatographische Bestimmungen von Styrol	50
	2.7.2	Bestimmung von Glutathion mittels eines Recycling-Tests	53
	2.7.3	Proteinbestimmung	54
2.8	Statistis	sche Auswertung	56

3	ERGEE	BNISSE	57
3.1	3.1 Entwicklung der Methode zur Bestimmung von Glutathion		
	in der N	lauslunge	57
	3.1.1	Bestimmung von Glutathion in Homogenat und Cytosol	59
	3.1.2	Bestimmung von Glutathion in Gefrierschnitten	69
3.2 Exposition gegen Styrol - Glutathionstatus und Zellproliferatio in der Mauslunge		ion gegen Styrol - Glutathionstatus und Zellproliferation	
		/lauslunge	74
	3.2.1	Glutathion in der Gesamtlunge im Verlauf dreitägiger	
		Expositionen	74
	3.2.2	Glutathion im Bronchialepithel nach dreitägigen Expositionen	76
	3.2.3	Zellproliferation im Bronchialepithel nach dreitägigen	
		Expositionen	78
	3.2.4	Zusammenhang zwischen Glutathionstatus und Zellproliferation	n 79

ii

4	DISKUSSION	81
4.1	Eine neue Methode zur Bestimmung von Glutathion in der Lunge	81
4.2	Glutathion im Bronchialepithel der Maus	87
4.3	Glutathion in der Lunge nach Expositionen gegen Styrol	89
4.4	Zellproliferation in der Lunge nach Expositionen gegen Styrol	94
4.5	Zusammenhang zwischen Glutathionstatus und Zellproliferation im Hinblick auf die Styrol-bedingte Lungentumorigenität bei der Maus	95
4.6	Ausblick	99

5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	ABKÜRZUNGEN	104
7	LITERATUR	105

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Styrol ist bei Raumtemperatur eine farblose Flüssigkeit mit einem hohen Dampfdruck, die zur Herstellung von Polymeren, Kunststoffen und Harzen verwendet wird. Hierbei können Menschen berufsbedingt gegen Styroldämpfe exponiert werden. In Langzeit-Inhalationsstudien mit Ratten und Mäusen war Styrol nur bei der Maus kanzerogen, wobei es ausschließlich Lungentumoren im Bereich der terminalen Bronchioli induzierte. Untersuchungen zum ursächlichen Mechanismus ergaben, dass inhaliertes Styrol die nicht-zilierten bronchialen Epithelzellen (Clarazellen) der Atemwege schädigen kann. Zudem wurde bei Mäusen eine vermehrte Proliferation dieser Zellen in den Atemwegen infolge von Styrolexpositionen beobachtet. Es wird vermutet, dass die Styrol-induzierte Erhöhung der Zellproliferation kausal mit der Entstehung von Tumoren in den terminalen Bronchioli zusammenhängt.

Nach inhalativer Aufnahme wird Styrol bei Maus, Ratte und Mensch vorwiegend in der Leber sowie zumindest bei den Nagetierspezies auch in der Lunge zu Styrol-7,8oxid metabolisiert, das die DNS alkyliert und genotoxisch wirkt. Die Entgiftung von Styrol-7,8-oxid erfolgt durch Hydroxylierung sowie durch Konjugation an intrazelluläres Glutathion (GSH). Neben seiner hauptsächlichen Funktion zur Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts in der Zelle spielt GSH auch im Fremdstoffmetabolismus eine bedeutende Rolle. Zudem ist GSH an der Regulation der Genexpression und des Zellzyklus beteiligt. Eine hohe Konzentration an Fremdstoffen und Metaboliten in den Clarazellen kann durch die vermehrte Konjugation an GSH zu einer Abnahme der intrazellulären GSH-Konzentration führen. Es wird vermutet, dass Änderungen des GSH-Status in der Lunge, die nach einer Styrolexposition gefunden wurden, im Zusammenhang mit einem Anstieg der Zellproliferation stehen. Bislang liegen keine Erkenntnisse über den zeitlichen Ablauf der Änderungen des GSH-Spiegels in der Lunge vor. Auch die Styrol-bedingte regiospezifische Induktion der Zellproliferation in den Atemwegen wurde bisher nur unzureichend untersucht, was möglicherweise dadurch bedingt ist, dass keine geeignete Methode existiert, um GSH-Gehalte zusammen mit der Zellproliferation in einzelnen Atemwegssegmenten der Mauslunge quantitativ zu bestimmen. Ziel der Arbeit war es daher, zunächst eine Methode für die Bestimmung von GSH und Zellproliferation in unterschiedlichen Atemwegssegmenten in der Lunge zu erarbeiten. Durch Inhalationsversuche sollte dann der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Styrol auf die GSH-Konzentration in der Gesamtlunge im Verlauf dreitägiger Expositionen (6 h/Tag) sowie die Änderung der GSH-Konzentration im Bronchialepithel einzelner Atemwegssegmente der Mauslunge und die Zellproliferation am Ende des dritten Expositionstages ermittelt werden. Anhand der Ergebnisse sollte dann der Mechanismus der styrolbedingten Kanzerogenität in der Mauslunge diskutiert werden.

1.2 Die Mauslunge

1.2.1 Anatomie

Die Lunge einer erwachsenen Maus hat ein Gesamtvolumen von ca. 1,3 ml (Mausstamm *Mus musculus* Linnaeus (38 g Körpergewicht); Valerius, 1996). Das Frischgewicht der Lunge beträgt etwa 140 mg und der Proteingehalt 109 mg/g Frischgewicht (Mausstamm C57BL/B6 (25 g Körpergewicht); Lyerla et al., 2003). Die Lunge der Maus ist ein paariges Organ und besteht aus einem linken und einem rechten Lungenflügel mit insgesamt fünf Lungenlappen. Der linke Lungenflügel besteht aus einem ungeteilten linken Lungenlappen; der rechte Lungenflügel hingegen wird in vier Lungenlappen (kranialer, mittlerer, kaudaler und zweigeteilter akzessorischer Lungenlappen) unterteilt (Abbildung 1; Dixon et al., 1999).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mauslunge aus dorsaler Sicht mit dem aus einen ungeteilten Lungenlappen bestehenden linken Lungenflügel (L) und dem rechten Lungenflügel (R), der in den kranialen (A), mittleren (B), kaudalen (C) und zweigeteilten akzessorischen (D) Lungenlappen unterteilt wird (aus Dixon et al., 1999).

Die Lunge kann in einen luftführenden Teil (Luftröhre und Bronchialsystem) sowie einen gasaustauschenden Teil (Alveolen) unterteilt werden. Die Luftröhre (Trachea) spaltet sich extrapulmonär in zwei Bronchien auf, die sich dann zu den einzelnen Lungenlappen sowie innerhalb der einzelnen Lungenlappen monopodial (mit durchgehender Verzweigungsachse) in Bronchioli weiterverzweigen (Abbildung 2; Dixon et al., 1999). Die terminalen Bronchioli bilden als kleinstes Segment des Bronchialsystems einen direkten Übergang zum Alveolarsystem (Dixon et al., 1999).

Die Atemwege sind von einer Schicht aus glatter Muskulatur umgeben, die zu den terminalen Bronchioli hin abnimmt (Dixon et al., 1999). Ausgekleidet werden die Atemwege von einem einschichtigen Zylinderepithel, das aus nicht-zilierten bronchialen Epithelzellen (Clarazellen), zilierten Zellen sowie wenigen Basalzellen und Bürstenzellen besteht (Dixon et al., 1999; Pack et al., 1981). Schleimsekretierende Zellen befinden sich in der gesunden Mauslunge nur in den extrapulmonären Bronchi und in der Trachea (Dixon et al., 1999). Die Zellen der Atemwege werden vom Bronchialsekret ("epithelial lining fluid") bedeckt (Dixon et al., 1999).



Abbildung 2: Links: Schematische Darstellung der Atemwege entlang einer Verzweigungsachse im linken Lungenlappen der Mauslunge mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Unterteilung in vier Atemwegssegmente. Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme der Mauslunge mit einem terminalen Bronchiolus (TB), Alveolargewebe (Alv) und einem arteriellen Blutgefäß (Art). Die Atemwege werden von einer Schicht aus glatter Muskulatur (GM) umhüllt. Die Clarazellen (CZ) der Atemwege unterscheiden sich durch die apikale Wölbung des Cytoplasmas von den Endothelzellen (EZ) der Blutgefäße. Paraffinschnitt mit 250facher Vergrößerung (aus Gartner und Hiatt, 2006).

Nach Green et al. (1997) beträgt der Anteil der Clarazellen in der Mauslunge etwa 5%. Ihr Anteil am Bronchialepithel nimmt in distaler Richtung von 50 - 60% in den proximalen Bronchi auf ca. 75% in den terminalen Bronchioli zu (Dixon et al., 1999; Pack et al., 1981). Ultrastrukturell zeichnen sich Clarazellen durch große Mengen an Endoplasmatischen Retikulum (Ishimura et al., 1985) und Sekretvesikeln (Dixon et al., 1999) im apikalen Bereich der Zelle aus, sodass eine kuppelartige Wölbung der Zelle ins Lumen der Atemwege entsteht (Pack et al., 1981; Plopper et al., 1980). Zilien-tragende Zellen hingegen besitzen diese cytoplasmatische Wölbung nicht (Dixon et al., 1999). Sie sind selbst nicht teilungsfähig und entstehen durch Ausdifferenzierung von Clarazellen (Pack et al., 1981; Singh und Katyal, 1997). Clarazellen unterliegen der Zellteilung mit einem Proliferationsindex von 0,3% (Dixon et al., 1999).

Die Alveolen sind von einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet, das aus 95 - 97% alveolaren Typ I- und 3 - 5% alveolaren Typ II-Zellen besteht (Dixon et al., 1999). Die flach der Basalmembran anliegenden alveolaren Typ I-Zellen bilden zusammen mit den Endothelzellen der Blutgefäße und der dazwischenliegenden Basalmembran die Blut-Luft-Schranke (Gartner und Hiatt, 2006). Die würfelförmigen Typ II-Zellen sind teilungsfähig (Proliferationsindex 0,3%) und können in Typ I-Zellen ausdifferenzieren (Dixon et al., 1999). Im Lumen der Alveolen befinden sich pulmonäre Makrophagen. Die Alveolen sind von einem dichten Geflecht aus Kapillaren umgeben (Gartner und Hiatt, 2006). Pulmonäre Arterien und Venen verlaufen entlang der Bronchi und Bronchioli. Sie zeichnen sich durch eine glatte Endothelschicht auf der Innenseite der Gefäße aus (Dixon et al., 1999), die sie deutlich von dem Epithel auf der Innenseite der Atemwege unterscheidet.

Wesentliche Unterschiede zur Lunge der Ratte und des Menschen

Die Rattenlunge ist anatomisch so untergliedert wie die der Maus. Beim Menschen hingegen besteht der linke Lungenflügel aus zwei und der rechte Lungenflügel aus drei Lungenlappen. Das Lungenvolumen der Ratte (ca. 240 g Körpergewicht; Valerius, 1996) beträgt etwa 14 ml, das des erwachsenen Menschen etwa 7 - 8 l (ICRP, 1974). Beim Menschen spalten sich die Atemwege im Gegensatz zu Ratte und Maus nahezu symmetrisch auf (Dixon et al., 1999). Der Übergang von den terminalen Bronchioli zu den Alveolen wird bei Ratte (Jeffery und Reid, 1975) und Mensch (ten Have-Opbroek et al., 1991) durch die respiratorischen Bronchioli dargestellt; sie werden dem gasaustauschenden Teil der Lunge zugeordnet (Gartner und Hiatt, 2006). Clarazellen befinden sich bei der Ratte in allen intrapulmonären Atemwegen mit dem größten Anteil im Bereich der distalen Atemwege (Jeffery und Reid, 1975; Storch und Welsch, 2009). Jedoch ist der Anteil der Clarazellen am Bronchialepithel bei der Ratte geringer als bei der Maus (Plopper et al., 1980). Beim

Menschen kommen in den oberen Atemwegen fast keine Clarazellen vor (Boers et al., 1999). In den terminalen Bronchiolen des Menschen sind lediglich 11% der Zellen des Bronchialepithels Clarazellen (Boers et al., 1999).

1.2.2 Physiologie

Die Hauptfunktion der Lunge besteht im Gasaustausch zwischen Außenluft und Blut (Dixon et al., 1999). Dieser findet überwiegend über die Blut-Luft-Schranke in den Alveolen statt (Gartner und Hiatt, 2006). Diese Barriere reduziert das Eindringen von Fremdkörpern (Staubpartikeln) und Bakterien in den Organismus (Gartner und Hiatt, 2006). Pulmonäre Makrophagen können eingeatmete Partikel und Bakterien über Phagocytose aufnehmen (Bowden, 1976). Sie bilden daher einen wichtigen Teil der Immunabwehr in der Lunge (Brain, 1992). Der Abtransport eingeatmeter Partikel und Bakterien aus der Lunge in Richtung der Trachea erfolgt mit dem Bronchialsekret überwiegend über die zilierten Zellen des Bronchialepithels (Gartner und Hiatt, 2006).

Fremdstoffe werden in der Mauslunge vor allem in den Clarazellen des Bronchialepithels und zu einem geringen Teil in den Typ II-Zellen der Alveolen und Endothelzellen der Blutgefäße metabolisiert (Dixon et al., 1999). Clarazellen sekretieren zudem das Bronchialsekret, die Proteine SP-A, SP-B und SP-D der "grenzflächenaktiven Substanz" (Surfactant) sowie das Clarazell-10 kD-Protein (CC10), das eine antioxidative und anti-inflammatorische Wirkung hat (Broeckaert et al., 2000; Singh und Katyal, 1997; Velsor et al., 2006). Zusätzlich werden in der Lunge Faktoren des Komplementsytems, Lysozym sowie Eicosanoide (Thromboxane, Prostaglandine) produziert (Dixon et al., 1999).

1.2.3 Fremdstoffinduzierte Clarazell-Toxizität

Das Lungengewebe kann insbesondere durch inhalierte aber auch durch systemisch verteilte Fremdstoffe sowie durch endogene Substanzen geschädigt werden (Fanucchi et al., 1997). Aufgrund der hohen metabolischen Kapazität von Clarazellen (Fanucchi et al., 1997; Ishimura et al., 1985; Phimister et al., 2004) können reaktive Stoffwechselprodukte entstehen, die zytotoxisch wirken können. Am Beispiel vom auf Clarazellen zytotoxisch wirkenden Naphthalin wurde gezeigt, dass Clarazellen nach ihrem Tod ins Atemwegslumen abschilfern und sich verbliebene zilierte Zellen teilweise über freiwerdende Epithelbereiche strecken (Phimister et al., 2005). Gehen auch zilierte Zellen aufgrund der Fremdstoffexposition zugrunde, kommt es zu einer Schädigung des gesamten Bronchialepithels (Dixon et al., 1999). Die Regeneration des Bronchialepithels kann durch eine erhöhte Proliferation überlebender Zellen - vermutlich Clarazellen - erfolgen (Dixon et al., 1999). Clarazellen können gegenüber einem zytotoxischen Stress kurzzeitig tolerant werden, wenn dem stoffspezifischen Stress eine Präexposition gegen den gleichen Fremdstoff (in diesem Fall Naphthalin) im subtoxischen Bereich vorausgeht (West et al., 2000a).

1.3 Styrol

1.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Styrol (Synonyme: Phenylethen, Ethylbenzol, Vinylbenzol) ist bei Raumtemperatur eine klare, farblose Flüssigkeit mit einem leicht süßlichen Geruch (Miller et al., 1994). Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 104,15 g/mol, eine spezifische Dichte von 0,905 g/ml (25°C), einen Schmelzpunkt von -30,6°C und einen Siedepunkt von 145,2°C. Styrol löst sich in Wasser bis zu einer Konzentration von 320 mg/l und ist gut in Ethanol oder Diethylether löslich (Miller et al., 1994). Aufgrund des hohen Dampfdrucks von 598 Pa (20°C), könn en sich leicht Styroldämpfe bilden. Eine Konzentration von 1 ppm Styrol in der Luft entspricht 4,26 mg/m³ (Miller et al., 1994).

1.3.2 Vorkommen und Exposition

Styrol ist eine wichtige Industriechemikalie zur Herstellung von Polymeren und Co-Polymeren, synthetischem Gummi, Verpackungsmaterial, Kunststoffen und Harzen (Miller et al., 1994). Die weltweite jährliche Produktion von Styrol betrug 2001 ungefähr 20 Millionen Tonnen (Meima und Menon, 2001).

Während der Produktionsprozesse und insbesondere bei der Verarbeitung (Laminierung, Bootsbau usw.) können Industriearbeiter gegen freiwerdende Styroldämpfe exponiert werden. Dabei kann die Expositionskonzentration kurzzeitig über 100 ppm betragen (NTP, 2008). Die zeitgewichtete Expositionskonzentration liegt mit zumeist weniger als 5 ppm Styrol (Miller et al., 1994) deutlich unter dem von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) festgelegten Arbeitsplatzgrenzwert von 20 ppm Styrol bzw. 86 mg/m³ (Stand: Januar 2011; BAuA).

Die Allgemeinbevölkerung ist gegen Styrolkonzentrationen von ungefähr 0,001 ppm pro Tag exponiert. Styrol ist in der Innenraumluft aufgrund von Emissionen aus Haushaltsprodukten, im Zigarettenrauch und in Automobilabgasen enthalten und wird zum überwiegenden Teil inhalativ aufgenommen. Geringe Mengen an Styrol können auch durch kontaminiertes Trinkwasser oder Nahrungsmitteln, die beispielsweise durch styrolhaltige Verpackungen kontaminiert wurden, aufgenommen werden (IARC, 2002; Miller et al., 1994). Styrol kommt natürlicherweise als Abbauprodukt in der Rinde des Storaxbaums vor (IARC, 2002).

1.3.3 Metabolismus

Die Aufnahme von Styrol erfolgt im Allgemeinen inhalativ, dermal oder oral (zusammengefasst in IARC, 2002). Bei Mäusen und Ratten tritt etwa zwei Drittel des in die Lunge gelangenden, inhalierten Styrols in den Blutkreislauf über; der Rest wird sofort wieder ausgeatmet. Beim Menschen hingegen werden 90% des eingeatmeten Styrols ins Blut aufgenommen (Csanády et al., 1994; Filser et al., 1993). Bei Konzentrationen unterhalb von 250 ppm Styrol in der Atemluft (Ratte, Maus) bzw. 80 ppm (Mensch) werden mehr als 95% des aufgenommenen Stoffes metabolisiert und weniger als 5% des Styrols unverändert wieder abgeatmet. Aufgenommenes Styrol wird im Organismus über das Blut verteilt (Csanády et al., 1994; Filser et al., 1994; Filser et al., 1993) und in fremdstoffmetabolisierenden Organen wie Leber (Bitzenhofer et al., 1994; Bogan et al., 1993) und Lunge (Hofmann et al., 2006; Oberste-Frielinghaus et al., 1999) verstoffwechselt.

In der Lunge erfolgt der Metabolismus von Styrol vorwiegend in den Clarazellen des Bronchialepithels und zu einem geringen Teil in den alveolaren Typ II-Zellen (Cruzan et al., 2002; Hynes et al., 1999). Das Hauptstoffwechselprodukt (>90%) von Styrol ist bei Maus (Csanády et al., 2003), Ratte (Bond, 1989) und Mensch (Guillemin und Bauer, 1979; Manini et al., 2002) Styrol-7,8-oxid (Abbildung 3). Bei Konzentrationen bis 250 ppm Styrol in der Atemluft nimmt die Belastung mit dem Hauptmetaboliten Styrol-7,8-oxid im Blut proportional zur Styrolkonzentration zu. Oberhalb von 250 ppm Styrol hingegen steigt bei der Maus die Konzentration von Styrol-7,8-oxid im Blut überproportional an (Kessler et al., 1992; Morgan et al., 1993a), während bei der Ratte ein Plateauwert erreicht wird (Kessler et al., 1992). Anhand von Inhalationsexperimenten mit radioaktiv markiertem Styrol wurde gezeigt, dass ein geringer Anteil des aufgenommenen Styrols (bei 160 ppm Styrol 6 -8% in der Maus, 2 - 3% in der Ratte; Boogaard et al., 2000a) durch Ringoxidation zu Styrol-3,4-oxid und dem Folgemetaboliten 4-Vinylphenol (4-VP) umgewandelt wird. Styrol wird zudem bei den drei Spezies in einem sehr geringen Ausmaß über die Bildung von Phenylacetaldehyd verstoffwechselt (Abbildung 3; Sumner und Fennell, 1994).



Abbildung 3: Erste Schritte des Metabolismus von Styrol bei der Ratte und wahrscheinlich auch bei der Maus (modifiziert nach Sumner und Fennell, 1994).

Bei Maus und Ratte wird Styrol vorwiegend durch die Cytochrom P450-abhängigen Monooxigenasen (CYP-Isoenzyme) in Styrol-7,8-oxid überführt, wie Filser et al. (1993) mittels des CYP-Inhibitors Diethyldithiocarbamat gezeigt haben. In der Mauslunge sind insbesondere die CYP-Isoenzyme CYP2E1 und CYP2F2 an der Biotransformation von Styrol beteiligt (Hynes et al., 1999; Shen et al., 2010). In der Lunge der Ratte wird Styrol durch die orthologen Isoenzyme CYP2E1 und CYP2F4 metabolisiert, wobei beide Isoenzyme jedoch in deutlich geringerem Ausmaß exprimiert sind als bei der Maus (Buckpitt et al., 1995; Green et al., 1997). Auch die maximale Metabolismusgeschwindigkeit von Styrol war bei der Ratte fast um den Faktor 3 geringer als bei der Maus (Filser et al., 1993). Weiterhin unterscheidet sich die Bildung der Enantiomere des Hauptmetaboliten Styrol-7,8-oxid zwischen Ratte und Maus. So wurden in der Maus etwas mehr R- als S-Enantiomere und in der Ratte etwas mehr S-Enantiomere gebildet (Hynes et al., 1999). Beim Menschen sind ebenfalls vorwiegend CYP2E1 und das orthologe CYP2F1 an der Biotransformation von Styrol beteiligt (Nakajima et al., 1994). Die menschliche Lunge besitzt allerdings eine äußerst geringe metabolische Aktivität von CYP-Enzymen für Styrol (Nakajima et al., 1994). So war die maximale Bildungsgeschwindigkeit von Styrol-7,8-oxid pro Gramm Lunge beim Menschen fast 400 mal niedriger als bei Ratte und Maus (Csanády et al., 2003).

Die Elimination der Stoffwechselprodukte von Styrol erfolgt bei Ratte und Mensch, und wahrscheinlich auch bei der Maus, hauptsächlich über den Urin, bei der Ratte auch über die Galle (2%) sowie durch Exhalation (12% als CO₂) (Sumner und Fennell, 1994). Untersuchungen der Abbauprodukte im Urin Styrol-exponierter Ratten ergaben, dass der Hauptmetabolit Styrol-7,8-oxid zu ungefähr 60% in einer durch die Epoxidhydrolase vermittelten Reaktion zu Phenylethylenglycol hydrolysiert und anschließend zu weiteren Folgemetaboliten umgesetzt wird (Abbildung 3). Etwa 40% des Styrol-7,8-oxids werden durch Glutathion-S-Transferasen (GST) an GSH konjugiert und weiter zu Merkaptursäurederivaten abgebaut (Sumner und Fennell, 1994). Beim Menschen erfolgt der Abbau von Styrol-7,8-oxid vorwiegend (>90%) über den Epoxidhydrolaseweg; die Konjugation mit GSH spielt wahrscheinlich nur eine geringe Rolle (Sumner und Fennell, 1994; Vodicka et al., 2004). Ein großer Teil der ringoxidierten Metabolite wird bei Ratte und Maus offensichtlich als CO₂ ausgeschieden. So betrug der Anteil der Folgemetaboliten von 4-VP im Urin bei Ratten nach einmaliger Verabreichung von Styrol (100 mg/kg Körpergewicht) lediglich 0,1% der Styroldosis (Bakke und Scheline, 1970). Im Urin von Mäusen, die 6 h lang gegen 140 und 280 ppm Styrol exponiert waren, lag der Anteil der 4-VP-Metaboliten weniger als 0,05% der aufgenommenen Styrolmenge (Linhart et al., 2010). Beim Menschen wurde nach beruflicher Styrolexposition (Konzentration nicht angegeben) ein 4-VP-Anteil aller im Urin gefundenen Styrolmetaboliten zwischen 0,5 und 2% festgestellt (Manini et al., 2002; Vodicka et al., 2004).

1.3.4 Toxizität und Kanzerogenität nach inhalativer Exposition

Styrol kann in Konzentrationen ab 20 ppm reizend auf die Augen und Schleimhäute der Atemwege wirken (IARC, 1994a). Bei Mäusen hat Styrol oberhalb von etwa 250 ppm eine toxische Wirkung, die jedoch nur bedingt von der Expositionskonzentration oder -zeit abhängt (Cruzan et al., 1997; Green et al., 2001; Morgan et al., 1993b). So waren bereits einmalige Expositionen (6 h) von Mäusen gegen Konzentrationen gegen 500 ppm oder zweimalige Expositionen (6 h/Tag) gegen 250 ppm Styrol akut toxisch und führten zu schweren Läsionen der Leber sowie zu erhöhter Mortalität (Morgan et al., 1993a). Die lethale Konzentration für 50% der Versuchstiere (LC₅₀) abgeleitet aus vier Expositionen (6 h/Tag) betrug 250 ppm Styrol für weibliche bzw. ca. 500 ppm Styrol für männliche Mäuse (Cruzan et al., 1997). Wie von Csanády et al. (2003) diskutiert wurde, reicht oberhalb von 250 ppm Styrol die GSH-Neusynthese nicht aus, um den durch GSH-Konjugation mit dem Metaboliten Styrol-7,8-oxid bedingten GSH-Verlust auszugleichen. Die hieraus resultierende dramatische Erhöhung der Belastung durch Styrol-7,8-oxid im Blut (siehe Abschnitt 1.3.3) könnte die akute Lebertoxizität und erhöhte Mortalität erklären.

Einmalige Expositionen von Mäusen gegen 40 und 160 ppm Styrol wirkten vor allem zytotoxisch auf Clarazellen der Lunge und verursachten einen fokalen Verlust an Cytoplasma in den terminalen Bronchioli innerhalb von 18 h nach der Exposition (Green et al., 2001). Bei wiederholten Expositionen bis zu 10 Tagen

(6 h/Tag) gegen 40 und 160 ppm Styrol wurden bereits nach drei Tagen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zellproliferation im Bronchialepithel von Mäusen beobachtet (Green et al., 2001). Die styrolbedingten Schädigungen der Clarazellen und die erhöhte Zellproliferation waren nach einer zweitägigen Unterbrechung der Exposition nicht mehr feststellbar, traten jedoch wieder auf, wenn die Exposition weitergeführt wurde (Green et al., 2001). Bei subchronischen Expositionen (6 h/Tag; 5 Tage/Woche; 13 Wochen) von Mäusen gegen 50 - 200 ppm Styrol wurden histopathologische Veränderungen der Lunge (Abnahme der Eosinophilie des Bronchialepithels) und des Nasen- und Rachenbereichs (Atrophie des olfaktorischen Epithels) gefunden (Cruzan et al., 1997). Konzentrationen ab 100 ppm Styrol führten nach 13 Wochen zu einer fokalen Häufung von Clarazellen (Cruzan et al., 1997). Bei einzelnen Tieren wurde zudem bei Styrolkonzentrationen ab 150 ppm eine Zunahme der Clarazellproliferation beobachtet (Cruzan et al., 1997). Die Langzeitinhalation von 20, 40, 80 und 160 ppm Styrol (6 h/Tag; 5 Tage/Woche) über etwa 2 Jahre führte in allen Expositionsgruppen zu histopathologischen Veränderungen (Metaplasien) im Nasen- und Rachenbereich (Cruzan et al., 2001). In der Lunge fanden sich bei den Männchen bei 40, 80 und 160 ppm Styrol sowie den Weibchen bei 20, 40 und 160 ppm Styrol im Bereich der terminalen Bronchioli bronchio-epitheliale Hyperplasien sowie erhöhte Inzidenzen bronchio-alveolärer Adenoma. In der höchsten Expositionsgruppe traten bei den Weibchen zudem Lungenkarzinome auf (Cruzan et al., 2001).

Bei Ratten wurden bei Styrolkonzentrationen bis zu 1500 ppm keine akut toxischen Wirkungen festgestellt (Cruzan et al., 1997). Bei subchronischer Exposition (6 h/Tag, 5 Tage/Woche) gegen bis zu 1500 ppm Styrol über 13 Wochen waren histopathologische Veränderungen (z.B. Atrophie des olfaktorischen Epithels) auf den Nasenund Rachenbereich beschränkt (Cruzan et al., 1997). Eine Erhöhung der Zellproliferation in der Rattenlunge wurde nicht festgestellt (Cruzan et al., 1997). Auch nach der Langzeitinhalation (6 h/Tag; 5 Tage/Woche) von bis zu 1000 ppm Styrol über bis zu 2 Jahre wurden in bei Ratten weder histopathologische Veränderungen der Lunge noch vermehrt Lungentumoren beobachtet (Cruzan et al., 1998). In einer früheren Inhalationsstudie traten bei weiblichen Ratten, die ein Jahr lang gegen bis zu 300 ppm Styrol exponiert waren, unabhängig von der Styrolkonzentration vermehrt Mammatumoren auf (Conti et al., 1988). Die Validität dieser Studie wurde jedoch von einer Arbeitsgruppe der "International Agency for Research on Cancer" (IARC, 2002) der WHO bezweifelt.

Für den Menschen liegen Erkenntnisse über die toxische Wirkung von Styrol nur nach beruflicher Exposition vor. Bei akuter Einwirkung von Styrolkonzentrationen ab 50 ppm wurden Reizungen der oberen Atemwege sowie oberhalb von 200 ppm Müdigkeit, Brechreiz, Störungen des Gleichgewichts und eine verlängerte Reaktionszeit beschrieben (zusammengefasst in DFG, 1987). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass bereits Expositionskonzentrationen von 20 ppm Styrol das Farbsehen beeinträchtigen können (zusammengefasst in IARC, 2002). Berufliche Expositionen gegen etwa 30 ppm Styrol für 4 - 6 Monate führten zu einer vermehrten Bildung von DNS-Addukten in T-Lymphozyten von Arbeitern (Vodicka et al., 1995). Das Risiko für das Auftreten von lymphatischen und hämatopoetischen Neoplasien oder adverser Effekte auf Leber, Niere, Immunsystem und zentrales und peripheres Nervensystem infolge einer beruflichen Styrolexposition war jedoch in verschiedenen retrospektiven Kohortenstudien nicht oder nur leicht erhöht (zusammengefasst in IARC, 1994a, 2002). Berufliche Expositionen gegen Styrol führten weder zu einer erhöhten Mortalität (Wong et al., 1994) noch zu einer Erhöhung von Spontanaborten oder Missbildungen (zusammengefasst in IARC, 2002).

1.3.5 Genotoxizität und Mutagenität

Ohne metabolische Aktivierung war Styrol in den meisten Bakterientests und bei *Drosophila melanogaster* nicht mutagen. In Anwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems jedoch wurden in einigen dieser Tests Genmutationen festgestellt (zusammengefasst in IARC, 1994a). In Säugetierzellen wurde *in vitro* die Induktion von DNS-Strangbrüchen, Chromosomen-Aberrationen sowie Schwester-Chromatid-Austausch zumeist mit, in wenigen Studien jedoch auch ohne metabolische Aktivierung beobachtet (zusammengefasst in IARC, 2002). Auch in menschlichen Lymphozyten konnte die Bildung von Mikronuclei und Schwester-Chromatid-Austausch durch Styrol nachgewiesen werden (zusammengefasst in IARC, 1994a, 2002).

In vivo zeigte sich bei Mäusen nach intraperitonealer Gabe von Styrol eine erhöhte Anzahl an DNS-Strangbrüchen in verschiedenen Organgeweben (zusammengefasst in IARC, 1994a, 2002). Bei Ratten hingegen wurden nach inhalativer Exposition weder Schwester-Chromatid-Austausch noch Chromosomen-Aberrationen noch die Bildung von Mikronuclei festgestellt (IARC, 1994a). Beim Menschen zeigte Styrol in der Mehrzahl der Studien keine genotoxische Wirkung. So wurden bei exponierten Arbeitern unabhängig von der Styrolkonzentration in 12 von 25 Studien Chromosomen-Aberrationen, in 6 von 16 Studien Schwester-Chromatid-Austausch und in 3 von 14 Studien die Bildung von Mikronuclei beobachtet (zusammengefasst in IARC, 2002).

Für den Metaboliten Styrol-7,8-oxid ist die genotoxische Wirkung *in vitro* und *in vivo* einschließlich der Auslösung von DNS-Strangbrüchen, Chromosomen-Aberrationen, Schwester-Chromatid-Austausch, und Mutationen eindeutig belegt (IARC, 1994b). Zudem bildete Styrol-7,8-oxid bei Mensch, Ratte und Maus O⁶- und N⁷-(Hydroxy-phenylethyl)Guanosin-Addukte mit der DNS (zusammengefasst in IARC, 1994b, 2002). Wegen der Bildung des genotoxischen und im Tierversuch krebserregenden

Metaboliten Styrol-7,8-oxid wurde Styrol von der IARC (1994a, 2002) als ein "potentielles Kanzerogen für den Menschen" (Gruppe 2b) klassifiziert.

1.3.6 Mechanismen der Kanzerogenität

Styrol ist ein Lungenkanzerogen bei der Maus, bei der Ratte hingegen gibt es keine belastbaren Hinweise für Kanzerogenität (siehe Abschnitt 1.3.4). Dieser Unterschied wird auf einen spezies-spezifischen Metabolismus von Styrol zurückgeführt, der mit einer allein in der Mauslunge gefundenen, Styrol-bedingten Induktion der Clarazellproliferation (Cruzan et al., 1997) einhergeht. Die ursprüngliche Vermutung, dass die Kanzerogenität in der Mauslunge allein auf der genotoxischen Wirkung des Metaboliten Styrol-7,8-oxid (vergleiche Abschnitt 1.3.5) beruht, wurde inzwischen widerlegt. So wiesen Boogaard et al. (2000b) mit Hilfe von radioaktiv markiertem Styrol nach, dass die N⁷-Guanin-Alkylierung der DNS durch Styrol-7,8-oxid in der Lunge von Mäusen und Ratten bei gleichen Expositionsbedingungen annähernd gleich und äußerst gering ist. Der Speziesunterschied in der Tumorigenität von Styrol lässt sich demnach nicht allein auf die Bildung von DNS-Addukten durch Styrol-7,8-oxid zurückführen. In einer weiteren Studie wurde durch Untersuchungen an ventilierten, perfundierten Lungen von Mäusen und Ratten gezeigt, dass bei gleichen Expositionsbedingungen (bis zu 410 ppm Styrol) die interne Belastung an Styrol-7,8-oxid bei Mäusen nur um den Faktor 2 höher ist als bei Ratten. Hieraus wurde geschlossen, dass die interne Belastung an Styrol-7,8-oxid allein nicht ausreiche, um die Entstehung von Lungentumoren bei der Maus durch Styrol zu erklären (Hofmann et al., 2006).

Nach Cruzan et al. (2009) ist die Lungenkanzerogenität von Styrol bei der Maus ausschließlich auf die durch CYP2F2 katalysierte Ringoxidation von Styrol in den Clarazellen zurückzuführen, durch die 4-VP entstehe. Dieses soll zu zytotoxischen Stoffen weitermetabolisiert werden; die resultierende Clarazelltoxizität soll regenerative Clarazellproliferation hervorrufen, die über Hyperplasie zu Adenomen und schließlich zu Karzinomen führt. Bei Ratte und Mensch soll die über CYP2F4 bzw. CYP2F1 erzielte 4-VP-Bildung in den Clarazellen der Lunge zu niedrig sein, um einen Styrol-bedingten zytotoxischen Effekt zu bewirken. Dieser Mechanismus wird allerdings durch folgende Untersuchungsergebnisse nicht gestützt. So zeigten Shen et al. (2010) an Lungenmikrosomen der Maus, dass die Ringoxidation von Styrol nicht nur über CYP2F2 sondern auch (sogar vorwiegend) über das Isoenzym CYP2E1 katalysiert wird. Weiterhin ist die Bildung von 4-VP über die Ringoxidation von Styrol bei Maus, Ratte und Mensch quantitativ nur von untergeordneter Bedeutung (siehe Abschnitt 1.3.3). Auch wurde anhand von inhaliertem radioaktiv markierten Styrol (160 ppm; 6 h) belegt, dass der Anteil der Ringoxidation am Metabolismus von Styrol bei der Maus nur 3 - 4 mal höher als bei der Ratte ist (Boogaard et al., 2000a). Somit ist es unwahrscheinlich, dass die nur bei der Maus gefundene, zu Lungentumoren führende Clarazellproliferation durch Styrol allein auf die durch Ringoxidation von Styrol entstandenen Metaboliten zurückzuführen ist.

Neuere Befunde deuten darauf hin, dass eine Styrol-induzierte Zellproliferation auch durch eine Störung der Glutathion (GSH)-Homöostase infolge massiver Schwankungen des GSH-Spiegels in Clarazellen während und nach einer Exposition gegen Styrol bedingt sein könnte (Filser et al., 2002; Hofmann et al., 2006). Solche Schwankungen können durch den Verbrauch von GSH bei der Konjugation mit Metaboliten sowie einer nachfolgenden, den Kontrollwert weit überschreitenden GSH-Neusynthese (erhöhter GSH-Rebound) entstehen. Aufgrund des Einflusses von GSH auf die Regulation des Zellzyklus könnten somit direkt intrazelluläre Signalwege betroffen sein und Zellproliferation ausgelöst werden. Indirekt könnte eine Absenkung des GSH-Spiegels durch Konjugation von GSH mit Metaboliten über den entstehenden oxidativen Stress zum Zelltod führen (Cotgreave und Gerdes, 1998; Dickinson et al., 2003), der wiederum eine regenerative Zellproliferation nach sich ziehen könnte. So haben Khan et al. (2009) bei Ratten gezeigt, dass eine massive GSH-Depletion, die durch GSH-Konjugation mit 1,2-Epoxipropan entstand, eine Zunahme der Zellproliferation im olfaktorischen Epithel verursachte. Für Styrol ist eine signifikante Abnahme der GSH-Konzentration im Lungenhomogenat von Mäusen ab Konzentrationen von bereits 80 ppm Styrol (6 h/Tag; 2 Tage) belegt; im Homogenat von Rattenlungen trat eine Absenkung des GSH-Spiegels erst ab etwa 300 ppm auf (Filser et al., 2002). Wenn ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Styrol-bedingten Störung der GSH-Homöostase und der Induktion der Zellproliferation besteht, sind mögliche Änderungen der GSH-Konzentration bei der Maus besonders in denjenigen Bereichen der Lunge zu erwarten, in denen Clarazellen gehäuft vorkommen (Pack et al., 1981) und in denen die Styrol-induzierten Lungentumoren beobachtet wurden (Cruzan et al., 2001).

1.4 Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid, das sich aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamin zusammensetzt (Abbildung 4). Es hat ein Molekulargewicht von 307,32 g/mol und ist mit 100 g/l (20°C) sehr gut wasserlöslich (Merck, 2008). Unter Einwirkung von Sauerstoff oxidiert GSH leicht nicht-enzymatisch zu seinem Disulfid (GSSG; Kamencic et al., 2000).



γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycin



1.4.1 Funktion und Homöostase

Im Organismus ist GSH ubiquitär verteilt. In der Zelle dient es als Substrat für GSTs und Glutathionperoxidasen (Meister, 1988). GSH spielt eine große Rolle als Antioxidanz und bei der Entgiftung von freien Radikalen, Peroxiden und Elektrophilen während des Metabolismus endogener und exogener Stoffe (Meister und Anderson, 1983). Zelluläres GSH ist wegen des GSH/GSSG-Redoxpotentials von -260 mV (Kirlin et al., 1999) wichtig für die Aufrechterhaltung des Redoxstatus der Zelle (Dickinson et al., 2003). Dieser bestimmt beispielsweise die Ausbildung der Tertiärstruktur von Proteinen und kann bei redoxsensitiven Proteinen "funktionale Änderungen" bewirken, durch die verschiedene Signalwege einer Zelle beeinflusst werden können (Redoxsignalling; Dickinson et al., 2003). Dadurch ist GSH u.a. an der Regulation der Genexpression und des Zellzyklus beteiligt (zusammengefasst in Cotgreave und Gerdes, 1998). Außerdem wird GSH für die mitochondriale Integrität benötigt (Martensson et al., 1989). Vaskuläres GSH fungiert als Speicher- und Transportform von Cystein innerhalb und zwischen den Organen (Meister, 1988).

Die Biosynthese von GSH erfolgt durch zwei ATP-abhängige Proteine (Dickinson et al., 2003; Meister, 1988). Im ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird Glutamin an Cystein durch die γ-Glutamylcysteinligase konjugiert. In der zweiten, durch die Glutathionsynthetase katalysierten Reaktion entsteht das Tripeptid durch Addition von Glycin an γ-Glutamylcystein (Meister, 1988). Die Regulation der GSH-Biosynthese erfolgt u.a. durch einen negativen Feedback-Mechanismus (Meister, 1988), bei dem eine hohe intrazelluläre GSH-Konzentration die Neusynthese von GSH durch kompetitive Hemmung der γ-Glutamylcysteinligase inhibiert (Meister, 1988; Tian et al., 1997). Unter Einwirkung von oxidativem Stress kann die GSH- Neusyntheserate durch Erhöhung der Expression der γ-Glutamylcysteinligase deutlich gesteigert werden (Tian et al., 1997).

Im Allgemeinen liegt Glutathion im Organismus in Konzentrationen von 0,1 bis 10 mmol/l vor, wobei der Anteil von GSSG weniger als 1% der Gesamtkonzentration an GSH und GSSG beträgt (Meister, 1988). Der GSH-Gehalt einzelner Organe unterscheidet sich stark. Besonders reich an GSH ist die Leber, die bei der Maus einen tageszeitabhängigen Gehalt zwischen 42 und 62 nmol GSH/mg Protein (Jaeschke und Wendel, 1985) bzw. durchschnittlich etwa 8,3 µmol GSH/g Frischgewicht (Martensson et al., 1989) besitzt. Der GSH-Gehalt in der Mauslunge beträgt etwa 18 nmol GSH/mg Protein (Jaeschke und Wendel, 1986) bzw. 1,7 µmol GSH/g Frischgewicht (Martensson et al., 1989) und unterliegt im Gegensatz zur Leber keinen diurnalen Schwankungen (Jaeschke und Wendel, 1985). Hohe GSH-Gehalte finden sich bei der Maus auch in den Nieren mit 17 nmol GSH/mg Protein und in der Milz mit 21 nmol GSH/mg Protein (Jaeschke und Wendel, 1986). Die GSH-Konzentration im Blutplasma der Maus wird mit 58 µmol/l (Martensson et al., 1989) und im Bronchialsekret mit etwa 510 µmol/l (Velsor et al., 2001) angegeben.

Innerhalb der Zelle befindet sich im Allgemeinen etwa 85% des GSH im Cytoplasma, der Rest in Zellkern und Mitochondrien (Green et al., 2006). Dies entspricht Gehalten von etwa 20 nmol GSH/mg cytoplasmatisches Protein, 8,2 nmol GSH/mg nukleäres Protein und 14 nmol GSH/mg mitochondriales Protein (Mausfibroblasten; Green et al., 2006). Für Clarazellen der Maus wurde jedoch gezeigt, dass die GSH-Konzentration in den Mitochondrien am höchsten ist, gefolgt von Cytoplasma und Zellkern (West et al., 2000b).

Infolge einer Exposition gegen Fremdstoffe kann es zu erniedrigten GSH-Konzentrationen in der Zelle kommen, wenn vermehrt reaktive Stoffwechselintermediate in der GST-katalysierten Reaktion mit GSH konjugiert werden (McKenna et al., 1977). So wurde bei Mäusen eine Abnahme der pulmonären GSH-Konzentration beispielsweise durch Ethylbenzol (Saghir et al., 2009), Brombenzol (Fakjian und Buckpitt, 1984), Dichlormethan (Foster et al., 1992), 1,1-Dichlorethen (Forkert und Moussa, 1993; Moussa und Forkert, 1992), Trichlorethen (Forkert und Forkert, 1994), Styrol (Filser et al., 2002), Naphthalin (Chichester et al., 1994; Plopper et al., 2001), 1-Nitronaphthalin (Watt und Buckpitt, 2000) und 1,3-Butadien (Himmelstein et al., 1995) demonstriert. In der Mauslunge kann die Abnahme von GSH kurzzeitig durch Aufnahme und Neusynthese von bis zu 200 nmol GSH/min aus dem in der Leber synthetisierten vaskulären GSH vermindert werden (Martensson et al., 1989). Infolge einer GSH-Depletion kann es durch die erhöhte Expression der y-Glutamylcysteinligase und der dadurch verstärkten GSH-Neusynthese vorübergehend zu einer im Vergleich zum Kontrollwert erhöhten GSH-Konzentration kommen (z.B. Tian et al., 1997).

1.4.2 Folgen einer Störung der Glutathion-Homöostase

Unter dem Begriff Homöostase versteht man allgemein die Konstanthaltung des inneren Milieus einer Zelle. Das Ausmaß einer Auslenkung der GSH-Homöostase vom Normalzustand hängt grundsätzlich von der ursprünglichen, physiologischen GSH-Konzentration, von Änderungen der GSH-Biosyntheserate und dem metabolisch bedingten GSH-Verbrauch ab (Potter und Tran, 1993). Bei einer Änderung der intrazellulären GSH-Konzentration bleibt die GSSG-Konzentration annähernd konstant (Dickinson et al., 2003). Dadurch verändert sich das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion und damit der Redoxstatus der Zelle. Dies kann die Funktionalität von redoxsensitiven Proteinen beeinflussen (Dickinson et al., 2003). So wurde gezeigt, dass beispielsweise die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie Activator Protein-1 (AP-1) und Nuclear Factor κB (NF κB) an die DNS, und hierüber auch die Genexpression, insbesondere der γ -Glutamylcysteinligase, vom GSH-Redoxstatus der Zelle abhängig ist (zusammengefasst in Cotgreave und Gerdes, 1998). Dadurch können sich Veränderungen der GSH-Homöostase letztlich auch auf die Regulation verschiedenster zellulärer Signalwege, die beispielsweise zu Apoptose oder Zellproliferation führen, auswirken (Zusammenfassungen in Aw, 2003; Cotgreave und Gerdes, 1998).

Eine Verringerung der intrazellulären GSH-Konzentration infolge von Fremdstoffexpositionen kann erhöhten oxidativen Stress zur Folge haben (Slater et al., 1995), der mit einer Störung der Calcium-Homoöstase, gesteigerter Lipidperoxidation sowie verstärkter Sensitivität der Zelle, z.B. gegenüber Strahlung oder Hyperoxie, einhergehen kann (Zusammenfassungen in Slater et al., 1995; Rahman und MacNee, 2000). Zudem kommt es zu vermehrter Bindung von reaktiven Metaboliten an zelluläre Makromoleküle (z.B. McKenna et al., 1977). Als Folge treten häufiger Zellschädigungen auf, die letztlich zum Untergang der Zelle durch Apoptose oder Nekrose führen können (Sweeney et al., 2009). Auch an isolierten, gegen Naphthalin exponierten Clarazellen wurden erhöhte Proteinalkylierungen und Zellschädigungen nach der Depletion des intrazellulären GSH demonstriert (Phimister et al., 2004). Nach Cruzan et al. (2009) könnte sich der Fremdstoff-induzierten Zytotoxizität eine regenerative Proliferation verbliebener Zellen anschließen.

Eine Erhöhung der intrazellulären GSH-Konzentration kann hingegen mit einer Toleranz gegenüber Zellschädigungen, die durch Fremdstoffe verursacht werden können, verbunden sein (Dickinson et al., 2003; West et al., 2000a). Zudem können erhöhte ebenso wie erniedrigte GSH-Gehalte Änderungen in der Signaltransduktion bewirken mit der Folge einer veränderten Genexpression, die in einer erhöhten Zellproliferation resultieren kann (Aw, 2003; Shaw und Chou, 1986). Eine Induktion der Zellproliferation steigert nicht nur das Risiko für die Manifestation genetischer Vorschäden in Zellen (Witschi, 1990) sondern auch das Risiko der Vermehrung bereits mutierter Zellen und hat damit einen tumorpromovierenden Effekt (Deml und Oesterle, 1996). Somit kann eine Störung der GSH-Homöostase, wie sie durch wiederholte Fremdstoffexpositionen entstehen kann, letztlich tumorigen wirken.

1.4.3 Methoden zur Glutathion-Bestimmung

Für Untersuchungen zum GSH-Gehalt wird im Allgemeinen Gewebehomogenat verwendet. Eine der gängigsten biochemischen Methoden zur Ermittlung von GSH (Ellman-Test) beruht auf der Bestimmung von wasserlöslichen Nicht-Proteinthiolen (NPSH) mittels der 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB, Ellman-Reagenz). Hierbei wird DTNB durch Reaktion mit NPSH zur freien 2-Nitro-5-Thiobenzoesäure (NTB) und einem gemischten Disulfid, bestehend aus einem NPS- und einem NTB-Rest (NPS–SNTB), umgesetzt (vergleiche mit Gleichung 1; Ellman, 1959). Die freie NTB wird photometrisch nachgewiesen. Da GSH mit mehr als 90% den weitaus überwiegenden Anteil an den löslichen Nicht-Proteinthiolen darstellt (z.B. Potter und Tran, 1993), lässt sich mit diesem einfachen Verfahren der GSH-Gehalt im Gewebehomogenat recht genau ermitteln. Ein spezifischeres Verfahren zur Bestimmung von GSH ist der sogenannte GSH-Recycling-Test (Tietze, 1969). Es handelt sich hierbei um einen kinetischen Test, bei dem ebenfalls NTB aus der Reaktion von GSH mit DTNB entsteht (Gleichung 1). Im Unterschied zum Ellman-Test wird jedoch das hierbei ebenfalls gebildete GS-SNTB in einem zweiten Schritt durch die Glutathion-Reduktase (GR) unter NADPH-Verbrauch zu NTB und GSH gespalten (Gleichung 2; Grassetti und Murray, 1967).

(2)
$$GS-SNTB \xrightarrow{} GSH + NTB$$

Durch Oxidation von GSH zu GSSG wird NADPH zurückgewonnen (Gleichung 3). Nach der NADPH-abhängigen, durch die GR vermittelten Reduktion von GSSG (Gleichung 4), reagiert das wiedergewonnene GSH erneut mit DTNB (Gleichung 1).



Die Bestimmung von GSH erfolgt photometrisch entweder durch Messung des NADPH-Verbrauchs oder der NTB-Bildung. Die jeweilige Geschwindigkeit ist proportional zur eingesetzten Konzentration an Gesamtglutathion, d.h. der Summe aus GSH und GSSG. Dennoch ist der GSH-Recycling-Test für die Bestimmung von GSH dem Ellman-Test überlegen, weil die fortlaufende Reaktion von der GSH-spezifischen GR abhängig (Tietze, 1969) und die Menge an mitbestimmtem GSSG in den Geweben (Meister, 1988) äußerst gering ist. In der Mauslunge liegt der GSSG-Gehalt bei weniger als 5% des Gesamtglutathion-Gehalts (Day et al., 2004; Park et al., 2001). Weitere gängige Verfahren zur Bestimmung von GSH im Homogenat basieren auf der elektrochemischen Detektion von GSH nach hochdruck-flüssigkeitschromatographischer (HPLC) Auftrennung (Lakritz et al., 1997; Yap et al., 2010) oder der fluorometrischen Bestimmung mittels Fluoreszenzfarbstoffen wie Monochlorbiman (MCB; z.B. Kamencic et al., 2000), das an GSH konjugiert wird.

Bei der Verwendung eines Gewebehomogenats sind jedoch keine Informationen über den GSH-Gehalt einzelner Zellen oder spezifischer Organbereiche ableitbar (West et al., 2000b). Um dennoch GSH in spezifischen Lungenarealen, wie dem Bronchialepithel, bestimmen zu können, wurden bisher histologische Schnitte der Lunge verwendet, bei denen GSH mit SH-reaktiven Farbstoffen (z.B. "Mercury Orange" (Chlor[p-[(2-Hydroxy-1-Naphthyl)azo]phenyl]Quecksilber; Asghar et al., 1975); "Mersalvl" (2-(3-Hydroxymercurio-2-Methoxypropylcarbamoyl)Phenoxyessigsäure; Sippel, 1978); N-(7-Dimethylamino-4-Methylcoumarinyl)Maleimid (DACM; Ogawa und Taneda, 1979)) detektiert wurde. Aufgrund ihrer geringen Spezifität gegenüber GSH ist bei der Verwendung dieser Farbstoffe jedoch allenfalls eine semiquantitative Bestimmung von GSH möglich (Chieco und Boor, 1983; Hedley und Chow, 1994). Auch Untersuchungen mit Antikörpern (z.B. Kaufmann et al., 2005) eignen sich nicht zur GSH-Quantifizierung, da neben freiem GSH auch proteingebundenes Glutathion (S-Glutathionylierung) mitbestimmt wird (Söderdahl et al., 2003). Die bisher einzige Methode zur guantitativen Bestimmung von GSH in einzelnen Bereichen der Lunge erfordert die Präparation einzelner Atemwege aus dem Lungengewebe (Mikrodissektion; Plopper et al., 1991). Diese Methode ist sehr aufwendig und zeitintensiv. Außerdem ist unklar, ob und inwieweit sich der GSH-Gehalt der Zellen im Laufe der Präparation durch Oxidation oder durch bereits einsetzende Rebound-Effekte nach einer Fremdstoffexposition verändert. Um GSH in einzelnen Lungenregionen verlässlich quantifizieren zu können, war deshalb die Entwicklung einer neuen Methode erforderlich.

1.5 Ziele der Arbeit

Wie einleitend dargelegt, wurden im Homogenat von Mauslungen Styrol-bedingte Abnahmen des GSH-Gehalts gefunden. Ob und inwieweit sich dieser Befund tatsächlich mit der in einzelnen Atemwegen beobachteten Induktion der Zellproliferation durch Styrol verknüpfen lässt, ist noch unklar. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, in der Lunge die Veränderungen des GSH-Spiegels im Verlauf einer dreitägigen Exposition gegen Styrol zu bestimmen und in verschiedenen Segmenten des Bronchialepithels, insbesondere den terminalen Bronchioli, den GSH-Status zusammen mit der Zellproliferation zu untersuchen.

Um dieses Ziel zu erreichen, sollte zunächst ein neues, sensitives Verfahren entwickelt werden, das es erlaubte, unmittelbar zu Expositionsende GSH sowohl in der Gesamtlunge als auch, zusammen mit der Zellproliferation, im Bronchialepithel schnell und quantitativ zu bestimmen. Nach der Validierung sollte es bei männlichen Mäusen angewandt werden, die drei Tage lang täglich sechs Stunden gegen Styrolkonzentrationen von 40 und 160 ppm zu exponieren waren. Diese Konzentrationen wurden ausgewählt, da die niedrige der Schwellenkonzentration für Lungentumoren bei der männlichen Maus und die hohe der höchsten eingesetzten Konzentration in einer Langzeit-Inhalationsstudie mit Styrol-exponierten Mäusen entsprach (Cruzan et al., 2001). Anhand der zu erhaltenden Daten sollte der Mechanismus der Styrolbedingten Kanzerogenität in der Mauslunge diskutiert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien und Laborwaren

Geräte

Gaschromatograph GC-8A ausgestattet mit	Shimadzu, Duisburg
Dosierschleife, 1,0 ml	
Flammenionisationsdetektor	
Integrator C-R5A Chromatopac	Shimadzu, Duisburg
Stahlsäule, Tenax TA, rostfrei, 1,8"	Varian, Darmstadt
60 - 80 mesh, 1,5 m x 2 mm	
Lichtmikroskop Axioplan ausgestattet mit	Zeiss, Göttingen
uEye [®] USB 2.0 Kamera	SDT Dr. Steiner, Seefeld
Lichtmikroskop Axioplan II ausgestattet mit	Zeiss, Göttingen
Monochromator	TILL Photonics, Gräfelfingen
dichroischem Spiegel 400 DCLP	AHF Analysentechnik, Tübingen
Emitter-Bandpassfilter 510/40 nm	AHF Analysentechnik, Tübingen
Microplate Reader Synergy 2 ausgestattet mit	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
Absorptionsfilter 360/40 nm	
Emissionsfilter 485/20 nm	
Mikrotom HM 500 M	Microm, Walldorf
NexES IHC-Immunostainer	Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA
Photometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Spektrometer UVIKON 941 Plus	Kontron Instruments, Neufarn
Ultraschalldesintegrator UP200S	Hielscher, Teltow
Ultraturrax Ika T5 FU	Kremer & Kreiler, München
Ultrazentrifuge Optima L-70	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Sigma 4K10	Sigma, Osterode

Chemikalien und Lösungen

"Antibody-Diluent"	Dako, Glostrup, Dänemark
Atemkalk Drägersorb 800 Plus	Dräger Medical AG, Lübeck
Bio-Rad Protein-Assay Farbkonzentrat	Bio-Rad, München
5-Bromdesoxyuridin ≥99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Buthioninsulfoximin ≥97%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylmaleat ≥97%	Fluka, Steinheim
Discovery MoMap Kit	Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA
5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure ≥98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eindeckmittel Pertex [®]	Medite, Burgdorf
Eosin-Y ≥99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutathion, oxidiert (GSSG) ≥98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutathion, reduziert (GSH) ≥99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion-Reduktase, 5 mg/ml Emulsion	Böhringer, Mannheim
iView DAB Detection Kit	Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA
Mayer's Hämatoxylinlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mercury Orange ≥97%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Monochlorbiman ≥95%	Fluka, Steinheim
Monoklonaler "Maus anti-BrdU"-Antikörper	Dako, Glostrup, Dänemark
(Klon Bu20a)	
N-Acetylcystein ≥99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Pentobarbital [®]	Phagro Bundesverband, Berlin
Styrol ≥99%	Sigma-Aldrich, Steinheim

Alle anderen Chemikalien wurden mit höchstem kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet und von Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Riedelde Häen (Seelze) bezogen. Zur Herstellung von stickstoffgesättigter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung, pH 7,4, (N₂PBS) wurden 8,006 g Natriumchlorid, 0,202 g Kaliumchlorid, 2,326 g Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat und 0,204 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1 l doppelt-destilliertem Wasser gelöst. Die eisgekühlte Lösung wurde im Ultraschallbad für 3 min entgast, anschließend für 10 min mit Stickstoff begast und maximal zwei Wochen bei +4℃ gelagert.

MCB wurde in einer Konzentration von 5 mmol/l in N₂PBS gelöst, sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 μ m) und bei +4°C im Dunkeln bis zu 3 Wochen gelagert.

Sonstige Laborwaren

Einwegkanülen, steril, 26 G x ½"	B. Braun, Melsungen
Einwegküvetten, 1,5 ml, Dicke 1,0 cm	Brand, Wertheim
Einwegspritzen, Omnifix [®] , 1 ml	B. Braun, Melsungen
Einwegsterilfilter, Minisart [®] , 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Expositionskugel, Glas, ca. 63 l	Kuglstatter, Garching
Exsikkator, Glas, 6,5 l	Glaswerk Wertheim, Wertheim
Gittereinsatz für Glaskugel	Helmholtz Zentrum München, Neuherberg
Glasfaserfilter, Ø 21 mm	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Homogenisator S, Glas, 2 ml	B. Braun, Melsungen
Mikrotomstempel	Helmholtz Zentrum München, Neuherberg
Mikrowellplatten Nunc, 96 "Wells", schwarz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Objektträger, Superfrost-Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Proteinstandard-Set, Rinderserumalbumin in	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchloridlösung	
Septen, teflonbeschichtet, Gummi, Ø 12,5 mm	SGE, Griesheim
Spritzen, Unimetrics 5, 10, 25 und 100 µl	Macherey & Nagel, Düren
Stahlkanülen, 1,0 x 200 mm und 1,0 x 300 mm	Unimed Neolab, Heidelberg

2.2 Behandlungen und Expositionen der Tiere

Für die Experimente wurden männliche B6C3F1-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) verwendet, die zu Beginn des jeweiligen Experiments ein Körpergewicht zwischen 21 und 29 g besaßen. Die Tiere konnten sich vor jedem Experiment mindestens fünf Tage akklimatisieren. Jeweils fünf Mäuse wurden in einem Macrolon-Stahlkäfig in einem Top flow-IVC-System (Tecniplast, Buggugiate, Italien) bei 55 - 65% relativer Luftfeuchtigkeit und 22 ± 2°C Raumtemperatur sowie einem 12 : 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Alle Tiere erhielten bis auf den Zeitraum der Expositionen Standarddiät (Nr. 1324, Altromin, Lage) und Leitungswasser *ad libitum*. Für die einzelnen Versuche wurden die Mäuse zufällig den Versuchsgruppen zugeordnet. Zu Beginn jedes Versuchstages wurde das Körpergewicht bestimmt.

2.2.1 Behandlungen mit L-Buthioninsulfoximin und Diethylmaleat

Zur systemischen GSH-Depletion wurden den Mäusen die zwei Substanzen L-Buthioninsulfoximin (BSO) und Diethylmaleat (DEM) (Abbildung 5) in Kombination verabreicht. BSO hemmt selektiv und irreversibel die γ-Glutamylcysteinligase und verhindert dadurch die Neusynthese von GSH (Griffith und Meister, 1979). Die Wirkung von DEM beruht auf den Verbrauch an GSH infolge der GST-katalysierten Konjugation von DEM und GSH im Cytosol (Gerard-Monnier et al., 1992).



Abbildung 5: Strukturformeln von L-Buthioninsulfoximin und Diethylmaleat.
BSO (0,4 mol/l in 0,9% steriler Kochsalzlösung) wurde den Mäusen jeweils 19 h vor der Lungeninflation mit einer Dosis von 890 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Für die Untersuchungen, bei denen der restliche GSH-Gehalt nach GSH-Depletion mit verschiedenen Testmethoden ermittelt wurde, erhielten die Tiere zusätzlich 3 h vor der Lungeninflation die gleiche Dosis BSO. Die Gabe von DEM (0,5 mol/l in Olivenöl) erfolgte jeweils 2,5 h vor der Lungeninflation intraperitoneal mit einer Dosis von 1 g/kg Körpergewicht.

2.2.2 Behandlungen mit Bromdesoxyuridin

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde das Thymidin-Analog 5-Bromdesoxyuridin (BrdU) verwendet. Nach intraperitonealer Applikation wird BrdU systemisch im Körper verteilt, von den Zellen resorbiert und bei der DNS-Replikation anstelle von Thymidin in die DNS eingebaut. Anschließend können Zellen, die diese Veränderung tragen, in Gewebeschnitten immunhistochemisch nachgewiesen werden (Leuner et al., 2009; siehe Abschnitt 2.6).

BrdU (10 mmol/l in 0,9% isotoner Kochsalzlösung) wurde den Kontrollen und den exponierten Mäusen an jedem Styrol-Expositionstag jeweils 10 min vor Expositionsbeginn und - mit Ausnahme der jeweils letzten Expositionsperiode - unmittelbar nach der Beendigung der Expositionen mit einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht.

2.2.3 Expositionen gegen Styrol

Die Mäuse wurden in einem geschlossenen Expositionssystem gegen konstante Styrolkonzentrationen in der Einatemluft von 40 bzw. 160 ppm Styrol bis zu 6 h/Tag und bis zu 3 Tage exponiert. Dazu wurden insgesamt 46 Tiere pro Expositionskonzentration exponiert. Zehn nicht-exponierte Tiere dienten als Kontrolltiere.

Expositionsaufbau

Die Expositionsversuche wurden nach einer Methode von Filser (1992) durchgeführt. Die Expositionen erfolgten bei Raumtemperatur in einer gasdicht verschlossenen Glaskugel (63 l) mit 8 cm langem Glashals (Innendurchmesser: 15 cm) und Glasdeckel mit drei Anschlüssen (Abbildung 6). Zwei Anschlüsse waren mit teflonbeschichteten Gummisepten verschlossen und dienten der Gasprobenentnahme bzw. der Zugabe von flüssigem Styrol. Über den dritten Anschluss wurde Sauerstoff der Atmosphäre über ein passives Partialdruck-System zugeführt. Zur Bindung von Kohlendioxid wurden 10 g Atemkalk pro Maus in einer Schale unter einem Gitter aus Polypropylen angebracht. Mit Hilfe eines Magnetrührers wurde die gleichmäßige Verteilung von Styrol in der Expositionskammer sichergestellt (Abbildung 6).



Abbildung 6: Versuchsaufbau für die Exposition gegen Styrol. Die Sauerstoffzufuhr erfolgte über ein passives System. Atemkalk diente zur Bindung von Kohlendioxid. Die Applikation von Styrol und die Gasprobenentnahme erfolgten über ein Gummiseptum.

Einstellung und Konstanthaltung der Expositionskonzentration

Die gewünschten Styrolkonzentrationen von 40 bzw. 160 ppm wurden durch Injektion von etwa 10 µl (40 ppm) bzw. 40 µl (160 ppm) flüssigem Styrol in die Expositionskammer eingestellt (siehe Abschnitt 2.7.1). In Zeitabständen von 3 - 10 min wurden Gasproben (3 ml) durch das Septum mit Hilfe einer 5 ml-Einwegspritze, die über eine 30 cm lange Stahlkanüle verfügte, aus der Mitte der Expositionskugel entnommen und die Styrolkonzentration gaschromatographisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.1). Da inhaliertes Styrol von den Tieren metabolisiert wird, wurde zur Aufrechterhaltung der gewünschten Konzentration in der Atmosphäre bei Bedarf flüssiges Styrol nachdosiert. Abbildung 7 zeigt typische Konzentrations-Zeitverläufe von Styrol in der Gasphase jeweils bei einer 6-stündigen Exposition gegen 40 und 160 ppm.



Abbildung 7: Konzentrations-Zeitverlauf von Styrol während 6-stündigen Expositionen von 2 Mäusen (40 ppm) bzw. 11 B6C3F1-Mäusen (160 ppm) in einem geschlossenen Expositionssystem (63 l) bei Zielkonzentrationen von 40 ppm (rot) bzw. 160 ppm Styrol (schwarz). Die Pfeile geben die jeweiligen Zeitpunkte der Zugabe von flüssigem Styrol in die Expositionskugel an.

Für jede Expositionsperiode wurde die zeitgewichtete mittlere Expositionskonzentration von Styrol (Gleichung 5) und deren Standardabweichung (Gleichung 6) nach Sachs (1998) berechnet.

(5)
$$\overline{C}_{ZG} = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^{N-1} \left[\left(\frac{C_i + C_{i+1}}{2} \right)^* (t_{i+1} - t_i) \right]$$

C_{ZG} zeitgewichtete mittlere Konzentration von Styrol [ppm]

C_i gemessene Konzentration von Styrol zum Zeitpunkt i [ppm]

t_i Zeitpunkt i der Probenentnahme [h]

T Gesamtzeit der Expositionsperiode [h]

N Gesamtzahl der Messungen

(6)
$$SD_{ZG} = \sqrt{\left[\sum_{i=1}^{N-1} \left(\frac{C_i + C_{i+1}}{2} - \overline{C}_{ZG}\right)^2 * \frac{t_{i+1} - t_i}{T}\right]}$$

SD_{ZG} zeitgewichtete Standardabweichung der mittleren Konzentration [ppm]

Aus den täglichen zeitgewichteten Expositionskonzentrationen von Styrol ergaben sich für je eine Gesamtexpositionszeit von 6 Versuchstagen bei Ziel-Konzentrationen von 40 bzw. 160 ppm mittlere zeitgewichtete Expositionskonzentrationen von $39,5 \pm 2,6$ ppm bzw. $157,3 \pm 11,1$ ppm. Während keiner Expositionsperiode wich die zeitgewichtete mittlere Styrol-Expositionskonzentration um mehr als 10% von der Ziel-Konzentration ab.

2.3 *In-situ*-Inflation der Mauslunge mit Monochlorbiman und Gewebeaufbereitung

Die im Folgenden (Abschnitte 2.3 - 2.5) beschriebenen Verfahren mit dem Ziel der *In-situ*-Bestimmung von GSH in der Mauslunge wurden in der vorliegenden Arbeit neu entwickelt, da bisher keine validen Methoden vorlagen.

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Natrium-Pentobarbital (25 mg/ml in destilliertem Wasser) mit einer Dosis von 220 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Nach dem Verlust der Schmerzempfindlichkeit nach ungefähr 3 min wurde das Fell im Bauch- und Halsbereich entfernt und die Trachea vom umgebenden Muskelgewebe freipräpariert. Anschließend wurde das Zwerchfell von der Bauchseite her durchschnitten, ohne den Brustkorb zu öffnen. Über einen Einschnitt wurde ein teflonbeschichteter Inflationsschlauch (Innendurchmesser: 2,0 mm) mit einer aufgesetzten 10 µl-Pipettenspitze in die Trachea eingeführt und die Spitze mittels Garn in der Trachea fixiert (Abbildung 8). Anschließend wurde die Mauslunge mit dem Druck einer 25 cm hohen Wassersäule mit MCB-Lösung (2,25 mmol/l in N₂PBS) aus einem Vorratsgefäß (5 ml-Einwegspritze) für 20 min inflatiert. Danach wurde der Inflationsschlauch mitsamt der Pipettenspitze entfernt und die Trachea mit Garn verschlossen. Der Brustkorb wurde eröffnet und die Lunge zusammen mit dem Herzen entnommen (Abbildung 8). Nach dem Abtrennen des Herzens wurden die einzelnen Lungenlappen freipräpariert. Für den gesamten Vorgang nach der Injektion des Narkotikums wurde eine Präparationszeit von etwa 35 min benötigt.



Abbildung 8: Links: Inflation der Mauslunge in situ über die Trachea. Rechts: Entnahme der inflatierten Lunge.

Der kaudale Lungenlappen des rechten Lungenflügels wurde sofort nach Abtrennen von der Lunge in einem gewogenen Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren, das Gewicht bestimmt und anschließend bis zur Herstellung des Lungenhomogenats (Abschnitt 2.3.1) bei -80°C gelagert. Kr anialer und mittlerer rechter Lungenlappen wurden zur Herstellung von Cytosol (Abschnitt 2.3.2) verwendet. Der linke Lungenlappen wurde auf einem Mikrotomstempel, der mit einem feuchten Glasfaserfilter belegt war, so ausgerichtet, dass die ventrale Lungenseite flach dem Stempel anlag und sich die dorsale Seite wölbte. Nach dem Schockgefrieren für 2 min in 2-Methylbutan bei -70°C wurde der Lungenflügel mits amt Stempel zuerst mit einer Polyethylenfolie und diese dann mit Aluminiumfolie umwickelt. Die verpackte Lungenprobe wurde für die Herstellung von Gefrierschnitten (Abschnitt 2.3.3) mindestens 12 h bei -21°C gelagert.

2.3.1 Herstellung von Homogenat

Zum kaudalen Lungenlappen wurde soviel eisgekühlter N₂PBS gegeben, dass der Gewichtsanteil des inflatierten Gewebes letztlich 10% betrug. Mit Hilfe eines Ultraturrax wurde dieses homogenisiert und zweimal für jeweils 1 sec mit einem Ultraschalldesintegrator nachbehandelt. Anschließend wurde das Homogenat 1 : 2 mit N₂PBS verdünnt und in Aliquots zu je 250 µl bei -80°C bis zur GSH- und Proteinbestimmung gelagert.

2.3.2 Herstellung von Cytosol

Sofort nach der Entnahme der inflatierten Lunge wurden der kraniale und der mittlere rechte Lungenlappen zu 1 ml eisgekühltem N₂PBS in einem 2 ml-Glashomogenisator gegeben und das Gewicht der Lungenflügel bestimmt. Mit einem Glaspistill wurde das Gewebe homogenisiert. Anschließend wurde ein Anteil des Homogenats (600 µl) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 1 h lang bei 100000 g und +4°C

zentrifugiert. Der Überstand (500 μl) wurde in zwei Aliquots von 250 μl bei -80°C bis zur GSH- und Proteinbestimmung gelagert.

2.3.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Mit Hilfe des auf -20℃ gekühlten Mikrotoms wurden Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 10 µm hergestellt. Hierzu wurde der gefrorene linke Lungenflügel in der Frontalebene geschnitten. Für die Untersuchungen wurden nur Serienschnitte der Schnittebenen zwischen Nummer 190 und 230 verwendet, da diese, wie in Voruntersuchungen ermittelt worden war, alle vier relevanten Atemwegssegmente enthielten (vergleiche Abbildung 2). Auf einem kodierten Glasobjektträger wurde jeweils nur ein Gefrierschnitt in Längsausrichtung aufgenommen. Nach Trocknung bei Raumtemperatur für 5 min wurden die Objektträger mit Aluminiumfolie umwickelt und bei -21℃ gelagert.

2.4 Fluorometrische Bestimmung von Glutathion im Homogenat und Cytosol der Mauslunge

Die Homogenat- und Cytosolproben der Mauslungen (siehe Abschnitte 2.3.1 und 2.3.2) wurden auf Eis aufgetaut. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden zu jeweils 50 µl Homogenat oder Cytosol 150 µl Acetonitril zugegeben und gründlich gemischt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur 3 min lang zentrifugiert (16500 g). Nach Zugabe von 400 µl N₂PBS zu 100 µl des Überstandes wurden 200 µl der erhaltenen Lösung in ein Well einer Mikrowellplatte überführt. Dann wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Microplate Readers mit 360/40 nm-Absorptions- und 485/20 nm-Emissions-filtern im Licht einer Quecksilberlampe mit den Einstellungen "Endpunktmessung" und Detektorposition "Top 400 nm" bei einer Empfindlichkeit von 65 Einheiten gemessen. Die GSH-Bestimmungen erfolgten jeweils in Triplikaten. Als Leerwerte dienten MCB-Lösungen von 0,113 mmol/l (Homogenat) bzw. 0,225 mmol/l (Cytosol).

Diese Konzentrationen entsprachen den jeweiligen Verdünnungen, die aus der Aufarbeitung der ursprünglich eingesetzten Inflationslösung mit einer MCB-Konzentration von 2,25 mmol/I resultierten. Die Kalibrierung erfolgte anhand von frischen, *in vitro* hergestellten Lösungen von MCB-GSH-Konjugat (siehe unten). Zu jeweils 50 µI der MCB-GSH-Kalibrierungslösungen und der entsprechenden Leerwerte wurden, wie oben beschrieben, 150 µI Acetonitril zugegeben, zentrifugiert und die Fluoreszenz in Duplikatmessungen bestimmt. Nach Berücksichtigung der Leerwerte wurden die GSH-Konzentrationen im Homogenat und dem Cytosol der Lungen über Steigung und Achsenabschnitt der Kalibriergeraden ermittelt.

In-vitro-Konjugation von Monochlorobiman und Glutathion

Für die Bildung des MCB-GSH-Konjugats wurden 105 μl einer GSH-Lösung (Konzentrationen: 0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 und 400 μmol GSH/l in N₂PBS) mit 105 μl einer um das jeweils 2,25fach höher konzentrierten MCB-Lösung gemischt. Danach wurden zu jedem Ansatz 3 μl eines GSH-depletierten Cytosols, das aus einer Rattenleber gewonnen war (siehe unten), zugegeben. In der Rattenleber nehmen GSTs einen Anteil von bis zu 10% der löslichen Proteine ein (Meister, 1988). Die enzymatische Konjugation von MCB mit GSH erfolgte dann durch 30-minütige Inkubation bei 37°C. Für jede Lös ung des MCB-GSH-Konjugats wurde ein Leerwert hergestellt, der die verbliebene MCB-Menge nach der Reaktion mit GSH (1:1-Stöchiometrie; Shrieve et al., 1988) berücksichtigte (Gleichung 7).

 $\begin{array}{ll} (7) & C_{MCB-Leerwert} = (C_{MCB-Inkubation} - C_{GSH})/2 \\ C_{MCB-Leerwert} & Konzentration des MCB-Leerwerts [µmol/l] \\ C_{MCB-Inkubation} & Konzentration des eingesetzten MCB [µmol/l] \\ C_{GSH} & Konzentration des eingesetzten GSH [µmol/l] \\ \end{array}$

Das GSH-depletierte Rattenlebercytosol wurde wie folgt hergestellt: Einer männlichen Fischer 344-Ratte (360 g Körpergewicht) wurde BSO (890 mg/kg Körpergewicht; siehe Abschnitt 2.2.1) intraperitoneal appliziert. Nach 4 h wurde sie mit Natrium-Pentobarbital (25 mg/ml in destilliertem Wasser; Dosis: 150 mg/kg Körpergewicht) getötet und die Leber mit eisgekühltem N₂PBS über die Pfortader perfundiert. Dann wurde die Leber entnommen und in N₂PBS mit einem Potter-Elvehjem-S-Gewebehomogenisator mit Teflonpistill (Sartorius, Göttingen) ein 20% iges Homogenat hergestellt, das dann für 1 h bei +4°C und 100000 g zentrifugiert wurde. Um restliches GSH im Überstand (Cytosol) zu entfernen, wurden zu 35 ml Cytosol 700 µl einer Lösung von 2-Chloracetophenon in Dimethylsulfoximin (50 mmol/l) zugegeben. Das elektrophile 2-Chloracetophenon wird GST-katalysiert an GSH konjugiert (Summer et al., 1996). Zur Bestimmung des noch verbliebenen GSHs wurden 10,5 µl dieses GSH-depletierten Rattenlebercytosols mit 94,5 µl N₂PBS und 105 µl 1,125 mmol/I MCB inkubiert (30 min; 37℃) und der G SH-Gehalt wie oben beschrieben mittels einer Kalibriergerade auf weniger als 3 nmol GSH/mg Protein bestimmt. Die Lagerung des GSH-depletierten Rattenlebercytosols erfolgte in Aliquots von jeweils 100 µl bei -80℃.

2.5 Bestimmung von Glutathion im Gefrierschnitt der Mauslunge

Fluoreszenzmikroskopie

Die Gefrierschnitte (siehe Abschnitt 2.3.3) wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 min luftgetrocknet. Die Fluoreszenz des MCB-GSH-Konjugats wurde dann über die gesamte Fläche des Gefrierschnitts in einem Intensitätsbereich von 0 bis 4096 willkürlichen, gerätespezifischen Einheiten mit Hilfe des inversen Axiovert II-Mikroskops bei einer 100fachen Gesamtvergrößerung im "Binning 2"-Modus aufgenommen. Die Anregung (bei 393 nm), Datenerstellung und Fluoreszenzauswertung erfolgte über ein Computer-assistiertes TILL-Imaging-System, das aus einer Monochromatoreinheit, einer gekühlten CCD-Kamera und einem Computer mit TILLvisION Software 4.01 (TILL Photonics, Gräfelfing) bestand. Die Belichtungszeit betrug 15 msec. Zum Fokussieren wurde eine Belichtungszeit von 1 msec verwendet. Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde die Lichtstärke am Objektiv bei 393 nm im 15 msec-Livemodus mittels einer Photodiode (TILL Photonics, Gräfelfing) auf 0,44 mV eingestellt. Die optimale Anregungswellenlänge von 393 nm war anhand eines Wellenlängenspektrums (siehe Abbildung 15) in einem Gefrierschnitt einer MCB-inflatierten Mauslunge ermittelt worden. Im Anschluss an die Messungen wurden die Objektträger bis zur histochemischen Anfärbung und lichtmikroskopischen Auswertung (siehe Abschnitt 2.6) mit Aluminiumfolie umwickelt bei -21℃ gelagert.

Quantifizierung von Glutathion

Die Bestimmungen der GSH-Gehalte im Bronchialepithel aller vier Atemwegssegmente (Abbildung 2) erfolgten immer an einem Gefrierschnitt pro Tier. Als Parameter für die GSH-Konzentration diente die Fluoreszenzintensität des MCB-GSH-Konjugats. Die Auswertung der Intensitäten erfolgte "blind" mittels kodierter Objektträger. Hierfür wurden die Fluoreszenzintensitäten in mehreren quadratischen Messfeldern (jedes als eine "Region of Interest" bzw. ein ROI bezeichnet), die aus jeweils 64 einzelnen Messpunkten bestanden, gemessen. Dabei betrugen die Abstände der ROIs entlang des Bronchialepithels 100 bis 150 µm zueinander. Die Anzahl der ROIs pro Gefrierschnitt betrug 15 - 23 in den terminalen Bronchioli, 15 - 25 in den distalen Bronchioli, 14 - 23 in den mittleren Bronchioli und 8 - 20 in den proximalen Bronchi. Jede einzelne Fluoreszenzintensität wurde um den allgemeinen Hintergrundwert (siehe unten) korrigiert. Danach wurde für jeden ROI die Summe der 64 korrigierten Einzelintensitäten berechnet und diese um einen Wert korrigiert (Gleichung 8), der die Fluoreszenz der unspezifischen Bindung von MCB im Gefrierschnitt berücksichtigte (siehe unten).

(8)
$$SI^{ROI} = \left[\sum_{i=1}^{64} (I_i - I_0)\right] - \overline{SI}_{unspezifisch}$$

 SI^{ROI} Summe der korrigierten Einzelintensitäten in einem ROI [willkürliche
Einheiten]
 I_i Fluoreszenzintensität einer Einzelmessung i [willkürliche Einheiten]
 I_0 allgemeiner Fluoreszenzhintergrund [willkürliche Einheiten]
 $\overline{SI}_{unspezifisch}$ Fluoreszenz der unspezifischen Bindung von MCB [willkürliche
Einheiten]

Für jedes Tier wurde dann der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung aller ROIs eines Atemwegssegments nach Gleichung 9 und 10 ermittelt.

(9) $\overline{SI}^{Segment} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^{m} SI_{j}^{ROI}$

(10)
$$SD^{Segment} = \sqrt{\frac{1}{m-1}\sum_{j=1}^{m} \left(SI_{j}^{ROI} - \overline{SI}^{Segment}\right)^{2}}$$

SD^{Segment} Standardabweichung der Summen der Einzelintensitäten der ROIs in einem Atemwegssegment [willkürliche Einheiten]

Als quantitatives Maß für den GSH-Gehalt wurde das gewogene Mittel der Summen der Einzelintensitäten der ROIs ($\overline{SI}_{gewogen}^{Segment}$) für alle Tiere in einer Behandlungsgruppe (Gleichung 11) mit der entsprechenden gewogenen Standardabweichung (Gleichung 12) nach Sachs (1998) berechnet.

(11)
$$\overline{SI}_{gewogen}^{Segment} = \frac{1}{M} \sum_{k=1}^{n} (m_k * \overline{SI}_k^{Segment})$$

- Silgewogengewogenes Mittel der Summen der Einzelintensitäten der ROIs in
einem Atemwegssegment über alle Tiere einer Behandlungsgruppe
[willkürliche Einheiten]
- M Gesamtzahl aller ROIs aller Tiere einer Behandlungsgruppe in einem Atemwegssegment

n Anzahl der Tiere (mit dem Index k) in einer Behandlungsgruppe

(12)
$$SD_{gewogen}^{Segment} = \sqrt{\frac{1}{M-1} \left[\sum_{k=1}^{n} \left(m_{k} - 1 \right) SD_{k}^{Segment^{2}} + \sum_{k=1}^{n} m_{k} \left(\overline{SI}_{k}^{Segment} - \overline{SI}_{gewogen}^{Segment} \right)^{2} \right]}$$

SD^{Segment} gewogene Standardabweichung für alle Tiere einer Behandlungsgruppe

Zusätzlich wurde aus den erhaltenen Werten der GSH-Gehalt in der Einheit nmol GSH/mg Protein bestimmt. Hierfür wurde der aus der Literatur bekannte Wert von 6,0 nmol/mg Protein für den GSH-Gehalt im distalen Atemwegssegment von Kontrollmäusen (Plopper et al., 2001) dem gewogenen Mittel der Summe der Einzelintensitäten der ROIs in diesem Atemwegssegment gleichgesetzt und hierüber dann die mittleren GSH-Gehalte und deren Standardabweichungen der übrigen Atemwegssegmente mittels den Gleichungen 13 und 14 berechnet.

(13)
$$C_{GSH}^{Segment} = \frac{a * \overline{SI}_{gewogen}^{Segment}}{\overline{SI}_{gewogen}^{distal}}$$

C^{Segment} GSH-Gehalt in einem Atemwegssegment [nmol GSH/mg Protein] a GSH-Gehalt in distalen Atemwegen von Kontrollmäusen: 6,0 nmol GSH/mg Protein

SIgewogenes Mittel der Summen der Einzelintensitäten der ROIs in
distalen Atemwegen von Kontrollmäusen [willkürliche Einheiten]

(14)
$$SD_{GSH}^{Segment} = \frac{a * SD_{gewogen}^{Segment}}{\overline{SI}_{gewogen}^{distal}}$$

SD^{Segment} Standardabweichung des GSH-Gehalts in einem Atemwegssegment [nmol GSH/mg Protein]

Bestimmung des allgemeinen Fluoreszenzhintergrundes und der Fluoreszenz aufgrund unspezifischer Bindung von Monochlorbiman

Der allgemeine Fluoreszenzhintergrund (I₀) entspricht der Fluoreszenz des MCB in einem Gefrierschnitt als Matrix. Um diesen zu ermitteln, wurden drei Gefrierschnitte einer 1 min lang mit N₂PBS inflatierten Lunge einer BSO + DEM-behandelten Maus (siehe Abschnitt 2.2.1) 30 sec lang mit jeweils 20 µl einer MCB-Lösung (2,25 mmol/l in N₂PBS) inkubiert. Anschließend wurde die MCB-Lösung durch Drehen des Objektträgers entfernt und die Fluoreszenz nach einer Trocknungszeit von 1 h bei Raumtemperatur wie oben beschrieben gemessen. In jeden der drei Gefrierschnitte wurden die Fluoreszenzintensitäten in 15 ROI mit jeweils 64 Einzelmesspunkten verteilt über alle vier Atemwegssegmente bestimmt und eine Häufigkeitsverteilung der nicht-korrigierten Fluoreszenzintensitäten erstellt. Aus dem geometrischen Mittel jeder Verteilung wurde ein Mittelwert bestimmt, der als allgemeiner Fluoreszenzhintergrund von MCB definiert wurde. Er betrug 119 willkürliche Einheiten und entsprach dem Hintergrundwert, der den Angaben des Herstellers nach bei Fluoreszenzbestimmungen generell zu berücksichtigen sei.

Für die Bestimmung des Anteils der Fluoreszenz der unspezifischen Bindung von MCB an Proteine und andere, von GSH verschiedene, zelluläre Bestandteile wurden die Fluoreszenzintensitäten im Homogenat MCB-inflatierter Lungen vor und nach der Fällung hochmolekularer Proteine verglichen. Hierfür wurde ein Homogenatgemisch aus den mit 2,25 mmol/l MCB-inflatierten Lungen dreier BSO + DEMbehandelten Mäuse (siehe Abschnitt 2.2.1) hergestellt. Jeweils 150 µl des Homogenatgemischs wurden entweder durch Zugabe von 450 µl N₂PBS (ohne weitere Zentrifugation) verdünnt oder mit 450 µl Acetonitril versetzt und bei 16500 g für 3 min zentrifugiert und dadurch deproteiniert. Anschließend wurden 200 µl der nichtzentrifugierten Lösung bzw. des Überstands in eine Mikrowellplatte überführt und die Fluoreszenz bestimmt (siehe Abschnitt 2.4). Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Für die Bestimmung des Leerwerts wurde eine MCB-Lösung (0,113 mmol/l in N₂PBS) anstelle des Homogenatgemischs eingesetzt. Nach Abzug des Leerwerts wurde der Anteil der Fluoreszenz der unspezifischen Bindung von MCB an der Gesamtfluoreszenz im Lungenhomogenat der BSO + DEM-behandelten Mäuse mit Hilfe der Gleichung 15 berechnet.

(15)
$$F_{unspezifisch} = \frac{F_{total} - F_{deproteiniert}}{F_{total}}$$

$F_{unspezifisch}$	Anteil der Fluoreszenz der unspezifischen Bindung von MCB an
	der Gesamthintergrundfluoreszenz im Lungenhomogenat
F _{total}	Gesamthintergrundfluoreszenz des Lungenhomogenats
	[willkürliche Einheiten]
F _{deproteiniert}	GSH-spezifische Restfluoreszenz des deproteinierten Lungen-

homogenats [willkürliche Einheiten]

Zur Berechnung der Fluoreszenz der unspezifischen Bindung von MCB (Sl_{unspezifisch}) im Gefrierschnitt wurde davon ausgegangen, dass ihr Anteil an der Gesamthintergrundfluoreszenz im Gefrierschnitt und im Homogenat identisch ist. Zur Ermittlung der Gesamthintergrundfluoreszenz in Gefrierschnitten wurde die Fluoreszenzintensitäten von drei BSO + DEM-behandelten Tieren (siehe Abschnitt 2.2.1) zunächst in jeweils 15 ROI jedes Atemwegssegments bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert aller Summen der Einzelintensitäten über alle ROI und alle Atemwegssegmente von den drei BSO + DEM-behandelten Tieren (\overline{SI}_{total}) berechnet. Von diesem Wert ausgehend wurde dann mit Hilfe des im Homogenat bestimmten Anteils der Hintergrundwert für die Fluoreszenz der unspezifischen Bindung von MCB im Gefrierschnitt berechnet (Gleichung 16).

(16) $\overline{SI}_{unspezifisch} = \overline{SI}_{total} * F_{unspezifisch}$

SI_{unspezifisch} Fluoreszenz der unspezifischen Bindung von MCB in einem Gefrierschnitt [willkürliche Einheiten]

SI
totalMittelwert der Summen der Einzelintensitäten über alle ROIs und
alle Atemwegssegmente von drei BSO+DEM-behandelten Tieren
(=Gesamthintergrundfluoreszenz) [willkürliche Einheiten]

2.6 Bestimmung der Zellproliferation im Gefrierschnitt der Mauslunge

Immunhistochemische Anfärbung von Bromdesoxyuridin

Für die Bestimmung der Zellproliferation im Bronchialepithel in Gefrierschnitten wurde ein neues Verfahren entwickelt, dessen Prinzip allerdings bereits bekannt ist (z.B. Uppala et al., 2005). Es beruht auf dem immunhistochemischen Nachweis von in die DNS inkorporiertem BrdU als Antigen. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit ein Antikörperkomplex aus primären und sekundären Antikörpern eingesetzt mit dem Ziel, unspezifische Anfärbungen im Lungengewebe durch den sekundären Antikörper (Kreuzreaktionen) zu verringern (Angabe des "MoMap-Kit"-Herstellers Ventana Medical System). Der primäre Antikörper im Antikörperkomplex reagiert spezifisch mit dem in der DNS enthaltenen BrdUs. Der sekundäre Antikörper des Komplexes ist mit einer Avidin-Biotin-Peroxidase gekoppelt. Durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat für die Peroxidase bildet sich an den Bindungsstellen des Antikörperkomplexes mit der DNS ein braunes, unlösliches Produkt, das lichtmikroskopisch sichtbar ist. So werden letzlich die Zellkerne von Zellen, die sich nach der Applikation von BrdU die DNS-Replikation durchlaufen haben, spezifisch als "BrdU-positiv"gekennzeichnet. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen jeder Färbeprozedur dienten Gefrierschnitte vom Dünndarm einer über drei Tage BrdU-behandelten Maus (2x 25 mg/kg/Tag intraperitoneal, vergleiche Abschnitt 2.2.2), die mit dem "Antibody-Diluent" mit bzw. ohne Antikörperkomplex inkubiert wurden.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Gefrierschnitt auf kodierten Objektträgern 15 min lang bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Fixierung des Gewebes erfolgte für 10 min in einem Gemisch aus 180 ml Methanol und 60 ml Aceton. Nach einminütigem Waschen in PBS wurden die Objektträger zur Denaturierung der DNS exakt 2 min lang in 25 mmol/l Natriumhydroxid in PBS inkubiert und anschließend erst zweimal je 30 sec, dann einmal 5 -10 min in PBS gewaschen. Der Antikörperkomplex wurde für jede Färbeprozedur frisch hergestellt. Hierfür wurde zuerst der monoklonale anti-BrdU-Antikörper 1 : 500 in "Antibody-Diluent" verdünnt. Dann wurden pro ml Antikörperlösung 50 µl "Lösung A" des MoMap-Kits (enthält Adjuvanzien und Linker; Angabe des Herstellers) und nach 15 min 50 µl "Lösung B" des MoMap-Kits (enthält den Sekundärantikörper; Angabe des Herstellers) zugegeben. Dann wurde die Antikörperkomplex-Lösung für weitere 15 min inkubiert, bevor die Gefrierschnitte für 2 h mit jeweils 100 µl der Antikörperkomplex-Lösung in der Feuchtkammer inkubiert wurden. Die Reaktion mit DAB wurde maschinell im "Immunostainer" mit der NexES IHC Software 9.0 (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) unter Verwendung des "iView[™] DAB Detektionskits" nach Herstellerangaben durchgeführt. Danach wurden die Objektträger erst 5 min in Seifenlauge, dann 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

Für die lichtmikroskopische Evaluierung wurden die Gefrierschnitte kontrastgefärbt. Die blaue Anfärbung der Zellkerne in den Gefrierschnitten wurde mit Hämatoxylinlösung und anschließendem Waschen der Objektträger für etwa 5 min in Leitungswasser und in destilliertem Wasser durchgeführt. Es folgten die rötliche Anfärbung des Cytosols mit Eosin Y-Lösung und die anschließende Dehydrierung der Gefrierschnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (2 min 70%; 2 min 90%; 2 min 96%; 2x 2 min 100% Ethanol). Nach einer weiteren Inkubation für 2 min in 100% Xylol wurden die Gefrierschnitte mit Pertex-Eindeckmittel und einem Glasplättchen eingedeckt und über Nacht bei etwa 60°C ausgehärtet.

Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden über die gesamte Fläche der kontrastgefärbten Gefrierschnitte mit Hilfe eines Axiovert-Lichtmikroskops mit der USB-Kamera und der Software Optimas Image Analysis v6.25 (Weiss Imaging and Solutions, Bergkirchen) bei Endvergrößerungen von 50fach, 100fach und 200fach angefertigt. Die Atemwege wurden anhand einer besonders intensiven Eosinfärbung und morphologisch anhand von Epithelzellen mit großen, runden, basal gelegenen Zellkernen und der Wölbung des Cytoplasma ins Lumen der Atemwege identifiziert. Die Zuordnung der Atemwege in die vier Segmente (siehe Abbildung 2) erfolgte durch den (visuellen) Vergleich des luminalen Durchmessers, der Schichtdicke der umgebenden glatten Muskulatur und der Lage auf dem Objektträger. Blutgefäße wurden anhand der glatten Zellflächen zur luminalen Seite hin und der abgeflachten, nadelförmigen Zellkerne identifiziert.

Quantifizierung der Zellproliferation

Die Zellproliferation wurde an jeweils einem Gefrierschnitt pro Tier für die einzelnen Atemwegssegmente getrennt ausgewertet. Hierfür wurde die Länge der Basalmembran zwischen dem Bronchialepithel und der Muskulaturschicht um die Atemwege mit Hilfe der Software Optimas 6.25 bei einer 200fachen Vergrößerung im Lichtmikroskop bestimmt (Abbildung 9). Es wurde in jedem der vier Atemwegssegmente (siehe Abbildung 2) jeweils eine Gesamtlänge der Basalmembran von mindestens 1 mm ausgewertet. Entlang dieser Basalmembran wurde die Anzahl der BrdUpositiven Zellen im Bronchialepithel im Lichtmikroskop ermittelt.



Abbildung 9: Quantifizierung der Zellproliferation im Epithel eines terminalen Bronchiolus (TB) mit Hilfe des "Unit length labelling index" (ULLI). Der ULLI beschreibt die Anzahl der Bromdesoxyuridinpositiven Zellen (2 hiervon durch Sterne gekennzeichnet) entlang der Basalmembran (BM, grüne Linie). Die Länge wurde mit einem Computerprogramm bestimmt. Positive Zellen im Alveolargewebe (Alv) gehen nicht in die Bestimmung des ULLI ein. Der Balken repräsentiert eine Länge von 50 µm.

Anschließend wurde für jedes Atemwegssegment der "Unit length labelling index" (ULLI) als quantitatives Mass der Zellproliferation berechnet (Gleichung 17). Die Kalibrierung der Längenmessung erfolgte anhand eines Objektträgers mit einer standardisierten 1 mm-Skala.

(17)
$$ULLI = \frac{N_{pos}}{L}$$

ULLI Unit length labelling index [mm⁻¹] für ein Atemwegssegment

N_{pos} Summe der BrdU-positiven Zellen entlang der Basalmembran im Epithel der Atemwege innerhalb eines Atemwegssegments

L Gesamtlänge der Basalmembran in einem Atemwegssegment [mm]

2.7 Etablierte analytische Verfahren

2.7.1 Gaschromatographische Bestimmungen von Styrol

Die Bestimmungen der Konzentration von Styrol in der Atmosphäre erfolgten mit einem Gaschromatographen (GC), der mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet war. Dazu wurde mit einer gasdichten 5 ml-Einwegspritze die Gasprobe (3 ml) über eine 1,0 ml-Dosierschleife in den GC injiziert und über den GC-Injektor (300°C) auf die Säule übertragen. Die Dosierschleife wurde nach jeder Probenaufgabe mit Stickstoff gespült. Die gaschromatographische Auftrennung erfolgte isotherm bei 220°C auf der mit Tenax TA gepackten Stahlsäule (1,5 m x 1/8") mit Wasserstoff und synthetischer Luft bei einem Druck von jeweils 0,6 kg/cm² und Stickstoff als Trägergas bei 2,0 kg/cm². Die Detektion erfolgte bei konstant 210°C. Die Identifizierung von Styrol erfolgte anhand der Retentionszeit von 1,87 min.



Abbildung 10: Chromatogramm einer Gasprobe (1,0 ml) aus der Atmosphäre einer Expositionskugel mit 40 ppm Styrol. Die spezifische Retentionszeit von Styrol betrug 1,87 min.

In Abbildung 10 ist exemplarisch ein Chromatogramm von Styrol dargestellt. Die Fläche der Detektorsignale wurde mit dem Integrator automatisch berechnet und anhand der Kalibrierungsgeraden in die Konzentration (ppm) umgerechnet. Für die Kalibrierung wurden Styrolkonzentrationen im Bereich von 20 bis 500 ppm in gasdicht verschlossenen Glasexsikkatoren unterschiedlicher Volumina (846 – 20245 ml) hergestellt. Dies erfolgte durch Injektion von flüssigem Styrol mittels einer Unimetrix-Spritze durch ein teflonbeschichtetes Gummiseptum in den Exsikkator. Das flüssige Styrol verdampfte unmittelbar nach der Injektion. Um eine rasche und gleichmäßige Verteilung der Substanz zu erreichen, wurde die Gasatmosphäre mit einem Magnetrührer und mittels 10 ml-Einwegspritzen durchmischt. Jede Styrolkonzentration wurde dreifach bestimmt. Unter der Annahme, dass sich Styrol nach dem Verdampfen wie ein ideales Gas verhält, wurde die aktuelle Konzentration von Styrol im Expositionsgefäß mit den Gleichungen 18 und 19 berechnet.

(18)
$$MV_{akt} = \frac{p * MV * T_{akt}}{T * p_{akt}}$$

MV _{akt}	aktuelles molares Volumen von Styrol [ml/mol]
р	Luftdruck unter Standardbedingungen: 760 Torr
MV	molares Volumen eines idealen Gases unter Standardbedingun-
	gen: 22400 ml/mol
T _{akt}	aktuelle Raumtemperatur [K]
т	Temperatur unter Standardbedingungen: 273,15 K
P _{akt}	aktueller Luftdruck [Torr]

(19)
$$C_{ST} = \frac{V_{ST} * d_{ST} * MV_{akt} * a}{V_{Ex} * MG_{ST}}$$

C_{ST} Konzentration von Styrol im Exsikkator [ppm]

V_{ST} injiziertes Volumen an Styrol [µl]

d_{ST}	spezifische Dichte von Styrol (25℃): 0,905 g/ml
MV _{akt}	aktuelles molares Volumen von Styrol [ml/mol]
а	Umrechnungsfaktor: 1000
V_{Ex}	Volumen des Exsikkators [ml]
MG _{ST}	Molekulargewicht von Styrol (25℃): 104,15 g/mol

Die um einen Leerwert korrigierten mittleren Flächen der Detektorsignale wurden gegen die jeweiligen Styrolkonzentrationen aufgetragen und die Kalibrierungsgerade durch lineare Regression durch den Nullpunkt bestimmt. Das Detektorsignal war über den gesamten Konzentrationsbereich von 20 bis 500 ppm Styrol linear (Abbildung 11). Bei den Konzentrationsmessungen war der Variationskoeffizient kleiner als 6%. Das Detektionslimit wurde nicht bestimmt, da es weit unterhalb der kleinsten eingesetzten Konzentration von 20 ppm Styrol lag.



Abbildung 11: Kalibrierungsgerade zur Bestimmung der Styrolkonzentration in der Atmosphäre der Expositionskugel. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (teilweise kleiner als das Symbol) dreier Messungen.

Vor jeder Expositionsperiode wurde eine Einpunkt-Kalibrierung durchgeführt. Hierzu wurde in einem Glasexsikkator (6490 ml) eine mittels der Gleichungen 18 und 19 berechnete Styrolkonzentration eingestellt, die nahe der Ziel-Konzentration lag, und diese dreifach gaschromatographisch bestimmt.

2.7.2 Bestimmung von Glutathion mittels eines Recycling-Tests

Die Bestimmung des Glutathiongehalts als Summe von oxidiertem und reduziertem Glutathion erfolgte nach der Methode von Tietze (1969). Der enzymabhängige und damit GSH-spezifische Test basiert auf einer fortlaufenden Oxidation und Reduktion von Glutathion und der Derivatisierung des reduzierten Glutathions mit DTNB zu einem chromophoren Produkt (siehe Abschnitt 1.4.3).

Für die GSH-Bestimmung wurden Lungen von Mäusen 20 min lang mit N₂PBS inflatiert und anschließend Lungenhomogenat und -cytosol, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, hergestellt. Zu jeweils 65 µl Lungenhomogenat bzw. -cytosol wurden 65 µl 10% ige meta-Phosphorsäure in N₂PBS gegeben und für 2 min bei 16500 g zentrifugiert. Der Überstand (80 µl) wurde mit 4 µl Triethanolamin (4 mmol/l in destilliertem Wasser) versetzt. Ein Teil der Lösung (50 µl) wurde anschließend zu einem Gemisch aus 800 µl eines Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-haltigen Natriumphosphatpuffers (19 ml 0,2 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 81 ml 0,2 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat, 100 ml doppelt-destilliertes Wasser, EDTA-Endkonzentration: 1 mmol/l, pH 7,4), 50 µl Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH; 4,5 mg/ml in 1% iger Natriumhydrogencarbonatlösung) und 20 µl Glutathion-Reduktase (Emulsion 1:11 in EDTA-haltigem Natriumphosphatpuffer verdünnt) zugegeben. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl DTNB-Lösung (50 mg DTNB und 15 mg Natriumhydrogencarbonat pro 10 ml EDTA-haltigem Natriumphosphatpuffer) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 10 sec wurde die Extinktion bei 405 nm über einen Zeitraum von 2 min gemessen und der GSH-Gehalt aus der konstanten Extinktionsänderung pro Minute berechnet. Die Messungen der Lungenhomogenate und -cytosole wurde in Duplikaten durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde oxidiertes Glutathion in Konzentrationen von 0,006 - 0,05 mmol/l in N₂PBS verwendet. Als Leerwert diente N₂PBS anstelle von GSSG. Die um den Leerwert bereinigten Extinktionsänderungen waren proportional zur eingesetzten Konzentration an GSH-Äquivalenten, wobei ein Molekül GSSG zwei GSH-Äquivalenten entsprach (Abbildung 12).



Abbildung 12: Kalibrierungsgerade des Glutathion-Recycling-Tests mit oxidiertem Glutathion in Konzentrationen von 0,006 - 0,05 mmol/l als Standard. Dargestellt sind jeweils Einzelmesswerte. Ein Molekül oxidiertes Glutathion entspricht der Summe aus zwei Äquivalenten an reduziertem Glutathion (GSH).

2.7.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung in Homogenat- und Cytosolproben wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Die Methode basiert auf der Reaktion des Farbstoffs Coomassie-Blau mit basischen und aromatischen Aminosäuren, bei der es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbstofflösung von 465 nach 595 nm kommt (Bradford, 1976). Das kommerziell erhältliche Farbreagenzkonzentrat (siehe Abschnitt 2.1) wurde im Verhältnis 1 : 4 mit doppelt-destilliertem Wasser verdünnt. Jeweils 10 µl des Lungenhomogenats oder -cytosols (siehe Abschnitte 2.3.1 und 2.3.2) wurden mit 1 ml der verdünnten Farbreagenzlösung in einer Einmalküvette vermischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm mit einem Photometer in Duplikaten gemessen. Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt. Hierfür wurden frisch hergestellte Verdünnungen des Proteinstandards (siehe Abschnitt 2.1) mit N₂PBS mit Konzentrationen zwischen 0,25 und 2,5 mg Protein/ml sowie ein Leerwert aus N₂PBS verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte dann unter Berücksichtigung des Leerwerts anhand der Steigung und des Achsenabschnitts der Kalibriergeraden (Abbildung 13).



Abbildung 13: Kalibrierungsgerade für die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford (1976). Dargestellt sind jeweils einzelne Messwerte.

2.8 Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4 für Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Für den Vergleich zweier Behandlungsgruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige Student t-Test verwendet. Bei mehr als zwei Behandlungsgruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit anschließendem Dunnetts Post-Hoc-Test durchgeführt. Als Kriterium für statistisch signifikante Unterschiede wurde allen Tests ein Signifikanzniveau von p < 0,05 zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung der Methode zur Bestimmung von Glutathion in der Mauslunge

Bevor die Methode zur Bestimmung von GSH im Lungengewebe mit MCB entwickelt wurde, wurden bereits beschriebene Methoden für den histochemischen Nachweis von GSH in Gefrierschnitten mit Hilfe der Farbstoffe Mercury Orange (Asghar et al., 1975; Chieco und Boor, 1983; Moussa und Forkert, 1992) und Mersalyl (Sippel, 1978) auf ihre Eignung untersucht. Beide Färbetechniken beruhen auf einer irreversiblen Reaktion des quecksilberhaltigen Farbstoffs mit der Thiolgruppe des GSH unter der Bildung eines schwerlöslichen Komplexes, der im Gewebeschnitt präzipitiert. Mit beiden Farbstoffen gelang es jedoch nicht, GSH in der Mauslunge reproduzierbar anzufärben und zu quantifizieren (zur möglichen Ursache siehe Diskussion). MCB hingegen erwies sich schließlich für die Bestimmung von GSH im Gefrierschnitt sowie im Lungenhomogenat und -cytosol als geeignet. MCB hat ein Molekulargewicht von 226,66 g/mol und ist selbst nur schwach-fluoreszierend. Im ungeladenen Zustand kann MCB Zellmembranen passieren (Cook et al., 1991; Fernández-Checa und Kaplowitz, 1990; Kosower et al., 1979). Katalysiert über GSTs erfolgt die Reaktion von MCB mit intrazellulärem GSH überwiegend im Cytoplasma zu einem Konjugat (Abbildung 14), das stark fluoresziert und nicht zellmembrangängig ist (Fernández-Checa und Kaplowitz, 1990; Rice et al., 1986). Das Wellenlängenspektrum für die Anregung und Emission des *in-vitro*-hergestellten MCB-GSH-Konjugats ist in Abbildung 15 dargestellt.



Abbildung 14: Konjugation von Monochlorbiman (MCB) mit Glutathion (GSH), katalysiert durch Glutathion-S-Transferasen (GST). Das entstehende MCB-GSH-Konjugat ist stark fluoreszierend.



Abbildung 15: Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektrum von *in-vitro*-hergestelltem Konjugat aus Glutathion (0,1 mmol/l) und Monochlorbiman (1,125 mmol/l) (siehe Abschnitt 2.4). Das Anregungsspektrum wurde mit einem Monochromator bei konstanter Emission von 485 nm, das Emissionsspektrum bei konstanter Anregung mit 385 nm, in 2 nm-Messschritten mit einem Fluoreszenzmessgerät (Tecan i-control; Tecan Group, Männedorf, Schweiz) im Top-Reading-Modus aufgenommen.

3.1.1 Bestimmung von Glutathion in Homogenat und Cytosol

Sensitivität und Linearität

Die Fluoreszenz des bei der *In-vitro*-Reaktion von MCB und GSH entstandenen Konjugats war bei einem jeweils 2,25fach molaren Überschuss von MCB gegenüber GSH im Bereich der GSH-Konzentrationen von 0,4 bis 200 µmol/l linear und damit auch im Bereich der für die Kalibrierungen der GSH-Bestimmungen im Lungenhomogenat und -cytosol eingesetzten GSH-Konzentrationen (3 bis 200 µmol/l) (Abbildung 16).



Abbildung 16: Fluoreszenzintensität des *in-vitro*-synthetisierten Konjugats (siehe Abschnitt 2.4) aus Glutathion (GSH) und Monochlorbiman (MCB) mit GSH-Endkonzentrationen von 0,4 bis 200 µmol/l und jeweils 2,25fach molarem Überschuss von MCB gegenüber GSH. Der Konzentrationsbereich von 0 bis 6,25 µmol/l GSH ist vergrößert dargestellt. Die Quantifizierungsgrenze (Q) wurde auf 2 µmol/l GSH festgelegt. Der Bereich von 3 bis 200 µmol/l GSH wurde für die Kalibrierung der GSH-Bestimmungen im Lungenhomogenat und –cytosol verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (teilweise kleiner als das Symbol) von drei unabhängigen Reaktionsansätzen, korrigiert um den jeweiligen Leerwert an MCB (siehe Abschnitt 2.4).

Bei der niedrigsten eingesetzten GSH-Konzentration von 0,4 µmol/l betrug das Signal-Rausch-Verhältnis aufgrund des gerätespezifischen Hintergrundes lediglich 1,5. Für eine verlässliche Quantifizierung von GSH wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 3 als erforderlich erachtet. Daher wurde die Quantifizierungsgrenze für den MCB-Test auf 2 µmol/l GSH festgelegt. Bei Anwendung des Standardprotokolls (siehe Abschnitte 2.3 und 2.4) wurden GSH-Konzentrationen zwischen 24 und 41 µmol/l im Homogenat und zwischen 56 und 83 µmol/l im Cytosol von normalen Mauslungen gemessen. Die Proteinkonzentrationen lagen zumeist zwischen 0,7 und 1,2 mg/ml (Cytosol) bzw. 0,9 und 1,5 mg/ml (Homogenat). Die Schwankungen von GSH und Proteinmenge dürften hauptsächlich auf unvermeidbare, unterschiedliche Puffermengen pro Lunge bei der Inflation und Gewebeaufbereitung zurückzuführen sein. Da bekannt ist, dass der Proteingehalt der Lunge konstant ist (Bradley et al., 1974), wurden die GSH-Konzentration im Folgenden auf den Proteingehalt bezogen.

Die Fluoreszenzintensität des bei der Inflation entstandenen MCB-GSH-Konjugats war in verschiedenen Verdünnungen von Lungenhomogenaten dreier Mäuse mit Proteingehalten von etwa 0,2 bis mindestens 3,1 mg/ml proportional zum GSH-Gehalt (Abbildung 17). In diesem Bereich war das Verhältnis von GSH zu Protein in den verschiedenen Verdünnungen mit Werten zwischen 20 und 23 (Maus 1), 24 und 27 (Maus 2) und 27 und 31 (Maus 3) konstant. Der über alle drei Tiere gewonnene Mittelwert für das GSH-Protein-Verhältnis und die entsprechende Standardabweichung betrug 25,8 \pm 4,1. Bei Proteingehalten von weniger als 0,2 mg/ml fiel das Verhältnis von GSH zu Protein deutlich ab.



Abbildung 17: Fluoreszenzintensität des Konjugats aus Monochlorbiman (MCB) und Glutathion (GSH) in verschiedenen Verdünnungen von Lungenhomogenaten dreier Kontrollmäuse in Abhängigkeit vom GSH- bzw. Proteingehalt. Von jeder Maus wurden ein Lungenhomogenat mit einem Gewichtsanteil des inflatierten Gewebes von 12,5% hergestellt und dieses mit stickstoffgesättigter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung zu Konzentrationen von 0,25 - 10% Gewichtsanteilen verdünnt. Der Proteingehalt jeder Verdünnung wurde rechnerisch aus der Proteinbestimmung, die mit dem auf 5% verdünnten Homogenat durchgeführt wurde, ermittelt. Die Konzentration von GSH wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden aus *in-vitro*-hergestelltem MCB-GSH-Konjugat bestimmt (siehe Abschnitt 2.4). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (teilweise kleiner als das Symbol) von jeweils drei Messungen jeder einzelnen Homogenatverdünnung einer Maus, korrigiert um den jeweiligen Leerwert an MCB (siehe Abschnitt 2.4). Linie: Regressionsgerade über alle Werte.

Der Einfluss von Bestandteilen des Homogenats auf die Proportionalität zwischen der Konzentration an MCB-GSH-Konjugat und der Fluoreszenzintensität wurde anhand eines "simulierten Lungenhomogenats" überprüft. Hierzu wurden mittels definierten, *in-vitro*-synthetisierten MCB-GSH-Konjugatlösungen (siehe Abschnitt 2.4) sowie verschiedener Verdünnungen eines GSH-depletierten Lungenhomogenats unterschiedliche Verhältnisse von Protein zu zugegebenem GSH im Bereich von 4 – 400 nmol GSH/mg Protein gewählt (Abbildung 18). Die Fluoreszenzintensität

des Konjugats war unabhängig von der eingesetzten Homogenatkonzentration mit Proteingehalten von 0 - 1,6 mg/ml über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 100 µmol/I GSH linear (Geradengleichungen: $y_{0 mg Protein/ml} = 161x + 115$, $R^2 = 0,9999$; $y_{0,25 mg Protein/ml} = 159x + 400$, $R^2 = 0,9998$; $y_{0,64 mg Protein/ml} = 161x + 703$, $R^2 = 0,9999$; $y_{1,28 mg Protein/ml} = 166x + 1071$, $R^2 = 0,9999$; $y_{1,60 mg Protein/ml} = 163x + 1501$, $R^2 = 0,9999$).



Abbildung 18: Fluoreszenz von *in-vitro*-hergestelltem Konjugat aus Glutathion (GSH) und Monochlorbiman (siehe Abschnitt 2.4) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration eines Lungenhomogenats. Ein Gemisch aus den Lungenhomogenaten (Gewichtsanteil des inflatierten Gewebes: 12,5%) dreier BSO + DEM-behandelter Mäuse (siehe Abschnitt 2.2.1) wurde mit 2-Chloracetophenon (Endkonzentration: 0,2 mmol/l) versetzt und nach einer Inkubation für 15 min bei 37°C mit stickstoffgesättigter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung zu Konzentrationen von 2 - 10% Gewichtsanteilen verdünnt. Jeweils 25 µl der Homogenatverdünnung wurde zu 25 µl Konjugatlösung (MCB-GSH-Konzentrationen: 0, 12,5, 50, 200 µmol/l) gegeben und die Fluoreszenzintensität nach Proteinfällung durch zugegebenes Acetonitril und anschließender Zentrifugation (siehe Abschnitt 2.4) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (teilweise kleiner als das Symbol) von drei verschiedenen Reaktionsansätzen jeweils korrigiert um den jeweiligen Leerwert an MCB (siehe Abschnitt 2.4). Linie: Regressionsgerade für die Proteinkonzentration von 0 mg/ml.

Aus den Zunahmen der Y-Abschnitte ergibt sich eine mittlere Fluoreszenzintensität von 918 \pm 165 willkürlichen Einheiten/mg Protein/ml Homogenat (n = 4) beziehungsweise 5,0 \pm 0,31 nmol GSH/mg Protein. Somit dürfte die zur eingesetzten Proteinkonzentration proportionale Zunahme der Fluoreszenzintensitäten das nach Proteinfällung und Depletion im Lungenhomogenat verbliebene GSH darstellen, da in einer direkten Bestimmung des GSH-Gehalts in diesem Lungenhomogenat mittels MCB-Test ein ähnlicher Hintergrundwert von 3,0 \pm 0,2 nmol GSH/mg Protein (n = 3) ermittelt wurde. Der Hintergrund beeinträchtigte die Steigungen der Geradengleichungen von im Mittel 162 \pm 2,6 willkürlichen Fluoreszenzeinheiten/µmol GSH/I (n = 5) nicht (siehe Abbildung 18). Bei den experimentellen GSH-Bestimmungen wurden für die Kalibrierungen der jeweilige Achsenabschnitt und die Steigung jeweils neu ermittelt.

Spezifität der Reaktion von Monochlorbiman mit Glutathion

Zur Uberprüfung der Spezifität des neuentwickelten MCB-Tests für die Bestimmung von GSH wurde die Reaktion von MCB mit GSH und mit dem niedermolekularen Thiol N-Acetylcystein (NAC) *in vitro* in An- und Abwesenheit von GST (zugegeben als GSH-depletiertes Lebercytosol einer Ratte; siehe Abschnitt 2.4) untersucht (Abbildung 19). Die enzymatische Reaktion zwischen GSH und MCB führte zu einem sofortigen, steilen Anstieg des Fluoreszenzsignals zu einem Plateau, das bei den eingesetzten GSH-Konzentrationen von 0,05 bzw. 0,1 mmol/l nach ca. 20 min erreicht wurde. Eine weitere Zugabe von Lebercytosol nach 60 min beeinflusste die Fluoreszenzintensität des MCB-GSH-Konjugats nicht. Die Fluoreszenzintensität nach der nicht-enzymatischen Reaktion von MCB mit GSH betrug bei den gleichen eingesetzten Konzentrationen nach 60 min im Mittel lediglich 4,0% (0,05 mmol/l GSH) bzw. 5,6% (0,1 mmol/l GSH) des Wertes der GST-abhängigen Reaktion. Wurde dann Lebercytosol hinzugegeben, stieg die Fluoreszenzintensität innerhalb von 20 min bis etwa zum Plateauwert der GST-abhängigen Reaktion an (Abbildung 19).

Mit NAC als Substrat war die Fluoreszenz mit und ohne GST äußerst gering. So betrug die mittlere Fluoreszenzintensität nach 100 min in Anwesenheit von GST 2,4% (0,05 mmol/l NAC) bzw. 5,0% (0,1 mmol/l NAC) und in Abwesenheit von GST nur 2,7% (0,05 mmol/l NAC) bzw. 3,3% (0,1 mmol/l NAC) des Wertes der GST-abhängigen Reaktion von GSH mit MCB (Abbildung 19).



Abbildung 19: *In-vitro*-Reaktion von 75 µl Monochlorobiman (MCB; 0,225 mmol/l bzw. 0,45 mmol/l) mit 75 µl Glutathion (GSH; leere und gefüllte Kreise) oder N-Acetylcystein (leere und gefüllte Dreiecke) in Konzentrationen von 0,1 mmol/l (geschlossene Symbole) und 0,2 mmol/l (offene Symbole) in Anwesenheit (rote Symbole) und Abwesenheit (schwarze Symbole) von Glutathion-S-Transferasen (zugegeben als GSH-depletiertes Rattenlebercytosol; siehe Abschnitt 2.4). Für die nichtenzymatische Reaktion wurde anstelle von 2,14 µl Rattenlebercytosol stickstoffgesättigte, phosphatgepufferte Kochsalzlösung zugegeben. Die Pfeile zeigen die Zugabe von GSH-depletierten Rattenlebercytosol an. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (teilweise kleiner als das Symbol) aus jeweils drei unabhängigen Reaktionsansätzen, korrigiert um den jeweiligen Leerwert an MCB (siehe Abschnitt 2.4).

Richtigkeit der Bestimmung von Glutathion

Zur Ermittlung der Richtigkeit der MCB-basierten GSH-Bestimmung wurde GSH ebenfalls mit dem GSH-Recycling-Test (siehe Abschnitt 2.7.2) in Lungenhomogenat und -cytosol von Kontrollmäusen und BSO + DEM-behandelten Tieren bestimmt (Abbildung 20). Mit der MCB-basierten Methode wurde im Lungenhomogenat von drei Kontrollmäusen eine durchschnittliche GSH-Konzentration von 22,8 \pm 0,9 nmol GSH/mg Protein ermittelt. Die Bestimmung von GSH mit dem GSH-Recycling-Test war im Lungenhomogenat dreier anderer Mäuse mit einer GSH-Konzentration von 19,0 \pm 4,3 nmol GSH/mg Protein statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Auch im Lungencytosol von Kontrolltieren wurden mit beiden Methoden statistisch nicht signifikant unterschiedliche Werte von 51,1 \pm 16,4 nmol GSH/mg Protein (MCB-Test) beziehungsweise 44,8 \pm 6,7 nmol GSH/mg Protein (GSH-Recycling-Test) erhalten (Abbildung 20).

Nach der Behandlung von Mäusen mit BSO + DEM wurde mit beiden Tests im Lungenhomogenat eine drastische Abnahme der GSH-Konzentration auf weniger als 3% des Kontrollwerts festgestellt (Abbildung 20). Im Lungencytosol der gleichen Tiere, bei denen auch GSH im Homogenat bestimmt worden war, wurde mit der neuentwickelten Testmethode ein signifikant höherer GSH-Gehalt als mit dem GSH-Recycling-Test nachgewiesen. Die Ursache für diesen Unterschied zwischen beiden Testmethoden bei der GSH-Bestimmung im Cytosol ist unklar.



Abbildung 20: Vergleich der Bestimmung von Glutathion (GSH) mittels des neuen Monochlorbimanbasierten Tests (MCB-Test) und des GSH-Recycling-Tests. Untersucht wurde der GSH-Gehalt im Lungenhomogenat und -cytosol von Kontrollmäusen und Mäusen, die mit L-Buthioninsulfoximin (BSO) und Diethylmaleat (DEM) (siehe Abschnitt 2.2.1) behandelt waren. Für den MCB-Test wurden die Lungen der Mäuse mit 2,25 mmol/l MCB-Lösung inflatiert und das Konjugat aus MCB und GSH fluorometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.4). Für den GSH-Recycling-Test wurden die Lungen mit stickstoff-gesättigter, phosphatgepuffer Kochsalzlösung inflatiert und der Gesamtgehalt an reduziertem und oxidiertem Glutathion bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.2). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei Tieren.

* statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Testmethoden (p < 0,05)
Einfluss von Inflationszeit und Konzentration von Monochlorbiman auf die Bestimmung von Glutathion

In Abbildung 21 ist die analysierte Konzentration des *in-situ*-gebildeten Konjugats aus GSH und MCB in Abhängigkeit von der Inflationszeit und der bei der Inflation eingesetzten MCB-Konzentration dargestellt. Bei Inflationen von Mauslungen mit einer 2,25 mmolaren MCB-Lösung über Zeiträume von 5 bis 60 min änderte sich der GSH-Gehalt im Homogenat sowie im Cytosol nur unwesentlich, wie anhand der äußerst geringen Steigungen der Regressionsgeraden zu sehen ist (Abbildung 21).

Bei Inflationen mit einer 2,22fach konzentrierteren MCB-Lösung anstelle der im Standardprotokoll verwendeten MCB-Konzentration von 2,25 mmol/l wurden weder im Homogenat noch im Cytosol statistisch signifikant verschiedene GSH-Gehalte bestimmt. Bei Verwendung einer Konzentration von 1,125 mmol/l MCB anstelle der 2,25 mmolaren Inflationslösung wurden bei Inflationszeiten von 20 und 30 min etwas geringere GSH-Gehalte erhalten. Möglicherweise war diese MCB-Konzentration zu gering, um einen vollständigen GSH-Umsatz zu erzielen.



Abbildung 21: Einfluss der Inflationszeit und der Konzentration von Monochlorbiman in der Inflationslösung auf die Bestimmung von Glutathion (GSH). Die Lunge von jeweils einer Kontrollmaus wurde *in situ* mit einer MCB-Lösung von 2,25 oder 5 mmol MCB/l über Zeiträume von 5, 10, 20, 30, 45 oder 60 min inflatiert bzw. mit MCB-Lösung von 1,125 mmol MCB/l über Zeiträume von 20 oder 30 min inflatiert. Die GSH-Gehalte im Homogenat bzw. Cytosol dann fluorometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.4). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikatmessungen von jeweils einem Tier. Linien: Regressionsgeraden über alle gleichfarbig dargestellten Messwerte.

3.1.2 Bestimmung von Glutathion in Gefrierschnitten

In Gefrierschnitten von MCB-inflatierten Mauslungen fand sich Fluoreszenz in verschiedenen Geweben, nicht jedoch im Lumen der Atemwege, der Blutgefäße und der Alveolen (Abbildung 22). Dabei zeichneten sich bei den Kontrollmäusen das Bronchialepithel, die glatte Muskulatur der Atemwege und Blutgefäße sowie das Endothel der Blutgefäße durch hohe Fluoreszenzintensitäten aus. Alveolargewebe und Bindegewebe hingegen fluoreszierten meist nur schwach. Nach Behandlung der Tiere mit BSO + DEM war die Fluoreszenzintensität im Epithel aller Atemwegssegmente deutlich reduziert. In den Blutgefäßen und den glatten Muskulaturschichten änderte sich die Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle nicht (Abbildung 22).



Abbildung 22: Fluoreszenz- und entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten der Lunge einer Kontrollmaus (A bzw. C) und einer mit L-Buthioninsulfoximin und Diethylmaleat behandelten Maus (B bzw. D). Die Fluoreszenzintensität des Konjugats aus Monochlorbiman und Glutathion ist in Falschfarben in willkürlichen Einheiten auf einer Skala von Schwarz (niedrig) bis Rot (hoch) dargestellt. Weiße Vierecke markieren Regionen (ROI) mit jeweils 64 Einzelmessungen für die quantitative Auswertung des GSH-Status. Die Balken entsprechen 50 µm. Alv: Alveolargewebe; B: Atemweg (Bronchiolus); BI: Blutgefäß

Innerhalb des Bronchialepithels waren die einzelnen Fluoreszenzintensitäten generell sehr unterschiedlich. Abbildung 23 zeigt die Häufigkeitsverteilungen der Intensitäten in jedem der vier Atemwegssegmente bei Kontrolltieren und BSO + DEM-behandelten Tieren. Jede Verteilung besteht aus insgesamt 2880 gemessenen Fluoreszenzintensitäten, die sich aus 15 Regionen (ROI) pro Tier mit jeweils 64 Einzelmessungen pro ROI und drei Tieren pro Behandlungsgruppe zusammensetzen. Bei Kontrollmäusen war in den proximalen Bronchi eine große Bandbreite an Fluoreszenzintensitäten über einen Bereich von 0 bis ca. 2500 willkürlichen Einheiten vorhanden. Die meisten Intensitäten lagen dabei zwischen 450 und 1100 willkürlichen Einheiten. In distaler Richtung der Atemwegssegmente waren die Häufigkeitsverteilungen bei den Kontrolltieren zu immer niedrigeren Intensitäten hin verschoben. In den terminalen Bronchioli von Kontrollmäusen wurden oberhalb von 1300 willkürlichen Einheiten keine Fluoreszenzintensitäten gemessen; das Maximum der Häufigkeitsverteilung lag zwischen 100 und 500 willkürlichen Einheiten (Abbildung 23).

Nach Behandlung von Mäusen mit BSO + DEM waren die Häufigkeitsverteilungen in allen vier Atemwegssegmenten nahezu identisch mit den Fluoreszenzintensitäten in einem sehr engen Bereich zwischen 0 und 500 willkürlichen Einheiten und einem Häufigkeitsmaximum bei ca. 100 willkürlichen Einheiten (Abbildung 23).



Abbildung 23: Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzintensitäten des Konjugats aus Monochlorbiman und Glutathion im Epithel der vier Atemwegssegmente von Kontrollmäusen (schwarze Symbole) und Mäusen, die mit L-Buthioninsulfoximin und Diethylmaleat (weiße Symbole) behandelt waren (siehe Abschnitt 2.2.1). Die Symbole repräsentieren die absoluten Häufigkeiten der Fluoreszenzintensitäten aus 2880 Messungen pro Atemwegssegment von drei Tieren mit jeweils 15 Regionen und 64 Einzelmessungen pro Region. Jede Fluoreszenzintensität wurde um den allgemeinen Fluoreszenzhintergrund von 119 willkürlichen Einheiten korrigiert (siehe Abschnitt 2.5).

Die Quantifizierung von GSH in Gefrierschnitten der Mauslunge ist unter der Voraussetzung möglich, dass die Reaktion von MCB mit GSH spezifisch für GSH ist. Zur Überprüfung der Spezifität wurden deshalb mögliche unspezifische Reaktionen von MCB im Lungenhomogenat untersucht und anschließend rechnerisch auf Gefrierschnitte übertragen (siehe Abschnitt 2.5). Der Anteil der Fluoreszenz aufgrund unspezifischer Reaktionen von MCB entsprach der Differenz der Fluoreszenzintensitäten im Lungenhomogenat MCB-inflatierter Mäuse vor und nach der Fällung hochmolekularer Zellbestandteile. Da die Bestimmung dieses Anteils umso genauer wird, je geringer die GSH-Konzentration und die damit verbundene Fluoreszenz des MCB-GSH-Konjugats im Homogenat ist, wurde für die Untersuchungen das Lungenhomogenat einer BSO + DEM-behandelten Maus mit einem Restgehalt von 3 nmol GSH/mg Protein eingesetzt. Nach der Fällung der Proteine des Homogenats betrug der Anteil der unspezifischen Fluoreszenz von MCB 66% an der Gesamtfluoreszenz (Abbildung 24). In Gefrierschnitten betrug der Mittelwert aller Summen der Einzelintensitäten über alle ROI und alle Atemwegssegmente von den drei BSO + DEMbehandelten Tieren (SI_{total} · siehe Abschnitt 2.5) 13894 willkürliche Einheiten. Bei einer Annahme von einem Anteil von 66% unspezifischer Bindungen von MCB, wie im Lungenhomogenat bestimmt, ergab sich für Gefrierschnitte ein Hintergrundwert (Slunspezifisch) von 9170 willkürlichen Einheiten. Dieser Wert wurde bei der Quantifizierung von GSH von jeder Summe der Einzelintensitäten in einem ROI (SI^{ROI}) subtrahiert. Je nach GSH-Gehalt der Atemwegssegmente entsprach der Hintergrundwert zwischen 11% (mittlere Bronchioli der gegen 40 ppm Styrol exponierten Tiere; Tabelle 2) und 40% der Gesamtfluoreszenz (terminale Bronchioli der Kontrolltiere; Tabelle 1).



Abbildung 24: Bestimmung des Anteils der Fluoreszenz der unspezifischen Bindungen von Monochlorbiman (MCB) im Lungenhomogenat. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität des Konjugats aus MCB und Glutathion im Lungenhomogenat einer mit L-Buthioninsulfoximin und Diethylmaleat behandelten Maus (siehe Abschnitt 2.2.1) vor und nach der Fällung von Proteinen mit Acetonitril (siehe Abschnitt 2.4) bestimmt. Der Anteil der unspezifischen Bindung von MCB ergibt sich aus der Differenz beider Messungen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dreier Messungen.

Die gewogenen Mittel der Summen der Einzelintensitäten der ROIs ($\overline{SI}_{gewogen}^{Segment}$; siehe Abschnitt 2.4) als Maß für den GSH-Gehalt in den Atemwegssegmenten von Kontrolltieren und BSO + DEM-behandelten Tieren sowie die daraus berechneten GSH-Gehalte in nmol/mg Protein sind in Tabelle 1 zusammengefasst. In Kontrolltieren wurden die mit 46224 ± 17748 willkürliche Einheiten bzw. 13,5 ± 5,2 nmol/mg Protein höchsten GSH-Gehalte in den proximalen Bronchi bestimmt. In distaler Richtung der Atemwegssegmente nahm der GSH-Gehalt bis auf 13444 ± 6971 willkürlichen Einheiten bzw. 3,9 ± 2,0 nmol/mg Protein in den terminalen Bronchioli ab. Nach der Behandlung von Mäusen mit BSO + DEM betrugen die GSH-Gehalte in allen Atemwegssegmenten lediglich 14 - 24% der entsprechenden Kontrollwerte. Die größte

Abnahme der GSH-Konzentration fand dabei in den terminalen Bronchioli, die ge-

ringsten Abnahme in den mittleren Bronchi statt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Glutathion (GSH) als Summe der Fluoreszenzintensitäten ($\overline{SI}_{gewogen}^{Segment}$) des Konjugats aus Monochlorbiman und GSH sowie der berechnete GSH-Gehalt im Bronchialepithel verschiedener Atemwegssegmente von Kontrollmäusen und von Mäusen, die mit L-Buthioninsulfoximin (BSO) und Diethylmaleat (DEM) behandelt waren (siehe Abschnitt 2.2.1).

A .	GSH, Kontro	olle	GSH, BSO + DEM		
Atemwegssegment	S ^{Segment} # [willkürliche Einheiten]	Gehalt [†] [nmol/mg Protein]	SI ^{gewogen} [willkürliche Einheiten]	Gehalt [†] [nmol/mg Protein]	
proximale Bronchi	46224 ± 17748 (3-4) [§]	13,5 ± 5,2	6520 ± 5160* (2-3) [§]	1,9 ± 1,5*	
mittlere Bronchi	32218 ± 12730 (4-5) [§]	$9,4 \pm 3,7$	7578 ± 5187* (3-4) [§]	2,2 ± 1,5*	
distale Bronchioli	20536 ± 10276 (5) [§]	$6,0 \pm 3,0$	4274 ± 3424* (3-5) [§]	1,2 ± 1,0*	
terminale Bronchioli	13444 ± 6971 (5) [§]	$3,9 \pm 2,0$	1864 ± 2768* (5) [§]	$0,5 \pm 0,8^{*}$	

[#]gewogenes Mittel der Summen der Einzelintensitäten ± gewogene Standardabweichung (n = 45) von drei Tieren mit jeweils 15 ausgewerteten Regionen (ROI) pro Segment und Tier

[§]Anzahl der ausgewerteten Atemwege pro Tier in Klammern

[†] berechnet auf Grundlage eines GSH-Gehalts von 6,0 nmol/mg Protein in den distalen Atemwegen von Kontrollmäusen (Plopper et al., 2001)

* statistisch signifikant verschieden vom entsprechenden Kontrollwert (p < 0,05)

3.2 Exposition gegen Styrol - Glutathionstatus und Zellproliferation in der Mauslunge

3.2.1 Glutathion in der Gesamtlunge im Verlauf dreitägiger Expositionen

Abbildung 25 zeigt die Änderung des mit dem neuen Verfahren ermittelten GSH-Gehalts im Lungenhomogenat von Mäusen über einen Zeitraum von drei Tagen während und nach bis zu 6 h/Tag andauernden Expositionen gegen 40 und 160 ppm Styrol. Am Ende jeder Expositionsperiode nahmen - mit Ausnahme der Exposition gegen 40 ppm Styrol am Tag 2 - die mittleren GSH-Gehalte konzentrationsabhängig um bis zu 47% im Vergleich zum Wert zu Beginn der jeweiligen Exposition ab. Im Anschluss an einmalige Expositionen stiegen die GSH-Gehalte unabhängig von der Expositionskonzentration innerhalb von 18 h auf 110% des Kontrollwertes an. Bis zu drei Tage nach den einmaligen Styrolexpositionen waren die GSH-Gehalte nicht signifikant (40 ppm) bzw. signifikant (160 ppm) gegenüber dem Kontrollwert erhöht. Nach zweimaligen Expositionen der Tiere waren die GSH-Gehalte 18 h nach Expositionsende mit 135% des Kontrollwerts bei beiden Expositionsgruppen signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Sie lagen selbst nach 24 h noch bei 112% (40 ppm) bzw. 117% (160 ppm) des Kontrollwertes. Bei dreifacher Styrolexposition waren die GSH-Gehalte zum Expositionsende ähnlich hoch wie der Kontrollwert (40 ppm) bzw. nur etwas geringer als dieser (160 ppm).



Abbildung 25: Gehalt an Glutathion (GSH) im Lungenhomogenat von Mäusen während und nach einer, zwei oder drei aufeinanderfolgenden Expositionen gegen Styrolkonzentrationen von 40 ppm (Kreise) oder 160 ppm (Dreiecke) über Periodendauern von jeweils 6 h (graue Balken; täglich 9 - 15 Uhr). Die schwarze Raute repräsentiert Mittelwert und Standardabweichung (n = 10) des Kontrollwerts. Rote Symbole zeigen Messdaten von Tieren, die nur während der ersten Periode exponiert wurden. Grüne Symbole reflektieren Messdaten von Tieren, die während der ersten und der zweiten Periode exponiert wurden. Blaue Symbole stellen Messdaten von Tieren dar, die während der drei Perioden exponiert wurden. Die Symbole für die exponierten Tiere stellen entweder Einzelwerte oder Mittelwerte und Standardabweichungen dar mit n = 3 für die ein- und zweimalig exponierten Tiere GSH-Gehalte von exponierten Tieren zu Beginn und Ende der Expositionsperioden (40 ppm Styrol, gestrichelt; 160 ppm Styrol, durchgezogen).

* statistisch signifikant verschieden vom Kontrollwert (p < 0,05)

statistisch signifikant verschieden vom GSH-Gehalt zu Beginn der jeweiligen Expositionsperiode (p < 0,05)</p>

3.2.2 Glutathion im Bronchialepithel nach dreitägigen Expositionen

Unmittelbar nach Beendigung der letzten von drei aufeinanderfolgenden Expositionen gegen Styrol mit Konzentrationen von 40 bzw. 160 ppm wurden die Lungen der exponierten Tiere sowie von Kontrollmäusen mit MCB inflatiert und der GSH-Gehalt im Bronchialepithel verschiedener Atemwegssegmente bestimmt (siehe Abschnitt 2.5). Bei mikroskopischer Betrachtung waren die Fluoreszenzintensitäten des für GSH charakteristischen MCB-GSH-Konjugats im Epithel aller Atemwegssegmente verglichen mit den Kontrollen leicht erhöht, wie in Abbildung 26 beispielhaft für die terminalen Bronchioli dargestellt ist.



Abbildung 26: Fluoreszenz- und entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten von Lungen einer Kontrollmaus und von Styrol-exponierten Mäusen. Die Fluoreszenzintensität des Konjugats aus Monochlorbiman und Glutathion ist in Falschfarben in einer willkürlichen Einheit auf einer Skala von Schwarz (niedrig) bis Rot (hoch) dargestellt. Die Zellproliferation wurde anhand der braunen Pigmentierung (Pfeile) nach der immunhistochemischen Anfärbung von Bromdesoxyuridin analysiert und daraus der "Unit length labelling index" als quantitatives Mass für die Zellproliferation bestimmt (siehe Abschnitt 2.6). Die Balken entsprechen 50 µm. Alv: Alveolargewebe; B: Atemweg (Bronchiolus); BI: Blutgefäß

Die quantitative Auswertung der GSH-Gehalte im Bronchialepithel nach dreitägiger Exposition gegen 40 und 160 ppm Styrol ist in Tabelle 2 als Fluoreszenzintensität und in Tabelle 3 als berechneter Wert dargestellt. Hierbei wurde zunächst nicht zwischen proliferierenden und nicht-proliferierenden Bereichen unterschieden. Die Zunahme des GSH-Gehalts war generell nach 40 ppm Styrol stärker ausgeprägt als nach 160 ppm Styrol. Der höchste Anstieg des GSH-Gehalts fand sich in den distalen Bronchioli mit 167% des Kontrollwertes (40 ppm Styrol) bzw. mit 118% des Kontrollwertes (160 ppm Styrol). Die geringste Zunahme wurde bei beiden Expositionskonzentrationen in den proximalen Bronchi beobachtet. Der relative Unterschied der GSH-Gehalte zwischen proximalen Bronchi und terminalen Bronchioli war mit Werten zwischen 43 und 46% unabhängig von Styrolexposition bei Kontrollen und exponierten Tieren gleich (Tabellen 2 und 3).

Tabelle 2: Gehalt an Glutathion (GSH) als Summe der Fluoreszenzintensitäten ($\overline{SI}_{gewogen}^{Segment}$) des Konjugats aus Monochlorbiman und GSH im Bronchialepithel verschiedener Atemwegssegmente der Lunge von jeweils 6 Mäusen, unabhängig vom Status der Zellproliferation, nach dreitägiger Exposition (6 h/Tag) gegen Styrol.

Atemweasseament	SI _{gewogen} [#] [willkürliche Einheiten]			
	Kontrolle	40 ppm Styrol	160 ppm Styrol	
proximale Bronchi	57719 ± 26016 (85) [§]	71400 ± 33405* (112) [§]	61201 ± 19299 (105) [§]	
mittlere Bronchi	47113 ± 17199 (110) [§]	74060 ± 25361* (121) [§]	$52413 \pm 22155 (105)^{\$}$	
distale Bronchioli	37968 ± 14688 (110) [§]	63423 ± 25545* (126) [§]	44985 ± 19924* (125) [§]	
terminale Bronchioli	31093 ± 10243 (115) [§]	38830 ± 17252* (109) [§]	34713 ± 16824 (117) [§]	

[#] gewogenes Mittel der Summen der Einzelintensitäten ± gewogene Standardabweichung

[§] Gesamtzahl der ausgewerteten Regionen (ROI) von 6 Tieren in Klammern

* statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle (p < 0,05)

Tabelle 3: Gehalt an Glutathion (GSH) im Bronchialepithel verschiedener Atemwegssegmente der Lunge von jeweils 6 Mäusen, unabhängig vom Status der Zellproliferation, nach dreitägiger Exposition (6 h/Tag) gegen Styrol, berechnet aus den Werten aus Tabelle 2 auf Grundlage eines GSH-Gehalts von 6,0 nmol/mg Protein in den distalen Atemwegen von Kontrollmäusen (Plopper et al., 2001).

Atomucacoamont	Gehalt [#] [nmol/mg Protein]				
Atemwegssegment	Kontrolle	40 ppm Styrol	160 ppm Styrol		
proximale Bronchi	9,1 ± 4,1	11,3 ± 5,3*	$9,7 \pm 3,0$		
mittlere Bronchi	$7,4 \pm 2,7$	$11,7 \pm 4,0^*$	$8,3 \pm 3,5$		
distale Bronchioli	$6,0 \pm 2,3$	$10,0 \pm 4,0^{*}$	7,1 ± 3,1*		
terminale Bronchioli	$4,9 \pm 1,6$	6,1 ± 2,7*	5,5 ± 2,7		

[#] Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 6)

* statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle (p < 0,05)

3.2.3 Zellproliferation im Bronchialepithel nach dreitägigen Expositionen

Die Bestimmung der Zellproliferation nach dreitägiger Exposition (6 h/Tag) gegen Styro erfolgte anhand der immunhistochemischen Anfärbung von BrdU in den identischen Atemwegen der Gefrierschnitte von Mauslungen, in denen die GSH-Gehalte bestimmt wurden. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung waren im Epithel aller Atemwegssegmente von Kontrollmäusen nur sehr wenige Zellen BrdU-positiv, d.h. die Anzahl der proliferierenden Zellen war sehr gering (Abbildung 26). Auch im Alveolargewebe waren nur vereinzelt proliferierende Zellen zu sehen. Nach der Exposition gegen 40 und 160 ppm Styrol hingegen war die Anzahl BrdU-positiver Zellen in allen Atemwegssegmenten im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht (Abbildung 26). Im Lichtmikroskop erschien die Anzahl der proliferierenden Zellen in beiden Expositionsgruppen ähnlich hoch. Bei den Styrol-exponierten Tieren traten zudem vereinzelt kleinere Anhäufungen ("Cluster") BrdU-positiver Epithelzellen auf. Auch im Alveolargewebe der Styrol-exponierten Tiere wurden vermehrt BrdU-positive Zellen beobachtet. Es wurden keine weiteren morphologischen Veränderungen der Atemwege, wie beispielsweise eine Zunahme von Gobletzellen (z.B. in Khan et al., 2009), gefunden.

Die quantitative Auswertung der Zellproliferation ist in Tabelle 4 dargestellt. Bei den Kontrolltieren zeigte sich von proximalen Bronchi zu den terminalen Bronchioli hin eine Abnahme des ULLI um den Faktor 4. Die Exposition gegen Styrol führte mit Ausnahme der mittleren Bronchioli in allen anderen Atemwegssegmenten konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der Zellproliferation. Besonders stark ausgeprägt war diese in den terminalen Bronchioli mit um Faktor 9 (40 ppm) bzw. Faktor 10 (160 ppm) höheren Werten als in Kontrolltieren.

Atomwogesogmont	ULLI ^{#,§}			
Aleinwegssegnieni	Kontrolle	40 ppm Styrol	160 ppm Styrol	
proximale Bronchi	11,7 ± 7,5	19,4 ± 11,6	23,1 ± 13,9	
mittlere Bronchioli	$6,7 \pm 3,0$	$5,0 \pm 5,2$	$4,5 \pm 4,5$	
distale Bronchioli	3,6 ± 2,1	$8,8 \pm 4,3$	$12,5 \pm 6,3^*$	
terminale Bronchioli	$3,2 \pm 2,9$	27,8 ± 8,1*	32,5 ± 3,7*	

Tabelle 4: Zellproliferation im Bronchialepithel verschiedener Atemwegssegmente der Lunge von jeweils 6 Mäusen nach dreitägiger Exposition (6 h/Tag) gegen Styrol.

[#] "Unit length labelling index" (Anzahl der Bromdesoxyuridin-positiven Zellen/mm Basalmembran) [§] Mittelwert ± Standardabweichung (n = 6)

* statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle (p < 0,05)

3.2.4 Zusammenhang zwischen Glutathionstatus und Zellproliferation

Die quantitaive Auswertung der GSH-Gehalte in den Atemwegen getrennt nach proliferierenden und nicht-proliferierenden Bereichen ist in Tabelle 5 als Fluoreszenzintensitäten und in Tabelle 6 als berechnete Werte zusammengefasst. Mit einer einzigen Ausnahme (distale Atemwege bei Kontrolltieren) sind die GSH-Gehalte unabhängig vom Atemwegssegment sowie unabhängig von der Exposition gegen Styrol in allen proliferierenden bzw. BrdU-positiven Bereichen des Bronchialepithels geringer als die GSH-Gehalte in den entsprechenden nicht-proliferierenden bzw. BrdUnegativen Bereichen. Bei den Kontrolltieren nahmen die GSH-Gehalte von den proximalen Bronchi zu den terminalen Bronchioli sowohl in den proliferierenden als auch in den nicht-proliferierenden Bereichen um den Faktor 2 ab. Diese graduelle Abnahme des GSH in distaler Richtung der Atemwege blieb nach der Exposition gegen 40 und 160 ppm Styrol in nahezu allen untersuchten Segmenten unabhängig vom Proliferationsstatus der Zellen erhalten. Zu beachten ist jedoch, dass die Anfärbung mit BrdU zwar angibt, dass sich Zellen während der drei Expositionstage in der S-Phase der Zellteilung befunden haben, letztlich aber keine Informationen zum genauen Zeitpunkt der Proliferation liefert. Daher lässt sich mit dieser Methode kein kausaler Zusammenhang zwischen GSH-Gehalt und Zellproliferation herstellen.

Tabelle 5: Gehalt an Glutathion (GSH) als Summe der Fluoreszenzintensitäten des Konjugats aus Glutathion und Monochlorbiman (SI^{gewogen}) in proliferierenden (BrdU⁺) und nicht-proliferierenden (BrdU⁻) Bereichen des Bronchialepithels verschiedener Atemwegssegmente der Mauslunge nach dreifägiger Exposition (6 h/Tag) gegen Styrol.

Atemwegssegment	Si ^{Segment} #, Kontrolle		Si ^{Segment} #, 40 ppm Styrol		SI ^{Segment} #, 160 ppm Styrol	
	BrdU⁻	BrdU⁺	BrdU⁻	BrdU⁺	BrdU [−]	BrdU⁺
proximale Bronchi	60280 ± 26611 (63) [§]	50383 ± 23231 (22) [§]	78421 ± 34109 (66) [§]	58529 ± 28214* (36) [§]	62607 ± 19590 (68) [§]	$58617 \pm 18739 (37)^{\$}$
mittlere Bronchi	48736 ± 17380 (89) [§]	40238 ± 14891* (21) [§]	76369 ± 24438 (105) [§]	[§] 58909 ± 24044* (16) [§]	53116 ± 22359 (94) [§]	$46410 \pm 20231 (11)^{\$}$
distale Bronchioli	37243 ± 13920 (102) [§]	41186 ± 16141 (23) [§]	66021 ± 25425 (97) [§]	54731 ± 24397* (29) [§]	46283 ± 21751 (92) [§]	$41365 \pm 13210 (33)^{\$}$
terminale Bronchioli	31791 ± 9915 (104) [§]	24487 ± 8320* (11) [§]	41926 ± 17405 (44) [§]	$36734 \pm 16961 (65)^{\$}$	41268 ± 16681 (49) [§]	$29989 \pm 15462^{*} (68)^{\$}$

[#] gewogenes Mittel der Summen der Einzelintensitäten ± gewogene Standardabweichung [willkürliche Einheiten] [§] Gesamtzahl der ausgewerteten Regionen (ROI) von 6 Tieren in Klammern

* statistisch signifikant verschieden von den entsprechenden Bereich nicht-proliferierender Zellen (p < 0,05)

Tabelle 6: Gehalt an Glutathion (GSH) in proliferierenden (BrdU⁺) und nicht-proliferierenden (BrdU⁻) Bereichen des Bronchialepithels verschiedener Atemwegssegmente der Mauslunge nach dreitägiger Exposition (6 h/Tag) gegen Styrol, berechnet aus den Werten aus Tabelle 5 auf Grundlage eines GSH-Gehalts von 6,0 nmol/mg Protein in den distalen Atemwegen von Kontrollmäusen (Plopper et al., 2001).

Atemwegssegment ——	GSH [#] , ⊮	GSH [#] , Kontrolle		GSH [#] , 40 ppm Styrol		GSH [#] , 160 ppm Styrol	
	BrdU ⁻	BrdU⁺	BrdU⁻	BrdU⁺	BrdU⁻	BrdU⁺	
proximale Bronchi	9,7 ± 4,3	8,1 ± 3,7	12,6 ± 5,5	$9,4 \pm 4,5^{*}$	10,1 ± 3,2	9,4 ± 3,0	
mittlere Bronchi	$7,9 \pm 2,8$	$6,5 \pm 2,4^*$	12,3 ± 3,9	$9,5 \pm 3,9^*$	$8,6 \pm 3,6$	$7,5 \pm 3,3$	
distale Bronchioli	$6,0 \pm 2,2$	$6,6 \pm 2,6$	10,6 ± 4,1	$8,8 \pm 3,9^*$	7,5 ± 3,5	6,7 ± 2,1	
terminale Bronchioli	5,1 ± 1,6	3,9 ± 1,3*	$6,8 \pm 2,8$	$5,9 \pm 2,7$	$6,6 \pm 2,7$	$4,8 \pm 2,5^*$	

[#] Mittelwert ± Standardabweichung (n = 6) [nmol GSH/mg Protein]

* statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle (p < 0.05)

4 Diskussion

4.1 Eine neue Methode zur Bestimmung von Glutathion in der Lunge

Die hier erarbeitete Methode für die GSH-Bestimmung in der Mauslunge basiert auf der durch endogene GSTs katalysierten Konjugation von MCB mit GSH. Die GST-Abhängigkeit dieser Reaktion wurde *in vitro* durch die eigenen Untersuchungen (Abschnitt 3.1.1) sowie durch Untersuchungen anderer (Bellomo et al., 1992; Fernández-Checa und Kaplowitz, 1990; Shrieve et al., 1988) in An- und Abwesenheit von GSTs im Cytosol der Rattenleber belegt. Welche GST-Isoenzyme im Einzelnen die Konjugation katalysieren, ist nicht bekannt.

Generelle Test-Bedingungen

Für die *In-situ*-Inflation der Mauslunge mit MCB wurde eine Konzentration von 2,25 mmol/l MCB gewählt. Bei der Inflation einer Mauslunge wurden zwischen 1,5 und 3 ml der MCB-Lösung verbraucht. Dies entspricht einer absoluten MCB-Menge zwischen 3,4 und 6,75 µmol. Bei einem GSH-Gehalt der Mauslunge von 1,69 µmol/g Frischgewicht (Martensson et al., 1989) und einem Lungengewicht von 0,14 g (24 g Körpergewicht; Lyerla et al., 2003) besteht bei der Inflation somit ein 14- bis 28facher molarer Überschuß von MCB gegenüber GSH. Dass die Konzentration von MCB für eine vollständige Konjugation des pulmonären GSH ausreichend war, zeigte sich bei Verwendung der doppelten MCB-Konzentration für die Inflation, bei der identische GSH-Gehalte bei Kontrolltieren gemessen wurden. Die höhere MCB-Konzentration war allerdings für die Bestimmung sehr niedriger GSH-Gehalte aufgrund des vergleichsweise hohen Hintergrundwertes der Fluoreszenz von freiem MCB ungeeignet. Eine nur halb so hohe MCB-Konzentration für die Inflation erschien hingegen nicht auszureichen, um die Konjugatbildung des pulmonären GSH

innerhalb einer angemessenen Inflationszeit abzuschließen (Abbildung 21). Die Invitro-Studien belegen, dass die Konjugatbildung zwischen MCB (0,45 mmol/l) und GSH (0,2 mmol/l) nach 20 min abgeschlossen war. Diese Reaktionszeit stimmt sehr gut mit der Zeit von 16 min überein, die den kinetischen Daten von Shrieve et al. (1988) zufolge bei dieser GSH-Konzentration und einer maximalen Bildungsgeschwindigkeit des Konjugats von 12,5 µmol/min zu erwarten war. Bei der In-situ-Inflation der Lunge mit MCB hingegen lag bereits nach 5 min (frühester Messzeitpunkt) das gesamte freie GSH als MCB-GSH-Konjugat vor, wie die Bestimmungen des GSH-Gehaltes nach unterschiedlichen Inflationszeiten zeigten. Dass die Reaktion in der Zelle tatsächlich schneller als im Lösungsgemisch abläuft, wird auch durch Studien mit Hepatozyten (Fernández-Checa und Kaplowitz, 1990) und Chinese hamster ovary (CHO)-Zellen (Rice et al., 1986) bestätigt, wonach die vollständige Konjugatbildung innerhalb von 2 bzw. 4 min erfolgte. Die in intakten Zellen im Vergleich zum artifiziellen Lösungsgemisch wesentlich kürzere Zeit bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenz könnte auf möglicherweise unterschiedliche GST-Aktivitäten in der Zelle und im Lösungsgemisch zurückzuführen sein. Da in vitro die vollständige Reaktion von GSH mit MCB eine 20-minütige Inflationsdauer erforderte und die maximale Fluoreszenz in vitro sowie in vivo über mindestens 60 min konstant war (siehe Abschnitt 3.1.1), wurde bei dem neuen Verfahren generell mit einer Inflationszeit von 20 min gearbeitet.

Auf die verlässliche Bestimmung von GSH im Lungenhomogenat hatte die Proteinkonzentration über einen weiten Bereich (Faktor 30 bei Kontrolltieren; Abbildung 17) keinen Einfluss. Da mit dem erarbeiteten Protokoll zur Gewebeaufbereitung die Proteinkonzentration im Lungenhomogenat etwa in der Mitte dieses Bereichs lag, konnten mögliche Schwankungen der Proteinkonzentration, wie sie beispielsweise durch unterschiedlich stark inflatiertes Lungengewebe bedingt sein könnten, leicht ausgeglichen werden.

Für die Bestimmung von GSH in Gefrierschnitten der Lunge erwies sich eine Schnittdicke von 10 µm als optimal. Diese ermöglichte die maximale Fluoreszenzausbeute bei der lichtmikroskopisch noch zweifelsfreien Identifikation der Lungenstrukturen (Atemwege, Blutgefäße usw.). Zudem wurde durch die Wahl einer Schnittdicke, die kleiner war als die Zellgröße von Clarazellen (ca. 15 µm; Pack et al., 1981), mögliche Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen angeschnittenen und ganzen Zellen ausgeschlossen. Eine Identifizierung einzelner Zelltypen (z.B. Clarazellen, zilierte Zellen) konnte bei dieser Schnittdicke mit dem Lichtmikroskop nicht erfolgen. Bei der Anwendung spezifischer histochemischer Verfahren sollte dies allerdings möglich sein; beispielsweise wurden in der vorliegenden Arbeit proliferierende Zellen mittels einer immunhistochemischen Nachweistechnik detektiert. Für die Bestimmung von GSH im Gefrierschnitt ist generell zu beachten, dass die Fluoreszenzmessung des MCB-GSH-Konjugats vor der histochemischen Färbung zu erfolgen hat, da ansonsten das lösliche Konjugat durch Wasch- und Färbeprozesse aus dem Gefrierschnitt entfernt wird.

GSH-Bestimmung im Homogenat

Eine wesentliche Voraussetzung für die korrekte Quantifizierung von GSH mit der hier entwickelten Methode war die Spezifität der Reaktion von MCB mit GSH. Bei der Bestimmung von GSH im Lungenhomogenat oder -cytosol konnte eine unspezifische Reaktion von MCB mit Makromolekülen wegen derer Fällung mit Acetonitril und anschließender Zentrifugation ausgeschlossen werden. In der Gesamtlunge wären unspezifische Reaktionen von MCB somit nur mit nichtfällbaren, niedermolekularen Zellbestandteilen möglich. Da die Konjugation von MCB mechanistisch über nukleophile Substitution abläuft, kämen für mögliche unspezifische Reaktionen insbesondere SH-haltige Moleküle in Frage. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass mit NAC als Modellsubstanz für niedermolekulare Thiole, im Gegensatz zu der Reaktion mit GSH, weder eine spontane noch eine GST-katalysierte Reaktion mit MCB stattfand (Abbildung 19). Auch reagierte MCB nicht mit den Thiolen Dithiothreitol und Cystein (Fernández-Checa und Kaplowitz, 1990). Dies legt den Schluss nahe, dass die GST-vermittelte Reaktion von MCB bei niedermolekularen Thiolen tatsächlich spezifisch mit GSH abläuft.

Die Reaktion von MCB mit GSH wurde bereits früher für die Quantifizierung von GSH eingesetzt. Hierbei wurde Leberhomogenat von Ratten mit MCB versetzt und der Gehalt des Tripeptids erst nach Ablauf der In-vitro-Konjugation mit GSH fluorometrisch bestimmt (Kamencic et al., 2000). Im Gegensatz hierzu erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Reaktion von MCB mit GSH bereits während der Inflation der Mauslunge. Dadurch wurde die Gefahr einer Oxidation von GSH während der Präparation und Gewebeaufbereitung bis zum Messzeitpunkt ausgeschlossen. Aus diesem Grund dürfte das in der vorliegenden Arbeit präsentierte Verfahren auch dem weit verbreiteten GSH-Recycling-Test sowie der direkten GSH-Bestimmung im Gewebehomogenat mittels HPLC-Analyse und elektrochemischer Detektion überlegen sein. Allerdings wurden mit den drei Methoden sehr ähnliche Ergebnisse erhalten, was wiederum die Richtigkeit der GSH-Bestimmung mittels des MCB-Tests bestätigt. So wurde hier im Lungenhomogenat von Kontrolltieren mit dem MCB-Test ein GSH-Gehalt von 22,8 ± 0,9 nmol GSH/mg Protein und mit dem GSH-Recycling-Test einer von 19,0 ± 4,3 nmol/mg Protein gemessen. Jaeschke und Wendel (1986) publizierten für die Mauslunge ein mit dem GSH-Recycling-Test erhaltenen GSH-Gehalt von 18,0 ± 1,7 nmol GSH/mg Protein; mittels elektrochemischer Detektion nach HPLC-Analyse ermittelten Phimister et al. (2004) einen Wert von ca. 22 nmol GSH/mg Protein.

Der weite lineare Bereich der MCB-Methode von 2 bis 200 µmol/l GSH (Abbildungen 17 und 18) erlaubt die verlässliche Quantifizierung von GSH im Lungenhomogenat oder –cytosol bei sehr unterschiedlichem GSH-Status. Die bei der Anwendung des Standardprotokolls üblicherweise gemessenen GSH-Konzentrationen von etwa 30 µmol/l (Homogenat) und 60 µmol/l (Cytosol) bei Kontrolltieren liegen etwa in der Mitte des Bestimmungsbereichs. Deshalb sollten auch erhöhte GSH-Gehalte in der Lunge, wie sie bei Mäusen bei Rebounds infolge einer vorangegangenen Depletion von GSH vorkommen können (bis zum 2,7fachen des Kontrollwerts; West et al., 2000a), problemlos zu erfassen sein. Bei einem Detektionslimit von 0,4 µmol/l GSH bzw. einer Quantifizierungsgrenze von 2 µmol/l GSH können mit dem MCB-Test Abnahmen der GSH-Konzentration um etwa 95% des Kontrollwerts im Lungenhomogenat und -cytosol nachgewiesen werden können. Damit ist das neuentwickelte Verfahren vergleichbar sensitiv wie der etablierte GSH-Recycling-Test mit einer Bestimmungsgrenze von 1 µmol/l (Tietze, 1969).

GSH-Bestimmung im Gefrierschnitt

Anders als im Homogenat, wo hochmolekulare Zellbestandteile entfernt wurden, fanden im Gefrierschnitt unspezifische Reaktionen von MCB mit Makromolekülen statt (siehe Abschnitt 3.1.2). Eine Fluoreszenz aufgrund unspezifischer Reaktionen von MCB hat insbesondere bei niedrigen GSH-Konzentrationen einen hohen Einfluss auf das Messergebnis und führt, falls sie nicht korrigiert wird, zu einer deutlichen Überschätzung des GSH-Gehalts.

In früheren Studien wurde GSH in histologischen Schnitten von Mauslungen (Forkert und Moussa, 1993; Moussa und Forkert, 1992) und Rattenlungen (Asghar et al., 1975) sowie von Mauslebern (Forkert und Moussa, 1993) mit histochemischen Färbungen mittels thiolreaktiver Farbstoffe wie Mercury Orange (Asghar et al., 1975; Chieco und Boor, 1983), Mersalyl (Sippel, 1978) oder DACM (Ogawa und Taneda, 1979) detektiert. Der Nachweis von GSH mit Mercury Orange und Mersalyl beruht auf der unspezifischen Reaktion der quecksilberhaltigen Farbstoffe mit Thiolen und der Präzipitation der entstandenen Komplexe im Gefrierschnitt. Eine gewisse Spezifität der Reaktion gegenüber GSH wurde bei tiefen Temperaturen (2 - 5℃) sowie kurzer Inkubationszeit (5 - 10 min) erzielt (Chieco und Boor, 1983). In eigenen Vorversuchen mit Mercury Orange und Mersalyl waren die Anfärbungen von GSH in der Mauslunge jedoch nicht reproduzierbar, möglicherweise aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Färbung bei den gewählten Versuchsbedingungen. Der Nachweis von GSH mit DACM beruht auf der Reaktion des Farbstoffs mit SH-Gruppen zu einem fluoreszierenden Produkt. Doch ist bei dieser Methode ein sehr hoher Hintergrund durch unspezifische Reaktionen mit Proteinen bekannt (Hedley und Chow, 1994), der darauf zurückzuführen sein dürfte, dass, im Gegensatz zu dem hier entwickelten MCB-Methode, die Reaktion nicht die GST-abhängige Katalyse erfordert. Auch immunologische Methoden wurden herangezogen, um GSH mittels Antikörpern im Gewebeschnitt zu detektieren (z.B. Kaufmann et al., 2005). Allerdings wird diskutiert, dass hierbei neben freiem GSH in den Zellen auch proteingebundenes Glutathion

miterfasst wird (Söderdahl et al., 2003). Zusammenfassend lässt sich der GSH-Gehalt in histologischen Schnitten mit den bekannten Techniken im Gegensatz zu der hier entwickelten Methode allenfalls semiquantitativ bestimmen.

Die guantitative Bestimmung des GSH-Gehalts in Atemwegssegmenten erfolgte bisher nur nach der Präparation einzelner Atemwege aus dem Lungengewebe mittels Mikrodissektion. Die Ermittlung des GSH-Gehalts erfolgte dann in den isolierten Atemwegen mittels HPLC-Analyse und elektrochemischer Detektion (Lakritz et al., 1997; Plopper et al., 2001) oder, nach Inkubation mit MCB, mittels Fluoreszenzmikroskopie (Plopper et al., 2001). Letztere GSH-Bestimmungsmethode entspricht aufgrund der Verwendung von MCB für die Fluoreszenzmikroskopie prinzipiell dem hier angewendeten Verfahren. Bisher wurde allerdings nicht berücksichtigt, dass auch bei der Verwendung von MCB eine Hintergrundfluoreszenz durch die Reaktion mit Proteinen unvermeidbar ist. Zudem erfolgt die Reaktion von MCB mit GSH in isolierten Atemwegen erst im Anschluss an die aufwendige, zeitintensive Präparation, was zu inkorrekten Messergebnissen infolge einer möglichen Autoxidation des GSH führen könnte. In der hier entwickelten Methode hingegen wird der GSH-Gehalt zum Inflationszeitpunkt bzw. unmittelbar nach einer Fremdstoffexposition fixiert und ist deshalb mit wesentlich größerer Sicherheit bestimmbar. Ein weiterer, grundsätzlicher Vorteil der Verwendung von Gefrierschnitten gegenüber isolierten Atemwegen ist, dass die GSH-Bestimmung nicht nur in Atemwegen sondern in allen Bereichen der Lunge möglich ist. Auch eröffnet sich, wie hier gezeigt, die Möglichkeit der Analyse weiterer Parameter (z.B. Zellproliferation) in den identischen Atemwegssegmenten, in denen GSH bestimmt wurde.

4.2 Glutathion im Bronchialepithel der Maus

Aus früheren Studien ist bekannt, dass GSH im Bronchialepithel der Maus hauptsächlich in den Clarazellen lokalisiert ist (Moussa und Forkert, 1992) und nur zu einem geringen Teil in den zilierten Zellen zu finden ist (Forkert und Moussa, 1993; Moussa und Forkert, 1992). Des weiteren sind im Bronchialepithel der Maus deutlich mehr Clarazellen als zilierte Zellen vorhanden (Dixon et al., 1999; Pack et al., 1981). Daher ist davon auszugehen, dass die im Gefrierschnitt beobachtete Fluoreszenz in den Atemwegen hauptsächlich auf in den Clarazellen lokalisiertes GSH zurückzuführen war.

Die große Bandbreite der Fluoreszenzintensitäten innerhalb einzelner Atemwegssegmente von Kontrollmäusen zeigt deutliche Unterschiede im GSH-Gehalt von Clarazellen der Mauslunge auf (Abbildung 23). Dieser Befund stimmt hervorragend mit den Ergebnissen anderer Autoren an isolierten Clarazellen (West et al., 2000b), mikrodissektierten Atemwegen (Plopper et al., 2001; West et al., 2000b) und Gefrierschnitten (Forkert und Moussa, 1993; Moussa und Forkert, 1992) der Mauslunge überein. Clarazellen sind eine sehr heterogene Zellpopulation und umfassen letztlich alle nicht-zilierten bronchiolaren Epithelzellen (Pack et al., 1981; Plopper et al., 1980). So könnten verschiedene Subpopulationen von Clarazellen, die sich morphologisch sowie ultrastrukturell stark unterscheiden (Pack et al., 1981; Plopper et al., 1980), eine Ursache für die beobachtete Diversität im GSH-Gehalt sein (West et al., 2000b).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie verdeutlichen auch große Unterschiede im GSH-Gehalt zwischen den einzelnen Atemwegssegmenten von Kontrollmäusen (Tabelle 1). So nahmen die in der vorliegenden Arbeit bestimmten GSH-Gehalte von den proximalen Bronchi zu den terminalen Bronchioli kontinuierlich auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes ab. Als mögliche Ursache diskutierten Plopper et al. (2001) das Vorhandensein der verschiedenen Clarazell-Subpopulationen in den einzelnen Atemwegssegmenten. Diese Autoren fanden mittels Fluoreszenzmikrokopie an mikrodissektierten Atemwegen von Kontrollmäusen ebenfalls in distaler Richtung der Atemwege abnehmende GSH-Gehalte. Allerdings war der intrapulmonale GSH- Gradient in der früheren Untersuchung wesentlich geringer ausgeprägt als in der vorliegenden Arbeit, was auf die fehlende Korrektur der Fluoreszenzintensitäten um den Hintergrundwert der Fluoreszenz aufgrund unspezifischer Bindungen von MCB zurückgeführt werden kann.

Die Behandlung mit BSO + DEM führte bei systemischer Applikation im Bronchialepithel der einzelnen Atemwegssegmente zu Abnahmen des jeweiligen GSH-Gehalts auf 14 - 24% des Kontrollwerts. In Übereinstimmung mit Literaturbefunden (z.B. Phimister et al., 2004, 2005; Himmelstein et al., 1995; Deutschmann und Laib, 1989) scheint es sich hierbei um die maximal mögliche GSH-Depletion in der Mauslunge nach Fremdstoffexpositionen zu handeln.

4.3 Glutathion in der Lunge nach Expositionen gegen Styrol

Glutathionstatus im Homogenat

In der Lunge wird ein beträchtlicher Teil des aufgenommenen Styrols oxidativ verstoffwechselt (Csanády et al., 1994; Filser et al., 1993). Hierbei entstehen vorwiegend Styrol-7,8-oxid und zu einem weitaus geringeren Teil auch ringoxidierte Metaboliten. Bei Ratte und Maus werden diese Stoffwechselprodukte zu einem wesentlichen Teil mit GSH konjugiert (zusammengefasst in IARC, 1994). Über diesen Prozess kann es zu einer Verringerung des intrazellulären GSH-Spiegels in Leber und Lunge kommen, wenn der metabolische Verbrauch von GSH der Neusynthese überwiegt (Csanády et al., 2003). Bisherige Studien haben nach zweitägigen (Filser et al., 2002) bzw. 20-tägigen (Gamer et al., 2004) Expositionen gegen Styrol in Konzentrationen von 40, 80, 160 und 320 ppm bzw. 40 und 160 ppm im Homogenat der Gesamtlunge von Mäusen jeweils am Ende der letzten Exposition GSH-Gehalte gemessen und konzentrationsabhängige Abnahmen von GSH gefunden. Im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen sanken die GSH-Gehalte auf 97% (40 ppm), 66% (80 ppm), 53% (160 ppm, 2 Tage) bzw. 70% (160 ppm, 20 Tage) und 39% (320 ppm). Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen detaillierteren Untersuchungen der Styrol-bedingten GSH-Depletion über drei Expositionstage bestätigen diese früheren Ergebnisse und zeigen darüber hinaus Änderungen des GSH-Status während und nach der täglichen Exposition. Insbesondere verdeutlichen die neuen Daten, dass es bereits am ersten Tag zu einem GSH-Verlust auf 71% (40 ppm) bzw. 53% (160 ppm) des Kontrollwerts kommt. Die auf den Kontrollwert bezogenen geringeren Abnahmen an den darauffolgenden Expositionstagen sind auf den schon im Anschluss an die erste Exposition auftretenden massiven Rebound-Effekt des GSHs zurückzuführen. Tatsächlich sind die konzentrationsabhängigen, täglichen GSH-Depletionen nach jeweils 6 Stunden nahezu konstant, wenn sie auf den GSH-Gehalt zu Beginn des jeweiligen Expositionstags bezogen werden. Als GSH-Rebound wird der nach einer Depletion auftretende Wiederanstieg des GSH verstanden, der durchaus über den Kontrollwert hinausgehen kann. Solche, den Kontrollwert übersteigende GSH-Rebounds wurden bei mehreren Organen und Geweben beobachtet, so z.B. an Rattenleber (Faller, 1998) und Rattennasenmucosa (Faller, 1998; Khan et al., 2009) nach Inhalation von 1,2-Epoxipropan. Für Styrol wurden erhöhte GSH-Gehalte in Mauslungen bisher nur nach inhalativer Exposition gegen 250 bzw. 500 ppm (Morgan et al., 1995) und nach intraperitonealer Applikation von 600 mg/kg (Harvilchuck und Carlson, 2006) beschrieben. Kontrollwerte übersteigende GSH-Rebounds werden oft als Adaptation gegenüber oxidativem Stress interpretiert (z.B. Deneke und Fanburg, 1989; Dickinson et al., 2003). Als Ursache für die im Vergleich zum Kontrollwert erhöhte GSH-Konzentration wird eine vorübergehende Erhöhung der GSH-Syntheseleistung, z.B durch vermehrte Expression der y-Glutamylcysteinligase, nach einer Fremdstoff-induzierten GSH-Depletion diskutiert (Borroz et al., 1994; Tian et al., 1997). Am Beispiel Naphthalin-exponierter Mäuse wurde gezeigt, dass in einzelnen Atemwegssegmenten (terminale Bronchioli) die GSH-Gehalte durch Rebounds sogar bis auf das 2,7fache des Kontrollwerts ansteigen können (West et al., 2000a). Da allerdings ein negativer Feedback-Mechanismus der GSH-Synthese besteht (Meister, 1988; Tian et al., 1997), ist zu erwarten, dass die GSH-Konzentration in der Lunge nach wiederholten Fremdstoff-induzierten GSH-Depletionen nicht über einen Maximalwert hinausgehen kann. Die Dauer bis zum Erreichen eines Rebound-bedingten GSH-Plateaus (minimale Gleichgewichtskonzentration vor Expositionsbeginn) scheint bei 2 – 3 Tagen zu liegen. Dahingehend lassen sich die Ergebnisse nach Styrol-Inhalation interpretieren, denn im Vergleich zum Kontrollwert wurden ähnliche GSH-Abnahmen in der Mauslunge nach dreitägiger (diese Arbeit) und 20-tägiger Styrolexpositionen (Gamer et al., 2004; siehe oben) gefunden. Auch bei 1,2-Epoxipropan-exponierten Ratten war nach drei Tagen der GSH-Plateauwert in der Leber eingestellt (Faller, 1998; Lee, 2002).

Die neuen, in der Gesamtlunge erhobenen GSH-Daten zeigen, dass sowohl nach den eintägigen als auch nach den zweitägigen Expositionen gegen Styrol die mittleren GSH-Konzentrationen am darauffolgenden Tag (nach 18 h) bei beiden Expositionskonzentrationen auf jeweils einen gemeinsamen Wert von 110 bzw. 135% des Kontrollwerts anstiegen, trotz unterschiedlicher, konzentrationsabhängiger Abnahmen des GSH während jeder Expositionsperiode (Abbildung 25). Möglicherweise handelt es sich hierbei um den maximalen Rebound-Effekt, bezogen auf Lungenhomogenat, der nach den vorliegenden Daten schon bei 40 ppm Styrol erzielt wurde. Hierfür sprechen auch Befunde von Gould et al. (2011). Die Autoren hatten nach 5-stündiger Zigarettenrauch-Exposition von Mäusen eine Absenkung des GSH- Spiegels auf 80% des Kontrollwerts beobachtet. Der anschließende Rebound des GSH betrug nach 16 h wie in der vorliegenden Studie 110% des Kontrollwerts. Ein weiterer Hinweis für einen begrenzten Rebound ergibt sich aus der Studie von D'Souza et al. (1988), die 12 h nach einmaliger 1,2-Dichlorethan-Exposition von Mäusen und hierdurch hervorgerufener GSH-Depletion im Lungenhomogenat eine ähnlich hohe Zunahme gegenüber dem Kontrollwert fanden. Nach den hier vorliegenden Daten kann der Rebound nach eintägiger Exposition gegen Styrol (160 ppm) über einen Zeitraum von 48 h anhalten. Damit könnten sich Rebound-Effekte auch bei nachfolgenden Styrolexpositionen auf die GSH-Gehalte zu Expositionsende auswirken. Hieraus lässt sich schließen, dass bei täglichen Expositionen (z.B. bei subchronischen Expositionen) zwischen mindestens 40 und 160 ppm Styrol die gleichen GSH-Konzentrationen im Lungenhomogenat zu erwarten sind, die hier nach drei Tagen gemessen wurden. Diese Folgerung wird durch die Befunde nach 20-tägiger Exposition (Gamer et al., 2004) bestätigt.

Glutathionstatus in den Atemwegen

Die bisher diskutierten Phänomene beziehen sich auf die Messung der GSH-Konzentrationen in der Gesamtlunge. Eine Fremdstoff-induzierte Absenkung der GSH-Konzentration wurde nach *In-vivo*-Expositionen zumeist im Lungenhomonat nachgewiesen. In einzelnen Lungenbereichen der Maus wurde der GSH-Status bisher nur im Zusammenhang mit Applikationen von 1,1-Dichlorethen bzw. Naphthalin untersucht. So wurde nach einmaligen intraperitonealen Gaben verschiedener Dosen von 1,1-Dichlorethen ein dosisabhängiger GSH-Abfall in den Clarazellen des Bronchialepithels und Zellen der Alveolarsepten gefunden (Forkert, 1997; Moussa und Forkert, 1992). Bei detaillierten Untersuchungen zum Mechanismus der Lungentoxizität von Naphthalin wurde nach einmaliger intraperitonealer Verabreichung von 200 mg/kg eine Abnahme des GSH-Gehalts im Epithel der einzelnen Atemwegssegmenten gezeigt. In den proximalen Bronchi war diese am geringsten und in den distalen Bronchioli am deutlichsten (Phimister et al., 2004; Plopper et al., 2001). Nach 7-tägigen Applikationen der gleichen Dosis desselben Stoffs wurde jedoch, verglichen mit dem Kontrollwert, eine Erhöhung des GSH-Gehalts auf 160% in den proximalen Bronchi und auf 270% in den terminalen Bronchioli ermittelt (West et al., 2000a). In der vorliegenden Arbeit wurde nach dreitägiger Inhalation bei 40 und 160 ppm Styrol ebenfalls eine Zunahme des GSH-Gehalts gefunden. Abgesehen hiervon liegen jedoch keine Daten zum zeitlichen Verlauf der GSH-Spiegel in den Atemwegssegmenten während und nach einmaliger und wiederholter Exposition gegen Styrol vor. Nichtsdestotrotz lässt sich aus den hier erarbeiteten Ergebnissen mit dem Lungenhomogenat der zeitliche Verlauf der GSH-Gehalte in den Atemwegssegmenten für die Dauer der ersten drei Tage der Styrolexposition abschätzen. Da Styrol in der Lunge zum größten Teil in den Clarazellen verstoffwechselt wird (Hynes et al., 1999) und die Metaboliten mit dem GSH in den Clarazellen konjugiert werden (Harvilchuck und Carlson, 2006), müssen die im Lungenhomogenat detektierten Veränderungen des GSH-Gehalts drastischere Veränderungen der GSH-Konzentrationen in den Clarazellen widerspiegeln. Das bedeutet, dass in den Atemwegen sowohl die durch Styrol bedingten GSH-Depletionen als auch der GSH-Rebound deutlich stärker ausgeprägt gewesen sein müssen als im Lungenhomogenat. Da im Lungenhomogenat die GSH-Depletionen bei 160 ppm Styrol stärker war als bei 40 ppm Styrol, der Rebound-Effekt bei beiden Expositionskonzentrationen jedoch gleich war (siehe Abschnitt 3.2.1), wird verständlich, dass nach dreimaliger Exposition der GSH-Gehalt in den Atemwegen bei 160 ppm Styrol geringer war als bei 40 ppm Styrol (siehe Abschnitt 3.2.2).

Von allen Atemwegssegmenten findet sich die höchste Clarazelldichte mit der größten Cytochrom P450-Aktivität in den terminalen Bronchioli (Boyd, 1977; Pack et al., 1981; Plopper et al., 1987; Plopper et al., 1980). Hier waren der physiologische GSH-Gehalt und der GSH-Rebound geringer als in den Clarazellen der anderen Atemwegssegmente (siehe Abschnitt 3.2.2). Wenn man für alle Atemwegssegmente von einer annähernd gleichen Konjugationsgeschwindigkeit von GSH mit oxidierten Styrolprodukten ausgeht, müsste demnach der größte GSH-Verlust in den terminalen Bronchioli zu finden sein. Dies wurde in den GSH-Depletionsexperimenten mit BSO + DEM-behandelten Mäusen (siehe Abschnitt 3.1.2) tatsächlich gefunden. Die Bedeutung dieser Schlussfolgerungen wird im Folgenden (Abschnitt 4.5) diskutiert.

4.4 Zellproliferation in der Lunge nach Expositionen gegen Styrol

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Zellproliferation in verschiedenen Atemwegssegmenten nach dreimaligen Expositionen gegen Styrol stellt eine Erweiterung früherer Studien dar, die sich ebenfalls mit der Zellproliferation im Bronchialepithel von Styrol-exponierten Mäusen befassten. So nahm nach intraperitonealer Gabe von Styrol (3 x 100 mg/kg/Tag) nach drei Tagen die Zellproliferation in den terminalen Bronchioli und größeren Atemwegen um das 1,3 bis 1,9fache des Kontrollwertes zu (Kaufmann et al., 2005). Die verglichen mit der vorliegenden Arbeit sehr geringe Zunahme der Zellproliferation dürfte zumindest teilweise auf die Applikationsmethode zurückzuführen sein. Da Styrol vorwiegend in der Leber metabolisiert wird (Csanády et al., 1994; Filser et al., 1993), ist davon auszugehen, dass die Styrolbelastung der Lunge nach intraperitonealer Applikation geringer war als bei inhalativer Aufnahme war. Nach der Inhalation von 40 und 160 ppm Styrol wurde, verglichen mit dem Kontrollwert, eine Zunahme der Zellproliferation nach 5 Tagen um das 1,4- (40 ppm) bzw. 2fache (160 ppm) in größeren Bronchioli und um das 2,7- (40 ppm) bzw. 4,5fache (160 ppm) in terminalen Bronchioli festgestellt (Green et al., 2001). In beiden Studien waren die Atemwege nur in terminale Bronchioli und größere Atemwege unterteilt worden. Bei der hier verwendeten, detaillierteren Unterteilung in vier verschiedene Atemwegssegmente wurde insbesondere in den terminalen Bronchioli eine deutlich höhere Induktion der Zellproliferation (Faktor 9 bzw. 10 bei 40 bzw. 160 ppm Styrol) bestimmt als bisher bekannt war. Die Befunde in den proximalen Atemwegen entsprechen in etwa den von Green et al. (2001) für die größeren Atemwege publizierten Ergebnissen.

4.5 Zusammenhang zwischen Glutathionstatus und Zellproliferation im Hinblick auf die Styrol-bedingte Lungentumorigenität bei der Maus

Wie einleitend dargestellt sind die mechanistischen Zusammenhänge zwischen Styrolexposition und der Induktion der Zellproliferation im Bronchialepithel bisher nicht aufgeklärt. Aufgrund der hier gefundenen Änderungen der GSH-Gehalte im Lungenhomogenat, stellt sich die Frage, ob – wie bereits früher vermutet (Hofmann et al., 2006) – die Induktion der Zellproliferation im Bronchialepithel mit den weitreichenden Änderungen des GSH-Status während und nach der Styrolexposition im Zusammenhang steht. Hierfür sind zwei Mechanismen vorstellbar:

1.) Durch Glutathion-Depletion verursachte Zytotoxizität mit nachfolgender regenerativer Zellproliferation

Eine massive Senkung der intrazellulären GSH-Konzentration bewirkt erhöhten oxidativen Stress, der zum Untergang der Zelle führen kann (zusammengefasst in Aw, 2003; Higuchi, 2004; Wu et al., 2004). Wie Thanislass et al. (1995) gezeigt haben, sind bereits bei der Abnahme der GSH-Konzentration in der Gesamtlunge auf weniger als 63% des Kontrollwerts Lungenschäden zu erwarten. Für isolierte Atemwege von Mäusen wurde gezeigt, dass Abnahmen der GSH-Gehalte, beispielsweise durch Naphthalinexpositionen, um mehr 50% des Kontrollwertes von Clarazellen zu reversiblen Veränderungen, um mehr als 75% sogar zu irreversiblen Schädigungen von Zellorganellen führen (Plopper et al., 2001). Offensichtlich kann ein Absinken der intrazellulären GSH-Konzentration zytotoxische Effekte nach sich ziehen. Diese können schließlich, wie einleitend dargestellt ist, zum Zelltod durch Apoptose führen. Es wird diskutiert, dass eine Depletion insbesondere des mitochondrialen GSHs direkt mit dem Fortschreiten der Apoptose korreliert (Franco und Cidlowski, 2009), vermutlich auf der durch verringerte GSH-Konzentrationen ausgelösten Aktivierung von Caspasen (Cotgreave und Gerdes, 1998; Rahman, 2005). Dem Zelltod könnte sich dann eine regenerative Proliferation der verbliebenen Zellen anschließen (Dixon et al., 1999). Der Mechanismus einer Induktion der Zellproliferation durch drastische Verringerungen des GSH-Gehalts wurde auch am Beispiel von 1,2-Epoxipropan diskutiert. Wiederholte Inhalationen von mehr als 100 ppm 1,2-Epoxipropan führten zu wiederkehrenden, massiven GSH-Depletionen auf weniger als 1/3 des Kontrollwerts und verursachten eine Erhöhung der Zellproliferation im olfaktorischen Epithelium von Ratten (Khan et al., 2009).

Im Fall von Styrol scheint dieser Mechanismus jedoch nicht zuzutreffen. Wie die Messungen in der Gesamtlunge zeigen, war die Absenkung der GSH-Gehalte in der Gesamtlunge nach den Styrolexpositionen gegen 40 ppm und 160 ppm zwar am ersten Tag am größten, nahm jedoch bei den nachfolgenden Expositionen aufgrund des erhöhten GSH-Rebounds ab. Im Bronchialepithel war selbst am ersten Expositionstag die GSH-Depletion (mit maximal 47% des Kontrollwerts) zu gering, um unter den Toxizitätsschwellenwert zu erreichen. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die gefundene erhöhte Zellproliferation auf akute Zellschädigungen zurückzuführen ist.

2.) Durch Glutathion-Depletion induzierte Zunahme von Glutathion-Resynthese und Zellproliferation

Ein alternativer Mechanismus für eine über Änderungen der intrazellulären GSH-Spiegel bedingte Induktion der Zellproliferation beruht auf Befunden, dass eine Fremdstoff-induzierte GSH-Depletion aufgrund der erhöhten Expression der für die GSH-Neusynthese entscheidenen y-Glutamylcysteinligase einen verstärkten GSH-Rebound nach sich zieht (Gerard-Monnier et al., 1992; Tian et al., 1997). Die hierdurch hervorgerufene Änderung des GSH-Status der Zellen ist höchstwahrscheinlich direkt mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Zellproliferation verknüpft, wie von mehreren Autoren abgeleitet wurde (Aw, 2003; Lu, 2009; Noda et al., 2001). Beispielsweise wurde gezeigt, dass eine Zellproliferation eng mit einer Zunahme des zellulären GSH-Gehalts bzw. GSH-Neusynthese assoziiert ist (Noda et al., 2002; Obrador et al., 1997; Shaw und Chou, 1986). Auch wurde nach GSH-Depletion und Thiol-Zugabe in Form von Cystein eine erhöhte Zellproliferation gefunden (Noda et al., 2001; Noda et al., 2002). Mechanistisch gesehen ändert sich sowohl bei einer Abnahme als auch bei einer Zunahme von GSH das Verhältnis von GSH zu GSSG, da die Konzentration an GSSG in der Mauslunge unter Bedingungen von oxidativen Stress nahezu konstant bleibt (DeLucia et al., 1975). Solche Änderungen des Redox-Gleichgewichts von Zellen haben einen direkten Einfluss auf die Aktivität redoxsensitiver Proteine, die in die Regulation zellulärer Signalwege involviert sind (Dickinson et al., 2003). So wird beispielsweise die Genexpression über die Bindung von Transkriptionsfaktoren sowie über weitere DNS-Bindedomänen wie dem Elektrophile Response Element (auch Antioxidant Response Element) in den Promotorregionen der Gene gesteuert (Franco und Cidlowski, 2009). Insbesondere die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB ist mit einem stimulatorischen Effekt auf die

Genexpression verbunden, wodurch die Regulation der Zellproliferation beeinflusst werden kann (zusammengefasst in Cotgreave und Gerdes, 1998; Mates et al., 2008; Pompella et al., 2003).

Die hier vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass es durchaus zu einer Störung der GSH-Homöostase während und nach jeder einzelnen Expositionsperiode aufgrund der GSH-Depletionen und GSH-Rebounds kommt. Damit tragen die hier gewonnenen Erkenntnisse erheblich zum Verständnis der Tumorigenität von Styrol in der Mauslunge bei.

Folgender Mechanismus ist für die Tumorigenität von Styrol wahrscheinlich: Eine Exposition gegen mindestens 40 ppm Styrol führt in den Atemwegen der Maus aufgrund der GSH-Konjugation mit Styrolmetaboliten, insbesondere mit Styrol-7,8-oxid, initial zu einer GSH-Depletion, die einen GSH-Rebound hervorruft, der zu einer Erhöhung des GSH-Spiegels führt. Die Änderungen des Redoxstatus sind direkt mit einer verstärkten Proliferation der Clarazellen gekoppelt. Durch die tägliche Styrolbedingte Störung der GSH-Homöostase (hier für die Dauer von drei Tagen gefunden) ist die Zellproliferation auch langfristig erhöht. Eine fortwährende erhöhte Zellproliferation in Verbindung mit der Belastung durch genotoxische Metaboliten (z.B. Styrol-7,8-oxid) und zytotoxische Stoffwechselprodukte (z.B. 4-VP) stellt ein großes Risiko für die Entstehung von Tumoren dar (Cohen und Ellwein, 1991). Die Regiospezifität der Lungentumoren wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass wie in der vorliegenden Arbeit gefunden - die terminalen Bronchioli die niedrigsten GSH-Spiegel (siehe Tabellen 2 bzw. 3) und die höchsten Clarazelldichte von allen Atemwegssegmenten (Pack et al., 1981; Plopper et al., 1980) aufweisen, was bedeutet, dass hier die größte Belastung durch genotoxische Metaboliten stattfindet.

Wie Filser et al. (2002) gezeigt haben, findet bei der Styrol-exponierten Ratte keine nennenswerte GSH-Depletion in der Lunge statt. Deshalb ist weder eine regenerative noch eine über Beeinflussung von Signalwegen induzierte Zellproliferation zu erwarten. Somit ist nachvollziehbar, dass Styrol bei der Ratte nicht kanzerogen war. Auch für den Menschen ist zumindest bis zu Konzentrationen von 200 ppm Styrol keine durch diesen Stoff bedingte Kanzerogenität zu erwarten, da es bis zu dieser Konzentration zu keiner Absenkung des GSH in der Lunge kommt (Csanády et al., 2003).

4.6 Ausblick

Bei der weiblichen Maus treten Lungentumoren schon bei 20 ppm Styrol auf. Nach dem hier diskutierten Mechanismus sollte schon bei dieser Styrolkonzentration nach einmaliger Exposition eine GSH-Depletion und bei wiederholter Exposition zudem ein verstärkter Reboundeffekt auftreten, die mit einer erhöhten Clarazellproliferation gekoppelt sind. Dieses soll mit der neu entwickelten Methode nicht nur im Lungenhomogenat sondern auch direkt in den Atemwegen ermittelt werden. Experimentell soll der hier diskutierte Mechanismus durch Untersuchungen zu der Homöostase von GSH und zur Zellproliferation in Atemwegen an der Styrol-unempfindlichen Ratte überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Die Industriechemikalie Styrol wirkte bei der Maus, nicht jedoch bei der Ratte, kanzerogen, wobei sie ausschließlich Lungentumoren induzierte. Bei Untersuchungen an der Maus war gefunden worden, dass inhaliertes Styrol eine Depletion von Glutathion (GSH) in der Lunge bewirken kann. Außerdem wurde eine erhöhte Proliferation der nicht-zilierten bronchialen Epithelzellen (Clarazellen) in den Atemwegen der Maus als Folge von Styrolexpositionen beschrieben. Die vorliegende Arbeit beruht auf der Annahme, dass beide Phänomene mit der Tumorentstehung in der Lunge in Zusammenhang stehen. Bislang lagen keine Erkenntnisse über den zeitlichen Ablauf der Änderungen des GSH-Spiegels in der Lunge vor. Auch die Styrol-bedingte regiospezifische Induktion der Proliferation in den Atemwegen war nur unzureichend untersucht worden, was möglicherweise dadurch bedingt war, dass keine geeignete Methode existierte, um GSH-Gehalte und gleichzeitig Zellproliferation in einzelnen Atemwegssegmenten der Mauslunge zu quantifizieren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, in Lungen von Bromdesoxyuridin (BrdU)-behandelten Mäusen die Veränderungen des GSH-Spiegels im Verlauf dreitägiger Expositionen gegen 40 und 160 ppm Styrol zu bestimmen und in verschiedenen Segmenten des Bronchialepithels, insbesondere den terminalen Bronchioli, dem Ort der styrolbedingten Tumorentstehung, den GSH-Status zusammen mit der Zellproliferation zu untersuchen. Aufgrund der Ergebnisse sollte der zur Styrol-Tumorigenität führende Mechanismus diskutiert werden.

Hierfür wurde zunächst ein neues, sensitives Verfahren entwickelt mittels dessen der GSH-Gehalt sowohl in der Gesamtlunge als auch, zusammen mit der Zellproliferation, im Bronchialepithel schnell und quantitativ bestimmt werden konnte. Es wurden Mauslungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monochlorbiman (MCB) inflatiert und GSH über die durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysierte *In-situ*-Konjugation von GSH mit MCB folgendermaßen bestimmt: In Lungenhomogenat und –cytosol wurde das entstandene MCB-GSH-Konjugat als GSH-Surrogat fluorometrisch erfasst. Im Bronchialepithel einzelner Atemwege wurde es nach Herstellung von Gefrierschnitten eines Lungenflügels mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. In den identischen Atemwegen wurde ebenfalls die Zellproliferation anhand der immunhistochemischen Anfärbung von BrdU ermittelt.

Die Spezifität der GST-vermittelten Konjugationsreaktion wurde in vitro demonstriert, wobei das anstelle von GSH als Reaktionspartner mit MCB eingesetzte N-Acetylcystein im Gegensatz zu GSH keine Fluoreszenz zeigte. Die Linearität der Reaktion wurde in Homogenatslösungen mit Proteingehalten von 0 - 1,6 mg Protein/ml über einen GSH-Konzentrationsbereich von 0 bis 100 µmol/l untersucht. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität war proportional zur GSH-Konzentration. Die mittlere Steigung der Geradengleichung betrug 162 ± 2,6 willkürliche Fluoreszenzintensitätseinheiten pro µmol GSH/I (n = 5). Der Y-Achsenabschnitt der linearen Regressionsgeraden war proportional abhängig vom unvermeidlichen GSH-Hintergrundgehalt im eingesetzten Lungenhomogenat. Die Sensitivität des neuen GSH-Bestimmungsverfahrens war mit einer Quantifizierungsgrenze von 2 µmol/I GSH (Signal : Rausch-Verhältnis 3:1) ähnlich derjenigen des etablierten GSH-Recycling-Tests (Quantifizierungsgrenze 1 µmol/I GSH). Bei Anwendung der Methode zur Quantifizierung von GSH wurde im Epithel einzelner Atemwege nach GSH-Depletion durch Behandlung mit einer Kombination von L-Buthioninsulfoximin (BSO) und Diethylmaleat (DEM) ein Fluoreszenzhintergrund gefunden, der möglicherweise auf unspezifische Bindungen von MCB im Gefrierschnitt zurückgeführt werden kann. Deshalb wurde bei den Untersuchungen der GSH-Gehalte in den Atemwegen die jeweils gemessene Fluoreszenz um diesen Hintergrund korrigiert. Aus der verbliebenen, GSH-spezifischen

Fluoreszenz wurde auf der Basis von Literaturdaten der GSH-Gehalt in nmol/mg Protein berechnet.

Zur Ermittlung des Zeitverlaufs der GSH-Gehalte in der Gesamtlunge in Abhängigkeit von der Styrolexpositionskonzentration wurde der GSH-Gehalt in Lungenhomogenat von Kontrollmäusen den GSH-Gehalten gegenübergestellt, die während und nach dreitägigen Expositionen von 6 h/Tag gegen 40 und 160 ppm Styrol im Homogenat gefunden worden. Es ergab sich folgendes Bild: Im Verlauf jeder Expositionsperiode wurde eine von der Styrolkonzentration abhängige Abnahme des GSH-Gehalts gefunden, die am ersten Expositionstag bei 29% (40 ppm) bzw. 47% (160 ppm) des Kontrollwerts und am dritten Tag bei 23% (40 ppm) bzw. 39% (160 ppm) des Wertes zu Beginn der dritten Expositionsperiode lag. Im Vergleich zum Kontrollwert mit 24,8 nmol GSH/mg Protein stieg der GSH-Gehalt bis zum Beginn der zweiten Expositionsperiode auf 110% und zu Beginn der dritten auf 135% an (erhöhter GSH-Rebound). Somit entsprachen die GSH-Gehalte am Ende der dritten Expositionsperiode in etwa dem Gehalt der Kontrolltiere. In den Atemwegssegmenten wurde der GSH-Gehalt sowohl in den Kontrolltieren als auch in den Styrolexponierten Tieren am Ende der dritten Expositionsperiode bestimmt. In den Kontrolltieren war der GSH-Gehalt in den Atemwegssegmenten unterschiedlich. Die niedrigsten GSH-Gehalte (4,9 ± 1,6 nmol GSH/mg Protein) fanden sich in den terminalen Bronchioli, die höchsten Gehalte (9,1 ± 4,6 nmol GSH /mg Protein) in den proximalen Bronchi. Nach den dreitägigen Styrolexpositionen waren die Gehalte in allen vier Atemwegssegmenten im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Der Anstieg war bei 160 ppm Styrol weniger stark ausgeprägt als bei 40 ppm Styrol. Bei der letzteren Exposition beliefen sich die statistisch signifikanten (p < 0.05) Zunahmen, verglichen mit den Kontrollwerten, auf 124% (proximale Bronchi), 158% (mittlere Bronchi), 167% (distale Bronchioli) und 124% (terminale Bronchioli). Die in den identischen
Atemwegen durchgeführten Untersuchungen zum Status der Zellproliferation ergaben in drei von vier Atemwegssegmenten der gegen 40 und 160 ppm Styrol exponierten Mäuse eine Zunahme proliferierender Zellen, die in den terminalen Bronchioli mit dem Faktor 9 (40 ppm) bzw. 10 (160 ppm) besonders stark ausgeprägt war. In der Diskussion wurde sich zuerst mit der neuen Methode zur Bestimmung von GSH in der Lunge sowie ihren Vor- und Nachteilen verglichen mit bisherigen Verfahren auseinandergesetzt. Insbesondere wurde betont, dass das neue Verfahren im Gegensatz zur den bisherigen Techniken die Fixierung des GSH-Status unmittelbar zum Ende einer Exposition erlaubt und die Bestimmung von GSH zusammen mit der Zellproliferation in denselben Atemwegen ermöglicht. Anschließend wurden die Untersuchungsergebnisse mit Styrol-exponierten Mäusen besprochen. Anhand der Befunde zum zeitlichen Verlauf des GSH-Status in der Gesamtlunge wurde erläutert, dass die am Ende der dritten Exposition gefundenen GSH-Gehalte in den Atemwegen auf den erhöhten GSH-Rebound zurückzuführen sind. Zur Erklärung der insbesondere in den terminalen Bronchioli ebenfalls ermittelten, Styrol-bedingten Zunahme der Zellproliferation wird ein neuer, wahrscheinlicher Mechanismus der Styrolbedingten Lungentumorigenität bei der Maus vorgestellt. Demnach ruft die durch die GSH-Konjugation mit dem Styrolmetaboliten Styrol-7,8-oxid während jeder Exposition erzielte GSH-Depletion in den Atemwegen einen verstärkten GSH-Rebound hervor. Die dadurch bedingten Änderungen des Redoxstatus sind direkt mit einer Zunahme der Zellproliferation gekoppelt. Eine über einen längeren Zeitraum anhaltende erhöhte Zellproliferation führt bei Langzeitexpositionen gegen Styrol zusammen mit der Belastung durch genotoxische Metaboliten, die in der Mauslunge vorwiegend in den terminalen Bronchioli gebildet werden, zur Tumorigenität in diesem Atemwegssegment.

6 Abkürzungen

ANOVA	Varianzanalyse
BrdU	5-Bromdesoxyuridin
BSO	L-Buthioninsulfoximin
СҮР	Cytochrom P450-abhängige Monooxigenase
DACM	N-(7-Dimethylamino-4-Methylcoumarinyl)Maleimid
DEM	Diethylmaleat
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GC	Gaschromatograph
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferasen
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
LC ₅₀	lethale Konzentration für 50% der Versuchstiere
N ₂ PBS	stickstoffgesättigte, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ppm	parts per million
4-VP	4-Vinylphenol

7 Literatur

Asghar, K., Reddy, B.G. und Krishna, G. (1975). Histochemical localization of glutathione in tissues. *J Histochem Cytochem* 23, 774-779.

Aw, T.Y. (2003). Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol Sci* 18, 201-204.

Bakke, O.M. und Scheline, R.R. (1970). Hydroxylation of aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 16, 691-700.

BAuA (2006). *Technische Regeln für Gefahrenstoffe. Arbeitsplatzgrenzwerte (TRGS 900)*. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin - Ausschuss für Gefahrstoffe, zuletzt geändert und ergänzt: GMBI 2011, 193-194 [Nr.110].

Bellomo, G., Vairetti, M., Stivala, L., Mirabelli, F., Richelmi, P. und Orrenius, S. (1992). Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4412-4416.

Bitzenhofer, U.N., Kessler, W., Kreuzer, P. und Filser, J.G. (1994). Kinetics of styrene and its metabolite styrene-7,8-oxide in the isolated perfused rat liver. *Toxicologist* 14, 118.

Boers, J.E., Ambergen, A.W. und Thunnissen, F.B. (1999). Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 1585-1591.

Bogan, R., Csanády, G.A. und Filser, J.G. (1993). Michaelis-Menten parameters of styrene metabolism in hepatocytes of rat and mouse. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347, R6.

Bond, J.A. (1989). Review of the toxicology of styrene. Crit Rev Toxicol 19, 227-249.

Boogaard, P.J., de Kloe, K.P., Sumner, S.C., van Elburg, P.A. und Wong, B.A. (2000a). Disposition of [Ring-U-(14)C]styrene in rats and mice exposed by recirculating nose-only inhalation. *Toxicol Sci* 58, 161-172.

Boogaard, P.J., de Kloe, K.P., Wong, B.A., Sumner, S.C., Watson, W.P. und van Sittert, N.J. (2000b). Quantification of DNA adducts formed in liver, lungs, and isolated lung cells of rats and mice exposed to (14)C-styrene by nose-only inhalation. *Toxicol Sci* 57, 203-216.

Borroz, K.I., Buetler, T.M. und Eaton, D.L. (1994). Modulation of gammaglutamylcysteine synthetase large subunit mRNA expression by butylated hydroxyanisole. *Toxicol Appl Pharmacol* 126, 150-155. Bowden, D.H. (1976). The pulmonary macrophage. *Environ Health Perspect* 16, 55-60.

Boyd, M.R. (1977). Evidence for the Clara cell as a site of cytochrome P450dependent mixed-function oxidase activity in lung. *Nature* 269, 713-715.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Bradley, K.H., McConnell, S.D. und Crystal, R.G. (1974). Lung collagen composition and synthesis. Characterization and changes with age. *J Biol Chem* 249, 2674-2683.

Brain, J.D. (1992). Mechanisms, measurement, and significance of lung macrophage function. *Environ Health Perspect* 97, 5-10.

Broeckaert, F., Clippe, A., Knoops, B., Hermans, C. und Bernard, A. (2000). Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Ann N Y Acad Sci* 923, 68-77.

Buckpitt, A., Chang, A.M., Weir, A., Van Winkle, L., Duan, X., Philpot, R. und Plopper, C. (1995). Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. IV. Metabolism of naphthalene and naphthalene oxide in microdissected airways from mice, rats, and hamsters. *Mol Pharmacol* 47, 74-81.

Chichester, C.H., Buckpitt, A.R., Chang, A. und Plopper, C.G. (1994). Metabolism and cytotoxicity of naphthalene and its metabolites in isolated murine Clara cells. *Mol Pharmacol* 45, 664-672.

Chieco, P. und Boor, P.J. (1983). Use of low temperatures for glutathione histochemical stain. *J Histochem Cytochem* 31, 975-976.

Cohen, S.M. und Ellwein, L.B. (1991). Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res* 51, 6493-6505.

Conti, B., Maltoni, C., Perino, G. und Ciliberti, A. (1988). Long-term carcinogenicity bioassays on styrene administered by inhalation, ingestion and injection and styrene oxide administered by ingestion in Sprague-Dawley rats, and para-methylstyrene administered by ingestion in Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Ann N Y Acad Sci* 534, 203-234.

Cook, J.A., Iype, S.N. und Mitchell, J.B. (1991). Differential specificity of monochlorobimane for isozymes of human and rodent glutathione S-transferases. *Cancer Res* 51, 1606-1612.

Cotgreave, I.A. und Gerdes, R.G. (1998). Recent trends in glutathione biochemistry - glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 242, 1-9.

Cruzan, G., Bus, J., Banton, M., Gingell, R. und Carlson, G. (2009). Mouse specific lung tumors from CYP2F2-mediated cytotoxic metabolism: an endpoint/toxic response where data from multiple chemicals converge to support a mode of action. *Regul Toxicol Pharmacol* 55, 205-218.

Cruzan, G., Carlson, G.P., Johnson, K.A., Andrews, L.S., Banton, M.I., Bevan, C. und Cushman, J.R. (2002). Styrene respiratory tract toxicity and mouse lung tumors are mediated by CYP2F-generated metabolites. *Regul Toxicol Pharmacol* 35, 308-319.

Cruzan, G., Cushman, J.R., Andrews, L.S., Granville, G.C., Johnson, K.A., Bevan, C., Hardy, C.J., Coombs, D.W., Mullins, P.A. und Brown, W.R. (2001). Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD-1 mice by inhalation exposure for 104 weeks. *J Appl Toxicol* 21, 185-198.

Cruzan, G., Cushman, J.R., Andrews, L.S., Granville, G.C., Johnson, K.A., Hardy, C.J., Coombs, D.W., Mullins, P.A. und Brown, W.R. (1998). Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD rats by inhalation exposure for 104 weeks. *Toxicol Sci* 46, 266-281.

Cruzan, G., Cushman, J.R., Andrews, L.S., Granville, G.C., Miller, R.R., Hardy, C.J., Coombs, D.W. und Mullins, P.A. (1997). Subchronic inhalation studies of styrene in CD rats and CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 35, 152-165.

Csanády, G.A., Kessler, W., Hoffmann, H.D. und Filser, J.G. (2003). A toxicokinetic model for styrene and its metabolite styrene-7,8-oxide in mouse, rat and human with special emphasis on the lung. *Toxicol Lett* 138, 75-102.

Csanády, G.A., Mendrala, A.L., Nolan, R.J. und Filser, J.G. (1994). A physiologic pharmacokinetic model for styrene and styrene-7,8-oxide in mouse, rat and man. *Arch Toxicol* 68, 143-157.

D'Souza, R.W., Francis, W.R. und Andersen, M.E. (1988). Physiological model for tissue glutathione depletion and increased resynthesis after ethylene dichloride exposure. *J Pharmacol Exp Ther* 245, 563-568.

Day, B.J., van Heeckeren, A.M., Min, E. und Velsor, L.W. (2004). Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary pseudomonas infection. *Infect Immun* 72, 2045-2051.

DeLucia, A.J., Mustafa, M.G., Hussain, M.Z. und Cross, C.E. (1975). Ozone interaction with rodent lung. III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls. *J Clin Invest* 55, 794-802.

Deml, E. und Oesterle, D. (1996). Chemische Kanzerogenese. In *Toxikologie. Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner* (H. Greim und E. Deml, Hrsg.), VCH, Weinheim, 135-160. Deneke, S.M. und Fanburg, B.L. (1989). Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 257, L163-173.

Deutschmann, S. und Laib, R.J. (1989). Concentration-dependent depletion of nonprotein sulfhydryl (NPSH) content in lung, heart and liver tissue of rats and mice after acute inhalation exposure to butadiene. *Toxicol Lett* 45, 175-183.

DFG (1987). Styrol. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologischarbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Hrsg). Wiley-VCH, Weinheim, 13. Auflage. 280-304

Dickinson, D.A., Moellering, D.R., Iles, K.E., Patel, R.P., Levonen, A.L., Wigley, A., Darley-Usmar, V.M. und Forman, H.J. (2003). Cytoprotection against oxidative stress and the regulation of glutathione synthesis. *Biol Chem* 384, 527-537.

Dixon, D., Herbert, R.A., Sills, R.C. und Boorman, G.A. (1999). Lungs, Pleura, and Mediastinum. In *Pathology of the Mouse. Reference and Atlas* (R. R. Maronpot, Hrsg.), Cache River Press, Vienna, IL, 1. Auflage, 293-304.

Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 82, 70-77.

Fakjian, N. und Buckpitt, A.R. (1984). Metabolism of bromobenzene to glutathione adducts in lung slices from mice treated with pneumotoxicants. *Biochem Pharmacol* 33, 1479-1486.

Faller, T.H. (1998). Untersuchungen zur Toxikokinetik von Propenoxid: - Glutathionkonzentrationen in Leber und Nasenmucosa exponierter Ratten - Kinetik in Zellfraktionen aus Leber und Lunge von Ratte, Maus und Mensch sowie der Nasenmucosa der Ratte. Dissertation an der Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München, 63-69.

Fanucchi, M.V., Murphy, M.E., Buckpitt, A.R., Philpot, R.M. und Plopper, C.G. (1997). Pulmonary cytochrome P450 monooxygenase and Clara cell differentiation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 302-314.

Fernández-Checa, J.C. und Kaplowitz, N. (1990). The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal Biochem* 190, 212-219.

Filser, J.G. (1992). The closed chamber technique - uptake, endogenous production, excretion, steady-state kinetics and rates of metabolism of gases and vapors. *Arch Toxicol* 66, 1-10.

Filser, J.G., Kessler, W. und Csanády, G.A. (2002). Estimation of a possible tumorigenic risk of styrene from daily intake via food and ambient air. *Toxicol Lett* 126, 1-18. Filser, J.G., Schwegler, U., Csanády, G.A., Greim, H., Kreuzer, P.E. und Kessler, W. (1993). Species-specific pharmacokinetics of styrene in rat and mouse. *Arch Toxicol* 67, 517-530.

Forkert, P.G. (1997). Conjugation of glutathione with the reactive metabolites of 1,1dichloroethylene in murine lung and liver. *Microsc Res Tech* 36, 234-242.

Forkert, P.G. und Forkert, L. (1994). Trichloroethylene induces pulmonary fibrosis in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 72, 205-210.

Forkert, P.G. und Moussa, M. (1993). Temporal effects of 1,1-dichloroethylene on nonprotein sulfhydryl content in murine lung and liver. *Drug Metab Dispos* 21, 770-776.

Foster, J.R., Green, T., Smith, L.L., Lewis, R.W., Hext, P.M. und Wyatt, I. (1992). Methylene chloride - an inhalation study to investigate pathological and biochemical events occurring in the lungs of mice over an exposure period of 90 days. *Fundam Appl Toxicol* 18, 376-388.

Franco, R. und Cidlowski, J.A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16, 1303-1314.

Gamer, A.O., Leibold, E., Deckardt, K., Kittel, B., Kaufmann, W., Tennekes, H.A. und van Ravenzwaay, B. (2004). The effects of styrene on lung cells in female mice and rats. *Food Chem Toxicol* 42, 1655-1667.

Gartner, L.P. und Hiatt, J.L. (2006). *Color Atlas of Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 4. Auflage, 235-254.

Gerard-Monnier, D., Fougeat, S. und Chaudiere, J. (1992). Glutathione and cysteine depletion in rats and mice following acute intoxication with diethylmaleate. *Biochem Pharmacol* 43, 451-456.

Gould, N.S., Min, E., Gauthier, S., Martin, R.J. und Day, B.J. (2011). Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure. *Respir Res* 12, 133.

Grassetti, D.R. und Murray, J.R. (1967). The use of 2,2'-dithiodipyridine in the determination of glutathione and of triphosphopyridine nucleotide by enzymatic cycling. *Anal Biochem* 21, 427-434.

Green, R.M., Graham, M., O'Donovan, M.R., Chipman, J.K. und Hodges, N.J. (2006). Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis* 21, 383-390.

Green, T., Mainwaring, G.W. und Foster, J.R. (1997). Trichloroethylene-induced mouse lung tumors: studies of the mode of action and comparisons between species. *Fundam Appl Toxicol* 37, 125-130.

Green, T., Toghill, A. und Foster, J.R. (2001). The role of cytochromes P-450 in styrene induced pulmonary toxicity and carcinogenicity. *Toxicology* 169, 107-117.

Griffith, O.W. und Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254, 7558-7560.

Guillemin, M.P. und Bauer, D. (1979). Human exposure to styrene. III. Elimination kinetics of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids after single experimental exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 44, 249-263.

Harvilchuck, J.A. und Carlson, G.P. (2006). Comparison of styrene and its metabolites styrene oxide and 4-vinylphenol on cytotoxicity and glutathione depletion in Clara cells of mice and rats. *Toxicology* 227, 165-172.

Hedley, D.W. und Chow, S. (1994). Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* 15, 349-358.

Higuchi, Y. (2004). Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J Cell Mol Med* 8, 455-464.

Himmelstein, M.W., Asgharian, B. und Bond, J.A. (1995). High concentrations of butadiene epoxides in livers and lungs of mice compared to rats exposed to 1,3butadiene. *Toxicol Appl Pharmacol* 132, 281-288.

Hofmann, C., Putz, C., Semder, B., Faller, T.H., Csanády, G.A. und Filser, J.G. (2006). Styrene-7,8-oxide burden in ventilated, perfused lungs of mice and rats exposed to vaporous styrene. *Toxicol Sci* 90, 39-48.

Hynes, D.E., DeNicola, D.B. und Carlson, G.P. (1999). Metabolism of styrene by mouse and rat isolated lung cells. *Toxicol Sci* 51, 195-201.

IARC (1994a). International Agency for Research on Cancer: Styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 60, 233-320.

IARC (1994b). International Agency for Research on Cancer: Styrene-7,8-oxide. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 60, 321.

IARC (2002). International Agency for Research on Cancer: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 82, 1-556.

ICRP (1974). *Report of the task group on reference man.* International Commission on Radiological Protection. Pergamon Press, Oxford.

Ishimura, K., Usa, M., Fujita, H., Kawata, S., Okamoto, M. und Yamano, T. (1985). Ultrastructural and immunohistochemical studies on non-ciliated cells of the tracheal

epithelium of normal, phenobarbital-treated and 3-methylcholanthrene-treated mice. *Cell Tissue Res* 240, 501-504.

Jaeschke, H. und Wendel, A. (1985). Diurnal fluctuation and pharmacological alteration of mouse organ glutathione content. *Biochem Pharmacol* 34, 1029-1033.

Jaeschke, H. und Wendel, A. (1986). Manipulation of mouse organ glutathione contents. II: Time and dose-dependent induction of the glutathione conjugation system by phenolic antioxidants. *Toxicology* 39, 59-70.

Jeffery, P.K. und Reid, L. (1975). New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J Anat* 120, 295-320.

Kamencic, H., Lyon, A., Paterson, P.G. und Juurlink, B.H. (2000). Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal Biochem* 286, 35-37.

Kaufmann, W., Mellert, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. und Poole, A. (2005). Effects of styrene and its metabolites on different lung compartments of the mouse - cell proliferation and histomorphology. *Regul Toxicol Pharmacol* 42, 24-36.

Kessler, W., Jiang, X. und Filser, J.G. (1992). Pharmacokinetics of styrene-7,8-oxide in the mouse and the rat. In *32nd Annual Meeting of the German Society of Occupational Medicine* (R. Kreutz und C. Pietkarski, Hrsg.), Genter Verlag, Köln, 622-626.

Khan, M.D., Klein, D., Mossbrugger, I., Oesterle, D., Csanády, G.A., Quintanilla-Martinez, L. und Filser, J.G. (2009). Is propylene oxide induced cell proliferation in rat nasal respiratory epithelium mediated by a severe depletion of water-soluble nonprotein thiol? *Toxicol Lett* 185, 203-210.

Kirlin, W.G., Cai, J., Thompson, S.A., Diaz, D., Kavanagh, T.J. und Jones, D.P. (1999). Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med* 27, 1208-1218.

Kosower, N.S., Kosower, E.M., Newton, G.L. und Ranney, H.M. (1979). Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3382-3386.

Lakritz, J., Plopper, C.G. und Buckpitt, A.R. (1997). Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal Biochem* 247, 63-68.

Lee, M.-S. (2002). Einfluss von inhaliertem Propenoxid auf Glutathion-Konzentrationen in Nasenschleimhaut und verschiedenen Organen der männlichen Fischer 344/N Ratte. Dissertation am Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München, 90-93. Leuner, B., Glasper, E.R. und Gould, E. (2009). Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive. *J Comp Neurol* 517, 123-133.

Linhart, I., Mraz, J., Scharff, J., Krouzelka, J., Duskova, S., Nohova, H. und Vodickova, L. (2010). New urinary metabolites formed from ring-oxidized metabolic intermediates of styrene. *Chem Res Toxicol* 23, 251-257.

Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30, 42-59.

Lyerla, T.A., Rusiniak, M.E., Borchers, M., Jahreis, G., Tan, J., Ohtake, P., Novak, E.K. und Swank, R.T. (2003). Aberrant lung structure, composition, and function in a murine model of Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L643-653.

Manini, P., Andreoli, R., Poli, D., De Palma, G., Mutti, A. und Niessen, W.M. (2002). Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry characterization of styrene metabolism in man and in rat. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16, 2239-2248.

Martensson, J., Jain, A., Frayer, W. und Meister, A. (1989). Glutathione metabolism in the lung: inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5296-5300.

Mates, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J. und Marquez, J. (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol* 82, 273-299.

McKenna, M.J., Watanabe, P.G. und Gehring, P.J. (1977). Pharmacokinetics of vinylidene chloride in the rat. *Environ Health Perspect* 21, 99-105.

Meima, G.R. und Menon, G.P. (2001). Catalyst deactivation phenomena in styrene production. *Appl. Catal. A: Gen.* 212, 239-245.

Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263, 17205-17208.

Meister, A. und Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.

Merck (2008). Sicherheitsdatenblatt: Glutathion (reduziert), Merck KGaA. Darmstadt.

Miller, R.R., Newhook, R. und Poole, A. (1994). Styrene production, use, and human exposure. *Crit Rev Toxicol* 24 Suppl, S1-10.

Morgan, D.L., Mahler, J.F., Dill, J.A., Price, H.C., Jr., O'Connor, R.W. und Adkins, B., Jr. (1993a). Styrene inhalation toxicity studies in mice. II. Sex differences in susceptibility of B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 21, 317-325.

Morgan, D.L., Mahler, J.F., Moorman, M.P., Wilson, R.E., Price, H.C., Jr., Richards, J.H. und O'Connor, R.W. (1995). Comparison of styrene hepatotoxicity in B6C3F1 and Swiss mice. *Fundam Appl Toxicol* 27, 217-222.

Morgan, D.L., Mahler, J.F., O'Connor, R.W., Price, H.C., Jr. und Adkins, B., Jr. (1993b). Styrene inhalation toxicity studies in mice. I. Hepatotoxicity in B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 20, 325-335.

Moussa, M. und Forkert, P.G. (1992). 1,1-Dichloroethylene-induced alterations in glutathione and covalent binding in murine lung: morphological, histochemical, and biochemical studies. *J Pathol* 166, 199-207.

Nakajima, T., Elovaara, E., Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V., Raunio, H., Pelkonen, O., Vainio, H. und Aoyama, T. (1994). Styrene metabolism by cDNA-expressed human hepatic and pulmonary cytochromes P450. *Chem Res Toxicol* 7, 891-896.

Noda, T., Iwakiri, R., Fujimoto, K. und Aw, T.Y. (2001). Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of CaCo-2 cells. *Faseb J* 15, 2131-2139.

Noda, T., Iwakiri, R., Fujimoto, K., Rhoads, C.A. und Aw, T.Y. (2002). Exogenous cysteine and cystine promote cell proliferation in CaCo-2 cells. *Cell Prolif* 35, 117-129.

NTP (2008). Final Report on Carcinogens Background Document for Styrene. (N. T. Program, Hrsg.), September, 44-72.

Oberste-Frielinghaus, H., Dhawan-Robl, M., Pütz, C., Csanády, G.A., Baur, C. und Filser, J.G. (1999). Metabolism of styrene and racemic styrene-7,8-oxide in microsomes and cytosol of lung obtained from mouse, rat and human. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359, R157.

Obrador, E., Navarro, J., Mompo, J., Asensi, M., Pellicer, J.A. und Estrela, J.M. (1997). Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo. *Biochem J* 325 (Pt 1), 183-189.

Ogawa, H. und Taneda, A. (1979). Characteristic distribution of sulfhydryl groups in human epidermal cancer by the new histochemical staining method. *Arch Dermatol Res* 264, 77-81.

Pack, R.J., Al-Ugaily, L.H. und Morris, G. (1981). The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat* 132, 71-84.

Park, E., Park, J., Kim, Y., Sung, J., Hwang, T., Kim, W., Han, M. und Park, Y. (2001). Role of oxidative stress in radiation-induced lung pathogenesis in mice. *J Biochem Mol Biol* 34, 544-550.

Phimister, A.J., Lee, M.G., Morin, D., Buckpitt, A.R. und Plopper, C.G. (2004). Glutathione depletion is a major determinant of inhaled naphthalene respiratory toxicity and naphthalene metabolism in mice. *Toxicol Sci* 82, 268-278.

Phimister, A.J., Williams, K.J., Van Winkle, L.S. und Plopper, C.G. (2005). Consequences of abrupt glutathione depletion in murine Clara cells: ultrastructural and biochemical investigations into the role of glutathione loss in naphthalene cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 506-513.

Plopper, C.G., Chang, A.M., Pang, A. und Buckpitt, A.R. (1991). Use of microdissected airways to define metabolism and cytotoxicity in murine bronchiolar epithelium. *Exp Lung Res* 17, 197-212.

Plopper, C.G., Cranz, D.L., Kemp, L., Serabjit-Singh, C.J. und Philpot, R.M. (1987). Immunohistochemical demonstration of cytochrome P-450 monooxygenase in Clara cells throughout the tracheobronchial airways of the rabbit. *Exp Lung Res* 13, 59-68.

Plopper, C.G., Mariassy, A.T. und Hill, L.H. (1980). Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung: I. A comparison of rabbit, guinea pig, rat, hamster, and mouse. *Exp Lung Res* 1, 139-154.

Plopper, C.G., Van Winkle, L.S., Fanucchi, M.V., Malburg, S.R., Nishio, S.J., Chang, A. und Buckpitt, A.R. (2001). Early events in naphthalene-induced acute Clara cell toxicity. II. Comparison of glutathione depletion and histopathology by airway location. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24, 272-281.

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. und Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66, 1499-1503.

Potter, D.W. und Tran, T.B. (1993). Apparent rates of glutathione turnover in rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 120, 186-192.

Rahman, I. (2005). Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutat Res* 579, 58-80.

Rahman, I. und MacNee, W. (2000). Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 16, 534-554.

Rice, G.C., Bump, E.A., Shrieve, D.C., Lee, W. und Kovacs, M. (1986). Quantitative analysis of cellular glutathione by flow cytometry utilizing monochlorobimane: some applications to radiation and drug resistance in vitro and in vivo. *Cancer Res* 46, 6105-6110.

Sachs, L. (1998). Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin, 8. Auflage, 137-138.

Saghir, S.A., Rick, D.L., McClymont, E.L., Zhang, F., Bartels, M.J. und Bus, J.S. (2009). Mechanism of ethylbenzene-induced mouse-specific lung tumor: metabolism

of ethylbenzene by rat, mouse, and human liver and lung microsomes. *Toxicol Sci* 107, 352-366.

Shaw, J.P. und Chou, I.N. (1986). Elevation of intracellular glutathione content associated with mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts. *J Cell Physiol* 129, 193-198.

Shen, S., Zhang, F., Gao, L., Zeng, S. und Zheng, J. (2010). Detection of phenolic metabolites of styrene in mouse liver and lung microsomal incubations. *Drug Metab Dispos* 38, 1934-1943.

Shrieve, D.C., Bump, E.A. und Rice, G.C. (1988). Heterogeneity of cellular glutathione among cells derived from a murine fibrosarcoma or a human renal cell carcinoma detected by flow cytometric analysis. *J Biol Chem* 263, 14107-14114.

Singh, G. und Katyal, S.L. (1997). Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 141-143.

Sippel, T.O. (1978). The histochemistry of thiols and disulphides. III. Staining patterns in rat tissues. *Histochem J* 10, 597-609.

Slater, A.F., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelsteen, D.J. und Orrenius, S. (1995). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 82-83, 149-153.

Söderdahl, T., Enoksson, M., Lundberg, M., Holmgren, A., Ottersen, O.P., Orrenius, S., Bolcsfoldi, G. und Cotgreave, I.A. (2003). Visualization of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulfides in cultured cells. *Faseb J* 17, 124-126.

Storch, V. und Welsch, U. (2009). *Kükenthal Zoologisches Praktikum*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 26. Auflage, 435-436.

Summer, K.H., Klein, D., Lichtmannegger, J. und Wolff, T. (1996). 2-Chloroacetophenone is an effective glutathione depletor in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 71, 127-129.

Sumner, S.J. und Fennell, T.R. (1994). Review of the metabolic fate of styrene. *Crit Rev Toxicol* 24 Suppl, S11-33.

Sweeney, L.M., Kirman, C.R., Albertini, R.J., Tan, Y.M., Clewell, H.J., Filser, J.G., Csanady, G., Pottenger, L.H., Banton, M.I., Graham, C.J., Andrews, L.S., Papciak, R.J. und Gargas, M.L. (2009). Derivation of inhalation toxicity reference values for propylene oxide using mode of action analysis: example of a threshold carcinogen. *Crit Rev Toxicol* 39, 462-486.

ten Have-Opbroek, A.A., Otto-Verberne, C.J., Dubbeldam, J.A. und Dykman, J.H. (1991). The proximal border of the human respiratory unit, as shown by scanning and transmission electron microscopy and light microscopical cytochemistry. *Anat Rec* 229, 339-354.

Thanislass, J., Raveendran, M. und Devaraj, H. (1995). Buthionine sulfoximineinduced glutathione depletion. Its effect on antioxidants, lipid peroxidation and calcium homeostasis in the lung. *Biochem Pharmacol* 50, 229-234.

Tian, L., Shi, M.M. und Forman, H.J. (1997). Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch Biochem Biophys* 342, 126-133.

Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27, 502-522.

Uppala, P.T., Roy, S.K., Tousson, A., Barnes, S., Uppala, G.R. und Eastmond, D.A. (2005). Induction of cell proliferation, micronuclei and hyperdiploidy/polyploidy in the mammary cells of DDT- and DMBA-treated pubertal rats. *Environ Mol Mutagen* 46, 43-52.

Valerius, K.P. (1996). Size-dependent morphology of the conductive bronchial tree in four species of myomorph rodents. *J Morphol* 230, 291-297.

Velsor, L.W., Kariya, C., Kachadourian, R. und Day, B.J. (2006). Mitochondrial oxidative stress in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 579-586.

Velsor, L.W., van Heeckeren, A. und Day, B.J. (2001). Antioxidant imbalance in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L31-38.

Vodicka, P., Bastlova, T., Vodickova, L., Peterkova, K., Lambert, B. und Hemminki, K. (1995). Biomarkers of styrene exposure in lamination workers: levels of O6guanine DNA adducts, DNA strand breaks and mutant frequencies in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene in T-lymphocytes. *Carcinogenesis* 16, 1473-1481.

Vodicka, P., Tuimala, J., Stetina, R., Kumar, R., Manini, P., Naccarati, A., Maestri, L., Vodickova, L., Kuricova, M., Jarventaus, H., Majvaldova, Z., Hirvonen, A., Imbriani, M., Mutti, A., Migliore, L., Norppa, H. und Hemminki, K. (2004). Cytogenetic markers, DNA single-strand breaks, urinary metabolites, and DNA repair rates in styrene-exposed lamination workers. *Environ Health Perspect* 112, 867-871.

Watt, K.C. und Buckpitt, A.R. (2000). Species differences in the regio- and stereoselectivity of 1-nitronaphthalene metabolism. *Drug Metab Dispos* 28, 376-378. West, J.A., Buckpitt, A.R. und Plopper, C.G. (2000a). Elevated airway GSH resynthesis confers protection to Clara cells from naphthalene injury in mice made tolerant by repeated exposures. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 516-523.

West, J.A., Chichester, C.H., Buckpitt, A.R., Tyler, N.K., Brennan, P., Helton, C. und Plopper, C.G. (2000b). Heterogeneity of clara cell glutathione. A possible basis for differences in cellular responses to pulmonary cytotoxicants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 27-36.

Witschi, H. (1990). Responses of the lung to toxic injury. *Environ Health Perspect* 85, 5-13.

Wong, O., Trent, L.S. und Whorton, M.D. (1994). An updated cohort mortality study of workers exposed to styrene in the reinforced plastics and composites industry. *Occup Environ Med* 51, 386-396.

Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. und Turner, N.D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134, 489-492.

Yap, L.P., Sancheti, H., Ybanez, M.D., Garcia, J., Cadenas, E. und Han, D. (2010). Determination of GSH, GSSG, and GSNO using HPLC with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 473, 137-147.