

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS 16

Regulative Mechanismen intrazellulärer Antioxidantien in Staub-exponierten humanen bronchoepithelialen Zellen *in vitro* und *in vivo*

von

A. Gillissen^{#*}, S. Löseke[#], M. Jaworska^{#§}, D. Wickenburg[#], A. Fisseler-Eckhoff[§],
G. Schultze-Werninghaus[#]

* Universitätsklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Medizinische Klinik und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. B. Lüderitz)

Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannsheil - Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum

[#] Medizinische Klinik und Poliklinik, Abt. für Pneumologie, Allergologie und Schlafmedizin (Leitender Arzt: Prof. Dr. G. Schultze-Werninghaus)

[§] Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. K.-M. Müller)

Die Arbeiten des Projektes „Umwelt und Gesundheit“
werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Förderkennzeichen: PUG L 95 006

72 Seiten

14 Abbildungen

184 Literaturstellen

Juni 1999

INHALT

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	REGULATIVE MECHANISMEN INTRAZELLULÄRER ANTIOXIDANTIEN IN STAUBEXPONIERTE HUMANEN BRONCHOEPITHELIALEN ZELLEN IN VITRO UND IN VIVO	1
1.2	EXPRESSION OF INTRACELLULAR ANTIOXIDANTS IN DUST EXPOSED HUMAN BRONCHOEPITHELIAL CELLS IN VITRO AND IN VIVO.....	4
2	EINLEITUNG	6
2.1	STAUBINDUZIERT ERKRANKUNGEN.....	7
2.1.1	<i>Asbestassoziierte Erkrankungen.....</i>	<i>9</i>
2.1.2	<i>Quarzstaub-assoziierte Erkrankungen</i>	<i>10</i>
2.1.3	<i>Pulmonale Erkrankungen durch künstliche Mineralfasern.....</i>	<i>10</i>
2.2	ZELLULÄRE MECHANISMEN STAUB-INDUZIRTER LUNGENERKRANKUNGEN	12
2.3	OXIDANTIEN ALS VERURSACHER STAUB-BEDINGTER PULMONALER ERKRANKUNGEN	14
2.4	ANTIOXIDATIVE SCHUTZMECHANISMEN	14
2.4.1	<i>Die Bedeutung von Oxidantien in biologischen Prozessen</i>	<i>14</i>
2.4.2	<i>Superoxid-Dismutase.....</i>	<i>18</i>
3	ZIEL DER STUDIE.....	22
4	MATERIAL UND METHODEN	24
4.1	MATERIALIEN	24
4.2	VERWENDETE STÄUBE.....	24
4.3	VERWENDETE ZELLINIE UND INKUBATIONSBEDINGUNGEN	25
4.4	PROBANDENCHARAKTERISIERUNG.....	26
4.5	SOD-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	27
4.6	NACHWEIS EINER SOD-INAKTIVIERUNG	28
4.7	KOMPETITIVE RT-PCR	28
4.8	QUANTIFIZIERUNG DER SOD-MRNA DURCH NORTHERN-ANALYSEN.....	29
4.9	NICHT-RADIOAKTIVE IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (NISH).....	29
4.10	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES MNSOD-ENZYMS	30
4.11	QUANTIFIZIERUNG DES MNSOD-ENZYMS IN ZELLYSATEN	30
4.12	BESTIMMUNG DES GESAMT-PROTEINS	31
4.13	STATISTIK.....	31
5	ERGEBNISSE.....	32
5.1	IN VITRO UNTERSUCHUNGEN AN STAUB-EXPONIERTE BEAS 2B-ZELLEN.....	32
5.1.1	<i>Superoxiddismutasenaktivität nach Exposition mit Fasern/Stäuben.....</i>	<i>32</i>
5.1.2	<i>Quantifizierung des MnSOD-Enzyms in exponierten BEAS 2B-Zellen</i>	<i>34</i>

5.1.3	<i>Quantifizierung der MnSOD-mRNA durch Northern-Analysen</i>	34
5.2	QUANTIFIZIERUNG DER $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA DURCH NORTHERN-ANALYSEN	36
5.2.1	<i>Nachweis der MnSOD-mRNA in exponierten BEAS 2B-Zellen durch In-situ-Hybridisierung</i>	37
5.3	IN VIVO UNTERSUCHUNGEN DER MNSOD-EXPRESSION AN BRONCHIALSCHLEIMHAUTBIOPSIEN	39
5.3.1	<i>Quantifizierung der MnSOD-mRNA in Bronchialschleimhautbiopsien</i>	40
5.3.2	<i>Quantifizierung des MnSOD-Enzyms in vivo</i>	41
5.3.3	<i>Messung der MnSOD-Aktivität in Biopsien verschiedener Probandengruppen</i>	42
5.3.4	<i>Hemmung der SOD Enzymaktivität durch Krokydolith und/oder H_2O_2</i>	43
5.4	MORPHOLOGISCHE ZUORDNUNG DER MNSOD-mRNA IN BRONCHIALSCHLEIMHAUTBIOPSIEN	44
5.4.1	<i>Morphologische Zuordnung des MnSOD-Enzyms in Bronchialschleimhautbiopsien</i>	45
6	DISKUSSION	46
6.1	DIE BARRIEREFUNKTION BRONCHOEPITHELIALER ZELLEN	46
6.2	IN VITRO UNTERSUCHUNGEN	47
6.2.1	<i>Verhalten der SOD-mRNA-Spiegel</i>	48
6.2.2	<i>Verhalten der SOD-Aktivitäts- und -Proteinkonzentrationen</i>	50
6.2.3	<i>Klärung der Differenz der verschiedenen SOD-mRNA- Aktivitäts- und -Proteinkinetiken (Enzymregulation)</i>	51
6.2.4	<i>Gründe für die unterschiedlichen Staub-spezifischen Effekte</i>	53
6.2.5	<i>Physikalische und chemische Unterschiede zwischen Krokydolith, Quarz und Steinwolle</i>	56
6.3	IN VIVO UNTERSUCHUNGEN.....	56
6.4	RESUMÉ	59
7	LITERATUR	61
8	DANKSAGUNGEN	75

1 Zusammenfassung

1.1 **Regulative Mechanismen intrazellulärer Antioxidantien in Staubexponierten humanen bronchoepithelialen Zellen in vitro und in vivo**

A. Gillissen^{*#}, S. Löseke[#], M. Jaworska^{#§}, D. Wickenburg[#], A. Fisseler-Eckhoff[§], G. Schultze-Werninghaus[#]

* Universitätsklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Medizinische Klinik und Poliklinik, Innere Medizin, Bonn; [§] Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannsheil - Universitätsklinik der Ruhr-Universität,

[#] Medizinische Klinik und Poliklinik, Abt. für Pneumologie, Allergologie und Schlafmedizin, [§] Institut für Pathologie, Bochum

Einleitung: Neben der Katalase und dem Glutathionsystem werden die Superoxid-Dismutasen (SOD), bestehend aus der im Zytosol lokalisierten Kupfer-/Zink-Superoxid-Dismutase ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD) und der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD), als die wichtigsten antioxidativ wirkenden Enzyme in Säugetierzellen angesehen. Antioxidantien schützen die wegen ihrer Barriere- und Stoffwechselfunktion wichtigen bronchoepithelialen Zellen auch vor Staub-induzierten reaktiven Sauerstoffmetaboliten.

Aufgabenstellung: Quantifizierung antioxidativer Protektionsmechanismen nach Staubexposition in bronchoepithelialen Zellen mit Betonung auf der genetisch regulierten SOD.

Studiendesign/Methodik: Das Forschungsvorhaben gliedert sich in zwei Abschnitte:

- a) Im *in vitro* Teil wurden nach Exposition einer humanen bronchoepithelialen Zelllinie (BEAS 2B) mit verschiedenen Stäuben (UICC [*Union Internationale Contre le Cancer*]-Krokydolith [KR], Steinwolle [SW] und Quarz [Si]; Konzentrationsbereich: $2\text{-}50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Inkubationszeit: 24 h) folgende Quantifizierungen durchgeführt: MnSOD mRNA, $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD mRNA (jeweils mittels Northern-Analysen), intrazelluläre SOD-Aktivitäten (kinetische Assays), und SOD-Enzymkonzentrationen (ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*).
- b) Um die Frage zu beantworten, ob sich die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragen lassen, wurden Probanden (n=61: stattgehabte Asbest- [n=8] bzw. Quarzmischstaub-Exposition [n=8]; nicht-staubexponierte Probanden: Raucher [n=19], Nichtraucher [n=26]) rekrutiert, bronchoskopiert und biopsiert. In den Bronchialschleimhautbiopsien wurden bestimmt: MnSOD mRNA (semiquantitative

RT-PCR), SOD-Aktivitäten (s.o.), SOD-Enzymkonzentrationen (s.o.), morphologische Lokalisation der MnSOD (mRNA: In-situ-Hybridisierung; Enzym: immunhistochemische Analysen).

Ergebnisse/Diskussion:

- ad a) Die initial sehr niedrigen MnSOD mRNA-Werte ruhender nicht-exponierter BEAS 2B-Zellen stiegen schon bei geringer KR-Exposition ($\geq 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) signifikant ($p < 0,01$) an und fielen bei höheren KR-Konzentrationen ($\geq 10-50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) wieder ab. Im Gegensatz dazu veränderte sich die schon initial in nicht-exponierten Zellen erhöhte $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD mRNA durch eine KR-Exposition ($\geq 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) nicht. Bei den o.g. höheren KR-Konzentrationen zeigte sich, wie bei der MnSOD mRNA, ein abfallendes Reaktionsmuster. Diese Reduktion ist die Folge eines beginnenden zytotoxischen KR-Effekts (siehe PUG-Bericht 1996, PUG LUVA 95 006). Der MnSOD mRNA-Anstieg bei den mit SW und Si exponierten Zellen war ähnlich. Ab Si-Konzentrationen von $\geq 25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sank die MnSOD mRNA. Im Gegensatz dazu trat eine SW-bedingte MnSOD und $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD mRNA-Reduktion nicht auf. Damit hatten alle Stäube eine MnSOD mRNA induzierende Wirkung, die jedoch bei KR und Si durch die zunehmende Staub-induzierte Zytotoxizität abnahm: $\text{KR} > \text{Si} > \text{SW}$. Während bei KR die SOD-Aktivität und die MnSOD-Enzymkonzentrationen anstiegen (KR $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 96 h Inkubation), verhielten sich die entsprechenden Werte nach Si und SW uneinheitlich.
- ad b) Die *in vitro* erhobenen Ergebnisse lassen sich nicht auf die *in vivo* Situation übertragen, da sich bezüglich der MnSOD mRNA, der SOD-Aktivitäts- und der SOD-Enzymbestimmungen zwischen den Staub- und nicht-staubexponierten Probanden keine signifikanten Unterschiede errechneten. Eine jahrzehntelange Zigarettenrauchexposition erwies sich dagegen als starker MnSOD mRNA-Induktor: Anstieg um das 4,3-fache gegenüber Nichtrauchern ($p < 0,001$). In der In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie zeigte sich eine vorzugsweise in den bronchoepithelialen Zellen lokalisierte MnSOD Expression. Eine SOD-Aktivitäts- oder SOD-Enzymerhöhung ließ sich bei den Rauchern nicht nachweisen. Diese im Vergleich zu den erhöhten MnSOD mRNA-Werten bestehende Diskrepanz wurde als erhöhter Enzymumsatz bei kompensatorisch erhöhten mRNA-Spiegeln gewertet.

Zusammenfassung: Alle getesteten Stäube (KR, Si, SW) zeigten *in vitro* einen prooxidativen Effekt (MnSOD-Induktion). KR, bei höheren Konzentrationen auch Si (nicht aber SW) wirkten zytotoxisch. *In vivo* scheinen die durch eine Staubexposition verursachten prooxidativen Effekte im Gegensatz zu dem Zigarettenrauch-bedingten Einfluß nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Zigarettenrauch ist nach unseren *in vivo* erhobenen Ergebnissen somit der stärkste Induktor einer zelleigenen antioxidativen Abwehrreaktion.

1.2 Expression of intracellular antioxidants in dust exposed human bronchoepithelial cells in vitro and in vivo

A. Gillissen^{*#}, S. Löseke[#], M. Jaworska^{#§}, D. Wickenburg[#], A. Fisseler-Eckhoff[§], G. Schultze-Werninghaus[#]

* University Hospital of Bonn, Dept. of Internal Medicine, Div. of Pneumology, Germany; [#] University Hospital Bergmannsheil, [#] Dept. of Internal Medicine, Div. of Pneumology, Allergology and Sleep Medicine, [§] Institute of Pathology, Bochum, Germany

Introduction: Besides catalase and the glutathione system particularly the genetically regulated superoxide dismutases (SOD) consisting of the cytosol located copper/zinc SOD ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD) and the mitochondrial manganese SOD (MnSOD) are considered as the major antioxidative defense enzymes in mammalian cells. In human lung bronchoepithelial cells function as a biological barrier between the environment and the lung interstitium. Thus, it is essential that these cells protect themselves also from reactive oxygen metabolites eventually derived from inhaled dust particles.

Task of this study: Quantification of antioxidative protection mechanisms in dust exposed bronchoepithelial cells particularly in regard to endogenous SOD expression.

Study design and methods: This study consists of two complementary parts:

- a) For the *in vitro* part BEAS 2B cells, a human non-malignant bronchoepithelial cell line, were exposed to increasing concentrations ($2\text{-}50\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) of various dusts: UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*)-crocidolite (CR), silica (Si) and rockwool (RW). MnSOD mRNA, $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD mRNA (both Northern Blot analysis), SOD-activities (kinetic assays), and SOD-enzymes (ELISA = *enzyme linked immuno sorbent assay*) were quantified.
- b) Furthermore, to evaluate if these *in vitro* data may or may not represent the *in vivo* situation, n=61 patients and healthy volunteers (asbestos exposed workers n=8, coal mining workers n=8, non-dust exposed volunteers: smoker n=19, non-smoker n=26) were recruited and, among clinical evaluations, bronchoscopies were performed and bronchial biopsies were taken. In these biopsies we performed the following evaluations: semi-quantification of MnSOD mRNA content (semiquantitative RT-PCR), quantification of SOD-activities (s.a.) and SOD-enzymes (s.a.). For morphological categorization, we additionally performed *in situ* hybridization as well as immunohistochemical analysis.

Results and discussion:

- ad a) The initially low MnSOD mRNA levels of non-exposed BEAS 2B cells increased significantly ($p < 0,01$) after CR exposure already at low fiber concentrations ($\geq 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). At higher concentrations ($\geq 10\text{-}50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) MnSOD mRNA levels attenuated. In contrast, initially elevated $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD mRNA levels in resting cells remained unchanged after dust exposure. However, at high CR concentrations they were, like the MnSOD mRNA levels, decreased. mRNA reduction pattern at high CR concentrations coincides with increasing cytotoxicity (see PUG-report 1996, PUG LUVA 95 006) indicating a toxic effect. MnSOD mRNA increase was also seen in Si and RW exposed cells. Reduction of these levels occurred after Si exposure using $\geq 25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ but not after RW incubation. Thus, Si and RW have a significant prooxidative effect. In contrast to CR, their cytotoxic potency is lower ($\text{CR} > \text{Si} > \text{RW}$). While SOD activity and MnSOD enzyme levels increased after CR exposure, Si and RW induced inconsistent results.
- ad b) From our results we conclude that the data obtained *in vitro* under controlled conditions may not be transferable to the *in vivo* situation because significant differences in MnSOD mRNA, SOD activity and SOD enzyme levels between asbestos, coal mining workers and non-smoking individuals were not seen. Most interestingly, cigarette smoke seems to be by far the strongest MnSOD mRNA inducer. MnSOD mRNA levels in bronchoepithelial cells in smokers were 4,3-times higher than in non-smokers ($p < 0,001$). In situ hybridization and immunohistochemistry demonstrated MnSOD expression mainly in bronchoepithelial cells supporting the hypothesis of the importance of their barrier function in the bronchial tree. In contrast to MnSOD mRNA elevations, activity and enzyme levels were comparable within all groups, thus lacking higher levels in the smoker group. This potential discrepancy may indicate a high SOD enzyme turnover with concurrent compensatory elevation of mRNA levels.

Summary: All dusts as tested (CR, Si, RW) were demonstrated to have prooxidative effects on bronchoepithelial cells by inducing cellular antioxidative defense (SOD). CR, at higher concentrations also Si, but not RW, increased cytotoxicity. *In vivo* however, after dust exposure SOD expression remained small in comparison to SOD expression after cigarette smoke inhalation. Thus, according to our results cigarette smoke is by far the most potent inducer of antioxidative defense in bronchoepithelial cell.

2 Einleitung

Inhalierte Stäube können in den Atemwegen und in der Lunge nicht nur akute und chronische inflammatorische Prozesse auslösen, sondern auch maligne Erkrankungen induzieren. In Abhängigkeit von der Faserart, der kumulativen Exposition, der Expositionsdauer und anderer mitbestimmender Faktoren (z.B. gleichzeitiges Zigarettenrauchen) führen insbesondere Asbestfasern nach einer u.U. jahrzehntelangen Latenzzeit zu Lungenfibrosen (Asbestosen), Lungenkarzinomen oder Pleuramesotheliomen (3;17). Die Zunahme Asbest-induzierter Lungenerkrankungen hat seit den 60er Jahren nicht nur eine klinische, sondern auch eine sozio-ökonomische Bedeutung erlangt, da diese als Berufskrankheiten zunehmend Entschädigungen zur Folge haben (39;63;116). Die Gründe für die pathogene Wirkung von Asbestfasern sind vielfältig. Sie hängt z.B. ab von der Fasergeometrie, der Faserchemie und insbesondere bei Krokydolith von der sehr hohen Materialbeständigkeit und Bioverfügbarkeit (siehe Übersichten (14;63)). Auf zellulärer Ebene scheint insbesondere bei Krokydolith der durch die Eisenionen an der Faseroberfläche vermittelte prooxidative Effekt bedeutsam zu sein. Eisenionen wirken bei Sauerstoffradikal-produzierenden Reaktionen als Katalysatoren. Die als Oxidantien bezeichneten reaktiven Sauerstoffmetabolite entstehen *in vivo* 1) durch anorganische Reaktionen, 2) werden durch aktivierte Entzündungszellen (z.B. durch Asbestfasern aktivierte Alveolarmakrophagen, besonders bei der s.g. frustranen Phagozytose) gebildet, oder werden 3) von externen Quellen (z.B. durch die Inhalation von Zigarettenrauch, Ozon, hohe FIO₂-Konzentrationen bei Beatmungspatienten u.v.a.m.) inhalativ in die Lunge hineingetragen. Reaktive Sauerstoffmetabolite sind aus mehreren Gründen zellpathogen: Sie können DNA-Strangbrüche induzieren, Onkogene aktivieren bzw. Tumorsuppressorgene inhibieren, Enzyme und Proteine inaktivieren oder führen zur Lipidperoxidation (19;20;90;153). Basierend auf diesen Erkenntnissen stellten wir die Hypothese auf, daß die klinisch beobachtbaren, z.B. durch Asbestfasern und quarzhaltige Stäube verursachten intrathorakalen Erkrankungen auch durch die faservermittelte Oxidantienfreisetzung bei gleichzeitigem inadäquaten Schutz durch das körpereigene Antioxidantiensystem hervorgerufen werden könnten (14;36;51;145). Dieser Aspekt wurde von uns sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* durchgeführten Untersuchungen an einer bronchoepithelialen Zelllinie bzw. an mittels Bronchoskopie gewonnenen Bronchialschleimhautbiopsien untersucht. Vor der Spezifizierung der Fragestellung und der Beschreibung der methodischen Schritte soll an

dieser Stelle zunächst eine Übersicht über den beschriebenen Themenkomplex gegeben werden.

2.1 Staubinduzierte Erkrankungen

Erkrankungskategorien	Verursachendes Agens
Irritationen des oberen Respirationstraktes	Reizende Gase und Lösungsmittel
Berufsasthma Sensibilisierung mit niedrig-, und hochmolekularen Substanzen Unspezifische Auslöser und RADS Chronische Bronchitis (COPD)	Isozyanate, Anhydride, Holzstaub, bzw. Tierallergene, Latex Reizgase Stein- (misch-) Stäube
Akute Inhalationsschäden Toxische Pneumonitis Metалldampffieber Polymerdampffieber Rauchinhalationen/Inhalationstraumen	Reizgase, Metalle Metalloxide: Zink, Kupfer Kunststoffe Verbrennungsprodukte
Exogen-allergische Alveolitis	Bakterien, Pilze, Tierproteine
Infektionserkrankungen	Tuberkulose, Viren, Bakterien
Pneumokoniosen	Asbest, Silikate, Kohle, Beryllium, Cobalt
Maligne Erkrankungen Sinunasale Tumoren Lungentumoren Pleuramesotheliome	Holzstäube Asbest, Radon Asbest

Tabelle 1: Durch berufliche Expositionen ausgelöste pulmonale Erkrankungen. RADS = *reactive airway dysfunction syndrom*. COPD = chronisch-obstruktive Atemwegserkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*), modifiziert nach (140).

Die Lunge hat durch ihre Aufgabe als Gasaustauschorgan über ihre sehr große Austauschfläche, den hohen Blutfluß und die dünnen Diffusionsmembranen der Alveolen einen intensiven Kontakt mit der "aerogenen" Umwelt. Es sind eine Fülle von inhalativen lungenpathogenen Substanzen beschrieben worden, z.B. mineralische Stäube (Asbest, Quarz), organische Materialien, mikrobiologische Organismen, Metalle (Beryllium, Nickel, Kobald, Aluminium) oder anorganische Gase (Karbonmonoxid, Chlor, Stick- und andere Oxide), die zu den unterschiedlichsten pulmonalen Erkrankungen führen können (Tab. 1). Die Expositionen treten oft in Zusammenhang mit der beruflichen Tätigkeit auf, weswegen viele dieser Substanzen auch aus berufsgenossenschaftlicher Sicht relevant sind (140).

Gewisse klinisch relevante Besonderheiten stehen in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Entwicklung berufsbedingter pulmonaler Erkrankungen (140):

- a) Nur wenige beruflich inhalierte Stoffe verursachen für sich alleine genommen bestimmte für den jeweiligen Stoff charakterische Lungenveränderungen. Oft läßt sich eine pulmonale Erkrankung nur schwer allein auf ein berufliches Agens zurückführen. Oft handelt es

sich um Mischbilder (z.B. die Entwicklung einer chronisch-obstruktiven Bronchitis bei einem rauchenden Bergmann).

- b) Lungen- und Atemwegserkrankungen sind oft multifaktoriell verursacht, so daß beruflich inhalierte Stoffe mit anderen Faktoren interagieren und es erst dadurch zu pulmonalen Problemen oder der Entwicklung maligner Erkrankungen kommt (z.B. entwickeln rauchende Asbestexponierte eher Lungenkarzinome als Nichtraucher der gleichen beruflichen Expositionsgruppe).
- c) Die am Arbeitsplatz inhalierte Substanz kann mehr als nur eine klinisch faßbare Erkrankung auslösen. So verursacht z.B. Cobalt zum einen interstitielle Lungen-erkrankungen, andererseits aber auch eine Atemwegsobstruktion, gleiches gilt grundsätzlich auch für die Quarzmischstaub-Exposition.
- d) Die Expositions-dosis ist ein für den Erkrankungsbeginn und für die Erkrankungsschwere in aller Regel bestimmender Faktor, da die Höhe und die Dauer der Exposition bis auf wenige Ausnahmen (z.B. korreliert die Inzidenz des Pleuramesothelioms nicht mit der Asbest-Expositionsdauer) mit der Erkrankungsschwere korreliert.
- e) Der Zeitfaktor kann eine Ursachenbeziehung zwischen der stattgehabten Exposition und der vorhandenen Erkrankung erschweren andererseits aber auch erleichtern. Bei akuten Erkrankungen, wie z.B. der toxischen Pneumonitis, ist die Ursachenbeziehung zu dem auslösenden Agens oft leicht. Dies trifft auch bei wiederholten Krankheitsschüben zu, die im ursächlichen Zusammenhang mit der Arbeitszeit oder der jeweiligen Tätigkeit stehen (z.B. Bäckerasthma). Diagnostisch schwierig wird es aber, wenn eine lange Latenzperiode zwischen der Tätigkeit und dem Ausbruch der Erkrankung besteht, oder wenn der Patient schon eine längere Zeit gar nicht mehr exponiert ist (z.B. Asbest-assoziierte Erkrankungen).
- f) Individuelle Faktoren können die Entwicklung von pulmonalen Erkrankungen begünstigen oder verhindern, wobei sich im Einzelfall das bestehende Risikoprofil oft nicht quantifizieren oder nur sehr grob abschätzen läßt. So können immunmodulierende Prozesse, wie sie nach einer chronischen Berylliumexposition beschrieben wurden, perpetuieren, obwohl die vorgeschriebenen MAK (maximale Arbeitsplatz-Exposition) – Werte eingehalten wurden. Eine andere Unsicherheit besteht in der individuell unterschiedlichen Reaktion bestimmter Schutzgene (z.B. Antioxidantien) auf bestimmte Reizstoffe. Beides, sowohl eine überschießende Reaktion (z.B. bei allergischen Reaktionen) aber auch eine zu schwache Reaktion kann die individuelle Empfänglichkeit

auf bestimmte Stoffe erheblich beeinflussen. Ob antioxidative Mechanismen (bzw. ein Mangel) an Antioxidantien in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind, ist derzeit nicht bekannt.

2.1.1 Asbestassoziierte Erkrankungen

Asbest ist ein natürlicherweise vorkommendes silikatisches Mineral. Es gelangte in Deutschland im wesentlichen in seinen beiden Modifikationen Chrysotil (Weißasbest) und Krokydolith (Blauasbest) mit Anteilen von 90-95% respektive 5-10% zum industriellen Einsatz. Wegen seiner speziellen Werkstoffeigenschaften wie Hitzebeständigkeit, Scher- und Bruchfestigkeit wurde es in zahlreichen Bereichen industriell verwendet. Seit 1993 besteht gemäß der Gefahrstoffverordnung ein generelles Asbestverbot in Deutschland (139).

Asbest hat beim Menschen sowohl im Bereich des Lungenparenchyms und der Pleura fibrogene als auch kanzerogene Wirkungen, die sich in Form von Lungenfibrosen (Asbestosen), Pleuraveränderungen (Plaques) und Tumoren im Bereich der Lunge und der Pleura manifestieren können (15;128;148). Seltener sind das Perikard und das Peritoneum betroffen. Bei Asbest-verursachten Erkrankungen handelt es sich um keine obligat auftretenden Gesundheitsstörungen, sondern um ein fakultatives Krankheitsgeschehen, wobei die Intensität und die Dauer der Exposition bei zusätzlich bestehender individueller Disposition maßgebliche Faktoren für den klinisch faßbaren Krankheitsverlauf darstellen (9). Für die fibrogene Wirkung ist eine durchschnittliche Latenzzeit von 15-20 Jahren anzunehmen (137).

Das Plattenepithel- und das Adenokarzinom sind die häufigsten nach einer Asbestexposition beobachtbaren histologischen Lungenkrebsformen (16;17). Das Risiko für einen Exponierten, einen Lungentumor zu entwickeln, steigt mit höherer und längerer Asbeststaub-Exposition sowie mit der Intensität eines Zigarettenabusus (Summationseffekt) (144). Im Gegensatz zum Lungenkarzinom scheint bei der Entwicklung Asbest-bedingter maligner Pleura- (Pleuramesotheliom) bzw. Peritonealerkrankungen keine Beziehung zur Expositionsdauer und zum Zigarettenkonsum zu bestehen. Mit dem Entstehen eines Mesothelioms sind 20-25 Jahre zurückliegende, aber oft relativ kurzandauernde Expositionen mit hohen Asbestfaserkonzentrationen von 1-2 Jahren verbunden (143).

2.1.2 Quarzstaub-assoziierte Erkrankungen

Inhalierter kristalliner Quarzsand bzw. die Kieselsäure (SiO_2) oder deren entsprechenden Anteile in Mischstäuben verursachen beim Menschen die Silikose. Zu den wichtigsten Belastungsquellen der SiO_2 -haltigen Stäube gehören, Steinmetzbetriebe, Schleifereien, Eisenhütten, Gesteinsmühlen und Steinbrüche (bes. Granit). Häufig tritt die Silikose dosisabhängig nach einer jahrelangen bis jahrzehntelangen Exposition auf. Bei sehr hohen Expositionen, wie sie bei Sandstrahlern in geschlossenen Räumen beschrieben wurden, können sich akute Silikosen schon nach wenigen Monaten entwickeln, die sogar trotz eines Expositionsstopps weiter fortschreiten können. Nach einer langfristigen, relativ geringen Belastung erscheinen nach ca. 15-20 Jahren als klassische radiologische Befunde kleine, rundliche Verschattungen, u.U. Lymphknotenverkalkungen (ca. 20%), eine retikuläre Zeichnungsvermehrung und unregelmäßige Verdichtungen (Schwielen). Funktionell leiden die Patienten an einer Atemwegsobstruktion, bei entsprechendem interstitiellen Einschränkungen auch an einer restriktiven Lungenerkrankung, wobei aber das Ausmaß der radiologischen Veränderungen nicht mit den Funktionsausfällen korrelieren muß. An typischen Komplikationen treten bei diesen Patienten vermehrt spezifische Infektionen auf (Silikotuberkulosen) (77).

Im Gegensatz zu der reinen Silikose entwickeln sich nur bei vergleichsweise wenigen Bergleuten eine als Anthrasilikose bezeichnete Pneumokoniose. Der Grund liegt wohl wesentlich in der anderen Staubzusammensetzung, denn Kohlestaub selbst ist weit weniger lungenpathogen als Silikat. Aber auch hier ist der allerdings wesentlich geringere SiO_2 -Anteil (<10%) im Kohlestaub das pathogenetisch auslösende Agens. Als weiterer Erkrankungsmechanismus wird eine durch die exzessiven Staubmengen bedingte Einschränkung des natürlichen bronchialen Reinigungsmechanismus diskutiert. Eine durch quarzhaltige Stäube bedingte Induktion maligner, pulmonaler Erkrankungen ist nicht zweifelsfrei geklärt, obwohl SiO_2 auch DNA-Schäden hervorrufen kann (77;157;184).

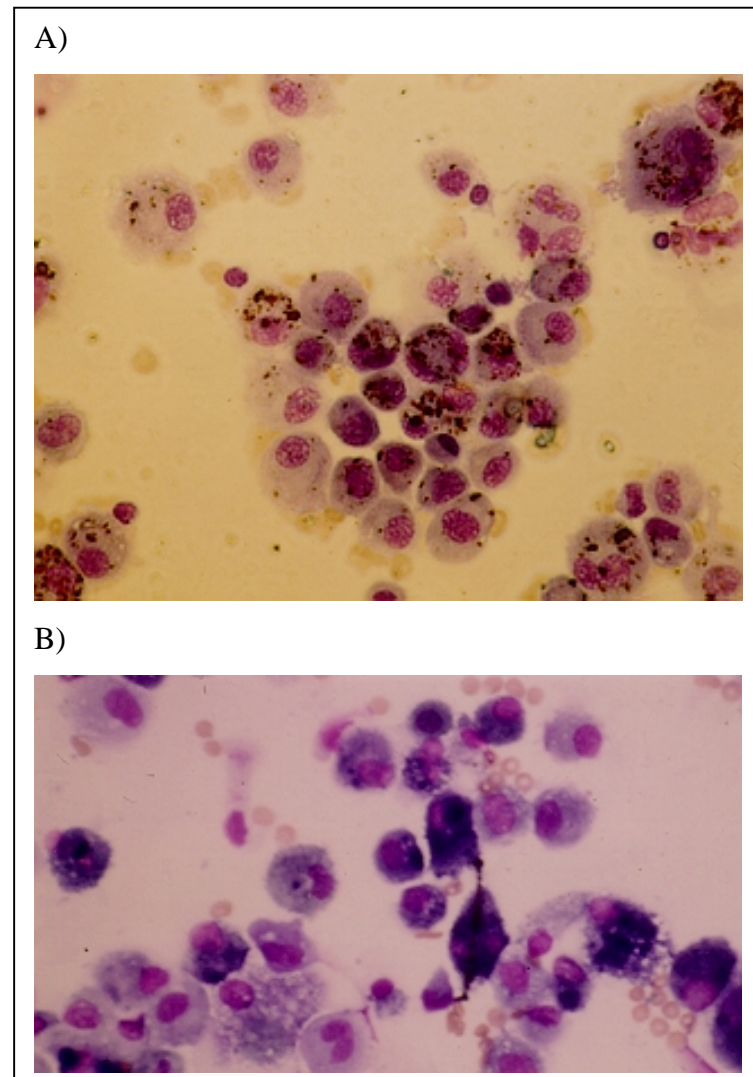
2.1.3 Pulmonale Erkrankungen durch künstliche Mineralfasern

Entsprechend ihrer Materialeigenschaften zählt man zu den künstlichen Mineralfasern (*man made mineral fibers* = MMMF) Produkte der petrochemischen Industrie, die *natürlichen* Fasern Sisal, Seide und Wolle, und die aus Schlacken hergestellten Fasern (s.u.). In der Literatur werden überwiegend die aus amorphen Silikaten mit einer kristallinen Struktur hergestellten als *künstliche* Mineralfasern unter dem Begriff der MMMF zusammengefaßt

(65). Die Einteilung dieser MMMF ist im Vergleich zum Asbest wesentlich heterogener (siehe Übersicht: (63)). Die MMMF werden entweder aus Schmelzschlacken (z.B. Kalkstein, Granit, Schiefer) oder aus Eisen- und Stahlschlacken (aber auch aus anderen Metallen wie Chrom, Blei, Kupfer etc.) hergestellt. Die heute verwendeten MMMF sind zusätzlich mit Bindemitteln (Phenol-Formaldehyde) und zusätzlich zur Reduktion der Staubentwicklung mit mineralischen oder pflanzlichen Ölen bzw. Wachsen behandelt (65).

Die MMMF sind im Gegensatz zu den natürlichen Fasern (insbesondere Asbestfasern) weit weniger intensiv untersucht worden. Ein Grund hierfür war das Fehlen eines „typischen“ oder gar spezifischen MMMF-induzierten Krankheitsbildes in den Lungen oder der Pleura (116;126;162). In tierexperimentellen Studien gibt es nach Verabreichung von hohen Dosen künstlicher Mineralfasern durchaus Reaktionsmuster, die den Befunden auf natürliche Mineralfasern ähnlich sind. Die Beurteilung der klinischen Relevanz dieser tierexperimentellen Befunde wird allerdings durch die bisher z.T. sehr hohe applizierte Fasermenge und die Applikationsart erschwert (10;11;123;163). In den großen Kohorten-Studien ließen sich bislang beim Menschen auch nach langjähriger Arbeitsplatz-bezogener Exposition gegenüber MMMF eine klare und allgemein akzeptierte Ursachen-Wirkungsbeziehung nicht ermitteln (41;155;162). Es fehlt immer noch der epidemiologisch-wissenschaftlich abgesicherte Beweis, daß MMMF ähnlich wie nach einer Asbestfaserexposition fibrogene und/oder kanzerogene Erkrankungen in der Lunge auslösen, weswegen in der derzeitigen Diskussion zwei wesentliche Standpunkte vertreten werden: Die Befürworter einer kanzerogenen Wirkung von MMMF weisen darauf hin, daß a) in den großen Kohortenstudien die Lungenkarzinom-bedingten Sterberaten ähnlich seien wie nach Asbestexposition, daß b) eine erhöhte Mortalität bei Arbeitern in MMMF-verarbeitenden bzw. herstellenden Betrieben nur durch das Bronchialkarzinom bedingt sei, und daß c) eine Beziehung bestünde zwischen der erhöhten Inzidenz von Lungenkarzinomen und dem Fasergehalt der Luft. Gegner der Hypothese einer pro-kanzerogenen Wirkung von MMMFs führen folgende Argumente an: a) Ein Anstieg der Lungenkarzinomhäufigkeit mit zunehmenden Arbeitsjahren konnte nicht gefunden werden. Eine signifikant gegenüber einem nicht-exponierten Kollektiv erhöht gefundene Mortalität fand sich lediglich im ersten Arbeitsjahr, c) die Häufigkeit pulmonaler Malignome betrifft nur Arbeiter der frühen Produktionsphase. Früher waren jedoch die MMMF nicht frei von kanzerogenen Zusatzstoffen. So waren z.B. Beimengungen von Asbest, Arsen oder polyzyklischen aroma-

tischen Hydrocarbonverbindungen häufig, so daß auch diese Stoffe für die Malignomhäufigkeit verantwortlich hätten sein können. d) In den Zigarettenrauch-korrigierten



dieser Frage bringen soll (11;34;38;41;42;42;55;63;65;85;113;122;127;132;134;155;162).

2.2 Zelluläre Mechanismen Staub-induzierter Lungenerkrankungen

Um die Pathogenese von Pneumokoniosen (und auch von Staub-induzierten kanzerogenen Prozessen) auf zellbiologischer Ebene zu analysieren und verstehen zu können, bedarf es

Abbildung 1: A) Makrophagen die mittels BAL bei einem Bergmann aus der Lunge herausgespült wurden. Es zeigen sich im Zytoplasma die typischen Kohleeinlagerungen. B) Makrophage mit einem Asbestkörperchen eines Asbest-exponierten Probanden

Detailkenntnisse der sie verursachenden inflammatorischen Prozesse und der gleichzeitig bestehenden zelleigenen protektiv wirkenden Verteidigungsmechanismen. Erst ein Ungleichgewicht zu Gunsten der bei einer Entzündungsreaktion ablaufenden zellschädigenden Mechanismen ermöglicht das Entstehen pathologischer Veränderungen (16).

Kontrollstudien ließ sich eine signifikante Steigerung des Krebsrisikos nach MMMF-Exposition nicht mehr nachweisen. Insgesamt scheint nach diesen Argumenten ein Zusammenhang von der erhöhten Malignitätsinzidenz nur mit den verschiedenen Beimengungen der frühen Produktionsphase zu bestehen. Dieser epidemiologische Aspekt ist aber nicht Gegenstand der hier vorgestellten auf zellbiologischen Verfahren beruhenden Untersuchungen, zumal eine z.Zt. noch laufende und noch nicht abgeschlossene große europäische Studie aus epidemiologischer Sicht eine Klärung in

Das Prinzip einer Staub-vermittelten pulmonalen Entzündungsreaktion beruht initial auf einer Aktivierung inflammatorischer Zellen (Bronchiallumen und Lungenparenchym), die dann eine Fülle von Entzündungsmediatoren (Proteasen, Sauerstoffradikale, Zytokine u.a.m.) freisetzen, wodurch unter der Voraussetzung eines unzureichenden, zelleigenen, antiinflammatorischen Schutzes oder inadäquater Reparaturmechanismen Schäden in der Lungenarchitektur resultieren (145). Zu den bedeutsamsten Entzündungszellen werden insbesondere die alveolären Makrophagen und die Granulozyten (neutrophile Granulozyten) gerechnet (16;152;160). Eine solche chronische Entzündungsreaktion, mit den dabei beginnenden parenchymalen Umbauvorgängen, ist durch eine Akkumulation mesenchymaler Zellen, die ihrerseits z.B. Wachstumsfaktoren freisetzen (z.B. *platelet-derived growth factor*, Fibronektin, *insuline-like growth factor*, *transforming growth factor β* , Prostaglandine, *epidermal growth factor-receptor protein* u.a.m.) charakterisiert (83;100;130). Diese Faktoren führen zu einer Steigerung der Kollagensynthese bei gleichzeitiger Hemmung der Kollagenase. Am Ende dieser Reaktion stehen dann die irreversiblen Lungenparenchymveränderungen, wie das Lungenemphysem und die Lungenfibrose (14;32;160).

Die Annahme, daß bei der Initiierung des oben beschriebenen Szenarios mononukleäre Zellen und hier besonders alveoläre Makrophagen eine Schlüsselrolle spielen, basiert sowohl auf, tierexperimentellen Studien, als auch auf Beobachtungen an entsprechend exponierten Menschen (160). Alveoläre Makrophagen nehmen inhalierte Partikel auf, um diese zu inaktivieren, abzubauen und schließlich zu eliminieren. In der Differentialzytologie aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) entsprechend belasteter Patienten lassen sich nicht nur ein erhöhter Makrophagenanteil (53) sondern in alveolären Makrophagen (Abb. 1A) auch intrazelluläre Einschlüsse von Kohlestäuben bzw. phagozytierte Asbestkörperchen lichtmikroskopisch nachweisen (Abb. 1B). Diese Makrophagen sind, meßbar an einer gesteigerten Oxidantienfreisetzung, wesentlich aktiver als die von Nicht-Exponierten (14;60;82;145). An Meerschweinchen durchgeführte Untersuchungen belegen, daß die durch Asbestfasern aktivierten alveolären Makrophagen zudem chemotaktische Faktoren freisetzen, die neutrophile Granulozyten anlocken (*neutrophil chemotactic factor*) (152). Alveoläre Makrophagen werden durch eine Staubexposition zur Sauerstoffradikalbildung angeregt. Die Zellen von Asbest-, Quarz-, oder auch Kohlemischstaub-Exponierten produzieren im Vergleich zu nicht-staubexponierten Zellen zwei- bis dreimal mehr reaktive Sauerstoffmetabolite einschließlich der als Ausgangsstoff für weit toxischere Radikale

wichtigen Superoxidanionen und des Wasserstoffperoxids (48;144). Auch Zigarettenraucher haben eine gesteigerte Anzahl aktivierter alveolärer Makrophagen, so daß bezüglich des zellulären Reaktionsmusters bei einer kombinierten Exposition (Staubinhalation bei Zigarettenrauchern) ein additiver proinflammatorischer Effekt anzunehmen ist (26;86;129). Der Nachweis einer unter den oben geschilderten Bedingungen erhöhten Sauerstoffradikalfreisetzung ist aus pathogenetischer Sicht bedeutungsvoll, da diese nicht-inhibierten Radikale zelltoxisch sind und daher die oben beschriebenen Lungenschäden hervorrufen oder intrapulmonale Entzündungsprozesse wesentlich mitbeeinflussen können (70;171).

2.3 Oxidantien als Verursacher Staub-bedingter pulmonaler Erkrankungen

Bezüglich der Einteilung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, deren Charakterisierung und Bedeutung bei pulmonalen Entzündungsprozessen, wie dem ARDS (*adult respiratory distress syndrome*), der idiopathischen Lungenfibrose (IPF), der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose), Asbest-assoziierten Erkrankungen oder der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), wird auf die zahlreichen Originalarbeiten und Übersichten in der Literatur sowie auf unser vorangegangenes Forschungsprojekt (PUG L 93 006) verwiesen (21;37;52;56;67;76;103;133;147).

2.4 Antioxidative Schutzmechanismen

In gesunden Säugetierzellen besteht ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und antioxidativ wirkenden Substanzen, zu denen Enzyme (z.B. Superoxid-Dismutase [SOD], Katalase, das Glutathionredoxsystem) und nicht enzymatische Antioxidantien (z.B. Glutathion [GSH], Vitamin A, C und E, Methionin, Albumin, Harnstoff, Bilirubin u.a.m.) gezählt werden. Die Gegenspieler dieser Antioxidantien sind das Superoxidanion (O_2^-) und das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die Ausgangssauerstoffmetabolite darstellen, aus denen dann entweder spontan oder über enzymatische Reaktionen wesentlich zelltoxischere Sauerstoffradikale, wie z.B. das Hydroxylradikal (OH^\cdot), entstehen können.

2.4.1 Die Bedeutung von Oxidantien in biologischen Prozessen

Die Erstbeschreibung von SOD 1969 durch McCord und Fridovich hatte direkt zu der Hypothese geführt, daß a) O_2^- das Schlüsselradikal zur Sauerstofftoxizität von Zellen darstellt, aus dem die anderen biologisch vorkommenden Oxidantien entstehen, und b) daß SOD als antioxidatives Schlüsselenzym anzusehen ist (112). Diese Hypothese ist zwar seither

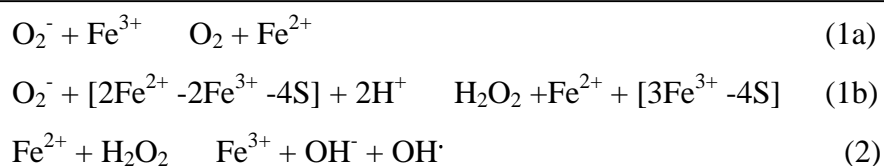
modifiziert worden, behielt aber bis zum heutigen Tag, in Zusammenhang mit den H_2O_2 -bildenden bzw. abbauenden Systemen (Glutathionredoxzyklus und Katalase) ihre Gültigkeit.

2.4.1.1 Entstehung des Superoxidanions

O_2^- wird vorzugsweise in den Mitochondrien (ca. 80% der gesamten produzierten Sauerstoffradikale) aus Sauerstoff (O_2) produziert. Zusätzliche extra-mitochondriale Entstehungsquellen sind selten, gibt es aber z.B. in myokardialen Zellen. O_2^- wird von verschiedenen Enzymsystemen, durch autooxidative Reaktionen und/oder im Rahmen nicht-enzymatischer Elektronentransferreaktionen, indem molekularer Sauerstoff produziert wird, gebildet. Diverse biologisch wichtige Moleküle oxidieren im Rahmen einer autooxidativen Reaktion, wobei O_2^- als Produkt entsteht: Glyceraldehyd, die reduzierte Form von Riboflavin und seine Abkömmlinge FMN und FAD, Adrenalin, Tetrahydropteridine und thiolhaltige Verbindungen. Im Rahmen enzymatischer Reaktionen sind folgende O_2^- -produzierenden Enzyme beschrieben worden: NADPH-Oxidase (vorzugsweise in neutrophilen Granulozyten), Xanthin-Dehydrogenase-Oxidase (vorzugsweise in Endothelzellen im intestinalen Organbereich; auch bedeutungsvoll bei ischämischen Reaktionen), Peroxidasen (Pflanzen und Bakterien), Indolamin-Dioxygenase (Enzymaktivität steigt in der Lunge nach viralen Infekten an), Tryptophan-Dioxygenase (in der Leber), Galaktoseoxidase (in Pilzen), und Aldehydoxidasen (in der Leber) (6;12;68;180). Am Ende dieser (mitochondrialen) Elektronentransportkette steht die Bildung von Wasser (H_2O). Einige Enzyme, wie z.B. die Glykolatoxidase, reduziert O_2 direkt zu H_2O_2 . Das Produkt der meisten intrazellulären Enzymsysteme ist jedoch O_2^- , das dann in intra- und extrazellulären Flüssigkeiten gelöst vorkommt (37).

Warum ist gerade das O_2^- für die Sauerstoffradikalbildung nach einer Staubexposition von so großer Bedeutung ? Die intrazellulären Konzentrationen von H_2O_2 und O_2^- befinden sich in gesunden Säugetierzellen in einem konstanten Gleichgewicht, wobei O_2^- überwiegt: $\text{H}_2\text{O}_2:\text{O}_2^-$

$\approx 1:10^3$. Beide sind



relativ

reaktionsträge (O_2^-

sogar noch mehr als

H_2O_2). Die Re-

aktionskonstante

Tabelle 2: Redoxreaktion zur Bildung des Hydroxylradikals ($\text{OH}\cdot$). Die Reaktion (2) wird auch als Fenton-Reaktion bezeichnet

von O_2^- wird mit $K \approx 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben (180). Durch ihre relative Reaktionsträgheit und der langen Lebenszeit können das geladene O_2^- via Passage durch Anionenkanäle in der Zellmembran und auch ungeladene H_2O_2 via einfacher Diffusion Zellmembranen passieren. Im Gegensatz dazu sind OH^\cdot und die unterchlorige Säure (HOCl) so reaktiv, daß sie sehr kurzlebig sind und schon am Entstehungsort mit dem bestmöglichen Oxidationspartner reagieren. Beide, O_2^- und H_2O_2 , sind durch verschiedene Redoxreaktionen Ausgangsprodukte zur Bildung wesentlich reaktiver und toxischerer Radikale, weswegen ihre Inhibition biologisch unverzichtbar ist. Besonders in der durch verschiedene Metalle (insbesondere Kupfer bzw. Eisen) vermittelten Katalyse entstehen hochtoxische Sauerstoffverbindungen wie z.B. das OH^\cdot (Tab. 2). Wie oben schon erwähnt, ist das OH^\cdot wesentlich reaktionsfreudiger (Reaktionskonstante $K \approx 10^7 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und damit auch zellschädigender. Das Konzept dieser auf O_2^- basierenden Fenton-Reaktion erfordert als Substrat außerdem noch H_2O_2 . O_2^- reduziert das dreiwertige Eisen (Reaktion 1a), welches in der Fenton-Reaktion (Reaktion 2) aus H_2O_2 die Hydroxylradikalbildung katalysiert. *In vivo* hat sich gezeigt, daß O_2^- auch Metallverbindungen ($4Fe - 4S$) oxidiert und durch diese Reaktion nicht nur H_2O_2 , sondern auch zweiwertiges Eisen für die Fenton-Reaktion zur Verfügung gestellt werden (12). Diese chemischen Reaktionen sind gerade für die Asbestfaser-vermittelten Oxidantienfreisetzung von Bedeutung, da Asbest zwei- und dreiwertige Eisenionen auf der Faseroberfläche besitzt. Die Elimination des O_2^- (und auch des H_2O_2) mittels spezifischer Antioxidantien (SOD) spielt in Zellen mit einem aeroben Stoffwechsel zur Vermeidung einer OH^\cdot -Entstehung (und weiterer Sauerstoffradikale) eine wichtige biologische Rolle. Somit werden *in vivo* auf zweierlei Weise reaktive Sauerstoffmetabolite freigesetzt, a) durch aktivierte Phagozyten und deren Oxidantien-produzierende Systeme und b) durch chemische Reaktionen.

2.4.1.2 Oxidantien-vermittelte Zellschäden

Nicht adäquat inhibierte reaktive Sauerstoffmetabolite sind unabhängig von ihrem Entstehungsort zellschädigend. Biomembranen und subzelluläre Organellen sind durch die dort vorhandenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membranphospholipiden gegenüber oxidativen Prozessen besonders empfindlich. Oxidantien reagieren dabei mit Fettsäuren und generieren lipidfreie Radikale (z.B. HO_2^\cdot , OH^\cdot , HOCl, Fe-Sauerstoffkomplexe), die weiter zum Peroxyradikal (ROO^\cdot) reagieren können (37;80). Dieser als Lipidperoxidation beschriebene Vorgang kann zu einer völligen Zerstörung von Zellmembranen führen, die nicht nur ganze Zellverbände und Zellen, sondern auch Membranen von Zellorganellen betreffen kann. Im Rahmen der Lipidperoxidation entstehen Aldehyde, die eine weitere

Verschlimmerung der zellulären Situation hervorrufen können. So vermögen nämlich die in der Lipidperoxidation gebildeten Malonaldehyde Aminogruppen miteinander zu verbinden, wodurch die Molekülstruktur von Proteinen, Enzymen, RNA, DNA und Phospholipiden geschädigt werden.

Sauerstoffradikale können auch Proteine inaktivieren, wobei die Empfindlichkeit der einzelnen Aminosäuren auf Oxidantien sehr unterschiedlich ist. Zystein, Zystin, Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin sind dabei besonders leicht angreifbar. Allerdings führt die Oxidation von Aminosäuren nicht notwendigerweise zu einer Inaktivierung des befallenen Proteins oder des Enzyms. Erst die Oxidation einer wichtigen Bindungsstelle, z.B. des Methionins beim α_1 -Antitrypsin, führt zu einem Funktionsverlust. Gleiches gilt z.B. auch für die Ca^{2+} -ATPase, die Glutaminsynthetase und andere Enzyme (180).

Seit langem weiß man, daß ionisierende Strahlung in Geweben über die Freisetzung von Oxidantien (z.B. OH^\cdot) zu Schäden des Erbgutes führt. Oxidantien können DNA-Schäden (insbesondere DNA-Strangbrüche) induzieren. Über die dann initiierten Reparaturmechanismen wird der Zellzyklus bis zum erfolgreichen Abschluß im weiteren Fortgang unterbrochen. Bei irreparablen Schäden wird außerdem ein Signal in Richtung programmierter Zelltod (Apoptose) induziert. Im Zentrum dieses komplexen Zell-/DNA-Reparaturmechanismus steht nach der heutigen Kenntnis das Phosphorprotein p^{53} , das selbst ein Potential zur Apoptoseinduktion besitzt. p^{53} kann aber durch Oxidantien gehemmt werden und so pro-Onkogene stimulieren. *c-fos*- und *c-jun*-Gene werden durch reaktive Sauerstoffmetabolite vermehrt aktiviert (90;98). Da *c-fos*- und *c-jun* Transkriptionsfaktoren (AP-1, ERG-1, NF- κ B) regulieren, beeinflussen auf diese Weise oxidative Vorgänge bei der Entzündungsreaktion bzw. für die Tumorentstehung bedeutsame Regulationsmechanismen (Zellproliferation und -differenzierung) (121;136;169). Die für die DNA-Reparatur verantwortlichen Mechanismen sind somit fehleranfällig und es besteht die Gefahr von Basensubstitutionen oder Fehlpaarungen mit dem Resultat von Punktmutationen. Werden von diesen Mutationen Gene mit Beteiligung an positiv oder negativ regulierenden Mechanismen der Zellproliferation betroffen, so besteht die Gefahr einer Tumorentstehung (63). Die Oxidantien-vermittelten mutagenen Schäden spielen bei den durch Asbest verursachten Tumoren eine ursächliche Rolle, da die Asbestfaser-vermittelte Freisetzung von Sauerstoffradikalen diese mutagenen Mechanismen triggern können (49;121;136).

Reaktive Sauerstoffmetabolite sind aber durch ihre zelltoxische Wirkung nicht nur unerwünscht, sondern sie haben eine Fülle von essentiellen biologischen Aufgaben zu erfüllen, die weit über die unspezifische Abwehr (z.B. von inhalierten Partikeln oder Organismen) hinausgehen. So entstehen bei der Reaktion von OCL^- mit Aminen N-Chloramine, die in vielen biologischen Prozessen von Bedeutung sind (Bildung von N-Chlortaurin aus Taurin bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten). Weitere wichtige durch Oxidantien getriggerte Reaktionen sind z.B.: Aktivierung der zellulären Bildung von Zytokinen und Eicosanoiden, z.B. Leukotrien B₄ (LTB₄), Interleukin 8 (IL-8), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Aktivierung von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1), über die Arachidonsäureepoxid-Bildung wird die Freisetzung von Peptidhormonen stimuliert, Regulation von Transkriptionsvorgängen im Zellkern, Initiierung einer gesteigerten Antioxidantien-Bildung (insbesondere SOD) etc. (37;69).

2.4.2 Superoxid-Dismutase

Die Rolle der Antioxidantien in Säugetierzellen ist schon mehrfach beschrieben worden, so daß an dieser Stelle auf eine breite Darstellung verzichtet werden soll und auf die Literatur verwiesen wird (1;18;22;51;52;56;75). Der protektive Effekt insbesondere einer Überexpression des MnSOD (Mangan-Superoxid-Dismutase) -Gens konnte in der Vergangenheit ebenfalls dokumentiert werden. Eine solche Überexpression reduziert Strahlen (Radon) –induzierte neoplastische Transformationen, unterdrückt das Wachstum maligner Zellen und steigert die Toleranz gegenüber toxischen Substanzen (z.B. Bleomycin, Asbest u.a.m.) (35;179). Ein ähnlich gutes regulatives Ansprechen ist von der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD (Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase) bisher trotz einer Fülle von Expositionsversuchen (inkl. verschiedenster Stäube) nicht beschrieben worden (7;151).

Auf Grund der physiologischen Bedeutung einer SOD-katalysierten Reduktion des O_2^- , um so der Fenton-Reaktion ihr Substrat (H_2O_2) zu entziehen und damit die Bildung des OH^\cdot zu verhindern, und wegen der in der Literatur schon vorbeschriebenen Bedeutung speziell der MnSOD im Rahmen der antioxidativen Abwehr in Staub-exponierten Zellen (Mesothelzellen, Epithelzellen, Phagozyten) soll im Hinblick auf die Fragestellung dieses Forschungsvorhabens die Charakteristika der SOD nachfolgend einleitend beschrieben werden.

Die SOD (EC-SOD; Superoxid: Superoxid-Oxidoreductase, EC 1.15.1.1.) baut spezifisch O_2^- mit einer Reaktionskonstanten von $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ab und war entwicklungsgeschichtlich die Voraussetzung für die Umstellung von anaeroben auf aerobe Lebensbedingungen (44). Das Vorkommen der SOD ist ubiquitär, sie ist essentiell für Zellen, die unter aeroben Bedingungen leben und kommt obligat auch in einigen Anaerobiern vor. Die SOD wurde in vielen Spezies (Pflanzen, Tiere) in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen und findet sich beim Menschen ebenfalls in allen Zellen, wobei allerdings auch hier die SOD-Konzentrationen je nach Organ schwanken. Hohe SOD-Konzentrationen finden sich in Organen mit einem hohen Sauerstoffumsatz (z.B. Lunge, Herz, Leber, Niere) (88;108;125). Die physiologisch-protective Rolle von SOD konnte in zahlreichen Untersuchungen *in vitro* und auch *in vivo* demonstriert werden. So ließen sich mit SOD-Mutationen (z.B. SOD-*knock out* Mäuse oder veränderte Zellkulturen) eine deutlich reduzierte Sauerstofftoleranz (z.B. unter hohen Sauerstoffkonzentrationen von >90%) erzielen: Verkürzung der Überlebenszeit, Steigerung pulmonaler Sauerstoff-toxischer Zellschäden. Insbesondere die MnSOD ist genetisch reguliert und kann bei Bedarf, d.h. bei einem entsprechenden Reiz, vermehrt durch die betroffene Zelle expremiert werden. Allerdings benötigen insbesondere bronchoepitheliale Zellen Zeit für eine solche Enzymsynthesesteigerung. Erzurum et al. wiesen nach einer Exposition von $14,8 \pm 0,2 \text{ h}$ mit 100% O_2 über eine Atemmaske bei gesunden Freiwilligen, zwar eine O_2 -induzierte Tracheobronchitis, aber keine Steigerung der SOD-mRNAs in mittels Bürstenzytologie gewonnenen Zellen des Bronchialepithels nach (43).

Die SOD-Enzyme werden entsprechend ihres zentralen Metallanteils in drei verschiedene Gruppen eingeteilt, a) die Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD, b) die MnSOD und c) die Eisen-SOD (FeSOD). Der Metallanteil gibt auch einen Hinweis auf das vorzugsweise zelluläre Vorkommen dieser Enzyme: Die Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD findet sich vorzugsweise im Zytosol eukaryonter Zellen und in den Chloroplasten; die MnSOD wurde fast ausschließlich in Prokaryonten und in der Matrix von Mitochondrien nachgewiesen. Zudem existiert eine extrazelluläre Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD-Form die auf der Zelloberfläche oder gelöst in biologischen Flüssigkeiten nachgewiesen wurde. Eine Fe-haltige SOD-Variante findet sich in Algen und bestimmten Pflanzenarten. MnSOD und FeSOD besitzen eine hohe Strukturhomologie (Aminosäuresequenz). Die SOD ist ein Glykoprotein mit einer Tetramerstruktur und einem Molekulargewicht von $\approx 30 \text{ kDa}$. Die Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD, nicht jedoch die beiden anderen SODs, kann durch Zyanid (ab ca. $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$) inhibiert werden (170). Dadurch lassen sich in Aktivitätsassays MnSOD und Cu^{2+}/Zn^{2+}

SOD gut voneinander unterscheiden (s.u. unter Material und Methoden). $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD und die FeSOD, nicht aber die MnSOD, können durch reaktive Sauerstoffmetabolite (insbesondere $5 \cdot 10^{-3} - 10^{-2}$ mol/l H_2O_2) über die Oxidation der Histidin-Untereinheit ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD) bzw. des Eisens mit Verlust der Tryptophanreste über eine OH^\cdot -Bildung im Rahmen der Fenton-Reaktion (FeSOD), aber im Fall der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD auch durch Kupferchelatoren, wie z.B. dem Diethyldithiocarbamat inhibiert werden (74;81).

Das humane MnSOD-Gen ist ein *single-copy* Gen, das aus fünf Exons besteht, die von vier Introns unterbrochen werden. An den Übergangsbereichen befinden sich die üblichen *splice junctions*. Die Transkriptionsinitiierungs-Bereiche liegen in einer G- und C-reichen (78%) *promotor*-Region, die aus einem Kluster von insgesamt sieben SP-1 und drei AP-2 *consensus*-Sequenzen (mit einer TATA-Box und einer CAAT-Box) besteht (115). Die 3'-*flanking* Region des MnSOD-Gens enthält eine NF- κ B *consensus* Sequenz. Die Existenz der SP-1, AP-2 und der NF- κ B-Bindungsstellen weist auf potentielle Regulatorelemente bei der Steuerung der MnSOD-Genexpression hin (179).

Wie schon erwähnt, wird die MnSOD durch äußere Einflüsse reguliert. So steigert eine oxidative Belastung (z.B. induziert durch Chemikalien [Fe^{2+} , Cu^{2+} , Paraquat, Catechol, *t*-butyl-Hydroxid, Diethylmaleat, Selenit u.a.m.], enzymatische Reaktionen [z.B. Xanthin/Xanthinoxidase] oder ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck) die MnSOD- nicht jedoch die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-Genexpression. Ähnliche Ergebnisse resultierten auch aus den mit Asbestfasern durchgeführten Expositionen aus der Mossman-Gruppe (120;167). Weitere Mediatoren, die zu einer Steigerung der MnSOD-Genexpression bzw. einer Steigerung des Enzyms oder der MnSOD-Aktivität führen, sind z.B. diverse Zytokine (Interferon-gamma [$\text{IFN-}\gamma$], $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin-1 [IL-1]). Eine durch Zytokine (kombinierte Exposition von $\text{IFN-}\gamma$ mit $\text{TNF-}\alpha$) induzierte MnSOD-Genexpression kann je nach gewähltem Zelltyp erheblich sein. Harris et al beschrieben 1991 in humanen Nierenzellen (ACHN) mit diesen beiden Zytokinen eine Steigerung der MnSOD-Genexpression um den Faktor 100 (71). Die Exposition dieser und anderer Zelllinien (A549 = humane Adenokarzinomzelllinie; HS153 = humane Fibroblasten) mit nur einem Zytokin (s.o.) führte dagegen nur zu einer Steigerung um ca. den Faktor 2-5 (71).

Der protektive Effekt von SOD wurde bis vor wenigen Jahren sogar therapeutisch in der lokalen Anwendung bei der Zystitis oder bei Arthritiden (intraartikuläre Injektionen) genutzt. Außerdem gibt es in der Literatur eine Fülle von Hinweisen mit SOD als anti-inflammatorischem Therapieansatz (61;182). So publizierten z.B. Muizellar et al 1993 eine Phase II Studie in der SOD oder Polyethylenglycol-konjugierte SOD (PEG-SOD) insgesamt 104 Patienten ca. 4 h nach erlittenem schwerem Kopftrauma intravenös appliziert wurde. Während in der Placebogruppe 44% in der darauffolgenden Wochen verstarben, waren es in der PEG-SOD-Gruppe nur 20% ($p < 0,03$) (124).

3 Ziel der Studie

Nach Inhalation treffen Stäube in den Atemwegen auf zwei verschiedene Zellkompartimente, die Phagozyten (insbesondere die alveolären Makrophagen) und den bronchialen Epithelverband. Da die bronchoepithelialen Zellen eine Barrierefunktion zwischen dem Bronchiallumen und dem Lungeninterstitium haben, ist ihr Funktionserhalt entscheidend für den Schutz des Lungengewebes vor inhalierten Schadstoffen. Zu den epidemiologisch besonders bedeutsamen Faktoren gehören in erster Linie aktives Zigarettenrauchen. Weitere wichtige Belastungsfaktoren sind Infektionen, immunologische/allergologische inflammatorische Prozesse arbeitsplatzbezogene Belastungen durch Stäube.

Vor dem Hintergrund der unter 2 (Einleitung) eingehend erläuterten Bedeutung eines ausgewogenen Oxidantien-/Antioxidantien-Gleichgewichts bei prooxidativen Belastungssituationen sollten in dieser Studie der Einfluß verschiedener Stäube (Krokydolith, Steinwolle, Quarz) auf die Superoxid-Dismutasen (MnSOD, $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD) in Epithelzellen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Die Studie gliedert sich daher in zwei Teile. Im ersten Teil wurden bronchoepitheliale Zellen *in vitro* mit den zu untersuchenden Stäuben exponiert, während im zweiten Teil *in vivo* von Probanden (Raucher/Nichtraucher, Asbestmischstaub-/Kohlemischstaub-Exponierte) Bronchialschleimhautbiopsien zur weiteren Evaluation der Superoxid-Dismutasen gewonnen wurden.

Folgende Fragestellungen wurden dabei bearbeitet:

- 1) Beeinflussung der MnSOD und der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD durch Staubexposition in bronchoepithelialen Zellen:
 - a) Reagieren exponierte bronchoepithelialen Zellen mit einer Steigerung oder Senkung der Superoxid-Dismutasen, wenn ja unter welchen Bedingungen (Frage nach der Konzentrationsabhängigkeit) ?
 - b) Reagieren bronchoepitheliale Zellen mit ihrem antioxidativen Verteidigungsmechanismus (SOD) unterschiedlich auf die verschiedenen Stäube (Krokydolith, Quarz, Steinwolle als Vertreter der künstlichen Mineralfasern) ?
 - c) Korreliert die Genexpression mit der Transkription und dem Genprodukt ?
 - d) Erklärungsmöglichkeiten eventueller Unterschiede in der Genexpression und dem Transkriptionsprodukt ?

- 2) Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation:
- a) Gibt es Unterschiede in der SOD-Expression in Biopsien der Bronchialschleimhaut zwischen Nicht-Exponierten/Asbeststaub-/Quarzmischstaub-Exponierten, bzw. Rauchern und Nichtrauchern ?
 - b) Sind *in vivo* tatsächlich bronchoepitheliale Zellen die SOD-Produzenten, oder vielmehr subepithelial gelegene Zellverbände ?

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

Agarose SeaKemLE (Biozym, Hessisch-Oldendorf), Anti-huMnSOD [Schaf] Antikörper (Calbiochem, Bad Soden), Aquatex (E. Merck, Darmstadt), Biotin konjugierter Anti-Schaf IgG-Antikörper [Hase] (Biozol, Echingen). CSPD, SP6 RNA-Polymerase, Dig-RNA Labeling Mix, positiv geladene Nylonmembran, Taq DNA-Polymerase, T7 RNA-Polymerase, Anti-Digoxigenin-AP-Fab Fragmente und die DNase I (Boehringer, Mannheim). Foetales Kälberserum FCS (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege), KCN (E. Merck, Darmstadt) Mikro-RNA Isolations-Kit Purescript (Biozym, Hessisch-Oldendorf), MnSOD-ELISA-Kit (Immundiagnostics, München). cDNA-Synthesekit SuperScript, Pen/Strep und RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein). DAB (3,3'-Diaminobenzidine) SigmaFast/Fast Red/Naphtol, Streptavidin-alkalische-Phosphatase, Superoxid-Dismutase, Xanthin und Xanthin-Oxidase (Sigma, Deisenhofen)

4.2 Verwendete Stäube

Für die Expositionsversuche wurden standardisierte UICC-Krokydolith-Fasern (*Union Internationale Contre le Cancer*; Fa. Mikrotechnik, München) bzw. Steinwolle (115-4 *experimental rockwool fiber*, Deutsche Rockwool GmbH, Gladbeck; zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. K.-M. Müller, BG-Kliniken Bergmannsheil, Institut für Pathologie, Bochum) verwendet. Beide Fasern sind detailliert in früheren Arbeiten charakterisiert worden (56;142;172). Die beiden Fasern unterscheiden sich sowohl durch ihre Fasergeometrie als auch durch ihre jeweilige chemische Zusammensetzung (Angaben als Mittelwerte): Krokydolith (Länge: 2,6 μm ; Durchmesser: 0,2 μm), Steinwolle (Länge: 25,6 μm ; Breite: 1,1 μm) (28;142). Der Eisengehalt von Krokydolithfasern beträgt 27% (Fe^{2+} : 14%, Fe^{3+} 13%), der von Steinwollefasern 7,51% (Fe^{3+}) (142;172). Außerdem verwendeten wir den Quarzstaub Dörentrup 12 (ebenfalls zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. K.-M. Müller). Als Kontrollpartikel wurden Latexkügelchen (Polystyren) verwendet (Tabelle 3).

Da Latexkügelchen chemisch und biologisch inert sind, wurde hiermit ausgeschlossen, daß der Versuchsansatz an sich schon zu einem Effekt führt. Alle für die *in vitro* Expositionsversuche verwendeten Stäube wurden vor Versuchsbeginn hitzesterilisiert und dadurch eine mögliche Endotoxinkontamination beseitigt (120° C, 30 min). Die

Charakteristika der verwendeten Stäube sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Im Limulus-Amoebocyte-Assay (Sigma Chemie Deisenhofen) schlossen wir sowohl im Zellmedium, als auch auf den Stuben eine Endotoxinbelastung aus.

Staubart	Durchmesser	Länge	Spezifische Oberfläche	Chemische-Zusammensetzung (%)
Krokydolith⁺	10 %: < 0,08 μm 50 %: < 0,11 μm 90 %: < 0,18 μm	10 %: < 0,3 μm 50 %: < 0,9 μm 90 %: < 3,6 μm 3 %: < 5,0 μm	8,3 m^2/g	$\text{Na}_2(\text{Fe}^{3+})_2(\text{Fe}^{2+})_3\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ Fe ²⁺ : 14 Fe ³⁺ : 13
Steinwolle[#]	min : 0,21 μm max: 3,24 μm Mittel: 1,07 μm	min: 3,16 μm max: 99,36 μm Mittel: 25,64 μm	1,9 m^2/g	SiO ₂ : 53,1 ; Fe ₂ O ₃ : 7,51 Al ₂ O ₃ : 5,8 ; CaO : 12,00 MgO : 19,30 ; Na ₂ O : 0,54 K ₂ O : 0,364 ; BaO : 0,012 TiO ₂ : 0,73 ; ZrO ₂ : 0,009 V ₂ O ₅ : 0,017 ; P ₂ O ₅ < 0,05 SrO : 0,037 ; MnO : 0,145 ZnO : 0,01 ; NiO : 0,04 CuO : 0,007 ; Li ₂ O : 0,005 SO ₃ : 0,13
Quarzstaub^{&} (Dorenrup 12)	Partikelgröße 58 %: < 10 μm 34 %: < 5 μm		8,5 m^2/g	SiO ₂ : 100
Latex-partikel[]	Durchmesser 0,094 \pm 0,013 μm		5,9 m^2/g	Polystyren

Tabelle 3: Charakteristik der verwendeten Stäube:

- Krokydolith⁺ entsprechend (172),
- Steinwolle[#] entsprechend Manville Technical Center, Denver/USA und (142),
- Quarzstaub[&] entsprechend (33;102;181)
- Latexpartikel[] entsprechend Sigma Chemie, Deisenhofen

4.3 Verwendete Zelllinie und Inkubationsbedingungen

Für die *in vitro* Expositionsversuche mit den oben beschriebenen Stuben wurde die bronchoepitheliale Zelllinie BEAS 2B (*American Type Culture Collection*) verwendet. Es handelt sich dabei um eine aus humanen bronchoepithelialen Zellen gewonnene und durch SV40 Transformation immortalisierte Zelllinie. Vergleichende Untersuchungen von Kinnula et al. (1994) mit frisch gewonnenen Primärkulturen ergaben keinen Unterschied bezüglich des antioxidativen Status gegenüber der BEAS 2B Zelllinie (99). Die Zellen wurden uns freundlicher Weise von Herrn Dr. C. C. Harris (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD/USA) zur Verfügung gestellt. In allen durchgeführten Versuchen wurden die Zellen in RPMI 1640-Zellmedium (10% FCS, 200 IU/ml Penicillin-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin) bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die *in vitro* durchgeführten Expositionsversuche zur Quantifizierung der Cu²⁺/Zn²⁺ SOD- und der MnSOD-Aktivität, sowie des MnSOD-Enzyms mittels ELISA wurden die Staubkonzentrationen so ausgewählt, daß die unterschiedlichen spezifischen Oberflächen ausgeglichen wurden. In diesen Versuchsansätzen bestand der gemeinsame Nenner also aus der gleichen Oberflächenmenge. Somit ergaben sich (bezogen auf eine gemeinsame Oberfläche von 0,25 µg/cm² pro cm² Wachstumsfläche der Zellen) folgende Staubkonzentrationen:

Krokydolith (3 µg/cm²), Steinwolle (12,97 µg/cm²) und Latexpartikel (4,23 µg/cm²).

Auch unter Verwendung höherer Staubkonzentrationen blieb diese Normierung in der genannten Weise erhalten. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 25; 50 µg/cm² = 0; 0,6; 2,4; 6; 12; 30; 60 µg/ml).

4.4 Probandencharakterisierung

Folgende Probanden wurden für die hier vorgestellten Untersuchungen rekrutiert:

1. Asbestbelastete Probanden (untersucht: n= 8):
 - a) Nachgewiesene Asbestbelastung, ≥ 10 Faserjahre oder ein anhängiges Berufskrankheitenverfahren (Asbest-assoziierte Erkrankungen), oder
 - b) Nachweis von Asbestkörperchen in den Alveolarmakrophagen oder in der BAL.
2. Quarzmischstaub-exponierte Probanden (untersucht: n= 8):
 - a) Nachgewiesene Untertage-Tätigkeit oder ein anhängiges Berufskrankheitenverfahren (Silikose oder CB-E = chronisch-obstruktive Bronchitis/Emphysem bei Bergleuten), oder
 - b) Kohlestaubeinlagerungen in den Alveolarmakrophagen oder den Bronchialschleimhautbiopsien (bzw. bronchoskopisch-makroskopischer Nachweis), oder
 - c) nachgewiesene Silikose im Röntgen-Thoraxbild.
3. Nicht-staubexponierte Probanden (n=45):
 - a) Raucher (Nachweis von Rauchermakrophagen), untersucht: n= 19.
 - b) Nichtraucher (auch Ex-Raucher seit ≥ 1 Jahr, Abwesenheit von Rauchermakrophagen), untersucht: n= 26.

Bezüglich der Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL), deren Auswertung, der Quantifizierung von Asbestkörperchen in der BAL und der Gewinnung von

Bronchialschleimhautbiopsien wird auf die als Standardverfahren angesehenen Verfahrensbeschreibungen in der Literatur verwiesen (29;30;53).

4.5 SOD-Aktivitätsbestimmung

Eine SOD-Aktivitätseinheit (U/ml) wird als diejenige Menge SOD definiert, bei der 50 % der Reduktionsrate des Ferricytochrom c inhibiert wird. Es wurden intrazellulär sowohl die Gesamt-SOD-, die MnSOD- als auch die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-Aktivität quantifiziert. Die Messung der SOD-Aktivität beruht auf der enzymatischen Herstellung von O_2^- aus der Reaktion von Xanthin mit Xanthin-Oxidase und der gleichzeitigen Detektion der O_2^- vermittelten Reduktion von Ferricytochrom c. O_2^- wurde in 1400 μl Natrium-Karbonatpuffer ($5 \cdot 10^{-2}$ mol/l; Na_2EDTA [10^{-4} mol/l]; pH 10), 50 μl Xanthin-Lösung ($3 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und 50 μl Ferricytochrom c (10^{-4} mol/l), in dem unmittelbar vor Gebrauch Xanthin-Oxidase (34,8 $\mu\text{U}/1,5$ ml) hinzugegeben wurde, mit einer konstanten Produktionsrate generiert. Die Kinetik der Reduktionsrate von Ferricytochrom c wurde vor Testbeginn mit der Menge hinzugegebener Xanthin-Oxidase folgendermaßen eingestellt (spektrophotometrische Messung bei 418 nm für 1 min):

- Reduktionsrate (Änderung der Extinktion) ohne Inhibition durch SOD: $\Delta_{\text{nm}} 0,02/\text{min}$
- Reduktionsrate (Änderung der Extinktion) mit Inhibition durch SOD (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$): $\Delta_{\text{nm}} 0,002/\text{min}$

Nach der Festlegung der benötigten Xanthin-Oxidase Menge wurde das Volumen des SOD Standards (12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aqua dest.) so eingestellt, daß nach 1 min Meßdauer eine Rate von $\Delta_{\text{nm}} 0,002$ erreicht wurde.

Unter den so vordefinierten Bedingungen führten wir die eigentliche Probenmessung als Vierfach-Bestimmung durch. Als Probenmaterial verwendeten wir den Proteinrohextrakt des Zellkulturmaterials (BEAS 2B-Zellen) oder des Biopsiematerials. Dazu wurden die Zellen bzw. die Biopsien durch Ultraschall (50 s gepulst), in Reaktionspuffer lysiert und anschließend bei 12000 x g, 4 °C, 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde als Proteinextrakt verwendet. Zur selektiven Messung der MnSOD-Aktivität wurde der Xanthin-Lösung KCN (Kaliumzyanid, $3 \cdot 10^{-4}$ mol/l Endkonzentration im Analyseansatz) zugesetzt. KCN hemmt, wie in der Einleitung (2.4.2) dargelegt, in dieser Konzentration spezifisch die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-Aktivität, wohingegen die Enzymaktivität der MnSOD nicht beeinträchtigt wird. Die zu messende Restaktivität der Proben in dem KCN-haltigen Puffer ist daher auf die MnSOD zurückzuführen.

Die Einheiten der SOD-Aktivität wurden nach folgender Formel bestimmt.

$$\begin{aligned} 1) \quad \text{errechnete Units} &= \frac{\text{Reduktion ohne SOD}}{\text{Reduktion mit SOD}} - 1 \\ 2) \quad \text{U/ml} &= \frac{\text{errechnete Units}}{\mu\text{l Probe}} \times 100 \times \text{Verdünnungsfaktor} \end{aligned}$$

4.6 Nachweis einer SOD-Inaktivierung

Zum Nachweis einer durch Krokydolith-induzierten oxidativen Inaktivierung des SOD-Enzyms verwendeten wir folgende Versuchsanordnung: Wir inkubierten (24 h) unter zellfreien Kulturbedingungen SOD (5 800 U/mg, Sigma Chemie, Deisenhofen) entweder ohne Zusatz, mit H₂O₂ (10⁻⁹ bis 1 mol/l), mit Krokydolith (50 µg/cm² = 60 µg/ml) oder mit Krokydolith zusammen mit H₂O₂ (10⁻³ mol/l). Die SOD-Aktivität wurde mittels des oben beschriebenen SOD-Aktivitätsassays (KCN-frei) quantifiziert.

4.7 Kompetitive RT-PCR

Aus den Biopsien der Bronchialschleimhaut wurde die Gesamt-RNA nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit dem Isolations-Kit Purescript (Biozym, Hessisch-Oldendorf) isoliert (24). Für die Durchführung der RT-PCR mußte die zelluläre Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription) werden. Dazu wurde jeweils 1 µg DNase-behandelte Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde durch Random Priming mit dem cDNA-Synthesekit SuperScript (Gibco BRL, Eggenstein) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die so erhaltene cDNA wurde als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt. Mit einem genspezifischen Primerpaar wurde ein 260 bp großer Teil des MnSOD kodierenden Bereichs amplifiziert. In der von uns verwendeten RT-PCR konkurrieren zwei Nukleinsäurefragmente als Template um das gleiche Primerpaar. Ein Nukleinsäurefragment fungierte als interner Standard, der in bekannter Menge dem PCR-Ansatz zugefügt wurde. Es handelte sich dabei um ein 67 bp kürzeres Fragment der MnSOD-cDNA. Beim Vergleich der Bandenintensitäten, der in der gelelektrophoretischen Auftrennung nachweisbaren zwei PCR-Produkte, ließ sich die Konzentration der Probe gegenüber dem internen Standard ermitteln. Als Negativkontrollen wurden von jeder Probandenprobe cDNA-Ansätze ohne Zugabe von reverser Transkriptase hergestellt und parallel in der PCR analysiert. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, daß die Amplifikate durch Kontamination mit genomischer DNA entstanden sind. Die cDNA Ansätze aller Probanden wurden vor der RT-PCR mittels

Amplifikation des *housekeeping* Gens β -Aktin durch PCR abgeglichen. Alle PCR-Ansätze wurden in unabhängigen Versuchen doppelt durchgeführt.

4.8 Quantifizierung der SOD-mRNA durch Northern-Analysen

Die Durchführung der Northern-Blot-Analysen zur Quantifizierung der spezifischen MnSOD oder $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA folgte mit leichten Modifikationen der bei Southern (1975) und Sambrook et al. (1989) beschriebenen Standardprotokolle (149;164). Dazu wurde 25 μg Gesamt-RNA auf einem 1 % denaturierenden Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Kapillartransfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim) wurde die Membran mit den verschiedenen Sonden über Nacht hybridisiert. Die sich anschließenden Waschschriffe zur Erzielung der notwendigen Stringenz wurden auf die jeweilig verwendeten Sonden eingestellt. Zum Nachweis der MnSOD-mRNA wurde bei den Hybridisierungen ein ^{32}P -markiertes 737 bp großes Fragment der humanen MnSOD-cDNA als Sonde verwendet. Zum spezifischen Nachweis der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA wurde ein nicht radioaktives Verfahren eingesetzt. Dazu wurde mittels *in vitro*-Transkription eine Digoxigenin markierte 600 bp große RNA-Sonde hergestellt. Als Template für die *in vitro*-Transkription diente das Plasmid pSP73, welches ein 600 bp großes Insert der humanen $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-cDNA enthält. Nach der Hybridisierung und den Waschschriffen wurde mittels eines Anti-Digoxigenin-Antikörpers an den die alkalische Phosphatase konjugiert ist und dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD die Signale visualisiert. Die Ergebnisse der Hybridisierungen wurden direkt auf einem Röntgenfilm detektiert (Expositionszeit für radioaktive Hybridisierung: 2-4 Tage; für nicht-radioaktive Hybridisierungsmethode: 2-10 min). Zur Standardisierung wurden die Blots mit der Sonde für das *housekeeping* Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) rehybridisiert und die Ergebnisse als Quotient GAPDH/SOD nach laserdensitometrischer Analyse (Densitometer Molecular Dynamics, Sunnyvale/USA) der Hybridisierungssignale angegeben.

4.9 Nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung (NISH)

In der zur morphologischen Lokalisierung der MnSOD-mRNA durchgeführten NISH wurde eine 737 bp große, Digoxigenin-markierte MnSOD antisense cRNA-Sonde eingesetzt, welche komplementär zur humanen MnSOD-mRNA ist. Als Negativkontrolle wurde ein Dünnschnitt der gleichen Bronchialschleimhautbiopsie mit der sense MnSOD-cRNA-Sonde hybridisiert. Die sense RNA-Sonde ist nicht komplementär zur zellulären MnSOD-mRNA, so daß keine Hybridisierungssignale auftraten. Beide Sonden (*sense* und *antisense*) wurden durch *in vitro*-

Transkription in Gegenwart von Digoxigenin markiertem DIG-11-UTP (Boehringer Mannheim) hergestellt. Nach der Entparaffinierung der Schnitte wurde die intrazelluläre RNA durch Proteinase-Behandlung demaskiert und unspezifische Bindungsstellen durch einen Prähybridisierungsschritt (1h bei 37 °C) abgeblockt. Die Hybridisierung mit der antisense bzw. sense MnSOD-cRNA-Sonde wurde über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Inkubationskammer durchgeführt. Unter stringenten Waschbedingungen bei 56 °C wurde ungebundene bzw. unspezifisch hybridisierte Sonde entfernt. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Zugabe eines mit einer alkalischen Phosphatase markierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers (Boehringer, Mannheim) und anschließender Detektion des an die Sonde gebundenen Antikörpers durch eine Färbelösung (Sigma Fast, Fast Red/Naphtol), die nach Umsetzung durch die alkalische Phosphatase als roter wasserunlöslicher Farbstoff präzipitierte. Die Schnitte wurden dann nach 5-minütiger Inkubation in 0,9%iger NaCl-Lösung mit Meyer's Hämatoxin gegengefärbt und anschließend mit Aquatex eingedeckelt.

4.10 Immunhistochemischer Nachweis des MnSOD-Enzyms

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnittpräparate wurden zur Demaskierung der antigenen Domänen für 10 min in einer 0,05 %igen Trypsinlösung (pH 7,4) bei 37 °C inkubiert. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 1,5 % Hasen-Normalserum folgte mit dem 1. Antikörper (Schaf-anti-huMnSOD) über Nacht bei 4 °C ein weiterer Inkubationsschritt. Nach Waschen in PBS (*phosphate buffered saline*) wurden die Schnitte bei Raumtemperatur (30 min) mit einem Biotin konjugierten 2. Antikörper (Hase-Anti-Schaf IgG) inkubiert. Anschließend wurde ein Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Komplex für 30 min auf die Schnitte gegeben. Die Visualisierung der zellulären Signale erfolgte nach Zugabe einer DAB-Färbelösung. Die Gegenfärbung der Schnittpräparate erfolgte mit Meyer's Hämatoxin. Bei der Durchführung der Negativkontrollen wurde der MnSOD-spezifische Antikörper durch Hasen-Normalserum bei der oben beschriebenen Versuchsdurchführung ersetzt.

4.11 Quantifizierung des MnSOD-Enzyms in Zelllysaten

Die Zellyse des *in vivo* gewonnenen Biopsiematerials erfolgte in 100 µl PBS und 100 µl Reaktionspuffer (25 mM Na₂CO₃, 25 mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH 10) mittels Ultraschall (50 s gepulst). Nach Zentrifugation der Proben bei 12.000 x g für 5 min wurde der Überstand als Proteinrohextrakt für die Quantifizierung des MnSOD-Gehaltes eingesetzt. Je 20 µl des Proteinrohextraktes wurden für eine Einzelmessung im MnSOD-ELISA verwendet (Durchführung nach Angaben des Herstellers s.o.). Die Quantifizierung der Intensität der

resultierenden Färbung wurde mit einem ELISA-Reader (Dynatech, MR5000, Denkendorf) bei 492 nm durchgeführt. Die Enzymmengen errechneten sich dann anhand eines MnSOD-Standards. Zum Ausschluß individuell unterschiedlicher Zellzahlen erfolgte die Normalisierung dieser Ergebnisse durch den Bezug auf die Gesamtproteinkonzentration (BioRad, Hercules/USA) des Zellysates. Alle Messungen wurden jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt.

4.12 Bestimmung des Gesamt-Proteins

Da eine exakte Bestimmung der Gesamtzellzahl in den von uns durchgeführten Versuchen nicht möglich war, wurden alle gewonnenen Ergebnisse auf mg Gesamtprotein (gemessen im Zellysate) bezogen. Dazu wurde eine nach Bradford (1976) modifizierte Methode verwendet. Das Meßprinzip beruht auf der spezifischen Reaktion von Proteinen mit der Farblösung Coomassie Brilliant Blue G-259 (BioRad, Hercules/USA), spektrophotometrisch messbar bei 630 nm. Alle Probenmessungen erfolgten in Dreifachbestimmungen.

4.13 Statistik

Für die statistische Sicherung von Unterschieden wurde der ANOVA-Test (Varianz-Test) für 2 unabhängige Stichproben angewandt. Die Nullhypothese wurde bei Überschreiten eines Wahrscheinlichkeitsniveaus von 95% ($=p < 0,05$) verworfen.

5 Ergebnisse

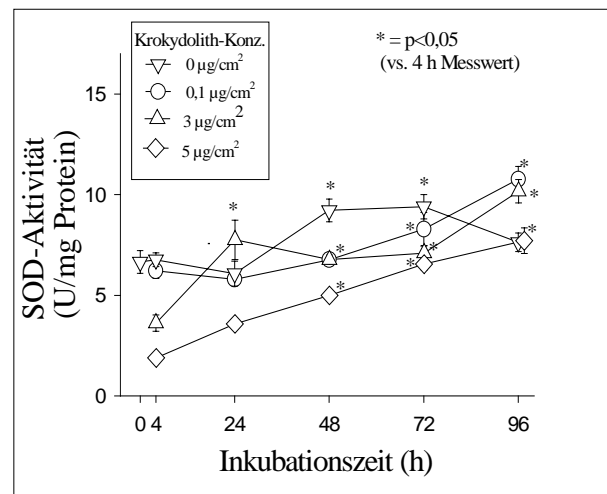
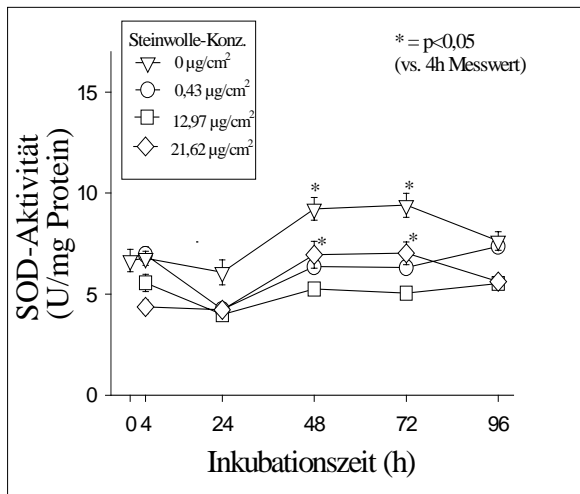
5.1 *In vitro* Untersuchungen an Staub-exponierten BEAS 2B-Zellen

Zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der zellulären MnSOD und Cu²⁺/Zn²⁺ SOD Genexpression wurde unter definierten Versuchsbedingungen die Induktion der Cu²⁺/Zn²⁺ SOD und MnSOD auf der Transkriptionsebene (Northern-Blot, In-Situ-Hybridisierung) und der Proteinebene (Quantifizierung der Proteinmenge mittels ELISA und der Enzymaktivität) durch Inkubation der Zellen mit den o.g. Stäuben untersucht.

5.1.1 Superoxiddismutasenaktivität nach Exposition mit Fasern/Stäuben

Die Ergebnisse der GesamtSOD und MnSOD-Aktivitäten sind in Abb. 2 dargestellt. Sowohl bei dem Verlauf der Gesamt-SOD (Abb. 2A) als auch bei den MnSOD-Aktivitäten (Abb. 2B) fällt auf, daß bei Inkubation mit Steinwolle bei allen verwendeten Konzentrationen die Zunahme der Aktivitäten über die Zeit flacher verläuft als bei Krokydolith. Außerdem zeigen sich keine linearen Unterschiede in Abhängigkeit zur gewählten Faserkonzentration oder zur Inkubationszeit. Obwohl einige Meßwerte sich zu den Ausgangswerten schwach signifikant ($p < 0,05$) unterscheiden, lassen sich Kinetiken (zeit-/konzentrationsabhängig) nicht erkennen. Im Gegensatz dazu ließ sich nach Krokydolithexposition ein stetiger, zeitabhängiger Anstieg der Gesamt-SOD-Aktivität beobachten ($p < 0,05$). Allerdings finden sich auch hier die höchsten SOD-Aktivitätsspiegel nicht bei der höchsten Faserkonzentration. Die MnSOD-Aktivitätsspiegel fielen sogar bei höheren Krokydolithexpositionen wieder ab (Abb. 2B rechts).

A)



B)

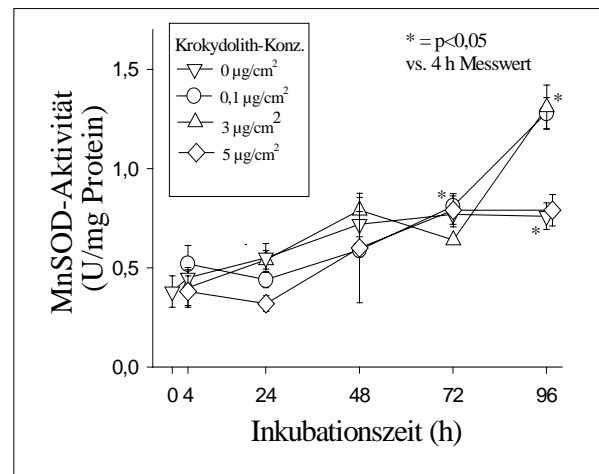
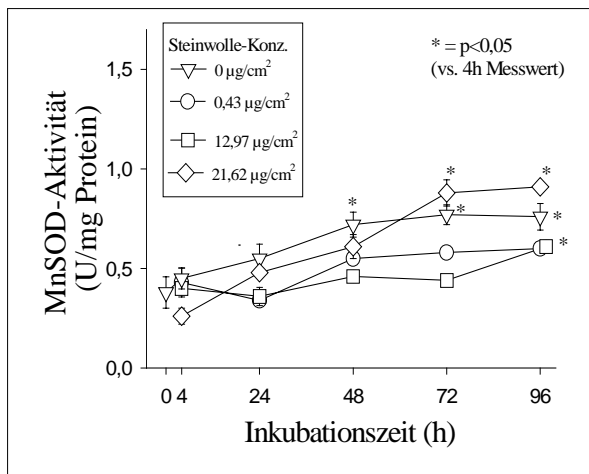


Abbildung 2:

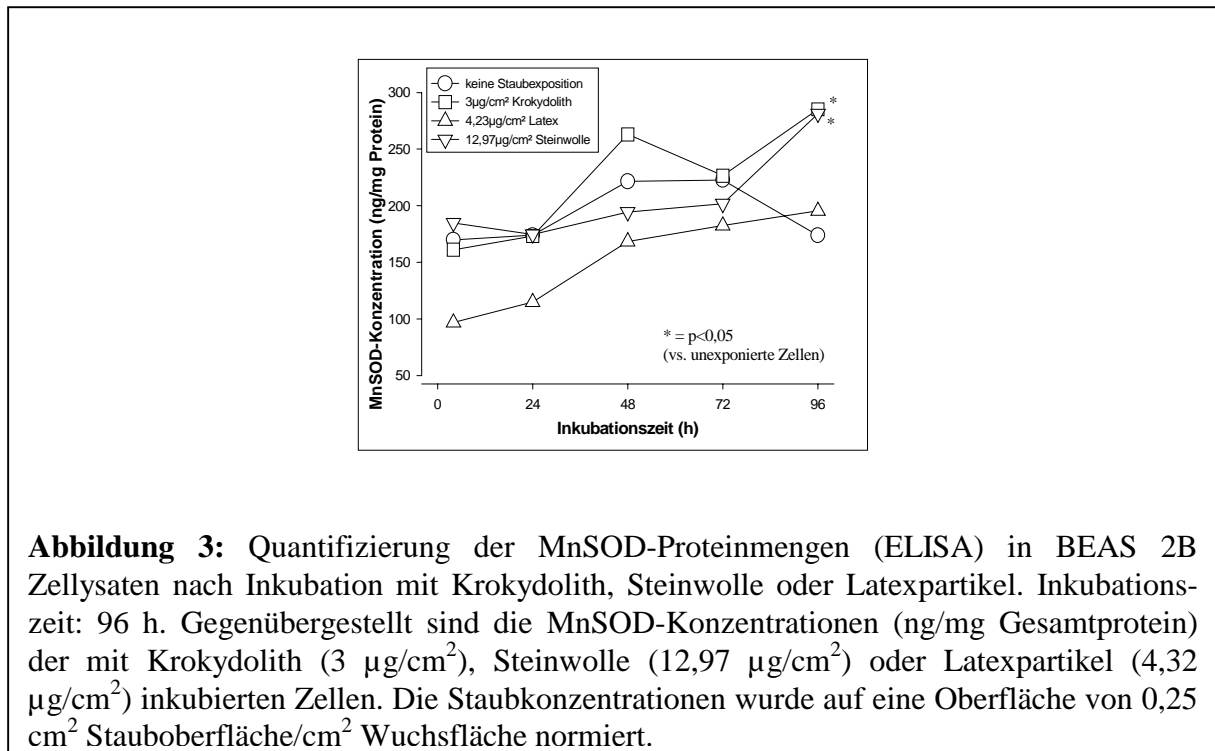
A) Spektrophotometrische Quantifizierung der Gesamt-SOD-Aktivität in BEAS 2B-Zellen nach Inkubation (0, 4, 24, 48, 72, 96 h) mit Steinwolle (0, 0,43, 12,97, und 21,62 µg/cm², linke Abb.) bzw. Krokydolith (0, 0,1, 3 und 5 µg/cm², rechte Abb.).

B) MnSOD-Aktivitäten (Steinwolleexposition links, Krokydolithexposition rechts). Die entsprechenden Staubexpositionen sind auf die äquivalente Oberfläche von Krokydolith bezogen (0; 0,008; 0,25; 0,42 cm²/cm² Wuchsfläche).

Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung.

5.1.2 Quantifizierung des MnSOD-Enzyms in exponierten BEAS 2B-Zellen

Die verwendeten Konzentrationen an Krokydolith ($3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Steinwolle ($12,97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Latexpartikel ($4,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ergeben sich durch die Normalisierung der verschiedenen Staubspezifischen Oberflächen (bezogen auf die einheitliche Oberfläche von $0,25 \text{ cm}^2$



Stauboberfläche/cm² Wuchsfläche.

Nach einer Inkubationszeit von 96 h zeigten sich lediglich nach der Krokydolith- und der Steinwolleexposition signifikant ($p < 0,05$) erhöhte MnSOD-Enzymmengen (Abb. 3).

5.1.3 Quantifizierung der MnSOD-mRNA durch Northern-Analysen

Mittels Northern-Analysen konnte eine Staub-vermittelte Steigerung auf die Transkriptionsrate der MnSOD-mRNA nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. In allen durchgeführten MnSOD Northern-Analysen liegt die MnSOD-Genexpression in unexponierten BEAS 2B-Zellen nahe der unteren Nachweisgrenze. Eine Exposition der Zellen über 24 h mit Krokydolith, Quarz oder Steinwolle (jeweils $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) führte zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,01$) der zellulären MnSOD-Transkriptionsrate.

Diese Induktion weist auf einen starken transkriptionellen Regulationsmechanismus der MnSOD-Genexpression hin, der durch Inkubation mit Krokydolith, Quarz und Steinwolle aktivierbar ist. Bei Exposition der Zellen mit höheren Konzentrationen treten jedoch Unterschiede im Verlauf der MnSOD-Transkriptionsraten bei den verschiedenen Stäuben auf.

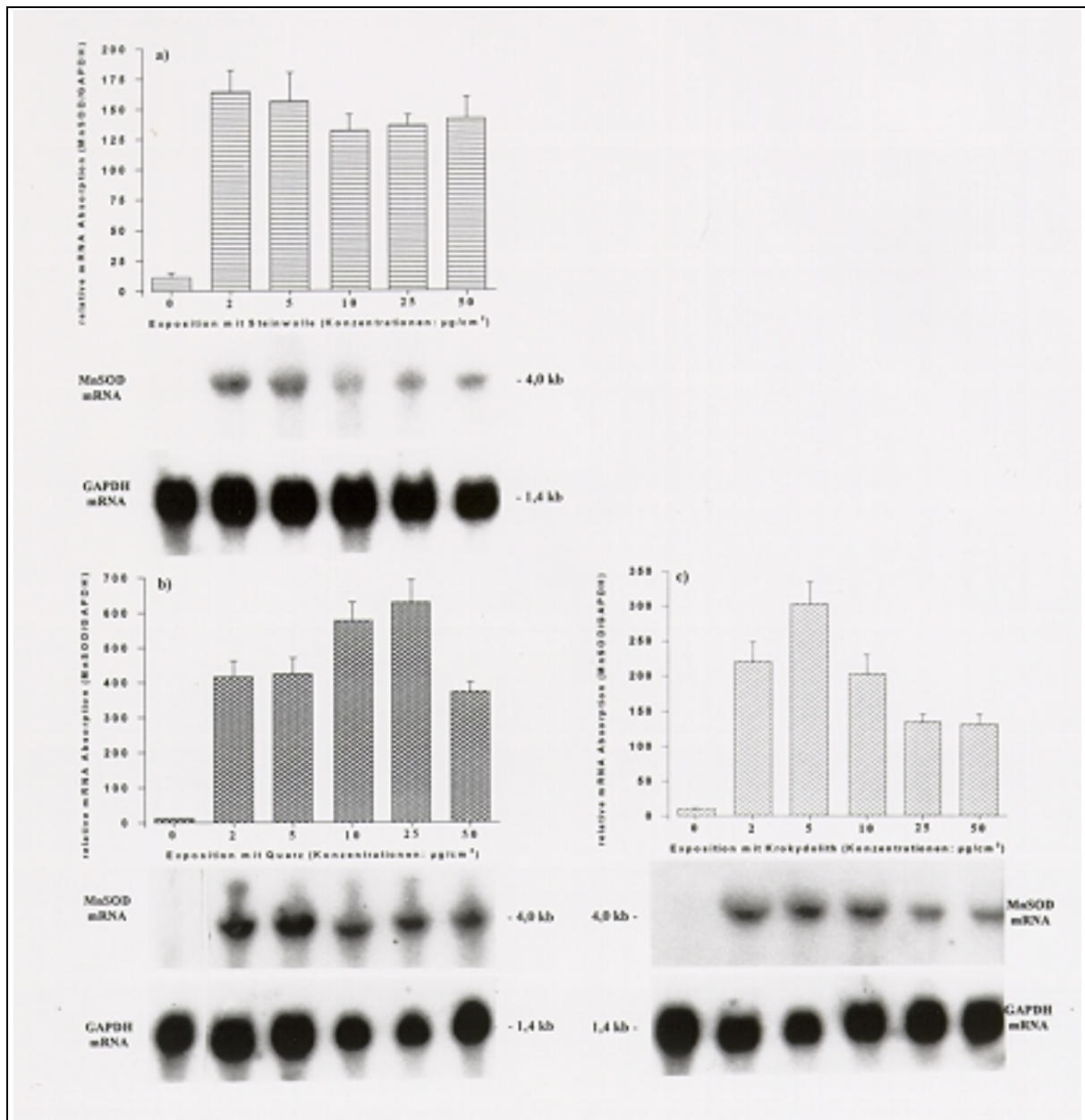


Abbildung 4: Ergebnisse des radioaktiven Nachweis der MnSOD-mRNA. Verlauf der MnSOD-Transkription nach 24 h Exposition der BEAS 2B-Zellen mit Steinwolle (a), Quarz (b) oder Krokydolith (c). Die Quantifizierung der Signalstärken (4,0 kb MnSOD-Transkript und 1,4 kb GAPDH-Transkript) wurde laserdensitometrisch durchgeführt. Bezüglich der methodischen Details wird auf Material und Methoden (4.8) verwiesen. Die jeweils untere Bildhälfte enthält ein repräsentatives Beispiel der Hybridisierungssignale. Mittelwerte (4 Experimente/Expositionsschritt) \pm Standardabweichung.

Sowohl bei Quarz ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) als auch bei Krokydolith (ab $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) kommt es zu einem Rückgang der MnSOD-Transkriptionsrate.

Dieser Rückgang des MnSOD-mRNA Gehaltes konnte dagegen nicht bei der Verwendung von Steinwolle beobachtet werden, denn hier bleiben die entsprechenden Werte selbst bei $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf einem erhöhten Niveau stehen.

5.2 Quantifizierung der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA durch Northern-Analysen

Zusätzlich zur MnSOD mRNA-Quantifizierung wurde in den entsprechend exponierten Zellen die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA mittels Northern-Analysen quantifiziert. Als Kontrollpartikel wurden Latexkügelchen verwendet. Die Abb. 5 zeigt die Hybridisierungsergebnisse der mit verschiedenen Konzentrationen (0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 25; 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) mit Krokydololith bzw. Latexkügelchen exponierten BEAS 2B-Zellen. Für die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD lassen sich die beiden 0,9 kb und 0,7 kb großen Transkripte nachweisen (43). Dabei handelt es sich bei dem 0,9 kb großen Transkript um ein Vorläufertranskript, das durch zelluläre Prozessierungsmechanismen zur reifen 0,7 kb großen $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA umgewandelt wird. Schon in unexponierten BEAS 2B-Zellen findet sich ein hoher Gehalt an $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA. Dieser Expressionsstatus lässt sich durch eine Staubexposition (Abb.

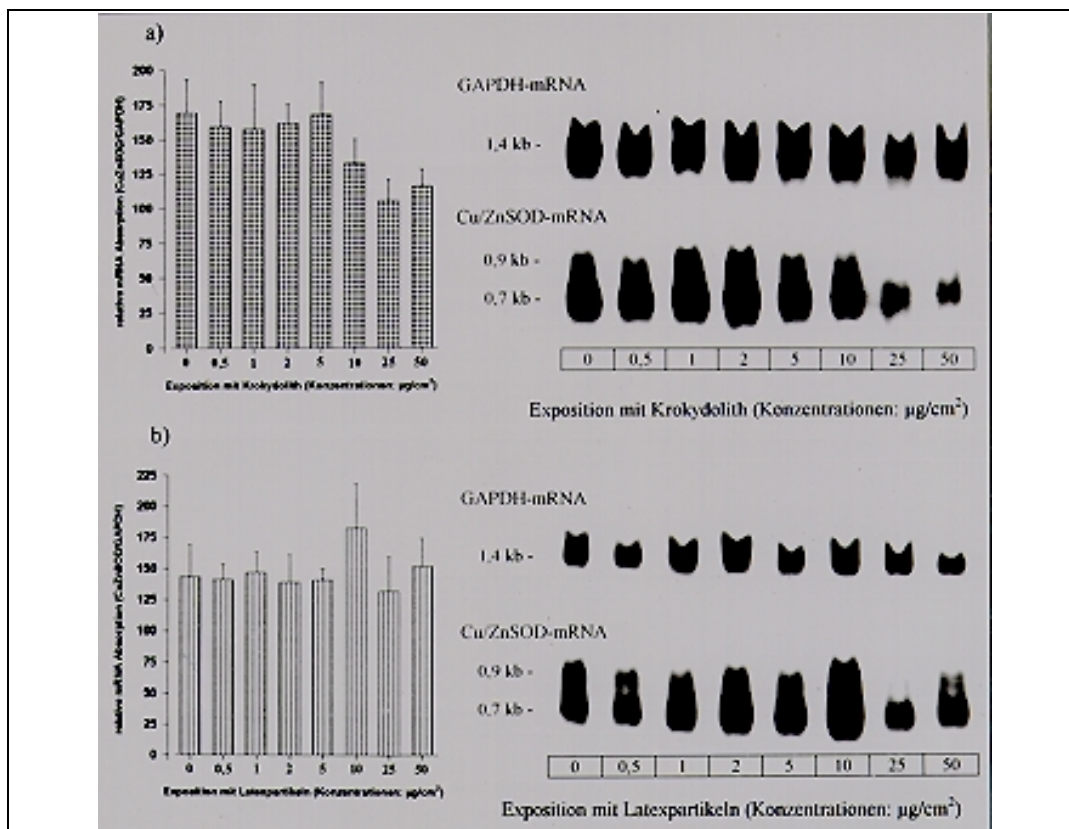


Abbildung 5: Ergebnisse des nicht-radioaktiven Nachweises der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA. 24 h Exposition der BEAS 2B-Zellen mit Krokydololith (a) oder Latexkügelchen (b). Die Quantifizierung der Signalstärken (0,7 kb $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-Transkript und 1,4 kb GAPDH-Transkript) wurde laserdensitometrisch durchgeführt. Bezüglich der methodischen Details wird auf Material und Methoden (4.8) verwiesen. Die rechte Bildhälfte enthält ein repräsentatives Beispiel. Mittelwerte (4 Experimente/Expositionsschritt) \pm Standardabweichung.

5) nicht weiter steigern. Ganz im Gegenteil kommt es bei Verwendung hoher Dosen an Krokydolith (25 und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) zu einer Abnahme der absoluten GAPDH und $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA Menge, was möglicherweise auf die zytotoxische Eigenschaft von Krokydolith zurückzuführen ist (54;110). Der Rückgang der Transkriptionsrate ist bei der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA höher als bei der GAPDH-mRNA, was zu einer Verschiebung der Relation GAPDH/ $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD und zu einem Absinken der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD mRNA-Menge führt. Durch die Exposition mit Latexkügelchen läßt sich eine Abnahme des $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-mRNA Gehaltes auch bei hohen Latexkonzentrationen (25, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nicht erzielen. Diese Beobachtung steht in guter Übereinstimmung mit der geringen zytotoxischen Potenz dieser Partikel. Die Ergebnisse zeigen, daß es sich bei der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD um ein konstitutiv expremiertes Enzym handelt, welches auch in unexponierten Zellen als antioxidativer Schutzmechanismus bereitgestellt wird, sich aber durch entsprechende Reize (z.B. durch die Exposition mit Krokydolithfasern) nicht weiter induzieren läßt.

5.2.1 Nachweis der MnSOD-mRNA in exponierten BEAS 2B-Zellen durch In-situ-Hybridisierung

Bestätigend zu den durchgeführten Northern-Analysen konnten auch in der In-situ-Hybridisierung in unexponierten BEAS 2B-Zellen keine MnSOD-mRNA Signale detektiert werden (Abb. 6A). Die mit Krokydolith exponierten Zellen ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2 = 2,4 \mu\text{g}/\text{ml}$, 24 h), die als Negativkontrolle mit der sense-cRNA MnSOD-Sonde inkubiert wurden, waren erwartungsgemäß ebenfalls negativ (Abb. 6B). Als Positivkontrolle wurde eine Digoxigenin-markierte β -Aktin antisense cRNA-Sonde verwendet, mit der auch bei unexponierten Zellen ein hoch-positives Hybridisierungssignal beobachtet werden konnte (Abb. 6C). Somit bestätigen die Positiv- (unexponierte Zellen und Hybridisierung mit der β -Aktin antisense cRNA-Sonde) und Negativkontrollen (mit Krokydolith exponierte Zellen, MnSOD-sense cRNA-Sonde) die Spezifität der Ergebnisse (Abb. 6A-C). Nach einer 24-stündigen Inkubation der BEAS 2B-Zellen mit jeweils $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Krokydolith (Abb. 6D), Quarz (Abb. 6E) oder Steinwolle (Abb. 6F) ließ sich durch die Hybridisierung mit der MnSOD-antisense cRNA-Sonde eine Steigerung der Transkription des MnSOD-Gens nachweisen. Somit führt die Exposition mit jedem der getesteten drei Stäuben zu einem zellulären Stimulus mit einer Steigerung der zellulären MnSOD-Expression. Die In-situ-Hybridisierungsexperimente bestätigt somit auf qualitativer Weise die Ergebnisse der Northern-Analysen.

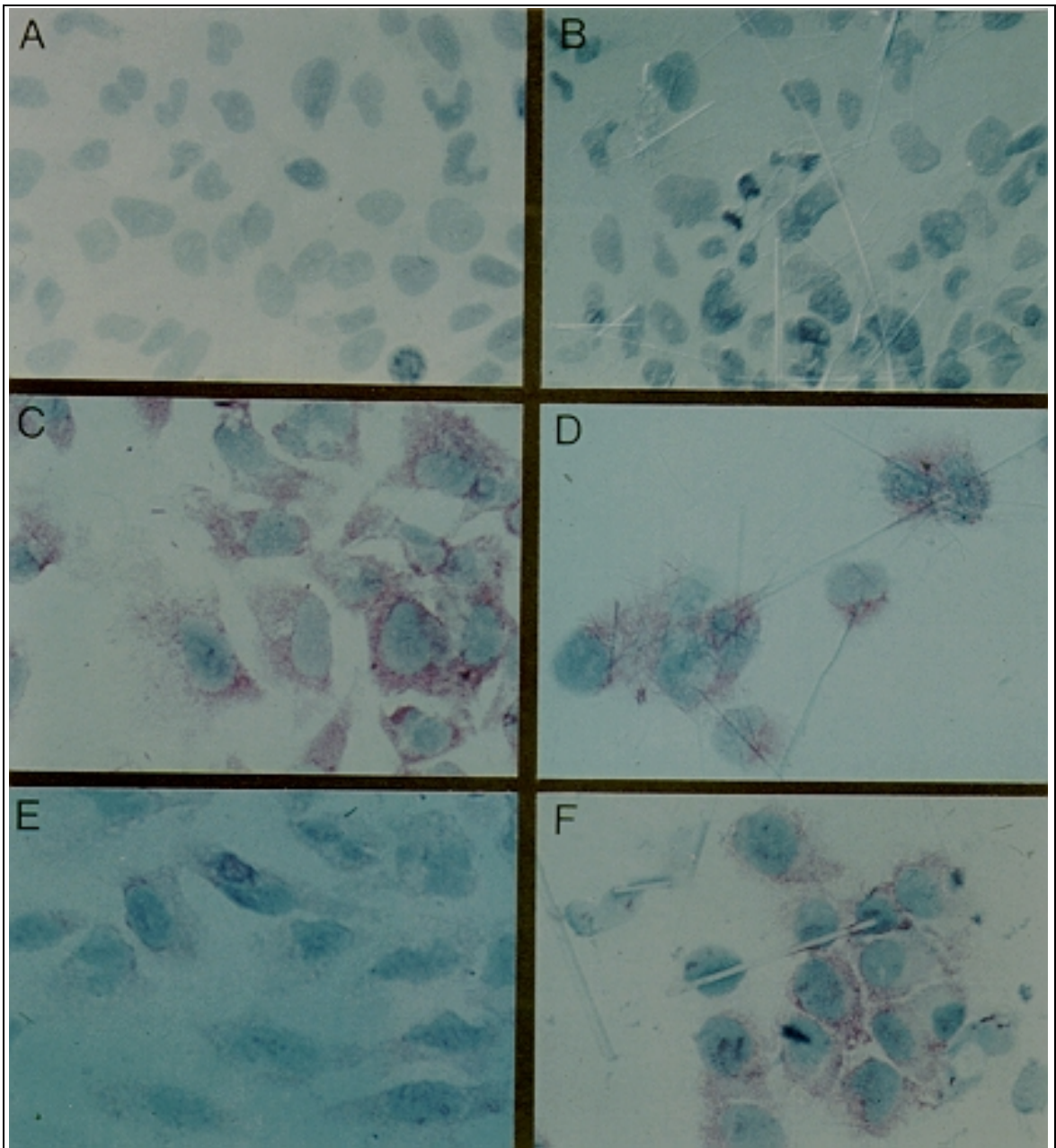


Abbildung 6: Nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung an BEAS 2B-Zellen zum Nachweis der MnSOD-mRNA nach Krokydolith, Steinwolle und Quarz Exposition (je $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für 24 h). A) keine Faserexposition, Hybridisierung mit MnSOD-antisense Sonde (Negativkontrolle). B) Krokydolithexposition, Hybridisierung mit MnSOD-sense Sonde (Negativkontrolle). C) Nachweis des *housekeeping* Gens β -Aktin in unexponierten Zellen (Positivkontrolle). Hybridisierung mit MnSOD-antisense Sonde nach Krokydolith-(D), Quarz- (E) und Steinwolleexposition (F).

5.3 In vivo Untersuchungen der MnSOD-Expression an Bronchialschleimhaut-biopsien

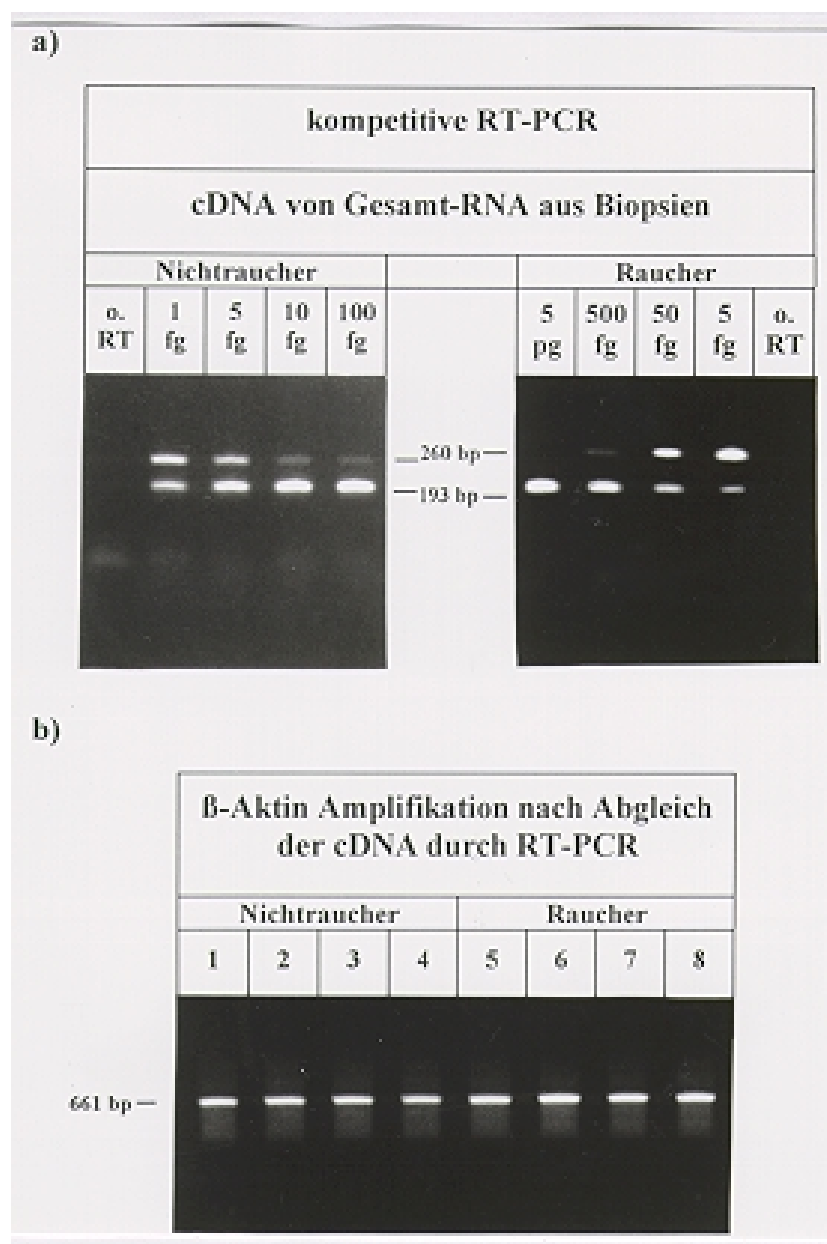


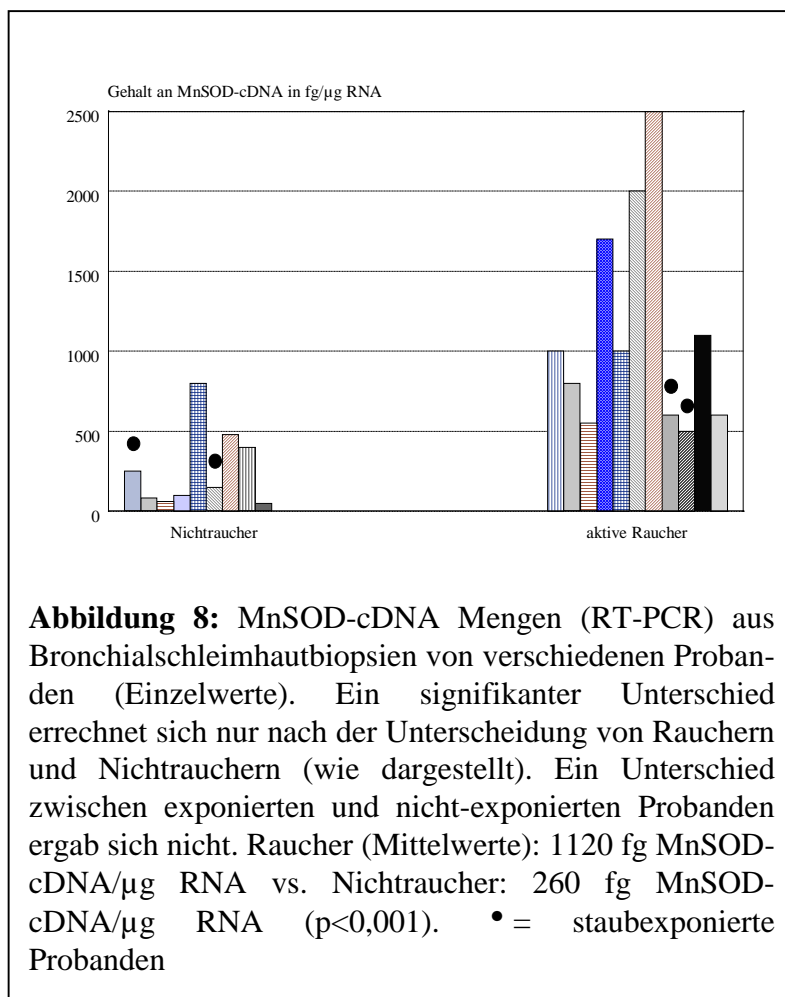
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der kompetitiven RT-PCR mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte.

- Es entstehen aus der Proben-cDNA zwei PCR-Produkte, ein 260 bp großes MnSOD-Fragment, und das 193 bp große MnSOD-Fragment des internen Standards. Die zugegebenen Mengen des internen Standards sind über den jeweiligen Spuren angegeben. o. RT = Negativkontrolle (keine Zugabe der reversen Transkriptase bei der cDNA Herstellung).
- Vergleich der Bandenintensitäten des PCR-Produktes (661 bp) des *housekeeping* Gens β-Aktin nach Abgleich probenabhängiger Schwankungen. Vergleichend sind 4 Nichtraucher (Spuren 1-4) und 4 Raucher (Spuren 5-8) gegenübergestellt.

Im zweiten Teil des Studienvorhabens wurde untersucht, ob sich die *in vitro* an Zellkulturen erhobenen Befunde auf die *in vivo* Situation übertragen lassen.

Die bronchoskopisch gewonnenen Bronchialschleimhautbiopsien wurden mittels semi-quantitativer RT-PCR auf ihren Gehalt an MnSOD-mRNA untersucht, außerdem wurden an den Biopsien die SOD-Aktivität und die SOD-Enzymmenge quantifiziert. Zusätzlich wurde an Dünnschnitten der Gewebe die morphologische Verteilung der MnSOD-mRNA und des MnSOD-Proteins untersucht.

5.3.1 Quantifizierung der MnSOD-mRNA in Bronchialschleimhautbiopsien



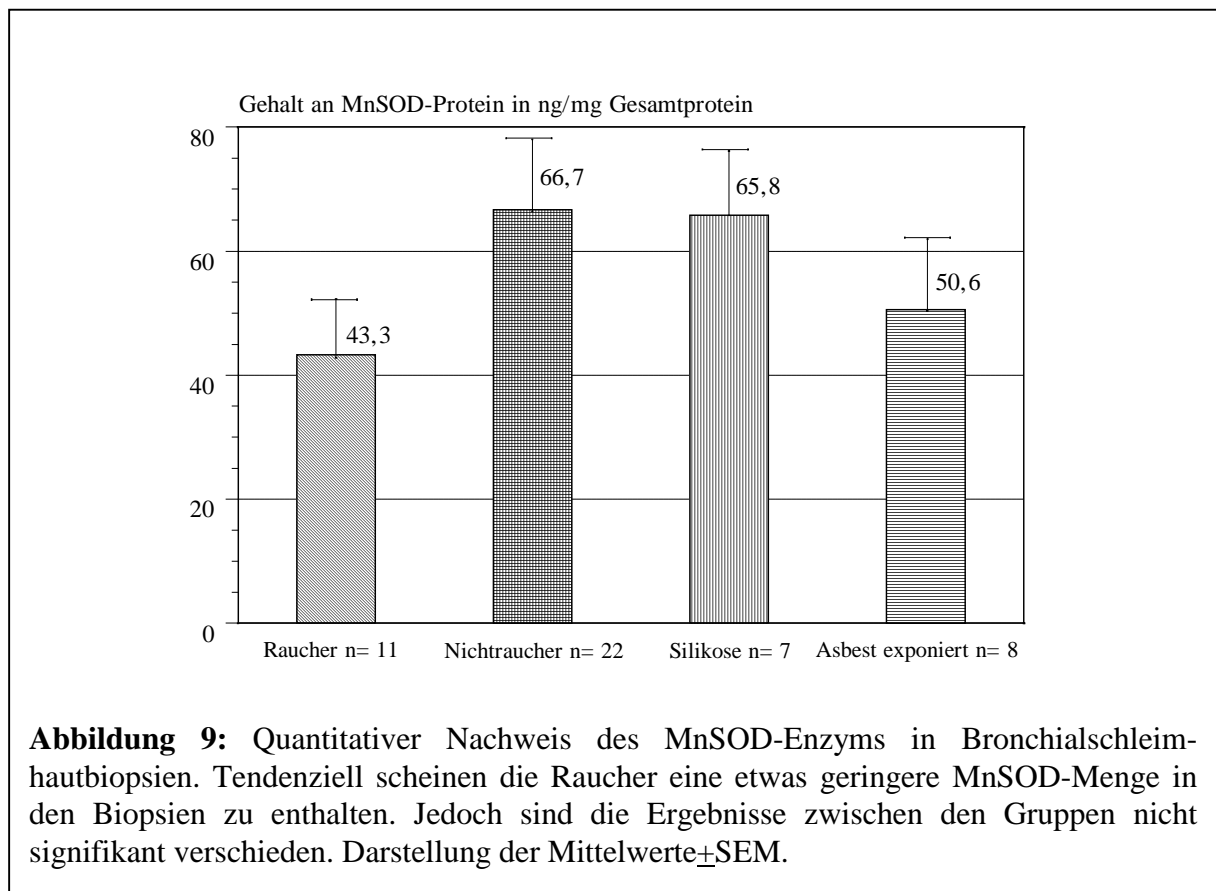
In der hier verwendeten semiquantitativen, kompetitiven RT-PCR entstehen während der PCR-Reaktion zwei unterschiedlich große PCR-Produkte: a) ein 260 bp großes MnSOD-Fragment aus der Proben (Biopsien)-cDNA, und b) ein 193 bp großes MnSOD-Fragment des in dieser PCR-Reaktion um das gleiche Primerpaar konkurrierenden internen Standards. Je nach Mengenverhältnis der MnSOD-cDNA aus den Biopsien zur Menge an zugegebenem Standard ergaben sich unterschiedliche Intensitäten der

beiden Banden. Kommt es zu gleich starken Bandenintensitäten, läßt sich anhand des in bekannter Menge zugegebenen internen Standards die unbekannte Menge der MnSOD-cDNA ermitteln. In Abb. 7a ist exemplarisch das Ergebnis zweier kompetitiver RT-PCRs (Raucher/Nichtraucher) gegenübergestellt. Je größer die Konzentration des internen Standards wird, desto mehr nimmt die Intensität der Proben-cDNA Bande ab (siehe Abb. 7a, durchgeführt mit: 50 µl Gesamtvolumen, abgegliche Mengen an cDNA, 45 Zyklen, 56 °C Hybridisierungstemperatur, 25 pmol MnSOD-Primer).

Die Abb. 8 zeigt die Einzelergebnisse von 20 untersuchten Probanden. Interessanterweise lassen sich in dem Biopsiematerial der Probanden große Unterschiede des Gehalts an MnSOD-mRNA nachweisen. Gruppiert man die Ergebnisse nach Rauchern und Nichtrauchern, so zeigt sich in den Bronchialschleimhautbiopsien der Raucher ein signifikant ($p < 0,001$) erhöhter MnSOD-cDNA Gehalt (Abb. 8). Im Mittel kann bei der Gruppe der aktiven Raucher eine 4,3-fach höhere Menge an MnSOD-mRNA gegenüber den Nichtrauchern in dem Gewebematerial nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen der staubexponierten Gruppe und den Nichtrauchern ergaben sich nicht (Daten nicht dargestellt). Somit war der bestimmende Faktor bei den MnSOD-mRNA-Mengen das Rauchverhalten, nicht jedoch die Staubexposition.

5.3.2 Quantifizierung des MnSOD-Enzyms *in vivo*

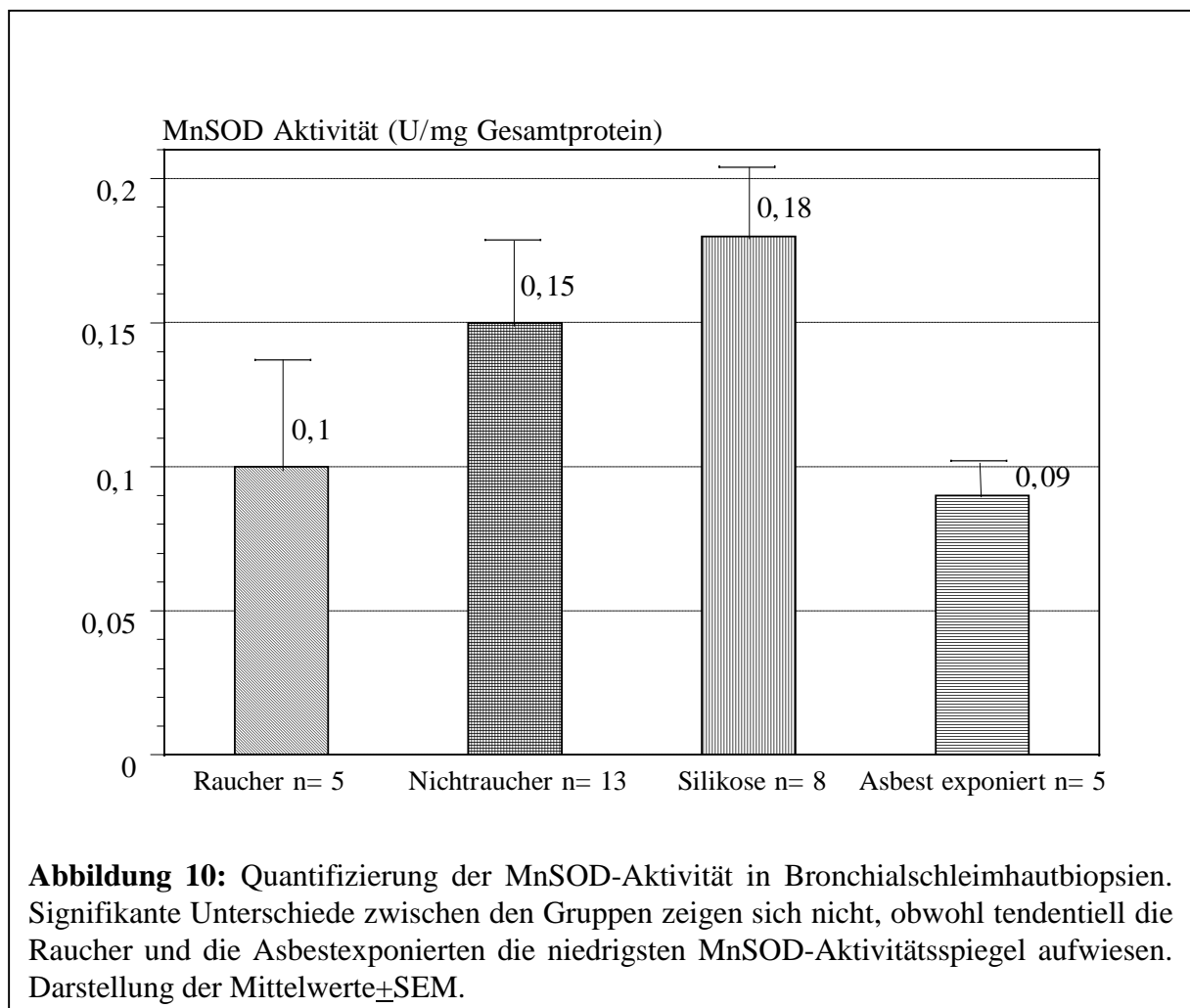
Mittels ELISA wurde in den Bronchialschleimhautbiopsien das MnSOD-Enzym quantitativ nachgewiesen. Die gemessenen Konzentrationen der einzelnen Probandengruppen sind in Abb. 9 zusammengestellt. Bei den MnSOD-Proteinmessungen zeigten sich nur moderate



Unterschiede (keine Signifikanz, Angaben als Mittelwerte \pm Standardirrtumswahrscheinlichkeit [SEM]). Ob die gezeigten Konzentrationsunterschiede einen Trend darstellen, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Die erniedrigten Werte in der Rauchergruppe (bei gleichzeitiger Steigerung der MnSOD-Transkriptionsrate) mag als ein Hinweis auf einen erhöhten SOD-Enzymumsatz gelten können.

5.3.3 Messung der MnSOD-Aktivität in Biopsien verschiedener Probandengruppen

Ergänzend zu den o.g. Messungen erfolgte in den Bronchialschleimhautbiopsien die MnSOD-

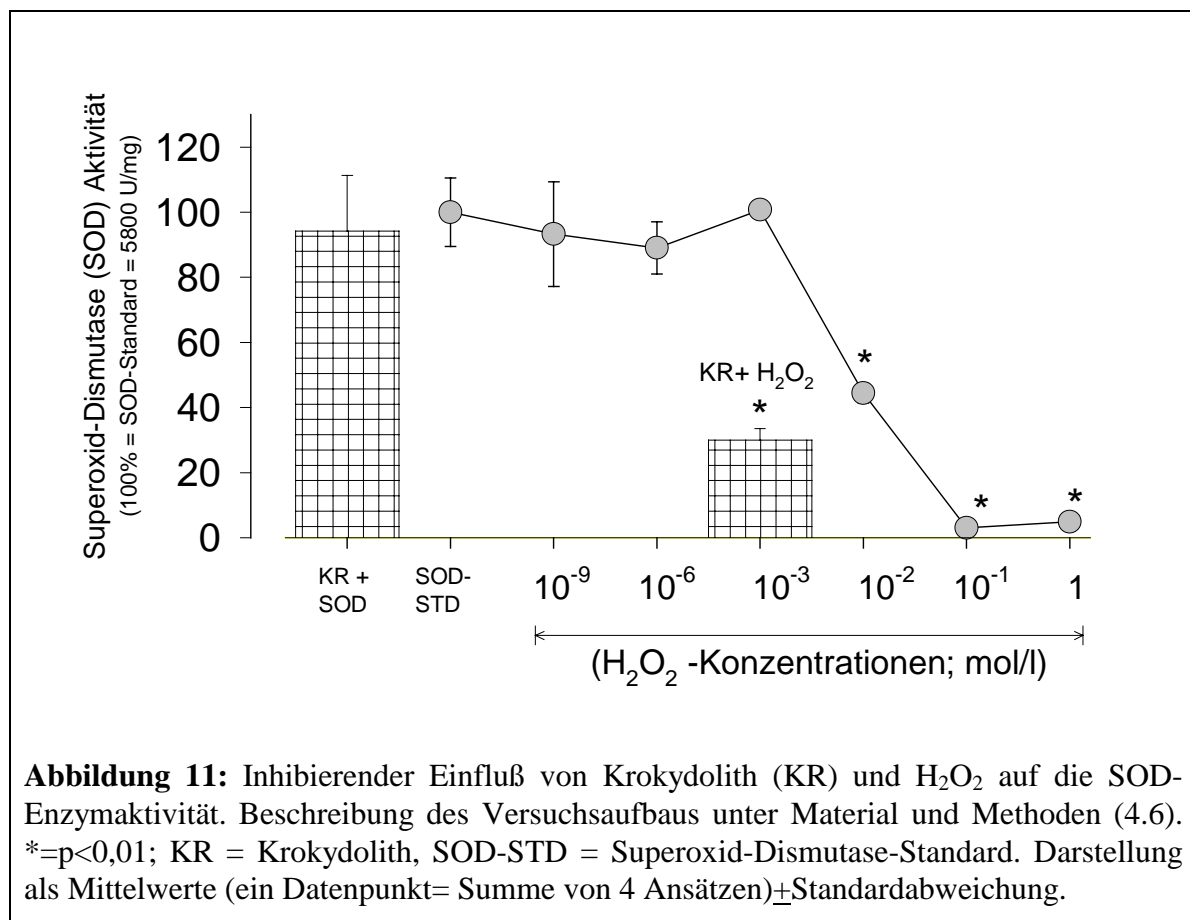


Aktivitätsbestimmung (Abb. 10).

Die Aktivitätswerte der einzelnen Gruppen decken sich mit den Ergebnissen der Quantifizierung des nativen MnSOD-Proteins in dem Gewebematerial. Es zeigt sich eine allerdings nicht signifikante Reduktion der MnSOD-Aktivität bei der Gruppe der Raucher und bei Asbest-exponierten Personen gegenüber der Nichtraucher. Dieser Trend könnte die Hypothese eines vermehrten Enzymumsatzes (bei gesteigerter Transkriptionsrate) bestätigen.

5.3.4 Hemmung der SOD Enzymaktivität durch Krokydolith und/oder H₂O₂

In diesem zellfreien *in vitro* Ansatz wurde untersucht, ob die im Rahmen einer Fenton-Reaktion freigesetzten reaktiven Sauerstoffmetabolite die SOD-Aktivität senken können. Da sich eine Diskrepanz zwischen der durch die Staubexposition bedingten Steigerung der mRNA-Antwort und der nur geringfügigen Steigerung der SOD-Aktivitätsspiegel gezeigt hatte, sollte in diesem Versuchsansatz die Frage nach einem gesteigerten Oxidantienbedingten Enzymumsatz geklärt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt. Nach einer 24-stündigen Inkubation von SOD mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen (10⁻⁹ - 1 M H₂O₂) konnte die Schwelle festgelegt werden, bei der H₂O₂ selbst keinen hemmenden Einfluß auf die Enzymaktivität mehr hat. Erst bei einer Konzentration von 10⁻² M H₂O₂ kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität des Proteins. Es wurde daher für die Inkubationsversuche mit Krokydolith und H₂O₂ eine Konzentration von 10⁻³ M H₂O₂ gewählt. Eine nur durch Krokydolith vermittelte Inhibition der SOD konnte durch den Kontrollansatz (Krokydolith mit SOD) ausgeschlossen werden. Außerdem verhielt sich die Enzymaktivität über den Inkubationszeitraum von 24 h konstant. Nach einer Inkubation der SOD mit 60 µg/ml Krokydolith in Natriumcarbonat-Puffer mit 10⁻³ M H₂O₂ ist eine signifikante Abnahme



der Enzymaktivität nach 24 h Inkubation zu beobachten.

5.4 Morphologische Zuordnung der MnSOD-mRNA in Bronchialschleimhautbiopsien

Die histologisch nachweisbare Verteilung der MnSOD-mRNA-Transkripte in dem Biopsiematerial soll klären helfen, welche Zellen primär in der Lage sind, sich vor einer oxidativen Belastung zu schützen (Bestätigung oder Verwerfen der Hypothese der Barrierefunktion bronchoepithelialer Zellen). Die Abb. 12 stellt exemplarisch das Ergebnis einer solchen Nicht-radioaktiven **In-situ-Hybridisierung** (NISH) an einer Bronchialschleimhautbiopsie eines Asbest-belasteten Probanden dar. Bei der In-situ-Hybridisierung mit der MnSOD-antisense cRNA-Sonde (Abb. 12A und C) zeigte sich eine im epithelialen Bereich (auch bei den proliferierenden Basalzellen des Epithels) gelegene Farbreaktion hier mit Nachweis einer stark positiven Anfärbung des Zytoplasmas. Zusätzlich läßt sich die MnSOD-mRNA auch in einzelnen, im Bereich der Tunica propria gelegenen, fibroblastären und histiozytären Zellen nachweisen. Bei kleinerer Vergrößerung (Abb. 12A) sind auch kapilläre Blutgefäße erfaßt, deren Endothelzellen vereinzelt eine schwach positive Reaktion aufweisen. Die durchgeführte Negativkontrolle (Abb. 12B) an einem zweiten Schnittpräparat der gleichen Biopsie zeigt neben der durch die Gegenfärbung mit Hämatoxilin erzielten Kernfärbung keine MnSOD-mRNA spezifische Rotfärbung.

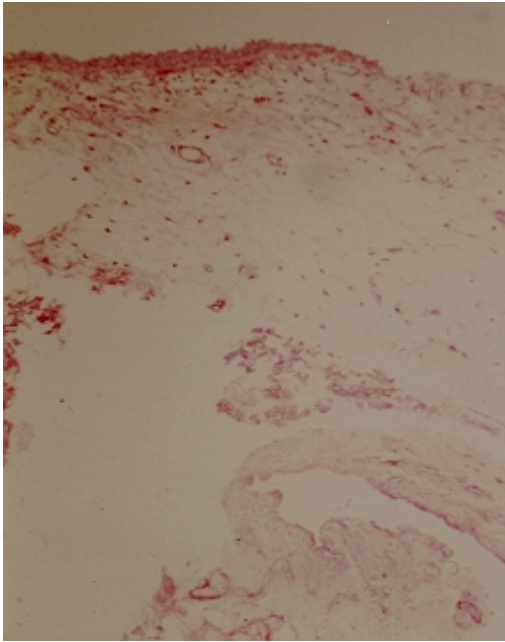
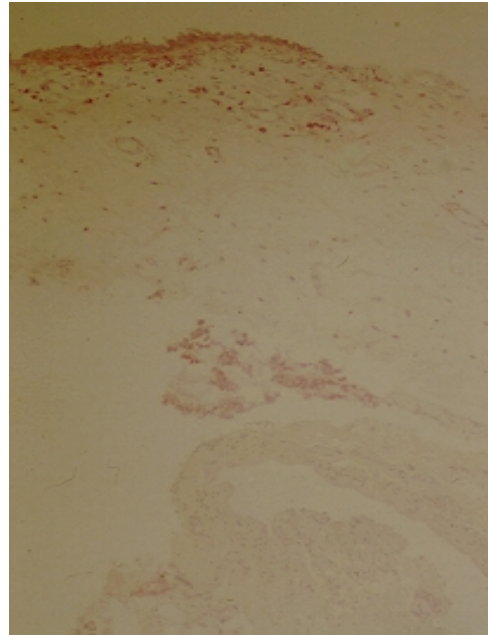
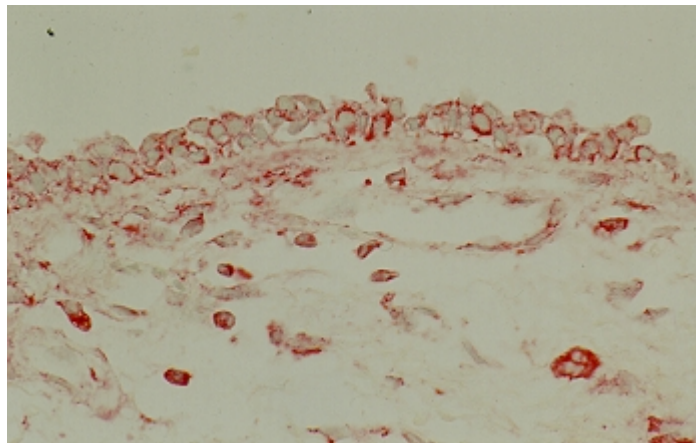
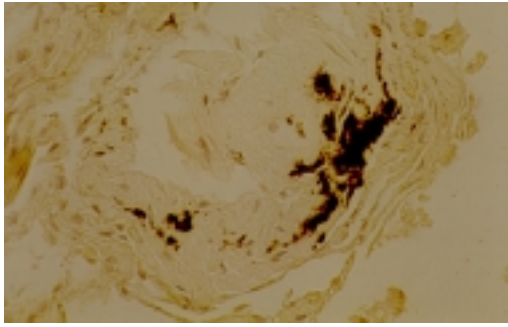
A)**B)****C)**

Abbildung 12: Nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung (NISH) an Dünnschnitten von Bronchialschleimhautbiopsien eines Asbeststaub-Exponierten zur histologischen Lokalisation der MnSOD-mRNA. In den apikalen Bereichen sind Epithelzellen erkennbar. A) Verwendung der antisense-MnSOD cRNA Sonde (100 x). B) Verwendung der MnSOD-sense cRNA-Sonde als Negativkontrolle (100 x), nur die Kernfärbung (Gegenfärbung) ist erkennbar. Bei C) läßt sich eine starke MnSOD-Transkription in allen epithelialen Zellen (Verg. 630x) aber auch in fibroblastären und histiozytären Zellen im Bereich der Tunica propria nachweisen.

5.4.1 Morphologische Zuordnung des MnSOD-Enzyms in Bronchialschleimhautbiopsien

Zusätzlich zu der morphologischen Verteilung der MnSOD-mRNA wurde das MnSOD-Protein in den Schnittpräparaten auf zellulärer Ebene detektiert. Mittels Immunhistochemie war es möglich das MnSOD-Protein in epithelialen Zellen nachzuweisen (Abb. 13).

A)



B)

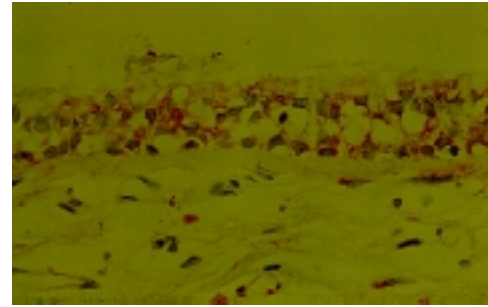


Abbildung 13: Mikrofotogramme einer transbronchialen Biopsie eines Patienten mit Silikose mit Immunhistochemischer Darstellung des MnSOD-Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers (Anti-human MnSOD-Antikörper). A) Negativkontrolle (Präimmunsera statt Anti-human MnSOD-Antikörper, 100x). In den verbreiterten Alveolarsepten Ablagerungen von schwärzlichem Mischstaubpigment. Die durchgeführten Negativkontrollen zeigen neben der Kernfärbung keinerlei unspezifische Rotfärbung. B) Detailaufnahme (630 x) mit Darstellung der Bronchialschleimhaut und angrenzender subepithelialer Basalmembranzzone sowie Stroma der Tunica propria. Positive zytoplasmatische Anfärbung der bronchialen Epithelzellen sowie vereinzelter Stromazellen. Negative Reaktion der subepithelialen Basalmembranzzone.

Exemplarisch wird hier das Ergebnis einer Immunhistochemie aus einer transbronchialen Biopsie eines Bergmanns dargestellt (Abb. 13).

6 Diskussion

6.1 Die Barrierefunktion bronchoepithelialer Zellen

Die Atemwege (Trachea mit Bronchialbaum) sind mit einer sie schützenden Epithelzellschicht ausgekleidet, wobei 95% der Oberfläche von Typ II Pneumozyten gebildet werden (31). Dieser Zellverband hat aufgrund seiner prädisponierenden Lokalisation neben den intraluminal befindlichen Entzündungszellen direkten Kontakt mit der Umwelt und ist daher besonders inhalierten Organismen, Partikeln, irritativen oder toxischen Stoffen ausgesetzt, die das in den Atemwegen bestehende physiologische Milieu grundlegend verändern und schädigen können (31;96). Eine wichtige Aufgabe bronchoepithelialer Zellen ist die Barrierefunktion zwischen der Atmosphäre und dem Lungengewebe, die die Voraussetzung für den Schutz und Erhalt des Lungeninterstitiums darstellt. Folgende Eigenschaften zeichnen das Atemwegsepithel aus: a) bronchoepitheliale Zellen sind wesentlich widerstandsfähiger gegenüber inhalierten Fremdstoffen als beispielsweise das Alveolarendothel, b) über die Epithelzellen wird im Übermaß vorhandene bronchiale

Flüssigkeit, wie sie bei der dekompensierten Linksherzinsuffizienz oder beim ARDS (*adult respiratory distress syndrome*) auftreten, wieder rückresorbiert, c) das Lungenepithel ist in der Lage schützende Proteine oder Proteinmischungen zu sezernieren, so setzen z.B. Pneumozyten Typ II die Surfactant-assoziierten Proteine SP-A und SP-B frei, d) sie produzieren Mukus und transportieren über den Zilienmechanismus (mukoziliäre Clearance) Fremdstoffe ab u.v.a.m.

Als Effektorzellen können bronchoepitheliale Zellen auch auf primäre und sekundäre Stimuli aktiv reagieren. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen sind sie in der Lage Eicosanoide, Sauerstoffradikale, den Plättchen-aktivierenden-Faktor, Zytokine u.a.m. zu produzieren bzw. freizusetzen (111). So besitzen Epithelzellen ein komplexes System, mit dem sie über autokrine, parakrine, endokrine und/oder exokrine Mechanismen auf proinflammatorische Reize reagieren bzw. untereinander, vermittelt durch *tight-junctions* kommunizieren können (2;96;99;111;141).

Inhalierte Fremdstoffe, wie z.B. Stäube, werden primär von alveolären Makrophagen aufgenommen, können sich aber auch direkt an die bronchoepithelialen Zellen anlagern, wie wir in *in vitro* Untersuchungen mittels rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen belegen konnten (56). Dadurch ist die bronchiale Epithelzelle zum einen den proinflammatorischen Mediatoren der Makrophagen (TNF- α und anderen Zytokinen, Proteasen, Sauerstoffradikalen) und zum anderen auch mechanischen und chemischen Reizen der angelagerten Stäube ausgesetzt.

6.2 In vitro Untersuchungen

Um den Einfluß von Stäuben auf zelluläre Metabolite zu analysieren, verwendeten die meisten Autoren entweder phagozytierende Zellen (humane Zellen, Zellen verschiedener Tierspezies bzw. sekundäre Zellkulturen), Hamster-Trachealepithelzellen (HTE= *hamster tracheal epithelial cells*), humane Lungenfibroblasten (HAL= *human adult lung fibroblasts*), aus Ratten gewonnene Tracheaorgankulturen, humane Endothelzellen, die aus Umbilicalvenen isoliert wurden (HUVEC), maligne Zelllinien (wie z.B. die A549-Zelllinie, die aus einem humanen Adenocarcinom isoliert wurde, die aber in ihren zellphysiologischen Charakteristika Typ II Pneumozyten ähnlich ist) oder humane Pleuramesotheliumzellen (HMC= *human pleural mesothelial cells*) (siehe Übersicht: (27;136) sowie (46;47;70;78;131;152;161)). Nur wenige Autoren verwendeten humane bronchoepitheliale

Zellen nicht-malignen Ursprungs, um Expositionsexperimente mit natürlichen Mineralfasern durchzuführen (95;97). An nicht-phagozytierenden *in vitro* kultivierten Zellen wurde der Einfluß von Stäuben auf das zelleigene SOD-System in der Vergangenheit fast ausschließlich an HTE-, HMC- und HAL-Zellen analysiert, womit unsere an BEAS 2B-Zellen durchgeführten Untersuchungen ein Novum darstellen. Grundsätzlich ist vor der Auswahl der für solche Untersuchungen zu verwendenden Zellen zu beachten, daß nicht jede kommerziell verfügbare Zelllinie auch SOD produziert bzw. dieses Enzym expremiert (109).

6.2.1 Verhalten der SOD-mRNA-Spiegel

Die in unseren Untersuchungen beobachtete Steigerung der MnSOD mRNA-Spiegel bestätigt im wesentlichen von anderen Arbeitsgruppen gemachte Beobachtung. Janssen et al (1994) inkubierten zwei verschiedene HMC-Zellkulturen (HMC 9017, HMC 9015) mit Krokydololith (1,25; 2,5; 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) bzw. einem O_2^- -generierenden Enzymsystem (Xanthin/Xanthinoxidase) und quantifizierten die MnSOD mRNA-Expression (91). Die Autoren beobachteten sowohl einen von der verwendeten Staubexpositionsmenge, als auch einen von der Expositionszeit abhängigen Anstieg der MnSOD mRNA-Konzentrationen, wobei jedoch das verwendete O_2^- -generierende Enzymsystem insgesamt höhere Werte als nach Asbestexposition erzielte. Der maximale Anstieg mit Werten um ca. das Doppelte ($p < 0,05$) ließ sich nach 24 h und einer Krokydololithkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ erzielen. Eine weitere Beobachtung zeigte, daß sich selbst eng verwandte Zellkulturen in Bezug auf die MnSOD-Expression sehr unterschiedlich verhalten können. So wurden im Vergleich zu den HMC 9017 bei den HMC 9015 ca. doppelt so hohe MnSOD mRNA-Konzentrationen gemessen (91). Untersuchungen an HAL-Zellen erbrachte dagegen auch bei der höchsten gewählten Faserkonzentration (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) und der längsten Expositionszeit (24 h) keinen signifikanten Anstieg der MnSOD mRNA-Spiegel. Die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. Im Gegensatz dazu stiegen bei unseren Experimenten in den verwendeten BEAS 2B-Zellen die initial sehr niedrigen MnSOD mRNA-Konzentrationen schon nach 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, noch mehr jedoch nach 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ signifikant an (siehe 5.1.3, Abb. 4). Wegen des im Gegensatz zu den HMC-Zellen unterschiedlichen Induktionsverhaltens ist daher anzunehmen, daß es sich bei den in ihrem Ausprägungsgrad divergenten Ergebnissen höchstwahrscheinlich um einen zellspezifischen Effekt handelt, wobei die BEAS 2B-Zellen mit sehr hohen SOD-Steigerungsraten auf einen exogenen prooxidativen Stress zu reagieren vermögen (136).

Der bei höchsten Staubkonzentrationen (25 und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) von uns beobachtete mRNA-Abfall (MnSOD und $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD) wird wahrscheinlich durch eine Staub-induzierte Steigerung der Zytotoxizität verursacht. Auf diesen Zusammenhang deuten sowohl unsere früheren Ergebnisse als auch die in der Literatur publizierten Daten hin (54;56;120). Durch die Faserexposition kommt es zu einer Abnahme der die Epithelzelle schützenden Antioxidantien (z.B. reduziertes Glutathion), der möglicherweise durch den Staub-verursachten prooxidativen Effekt bedingt ist, wodurch Apoptose (nachgewiesen über die Zunahmen von DNA-Strangbrüchen, zellmorphologische Veränderungen, BAX-Proteinquantifizierung) und Zelltod (nachgewiesen mittels Trypan Blau und zellulärer LDH-Freisetzung) die Folge sind. Fügt man nämlich Antioxidantien hinzu (z.B. SOD, Katalase, N-Acetylcystein) läßt sich diese Entwicklung aufhalten bzw. bremsen (54;59;118;120;131). Ähnliche Ergebnisse konnten schon früher an Rattenlungenfibroblasten und Alveolarmakrophagen (nach vorheriger Isolation aus der Rattenlunge) erhoben werden, wobei mittels Katalase und Desferoxamin, nicht aber mit hitzeinaktivierter SOD oder Katalase bzw. hitzeinaktiviertem Rinderalbumin, der Krokydolith-induzierte Zelltod verhindert oder zumindest reduziert wurde (156). Die Prävention oder Minimierung Asbestfaser-induzierter Lungenschäden durch Antioxidantien läßt sich auch gut im tierexperimentellen Modell dokumentieren. So waren Mossman et al (1990) in der Lage, die Induktion einer Lungenfibrose der mit Krokydolith inhalativ behandelten Ratten durch die Applikation von Polyethylenglycol-konjugierter Katalase zu verhindern (119).

Die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD mRNA-Konzentrationen verhielten sich gänzlich anders als die der MnSOD. Erstens lagen die Basiskonzentrationen der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD wesentlich höher und zweitens konnte eine weitere Steigerung durch die entsprechende Staubexposition nicht induziert werden. Auch diese Beobachtung bestätigt die an anderen Zelllinien (z.B. HTE) gewonnenen Ergebnisse. Die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD Expression ließ sich mit verschiedenen Asbestfasern (Krokydolith, Chrysotil) oder mit H_2O_2 in exponierten HTE-Zellen nicht weiter steigern (159;175). Die Autoren interpretierten diese Ergebnisse als Indiz, bezogen auf die beiden SOD-Enzyme, für die zellcharakteristische und Zellzyklus-spezifische antioxidative Abwehrreaktion. In Endothelzellen, die aus Rinderpulmonalarterien isoliert wurden, konnte nach Endotoxingabe die MnSOD, nicht aber die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD, Katalase und Glutathion-Peroxidase gesteigert werden (158).

Da die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD auch in BEAS 2B-Zellen nicht weiter aktivierbar ist, nehmen wir neben möglichen zellspezifischen Unterschieden an, daß erstens das Zytosol möglicherweise nur eine bestimmte $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-Menge benötigt, da hier lediglich 10-20% der intrazellulär produzierten Oxidantien vorliegen, und daß zweitens im Gegensatz dazu die in den Mitochondrien lokalisierte MnSOD biologisch für das Überleben der Zelle von übergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Die physiologische Notwendigkeit einer Bereitstellung ausreichender MnSOD-Mengen erklärt sich aus dem in den Mitochondrien im Gegensatz zum Zytosol sehr hohen oxidativen Stoffwechsel, wobei dort bis zu 80-90% der zellulären Oxidantien produziert werden, die uninhibiert zelltoxisch wären (45;68;180).

Tierexperimentelle Untersuchungen weisen grundsätzlich in die gleiche Richtung. In den Lungenextrakten Asbest-exponierter Ratten wurden im Gegensatz zu den nicht-exponierten Tieren eine bis zu fünffache Steigerung der MnSOD mRNA-, aber noch nicht einmal eine Verdoppelung der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-Konzentrationen nachgewiesen (84;92). In den Lungen der mit Quarz behandelten Tiere fehlte selbst diese nur geringe $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD mRNA-Induktion (92).

6.2.2 Verhalten der SOD-Aktivitäts- und -Proteinkonzentrationen

Eine signifikante Steigerung der SOD-Aktivitäten konnten wir in den mit Krokydolith exponierten (Konzentrationen bis $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) BEAS 2B-Zellen ab einer Inkubationsdauer von ≥ 48 h nachweisen. Die hohen SOD mRNA-Spiegel zum 24 h -Zeitpunkt führten zeitlich danach zur entsprechenden Enzymproduktion. Der Effekt nach Steinwolleeexposition ist wesentlich schwächer ausgeprägt, wobei eine Kinetik (SOD-Enzymanstieg in Korrelation zur Inkubationszeit und zur Staubkonzentration) nicht nachgewiesen wurde. Die späte MnSOD-Enzymproduktion wurde auch in anderen *in vitro* Modellen gefunden. Mossman et al (1986) wiesen in mit UICC-Krokydolith ($1,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bzw. Chrysotil ($0,36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) exponierten HTE-Zellen erst nach 72 h eine SOD-Aktivitätssteigerung um ca. 25% und nach 96 h sogar eine Steigerung um $>100\%$ (nur bei Chrysotil; bei Krokydolith um ca. 30%) des Ausgangswertes nach (120).

Aus den mittels ELISA quantifizierten MnSOD-Enzymkonzentrationen konnte in unseren Messungen eine signifikante Staub-bedingte Enzymsteigerung nicht errechnet werden. Auch Janssen et al (1994) mußten nach ihren an HAL-Zellen gewonnenen Ergebnissen (Western Blot) eine durch Krokydolith steigerbare MnSOD-Enzymmenge ausschließen

(Inkubationszeiten 24 h und 48 h) (91). Da in dieser Untersuchung jedoch die Exposition mit O_2^- (Inkubationszeit: 48 h) mit einer ca. fünffachen Steigerung der MnSOD-Menge resultierte, ergeben sich die folgenden drei Erklärungsmöglichkeiten: a) Krokydolithfasern haben im Vergleich zu dem gewählten Xanthin/Xanthinoxidase-Enzymsystem einen schwächeren prooxidativen Effekt, b) Krokydolithfasern wirken zytotoxisch, wie von uns schon früher nachgewiesen wurde, weswegen der fehlende MnSOD-Enzymanstieg durch die beginnende Zellschädigung erklärt wäre, c) es kommt zu einem Mißverhältnis von Enzymproduktion und Enzymverbrauch (siehe 6.2.3), d) es treten Transkriptions- und/oder Translationsfehler auf, oder e) es liegen andere Störungen vor (pH-Verschiebungen u.a.m.) (54;56). Diese Gesichtspunkte werden weiter unten eingehend diskutiert.

In vivo, d.h. in tierexperimentellen Untersuchungen (Ratten), korrelierte allerdings die Asbeststaub-bedingte (Krokydolithexposition: 7-10 mg/m³) Steigerung pulmonaler MnSOD mRNA-Spiegel gut mit den entsprechenden Enzymaktivitäten (84;92). Dabei wurde nach einer Expositionszeit von 6-9 Tagen eine über 2 Wochen bestehende Erhöhung der entsprechenden Werte von 1,5-fachen (1. Tag) bis zum fünffachen (5. Tag) des Ausgangswertes beobachtet. Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch die Exposition mit Quarzstaub (92). Die Zellen mit der höchsten SOD-Expression waren dabei die Typ II bronchoepithelialen Zellen (92;136).

6.2.3 Klärung der Differenz der verschiedenen SOD-mRNA- Aktivitäts- und - Proteinkinetiken (Enzymregulation)

Die nur mäßige Induktion der SOD-Aktivitäten und das Fehlen einer signifikanten SOD-Enzymsteigerung in den Staub-exponierten bronchoepithelialen Zellen veranlaßte uns die Hypothese eines möglicherweise vermehrten Oxidantien-getriggerten SOD-Enzymumsatzes zu überprüfen. Wie in Abschnitt 6.2.1 diskutiert, bestätigen eine ganze Reihe von Hinweisen den prooxidativen Effekt von Stäuben (insbesondere Asbestfasern). Unsere Versuchsanordnung, in der sich das SOD-Enzym (bzw. der SOD-Standard) durch koinkubiertes Krokydolith schon bei niedrigeren H_2O_2 -Konzentrationen inaktivieren ließ, weist auf die Bedeutung der Fenton-Reaktion hin. Offenbar wurden in diesem Versuchsansatz unter der katalysierenden Vermittlung der auf der Faseroberfläche befindlichen Fe^{2+} -Ionen aus H_2O_2 Hydroxylradikale gebildet, die das SOD-Enzym zu inaktivieren vermögen. Es ist daher zu vermuten, daß die erhöhten mRNA-Spiegel zwar zu einer Steigerung der SOD-Enzymmenge führten, daß diese sich aber - bedingt durch die oxidative Inaktivierung und die

begleitende Erhöhung des Enzymumsatzes - netto nicht bemerkbar macht. Schon seit Mitte der 70'er Jahre weiß man, daß reaktive Sauerstoffmetabolite SOD inaktivieren können, weswegen die Hypothese eines erhöhten Enzymumsatzes bei gleichzeitig erhöhter Enzymproduktion durchaus plausibel erscheint (13;81).

Eine andere Möglichkeit für diese Differenz wäre das Auftreten von Transkriptions- und/oder Translationsfehlern, die ein "Umschreiben" der genetischen Information in das aktive Enzym unterbinden würde. Die Enzymstruktur der durch interaktiv wirkende Dimere und deren Verbindungen sehr stabilen SOD ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD) ist insgesamt kompliziert. Die SOD besteht aus 8 antiparallelen β -Ketten, die einen abgeflachten und asymmetrischen Zylinder bilden. Schon ein durch Transkriptionsfehler hervorgerufener Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der SOD-Aminosäurenkette kann zu einer fehlerhaften räumlichen Strukturänderung und damit zur Funktionslosigkeit des Enzyms führen (170).

Wie unter 2.4.2 erwähnt, enthält das humane MnSOD-Gen mehrere Kopien von *consensus* Sequenzen, die für die Transkriptionsfaktoren AP-2, SP-1 (5'-*flanking* Region), und NF- κ B (Transkriptionsfaktor für den nukleären Faktor kappa B, lokalisiert auf der 3'-*flanking* Region) kodieren. Dadurch können auch Entzündungsmediatoren, wie Zytokine (insbesondere IL-1, TNF- α und IFN- γ) in die Regulation der SOD-Transkription eingreifen (174). Ein solcher Zusammenhang ist zwar nicht bei Staub-exponierten bronchoepithelialen Zellen, aber in Bezug auf die Steigerbarkeit von MnSOD bei mediatorgetriggerten Entzündungsprozessen beschrieben worden (71;71;104;151;173;178;183). So konnten Visner et al (1991) in den aus Pulmonalarterien des Schweins isolierten und *in vitro* kultivierten Endothelzellen die MnSOD mRNA-Menge durch Endotoxin, TNF- α und IL-1 β steigern (177). Ob dieser Aspekt bei *in vitro* durchgeführten Staubexpositionsuntersuchungen, die wie bei uns nur mit einer einzigen Zelllinie (ohne Kokulturen z.B. mit mediatorproduzierenden Phagozyten, bzw. ohne zusätzlichen Mediatorgaben) durchgeführt wurden, relevant ist, bleibt letztendlich unklar. Da auch bronchoepitheliale Zellen in der Lage sind, geringe Mediatormengen zu produzieren (TNF- α , IL-1 und IL-8) müßten in diesen nur mit einer einzigen Zelllinie durchgeführten Experimenten die bronchoepithelialen Zellen mit ihren eigenen Zytokinen die SOD-Expression steuern können, was nach derzeitigem Kenntnisstand spekulativ ist (114;146). Die erwähnte Versuchskombination Staub-exponierter Kokulturuntersuchungen ist bisher in der Literatur auch noch nicht beschrieben worden und fand als Erklärungsansatz daher nur

ansatzweise Beachtung (35;84;91;96). Möglicherweise liegt hier aber der Schlüssel zu der Beobachtung, daß im Tierexperiment die MnSOD mRNA-Spiegel mit den Aktivitätskonzentrationen korrelieren, in den Zellkulturen, die nur mit einer einzigen Zelllinie durchgeführt wurden, jedoch nicht.

Ein weiterer Aspekt der SOD-Genregulation ist die Abhängigkeit der SOD-Biosynthese vom zellulären Metallgehalt. So konnten Privalle und Fridovich (1992) an unter anaeroben Bedingungen kultivierten *Escherichia coli* demonstrieren, daß die Anreicherung des Wachstumsmediums mit zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) die zelluläre Synthese der MnSOD unterdrückt (135). Die Gabe von Mn^{2+} dagegen förderte unter diesen Bedingungen die bakterielle MnSOD-Bildung. Somit herrscht im intrazellulären Milieu ein die MnSOD-Bildung regulierender Wettbewerb: anaerobe Bedingungen fördern die Eisenbindung an das SOD-Molekül (und damit die Hemmung der MnSOD-Synthese), während umgekehrt aerobe Bedingungen die MnSOD-Bindung stimulieren. Die Autoren konstatierten somit insgesamt zwei regulative Mechanismen der MnSOD-Synthese, a) die Transkription (wie oben beschrieben), und b) die Abhängigkeit von den jeweiligen Kulturbedingungen (aerobe/anaerobe Bedingungen und Metallgehalt) (135). Ein ähnlicher Regelmechanismus wurde auch bei der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD beschrieben. In diätetisch kupferdefizienten Ratten war in bestimmten Organen (Leber, Herz und Gehirn) der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-Gehalt signifikant gegenüber den normal ernährten Ratten erniedrigt. Umgekehrt stieg bei niedrigen $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD-Werten die MnSOD-Spiegel konsekutiv an (101).

6.2.4 Gründe für die unterschiedlichen Staub-spezifischen Effekte

Stäube können durch chemische auf der Stauboberfläche ablaufende Prozesse reaktive Sauerstoffmetabolite bilden. Wie unter 2.4.1.1 schon erwähnt können auf der Oberfläche von Asbestfasern im Rahmen einer Redoxreaktion aus dem Superoxid-Anion (O_2^-) und dem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) das toxische $\text{OH}\cdot$ entstehen. Diese Reaktion wird durch Metalle (insbesondere durch Fe^{2+}) in der s.g. Fenton-Reaktion katalysiert. Dabei wird H_2O_2 über Fe^{2+} als Katalysator in der Fenton-Reaktion zu den toxischeren Sauerstoffradikalen $\text{OH}\cdot$ und OH^- abgebaut (Tab. 2). Es besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Eisengehalt (Fe^{2+}) und dem Ausmaß der durch die Radikalbildung induzierten Lipidperoxidation, die in isolierten Leber-Mitochondrien und Mikrosomen gemessen wurde (8;17;136). Nach einer Vorbehandlung mit Desferoxamin, einem Eisen-Chelator, hatte die Eisen- oder Krokydolith-Exposition einen deutlich geringeren zelltoxischen Effekt (54;120). Ebenso konnte die

Krokydolith-verursachte Apoptoserate durch die Bindung oberflächlicher Eisenionen reduziert werden (59). Ein weiteres Indiz für den prooxidativen Effekt von Eisenionen zeigt die Induzierbarkeit einer Lipidperoxidation durch Eisenoxide (z.B. Fe_3O_4) (118). Allerdings weisen andere Befunde daraufhin, daß neben den von den Fasern freigesetzten Eisenionen auch andere Faktoren (s.u.) für den beobachteten zytotoxischen Effekt verantwortlich zu machen sind, da Fasern wie z.B. das Chrysotil, die kaum oder kein Eisen enthalten, trotzdem eine zytotoxische Wirkung besitzen. Umgekehrt können bestimmte eisenhaltige Fasern deutlich weniger pathogen wirken, ein für die Beurteilung der Toxizität von MMMF wichtiger Aspekt (56).

Ein weiterer biologisch bedeutsamer Faktor ist neben der Faserchemie das Faserlängen/-breitenverhältnis. Mossman und Landesman untersuchten schon 1983, ob diesbezüglich in HTE-Zellen eine Beziehung zur Zytotoxizität feststellbar ist (117). Die Autorinnen verglichen (24 h Inkubation) dabei UICC-Krokydolith- mit Chrysotil-Asbest mit einer langen ($>10 \mu\text{m}$) und kurzen ($\leq 1 \mu\text{m}$) Faserpräparation. Die Zytotoxizität verhielt sich dabei wie folgt: lange Chrysotil- $>$ UICC-Krokydolith- $>$ kurze Chrysotilfasern (117).

Hart et al. untersuchten in einem *in vitro* Modell an CHO-Zellen (chinesische Hamstero-varienzellen = *chinese hamster ovary cells*) die zytotoxische Wirkung von in ihrer chemischen Zusammensetzung gleichen, jedoch in ihrer Fasergeometrie variierenden künstlichen und natürlichen Mineralfasern (Glas- und Mineralwollefasern, keramische Fasern, Chrysotil- und Krokydolithfasern) (72). Die künstlichen Mineralfasern - definiert als EC_{50} (Faserkonzentration/ cm^2 , bei der die Zellproliferation um 50 % gegenüber nicht-exponierten Kontrollen reduziert ist) - waren im Vergleich zum Chrysotil bzw. Krokydolith um den Faktor 10-50 weniger zelltoxisch. Bei der vergleichenden Exposition der Zellen mit Fasern mit jeweils gleicher EC_{50} Konzentration zeigte sich keine Abhängigkeit zur Faserdicke (untersuchtes Spektrum: $0,3 - 7 \mu\text{m}$), wohingegen mit zunehmender Faserlänge (bis zu $20 \mu\text{m}$) die Zytotoxizität exponentiell zunahm. Bei der Übertragung dieser Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse beim Menschen muß aber trotzdem auch der Faserdurchmesser Berücksichtigung finden. Durch einen dickeren Faserdurchmesser wird nämlich der (Ab-) Transport aus den Lungen verlangsamt, womit sich die Bioverfügbarkeit der jeweiligen Fasern verlängert (63).

Auch immunologische Prozesse scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. So regten z.B. die mit Immunglobulin G behandelten Chrysotil-Fasern Alveolarmakrophagen viel stärker zur Oxidantienproduktion und Zytokinfreisetzung an, als z.B. unbehandelte Fasern (35). Die Oberflächenladung von Partikeln wurde auch als eine für eine faserinduzierte proinflammatorische Wirkung bedeutsamer Faktor beschrieben (105).

Wir konnten zeigen, daß Quarz die Zelle zur MnSOD mRNA-Bildung anregt, was einen prooxidativen Effekt voraussetzen würde. Silizium und Silizium-Oxid können beide mit Wasser und Sauerstoffradikalen reagieren und hochtoxische Sauerstoffmetabolite bilden (z.B. OH[•], siehe Abb. 14) (176). SiO₂ ist z.B. in der Lage, Lipide zu oxidieren bzw. eine Lipidperoxidation zu initiieren (176). Ghio et al.

1. $\text{Si-O}\cdot + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiOH} + \text{OH}\cdot$
2. $\text{Si-O}\cdot + \text{OH}\cdot \rightarrow \text{SiOOH}$
3. $\text{SiOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiOH} + \text{H}_2\text{O}_2$
 - a) H_2O_2 mit Fe^{2+} in Fenton-Reaktion
 - b) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Si} \rightarrow \text{SiOH} + \cdot\text{OH}$

Abbildung 14: Mögliche Reaktionsschritte von Siliziumoxid mit Wasser zu Hydroxylradikalen (OH[•]) und H₂O₂. Reaktion von H₂O₂ mit Fe²⁺ in der Fenton-Reaktion bzw. auch mit Silizium zu $\cdot\text{OH}$ (3a, b)

(50) beschrieben, daß Fe³⁺ über die Bindung an Silizium-Gruppen auf der Oberfläche von amorphem Silikat an einem Elektronenaustausch teilnehmen kann. Als Resultat steht das so gebildete Fe²⁺ für die Fenton-Reaktion zur Verfügung. Über eine Silizium-Eisenverbindung kann auch körpereigenes Eisen absorbiert werden (66). Versuche an Schafen zeigten, daß auf der Partikeloberfläche von Siliziumoxid befindliche Eisenionen mit Aluminiumsalzen entfernt werden können. So konnten verschiedene inflammatorische Parameter in der BAL (Lactat-Dehydrogenase, Glykosaminoglykane, Lecithin, Phosphatidylglyzerol) und die Entwicklung einer histologisch nachweisbaren Silikose signifikant reduziert werden (40). Desweiteren können mit Silikaten inkubierte alveoläre Makrophagen Mediatoren wie TNF α freisetzen und damit sekundär die Oxidantienproduktion von Entzündungszellen induzieren. Die prooxidativen und damit pro-inflammatorischen Effekte erklären auch die durch Siliziumoxide in Epithelzellen nachgewiesenen Befunde von DNA-Brüchen (58;150).

Da viele künstliche Mineralfasern ebenfalls Silikate enthalten, wäre hier ein ähnlicher prooxidativer Mechanismus denkbar.

6.2.5 Physikalische und chemische Unterschiede zwischen Krokydolith, Quarz und Steinwolle

Der unterschiedliche Einfluß der hier untersuchten Stäube auf die SOD-Expression (bei gleichem experimentellen Modell) ist Ausdruck Staub-spezifischer Charakteristika: chemische Zusammensetzung, Geometrie (Längen-Breiten-Verhältnis), Oberflächenladung und Oberflächengröße (96;118). Hohe Staubkonzentrationen (insbesondere Krokydolith und Quarz) führten zu einer gesteigerten Zytotoxizität und damit zu einem Abfall der SOD-Werte. Da die als Kontrollsubstanz verwendeten Latexkügelchen und auch die Steinwolle in hohen Konzentrationen (bis $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) nicht zu einem SOD mRNA-Abfall führten, ist, basierend auf den oben aufgeführten möglichen Einflußgrößen, gegenüber Krokydolith und Quarz von einer geringeren bzw. fehlenden zellschädigenden und/oder prooxidativen Wirkung auszugehen. Das bei Steinwolle geringe prooxidative Potential bestätigen auch andere an zellfreien Systemen durchgeführten Studien (79).

Eine weit wichtigerer Aspekt ist die Frage, ob sich die *in vitro* beobachteten Phänome auch auf die *in vivo* Situation übertragen lassen.

6.3 In vivo Untersuchungen

Neben Stäuben werden bronchiale Entzündungszellen von inhalierten Partikel organischen oder anorganischen Ursprungs, Organismen, verschiedenen Gasen (inkl. hohen Sauerstoffkonzentrationen, Ozon, Stickoxiden etc.) und im Rahmen von pulmonalen Entzündungsprozessen aktiviert (20;51;63;76;87). Diese Zellaktivierung impliziert auch eine erhöhte Oxidantienbelastung, vor der sich insbesondere bronchoepitheliale Zellen durch die Bereitstellung von Antioxidantien schützen müssen (20;23;51;76). Wir stellten uns auch die Frage, ob die *in vitro* unter streng definierten Expositionsbedingungen gewonnenen Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragbar sind, bei der andere zusätzliche Expositionen (insbesondere Zigarettenrauch) pathophysiologisch bedeutsam sein können. Dazu quantifizierten wir die MnSOD (mRNA-Spiegel, Aktivität, Enzymkonzentration) in der mittels Biopsien gewonnenen Bronchialschleimhaut und führten außerdem eine Gewebelokalisation des Enzyms und der MnSOD mRNA durch. Auf die Quantifizierung der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD wurde auf Grund der fehlenden Reaktion im *in vitro* Versuchsansatz und wegen des vor diesem Hintergrund nicht gerechtfertigten hohen zusätzlichen Aufwands verzichtet. Für die Durchführung der *in vivo* Untersuchungen wurden Probanden mit nachgewiesener Asbest- oder Quarzmischstaub-Exposition bzw. nicht Staub-exponierte

Freiwillige rekrutiert. Eine weitere Gruppenunterscheidung bildete der Zigarettenkonsum, da Zigarettenrauch ein stark prooxidatives Wirkungspotential besitzt (25;106;129;138).

An wesentlichen Ergebnissen fanden wir:

- a) Ein Asbest- oder Quarzmischstaub-bedingter Anstieg der MnSOD mRNA-Konzentrationen in den Bronchialschleimhautbiopsien mußte basierend auf unseren Ergebnissen ausgeschlossen werden.
- b) Eine hochsignifikante Beziehung einer MnSOD mRNA-Erhöhung fand sich nur in der Korrelation zum Zigarettenkonsum. Die Gruppe der Raucher hatte im Mittel gegenüber den Nichtrauchern eine erhöhte MnSOD mRNA-Konzentration.
- c) Erwartungsgemäß wurde insbesondere in den als Barriere zur Außenwelt fungierenden bronchoepithelialen Zellen (siehe Abschnitt 0) und weniger in dem subepithelial gelegenen Gewebe MnSOD mRNA und das MnSOD-Enzym nachgewiesen.
- d) Ein signifikanter SOD-Enzym- und Aktivitätsanstieg fand sich im Gegensatz zu dem mRNA-Verhalten bei den Rauchern überraschenderweise nicht.

ad a)

Der fehlende Anstieg steht nur vordergründig in einem gewissen Widerspruch zu den an Tieren durchgeführten Untersuchungen, in denen nämlich eine Staub-induzierbare pulmonale MnSOD-Induktion durchaus nachgewiesen werden konnte (36;84;89;92). Verschiedene Aspekte sind dabei zu berücksichtigen: Im Tierversuch sind aufgrund der definierten Bedingungen Störfaktoren ausgeschlossen, die dort applizierte Staubkonzentration ist höher und kürzer (Monate) als beim Menschen (jahr- oder jahrzehntelange Exposition), zudem bezieht sich die Evaluation der Ergebnisse (Northern-Blot- und Western-Blot-Analysen) meistens nicht auf das Bronchialepithel, sondern auf die bei diesen Tieren post mortem explantierte und in toto analysierte Lunge.

Es gibt aber Hinweise *in vivo*, daß Asbest-exponierte Arbeiter einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind. Kamal et al (1992) konnten im Plasma von 97 Asbestarbeitern gegenüber der gesunden und nicht exponierten Kontrollgruppe (n=42) eine Erhöhung der SOD-Aktivitätsspiegel und der Malondialdehydkonzentrationen (MDA) nachweisen (94). MDA gilt als Indikator einer erhöhten Lipidperoxidation. Eine Beziehung zum Ausmaß der

Asbest-vermittelten Erkrankungen (Asbestose, Pleuraplaques) zu den SOD- und MDA-Werten fanden die Autoren allerdings nicht.

Möglicherweise bilden Stäube *in vivo* einen geringeren Reiz, als es unter *in vitro* Bedingungen (wie hier vorgestellt) möglich ist. Diese Hypothese wird auch durch Untersuchungen *in vitro* gestützt. Gute zelluläre, die zelluläre antioxidative Antwort stimulierende Reize sind Oxidantien selbst. Shull et al dokumentierten in tracheobronchialen Zellen nach H₂O₂-Exposition ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) eine dreifache Steigerung der Katalasen mRNA-Spiegel, weniger deutlich auch eine MnSOD und Glutathionperoxidasen mRNA-Steigerung mit einem Maximum nach 24 h (159). O₂⁻ führte dagegen in HAL-Zellen bis zu einer fünffachen MnSOD-Steigerung, die wesentlich stärker als die nach Krokydolithexposition war. Auch in HMC-Zellen konnte mit O₂⁻ gegenüber Krokydolith eine stärkere MnSOD-Induktion erzielt werden (91).

ad b)

Die stark prooxidative Wirkung jahrzehntelanger Zigarettenrauchexposition ist seit langem bekannt. Zigarettenrauch führt nicht nur zu einer Aktivierung von Alveolarmakrophagen und Granulozyten, sondern induziert auch eine Steigerung der Glutathionsynthese (4;5;62;64;82;107;138). Unsere mittels RT-PCR gewonnen Ergebnisse stehen in einem sehr guten Zusammenhang mit diesen in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen. Das Bronchialepithel ist somit auch durch eine gesteigerte MnSOD-Expression in der Lage sich vor a) den im Zigarettenrauch enthaltenen reaktiven Sauerstoffmetaboliten, aber b) auch vor den sich im Bronchiallumen befindlichen aktivierten Entzündungszellen und sekundär von ihnen freigesetzten Oxidantien zu schützen. Ähnliche Untersuchungen an der Lunge sonst gesunder Raucher ist in der Literatur verständlicherweise (hoher apparativer und personeller Aufwand) sehr rar. Su et al publizierten 1997 eine Sammelkasuistik. An 4 Rauchern, die sich eines pulmonal-chirurgischen Eingriffes unterziehen mußten (Diagnosen: Abklärung und Therapie eines intrapulmonalen Rundherdes), wurden im gesunden Lungengewebe die extrazelluläre SOD mittels In-situ-Hybridisierung, RT-PCR/Southern Blot-Analysen und Immunhistochemie detektiert. Auch hier waren insbesondere die Alveolar-Typ II-Zellen und bronchoepithelialen Zellen, nicht jedoch z.B. Alveolarmakrophagen SOD-positiv (168). Einen Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern errechnete sich allerdings aus methodischen Gründen (n=4) nicht. Erzurum et al (1993) untersuchten zwar nur Nichtraucher,

exponierten diese aber 12-18 h mit 100% O₂ (nasale Applikation). Diese Arbeitsgruppe fand keine Steigerung der MnSOD, Cu²⁺/Zn²⁺ SOD und Katalase-Genexpression in den mittels Bronchialbürstungen gewonnenen bronchoepithelialen Zellen (43). Die Autoren begründeten dieses Ergebnis mit der im Vergleich zu Zigarettenrauchern nur sehr kurzen Inkubationszeit und der Unfähigkeit bronchoepithelialer Zellen, sich an die sauerstoffreiche Situation schnell anpassen zu können, denn in tierexperimentellen Studien korrelierte die verbesserte O₂ – Toleranz mit zunehmender Expression antioxidativer Enzyme gut (73). Außerdem ist das Lungengewebe von verschiedenen Species inkl. Primaten sehr wohl in der Lage, die genannten antioxidativen Enzyme nach einer >24-stündigen und fraktionierten O₂ –Exposition heraufzuregulieren (73;93;166).

Welche Faktoren im Zigarettenrauch besonders prooxidativ wirken, bleibt spekulativ, da im Zigarettenrauch über 4000 Einzelsubstanzen enthalten sind (25). Es gibt aber Hinweise, daß im inhalierten Teer stark oxidierende Bestandteile, die auch DNA-Strangbrüche verursachen können, enthalten sind (165). Andere Substanzen, wie z.B. das aus Stickstoffmonoxid und O₂⁻ gebildete (Reaktionskonstante: k=6,7 x 10⁹) extrem reaktive Peroxinitrit erhöhen ebenfalls die Belastung der Lunge von Rauchern mit Sauerstoffradikalen (57;80;154).

ad c)

Unsere an den Probanden mittels Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung gewonnenen Ergebnisse stehen in einem sehr guten Einklang mit der Hypothese der auch im Hinblick auf die antioxidative Abwehr wichtigen Barrierefunktion bronchoepithelialer Zellen. Damit konnten wir die Ergebnisse andere Arbeitsgruppen bestätigen (siehe auch Ausführungen in den Abschnitten 0 und 6.3/ad b) (168).

ad d)

Die scheinbare Diskrepanz zwischen den bei Rauchern hohen MnSOD mRNA-, aber gegenüber der nichtrauchenden Gruppe unveränderten SOD-Aktivitäts- und Enzymspiegeln wurde schon eingehend diskutiert (siehe 6.2.3). Demnach müssen die gleichen Möglichkeiten für diese auch *in vitro* nachzuweisende Diskrepanz in Betracht gezogen werden.

6.4 Resumé

In dieser *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Studie ergeben sich folgende Kernaussagen:

- Die getesteten Stäube lösen in bronchoepithelialen Zellen eine unterschiedliche Antwort auf die zelleigene antioxidative Enzymreaktion aus, wobei sich deren Wirkungsstärke wie folgt staffelt: Krokydolith > Quarz > Steinwolle
- Steinwolle ist von den getesteten Stäuben als Vertreter der künstlichen Mineralfasern am wenigsten zytotoxisch (siehe insbesondere unseren PUG-Bericht 1996, PUG LUVA 95 006).
- Die direkte Übertragbarkeit der *in vitro* erhobenen Ergebnisse auf die Situation beim Menschen wird durch die fehlenden Unterschiede zwischen Staub-exponierten Probanden und Nichtrauchern relativiert.
- Im Gegensatz zu einer Asbest- oder Quarzmischstaub-Exposition führt Zigarettenrauch zu einer ausgeprägten antioxidativen Reaktion.
- Die Barrierefunktion bronchoepithelialer Zellen wird auch in Hinblick auf die in der Lunge wichtige antioxidative Abwehrfunktion bestätigt.

7 Literatur

1. Abramson SL, Malech HL, Galin JI. Neutrophils. In: Crystal RG, West JB, eds. The lung, scientific foundation. New York: Raven Press, 1991:553-563.
2. Adler KB, Fischer BM, Wright DT, Cohn LA, Becker S. Interactions between respiratory epithelial cells and cytokines: relationships to lung inflammation. In: Boland BM, Cullinan J, Rogers T, eds. Cells and cytokines in lung inflammation. New York: The New York Academy of Sciences, 1994:128-145.
3. American Thoracic Society. Adverse effects of crystalline silica exposure. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1997;155:761-765.
4. Anderson R, Theron AJ, Ras GJ. Regulation by the antioxidants ascorbate, cysteine, and dapsone of the increased extracellular and intracellular generation of reactive oxidants by activated phagocytes from cigarette smokers. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1987;135:1027-1032.
5. Anderson R, Theron AJ, Richards GA, Myer MS, van Rensburg AJ. Passive smoking by humans sensitizes circulating neutrophils. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1991;144:570-574.
6. Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic.Biol.Med.* 1996;20:675-705.
7. Auwerx JH, Chait A, Wolfbauer G, Deeb SS. Loss of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in differentiated cells of myelo-monocytic origin. *Blood* 1989;74:1807-1810.
8. Bacon BR, O'Neill R, Park CH. Iron-induced peroxidative injury to isolated rat hepatic mitochondria. *J.Free Radicals Biol.Med.* 1986;2:339-347.
9. Becklake MR. Occupational exposures: evidence for a causal association with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989;140:S85-S91
10. Bernstein DM. An evaluation of the use of an inhalation model versus intraperitoneal injection model of the assessment in rats of the carcinogenicity of natural and man-made vitreous fibres. *Zbl.Arbeitsmed.* 1993;43:120-128.
11. Bignon J, Brochard P, Brown R, Davis JMG, Vu V, Gibbs G, Greim M, Oberdörster G, Sébastien P. Assessment of the toxicity of man-made fibres. A final report of a workshop held in Paris, France, 3-4 February 1994. *Ann.Occup.Hyg.* 1995;39:89-106.
12. Boveris A, Cadenas E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch LB, Massaro DJ, eds. Oxygen, gene expression, and cellular function. New York: Marcel Dekker Inc., 1997:1-25.
13. Bray RC, Cockle SA, Fielden EM, Roberts PB, Rotilio G, Calabrese L. Reduction of inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem.J.* 1974;139:43-48.

14. Brody AR. Asbestos-induced lung disease. *Environ.Health Perspect.* 1993;100:21-30.
15. Brody AR. Pleural disease. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995;12:579-580.
16. Brown RC, Hoskins JA, Miller K, Mossman BT. Pathogenetic mechanisms of asbestos and other mineral fibers. *Molec.Aspects Med.* 1990;11:325-349.
17. Browne K. Asbestos-related disorders. In: Parkes WR, ed. *Occupational lung disorders.* 3 Ed. Oxford/UK: Butterworth-Heinemann, Linacre House, Jordan Hill, 1994:411-504.
18. Buhl R. Oxidantien und Antioxidantien in der Lunge im Fenster der bronchoalveolären Lavage. *Atemw.Lungenkrkh.* 1994;20:127-130.
19. Buhl R, Stahl E, Meier-Sydow J. In vivo assessment of pulmonary oxidant damage: the role of bronchoalveolar lavage. *Monaldi Arch.Chest Dis.* 1994;49:1-8.
20. Buhl R, Vogelmeier C. Therapie von Lungenkrankheiten mit Antioxidantien. *Pneumologie* 1994;48:50-56.
21. Cantin A, Hubbard RC, Crystal RG. Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989;139:370-372.
22. Cantin AM, Crystal RG. Oxidants, antioxidants, and the pathogenesis of emphysema. *Eur.J.Respir.Dis.* 1985;66(suppl. 139):7-17.
23. Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J.Clin.Invest.* 1990;86:962-971.
24. Chromczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 1987;162:156-159.
25. Church DF, Pryor WA. The oxidative stress placed on the lung by cigarette smoke. In: Crystal RG, West JB, eds. *The lung scientific foundation.* New York: Raven Press, 1991:1975-1979.
26. Church T, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ.Health Perspect.* 1985;64:111-126.
27. Churg A. The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cells. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1996;154:1124-1140.
28. Clark NE, Verma DK, Julian JA. Determination of the variability in elemental composition of asbestos fibres by analytical transmission electron microscopy. *Ann.Occup.Hyg.* 1995;39:79-88.
29. Costabel U. Methode und Technik der bronchoalveolären Lavage. *Prax.Klin.Pneumol.* 1988;42:218-221.
30. Costabel U. Bronchoalveoläre Lavage. *Pneumologische Akzente* 1992;31:1-6.

31. Crapo JD, Barry BE, Gehr P. Cell number and cell characterization of the normal human lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1982;126:332-337.
32. Crystal RG, Ferrans VJ, Basset G. Biologic basis of pulmonary fibrosis. In: Crystal RG, West JB, eds. *The lung*. New York: Raven Press, 1991:2031-2046.
33. Daniel LN, Mao Y, Vallyathan V, Saffiotti U. Binding of the cationic dye, Janus Green B, as a measure of the specific surface area of crystalline silica in aqueous suspension. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;123:62-67.
34. De Vuyst P, Dumortier P, Swaen GMH, Pairon JC, Brochard P. Respiratory health effects of man-made vitreous (mineral) fibres. *Eur.Respir.J.* 1995;8:2149-2173.
35. Donaldson K, Brown RC, Brown GM. Respirable industrial fibres: mechanisms of pathogenicity. *Thorax* 1993;48:390-395.
36. Dong H, Buard A, Renier A, Jaurand J. Role of oxygen derivatives in the cytotoxicity and DNA damage produced by asbestos on rat pleural mesothelial cells in vitro. *Carcinogenesis* 1994;15:1251-1255.
37. Döring G, Worlitzsch D. Reaktive Sauerstoffverbindungen und Arachidonsäuremetaboliten polymorphokerniger Leukozyten. *Immunobiology* 1995;23:148-157.
38. Draeger U. Stand der Bewertung von Steinwolle-Dämmstofffasern. *Zbl.Arbeitsmed.* 1997;47:435-442.
39. Drexel G, Francks HP, Plinske W, Butz M. BK-DOK Dokumentation des Berufskrankheiten-Geschehens in der Bundesrepublik Deutschland '90. Sankt Augustin: HVBG, Abt. Öffentlichkeitsarbeit, 1992:
40. DuBois R, Begin R, Cantin A, Massé S, Martel M, Bilodeau G, Dufresne A, Perreault G, Sébastien P. Aluminium inhalation reduces silicosis in a sheep model. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1988;137:1172-1179.
41. Engholm G, Englund A, Fletcher AC, Hallin N. Respiratory cancer incidence in Swedish construction workers exposed to man-made mineral fibers and asbestos. *Ann.Occup.Hyg.* 1987;31:663-675.
42. Enterline PE, Marsh GM, Henderson V, Callahan C. Mortality update of a cohort of U.S. man-made-mineral fibre workers. *Ann.Occup.Hyg.* 1987;31:625-656.
43. Erzurum SC, Danel C, Gillissen A, Chu S-C, Trapnell BC, Crystal RG. In vivo antioxidant gene expression in human airway epithelium of normal individuals exposed to 100% O₂. *J.Appl.Physiol.* 1993;75(3):1256-1262.
44. Fitch WM, Ayala FJ. The superoxide dismutase molecular clock revisited. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994;91:6802-6807.
45. Fung H, Kow YW, Van Houthen B, Taatjes DJ, Hatahet Z, Janssen YMW, Vacek P, Faux SP, Mossman BT. Asbestos increases mammalian AP-endonuclease gene

- expression, protein levels, and enzyme activity in mesothelial cells. *Cancer Res.* 1998;58:189-194.
46. Garcia JGN, Dodson RF, Callahan KS. Asbestos-induced endothelial cell activation and injury. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1988;138:958-964.
 47. Garcia JGN, Dodson RF, Callahan KS. Effect of environmental particulates on cultured human and bovine endothelium. *Lab.Invest.* 1989;61:53-61.
 48. Gercken, G., Berg, I., and Schlüter, T. Staubinduzierte Stimulation von Alveolarmakrophagen zur Bildung aktiver Sauerstoffspezies. Projekt Umwelt und Gesundheit (PUG) im Kernforschungszentrum Karlsruhe. KfK-PUG 7. 1992. Karlsruhe, Kernforschungszentrum Karlsruhe. (GENERIC)
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
 49. Ghio AJ, Kenedy TP, Stonehuerner JG, Crumbliss A, Hoidal J. DNA strand breaks following in vitro exposure to asbestos increase with surface- complexed Fe⁺⁺⁺. *Archives Biochem.Biophys.* 1994;311:13-18.
 50. Ghio AJ, Kennedy TP, Schapira RM, Crumbliss AL, Hoidal JR. Hypothesis: is lung disease after silicate inhalation caused by oxidant generation ? *Lancet* 1990;336:967-969.
 51. Gillissen A. Oxidantien und der protektive Effekt von Glutathion. *Atemw.-Lungenkrkh.* 1993;19:225-231.
 52. Gillissen A. Die Rolle von Sauerstoffradikalen bei pulmonalen Entzündungsprozessen - antioxidative Therapieansätze. *Lunge und Atmung* 1996;22:17-19.
 53. Gillissen A, Bartling A, Rasche K. Bronchoalveoläre Lavage. Durchführung - Indikation - Befundinterpretation - Kosten. *Der Klinikarzt* 1996;26:50-56.
 54. Gillissen A, Jaworska M, Löseke S, Neumeister W, Rasche K, Schmitz I, Schultze-Werninghaus G. Die Abhängigkeit der krokydolithasbestinduzierten Zytotoxizität vom intrazellulären Glutathiongehalt bronchoepithelialer Zellen. *Pneumologie* 1997;51:941-948.
 55. Gillissen A, Jaworska M, Schultze-Werninghaus G. Künstliche Mineralfasern - so gefährlich wie Asbest ? *Umweltforschung* 1995;7:
 56. Gillissen A, Jaworska M, Wickenburg D, Schultze-Werninghaus G. Oxidantienmetabolismus und anti-oxidative Schutzmechanismen in staubbelasteten humanen Lungenzellen. Karlsruhe: Projekt für Umwelt und Gesundheit im Forschungszentrum Karlsruhe, 1996:
 57. Gillissen A, Löseke S, Hippeli S, Jaworska M. Nitric oxide synthase gene expression in the bronchial epithelium. *Current Pneumology* 1997;1:20-30.
 58. Gillissen A, Montalván-Dobmayr S, Höfken G, Fissel-Eckhoff A, Schultze-Werninghaus G. Apoptotic DNA strand breaks in bronchial epithelial cells after exposure to natural and man made mineral fibers. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1996;153:A301(Abstract)

59. Gillissen A, Montalván-Dobmayr S, Wickenburg D, Schärling B, Schultze-Werninghaus G. Apoptotic DNA-strand breaks in bronchoepithelial cells due to prooxidative function of crocidolite. *Eur.Respir.J.* 1996;9:114S(Abstract)
60. Gillissen A, Rasche B, Hoffarth HP, Reichel G. Verhalten der Immunglobuline und Proteaseninhibitoren bei Asbestose. In: Meyer-Falcke A, Jansen G, eds. *Arbeitsmedizin Schwerpunkte medizinischer Prävention - Chance für den arbeitenden Menschen. Arbeitsmedizinischen Kolloquium der gewerblichen Berufsgenossenschaften. 29. Jahrestagung in Düsseldorf vom 26. bis 29. April 1989.* Stuttgart: Gentner Verlag, 1989:493-496.
61. Gillissen A, Roum JH, Hoyt RF, Crystal RG. Augmentation of respiratory epithelial lining fluid antioxidant screen by aerosolization of recombinant human Cu⁺⁺/Zn⁺⁺ superoxide dismutase. *Chest* 1993;104:811-815.
62. Gillissen A, Schwarz S, Schärling B, Duchna H-W, Schmalz O, Schultze-Werninghaus G. Die Oxidantien-/Antioxidantien-Imbalance in den Atemwegen von beatmeten Intensivpatienten. *Pneumologie* 1998;52:S11(Abstract)
63. Gillissen A, Wiethage T. Zelluläre Reaktionen auf Mineralfasern. *Pneumologie* 1996;50:5-17.
64. Greening AP, Lowrie DB. Extracellular release of hydrogen peroxide by human alveolar macrophages: the relationship to cigarette smoking and lower respiratory tract infections. *Clin.Science* 1983;65:661-664.
65. Gruber UF. Erzeugen Mineralwolle-Dämmstoffe beim Menschen Krebs ? *Zbl.Arbeitsmed.* 1992;42:236-240.
66. Guest L. The endogenous iron content, by Mossbauer spectroscopy, of human lungs: lungs from various occupational groups. *Ann.Occup.Hyg.* 1978;151-157.
67. Gutteridge JM, Quinlan GJ, Mumby S, Heath A, Evans TW. Primary plasma antioxidants in adult respiratory distress syndrome patients: changes in iron-oxidizing, iron-binding, and free radical-scavenging proteins. *J.Lab.Clin.Med.* 1994;124:263-273.
68. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am.J.Med.* 1991;91:3C-14S-3C-22S.
69. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 2 Ed. Oxford: Clarendon Press, 1989:
70. Hansen K, Mossman BT. Generation of superoxide (O₂⁻) from alveolar macrophages exposed to asbestiform and nonfibrous particles. *Cancer Res.* 1987;47:1681-1686.
71. Harris CA, Derbin KS, Hunte-McDonough B, Krauss MR, Chen KT, Smith DM, Epstein LB. Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J.Immunol.* 1991;147:149-154.

72. Hart GA, Kathman LM, Hesterberg TW. In vitro cytotoxicity of asbestos, and man-made vitreous fibers: Roles of fiber length, diameter and composition. *Carcinogenesis* 1994;15:971-977.
73. Hass MA, Igbal J, Clerich LB, Frank L, Massaro D. Rat lung Cu,Zn superoxide dismutase. Isolation and sequence of a full-length cDNA and studies of enzyme induction. *J.Clin.Invest.* 1989;83:1241-1246.
74. Hassan HM. Cytotoxicity of oxyradicals and the evolution of superoxide dismutases. In: Clerch LB, Massaro AF, eds. *Oxygen, gene expression, and cellular function*. New York: Marcel Dekker Inc., 1997:27-47.
75. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989;140:531-554.
76. Heffner JE, Repine JE. Antioxidants in the lung. In: Crystal RG, West JB, eds. *The lung, scientific foundation*. New York: Raven Press, 1991:1811-1820.
77. Heppleston AG. Pulmonary toxicology of silica, coal and asbestos. *Environ.Health Perspect.* 1984;55:11-127.
78. Hill IM, Beswick PH, Donaldson K. Differential release of superoxide anions by macrophages treated with long and short fibre amosite asbestos is a consequence of differential affinity of opsonin. *Occup.Environ.Med.* 1995;52:92-96.
79. Hippeli S, Dornisch K, Kaiser S, Drager U, Elstner EF. Biological durability and oxidative potential of a stonewool mineral fibre compared to crocidolite asbestos fibres. *Arch.Toxicol.* 1997;71:532-535.
80. Hippeli S, Elstner EF. OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical- and peroxy nitrite-toxicity. *Z.Naturforsch.* 1997;52:564-570.
81. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochem.* 1975;14:5294-5299.
82. Hoidal JR, Fox RB, LeMarbe PA, Perri R, Repine JE. Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1981;123:85-89.
83. Holian A, Kelley K, Hamilton Jr. RF. Mechanisms associated with human alveolar macrophage stimulation by particulates. *Environ.Health Perspect.* 1994;102:69-74.
84. Holley JA, Janssen YMW, Mossman BT, Taatjes D. Increased manganese superoxide dismutase protein in type II epithelial cells of rat lung after inhalation of crocidolite asbestos or cristobalite silica. *Am.J.Pathol.* 1992;141:475-485.
85. Hughes JM, Jones RN, Glindmeyer HW, Hammad YY, Weill H. Follow up study of workers exposed to man made mineral fibres. *Brit.J.Ind.Med.* 1987;50:658-667.

86. Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction: accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1983;128:833-838.
87. Ishizaki T, Yano E, Urano N, Evans PH. Crocidolite-induced reactive oxygen metabolites generation from human polymorphonuclear leukocytes. *Environmental Research* 1994;66:208-216.
88. Izokun-Etiobhio BO, Oraedu ACI, Ugochukwu EN. A comparative study of superoxide dismutase in various animal species. *Comp.Biochem.Physiol.* 1990;95B:521-523.
89. Janssen YM, Marsh JP, Driscoll KE, Borm PJ, Oberdorster G, Mossman BT. Increased expression of manganese-containing superoxide dismutase in rat lungs after inhalation of inflammatory and fibrogenic minerals. *Free Radic.Biol.Med.* 1994;16:315-322.
90. Janssen YMW, Heintz NH, Mossman BT. Induction of c-fos and c-jun proto-oncogene expression by asbestos is ameliorated by N-acetyl-L-cysteine in mesothelial cells. *Cancer Res.* 1995;55:2085-2089.
91. Janssen YMW, Marsh JP, Absher MP, Gabrielson E, Borm PJA, Driscoll K, Mossman BT. Oxidant stress responses in human pleural mesothelial cells exposed to asbestos. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1994;149:795-802.
92. Janssen YMW, Marsh JP, Absher MP, Hemenway D, Vacek PM, Leslie KO, Borm PJA, Mossman BT. Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. *J.Biol.Chem.* 1992;267:10625-10630.
93. Jornot L, Junod AF. Response of human endothelial cell antioxidant enzymes to hyperoxia. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1992;6:107-115.
94. Kamal AA, el-Khafif M, Koraah S, Massoud A, Caillard JF. The blood superoxide dismutase and plasma malondialdehyde among workers exposed to asbestos. *Am.J.Ind.Med.* 1992;21:353-361.
95. Kamp DW, Dunne M, Weitzman SA, Dunn MM. The interaction of asbestos and neutrophils injures cultured human pulmonary epithelial cells: role of hydrogen peroxide. *J.Lab.Clin.Med.* 1989;114:604-612.
96. Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic.Biol.Med.* 1992;12:293-315.
97. Kamp DW, Israbian VA, Preusen SE, Zhang CX, Weitzman SA. Asbestos causes DNA strand breaks in cultured pulmonary epithelial cells: role of iron-catalyzed free radicals. *Am.J.Physiol.* 1995;268:L471-L480
98. Kerppola T, Curran T. Transcription - Zen and the art of Fos and Jun. *Nature* 1995;373:199-200.
99. Kinnula VL, Yankaskas JR, Chang L, Virtanen I, Linnala A, Kang BH, Crapo JD. Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have

- significant antioxidative capacity in vitro. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1994;11:568-576.
100. Kuwahara M, Verma K, Ando T, Hemenway DR, Kagan E. Asbestos exposure stimulates pleural mesothelial cells to secrete the fibroblast chemoattractant, fibronectin. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1993;10:167-176.
 101. Lai CC, Huang WH, Askari A, Wang Y, Sarvazyan N, Klevay LM, Chiu TH. Differential regulation of superoxide dismutase in copper-deficient rat organs. *Free Radic.Biol.Med.* 1994;16:613-620.
 102. Lambert ND, Mao Y, Vallyathan V, Saffiotti U. Binding of the cationic dye, Janus Green B, as a measure of the specific surface area of crystalline silica in aqueous suspension. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;123:62-67.
 103. Laurent T, Markert M, Feihl F, Schaller MD, Perret C. Oxidant-antioxidant balance in granulocytes during ARDS. Effect of N-acetylcysteine. *Chest* 1996;109:163-166.
 104. Lee CY, Pastore JN, Tang G, Tsan M-T. Cellular distribution of pulmonary Mn and CuZn superoxid dismutase: effect of hyperoxia and interleukin-1. *J.Histochem.Cytochem.* 1994;42:1201-1205.
 105. Light W, Wei ET. Surface charge and asbestos toxicity. *Nature* 1978;265:537-538.
 106. Linden M, Hakansson L, Ohlsson K, Sjödin K, Tegner H, Tunek A, Venge P. Glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from smokers is related to humoral markers of inflammatory cell activity. *Inflammation* 1989;13(6):651-658.
 107. MacNee W, Bridgeman MME, Marsden M, Drost E, Lannan S, Selby C, Donaldson K. The effect of n-acetylcysteine and glutathione on smoke-induced changes in lung phagocytes and epithelial cells. *Am.J.Med.* 1991;91:3C-60S-3C66S.
 108. Marklund S. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem.J.* 1984;222:649-655.
 109. Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem.J.* 1990;266:213-219.
 110. Marks-Konczalik J, Gillissen A, Jaworska M, Löseke S, Voss B, Fissel-Eckhoff A, Schmitz I, Schultze-Werninghaus G. Induction of manganese superoxide dismutase gene expression in bronchoepithelial cells after rockwool exposure. *Lung* 1998;176:165-180.
 111. Martin LD, Rochelle LG, Fischer BM, Krunkosky TM, Adler KB. Airway epithelium as an effector of inflammation: molecular regulation of secondary mediators. *Eur.Respir.J.* 1997;10:2139-2146.
 112. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein). *J.Biol.Chem.* 1969;244:6049-6055.

113. McDonald JC, Case BW, Enterline PE, Henderson V, McDonald AD, Plourde M, Sébastien P. Lung dust analysis in the assessment of past exposure of man-made-mineral fibre workers. *Ann.Occup.Hyg.* 1987;31:625-656.
114. Meidenbauer N, Kühnlein T, Kuttler E, Gillissen A, Hahn EG, Siegfried W. Human airway epithelial cells secrete interleukin-8 predominantly to the basolateral side after stimulation with TNF- α . *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1994;149:A983(Abstract)
115. Meyrick B, Magnuson MA. Identification and functional characterization of the bovine manganous superoxide dismutase promoter. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1994;10:113-121.
116. Mohrmann W. Asbestosen - Pneumokoniosen durch künstliche Mineralfasern ? In: Nolte D, ed. *Arbeitsmedizinisches Kolloquium Bad Reichenhall 1993. Beruflich bedingte Lungenfibrosen.* Würzburg: Berufsgenossenschaft der keramischen und Glas-Industrie, 1993:43-75.
117. Mossman BT, Landesman JM. Importance of oxygen free radicals in asbestos-induced injury to airway epithelial cells. *Chest* 1983;83:50S-51S.
118. Mossman BT, Marsh JP. Evidence supporting a role for active oxygen species in asbestos-induced toxicity and lung disease. *Environ.Health Perspect.* 1989;81:91-94.
119. Mossman BT, Marsh JP, Sesko A, Hill S, Shatos MA, Doherty J, Petruska J, Adler KB, Hemenway RM, Vacek P, Kagan E. Inhibition of lung injury, inflammation, and interstitial pulmonary fibrosis by polyethylene glycol-conjugated catalase in a rapid inhalation model of asbestosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1990;141:1266-1271.
120. Mossman BT, Marsh JP, Shatos MA. Alteration of superoxide dismutase activity in tracheal epithelial cells by asbestos and inhibition of cytotoxicity by antioxidants. *Lab.Invest.* 1986;54:204-212.
121. Moyer VD, Cistulli CA, Vaslet CA, Kane AB. Oxygen radicals and asbestos carcinogenesis. *Environ.Health Perspect.* 1994;102:131-136.
122. Muhle H, Bellmann B. Biopersistence of man-made vitreous fibres. *Ann occup Hyg* 1995;39:655-660.
123. Muhle H, Pott F, Bellmann B, Takenaka S, Ziem U. Inhalation and injection experiments in rats to test the carcinogenicity of MMMF. *Ann.Occup.Hyg.* 1987;31(4B):755-764.
124. Muizelaar JP, Marmarou A, Young HF, Choi SC, Wolf A, Schneider RL, Kontos HA. Improving the outcome of severe head injury with the oxygen radical scavenger polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase. *J.Neurosurg.* 1993;78:375-382.
125. Munim A, Asayama K, Dobashi K, Suzuki K, Kawaoi A, Kato M. Immunohistochemical localization of superoxide dismutases in fetal and neonatal rat tissues. *J.Histochem.Cytochem.* 1992;40:1705-1713.
126. Müller K-M, Respondek M, Wiethage Th. Pulmonale Reaktionsmuster auf künstliche Mineralfasern. In: *Projekt Umwelt und Gesundheit (PUG) im Kernforschungszentrum*

- Karlsruhe, ed. 3. Statuskolloquium des PUG. 3 Ed. Karlsruhe/Germany: Projekt für Umwelt und Gesundheit (PUG) im Kernforschungszentrum Karlsruhe, 1994:253-262.
127. Nies E. In-vitro-Verfahren als Beitrag zur Abschätzung des Mineralfaser-Krebsrisikos. Staub-Reinhaltung der Luft 1995;55:1-6.
 128. Nowak D. Bronchialkarzinom durch genetische und Umweltfaktoren: Genetische Faktoren. Pneumologie 1994;48:526-528.
 129. Ogushi F, Hubbard RC, Fells GA, Crystal RG. Risk factors for emphysema: cigarette smoking is associated with a reduction in the association rate constant of lung α_1 -antitrypsin for neutrophil elastase. J.Clin.Invest. 1991;87:1060-1065.
 130. Pache J-C, Janssen YMW, Walsh ES, Quinlan TR, Zanella CL, Low RB, Taatjes DJ, Mossman BT. Increased epidermal growth factor-receptor protein in a human mesothelial cell line in response to long asbestos fibers. Am.J.Pathol. 1998;152:333-340.
 131. Pääkkö P, Rämetsä M, Vähäkangas K, Korpela N, Soini Y, Turunen S, Jaworska M, Gillissen A. Crocidolite asbestos causes an induction of p53 and apoptosis in cultured A549 lung carcinoma cells. Apoptosis 1998;3:203-212.
 132. Plato N, Westerholm P, Gustavsson P, Hemmingsson T, Hogstedt C, Krantz S. Cancer incidence, mortality and exposure-response among Swedish man-made vitreous fiber production workers. Scand.J.Work Environ.Health. 1995;21:353-361.
 133. Postma DS, Renkema TEJ, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction. Am.Rev.Respir.Dis. 1988;137:57-61.
 134. Pott F. Detection of mineral fibre carcinogenicity with the intraperitoneal test - recent results and their validity. Ann.Occup.Hyg. 1995;39:771-779.
 135. Privalle CT, Fridovich I. Transcriptional and maturational effects of manganese and iron on the biosynthesis of manganese-superoxide dismutase in *escherichia coli*. J.Biol.Chem. 1992;267:9140-9145.
 136. Quinlan TR, Marsh JP, Janssen YMW, Borm PA, Mossman BT. Oxygen radicals and asbestos-mediated disease. Environ.Health Perspect. 1994;102:107-110.
 137. Quinlan TR, Marsh JP, Janssen YMW, Leslie KO, Hemenway D, Mossman BT. Dose-responsive increases in pulmonary fibrosis after inhalation of asbestos. Am.J.Respir.Crit.Care Med. 1994;150:200-206.
 138. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. Am.J.Respir.Crit.Care Med. 1996;154:1055-1060.
 139. Raithel HJ. Asbestbedingte Berufskrankheiten. Dt.Ärztebl. 1996;93:B-546-B553

140. Redlich CA. Occupational lung disorders: general principles and approaches. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM, eds. Fishman's pulmonary diseases and disorders. New York: McGraw-Hill, 1997:867-891.
141. Rennard SI, Beckmann JD, Robbins RA. Biology of airway epithelial cells. In: Crystal RG, West JB, eds. The Lung. New York: Raven Press, 1991:157-167.
142. Respondek M, Wiethege Th, Müller K-M. Pulmonale Reaktionsmuster auf künstliche Mineralfasern. Karlsruhe: Projekt für Umwelt und Gesundheit im Forschungszentrum Karlsruhe, 1995:
143. Robinson BWS. Asbestos and cancer: human natural killer cell activity is suppressed by asbestos fibers but can be restored by recombinant interleukin-2. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989;139:897-901.
144. Rom WN, Bitterman PB, Rennard SI, Cantin A, Crystal RG. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1987;136:1429-1434.
145. Rom WN, Travis WD, Brody AR. Cellular and molecular basis of the asbestos-related diseases. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1991;143:408-422.
146. Rosenthal GJ, Germolec DR, Blazka ME, Corsini E, Simeonova P, Pollock P, Kong L-Y, Kwon J, Luster MI. Asbestos stimulates IL-8 production from human lung epithelial cells. *J.Immunol.* 1994;153:3237-3244.
147. Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J.Appl.Physiol.* 1993;75:2419-2424.
148. Rüdiger HW, Nowak D. Bronchialkarzinom. Die Rolle von Anlage und Umwelt. *Internist-Berl.* 1994;35:700-709.
149. Sambrook J, Fritsch BF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 Ed. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989:
150. Sarih M, Souvannavong V, Brown SC, Adam A. Silica induces apoptosis in macrophages and the release of interleukin-1 α and interleukin-1 β . *J.Leukoc.Biol.* 1993;54:407-413.
151. Sato M, Sasaki M, Hojo H. Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor- α and Interleukin-6. *Arch.Biochem.Biophys.* 1995;316:738-744.
152. Schoenberger CI, Hunninghake GW, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Role of macrophages in asbestosis: modulation of neutrophil migration to the lung after acute asbestos exposure. *Thorax* 1982;37:803-809.
153. Schraufstatter IU, Cochrane CG. Oxidants: types, sources, and mechanisms of injury. In: Crystal RG, West JB, eds. The lung, scientific foundations. New York: Raven Press, 1991:1803-1810.

154. Schulz C, Gillissen A, Schultze-Werninghaus G. Die Bedeutung der induzierbaren Stickoxidsynthese bei pulmonalen Entzündungsprozessen. *Pneumologie* 1998;52:340-349.
155. Shannon HS, Jamieson E, Julian JA, Muir DCF, Walsh C. Mortality experience of Ontario glass fibre workers - extended follow-up. *Ann.Occup.Hyg.* 1987;31:657-662.
156. Shatos MA, Doherry JM, Marsh JP, Mossman BT. Prevention of asbestos-induced cell death in rat lung fibroblasts and alveolar macrophages by scavengers of active oxygen species. *Environmental Research* 1987;44:103-116.
157. Shi X, Mao Y, Daniel LN, Saffiotti U, Dalal NS, Vallyathan V. Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation. *Environ.Health Perspect.* 1994;102:149-154.
158. Shiki Y, Meyrick BO, Brigham KL, Burr IM. Endotoxin increases superoxide dismutase in cultured bovine pulmonary endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 1987;252:C436-C440
159. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YMW, Marsh JP, Mossman BT. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J.Biol.Chem.* 1991;266:24398-24403.
160. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1990;141:471-501.
161. Simeonova PP, Luster MI. Asbestos induction of nuclear transcription factors and interleukin 8 gene regulation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1996;15:787-795.
162. Simonato L, Fletcher AC, Cherrie JW, Andersen A, Bertazzi P, Charnay N, Claude J, Dodgson J, Esteve J, Frentzel-Beyme R, Gardner MJ, Jensen O, Olsen J, Teppo L, Winkelmann R, Westerholm P, Winter PD, Zochetti C, Saracci R. The international agency for research on cancer historical cohort study of MMMF production workers in seven european countries: extension of the follow-up. *Ann.Occup.Hyg.* 1987;31(4B):603-623.
163. Smith DM, Ortiz LW, Archuleta RF, Johnson NF. Long-term health effects in hamsters and rats exposed chronically to man-made vitreous fibres. *Ann.Occup.Hyg.* 1987;31(4B):731-754.
164. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol* 1975;98:503-517.
165. Stone KK, Bermúdez E, Pryor WA. Aqueous extracts of cigarette tar containing the tar free radical cause DNA nicks in mammalian cells. *Environ.Health Perspect.* 1994;102:173-178.
166. Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct, activation by oxidation. *Science Wash.DC* 1990;2448:189-194.
167. Stråling P, Marklund SL. *Biochem.J.* 1994;298:347-352.

168. Su W-Y, Folz R, Chen J-S, Crapo JD, Chang L-Y. Extracellular superoxide dismutase mRNA expressions in the human lung by *in situ* hybridization. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1997;16:162-170.
169. Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic.Biol.Med.* 1996;21:335-348.
170. Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS, Richardson DC. Determination and analysis of the 2Å Structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J.Mol.Biol* 1982;160:181-217.
171. Thomas G, Ando T, Verma K, Kagan E. Asbestos fibers and interferon-gamma up-regulate nitric oxide production in rat alveolar macrophages. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1994;11:707-715.
172. Timbrell V, Rendall REG. Preparation of the UICC standard references sample asbestos. *Powder Technology* 1971;5:279-287.
173. Tsan M-F, White JE. Kinetics of pulmonary superoxide dismutase in interleukin-1-induced oxygen-tolerant rats. *Am.J.Physiol.(Lung Cell.Mol.Physiol.)* 1992;263:L342-L347
174. Tsan M-F, White JE, Treanor C, Shaffer JB. Molecular basis for tumor necrosis factor-induced increase in pulmonary superoxide dismutase activities. *Am.J.Physiol.(Lung Cell.Mol.Physiol.)* 1990;259:L506-L512
175. Vallyathan V. Generation of oxygen radicals by minerals and its correlation to cytotoxicity. *Environ.Health Perspect.* 1994;102:111-115.
176. Vallyathan V, Shi X, Dalal NS, Irr W, Castranova V. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1988;138:1213-1219.
177. Visner GA, Block ER, Burr IM, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase in procine pulmonary artery endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 1991;260:L444-L449
178. Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. *J.Biol.Chem.* 1990;265:2856-2864.
179. Wan XS, Devalaraja MN, Clair DKSt. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 1994;13:1127-1136.
180. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol.Scand.* 1986;548:9-37.
181. Weller W. Anthrako-Silikose. Hamm/Germany: Griebisch Druck GmbH, 1977:
182. Wilsmann KM. Ten years of clinical experience of SOD treatment of inflammatory disorders. In: Rotilio G, ed. *Superoxide and superoxide dismutase in chemistry.* New York: Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 1986:500-507.

183. Wong GHW, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 1988;242:941-943.
184. Xianglin S, Mao Y, Daniel LN, Saffiotti U, Dalal NS, Vallyathan V. Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation. *Environ.Health Perspect.* 1994;102:149-154.

8 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. K.-M. Müller und seinen Mitarbeitern/-innen möchten wir an dieser Stelle ganz ausdrücklich für die Hilfe bei der Herstellung der histologischen Schnitte danken.

Frau B. Schärting danken wir für Ihre tatkräftige Unterstützung bei den meisten der oben beschriebenen Versuche.

Frau Umut Arinir und Frau Kerstin Everkamp möchten wir an dieser Stelle ebenfalls für ihre Unterstützung danken. Frau U. Arinir führte den größten Teil der Aktivitätsuntersuchungen durch und Frau K. Everkamp quantifizierte mittels ELISA die SOD-Enzymmengen. Außerdem erstellte Frau K. Everkamp einen Teil der immunhistochemischen Bilder.