

Aus der Klinik für Neonatologie (Campus Charité Mitte)  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur oxidativen  
Schädigung der Lunge:  
Hyperoxie *in vivo* und Kultivierung  
isolierter Typ-II-Pneumozyten in  
Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –

Universitätsmedizin Berlin

von

Roswitha Jehle

aus Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Prof. Dr. B. Rüstow
2. Prof. Dr. D. Olthoff
3. Prof. Dr. H.-J. Galla

Datum der Promotion: 14.03.2005

## KURZZUSAMMENFASSUNG

Beim neonatalen Atemnotsyndrom (IRDS) ist die Beatmung der Frühgeborenen mit hohen Sauerstoffpartialdrücken eine oft lebensrettende Therapie. Eine schwerwiegende Nebenwirkung dieser Therapie ist die Induktion einer akuten Lungenerkrankung, die aus bislang ungeklärter Ursache in eine chronische Form übergehen kann. Durch die therapeutische Hyperoxie entstehen vermehrt verschiedene Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die an der Pathogenese der chronischen Lungenerkrankungen wie der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD), beteiligt sind. Die genauen Mechanismen dieser Lungenschädigung sind weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit ist es, Modelle für oxidativen Stress in der Lunge zu entwickeln und die Mechanismen der oxidativen Schädigung zu charakterisieren; der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt dabei auf den funktionell wichtigen Typ-II-Pneumozyten. Folgende Modelle werden untersucht: 1. Untersuchung von isolierten Typ-II-Zellen aus Hyperoxie-exponierten bzw. Kontroll-Ratten (*in vivo* Modell) und 2. Kultivierung isolierter Typ-II-Zellen in Gegenwart von 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*in vitro* Modell).

Die Messung der antioxidativen Antwort nach 44-stündiger Hyperoxie mit 95% O<sub>2</sub> zeigt, dass die Aktivität der Superoxiddismutasen (SOD) in den Typ-II-Pneumozyten auf das dreifache ansteigt, während die Catalase-Aktivität der Typ-II-Zellen sowie die totale antioxidative Kapazität (TAC) in der Bronchoalveoläre Lavage (BAL), den Typ-II-Zellen und im Blutplasma unverändert bleiben.

Gemessen an steigenden Konzentrationen von Malondialdehyd (MDA), Lipidhydroperoxiden (LOOH) und PAF-ähnlichen Oxidationsprodukten von Phospholipiden (PAF-related compounds, PAF-RC), führt Hyperoxie zu vermehrter Lipidperoxidation im Blutplasma, nicht aber in der BAL. Die PAF-RC wirken über den Rezeptor des Thrombozyten-aktivierenden Faktors (PAF) proinflammatorisch, ihre Konzentration in Geweben und biologischen Flüssigkeiten wird durch die PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) reguliert. Unter Hyperoxie ist die PAF-AH-Aktivität im Blutplasma unverändert, in der BAL jedoch auf ein Drittel vermindert. Wir nehmen daher an, dass die hyperoxische Lungenschädigung weder durch eine verminderte PAF-AH-Aktivität noch durch die direkte Peroxidation von Surfactantlipiden in den Alveolen vermittelt wird. Wahrscheinlich wird die pulmonale Sauerstofftoxizität durch die Lipidperoxidation im Blutgefäßsystem oder -plasma verursacht.

Die Literatur weist eine erhöhte Expression von Stressproteinen (HSP) nach der Isolation der alveolären Typ-II-Zellen nach, die mit der Dauer der Zellen in Kultur abnimmt (Brandes 1989). Wir zeigen dagegen, dass erst die Kultivierung der Zellen unter Basalbedingungen zu einer starken HSP-Expression führt, frisch isolierte Typ-II-Zellen exprimieren jedoch keine HSP. In Übereinstimmung mit der neueren Literatur schließen wir daraus, dass basale Zellkulturbedingungen für Typ-II-Zellen ein Stressfaktor darstellen können.

Die Inkubation von Typ-II-Zellen mit  $H_2O_2$  führt zu einem Anstieg der antioxidativen Abwehr: Der initiale oxidative Stress wird durch zelluläres Glutathion (GSH) kompensiert, dessen Konzentration nach 5min stark abfällt, aber innerhalb von 10min wieder regeneriert wird. Im Gegensatz dazu sinkt die Vitamin-E-Konzentration unter  $H_2O_2$ -Behandlung stetig ab. Die weitere Behandlung mit  $H_2O_2$  führt zu einem Anstieg der zellulären Aktivität der antioxidativen Enzyme Catalase und Superoxiddismutasen sowie einer erhöhten Expression von HSP.

Unter  $H_2O_2$ -Belastung nimmt die Konzentration der Surfactantlipide in Typ-II-Zellen ab: Zum einen werden ungesättigte Surfactantlipide oxidiert, zum anderen wird die Aufnahme von Palmitinsäure in die Zelle und die Synthese von PC gehemmt. Der entscheidende Schritt ist dabei vermutlich die oxidative Hemmung eines Schlüsselenzyms der Phospholipidsynthese, der Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT). Die Konzentration der zellulären Antioxidantien Vitamin E und Glutathion ist scheinbar zu gering, um die GPAT und die zellulären Lipide vor der v.a. initial sehr hohen  $H_2O_2$ -Belastung zu schützen.

**Schlagworte: Oxidativer Stress, Lunge, Zellkultur, antioxidative Abwehr, Lipidperoxidation**

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>KURZZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b><u>1 EINLEITUNG</u></b>	<b><u>6</u></b>
1.1 FUNKTION UND STOFFWECHSEL DER TYP-II-PNEUMOZYTEN	6
1.2 ZUSAMMENSETZUNG UND FUNKTION DES SURFACTANTS	7
1.3 OXIDATIVER STRESS UND FREIE RADIKALE	9
1.4 ANTIOXIDANTIEN IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN	11
1.5 MEDIZINISCHE BEDEUTUNG DES OXIDATIVEN STRESS	13
1.6 LIPIDPEROXIDATION	15
1.6.2 PAF, PAF-ÄHNLICHE SUBSTANZEN UND PAF-ACETYLHYDROLASE	15
1.7 MODELLE FÜR DIE UNTERSUCHUNG DES OXIDATIVEN STRESS IN DER LUNGE	17
1.7.1 <i>IN VIVO</i> HYPEROXIE	17
1.7.2 <i>IN VITRO</i> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	19
<b><u>2 FRAGESTELLUNG</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b><u>3 MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>23</u></b>
3.1 ISOLIERUNG DER TYP-II-PNEUMOZYTEN	23
3.2 MODELLE ZUR BESCHREIBUNG DES OXIDATIVEN STRESS	24
3.2.1 HYPEROXIE <i>IN VIVO</i>	24
3.2.2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>IN VITRO</i>	24
3.3 BESTIMMUNG DER H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -KONZENTRATION	25
3.4 ANTIOXIDANTIEN	25
3.4.1 TOTALE ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT (TAC)	25
3.4.2 GLUTATHION (GSH)	25
3.4.3 VITAMIN E	26
3.4.4 POLYUNGESÄTTIGTE FETTSÄUREN (PUFA)	26

---

<b>3.5</b>	<b>AKTIVITÄT ANTIOXIDATIVER ENZYME</b>	<b>27</b>
3.5.1	CATALASE	27
3.5.2	SUPEROXIDDISMUTASEN (SOD)	27
<b>3.6</b>	<b>SYNTHESE VON SURFACTANTLIPIDEN</b>	<b>27</b>
3.6.1	ZELLULÄRE PALMITINSÄURE-(16:0)-AUFNAHME	27
3.6.2	PHOSPHATIDYLCHOLIN-(PC)-SYNTHESE	28
<b>3.7</b>	<b>LIPIDPEROXIDATION</b>	<b>28</b>
3.7.1	MALONDIALDEHYD (MDA)	28
3.7.2	LIPIDHYDROPEROXIDE (LOOH)	28
3.7.3	PAF-ÄHNLICHE SUBSTANZEN (PAF-RELATED COMPOUNDS, PAF-RC)	29
3.7.4	PAF-ACETYLHYDROLASE (PAF-AH)	30
3.7.5	PHOSPHOLIPASE A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> )	30
<b>3.8</b>	<b>EXPRESSION VON HITZESCHOCKPROTEINE (HSP)</b>	<b>31</b>
<b>3.9</b>	<b>BERECHNUNGEN UND STATISTIK</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b>4.1</b>	<b>HYPEROXIE</b>	<b>33</b>
4.1.1	ANTIOXIDATIVE ABWEHR	33
4.1.2	LIPIDPEROXIDATION	34
<b>4.2</b>	<b>KULTIVIERUNG VON TYP-II-PNEUMOZYTEN IN GEGENWART VON H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>36</b>
4.2.1	EINFLUSS DER ZELLKULTURBEDINGUNGEN	36
4.2.2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -CLEARANCE	38
4.2.3	ANTIOXIDATIVE ABWEHR	39
4.2.4	SURFACTANTLIPIDSYNTHESE	41
4.2.5	LIPIDPEROXIDATION	42
4.2.6	EXPRESSION VON HITZESCHOCKPROTEINEN (HSP)	43

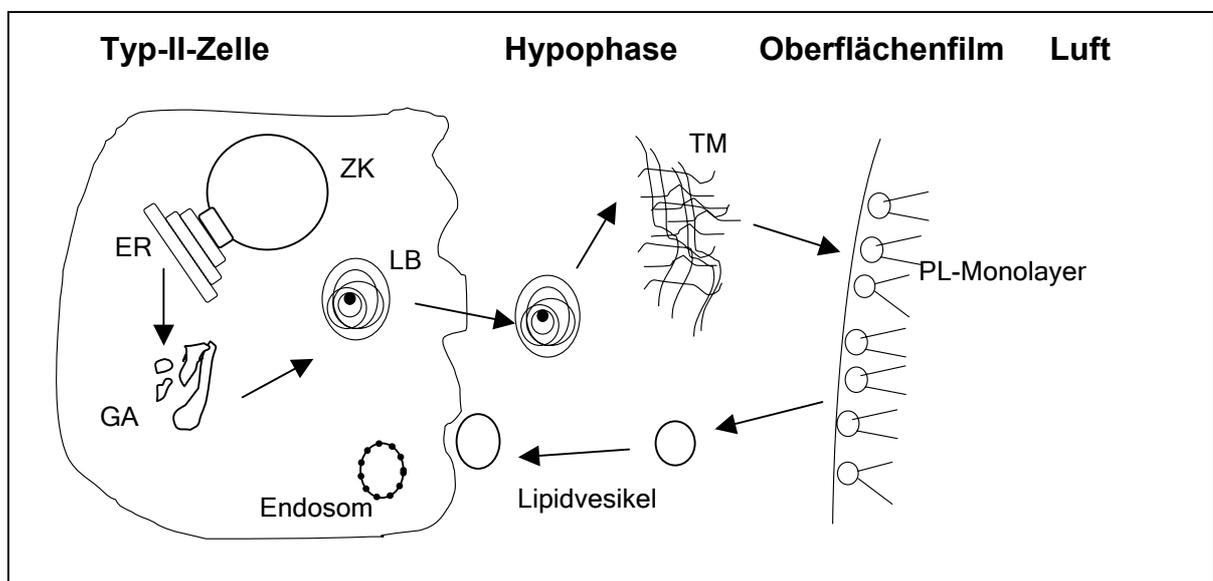
---

<b>5</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>45</b>
5.1	ZELLKULTURBEDINGUNGEN ALS STRESSFAKTOR	45
5.2	ANTIOXIDATIVE ABWEHR	47
5.2.1	GLUTATHION ALS SCHNELLES REAKTIONSSYSTEM NACH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -BELASTUNG	47
5.2.2	ERHÖHTE CATALASE/SUPEROXIDDISMUTASEN-AKTIVITÄT NACH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -STRESS	48
5.2.3	EINFLUSS VON HYPEROXIE AUF DIE PULMONALE ANTIOXIDATIVE ABWEHR	49
5.3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HEMMT DIE SURFACTANTLIPIDSYNTHESE	49
5.4	LIPIDPEROXIDATION	50
5.4.1	<i>IN VIVO</i> HYPEROXIE VERÄNDERT DIE LIPIDPEROXIDATION IN DER LUNGE NICHT	50
5.4.2	<i>IN VITRO</i> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> FÜHRT ZU LIPIDPEROXIDATION IN DEN TYP-II-PNEUMOZYTEN	51
5.5	ERHÖHTE EXPRESSION VON HITZESCHOCKPROTEINEN UNTER H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	51
<b>6</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG</u></b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b>61</b>
	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND CHEMISCHEN FORMELN	61
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	64
	TABELLENVERZEICHNIS	65
	DANKSAGUNG	66
	LEBENS LAUF	67
	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	69

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 FUNKTION UND STOFFWECHSEL DER TYP-II-PNEUMOZYTEN

Typ-II-Pneumozyten sind funktionell wichtige Zellen in den Alveolen der Lunge, deren Hauptaufgabe in der Produktion und bedarfsgerechten Sekretion des alveolären Surfactant besteht. Des Weiteren verhindern sie die Entstehung eines Alveolarödems durch aktiven Transport von Natrium-Ionen aus dem Alveolarraum und sind an lokalen immunologischen Reaktionen beteiligt. Darüber hinaus können sie zu Typ-I-Pneumozyten differenzieren und somit das Alveolarepithel regenerieren (van Golde 1994, Creuwels 1997).



ZK: Zellkern, ER: Endoplasmatisches Retikulum, GA: Golgi-Apparat, LB: Lamellarkörperchen, TM: Tubuläres Myelin, PL: Phospholipide.

**Abbildung 1.1 Stoffwechsel der Typ-II-Zellen nach van Golde et al. (1994) und Creuwels et al. (1997).**

Im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Zellen werden die Surfactantlipide synthetisiert, zusammen mit spezifischen Proteinen über den Golgi-Apparat in die sog. Lamellarkörperchen (LB) transportiert und dort als zellulärer Surfactant gespeichert. Auf verschiedene sekretorische Reize werden die LB in den Alveolarraum sezerniert und bilden dort das tubuläre Myelin (TM), aus dem der oberflächenaktive Surfactantfilm an der Luft-Wasser-Grenze entsteht (Abbildung 1.1). Bis zu 85% des Surfactant wird von den Typ-II-Zellen als Endosomen wieder aufgenommen und recycelt, nur ein geringer Teil wird von Makrophagen phagozytiert. Insgesamt beträgt der Turnover der Surfactantlipide etwa 5-10h (van Golde 1994, Creuwels 1997).

## 1.2 ZUSAMMENSETZUNG UND FUNKTION DES SURFACTANTS

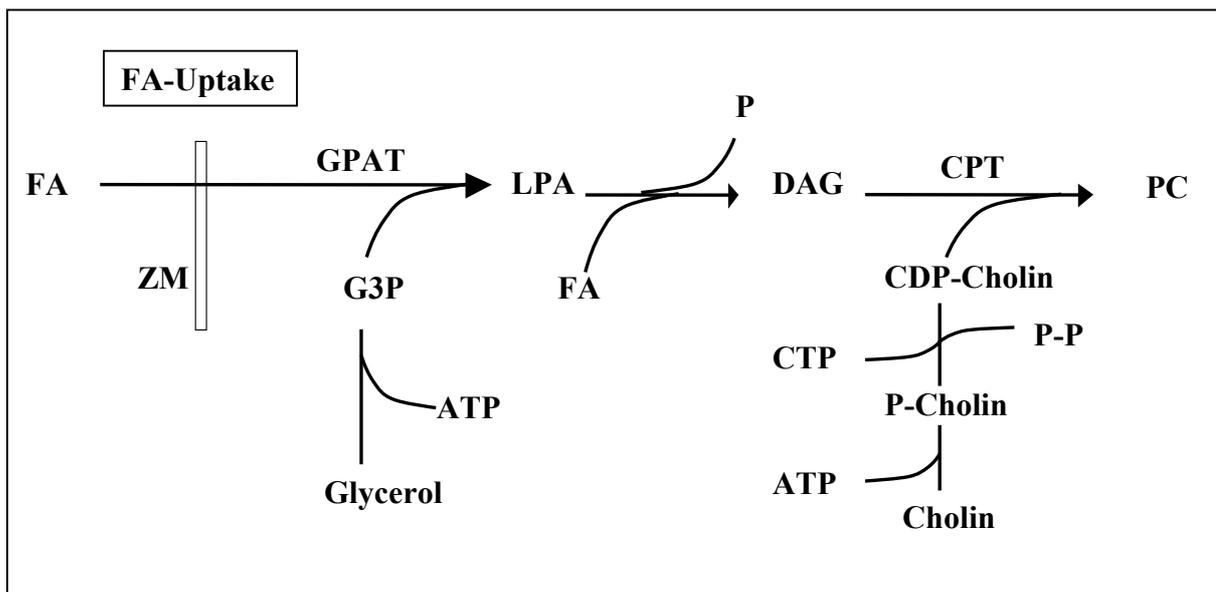
1929 stellt von Neergaard fest, dass ein dreimal höherer Druck notwendig ist, um die Lunge mit Luft statt mit Flüssigkeit zu füllen, und folgert daraus, dass die Alveolen durch eine Substanz stabilisiert werden, die die hohe Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Fläche vermindert (von Neergaard 1929). Aber erst ab 1955 werden diese Ergebnisse mit einem hohen Phospholipidgehalt der Lunge in Zusammenhang gebracht, was schließlich zu der Entdeckung des Surfactants (Abkürzung für: Surface Active Agent) führte. Tabelle 1.1 zeigt die prozentuale Zusammensetzung des Surfactant.

**Tabelle 1.1 Zusammensetzung des Surfactants [in Gewichtsprozent]**

<b>Lipide</b>		90%
Phospholipide		83%
Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)	36%	
Ungesättigtes Phosphatidylcholin (PC)	32%	
Phosphatidylglycerol (PG)	8%	
Phosphatidylethanolamin (PE)	3%	
Phosphatidylinositol (PI)	2%	
Sphingomyelin (SM)	2%	
Lyso-Bis-Phosphatidsäure	1%	
Cholesterin	15%	
Neutralfette	2%	
<b>Proteine</b>		10%

nach Rüstow und Nakagawa (1988), Creuwels et al. (1997) und Goerke (1998).

Surfactant besteht hauptsächlich aus Lipiden und zu 10% aus Proteinen. Fast 90% der Surfactantlipide sind Phospholipide, wobei das oberflächenwirksame Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) kennzeichnend ist. Über 30% sind ungesättigte Phospholipide, die die Fluidität des Surfactants bei Körpertemperatur erhöhen und so die Adsorption des Surfactants an die alveoläre Oberfläche erleichtern (Bangham 1987, van Golde 1994). Das wichtigste neutrale Lipid des Surfactants ist Cholesterin, welches die Fluidität der DPPC-angereicherten Lipidphasen erhöht und die Ausbreitung der Surfactantschicht an der Luft-Wasser-Grenze erst ermöglicht (Fleming 1988).



FA: Fettsäure; ZM: Zellmembran; G3P: Glycerol-3-Phosphat; LPA: Lyso-Phosphatidsäure; DAG: Diacylglycerol; GPAT: Glycerol-3-Phosphat Acetyltransferase; CPT: Cholin-Phosphotransferase; P: Phosphat.

**Abbildung 1.2 PC-Synthese (nach Haagsman und van Golde 1985, Alberts 1997).**

Abbildung 1.2 zeigt schematisch die Synthese von PC: Aus Glukose entsteht sn-Glycerol-3-phosphat (G3P), das dann mit zwei Fettsäuren zu Phosphatidsäure (PA) azyliert wird, die wiederum wird von Phosphatidsäure-Phosphatase zu Diacylglycerol (DAG) dephosphoryliert. Im letzten Schritt der PC-Synthese reagiert DAG mit CDP-Cholin, das durch die Cholin-Phosphotransferase (CPT) katalysiert wird. Neben der de novo Synthese kann DPPC aus ungesättigtem PC über De- und Reacylierung der ungesättigten Fettsäure in sn-2-Stellung am Glycerol entstehen.

Surfactant bildet eine unspezifische Barriere gegen die Adhäsion von Keimen und wirkt immunmodulierend sowohl anti- als auch proinflammatorisch. Die Hauptaufgabe des alveolären Surfactant ist jedoch die Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen der Lunge, wodurch der endexpiratorische Kollaps der Alveolen verhindert und die Atemarbeit um ein Vielfaches vermindert wird. Da die Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Größe der Alveolen gesenkt wird, ermöglicht der Surfactant die Belüftung unterschiedlich großer Alveolen (van Golde 1994, Goerke 1998).

Ist der Surfactantgehalt der Lunge vermindert, erhöht sich somit die alveoläre Oberflächenspannung, was zu Atelektasen führen kann. Durch die gestörte Blut-Luft-Schranke können im sog. „Capillary Leak Syndrome“ Proteine und Plasma in den Alveolarraum übertreten und so ein alveoläres Lungenödem verursachen. Atelektasen und Ödem führen durch ein erhöhtes Shuntvolumen der Lunge zur Hypoxämie und zur respiratorischen Azidose. Davon sind insbesondere Frühgeborene betroffen, deren unreife Typ-II-Zellen nur unzureichend Surfactant produzieren: Der Sauerstoffgehalt im arteriellen Blut kann dann postpartal soweit sinken, dass es zum Infant Respiratory Distress Syndrome (IRDS) kommt und die Kinder beatmungspflichtig werden (Weis 1996). Die Beatmung dieser Kinder reduziert zwar die akute Hypoxämie, führt aber durch die Sauerstoffbelastung zu erhöhtem oxidativen Stress und zu weiteren Lungenschädigung.

### 1.3 OXIDATIVER STRESS UND FREIE RADIKALE

Oxidativer Stress ist definiert als die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Oxidantien (Halliwell 1990, Sies 1991, Sies 1993). Als Ursache kommt demnach sowohl eine vermehrte Belastung mit Oxidantien, z.B. bei Beatmung mit hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen, als auch die Verminderung der Konzentration von Antioxidantien (s.a. Kapitel 1.4) in Frage (Junod 1989). Oxidativer Stress führt im weiteren zu Lipidperoxidation, Proteinschäden und DNA-Strangbrüchen (s.a. Kapitel 1.5).

Bei oxidativem Stress spielen die freien Radikale, d.h. Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen, eine wichtige Rolle. Die freien Radikale des Sauerstoffs und seiner Verbindungen werden zusammen mit nicht radikalischen, aber sehr reaktiven Sauerstoffverbindungen als Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet. Die wichtigsten ROS sind in Tabelle 1.2 aufgelistet.

Sauerstoff ( $O_2$ ) ist insofern ein ungewöhnliches Molekül, als es zwei ungepaarte Elektronen besitzt und deshalb auch als Biradikal bezeichnet wird. Da Elektronen von  $O_2$  bevorzugt nacheinander akzeptiert werden, führt dies beim Sauerstoffmolekül zur Entstehung von ROS wie  $H_2O_2$  und  $\bullet O_2^-$  (Ames 1993, Sanders 1999).

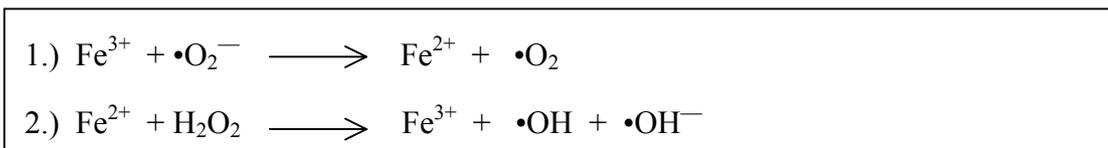
**Tabelle 1.2: Wichtige Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**

Spezies	Name	Halbwertszeit
$\bullet\text{O}_2^-$	Superoxidanionradikal	- (enzymatischer Abbau)
$\text{H}_2\text{O}_2$	Wasserstoffperoxid	- (enzymatischer Abbau)
$\bullet\text{OH}^-$	Hydroxylradikal	$10^{-9}\text{s}$
$\bullet\text{RO}$	Alkoxyradikal	$10^{-6}\text{s}$
$\bullet\text{ROO}$	Alkyldioxyradikal	7s
$\text{ROOH}$	Alkylhydroperoxid	-
$\text{O}_3$	Ozon	-
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff	$10^{-5}\text{s}$
$\bullet\text{NO}$	Nitritoxidradikal	1-10s

nach Sies (1993).

Langlebiger ROS wie  $\bullet\text{O}_2^-$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  schädigen die Zelle nicht nur am Entstehungsort, sondern diffundieren in andere Zellen und generieren auch dort aggressivere Radikale wie  $\bullet\text{OH}^-$ , die dann wichtige Zellstrukturen oxidieren können (Halliwell 1990, Sies 1993).

Das besonders reaktive  $\bullet\text{OH}^-$  entsteht in der Fenton-Haber-Weiss-Reaktion durch Katalyse von freien Eisen- oder Kupfer-Ionen aus  $\bullet\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Abbildung 1.3), freie Eisen- und Kupfer-Ionen wirken daher prooxidativ:



**Abbildung 1.3 Fenton-Haber-Weiss-Reaktion (nach Kappus 1985, Halliwell 1990).**

Von den  $10^{12}$  Sauerstoffmolekülen, die eine Rattenzelle täglich verbraucht, werden unter physiologischen Bedingungen 2% zu ROS; die ROS-Produktion menschlicher Zellen wird auf ein Zehntel, immerhin  $2 \times 10^9$  ROS-Moleküle pro Tag und Zelle, geschätzt (Ames 1993, Sanders 1999). Diese ROS entstehen z.B. als Nebenprodukt in der Atmungskette, in den Peroxisomen der Zellen, im Cytochrom-P450-System und in Phagozyten im Rahmen der Immunantwort.

## 1.4 ANTIOXIDANTIEN IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN

Antioxidantien sind Stoffe, die in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen die Oxidation eines Substrates verhindern oder vermindern können (Halliwell 1990, Sies 1993, Gille 1992). Antioxidantien im engeren Sinne interagieren direkt mit den ROS, aber auch Coeruloplasmin, Transferrin und Ferritin wirken als Antioxidantien, indem sie freie Kupfer- bzw. Eisen-Ionen binden und die Metallkatalyse der Fenton-Haber-Weiss-Reaktion unterbinden (Prävention). Darüber hinaus tragen auch verschiedene zelluläre Reparatursysteme zur antioxidativen Abwehr bei (Kappus 1985).

**Tabelle 1.3 Wichtige Antioxidantien in biologischen Systemen**

System	Beispiele
Nicht enzymatisch	$\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), $\beta$ -Carotin (Vitamin A), Ubichinon, Urat, Bilirubin, Ascorbat (Vitamin C), Glutathion (GSH) Plasmaproteine (Albumin, Coeruloplasmin etc.)
Enzymatisch (direkt)	Superoxiddismutasen (SOD), Catalase Glutathionperoxidasen (GPx)
Enzymatisch (indirekt)	Konjugationsenzyme (Glutathion-S-Transferase etc.) NADPH-Oxidoreduktase, NADPH (Pentosephosphatweg) Glutathionreduktase (GR)
Reparatursysteme	DNA-Reparatur Turnover oxidiertes Proteine und PL

nach Sies (1993).

Die antioxidative Abwehr kann durch die Kombination von lipid- und wasserlöslichen Antioxidantien verstärkt werden: Z.B. können ein bis drei Moleküle Vitamin E, die in der Lipidphase der Lipoproteine bzw. in der Membranstruktur der Zellen lokalisiert sind, tausend Moleküle ungesättigter Fettsäuren vor Peroxidation schützen. Das lipophile Vitamin E wird dabei selbst zum Radikal, hydrophile Antioxidantien wie Ascorbat und Glutathion regenerieren dann Vitamin E, so dass das freie Radikal-Elektron aus der Lipidphase oder aus der Zellmembran entfernt und an Substanzen des Blutplasmas abgegeben wird (Sies 1993).

Das häufigste Phospholipid des Surfactants, DPPC, ist wegen seiner zwei gesättigten Fettsäuren relativ unempfindlich gegen oxidative Schädigung, andererseits enthält der Surfactant fast eben so viele ungesättigte Phospholipid-Spezies wie DPPC und das funktionell wichtige, leicht oxidierbare Cholesterin als Substrate der Lipidperoxidation (Tabelle 1.1). Im alveolaren Surfactantmonolayer sind die Phospholipide darüber hinaus so angeordnet, dass die aliphatischen Ketten ihrer Fettsäuren zur Luftphase des Alveolarraum orientiert sind; sie sollten deshalb besonders anfällig für eine Schädigung durch Oxidantien in der Atemluft sein.

Zum Schutz vor oxidativem Stress enthält der Surfactant verschiedene Antioxidantien (Halliwell 1990), so z.B. Glutathion (GSH) als das wichtigste wasserlösliche Antioxidanz: GSH und alle Enzyme des Glutathionsystems werden durch die Zellen aktiv in den alveolären Surfactant transportiert (Brown 1992, Jenkinson 1988). Da der alveoläre Surfactant zu ca. 90% aus Lipiden besteht, ist anzunehmen, dass vor allem die lipophilen Antioxidantien am antioxidativen Potential der Lunge beteiligt sind. Vitamin E, das wichtigste lipophile Antioxidanz des Surfactants, wird von Typ-II-Zellen aus dem Blut, bevorzugt aus High Density Lipoproteinen (HDL), aufgenommen und mit den Surfactantlipiden in den Alveolarraum sezerniert (Rüstow 1993, Kollack 1999). Auch die Lipidperoxid-abbauenden Enzyme Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) und PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) werden aktiv in den Surfactant transportiert (Stremmler 1989, Triggiani 1997). Des Weiteren findet man im Surfactant geringe Mengen von Plasmalogenen, den Etheranaloga des PC und PE (Rüstow 1994). Es wird vermutet, dass sie eine antioxidative Funktion haben, da ihre Etherbindung leicht oxidierbar ist und sie so andere, funktionell wichtige Strukturen vor Oxidation schützen können (Zoeller 1988, Halliwell 1990, Sies 1993).

Typ-II-Zellen selbst haben ebenfalls ein hohes antioxidatives Potential und sind deshalb relativ resistent gegenüber oxidativer Schädigung, insbesondere zeigen sie eine hohe Aktivität der antioxidativen Enzyme Catalase und SOD (Crapo 1980). Zudem entfernen Typ-II-Zellen geschädigten Surfactant aus dem Alveolarraum und regenerieren ihn. Kommt es zu einer vermehrten oxidativen Belastung der Lunge z. B. durch Hyperoxie, können Typ-II-Zellen den Turnover des Antioxidanz Vitamin E kompensatorisch so erhöhen, dass die Konzentration der ungesättigten Fettsäuren, der Plasmalogene und des Cholesterins – möglichen Substraten einer Oxidation – unverändert bleibt (Tölle 1997).

## 1.5 MEDIZINISCHE BEDEUTUNG DES OXIDATIVEN STRESS

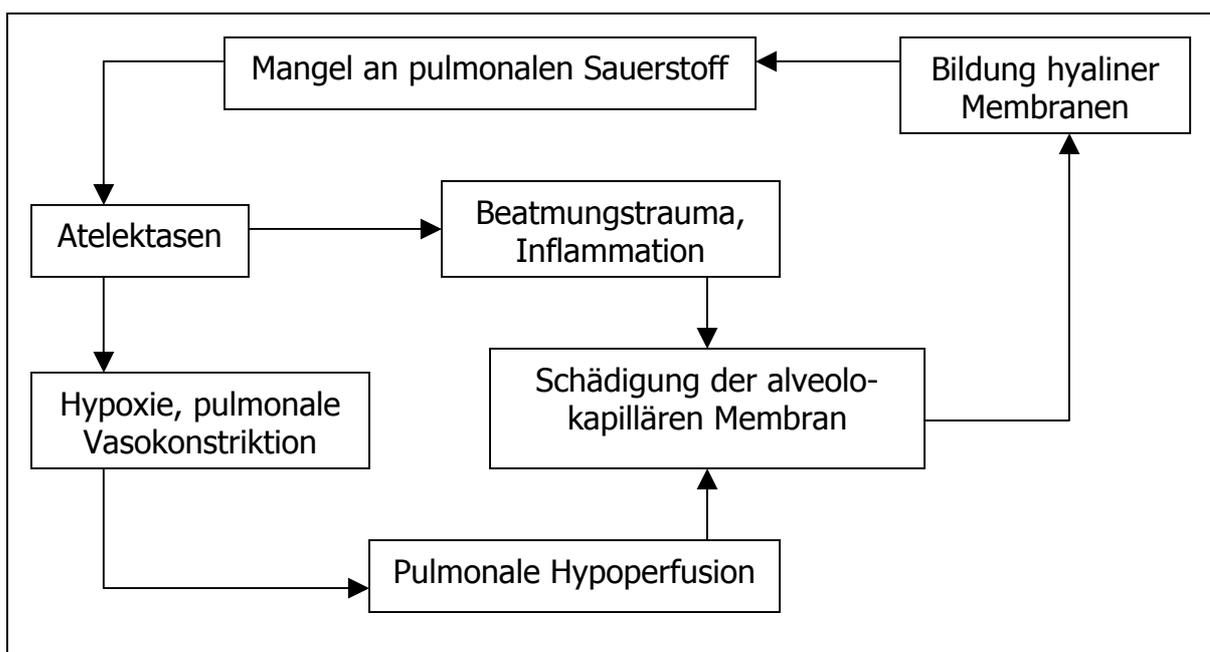
Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) haben große Bedeutung in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen; es gibt auch die Auffassung, dass an allen Krankheiten Radikale in irgendeiner Form ursächlich beteiligt sind. Sehr gut untersucht ist z.B. die Mitwirkung von ROS bei der Entstehung der Arteriosklerose: Die Oxidation von LDL-Lipiden und des Apolipoproteins führt zur unkontrollierten Aufnahme von oxidiertem LDL durch Makrophagen, die dabei zu sog. Schaumzellen werden und die Bildung von arteriosklerotischen Gefäßplaques einleiten. Als Oxidantien für LDL werden u.a. aktivierte Leukozyten und die bei Diabetes mellitus entstehenden Endiol-Tautomere von Zuckern diskutiert. Kardiovaskuläre arteriosklerotische Erkrankungen sind mit erniedrigten Plasmaspiegeln von  $\beta$ -Carotenen, Ascorbat und  $\alpha$ -Tocopherol assoziiert (Ames 1993, Elstner 1995).

Viele bekannte Karzinogene wirken als Radikalgeneratoren, am bekanntesten sind wohl die Radikale im Zigarettenrauch, die zu einem vielfach erhöhtem Krebsrisiko führen. Ungefähr eines von tausend Teilchen im Zigarettenrauch ist in der Lage, Makromoleküle zu oxidieren (Ames 1993). Dies führt zu einer erhöhten Konzentration von Antioxidantien in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) von Rauchern, so ist z.B. ihr Glutathion-Spiegel in der BAL mehr als doppelt so hoch wie der von Nichtrauchern. Durch die oxidative Belastung des Zigarettenrauches nimmt auch die Anzahl der inflammatorischen Zellen in der BAL stark zu (Buhl 1995).

ROS spielen zudem eine Rolle bei der Entzündungsreaktion, da sie z.B. aktivierte Leukozyten im sog. „Oxidative Burst“ verschiedene ROS produzieren: Superoxidanionen ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) über die membranständige NADPH-Oxidase, hypochlorige Säure (HOCl) durch die Myeloperoxidase sowie  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{NO}\bullet$  (Ames 1993). Auch die bei der Entzündungsreaktion wichtige Cyclooxygenase produziert im Rahmen der Prostaglandinsynthese radikale Zwischenstufen (Choi 1996). Diese Radikale wirken bakterizid, sind aber bei chronischer Entzündung für Gewebeschädigungen wie Emphysem und Arthritiden verantwortlich (Elstner 1995).

In der Lunge finden sich erhöhte Konzentrationen von freien Sauerstoffradikalen bei der pulmonalen Fibrose, beim Asthma bronchiale sowie bei den chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (Haagsman 1985, Choi 1996). Des Weiteren wird den ROS-induzierten Veränderungen ein wichtige Rolle bei der Pathogenese des akuten Lungenversagens (ARDS) zugesprochen.

Frühgeborene sind besonders anfällig für oxidativen Stress, da sie im Vergleich zu Erwachsenen niedrigere Konzentrationen von Antioxidantien aufweisen; so findet man z.B. verminderte Transferrin- und Coeruloplasminspiegel im Blutplasma mit entsprechend erhöhten Konzentrationen von freiem Hämoglobin und  $\text{Fe}^{2+}$ . Die Aktivität der antioxidativen Enzyme Catalase, SOD und Glutathionperoxidase ist verringert und der Vitamin-C- und -E-Gehalt im Gewebe, z.B. der Lunge, niedriger als bei Erwachsenen (Frank 1987, Moison 1995). 50-80% der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von 28 Wochen bilden postpartal ein Surfactantmangelsyndrom aus, im Alter von 28-30 Wochen sind es immer noch 30-50%. Müssen Frühgeborene dann aufgrund eines IRDS beatmet werden, bedeutet das eine erhöhte oxidative Belastung für den unreifen Organismus, es kommt zur Aktivierung inflammatorischer Zellen und damit zu neuem Sauerstoffstress. Durch Epitheldefekte treten Plasmaproteine in den Alveolarraum über, was zur Bildung von hyalinen Membranen, zur Entstehung eines Lungenödems und zur weiteren Inaktivierung der oberflächenwirksamen Eigenschaften der Surfactantlipide kommen (Weis 1996). Die Beatmungsdrücke und -frequenzen müssen zunehmend erhöht werden und verursachen weitere Schädigungen (Barotrauma; s.a. Abbildung 1.4). Schwerwiegende Spätfolgen können die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD), Enzephalopathien oder die Retinopathia praematurorum mit einer retrolentaler Fibroplasie sein, die zusammen als „Oxygen Radical Diseases of the Premature“ bezeichnet werden (Kohlschütter 1995, Böhles 1997).



**Abbildung 1.4 Pathogenese des neonatalen Atemnotsyndroms nach Wauer (1993).**

## 1.6 LIPIDPEROXIDATION

Sauerstoff ist in lipophilen Medien ca. sieben- bis achtmal löslicher als in Wasser, Lipide sind daher besonders von oxidativem Stress betroffen (Payne 1995). ROS lösen bei der Lipidperoxidation eine Radikalkettenreaktion aus, wodurch wird die Struktur der Membran zerstört, ihre Fluidität vermindert und die Permeabilität z.B. für Kalzium-Ionen erhöht (Halliwell 1993, Kappus 1985). Abbildung 1.5 zeigt schematisch den Verlauf der Kettenreaktion bei der Fettsäureoxidation (nach Kappus 1985, Halliwell 1993): Radikale wie  $\bullet\text{OH}$  können Lipidperoxidation initiieren, indem sie dem Lipid ein Wasserstoffatom entziehen, zurück bleibt ein Lipidradikal. Nach Dien-Konjugation und Sauerstoffanlagerung wird ein Endoperoxid gebildet, bei dessen Zerfall die Kette gespalten wird und Alkyloxyradikale sowie Ethan entsteht. Für die Bildung von Lipidhydroperoxiden (LOOH) sind wenigstens zwei Doppelbindungen nötig, sind dagegen drei isolierte Doppelbindungen vorhanden, kann durch intramolekulares Rearrangement Malondialdehyd (MDA) gebildet werden. Es werden auch andere Reaktionswege der Lipidperoxidation diskutiert, die aber alle unter Endo/Hydroperoxidbildung ablaufen.

Insgesamt ist das Ausmaß der Lipidperoxidation von verschiedenen Faktoren wie der Lipid/Protein-Ratio, der Zusammensetzung der Fettsäuren, der Sauerstoffkonzentration im Gewebe und der Anwesenheit von kettenbrechenden Antioxidantien abhängig. In Folge der Lipidperoxidation kann der Sauerstoffverbrauch der Zelle soweit steigen, dass es zu intrazellulärer Hypoxie kommt (Kappus 1985).

### 1.6.1 PAF, PAF-ähnliche Substanzen und PAF-Acetylhydrolase

Der Thrombozyten-aktivierende Faktor (Platelet Activating Factor, PAF) oder 1-O-Alkyl-2-Acetyl-Glycero-Phosphocholin, ist ein starker proinflammatorischer Mediator, der bei der Entstehung verschiedener akuter und chronischer Lungenschädigungen wie dem Asthma bronchiale, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COLD), der Lungenfibrose und dem akuten Lungenversagen (ARDS) beteiligt ist (Henderson 1991, Triggiani 1997). PAF führt *in vivo* zu bronchialer Hyperreaktivität mit Bronchokonstriktion sowie zu erhöhter vaskulärer Permeabilität und zur Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Lunge (Triggiani 1997).

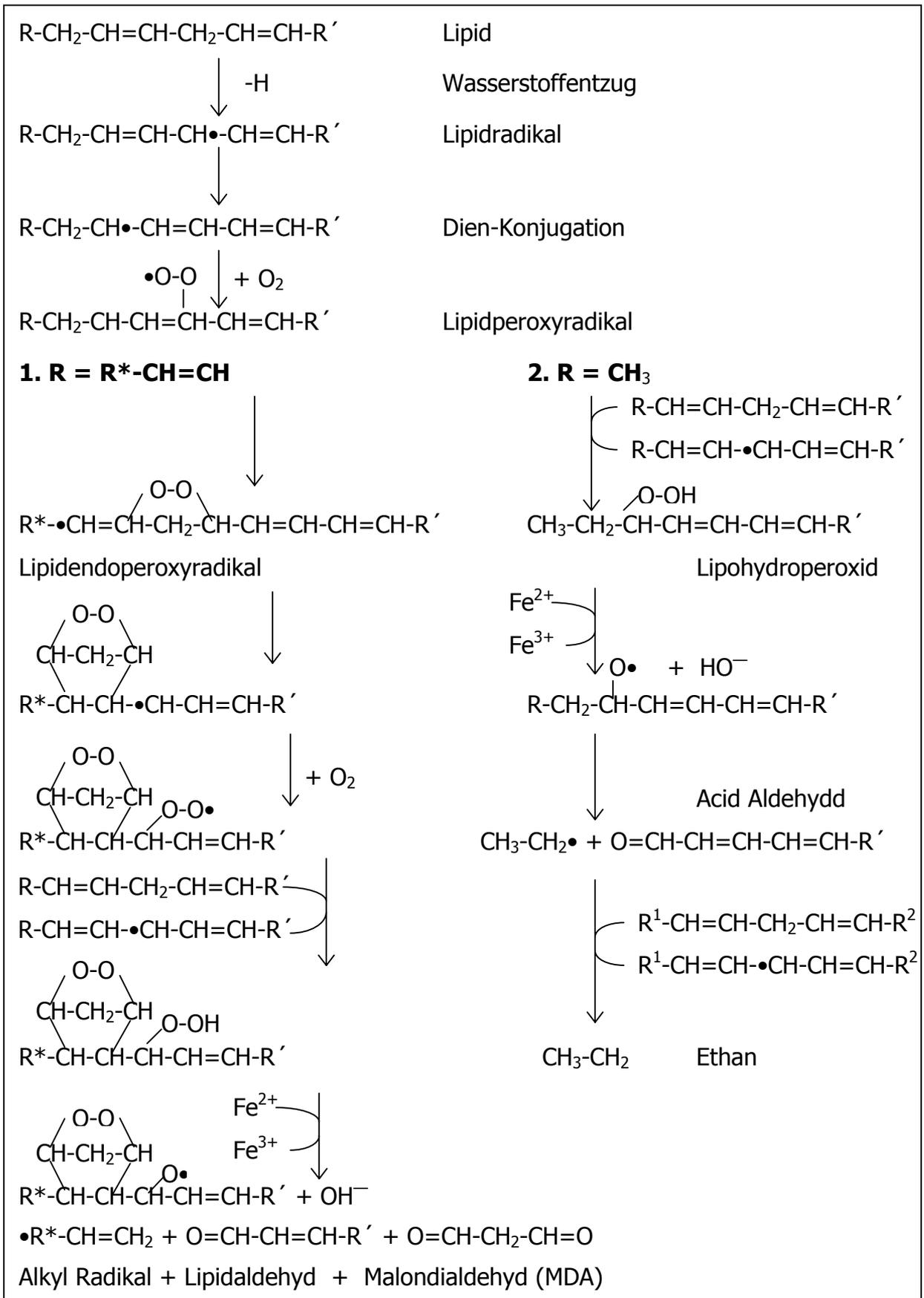


Abbildung 1.5 Fettsäureoxidation nach Kappus (1985), Halliwell und Gutteridge (1993).

Der oxidative Abbau von ungesättigtem Phosphatidylcholin führt zu PAF-ähnlichen Produkten mit einem kurzketigen Oxidationsprodukt in der sn-2-Position. Einige dieser Produkte haben PAF-ähnliche Aktivität, die wahrscheinlich über den PAF-spezifischen Rezeptor vermittelt wird (Tanaka 1993, Tanaka 1994), es gibt Hinweise, dass unter bestimmten Bedingungen im menschlichen Plasma die PAF-Wirkung nicht auf PAF, sondern eher auf die PAF-ähnlichen Substanzen zurückzuführen ist (Frey 2000).

Die Konzentration von PAF und der PAF-ähnlichen Substanzen (PAF-RC) wird in der bronchialen Lavage von PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) kontrolliert, sie katalysiert den hydrolytischen Abbau der Acetylgruppe in sn-2-Position und produziert dabei inaktives Lyso-PAF und Essigsäure (Blank 1981, Stafforini 1987). Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) spaltet ebenfalls Fettsäuren in der sn-2-Position, bevorzugt aber langkettige Fettsäuren (Triggiani 1997).

## **1.7 MODELLE FÜR DIE UNTERSUCHUNG DES OXIDATIVEN STRESS IN DER LUNGE**

### **1.7.1 *In vivo* Hyperoxie**

Hyperoxische Beatmung ist zur Zeit eine unverzichtbare lebenserhaltende Behandlung in der Intensivmedizin, z.B. bei neonataler Lungenunreife. Diese Hyperoxie führt aber zu einer vermehrten Bildung von ROS (Kapitel 1.3), wovon insbesondere die Lunge betroffen ist, da Lunge und Lungensurfactant direkt der höheren O<sub>2</sub>-Konzentration ausgesetzt sind. Experimentell simuliert *in vivo* Hyperoxie bei Versuchstieren am besten die Situation beatmeter Neu- und Frühgeborener.

Wie bereits in 1.2 dargelegt, führt Hyperoxie über die Abnahme der Surfactantlipide zu Atelektasen- und Ödembildung, in deren Folge es zu einer lebensbedrohlichen arteriellen Hypoxämie kommen kann (Matalon 1981, Holm 1988). Die Typ-II-Zellen reagieren mit einer Zellhypertrophie (Holm 1985), zusätzlich steigt die Anzahl der Typ-II-Zellen in der Lunge (Young 1982).

Betrachtet man die in verschiedenen Publikationen mitgeteilten Ergebnisse zu hyperoxisch induzierten Veränderungen in der Lunge jedoch genauer, sind diese z.T. grob widersprüchlich (Tabelle 1.4).

**Tabelle 1.4 Effekt von *in vivo* Hyperoxie: Literaturübersicht (Auswahl)**

<b>O<sub>2</sub>-Behandlung</b>	<b>Effekt</b>	<b>Literatur</b>
85% O <sub>2</sub> , 9d, R	Typ-II-Zellen: PC ↑, DPPC ±	Brumley 1979
85% O <sub>2</sub> , 7d, R	Typ-II-Zellen: DPPC-Gehalt ↑, PC-Turnover ↑	Young 1982
>95% O <sub>2</sub> , 48h, n, K	Lungenschnitte: PC-Synthese/Turnover ↓; PC-Uptake ±	Ward 1983
85% O <sub>2</sub> , 64h, K	BAL: PL ↓, PC ±, DPPC ±	Holm 1985
100% O <sub>2</sub> , 64h, K	BAL: PL ↓, PC-Synthese ↓	Holm 1988
100% O <sub>2</sub> , bis zu 8d, H	BAL: PL ↑, PC ±, DPPC (↑)	Minoo 1992
>95% O <sub>2</sub> , 64h, R	BAL: PL ↑, DPPC ↓	Balaan 1995
80% O <sub>2</sub> , 11d, R	Catalase ↑, GR ↑, GPx ↑, SOD ↑	Coursin 1987
100% O <sub>2</sub> , 64h, K	PL ↑; CuZnSOD ±, MnSOD ±, GPx ±	Baker 1989
85% O <sub>2</sub> , 7d, R	CuZnSOD ↑*, MnSOD ↑	Chang 1995
85% O <sub>2</sub> , 3d, R	Catalase ±, CuZnSOD ±, MnSOD ±, GPx ↑	Ho 1996

n: Neugeborene Tiere, K: Kaninchen, R: Ratte, H: Hamster; PC: Phosphatidylcholin, DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholin, BAL: Bronchoalveoläre Lavage, PL: Phospholipide, GR: Glutathion-Reduktase, GPx: Glutathion-Peroxidase, MnSOD: Mangan-Superoxid-Dismutase, CuZnSOD: Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase, \*s. Anmerkung im Text.

Frank et al. untersuchen 1978 die unterschiedliche Reaktion von Meerschweinchen, Hamster, Maus, Kaninchen und Ratte auf Hyperoxie und finden keinen Unterschied bei der Aktivität der SOD oder GPx, ein Anstieg der Catalase-Aktivität zeigt sich lediglich bei Ratten. Werden dagegen neonatale Tiere einer Hyperoxie ausgesetzt, zeigen Kaninchen und Ratten einen Anstieg der Aktivität aller drei antioxidativen Enzyme, Mäuse einen Anstieg von SOD und GPx. Es scheint daher, dass die unterschiedlichen Literaturergebnisse über den Einfluss von Hyperoxie auf die PC-Synthese oder die Aktivität antioxidativer Enzyme u.a. auf speziesabhängige Unterschiede und auf das Alter der Tiere zurückzuführen sind. Insgesamt ist allerdings die Bedeutung der erhöhten Aktivität antioxidativer Enzyme unter Hyperoxie unklar: Baker et al. (1989) finden nach subletaler Sauerstoff-Präexposition und anschließender Erholung bei Raumluft eine erhöhte Toleranz für Hyperoxie, die jedoch nicht mit einem Anstieg der Aktivität antioxidativer Enzyme verbunden ist. In diesem Zusammenhang ist auch bemerkenswert, dass Chang et al. (1995) unter Hyperoxie eine Erhöhung der CuZnSOD-Aktivität finden, der größte Teil des Proteins aber inaktiviert ist.

Trotz dieser Unterschied simuliert das Hyperoxie-Modell am besten die Beatmung Frühgeborener mit IRDS, allerdings haben wichtige Parameter wie das Alter der Tiere, die Körpermasse, die  $O_2$ -Konzentration und Expositionsdauer einen erheblichen Einfluss auf die Messergebnisse und sollten eindeutig definiert werden.

### 1.7.2 *In vitro* $H_2O_2$

Da Untersuchungen zum pathobiochemischen Mechanismus der hyperoxischen Lungenschädigung im Ganztiermodell mit einigen Unsicherheiten und Widersprüchen verbunden sind, scheint es sinnvoll, das Modell zu vereinfachen und es auf Untersuchungen zur oxidativen Schädigung der funktionell wichtigen Typ-II-Zellen in Primärkultur zu begrenzen. Dabei ist die Inkubation isolierter Typ-II-Zellen mit  $H_2O_2$  ein geeignetes Modell, da 1. die  $O_2$ -Toxizität bei Hyperoxie durch  $H_2O_2$  vermittelt wird (Luo 1999) und 2. sich ein erhöhter  $H_2O_2$ -Gehalt z.B. in der Expirationsluft von ARDS-Patienten (Sanders 1999) findet.

Wie sich Typ-II-Zellen gegen oxidative Belastung durch  $H_2O_2$  schützen, ist unklar:  $H_2O_2$  dringt schnell in Zellen ein und wird dort metabolisiert, seine Halbwertszeit im Zellmedium liegt dabei zwischen 10min (Engstrom 1990) und 25min (Simon 1991). Engstrom et al. (1990) zeigen, dass GSH-Depletion zu keiner Änderung der  $H_2O_2$ -Clearance führt und nehmen deshalb an, dass der  $H_2O_2$ -Schutz GSH-unabhängig ist. Es gibt aber auch Hinweise, dass  $H_2O_2$  in niedrigen Dosen von Glutathionperoxidase metabolisiert wird, in höheren Dosen dagegen von Catalase (Gille 1992).

$H_2O_2$ -Stress führt zu einer Abnahme des ATP-Gehaltes in Typ-II-Pneumozyten (LaCagnin 1990, Abernathy 1995, Crim 1995), vermutlich durch Hemmung sowohl der mitochondrialen ATP-Synthese als auch der ATP-Gewinnung in der Glykolyse (LaCagnin 1990). Hudak et al. (1995) zeigen, dass  $H_2O_2$  die poly-(ADP)-Ribose Polymerase aktiviert und dadurch die zelluläre ATP-Konzentration vermindert. Darüber hinaus ist auch ein erhöhter ATP-Verbrauch denkbar, z.B. bei der kompensatorischen Reparatur von Zellstrukturen oder für die Regeneration von GSH.

Unter  $H_2O_2$  sinkt der Gehalt des funktionell wichtigen Phosphatidylcholins (PC) in den Typ-II-Zellen (Holm 1991, Hudak 1995, Crim 1995), da die PC-Synthese auf der Stufe der Veresterung von Fettsäuren mit Glycerol durch die SH-abhängige Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) und auf der Stufe des Einbau von Cholin in PC gehemmt wird (Holm 1991, Hudak 1995). Folglich ist die Verminderung des PC-Gehaltes nur zum Teil von der  $H_2O_2$ -induzierten ATP-Depletion abhängig.

Das  $H_2O_2$ -Modell kann Untersuchungen hyperoxisch behandelte Tiere nicht ersetzen: Zum einen sind die Ergebnisse mit isolierten Zellen in Primärkultur nicht ohne weiteres mit denen der gesamten Lunge nach Hyperoxie *in vivo* vergleichbar, zum anderen sind die Untersuchungszeiträume durch die kurze Überlebenszeit der Typ-II-Zellen in der Kultur limitiert. Das Modell stellt aber eine sinnvolle Ergänzung zur Untersuchung des oxidativen Stress in der Lunge dar und kann insbesondere die Rolle der Typ-II-Zellen bei der Abwehr von oxidativem Stress näher charakterisieren.

## 2 FRAGESTELLUNG

In dieser Arbeit werden zwei Modelle für oxidativen Stress untersucht:

1. 44-stündige Hyperoxie von Wistar-Ratten mit 95% O<sub>2</sub>.
2. Inkubation isolierter Typ-II-Pneumozyten mit 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für maximal 60min.

Im Modell 1 der subletalen Hyperoxie sollen die *in vivo* auftretenden Veränderungen, im Modell 2 gezielt die Effekte auf Typ-II-Zellen erfasst werden.

Für beide Modelle ist wichtig abzuklären, welchen Einfluss die Kulturbedingungen auf die Typ-II-Zellen haben: Da Typ-II-Pneumozyten üblicherweise unter Basalbedingungen in Raumluft und 37°C auf Plastikschalen in der Kultur gehalten werden, haben wir zunächst untersucht, inwiefern die unphysiologisch hohen Sauerstoffkonzentrationen der Raumluft einen Stressfaktor für die Zellen darstellen. Gemessen wurde die gesamte antioxidative Kapazität, die Aktivität der antioxidativen Enzyme Catalase und Superoxiddismutasen (SOD) sowie die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP) im Verlauf der Zellkultur.

Es wird angenommen, dass bei *in vivo* Hyperoxie zunächst das antioxidative Schutzschild des Surfactants durchschlagen werden muss, bevor es zu einer oxidativen Schädigung der Lunge kommt. Dabei stellt sich die Frage, ob die oxidative Schädigung der Lunge durch einen Mangel an funktionell wichtigen Lipiden und Proteinen oder durch zytotoxische Oxidationsprodukte verursacht wird; weiterhin ist unklar, ob sich die oxidative Schädigung mehr im lipo- oder mehr im hydrophilen Milieu abspielt. Dies hat Auswirkungen auf die Ansätze einer möglichen klinischen Therapie. Dazu haben wir die Lipidperoxidation anhand der Konzentration von Lipidhydroperoxiden (LOOH), Malondialdehyd (MDA) und von PAF-ähnlichen Substanzen (PAF-RC) unter Hyperoxie und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress untersucht.

Die PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) inaktiviert PAF-RC, die durch ROS im Rahmen der Entzündungsreaktion entstehen und proinflammatorische Wirkung haben (Frey 2000). Die ROS selbst jedoch können die PAF-AH-Aktivität rasch und irreversibel hemmen (Ambrosio 1994, Triggiani 1997). Da auch durch Entzündungsreaktionen ROS entstehen, wird durch den ROS-vermittelten Verlust der PAF-AH-Aktivität der proinflammatorische Effekt von PAF verlängert. Wir haben untersucht, inwieweit die Konzentration von PAF-RC in BAL und Plasma mit der Aktivität von PAF-AH korreliert und ob die ROS-induzierte Zerstörung von PAF-AH einen Mechanismus für Lungenschäden unter Hyperoxie oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung darstellt.

HSP sind in der Evolution stark konservierte Moleküle und werden in den meisten Zellen physiologisch auf niedrigem Niveau exprimiert. HSP sind wichtig für die Faltung von de novo synthetisierten Proteinen, deren Translokation durch intrazelluläre Membranen, für die Formation von Proteinoligomeren und deren Abbau. Bei oxidativer Belastung können sie beschädigte Proteine stabilisieren und neu falten. Hitzeschockproteine sind frühe und sehr sensitive Marker des zellulären Stress in vielen Zelltypen (Hightower 1991, Jaattela 1992). Ein Anstieg der HSP-Expression unter Hyperoxie ist bekannt (Choi 1995, Ho 1996), wir haben hier den Effekt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Expression von HSP in Typ-II-Zellen untersucht.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Die Reinheit der verwendeten Chemikalien war *pro analysis*, sie wurden von kommerziellen Herstellern bezogen. Spezielle Materialien und Geräte werden bei der Beschreibung ihrer Verwendung definiert.

#### 3.1 ISOLIERUNG DER TYP-II-PNEUMOZYTEN

Die Durchführung der Tierversuche wurde von der zuständigen Behörde des Landes Berlin genehmigt, die Bedingungen der Tierhaltung genügten den Anforderungen des Deutschen Tierschutzgesetzes.

Typ-II-Pneumozyten wurden durch Verdauung des zerkleinerten Lungengewebes mit Elastase und anschließender Reinigung der proteolytisch isolierten Zellen auf IgG-Platten (nach Dobbs et al. 1986) isoliert: Dazu wurden ca. 120g schwere Wistar-Ratten durch die Applikation von 40mg Pentobarbital in 7500I.E. Heparin betäubt und die Lungen mit „with-Puffer“ (140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 2,5mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3mM MgSO<sub>4</sub>, 6mM Glucose, 10mM HEPES, pH 7,4) über die Arteria pulmonalis blutfrei gespült. Anschließend wurden die Lungen mit „without-Puffer“ (140mM NaCl, 5mM KCl, 6mM Glucose, 0,2mM EGTA, 10mM HEPES, 2,5mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) lavagiert, zerkleinert und mit 6mg Elastase (Schweinepankreas von Roche Biochemicals, Deutschland) 32min verdaut. Die Typ-II-Pneumozyten wurden nach Filtration über Gaze verschiedener Porenweite bei 160×g, 10min, 4°C abzentrifugiert. Durch Inkubation der Zellpräparation auf IgG-(Rat IgG, Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)-beschichteten Plastikschalen für 45min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Makrophagen weitgehend entfernt. Pro Ratte wurden dabei 15-20×10<sup>6</sup> Zellen gewonnen, die Vitalitätsfärbung mit 0,2% Trypanblau ergab >95% vitale Zellen. Die Reinheit der frisch isolierten Typ-II-Pneumozyten lag bei 70-85%.

Für Messungen in Zellsuspension wurden 2×10<sup>6</sup> Zellen in 1ml Dulbecco's Modified Eagle Medium ohne Phenolrot (DMEM; GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) aufgenommen.

Durch Ausplattieren von 0,8-1,1×10<sup>6</sup> Zellen/3,5mm<sup>2</sup> in 2ml DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FKS von GibcoBRL) und Inkubation für 18h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) wurden adhärenente Zellen gewonnen.

Die Proteinbestimmung als Maß für die Menge der isolierten Zellen erfolgte mit dem BCA- (Bicinchoninic Acid)-Proteinbestimmungstest von Pierce: Die entstandenen Kupfer-Protein-Komplexe wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda=570$  nm quantifiziert.

## **3.2 MODELLE ZUR BESCHREIBUNG DES OXIDATIVEN STRESS**

### **3.2.1 Hyperoxie *in vivo***

Männliche Wistar-Ratten wurden 44h bei 95% Sauerstoff, Kontrolltiere unter gleichen Bedingungen bei Raumluft gehalten. Die Ratten wurden durch intraperitoneale Applikation von Pentobarbital betäubt und die Typ-II-Zellen wie unter Kapitel 3.1 beschrieben präpariert. Heparin-Plasma wurde aus der Vena Cava Inferior entnommen und zentrifugiert, Bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde nach viermaliger Lavage mit w/o-Puffer und Zentrifugation ( $160\times g$ , 10min,  $4^{\circ}C$ ) gewonnen.

### **3.2.2 $H_2O_2$ *in vitro***

$10^6$  adhärenente Typ-II-Zellen wurden mit 2ml 0,5mM  $H_2O_2$ -Lösung in DMEM bis zu 60min inkubiert, die Konzentration der eingesetzten  $H_2O_2$ -Lösung wurde dabei durch Titration mit 10mM  $KMnO_4$  überprüft. Es wurde DMEM ohne Phenolrot verwendet, da Fujiwara et al. (1998) nachgewiesen haben, dass Phenolrot in Konzentrationen, wie sie in Medien vorkommen, als Antioxidanz wirkt. Bei einigen Experimenten wurden den Zellen nach 10min erneut  $H_2O_2$  zugesetzt (Endkonzentration: 0,5mM), bei einer Gesamtinkubationszeit von z.B. 30min wurde dieses Zeitschema dann  $3\times 10$ min genannt. Die Zellen wurden anschließend mit eiskaltem PBS (Dulbecco's w/o  $NaCO_3$ , GibcoBRL) gewaschen und mit den Triton X-100 (Endkonzentration: 1% in den jeweiligen Puffern) lysiert.

Für Experimente in Zellsuspension wurden  $10^6$  frisch isolierte Zellen in 0,5ml DMEM aufgenommen und 0,1ml  $H_2O_2$  in DMEM zugegeben, so dass die Endkonzentration 0,5mM  $H_2O_2$  betrug. Bei Inkubation der Zellen mit  $H_2O_2$  für 3 bzw.  $6\times 10$ min wurde nach 10min erneut 0,1ml  $H_2O_2$ -DMEM zugegeben, so dass die Endkonzentration 0,5mM  $H_2O_2$  betrug. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen bei  $160\times g$ ,  $4^{\circ}C$ , 10min abzentrifugiert und weiterbearbeitet.

### 3.3 BESTIMMUNG DER H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-KONZENTRATION

Zur Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration wurde der Test nach Berndt und Bergmeyer (1970) verwendet: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bildet in Gegenwart von Peroxidase mit o-Dianisidin einen Farbkomplex, der bei einer Wellenlänge von  $\lambda=436\text{nm}$  photometrisch quantifiziert werden kann. Der Messansatz enthielt: 0,1ml Zellmedium bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Standard in DMEM mit 1,2ml 0,12mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), 8400U/l Peroxidase (Roche Biochemicals, Deutschland) und 50mg/l o-Dianisidin.

### 3.4 ANTIOXIDANTIEN

#### 3.4.1 Totale antioxidative Kapazität (TAC)

Die totale antioxidative Kapazität (TAC) wurde nach Miller et al. (1993) bestimmt: Radikale wurden durch 2,2-Azino-bis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda=734\text{nm}$  nachgewiesen, diese Radikalgeneration wurde durch Antioxidantien in der Probe bzw. durch das Tocopherol-Analog Trolox® (3-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) als Standard gehemmt und so quantifiziert. Es wurden 10<sup>6</sup> Typ-II-Zellen in 0,1ml 0,1% Triton X-100, 0,7ml BAL bzw. 10 $\mu$ l Heparin-Plasma eingesetzt.

#### 3.4.2 Glutathion (GSH)

Glutathion (GSH) wurde nach Griffith (1983) photometrisch bestimmt: 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzolsäure reagiert zu Thiobis-2-Nitrobenzolsäure mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda=412\text{nm}$ . Reduziertes GSH wird direkt derivatisiert, oxidiertes GSH-Disulfid (GSSG) wird unter NADPH-Verbrauch von Glutathionreduktase zu GSH reduziert. Die pro Zeiteinheit entstehende Thio-bis-2-Nitrobenzolsäure ist dabei von der Menge des gesamten Glutathions (GSH + GSSG) abhängig. 10<sup>6</sup> adhärente Typ-II-Zellen wurden mit 0,2ml 0,1% Triton X-100 lysiert, die Extinktionsänderung  $\Delta E$  bei  $\lambda=412\text{nm}$  für  $\Delta t=30\text{s}$  gemessen.

Die quantitative Differenzierung von GSH und oxidiertem GSH (GSSG) erfolgte im Testkit von ImmunDiagnostik (Bensheim, Deutschland) nach Derivatisierung, HPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion.  $1,5 \times 10^6$  frisch isolierte Typ-II-Zellen wurden in  $80 \mu\text{l}$  einer Lösung mit 0,5% Triton X-100 und internem Standard ( $0,2 \mu\text{mol/ml}$ ) gegeben,  $5 \mu\text{l}$  des Zelllysats dienten zur Proteinbestimmung. Die Messungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt: Nach der Derivatisierung wurden zwei  $50 \mu\text{l}$  Aliquots des klaren Überstandes der Messansätze über HPLC (Merck Euro Lab, Berlin, Deutschland) an Prontosil AQ HPLC Säule (Bischoff Chromatographie, Leonberg, Deutschland;  $5 \mu\text{m}$ ;  $125 \times 4 \text{mm}$ ) mit einem Fluoreszenzdetektor (Merck, Hitachi F1050, Berlin, Deutschland; Anregungswellenlänge  $385 \text{nm}$ , Emissionswellenlänge  $515 \text{nm}$ ) gemessen. Für die Quantifizierung wurde die Fläche des GSH-Peaks mit der Fläche des internen Standards ins Verhältnis gesetzt.

### 3.4.3 Vitamin E

Die Bestimmung des Vitamin-E-Gehaltes erfolgte nach Catignani und Bieri nach HPLC-Trennung (1983): Aus  $3 \times 10^6$  Typ-II-Zellen bzw.  $0,2 \text{ml}$  Heparin-Plasma bzw.  $10 \text{ml}$  BAL wurde Vitamin E mit  $0,45 \text{ml}$  Isopropanol und  $4,5 \mu\text{g}$  internem Standard (Vitamin-E-Acetat) extrahiert. Die Isoformen des Vitamin E wurden in  $50 \mu\text{l}$  des Extraktes an einer RP-Säule (C<sub>18</sub>-Nucleosil 100,  $10 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4 \text{mm}$ ) mit isokratischem Fluss von  $1,3 \text{ml/min}$  bei  $50^\circ\text{C}$  und Methanol/H<sub>2</sub>O (19:1) als Laufmittel getrennt, detektiert wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda=295 \text{nm}$ . alpha-Tocopherol wurde durch die relative Retentionszeit zum internen Standard identifiziert und durch den Vergleich der integrierten Flächen der Probe und des Standards quantifiziert.

### 3.4.4 Polyungesättigte Fettsäuren (PUFA)

Der Gehalt an polyungesättigten Fettsäuren (PUFA) wurde durch HPLC-Analyse nach Lipidextraktion und dünnschichtchromatographischer Trennung gemessen (nach Rüstow 1993).  $10^6$  Typ-II-Zellen in  $0,5 \text{ml}$  0,1% Natriumlaurylsulfat (SDS) bzw.  $0,2 \text{ml}$  Heparin-Plasma bzw.  $1 \text{ml}$  BAL wurden mit Margarinsäure (17:0) als Standard versetzt und eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer (1959) durchgeführt. Die neutralen Lipide wurden von den Phospholipiden durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie auf H60 Silika Gel (Merck, Deutschland) in Hexan/Äther (80:20) als Lösungsmittel getrennt. Die Startregion mit den Phospholipiden wurde mit 5% Methanol in Hexan zu Fettsäuremethylester umgeestert, die Fettsäuremethylester anschließend dünnschichtchromatographisch gereinigt und gaschromatographisch getrennt (Hewlett Packard 5890 Series II).

### 3.5 AKTIVITÄT ANTIOXIDATIVER ENZYME

#### 3.5.1 Catalase

Catalase spaltet  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$ , der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abfall kann bei einer Wellenlänge von  $\lambda=240\text{nm}$  photometrisch gemessen werden (UV-Methode nach Aebi 1983). Die Catalase-Aktivität wurde in 1,1 ml Probenvolumen mit 50mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH 7,4) und 10,9mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei  $22^\circ\text{C}$  und 240nm gemessen. Für die Messung der zellulären Catalase wurde 0,1ml Zelllysat ( $0,5 \times 10^6$ ) in 0,1% Triton X-100 eingesetzt.

#### 3.5.2 Superoxiddismutasen (SOD)

Superoxidanionradikale ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) bilden über verschiedene Oxidationsschritte aus  $\text{NaNO}_2$ , Sulphanilamid und Naphtylendiamin einen Azofarbstoff, der bei einer Wellenlänge von  $\lambda=540\text{nm}$  gemessen werden kann. Durch SOD wird  $\bullet\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  abgebaut und dadurch die Farbstoffbildung verhindert, der Zusammenhang zwischen SOD-Aktivität und der Extinktion ist logarithmisch (nach Elstner 1983). Superoxidanionradikale wurden durch Reaktion von Anthraquinon-2-sulphoninsäure und NADH, katalysiert durch Diaphorase, und anschließender Autooxidation gewonnen. SOD-Standard und Diaphorase stammten von Roche Biochemicals, Deutschland. Für den Test wurden  $10^6$  Typ-II-Zellen in 0,2ml 0,1% Triton X-100 eingesetzt.

### 3.6 SYNTHESE VON SURFACTANTLIPIDEN

#### 3.6.1 Zelluläre Palmitinsäure-(16:0)-Aufnahme

Die Fettsäure-Aufnahme von Typ-II-Zellen wurde anhand der initialen Aufnahme radioaktiv markierter Palmitinsäure (16:0) gemessen (nach Guthmann 1999). Für die Inkubationslösung wurden  $29\mu\text{l}$   $[(9,10)_n\text{-}^3\text{H}]\text{-16:0}$  ( $1\mu\text{Ci/ml}$ ; Amersham, Buckinghamshire, England) und  $229\mu\text{l}$  16:0 (1mg/ml) in Ethanol mit Cellite (Sulpeco) unter  $\text{N}_2$  getrocknet, anschließend mit 3ml DMEM und 0,33% BSA (fettsäurefreies Rinderalbumin, Roche Biochemicals) 1h bei  $37^\circ\text{C}$  gerührt. Der Überstand nach Zentrifugation wurde mit DMEM 1:10 verdünnt (Inkubationslösung). Je  $10^6$  Typ-II-Zellen wurden mit 1ml Inkubationslösung 30sec inkubiert, anschließend nacheinander mit 1% BSA in DMEM, DMEM und PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,5ml 1% SDS lysiert, 0,4ml des Lysates wurden mit 4ml Szintillationsflüssigkeit (Optiphase „Hisafe 3“) im Szintillationscounter (Wallac Scintillation Products Philip's Szintillationscounter PW 4700 mit automatischer Kompensation für Quenching) gemessen.

### 3.6.2 Phosphatidylcholin-(PC)-Synthese

Die Synthese von PC wurde durch Einbau von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Cholin und  $^3\text{H}$ -markierter Palmitinsäure (16:0) in PC gemessen.  $10^6$  Zellen wurden mit  $8,6\mu\text{g}$  16:0 und  $1,1\mu\text{Ci}$  [(9,10) $_n$ - $^3\text{H}$ ]-16:0 (Amersham, England),  $0,15\text{ml}$  0,5% BSA,  $2,8\mu\text{Ci}$ -[Methyl- $^{14}\text{C}$ ]-Cholinchlorid in DMEM 10min inkubiert. Nach Waschen mit 0,2% BSA in DMEM wurden die Zellen mit  $0,4\text{ml}$  0,1% SDS lysiert, aus  $0,3\text{ml}$  des Lysates wurden die Lipide nach Bligh und Dyer (1959) extrahiert und auf der Dünnschicht (Kieselgel 60, Schichtdicke  $0,25\text{cm}$ , Merck, Deutschland) mit Chloroform/Methanol/Wasser (130/80/10) getrennt. Die PC-Region auf der Platte wurde an Hand eines mitchromatographierten Standards identifiziert, abgetragen und mit  $4\text{ml}$  Szintillationsflüssigkeit im Szintillationscounter die Radioaktivität gemessen.

## 3.7 LIPIDPEROXIDATION

### 3.7.1 Malondialdehyd (MDA)

Malondialdehyd (MDA), aber auch andere Substanzen, reagieren mit Thiobarbitursäure zu einem Fluoreszenzfarbstoff, d.h. in dem hier angewandten Test werden alle thiobarbitursäurereaktive Substanzen erfasst (Ohkawa 1979).  $10^6$  Typ-II-Zellen in  $0,15\text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$  bzw.  $0,1\text{ml}$  Plasma bzw.  $1,5\text{ml}$  BAL wurden in  $0,3\text{ml}$   $1,35\text{mM}$  Acetatpuffer (pH 3,5),  $0,3\text{ml}$   $20\text{mM}$  Thiobarbitursäure und  $0,04\text{ml}$  8,1% SDS 60min bei  $90^\circ\text{C}$  inkubiert, als Standard diente 1,1,3,3-Tetrahydroxypropan in Eisessig ( $10$ - $140\mu\text{l}$ ). Anschließend wurde auf Eis  $0,2\text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$  und  $1\text{ml}$  1-Butanol dazugegeben, 20min bei  $4^\circ\text{C}$  geschüttelt und dann 10min lang bei  $3000\times g$  zentrifugiert. Der organische Überstand wurde bei  $514\text{nm}$  Primärstrahlung und  $554\text{nm}$  Sekundärstrahlung im Fluoreszenzspektrometer gemessen.

### 3.7.2 Lipidhydroperoxide (LOOH)

Zur Bestimmung der Lipidhydroperoxide wurde der Testkit LPO-CC (Kamiya Biomedical Co., Thousand Oaks, CA, USA) verwendet, bei dem Lipidhydroperoxide zu Hydroxyl-derivaten reduziert werden, die dann in Gegenwart von Hämoglobin Methylenblau bilden, das wiederum bei einer Wellenlänge von  $\lambda=675\text{nm}$  gemessen werden kann. Als Standard diente  $50\mu\text{M}$  Cumenhydroperoxid. Vor dem Assay wurden die Lipide nach Bligh und Dyer (1959) aus den Proben extrahiert, unter  $\text{N}_2$  eingengt und in  $0,1\text{ml}$  Isopropanol wieder aufgenommen (Leerwert  $0,1\text{ml}$  Isopropanol). Für die Messungen wurden  $5\times 10^6$  Typ-II-Zellen mit  $0,5\text{ml}$  0,1% SDS lysiert bzw.  $0,5\text{ml}$  Heparin-Plasma bzw.  $5\text{ml}$  BAL eingesetzt.

### 3.7.3 PAF-ähnliche Substanzen (PAF-Related Compounds, PAF-RC)

Die Messung der PAF-ähnlichen Substanzen (PAF-RC) erfolgte nach Lipidextraktion, Derivatisierung und HPLC-Trennung nach Frey et al. (2000). Die Lipide von  $10^7$  Typ-II-Zellen in 0,5ml PBS bzw. 0,5ml Heparin-Plasma bzw. 12ml BAL (nach Zentrifugation bei  $100.000\times g$  für 1h) wurden mit 2ml Methanol, 1ml Dichlormethan und 0,5ml  $H_2O$  extrahiert, 0,5nmol 1-Palmitoyl-2-Suberoyl-Phosphatidylcholin diente als interner Standard. Der Lipidextrakt wurde mit 300 $\mu$ l 0,1M 9-(Chloromethyl)-Anthracen in Benzen/Triethylamin (4:1) 2h bei 70°C derivatisiert. Die Phospholipide wurden anschließend auf der Extract-Clean-Silica-Kartusche (200mg/3,0ml Alltech, Unterhaching) erst mit 4ml Chloroform/Triethylamin (9:1), anschließend mit 4ml Methanol/Ammoniak (32%; 95+5) eluiert.

Das Eluat wurde mittels HPLC getrennt (Silica-Phase, Lichrosorb Silica Säule 100; 5 $\mu$ m, 60x8mm), als Laufmittel diente Acetonitril/ $H_2O$  (88:12). Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 2,5ml/min und einer Temperatur von 50°C. Die fluoreszenzmarkierten Phospholipide wurden bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda=360$ nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda=460$ nm detektiert, im UV-Bereich wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda=205$ nm nicht derivatisiertes PC detektiert. Die am Ende des PC-Peaks eluierten PAF-RC wurden gesammelt und in einem zweiten Schritt auf einer RP-Säule  $C_{18}$  Säule Nucleosil 100 (10 $\mu$ m, 250x4mm) bei 50°C und einem Fluss von 1ml/min quantifiziert. Als Laufmittel diente Methanol/ $H_2O$  (9:1) mit 20mM Cholinchlorid bis zur 29.Minute und Methanol/Acetonitril (9:1) mit 20mM Cholinchlorid ab der 31.Minute. Die Detektion erfolgte im Fluoreszenzbereich wie oben beschrieben. PAF-RC wurden durch ihre relative Retentionszeit von 0,80 zum internen Standard identifiziert, die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Peakfläche von PAF-RC mit der des internen Standards.

### 3.7.4 PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH)

Die PAF-Acetylhydrolase-(PAF-AH)-Aktivität wurde durch Freisetzung von  $^3\text{H}$ -markierter Essigsäure aus  $^3\text{H}$ -PAF bestimmt (modifiziert nach Stafforini 1987):  $0,6 \times 10^6$  Typ-II-Zellen wurden in  $30\mu\text{l}$  0,1% Triton X-100 aufgenommen, heparinisiertes Plasma wurde mit 100mM HEPES, 1mM EGTA (pH 7,2) 1:100 verdünnt, für Messungen in der BAL wurden  $30\mu\text{l}$  eingesetzt. Der Substrat-Mix, bestehend aus  $50\mu\text{l} = 1,1 \times 10^6$  dpm 1-Hexa-decyl-2- $^3\text{H}$ acetyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholin (DuPont) und  $40\mu\text{l}$  PAF (10mM in Ethanol), wurde unter Stickstoff getrocknet und in 1ml 0,01% Tween 20 wiederaufgenommen. Zu den Proben wurden  $10\mu\text{l}$  0,5M HEPES, 5mM EGTA (pH 7,2 bei  $37^\circ\text{C}$ ) und  $10\mu\text{l}$  Substrat-Mix zugegeben und 30min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2,5ml Chloroform/Methanol (4:1) und 0,45ml 10mM Tris-Puffer (pH 7,4) gestoppt und mindestens 30sec kräftig gemischt. Die  $^3\text{H}$ -Aktivität wurde in 0,5ml des wässrigen Überstandes mit 4ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationscounter (Wallac 1410 Pharmacia, Uppsala, Schweden) gemessen.

### 3.7.5 Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

Die Phospholipase-A<sub>2</sub>-(PLA<sub>2</sub>)-Aktivität wurde durch die Freisetzung von Fettsäuren aus 2-[1- $^{14}\text{C}$ ]-Arachidonyl-Phosphatidylethanolamin ( $^{14}\text{C}$ -PE, NEN, Boston, USA) nach Nakamura et al. (1995) und Kim und Bonventre (1993) gemessen. 0,05ml Substrat (spezifische Radioaktivität 55Ci/mol) wurde unter  $\text{N}_2$  getrocknet und in 0,1ml Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert.  $2 \times 10^6$  Typ-II-Zellen, 0,1ml Heparin-Plasma (1:5 verdünnt), 0,1ml BAL in 75mM Tris-Base und 5mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 8,5 bei  $37^\circ\text{C}$ ) wurden mit 0,9nmol  $^{14}\text{C}$ -PE 60min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend mit 0,56ml Dole-Reagenz (48,75ml Isopropanol, 50ml n-Heptan, 1,25ml 0,5M Schwefelsäure) und 0,11ml  $\text{H}_2\text{O}$  gestoppt (nach Dole und Meimertz 1961), gemischt und 3min bei  $1900 \times g$  zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde mit 25mg Kieselgel 60 (LiChroprep 60, Merck, Deutschland, Korngröße 15-25 $\mu\text{m}$ ) und 0,85ml n-Heptan 5min bei  $22^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend 5min bei  $1900 \times g$  zentrifugiert. 0,8ml des Überstandes mit freien Fettsäuren wurde mit 4ml Szintillationsflüssigkeit gemessen.

### 3.8 EXPRESSION VON HITZESCHOCKPROTEINE (HSP)

Die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP) wurde im Western Blot gemessen:  $4 \times 10^6$  Typ-II-Zellen wurden in 0,5ml PBS lysiert, abzentrifugiert und in 40 $\mu$ l Lysepuffer (140mM NaCl, 1% Triton X-100, 10mM Tris, pH 7,5) aufgenommen. Nach Zentrifugation mit 1000 $\times$ g, 4°C, 10min und Proteinbestimmung wurden 37 $\mu$ l des Überstandes mit 1,85 $\mu$ l 5mM EDTA, 0,5 $\mu$ l 1mM Dithiotreitol (DTT) und 0,95 $\mu$ l 0,4mM PMSF versetzt. Die Proben wurden mit Lämmli-Probenpuffer (2% SDS, 5% Glycerol, 10mM Dithiotreitol, 1% Bromphenolblau, 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8) auf 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt und 5min bei 95°C inkubiert. Tabelle 3.1 zeigt die eingesetzten Proteinmengen von Typ-II-Zellen und Positiv-Kontrollen in der Elektrophorese.

**Tabelle 3.1 Eingesetzte Proteinmengen für die HSP-Bestimmung**

Hitzeschockprotein (HSP)	Positiv-Kontrolle	Typ-II-Zellen
HSP 32	5 ng	2 $\mu$ g Protein
HSP 60	3 ng	4 $\mu$ g Protein
HSP 70	15 ng	50 $\mu$ g Protein
HSP 90	25 ng	5 $\mu$ g Protein

HSP 32 entspricht der Hämoxxygenase-1 (HO-1). Positiv-Kontrollen von der Firma Novex, Frankfurt/M, Deutschland.

Die Elektrophorese wurde in 12% SDS-Polyacrylamid-Gelen (Novex, Frankfurt/M, Deutschland) bei 30mA, 400-500V mit Lämmli-Puffer durchgeführt, als Molekulargewichts-Marker verwendeten wir MultiMarker Multi-Colored Standard (Novex, Frankfurt/M, Deutschland). Für den Western-Blot wurden das Elektrophoresegele und eine Polyvinyliden-difluorid-(PVDF)-Transfer-Membran in Transfer-Puffer (12mM Tris, 96mM Glycin, 20% Methanol) äquilibriert und bei 25V und 100mA 15-18h im TE Series Transphor Unit (Hoefer Scientific Instruments) bei 4°C geblottet. Die Transfereffizienz wurde mit Cromassie-Blau Färbung kontrolliert, anschließend wurde mit 100% Methanol und TBS (140mM NaCl, 3mM KCl, 16mM Tris, pH 7,4) gewaschen. Die PVDF-Membran wurde mit Blockierungslösung TBS-T [TBS mit 0,1% Polyoxyethylensorbitanmonolaureat (Tween) und 5% Magermilchpulver] bei 4°C über Nacht blockiert. Danach wurde die Membran bei Raumtemperatur 60min mit 0,5 $\mu$ g/ml bzw. 2 $\mu$ g/ml für HSP 32 mit den primären Antikörpern (monoklonaler IgG<sub>1</sub>-Maus-Antikörper bzw. IgG<sub>2b</sub>-Maus-Antikörper für HSP 32, Stressgen Victoria, Kanada) in TBS inkubiert, als zweiter Antikörper wurde Meerrettich-Peroxidase-markiertes Schafs-

Antimaus-IgG (DAKO, Dänemark; Verdünnung 1:2000) verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Hyperfilm ECL-System (Amersham, England) nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung der optischen Dichte (OD) der Banden erfolgte dann mit der Software Pharmacia Image Master DTS Quantity One (Version 2.3).

### **3.9 BERECHNUNGEN UND STATISTIK**

Wurde die Konzentration der Proben mit Hilfe einer mitgeführten Standardreihe berechnet, war die Regressionsgerade der Standardwerte Grundlage für die Berechnung der Probenwerte; für das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  galt dabei  $r^2 > 0,95$ .

Die Ergebnisse werden als Mittelwert (MW) und Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat der Firma SPSS Inc. (Version 2.03): Die Signifikanz wurde mit dem jeweils angegebenen Testverfahren berechnet, Unterschiede von  $p < 0,05$  wurden dabei als signifikant angesehen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 HYPEROXIE

#### 4.1.1 Antioxidative Abwehr

Der Einfluss von Hyperoxie auf alle Antioxidantien im Gewebe kann durch die Messung der totalen antioxidativen Kapazität (TAC) erfasst werden, deren größter Anteil Glutathion (GSH) darstellt: Es macht ca. 90% der intrazellulären nicht-proteingebundenen Thiole der Zelle aus und ist somit eines der wichtigsten Antioxidantien der Zelle (Jenkinson 1988). GSH wirkt antioxidativ, indem es zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird, welches durch die Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert wird. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Konzentration von GSSG ca. 0,2-1% der gesamten GSH-Konzentration.

Catalase und Superoxiddismutasen (SOD) sind wichtige antioxidative Enzyme der Typ-II-Zellen: Das unter Hyperoxie entstehende Superoxidanionradikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) wird von SOD zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  abgebaut, welches wiederum von Catalase zu  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abgebaut wird.

**Tabelle 4.1 Einfluss von *in vivo* Hyperoxie auf antioxidative Parameter von frisch isolierten Typ-II-Zellen**

Antioxidanz	Kontrolle	Hyperoxie
TAC (n=3)	100%	105 ± 20%
GSH (n=2)	100%	77 / 75%
GSSG (n=2)	100%	118 / 120%
Catalase (n=5)	100%	89 ± 30%
SOD (n=3)	100%	308 ± 73% *

TAC – totale antioxidative Kapazität, GSH – reduziertes Glutathion, GSSG – oxidiertes Glutathion, SOD – Superoxiddismutasen; Werte in % von Kontrolle ± Standardabweichung, Kontrollwerte: TAC 58,8 ± 6,9nmol/mg Protein, GSH 34,8 ± 5,9nmol/mg Protein, Catalase 100 ± 12mU/mg, SOD 7,5 ± 1,73mU/mg Protein; n: Anzahl der unabhängigen Experimente, \*p<0,05 (paariger Student's t-test).

Unter Hyperoxie finden wir keine Veränderungen der TAC der Typ-II-Pneumozyten (Tabelle 4.1), auch im Plasma und in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) lässt sich keine Veränderung der TAC nachweisen (nicht gezeigt). Unter Hyperoxie kommt es des Weiteren zu einem leichten Abfall des Anteils von reduziertem GSH sowie einem Anstieg des GSSG-Anteils. Die Aktivität der Catalase wird durch Hyperoxie nicht beeinflusst, wohingegen die SOD-Aktivität stark ansteigt - bei großer Standardabweichung lagen alle gemessenen Einzelwerte der SOD über 200% der Kontrollwerte.

### 4.1.2 Lipidperoxidation

Da die Typ-II-Zellen auf oxidativen Stress durch Hyperoxie v.a. mit einem Anstieg der SOD-Aktivität reagieren, während die anderen gemessenen Parameter nur geringe bzw. keine Veränderungen zeigen, stellt sich die Frage, ob eine Schädigung durch Hyperoxie eintritt, indem z.B. Surfactantlipide oxidiert werden. Um diese Arbeitshypothese zu prüfen, haben wir die Konzentration von Malondialdehyd (MDA), Lipidhydroperoxiden (LOOH) und die PAF-ähnlichen Substanzen (PAF-Related Compounds, PAF-RC) bestimmt. MDA und LOOH sind Abbauprodukte der Radikalkettenreaktion (s.a. Abbildung 1.5), PAF-RC entstehen durch oxidative Kettenverkürzung der ungesättigten Fettsäuren in sn-2 Position des Phosphatidylcholins, ihre Konzentration im Gewebe wird durch PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) und Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) reguliert.

**Tabelle 4.2 Einfluss von *in vivo* Hyperoxie auf die Lipidperoxidation und auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme PAF-AH und PLA<sub>2</sub> im Plasma und in der Bronchoalveolärer Lavage (BAL)**

	Plasma		BAL	
	Kontrolle	Hyperoxie	Kontrolle	Hyperoxie
MDA (n=6)	100%	130 ± 19% *	100%	108 ± 26%
LOOH (n=3)	100%	260 ± 77% *	100%	122 ± 53%
PAF-RC (n=5)	100%	264 ± 55% *	100%	133 ± 33 %
PAF-AH (n=3)	100%	109 ± 6%	100%	32 ± 5% *
PLA <sub>2</sub> (n=4)	100%	98 ± 11%	100%	76% ± 41%

MDA – Malondialdehyd; LOOH – Lipidhydroperoxide; PAF-RC – PAF-ähnliche Substanzen; PAF-AH – PAF-Acetylhydrolase; PLA<sub>2</sub> – Phospholipase-A<sub>2</sub>; Werte in % der Kontrolle ± Standardabweichung; Kontrollwerte Plasma: MDA: 1,88 ± 0,36 nmol/ml; LOOH: 2,17 ± 0,69 nmol/ml; PAF-RC: 0,41 ± 0,15pmol/ml; PAF-AH: 32,4 ± 3,3nmol/min/ml; Kontrollwerte BAL: MDA 0,79 ± 0,21 mmol/mg Protein; LOOH: 0,30 ± 0,12 mmol/mg Protein; PAF-RC: 0,06 ± 0,03 mmol/mg Protein; PAF-AH: 3,7 ± 1,1nmol/min/mg Protein; n: Anzahl der unabhängigen Experimente, \*p<0,05 (paariger Student's t-test) vs. Kontrolle.

Tabelle 4.2 zeigt, dass Hyperoxie zu einem signifikanten Anstieg der Lipidperoxidation im Plasma führt, wobei die Aktivität der antioxidativen Enzyme PAF-AH und PLA<sub>2</sub> unverändert bleibt. In der Lavage dagegen fällt die Aktivität der PAF-AH auf ein Drittel, während keine Veränderung der Lipidperoxidation oder der PLA<sub>2</sub>-Aktivität nachweisbar ist. Beide Ergebnisse passen insofern nicht zusammen, als eine verminderte PAF-AH-Aktivität zu erhöhten PAF-RC in der BAL führen sollte. Möglich ist, dass PAF-AH nicht in den Surfactant-Subfraktionen lokalisiert ist, die die Substrate der PAF-RC enthalten: Wir haben deshalb den Einfluss von Hyperoxie auf die Aktivität der PAF-AH in den verschiedenen Subfraktionen der Lavage untersucht. Die Surfactantsubfraktionen wurden dabei durch Differentialzentrifugation der Lungenlavagen isoliert (nach Guthmann 1999).

**Tabelle 4.3 PAF-AH-Aktivität in Lungenzellen und verschiedenen Fraktionen der BAL: Einfluss von *in vivo* Hyperoxie**

Fraktion	Kontrolle	Hyperoxie		
	[nmol/h/mg Protein]	[nmol/h/mg Protein]		% von Kontrolle
Makrophagen	46 ± 9	23 ± 7	*	50%
Typ-II-Pneumozyten	33 ± 3	36 ± 4		109%
BAL	222 ± 60	69 ± 11	*	31%
P3 (1000×g; 20min)	33 ± 17	30 ± 15		91%
P4 (60 000×g; 60min)	79 ± 30	31 ± 17		39%
P5 (100 000×g; 16h)	51 ± 18	16 ± 4	*	31%
Überstand	28 ± 2	15 ± 7	*	54%

BAL - Bronchoalveolären Lavage, Daten aus n=3 unabhängige Experimente, \*p<0,05 (paariger Student's t-test) vs. Kontrolle.

In den Fraktionen P4 und P5, die den Surfactantmonolayer repräsentieren (Magoon 1983, Guthmann 1995), messen wir die höchste PAF-AH-Aktivität. Zusammen mit der P3-Fraktion, die dem frisch sezernierten Surfactant entspricht, enthalten diese Fraktionen ca. 75% des totalen Surfactants. Es fällt auf, dass die PAF-AH-Aktivität unter Hyperoxie lediglich in den Makrophagen, der P5-Fraktion und im Überstand signifikant abnimmt, d.h. in den Anteilen des Surfactants, die für die Oberflächenfunktion des Surfactants weniger bedeutend sind.

Zusammenfassend finden wir unter Hyperoxie:

- Keine Veränderung der totalen antioxidativen Kapazität in Plasma, BAL und Typ-II-Zellen. In den Typ-II-Zellen kommt es zu einem Abfall des Anteils von reduziertem GSH und einer Erhöhung des Anteils von oxidiertem GSSG (Tabelle 4.1).
- Die Aktivität des antioxidativen Enzyms Catalase bleibt unverändert, die SOD-Aktivität dagegen steigt auf das dreifache an (Tabelle 4.1).
- In der Lunge ist keine Lipidperoxidation messbar, im Plasma zeigt sich jedoch ein Anstieg der MDA-, LOOH- und PAF-RC-Konzentration (Tabelle 4.2).
- Die plasmatische PAF-AH-Aktivität bleibt dabei unverändert, während die PAF-AH-Aktivität in der Lunge auf ein Drittel absinkt (Tabelle 4.2). Die PAF-AH nimmt v.a. in den funktionell weniger wichtigen Subfraktionen des Surfactants ab (Tabelle 4.3).

## **4.2 KULTIVIERUNG VON TYP-II-PNEUMOZYTEN IN GEGENWART VON H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

### **4.2.1 Einfluss der Zellkulturbedingungen**

Wie in Kapitel 1.7 diskutiert, wurde wegen widersprüchlicher Ergebnisse bei Untersuchungen mit dem Ganztiermodell ein vereinfachtes Modell gesucht: Dazu werden Typ-II-Pneumozyten in Primärkultur unter Basalbedingungen (Raumluft und 37°C) in der Kultur gehalten und in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Da nicht auszuschließen ist, dass allein die basalen Kulturbedingungen einen Stressfaktor darstellen, haben wir zunächst untersucht, inwieweit die Kultivierung der Zellen unter Basalbedingungen einen Einfluss auf das antioxidative Potential oder die HSP-Expression hat.

**Tabelle 4.4 Einfluss einer 18-stündigen Zellkultur auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme Catalase und SOD, die totale antioxidative Kapazität (TAC), den GSH-Gehalt sowie die HSP-Expression von Typ-II-Zellen**

	Zellsuspension	adhärente Zellen (18h)
Catalase (n=4)	100 ± 11%	63 ± 43%
SOD (n=3)	100 ± 19%	100 ± 30%
TAC (n=3)	100 ± 10%	139 ± 59%
GSH (n=3)	100 ± 12%	40 ± 16% *
HSP 32 (n=2)	1	9,02 / 3,04
HSP 60 (n=2)	1	1,07 / 0,47
HSP 70 (n=2)	1	2,29 / 1,51
HSP 90 (n=2)	1	1,39 / 1,81

SOD – Superoxiddismutasen-Aktivität, TAC – totale antioxidative Kapazität, GSH – Glutathion, HSP – Expression der Hitzeschockproteine, Vergleich von frisch isolierten Zellen (Zellsuspension) und adhärenen Zellen nach 18h Zellkultur. Werte in % Kontrolle ± Standardabweichung bzw. Optische Dichte (OD) der Western Blots für HSP; Kontrollwerte: Catalase 128 ± 14mU/mg Protein, SOD 7 ± 1,32mU/mg Protein, TAC 53 ± 5,3µmol/mg Protein, GSH 38 ± 4,1nmol/mg Protein; n: Anzahl der unabhängigen Experimente, \*p<0,05 (Student's t-test) vs. Zellsuspension.

Die Inkubation von Typ-II-Zellen unter Primärkulturbedingungen führt zu einem deutlichen Abfall der GSH-Konzentration, während die Zellkultur keinen Einfluss auf die totale antioxidative Kapazität (TAC) oder die SOD-Aktivität hat. Der Abfall der Catalase-Aktivität nach 18h ist nicht signifikant, fällt aber im Laufe der Kultur weiter und erreicht nach 48h signifikante Werte (nicht gezeigt).

Die Expression von HSP 32 steigt dagegen während der Kultivierung der Zellen deutlich an. HSP 70 und 90 zeigen einen weniger starken Anstieg in der Zellkultur, HSP 60 zeigt keine Veränderung.

#### 4.2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Clearance

Um auszuschließen, dass ein unterschiedlicher Gehalt von Makrophagen und Lymphozyten, die in den Typ-II-Zellpräparationen als Verunreinigung enthalten sind, unsere Messergebnisse verfälschen, haben wir die Zusammensetzung der Zellpräparation vor und nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Durchflußzytometer (FACS) gemessen: Dabei zeigt sich kein Unterschied von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten und Kontrollzellen (nicht gezeigt). Um des Weiteren den Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Vitalität der Typ-II-Zellen zu messen, haben wir nach Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum einen eine Vitalitätsfärbung mit 0,02% Trypanblaulösung durchgeführt, zum anderen wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellmedium gemessen: Beide Parameter zeigen ebenfalls keinen Unterschied zu den Kontrollzellen (nicht gezeigt).

In der Literatur gibt es unklare Angaben darüber, wie schnell H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus dem Inkubationsmedium von den Zellen aufgenommen und verstoffwechselt wird (Simon 1991, Engstrom 1990). Wir haben daher die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Clearance von adhärennten Typ-II-Pneumozyten untersucht (Tabelle 4.5). Um auszuschließen, dass unter unseren Inkubationsbedingungen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zellmedium abgebaut wird, haben wir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in zellfreiem Medium (DMEM) inkubiert, unter diesen Bedingungen bleibt die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration unverändert (nicht gezeigt).

**Tabelle 4.5 Einfluss der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubationszeit auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Clearance adhärennter Typ-II-Zellen**

Inkubationszeit mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					
0min	1min	2min	5min	10min	30min
500µM	225 ± 12µM *	96 ± 67µM *	41 ± 46µM *	0 ± 1µM *	0µM

Adhärennten Zellen wurden mit 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die verbleibende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Kulturmedium gemessen. Werte ± Standardabweichung; Daten aus n=3 unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (ANOVA) vs. Ausgangskonzentration.

Tabelle 4.5 zeigt, dass nach 10min kein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Kulturmedium mehr nachzuweisen ist, deshalb haben wir bei einigen der folgenden Versuche nach 10min die Zellen erneut mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltigem Medium inkubiert.

### 4.2.3 Antioxidative Abwehr

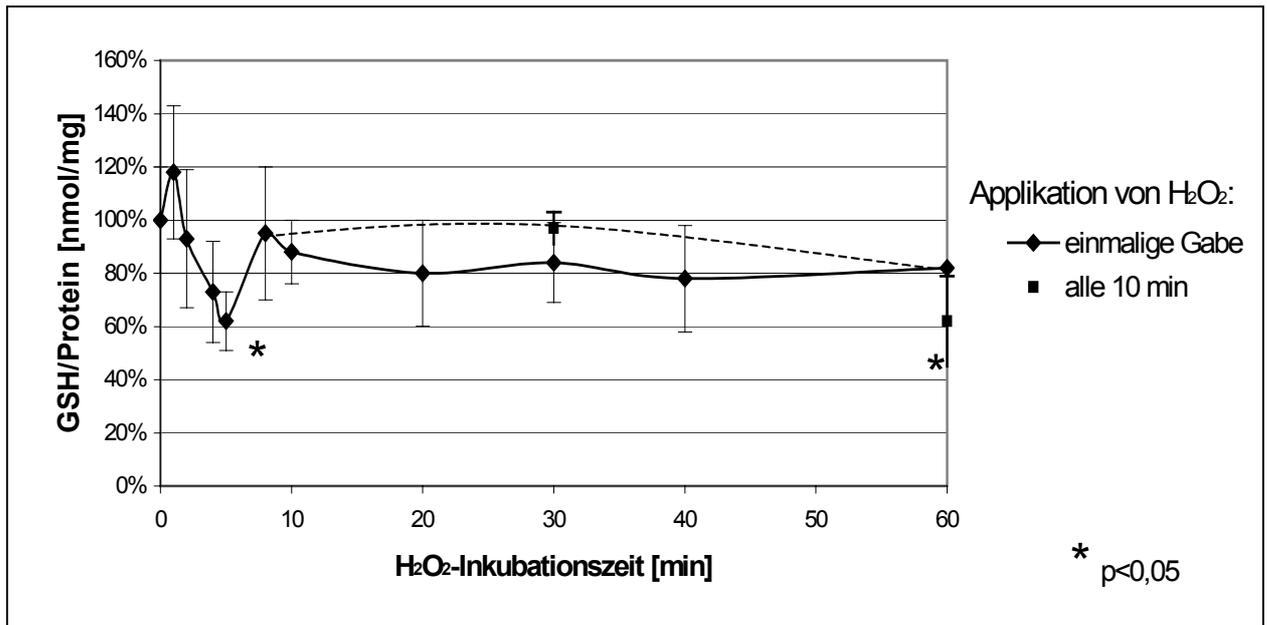
Eines der wichtigsten Schutzsysteme der Zellen gegen oxidativen Stress ist das Glutathion (GSH/GSSG)-System: Oxidiertes GSSG wird durch die Glutathionreduktase wieder in GSH umgewandelt, das dafür notwendige NADPH wird durch den Pentosephosphatzyklus mit dem Schlüsselenzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zur Verfügung gestellt (Griffith 1983). Unter oxidativem Stress kann GSH aber auch mit anderen SH-Gruppen zu sog. gemischten Disulfiden reagieren (Ishii 1992). Wir haben hier den Einfluss von  $H_2O_2$  auf die Konzentration des gesamten GSH gemessen.

Um das gesamte antioxidative Potential der Zellen abschätzen zu können, haben wir die totale antioxidative Kapazität (TAC) bestimmt, weiterhin die Konzentration der lipophilen Antioxidantien Vitamin E und der polyungesättigten Fettsäuren (PUFA), einem möglichem Substrat der ROS. PUFA werden dabei leicht oxidiert und können durch den Verbrauch von ROS die Oxidation anderer Zellbestandteile verhindern; sie wirken deshalb antioxidativ (Sies 1993).

**Tabelle 4.6 Einfluss der Inkubation adhärenter Typ-II-Zellen in Gegenwart von 0,5mM  $H_2O_2$  auf die Konzentration verschiedener Antioxidantien**

Zeit nach $H_2O_2$ -Gabe [min]	GSH n=5	TAC n=3	Vitamin E n=3	PUFA n=2
Kontrolle	100 ± 17%	100 ± 7%	100 ± 6%	100 ± 19%
5min $H_2O_2$	62 ± 19% *	68 ± 7% *	86% (n=1)	n.b.
10min $H_2O_2$	88 ± 25%	105 ± 18%	79% (n=2)	104 ± 32%
3×10min $H_2O_2$	97 ± 6%	95±12%	73 ± 7% *	118 ± 26%
6×10min $H_2O_2$	62 ± 17% *	113 ± 18%	n.b.	69 ± 36%

GSH – Glutathion-Konzentration, TAC – totale antioxidative Kapazität, Vitamin-E-Konzentration, PUFA – polyungesättigten Fettsäuren; Werte in % der Kontrolle ± Standardabweichung; Kontrollwerte: GSH 34,8 ± 5,9nmol/mg Protein; TAC 76,6 ± 5,36µmol/mg Protein, Vitamin E 6,0 ± 0,4ng/10<sup>6</sup> Typ-II-Zellen, PUFA/Palmitinsäure 0,43 ± 0,081. n: Anzahl der unabhängigen Experimente; \*p<0,05 (ANOVA: Dunnett's Test) vs. Kontrolle, n.b. nicht bestimmt.



Werte in % der mitgeführten Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung, s.a. Tabelle 4.6.

#### Abbildung 4.1 Einfluss der Inkubation adhärenter Typ-II-Zellen in Gegenwart von 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die GSH-Konzentration.

Bei der Inkubation von Typ-II-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verlaufen die GSH-Konzentration und die TAC zunächst parallel: Nach einem steilen Abfall innerhalb der ersten 5min wird die GSH-Konzentration schnell regeneriert und erreicht nach 10min wieder Kontrollwerte. Im weiteren Verlauf fällt die GSH-Konzentration aber im Gegensatz zur TAC wieder langsam ab und erreicht nach 6 $\times$ 10min 60% der Ausgangskonzentration ( $p < 0,05$ ). Es scheint daher, dass GSH die Typ-II-Zellen vor allem vor dem initialen oxidativen Stress schützt.

Unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fällt der Vitamin-E-Gehalt dagegen kontinuierlich über die gesamte Inkubationszeit ab, der Anteil des Vitamin E-Chinons bleibt dabei unverändert (nicht gezeigt). Die PUFA-Konzentration zeigt keinen Unterschied zur Kontrolle, auch die Anteile der Arachidonsäure (20:4) und der Linolsäure (18:2) werden durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht beeinflusst (nicht gezeigt). Es kann spekuliert werden, dass Vitamin E in der Lage ist, die PUFA effektiv vor oxidativer Schädigung zu schützen.

Neben der Konzentration der Antioxidantien haben wir die Aktivität der antioxidativen Enzyme Catalase und Superoxiddismutasen (SOD) in den Typ-II-Zellen gemessen (Tabelle 4.7).

**Tabelle 4.7 Einfluss der Inkubation adhärenter Typ-II-Zellen in Gegenwart von 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die zelluläre Aktivität der antioxidativen Enzyme Catalase und SOD**

Zeit nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gabe	Catalase	SOD
Kontrolle	100 ± 12%	100 ± 23%
10min	138 ± 60%	269 ± 142% *
30min	136 ± 42%	103 ± 28%
60min	172 ± 32% *	173 ± 18%
3×10min	117 ± 36%	259 ± 90% *#
6×10min	132 ± 39%	268 ± 97% *

SOD – Superoxiddismutasen. Werte in % von Kontrolle ± Standardabweichung; Kontrollwerte: Catalase 100 ± 12mU/mg, SOD 7,5 ± 1,73mU/mg; Daten aus n=3 unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (ANOVA) vs. Kontrolle, #p<0,05 (Student's t-test) vs. 30min.

Unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung steigt die Aktivität von Catalase und SOD in den Typ-II-Zellen zeitabhängig an; hierbei fällt allerdings auf, dass die SOD-Aktivität bei mehrfacher Gabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen stärkeren Anstieg gegenüber der einmaligen Gabe zeigt (signifikant für 30min vs. 3×10min).

#### 4.2.4 Surfactantlipidsynthese

Es ist bekannt, dass oxidativer Stress zu einem verminderten Gehalt von Surfactantlipiden in der BAL und den Typ-II-Zellen führt (Holm 1991, Crim 1995, Hudak 1995, Guthmann 2003). Dies kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen kann die Synthese der Surfactantlipide gehemmt werden, zum anderen können Surfactantlipide oxidiert werden. Wir haben daher in den folgenden beiden Abschnitte den Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation sowohl auf die Surfactantlipidsynthese als auch auf die Lipidperoxidation untersucht.

Eine optimale DPPC-Synthese ist an eine ausreichende Aufnahme exogener Palmitinsäure (16:0) durch Typ-II-Zellen gebunden, wir haben deshalb die initiale Fettsäureaufnahme nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation gemessen. Des Weiteren haben wir die PC-Synthese unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anhand des Einbaus von <sup>3</sup>H-Palmitinsäure und <sup>14</sup>C-Cholin in PC untersucht.

**Tabelle 4.8 Einfluss der Inkubation adhärenter Typ-II-Zellen in Gegenwart von 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die initiale <sup>3</sup>H-Palmitinsäure-(16:0)-Aufnahme sowie den <sup>14</sup>C-Cholin- und <sup>3</sup>H-16:0-Einbau in PC**

Zeit nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gabe	16:0-Aufnahme	Cholin-Einbau	16:0-Einbau
Kontrolle	100%	100 ± 37%	100 ± 44%
10min	n.b.	44 ± 3% *	55 ± 1% *
3×10min H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	75 ± 12%	29 ± 7% *	12 ± 3% *
6×10min H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	51 ± 13% #	18 ± 8% *	12 ± 1% *

Werte in % von Kontrolle ± Standardabweichung; Daten aus n=3 unabhängigen Experimenten; #p<0,05 (t-test) vs. Kontrolle; \*p<0,05 (ANOVA: Dunnett's Test) vs. Kontrolle; n.b. nicht bestimmt.

Sowohl die initiale Aufnahme von Palmitinsäure als auch der Einbau von Cholin- und Palmitinsäure sind unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation vermindert, wobei die Fettsäureaufnahme in geringerem Maße und erst bei 6×10min signifikant gehemmt wird. Da der Cholin- und 16:0-Einbau aber schon innerhalb von 10min reduziert sind, kann die verminderte Aufnahme exogener Palmitinsäure nicht der alleinige Grund der reduzierten PC-Synthese sein. Holm et al. finden in diesem Zusammenhang unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Holm 1991) und Hyperoxie (Holm 1988) eine Hemmung der SH-Gruppenhaltigen G3P-Acyltransferase (GPAT), einem Enzym, das den Einbau von Palmitinsäure in Glycerol-3-Phosphat katalysiert (s.a. Abbildung 1.2).

#### 4.2.5 Lipidperoxidation

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu einem Abfall der Konzentration des wichtigsten lipophilen Antioxidanz Vitamin E, daher ist eine Erhöhung der Lipidperoxidation wahrscheinlich. Um diese Arbeitshypothese zu prüfen, haben wir den Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Konzentration von Lipidhydroperoxiden (LOOH) und PAF-ähnlichen Substanzen (PAF-RC) sowie die Aktivität der PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) und der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) gemessen.

**Tabelle 4.9 Einfluss der Inkubation frisch isolierter Typ-II-Zellen in Gegenwart von 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Lipidperoxidation sowie die Aktivität der antioxidativen Enzyme PAF-AH und PLA<sub>2</sub> in frisch isolierten Typ-II-Zellen**

Zeit nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gabe	LOOH	PAF-RC	PAF-AH	PLA <sub>2</sub>
Kontrolle	100%	100%	100 ± 18%	100 ± 12%
5min H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	213%	510%	189 ± 3% *	184 ± 88% *
3×10min H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	241%	423 ± 18% *	59 ± 22% *	133 ± 62%

LOOH – Lipidhydroperoxide, PAF-RC – PAF-related Compounds, PAF-AH – PAF-Acetylhydrolase-Aktivität, PLA<sub>2</sub> – Phospholipase-A<sub>2</sub>-Aktivität; Werte in % von der Kontrolle ± Standardabweichung, Daten aus n=3 unabhängigen Experimenten (LOOH: n=2), Kontrollwerte: LOOH 32,3 nmol/mg Protein; PAF-AH 3607 dpm/min/μg Protein; PLA<sub>2</sub> 388 dpm/min/mg Protein; \*p<0,05 (ANOVA) vs. Kontrolle.

Unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> finden wir einen Anstieg der Konzentration von Lipidhydroperoxiden und PAF-RC, von den antioxidativen Enzymen zeigen sowohl PAF-AH als auch PLA<sub>2</sub> eine erhöhte Aktivität nach 5min. Die PAF-AH-Aktivität erreicht nach 10min wieder die Kontrollwerte (nicht gezeigt) und fällt bis zum Ende der Inkubationszeit auf 50%. Wir führen diese Veränderungen auf eine Hemmung der PAF-AH durch ROS zurück, z.B. durch Oxidation der SH-Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms oder durch oxidative Zerstörung des Enzymproteins. Die Aktivität der PLA<sub>2</sub> dagegen bleibt nach einem anfänglichen Anstieg leicht erhöht (nicht signifikant).

#### 4.2.6 Expression von Hitzeschockproteinen (HSP)

Hitzeschockproteine (HSP) sind sehr sensible Indikatoren für zellulären Stress verschiedenster Art, u.a. auch für oxidativen Stress. HSP 32, das auch Hämoxxygenase-1 (HO-1) genannt wird, katalysiert den ersten Schritt des oxidativen Zerfalls von Hämoglobin zu Bilirubin; hierbei ist HO-1 im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten HO-2 und 3 durch Stressfaktoren induzierbar (Wong 1997, Choi 1996). HSP 60 ist das einzige hier untersuchte Hitzeschockprotein, das im Mitochondrium lokalisiert ist. Als molekulares Chaperon unterstützt es die Faltung von neu synthetisierten oder beschädigten Proteinen (Wong 1997). HSP 70 und 90 regulieren dagegen die Initiation des programmierten Zelltods, indem sie die Reifung von Apoptosomen beeinflussen (Xanthoudakis 2000, Wong 1997).

**Tabelle 4.10 Einfluss der Inkubation frisch isolierter Typ-II-Zellen in Gegenwart von 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die HSP-Expression frisch isolierter Typ-II-Zellen**

Zeit nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gabe [min]	HSP-Expression			
	HSP 32	HSP 60	HSP 70	HSP 90
Kontrolle	1	1	1	1
60min H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,49 ± 1,66	2,25 ± 0,63	7,23 / 5,27	4,72 ± 2,47

HSP – Hitzeschockproteine, Optische Dichte (OD) der Western Blots nach Gelelektrophorese und Detektion mit monoklonalen Antikörper, Werte bezogen auf Kontrolle ± Standardabweichung, n.b. nicht bestimmt, Daten aus n=3 unabhängigen Experimenten (n=2 für HSP 70).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkt einen Anstieg der Expression der Stressproteine in frisch isolierten Zellen insbesondere von HSP 70 und 90; HSP 32, das als Hämoxygenase antioxidative Funktion hat, steigt dagegen nur wenig an. Inkubiert man jedoch adhärenente Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, findet sich nur ein geringer Anstieg der HSP-Expression (nicht gezeigt), vermutlich da die basale Expression von HSP in den Kontrollzellen schon durch die Zellkulturbedingungen erhöht ist (s. 4.2.1).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Belastung von isolierten Typ-II-Pneumozyten führt zusammengefasst zu:

- Einem kurzfristigen Abfall der zellulären GSH-Konzentration, die innerhalb von 10min wieder regeneriert wird und dann im Laufe der weiteren Inkubation langsam absinkt (Tabelle 4.6, Abbildung 4.1).
- Einem kontinuierlichem Absinken des Vitamin-E-Spiegels bei unveränderter PUFA-Konzentration (Tabelle 4.6).
- Typ-II-Zellen reagieren auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einem Anstieg der Aktivität ihrer antioxidativen Enzyme Catalase und SOD (Tabelle 4.7) und mit einer erhöhten Expression von Hitzeschockproteinen (Tabelle 4.10).
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation führt zu einem Abfall der Konzentration der Surfactantlipide, zum einen durch die Hemmung der Surfactantlipidsynthese; dabei wird sowohl die Palmitinsäure-Aufnahme als auch der Einbau von Palmitinsäure und Cholin in PC gehemmt (Tabelle 4.8). Zum anderen ist eine verstärkte Oxidation ungesättigter Surfactantlipide durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachweisbar (Tabelle 4.9).
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress führt zu einer oxidativen Hemmung der PAF-AH-Aktivität bei unveränderter Aktivität der PLA<sub>2</sub> (Tabelle 4.9).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 ZELLKULTURBEDINGUNGEN ALS STRESSFAKTOR

Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Isolation der Zellen aus dem Zellverband einen Stressfaktor darstellt und die Zellen sich unter optimalen Bedingungen in der Zellkultur von diesem Stress erholen. Dies unterstützen die Ergebnisse von Brandes und Finkelstein, die kurz nach der Isolation eine hohe Synthese der HSP 70, 53 und 25 zeigen, welche im Laufe der Zellkultur abnimmt und nach 18h nicht mehr nachweisbar ist (1989). In dieser Arbeit dagegen zeigen wir, dass die HSP-Expression direkt nach der Isolation relativ gering ist und während der Zellkultur insbesondere die Expression von HSP 32 stark zunimmt (Kapitel 4.2.1).

Brandes und Finkelstein bestimmen die Proteinsynthese der Hitzeschockproteine, indem sie isolierte Typ-II-Zellen je 1 Stunde in Leucin-depletiertem Medium halten und anschließend mit [<sup>3</sup>H]-Leucin inkubieren, d.h. auch die Kontrollzellen werden 2 Stunden in der Zellkultur bei 37°C und Raumluft gehalten. Es ist daher denkbar, dass nicht die Isolation aus dem Zellverband die Synthese der Hitzeschockproteine erhöht hat, sondern diese zweistündige Zellkultur. Ein anderer Unterschied ist, dass Brandes und Finkelstein die Typ-II-Zellen mit Elastase/Trypsin-Verdauung mit anschließender Gradientenzentrifugation isolieren, wohingegen wir die Zellen durch Elastase-Verdauung und IgG-Reinigung nach Dobbs et al. (1986) gewinnen. Letztlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Tierespezies zu den widersprüchlichen Ergebnissen zur HSP-Expression führen, da Brandes und Finkelstein Typ-II-Pneumozyten aus Kaninchenlungen isolieren, während wir Typ-II-Zellen aus Rattenlungen verwenden.

Es gibt allerdings weitere Hinweise, dass allein die basalen Zellkulturbedingungen eine oxidative Belastung für die Zellen darstellen: So finden Buckley et al. (1998) nach *in vivo* Hyperoxie eine erhöhte Expression von proapoptotischen Markern wie p53, p21 und Bax sowie vermehrte DNA-Fragmentation lediglich in adhärennten Zellen, nicht aber in frisch isolierten Zellen. Auch steht ein Anstieg der HSP-32-Expression, wie wir ihn für Typ-II-Zellen im Verlauf der Zellkultur gezeigt haben, oft in Zusammenhang mit oxidativem Stress (Choi 1996).

Welche Prozesse diesen *in vitro* Stress auslösen, ist nicht bekannt; zum einen könnte der höhere Sauerstoffpartialdruck der Raumluft im Vergleich zum Gewebe diesen Stress verursachen, andererseits ist aber auch eine unzureichende Versorgung mit Antioxidantien durch das Zellmedium denkbar. Für eine mangelhafte Versorgung mit Antioxidantien in der Zellkultur spricht, dass wir unter alimentärer Vitamin-E-Depletion einen ähnlich starken HSP-32-Anstieg wie in der Zellkultur finden (Topbas 2000), nicht jedoch unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Belastung (Kapitel 4.2.6). Auch zeigen Risé und Galli (1999), dass Hep-G2-Zellen nur 0,5% des Vitamin-E-Gehaltes von Lebergewebe enthalten und dass FKS aus dem Kulturmedium diese Differenz nicht ausgleichen kann, da es selbst nur wenig mehr Vitamin E als die Zellen enthält. Allerdings haben auch die Matrix, auf der die Zellen wachsen, und die Zelldichte Auswirkungen auf die Schädigung der Zellen in Basalkultur.

Die im Laufe der Zellkultur sinkende Catalase-Aktivität (signifikant nach 48h, Kapitel 4.2.1) könnte auf den Beginn einer Differenzierung der Typ-II-Zellen zu Typ-I-Zellen zurückzuführen sein, da Typ-I-Zellen im Vergleich zu Typ-II-Zellen eine um ein vielfaches geringere Aktivität an antioxidativen Enzymen wie Catalase oder SOD aufweisen (Panus 1989, Simon 1991, Kinnula 1992). Die meisten anderen Gruppen finden ebenfalls einen Rückgang der Aktivität von SOD (Aerts 1992) und Catalase (Kinnula 1992, Aerts 1992, Simon 1991) in der Zellkultur. Panus et al. (1989) dagegen messen einen Anstieg der SOD- und Catalase-Aktivität. Der GSH-Gehalt bleibt in einer der Untersuchungen unverändert (Simon 1991) bzw. steigt sogar an (Aerts 1992). Wir finden jedoch einen deutlichen Abfall der GSH-Konzentration unter Zellkulturbedingungen (Kapitel 4.2.1). Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Trägermedien, die für die Zellkultur verwendet werden, und die daraus folgenden unterschiedlichen Zeitpunkte in der Differenzierung zu Typ-I-Zellen zurückzuführen.

Zusammenfassend zeigen wir, dass in Abhängigkeit von der verwendeten Zellpräparation unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden, insbesondere Untersuchungen von adhärenenten Typ-II-Zellen spiegeln nicht die Wirkung verschiedener *in vitro* Behandlungen der Zellen wieder, sondern sind durch die basalen Kulturbedingungen verfälscht. Insgesamt müssen daher die Aussagen von einigen publizierten Ergebnissen relativiert werden.

Für weitere Untersuchungen ist es wichtig, die unzureichenden Zellkulturbedingungen zu verbessern, da es zum einen Versuche gibt, die z.B. aufgrund ihrer kurzen Inkubationszeit schwer in Zellsuspension mit der anschließenden Zentrifugation durchführbar sind. Zum anderen lässt sich die Reinheit der Typ-II-Zellen durch die Zellkultur verbessern: V.a. Erythrozyten kommen in unterschiedlichen Anteilen in der Zellpräparation vor und können die Untersuchungsergebnisse beeinflussen, sie sind aber durch fehlende Adhärenz in der Zellkultur relativ einfach von Typ-II-Zellen zu trennen (Dobbs 1986). Des Weiteren ist denkbar, dass Zelloberflächenproteine durch die Verdauung mit Elastase zerstört und im Laufe der Zellkultur regeneriert werden. Die begonnenen Untersuchungen zur Optimierung der Zellkultur (Panus 1989, Simon 1991, Aerts 1992, Buckley 1998) sind ein wesentlicher Beitrag, die experimentellen Schwierigkeiten und widersprüchlichen Ergebnisse zu minimieren.

## **5.2 ANTIOXIDATIVE ABWEHR**

### **5.2.1 Glutathion als schnelles Reaktionssystem nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Belastung**

Typ-II-Zellen enthalten relativ hohe Konzentrationen von GSH, welches sie aktiv aus dem Plasma durch das alveoläre Epithel in den Surfactant transportieren; der GSH-Gehalt der BAL ist so um ein Vielfaches höher als der des Plasmas (Brown 1992, Jenkinson 1988). Durch den Abbau von Peroxiden und Hydroperoxiden wirkt GSH antioxidativ, daneben reduziert es oxidierte Disulfide von Proteinen und erhält so ihre Struktur und Funktion (Jenkinson 1988, Cotgreave 1997).

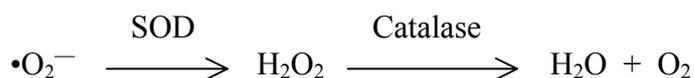
Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die GSH-Konzentration unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Belastung mit ihrem initialen steilen Abfall und der folgenden schnellen Erholung (Kapitel 4.2.3, Abbildung 4.1) zeigt die GSH-Konzentration von Erythrozyten, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert werden (Clahsen 1992, Moison 1995). Es wird daher vermutet, dass die Erythrozyten sowohl die pulmonalen Endothelzellen als auch die gesamte Lunge vor oxidativer Schädigung schützen (Moison 1995). Dieser Schutzmechanismus trifft allerdings für die Typ-II-Zellen nicht zu, da Typ-II-Zellen keine direkte Verbindung mit den Blutkapillaren haben und somit nicht in direkten Kontakt zu Erythrozyten treten können.

Zum antioxidativen Potential der Lunge trägt GSH aufgrund seiner hohen Konzentration in der Lunge und der eigenen antioxidativen Kapazität (Miller 1993) entscheidend bei. Das antioxidative Potential eines Gewebes kann z.B. durch die totale antioxidative Kapazität (TAC) erfasst werden. Der parallele Verlauf der TAC und der GSH-Konzentration mit dem steilen Abfall und der schnellen Regeneration innerhalb von 10min unter  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestätigt, dass die GSH-Konzentration maßgeblich für die TAC ist (Kapitel 4.2.3). Der Abfall der GSH-Konzentration nach  $6 \times 10$ min bei unveränderter TAC könnte mit der Annahme erklärt werden, dass andere Antioxidantien nach 60min den GSH-Abfall kompensieren.

Eine wichtige Einschränkung der TAC ist, dass sie nur im hydrophilen Medium gemessen wird und daher z.B. das lipophile Vitamin E nur zu 3% in die TAC im Plasma eingeht (Miller 1993). Entsprechend zeigt sich der Abfall der Vitamin-E-Konzentration nach 30min nicht in einem Abfall der TAC (Kapitel 4.2.3).

### 5.2.2 Erhöhte Catalase/Superoxiddismutasen-Aktivität nach $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress

$\text{H}_2\text{O}_2$  dringt innerhalb von 10min (Kapitel 4.2.2) in die Zelle ein und wird durch Catalase zu Sauerstoff und Wasser abgebaut.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann aber auch in der Fenton-Haber-Weiss-Reaktion durch Metallkatalyse (Abbildung 1.3) Superoxidanionradikale ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) generieren, die dann durch Superoxiddismutasen (SOD) wieder in das ungefährlichere  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurückverwandelt werden (nach Elstner 1983, Aebi 1983).



#### Abbildung 5.1 SOD/Catalase-System.

$\text{H}_2\text{O}_2$ -Inkubation erhöht die Catalase- und SOD-Aktivität der Typ-II-Zellen (Kapitel 4.2.3), wobei auffällt, dass insbesondere bei mehrfachem Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  die SOD-Aktivität stark ansteigt, wohingegen sie bei einmaliger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gabe nur leicht und erst nach 60min erhöht ist. Die Catalase-Aktivität jedoch wird durch ein- oder mehrfache  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gabe nicht beeinflusst (Kapitel 4.2.3). Eine mögliche Erklärung ist, dass die  $\bullet\text{O}_2^-$ -Radikale, die von den SOD abgebaut werden, hauptsächlich bei längerer und wiederholter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Exposition entstehen und dadurch eine stärkere Erhöhung der SOD-Aktivität induziert wird. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Expressionsrate beider Enzyme innerhalb des untersuchten Zeitintervalls stark differiert und dadurch die unterschiedlichen Aktivitäten nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gabe verursacht werden.

### 5.2.3 Einfluss von Hyperoxie auf die pulmonale antioxidative Abwehr

Cao et al. (1999) vermuten, dass unter Hyperoxie niedermolekulare Antioxidantien aus der Lunge in das Serum wandern, da sie unter Hyperoxie einen Abfall der pulmonalen neben einer Erhöhung der plasmatischen proteinfreien antioxidativen Kapazität finden. Wir können dagegen bei subletaler Hyperoxie *in vivo* keine Veränderung der gesamten totalen antioxidativen Kapazität (TAC) der Typ-II-Zellen nachweisen (Kapitel 4.1.1), allerdings haben wir auch die totale antioxidative Kapazität inklusive der Proteine gemessen.

Hyperoxie *in vivo* führt bei unveränderter Catalase-Aktivität zu einem starken Anstieg der SOD-Aktivität (Kapitel 4.1.1) in den Typ-II-Zellen. Wie schon in 5.2.2 diskutiert, kann spekuliert werden, dass unter Hyperoxie bevorzugt  $\bullet\text{O}_2^-$  entsteht, so dass vor allem die Aktivität der SOD ansteigt, während die Aktivität des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abbauenden Enzyms Catalase unverändert ist. Allerdings ist auch hier eine unterschiedliche Expressionsrate beider Enzyme im Beobachtungszeitraum nicht auszuschließen.

Auch andere Autoren fanden eine erhöhte SOD-Aktivität unter Hyperoxie, es wurde daher vermutet, dass die Superoxiddismutasen für die pulmonale Adaptation unter Hyperoxie eine entscheidende Rolle spielen (Chang 1995, Quinlan 1994). Allerdings zeigen Frank et al. (1978) und Baker et al. (1989), dass eine Erhöhung der Aktivität antioxidativer Enzyme nicht mit der Überlebensrate oder dem Grad der Lungenschädigung unter Hyperoxie korreliert.

### 5.3 $\text{H}_2\text{O}_2$ HEMMT DIE SURFACTANTLIPIDSYNTHESE

Mehrere Untersuchungen zeigen, dass unter oxidativem Stress sowohl die Gesamtmenge als auch einzelne Komponenten des Surfactants abnehmen (Holm 1988, Holm 1991, Crim 1995, Rice 1992). Zum einen könnte die Synthese von Surfactantbestandteilen gehemmt werden, zum anderen ihr Abbau so verändert sein, dass ein erhöhter Verbrauch von Surfactantlipiden z.B. durch Oxidation nicht kompensiert werden kann.

Wir finden neben einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Hemmung der PC-Synthese eine Verminderung des initialen Fettsäure-Uptakes bei Typ-II-Zellen (Kapitel 4.2.4). Palmitinsäure wird von Typ-II-Pneumozyten durch CD-36/FAT aufgenommen (Guthmann 1999), es ist daher denkbar, dass CD36/FAT durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert wird und dadurch nicht mehr in der Lage ist, Fettsäuren in die Zelle zu transportieren. Andererseits würde auch ein ATP-Mangel, wie er mehrfach unter  $\text{H}_2\text{O}_2$  beschrieben ist (LaCagnin 1990, Abernathy 1995, Crim 1995), die Fettsäureaufnahme vermindern können.

Der Einbau von Palmitinsäure und Cholin wird durch  $H_2O_2$  schon nach 5min gehemmt, zu einem Zeitpunkt, wo die Fettsäureaufnahme noch unverändert ist (Kapitel 4.2.4). Dies spricht dafür, dass die Hemmung von Schlüsselenzymen wie der Glycerol-3-Phosphat-Acetyltransferase (GPAT) (Abbildung 1.2) eine entscheidende Rolle spielt. Guthmann et al. (2003) zeigen in diesem Zusammenhang, dass die Hemmung der G3P-Acetyltransferase für die Reduktion der PC-Synthese bei Typ-II-Zellen aus Vitamin-E-depletierten Ratten verantwortlich ist. Da sowohl die GSH- als auch die Vitamin-E-Konzentration unter  $H_2O_2$  abfallen (Kapitel 4.2.3), ist denkbar, dass das SH-haltige Enzym GPAT nicht ausreichend vor Oxidation geschützt und so inaktiviert wird.

## 5.4 LIPIDPEROXIDATION

### 5.4.1 *In vivo* Hyperoxie verändert die Lipidperoxidation in der Lunge nicht

Die PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) reguliert den Abbau von PAF und PAF-ähnlichen Substanzen (PAF-RC) und spielt daher eine wichtige Rolle bei der akuten und chronischen Lungenschädigung. Die Hemmung der PAF-AH-Aktivität in der Lunge unter Hyperoxie führt allerdings nicht zu einem Anstieg von Produkten der Lipidperoxidation (Kapitel 4.1.2). Auch Ambrosio et al. (1994) finden keine erhöhte MDA-Konzentration bei einer durch ROS-induzierten Hemmung der PAF-AH im Plasma. Wir zeigen, dass in der P3-Subfraktion, die den frisch sezernierten Surfactant repräsentiert, ebenso wie in den Typ-II-Zellen, die PAF-AH-Aktivität durch Hyperoxie nicht beeinflusst wird, wohingegen in den Makrophagen, dem Überstand und der P5-Subfraktion die PAF-AH-Aktivität sinkt. Wir nehmen an, dass das Enzym durch die Struktur der Lamellarkörperchen in den Typ-II-Zellen und/oder durch das höhere antioxidative Potential der Zellen und der verschiedenen BAL-Fraktionen geschützt wird.

Aus unseren Ergebnissen schließen wir, dass weder die hyperoxisch-bedingte Inhibition der PAF-AH-Aktivität noch die direkte Oxidation der Lipide in den Alveolen an der hyperoxischen Lungenschädigung beteiligt sind. Es kann spekuliert werden, dass die empfindlicheren vaskulären Endothelzellen der Lunge (Crapo 1980, Engstrom 1990) unter Hyperoxie direkt geschädigt werden, die Typ-II-Pneumozyten und der Surfactant dagegen aufgrund ihres höheren antioxidativen Potentials keine erhöhte Lipidperoxidation aufweisen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in der Lunge entstandene Lipidperoxidationsprodukte ins Plasma transportiert werden und dann dort nachweisbar sind.

#### **5.4.2 *In vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu Lipidperoxidation in den Typ-II-Pneumozyten**

Unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress finden wir zunächst eine kurzzeitig erhöhte Aktivität von PAF-AH, die dann im Laufe der Inkubationszeit abnimmt (Kapitel 4.2.5); wir vermuten, dass die beschriebene Oxidation des PAF-AH-Proteins durch ROS (Triggiani 1997, Ambrosio 1994) diese Aktivitätsveränderungen auslöst. Die Aktivität der PLA<sub>2</sub> bleibt im Gegensatz zur PAF-AH nach 60min noch leicht, allerdings nicht signifikant, erhöht (Kapitel 4.2.5). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen finden Rice et al. (1992) unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen Anstieg der Konzentration von freien Fettsäuren durch eine verstärkte Aktivität der PLA<sub>2</sub>.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation führt nach 5min zu einem Anstieg der Konzentrationen von Lipidhydroperoxiden und PAF-RC in den Typ-II-Zellen, zu einem Zeitpunkt also, wo die Aktivitäten der PAF-AH und der PLA<sub>2</sub> sogar erhöht sind (Kapitel 4.2.5). Wir vermuten, dass die initial hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration die oxidative Abwehr der Zellen überwältigt und deshalb eine Oxidation der Lipide durch Antioxidantien wie Vitamin E nicht verhindert werden kann. Wie aber schon für Hyperoxie gezeigt, besteht auch unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress zwischen der ROS-induzierter Hemmung der PAF-AH und der Lipidperoxidation kein direkter Zusammenhang.

#### **5.5 ERHÖHTE EXPRESSION VON HITZESCHOCKPROTEINEN UNTER H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

HSP können die Expression anderer Proteine, z.B. der Akute-Phase-Proteine der Leber, stoppen und die Induktion der Apoptose verhindern. Bei der Induktion der HSP-Expression durch ein Stressagens wird auch der Schutz vor anderen Agentien erhöht (additiver Effekt). Verschiedenste Stressformen induzieren einen teilweise drastischen Anstieg der Expression zytoprotektiver HSP (Hightower 1991, Wong 1997, Wong 1998).

Die HSP-Expression wird durch den Transkriptionsfaktor „Heat Shock Factor“ (HSF) geregelt, der normalerweise als Monomer an Hitzeschockproteine bindet. Bindet z.B. HSP 70 bei oxidativem Stress an geschädigte Proteine, werden die Monomere freigesetzt und bilden Trimere, die dann als Transkriptionsfaktor wirken (Hightower 1991, Wong 1997).

Hämoxxygenase-1 (HO-1), oder HSP 32, katalysiert den ersten Schritt des oxidativen Zerfalls von Hämoglobin zu Bilirubin; dabei entstehen neben freiem Eisen und dem vasodilatativ wirkenden Kohlenmonoxid (CO), welches die Sauerstoffversorgung der beschädigten Zellen sichern kann (Wong 1997), auch die Antioxidantien Bilirubin und Ferritin. Unter  $H_2O_2$ -Stress steigt die Expression von HSP 32 allerdings nur gering an (Kapitel 4.2.6).

Im Gegensatz dazu finden wir, ebenso wie Polla et al. (1996), einen sehr starken Anstieg von HSP 70 unter  $H_2O_2$ -Belastung (Kapitel 4.2.6). Auch durch *in vivo* Hyperoxie (Ho 1996), beim Asthma bronchiale, beim Ischämie/Reperfusion- und Entzündungsstress (Wong 1997) kommt es zu einem Anstieg der HSP-70-Expression in der Lunge. HSP 70 reguliert durch verschiedene Mechanismen die Reifung der Apoptosomen und verhindert so die Caspase 9-Aktivierung und die Einleitung des letzten Teils der apoptotischen Kaskade (Xanthoudakis 2000). Insgesamt gilt HSP 70 als das durch Stress am stärksten induzierbare HSP und wirkt im Zytoplasma, im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien als Chaperon (Polla 1996, Wong 1997, Welch 1992).

$H_2O_2$  führt lediglich zu einem leichten Anstieg der HSP-90-Expression (Kapitel 4.2.6). HSP 90 wird mit der Aktivität des Steroidrezeptors in Verbindung gebracht und aktiviert zusammen mit HSP 70 verschiedene Transkriptionsfaktoren (Hightower 1991, Wong 1997), seine exakte Funktion ist aber noch nicht geklärt.

Insgesamt kann spekuliert werden, ob für die Typ-II-Zellen, da sie selbst einen relativ hohen Gehalt an Antioxidanten besitzen (Kapitel 1.4), die antioxidative Funktion von HSP 32 weniger entscheidend ist und seine Expression deshalb unter  $H_2O_2$  nur gering ansteigt. Dagegen finden wir unter  $H_2O_2$ -Stress eine vermehrte Expression der Stressproteine, für die eine antiapoptotische Wirkung gezeigt werden konnte. Weitere Untersuchungen müssen allerdings zeigen, ob dies tatsächlich eine aktive Gegenregulation zur Einleitung des programmierten Zelltodes der Typ-II-Zellen darstellt.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

Als wesentliche Ursache der akuten oder chronischen Lungenerkrankungen bei Neugeborenen wird eine oxidative Schädigung der Lunge durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) angenommen. Luo et al (1999) zeigen, dass die hyperoxische Lungenschädigung durch  $H_2O_2$  vermittelt wird. *In vivo* Hyperoxie und *in vitro*  $H_2O_2$ -Exposition als Simulation der Hyperoxie haben unter gleichen Versuchsbedingungen allerdings unterschiedliche Folgen: Milde Hyperoxie führt bei unveränderter Catalase-Aktivität und totaler antioxidativer Kapazität zu einem starken Anstieg der SOD-Aktivität in den Typ-II-Zellen, dagegen finden wir unter  $H_2O_2$ -Stress eine Erhöhung der beiden untersuchten antioxidativen Enzyme und einen kurzfristigen Abfall der totalen antioxidative Kapazität.

Die Schädigung der Lunge bei milder Hyperoxie wird nicht durch oxidative Veränderung der Surfactantlipide vermittelt, da der Abfall der PAF-Acetylhydrolase-Aktivität in der BAL keinen Einfluss auf die Lipidperoxidation hat. Die Hyperoxie-induzierte ROS-Bildung reicht demnach aus, um das Enzym zu hemmen, nicht jedoch, um eine vermehrte Lipidperoxidation zu induzieren. Im Plasma dagegen kommt es unter Hyperoxie zu einen Anstieg der Lipidperoxidation, dies hat aber keinen Effekt auf die PAF-AH-Aktivität. Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Interaktion zwischen Lunge und Plasma für die Genese der oxidativen Lungenschädigung näher zu charakterisieren.

Bislang wurde angenommen, dass die Isolation der Typ-II-Zellen aus dem Zellverband Stress für die Zellen darstellt. Wir zeigen dagegen in Übereinstimmung mit der neueren Literatur, dass nicht durch die Isolation, sondern als Folge der basalen Zellkulturbedingungen insbesondere die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP) innerhalb von 18h dramatisch ansteigt, des Weiteren sinkt die GSH-Konzentration der Typ-II-Zellen im Laufe der Zellkultur auf 40%. Primärkulturen von Typ-II-Zellen unter Basalbedingungen sind daher nur bedingt geeignet, um den Einfluss verschiedener Stressfaktoren auf den Stoffwechsel von Typ-II-Zellen zu untersuchen.

Oxidative Belastung von Typ-II-Zellen durch  $H_2O_2$  wird zunächst von Glutathion (GSH) kompensiert, das initial stark abfällt, aber innerhalb von 10min wieder regeneriert ist. Die Konzentration des lipophilen Antioxidanz Vitamin E fällt dagegen kontinuierlich über die gesamte Inkubationszeit ab. Die Typ-II-Zellen reagieren auf  $H_2O_2$ -Stress weiterhin mit einer erhöhten Expression von Hitzeschockproteinen und einer vermehrten Aktivität der antioxidativ wirkenden Enzyme Catalase und SOD (Adaptation).

Unter  $H_2O_2$  sinkt die Konzentration der Surfactantlipide: Neben einer vermehrten Lipidperoxidation wird die Synthese der Surfactantlipide gehemmt. Die Lipidsynthese nimmt ab, da zum einen die Aufnahme der Palmitinsäure in Zelle beeinträchtigt wird, zum anderen der Einbau von Palmitinsäure und Cholin in PC vermindert ist. Wir vermuten, dass der Hemmung des SH-haltigen Schlüsselenzyms Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) in diesem Prozess eine entscheidende Rolle zukommt.

Für weitere Untersuchungen ist zu beachten, dass Hyperoxie von Ratten die besonderen Bedingungen der beatmeten Früh-/Neugeborenen nur unvollkommen simuliert, da im Tiermodell im Gegensatz zum IRDS andere pathogenetische Faktoren und nicht der Surfactantmangel an erster Stelle stehen. Auch weisen Neugeborenen in den z.T. noch unreifen Geweben einen relativen Mangel an Antioxidantien auf. Daher wäre eine Möglichkeit, alimentären Vitamin-E-Mangel, wie er bei Neugeborenen vorkommt, mit Hyperoxie oder mit kurzzeitigem oxidativem Stress z.B. durch  $H_2O_2$ , zu kombinieren.

Für künftige Untersuchungen mit dem Ziel, Ansätze zur Therapie oder Prävention von Sauerstoff-assoziierten Erkrankungen zu finden, sind daher die Verbindungen zwischen Lipidperoxidation, dem Redox-/Antioxidantien-Status, von Apoptose und Inflammation sowie zentraler Regulationsmechanismen von entscheidender Bedeutung.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abernathy F und Pacht ER: Alteration of adenosine triphosphate and other nucleotides after sublethal oxidant injury to rat type II alveolar epithelial cells. *Am J Med Sci* 309: 140-145, 1995.
- Aebi H: Catalase, 273-285. In: Bergmeyer HU (Hrsg.): *Methods in Enzymatic Analysis* (III). 3<sup>rd</sup> ed. VCH, Weinheim New York 1983.
- Aerts C, Wallaert B and Voisin C: *In vitro* effects of hyperoxia on alveolar type II pneumocytes: Inhibition of glutathione synthesis increases hyperoxic cell injury. *Exp Lung Research* 18: 845-861, 1992.
- Alberts B, Bray D et al.: *Molekularbiologie der Zelle*, 699. 3. Aufl. VCH Weinheim, 1995.
- Ambrosio G, Oriente A et al.: Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor. *J Clin Invest* 93: 2408-2416, 1994.
- Ames BN, Shigenaga MK und Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7915-7922, 1993.
- Baker RR, Holm BA et al.: Development of O<sub>2</sub> tolerance in rabbits with no increase in antioxidant enzymes. *J Appl Physiol* 66: 1679-1684, 1989.
- Balaan M.R., Bowman L. et al.: Hyperoxia-induced alterations of rat alveolar lavage composition and properties. *Exp Lung Res* 21: 141-156, 1995.
- Bangham AD: Lung surfactant: how it does and does not work. *Lung* 165: 17-25, 1987.
- Berndt E und Bergmeyer HU: Anorganische Peroxide, 2165-2167. In: Bergmeyer HU (Hrsg.): *Methoden der enzymatischen Analyse* (III). 2. Aufl. Akademie Verlag Berlin 1970.
- Blank ML, Lee T et al.: A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J Biol Chem* 256: 175-178, 1981.
- Bligh EG und Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Physiol* 37: 911-917, 1959.
- Böhles H: Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *Int J Vitam Nutr Res* 67: 321-328, 1997.
- Brandes ME und Finkelstein JN: Induction of the stress response by isolation of rabbit type II pneumocytes. *Exp Lung Res* 15: 93-111, 1989.
- Brown LP, Bai C und Jones DP: Glutathione protection in alveolar type II cells from fetal and neonatal rabbits. *Am J Physiol* 262: L305-L312, 1992.
- Brumley GW, Tuggle B et al.: Disaturated phosphatidylcholine in rat lungs with altered numbers of type II alveolar epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 119: 461-470, 1979.
- Buckley S, Barsky L et al.: Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats. *Am J Physiol* 274: L714-L720, 1998.
- Buhl R, Bargon J und Caspary W: Therapie von Lungenerkrankungen mit Antioxidantien, 163-187. In: Böhles H (Hrsg): *Oxidativer Stress in der Kinderheilkunde*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1995.

- Cao G, Shukitt-Hale B et al.: Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants. *J Appl Physiol* 86: 1817-1822, 1999.
- Catignani GL und Bieri JG: Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in serum or plasma by high pressure liquid chromatography. *Clin Chem* 29: 708-712, 1983.
- Chang LY, Kang BH et al.: Immunocytochemical localization of the sites of superoxide dismutase induction by hyperoxia in rat lung. *Lab Invest* 73: 29-39, 1995.
- Choi AMK, Sylvester S et al.: Molecular responses to hyperoxia *in vivo*: relationship to increased tolerance in aged rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 74-82, 1995.
- Choi AM und Alam J: Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19, 1996.
- Clahsen PC, Moison RM et al.: Recycling of glutathione during oxidative stress in erythrocytes of the newborn. *Pediatr Res* 32: 399-402, 1992.
- Clark JM und Lambertsen CJ: Rate of development of pulmonary O<sub>2</sub> toxicity in man during O<sub>2</sub> breathing at 2.0 Ata. *J Appl Physiol* 30: 739-752, 1971.
- Cotgreave IA, Gerdes RG: Recent trends in glutathione biochemistry – glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Comm* 242: 1-9, 1998.
- Coursin DB, Chila HP et al.: Adaption to chronic hyperoxia. biochemical effects and the response to subsequent lethal hyperoxia. *Am Rev Respir Dis* 135: 1002-1006, 1987.
- Crapo JD, Barry BE et al.: Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis* 122: 123-143, 1980.
- Creuwels LA, van Golde LMG und Haagsman HP: The pulmonary surfactant system: Biochemical and clinical aspects. *Lung* 174: 1-39, 1997.
- Crim C und Longmore WJ: Sublethal hydrogen peroxide inhibits alveolar type II cell surfactant phospholipid biosynthetic enzymes. *Am J Physiol* 268: L129-L135, 1995.
- Dobbs RG, Gonzalez R und Williams MC: An improved method for isolating type II cells with high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 134: 141-145, 1986.
- Dole VP und Meimertz H: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J Biol Chem* 235: 2595-2599, 1960.
- Elstner EF, Youngman RJ et al.: Superoxide dismutase, 293-302. In: Bergmeyer HU (Hrsg.): *Methods in Enzymatic Analysis (III)*. 3<sup>rd</sup> ed. VCH, Weinheim New York 1983.
- Elstner EF und Schempp H: Grundzüge der Sauerstoffbiologie als Basis für das Verständnis radikalisch verlaufender Stoffwechsel- und Krankheitsprozesse, 1-21. In: Böhles H (Hrsg): *Oxidativer Stress in der Kinderheilkunde*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1995.
- Engstrom PC; Easterling L et al.: Mechanisms of extracellular hydrogen peroxide clearance by alveolar type II pneumocytes. *J Appl Physiol* 69: 2078–2084, 1990.
- Fleming BD und Keough KMW: Surface respreading after collapse of monolayers containing major lipids of pulmonary surfactant. *Chem Phys Lipids* 49: 81-86, 1988.

- Frank L, Bucher JR et al.: Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol* 45: 699-704, 1978.
- Frank L und Sosenko IRS: Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. *J Pediatr* 110: 106-110, 1987.
- Frey B, Haupt R et al.: Increase in fragmented phosphatidylcholine in blood plasma by oxidative stress. *J Lipid Res* 41: 1145-1153, 2000.
- Fujiwara K, Sato H et al.: Involvement of endotoxins or tumor necrosis factor- $\alpha$  in macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. *FEBS Lett* 431: 116-120, 1998.
- Gille JJP und Joenje H: Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat Res* 275: 405-414, 1992.
- Goerke J: Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta* 1408: 79-89, 1998.
- Griffith OW: Glutathione and glutathione disulphide, 521-529. In: Bergmeyer HU (Hrsg.): *Methods in Enzymatic Analysis (III)*. 3<sup>rd</sup> ed. VCH, Weinheim New York 1983.
- Guthmann F, Haupt R et al.: Alveolar surfactant subfractions differ in their lipid composition. *Int J Biochem Cell Biol* 27: 1021-1026, 1995.
- Guthmann F, Haupt R et al.: Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes. *Am J Physiol* 277: 191-196, 1999.
- Guthmann F, Kolleck I et al.: Vitamin E deficiency reduces surfactant lipid biosynthesis in alveolar type II cells. *Free Rad Biol Med*, 34 663-673, 2003.
- Haagsman HP und van Golde LMG: Lung surfactant and pulmonary toxicology. *Lung* 163: 275-303, 1985.
- Halliwell B und Gutteridge JMC: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8, 1990.
- Halliwell B und Gutteridge JM: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57(suppl): 715S-725S, 1993.
- Henderson WR Jr: Eicosanoids and platelet-activating factor in allergic respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis* 143: S86-S90, 1991.
- Hightower LE: Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66: 191-197, 1991.
- Ho YS, Dey MS und Crapo JD: Antioxidant enzyme expression in rat lung during hyperoxia. *Am J Physiol* 270: L810-L818, 1996.
- Holm BA, Notter RH et al.: Pulmonary physiological and surfactant changes during injury and recovery from hyperoxia. *J Appl Physiol* 59:1402-1409, 1985.
- Holm BA, Matalon S et al.: Type II pneumocyte changes during hyperoxic lung injury and recovery. *J Appl Physiol* 65: 2672-2678, 1988.
- Holm BA, Hudak BB et al.: Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated injury to type II cell surfactant metabolism and protection with PEG-catalase. *Am J Physiol* 261: C751-C757, 1991.
- Hudak BB, Tufariello J et al.: Inhibition of poly-(ADP-ribose) polymerase preserves surfactant synthesis after hydrogen peroxide exposure. *Am J Physiol* 269: L59-L64, 1995.

- Ishii Y, Partridge CA et al.: Tumor necrosis factor-alpha-mediated decrease in glutathione increases the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Clin Invest* 89: 794-802, 1992.
- Jaattela M, Wissing D et al.: Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med* 24: 249-258, 1992.
- Jenkinson SG, Black RD und Lawrence RA: Glutathione concentrations in rat lung bronchoalveolar lavage fluid: Effect of hyperoxia. *J Lab Clin Med* 112: 345-351, 1988.
- Junod AF: Oxygen free radicals und lungs. *Int Care Med* 15: S21-S23, 1989.
- Kappus H: Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance, 273-310. In Sies H. (Hrsg): *Oxidative Stress*. Academic Press, New York, 1985.
- Kim DK und Bonventre JV: Purification of a 100kDa phospholipase A<sub>2</sub> from spleen, lung and kidney: antiserum raised to pig spleen phospholipase A<sub>2</sub> recognizes a similar form in bovine lung, kidney and platelets, and immunoprecipitates phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Biochem J* 294: 261-270, 1993.
- Kinnula VL, Chang L et al.: Oxidants and antioxidants in alveolar epithelial type II cells: in situ, freshly isolated, and cultured cells. *Am J Physiol* 262: L69-77, 1992.
- Kohlschütter A, Agenu J et al.: Antioxidantienstatus im Kapillarblutproben: ein Instrument zum Studium radikal-gefährdeter Frühgeborener, 45-56. In: Böhles H (Hrsg): *Oxidativer Stress in der Kinderheilkunde*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1995.
- Kolleck I, Schlame M et al.: HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes. *Free Radic Biol Med* 27: 882-890, 1999.
- LaCagnin LB, Bowman L et al.: Metabolic changes in alveolar type II cells after exposure to hydrogen peroxide. *Am J Physiol* 259, L57-L65, 1990.
- Luo X, Christie NA et al.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates O<sub>2</sub> toxicity in cultured fetal rat distal lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 26: 1357-1368, 1999.
- Magoon MW, Wright JR et al.: Subfractionation of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity. *Biochim Biophys Acta* 750: 18-31, 1983.
- Matalon S und Egan EA: Effect of 100% O<sub>2</sub> breathing on permeability of alveolar epithelium to solute. *J Appl Physiol* 50: 859-863, 1981.
- Miller NJ, Rice-Evans C et al.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 84: 407-412, 1993.
- Minoo P, King RJ und Coalson JJ: Surfactant proteins and lipids are regulated independently during hyperoxia. *Am J Physiol* 263, L291-L298, 1992.
- Moison RMW, Haasnoot AA et al.: Pathogenesis and detection of oxygen toxicity in the newborn, 23-44. In: Böhles H (Hrsg): *Oxidativer Stress in der Kinderheilkunde*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1995.
- Nakamura H, Kim DK et al.: Heparin-enhanced plasma phospholipase A<sub>2</sub> activity and prostacyclin synthesis in patients undergoing cardiac surgery. *J Clin Invest* 95: 1062-1070, 1995.
- Ohkawa H, Ohishi N und Yagi K: Assay for lipidperoxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979.

- Panus PC, Matalon S und Freeman BA: Responses of type II pneumocyte antioxidant enzymes to normoxic and hyperoxic culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 25: 821-829, 1989.
- Payne CM, Bernstein C und Bernstein H: Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. *Leuk Lymphoma* 19: 43-93, 1995.
- Polla BS, Kantengwa S et al.: Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6458-6463, 1996.
- Quinlan T, Spivack S und Mossman BT: Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environ Health Perspect* 102 (Suppl 2): 79-87, 1994.
- Rice KL, Duane PG et al.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury causes Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent hydrolysis of phosphatidylcholine in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 263: L430-L438, 1992.
- Risé P und Galli C: Arachidonic and docosaehaenoic acids differentially affect the expression of fatty acyl-CoA oxidase, protein kinase C and lipid peroxidation in HepG2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60: 367-370, 1999.
- Rüstow B und Nakagawa Y: Species pattern of phosphatidylinositol from lung surfactant and a comparison of the species pattern of phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol synthesized de novo in lung microsomal fractions. *Biochem J* 254: 67-71, 1988.
- Rüstow B, Haupt R et al.: Type II pneumocytes secrete vitamin E together with surfactant lipids. *Am J Physiol* 265: L133-L139, 1993.
- Rüstow B, Kolley I et al.: Synthesis and secretion of plasmalogens by type-II pneumocytes. *Biochem J* 302: 665-668, 1994.
- Sies H (Hrsg): Oxidative stress – oxidants and antioxidants. Academic Press New York, 1991.
- Sies H: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219, 1993.
- Simon RH, Edwards JA et al.: Injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: dependence on phenotype and catalase. *Am J Physiol* 260: L318-L325, 1991.
- Sanders KA, Hueckstead T et al.: Regulation of oxidant production in acute lung injury. *Chest* 116: 56S-61S, 1999.
- Stafforini DM, Prescott SM et al.: Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *J Biol Chem* 262: 4223-4230, 1987.
- Stremmler KE, Stafforini DM et al.: An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *J Biol Chem* 264: 5331-5334, 1989.
- Tanaka T und Minamino H: Formation of platelet-activating factor-like phospholipids by Fe<sup>2+</sup>/ascorbate/EDTA-induced lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1166: 264-274, 1993.
- Tanaka T, Iimori M et al.: Platelet-aggregating effects of platelet-activating factor-like phospholipids formed by oxidation of phosphatidylcholines containing an sn-2-polyunsaturated fatty acyl group. *Biochim Biophys Acta* 1210: 202-208, 1994.
- Tölle A, Kolley I et al.: Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant and the turnover of surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E. *Biochim Biophys Acta* 1346: 198-204, 1997.

- Topbas ÖF, Jehle R et al.: An electrophoretic study of Vitamin E status and expression of heat shock proteins in alveolar type II cells and liver. *Electrophoresis* 21: 3552-3557, 2000.
- Triggiani M, De Marino V et al.: Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 94-100, 1997.
- Van Golde LMG, Batenburg JJ et al.: The pulmonary surfactant system. *News Physiol Sci* 9: 13-20, 1994.
- Von Neergaard K: Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik; Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamte Exp Med* 66: 373-394, 1929.
- Ward JA und Roberts RJ: Effect of Hyperoxia on phosphatidylcholine synthesis, secretion, uptake and stability in the newborn rabbit lung. *Biochim Biophys Acta* 796: 42-50, 1983.
- Wauer RR: Surfactanttherapie des neonatalen Atemnotsyndroms. Georg Thieme, Stuttgart New York, 1993.
- Weis CM, Cox CA, Fox WW: Oxygen Therapy, 538-545. In: Spitzer AR (Hrsg): *Intensive Care of the Fetus and Neonate*. Mosby, St. Louis, 1996.
- Welch WJ: Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063-1081, 1992.
- Wong HR und Wespe JP: Heat stress response and the lung. *Am J Physiol* 273: L1-L9, 1997.
- Wong HR, Menendez IY et al.: Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. *Am J Physiol* 275: L836-L841, 1998.
- Xanthoudakis S und Nicholson DW: Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol* 2: E163-E165, 2000.
- Young SL, Crapo JD et al.: Pulmonary surfactant lipid production in oxygen-exposed rat lungs. *Lab Invest* 46: 570-576, 1982.
- Zoeller RA, Morrand OH und Raetz CR: A possible role for plasmalogenes in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* 263: 11590-11596, 1988.

## 8 ANHANG

### VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND CHEMISCHEN FORMELN

16:0	Palmitinsäure
ABTS	2,2-Azino-bis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ANOVA	Analysis of Variance – Varianzanalyse
ADP	Adenosindiphosphat
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome – akutes Lungenversagen
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BSA	Bovine Serum Albumin – Rinderalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
CO	Kohlenmonoxid
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid – Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
Dpm	Disintegrations per minute – Zerfälle pro Minute
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethyl)-ether-4N'-tetraacetat
FACS	Durchflusszytometer
FAT	Fatty-Acid-Transferase
FKS	Fetales Kälberserum

---

G3P	Glycerol-3-Phosphat
GPAT	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
GPx	Glutathionperoxidasen
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSSG	(oxidiertes) Glutathion-Disulfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoproteine
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure
•HO	Hydroxylradikal
HO-1	Hämoxygenase-1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography – Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
HSP	Hitzeschockproteine
I.E.	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IRDS	Infant Respiratory Distress Syndrome – neonatales Atemversagen
KCl	Kaliumchlorid
KMnO <sub>4</sub>	Kaliumpermanganat
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoproteine
LOOH	Lipidhydroperoxide
MDA	Malondialdehyd
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaCO <sub>3</sub>	Natriumkarbonat
NAD	β-Nicotindiamid

---

NADPH	$\beta$ -Nicotindiamidmonophosphat
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
•NO	Nitritoxidradikal
n.s.	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanionradikal
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
OD	Optische Dichte
p53	Protein 53
PAF	Thrombozyten-aktivierender Faktor (1-O-Alkyl-2-Acetyl-Phosphatidylcholin)
PAF-AH	PAF-Acetylhydrolase
PAF-RC	PAF-related compounds – PAF-ähnliche Substanzen
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Phosphatidylcholin
PL	Phospholipide
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PUFA	Polyungesättigte Fettsäuren
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumlaurylsulfat
SH	Sulfhydryl
SOD	Superoxiddismutasen
TAC	Totale antioxidative Kapazität
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trolox®	3-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

ABBILDUNG 1.1 STOFFWECHSEL DER TYP-II-ZELLEN NACH VAN GOLDE ET AL. (1994) UND CREUWELS ET AL. (1997). .....	6
ABBILDUNG 1.2 PC-SYNTHESE (NACH HAAGSMAN UND VAN GOLDE 1985, ALBERTS 1997). ....	8
ABBILDUNG 1.3 FENTON-HABER-WEISS-REAKTION (NACH KAPPUS 1985, HALLIWELL 1990).	10
ABBILDUNG 1.4 PATHOGENESE DES NEONATALEN ATEMNOTSYNDROMS NACH WAUER (1993). .....	14
ABBILDUNG 1.5 FETTSÄUREOXIDATION NACH KAPPUS (1985), HALLIWELL UND GUTTERIDGE (1993). .....	16
ABBILDUNG 4.1 EINFLUSS DER INKUBATION ADHÄRENTER TYP-II-ZELLEN IN GEGENWART VON 0,5MM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> AUF DIE GSH-KONZENTRATION. ....	40
ABBILDUNG 5.1 SOD/CATALASE-SYSTEM.....	48

## TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1.1 ZUSAMMENSETZUNG DES SURFACTANTS [IN GEWICHTSPROZENT] .....	7
TABELLE 1.2: WICHTIGE REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS).....	10
TABELLE 1.3 WICHTIGE ANTIOXIDANTIEN IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN .....	11
TABELLE 1.4 EFFEKT VON <i>IN VIVO</i> HYPEROXIE: LITERATURÜBERSICHT (AUSWAHL).....	18
TABELLE 3.1 EINGESETZTE PROTEINMENGEN FÜR DIE HSP-BESTIMMUNG.....	31
TABELLE 4.1 EINFLUSS VON <i>IN VIVO</i> HYPEROXIE AUF ANTIOXIDATIVE PARAMETER VON FRISCH ISOLIERTEN TYP-II-ZELLEN.....	33
TABELLE 4.2 EINFLUSS VON <i>IN VIVO</i> HYPEROXIE AUF DIE LIPIDPEROXIDATION UND AUF DIE AKTIVITÄT DER ANTIOXIDATIVEN ENZYME PAF-AH UND PLA <sub>2</sub> IM PLASMA UND IN DER BRONCHOALVEOLÄRER LAVAGE (BAL) .....	34
TABELLE 4.3 PAF-AH-AKTIVITÄT IN LUNGENZELLEN UND VERSCHIEDENEN FRAKTIONEN DER BAL: EINFLUSS VON <i>IN VIVO</i> HYPEROXIE.....	35
TABELLE 4.4 EINFLUSS EINER 18-STÜNDIGEN ZELLKULTUR AUF DIE CATALASE- UND SOD-AKTIVITÄT, DIE TOTALE ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT (TAC) SOWIE DEN GSH-GEHALT VON TYP-II-ZELLEN .....	37
TABELLE 4.5 EINFLUSS DER H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -INKUBATIONSZEIT AUF DIE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -CLEARANCE ADHÄRENTER TYP-II-ZELLEN.....	38
TABELLE 4.6 EINFLUSS DER INKUBATION ADHÄRENTER TYP-II-ZELLEN IN GEGENWART VON 0,5MM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> AUF DIE KONZENTRATION VERSCHIEDENER ANTIOXIDANTIEN .....	39
TABELLE 4.7 EINFLUSS DER INKUBATION ADHÄRENTER TYP-II-ZELLEN IN GEGENWART VON 0,5MM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> AUF DIE ZELLULÄRE AKTIVITÄT DER ANTIOXIDATIVEN ENZYME CATALASE UND SOD .....	41
TABELLE 4.8 EINFLUSS DER INKUBATION ADHÄRENTER TYP-II-ZELLEN IN GEGENWART VON 0,5MM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> AUF DIE INITIALE <sup>3</sup> H-PALMITINSÄURE-(16:0)-AUFNAHME, CHOLIN- UND 16:0-EINBAU IN PC .....	42
TABELLE 4.9 EINFLUSS DER INKUBATION FRISCH ISOLIERTER TYP-II-ZELLEN IN GEGENWART VON 0,5MM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> AUF DIE LIPIDPEROXIDATION SOWIE DIE AKTIVITÄT DER ANTIOXIDATIVEN ENZYME PAF-AH UND PLA <sub>2</sub> IN FRISCH ISOLIERTEN TYP-II-ZELLEN ...	43
TABELLE 4.10 EINFLUSS DER INKUBATION FRISCH ISOLIERTER TYP-II-ZELLEN IN GEGENWART VON 0,5MM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> AUF DIE HSP-EXPRESSION FRISCH ISOLIERTER TYP-II-ZELLEN .....	44

## **DANKSAGUNG**

Die vorliegende Arbeit entstand von Oktober 1998 bis Juni 2000 im Lipidlabor der Klinik für Neonatologie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin im Rahmen des Projekts „Perinatale Lunge“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. R.R. Wauer.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. sc. nat. Bernd Rüstow für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung der Arbeit mit viel Geduld und kritischen Anregungen und für die sehr gute Arbeitsatmosphäre in seinem Labor.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei auch bei Herrn PD Dr. med. Michael Schlame für die Hilfe bei Themensuche, für die stets zuverlässige und bereitwillige Unterstützung meiner Arbeiten und die sehr gute Zusammenarbeit.

Für das zuverlässige und freundliche Miteinander im Labor danke ich der „Rüstow-Truppe“ Frau Dr. med. Ingrid Kolleck, Frau Ruth Herrmann, Frau Antje Maier und Frau Ullrike Noak, die mir stets mit Rat und Hilfe bei der täglichen Laborarbeit zur Seite standen und so für diese Arbeit unersetzlich wurden.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. sc. nat. Bettina Frey für die Messung der PAF-related Compounds und die gute Zusammenarbeit in diesem Projekt. Des Weiteren danke ich Frau Beate Diemar für die Vitamin-E- und PUFA-Messungen, Herrn Ömer Faruk Topbas für die Hilfe bei den Messungen der HSP und Frau Kruse und dem Labor von Prof. Schimke für die Möglichkeit, am Fluoreszenzspektrometer zu messen.

Meine Arbeit in diesem Projekt wurde durch ein Forschungsstipendium der Charité gefördert. Für diese finanzielle Hilfe möchte ich mich herzlich bedanken.

---

**LEBENS LAUF****Persönliche Daten**

---

Name	Roswitha Jehle
Geburtsdatum, -ort	30.11.1976 in Düsseldorf
Familienstand	Ledig

**Schulischer Werdegang**

---

1982 – 1986	Grundschule Willbeck, Erkrath
1986 – 1995	Gymnasium Hochdahl, Erkrath und Ludwigsgymnasium, Straubing
30.06.1995	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**Universitärer Werdegang**

---

1995 – 2002	Medizinstudium an der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin
10/2001 – 09/2002	Praktisches Jahr: Chirurgie (Spital Menziken, Aargau, Schweiz); Innere Medizin (University of Stellenbosch, Südafrika) und Anästhesie (Charité Campus Virchow, Berlin)
17.12.2002	Abschluss: Staatsexamen

**Extracurriculäre Ausbildung**

---

10/1997 – 03/2000	Englisch für Mediziner, abgeschlossen mit Hochschulmittelstufe (UNICERT® III)
-------------------	--

**Auslandsaufenthalt**

---

09/2000 – 03/2001	Forschungsaufenthalt im Rahmen des Berlin Biomedical Exchange Programm (BMEP) bei Paul M. Heerdt, M.D./Ph.D., Cornell University, New York, USA
-------------------	---

**Arbeitserfahrung**

---

03/2003 – 12/2003	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin – Kardiologie und Allgemeine Innere Medizin, Wenckebach-Krankenhaus, Berlin
Seit 01/2004	Ärztin im Praktikum, Anästhesie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin

**Teilaspekte dieser Arbeit wurden bisher in folgender Form veröffentlicht:**

Jehle R, Topbas ÖF, Rüstow B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Treatment Of Type-II-Pneumocytes: A Model Of Oxidative Stress In The Lung. 10<sup>th</sup> European Student's Conference, Berlin, Oktober 1999.

Topbas ÖF, Jehle R, Sinha P, Rüstow B: An Electrophoretic Study of Vitamin E Status and Expression of Heat Shock Proteins in Alveolar Type II Cells and Liver. *Electrophoresis* 21: 3552-3557, 2000.

Jehle R, Schlame M, Büttner C, Frey B, Sinha P, Rüstow B: Platelet-Activating Factor (PAF)-Acetylhydrolase and PAF-Like-Compounds in Lung Cells and Surfactant: Effects of Hyperoxia. *Biochim Biophys Acta* 1532: 60-66, 2001.

**Weitere Veröffentlichungen:**

Heerdt PM, Schlame M, Jehle R, Barbone A, Burkhoff D, Blanck TJJ: Disease-Specific Remodeling of Cardiac Mitochondria After a Left Ventricular Assist Device. *Ann Thorac Surg* 73: 1216-1221, 2002.

Schlame M, Towbin JA, Heerdt PM, Jehle R, DiMauro S, Blanck TJJ: Deficiency of Tetralinoleoyl-Cardiolipin in Barth Syndrome. *Ann Neurol* 51: 634-637, 2002.

Jehle R, Schlame M, Heerdt PM: Load-Dependent Remodeling of Mitochondrial Membranes in Human Heart Failures. 23<sup>rd</sup> Annual Meeting and Workshop of the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Vancouver, Kanada, Mai 2001.

### **EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, Roswitha Jehle geb. am 30.11.1976 in Düsseldorf, dass ich für diese Dissertation „Untersuchungen zur oxidativen Schädigung der Lunge: Hyperoxie *in vivo* und Kultivierung isolierter Typ-II-Pneumozyten in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.“ nur die angegebenen Hilfsmittel und Literatur verwendet habe und diese Arbeit nicht an irgendeiner anderen Stelle zur Promotion eingereicht habe.

Berlin, den 25.07.2004

A handwritten signature in black ink, reading "Roswitha Jehle". The signature is written in a cursive style with a large initial 'R'.

Roswitha Jehle