

KfK 5443 B
Dezember 1994

In vitro-Untersuchungen zum Einfluß von Ozon auf Immunfunktionen von Alveolarmakrophagen

M. M. Mosbach
Institut für Toxikologie

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Toxikologie

KfK 5443 B

**In vitro-Untersuchungen zum
Einfluß von Ozon auf Immunfunktionen
von Alveolarmakrophagen**

Monika M. Mosbach

Dissertation genehmigt von der Fakultät
für Bio- und Geowissenschaften der
Universität Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0303-4003

In vitro-Untersuchungen zum Einfluß von Ozon auf Immunfunktionen von Alveolar-makrophagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Ozon auf die Morphologie und Cytokinfreisetzung von Rinderalveolarmakrophagen (RAM), humanen Alveolarmakrophagen (HAM) und zu Makrophagen differenzierten HL-60 Zellen untersucht. Die Inkubation mit 0.25 bis 2.5 ppm Ozon wurde in zwei verschiedenen Expositionssystemen durchgeführt, die insofern realitätsnahe in vitro-Modelle darstellten, als sie einen direkten Kontakt der Zellen mit dem Gas ermöglichten.

Ozon führte bei Rinderalveolarmakrophagen zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der Freisetzung des Tumor Nekrose Faktors α (TNF), eines chemotaktischen Faktors (ChF) für Makrophagen und eines chemotaktischen Faktors für neutrophile Granulozyten (vermutlich C5a und IL8). Diese Effekte sind teilweise schon bei 0.25 ppm Ozon sehr ausgeprägt.

Die Phagozytose von Latex-Partikeln führte bei RAM zu keiner Veränderung der Cytokinsekretion, während die Phagozytose von Quarz- und denaturierten Albumin-Partikeln eine Freisetzung von TNF und ChF für Makrophagen bewirkte. Durch die Kombination von Ozon mit einer vorangehenden Phagozytose kam es jedoch bei keinem der Stäube zu einem synergistischen Effekt.

Die Zugabe von Dipalmitoyllecithin bewirkte einen geringeren Vitalitätsverlust und eine Verminderung des Anstieges der Mediatorfreisetzung. Auch Vitamin E zeigte diesbezüglich einen Schutzeffekt, der allerdings nur bei Vorinkubation der RAM auftrat.

Die Untersuchungen mit den humanen AM zeigten, daß RAM und HAM bezüglich der Freisetzung von TNF und IL8 nach Ozonbehandlung weitgehend übereinstimmten. Eine Sonderstellung nahmen die HAM von Sarkoidose-Patienten ein, deren Cytokinsekretion durch Ozon zum Teil gehemmt wurde. Die Makrophagen-ähnlichen humanen HL-60 Zellen konnten durch Ozon zwar zur Freisetzung chemotaktischer Faktoren und IL6, nicht aber zur TNF-Sekretion stimuliert werden.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß Ozon in vergleichsweise geringen Konzentrationen immunologische Funktionen von Alveolarmakrophagen beeinflussen kann. Es gibt jedoch diesbezüglich keine Hinweise auf synergistische Effekte bei einer Kombination von Ozon mit Staubpartikeln.

In vitro-Studies on the Effects of Ozone on Immunofunctions of Alveolar Macrophages

The influence of ozone on the morphology and cytokine release by bovine (BAM) and human (HAM) alveolar macrophages as well as by macrophage-like HL-60 cells was investigated. The exposure with 0.25 - 2.5 ppm ozone was performed in two different systems which allowed direct contact between ozone and the cells. With BAM ozone induced the release of Tumor Necrosis Factor α (TNF), a chemoattractant (ChF) for macrophages and a chemoattractant for neutrophils (probably C5a and IL8 respectively). These effects to some extent are already well defined with 0.25 ppm ozone.

The phagocytosis of latex-particles was without any effects on BAM whereas the phagocytosis of quartz or denatured albumin-particles caused the release of TNF and ChF for macrophages. No synergistic effects were observed by combination of particles with ozone.

The addition of dipalmitoyl lecithin was followed by a protective effect concerning loss of viability and mediator release. Analogous results were obtained by preincubation with vitamin E.

The results obtained with HAM were similar to those with BAM. However, in case of cells from sarcoidosis patients ozone could even show an inhibitory effect on cytokine production. After ozone exposure, the macrophage-like human HL-60 cells released chemotactic factors and IL6 but not TNF.

The results show that comparatively low concentrations of ozone can influence immunological functions of alveolar macrophages. There is, however, no evidence of synergistic effects between particles and ozone.

Abkürzungen

AM	Alveolarmakrophagen
AMAD	Activity Median Aerodynamic Diameter
Anti-	Antikörper gegen
BAL	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
ChF	Chemotaktischer Faktor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPL	L- α Dipalmitoyllecithin
FDA	Fluoresceindiacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum
Eos.	Eosinophile Granulozyten
HAM	Humane Alveolarmakrophagen
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hr	human rekombinant
KM	Kulturmedium
Ko	Kontrolle
IL1	Interleukin 1
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
LBP	LPS-bindendes Protein
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
Lym.	Lymphozyten
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MEM	Minimum Essential Medium
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid
O₃	Ozon
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMN	Polymorphonukleäre Neutrophile Granulozyten
ppm	parts per million
P/S	Penicillin/Streptomycin
RAM	Rinderalveolarmakrophagen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RSA	Rinderserumalbumin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TNF	Tumor Nekrose Faktor α
TPA	12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat
ZAS	Zymosan Aktiviertes Serum

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1. Puffer und Zellkulturmedien	9
2.1.1. Puffer	9
2.1.2. Zellkulturmedien	10
2.1.3. Kulturzusätze	11
2.1.3.1. Partikuläre Zusätze	11
2.1.3.2. Surfactant	12
2.1.3.3. Sonstige Zusätze	12
2.2. Zellmaterial für die Versuche mit gas- und partikelförmigen Schadstoffen	13
2.2.1. Rinderalveolarmakrophagen	13
2.2.1.1. Gewinnung der Rinderalveolarmakrophagen	13
2.2.1.2. Zellkulturbedingungen	14
2.2.2. Humane Alveolarmakrophagen	15
2.2.2.1. Herkunft der humanen Alveolarmakrophagen	15
2.2.2.2. Gewinnung der humanen Alveolarmakrophagen	17
2.2.2.3. Zellkulturbedingungen	17
2.2.3. HL-60 Zellen	18
2.2.3.1. Zellkulturbedingungen	18
2.3. Inkubationsversuche	19
2.3.1. Inkubation mit Stäuben	19
2.3.2. Inkubation mit Surfactant-Phospholipiden	19
2.3.3. Inkubation mit Vitamin E	20
2.3.4. Exposition der Zellen mit Ozon	20
2.3.4.1. Expositionssystem Wippe	20
2.3.4.2. Expositionssystem Voisin-Kammer	21
2.3.5. Gewinnung Cytokin-haltiger Überstände	23
2.3.6. Zeitlicher Versuchsablauf	24
2.4. Morphologische und biochemische Untersuchungen	25
2.4.1. Lichtmikroskopie	25
2.4.1.1. Hemacolorfärbung	25
2.4.1.2. Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung mit Trypanblau	25
2.4.2. Fluoreszenzmikroskopie	26
2.4.2.1. Vitalitätsbestimmung mit Ethidiumbromid und Fluoresceindiacetat	26
2.4.3. Rasterelektronenmikroskopie	27
2.4.4. Transmissionselektronenmikroskopie	27
2.4.5. Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Freisetzung	30

2.5.	Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung	30
2.5.1.	Tumor Nekrose Faktor α - Bestimmung mit Wehi-164 Zellen	30
2.5.1.1.	Allgemeines.....	30
2.5.1.2.	Kultur der Wehi-Zellen.....	31
2.5.1.3.	TNF-Bioassay	31
2.5.2.	Cytokinbestimmung mittels ELISA.....	32
2.5.2.1.	TNF α	33
2.5.2.2.	IL6.....	34
2.5.2.3.	IL8.....	34
2.5.3.	Bestimmung des chemotaktischen Faktors für Makrophagen	34
2.5.3.1.	48 well Mikrochemotaxis-Kammer-Methode	34
2.5.4.	Bestimmung des chemotaktischen Faktors für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten	36
2.5.4.1.	Gewinnung der polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten.....	36
2.5.4.2.	Leading-Front-Methode	37
2.5.5.	Charakterisierung der chemotaktischen Faktoren	38
2.5.5.1.	Neutralisation mit Anti-IL8, Anti-MIP-1 α und Anti-C5	38
2.5.5.2.	Molekulargewichtsbestimmung des ChF für Makrophagen	39
2.6.	Bezugsquellen	39
2.7.	Statistik	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Einfluß von Ozon auf Rinderalveolarmakrophagen - Vergleich zweier verschiedener Expositionssysteme	41
3.1.1.	Morphologische und biochemische Untersuchungen	41
3.1.2.	Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung	43
3.2.	Einfluß von Ozon auf HL-60 Makrophagen	45
3.2.1.	Fluoreszenzmikroskopie und Vitalitätsbestimmung	45
3.2.2.	Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung	45
3.3.	Einfluß von Ozon auf humane Alveolarmakrophagen	47
3.3.1.	Lichtmikroskopie und Vitalitätsbestimmung	47
3.3.2.	Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung	47
3.3.3.	Cytokinfreisetzung bei HAM von Sarkoidosepatienten	48
3.4.	Einfluß von Ozon in Kombination mit Stäuben	49
3.4.1.	Lichtmikroskopie	49
3.4.2.	Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung	50
3.5.	Einfluß von Ozon in Kombination mit Surfactant-Phospholipiden - Vergleich zweier verschiedener Expositionssysteme	52
3.5.1.	Fluoreszenzmikroskopie und Vitalitätsbestimmung	52
3.5.2.	Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung	53

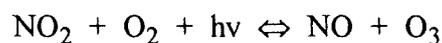
3.6.	Einfluß von Ozon in Kombination mit LPS	54
3.6.1.	Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung	54
3.7.	Einfluß von Ozon in Kombination mit Vitamin E	55
3.7.1.	Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung	55
3.8.	Charakterisierung der chemotaktischen Faktoren	55
3.8.1.	ChF für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten	56
3.8.2.	ChF für Makrophagen	56
4.	Diskussion	58
4.1.	Eignung von Makrophagen verschiedener Herkunft zur Untersuchung der Ozonwirkung	58
4.2.	Vergleich zweier verschiedener Expositionssysteme - Einfluß von Surfactant-Bestandteilen	60
4.3.	Einfluß von Ozon auf Makrophagen	62
4.3.1.	Ozon-induzierte Veränderungen an der Zellmembran von Alveolarmakrophagen	63
4.3.2.	Ozon-induzierte Veränderungen der Cytokinfreisetzung bei Alveolarmakrophagen	65
4.4.	Ozonwirkung auf Alveolarmakrophagen in Kombination mit anderen Stimulantien	68
4.4.1.	Stäube.....	68
4.4.2.	Lipopolysaccharid	69
4.5.	Charakterisierung der chemotaktischen Faktoren	70
4.5.1.	ChF für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten	70
4.5.2.	ChF für Makrophagen	71
4.6.	Zusammenfassende Diskussion	73
5.	Zusammenfassung	74
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Abbildungen	91

1. Einleitung

Ozon ist ein Reizgas mit stark oxidativem Potential, dessen gesundheitsschädigender Einfluß insbesondere auf den Respirationstrakt aus zahlreichen Studien bekannt ist. In der Troposphäre, d.h. in den unteren Luftschichten bis ca. 12 km Höhe, ist die Ozonkonzentration in den Sommermonaten der letzten Jahre erheblich angestiegen.

Die natürliche Ozonentstehung findet in der Stratosphäre in 12 bis 50 km Höhe statt, indem molekularer Sauerstoff (O₂) nach Absorption ultravioletter Strahlung (< 248 nm) in Atome zerfällt, die wieder mit molekularem Sauerstoff zu Ozon (O₃) reagieren (Kay und McFarland, 1991). Diese Schicht ist wichtig für das Leben auf der Erde, da sie die gefährliche kurzweilige UV-Strahlung der Sonne abschirmt.

Von der Stratosphäre gelangt das Ozon durch Vermischungsprozesse in die Troposphäre und erreicht natürlicherweise Konzentrationen von 0.02 bis 0.03 ppm. Lediglich in Bergregionen können höhere Konzentrationen durch Absinkprozesse aus größeren Höhen gemessen werden. So sind Spitzenwerte von über 0.1 ppm beispielsweise im Hochschwarzwald keine Seltenheit (Umweltbundesamt/VDI-Nachrichten, 1993). Atmosphärische Ozonkonzentrationen, die die natürlichen "Hintergrundwerte" überschreiten, beruhen auf der Entstehung von photochemischem Smog. Besonders in Ballungsgebieten, wo die Konzentrationen der lokalen Vorläufer Stickoxide, Kohlenmonoxide und Kohlenwasserstoffe aus dem Kraftverkehr sehr hoch sind, erfolgt unter dem Einfluß des Sonnenlichtes eine Photooxidation, die zur Entstehung großer Mengen Ozon führt (Wardlaw, 1993). Stickstoffdioxid (NO₂) gilt als Vorläufer des Ozons, da es durch Photolyse zu Stickstoffmonoxid (NO) und atomarem Sauerstoff (O) zerfällt. Dieser atomare Sauerstoff verbindet sich mit dem Luftsauerstoff zu Ozon. Stickstoffmonoxid reagiert nun mit Ozon zurück und es kommt zur Entstehung eines dynamischen Gleichgewichts:



Höhere Ozonkonzentrationen entstehen dadurch, daß andere Radikale in das Reaktionsgeschehen eingreifen und NO zu NO₂ oxidieren. Hierbei handelt es sich um HO₂-Radikale und Peroxiradikale, die aus Kohlenwasserstoffradikalen durch Reaktion mit Sauerstoff entstehen (Elstner, 1990).

Daß für die Ozonbildung neben der Sonneneinstrahlung in erster Linie antropogene Schadstoffquellen verantwortlich sind, bestätigen die hohen Maximalwerte in Großstädten wie z.B. Los Angeles. Aber auch in Deutschland wurde nach Auskunft der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (LfU) im Jahr 1992 18 mal der Halbstundenwert von 300 µg/m³ Ozon (entspricht 0.15 ppm) überschritten. Am 8.8.1992 wurde der höchste Wert Baden-

Württembergs mit $362 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (entspricht 0.181 ppm) in Wiesloch gemessen. In der Regel werden die höchsten Konzentrationen am späten Nachmittag erreicht (Umweltbundesamt, 1991).

Die hohen Ozonkonzentrationen in den Vorstädten und ländlichen Gebieten beruhen auf dem Transport der Luftmassen durch aufkommende Winde. In den Städten sinken mit Einbruch der Dunkelheit die Ozonwerte stark ab, was auf die NO-Emission während der abendlichen Hauptverkehrszeit und die fehlende Sonneneinstrahlung zurückzuführen ist. In den ländlichen Gebieten erfolgt dagegen keine solche massive Emission von NO, so daß dort das Konzentrationsniveau weitgehend über Nacht erhalten bleibt (Umweltbundesamt, 1991; Wardlaw, 1993). 1993 wurde beispielsweise in der Woche vom 2. bis 8. Juli ein Spitzenwert von $284 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (entspricht 0.142 ppm) in Witzenhausen (Hessen) gemessen (Umweltbundesamt/VDI-Nachrichten, 1993).

Der MIK (maximale Immissionskonzentrations)-Wert, der die Schwelle angibt, unterhalb der eine Belästigung im Sinne des Wohlbefindens des Menschen ausgeschlossen ist, beträgt $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ als Halbstundenwert (entspricht 0.06 ppm). Der EU-Wert von $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ als 1-Stundenwert (entspricht 0.09 ppm) ist der Schwellenwert für die Unterrichtung der Bevölkerung.

Abgesehen von Schadstoffaufnahmen über die Haut oder die Schleimhäute der Augen geht der Hauptwirkungspfad der Luftverunreinigungen im menschlichen Körper über den Atemtrakt. Aus zahlreichen in vivo-Experimenten und epidemiologischen Studien ist die Beeinträchtigung der Lungenfunktionen durch Ozoneinwirkung bekannt: Nach Exposition von gesunden jungen Männern mit 0.08 ppm Ozon für 6.6 Stunden bei leichter Arbeit fanden McDonnell et al. (1991) eine Verminderung der forcierten Vitalkapazität (FVC) und des forcierten expiratorischen Sekundenvolumens ($\text{FEV}_{1,0}$), sowie eine signifikante Erhöhung des Atemwegswiderstandes und der Atemwegsreaktivität. Auch Horstman et al. (1991) bestätigten, daß natürlich vorkommende Ozonkonzentrationen (0.012 ppm, 6.6 Stunden pro Tag) bei normaler Aktivität der Versuchspersonen einen Rückgang des forcierten expiratorischen Volumens auslösten. Allerdings kam es am zweiten und dritten Tag der Ozonexposition bereits zu einer Abschwächung der Antwort. Im Gegensatz dazu ging die durch Ozon erhöhte Atemwegsreaktivität nach Metacholin-Provokation nicht zurück. Bei Hunden nahm nach zweistündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon die Compliance (Lungendehnbarkeit) ab, während auch hier der Atemwegswiderstand zunahm (Fouke et al., 1991). Kinney et al. (1989) untersuchten die Lungenfunktion von Kindern in Tennessee über einen Zeitraum von zwei Monaten und konnten einen Zusammenhang zwischen der Ozonkonzentration und Kurzzeit-Lungenfunktionsveränderungen (FEV, FVC) nachweisen. Neben der Beeinträchtigung der allgemeinen Lungenfunktionen konnten Horstman et al. (1991) auch eine erhöhte Proteinmenge in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach zweistündiger Exposition mit

0.4 ppm Ozon zeigen. Andere Autoren beschrieben einen Anstieg der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, der Glutathion-Peroxidase (Rietjens et al., 1985) und des Kollagengehaltes (Choi et al., 1994), Epithelzellveränderungen (Pinkerton et al., 1993) und den Influx von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in die Lunge von Ratten (Bassett et al., 1988; Chang et al., 1992; Hiroshima et al., 1987; Shima und Adachi, 1991).

Epidemiologische Untersuchungen mit Kindern wiesen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen erhöhten Ozonkonzentrationen und dem Risiko für Atemwegserkrankungen hin (Romieu et al., 1992). Auch Frischer et al. (1993) folgerten aus ihren Untersuchungen mit Kindern, daß Ozon eine reversible Entzündungsantwort der Atemwege initiiert. Es ist sehr auffällig, daß zahlreiche epidemiologische Studien mit Kindern durchgeführt wurden. Kinder sind offensichtlich von Luftschadstoffen stärker betroffen als Erwachsene, da sie relativ zu ihrer Größe einen erhöhten Sauerstoffbedarf haben, und damit ihre Atemfrequenz höher ist. Außerdem verbringen sie häufig mehr Zeit im Freien als Erwachsene (Reigart et al., 1993). Eine weitere Gruppe, die besonders empfindlich auf erhöhte Ozonkonzentrationen reagiert, sind Allergiker und Asthmatiker, die eine Steigerung der bronchialen Allergieempfindlichkeit nach Ozonexposition zeigten (White et al., 1994, Rusznak et al., 1994; Jörres et al., 1993; Molfino et al., 1991; Eltschka et al., 1991).

Diese hier aufgeführten Untersuchungen sprechen dafür, daß durch Ozon zunächst zelluläre immunologische Funktionen betroffen sind. Da Ozon ein schlecht wasserlösliches Gas ist, wird es nicht wie beispielsweise SO₂ bereits in den oberen Atemwegen resorbiert, sondern ein großer Teil dringt tief in die Lungenperipherie bis zu den Alveolen vor (Hu et al., 1992). Hier werden neben den Epithelzellen die Alveolarmakrophagen, die eine Quelle wichtiger proinflammatorischer Mediatoren darstellen, von dem Schadgas angegriffen.

Vor diesem Hintergrund erscheinen die Untersuchungen zur Ozonwirkung auf die Immunfunktionen von Alveolarmakrophagen von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurden durch bronchoalveoläre Lavage AM aus Rinderlungen und menschlichen Lungen isoliert und in vitro mit verschiedenen Ozonkonzentrationen exponiert. Außerdem sollte untersucht werden, ob zu Makrophagen differenzierte HL-60 Zellen als Modell für diese Experimente geeignet sind.

Die in vitro-Versuche mit isolierten AM bzw. mit der Zelllinie haben gegenüber in vivo-Experimenten den Vorteil, daß der Einfluß von Ozon auf eine bestimmte Zielzelle betrachtet werden kann, d.h. andere Störfaktoren, die bei in vivo-Experimenten die Feststellung einer möglichen Ursache-Wirkungs-Beziehung erschweren, können in diesem System vollständig ausgeschlossen werden. Bei der Verwendung von Rinderlungen frisch geschlachteter Tiere steht eine besonders große Anzahl genetisch homogener Zellen zur Verfügung, die zahlreiche Parallelansätze ermöglichen und die Ergebnisauswertung erleichtern. Außerdem bringen Laboruntersuchungen am Menschen eine Reihe praktischer Einschränkungen und ethischer Bedenken mit sich. Ein anderer, bedeutender Aspekt, der sich bei epidemiologischen

Untersuchungen als Nachteil erweist, ist die Tatsache, daß Ozon in Kombination mit anderen Luftschadstoffen in der Außenluft auftritt, und daher eine genaue Zuordnung der gemessenen Effekte schwierig erscheint. Dieses Problem kann durch die kontrollierte Exposition mit dem Ozongenerator ausgeschlossen werden.

Für die vorliegenden Experimente wurden zwei verschiedene Expositionssysteme eingesetzt, die beide den direkten Kontakt der AM mit dem Schadgas ermöglichten. Bei der Inkubation in der "Voisin-Kammer" wurden die Zellen die gesamte Zeit in Gasphase gehalten, wobei sie sich mit Hilfe ihrer Pseudopodien, die durch die Membran hindurchgreifen, mit basal befindlichem Medium versorgen und von apikal mit Ozon begast werden. Im Gegensatz dazu wurden die AM für die Exposition auf der "Wippe" nach herkömmlicher Art in Kulturflaschen ausgesät und alternierend mit Ozon und Medium exponiert. Mit beiden Systemen sollte der Einfluß von Ozon in Abhängigkeit von der Konzentration und der Expositionsdauer untersucht werden. Als Parameter hierfür dienten zunächst Morphologie, Vitalität und Freisetzung der cytoplasmatischen LDH. Um mögliche immunomodulatorische Effekte von Ozon auf Alveolarmakrophagen zu bestimmen, wurde im folgenden auch die Sekretion der proinflammatorischen Mediatoren Tumor Nekrose Faktor α , Interleukin 8, Interleukin 6, sowie die Freisetzung chemotaktischer Faktoren für Makrophagen und für neutrophile Granulozyten untersucht.

Der Mensch ist niemals Ozon als alleinigem Schadstoff ausgesetzt, sondern immer einer Kombination verschiedener gasförmiger und partikulärer Noxen. Eine der Hauptaufgaben von Alveolarmakrophagen ist es, die Lunge vor inhalierten Staubpartikeln durch Phagozytose zu schützen. In Situationen, in denen sich größere Partikelmengen in der Lunge ansammeln, sezernieren die aktivierten Makrophagen Mediatoren, die in die Pathogenese akuter und chronischer Lungenerkrankungen involviert sind. In der Literatur gibt es zahlreiche Untersuchungen über den Einfluß von Kohle-, Quarz- und Asbeststäuben auf den Menschen, besonders im Hinblick auf die Entwicklung einer Fibrose, die mit Veränderungen der IL1- und TNF-Sekretion einhergeht (Borm et al., 1992; Gosset et al., 1991; Lassalle et al., 1990). Auch mit Ratten wurden viele Experimente durchgeführt, die eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Alveolarmakrophagen in der bronchoalveolären Lavage, sowie eine verstärkte Cytokinfreisetzung der Alveolarmakrophagen nach SiO₂-Exposition zeigten (Driscoll et al., 1990; Oghiso und Kubota, 1987; Ouellet et al., 1993). Im Gegensatz dazu gibt es nur wenige Untersuchungen über Kombinationswirkungen von Ozon und Partikeln. Da deren Einfluß auf die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren bislang noch gar nicht untersucht wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob eine Staubphagozytose mit anschließender Ozonexposition zu einer additiven oder möglicherweise sogar überadditiven Wirkung bezüglich der Cytokinfreisetzung von AM führt. Hinweise auf ein solches Verhalten gaben Untersuchungen von Morimoto et al. (1993), die

nach Rauchinhalation und Mineralfaserinkubation bei Rattenalveolarmakrophagen eine gesteigerte TNF-Sekretion fanden. Im Rahmen der Untersuchungen für diese Arbeit wurden Latex-, Quarz- und denaturierte Albumin-Partikel eingesetzt, wobei mit Latex als Inertstaub und mit Quarz als toxischem Teilchen zwei Extreme verwendet wurden.

Neben toxischen Staubpartikeln ist das sicherlich bekannteste Stimulans für die Aktivierung von Makrophagen eine bakterielle Infektion. Zellmembranen gramnegativer Bakterien enthalten das Lipopolysaccharid (LPS), dessen Lipid A-Komponente, ein phosphoryliertes Hexosamin-Disaccharid mit langen Fettsäureketten, die Freisetzung einer Vielzahl von Cytokinen, Lipidmediatoren und Komplementfaktoren auslöst (Rietschel et al., 1982). In hohen Dosen führt LPS zum septischen Schock (Welbourn und Young, 1992). Da Ozon ebenfalls in die Freisetzung immunologischer Mediatoren eingreift, war die Untersuchung der Wirkung einer Kombinationsapplikation von besonderem Interesse. In der Literatur ist zwar eine allgemeine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber Bakterieninfektionen nach Ozonexposition beschrieben (Gilmour et al., 1991 und 1993a und b), allerdings liegen keine genaueren Erkenntnisse über eine mögliche Beeinflussung von Ozon auf die Stimulierbarkeit der Cytokinsekretion von AM vor. Aus diesem Grund sollte im folgenden untersucht werden, ob die LPS-induzierte, Rezeptor-vermittelte Mediatorfreisetzung durch eine vorausgehende Ozonexposition verändert wird.

Mit den für die vorliegende Arbeit verwendeten Expositionssystemen, die einen direkten Kontakt der AM mit dem Schadgas ermöglichten, sollte die Situation in der Lunge möglichst naturgetreu imitiert werden. Allerdings ist in vivo die Oberfläche einer jeden Alveole mit Surfactant ausgekleidet. Surfactant setzt sich zu ca. 90% aus Lipiden und zu ca. 10% aus verschiedenen Surfactant-Proteinen (SPA, SPB, SPC und SPD) zusammen. Dipalmitoyllecithin (DPL) bildet mit 70-80% den Hauptbestandteil des Lipidgehaltes. Die Haupteigenschaft des Surfactant ist die Verminderung der Oberflächenspannung zur Vermeidung eines expiratorischen Kollapses der Alveolen. Daneben wird ihm auch eine mögliche Funktion bei der Lungenverteidigung zugeordnet (Harwood, 1987; Hamm et al., 1992). Um die verwendeten in vitro-Systeme der Realität noch etwas besser anzupassen, erhielten die Makrophagen vor Expositionsbeginn einen Zusatz von Dipalmitoyllecithin bzw. von Alveofact, einem kommerziell erhältlichen Surfactant-Präparat aus Rinderlungen, das seine klinische Anwendung bei Kindern findet, die mit einem akuten Atemnotsyndrom geboren werden. Mit dieser Versuchsanordnung sollte untersucht werden, ob Surfactant die Ozonwirkung auf die AM verändert, wobei sowohl eine Verstärkung als auch ein Schutzeffekt denkbar wären. Außerdem könnte eine solche Beeinflussung Hinweise auf den Mechanismus der Ozontoxizität geben.

Um die Ozonwirkung etwas genauer zu untersuchen, wurde auch Vitamin E eingesetzt. Vitamin E (oder DL- α Tocopherol) ist ein wichtiges Antioxidans, das aufgrund seiner lipo-

philen Eigenschaft in die Membran eindringen kann und so Schutz vor freien Radikalen bietet (Packer et al., 1979). Seine cytoprotektive Wirkung ist bereits von vielen Autoren beschrieben worden (Conti et al., 1993; Mayer, 1992; Menzel, 1993). In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob durch den Zusatz des Radikalfängers zum Kulturmedium die Ozon-induzierte Cytokinfreisetzung beeinflusst wird. Dies würde eine durch Ozon vermittelte Bildung freier Radikale bestätigen.

Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich bei den untersuchten Cytokinen um TNF, IL8, IL6 sowie um chemotaktische Faktoren für Granulozyten und Makrophagen. Diese sind wichtige proinflammatorische Mediatoren, die alle auch bei einer Stimulation der AM mit LPS sezerniert werden.

Der humane Tumor Nekrose Faktor α hat ein Molekulargewicht von 17 kDa, das Protein liegt als Trimer vor (Rock und Lowry, 1991). Es wird in erster Linie von stimulierten Makrophagen und auch von Blut-Monozyten produziert (Martinet et al., 1988; Nii et al., 1993). Der Tumor Nekrose Faktor erhielt seinen Namen aufgrund seiner Funktion als Auslöser hämorrhagischer Nekrosen bestimmter Tumoren. Später zeigte sich, daß TNF ein genereller Entzündungsmediator ist. Als solcher stimuliert er die Synthese von IL6 und IL8 (Sheron und Williams, 1992). Die Injektion von TNF führt zum septischen Schock, der mit Lungenödemen und Gewebeverletzungen einhergeht und letztlich zum Tod führen kann (Tracey und Cerami, 1989). Bei lokalen Infektionen oder Entzündungen stellt TNF in kleinen Mengen jedoch einen lebenswichtigen Mediator dar, der die Immunantwort erhöht (Tracey und Cerami, 1989). Zu den Wirkungen, die TNF bei Zielzellen verursacht, gehören u.a. Veränderungen des Arachidonsäure-Metabolismus (Fletcher et al., 1993; Hayakawa et al., 1991), Bildung freier Radikale (Das et al., 1990), Fibroblastenproliferation und Kollagenproduktion der Fibroblasten (Elias und Reynolds, 1990), sowie die Beeinflussung der Neutrophilen-Chemotaxis (Vollmer et al., 1992; Kownatzki et al., 1988). Zum Teil überschneiden sich die Aktivitäten von TNF mit denen von IL1, obwohl beide verschiedene Rezeptoren besitzen (Van Deuren et al., 1992).

Interleukin 8 ist ein 8 kDa schweres Protein, das aus 79 Aminosäuren besteht. Es gehört zu der sogenannten C-X-C-Gruppe der Chemokine mit einem Glutamin-Rest zwischen seinen ersten beiden Cystein-Resten und wird von vielen verschiedenen Zellarten nach Stimulation mit Endotoxin, Phorbol ester, TNF oder IL1 sezerniert. IL8, das früher auch mit dem Namen NAP1 (Neutrophil Activating Peptide 1) bezeichnet wurde, sorgt im Falle einer Infektion dafür, daß neutrophile Granulozyten an den Entzündungsort gelockt werden. Daneben induziert es bei diesen Zellen die Degranulation sowie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies

(Fujishima et al., 1993; Strieter et al., 1992, Baggiolini und Clark-Lewis, 1992, Schröder, 1992).

Bei Interleukin 6 handelt es sich um einen Schlüsselmediator der komplexen Kaskade der Akute-Phase-Antwort. Als solcher ist er involviert in die Entstehung von Fieber, die Synthese von Akute-Phase-Proteinen und die Erhöhung des Glucocorticoidgehaltes im Serum (Brach und Herrmann, 1992). Die IL6-Freisetzung kann ebenfalls stimuliert werden durch LPS, TNF und IL1 (Van Deuren et al., 1992; Evans et al., 1992).

Der Nachweis dieser drei Cytokine konnte für humane Makrophagen mit ELISA-Testkits durchgeführt werden. Der von Rinderalveolarmakrophagen sezernierte Tumor Nekrose Faktor wurde mit der TNF-sensitiven Wehi 164-Zelllinie quantifiziert.

Im Falle einer entzündlichen Lungenreaktion sind chemotaktische Faktoren dafür verantwortlich, daß weitere Abwehrzellen an den Infektionsort gelockt werden, um dort ihre immunologischen Aufgaben zu übernehmen. Da von mehreren Autoren nach Ozonexposition ein Anstieg der Zahl der Granulozyten (Koren et al., 1989; Driscoll et al., 1993) und auch der Makrophagen (Wright et al., 1987; Hotchkiss et al., 1989) in der Lunge beschrieben worden war, stellten die Untersuchungen zur Sekretion von chemoattraktiv wirkenden Faktoren und deren grobe Charakterisierung einen wichtigen Aspekt der vorliegenden Arbeit dar. Die Bestimmung der Konzentration der chemotaktischen Faktoren für Makrophagen bzw. für neutrophile Granulozyten in den Kulturüberständen erfolgte mit Hilfe von Bioassays. Hierbei wurde die Migration der Zellen durch die Poren eines Filters (Polycarbonatfilter) bzw. in einen Filter hinein (Nitrozellulosefilter) ausgewertet.

Durch solche Bioassays kann zwar die chemotaktische Aktivität der Proben quantifiziert werden, allerdings liefern sie keine Information über die Struktur oder Anzahl dieser Faktoren. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe von Antikörpern gegen bekannte chemotaktische Faktoren eine nähere Charakterisierung angestrebt werden. Desweiteren wurde versucht, das Molekulargewicht mit Membranfiltrationsexperimenten einzugrenzen.

Zusammenfassend können die Ziele der vorliegenden Arbeit folgendermaßen formuliert werden:

1. Vergleichende Untersuchungen zum Einfluß von Ozon auf die Morphologie und die Cytokinfreisetzung durch

- Rinderalveolarmakrophagen
- HL-60 Makrophagen
- humane Alveolarmakrophagen

bei direkter Exposition der Zellen mit dem Gas in zwei verschiedenen Expositionssystemen.

2. Prüfung der modifizierenden Wirkung von Partikeln, LPS, Surfactant-Bestandteilen und Vitamin E auf die Effekte von Ozon.

3. Charakterisierung der Ozon-induzierten chemotaktischen Faktoren für Makrophagen und für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten.

2. Material und Methoden

2.1. Puffer und Zellkulturmedien

2.1.1. Puffer

PBS

137.0 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
0.9 mM	CaCl ₂
0.5 mM	MgCl ₂ x 2H ₂ O
6.5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
1.5 mM	KH ₂ PO ₄

Der pH-Wert wurde mit HCl (37%) auf 7.4 eingestellt.

PBS mit Penicillin/Streptomycin (P/S)

450 ml	PBS (s.o.)
5 ml	P/S (10 000 U/ml Penicillin und 10 000 µg/ml Streptomycin)

PBS ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺

137.0 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
6.5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
1.5 mM	KH ₂ PO ₄

Der pH-Wert wurde mit HCl (37%) auf 7.2 eingestellt.

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

0.185 g/l	CaCl ₂ x H ₂ O
0.100 g/l	MgSO ₄
0.400 g/l	KCl
8.000 g/l	NaCl
0.448 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
1.000 g/l	K ₂ HPO ₄
1.000 g/l	D-Glucose

Diese Zutaten wurden mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und mit 0.35 g NaHCO₃ versetzt. Vor der Sterilfiltration (Millipore Schlauchpumpe, Medium-sterivex GV-Filter-einheit mit Füllglocke) wurde der pH-Wert mit 1N HCl oder 1N NaOH auf 7.4 eingestellt.

HBSS mit Rinderserumalbumin (RSA): für die Primärkultur der polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten

HBSS (s.o.)

0.5% RSA

2.1.2. Zellkulturmedien

KM 1: für die Primärkultur der bovinen und humanen Alveolarmakrophagen

450 ml RPMI 1640

5 ml P/S (10 000 U/ml Penicillin und 10 000 µg/ml Streptomycin)
oder

5 ml Tetracyclin-Hydrochlorid (Stammlösung: 1 mg/ml)

KM 2: für die in vitro-Kultur unter 20 Stunden

450 ml RPMI 1640

5 ml P/S

50 ml fötales Kälberserum (FCS, 30 Minuten hitzeinaktiviert bei 56°C)
und gegebenenfalls

5 ml Amphotericin B (Stammlösung: 250 µg/ml)

KM 3: für die in vitro-Kultur über 20 Stunden

450 ml RPMI 1640

50 ml FCS (hitzeinaktiviert s.o.)

5 ml P/S

5 ml Amphotericin B (s.o.)

KM 4: für die Kultivierung von HL-60 Zellen

450 ml RPMI 1640

75 ml FCS (hitzeinaktiviert s.o.)

7.5 ml L-Glutamin (200 mM)

5 ml MEM 100 (Non Essential Aminoacids)

5 ml Natriumpyruvat (100 mM)

5 ml P/S

KM 5: für die Kultivierung von Wehi-164 Zellen

450 ml RPMI 1640

50 ml FCS (hitzeinaktiviert s.o.)

5	ml	L-Glutamin (200 mM)
5	ml	P/S

2.1.3. Kulturzusätze

2.1.3.1. Partikuläre Zusätze

Quarz (SiO₂)

Bei den verwendeten Staub-Partikeln handelt es sich um eine Subfraktion des Quarzes Sikron F 600 (Palas GmbH, Karlsruhe), die mit Hilfe eines five stage cyclone (Southern Research Inst. Alabama) bei der Fa. Palas hergestellt wurde. Die Röntgenstrukturanalyse (Prof. Politis, IFKP, KfK) zeigt, daß es sich um ein kristallines Siliziumdioxid mit einer Reinheit von 99% handelt. Die Partikelgrößenverteilung des Quarzes liegt im Bereich von 0.92 - 1.6 µm (ermittelt durch Herrn Bürkin, IMT-I, KfK), der AMAD ist 1.7 µm. Die spezifische Oberfläche des Quarzes (ermittelt durch Frau Dr. Drosselmeyer, ITOX, KfK) beträgt 2.72 m²/g, die Dichte 2.66 g/cm³. Für die Inkubationsversuche wurde der Quarz in einer Konzentration von 50 µg/ml in PBS mit P/S aufgenommen und anschließend für 5 Minuten auf Eis mit Ultraschall (Branson Sonifier B15, Einstellung 50%, pulsed) resuspendiert.

Latex

Als biologisch inerte Testpartikel wurden Latex-Partikel (Dow-Latex, Serva) mit einem Durchmesser von 1.1 µm in einer Konzentration von 250 µg/ml PBS mit P/S verwendet.

Albumin

Die Albumin-Partikel wurden aus Rinderserumalbumin (RSA) mit Hilfe eines sogenannten "compressed air nebulizers" zur Herstellung von Aerosolen von Herrn Dr. Raghunath im ITOX (KfK) gemacht (Raghunath et al. 1990). Hierbei wird die RSA-Lösung der Druckluft (25 psi) tröpfchenweise ausgesetzt, und die dabei entstehenden Partikel wurden auf einer Aluminiumfolie gesammelt. Anschließend wurden sie 90 Minuten bei 200°C denaturiert. Der mittlere aerodynamische Durchmesser betrug 0.8 µm. Die Albumin-Partikel wurden in einer Konzentration von 10⁸ Teilchen pro ml PBS mit P/S eingesetzt.

2.1.3.2. SurfactantDPL

Dipalmitoyllecithin (L- α DPL), das den Hauptbestandteil des Surfactant darstellt, wurde in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ in PBS mit P/S aufgenommen und anschließend 5 Minuten auf Eis mit Ultraschall behandelt (siehe 2.1.3.1.).

Alveofact

Alveofact ist ein kommerziell erhältliches Phospholipidgemisch, das bei Neugeborenen mit dem akuten Atemnotsyndrom eingesetzt wird. Es wurde in der gleichen Konzentration wie DPL verwendet und genauso behandelt.

2.1.3.3. Sonstige Zusätze

Folgende Substanzen wurden dem Medium für bestimmte Versuche in Form von Stammlösungen zugesetzt:

Zusatz	Lösungsmittel	Konz. der Stammlsg.	Endkonzentration
Lipopolysaccharid von Salmonella abortus equi	0.9% NaCl	1 mg/ml	10 $\mu\text{g/ml}$
Actinomycin D	0.9% NaCl	1 mg/ml	10 $\mu\text{g/ml}$
Calcitriol (1- α 15, Dihydroxy-Vitamin D ₃)	EtOH _{puriss.}	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁶ M
DL- α Tocopherol	EtOH _{puriss.}	10 mM	100 μM

2.2. Zellmaterial für die Versuche mit gas- und partikelförmigen Schadstoffen

2.2.1. Rinderalveolarmakrophagen

2.2.1.1. Gewinnung der Rinderalveolarmakrophagen (RAM)

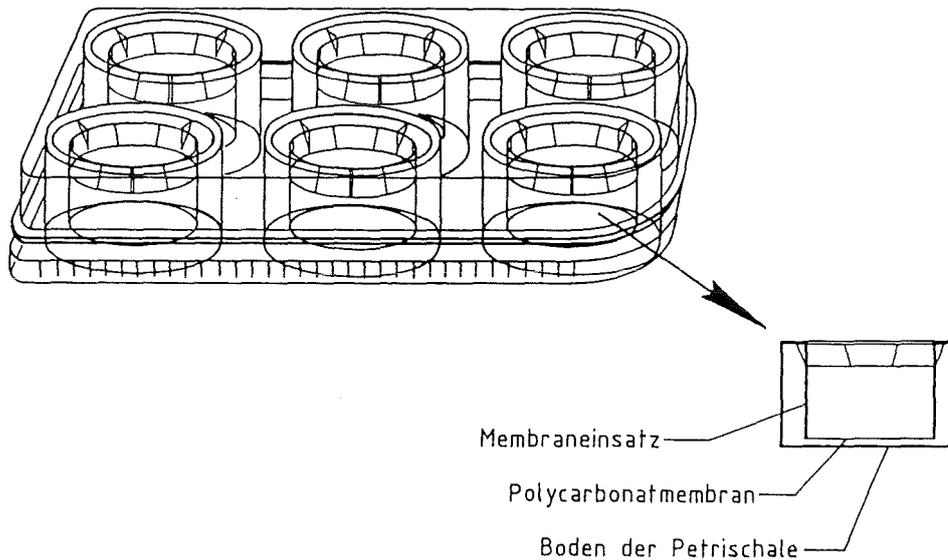
Die Alveolarmakrophagen (AM) wurden post mortem durch bronchoalveoläre Lavagierung aus Rinderlungen (Städt. Schlachthof Karlsruhe, Fa. Langendörfer) gewonnen. Nach Überprüfen der Lunge auf Bluteintritt, mechanische Unversehrtheit und deutliche sichtbare Emphyse wurde die Lunge mit insgesamt 9 Liter isotonischer Kochsalzlösung mit Hilfe eines Schlauches über die Trachea gefüllt. Dieses Flüssigkeitsvolumen wurde je nach Größe der Lunge auf 2 bis 3 Spüldurchgänge verteilt, wobei die Lunge jedesmal kräftig massiert wurde, um die Ausbeute zu erhöhen. Die auf diese Weise gewonnene Lavageflüssigkeit wurde durch sterilen Verbandmull (amicus-Verbandmull, VM 20 DIN, 61630, Michalik) und Nylongaze mit 100 µm Maschenweite (Seidengazefabrik Eckert, Waldkirch) filtriert und anschließend 10 Minuten mit 250 g bei 4°C zentrifugiert (Hettich Rotixa IRP, Rotor Nr. 5096). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in kalter NaCl resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 250 g, 4°C). Geringe Mengen an Erythrozyten, die sich auf dem Makrophagenpellet befanden, wurden mit Hilfe einer Transferpipette vorsichtig abgespült und zusammen mit dem Überstand verworfen. Die gereinigten Pellets wurden in insgesamt 60 ml Kochsalzlösung in Zentrifugenröhrchen (Greiner) aufgenommen. Zur Abtrennung unerwünschter Begleitzellen und toter Alveolarmakrophagen wurden jeweils 30 ml Zellsuspension mit 20 ml Ficoll-Paque (Pharmacia) vorsichtig unterschichtet und 20 Minuten bei 250 g und 4°C zentrifugiert. Die lebenden Alveolarmakrophagen wurden an der Grenzschicht zwischen NaCl und Ficoll-Paque angereichert und konnten mit einer Transferpipette abgenommen werden. Zur Entfernung von Ficoll-Resten wurde die Zellsuspension nochmals mit NaCl gewaschen und zentrifugiert (10 Minuten, 250 g, 4°C). Schließlich wurden die gereinigten Rinderalveolarmakrophagen in Kulturmedium 1 (siehe 2.1.2.) resuspendiert und die Zellzahl sowie die Vitalität bestimmt (siehe 2.4.1.2.). Pro Lunge konnten $0.7 - 1.2 \times 10^9$ Zellen isoliert werden, die Vitalität lag in der Regel über 90%. Bei Vitalitätsraten unter 80% wurden die Zellen dieses Tieres nicht verwendet.

2.2.1.2. Zellkulturbedingungen

a) Kulturbedingungen für die Ozonexpositions-Versuche (unter 20 Stunden)

Da die Ozonexposition mit zwei verschiedenen Expositionssystemen erfolgte (siehe 2.3.4.) wurde die Zellsuspension mit 3×10^6 Zellen pro ml je nach Versuch folgendermaßen in die Kulturgefäße ausgesät:

- Kleine Kulturflaschen (25 cm^2 Wachstumsfläche, Greiner) für die Expositionsversuche mit der Wippe erhielten 4 ml Zellsuspension. Nach zweistündiger Inkubationszeit im Brutschrank (Härens) wurde das Medium einschließlich der nicht adhärenen Zellen abgesaugt. Die Monolayer in den Kulturflaschen erhielten jeweils 4 ml KM 2.
- Für die Versuche mit der Voisin-Kammer wurden die in der folgenden Abbildung dargestellten Luftkulturschälchen ("Transwell", Costar) verwendet. Hierbei handelt es sich um Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen. In diese Vertiefungen sind Schälchen eingesetzt, deren Böden aus einer Polycarbonatmembran mit $0.4 \mu\text{m}$ Porenweite bestehen (siehe Abbildung). Diese Membranen haben keinen Kontakt zu den Vertiefungen der Zellkulturplatten.



Es wurde jeweils 1 ml Zellsuspension direkt auf die Membran gegeben. Solange die Membran von unten nicht befeuchtet wurde lief keine Flüssigkeit durch. Nach zwei-

stündiger Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und bis zu Versuchsbeginn erhielten die Zellen KM 2. Hierfür wurden jeweils 1.5 ml Medium oben auf die Membran gegeben und weitere 2.5 ml in den Zwischenraum unterhalb der Membran pipettiert, so daß die Zellen von allen Seiten mit Medium umspült waren.

b) Kulturbedingungen für eine mehrtägige Kultur (über 20 Stunden)

Um die Rinderalveolarmakrophagen mehrere Tage zu kultivieren, wurden sie in mittlere Kulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche ausgesät (45 x 10⁶ Zellen pro 15 ml) und für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde das Medium mit den nicht adhärennten Zellen abgesaugt und jeweils 15 ml KM 3 zugegeben. Dieses enthielt Amphotericin B zur Vermeidung einer Kontamination mit Pilzen bei Langzeitkulturen.

c) Kulturbedingungen für lichtmikroskopische Untersuchungen

- Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen von Alveolarmakrophagen, die mit Staubpartikeln inkubiert werden sollten, wurden Deckgläser durch Eintauchen in EtOH_{puriss.} und Abflammen sterilisiert und in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen (je 10 cm² Wachstumsfläche, Greiner) gelegt. Pro Vertiefung wurden 2 ml Zellsuspension (3 x 10⁶ Zellen pro ml) ausgesät. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und durch je 2 ml KM 2 ersetzt.
- Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen Ozon-exponierter Makrophagen wurden diese wie unter a) beschrieben behandelt.

2.2.2. Humane Alveolarmakrophagen

2.2.2.1. Herkunft der humanen Alveolarmakrophagen (HAM)

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Alveolarmakrophagen stammten alle von Patienten der Thoraxklinik in Heidelberg/Rohrbach. Die bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BAL) wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Moley im Einverständnis mit Herrn Prof. Dr. Ebert zur Verfügung gestellt. Aus den Untersuchungsberichten der behandelnden Ärzte erhielt ich Informationen über die Krankheitsgeschichte eines jeden der sechs Patienten sowie über die prozentuale Verteilung der verschiedenen Zelltypen in den Lavageflüssigkeiten:

Patient 1:

Bei dem Patienten lag eine rezidivierende Pleuropneumonie vor. In den letzten Monaten waren wiederholt pleuritische Beschwerden mit infiltrativen Veränderungen sowohl rechts als auch links in der Lunge aufgetreten. Im Bronchialsekret wurde zusätzlich Staphylococcus aureus nachgewiesen.

Patient 2:

Hier handelte es sich um eine interstitielle Lungenerkrankung unklarer Genese, die zu einer restriktiven Ventilationsstörung mit Partialinsuffizienz der Atmung und eingeschränkter Diffusionskapazität geführt hatte. Es lagen Verdickungen sämtlicher Interlobulärsepten vor sowie Noduli in beiden Lungen. Der Patient war starker Raucher.

Patient 3:

Dieser Patient hatte von 1968 bis 1971 Kontakt mit Asbest. Eine Fibrosierung und anthrakotisches Pigment waren sichtbar, so daß eine Asbestose nicht ganz ausgeschlossen werden konnte, jedoch wurde der Befund vom Pathologen am ehesten auf eine chronisch obstruktive Atemwegserkrankung bei Nikotinabusus zurückgeführt.

Patient 4:

Es wurde eine interstitielle Lungenerkrankung mit retikulonodulärer Zeichnungsvermehrung diagnostiziert. Aufgrund dieser Erkrankung zeigte sich bei der Lungenfunktionsuntersuchung eine leichte restriktive Ventilationsstörung. Zusätzlich lag eine chronisch obstruktive Bronchitis vor sowie schwerer Nikotinabusus.

Patient 5:

Hier handelte es sich um eine Lungensarkoidose Typ II ohne derzeitige wesentliche interstitielle Fibroseneigung. Die Bronchoskopie zeigte ein kleines epitheloidzelliges Granulom ohne zentrale Nekrose und mäßiggradig interstitiell eingelagerte mononukleäre und partiell auch granulozytäre Infiltrate.

Patient 6:

Bei diesem Patienten wurde eine interstitielle Lungenerkrankung mit histologisch nachweisbarer Fibrosierungstendenz nachgewiesen bei gleichzeitig auftretender bilateraler Lymphadenopathie. Es bestand der Verdacht auf eine Sarkoidose Typ II.

Zellverteilung in der BAL

	Zellzahl/ml	AM	Lym.	PMN	Eos.	sonstige
Patient 1	2.8×10^5	92%	5%	1%	2%	-
Patient 2	5.0×10^5	79%	7%	5%	9%	-
Patient 3	1.4×10^5		keine Angaben			
Patient 4	6.5×10^5	95%	2%	2%	1%	-
Patient 5	2.1×10^5	73%	23%	3%	-	1%
Patient 6	4.7×10^5	36%	63%	1%	-	-

Aufgrund der verschiedenen Krankheitsbilder ließen sich die Patienten nicht als homogene Gruppe zusammenfassen. Deshalb wurden auch die Ergebnisse der jeweiligen Alveolarmakrophagen getrennt nach Patient 1 bis 6 dargestellt. Eine Ausnahme bildeten die Patienten 5 und 6 mit der Diagnose Sarkoidose Typ II bzw. Verdacht auf Sarkoidose Typ II, deren BAL durch die hohe Zahl an Lymphozyten auffiel. Sie wurden auch im Ergebnisteil gesondert betrachtet.

2.2.2.2. Gewinnung der humanen Alveolarmakrophagen

Die erhaltene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit wurde mit 250 g bei 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit isotonischer NaCl resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem Dekantieren der Kochsalzlösung wurde das gereinigte Zellpellet in 10 ml KM 2 aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Trypanblau-Methode bestimmt.

2.2.2.3. Zellkulturbedingungen

- Die humanen Alveolarmakrophagen, die für die Ozonexpositions-Versuche mit der Wippe benutzt wurden, wurden in kleine Kulturflaschen ausgesät. Jede Kulturflasche enthielt $4-5 \times 10^6$ Zellen. Nach zwei Stunden fand ein Mediumwechsel mit KM 2 statt. Im folgenden wurden die humanen Alveolarmakrophagen genau wie die Rinderalveolarmakrophagen weiterbehandelt.

Bei den Zellkulturen der Sarkoidose-Patienten wurde bei jedem Mediumwechsel zusätzlich einmal gewaschen, um die Lymphozyten, die nicht adhärent waren, zu entfernen.

- Für die Versuche mit der Voisin-Kammer wurden in jede Vertiefung der Luftkulturschälchen 2×10^6 Zellen pipettiert, die ebenfalls wie die RAM weiterbehandelt wurden.

2.2.3. HL-60 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen stammten von der American Type Culture Collection Maryland, U.S.A.. Es handelt sich um eine promyeloische Leukämiezelllinie menschlichen Ursprungs, die durch verschiedene Agenzien in Richtung Granulozyten (mittels DMSO) oder in Richtung Monozyten/Makrophagen (mittels Calcitriol oder TPA) differenziert werden kann (Harris und Ralph, 1985).

2.2.3.1. Zellkulturbedingungen

a) Generelle Kulturbedingungen

Bei den HL-60 Zellen handelte es sich um eine Suspensionskultur, die durch einfaches Überführen des gewünschten Aliquots in eine neue Kulturflasche passagiert werden konnte. Es wurden alle 3-4 Tage 5×10^6 Zellen in 20 ml frischem KM 4 in mittlere Kulturflaschen (75 cm^2 Wachstumsfläche) ausgesät. Hierbei wurde die Zellzahl und die Vitalität mit Hilfe der Trypanblau-Methode bestimmt (siehe 2.4.1.2.).

Für die Differenzierung der HL-60 Zellen in Richtung Monozyten/Makrophagen in mittleren Kulturflaschen wurden 10^7 Zellen für 3 Tage mit 20 ml KM 4 mit 10^{-6} molarem Calcitriol inkubiert. Nach dieser Zeit hatte sich die Zellzahl verdreifacht.

b) Kulturbedingungen für die Ozonexpositionsversuche

Aufgrund der mangelnden Adhärenz der HL-60 Makrophagen erfolgte die Ozonexposition ausschließlich in Luftkulturschalen in der Voisin-Kammer. Hierfür wurden 1×10^6 HL-60 Zellen auf jede Membran ausgesät, die von beiden Seiten mit insgesamt 4 ml Calcitriolhaltigem Medium umgeben war. Nach einer Differenzierungszeit von 3 Tagen wurden die Zellen für den Versuch eingesetzt.

2.3. Inkubationsversuche

Da zwei verschiedene Systeme für die Ozonexposition der Makrophagen verwendet wurden, muß bei der Vorinkubation mit Stäuben bzw. Surfactant-Phospholipiden unterschieden werden zwischen Versuchen in Luftkulturschälchen (für die Voisin-Kammer) und solchen in kleinen Kulturflaschen (für die Wippe, siehe 2.3.4.).

2.3.1. Inkubation mit Stäuben

Um den Einfluß einer der Ozonexposition vorangehenden Staubphagozytose zu untersuchen, erhielten die Zellen eine Stunde vor Expositionsbeginn die unter 2.1.3.1. angegebenen partikulären Zusätze.

Bei den in kleinen Kulturflaschen gehaltenen bovinen und humanen Alveolarmakrophagen wurde ca. 16 Stunden nach der Aussaat das Medium abgezogen und durch 2.5 ml PBS mit dem jeweiligen partikulären Zusatz ersetzt. Die Kontrollen wurden entsprechend nur mit PBS (mit P/S) inkubiert.

Für die Staubinkubation in Luftkulturschälchen wurde zunächst der Unterstand, d.h. das Medium unterhalb der Membran, abgesaugt. Innerhalb von 10 Minuten lief das restliche Medium nach unten durch, so daß es ebenfalls entfernt werden konnte. Nun wurde pro Vertiefung 1 ml der vorbereiteten Staublösung auf die Membran appliziert. Diese Methode ermöglichte es, bei den wenig adhärenen HL-60 Makrophagen keine Zellzahlverluste in Kauf nehmen zu müssen.

2.3.2. Inkubation mit Surfactant-Phospholipiden

Um eine mögliche Interaktion von Surfactant-Bestandteilen mit Ozon zu untersuchen, wurde die DPL- bzw. Alveofact-Lösung wie unter 2.1.3.2. beschrieben hergestellt und 10 Minuten vor Expositionsbeginn auf die Zellen gegeben. Die Applikation erfolgte genau wie die der partikulären Zusätze.

In den Luftkulturschälchen lief die Flüssigkeit durch die Membranen durch und hinterließ einen Phospholipidfilm auf den Zellrasen.

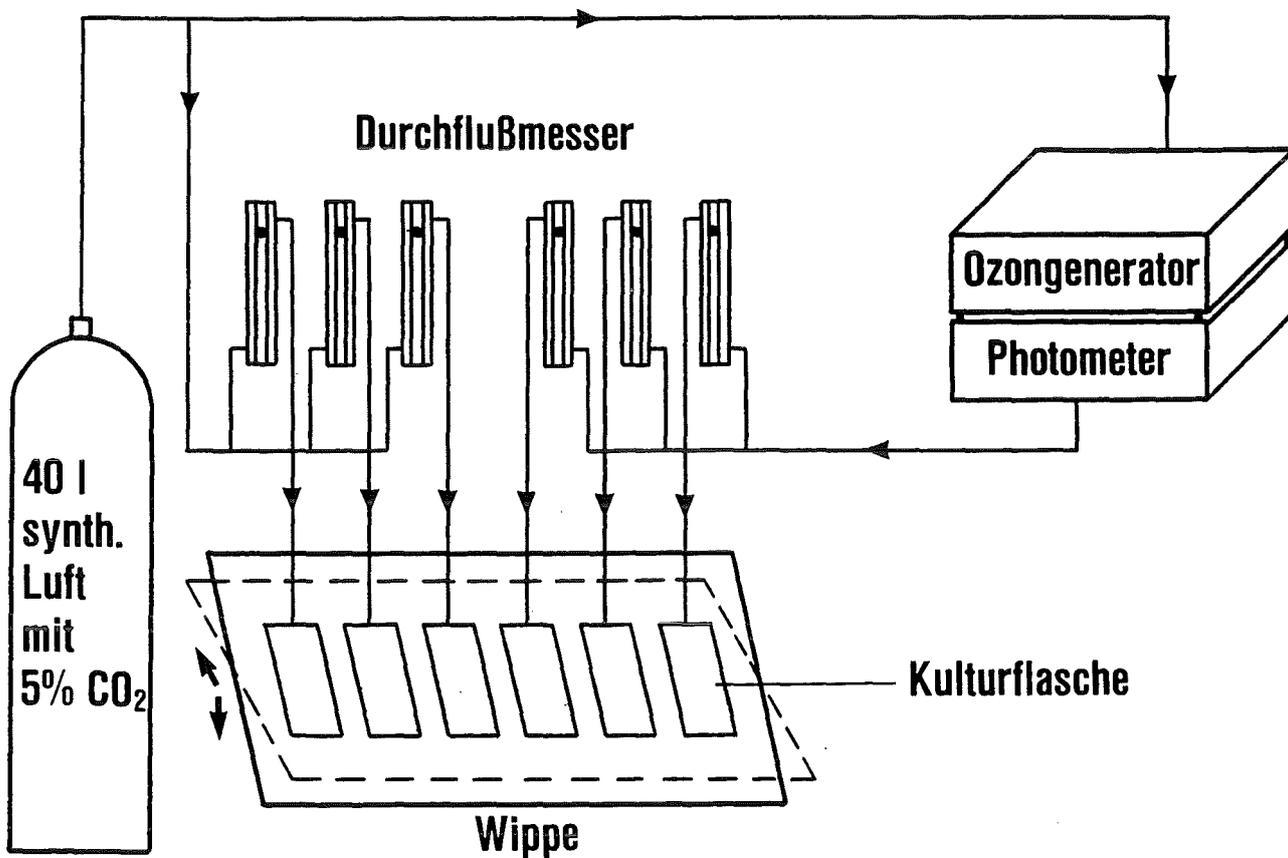
2.3.3. Inkubation mit Vitamin E

Für diejenigen Zellkulturen, die das DL- α Tocopherol nur während der Ozonexposition erhielten, wurde ein entsprechendes Aliquot der Stammlösung (siehe 2.1.3.3.) dem PBS unmittelbar vor Expositionsbeginn zugegeben. Bei einem Teil der Makrophagenkulturen fand eine 24-stündige Vorinkubation mit Tocopherol statt. Hierfür erhielten die RAM direkt nach der Lavagierung einen Tocopherol-Zusatz zum Kulturmedium.

2.3.4. Exposition der Zellen mit Ozon

2.3.4.1. Expositionssystem Wippe

Ozon wurde mit Hilfe eines Ozongenerators (Ozomat, Anseros) durch Spannungsentladungen aus synthetischer Luft mit 5% CO₂ hergestellt. Dieses Gemisch gelangte aus einer Gasflasche über einen Druckminderer zum Generator. Die Gasanlage zur Entnahme von synthetischer Luft mit 5% CO₂ inklusive Druckminderer, Durchflußmessern und Sicherheitsschrank wurden von der Fa. Messer Griesheim, Karlsruhe, installiert. Dem Ozongenerator angeschlossen war ein Photometer, welches die Ozonkonzentration durch UV-Licht kontinuierlich bestimmte und über einen "feed-back"-Mechanismus regulierte. Die eingesetzten Ozonkonzentrationen lagen zwischen 0.25 und 2.5 ppm. Bei dem Expositionssystem Wippe, das von Mayer (1992) entwickelt worden war, gelangte das Ozon mit 5% CO₂ über Teflonschläuche zu 3 Durchflußmessern, die jeweils eine Durchflußgeschwindigkeit von 3 l/Stunde gewährleisteten. Parallel hierzu wurde das Luft/CO₂-Gemisch direkt aus der Gasflasche über einen Druckminderer 3 weiteren Durchflußmessern zugeführt. Diese 6 Durchflußmesser waren über Teflonschläuche, die mit einem Gummistopfen am Flaschenhals festgemacht wurden, mit den kleinen Kulturflaschen verbunden. Ein abführender Schlauch, der in der durchbohrten Flaschenrückwand steckte, führte in die Außenluft. Die Kulturflaschen mit den Makrophagen befanden sich in einem auf 37°C beheizbaren Plexiglaskasten, der auf einer Wippe (Rockomat, Tecnomara) stand. Diese wurde auf eine Wippbewegung pro Minute eingestellt. So waren die Zellen wechselweise dem Gas und der Flüssigkeit ausgesetzt. Die Expositionszeit betrug 2 oder 4 Stunden. Die gesamte Apparatur ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

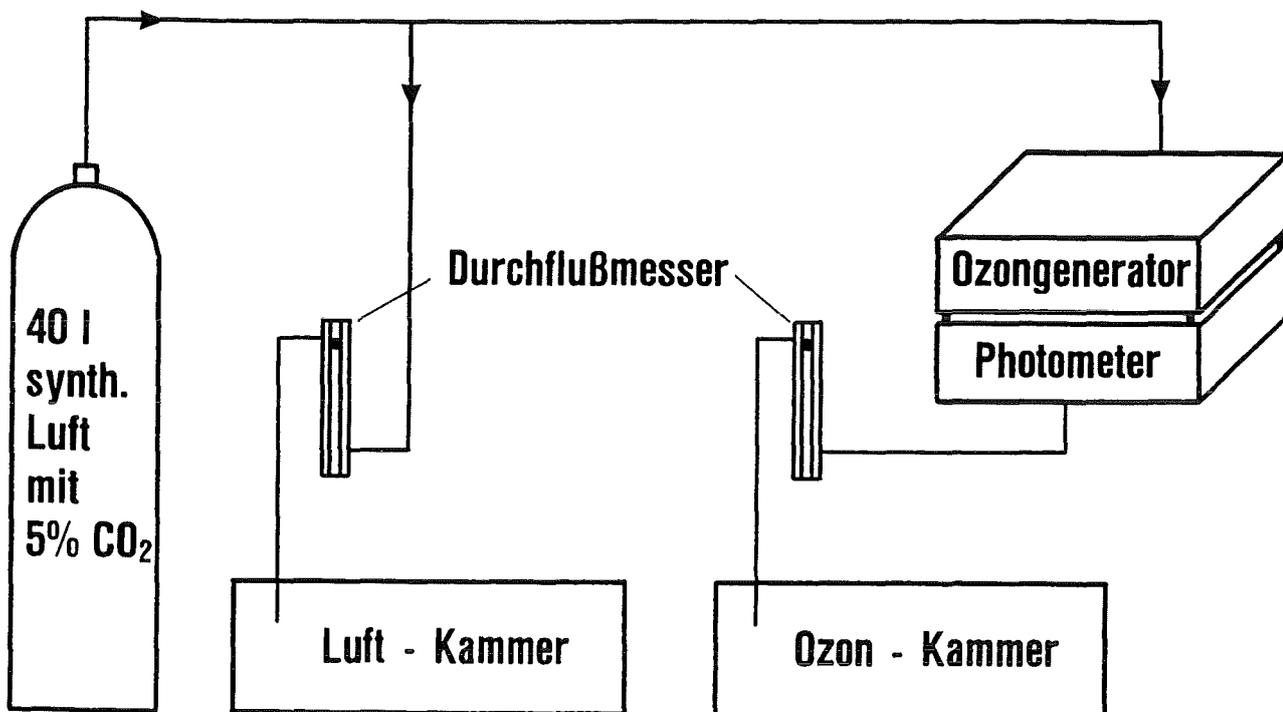


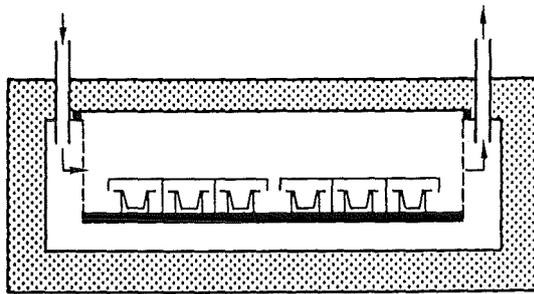
2.3.4.2. Expositionssystem Voisin-Kammer

Bei diesem System wurde die Exposition der Zellen mit Ozon in Anlehnung an eine Methode von Voisin et al. (1977) in 2 speziell angefertigten Expositionskammern (Fa. Maton, Lille, Frankreich) vorgenommen. Hierfür wurden die in Luftkulturschälchen ausgesäten bzw. differenzierten Zellen verwendet, sodaß ein direkter Kontakt der Zellen mit dem Gas gewährleistet war.

Eine der Expositionskammern war über einen Druckminderer und Durchflußmesser direkt mit der Gasflasche mit synthetischer Luft und 5% CO₂ verbunden. Für die zweite Expositionskammer wurde das Luft/CO₂-Gemisch noch über den Ozongenerator mit Photometer geleitet und gelangte dann über einen zweiten Durchflußmesser in die Ozonkammer. Der Druckminderer direkt an der Entnahmestelle senkte den schwankenden Vor- druck des Leitungssystems auf 1 bar, und der Durchflußmesser unmittelbar vor der Kammer gewährleistete einen konstanten Gasfluß von 0.5 l/min. Als Verbindungsstücke wurden ausschließlich Teflonschläuche verwendet.

Das System bestand aus einer Außenkammer, die mit Wasser gefüllt war, das auf 37°C beheizt werden konnte. In diese Außenkammer war eine zweite Kammer eingesenkt, in der die Ozonexposition stattfand. Diese Innenkammer besaß einen fest anschraubbaren Deckel, der zur Beschickung der Kammer mit Zellkulturschalen vor Versuchsbeginn geöffnet und nach Beschickung wieder fest verschlossen werden konnte. Dies war für die anschließende Inkubation von Bedeutung, für die die gesamte Innenkammer in das Wasserbad der Außenkammer abgesenkt und fixiert wurde. Das 37°C warme Wasser umspülte dann die gesamte Innenkammer. Auf der Oberseite der Innenkammer befanden sich auch die Ein- und Austrittsstutzen für das Gas, das durch das Seitenteil eines Lochblecheinsatzes in den eigentlichen Expositionsraum ein- und auf der gegenüberliegenden Seite wieder austrat, um dann über einen Teflonschlauch in die Außenluft zu gelangen. Der Boden des Einsatzes diente als Standfläche für die Luftkulturschälchen. Der Zwischenraum zwischen Boden der Innenkammer und Boden des Einsatzes wurde mit Wasser gefüllt, um eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit für die Zellkultur zu gewährleisten. In der folgenden Abbildung ist im oberen Teil die gesamte Anlage zur Ozon- bzw. Luftexposition in den Voisin-Kammern zu sehen und im unteren Teil das Schema einer einzelnen solchen Kammer.





Die Ozonkonzentration des einströmenden Gases wurde auch hier kontinuierlich während des ganzen Versuches mittels des Photometers gemessen und durch einen "feed-back"-Mechanismus reguliert. In regelmäßigen Abständen wurde auch die aus der Kammer ausströmende Gaskonzentration bestimmt, die um 1 bis 5% unter der eingestellten Soll-Konzentration lag.

2.3.5. Gewinnung Cytokin-haltiger Überstände

Nach Beendigung der Luft- bzw. Ozonbegasung wurden die kleinen Kulturflaschen aus dem Expositionssystem Wippe herausgenommen und die jeweilige Inkubationslösung abgesaugt. Jede Kulturflasche erhielt nun 3 ml KM 2 und wurde zur Freisetzung von Cytokinen in den Kulturüberstand für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert.

Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, daß bei einer zweistündigen Inkubation die maximale Cytokinkonzentration (nach LPS-Stimulation) in den Überständen gemessen werden konnte (vgl. Abb. 1 und 2).

Die Luftkulturschälchen wurden ebenfalls aus der Luft- bzw. Ozonkammer herausgeholt und der Mediumunterstand für die Bestimmung der cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase abgenommen. Jeder Versuchsansatz wurde in 4 gleichbehandelten Membraneinsätzen der Kulturschalen durchgeführt, von denen jeweils eine unmittelbar nach der Gasexposition zur Vitalitätsbestimmung mit der Ethidiumbromid/FDA-Methode (siehe 2.4.2.1.) entnommen wurde. Pro verbleibende Vertiefung wurden 1.5 ml KM 2 unter die Membran und 1.5 ml auf den Zellrasen appliziert. Es folgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank.

KM 2 erhielt 10% FCS, welches zur Stabilisation der freigesetzten Cytokine notwendig war.

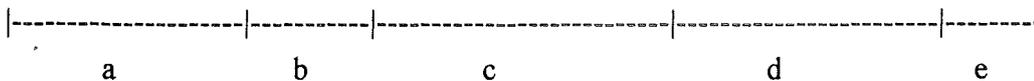
Untersuchung der LPS-induzierten Cytokinfreisetzung

Um den Einfluß von Ozon auf die LPS-induzierte Cytokinfreisetzung zu untersuchen, erhielt KM 2 während der zweistündigen Inkubation 10 µg/ml LPS (siehe 2.1.3.3.). LPS ist ein Standardstimulans zur Cytokinfreisetzung bei Makrophagen. Es bildet mit dem LPS-bindenden-Protein (LBP) einen Komplex, der von dem durch CD14 codierten Zellrezeptor erkannt wird (Tobias et al., 1992). Dieses LBP ist in fötalem Kälberserum enthalten, welches dem KM 2 zugesetzt wurde.

Nach der Inkubation im Brutschrank wurde bei allen Ansätzen das Medium abgenommen und 7 Minuten mit 250 g bei 4°C zentrifugiert, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Die Überstände wurden anschließend aliquotiert und bei -20°C für die Bestimmung der sezernierten Cytokine aufbewahrt.

Die verbleibenden Kulturflaschen mit den Alveolarmakrophagen wurden zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität verwendet (siehe 2.4.1.2.).

2.3.6. Zeitlicher Versuchsablauf



- a Bronchoalveoläre Lavage und ca. 16 Stunden Inkubation im Brutschrank bei RAM und HAM bzw. 3 Tage Differenzierung bei HL-60 Zellen
- b Gegebenenfalls einstündige Phagozytose von Staubpartikeln
- c Zwei- oder vierstündige Ozonexposition gegebenenfalls mit Surfactant oder Vitamin E
- d Mikroskopische Untersuchung der Morphologie bzw. Mediumwechsel, LDH-Bestimmung und zweistündige Inkubation im Brutschrank zur Cytokinfreisetzung, gegebenenfalls mit LPS
- e Abnehmen der Überstände
Bestimmung von Zellzahl, Vitalität und Cytokinfreisetzung

2.4. Morphologische und biochemische Untersuchungen

2.4.1. Lichtmikroskopie

2.4.1.1. Hemacolorfärbung

Nach Absaugen des Mediums wurden die Alveolarmakrophagen auf den Deckgläsern (siehe 2.2.1.2.c) mit der Hemacolor-Schnellfärbung behandelt. Die Mikroskopie der Deckgläser erfolgte mit Ölimmersionsoberjektiven an einem Leitz Diaplan Mikroskop (Vergrößerung: $\times 10 \times 100$), während die AM in Kulturflaschen mit einem Inversmikroskop (Leitz Fluovert, Vergrößerung: $\times 10 \times 10$ bzw. $\times 10 \times 20$) betrachtet wurden. Zur fotografischen Dokumentation diente eine Fotoausrüstung der Fa. Wild (Photoautomat MPS 45, Kamera MPS 51).

2.4.1.2. Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung mit Trypanblau

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach der von Hanks und Wallace (1958) beschriebenen Trypanblau-Ausschluß-Methode. Als Stammlösung wurde eine 0.5%ige Lösung Trypanblau in 0.9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Am Inkubationsende erhielt jede Kulturflasche 2 ml dieser Lösung, die nach zwei Minuten wieder abgenommen wurde und durch 2 ml PBS ersetzt wurde. Trypanblau konnte die Zellmembranen intakter Zellen nicht durchdringen, sodaß nur die toten Zellen eine tiefblaue Färbung aufwiesen. Die Zahl der lebenden und toten Zellen wurde mit dem Inversmikroskop (s.o., Objektiv mit Gitter: $\times 10$) bestimmt. Pro Kulturflasche wurden 3 Gitternetze mit einer scheinbaren Kantenlänge von 150 μm an verschiedenen Stellen des Flaschenbodens ausgezählt, um den Anteil toter Zellen zu bestimmen.

Die exakte Bestimmung der Gesamtzellzahl pro Kulturflasche erfolgte am Ende der Inkubationszeit durch zweimaliges Waschen jeweils einer der Kontrollkulturen mit je 2.5 ml einer warmen, 0.25%igen Trypsinlösung, wobei beim zweiten Waschvorgang ca. 1 ml dieser Lösung für 5 Minuten auf dem Zellrasen belassen wurde. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in PBS aufgenommen. 200 μl der Zellsuspension wurden mit 200 μl der Trypanblaustammlösung gemischt und mit Hilfe einer Neubauerkammer (Brand) die Zellzahl und Vitalität im Lichtmikroskop ermittelt.

Für die Zellzahlbestimmung der HL-60 Makrophagen in den Luftkulturschälchen wurden die Schalen mit PBS ausgespült und die erhaltene Zellsuspension analog gefärbt und ausgezählt.

2.4.2. Fluoreszenzmikroskopie

2.4.2.1. Vitalitätsbestimmung mit Ethidiumbromid und Fluoresceindiacetat

Für die Vitalitätsbestimmung der Makrophagen in den Luftkulturschalen wurde eine Färbelösung aus Ethidiumbromid und Fluoresceindiacetat verwendet, da eine Bestimmung mit Trypanblau nicht möglich war. Diese färbt zwar die toten Zellen blau, die lebenden sind allerdings aufgrund der Membran im Lichtmikroskop nicht sichtbar.

Der hier verwendete Vitalitätstest wurde nach einer Methode von Dankberg und Persidsky (1976) durchgeführt. Vitale Zellen mit intakten Zellmembranen fluoreszieren grün, da Fluoresceindiacetat als unpolarer, fluoreszierender Ester in die Zelle eindringt und im Zellinneren durch Esterasen gespalten wird. So kommt es zur Freisetzung von Fluorescein, das ein polares Molekül ist und die intakte Zelle nicht verlassen kann. Es reichert sich rasch in der Zelle an und führt zu einer grünen Fluoreszenz unter UV-Anregung. Sind die Zellmembranen geschädigt, tritt das Fluorescein so schnell aus wie das Fluoresceindiacetat in die Zelle eindringt, es ist keine Fluoreszenz sichtbar. Diese toten Zellen sind an dem rot fluoreszierenden Zellkern zu erkennen, da Ethidiumbromid aufgrund der zerstörten Membranen leicht in die Zelle eindringen kann und mit der DNA einen rot fluoreszierenden Komplex bildet.

Für alle durchgeführten Experimente wurden Stammlösungen von Ethidiumbromid (200 µg/ml in HBSS) und Fluoresceindiacetat (5 µg/ml in Aceton) hergestellt und bei 20°C aufbewahrt. Für jeden Versuch wurde die Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid-Gebrauchslösung frisch hergestellt. Dazu wurden 100 µl der Ethidiumbromidstammlösung und 2 µl der Fluoresceindiacetatstammlösung mit 4.9 ml HBSS vermischt. Die Membran wurde mit einem Skalpell aus ihrer Halterung herausgeschnitten, in eine Petrischale gelegt und für 10 Minuten mit 2 ml der Gebrauchslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran auf einen mit HBSS befeuchteten Objektträger überführt und mit einem Deckglas bedeckt. Im Fluoreszenzmikroskop (Leitz Diaplan, Vergrößerung: x 12.5 x 10 bzw. x 12.5 x 20) konnten mit Hilfe zweier verschiedener Filter die grün-gelblich fluoreszierenden, lebenden Zellen (Anregungswellenlänge 450-490 nm) und die rot fluoreszierenden, toten Zellen (Anregungswellenlänge 530-560 nm) betrachtet werden. Die Vitalität wurde durch Auszählen bestimmt. Zu Versuchsbeginn lag die Vitalität in jedem Fall über 90%.

2.4.3. Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der RAM wurden die Zellen wie unter 2.2.1.2.a) ausgesät und mit dem Expositionssystem Voisin-Kammer dem Ozon bzw. der synthetischen Luft ausgesetzt (siehe 2.3.4.2.).

Anschließend wurde die Membran der Luftkulturschälchen mit einem Skalpell herausgeschnitten, und die Präparation der Zellen erfolgte nach einer von Millipore (Eschborn) empfohlenen Methode. Hierfür wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und auf Eis jeweils 30 Minuten mit Puffer A, B und C behandelt.

Puffer A:	10 ml	0.2M Cacodylatpuffer
	4 ml	25% Glutaraldehyd
	6 ml	Aqua bidest.
Puffer B:	10 ml	0.2M Cacodylatpuffer
	10 ml	Aqua bidest.
	7 %	Sucrose
Puffer C:	10 ml	0.2M Cacodylatpuffer
	10 ml	4% wässrige OsO ₄ -Lösung

Daraufhin wurde mit Aqua bidest. gespült. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (35, 70, 85, 95 und 100%, jeweils für 5 Minuten) wurden die Zellen entwässert und abschließend mit Hexamethyldisilazan für 5 Minuten überschichtet. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurden die Proben bis zur Goldbedampfung im Exsikkator aufbewahrt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Schüler (KfK, IMT) an einem Philipps 525 M Rasterelektronenmikroskop angefertigt.

2.4.4. Transmissionselektronenmikroskopie

Folgende Lösungen wurden hergestellt:

0.2M Cacodylatpuffer

21.4 g Na-Cacodylat x 3 H₂O (Serva)

ad 500 ml H₂O dest.

Der pH-Wert wurde mit 1M HCl auf 7.0 eingestellt.

0.2M Cacodylatpuffer mit 0.2M Sucrose

21.4 g Na-Cacodylat x 3 H₂O

34.23 g Sucrose

ad 500 ml H₂O dest.

Der pH-Wert wurde mit 1M HCl auf 7.0 eingestellt.

0.1M Cacodylatpuffer mit 0.1M Sucrose

50 ml 0.2M Cacodylatpuffer

3.423 g Sucrose

ad 100 ml H₂O dest.

Der pH-Wert wurde mit 1M HCl auf 7.0 eingestellt.

2% Glutaraldehydlösung

0.8 ml Glutaraldehyd 25% (Serva)

4.2 ml H₂O dest.

5.0 ml 0.2M Cacodylatpuffer mit 0.2M Sucrose

Veronalpuffer

2.94 mg Na-Diäthylbarbitursäure (Balzer Union)

1.94 mg Na-Acetat x 3 H₂O

ad 100 ml H₂O dest.

Paladepuffer

1.00 ml Veronalpuffer

1.00 ml 1M HCl

1.25 ml 4%ige OsO₄-Lösung

1.75 ml H₂O

2%ige Uranylacetatlösung (Fluka)Epon-Araldite

5 ml Epon 812 (Serva)

11 ml Araldite Härter HY 964 (Serva)

3 ml Araldite CY 206 (Serva)

Diese Zutaten wurden gut gemischt und kurz vor Gebrauch wurde 2% Araldite Beschleuniger DY 964 (Serva) zugegeben.

Bleicitratlösung

1.33 g Pb(NO₃)₂ (Merck)
2.11 g Na-Citrat x 5.5 H₂O
1.76 g Na-Citrat x 2 H₂O

ad 30 ml H₂O dest.

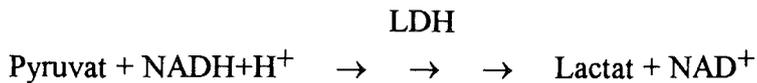
Die Lösung wurde für 5 Minuten geschüttelt, und nach 30 Minuten wurden 8 ml 1M NaOH zugegeben. Am nächsten Tag wurde mit CO₂-freiem Aqua bidest. auf 50 ml aufgefüllt.

Die Zellen wurden für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen nach einer von Wilczek (1991) modifizierten Methode von Cornell (1969) eingebettet. Nach der Luft- bzw. Ozonexposition wurden die Membranen genau wie für die raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgeschnitten (siehe 2.4.3.). Sie wurden zweimal mit PBS gespült und über Nacht in der 2%igen Glutaraldehydlösung im Kühlschrank aufbewahrt. Sämtliche nun folgenden Inkubationen in Puffer oder Ethanol wurden auf Eis durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal mit 0.1M Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend in schmale Streifen geschnitten. Nach einer zweistündigen Inkubation mit Paladepuffer folgte die Kontrastierung mit Uranylacetat für eine Stunde, dann wurde für 15 Minuten H₂O zugegeben. Zur Entwässerung wurde eine Alkoholreihe durchlaufen, wobei jeweils einmal für 15 Minuten mit 70%, 90% und 95% Ethanol inkubiert wurde und je zweimal für 15 Minuten mit 100% Ethanol und mit 100% Ethanol, das mit CuSO₄ gesättigt war. Anschließend wurden die Membranstreifen für 20 Minuten in eine Epon-Araldite/Ethanol-Mischung (1:1) gegeben. Die Inkubationen mit Epon-Araldite wurden in einem evakuierten Exsikkator durchgeführt. Die Membranstreifen wurden zweimal für 24 Stunden in Epon/Araldite bei Raumtemperatur aufbewahrt und dann für eine Stunde bei 60°C in frischem Epon/Araldite inkubiert. Die Einbettung erfolgte in Flachformen, die zur Polymerisation des Epon/Araldite für drei Tage bei 60°C aufbewahrt wurden. Die 100 nm-dicken Schnitte wurden mit einem Diamantmesser an einem Sorvall MT2-B Ultramikrotom angefertigt und auf unbeschichtete Kupfergrids aufgebracht. Die Kontrastierung erfolgte durch Inkubation in der Uranylacetatlösung für eine Minute und in der Bleicitratlösung für fünf Minuten. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Frau Kampmann (KfK, ITOX) an einem Siemens Elmiskop IA bei 80 kV Beschleunigungsspannung angefertigt.

2.4.5. Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Freisetzung

Unmittelbar nach der Ozonexposition in der Voisin-Kammer wurde der Kulturunterstand der Zellen aus den Luftkulturschälchen entnommen. Die quantitative Bestimmung der cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (LDH) erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Testkit (Sigma). Als Standard wurde Precinorm E verwendet.

Reaktionsprinzip:



Die Bestimmung wurde gemäß der dem Testkit beiliegenden Vorschrift durchgeführt. Die Extinktionsabnahme wurde über 3 Minuten bei 340 nm im Beckmann DU-65 Photometer gemessen. Die LDH-Aktivität (Units pro Liter) wurde aus der Extinktionsabnahme pro Minute errechnet.

2.5. Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung

2.5.1. Tumor Nekrose Faktor α - Bestimmung mit Wehi-164 Zellen

2.5.1.1. Allgemeines

Bei den Wehi-Zellen handelt es sich um eine TNF-sensitive Fibroblastenzelllinie der Maus. Der Subklon 164/13 wurde auf seine Sensitivität gegenüber TNF α selektiert. Wir erhielten die Zellen freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Wendel, Institut für Biochemie und Pharmakologie der Universität Konstanz. In unserem Labor wurde der TNF-Bioassay durch Matejka (1992) nach der Methode von Espevik und Nissen-Meyer (1986) eingeführt.

Inkubiert man die Wehi-Zellen mit TNF-haltigem Medium, führt dies aufgrund der zytotoxischen Wirkung des Cytokins zu einem Vitalitätsverlust, der in bestimmten Konzentrationsbereichen linear mit der TNF-Konzentration korreliert. Nach einer bestimmten Inkubationsdauer der Standardverdünnungen bzw. der zu untersuchenden Proben wurde MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) zugesetzt, welches von den Mitochondrien der noch lebenden Zellen durch eine Succinat-abhängige Dehydrogenase zu dem blauen Farbstoff Formazan umgesetzt wurde. Dieser wurde durch Lyse der Zellen mit einem Detergens freigesetzt und spektralphotometrisch bei 550 nm gemessen.

2.5.1.2. Kultur der Wehi-Zellen

Wehi-Zellen wachsen in Kultur als adhärenente Monolayer. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche gehalten und regelmäßig auf ihre Zelldichte hin überprüft. In Abständen von 3 bis 4 Tagen war ein konfluenter Monolayer erreicht und die Kulturen wurden passagiert. Hierfür wurde das Medium abgezogen und zweimal mit je 5 ml einer 0.25%igen Trypsinlösung gewaschen, wobei beim zweiten Waschvorgang ca. 1 ml dieser Lösung auf dem Zellrasen belassen wurde. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in KM 5 aufgenommen und 10 Minuten mit 250 g bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in KM 5 aufgenommen, und die Zellzahl und Vitalität wurde mit Hilfe der Trypanblau-Ausschluß-Methode (siehe. 2.4.1.2.) bestimmt. Die Vitalität lag in jedem Fall über 95%. Dann wurden 1 x 10⁶ Zellen mit 20 ml KM 5 in eine neue Kulturflasche überführt und die Passagezahl um eins erhöht. Die Wehi-Zellen wurden maximal bis zur Passagezahl 17 verwendet.

2.5.1.3. TNF-Bioassay

Für die Tumor Nekrose Faktor-Bestimmung mit Hilfe des Bioassays wurden konfluente Wehi-Zellkulturen wie unter 2.5.1.2. beschrieben mit Trypsin behandelt und die Zellsuspension abzentrifugiert. Es wurde eine Zellzahl von 3 x 10⁵ Zellen pro ml eingestellt. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 96 well-Mikrotiterplatten (Falcon, Primaria) mit Hilfe einer Multi-Pipette (Flow Laboratories). Jede Vertiefung erhielt 200 µl Zellsuspension (6 x 10⁴ Zellen), wobei die letzte Reihe jeder Platte leergelassen wurde. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten für 5 Stunden im Brutschrank inkubiert, um die Zellen wieder adhärenent werden zu lassen.

Für die exakte Bestimmung des TNF-Gehaltes wurde eine Standardreihe mit 9 verschiedenen Konzentrationen von humanem rekombinantem (hr-) TNF hergestellt (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 1 pg/ml). Die Proben wurden ebenfalls seriell verdünnt (1:2, 1:4, 1:10, 1:40, 1:100), um eventuell auftretende hohe TNF-Konzentrationen, die nicht im linearen Bereich der Eichkurve (zwischen 1 und 50 pg/ml) lagen, durch eine Verdünnung zu erfassen und eine ebenso mögliche Maskierung unverdünnter oder gering verdünnter Proben zu kompensieren. Die Verdünnungen von Standard und Proben erfolgte mit KM 5. Nach der Inkubation der Mikrotiterplatten wurden diese für 5 Minuten bei 250 g (Mikrotiterplattenrotor, Zentrifuge Hettich Rotixa) zentrifugiert, und zur Entfernung des Mediums wurden sie auf Zellstoff ausgeschlagen. Es folgte die Zugabe der Standard- und Probenverdünnungen:

Die letzte Reihe jeder Mikrotiterplatte, die keine Zellen enthielt, diente als Leerwert, dessen Mittelwert nach der photometrischen Messung von allen Meßwerten abgezogen wurde. Aus diesem Grund erhielt jede Vertiefung dieser Reihe 100 µl KM 5. In die Vertiefungen der ersten Reihe jeder Platte wurde ebenfalls nur Medium ohne TNF pipettiert, da sie als Kontrollreihe diente und somit ein Maß war für die maximale Vitalität bzw. Farbstoffbildung der Zellen. Von jeder Proben- bzw. Standardverdünnung wurden 4 Ansätze gemacht, wobei pro Vertiefung 100 µl auf die Zellen pipettiert wurde. Nachfolgend erhielten alle Platten pro Vertiefung 100 µl Actinomycin D-Lösung (10 µg/ml in KM 5, siehe 2.1.3.3.), die mit der Multi-Pipette zugegeben wurde. Anschließend wurden die Platten zur Inkubation für 18 Stunden in den Brutschrank gestellt. Zu allen Überständen wurden dann jeweils 20 µl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS ohne Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) gegeben. Nach weiteren vier Stunden Inkubation im Brutschrank erhielt jede Vertiefung 60 µl einer SDS-Lösung (20% Sodiumdodecylsulfat in 0.02M HCL), die über Nacht die Lyse der Zellen bewirkte. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit dem ELISA-Reader (Titertek Multiskan Plus MK II, Labsystems) bei 550 nm gemessen. Je niedriger hierbei die gemessene Absorption war, desto weniger Formazan war von den Zellen gebildet worden, d.h. desto höher war die Cytotoxizität bzw. der TNF-Gehalt der jeweiligen Proben- bzw. Standardlösung. Die Cytotoxizität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Cytotoxizität} = \frac{\text{Absorption Kontrolle} - \text{Absorption Probe}}{\text{Absorption Kontrolle}} \times 100$$

Zur TNF-Quantifizierung wurde die Cytotoxizität der Standardverdünnungen in Abhängigkeit von der TNF-Konzentration aufgetragen, was eine typische Cytotoxizitätskurve ergab (vgl. Abb. 3). Über eine lineare Regression im Bereich zwischen 0 und 50 pg TNF/ml konnten die TNF-Gehalte der Proben berechnet werden.

2.5.2. Cytokinbestimmung mittels ELISA

Allgemeines Prinzip:

Beim ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) wird die zu untersuchende Lösung auf den Antikörper-beschichteten Boden einer Mikrotiterplatte pipettiert. Der spezifische Antikörper bindet nun das Antigen aus der Lösung, und nach einer gewissen Inkubationszeit wird die Platte gewaschen, um sonstige nicht gebundene Antigene zu entfernen. Nun wird eine Lösung mit dem gleichen Antikörper zugegeben, an den allerdings ein Enzym

gekoppelt ist. Während der folgenden Inkubation bindet dieser Antikörper an das Antigen, das bereits mit dem Platten-beschichteten Antikörper reagiert hat. Die Platte wird erneut gewaschen, und im nächsten Schritt wird eine Substratlösung zugegeben, die von dem Antikörper-gebundenen Enzym zu einer photometrisch meßbaren Farblösung umgesetzt wird. Diese enzymatische Reaktion wird nach einer bestimmten Zeit abgestoppt und die Messung vorgenommen. Die Absorption ist nun proportional zum Enzymgehalt und somit proportional zum Antigengehalt der zu untersuchenden Lösung.

Um eine exakte Cytokin-Quantifizierung vornehmen zu können, wird eine Standardreihe des zu bestimmenden Cytokins hergestellt und genau wie die Proben behandelt. Nach der photometrischen Messung konnte eine Eichgerade erstellt werden, um die erhaltenen Absorptionen der Probelösungen der jeweils entsprechenden Cytokinkonzentration zuzuordnen.

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Testkits stammten von der Fa. Biermann ('Quantikine'). Sie enthielten neben den mit dem jeweiligen Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten die Waschpuffer-Stammlösung, Farbreagenz A und Farbreagenz B (Tetramethylbenzidin und stabilisiertes H₂O₂, die zusammen die Substratlösung ergaben), sowie die Stopplösung (2N Schwefelsäure). Je nach zu bestimmendem Cytokin beinhaltete das Testkit den entsprechenden Standard und das 'Konjugat', eine Lösung polyklonaler Antikörper, an die eine Meerrettichperoxidase gebunden ist.

Da die kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits nur mit Antikörpern gegen humane Cytokine erhältlich waren, konnten damit nur die Überstände der Versuche mit humanen Alveolarmakrophagen und mit HL-60 Makrophagen untersucht werden. Für die Bestimmung der Sekretion boviner Cytokine wurden die zuvor beschriebenen Bioassays herangezogen.

2.5.2.1. TNF α

Zunächst wurde der hr-TNF-Standard gelöst und folgende Konzentrationen hergestellt: 15.7, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 und 1000 pg/ml. Die Verdünnung erfolgte mit dem Medium, das auch für die jeweiligen Proben verwendet wurde. Als Nullwert diente Medium ohne TNF-Zusatz. Von den Probe- bzw. Standardlösungen wurden je 200 μ l in zwei parallele Vertiefungen pipettiert und die Platte für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert.

Das Absaugen der Überstände und das dreimalige Spülen mit 400 μ l des zuvor 1:50 verdünnten Waschpuffers erfolgte mit einem ELISA-Plattenwäscher (SCT 812 SW 1,

Vertrieb SCT Labinstruments). Anschließend wurde 200 µl TNF-Konjugat pro Vertiefung zugegeben. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Platten erneut gewaschen (s.o.) und in jede Vertiefung 20 µl Substratlösung pipettiert. Diese wurde aus gleichen Teilen Farbreagenz A und B unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung pro Ansatz unterbrochen. Die entstandene bläuliche Färbung der Substratlösung schlug durch die 2N Schwefelsäure nach gelb um. Innerhalb von 30 Minuten wurde die Absorption bei 450 nm mit einem ELISA-Reader (s.o.) gemessen. Über die Daten der Regressionsgeraden der Standardwerte konnten die TNF-Gehalte der Proben berechnet werden.

2.5.2.2. IL6

Der Interleukin 6-ELISA lief im wesentlichen wie der TNF-ELISA ab. Die Inkubationen fanden allerdings bei Raumtemperatur statt. Außerdem wurde in jede Vertiefung 100 µl eines mitgelieferten Verdünners pipettiert, bevor 100 µl der Probe-bzw. Standardlösung hinzugegeben wurde. Als Standard wurden Lösungen folgender IL6-Konzentrationen hergestellt: 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 und 100 pg/ml.

2.5.2.3. IL8

Der Interleukin 8-Assay entsprach weitestgehend dem IL6-ELISA. Die Standardverdünungen waren 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 und 2000 pg/ml. Je nach Versuch mußten die Proben um den Faktor 50 bzw. 100 verdünnt werden, damit die gemessenen Absorptionen innerhalb des Standardbereiches lagen.

2.5.3. Bestimmung des Chemotaktischen Faktors für Makrophagen

2.5.3.1. 48 well Microchemotaxis-Kammer-Methode

Diese Methode wurde nach Falk et al. (1980) in einer speziellen Chemotaxiskammer (Neuro Probe 48 Micro Chemotaxis Chamber, Nucleopore) durchgeführt. Sie wurde in unserem Labor von Polzer (1992) etabliert.

Die Handhabung der Kammer erfolgte gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers. In die Löcher der unteren Kammerhälfte wurden jeweils 25 µl der zu untersuchenden

Probe bzw. des Standards pipettiert. Pro Ansatz wurden 6 Löcher gefüllt. Auf die luftblasenfrei gefüllten Löcher wurde eine Polycarbonatmembran (PVPPF, 25 x 80 mm, Nucleopore) gelegt, deren Porenweite für die Versuche mit RAM 5 µm und für die etwas kleineren HL-60 Makrophagen 3 µm betrug. Über eine Dichtung wurde der obere Kammerteil fest verschraubt und die gesamte Kammer für 30 Minuten in den Brutschrank gestellt.

In der Zwischenzeit wurde mit den vorbereiteten RAM (siehe 2.2.1.2.b) bzw. HL-60 Makrophagen (siehe 2.2.3.1.a) eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen pro ml hergestellt.

Bei den RAM wurde das Medium abgesaugt und jede Flasche zweimal mit je 5 ml einer 0.25%igen Trypsinlösung gewaschen, wobei beim 2. Waschvorgang ca. 1 ml der Trypsinlösung auf dem Zellrasen belassen und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert wurde. Als sich alle RAM vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurde die Zellsuspension in 30 ml KM 1 aufgenommen und 10 Minuten mit 250 g bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet in KM 1 aufgenommen und Zellzahl und Vitalität (siehe 2.4.1.2.) bestimmt. Die Vitalität lag in jedem Fall über 85%. Die RAM, die für den Chemotaxis-Assay eingesetzt wurden, sollten nach Möglichkeit aus derselben Lunge stammen, aus der auch die Alveolarmakrophagen stammten, die für die Gewinnung der cytokinhaltigen Überstände eingesetzt wurden. Die Zellen wurden für vier Tage in Kulturflaschen gehalten (siehe 2.2.1.2.b), wodurch sie auch erst die Migrationsfähigkeit erwarben.

Da die mit Calcitriol differenzierten HL-60 Makrophagen nur schwach adhärent waren, wurden sie mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend ebenfalls zentrifugiert, in KM 1 aufgenommen und gezählt.

Jedes Loch der oberen Kammerhälfte der Chemotaxiskammer erhielt 50 µl der Zellsuspension, wobei darauf geachtet wurde, Luftblasen zu vermeiden. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurde die Kammer auseinandergeschraubt, die Membran entnommen und die nicht hindurchgewanderten Zellen von der oberen Membranseite abgestreift. Die Membran wurde über Nacht luftgetrocknet. Mittels Hemacolorfärbung wurden die gewanderten Makrophagen (untere Membranseite) angefärbt, wofür die Membran in jeder Farblösung für eine Minute inkubiert wurde. Die Auswertung des Versuchs erfolgte nach einer von Cerra und Nathansson (1989) beschriebenen Methode durch die Messung der Farbintensität an einem Laserdensitometer (Ultrosan XL, LKB) in automatischem Peak-Integrationsmodus mit der Einstellung für x-Width=4 und y-Step=5.

Die zu untersuchenden Proben der Ozon-exponierten Makrophagen wurden unverdünnt eingesetzt, wobei jede Probe sechsfach gemessen wurde. Die Kontrolle bestand aus dem Medium, in dem auch die Proben aufgenommen waren. Als Standard diente 10% Zymosan aktiviertes Serum (ZAS) in KM 1. Mit dieser ZAS-Konzentration wurde in Vorversuchen mit 0 - 20% ZAS die maximal mögliche Chemotaxis sowohl für RAM als auch für HL-60 Makrophagen erreicht (vgl. Abb. 4 und 5). Die chemotaktische Aktivität der untersuchten Überstände wurde in relativen chemotaktischen Einheiten angegeben, wobei die Migration bei Kontrollmedium 0 und bei 10% ZAS 100 relativen Einheiten entsprach. Sie wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Chemotaktische Aktivität} = \frac{X - X_{K0}}{X_{ZAS} - X_{K0}} \times 100 \text{ [relative Einheiten]}$$

X : Chemotaktische Wirkung der Proben

X_{K0} : Chemotaktische Wirkung der Kontrolle (Medium)

X_{ZAS} : Chemotaktische Wirkung der 10%igen ZAS-Lösung

Herstellung von Zymosan aktiviertem Serum (ZAS)

0.75 g Zymosan A von *Saccharomyces cerevisiae* wurden in 30 ml PBS gewaschen, 10 Minuten mit 1000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 30 ml nicht hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert und eine Stunde im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 Minuten (3500 g) erfolgte eine einstündige Hitzeinaktivierung des Überstandes bei 56°C. Das aktivierte Serum wurde nun aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.5.4. Bestimmung des Chemotaktischen Faktors für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten

2.5.4.1. Gewinnung der polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten

Zur Gewinnung der polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten wurde frisches Rinderblut, das uns vom Schlachthof Karlsruhe zur Verfügung gestellt wurde, mit 20 Einheiten Heparin pro ml (Liquemin, La Roche) versetzt und 1:3 mit HBSS verdünnt. Die Isolation der bovinen PMN erfolgte nach der Methode von Chodirker et al. (1968). Durch vorsichtiges Überschichten von 20 ml Ficoll-Paque (Pharmacia) mit 25 ml des Blut-HBSS-Gemisches und anschließender Zentrifugation mit 500 g für 30 Minuten bei

Raumtemperatur konnte folgende Fraktionierung erreicht werden: ganz unten im Zentrifugenröhrchen sammelten sich die Erythrozyten und Granulozyten, die von den monozytären Leukozyten und dem klaren HBSS bedeckt waren. Nun wurde von oben abgesaugt, sodaß nur das Erythrozyten/Granulozyten-Pellet zurückblieb. Um die Granulozyten zu isolieren, mußten nun die Erythrozyten lysiert werden. Hierfür wurde jedes Pellet ca. 20 Sekunden lang mit 20 ml 0.2%iger NaCl resuspendiert, und anschließend wurden jeweils weitere 20 ml 1.6%ige NaCl hinzugefügt, damit eine physiologisch Konzentration vorlag. Nach der Zentrifugation (250 g, 7 Minuten) wurde der Überstand verworfen. Diese Behandlung zur Lyse der Erythrozyten wurde 4 bis 5 Mal wiederholt. Das erhaltene weiße Pellet mit den Granulozyten wurde in HBSS mit 0.5% Rinderserumalbumin aufgenommen und Zellzahl und Vitalität mit Trypanblau bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf 0.6×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

2.5.4.2. Leading-Front-Methode

Die Quantifizierung der Granulozyten-Migration wurde nach Kownatzki et al. (1986) auf der Grundlage der Methode von Zigmond und Hirsch (1973) in speziellen Chemotaxiskammern (Nucleopore) durchgeführt. Im Unterschied zur 48 well Microchemotaxiskammer hatte jede Kammer nur eine Vertiefung mit 13 mm Durchmesser, und es wurden 150 µm dicke Cellulosenitrat-Membranen (Sartorius) mit 3 µm Porendurchmesser verwendet, in die die Zellen hineinwanderten. Auch hier gab es ein unteres Kammerteil, in das 200 µl des zu testenden Überstandes pipettiert wurden, und ein oberes Kammerteil, das 800 µl Zellsuspension erhielt. Die Cellulosenitrat-Membranen wurden unmittelbar vor dem Auflegen auf die untere Kammerhälfte mit HBSS getränkt. Jede Probe wurde unverdünnt und 1:10 verdünnt eingesetzt, als Kontrolle diente das Kulturmedium, in dem auch die Proben aufgenommen waren, und als Standard-Chemoattraktant wurde auch hier ZAS (siehe 2.5.3.1.) verwendet. Vorversuche ergaben, daß die maximale Migration mit einer ZAS-Konzentration von 10% zu erreichen war. Nachdem die Kammern verschlossen und gefüllt waren, folgte eine Inkubation im Brutschrank für 90 Minuten. Im Anschluß daran wurden die Kammern aufgeschraubt, die Membranen entnommen und wie folgt fixiert und gefärbt:

Propanol 100%	1 Minute
Hämatoxylin-Harris	6 Minuten
Wasser	kurz ¹
Propanol 70%-HCl	30 Sekunden
Wasser	kurz ¹

Blueing Agent	3 Minuten
Wasser	kurz ¹
Propanol 70%	2 Minuten
Propanol 95%	2 Minuten
Propanol 100%	2 Minuten
Propanol	2 Minuten
Xylol	4 Minuten

Einbetten in Kanadabalsam.

¹Unter fließendem Wasser, bis keine Farbe mehr herauslief.

24 Stunden nachdem die Membranen eingebettet worden waren, wurden sie unter einem Leitz Diaplan Mikroskop (Vergrößerung x 10 x 40) ausgewertet. Hierfür wurde bei jeder Membran an vier verschiedenen Stellen mit dem Mikroskop die Membranoberfläche scharfgestellt. Mit Hilfe einer Mikrometerschraube wurde nun solange durch die Membran durchfokussiert bis die Ebene, auf der die letzten Zellen zu sehen waren, erreicht war. Diese Zellen bildeten die sogenannte "Leading-Front". Von einem speziell angefertigtem Meßgerät, das mit der Millimeterschraube gekoppelt war, wurde die Migrationsentfernung angezeigt. Die chemotaktische Aktivität wurde auch hier in relativen Einheiten angegeben, wobei das Kontrollmedium 0 und 10% ZAS 100 relative Einheiten enthielt.

2.5.5. Charakterisierung der chemotaktischen Faktoren

2.5.5.1. Neutralisation mit Anti-IL8, Anti-MIP-1 α und Anti-C5

Zur näheren Charakterisierung der in den Ozon-exponierten Makrophagenüberständen befindlichen Faktoren, die für Makrophagen bzw. für neutrophilie Granulozyten chemotaktisch wirkten, wurden diese vor dem jeweiligen Chemotaxis-Assay mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Durch eine einstündige Inkubation der zu untersuchenden Probe mit dem Antikörper bei 37°C konnte der chemotaktische Faktor neutralisiert werden. Es wurden monoklonale Antikörper gegen humanes IL8 und MIP-1 α (Biermann, Endkonzentration: 10 μ g/ml) sowie gegen den Komplementfaktor C5 (goat Antiserum to Human C5, ICN, Endverdünnung: 1:100) eingesetzt.

2.5.5.2. Molekulargewichtsbestimmung des ChF für Makrophagen

Um das Molekulargewicht der in den Ozon- bzw. Quarz-exponierten Makrophagen-überständen vorhandenen chemotaktischen Faktoren für Makrophagen einzuschätzen, wurden die jeweiligen Überstände durch spezielle Membranfilter zentrifugiert. Es handelte sich hierbei um Polypropylenröhrchen mit Filtereinheiten, deren Membranen eine Abscheidungsgrenze von 30 bzw. 10 kDa hatten (Ultrafree-MC-Filtereinheit, Millipore). Nach der Zentrifugation (2000 g, 45 Minuten) wurden die filtrierte Medien zum Chemotaxis-Assay mit der 48 well Mikrochemotaxis-Kammer-Methode eingesetzt.

2.6. Bezugsquellen

Actinomycin D	Sigma
Alveofact	Thomae
Amphotericin B	Boehringer
Calcitriol	La Roche
(1- α 15, Dihydroxy-Vitamin D ₃)	
DMSO	Sigma
L- α DPL	Sigma
Ethidiumbromid	Serva
EtOH _{puriss.}	Merck
FCS	Gibco
FDA	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Hemacolor-Schnellfärbung	Merck
Hexamethyldisilazan	Sigma
Lipopolysaccharid von Salmonella abortus equi	Sigma
MEM 100	Gibco
MTT	Serva
Natriumpyruvat	Sigma
Precinorm E	Boehringer
P/S	Gibco
RPMI 1640	Gibco
RSA	Serva
Synthetische Luft mit 5% CO ₂	Messer Griesheim
DL- α Tocopherol	Merck
Trypsin	Gibco
Zymosan von Saccharomyces cerevisiae	Sigma

2.7. Statistik

Bei allen in den Abbildungen dargestellten Meßdaten handelt es sich um arithmetische Mittelwerte. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler wieder.

Um zu überprüfen, ob die Daten normalverteilt sind, wurde der David-Quotient (Sachs, 1984) ermittelt, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zugrunde gelegt wurde. Die statistische Signifikanzanalyse des Unterschiedes zweier Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Testes nach Student durchgeführt (Ehrenberg, 1986). Unter Berücksichtigung, ob es sich um Meßwertpaare oder unabhängige Stichproben handelt, wurde ein statistisch signifikanter Unterschied dann angenommen, wenn $p < 0.05$ war.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß von Ozon auf Rinderalveolarmakrophagen - Vergleich zweier verschiedener Expositionssysteme

Um den Einfluß der Expositionsanordnung bei der Begasung von Alveolarmakrophagen mit Ozon zu untersuchen, wurden die meisten Untersuchungen von RAM sowohl mit der Wippe als auch mit der Voisin-Kammer durchgeführt.

3.1.1. Morphologische und biochemische Untersuchungen

Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Alveolarmakrophagen nach Exposition auf der Wippe konnte kein Unterschied zwischen der Behandlung mit Ozon und synthetischer Luft festgestellt werden. Dies galt unabhängig von der Ozonkonzentration und der Expositionsdauer.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen RAM nach vierstündiger Exposition in der Voisin-Kammer mit synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid und Fluoresceindiacetat. Die Zellen befanden sich auf den Membranen der Luftkulturschälchen. Durch die Ozonexposition kam es zu einem deutlichen Vitalitätsverlust, der durch die verminderte Anzahl grün-gelblich fluoreszierender Zellen bei gleichzeitig erhöhter Anzahl rot fluoreszierender Zellkerne sichtbar ist.

Elektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von RAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer (Abb. 8a-c) zeigen die meist kugelförmigen Zellen mit stark strukturierter Oberfläche. Zum Teil haben sie sehr lange Pseudopodien, mit denen sie in den Poren der Membran verankert sind oder auch Zell-Zell-Kontakte knüpfen (Abb. 8a). Bereits durch eine zweistündige Exposition mit 0.5 ppm Ozon kam es zu deutlichen Veränderungen der Zelloberfläche. Die Zellen erscheinen flacher und es sind einige Zelltrümmer zu sehen. Die auffälligste Veränderung ist jedoch das Auftreten von "Löchern" in der Zellmembran (Abb. 9a-c).

Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an den gleichen Proben durchgeführt wie auch die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen. Man

sieht in Abbildung 10a-c Aufnahmen von Schnitten durch RAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft. Die Zellmembranen sind intakt, das Cytoplasma ist stark strukturiert und zum Teil sind Mitochondrien, der Golgi-Apparat sowie zahlreiche Vesikel und Vakuolen zu erkennen. Der längliche Zellkern weist einen deutlichen Anteil an Heterochromatin auf (Abb. 10b und c). In Abbildung 10a sind die zahlreichen Zellausläufer gut zu erkennen, mit denen die Makrophagen in der Membran verankert sind (Abb. 10c).

Die Aufnahmen der Schnitte nach zweistündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon (Abb. 11a-d) zeigen deutliche Unterschiede zu den Aufnahmen der luftbegasten Kontrollen. Alle Zellen sind wesentlich flacher und bei vielen ist die Zellmembran zum Teil bzw. vollständig zerstört (Abb. 11a). In Abbildung 11b ist ein noch intakter RAM mit deutlich reduzierter Zelloberflächenstruktur direkt neben einer Zelle mit bereits aufgelöster Membran zu erkennen. Zellorganellen sind bei derart geschädigten Zellen nur noch vereinzelt vorhanden (Abb. 11c und d).

Vitalitätsbestimmung

Abbildung 12 zeigt die Vitalität von RAM nach Exposition mit Ozon für vier Stunden in Abhängigkeit von der Konzentration und vom Expositionssystem. Zu Versuchsbeginn lag die Vitalität der RAM in jedem Fall über 95%. In Analogie zu den lichtmikroskopischen Betrachtungen konnte bei den Experimenten mit der Wippe bis zu 2 ppm Ozon kein signifikanter Unterschied zu den Luft-exponierten Zellen festgestellt werden.

Ein deutlicher, fast linearer Vitalitätsverlust im Bereich zwischen 0.25 und 2 ppm war bei den Zellen sichtbar, die in der Voisin-Kammer begast wurden, wobei der Unterschied zwischen 0 und 0.25 ppm Ozon noch nicht signifikant war. Da nach der Exposition mit 2 ppm Ozon 65% der Zellen tot und zum größten Teil nicht mehr adhärent waren, wurde als Obergrenze für die Versuche mit der Voisin-Kammer eine Konzentration von 1 ppm Ozon festgelegt, was einem maximalen Vitalitätsverlust von ca. 35% entsprach.

Die Bestimmung der freigesetzten cytoplasmatischen LDH im Kulturmedium diente der Verifizierung der durch Auszählen ermittelten Vitalitätsraten.

Bei den Versuchen mit der Wippe konnte keine Freisetzung der cytoplasmatischen LDH ins Kulturmedium gemessen werden, da durch die Ozonbegasung bei gleichzeitiger Wippbewegung das Protein LDH zerstört wurde. So konnten in Kontrollexperimenten von 100 U/l einer LDH-Standardlösung nach der vierstündigen Begasung mit 1 ppm Ozon nur noch 23 U/l nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

Abbildung 13 zeigt die LDH-Freisetzung von RAM während einer vierstündigen Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Konzentration. Es ist ein deutlicher

Anstieg der LDH im Kulturunterstand zu sehen, der bei 1 ppm Ozon 180 U/l erreichte. Dieser Anstieg korrelierte gut mit der Vitalitätsminderung.

3.1.2. Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen zur Freisetzung von Cytokinen nach Ozonexposition sind eine Zusammenstellung vieler verschiedener Versuche. Da es zwischen den RAM, die aus verschiedenen Lungen isoliert wurden, teilweise große Unterschiede in Bezug auf eine "Voraktivierung" bzw. Spontanfreisetzung der untersuchten Cytokine gab, wurden für die Darstellung der Konzentrationsabhängigkeiten nur Versuche miteinbezogen, deren Kontrollen keine oder nur eine geringe Spontansekretion aufwiesen. Auf mögliche Ursachen dieser "Voraktivierung" wird in der Diskussion eingegangen.

Die Freisetzung der verschiedenen Cytokine konnte nicht während der Ozonexposition bestimmt werden, da Vorversuche ergaben, daß das Reizgas Ozon neben der LDH auch andere Proteine wie z.B TNF oder IL8 zerstört. Infolgedessen fand unmittelbar nach der Ozonexposition ein Mediumwechsel statt. Nach weiteren zwei Stunden wurde dieses Medium dann zur Bestimmung der Cytokinkonzentrationen abgenommen.

Die Inkubationsdauer von zwei Stunden ergab sich aus weiteren Vorversuchen über die zeitabhängige Freisetzung von TNF und dem ChF für Makrophagen nach LPS-Stimulation, die zeigten, daß zwei Stunden nach Stimulation die maximalen Cytokingehalte gemessen werden konnten (siehe 2.3.5. und Abb. 1 und 2)

TNF α

Abbildung 14 zeigt die Freisetzung des Polypeptidmediators Tumor Nekrose Faktor α nach Ozonexposition auf der Wippe in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration bei RAM. Man erkennt eine deutliche konzentrationsabhängige Zunahme des TNF-Gehaltes, wobei aber kein wesentlicher Unterschied zwischen der zwei- und der vierstündigen Exposition zu verzeichnen war.

Auch die TNF-Freisetzung nach Ozonexposition in der Voisin-Kammer stieg kontinuierlich an (Abb.15). Beim Vergleich der beiden Expositionssysteme war besonders auffällig, daß bei jeweils vierstündiger Ozonexposition mit der Voisin-Kammer wesentlich höhere TNF-Konzentrationen erreicht wurden als mit der Wippe. So lag der TNF-Gehalt nach 1 ppm

Ozon mit der Wippe bei 17 pg pro ml Kulturüberstand (Abb. 14) und mit der Voisin-Kammer bei 85 pg pro ml (Abb. 15).

ChF für Makrophagen

Im Kulturüberstand von RAM, die mit Ozon exponiert worden waren, konnte eine auf unbehandelte Rinderalveolarmakrophagen chemoattraktiv wirkende Aktivität festgestellt werden. Die Freisetzung dieses ChF für RAM wurde zu der einer 10%igen ZAS-Lösung in Relation gesetzt. Die Festlegung auf eine 10%ige ZAS-Lösung als Standard-Stimulans ergab sich aus Vorversuchen mit verschiedenen ZAS-Konzentrationen, wobei die maximale Migrationsfähigkeit durch 10% ZAS erreicht wurde (siehe 2.5.3.1. und Abb. 4).

Betrachtet man Abbildung 16, erkennt man, daß die Freisetzung des ChF für AM nach Ozonexposition mit der Wippe in Abhängigkeit von der Konzentration sowohl bei zweistündiger als auch bei vierstündiger Inkubation anstieg. Die vierstündige Exposition bewirkte dabei ungefähr eine doppelt so hohe Freisetzung wie die zweistündige Exposition. Abbildung 17 zeigt den ebenfalls konzentrationsabhängigen Anstieg der Sekretion des ChF bei Ozonbehandlung in der Voisin-Kammer. In Analogie zu den Ergebnissen der TNF-Messung war die vierstündige Ozonexposition in der Voisin-Kammer ein wesentlich potenterer Stimulus als diejenige auf der Wippe (Abb. 16).

ChF für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten

Die Kulturüberstände ozonexponierter RAM enthielten neben dem ChF für unbehandelte RAM auch einen solchen, der chemotaktische Aktivität für PMN aus Rinderblut aufwies. Auch hier wurde die Konzentration in relativen Einheiten wiedergegeben, wobei 100 relative Einheiten der chemoattraktiven Wirkung einer 10%igen ZAS-Lösung entsprachen. In Abbildung 18 ist zu sehen, daß eine zweistündige Ozonexposition mit der Wippe bis zu 1 ppm Ozon keine Freisetzung von ChF für PMN auslöste, und es erst bei 2.5 ppm Ozon zu einer geringen Zunahme kam. Im Gegensatz dazu bewirkte die vierstündige Exposition bei steigender Ozonkonzentration einen steilen, fast linearen Anstieg der PMN-ChF-Konzentration, wobei durch 1 ppm Ozon schon 96% der chemotaktischen Wirkung einer 10%igen ZAS-Lösung erreicht wurden.

Die in Abbildung 19 dargestellte Freisetzung dieses Faktors nach vierstündiger Ozonexposition in der Voisin-Kammer entsprach weitestgehend den Ergebnissen, die mit der Wippe erzielt worden waren.

3.2. Einfluß von Ozon auf HL-60 Makrophagen

Die promyeloischen HL-60 Zellen, die durch Applikation von 10^{-6} M Calcitriol innerhalb von drei Tagen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenzierten, waren nur schwach adhärent und lösten sich durch eine zwei- bis vierstündige Wippbewegung vom Boden der Kulturflaschen ab. Daher wurden alle Untersuchungen zum Einfluß von Ozon auf HL-60 Makrophagen in den Luftkulturschälchen und in der Voisin-Kammer durchgeführt.

3.2.1. Fluoreszenzmikroskopie und Vitalitätsbestimmung

Abbildung 20 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Makrophagen nach vierstündiger Exposition mit synthetischer Luft. Die Zellen erscheinen rund und sind etwas kleiner als die RAM (Abb. 6). Wie aus Abbildung 21a und b deutlich wird, bewirkte die Exposition mit 0.5 ppm Ozon einen starken Vitalitätsverlust. Dieser ist durch die verminderte Anzahl lebender, grün-gelblich fluoreszierender Zellen bei gleichzeitig erhöhter Anzahl toter, rot fluoreszierender Makrophagen sichtbar.

Die quantitative Bestimmung der Vitalität von HL-60 Makrophagen in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Vitalität der Zellen wurde durch Ozon stark vermindert und lag nach zweistündiger Exposition mit 1 ppm Ozon nur noch bei 40%. Eine vierstündige Ozonexposition bewirkte bereits bei 0.5 ppm eine 40%ige Vitalitätsminderung, so daß keine höheren Konzentrationen für die weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden.

Die Freisetzung der cytoplasmatischen LDH in den Kulturunterstand von HL-60 Makrophagen (Abb. 23) war durch die vierstündige Exposition mit 0.5 ppm Ozon im Vergleich zur Exposition mit synthetischer Luft signifikant erhöht. Dies steht in guter Korrelation zu der ermittelten Vitalitätsminderung.

3.2.2. Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Freisetzung verschiedener Cytokine in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration und der Expositionszeit dargelegt. Da es sich bei den differenzierten HL-60 Makrophagen um eine humane Zelllinie

handelt, und für humane Cytokine Antikörper verfügbar sind, konnte die Bestimmung von TNF, IL8 und IL6 mit ELISA-Testkits durchgeführt werden. In Vorversuchen zeigte sich, daß hiermit für TNF eine wesentlich genauere Quantifizierung möglich war als mit dem Wehi-Assay.

TNF α

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Freisetzung von TNF in den Kulturüberstand bei verschiedenen Ozonkonzentrationen dargestellt. Es kam bei keiner der eingesetzten Ozonkonzentrationen weder durch die zweistündige noch durch die vierstündige Exposition zu einem signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. Allenfalls bei der vierstündigen Exposition war in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration ein tendenzieller Anstieg der TNF-Sekretion sichtbar.

ChF für Makrophagen

Die Freisetzung des ChF für HL-60 Makrophagen (Abb. 25) wurde bei beiden Expositionszeiten durch 0.5 ppm Ozon signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle. Die induzierte Migration der Makrophagen lag jedoch bei allen Experimenten unter 10% derjenigen, welche durch ZAS (10%ige Lösung) ausgelöst wurde, und ist somit als äußerst gering zu beurteilen.

IL8

Die Untersuchungen zur Freisetzung von IL8 bei HL-60 Makrophagen ergaben, daß die Zellen spontan, d.h. auch ohne vorherige Stimulation, große Mengen an IL8 sezernierten. Die Sekretion war allerdings durch Standardstimulantien wie LPS noch um ein Vielfaches steigerungsfähig.

Bei Betrachtung der Abbildung 26 sieht man, daß die Konzentration von IL8 im Kulturüberstand durch Ozon nicht beeinflußt wurde. Die Werte nach vierstündiger Exposition lagen zwar deutlich höher als nach zweistündiger Exposition, allerdings galt das auch für die Kontrollen. Aus diesem Grund muß davon ausgegangen werden, daß die HL-60 Makrophagen bei diesem Versuchsansatz von vornherein eine höhere Spontansekretion zeigten. Der einzige signifikante Anstieg der IL8-Freisetzung wurde nach zweistündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon gemessen.

IL6

Abbildung 27 zeigt die Freisetzung von IL6 bei HL-60 Makrophagen in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration und der Expositionszeit. Sowohl bei der zweistündigen als auch bei

der vierstündigen Exposition kam es erst durch 0.5 ppm Ozon zu einem signifikanten Anstieg der IL6-Konzentration im Kulturüberstand.

3.3. Einfluß von Ozon auf humane Alveolarmakrophagen

Wie in 2.2.2.1. beschrieben, wurden Alveolarmakrophagen von insgesamt 6 Patienten für die Experimente eingesetzt, wobei zwei davon aufgrund der Diagnose Sarkoidose Typ II getrennt betrachtet wurden. Alle Untersuchungen zum Einfluß von Ozon auf humane Alveolarmakrophagen (HAM) wurden mit der Wippe als Expositionssystem durchgeführt.

3.3.1. Lichtmikroskopie und Vitalitätsbestimmung

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen lebender HAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft (Abb. 28a und b) und mit 1 ppm Ozon (Abb. 29) auf der Wippe zeigten morphologisch keine Ozon-induzierten Unterschiede. Nach Applikation von Trypanblau war auch bezüglich der Vitalität kein Unterschied zu sehen. Bei den abgebildeten Zellen handelte es sich um Zellen von Patient 4, in dessen BAL 95% der Zellen Makrophagen waren, die einen dichten, gut adhärenen Zellrasen bildeten. Auffällig war, daß fast alle AM aufgrund des starken Nikotinabusus des Patienten 4 sehr stark granuliert waren.

Die bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten der Sarkoidose-Patienten (Patient 5 und 6) zeichneten sich durch eine hohe Anzahl an Lymphozyten aus. Diese wurden nicht adhären und konnten durch zusätzliches Spülen vor Versuchsbeginn vom Zellrasen der adhärenen Makrophagen entfernt werden.

3.3.2. Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung

TNF α

In den Abbildungen 30 und 31 ist die TNF-Freisetzung in den Kulturüberstand der HAM von vier verschiedenen Patienten nach Exposition mit synthetischer Luft bzw. Ozon dargestellt. Laut Untersuchungsberichten (siehe 2.2.2.1.) handelte es sich zwar bei allen vier Patienten um solche mit einer fibrosierenden Lungenerkrankung, allerdings zeigten die

Kontrollwerte der TNF-Freisetzung nach Behandlung der AM mit synthetischer Luft sehr unterschiedliche Ergebnisse. So lag bei Patient 3 und besonders bei Patient 4 eine starke Spontansekretion vor. Sehr auffällig ist jedoch, daß durch Ozon die TNF-Sekretion der AM aller vier Patienten signifikant anstieg, und zwar sowohl durch 0.5 ppm Ozon als auch durch 1 ppm Ozon.

IL8

Die Ergebnisse der IL8-Freisetzung von HAM (Abb. 32 und 33) nach Luft- bzw. Ozonexposition sind zum Teil widersprüchlich. Auch hier muß berücksichtigt werden, daß es sich um vier verschiedene Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern handelte. Bei den HAM von Patient 1 und 2 bewirkte die Exposition mit 1 ppm Ozon für 2 bzw. 4 Stunden einen deutlichen Anstieg der IL8-Sekretion. Kein signifikanter Unterschied der IL8-Konzentration konnte dagegen in den Überständen der HAM von Patient 3 festgestellt werden. Bei den Zellen von Patient 4 kam es sogar zu einer Verminderung der IL8-Freisetzung.

IL6

Bei Betrachtung der Abbildungen 34 und 35 zeigt sich, daß die AM der vier Patienten nach Exposition mit synthetischer Luft (Kontrollen) sehr unterschiedliche Mengen an IL6 pro ml Kulturüberstand sezernierten. Das korreliert sehr gut mit den entsprechenden Ergebnissen der TNF-Sekretion. Während die Zellen von Patient 1 und 2 kaum IL6 freisetzten, lagen die entsprechenden Werte bei Patient 3 und 4 bei 380 pg pro ml Kulturüberstand. Durch Ozon kam es allerdings bei keinem der vier Experimente zu einer signifikanten Änderung der IL6-Sekretion.

3.3.3. Cytokinfreisetzung bei HAM von Sarkoidose-Patienten

TNF α

In Abbildung 36 ist der Einfluß einer Exposition mit synthetischer Luft bzw. Ozon auf die TNF-Freisetzung der AM von Patient 5 (a) und Patient 6 (b) dargestellt. In beiden Fällen zeichnete sich die BAL durch eine hohe Anzahl an Lymphozyten aus. Ozon bewirkte bei den AM von Patient 5 eine signifikante Abnahme der TNF-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle, wogegen bei Patient 6 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

IL8

Nach der vierstündigen Exposition mit 0.5 ppm (Abb. 37a) bzw. mit 1 ppm Ozon (Abb. 37b) kam es bei den HAM der Sarkoidose-Patienten zu einer signifikanten Abnahme der IL8-Sekretion im Vergleich zu den luftbegasten Kontrollen.

IL6

Abbildung 38 zeigt den Einfluß einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon auf die IL6-Freisetzung der AM von Patient 5. Es ist ein signifikanter Anstieg durch Ozon erkennbar. In den Kulturüberständen der AM von Patient 6 konnte kein IL6 nachgewiesen werden.

3.4. Einfluß von Ozon in Kombination mit Stäuben

Um die Kombinationswirkungen von Gasen mit Staubpartikeln auf AM zu untersuchen, wurde der Luft- bzw. Ozonexposition auf der Wippe eine einstündige Inkubation mit den jeweiligen partikulären Stäuben vorangestellt. Sämtliche Versuche wurden mit RAM durchgeführt.

3.4.1. Lichtmikroskopie

Zunächst wurde durch Hemacolorfärbung und lichtmikroskopische Betrachtung der Zellen nach der jeweiligen Staubinkubation überprüft, ob die RAM die Partikel tatsächlich phagozytiert hatten. Abbildung 39 zeigt Kontrollzellen, die ohne Partikel in Medium kultiviert wurden. Der Zellkern sowie das partikelfreie Cytoplasma sind deutlich zu sehen. Nach einer zweistündigen Inkubation von RAM mit Latex-Partikeln (Abb. 40) sind zum Teil über zwanzig dieser Partikel im Cytoplasma einer Zelle sichtbar. Ebenfalls konnte bei der lichtmikroskopischen Betrachtung die Phagozytose der Quarz-Partikel (Abb. 41) und der denaturierten Albumin-Partikel (Abb. 42) bestätigt werden.

3.4.2. Untersuchungen der Cytokinfreisetzung

Die in den folgenden Abbildungen dargestellten Ergebnisse zeigen den Einfluß der Kombination verschiedener Ozonkonzentrationen mit Latex-, Quarz- oder Albumin-Partikeln auf die Freisetzung von TNF und ChF für Makrophagen. In allen Abbildungen sind im oberen Teil (a) die Ergebnisse der Luftexposition neben denen der Staubphagozytose mit anschließender Luftexposition dargestellt. Im unteren Teil (b) sind die Ergebnisse der Exposition mit Ozon allein neben denen der Kombinationsapplikation Partikel plus Ozon abgebildet. Auf den direkten Vergleich der Behandlung mit synthetischer Luft oder Ozon wurde verzichtet, da dies in 3.1. bereits ausführlich besprochen wurde.

Latex

Latex ist bekannt als biologisch inerte Staub und hatte als solcher keinen Einfluß auf die Vitalität der RAM.

In Abbildung 43a sind die Ergebnisse der Exposition mit synthetischer Luft dargestellt. Weder durch synthetische Luft allein noch durch die vorangestellte Phagozytose von Latex-Partikeln wurde die TNF-Freisetzung beeinflusst. Dasselbe Ergebnis wurde für die Sekretion des ChF für Makrophagen ermittelt (Abb. 44a). Die zweistündige Exposition mit der hohen Konzentration von 2.5 ppm Ozon bewirkte einen deutlichen Anstieg sowohl der TNF- (Abb. 43b) als auch der ChF-Freisetzung (Abb. 44b). Im Vergleich zu der Behandlung mit Ozon allein konnte durch die Kombination von Latex plus Ozon nur ein leichter Anstieg der TNF-Freisetzung nicht aber der ChF-Freisetzung in den Kulturüberstand erreicht werden. Ganz ähnlich waren die Ergebnisse der Exposition mit 1 ppm Ozon in Kombination mit Latex (Abb. 45 und 46). Es zeigte sich eine sehr geringe Freisetzung an TNF und ChF für Makrophagen durch synthetische Luft, die auch durch Latex nicht signifikant verändert wurde. Im Vergleich dazu bewirkte die Exposition der RAM mit 1 ppm Ozon nur eine leichte Sekretionssteigerung der beiden untersuchten Cytokine, und durch die Kombination mit Latex kam es auch hier zu keinem zusätzlichen signifikanten Effekt (Abb. 45b und 46b).

Quarz

Quarz-Partikel sind in hohen Konzentrationen toxisch für AM. Die hier eingesetzte vergleichsweise geringe Konzentration von 50 µg pro ml bewirkte innerhalb einer zweistündigen Inkubation einen Vitalitätsverlust von weniger als 10%.

Abbildung 47a zeigt, daß es durch die Phagozytose von Quarz-Partikeln zu einer Stimulation der TNF-Sekretion im Vergleich zu den Kontrollen kam. Dasselbe wurde bei der Freisetzung des ChF für Makrophagen ermittelt (Abb. 48a). Die zweistündige Exposition

mit 2.5 ppm Ozon löste eine starke TNF- (Abb. 47b) und ChF-Freisetzung (Abb. 48b) aus, wobei nur die ChF-Freisetzung durch die Inkubation mit Quarz zusätzlich stimuliert werden konnte.

Die in den Abbildungen 49 und 50 dargestellten Ergebnisse nach Exposition mit synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon in Kombination mit Quarz zeigen ein ähnliches Verhalten der Makrophagen: Quarz in Kombination mit Luft bewirkte einen deutlichen Anstieg der TNF- (Abb. 49a) und ChF-Sekretion (Abb. 50a). Die Ozon-induzierte Freisetzung der beiden Cytokine konnte jedoch durch die zusätzliche Quarz-Phagozytose nicht mehr gesteigert werden (Abb. 49b und 50b).

In den Abbildungen 51 und 52 sind die Freisetzungen der Cytokine nach Behandlung der RAM mit 0.5 ppm Ozon gezeigt. Die Ergebnisse stimmen gut mit denen der Inkubation mit 1 ppm (Abbildungen 49a und 50a) überein. Die Exposition mit 0.5 ppm Ozon bewirkte eine deutliche TNF-Sekretion, die durch Vorinkubation mit Quarz nicht verändert wurde (Abb. 51b). Die Freisetzung des ChF für Makrophagen wurde in diesem Fall jedoch durch Ozon allein kaum stimuliert, so daß erst Quarz hier zu einem Anstieg der Konzentration dieses ChF führte.

Die Ergebnisse der Kombinationsapplikation von Quarz mit synthetischer Luft bzw. 0.25 ppm Ozon auf die TNF- und ChF-Freisetzung sind in den Abbildungen 53 und 54 gezeigt. Wie bei den höheren Konzentrationen kam es auch hier durch die Quarz-Inkubation allein zu einer Erhöhung der Cytokinkonzentration im Vergleich zu den luftbegasten Kontrollen (a). Die Exposition mit 0.25 ppm Ozon (b) bewirkte keine signifikant höhere Freisetzung von TNF oder ChF für Makrophagen als diejenige mit synthetischer Luft. Die zusätzliche Quarz-Phagozytose führte zu einem Anstieg beider untersuchten Cytokine, allerdings unterscheiden sich die Werte nicht von denjenigen, die nach Behandlung mit Quarz allein erhalten wurden.

Albumin

Als Beispiel für biogenes Material wurden denaturierte Albumin-Partikel hergestellt und in Kombination mit synthetischer Luft bzw. Ozon eingesetzt. Die Konzentration betrug 10^8 Teilchen pro ml, wobei pro Kulturflasche (3×10^6 Zellen) 3 ml zugesetzt wurden.

In Abbildung 55a und 56a ist dargestellt, daß die Albumin-Partikel in Kombination mit synthetischer Luft die Freisetzung von TNF und ChF für Makrophagen auslösten. Die durch Ozon induzierte (in diesem Fall vergleichsweise niedrige) TNF-Sekretion wurde durch die Albumin-Phagozytose nicht verändert (Abb. 55b). Im Gegensatz dazu kam es bei denselben Experimenten zu einem signifikanten Anstieg der Freisetzung des ChF für Makrophagen

durch Albumin (Abb. 56b), die Werte unterscheiden sich aber nicht signifikant von denen, die nach Behandlung mit Albumin plus Luft gemessen wurden.

Die Ergebnisse der Kombinationsversuche mit verschiedenen Stäuben und Ozon zeigten in keinem der untersuchten Fälle einen additiven oder sogar synergistischen Effekt auf die Cytokinfreisetzung von RAM.

3.5. Einfluß von Ozon in Kombination mit Surfactant-Phospholipiden - Vergleich zweier verschiedener Expositionssysteme

Als Surfactant-Phospholipide wurden Dipalmitoyllecitin (DPL) und Alveofact in einer Konzentration von 100 µg pro ml verwendet. Um festzustellen, ob die Surfactant-Bestandteile die Wirkung von Ozon auf AM verändern, wurden diese Untersuchungen mit beiden Expositionssystemen durchgeführt. Für die Experimente mit der Wippe wurde das DPL dem Medium zugegeben. Vor der Inkubation der Luftkulturschälchen in der Voisin-Kammer fand ein "Coaten" der Zellen statt: Das Medium im Kulturunterstand wurde entfernt, und anschließend wurde die DPL- bzw. Alveofact-Lösung auf die RAM gegeben. Diese lief durch die Membran hindurch und hinterließ einen Phospholipidfilm auf dem Zellrasen.

3.5.1. Fluoreszenzmikroskopie und Vitalitätsbestimmung

Wie in 3.1.1. beschrieben hat eine Ozonexposition mit der Wippe keinen Einfluß auf die Morphologie bzw. Vitalität der AM. Entsprechend konnte auch durch DPL keine Veränderung ermittelt werden (ohne Abb.). Im Gegensatz dazu zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von RAM nach vierstündiger Exposition mit Ozon in der Voisin-Kammer (Abb. 58a und b) im Vergleich zu Luft-exponierten Zellen (Abb. 57a und b) einen deutlichen Vitalitätsverlust, der durch die Zugabe von DPL stark vermindert wurde (Abb. 59a und b). Quantitative Vitalitätsbestimmungen sind in Abb. 64 und 67 dargestellt, wo sie jeweils neben der dazugehörigen Untersuchung der Cytokinfreisetzung aufgeführt sind. Die Abbildungen zeigen, daß weder DPL noch Alveofact in Kombination mit synthetischer Luft die Vitalität der RAM beeinflussten (a). Der durch 0.5 ppm (Abb. 64b) bzw. 0.25 ppm Ozon (Abb. 67b) induzierte Vitalitätsverlust wurde aber nahezu verhindert.

3.5.2. Untersuchungen der Cytokinfreisetzung

In den Abbildungen 60 bis 63 ist der Einfluß einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. Ozon in Kombination mit DPL auf die Freisetzung von TNF und ChF für RAM gezeigt. Die Exposition mit 1 und 0.5 ppm Ozon fand auf der Wippe statt. Im oberen Teil (a) jeder Abbildung ist zu erkennen, daß die Zugabe von DPL in den Kulturüberstand keine signifikante Veränderung der Cytokin-Freisetzung bewirkte. Auch auf die Ozon-induzierte TNF- (Abb. 60b und 62b) und ChF-Freisetzung (Abb. 61b und 63b) hatte DPL keinen Einfluß.

Ganz anders stellten sich die Ergebnisse nach Exposition mit der Voisin-Kammer dar. Wie bereits beschrieben, bewirkte Ozon hier eine stärkere Freisetzung der untersuchten Cytokine als bei Exposition mit der Wippe. DPL, das in Kombination mit synthetischer Luft auch hier keinen Effekt zeigte (Abb. 65a und 66a), bewirkte eine Verminderung der Cytokin-Freisetzung durch Ozon. Der Unterschied zur Ozonbehandlung ohne DPL war für TNF allerdings nicht signifikant (Abb. 65b), dagegen kam es bei der Freisetzung des ChF für Makrophagen zu einem hoch signifikanten Unterschied (Abb. 66b).

Alveofact, das schon bei der Vitalitätsbestimmung den gleichen Effekt wie DPL zeigte (siehe 3.5.1.), konnte die Ozon-induzierte Cytokinfreisetzung bei RAM ebenfalls hemmen. Die unteren Teile der Abbildungen 68 und 69 zeigen, daß bei der Exposition mit 0.25 ppm Ozon die Konzentration von TNF und ChF im Kulturüberstand durch Alveofact niedriger war, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant. Im Gegensatz dazu kam es bei dem analogen Experiment mit 1 ppm Ozon (Abb. 70 und 71) zu einer signifikanten Hemmung der Cytokinfreisetzung durch Alveofact. Auffällig ist hier, daß besonders die Freisetzung des ChF für Makrophagen von diesem Schutzeffekt des Alveofact betroffen ist (Abb. 71b), was sich ja auch schon bei der DPL-Applikation zeigte (Abb. 66b).

Bei Betrachtung der Abbildungen 70a und 71a erkennt man, daß die RAM in diesem Versuch "voraktiviert" waren, d.h. daß sie bei Behandlung mit synthetischer Luft allein (Kontrolle) bereits TNF und vor allem ChF für Makrophagen freisetzten. Diese Sekretion wurde durch Alveofact ebenfalls etwas gehemmt.

Die letzte Abbildung (Abb. 72a und b) in diesem Kapitel zeigt die Ergebnisse eines Experiments mit humanen AM von Patient 4 (siehe 2.2.2.1.). Analog zu den Ergebnissen mit RAM wurde auch hier durch Zugabe von DPL der durch Ozon ausgelöste Anstieg der TNF-Sekretion sowie die erhöhte Spontanfreisetzung vermindert.

3.6. Einfluß von Ozon in Kombination mit LPS

Im folgenden Abschnitt sollte überprüft werden, inwieweit eine Ozonbehandlung mit der Voisin-Kammer die stimulierte Cytokinfreisetzung beeinflusst. Lipopolysaccharid, das als Standardstimulans für die Freisetzung aller untersuchten Cytokine diente, wurde dem Kulturmedium unmittelbar nach der Luft- bzw. Ozonexposition zugegeben, und nach zwei Stunden wurden die Überstände abgenommen.

3.6.1. Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung

Die Ergebnisse der LPS-Stimulation der RAM nach zweistündiger Begasung mit synthetischer Luft zeigen eine deutliche Steigerung der Freisetzung von TNF (Abb. 73a) und ChF für Makrophagen (Abb. 74a) gegenüber den Kontrollen. In Abbildung 73b ist zu sehen, daß die Ozon-induzierte TNF-Sekretion durch LPS-Inkubation zusätzlich stimulierbar war, jedoch gehen die Werte nicht über die einer einfachen LPS-Stimulation hinaus. Für die Freisetzung des ChF für Makrophagen gilt im Prinzip dasselbe, allerdings wurde hier durch die Kombination Ozon plus LPS eine höhere ChF-Konzentration erreicht als durch LPS allein, so daß man hier von einer additiven Wirkung sprechen kann.

Ganz ähnlich waren die Ergebnisse der vierstündigen Exposition mit Luft bzw. 0.5 ppm Ozon und anschließender LPS-Inkubation (Abb. 75 und 76). Auch hier kam es durch LPS allein zu der bekannten Sekretionssteigerung der beiden untersuchten Cytokine (a). Die Ozon-induzierte TNF- (Abb. 75b) und ChF-Freisetzung (Abb. 76b) wurde durch LPS zwar etwas verstärkt, aber es war ebenfalls in keinem Fall ein synergistischer Effekt durch die Kombination Ozon plus LPS sichtbar.

In Abbildung 77a bis c sind die Ergebnisse eines Vergleichsexperiments mit HAM von Patient 2 dargestellt. Es wird jeweils die Kombination synthetische Luft plus LPS mit der Kombination Ozon plus LPS verglichen. Die zweistündige Exposition mit 1 ppm Ozon fand auf der Wippe statt und führte zu keiner signifikanten Veränderung der LPS-induzierten TNF-Freisetzung (a). Die Mediumkonzentration von IL8 wurde durch Ozon erhöht (b) und diejenige von IL6 vermindert (c).

Da es, wie in den Abbildungen 73 bis 76 gezeigt, nur für den ChF für Makrophagen zu einer Erhöhung der LPS-induzierten Sekretion durch Ozon kam, wurde im folgenden Experiment untersucht, ob dieser Ozoneffekt durch die Zugabe von DPL verhindert werden konnte. In

Abbildung 78a und 79a ist dargestellt, daß sowohl durch 1 ppm als auch durch 0.5 ppm Ozon die ChF-Konzentration anstieg. Dieser Anstieg wurde durch DPL verhindert (Abb. 78b und 79b), so daß bezüglich der LPS-Stimulierbarkeit kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Luft- und Ozon-exponierten Zellen feststellbar war.

3.7. Einfluß von Ozon in Kombination mit Vitamin E

3.7.1. Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung

DL- α Tocopherol (Vitamin E), dessen antioxidative Eigenschaft bekannt ist, wurde in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt, um einen möglichen Schutzeffekt gegenüber Ozon zu untersuchen.

Die Abbildungen 80a und 80b zeigen die Ergebnisse einer zweistündigen Exposition von RAM, mit 1 ppm Ozon auf der Wippe in Kombination mit Vitamin E. Bei der Vitamin E-Inkubation wurde zwischen zwei verschiedenen Behandlungsweisen unterschieden: Entweder erhielten die Zellen den Vitamin E-Zusatz erst zu Beginn der Ozonexposition (C), oder sie wurden bereits nach der Lavagierung in Vitamin E-haltigem Medium kultiviert und waren somit ca. 24 Stunden vorinkubiert (D). Die Konzentration von TNF (Abb. 80a) als auch die von ChF für Makrophagen (Abb. 80b) war nach der Ozonbehandlung (B) deutlich höher als bei der luftbegasteten Kontrolle (A). Die Vitaminzugabe während der Ozonexposition (C) bewirkte keine Verminderung der Cytokinfreisetzung. Im Gegensatz dazu führte die Vorinkubation mit Vitamin E (D) zu einer Hemmung der Ozon-induzierten TNF- und ChF-Freisetzung. Die Werte der TNF-Sekretion zeigten nicht einmal mehr einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten (A), wogegen die Konzentration des ChF bei D noch über Kontrollniveau lag.

3.8. Charakterisierung der chemotaktischen Faktoren

Die Quantifizierung der chemotaktischen Faktoren, die in den Ergebnissen dargestellt sind, wurde mit Hilfe von Bioassays durchgeführt, wobei es sich im Falle des ChF für Granulozyten um die Leading-Front-Methode handelte und im Falle des ChF für Makrophagen um

die 48 well Mikrochemotaxis-Kammer-Methode. Durch nachfolgende Experimente wurde versucht, die einzelnen Faktoren, die diese Migration auslösten, näher zu bestimmen.

3.8.1. ChF für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten

Da IL8 als ChF für neutrophile Granulozyten bekannt ist, wurde untersucht, ob es sich bei dem in dieser Arbeit gemessenen ChF für PMN ebenfalls um IL8 handeln könnte. In Abbildung 81a ist die Migration der Granulozyten in Abhängigkeit von der IL8-Konzentration dargestellt. Die maximale Wanderung wurde bei 1 ng IL8 pro ml erreicht. Zum Vergleich ist in Abbildung 81b die chemotaktische Aktivität von ZAS gezeigt, dessen 10%ige Konzentration in allen Untersuchungen als Standardstimulans und zur Definition von 100 relativen Einheiten diente.

Nachdem geklärt war, daß hr-IL8 chemotaktische Aktivität für bovine PMN besaß, wurde versucht, diese Wirkung des IL8 durch Kombination mit einem monoklonalen Antikörper gegen hr-IL8 zu neutralisieren. Abbildung 82 macht deutlich, daß durch die einstündige Inkubation von IL8 mit Anti-IL8 die chemotaktische Aktivität stark vermindert wurde (mittlere Säule). Anti-IL8 allein bewirkte keine Migration der Granulozyten.

Im folgenden ging es darum herauszufinden, ob der durch Ozon induzierte ChF für Granulozyten ebenfalls IL8 ist. Hierfür wurde ein RAM-Überstand, der nach vierstündiger Exposition mit 1 ppm Ozon gewonnen worden war, mit Anti-hr-IL8 inkubiert. Abbildung 83 zeigt, daß die hohe chemotaktische Ausgangsaktivität von 92 relativen Einheiten durch Anti-IL8 konzentrationsabhängig bis auf 20 relative Einheiten neutralisiert werden konnte. Die durch LPS-Inkubation der RAM induzierte chemotaktische Aktivität im Kulturüberstand konnte durch Anti-IL8 ebenfalls vermindert werden. Es blieb jedoch bei einer Restaktivität von 30 relativen Einheiten (Abb. 84).

3.8.2. ChF für Makrophagen

Um den Faktor, der für AM chemotaktische Aktivität besitzt, näher zu bestimmen, wurde zunächst untersucht, ob das für die Granulozyten-Migration verantwortliche IL8 auch für Makrophagen chemotaktisch wirkt. In Abbildung 85a ist deutlich zu erkennen, daß IL8 unabhängig von der Konzentration keine chemotaktische Aktivität für RAM aufweist. Abbildung 85b zeigt im Vergleich die durch das Standardstimulans ZAS induzierte Migration der Makrophagen. Entsprechend wurde auch, wie in Abbildung 86 zu sehen ist, durch Anti-IL8

keine Neutralisation der chemotaktischen Aktivität in den Überständen, die nach vierstündiger Exposition mit 1 ppm Ozon gewonnen worden waren, erreicht.

Im Gegensatz dazu konnte, wie Abbildung 87 zeigt, die chemotaktische Aktivität des Ozon-exponierten RAM-Überstandes (a) durch die Inkubation mit Antikörpern gegen C5 deutlich vermindert werden (c). Verwunderlich war hier allerdings, daß der Antikörper allein eine gewisse Migration der Makrophagen auslöste (b).

Als weiterer möglicher ChF für Makrophagen wurde MIP-1 α in Betracht gezogen. Wie Abbildung 88 zeigt, konnten jedoch keine Hinweise auf eine Neutralisation der chemotaktischen Aktivität mit Anti-MIP-1 α gefunden werden.

Mit Hilfe spezieller Membranfilter, deren Abscheidungsgrenze 30 bzw. 10 kDa betrug, wurde versucht, den ChF für Makrophagen über das Molekulargewicht etwas näher zu charakterisieren. Zunächst wurde der ChF untersucht, der sich in den Überständen von RAM nach vierstündiger Exposition mit Ozon befand (Abb. 89). Nach Zentrifugation mit einem Filter, dessen Membran eine Abscheidungsgrenze von 30 kDa hatte, konnte noch eine deutliche chemotaktische Aktivität im Kulturüberstand gefunden werden. Diese lag sogar über der Ausgangsaktivität, was eine Folge der Aufkonzentrierung durch die Filtration war. Im Gegensatz dazu war nach Zentrifugation mit dem 10 kDa-Membranfilter keine chemotaktische Aktivität mehr meßbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß das Molekulargewicht des durch Ozonexposition induzierten ChF für Makrophagen zwischen 10 und 30 kDa liegt.

Dieselbe Behandlung der mit Quarz inkubierten RAM-Überstände (Abb. 90) führte zu dem überraschenden Ergebnis, daß es sich hierbei nicht um denselben ChF für Makrophagen handeln konnte, der nach Ozonexposition freigesetzt wurde. Die Membranfiltrationen zeigten nämlich deutlich, daß auch nach der Zentrifugation mit dem 10 kDa-Membranfilter noch chemotaktische Aktivität im Kulturüberstand vorhanden war. Somit muß das Molekulargewicht des durch Quarz induzierten ChF für Makrophagen kleiner als 10 kDa sein.

4. Diskussion

Ozon ist ein Luftschadstoff, der durch die steigenden Konzentrationen in der Troposphäre in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen hat. Für die erhöhte Ozonbildung sind hauptsächlich antropogene Schadstoffquellen verantwortlich (siehe Einleitung). Aus zahlreichen Untersuchungen geht hervor, daß in erster Linie der Respirationstrakt von den toxischen Effekten des Reizgases betroffen ist. Durch die Inhalation von Ozon kommt es neben Veränderungen der Lungenfunktionen (Kinney et al., 1989; Lippmann, 1989; Bates, 1989; Koenig und Pierson, 1991) auch zur Beeinflussung immunologischer Reaktionen (Frischer et al., 1993; Zwick et al., 1991). Dies war einer der Gründe, warum in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Ozon auf Alveolarmakrophagen, die eine Quelle wichtiger proinflammatorischer Mediatoren darstellen, untersucht wurde.

Da das Arbeiten mit humanen AM aus verschiedenen Gründen problematisch war (siehe 4.1.), sollte zunächst geklärt werden, inwieweit RAM und HL-60 Makrophagen als Modell für die Experimente mit Ozon geeignet sind. Die Ozonexposition fand in zwei verschiedenen Expositionssystemen statt, die in Bezug auf die Übertragbarkeit auf die in vivo-Situation miteinander verglichen wurden. Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, Ozon-induzierte Veränderungen der Morphologie und Cytokinfreisetzung von Makrophagen zu erfassen, darüberhinaus sollte geprüft werden, ob Vitamin E und Surfactantbestandteilen hierbei eine modifizierende Wirkung zuzuordnen ist. Außerdem wurden Kombinationswirkungen von Ozon mit anderen Stimuli, wie Staubphagozytose oder LPS-Inkubation, untersucht. Bei den untersuchten Cytokinen handelte es sich um den Tumor Nekrose Faktor α , Interleukin 8, Interleukin 6 sowie um chemotaktische Faktoren für Makrophagen und Granulozyten, die abschließend näher charakterisiert wurden.

4.1. Eignung von Makrophagen verschiedener Herkunft zur Untersuchung der Ozonwirkung

Da die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, die uns von der Thoraxklinik Heidelberg/Rohrbach zur Verfügung gestellt wurde, nur 5 - 20 x 10⁶ humane Alveolarmakrophagen enthielt, konnten bei den Untersuchungen des Einflusses von Ozon auf HAM nur wenige Parallelansätze durchgeführt werden. Außerdem handelte es sich durchweg um Zellen von Patienten mit unterschiedlichen pathologischen Vorgeschichten. Die Patienten waren auch zum größten Teil starke Raucher, so daß nicht auszuschließen war, daß zusätzliche Faktoren die Experimente mit Ozon beeinflussen könnten.

Aus diesen Gründen sollte geklärt werden, ob Rinderalveolarmakrophagen, die in unserem Labor bereits für Untersuchungen zur Cytokinfreisetzung nach Inkubation mit NO₂ (Lind,

1993) und seltenen Erden (Schmidt, 1992; Polzer, 1992) eingesetzt worden waren, für die Ozonexperimente ein geeignetes Modell darstellen. Das Arbeiten mit RAM hatte den großen Vorteil, daß problemlos ca. 10^9 AM aus einer Lunge erhalten wurden, und durch die große Anzahl einer genetisch homogenen Zellpopulation konnten zahlreiche Vergleichsexperimente zur Untersuchung von Morphologie und Cytokinfreisetzung durchgeführt werden. Allerdings muß bedacht werden, daß es zwischen bovinen und humanen Makrophagen zum Teil Unterschiede in Bezug auf die Membranrezeptoren gibt. So konnten Bielefeldt-Ohmann und Babiuk (1984) zeigen, daß Rinderphagozyten z.B. keine fMLP-Rezeptoren aufweisen.

Als zweite Alternative zu den HAM wurden HL-60 Zellen eingesetzt. Da es sich hierbei um eine Zelllinie handelte, konnten problemlos genügend Zellen bereitgestellt werden. Ein weiterer Vorteil war, daß es sich um humane Zellen handelte, was den Einsatz von ELISA-Testkits zur hochspezifischen Quantifizierung der Cytokingehalte ermöglichte. Allerdings waren diese promyeloischen Leukämiezellen mit Calcitriol nur in Richtung Monozyten/Makrophagen differenzierbar, d.h. sie wiesen zwar viele Eigenschaften von Makrophagen auf, wie z.B. Phagozytoseaktivität, Sekretion der unspezifischen Esterase und Migrationsfähigkeit, allerdings zeigten sie kaum Plastik-Adhärenz (Collins, 1987). Aufgrund dessen konnten sie nicht für die Versuche mit dem Expositionssystem Wippe eingesetzt werden.

Bei der Vitalitätsbestimmung zeigte sich bei den HAM nach Ozonexposition auf der Wippe keine Veränderung. Dies war unabhängig von der Ozonkonzentration. Auch bei den RAM führte die Ozonapplikation auf der Wippe zu keinem Vitalitätsverlust. Dagegen konnten sowohl bei RAM als auch bei HL-60 Zellen mit dem Expositionssystem nach Voisin Vitalitätsverluste festgestellt werden, die jedoch bei den HL-60 Zellen wesentlich höher lagen. So bewirkte die vierstündige Exposition mit 1 ppm Ozon bei den Rinderzellen einen Vitalitätsverlust von 40% (Abb. 12), während bei den HL-60 Makrophagen dies bereits bei 0.5 ppm Ozon erreicht wurde (Abb. 22).

Um die Ergebnisse der Cytokinfreisetzung zwischen HAM einerseits und RAM und HL-60 Zellen andererseits zu vergleichen, werden nur die Ergebnisse der HAM von Patient 1 bis 4 herangezogen, da die Sarkoidose-Patienten (Patient 5 und 6) getrennt betrachtet werden sollten. Bei den HAM aller vier Patienten war eine Ozon-induzierte Stimulation der TNF-Freisetzung zu erkennen (Abb. 30 und 31). Analog dazu beschrieben Paulesu et al. (1991) eine Induktion der TNF-Freisetzung bei menschlichen Blut-Leukozyten durch Ozon. Die IL8-Sekretion der Patienten 1 und 2 wurde durch Ozon ebenfalls stimuliert, während die Freisetzung von IL6 unbeeinflusst blieb (Abb. 32 bis 34). Auch die RAM zeigten eine deutliche TNF-Sekretionssteigerung (Abb. 14 und 15) durch Ozon sowie einen Konzentrationsanstieg des ChF für PMN (Abb. 18 und 19), bei dem es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um IL8 handelte (siehe 4.5.). Dies korreliert gut mit dem häufig beschriebenen Anstieg von

neutrophilen Granulozyten in der BAL nach in vivo-Exposition mit Ozon (Koren et al., 1989; Bassett et al. 1988).

Samet und Friedman (1992) verwendeten bereits HL-60 Zellen, um den Einfluß von Ozon auf die Produktion des Plättchen-Aktivierenden-Faktors zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen allerdings mit TPA zu Makrophagen differenziert. Bei den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Calcitriol-differenzierten HL-60 Makrophagen bewirkte Ozon keine signifikante Steigerung der TNF- und IL8-Freisetzung. Die Sekretion von IL6 konnte jedoch durch 0.5 ppm Ozon stimuliert werden (Abb. 24, 26 und 27). Somit zeigten die Ergebnisse der Ozon-induzierten Cytokinfreisetzung von HL-60 Makrophagen große Unterschiede zu denen von HAM.

Aufgrund dieser vergleichenden Untersuchungen konnte eindeutig entschieden werden, daß RAM als Modell zur Untersuchung des Einflusses von Ozon auf humane AM besser geeignet sind als HL-60 Makrophagen. Die Eignung von RAM konnte außerdem durch die Analogie der Ergebnisse der Cytokinfreisetzung von HAM und RAM nach Inkubation mit DPL bzw. LPS bestätigt werden: Bei beiden Zellarten führte eine Surfactant-Beschichtung der Zellen in den Luftkulturschälchen zu einer protektiven Wirkung bezüglich der TNF-Freisetzung (Abb. 70 und 72). Ebenso bewirkte LPS in beiden Fällen einen deutlichen Anstieg der TNF-Sekretion, der durch Ozon nicht mehr wesentlich gesteigert werden konnte (Abb. 73, 75 und 77a). Möglicherweise sind die Rinderzellen in Bezug auf die Sensitivität gegenüber Ozon besser mit den HAM vergleichbar, weil es sich bei ihnen ebenfalls um 'Alveolar'-Makrophagen handelt, wogegen es sich bei den HL-60 Makrophagen, die zwar humaner Herkunft sind, um promyeloische Zellen handelt, die aber lediglich in Richtung Monozyten/ Makrophagen differenziert wurden.

4.2. Vergleich zweier verschiedener Expositionssysteme - Einfluß von Surfactant-Bestandteilen

In der Literatur sind mehrere verschiedene Systeme zur in vitro-Begasung von Zellen beschrieben. Da das Ozon bei einigen dieser Versuchsanordnungen ins Kulturmedium geleitet wurde (Konings, 1986; Sweet et al., 1980), ist der direkte Einfluß des Gases auf die Zellen nur schwer quantifizierbar. Man muß davon ausgehen, daß sich die applizierte Ozonkonzentration zumindest zum Teil im Kulturmedium löst (Mortimer, 1987) und daher nicht in vollem Maße auf die Zellen einwirkt. Ganz davon abgesehen, daß möglicherweise durch die Interaktion zwischen Kulturmedium und Ozon Artefakte entstehen könnten, die dann ganz andere Effekte bei den Zellen hervorrufen könnten, als dies für Ozon allein zuträfe. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit für die Ozonbegasung der RAM zwei verschiedene

Expositionssysteme verwendet, die einen unmittelbaren Kontakt der Makrophagen mit dem Schadgas ermöglichten.

Für die Exposition mit der Wippe wurden die Zellen in den Kulturflaschen mit einer dünnen Flüssigkeitsschicht bedeckt. Hierfür wurde PBS verwendet, um die in der Literatur (Wenzel und Morgan, 1982) erwähnten Einflüsse von Zellkulturmedium auf die Ozontoxizität auszuschließen. Durch die Wippbewegung waren die Makrophagen wechselweise dem durchströmenden Gas und der Flüssigkeit ausgesetzt. Obwohl die Wippbewegungen sehr langsam waren, konnte der Zellrasen niemals völlig austrocknen, was der Situation in der Lunge, wo auch keine völlige Trockenheit vorliegt, sehr nahe kam. Allerdings wurde in diesem System jeweils nur ein Teil der Makrophagen mit Ozon exponiert, während der andere unter Flüssigkeit, und damit nicht angreifbar für das schlecht wasserlösliche Ozon war. Dies hat eine deutlich kürzere effektive Inkubationszeit zur Folge, und das könnte auch ein Grund sein, weshalb mit der Wippe, selbst bei hohen Ozonkonzentrationen, wesentlich geringere Vitalitätsverluste und Cytokinfreisetzen erreicht wurden als mit der Voisin-Kammer (Abb. 12 und 14 bis 19). Ein zusätzliches Problem bei der Ozonexposition mit der Wippe war die Tatsache, daß nicht alle Makrophagen gleich gut adhären und sich zum Teil Zellen durch die Wippbewegung ablösten. Deshalb wurde die maximale Inkubationszeit auf vier Stunden limitiert. Um mögliche Unterschiede auszugleichen, wurden außerdem am Versuchsende die adhären Zellen gezählt und die Ergebnisse auf 10^6 Zellen normiert.

Für die Exposition in der Voisin-Kammer wurden die Makrophagen in den Luftkulturschälchen ausgesät, wo sie sich mit Hilfe ihrer Pseudopodien von der unter der Membran befindlichen Flüssigkeitsschicht ernährten. Der Zellrasen erschien von oben völlig trocken und war somit dem Ozon unmittelbar ausgesetzt. Dies ist sicherlich der Grund für die deutlich höheren Werte des Vitalitätsverlustes sowie der Freisetzung aller untersuchten Cytokine im Vergleich zu den Ergebnissen mit der Wippe (siehe oben).

Um das System der Realität, d.h. der in vivo-Situation in der Lunge, etwas stärker anzupassen, wurden die Zellen mit einer dünnen Schicht Surfactant bedeckt. Die Ozonexposition der mit Surfactant beschichteten RAM führte zu einem deutlich geringeren Vitalitätsverlust im Vergleich zur Ozonbehandlung ohne Phospholipide (Abb. 57-59, Abb. 64). Zwischen dem verwendeten reinen DPL und Alveofact, einem Phospholipidgemisch mit großem DPL-Anteil, war kein qualitativer Unterschied feststellbar. Der Schutzeffekt des Surfactant zeigte sich auch bezüglich der Ozon-induzierten Freisetzung von TNF und ChF für Makrophagen (Abb. 68 - 72) sowohl bei RAM als auch bei HAM. Besonders stark wurde die Sekretion des ChF durch DPL (Abb. 66) bzw. Alveofact (Abb. 71) gehemmt. Eine ebenfalls inhibitorische Wirkung von synthetischem Surfactant auf die Sekretion von TNF, IL1, IL6 und IL8 bei HAM nach LPS-Stimulation fanden Thomassen et al. (1992). Dies läßt darauf schließen, daß Surfactant möglicherweise eine immunoregulatorische Funktion bezüglich der Cytokinproduktion in der Lunge einnimmt. Das wäre auch eine mögliche Erklärung für die Vermin-

derung der teilweise erhöhten Spontanfreisetzung (Abb. 70 bis 72) durch den Zusatz von Surfactant. Andererseits liegt im Falle der Ozonexposition die Vermutung nahe, daß durch das "Coaten" der Zellen die Membran vor dem oxidativen Angriff des Reizgases geschützt wurde. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmungen (Abb. 64 und 67). Dieselbe Art der DPL-Applikation wurde bereits bei Lind (1993) in Kombination mit NO₂ eingesetzt und führte dort zu einer protektiven Wirkung bezüglich der Freisetzung des Superoxidanionenradikals bei RAM. Da ein DPL-Zusatz zum Kulturmedium bei Ozonexposition mit der Wippe die Cytokinproduktion nicht vermindern konnte (Abb. 60 bis 63), war es für die protektive Wirkung offensichtlich entscheidend, daß sich der Phospholipidfilm unmittelbar auf dem Zellrasen befand.

Beim Vergleich der beiden Expositionssysteme zeigt sich ganz deutlich, daß die Exposition der Zellen in der Voisin-Kammer mit direktem Gaskontakt ein stärkeres Stimulans für die RAM darstellte als die Ozonbehandlung in Kulturflaschen auf der Wippe. Allerdings wurden diese Unterschiede wieder etwas ausgeglichen durch die Surfactant-Beschichtung der Zellen in den Luftkulturschälchen, womit auch das methodisch bedingte Austrocknen des Zellrasens verhindert werden konnte. So stellte jedes der beiden Expositionssysteme ein geeignetes Modell zur Untersuchung des Einflusses von Ozon auf Alveolarmakrophagen dar.

In beiden Untersuchungssystemen zeigten die RAM dasselbe immunologische Verhalten wie in der konventionellen Submerskultur, was mit den Untersuchungen mit synthetischer Luft in Kombination mit Quarz bzw. Latex verifiziert werden konnte: Die bei Schmidt (1992) dargestellte Freisetzung von TNF nach Quarzinkubation von RAM im Brutschrank wurde mit den hier benutzten Expositionssystemen nach der Phagozytose von Quarz und anschließender Begasung mit synthetischer Luft ebenfalls beobachtet (Abb. 47a und 49a). Latex dagegen blieb als Inertstaub auch in Kombination mit synthetischer Luft ohne Einfluß auf die TNF- und ChF-Freisetzung (Abb. 43 - 46). Zu demselben Ergebnis bezüglich des Expositionssystems Voisin-Kammer kam auch Lind (1993). Dies bedeutet für die hier durchgeführten Experimente, daß die beiden präsentierten Versuchsanordnungen in keinem Fall eine Veränderung der physiologisch-immunologischen Reaktionsmechanismen der Zellen zur Folge haben.

4.3. Einfluß von Ozon auf Makrophagen

In der Literatur sind zahlreiche in vivo-Experimente beschrieben, die die toxischen Effekte von Ozon untersuchen. Bereits 1957 wurde von Stokinger die LD₅₀, d.h. diejenige Ozonosis, durch die 50% der untersuchten Tiere getötet werden, bestimmt. Bei einer vierstün-

digen Exposition entsprach sie für Mäuse einem Wert von 3.8 ppm. In den letzten Jahren wurden in vivo-Experimente mit niedrigeren Ozonkonzentrationen (0 bis 1 ppm) durchgeführt, um den Einfluß umweltrelevanter Konzentrationen zu untersuchen. Neben Veränderungen von Lungenfunktionen, wie der Verminderung der Vitalkapazität und der expiratorischen Sekundenkapazität (McDonnell et al., 1991), gibt es Hinweise auf Ozon-induzierte Entzündungsprozesse (Chang et al., 1992). Auch epidemiologische Studien bestätigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen Atemwegserkrankungen und hohen Ozonkonzentrationen in Südkalifornien (Ostro et al., 1993; Frischer et al., 1993) und in Mexico-City (Romieu et al., 1992). Allerdings kann nur durch in vitro-Experimente der Einfluß von Ozon auf verschiedene immunologische Parameter einzelner Zellarten der Lunge untersucht werden. Um den Mechanismus der Ozontoxizität für Makrophagen genauer zu klären, sollen im folgenden die Ozon-induzierten Veränderungen bezüglich der Vorgänge an der Zellmembran sowie die Veränderungen der Cytokinfreisetzung besprochen werden.

4.3.1. Ozon-induzierte Veränderungen an der Zellmembran von Alveolar-makrophagen

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Ozon-exponierten RAM (Abb. 58a und b) sowie der HL-60 Makrophagen (Abb. 21a und b) zeigen einen deutlichen Vitalitätsverlust, der durch die Freisetzung der LDH bestätigt werden konnte (Abb. 13 und 23). Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Dumler et al. (1994) nach Ozonexposition nasaler und bronchialer Epithelzellen. Im Gegensatz zu fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von RAM mit NO₂ (Lind, 1993) ist hier keine Bildung von "Blebs" an der Zelloberfläche zu sehen. Stattdessen bewirkte Ozon Membranzerstörungen, die erst mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (Abb. 9a-c) und der Transmissionselektronenmikroskopie (Abb. 11a-c) sichtbar gemacht werden konnten. Besonders die mit dem TEM gemachten Aufnahmen zeigen deutliche "Löcher" in der Zellmembran, durch die der größte Teil des Cytoplasmas ausgetreten ist (Abb. 11c und d). Wahrscheinlich verläuft diese Ozon-bedingte Zerstörung der Membranen über die Bildung von freien Radikalen (Mehlmann und Borek, 1987), die dann einerseits für die Oxidation von Thiolen, Aminen und Proteinen verantwortlich sind und andererseits die Peroxidation der Membranlipide auslösen. Nach Morgan und Wenzel (1985) wird der Ozoneffekt hauptsächlich über Wasserstoffperoxid und daneben auch über das Superoxidanionenradikal und das Hydroxylradikal vermittelt. Diese reaktiven Sauerstoffspezies oxidieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren, und es kommt in Anwesenheit von Sauerstoff zur Entstehung von Lipidperoxyl- und Lipidalkoxyradikalen (Cheeseman, 1993), die so die Kettenreaktion immer wieder neu entstehender Radikale fortsetzen. Im Gegensatz dazu geht Menzel (1993) davon aus, daß Ozon direkt mit den Ethylengruppen einer mehrfach ungesättigten Fettsäure zum 'Criegee-Ozonid' reagiert, das dann über die Bildung eines

sekundären Ozonides ebenfalls zur Entstehung von Alkoxy- und Peroxylradikalen führt. Diese beiden möglichen Reaktionswege wurden auch schon von Alink und Rietjens (1990) aufgezeigt.

Die Theorie des über freie Radikale vermittelten Ozoneffektes konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchungen mit dem Radikalfänger Vitamin E bestätigt werden, dessen antioxidative Funktion auf seine phenolische Hydroxylgruppe zurückzuführen ist. Wie in Abbildung 80 dargestellt ist, konnte bei RAM durch eine Vorinkubation mit DL- α Tocopherol die Ozon-induzierte Cytokinfreisetzung vermindert werden. Die bloße Zugabe von Vitamin E zum Kulturmedium während der Ozonexposition zeigte jedoch keinen Effekt. Das legt die Vermutung nahe, daß das lipophile Antioxidans mit der Isoprenoid-Seitenkette erst dann seine protektive Wirkung entfalten kann, wenn es in die Zellmembran eingebaut worden ist. Dieser Einbau konnte während der Vorinkubation erfolgen. Diplock (1982) geht davon aus, daß Vitamin E in biologische Membranen inkorporiert wird durch eine physiko-chemische Assoziation der α Tocopherol-Seitenkette mit Arachidonsäure-Resten der Membranphospholipide. Die Interaktion mit Membranphospholipiden wurde auch von Salgado et al. (1993) beschrieben.

Neben Vitamin E sind in der Literatur noch viele andere Radikalfänger wie z.B. Superoxid-dismutase, Glutathion, Glutathionperoxidase oder Ascorbinsäure (Vitamin C) erwähnt. Rietjens et al. (1986) fanden, daß bei einer Exposition von Rattenalveolarmakrophagen mit NO_2 Vitamin C das bessere Antioxidans war, während vor Ozon Vitamin E besser schützte. Mayer (1992) konnte eine cytoprotektive Wirkung von Vitamin C bezüglich der Mortalität von Lungenfibroblasten nach Ozonexposition nachweisen, und Banks et al. (1991) ermittelten nach Taurin-Zugabe zum Kulturmedium von Ozon-exponierten Rattenalveolarmakrophagen einen verminderten Vitalitätsverlust und eine geringere ATPase-Freisetzung. Aus allen hier aufgeführten Literaturstellen geht eindeutig hervor, daß Ozon über die Bildung von freien Radikalen zur Lipidperoxidation führt. Von DL- α Tocopherol wird diese Kettenreaktion gestoppt, indem es mit Peroxylradikalen reagiert und so deren Angriff auf neue ungesättigte Fettsäuren verhindert (Liebler, 1993).

Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde ein Schutzeffekt vor Ozon auch durch das "Coaten" der RAM mit DPL (Abb. 64) bzw. Alveofact (Abb. 67) erreicht. Da die Zugabe von DPL zum Kulturmedium bei Exposition mit der Wippe ohne Einfluß blieb (Abb. 60 bis 63), scheint die Anwesenheit des Phospholipidfilms direkt auf dem Zellrasen von entscheidender Bedeutung zu sein. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß Ozon zunächst an der Zellmembran angreift. Der genaue Schutzmechanismus von DPL ist allerdings unklar, da das Phosphatidylcholin mit seinen beiden Palmitinsäuren keine Doppelbindungen enthält, um einen Angriff freier Radikale abzufangen. Die von Prof. Dr. Müller an der Universitätsklinik Marburg mit der HPLC durchgeführten Analysen einer DPL-Lösung, die von

uns mit Ozon exponiert worden war, ergaben ebenfalls keine Hinweise auf Veränderungen am DPL-Molekül.

4.3.2. Ozon-induzierte Veränderungen der Cytokinproduktion bei Alveolar-makrophagen

Cytokine sind wichtige multifunktionale Mediatoren für das Zellverhalten und die Zell-Zell-Kommunikation. In der Lunge werden sie zum großen Teil von Makrophagen freigesetzt. Die Exposition von RAM mit Ozon bewirkte einen deutlichen konzentrationsabhängigen Anstieg der Sekretion von TNF, ChF für Makrophagen und ChF für neutrophile Granulozyten (Abb. 14 bis 19). Dies galt für beide Expositionssysteme, wobei die vierstündige Exposition zu deutlicheren Effekten führte als die zweistündige.

Die Quantifizierung des TNF-Gehaltes in den Kulturüberständen der RAM erfolgte mit Wehi-Zellen. Schmidt (1992) diskutierte bereits ausführlich, daß die im Bioassay gemessene Cytotoxizität tatsächlich durch TNF ausgelöst wurde. Die wichtigsten Argumente hierfür waren, daß sowohl mit Wehi-Zellen als auch mit der murinen Zelllinie L929 dieselbe cytotoxische Wirkung eines entsprechenden Kulturüberstandes gefunden wurde, und daß diese Wirkung durch Inkubation mit einem humanen monoklonalen Antikörper um 30% reduziert werden konnte. Antikörper gegen bovines TNF standen und stehen bis heute leider nicht zur Verfügung. Eine etwas stärkere Neutralisation von bovinem TNF mit Anti-hr-TNF erhielten Bienhof et al. (1992).

Wie bereits unter 4.1. erwähnt, konnte von Paulesu et al. (1991) eine TNF-Freisetzung bei menschlichen Blut-Leukozyten nach Ozonexposition gezeigt werden. Dieselbe Gruppe konnte auch einen Anstieg der TNF-Sekretion von Rattenalveolarmakrophagen nach Exposition mit Zigarettenrauch, einem ebenfalls oxidierend wirkenden Schadgas, nachweisen (Pessina et al., 1993). Im Gegensatz hierzu konnten Becker et al. (1991) nach Exposition von HAM mit 1 ppm Ozon für zwei Stunden keine erhöhte TNF-Konzentration in den Kulturüberständen finden. Dies könnte aber daran liegen, daß deren Überstände erst nach 18 Stunden abgenommen und untersucht wurden. Die in Abbildung 1 dargestellten Vorversuche zeigten nämlich, daß die TNF-Konzentration im Überstand bei LPS-Stimulation bereits nach einer Stunde ihr Maximum erreichte, nach sechs Stunden sank die Konzentration aber schon erheblich ab. Vermutlich wird das TNF wieder von den Zellen aufgenommen. Ebenfalls keinen signifikanten Anstieg der TNF-Sekretion fanden Zelikoff et al. (1991), deren Nachweisgrenze für TNF jedoch bei 3 U/ml, d.h. bei 150 pg/ml lag. Werte in diesem Bereich konnten in der vorliegenden Arbeit auch erst durch starke Stimulation der AM erreicht werden.

Die durch Ozon induzierte Sekretionssteigerung des ChF für Makrophagen (Abb. 16 und 17) bestätigt die Ergebnisse von Hotchkiss et al. (1989), die eine signifikant erhöhte Anzahl

von AM 42 Stunden nach einer sechsstündigen *in vivo*-Exposition mit 0.8 ppm Ozon in der BAL von Ratten fanden. Schultheis und Bassett (1994) konnten in der BAL von Meer-schweinchen sogar eine Verdoppelung der Anzahl von Alveolarmakrophagen zwei Tage nach einer vierstündigen Exposition mit 2 ppm Ozon nachweisen. Die entsprechenden *in vitro*-Experimente zu diesem Thema stammen von Driscoll und Schlesinger (1988), die Rattenalveolarmakrophagen mit 0.3 und 1.2 ppm Ozon exponierten und im Medium chemo-taktische Aktivität für Monozyten und PMN aus dem Blut fanden. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit dem in Abbildung 18 und 19 dargestellten Ozon-induzierten, steilen Anstieg der Sekretion von ChF für neutrophile Granulozyten aus Rinderblut. Damit korreliert auch die von Koren et al. (1989) beschriebene 8.2-fache Erhöhung der PMN-Anzahl in der BAL 18 Stunden nach einer zweistündigen Exposition mit 0.4 ppm Ozon bei Menschen. Alle diese Daten weisen darauf hin, daß eine Ozoninhalation inflammatorische Prozesse in der Lunge initiiert und damit möglicherweise zur Entwicklung von Atemwegs-erkrankungen beiträgt.

Wie bereits im Ergebnisteil angesprochen, trat bei einigen Experimenten mit RAM eine gewisse "Voraktivierung", d.h. eine Spontanfreisetzung der untersuchten Cytokine bei Inku-bation mit synthetischer Luft auf. Dies könnte durch Amphotericin B ausgelöst worden sein, das einigen Kulturen zur Vermeidung von Pilz-Kontaminationen zugesetzt wurde. Eine vergleichbare Wirkung von Amphotericin B zeigen Untersuchungen von Wolf und Massof (1990), die eine erhöhte O_2^- -Sekretion nach Zugabe des Antimykotikums nachweisen konn-ten. Aus den Untersuchungen von Tokuda et al. (1993) geht hervor, daß eine Vorinkuba-tion mit Amphotericin B bei Peritonealmakrophagen die TNF-Produktion nach LPS-Sti-mulation deutlich erhöhte. Neben diesem methodisch bedingten Grund könnte für die spontane "Voraktivierung" der RAM auch die individuelle Vorgeschichte eines jeden Tieres verantwortlich sein.

Hierfür sprechen auch die Ergebnisse der erhöhten Cytokinfreisetzung der HAM nach Exposition mit synthetischer Luft. Alle Alveolarmakrophagen stammten von Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern, die jedoch unter dem weiten Begriff 'fibrosierende Erkran- kungen' zusammengefaßt werden können. Vergleichbare Ergebnisse fanden Zhang et al. (1993), die bei Alveolarmakrophagen von Patienten mit fibrotischen, interstitiellen Lungen-erkrankungen ebenfalls eine erhöhte TNF-Sekretion nachgewiesen haben. Auffällig war auch, daß die erhöhte Spontansekretion bei Patient 3 und 4 nicht nur TNF (Abb. 31) betraf, sondern auch IL6 (Abb. 35). Bei Patient 3 zeigte sich zusätzlich eine leicht erhöhte IL8-Freisetzung nach Luftexposition (Abb. 33a). Dies korreliert gut mit den Ergebnissen von Sheron und Williams (1992), bei denen TNF als zentraler Mediator einer Cytokin-Kaskade zeitversetzt die Freisetzung von IL8 und IL6 auslöste. Dieselbe Meinung vertreten auch Van Deuren et al. (1992).

Die Ozonexposition bewirkt bei den HAM genau wie bei den RAM einen Anstieg der TNF-Sekretion (Abb. 30 und 31). Bezüglich IL8 (Abb. 32 und 33) war die Reaktion jedoch uneinheitlich, da es nur bei den Zellen ohne "Voraktivierung" (von Patient 1 und 2) zu einem Ozon-induzierten Sekretionsanstieg kam. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der von Aris et al. (1993) gefundenen signifikanten Erhöhung der IL8-Konzentration in der Lavage der proximalen Atemwege 18 Stunden nach einer vierstündigen Exposition mit 0.2 ppm Ozon bei gesunden jungen Freiwilligen. Die IL6-Freisetzung wurde von Ozon nicht beeinflusst, unabhängig davon, ob die HAM vorstimuliert waren (Abb. 35) oder nicht (Abb. 34). Im Gegensatz dazu ermittelten Devlin et al. (1991) bei Menschen eine erhöhte IL6-Konzentration in der BAL nach zweistündiger Exposition mit Ozon. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse ist die Tatsache, daß die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten HAM alle von Rauchern stammten, während es sich bei der von Devlin et al. (1991) untersuchten Gruppe um gesunde Nichtraucher handelte. Bestätigt wird diese Vermutung von Soliman und Twigg (1992), die ebenfalls fanden, daß die stimulierte Sekretion von IL6 bei AM von Rauchern vermindert war.

Die Patienten 5 und 6 bildeten die Sondergruppe der Sarkoidose-Patienten. "Sarkoidose ist eine multisystemische Erkrankung unbekanntes Ursprungs, die charakterisiert ist durch eine Alveolitis und die Anwesenheit von Granulomen innerhalb der Lunge" (Orosi und Nugent, 1993). Die BAL zeichnet sich durch eine erhöhte Anzahl von Makrophagen und Lymphozyten aus. Die AM der beiden Patienten zeigten eine deutliche Spontansekretion aller untersuchten Cytokine (Abb. 36-38). Zu diesem Ergebnis kamen auch Baughman et al. (1990) sowie Terao et al. (1993) bezüglich TNF und Homolka und Müller-Quernheim (1993) bezüglich IL6. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der HAM von Patient 1 bis 4 kam es hier durch Ozon zu keinem Anstieg der TNF-Sekretion. Die IL8-Freisetzung wurde in beiden Fällen inhibiert. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorstimulierten HAM der Patienten 3 und 4, bei denen Ozon ebenfalls eine Hemmung der IL8-Sekretion bewirkte. Aufgrund der relativ kleinen Patientenzahl und dem Fehlen "echter" Kontrollzellen, d.h. AM von gesunden Nichtrauchern, können im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch keine endgültigen Aussagen über die Cytokinproduktion der AM von Sarkoidose-Patienten gemacht werden. Hierfür wären weitere umfassende Untersuchungen mit dieser Patientengruppe notwendig.

Auffällig war bei allen Experimenten mit HAM, daß der Einfluß von Ozon auf die Cytokinproduktion sehr stark abhängig war von dem jeweiligen Krankheitsbild und der damit verbundenen möglichen "Voraktivierung" der AM: RAM und HAM ohne Vorstimulation (Patient 1) zeigten nach Ozonbehandlung einen deutlichen Anstieg der Freisetzung aller untersuchten Cytokine. Bei vorstimulierten HAM und auch bei denen von Sarkoidose-Patienten bewirkte Ozon eine Inhibition, besonders bezüglich der IL8-Freisetzung.

Neben den hier beschriebenen Veränderungen der Cytokinfreisetzung sind aus der Literatur weitere Ozoneffekte wie die Verminderung der Phagozytoseaktivität (Canning et al., 1991) und der O_2^- -Produktion (Ryder-Powder et al., 1988) von AM sowie die Erhöhung des Arachidonsäure-Metabolismus (Friedman et al., 1992) bekannt. Somit kann davon ausgegangen werden, daß Ozon eine weitreichende immunomodulatorische Wirkung sowohl inhibierender als auch stimulierender Natur auf die Lunge hat. Wie aus mehreren Untersuchungen hervorgeht (Molfino et al., 1992; Jörres et al., 1993, White et al., 1994), macht sich dieser Einfluß von Ozon besonders bei vorbelasteten Menschen wie beispielsweise Asthmatikern durch gehäuftes Auftreten allergischer Atemwegsreaktionen bemerkbar.

4.4. Ozonwirkung auf Alveolarmakrophagen in Kombination mit anderen Stimulantien

4.4.1. Stäube

Eine der Hauptaufgaben von AM ist es, inhalede Staubpartikel zu phagozytieren. Daß Stäube einen Einfluß auf die Cytokinproduktion haben, ist aus vielen Literaturstellen bekannt (Kagan et al., 1983; Oghisio und Kubota, 1987; Gosset et al., 1991; Ouellet et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden die als biologisch inert geltenden Latex-Partikel und die als toxisch bekannten Quarz-Partikel (Matthay et al., 1978) als zwei Extreme verwendet, um die Kombinationswirkungen mit Ozon zu untersuchen. Die Phagozytose von Latex-Partikeln bewirkt keine Veränderung der Vitalität oder der Cytokinfreisetzung von AM (Abb. 43 bis 46). Dies bestätigen Untersuchungen von Kobzik et al. (1993), die ebenfalls keine TNF-Freisetzung bei AM von Hamstern nach Latex-Phagozytose gefunden haben.

Im Gegensatz dazu induziert die Quarz-Phagozytose bei Makrophagen neben der Freisetzung von O_2^- (Berg et al., 1993) und Arachidonsäure-Metaboliten (Koren et al., 1992; Kuhn et al., 1993) auch die Sekretion von Cytokinen (Abb. 47 bis 54). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Quarz-induzierte TNF-Produktion fanden auch Donaldson et al. (1992) bei Rattenalveolarmakrophagen und Schmidt (1992) bei RAM. Die gleichzeitig erhöhte Konzentration von ChF für Makrophagen im Kulturüberstand korreliert gut mit den Ergebnissen von Polzer (1992) und mit der von Driscoll et al. (1990) beschriebenen Akkumulation von Makrophagen in der Lunge nach in vivo-Exposition mit SiO_2 bei Ratten. Die Toxizität von Quarz kommt nach Dalal et al. (1990) durch freie Radikale zustande, die an der Oberfläche des gemahlene Quarzes entstehen. Diese Radikale sind involviert in die Initiation einer oxidativen Kettenreaktion, die zur Zerstörung der Membranen durch Lipidperoxidation führt.

Neben den anorganischen Partikeln wurden als Beispiel für biogenes Material denaturierte Albumin-Partikel eingesetzt, die in Kombination mit synthetischer Luft die RAM zur Freisetzung von TNF und ChF für Makrophagen stimulierten (Abb. 55 und 56). Dies paßt gut zu den Ergebnissen von Shacter et al. (1993), die eine Stimulation der IL6- und PGE₂-Sekretion von Peritonealmakrophagen durch Albumin-Polymere zeigen konnten. Mit der Kombinationsapplikation von Stäuben plus Ozon sollte ein möglicher synergistischer Effekt auf die Cytokinproduktion untersucht werden. Hinweise auf eine solche Wirkung gibt es von in vivo-Experimenten mit Ratten, bei denen nach mehrtägiger Exposition mit Ozon in Kombination mit Ammoniumsulfat-Aerosolen mehr Makrophagen und Monozyten in der Lunge nachgewiesen wurden als nach Behandlung mit Ozon allein (Last et al., 1984). Auch Jakob und Hemenway (1994) konnten eine Verstärkung der Ozon-induzierten Hemmung der Phagozytoserate und auch eine Veränderung der Zellverteilung in der BAL nach einer vierstündigen Koexposition von 1 ppm Ozon mit inerten Kohlestaub-Partikeln zeigen. Morimoto et al. (1993) fanden einen synergistischen Effekt auf die TNF-Freisetzung bei Ratten nach achtstündiger in vivo-Exposition mit Rauch und anschließender Inkubation der AM mit Chrysotil- und Keramik-Fasern für 24 Stunden. Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten in vitro-Experimenten konnte ein möglicher synergistischer Effekt von Latex-, Quarz- oder Albumin-Partikel und Ozon nicht nachgewiesen werden, da die Cytokinfreisetzung, die durch die Phagozytose dieser Stäube induziert wurde, durch die Ozonexposition nicht wesentlich beeinflußt wurde (Abb. 43 bis 56). Möglicherweise bedarf es hierfür einer längeren Inkubationszeit. Zwischen Quarz und Ozon konnten auch Shiotsuka et al. (1986) keine Interaktion feststellen bezüglich des Hydroxyprolin-Gehaltes der Lunge als Hinweis auf die Entwicklung einer Lungenfibrose.

4.4.2. Lipopolysaccharid (LPS)

LPS ist ein makromolekulares Glykolipid, das Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien ist. Seine Lipidkomponente, das sogenannte Lipid A, ist für die biologische Wirkung verantwortlich, die über die Aktivierung immunkompetenter Zellen bis hin zum septischen Schock und zu Multiorganversagen führen kann (Rietschel et al., 1982; Tracey und Cerami, 1989). Die bei Infektionen zunächst betroffenen Zellen sind die neutrophilen Granulozyten und die Makrophagen. Besonders von den Makrophagen werden nach LPS-Stimulation neben dem Superoxidanionenradikal eine Reihe von Cytokinen und Lipidmediatoren sezerniert (Welbourne und Young, 1992; Schade et al., 1993).

Wie sich in Vorversuchen für diese Arbeit herausstellte, konnte die Cytokinfreisetzung der Makrophagen durch die Anwesenheit von FCS oder RSA im Kulturmedium deutlich gesteigert werden. Hierfür ist das LPS-bindende-Protein (LBP) verantwortlich, das mit LPS einen Komplex bildet, der von dem durch CD14 codierten Zellrezeptor erkannt wird und so die

LPS-vermittelte Freisetzung von IL1, TNF, IL6 und IL8 auslöst (Jirillo et al, 1993; Khemlani et al., 1992; Tobias et al., 1992). Die LPS-induzierte Freisetzung von TNF und ChF für Makrophagen konnte in unserem Labor bereits von Schmidt (1992) und von Polzer (1992) gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit ging es unter anderem um die Fragestellung, ob die Kombinationsinkubation von Ozon und LPS einen Einfluß auf die Cytokinfreisetzung von Alveolarmakrophagen hat. Bei in vivo-Experimenten mit Ratten (van Loveren et al., 1988) und Mäusen (Gilmour et al., 1993a und b), die mit Bakterien infiziert worden waren, bewirkte eine vorausgehende Ozonexposition eine Hemmung der Phagozytoseaktivität und eine verminderte Sekretion lysosomaler Enzyme bei den Makrophagen, d.h. Ozon erhöhte die Empfindlichkeit gegenüber Bakterieninfektionen. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß LPS die Ozon-induzierte Cytokinfreisetzung signifikant verstärkte, allerdings ging die Stimulation mit Ozon plus LPS bezüglich der TNF-Freisetzung nicht wesentlich über die Stimulation mit LPS allein hinaus (Abb. 73, 75 und 77a). Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Becker et al. (1989), die feststellten, daß die durch Endotoxin induzierte IL1-Produktion humaner Monozyten von Ozon nicht beeinflusst wurde. Die LPS-induzierte Sekretion des ChF für Makrophagen stieg jedoch durch die vorausgegangene Ozonexposition deutlich an. Dieser Effekt war allerdings nur additiv und in keinem Fall überadditiv (Abb. 74 und 76). Er war aber eindeutig durch Ozon ausgelöst, da die zusätzliche Sekretion des ChF durch die Beschichtung der Zellen mit der "Schutzsubstanz" DPL verhindert werden konnte (Abb. 78 und 79).

Man kann also davon ausgehen, daß die Rezeptorbindung von LPS und die dadurch ausgelöste Cytokinproduktion durch die Ozonbehandlung der Makrophagen nicht wesentlich beeinflusst wird. Auch bei den HAM kam es nur zu geringfügigen Veränderungen der LPS-induzierten Cytokinfreisetzung durch Ozon (Abb. 77). Somit zeigte Ozon eine ganz andere Wirkung auf Alveolarmakrophagen als NO₂, da nämlich eine Exposition von RAM mit 3 ppm NO₂ die LPS-induzierte TNF-Freisetzung völlig verhindern konnte (Lind, 1993).

4.5. Charakterisierung der chemotaktischen Faktoren

4.5.1. ChF für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten

Aus zahlreichen Literaturstellen ist bekannt, daß Interleukin 8 ein chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten ist (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992; Bickel, 1993; Schröder, 1992; Kunkel et al., 1991; Rot, 1993). Chemotaktische Faktoren binden an spezielle Membranrezeptoren und verursachen biochemische und strukturelle Verän-

derungen in den PMN (Harvath, 1989). So kommt es zur Umorganisation von Cytoskelett-Proteinen als Voraussetzung für die gerichtete Migration.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit humanem IL8 und Antikörpern gegen IL8 machen deutlich, daß IL8 auch chemotaktische Aktivität aufweist für bovine PMN (Abb. 81 und 82). IL8 wird von vielen verschiedenen Zellen nach Stimulation mit z.B. Endotoxin, TPA, IL1 oder TNF freigesetzt (Miller und Krangel, 1992). Die durch LPS-Stimulation der RAM induzierte chemotaktische Aktivität in den Kulturüberständen konnte durch Anti-hr-IL8 nicht völlig neutralisiert werden (Abb. 84). Dies liegt sehr wahrscheinlich darin begründet, daß nach LPS-Stimulation nicht nur IL8, sondern auch andere ChF für neutrophile Granulozyten sezerniert werden wie z.B. LTB₄, fMLP oder C5a (Koyama et al., 1991; Rankin et al., 1990; Baggiolini, 1992). Die durch Ozonexposition ausgelöste Freisetzung des ChF für PMN war ebenfalls zum größten Teil auf IL8 zurückzuführen (Abb. 83). Da die IL8-Sekretion auch durch TNF stimuliert wird (Fujishima et al., 1993; Sheron und Williams, 1992) und sowohl LPS als auch Ozon die TNF-Freisetzung auslösen, könnte es sich hierbei um eine indirekte über TNF vermittelte Sekretion handeln. Eine solche Interaktion von TNF und IL8 bezüglich der PMN-Chemotaxis vermuten auch Smith et al. (1993).

4.5.2. ChF für Makrophagen

Aufgrund der Untersuchungen zur Charakterisierung des ChF für Makrophagen mit IL8 und Anti-IL8 kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß IL8 auch für Alveolarmakrophagen chemotaktische Aktivität besitzt (Abb. 85 und 86). Dieselbe Meinung vertreten auch Kunkel et al. (1991). Im Gegensatz dazu konnte mit Antikörpern gegen den humanen Komplementfaktor C5 die chemotaktische Aktivität der untersuchten Überstände deutlich reduziert werden (Abb. 87). Vom Komplementfaktor C5 wird bei Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen oder alternativen Weg das C5a-Fragment durch die C5-Konvertase abgespalten (Roitt et al., 1987). C5a ist ein Peptid mit 74 Aminosäuren und 15 kDa und stellt einen wichtigen ChF für Leukozyten dar. Da bislang kein Antikörper gegen das C5a-Fragment kommerziell erhältlich ist, wurde in den vorliegenden Untersuchungen ein Antikörper gegen das Vorläufer-Peptid C5 verwendet. Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen C5 mit C5a-Fragmenten wurden schon von Hugli (1981) beschrieben. Aus diesen Gründen gaben die Ergebnisse der Experimente mit Anti-C5 einen starken Hinweis darauf, daß C5a ein ChF von und für Makrophagen ist. Ähnliche Untersuchungen wurden von Polzer (1992) durchgeführt, der ebenfalls eine Abschwächung der chemotaktischen Aktivität durch Antiserum gegen C5 zeigen konnte und seine Ergebnisse mit denen von Kazmierowski et al. (1977) verglich, die in der BAL von Affen einen ChF mit einem Molekulargewicht von 15 kDa fanden. Sie konnten die chemotaktische Aktivität dieses

Faktors durch Antikörper gegen humanes C5 deutlich vermindern und schlossen daraus, daß es sich im C5a handelte.

Die Anwesenheit von C5a-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Makrophagen ist bekannt, (Chenoweth und Goodman, 1982) und ihre Fähigkeit, C5 zu sezernieren, wurde von Martin und Loos (1989) beschrieben. Die chemotaktische Wirkung von ZAS, das in allen Versuchen als Positivkontrolle eingesetzt wurde, beruht auch zum größten Teil auf C5a (Chenoweth und Goodman, 1982).

Die aufgrund der vorliegenden Ergebnisse naheliegende Vermutung, daß der durch Ozon induzierte ChF C5a ist, wurde auch schon von Driscoll und Schlesinger (1988) geäußert. Sie konnten mit der 48 well Mikrochemotaxis-Kammer-Methode zeigen, daß Alveolarmakrophagen von Kaninchen durch 0.3 und 1.2 ppm Ozon zur Freisetzung von ChF für neutrophile Granulozyten und für Monozyten stimuliert wurden. Allerdings gehen sie davon aus, daß von Ozon-stimulierten Makrophagen ein proteolytisches Enzym sezerniert wird, das C5 spaltet. Die Fähigkeit von Makrophagen, ein solches Enzym zu sezernieren, beschrieb bereits Ward (1974).

Wenn es sich bei dem ChF für Makrophagen tatsächlich um C5a handelt, der auch ein ChF für neutrophile Granulozyten ist, wäre dies auch eine Erklärung dafür, daß die chemotaktische Aktivität der RAM-Überstände nach Ozon-bzw. LPS-Inkubation durch Anti-IL8 nur zu ca. 75% neutralisiert werden konnte (siehe Abb. 83 und 84).

Trotz der starken Hinweise auf C5a konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, daß Makrophagen durch Ozon noch zur Produktion anderer ChF stimuliert wurden. Die Liste der bekannten ChF ist sehr lang, allerdings haben nur wenige die Eigenschaften, von Makrophagen sezerniert zu werden und gleichzeitig chemotaktisch auf Makrophagen bzw. Monozyten zu wirken. Ein weiterer Faktor, der diese Anforderungen erfüllt, ist das Macrophage Inflammatory Protein-1 α , das einen wichtigen Mediator der Monozyten- und PMN-Chemotaxis darstellt (Standiford et al., 1993), wobei dessen Hauptzielzellen die mononukleären Leukozyten sind (McCull et al., 1993). Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen mit den Antikörpern gegen hr-MIP-1 α keinen Hinweis auf eine Beteiligung von MIP-1 α an der Ozon-induzierten chemotaktischen Aktivität der RAM-Überstände geben (Abb. 88), ist dies nicht mit völliger Sicherheit auszuschließen, da möglicherweise auch der Antikörper gegen humanes MIP-1 α das bovine MIP-1 α nicht neutralisieren konnte.

Klärendere Informationen hierzu lieferten die Membranfiltrationsexperimente: Es zeigte sich, daß der Ozon-induzierte ChF für Makrophagen größer als 10 kDa und kleiner als 30 kDa ist (Abb. 89). Somit konnte einerseits MIP-1 α , dessen Molekulargewicht 8 kDa beträgt (Wolpe und Cerami, 1989), ausgeschlossen werden. Andererseits bestätigen diese Ergebnisse die Vermutung, daß es sich um C5a handelt, dessen Molekulargewicht bei Rindern zwar nicht bekannt ist, aber bei Mensch, Maus und Meerschweinchen zwischen 10 und 15 kDa liegt (Hugli, 1981).

Interessanterweise zeigten dieselben Untersuchungen zur Charakterisierung des ChF für Makrophagen nach Quarzinkubation von RAM, daß das Molekulargewicht dieses Faktors unter 10 kDa liegt (Abb. 90). Daher muß davon ausgegangen werden, daß RAM durch Ozon zur Sekretion eines anderen ChF als durch Quarz stimuliert werden. Bei diesem Quarz-induzierten ChF könnte es sich nun um MIP-1 α handeln. Dies entspricht Ergebnissen von Driscoll et al. (1993), die nach in vivo-Exposition von Ratten mit Quarz-Staub MIP-1 α in der BAL fanden, und die auch nachweisen konnten, daß Alveolarmakrophagen in der Lage sind, MIP-1 α zu sezernieren. Um diese Vermutung aber mit letzter Sicherheit zu bestätigen, müßten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Wichtig und neu war in diesem Zusammenhang der Befund, daß die durch verschiedene Stimuli induzierte chemotaktische Aktivität für RAM in den Kulturüberständen auf unterschiedlichen Faktoren beruhen kann.

4.6. Zusammenfassende Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund von vergleichenden morphologischen und biochemischen Untersuchungen gezeigt werden, daß RAM ein besseres Modell zur Untersuchung des Einflusses von Ozon auf humane AM sind als differenzierte HL-60 Zellen. Beide hierfür eingesetzten Expositionssysteme ermöglichen einen direkten Kontakt der Zellen mit dem Schadgas und sind somit gut geeignet zur in vitro-Untersuchung der Ozonwirkung. Durch die Applikation von Surfactant-Bestandteilen konnte die Exposition in den Luftkulturschälchen noch "realitätsnäher" gestaltet werden.

Bei den morphologischen Untersuchungen zeigten sich Ozon-induzierte Veränderungen, die besonders die Zellmembran betrafen. Der durch Applikation des Radikalfängers Vitamin E aufgetretene Schutzeffekt deutet auf eine über freie Radikale vermittelte Oxidation von Membranlipiden und -proteinen hin. Über die Membran gelangte der Einfluß von Ozon dann, vermutlich über Beeinflussung der Signaltransduktion, in das Zellinnere und bewirkte hier eine Veränderung der Cytokinfreisetzung, die jedoch unabhängig war von einer zusätzlichen Staubphagozytose oder Rezeptor-vermittelten Stimulation mit LPS. Grundsätzlich kam es durch die Ozonexposition zu einem Anstieg der Freisetzung von TNF, von einem ChF für Makrophagen, bei dem es sich vermutlich um den Komplementfaktor C5a handelt, und von einem ChF für PMN, bei dem es sich um IL8 handelt. Eine Ausnahme bildeten jedoch die HAM von Sarkoidose-Patienten, bei denen sich eine Verminderung der Spontansekretion durch Ozon andeutete. Aufgrund dieser Veränderungen der Cytokinproduktion muß man davon ausgehen, daß Ozon in Konzentrationen, die nur um den Faktor 2 bis 3 über den im Sommer erreichten Spitzenwerten liegen, in die Regulation der Mediatorfreisetzung eingreift. Somit könnte es wichtige immunologische Funktionen der Makrophagen beeinflussen, was besonders für vorbelastete Personen wie z.B. Asthmatiker von großer Bedeutung ist.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Ozon auf die Morphologie und Cytokinfreisetzung von Rinderalveolarmakrophagen (RAM), humanen Alveolarmakrophagen (HAM) und zu Makrophagen differenzierten HL-60 Zellen untersucht. Die Inkubation mit 0.25 bis 2.5 ppm Ozon wurde in zwei verschiedenen Expositionssystemen durchgeführt, die insofern realitätsnahe in vitro-Modelle darstellten, als sie einen direkten Kontakt der Zellen mit dem Gas ermöglichten.

Die morphologischen Untersuchungen der RAM zeigten Ozon-induzierte Veränderungen an der Zellmembran. Damit verbunden war die Sekretion der cytoplasmatischen LDH. Ozon führte bei Rinderalveolarmakrophagen zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der Freisetzung des Tumor Nekrose Faktors α (TNF), eines chemotaktischen Faktors (ChF) für Makrophagen und eines chemotaktischen Faktors für neutrophile Granulozyten. Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der chemotaktischen Faktoren gaben Hinweise darauf, daß es sich bei dem ChF für neutrophile Granulozyten um Interleukin 8 handelte und bei dem ChF für Makrophagen vermutlich um den Komplementfaktor C5a.

Die Phagozytose von Latex-Partikeln führte bei RAM zu keiner Veränderung der Cytokinsekretion, während die Phagozytose von Quarz- und denaturierten Albumin-Partikeln eine Freisetzung von TNF und ChF für Makrophagen bewirkte. Durch die Kombination von Ozon mit einer vorangehenden Phagozytose kam es jedoch bei keinem der Stäube zu einem synergistischen Effekt.

Lipopolysaccharid löste eine deutliche Cytokinfreisetzung aus, die aber durch eine zusätzliche Ozonexposition nicht mehr wesentlich gesteigert werden konnte.

Um der in vivo-Situation in der Lunge näher zu kommen, wurde Dipalmitoyllecithin als Hauptbestandteil des Lungensurfactant eingesetzt. Wenn dieses direkt auf den Zellrasen gegeben wurde, führte es bei Ozonexposition zu einem geringeren Vitalitätsverlust und der Verminderung des Anstieges der Mediatorfreisetzung.

Auch Vitamin E zeigte diesbezüglich einen Schutzeffekt, der allerdings nur bei 24-stündiger Vorinkubation der RAM auftrat und wahrscheinlich auf dessen antioxidative Eigenschaft zurückzuführen ist.

Die Untersuchungen mit den humanen AM zeigten, daß RAM und HAM bezüglich der Freisetzung von TNF α und IL8 nach Ozonbehandlung weitgehend übereinstimmten. Allerdings stammten alle HAM von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern, die die Ergebnisse beeinflussten. Eine Sonderstellung nahmen die HAM von Sarkoidose-Patienten ein, deren Cytokinsekretion durch Ozon zum Teil gehemmt wurde.

Die in der Arbeit ebenfalls eingesetzten Makrophagen-ähnlichen humanen HL-60 Zellen reagierten bezüglich der Vitalität empfindlicher auf die Ozonbehandlung als die RAM und HAM und konnten durch Ozon zwar zur Freisetzung chemotaktischer Faktoren und IL6 nicht aber zur TNF-Sekretion stimuliert werden.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß Ozon in vergleichsweise geringen Konzentrationen immunologische Funktionen von Alveolarmakrophagen beeinflussen kann. Es gibt jedoch diesbezüglich keine Hinweise auf synergistische Effekte bei einer Kombination von Ozon mit Staubpartikeln.

6. Literaturverzeichnis

ALINK, G.M., RIETJENS, I.M.C.M.:

Mechanisms of O₃ and NO₂ Toxicity in Lung Cells In Vitro

in: Environmental Hygiene, 7-10

Ed.: Seemayer, N.H., Hadnagy, W.

Springer Verlag Berlin 1990

ARIS, R.M., CHRISTIAN, D., HAERNE, P.Q., KERR, K., FINKBEINER, W.E., BALMES, J.R.:

Ozone-Induced Airway Inflammation in Human Subjects as Determined by Airway Lavage and Biopsy

Am. Rev. Respir. Dis. 148 (1993), 1363-1372

BAGGIOLINI, M.:

Neutrophil Activation and the Role of Interleukin-8 and Related Cytokines

Int. Arch. Allergy Immunol. 99 (1992), 196-199

BAGGIOLINI, M., CLARK-LEWIS, I.:

Interleukin-8, a Chemotactic and Inflammatory Cytokine

FEBS Letters 307 (1992), 97-101

BANKS, M.A., PORTER, D.W., MARTIN, W.G., CASTRANOVA, V.:

Ozone-Induced Lipid Peroxidation and Membrane Leakage in Isolated Rat Alveolar Macrophages - Protective Effects of Taurine

J. Nutr. Biochem. 2 (1991), 308-313

BASSETT, D.J.P., BOWEN-KELLY, E., ELBON, C.L., REICHENBAUGH, S.S.:

Rat Lung Recovery from 3 Days of Continuous Exposure to 0.75 ppm Ozone

J. Toxicol. Environm. Health 25 (1988), 329-347

BATES, D.V.:

Ozone - Myth and Reality

Environm. Res. 50 (1989), 230-237

BAUGHMAN, R.P., STROHOFER, S.A., BUCHSBAUM, J., LOWER, E.E.:

Release of Tumor Necrosis Factor by Alveolar Macrophages of Patients with Sarcoidosis

J. Lab. Clin. Med. 115 (1990), 36-42

BECKER, S., JORDAN, R.L., ORLANDO, G.S., KOREN, H.S.:

In Vitro Ozone Exposure Inhibits Mitogen-induced Lymphocyte Proliferation and IL-2 Production

J. Toxicol. Environm. Health 26 (1989), 469-483

BECKER, S., MADDEN, M.C., NEWMAN, S.L., DEVLIN, R.B., KOREN, H.S.:

Modulation of Human Alveolar Macrophage Properties by Ozone Exposure in Vitro

Toxicol. Appl. Pharmacol. 110 (1991), 403-415

BERG, I., SCHLÜTER, T., GERCKEN, G.:

Increase of Bovine Alveolar Macrophage Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Release by Dusts of Different Origin

J. Toxicol. Environm. Health 39 (1993), 341-354

BICKEL, M.:

The Role of Interleukin-8 in Inflammation and Mechanisms of Regulation

J. Periodontol. 64 (1993), 456-460

BIELEFELDT-OHMANN, H., BABIUK, L.A.:

In Vitro Generation of Hydrogen Peroxide and of Superoxide Anion by Bovine Polymorphonuclear Neutrophilic Granulocytes, Blood Monocytes, and Alveolar Macrophages

Inflammation 8 (1984), 251-275

BIENHOFF, S.E., ALLEN, G.K., BERG, J.N.:

Release of Tumor Necrosis Factor-alpha from Bovine Alveolar Macrophages Stimulated with Bovine Respiratory Viruses and Bacterial Endotoxins

Vet. Immunol. Immunopathol. 30 (1992), 341-357

BORM, P.J.A., SCHINS, R., JANSSEN, Y.M.W., LENAERTS, L.:

Molecular Basis for Differences in Susceptibility to Coal Workers' Pneumoconiosis

Toxicology Letters 64/65 (1992), 767-772

BRACH, M.A., HERRMANN, F.:

Interleukin 6: Presence and Future

Int. J. Clin. Lab. Res. 22 (1992), 143-151

CANNING, B.J., HMIELESKI, R.R., SPANNHAKE, E.W., JAKAB, G.J.:

Ozone Reduces Murine Alveolar and Peritoneal Macrophage Phagocytosis - The Role of Prostanoids

Am. J. Physiol. 261 (1991), 277-282

CERRA, R.F., NATHANSSON, S.D.:

Organ-specific Chemotactic Factors Present in Lung Extracellular Matrix

J. Surg. Res. 46 (1989), 422-426

CHANG, L.-Y., HUANG, Y., STOCKSTILL, B.L., GRAHAM, J.A., GROSE, E.C.,

MENACHE, M.G., MILLER, F.J., COSTA, D.L., CRAPO, J.D.:

Epithelial Injury and Interstitial Fibrosis in the Proximal Alveolar Regions of Rats Chronically Exposed to a Simulated Pattern of Urban Ambient Ozone

Toxicol. Appl. Pharmacol. 115 (1992), 241-252

CHEESEMAN, K.H.:

Tissue Injury by Free Radicals

Toxicology and Industrial Health 9 (1993), 39-51

CHENOWETH, D.E., GOODMAN, M.G.:

The C5a Receptor of Neutrophils and Macrophages

in: Leukocyte Locomotion and Chemotaxis, 252-273

Ed.: Keller, H., Till, G.O.

Birkhäuser Verlag 1982

-
- CHODIRKER, W.B., BOCK, G.N., VAUGHAN, J.H.:
Isolation of Human PMN Leukocytes and Granules: Observations on Early Blood Dilution and on Heparin
J. Lab. & Clin. Med. 71 (1968), 9-19
- CHOI, A.M.K., ELBON, C.L., BRUCE, S.A., BASSETT, D.J.P.:
Messenger RNA Levels of Lung Extracellular Matrix Proteins During Ozone Exposure
Lung 172 (1994), 15-30
- COLLINS, S.J.:
The HL-60 Promyelocytic Leukemia Cell Line: Proliferation, Differentiation, and Cellular Oncogene Expression
Blood, Vol. 70 (1987), 1233-1244
- CONTI, M., COUTURIER, M., LEMONNIER, A., LEMONNIER, F.:
Effects of α -Tocopherol on Antioxidant Enzyme Activity in Human Fibroblast Cultures
Internat. J. Vit. Nutr. Res. 63 (1993), 71-76
- CORNELL, R.:
The Use of Nucleopore Filters in Ultrastructural Studies of Cell Cultures
Exp. Cell Res. 56 (1969), 156-158
- DALAL, N.S., SHI, X., VALLYATHAN, V.:
Role of Free Radicals in the Mechanisms of Hemolysis and Lipid Peroxidation by Silica: Comparative ESR and Cytotoxicity Studies
J. Toxicol. Environm. Health 29 (1990), 307-316
- DANKBERG, F., PERSIDSKY, M.D.:
A Test of Granulocyte Membrane Integrity and Phagocytic Function
Cyrobiology 13 (1976), 430-432
- DAS, U.N., PADMA, M., SAGAR, P.S., RAMESH, G., KORATKAR, R.:
Stimulation of Free Radical Generation in Human Leukocytes by Various Agents Including Tumor Necrosis Factor Is a Calmodulin Dependent Process
Biochem. Biophys. Res. Commun. 167 (1990), 1030-1036
- DEVLIN, R.B., MCDONNELL, W.F., MANN, R., BECKER, S., HOUSE, D.E., SCHREINEMACHERS, D., KOREN, H.S.:
Exposure of Humans to Ambient Levels of Ozone for 6.6 Hours Causes Cellular and Biochemical Changes in the Lung
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 4 (1991), 72-81
- DIPLOCK, A.T.:
The Modulating Influence of Vitamin E in Biological Membrane Unsaturated Phospholipid Metabolism
Acta Vitaminol. Enzymol. 4 (1982), 303-309
- DONALDSON, K., BROWN, G.M., BROWN, D.M., SLIGHT, J., LI, X.Y.:
Epithelial and Extracellular Matrix Injury in Quartz-Inflamed Lung: Role of the Alveolar Macrophage
Environm. Health Persp. 97 (1992), 221-224

- DRISCOLL, K.E., SCHLESINGER, R.B.:
Alveolar Macrophage-Stimulated Neutrophil and Monocyte Migration: Effect of In Vitro Ozone Exposure
Toxicol. Appl. Pharmacol. 93 (1988), 312-318
- DRISCOLL, K.E., LINDENSCHMIDT, R.C., MAURER, J.K., HIGGINS, J.M., RIDDER, G.:
Pulmonary Response to Silica or Titanium Dioxide: Inflammatory Cells, Alveolar Macrophage-derived Cytokines, and Histopathology
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2 (1990), 381-390
- DRISCOLL, K.E., HASSENBEIN, D.G., CARTER, J., POYNTER, J., ASQUITH, T.N., GRANT, R.A., WHITTEN, J., PURDON, M.P., TAKIGIKU, R.:
Macrophage Inflammatory Proteins 1 and 2: Expression by Rat Alveolar Macrophages, Fibroblasts, and Epithelial Cells and in Rat Lung after Mineral Dust Exposure
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 8 (1993), 311-318
- DUMLER, K., HANLEY, Q.S., BAKER, C., LUCHTEL, D.L., ALTMAN, L.C., Koenig, J.Q.:
The Effects of Ozone Exposure on Lactate Dehydrogenase Release from Human and Primate Respiratory Epithelial Cells
Toxicology Letters 70 (1994), 203-209
- EHRENBERG, A.S.C.:
Statistik oder der Umgang mit Daten
VCH Verlagsgesellschaft Weinheim 1986
- ELIAS, J.A., REYNOLDS, M.M.:
Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Synergistically Stimulate Lung Fibroblast Interleukin 1 α Production
Am. Rev. Respir. Cell Mol. Biol. 3 (1990), 13-20
- ELSTNER, E.F.:
Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin, Kap. V., 2.1., 464-468
BJ-Wissenschaftsverlag Mannheim Wien Zürich 1990
- ELTSCHKA, R., HERCEG, R., MOSELER, M., MATTHYS, H.:
Auswirkungen der Luftverunreinigung auf spirometrische Größen, bronchiale Hyperreagibilität, Krankheitsrisiko und Krankheitsverlauf
in: *Berichtsband zum 7. Statuskolloquium des Projektes Europäisches Forschungszentrum für Maßnahmen zur Luftreinhaltung, Karlsruhe, KfK-PEF 80 (1991), Bd. 2, 455-464*
- ESPEVIK, T., NISSEN-MEYER, J.:
A Highly Sensitive Cell Line, WEHI 164 Clone 13 for Measuring Cytotoxic Factors/Tumor Necrosis Factor from Human Monocytes
J. Immunol. Meth. 95 (1986), 99-105
- EVANS, R., FONG, M., FULLER, J., KAMDAR, S., MEYERHARDT, J., STRASSMANN, G.:
Tumor Cell IL-6 Gene Expression Is Regulated by IL-1 alpha/beta and TNF alpha-Proposed Feedback Mechanisms Induced by the Interaction of Tumor Cells and Macrophages
J. Leukoc. Biol. 52 (1992), 463-468

-
- FALK, W., GOODWIN, R.H., LEONHARD, E.J.:
A 48-Well Micro Chemotaxis Assembly for Rapid and Accurate Measurement of Leukocyte Migration
J. Immunol. Meth. 33 (1980), 239-247
- FLETCHER, J.R., COLLINS, J.N., GRAVES, E.D., LUTERMAN, A., WILLIAMS, M.D., IZENBERG, S.D., RODNING, C.B.:
Tumor Necrosis Factor-induced Mortality Is Reversed with Cyclooxygenase Inhibition
Annals of Surgery 217 (1993), 668-675
- FOUKE, J.M., WOLIN, A.D., MCFADDEN, JR., E.R.:
Effects of Ozone on Lung Mechanics and Cyclooxygenase Metabolites in Dogs
Prostaglandins 42 (1991), 343-353
- FRIEDMAN, M., MADDEN, M.C., SAMET, J.M., KOREN, H.S.:
Effects of Ozone Exposure on Lipid Metabolism in Human Alveolar Macrophages
Environm. Health Persp. 97 (1992), 95-101
- FRISCHER, T.M., KUEHR, J., PULLWITT, A., MEINERT, R., FORSTER, J., STUDNICKA, M., KOREN, H.:
Ambient Ozone Causes Upper Airways Inflammation in Children
Am. Rev. Respir. Dis 148 (1993), 961-964
- FUJISHIMA, S., HOFFMAN, A.R., VU, T., KIM, K.J., ZHENG, H., DANIEL, D., KIM, Y., WALLACE, E.F., LARRICK, J.W., RAFFIN, T.A.:
Regulation of Neutrophil Interleukin 8 Gene Expression and Protein Secretion by LPS, TNF- α , and IL-1 β
J. Cell. Physiol. 154 (1993), 478-485
- GILMOUR, M.I., HMIELESKI, R.R., STAFFORD, E.A., JAKAB, G.J.:
Suppression and Recovery of the Alveolar Macrophage Phagocytic System during Continuous Exposure to 0.5 ppm Ozone
Exp. Lung Res. 17 (1991), 547-558
- GILMOUR, M.I., PARK, P., DOERFLER, D., SELGRADE, M.-J.K.:
Factors that Influence the Suppression of Pulmonary Antibacterial Defenses in Mice Exposed to Ozone
Exp. Lung Res. 19 (1993a), 299-314
- GILMOUR, M.I., PARK, P., SELGRADE, M.-J.K.:
Ozone-enhanced Pulmonary Infection with *Streptococcus zooepidemicus* in Mice
The Role of Alveolar Macrophage Function and Capsular Virulence Factors
Am. Rev. Respir. Dis. 147 (1993b), 753-760
- GOSSET, P., LASSALLE, P., VANHEE, D., WALLAERT, B., AERTS, C., VOISIN, C., TONNEL, A.-B.:
Production of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 by Human Alveolar Macrophages Exposed In Vitro to Coal Mine Dust
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 5 (1991), 431-436

HAMM, H., FABEL, H., BARTSCH, W.:

The Surfactant System of the Adult Lung: Physiology and Clinical Perspectives
Clin. Investig. 70 (1992), 637-657

HANKS, J.H., WALLACE, J.H.:

Determination of Cell Viability
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98 (1958), 156-160

HARRIS, P., RALPH, P.:

Human Leukemic Models of Myelomonocytic Development: A Review of the HL-60 and U937 Cell Lines
J. Leukoc. Biol. 37 (1985), 407-422

HARVATH, L.:

Regulation of Neutrophil Chemotaxis
Annual Reports in Medicinal Chemistry 24 (1989), 233-241

HARWOOD, J.L.:

Lung Surfactant
Prog. Lipid Res. 26 (1987), 211-256

HAYAKAWA, M., OKU, N., TAKAGI, T., HORI, T., SHIBAMOTO, S., YAMANAKA, Y., TAKEUCHI, K., TSUJIMOTO, M., ITO, F.:

Involvement of Prostaglandin-Producing Pathway in the Cytotoxic Action of Tumor Necrosis Factor
Cell Structure and Function 16 (1991), 333-340

HIROSHIMA, K., KOHNO, T., OWADA, H., HAYASHI, Y.:

A Morphological Study of the Effects of Ozone on Rat Lung. I. Short-term Exposure
Exp. Mol. Pathol. 47 (1987), 327-345

HOMOLKA, J., MÜLLER-QUERNHEIM, J.:

Increased Interleukin-6 Production by Bronchoalveolar Lavage Cells in Patients with Active Sarcoidosis
Lung 171 (1993), 173-183

HORSTMAN, D., FOLINSBEE, L., KEHRL, H., ABDUL-SALAAM, S., IVES, P.:

Indicators of Lung Injury with Daily Prolonged Exposures to 0.12 ppm Ozone
84th Annual Meeting & Exhibition 4 (1991), 1-7, Vancouver British Columbia

HOTCHKISS, J.A., HARKEMA, J.R., KIRKPATRICK, D.T., HENDERSON, R.F.:

Response of Rat Alveolar Macrophages to Ozone: Quantitative Assessment of Population Size, Morphology, and Proliferation Following Acute Exposure
Exp. Lung Res. 15 (1989), 1-16

HU, S.C., BEN-JEBRIA, A., ULTMAN, J.S.:

Longitudinal Distribution of Ozone Absorption in the Lung: Quiet Respiration in Healthy Subjects
J. Appl. Physiol. 73 (1992), 1655-1661

HUGLI, T.E.:

The Structural Basis for Anaphylatoxin and Chemotactic Functions of C3a, C4a, and C5a
Critical Reviews in Immunology 1 (1981), 321-366

JAKAB, G.J., HEMENWAY, D.R.:

Concomitant Exposure to Carbon Black Particulates Enhances Ozone-Induced Lung
Inflammation and Suppression of Alveolar Macrophage Phagocytosis
J. Toxicol. Environm. Health 41 (1994), 221-231

JIRILLO, E., TORTORELLA, C., ANTONACI, S.:

Interaction between Bacterial Endotoxins and Host Immunocompetent Cells
Med. Sci. Res. 21 (1993), 83-85

JÖRRES, R., NOWAK, D., MAGNUSSEN, H.:

Die Wirkung der Einatmung von Ozon auf die allergische Reaktion des Bronchialsystems
in: Berichtband zum 2. Statuskolloquium des Projektes Umwelt und Gesundheit, Karlsruhe,
KfK-PUG 9 (1993), 97-107

KAGAN, E., OGHISO, Y., HARTMANN, D.-P.:

Enhanced Release of a Chemoattractant for Alveolar Macrophages after Asbestos Inhalation
Am. Rev. Respir. Dis. 128 (1983), 680-687

KAYE, J., MCFARLAND, M.:

Atmospheric Ozone
Encyclopedia of Earth System Science 1 (1991), 237-260

KAZMIEROWSKI, J.A., GALLIN, J.I., REYNOLDS, H.Y.:

Mechanism for the Inflammatory Response in Primate Lungs: Demonstration and Partial
Characterization of an Alveolar Macrophage-Derived Chemotactic Factor with Preferential
Activity for Polymorphonuclear Leukocytes
J. Clin. Invest. 59 (1977), 273-281

KHEMLANI, L.S., BOCHSLER, P.N., MADDUX, J.M.:

Lipopolysaccharide-Binding Factors Are Present in Bovine Serum
BioFactors 4 (1992), 33-36

KINNEY, P.L., WARE, J.H., SPENGLER, J.D., DOCKERY, D.W., SPEIZER, F.E.,

FERRIS, JR., B.G.:

Short-term Pulmonary Function Change in Association with Ozone Levels
Am. Rev. Respir. Dis. 139 (1989), 56-61

KOBZIK, L., HUANG, S., PAULAUSKIS, J.D., GODLESKI, J.J.:

Particle Opsonization and Lung Macrophage Cytokine Response - In Vitro and In Vivo
Analysis
J. Immunol. 151 (1993), 2753-2759

KOENIG, J.Q., PIERSON, W.E.:

Air Pollutants and the Respiratory System: Toxicity and Pharmacologic Interventions
Clinical Toxicology 29 (1991), 401-411

KONINGS, A.W.:

Mechanisms of Ozone Toxicity in Cultured Cells. I. Reduced Clonogenic Ability of Polyunsaturated Fatty Acid-supplemented Fibroblasts. Effects of Vitamin E
J. Toxicol. Environm. Health 18 (1986), 491-497

KOREN, H.S., DEVLIN, R.B., GRAHAM, D.E., MANN, R., MCGEE, M.P., HORSTMAN, D.H., KOZUMBO, W.J., BECKER, S., HOUSE, D.E., MCDONNELL, W.F., BROMBERG, P.A.:

Ozone-induced Inflammation in the Lower Airways of Human Subjects
Am. Rev. Respir. Dis. 139 (1989), 407-415

KOREN, H.S., JOYCE, M., DEVLIN, R.B., BECKER, S., DRISCOLL, K., MADDEN, M.C.:

Modulation of Eicosanoid Production by Human Alveolar Macrophages Exposed to Silica in Vitro
Environm. Health Persp. 97 (1992), 77-83

KOWNATZKI, E., KAPP, A., UHRICH, S.:

Novel Neutrophil Chemotactic Factor Derived from Human Peripheral Blood Mononuclear Leukocytes
Clin. Exp. Immunol. 64 (1986), 214-222

KOWNATZKI, E., KAPP, A., UHRICH, S.:

Modulation of Human Neutrophilic Granulocyte Functions by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor and Recombinant Human Lymphotoxin. Promotion of Adherence, Inhibition of Chemotactic Migration and Superoxide Anion Release from Adherent Cells
Clin. Exp. Immunol. 74 (1988), 143-148

KOYAMA, S., RENNARD, S.I., LEIKAUF, G.D., SHOJI, S., VON ESSEN, S., CLAASSEN, L., ROBBINS, R.A.:

Endotoxin Stimulates Bronchial Epithelial Cells to Release Chemotactic Factors for Neutrophils - A Potential Mechanism for Neutrophil Recruitment, Cytotoxicity, and Inhibition of Proliferation in Bronchial Inflammation
J. Immunol. 147 (1991), 4293-4301

KUHN, D.C., GRIFFITH, J.W., STAUFFER, J.L., RILING, S., DEMERS, L.M.:

Characterization of Alveolar Macrophage Eicosanoid Production in a Non-Human Primate Model of Mineral Dust Exposure
Prostaglandins 46 (1993), 207-220

KUNKEL, S.L., STANDIFORD, T., KASAHARA, K., STRIETER, R.M.:

Interleukin-8 (IL-8): The Major Neutrophil Chemotactic Factor in the Lung
Exp. Lung Res. 17 (1991), 17-23

LASSALLE, P., GOSSET, P., AERTS, C., FOURNIER, E., LAFITTE, J.J., DEGREEF, J.M., WALLAERT, B., TONNEL, A.B., VOISIN, C.:

Abnormal Secretion of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor α by Alveolar Macrophages in Coal Worker's Pneumoconiosis: Comparison between Simple Pneumoconiosis and Progressive Massive Fibrosis
Exp. Lung Res. 16 (1990), 73-80

LAST, J.A., HYDE, D.M., CHANG, D.P.Y.:

A Mechanism of Synergistic Lung Damage by Ozone and a Respirable Aerosol
Exp. Lung Res. 7 (1984), 223-235

LIEBLER, D.C.:

The Role of Metabolism in the Antioxidant Function of Vitamin E
Critical Reviews in Toxicology 23 (1993), 147-169

LIND, I.:

Untersuchungen der Wirkungen von NO₂ auf Immunfunktionen von
Rinderalveolarmakrophagen in einem realitätsnahen in vitro-System
Dissertation, Universität Karlsruhe (1993)

LIPPMANN, M.:

Health Effects of Ozone - A Critical Review
J. Air Pollut. Control Assoc. 39 (1989), 672-695

MARTIN, H., LOOS, M.:

Biosynthesis of Complement Components by Macrophages
in: Macrophage-Derived Cell Regulatory Factors, Cytokines, 155-172
Ed.: Sorg, C.
Karger Verlag Basel 1989

MARTINET, Y., YAMAUCHI, K., CRYSTAL, R.G.:

Differential Expression of the Tumor Necrosis Factor/Cachectin Gene by Blood and Lung
Mononuclear Phagocytes
Am. Rev. Respir. Dis. 138 (1988), 659-665

MATEJKA, M.:

Einfluß von Lanthan and Cer auf die Freisetzung des Tumornekrosefaktors durch
Makrophagen
Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (1992)

MATTHAY, R.A., BALZER, P.A., PUTMAN, C.E., GEE, J.B.L., BECK, G.J.,
GREENSPAN, R.H.:

Tantalum Oxide, Silica and Latex: Effects on Alveolar Macrophage Viability and Lysozyme
Release
Investigative Radiology 13 (1978), 514-518

MAYER, D.:

Schädigung humaner Lungenzellen durch Ozon
Dissertation, Universität Heidelberg (1992)

MCCOLL, S.R., HACHICHA, M., LEVASSEUR, S., NEOTE, K., SCHALL, T.J.:

Uncoupling of Early Signal Transduction Events from Effector Function in Human Peripheral
Blood Neutrophils in Response to Recombinant Macrophage Inflammatory Proteins-1 α and
-1 β
J. Immunol. 150 (1993), 4550-4560

MCDONNELL, W.F., KEHRL, H.R., ABDUL-SALAAM, S., IVES, P.J., FOLINSBEE, L.J.,
DEVLIN, R.B., O'NEIL, J.J., HORSTMAN, D.H.:

Respiratory Response of Humans Exposed to Low Levels of Ozone for 6.6 Hours
Arch. Env. Health 46 (1991), 273-281

MEHLMAN, M.A., BOREK, C.:

Toxicity and Biochemical Mechanisms of Ozone
Environm. Res. 42 (1987), 36-53

MENZEL, D.B.:

Antioxidants in Lung Disease
Toxicology and Industrial Health 9 (1993), 323-336

MILLER, M.D., KRANGEL M.S.:

Biology and Biochemistry of the Chemokines: A Family of Chemotactic and Inflammatory
Cytokines
Critical Reviews in Immunology 12 (1992), 17-46

MOLFINO, N.A., WRIGHT, S.C., KATZ, I., TARLO, S., SILVERMAN, F., MCCLEAN,
P.A., SZALAI, J.P., RAIZENNE, M., SLUTSKY, A.S., ZAMEL, N.:

Effect of Low Concentrations of Ozone on Inhaled Allergen Responses in Asthmatic Subjects
Lancet 338 (1991), 199-203

MOLFINO, N.A., SLUTSKY, A.S., ZAMEL, N.:

The Effects of Air Pollution on Allergic Bronchial Resopnsiveness
Clinical and Experimental Allergy 22 (1992), 667-672

MORGAN, D.L., WENZEL, D.G.:

Free Radical Species Mediating the Toxicity of Ozone for Cultured Rat Lung Fibroblasts
Toxicology 36 (1985), 243-251

MORIMOTO, Y., KIDO, M., TANAKA, I., FUJINO, A., HIGASHI, T., YOKOSAKI, Y.:

Synergistic Effects of Mineral Fibres and Cigarette Smoke on the Production of Tumor
Necrosis Factor by Alveolar Macrophages of Rats
Br. J. Industr. Med. 50 (1993), 955-960

MORTIMER, C.E.:

Chemie - Das Basiswissen der Chemie, 88-93
5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1987

NII, A., SONE, S., ORINO, E., OGURA, T.:

Induction of a 26-kDa Membrane-Form Tumor Necrosis Factor (TNF) α in Human Alveolar
Macrophages
J. Leukoc. Biol. 53 (1993), 29-36

OGHISO, Y., KUBOTA, Y.:

Interleukin 1 Production and Accessory Cell Function of Rat Alveolar Macrophages Exposed
to Mineral Dust Particles
Microbiol. Immunol. 31 (1987), 275-287

OROSI, P., NUGENT, K.:

Studies of Phagocytic and Killing Activities of Alveolar Macrophages in Patients with Sarcoidosis

Lung 171 (1993), 225-233

OSTRO, B.D., LIPSETT, M.J., MANN, J.K., KRUPNICK, A., HARRINGTON, W.:

Air Pollution and Respiratory Morbidity among Adults in Southern California

Am. J. Epidemiol. 137 (1993), 691-700

OUELLET, S., YANG, H., AUBIN, R.A., HAWLEY, R.G., WENCKEBACH, G.F.C., LEMAIRE, I.:

Bidirectional Modulation of TNF- α Production by Alveolar Macrophages in Asbestos-induced Pulmonary Fibrosis

J. Leukoc. Biol. 53 (1993), 279-286

PACKER, J.E., SLATER, T.F., WILLSON, R.L.:

Direct Observation of a Free Radical Interaction between Vitamin E and Vitamin C

Nature 278 (1979), 737-738

PAULESU, L., LUZZI, E., BOCCI, V.:

Studies on the Biological Effects of Ozone: 2. Induction of Tumor Necrosis Factor (TNF- α) on Human Leukocytes

Lymphokine and Cytokine Research 10 (1991), 409-412

PESSINA, G.P., PAULESU, L., CORRADESCHI, F., LUZZI, E., DI STEFANO, A., TANZINI, M., MATTEUCCI, G., BOCCI, V.:

Effects of Acute Cigarette Smoke Exposure on Macrophage Kinetics and Release of Tumour Necrosis Factor α in Rats

Mediators of Inflammation 2 (1993), 119-122

PINKERTON, K.E., DODGE, D.E., CEDERDAHL-DEMMLER, J., WONG, V.J., PEAKE, J., HASELTON, C.J., MELLICK, P.W., SINGH, G., PLOPPER, C.G.:

Differentiated Bronchiolar Epithelium in Alveolar Ducts of Rats Exposed to Ozone for 20 Months

Am. J. Pathol. 142 (1993), 947-956

POLZER, G.:

Morphologische und biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Seltenen Erdmetallverbindungen auf Rinderalveolarmakrophagen

Dissertation, Universität Karlsruhe (1992)

RAGHUNATH, B., IYER, M.R., SONI, P.S., SAMUEL, A.M., SOMAN, S.D.:

Barc Aerosol Generation/Inhalation System

The 3rd Int. Aerosol. Conference, Japan 1990

RANKIN, J.A., SYLVESTER, I., SMITH, S., YOSHIMURA, T., LEONARD, E.J.:

Macrophages Cultured In Vitro Release Leukotrien B₄ and Neutrophil Attractant/Activation Protein (Interleukin 8) Sequentially in Response to Stimulation with Lipopolysaccharide and Zymosan

J. Clin. Invest. 86 (1990), 1556-1564

REIGART, J.R., ETZEL, R.A., GOLDMAN, L.R., HENDRICK, J.G., MOFENSON, H.C., SIMON, P.R., FALK, H., MILLER, R.W., ROGAN, W., NEEDLEMAN, H.L., JACKSON, R.J., LANDRIGAN, P., LIPSETT, M.:

Ambient Air Pollution: Respiratory Hazards to Children - Committee on Environmental Health Pediatrics 91 (1993), 1210-1213

RIETJENS, I.M.C.M., VAN BREE, L., MARRA, M., POELEN, M.C.M., ROMBOUT, P.J., ALINK, G.M.:

Glutathione Pathway Enzyme Activities and the Ozone Sensitivity of Lung Cell Populations Derived from Ozone Exposed Rats
Toxicology 37 (1985), 205-214

RIETJENS, I.M.C.M., POELEN, M.C.M., HEMPENIUS, R.A., GIJBELS, M.J.J., ALINK, G.M.:

Toxicity of Ozone and Nitrogen Dioxide to Alveolar Macrophages: Comparative Study Revealing Differences in their Mechanism of Toxic Action
J. Toxicol. Environm. Health 19 (1986), 555-568

RIETSCHEL, E.TH., SCHADE, U., JENSEN, M., WOLLENWEBER, H.-W., LÜDERITZ, O., GREISMAN, S.G.:

Bacterial Endotoxins: Chemical Structure, Biological Activity and Role in Septicaemia
Scand. J. Infect. Dis. 31 (1982), 8-21

ROCK, C.S., LOWRY, S.F.:

Current Research Review: Tumor Necrosis Factor- α
J. Surg. Res. 51 (1991), 434-445

ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K.:

Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Kap. 7, 65-78
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1987

ROMIEU, I., LUGO, M.C., VELASCO, S.R., SANCHEZ, S., MENESES, F., HERNANDEZ, M.:

Air Pollution and School Absenteeism among Children in Mexico City
Am. J. Epidemiol. 136 (1992), 1524-1531

ROT, A.:

Neutrophil Attractant/Activation Protein-1 (Interleukin-8) Induces in Vitro Neutrophil Migration by Haptotactic Mechanism
Eur. J. Immunol. 23 (1993), 303-306

RUSZNAK, C., DEVALIA, J.L., DAVIES, R.J.:

The Impact of Pollution on Allergic Disease
Allergy 49 (1994), 21-27

RYDER-POWDER, J.E., AMORUSO, M.A., CZERNIECKI, B., WITZ, G., GOLDSTEIN, B.D.:

Inhalation of Ozone Produces a Decrease in Superoxide Anion Radical Production in Mouse Alveolar Macrophages
Am. Rev. Respir. Dis. 138 (1988), 1129-1133

SACHS, L.:

Angewandte Statistik

6. Auflage, Springer Verlag Berlin 1984

SALGADO, J., VILLALAIN, J., GOMEZ-FERNANDEZ, J.C.:

α -Tocopherol Interacts with Natural Micelle-Forming Single-Chain Phospholipids Stabilizing the Bilayer Phase

Archives of Biochemistry and Biophysics 306 (1993), 368-376

SAMET, J.M., FRIEDMAN, M.:

Effect of Ozone on Platelet Activating Factor Metabolism in Phorbol-differentiated HL60 Cells

Toxicol. Appl. Pharmacol. 117 (1992), 19-25

SCHADE, F.U., ENGEL, R., HÄRTLING, S., HOLLER, J., JAKOBS, D.:

The Role of Unsaturated Fatty Acids in Endotoxin-Induced Macrophage Activation

Immunobiol. 187 (1993), 283-302

SCHMIDT, A.:

Die Wirkung von Quarz auf die Lysosomen und die Tumor Nekrose Faktor-Produktion von Alveolarmakrophagen

Dissertation, Universität Karlsruhe (1992)

SCHRÖDER, J.-M.:

Interleukin 8

Advances in Neuroimmunology 2 (1992), 109-124

SCHULTHEIS, A.H., BASSETT, D.J.P.:

Guinea Pig Lung Inflammatory Cell Changes Following Acute Ozone Exposure

Lung 172 (1994), 169-181

SHACTER, E., ARZADON, G.K., Williams, J.A.:

Stimulation of Interleukin-6 and Prostaglandin E₂ Secretion From Peritoneal Macrophages by Polymers of Albumin

Blood 82 (1993), 2853-2864

SHERON, N., WILLIAMS, R.:

IL-8 as a Circulating Cytokine - Induction by Recombinant Tumor Necrosis Factor-alpha

Clin. Exp. Immunol. 89 (1992), 100-103

SHIMA, M., ADACHI, M.:

Changes of Procoagulant and Fibrinolytic Activities in the Alveoli of Rats Exposed to Ozone

Jpn. J. Hyg. 46 (1991), 724-745

SHIOTSUKA, R.N., YERMAKOFF, J.K., OSHEROFF, M.R., DREW, R.T.:

The Combination of Ozone and Silica on the Development of Pulmonary Fibrosis

J. Toxicol. Environm. Health 17 (1986), 297-310

SMITH, W.B., GAMBLE, J.R., CLARK-LEWIS, I., VADAS, M.A.:

Chemotactic Desensitization of Neutrophils Demonstrates Interleukin-8 (IL-8)-dependent and IL-8-independent Mechanisms of Transmigration through Cytokine-activated Endothelium

Immunology 78 (1993), 491-497

SOLIMAN, D.M., TWIGG, H.L.:

Cigarette Smoking Decreases Bioactive Interleukin-6 Secretion by Alveolar Macrophages
Am. J. Physiol. 263 (1992), L471-L478

STANDIFORD, T.J., ROLFE, M.W., KUNKEL, S.L., LYNCH, J.P., BURDICK, M.D.,
GILBERT, A.R., ORRINGER, M.B., WHYTE, R.I., STRIETER, R.M.:

Macrophage Inflammatory Protein-1 α Expression in Interstitial Lung Disease
J. Immunol. 151 (1993), 2852-2863

STOKINGER, H.E.:

Evaluation of the Hazards of Ozone and Oxides of Nitrogen
A.M.A. Arch. Industr. Health 15 (1957), 181-190

STRIETER, R.M., KASAHARA, K., ALLEN, R.M., STANDIFORD, T.J., ROLFE, M.W.,
BECKER, F.S., CHENSUE, S.W., KUNKEL, S.L.:

Cytokine-induced Neutrophil-derived Interleukin-8
Am. J. Pathol. 141 (1992), 397-407

SWEET, F., KAO, M., LEE, D.D., HAGAR, W.L., SWEET, W.E.:

Ozone Selectivity Inhibits Growth of Human Cancer Cells
Science 209 (1980), 931-932

TERAO, I., HASHIMOTO, S., HORIE, T.:

Effect of GM-CSF on TNF-Alpha und IL-1-Beta Production by Alveolar Macrophages and
Peripheral Blood Monocytes from Patients with Sarcoidosis
Int. Arch. Allergy Immunol. 102 (1993), 242-248

THOMASSEN, M.J., MEEKER, D.P., ANTAL, J.M., CONNORS, M.J., WIEDEMANN,
H.P.:

Synthetic Surfactant (Exosurf) Inhibits Endotoxin-stimulated Cytokine Secretion by Human
Alveolar Macrophages
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 7 (1992), 257-260

TOBIAS, P.S., MATHISON, J., MINTZ, D., LEE, J.-D., KRAVCHENKO, V., KATO, K.,
PUGIN, J., ULEVITCH, R.J.:

Participation of Lipopolysaccharide-binding Protein in Lipopolysaccharide-dependent
Macrophage Activation
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 7 (1992), 239-245

TOKUDA, Y., TSUJI, M., YAMAZAKI, M., KIMURA, S., ABE, S., YAMAGUCHI, H.:

Augmentation of Murine Tumor Necrosis Factor Production by Amphotericin B In Vitro and
In Vivo
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37 (1993), 2228-2230

TRACEY, K.J., CERAMI, A.:

Cachectin/Tumor Necrosis Factor and Other Cytokines in Infectious Disease
Current Opinion in Immunology 1 (1989), 454-461

UMWELTBUNDESAMT:

Daten zur Umwelt 1990/91, 196-203
Erich Schmidt Verlag 1991

UMWELTBUNDESAMT:

Umweltindex: Immissions-Belastungen in Deutschland
VDI-Nachrichten Nr. 27 (9.7.1993)

UMWELTBUNDESAMT:

Umweltindex: Immissions-Belastungen in Deutschland
VDI-Nachrichten Nr. 28 (16.7.1993)

VAN DEUREN, M., DOFFERHOFF, A.S.M., VAN DER MEER, J.W.M.:

Cytokines and the Response to Infection
J. Pathol. 168 (1992), 349-356

VAN LOVEREN, H., ROMBOUT, P.J.A., WAGENAAR, S.J. SC., WALVOORT, H.C.,
VOS, J.G.:

Effects of Ozone on the Defense to a Respiratory *Listeria monocytogenes* Infection in the Rat
Suppression of Macrophage Function and Cellular Immunity and Aggravation of
Histopathology in Lung and Liver during Infection
Toxicol. Appl. Pharmacol. 94 (1988), 374-393

VOISIN, C., AERTS, C., JAKUBCZAK, E., TONNEL, A.V.:

La Culture Cellulaire en Phase Gazeuse
Bull. Europ. Physiopath. Resp. 13 (1977), 69-82

VOLLMER, K.L., ALBERTS, J.S., CARPER, H.T., MANDELL, G.L.:

Tumor Necrosis Factor-alpha Decreases Neutrophil Chemotaxis to N-Formyl-1-Methionyl-1-
Leucyl-1-Phenylalanine: Analysis of Single Cell Movement
J. Leukoc. Biol. 52 (1992), 630-636

WARD, P.A.:

Leukotaxis and Leukotactic Disorders
Am. J. Pathol. 77 (1974), 520-538

WARDLAW, A.J.:

The Role of Air Pollution in Asthma
Clinical and Experimental Allergy 23 (1993), 81-96

WELBOURN, C.R.B., YOUNG, Y.:

Endotoxin, Septic Shock and Acute Lung Injury: Neutrophils, Macrophages and Inflammatory
Mediators
Br. J. Surg. 79 (1992), 998-1003

WENZEL, D.G., MORGAN, D.L.:

Role of in Vitro Factors in Ozone Toxicity for Cultured Rat Lung Fibroblasts
Drug and Chemical Toxicology 5 (1982), 201-217

WHITE, M.C., ETZEL, R.A., WILCOX, W.D., LLOYD, C.:

Exacerbations of Childhood Asthma and Ozone Pollution in Atlanta
Environm. Res. 65 (1994), 56-68

WILCZEK, W.:

Reaktionen von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz und Hochtemperatursupraleiterstäube
Dissertation, Universität Karlsruhe (1991)

WOLF, J.E., MASSOF, S.E.:

In vivo Activation of Macrophage Oxidative Burst Activity by Cytokines and Amphotericin B
Infection and Immunity 58 (1990), 1296-1300

WOLPE, S.D., CERAMI, A.:

Macrophage Inflammatory Proteins 1 and 2: Members of a Novel Superfamily of Cytokines
FASEB J. 3 (1989), 2565-2573

WRIGHT, E.S., WHITE, D.M., BRADY, A.N., LI, L.C., D'ARCY, J.B., SMILER, K.L.:

DNA Synthesis in Pulmonary Alveolar Macrophages and Typ II Cells: Effects of Ozone
Exposure and Treatment with α -Difluoromethylornithine
J. Toxicol. Environm. Health 21 (1987), 15-26

ZELIKOFF, J.T., KRAEMER, G.-L., VOGEL, M.C., SCHLESINGER, R.B.:

Immunomodulating Effects of Ozone on Macrophage Functions Important for Tumor
Surveillance and Host Defense
J. Toxicol. Environm. Health 34 (1991), 449-467

ZHANG, Y., LEE, T.C., GUILLEMIN, B., YU, M.-C., ROM, W.N.:

Enhanced IL-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Release and Messenger RNA Expression in
Macrophages from Idiopathic Pulmonary Fibrosis or after Asbestos Exposure
J. Immunol. 150 (1993), 4188-4196

ZIGMOND, S.H., HIRSCH, J.G.:

Leukocyte Locomotion and Chemotaxis - New Methods for Evaluation, and Demonstration of
a Cell-Derived Chemotactic Factor
J. Exp. Med. 137 (1973), 387-410

ZWICK, H., POPP, W., WAGNER, C., REISER, K., SCHMÖGER, J., BÖCK, A.,
HERKNER, K., RADUNSKY, K.:

Effects of Ozone on the Respiratory Health, Allergic Sensitization, and Cellular Immune
System in Children
Am. Rev. Respir. Dis. 144 (1991), 1075-1079

7. Abbildungen

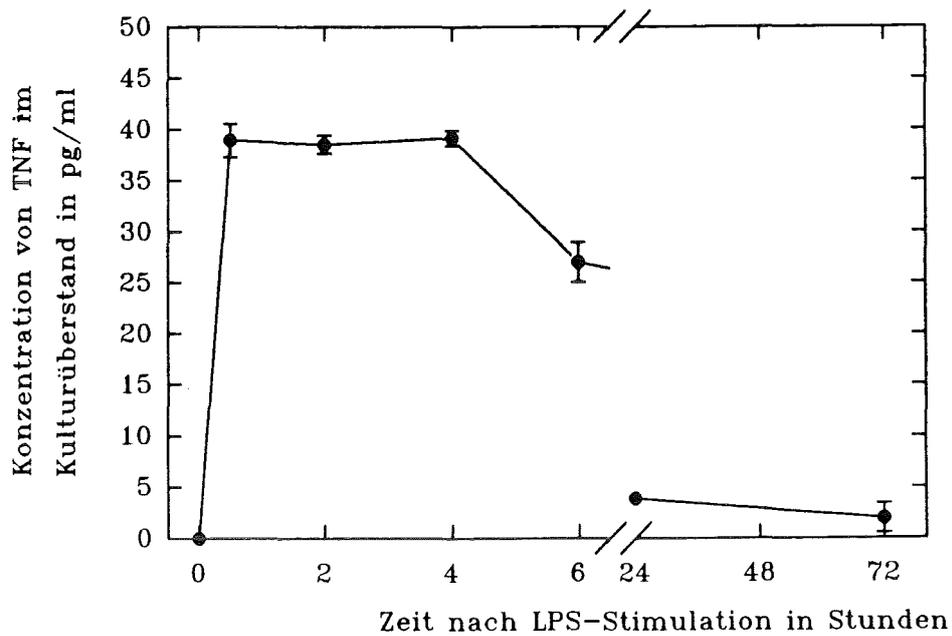


Abb. 1: Zeitabhängige Freisetzung von TNF in den Kulturüberstand nach zweistündiger LPS-Stimulation ($10 \mu\text{g/ml}$) von RAM.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=4$

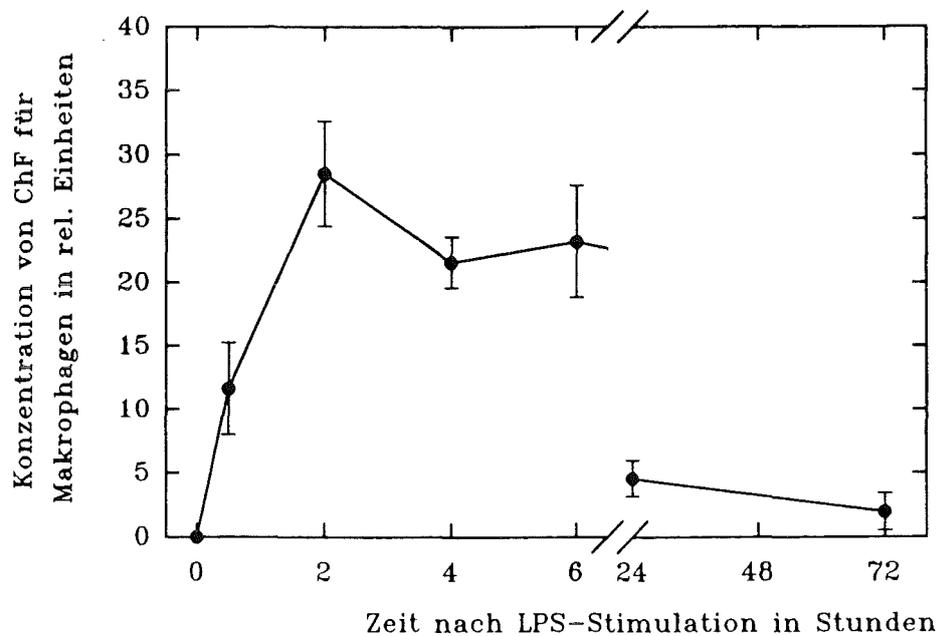


Abb. 2: Zeitabhängige Freisetzung von ChF für Makrophagen in den Kulturüberstand nach zweistündiger LPS-Stimulation ($10 \mu\text{g/ml}$) von RAM.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=6$

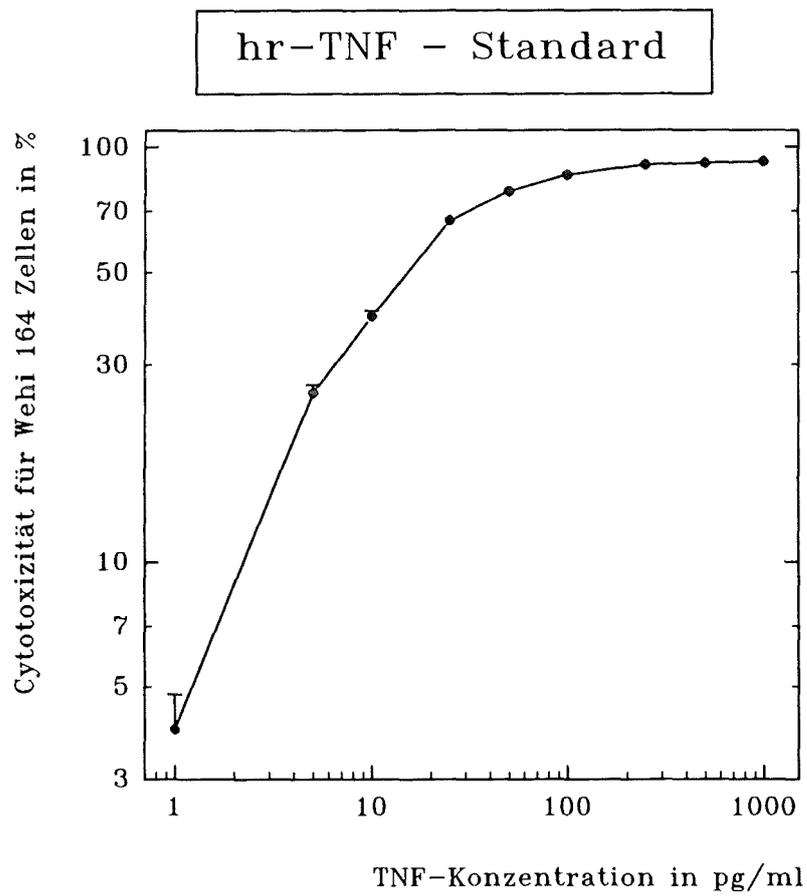


Abb. 3: Cytotoxizität von TNF für Wehi 164/13-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4

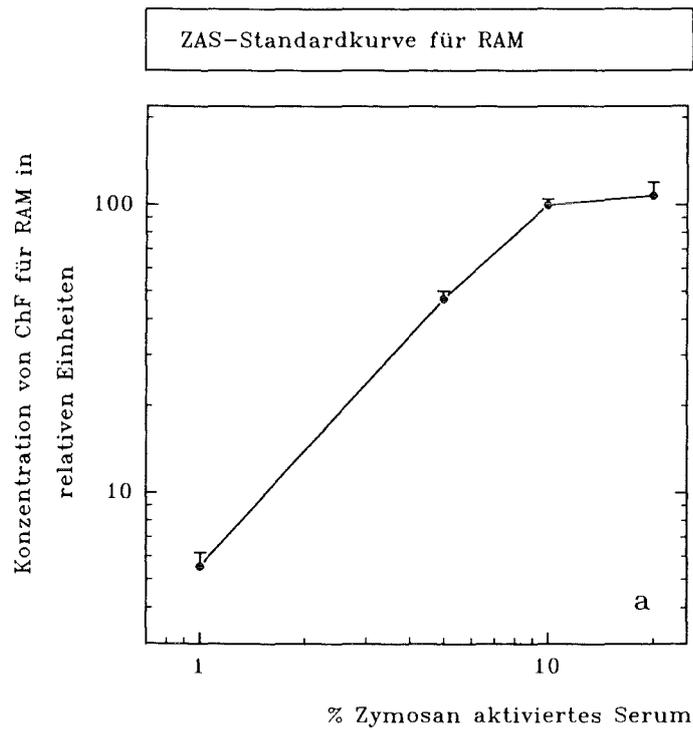


Abb. 4: Chemotaktische Aktivität von ZAS für RAM in Abhängigkeit von der Konzentration.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6

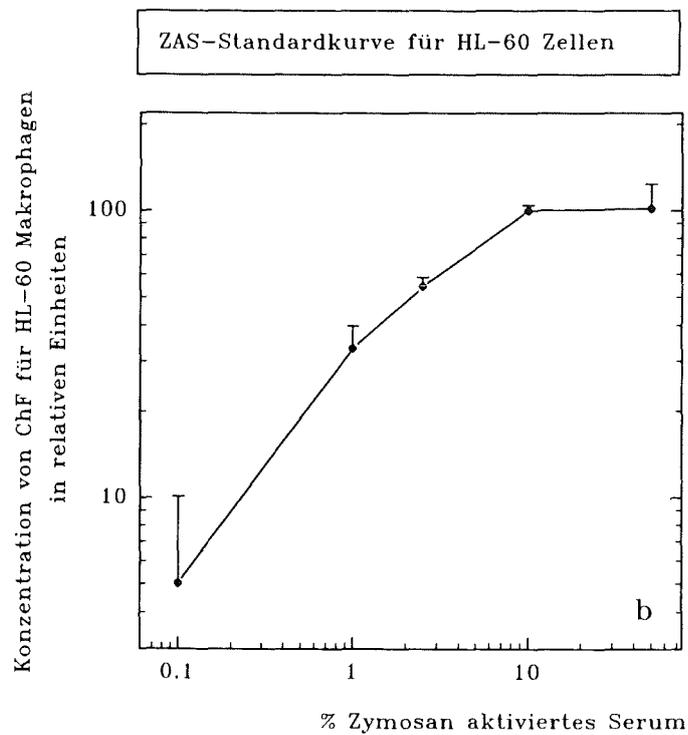


Abb. 5: Chemotaktische Aktivität von ZAS für HL-60 Makrophagen in Abhängigkeit von der Konzentration.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6

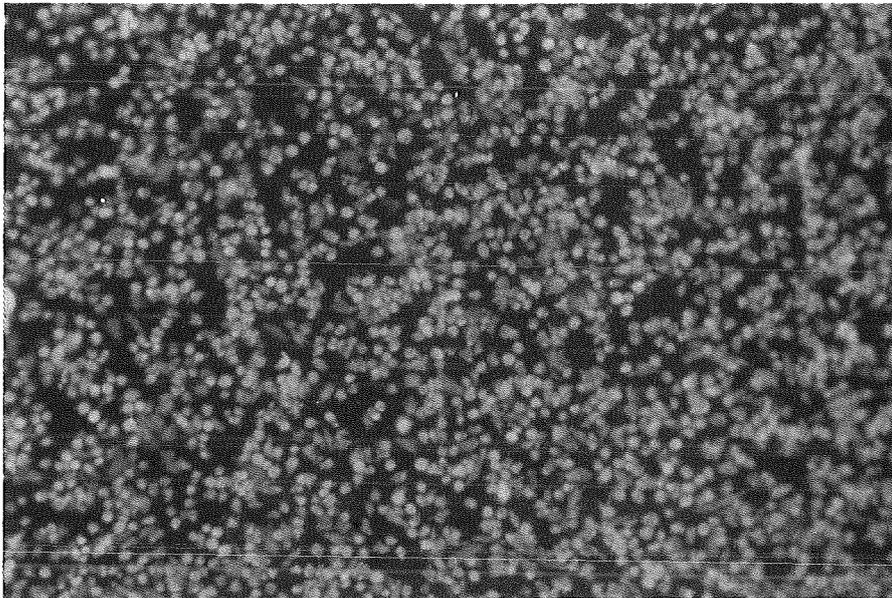


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von RAM nach vierstündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer. Anregungswellenlänge: 450-490 nm, Vergrößerung: x 150

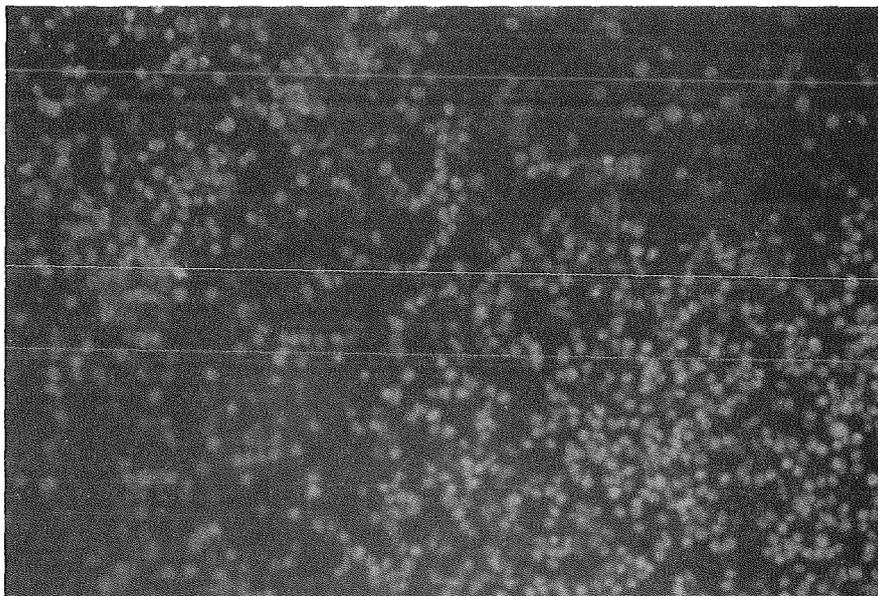


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von RAM nach vierstündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer. Anregungswellenlänge: 450-490 nm, Vergrößerung: x 150

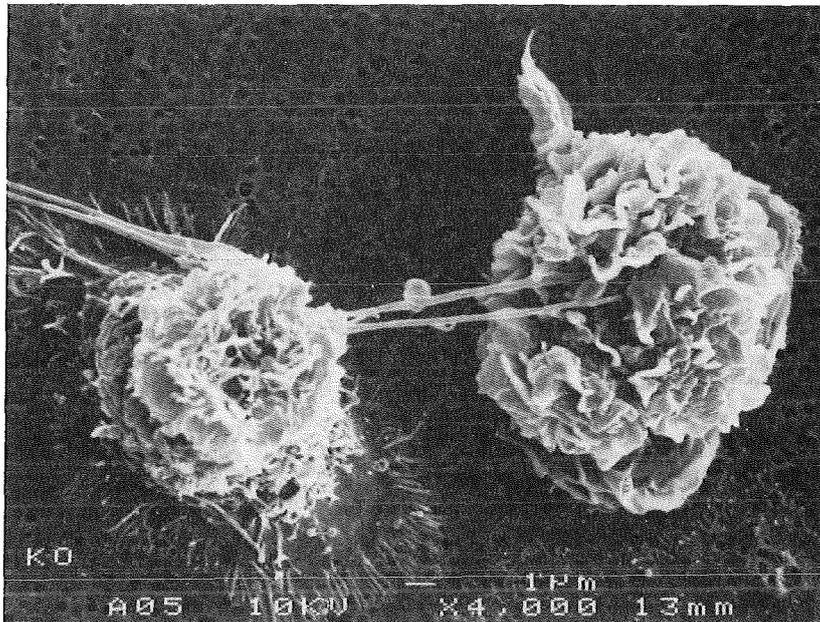


Abb. 8a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer. Vergrößerung: x 4000

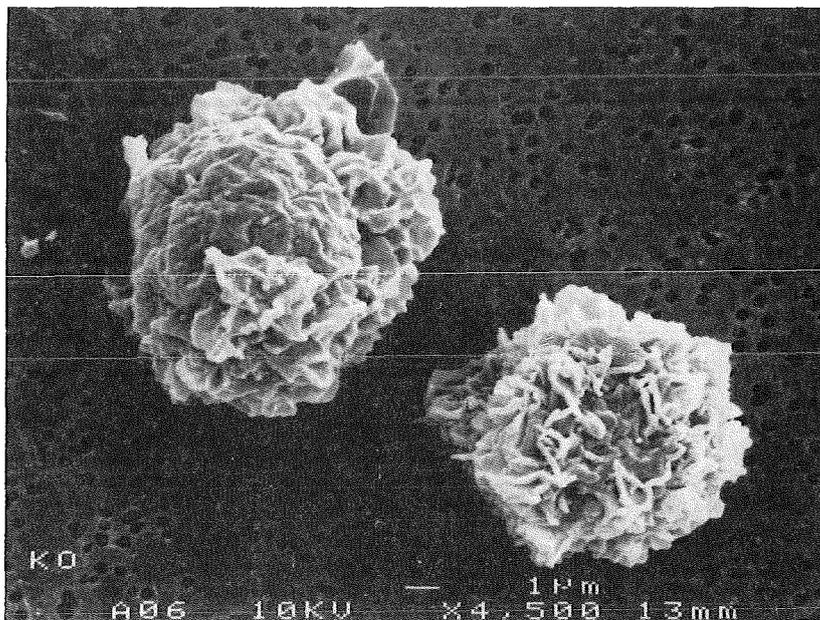


Abb. 8b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer. Vergrößerung: x 4500

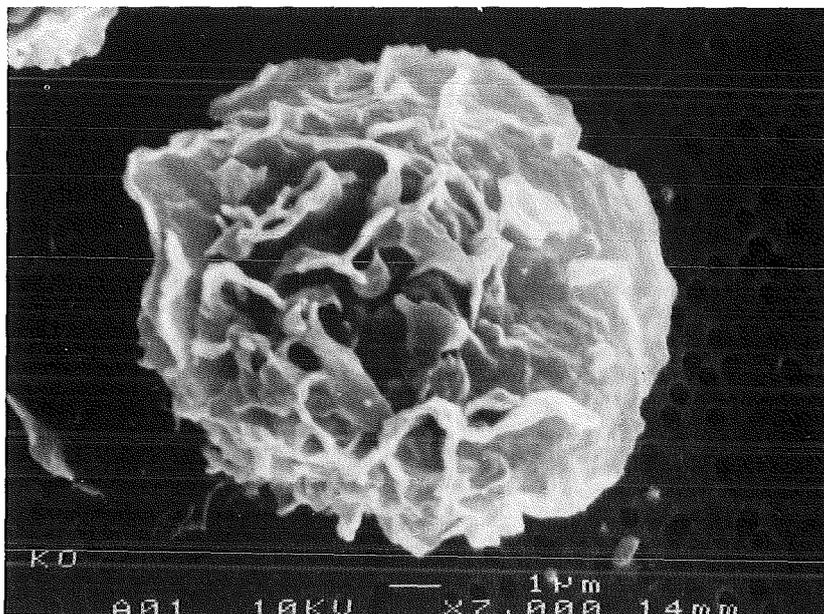


Abb. 8c: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer. Vergrößerung: x 7000

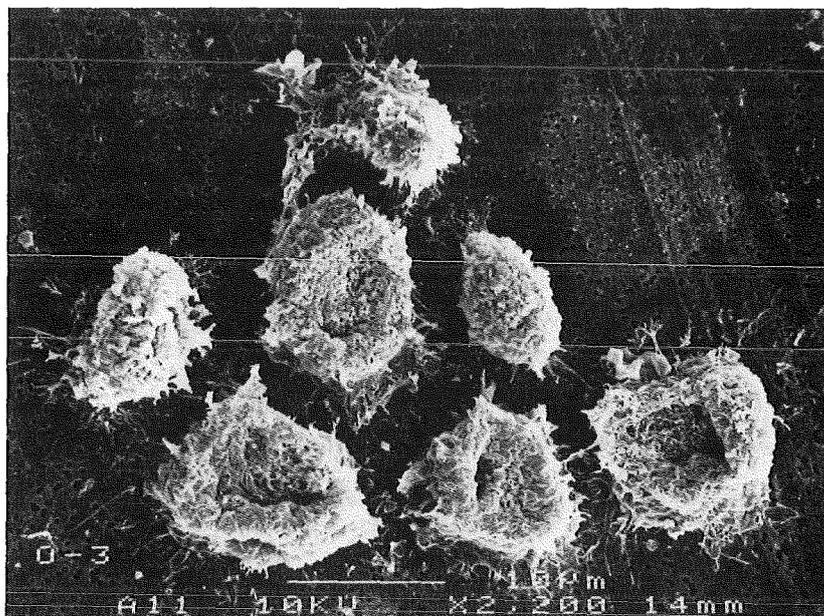


Abb. 9a: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer. Vergrößerung: x 2200

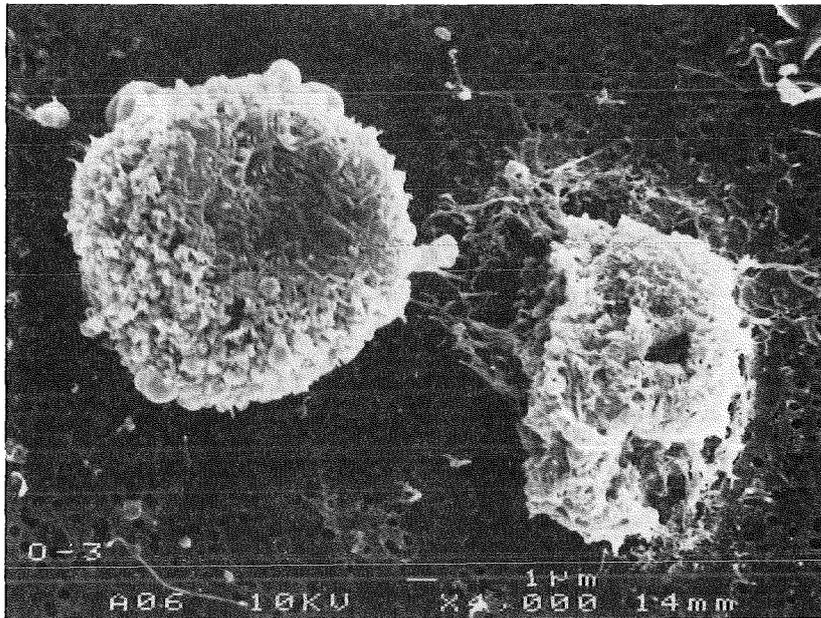


Abb. 9b: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit 0,5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer. Vergrößerung: x 4000

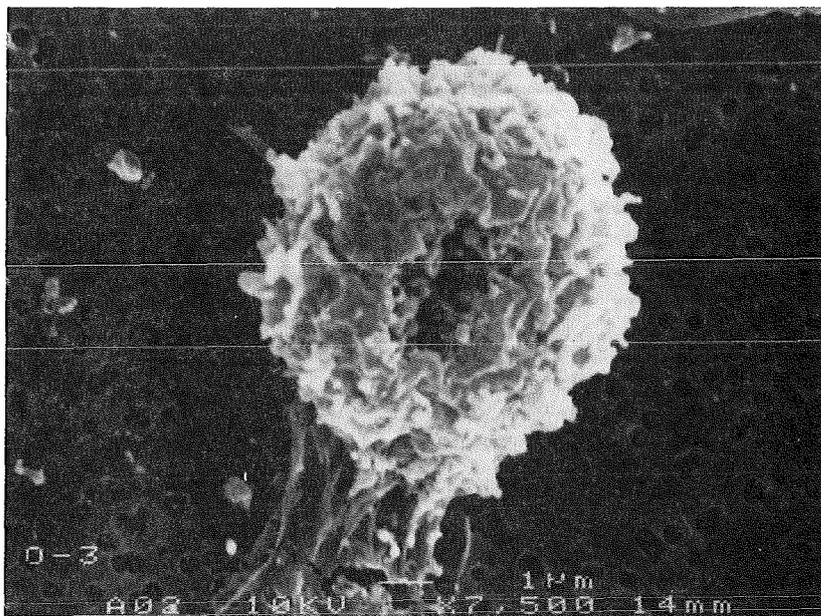


Abb. 9c: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit 0,5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer. Vergrößerung: x 7500

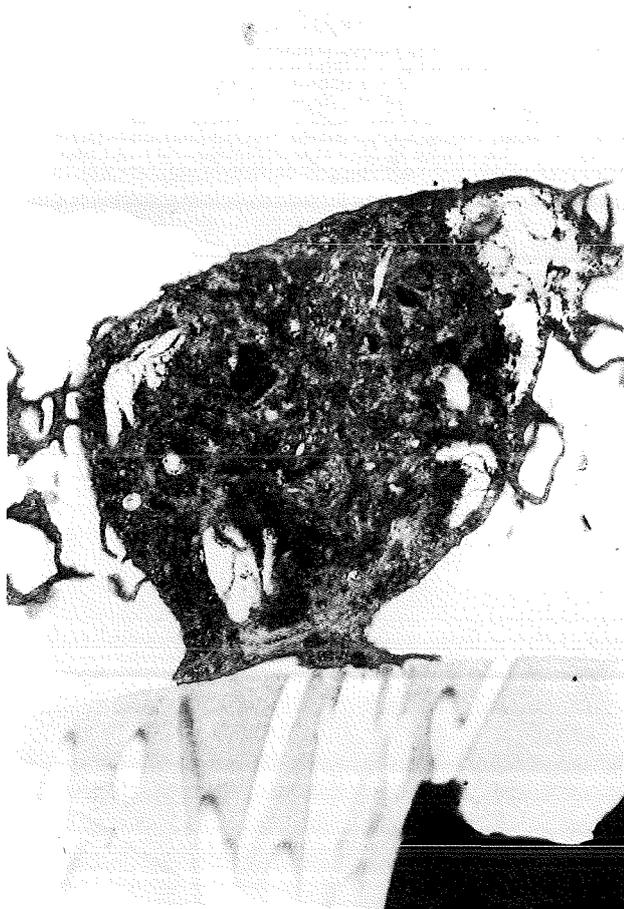


Abb. 10a: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer.
Vergrößerung: x 6000

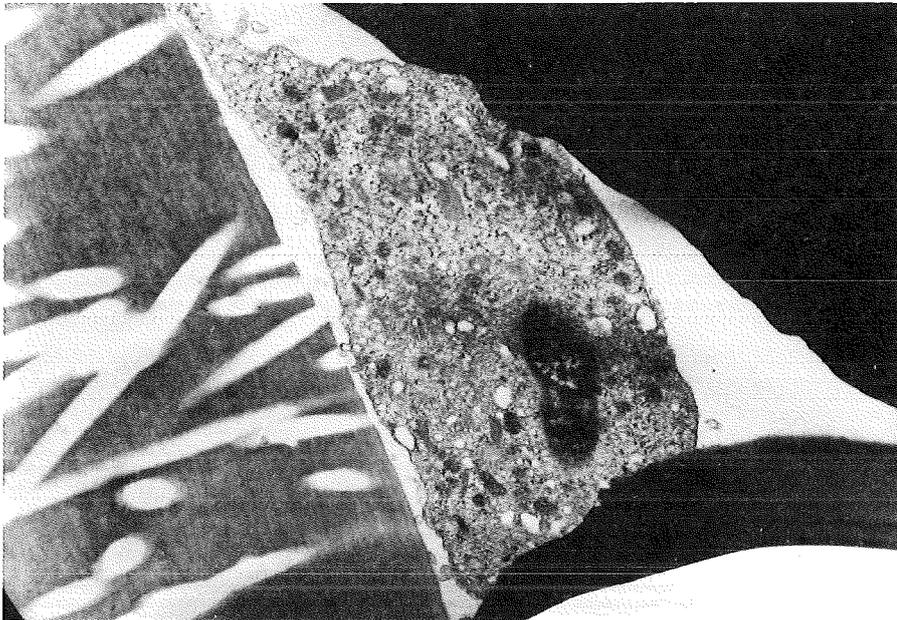


Abb. 10b: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer.
Vergrößerung: x 10500

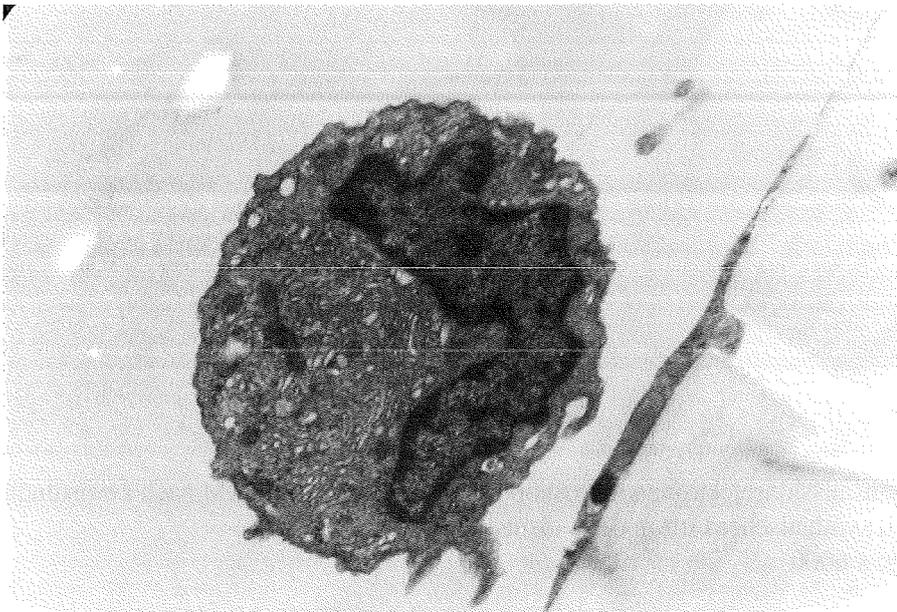


Abb. 10c: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer.
Vergrößerung: x 14250

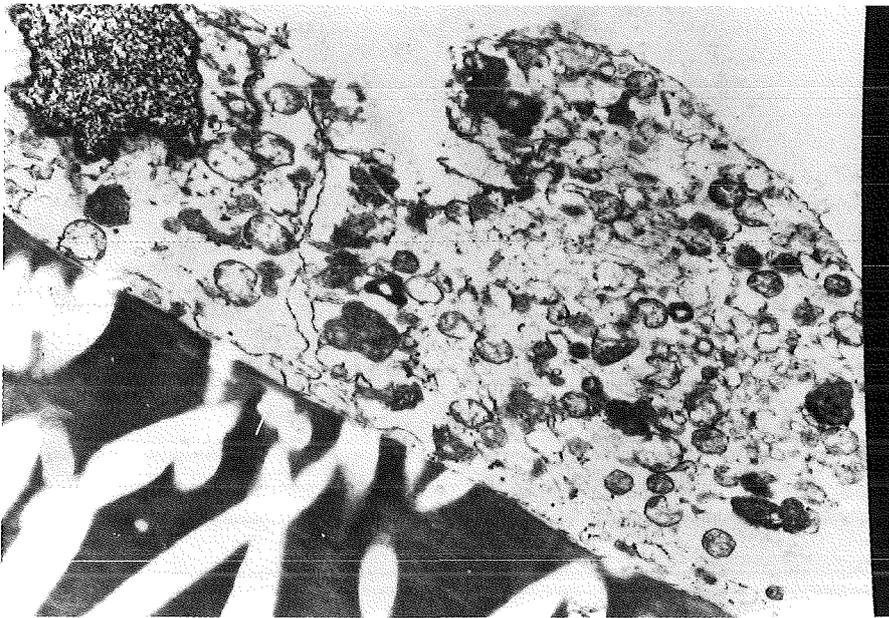


Abb. 11a: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer.
Vergrößerung: x 7500

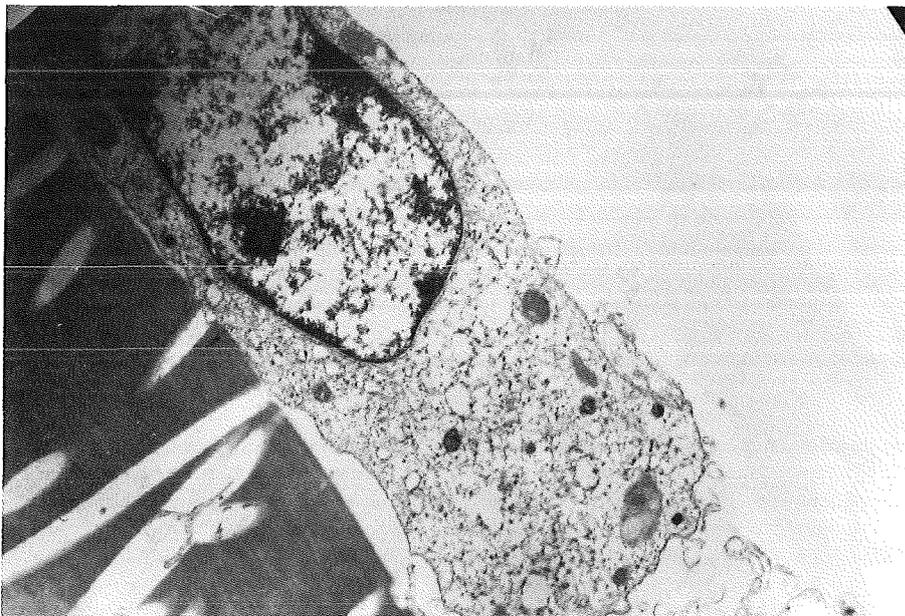


Abb. 11b: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer.
Vergrößerung: x 7500

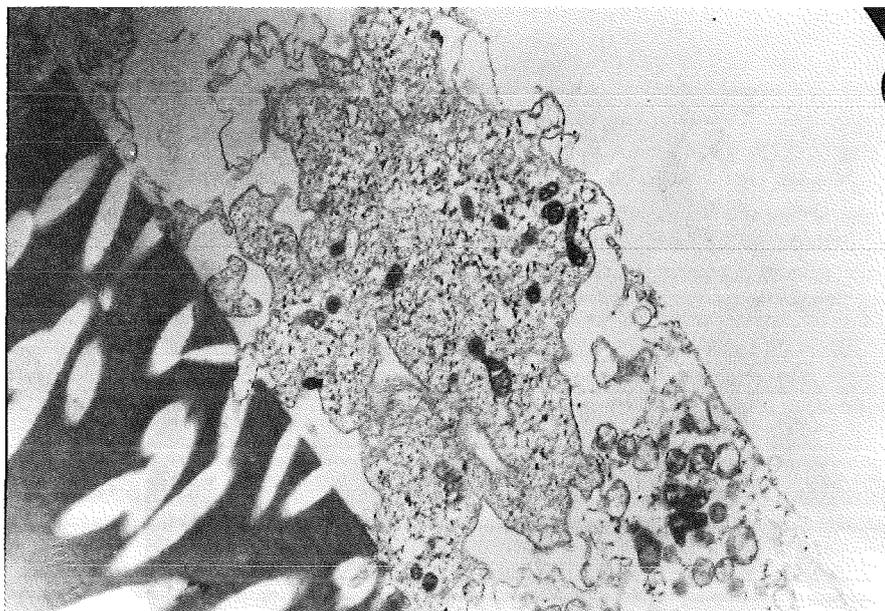


Abb. 11c: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer. Vergrößerung: x 6000

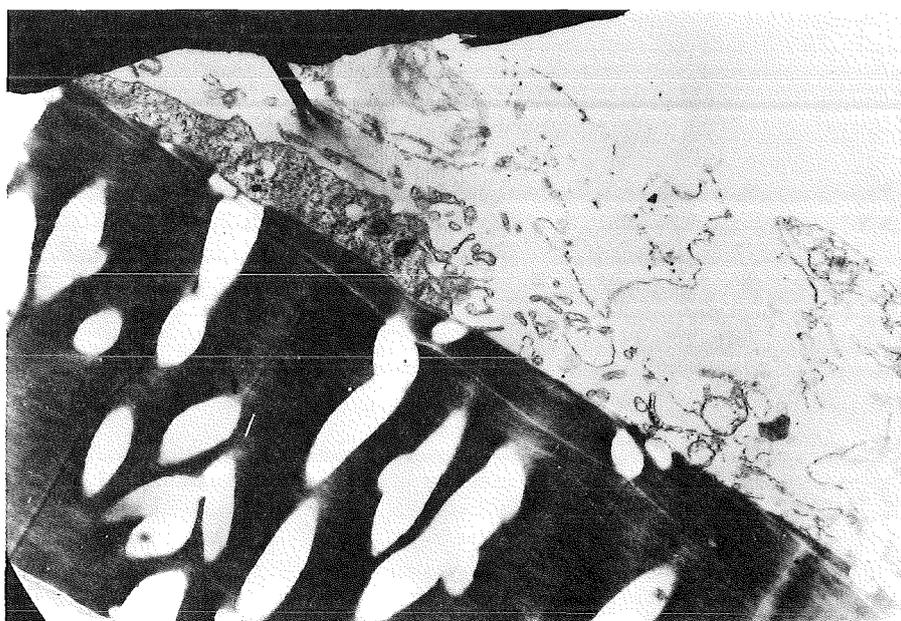


Abb. 11d: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von RAM nach zweistündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer. Vergrößerung: x 6000

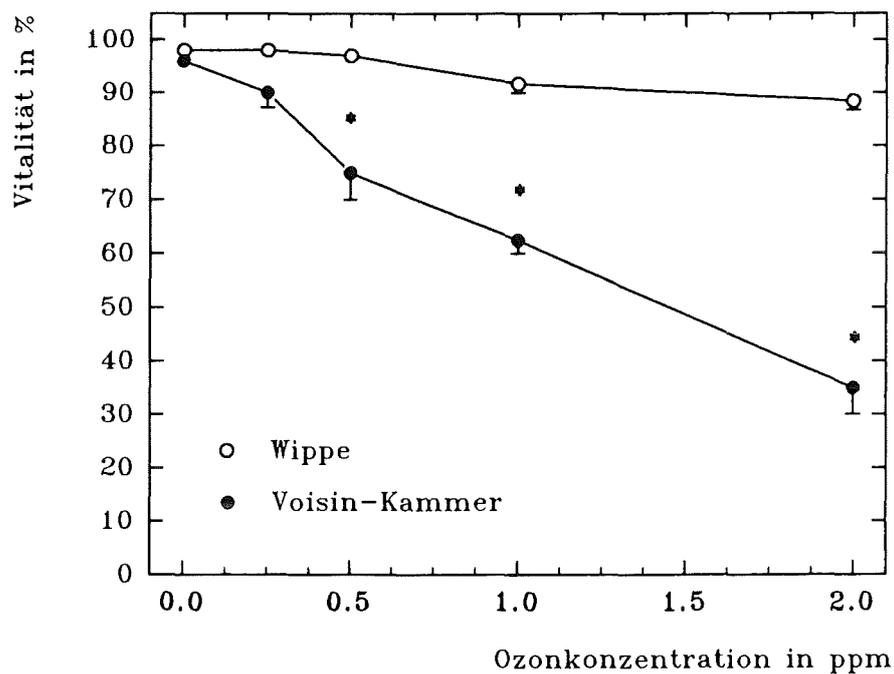


Abb. 12: Vitalität von RAM nach Exposition mit Ozon für 4 Stunden in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration und vom Expositionssystem.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=8$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p<0.05$

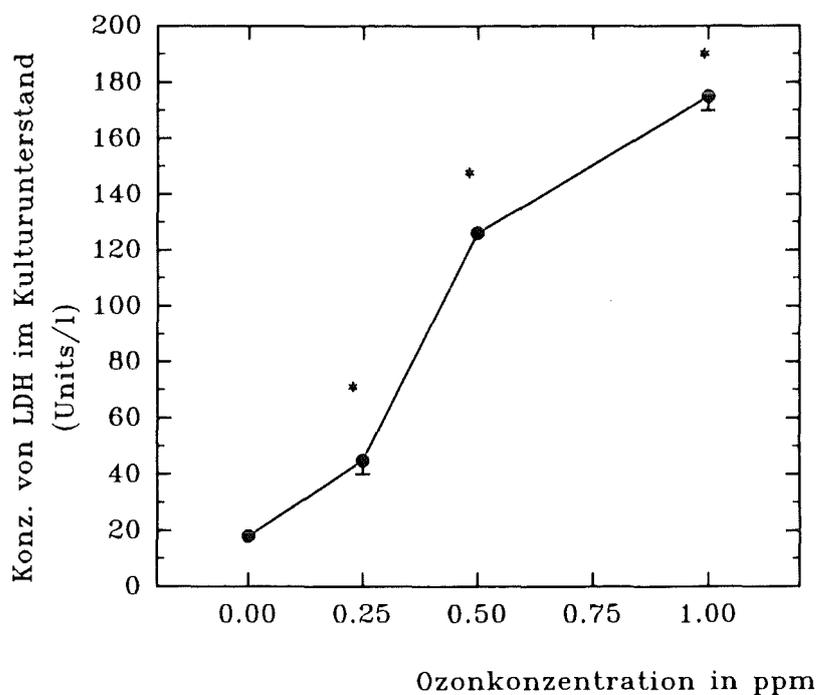


Abb. 13: LDH-Freisetzung von RAM während einer vierstündigen Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Konzentration.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=4$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p<0.05$

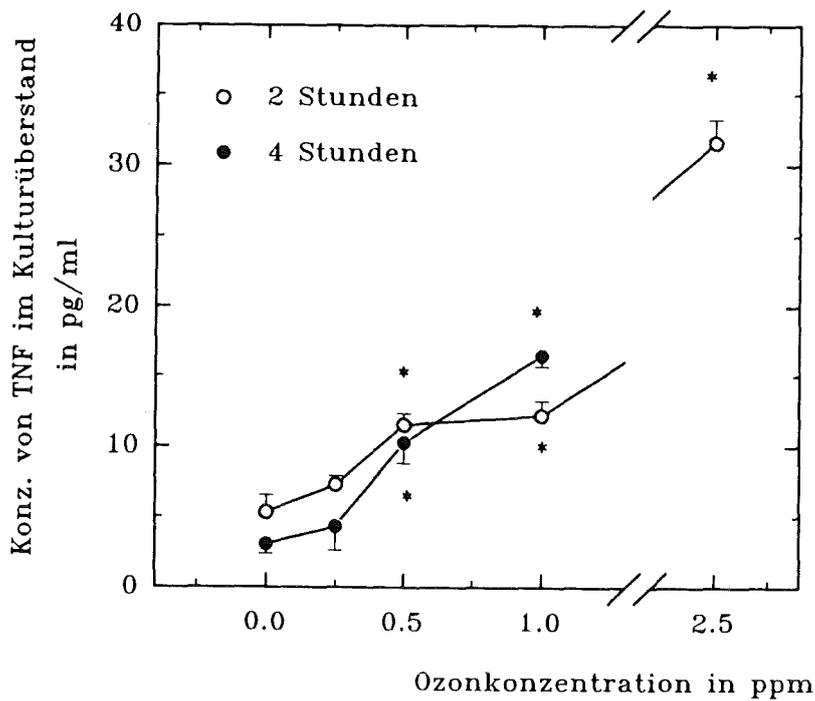


Abb. 14: Freisetzung von TNF nach Ozonexposition auf der Wippe in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration bei RAM.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=6$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

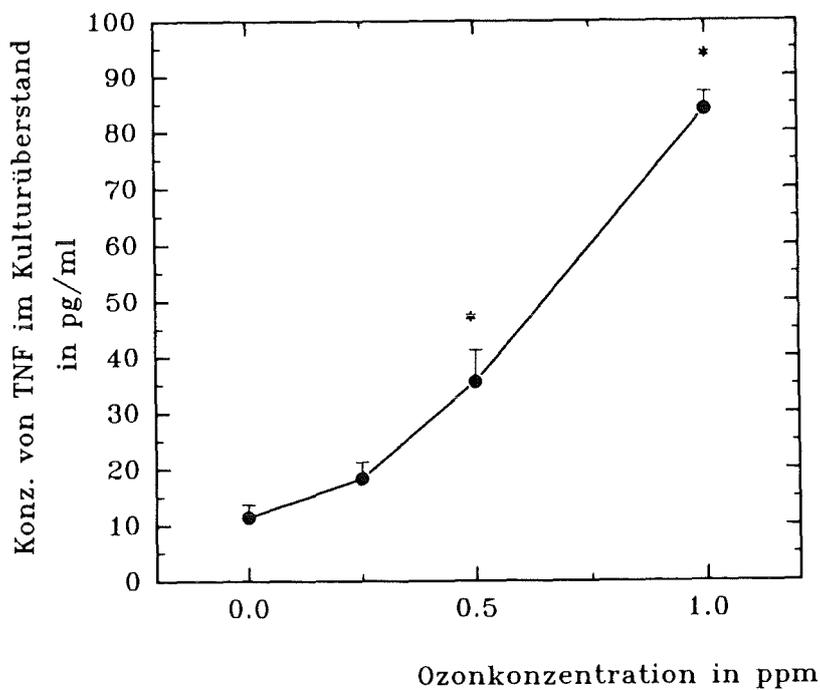


Abb. 15: Freisetzung von TNF nach vierstündiger Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Konzentration bei RAM.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=6$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

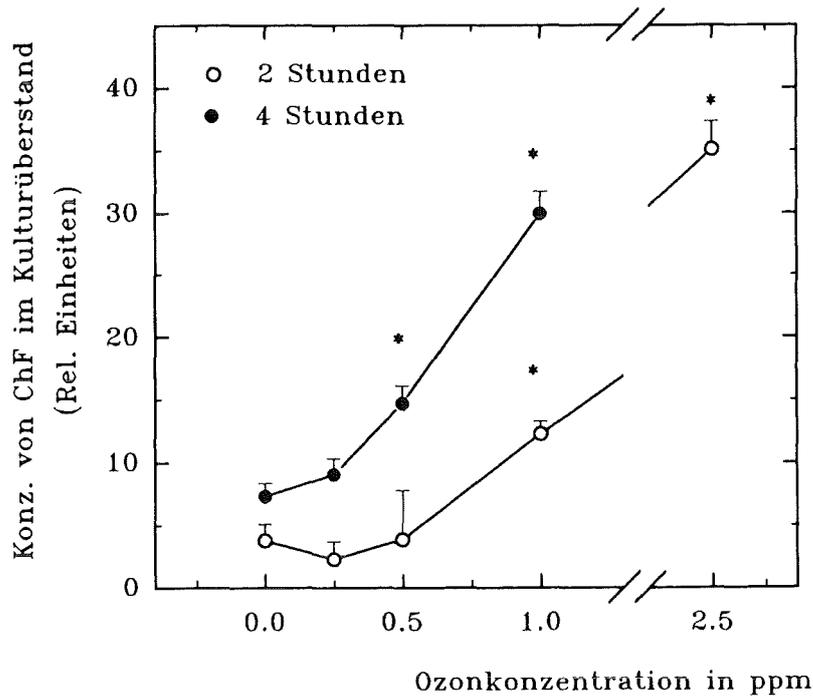


Abb. 16: Freisetzung von ChF für RAM nach Ozonexposition auf der Wippe in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=6$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

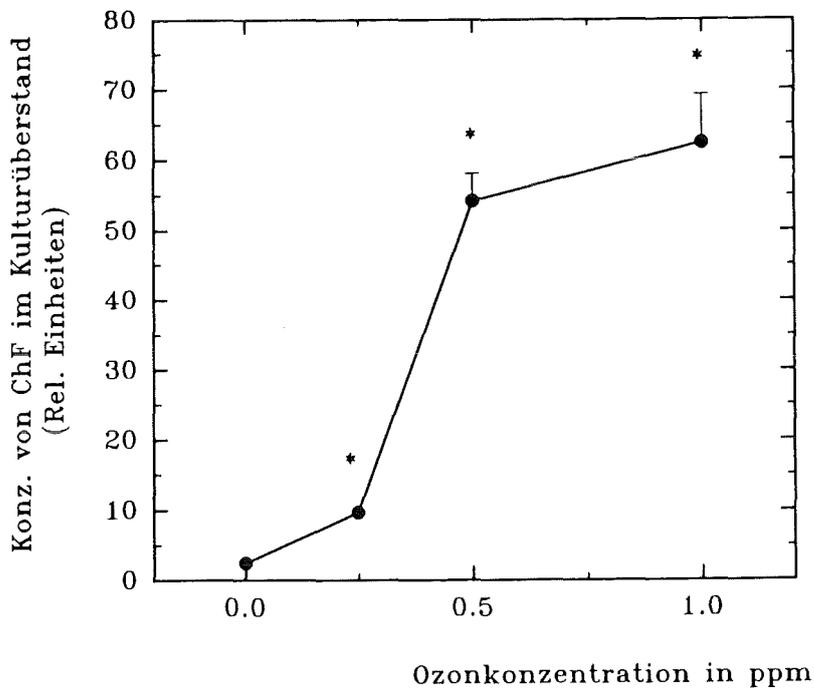


Abb. 17: Freisetzung von ChF für RAM nach vierstündiger Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Konzentration.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=6$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

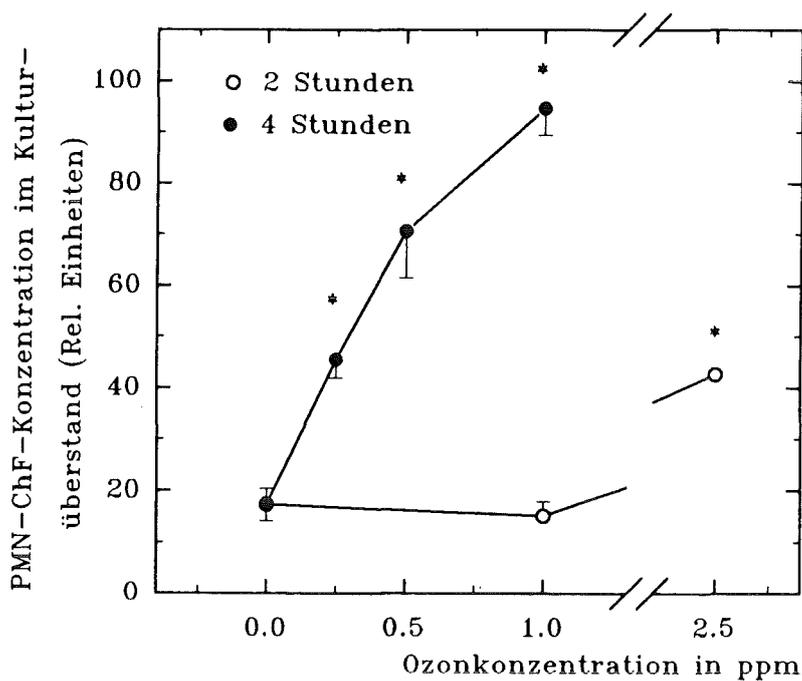


Abb. 18: Freisetzung von ChF für PMN nach Ozonexposition auf der Wippe in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration bei RAM.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=4$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

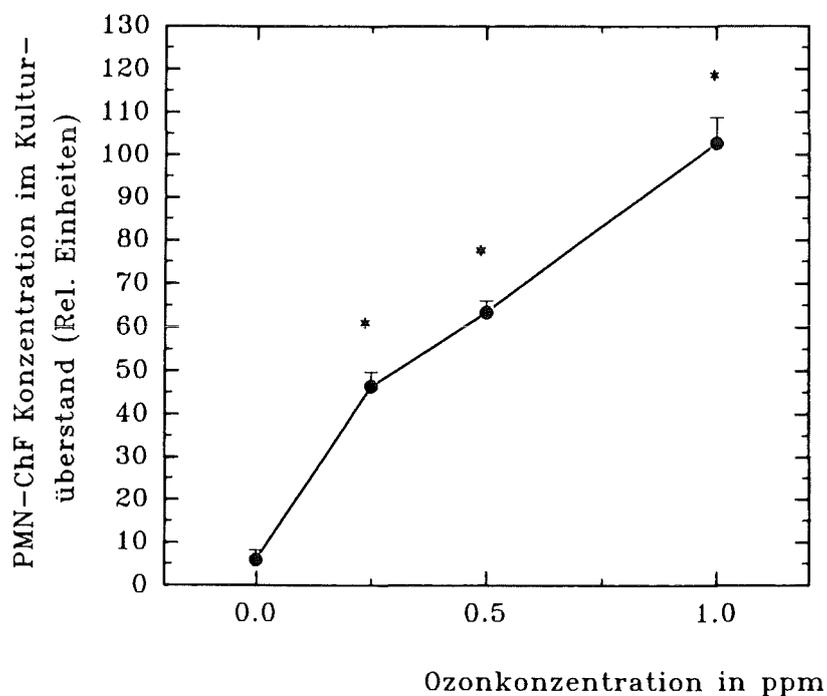


Abb. 19: Freisetzung von ChF für PMN nach vierstündiger Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Konzentration bei RAM.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=6$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

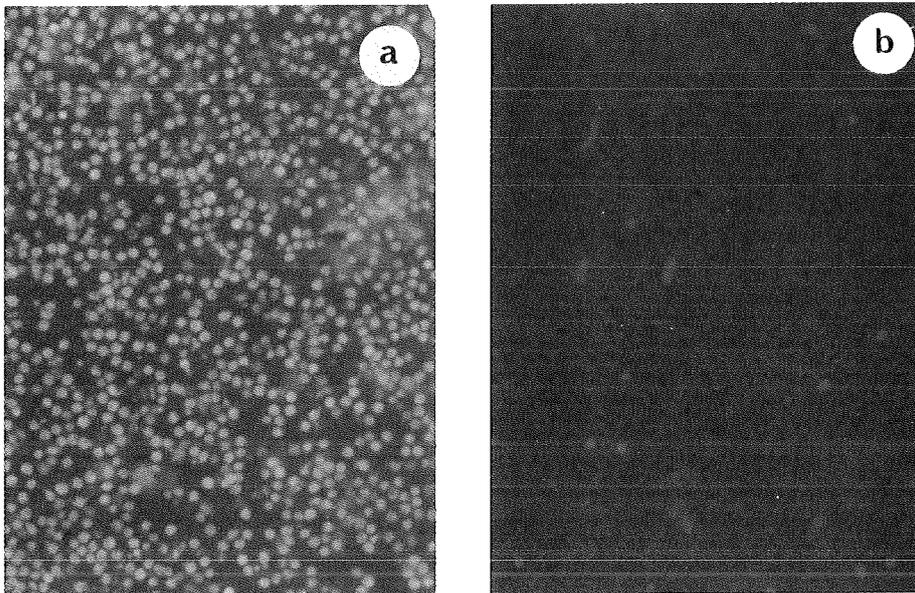


Abb. 20a und b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Makrophagen nach vierstündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer. Die lebenden Zellen fluoreszieren grün-gelblich (a, Anregungswellenlänge: 450-490 nm), die toten fluoreszieren rot (b, Anregungswellenlänge: 530-560 nm). Vergrößerung: x 150

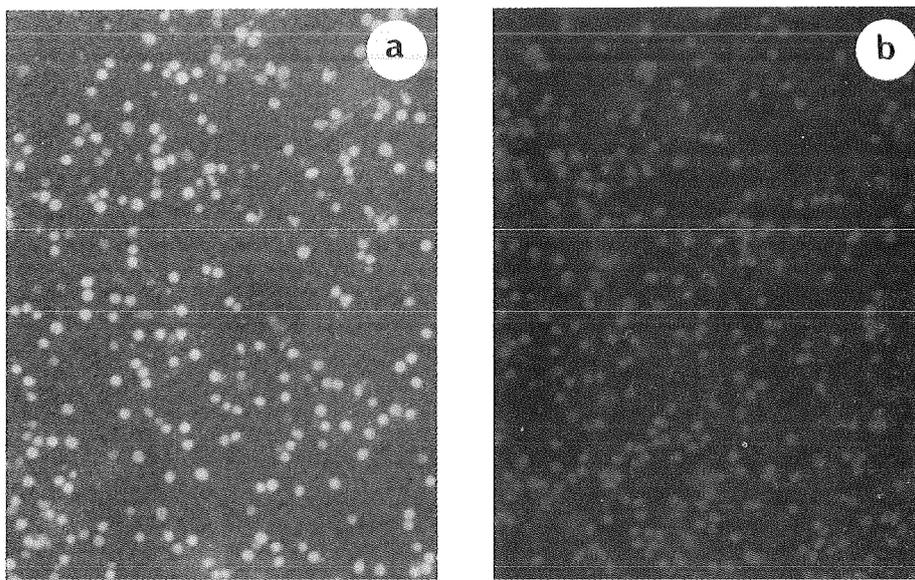


Abb. 21a und b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Makrophagen nach vierstündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer. Die lebenden Zellen fluoreszieren grün-gelblich (a, Anregungswellenlänge: 450-490 nm), die toten fluoreszieren rot (b, Anregungswellenlänge: 530-560 nm). Vergrößerung: x 150

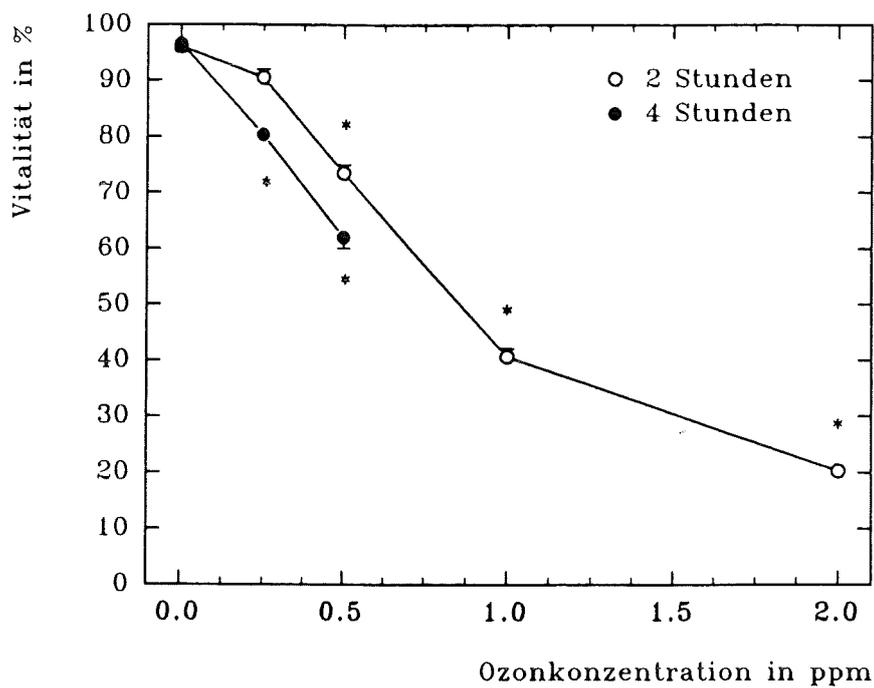


Abb. 22: Vitalität von HL-60 Makrophagen nach Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=4$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

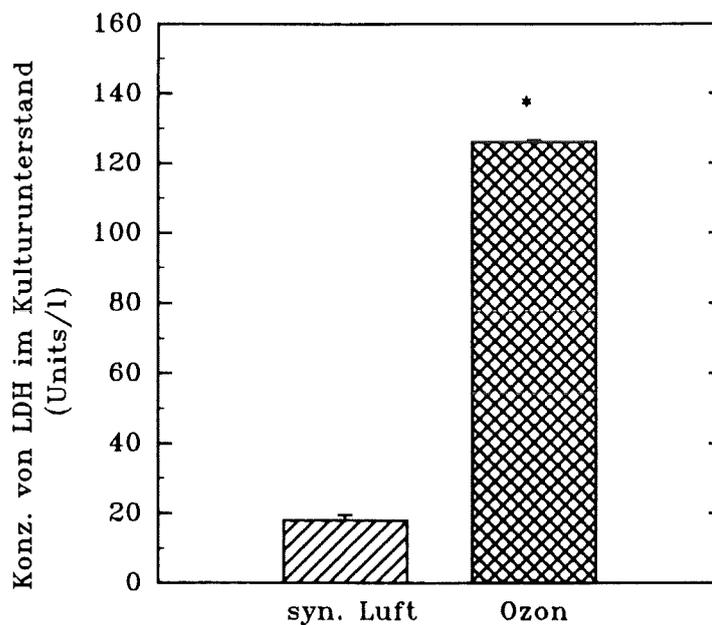


Abb. 23: LDH-Freisetzung von HL-60 Makrophagen während einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer.

Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=4$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

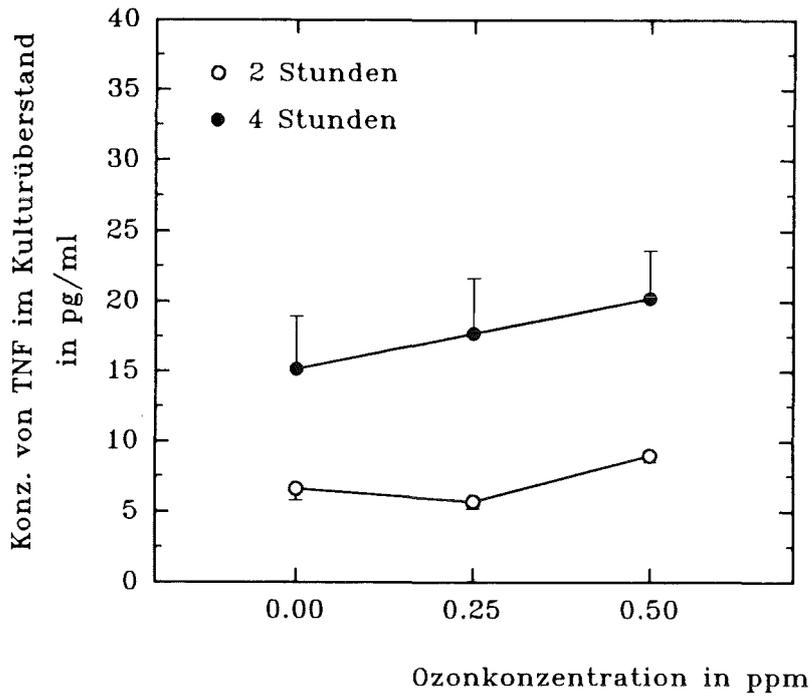


Abb. 24: Freisetzung von TNF nach Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration bei HL-60 Makrophagen
 Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4
 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

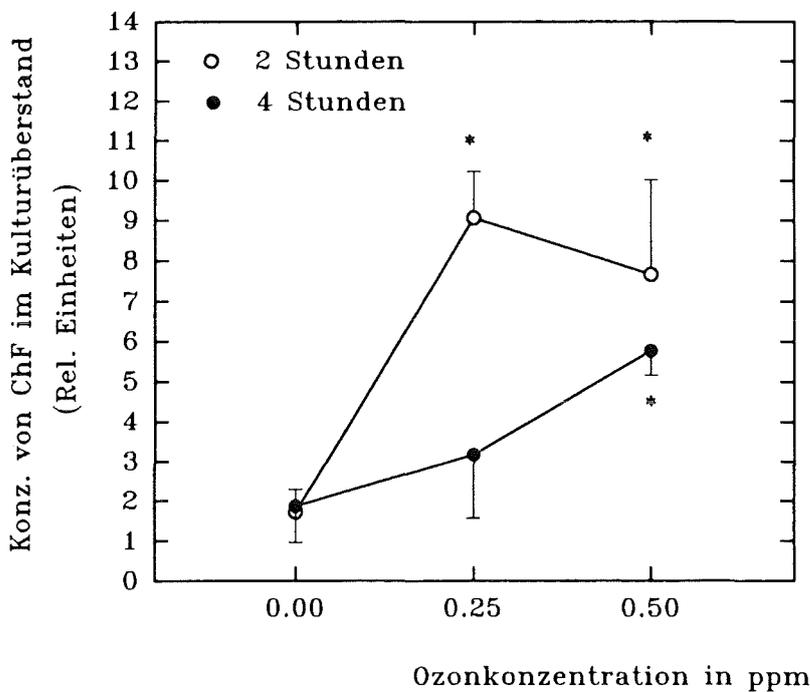


Abb. 25: Freisetzung von ChF für HL-60 Makrophagen nach vierstündiger Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration.
 Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4
 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p < 0.05$

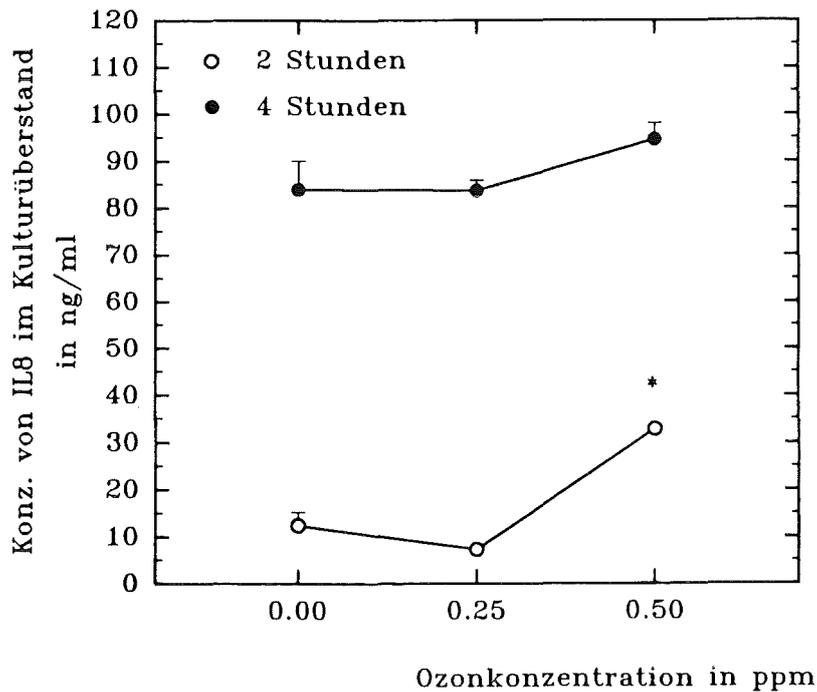


Abb. 26: Freisetzung von IL8 nach Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration bei HL-60 Makrophagen. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=4$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p<0.05$

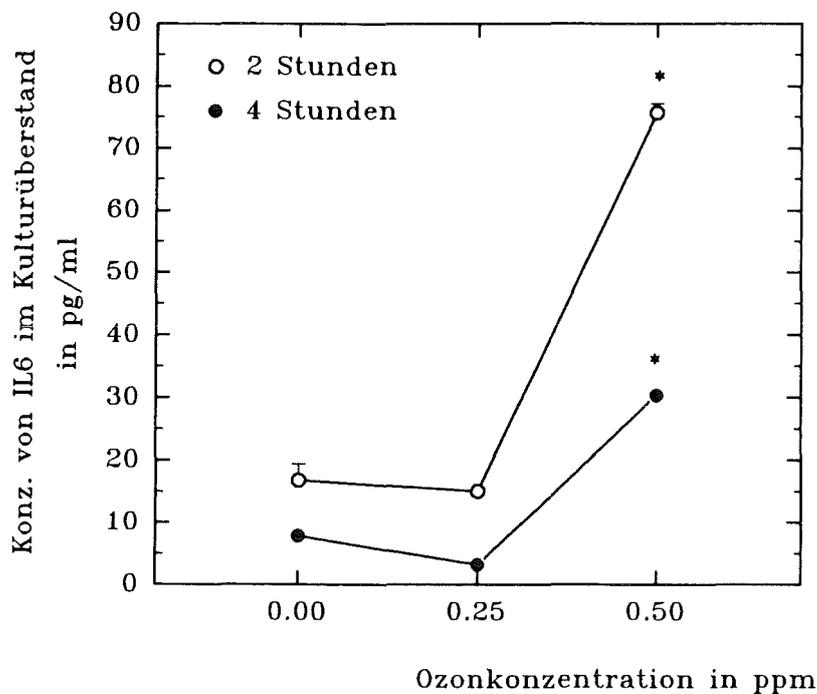


Abb. 27: Freisetzung von IL6 nach Ozonexposition in der Voisin-Kammer in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Ozonkonzentration bei HL-60 Makrophagen. Arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=4$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (0 ppm) für $p<0.05$

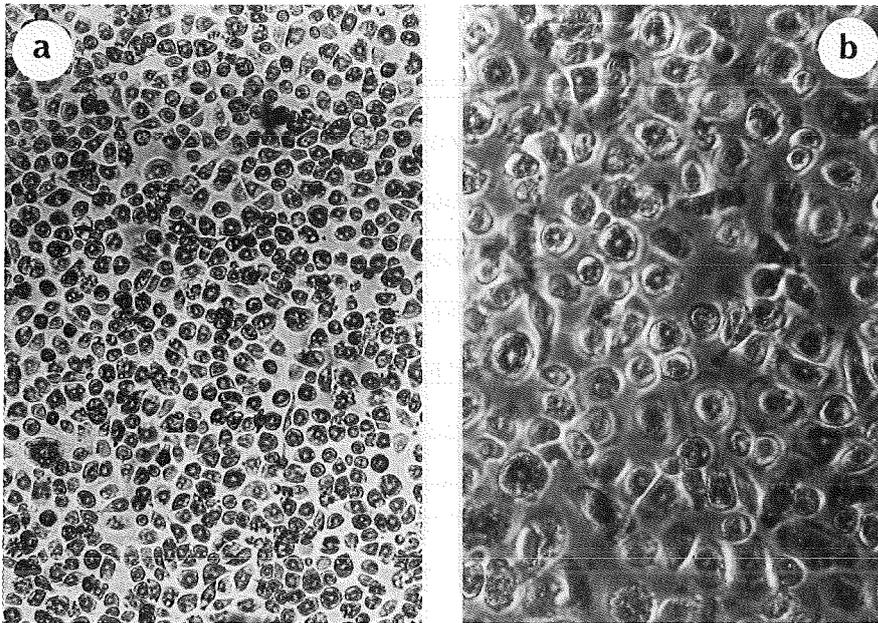


Abb. 28a und b: Lichtmikroskopische Aufnahmen von lebenden HAM nach zweistündiger Exposition mit synthetischer Luft auf der Wippe. Vergrößerung: x 150 (a), x 480 (b)

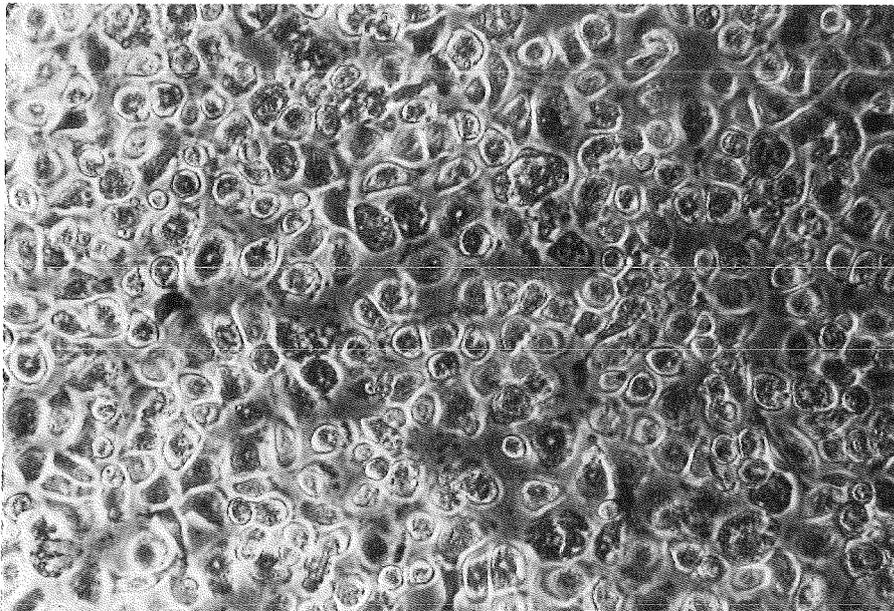


Abb. 29: Lichtmikroskopische Aufnahme von lebenden HAM nach zweistündiger Exposition mit 1 ppm Ozon auf der Wippe. Vergrößerung: x 480

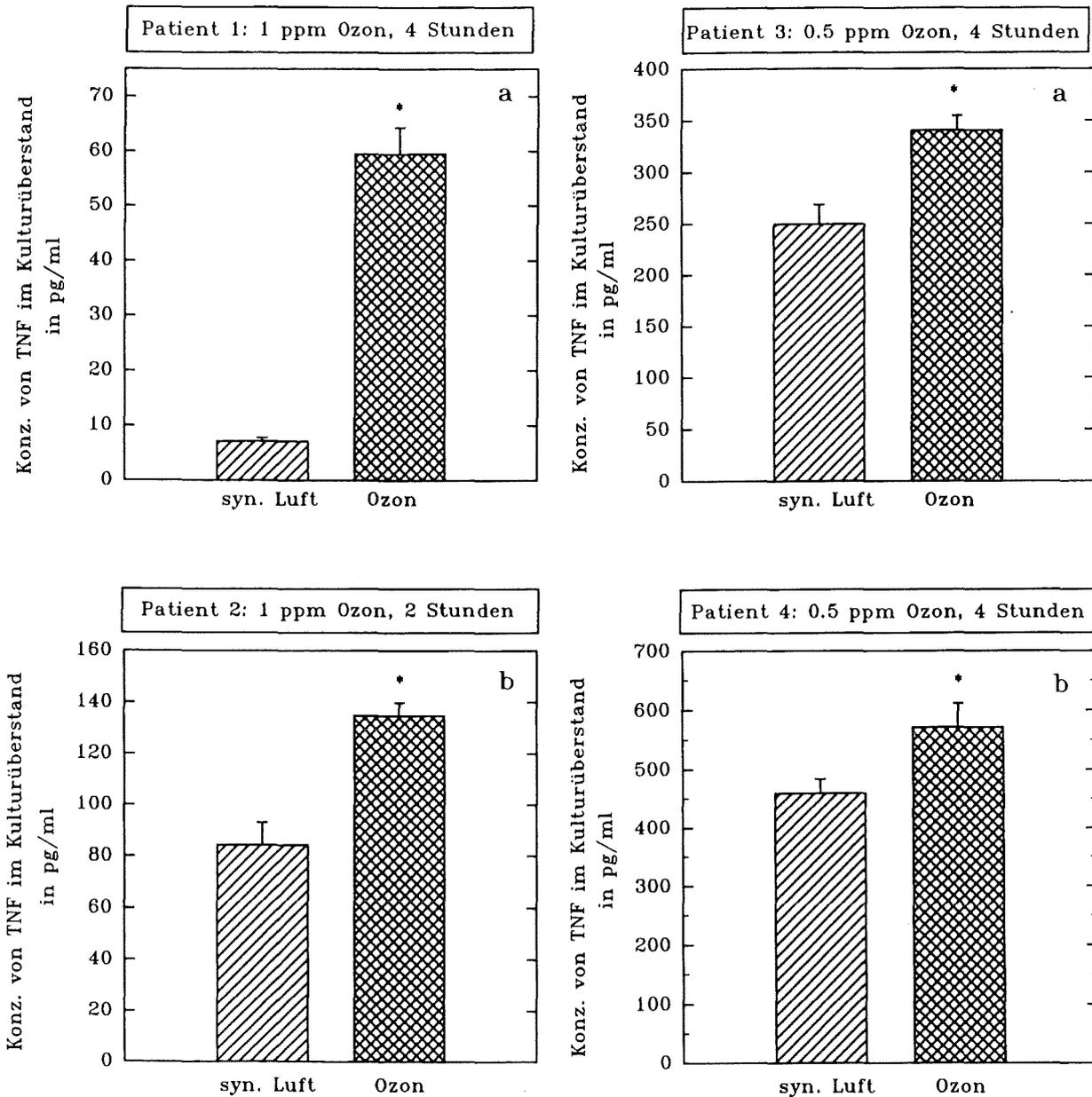


Abb. 30a und b: Einfluß einer zwei- und vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon auf der Wippe auf die TNF-Freisetzung von HAM.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

Abb. 31a und b: Einfluß einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon auf der Wippe auf die TNF-Freisetzung von HAM.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

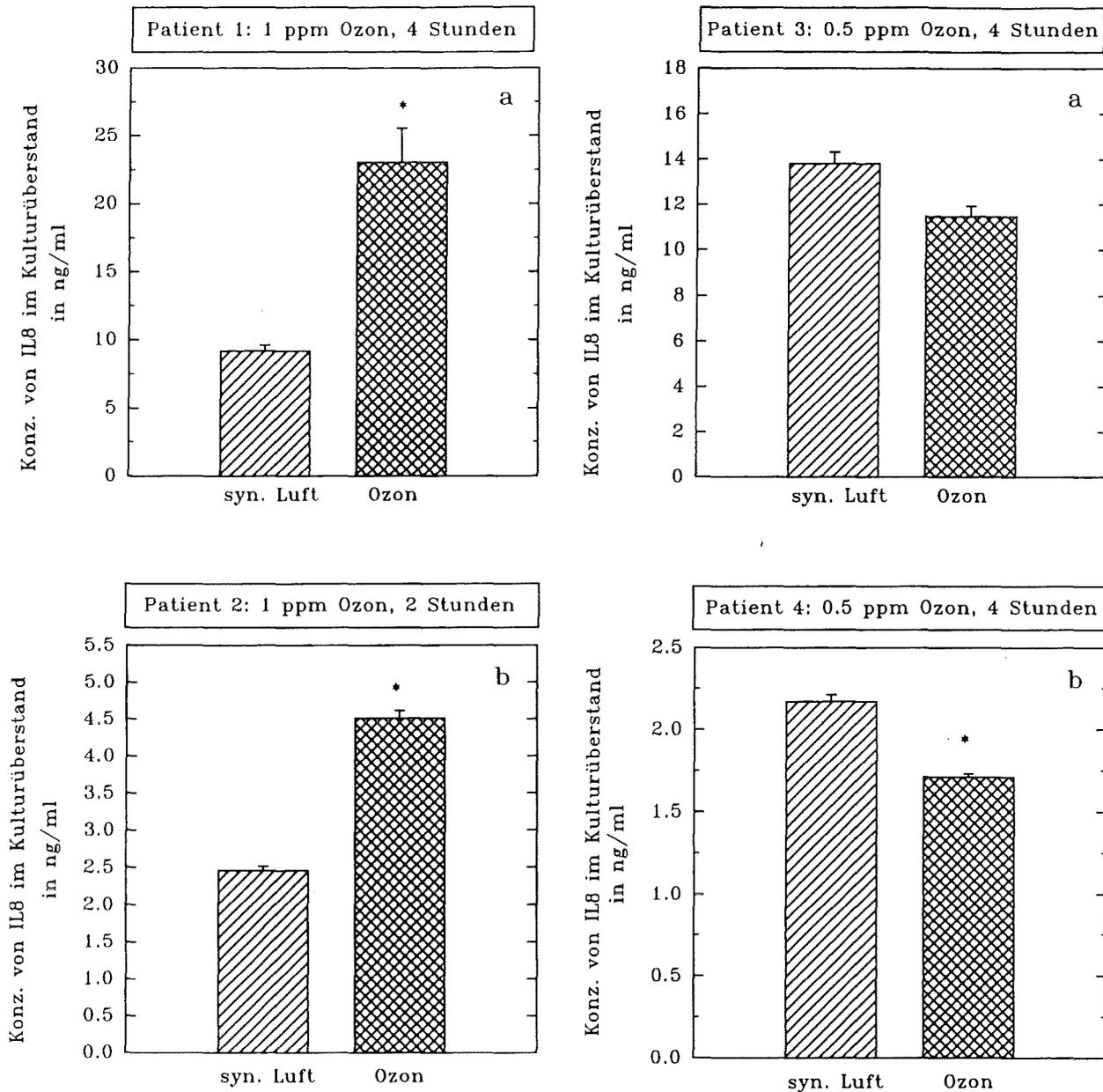


Abb. 32a und b: Einfluß einer zwei- und vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon auf der Wippe auf die IL8-Freisetzung von HAM.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

Abb. 33a und b: Einfluß einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon auf der Wippe auf die IL8-Freisetzung von HAM.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

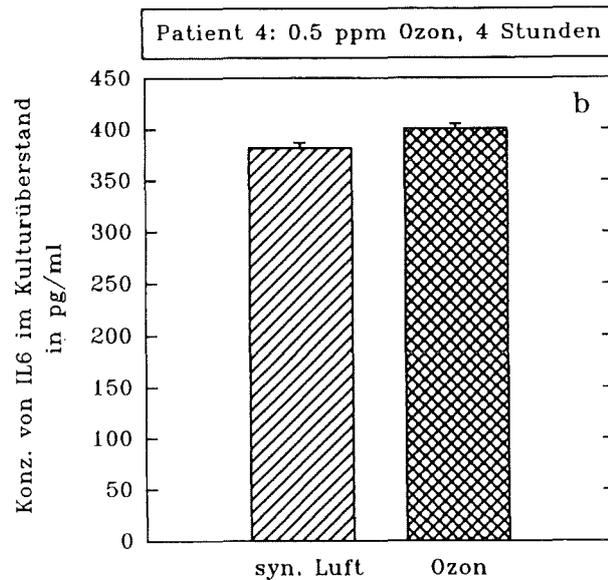
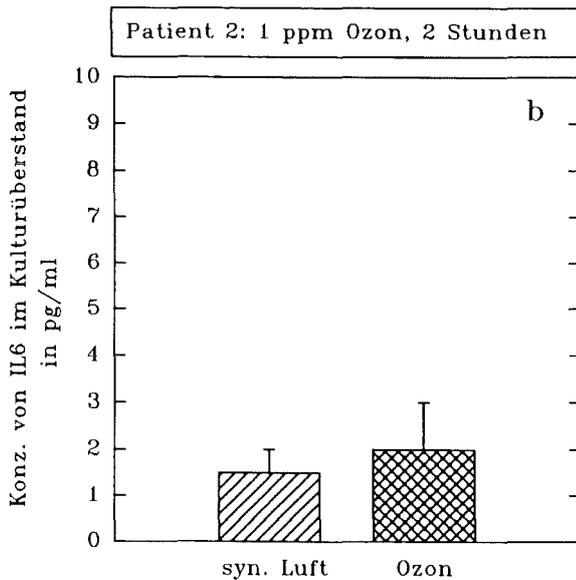
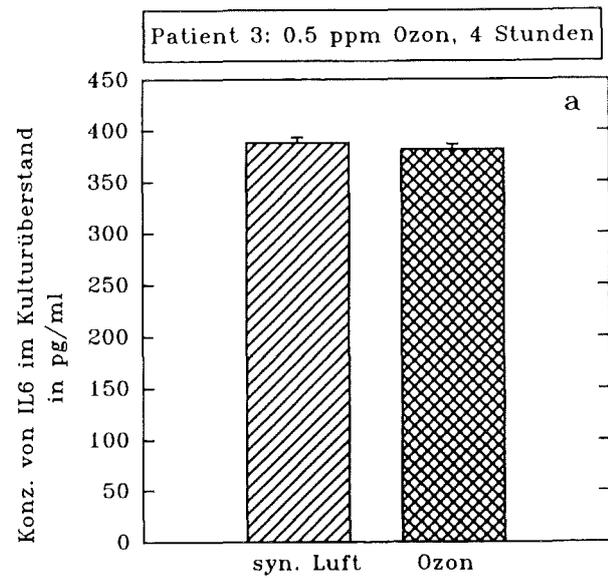
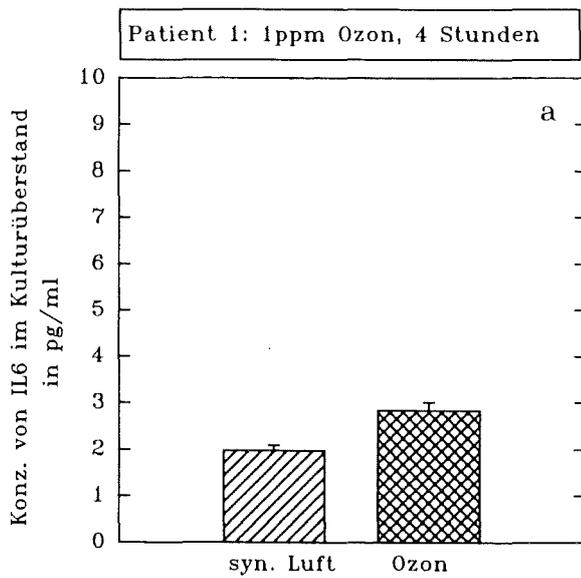


Abb. 34a und b: Einfluß einer zwei- und vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon auf der Wippe auf die IL6-Freisetzung von HAM.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

Abb. 35a und b: Einfluß einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon auf der Wippe auf die IL6-Freisetzung von HAM.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

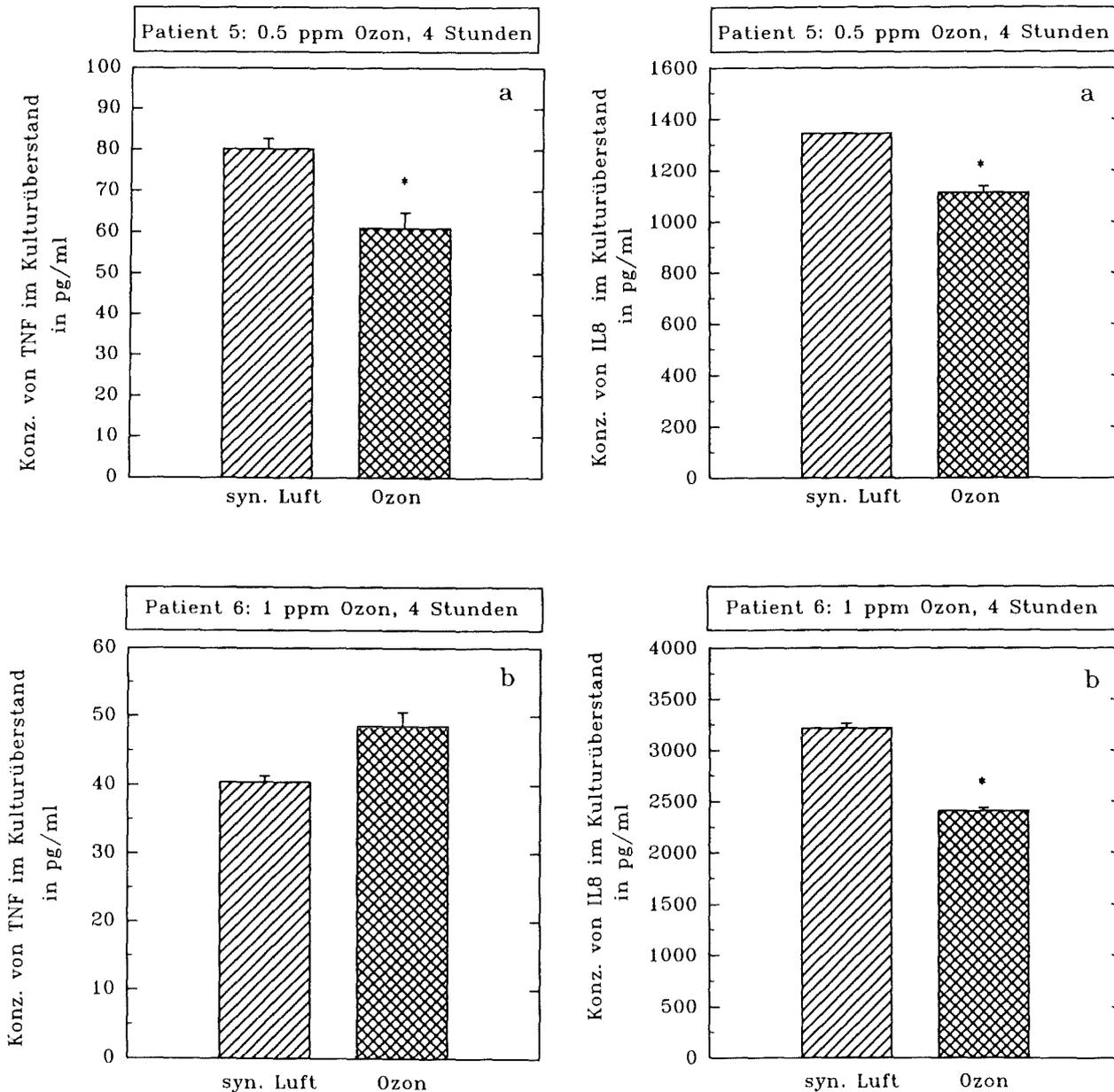


Abb. 36a und b: Einfluß einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 0.5 und 1 ppm Ozon auf der Wippe auf die TNF-Freisetzung von HAM. (Patient 5 und 6: Sarkoidose). Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

Abb. 37a und b: Einfluß einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 0.5 und 1 ppm Ozon auf der Wippe auf die IL8-Freisetzung von HAM. (Patient 5 und 6: Sarkoidose). Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

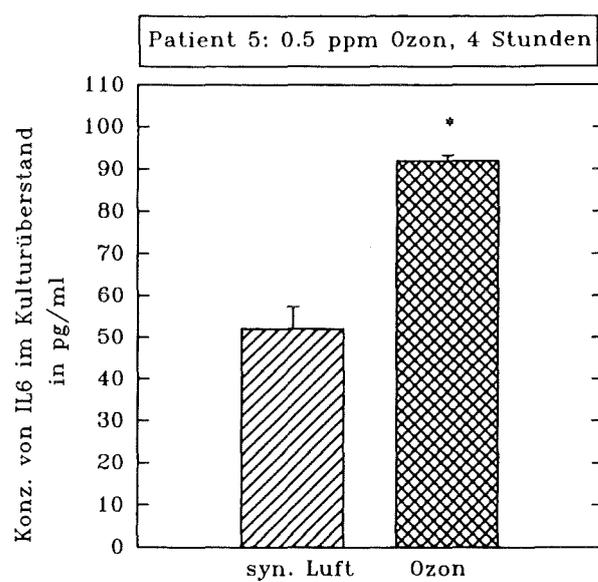


Abb. 38: Einfluß einer vierstündigen Exposition mit synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon auf der Wippe auf die IL6-Freisetzung von HAM. (Patient 5: Sarkoidose). Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

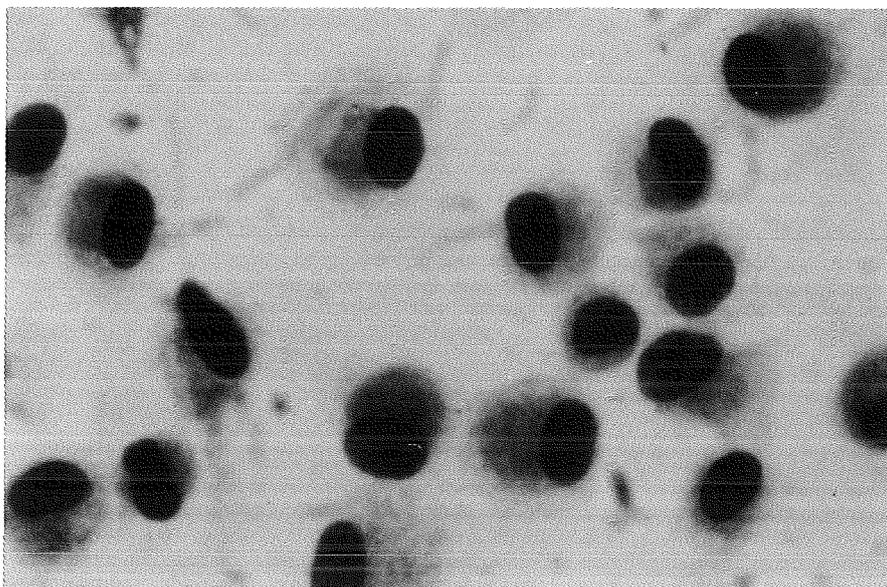


Abb. 39: Lichtmikroskopische Aufnahme (Ölimmersion) von Rinderalveolarmakrophagen (Kontrolle).
Hemacolorfärbung, Vergrößerung: x 1500

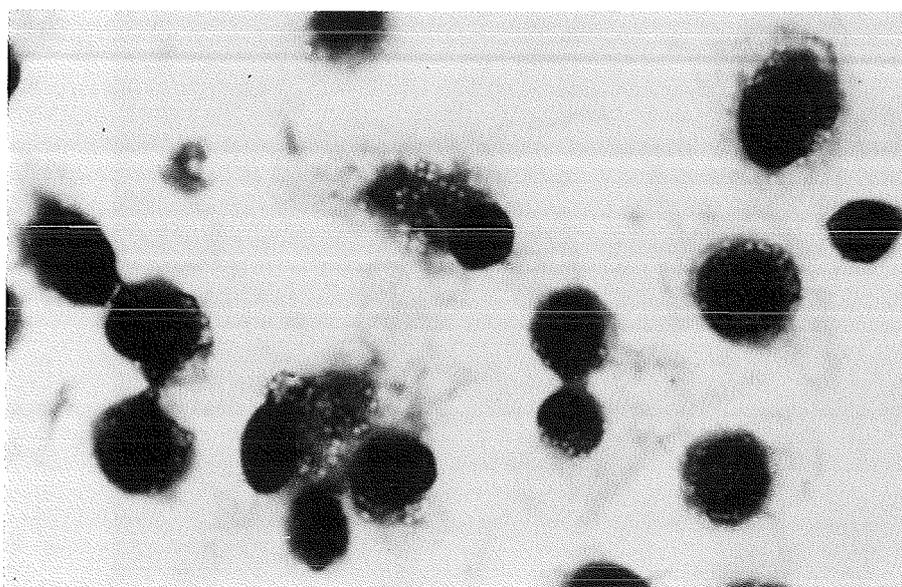


Abb. 40: Lichtmikroskopische Aufnahme (Ölimmersion) von Rinderalveolarmakrophagen nach zweistündiger Inkubation mit Latex-Partikeln.
Hemacolorfärbung, Vergrößerung: x 1500

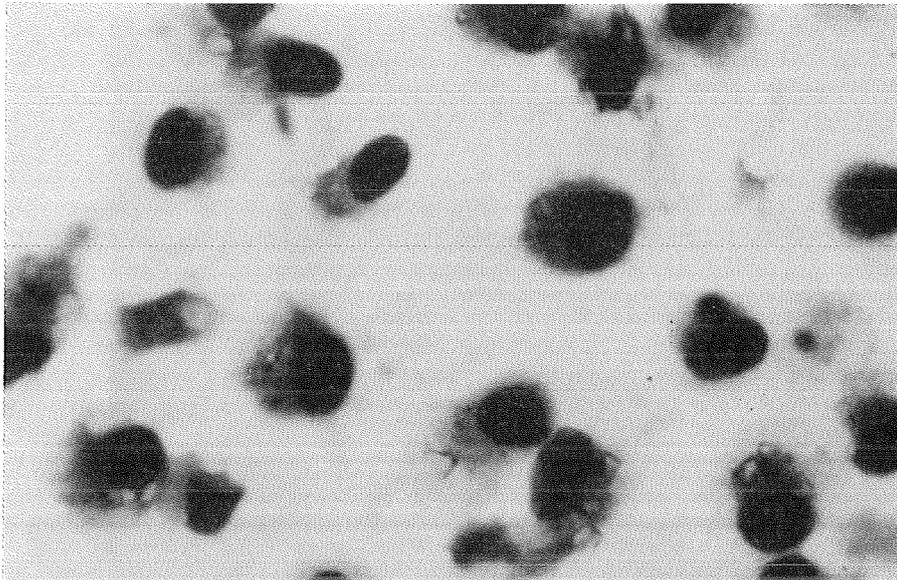


Abb. 41: Lichtmikroskopische Aufnahme (Ölimmersion) von Rinderalveolarmakrophagen nach zweistündiger Inkubation mit Quarz-Partikeln.
Hemacolorfärbung, Vergrößerung: x 1500

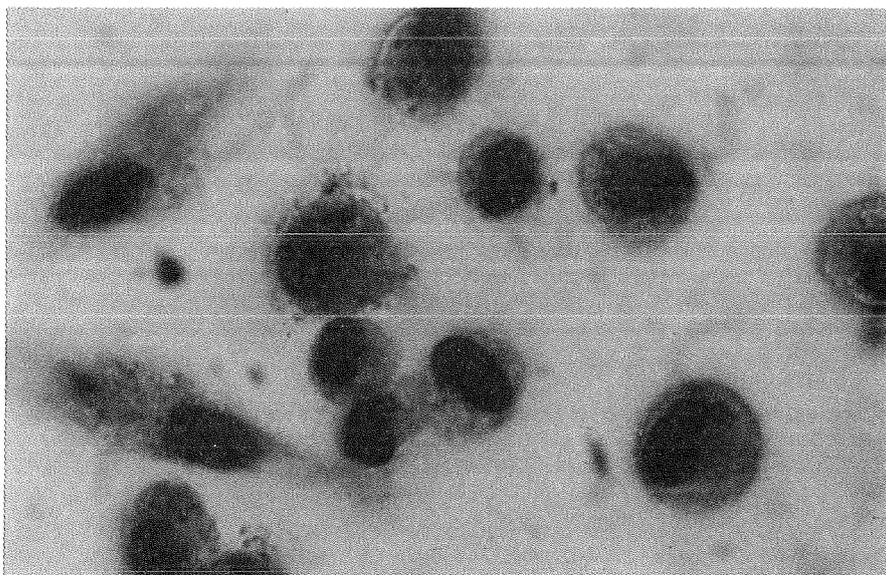


Abb. 42: Lichtmikroskopische Aufnahme (Ölimmersion) von Rinderalveolarmakrophagen nach zweistündiger Inkubation mit Albumin-Partikeln.
Hemacolorfärbung, Vergrößerung: x 1500

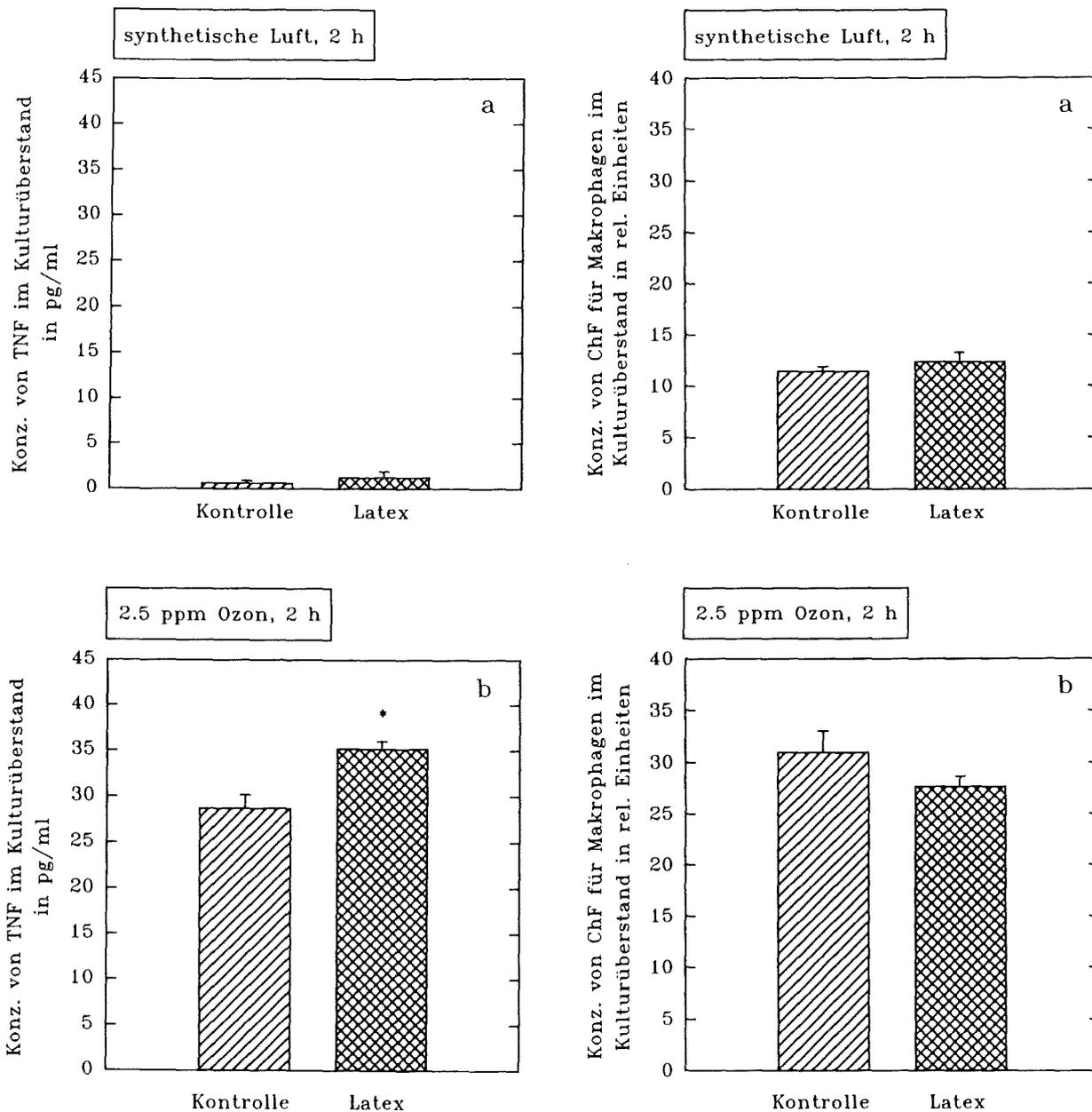


Abb. 43a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 2.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Latex (250 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 44a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 2.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Latex (250 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

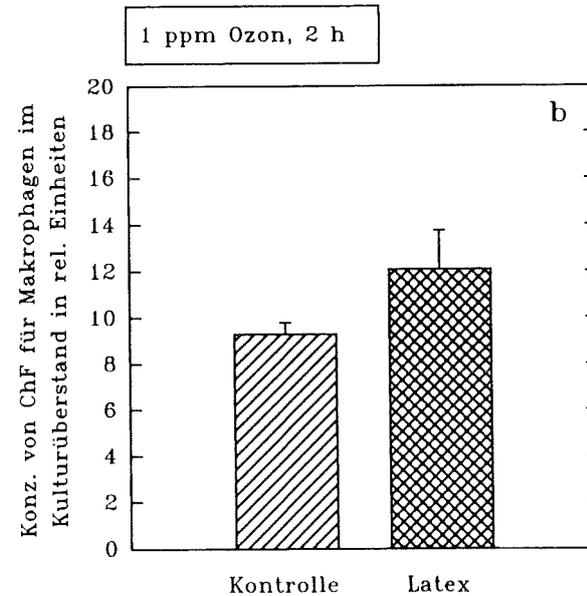
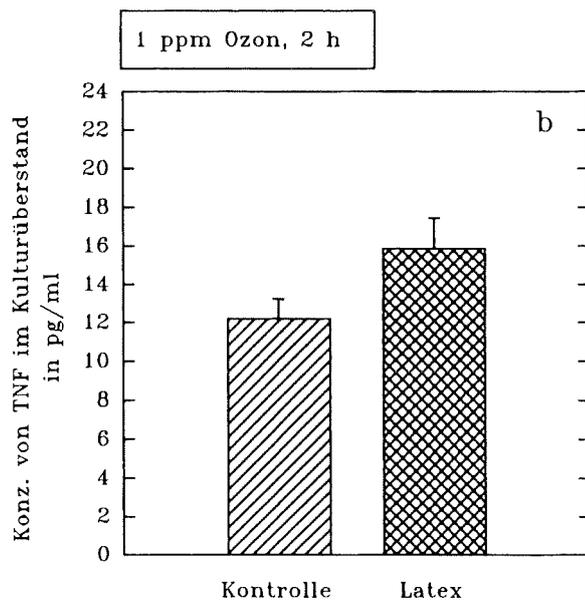
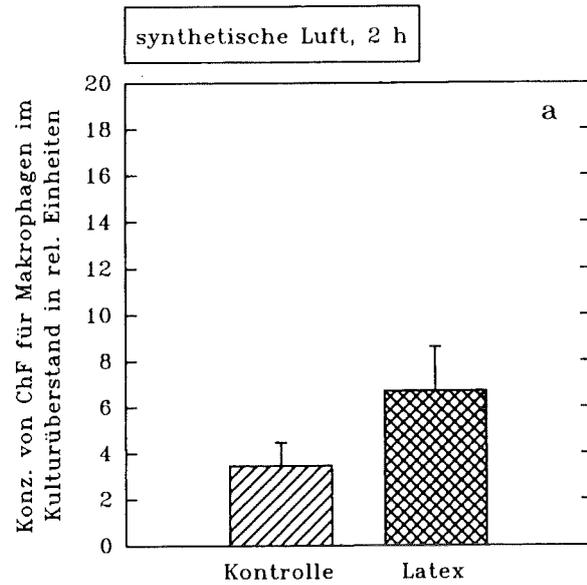
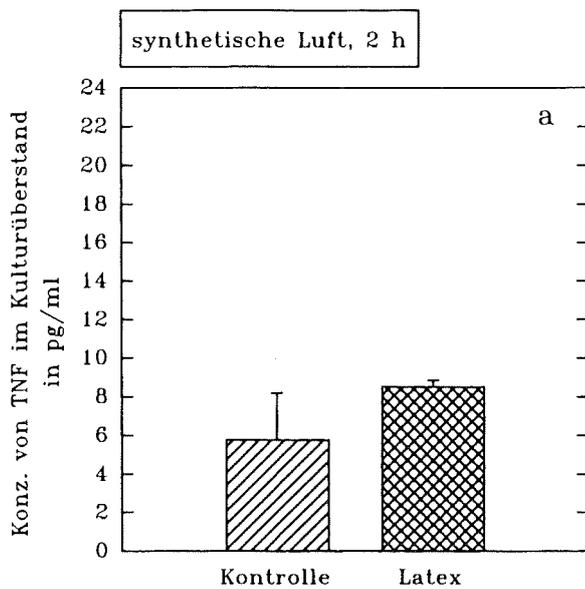


Abb. 45a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Latex (250 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 46a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Latex (250 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

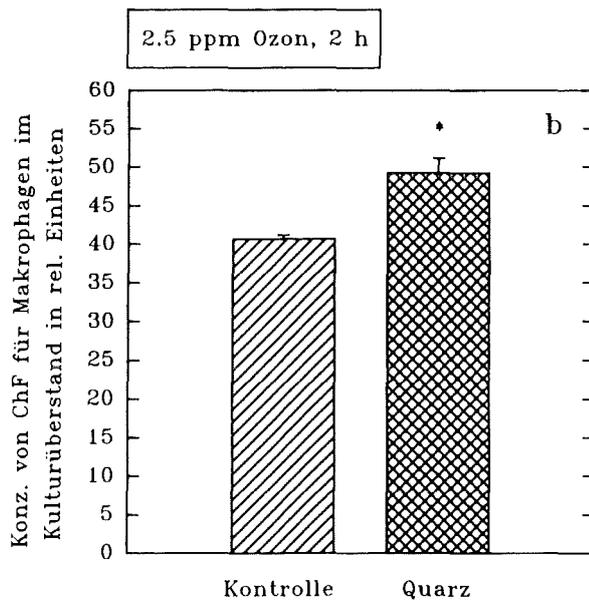
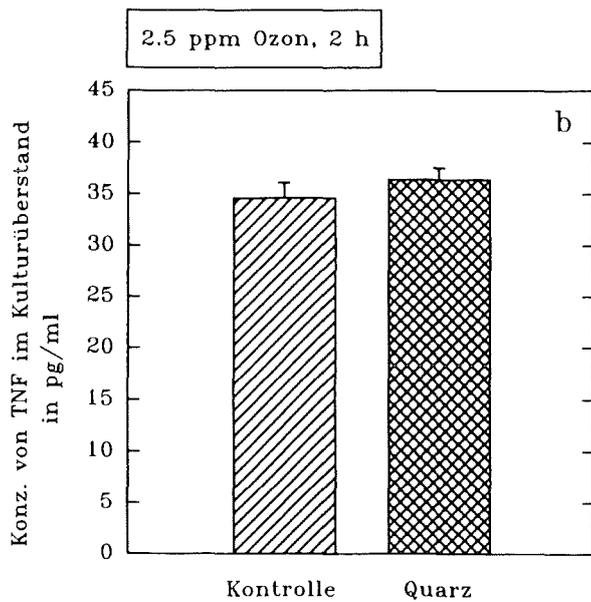
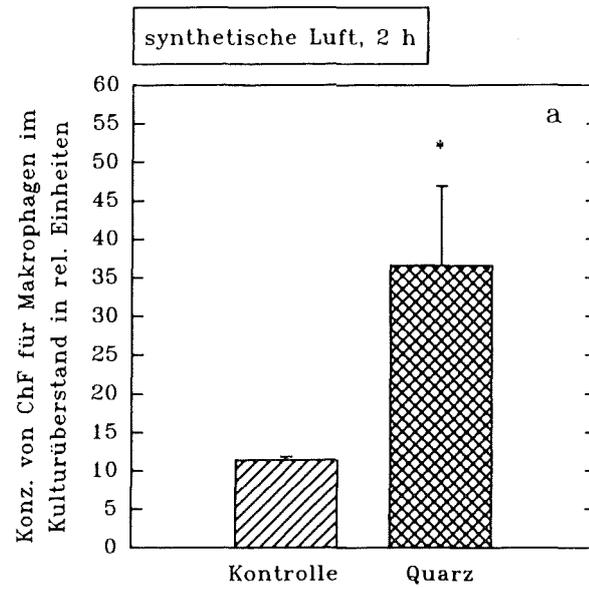
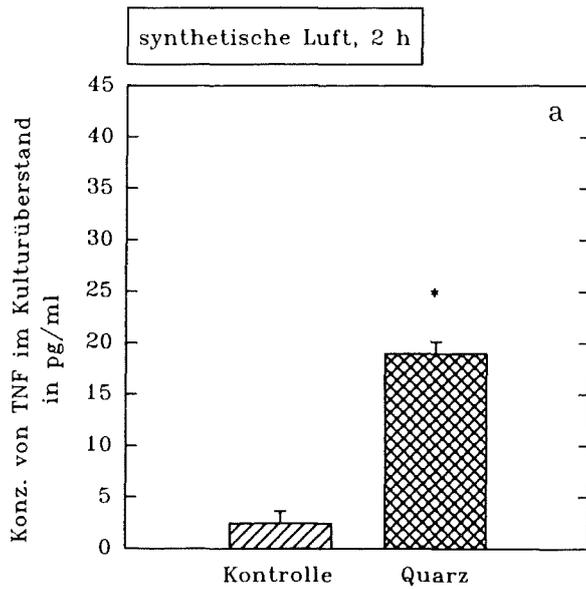


Abb. 47a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 2.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Quarz (50 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 48a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 2.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Quarz (50 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

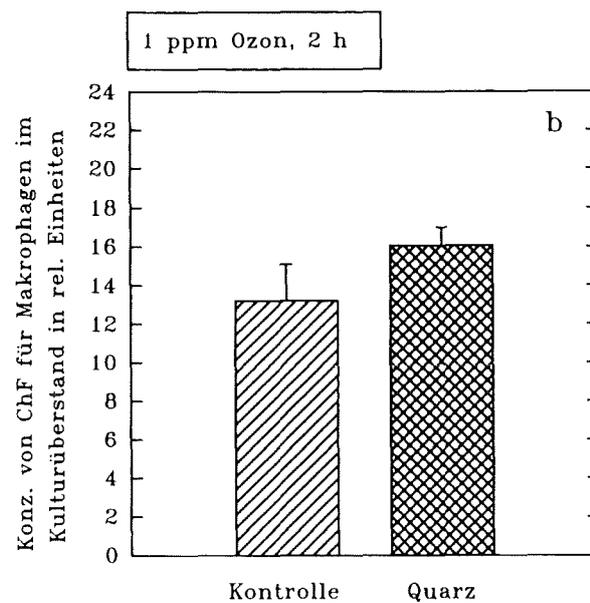
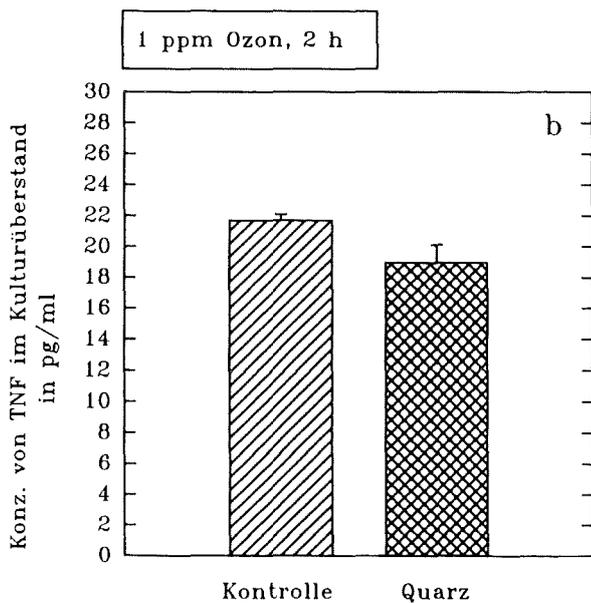
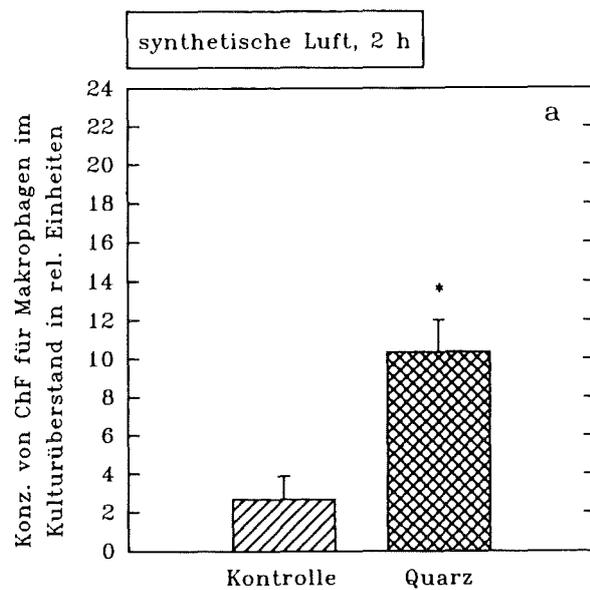
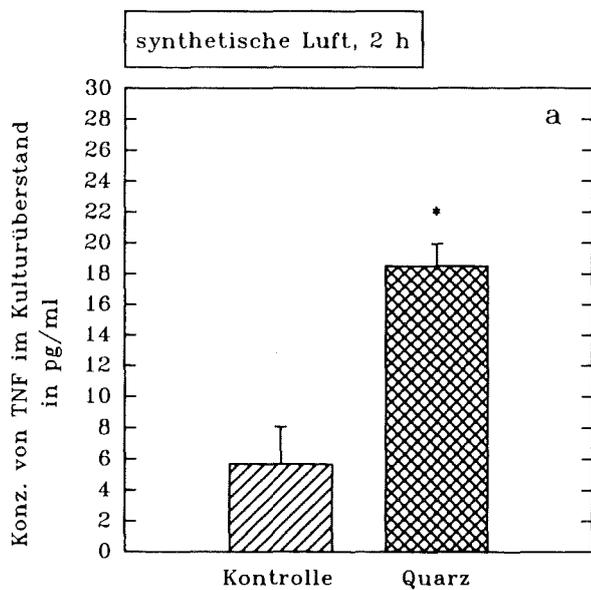


Abb. 49a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Quarz (50 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 50a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Quarz (50 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

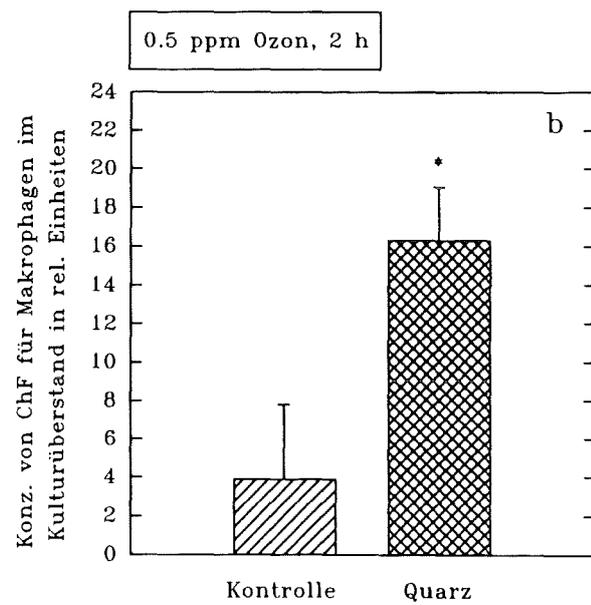
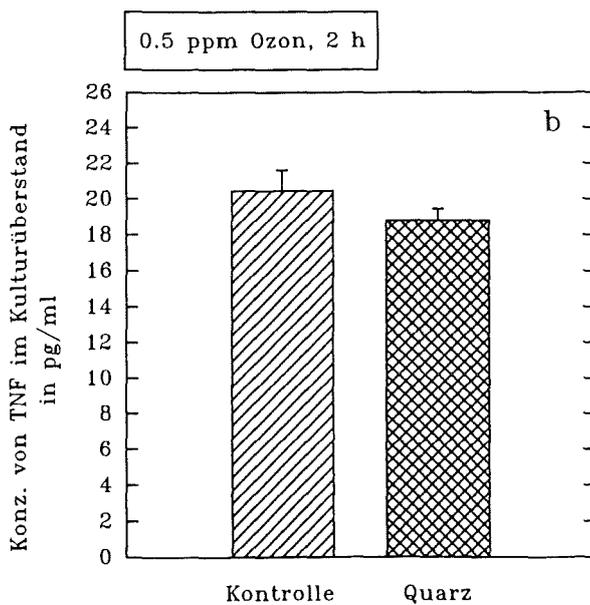
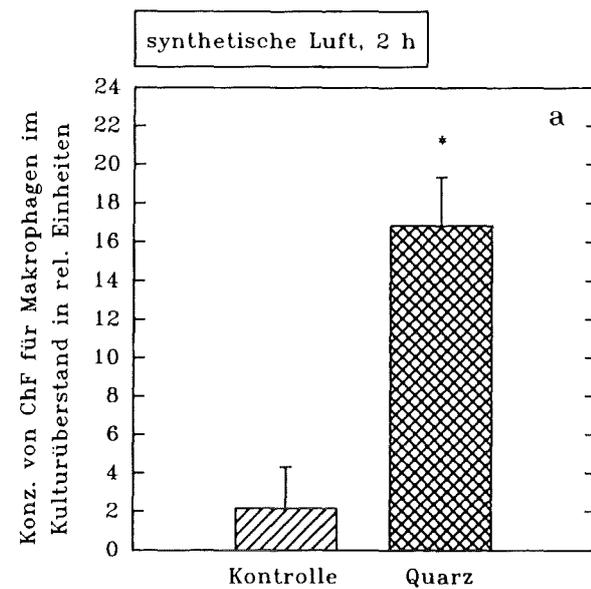
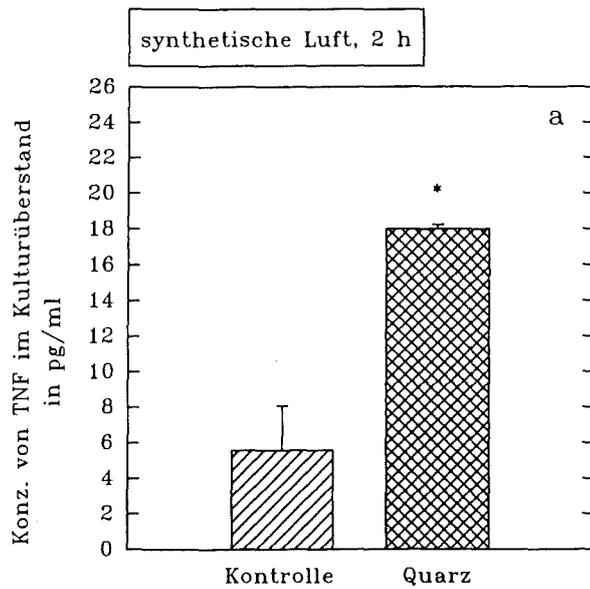


Abb. 51 a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Quarz (50 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 52a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Quarz (50 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

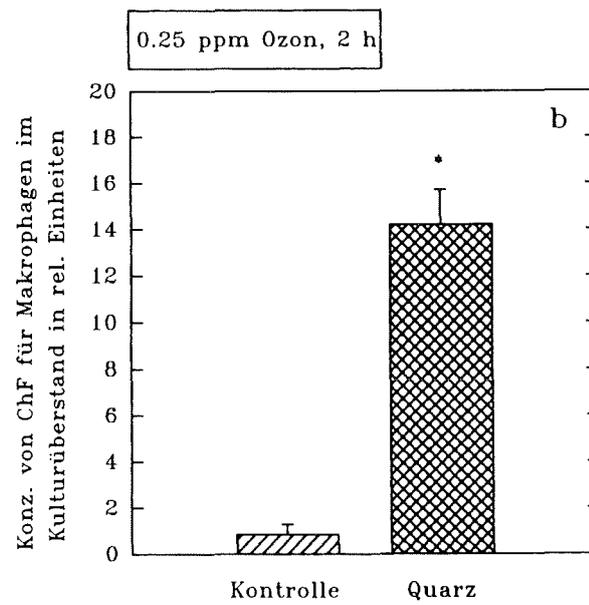
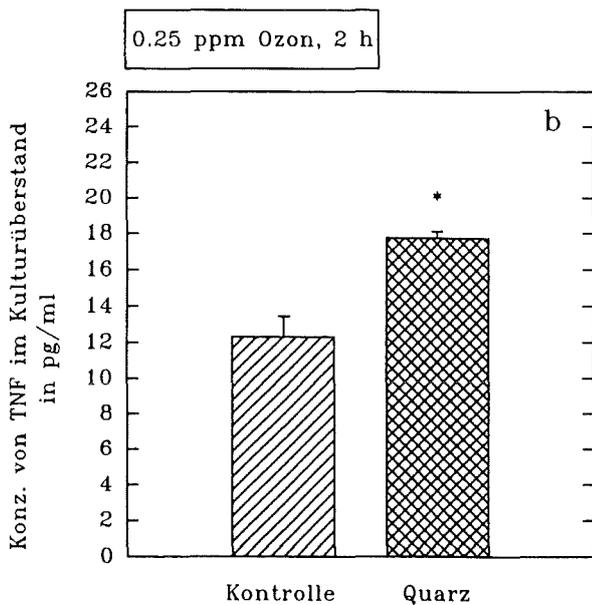
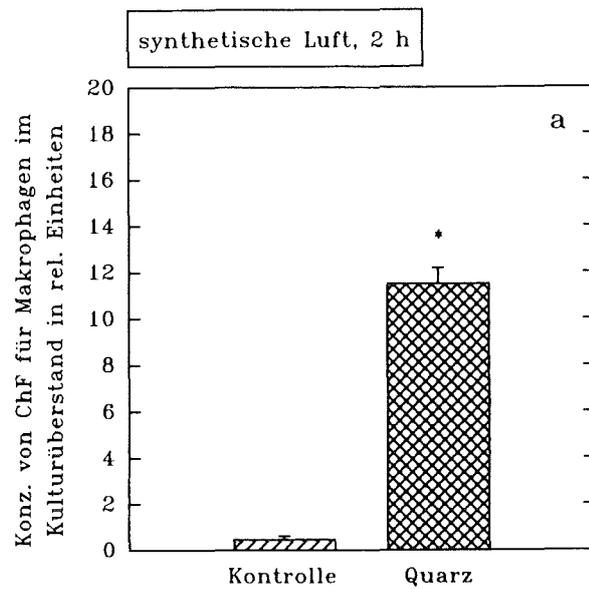
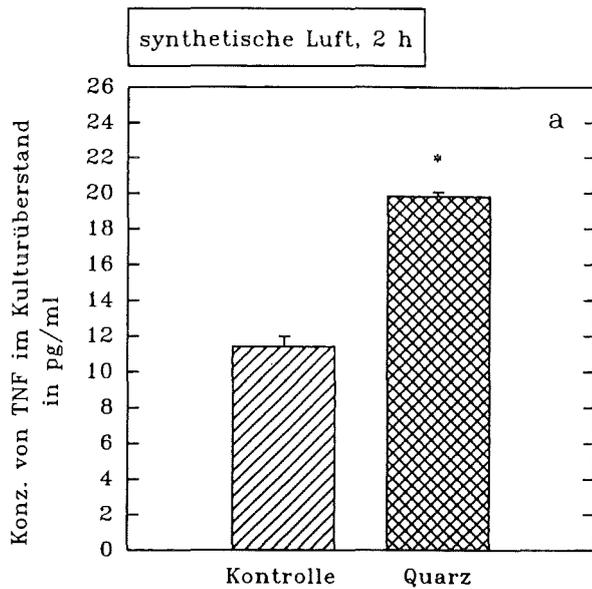


Abb. 53a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.25 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Quarz (50 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

Abb. 54a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.25 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Quarz (50 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

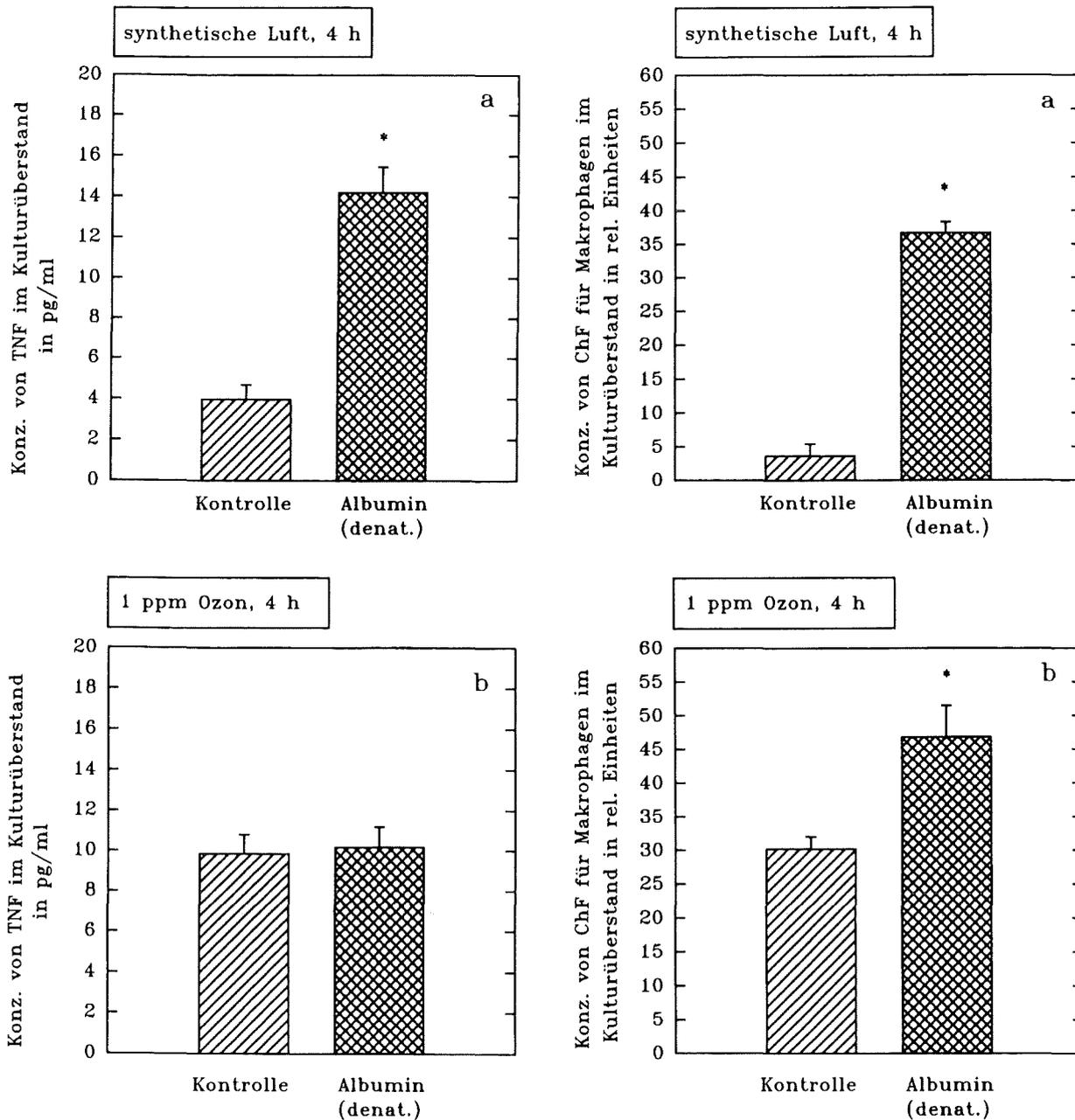


Abb. 55a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit Albumin-Partikeln auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 56a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit Albumin-Partikeln auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

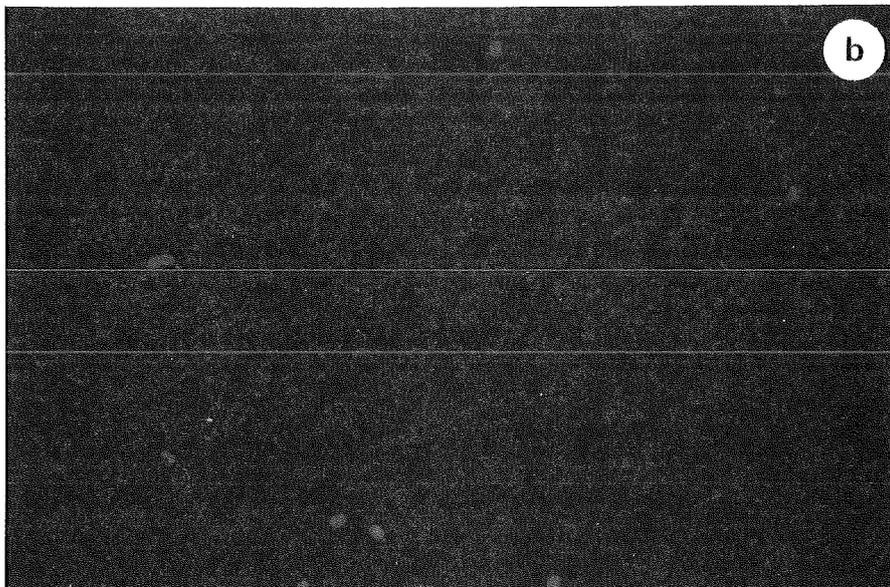
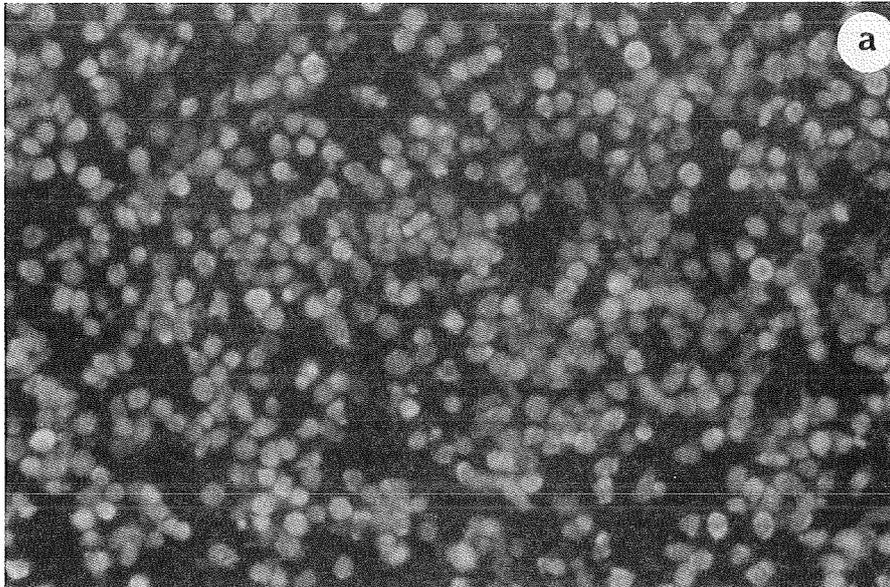


Abb. 57a und b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von RAM nach vierstündiger Exposition mit synthetischer Luft in der Voisin-Kammer. Die lebenden Zellen fluoreszieren grün-gelblich (a, Anregungswellenlänge: 450-490 nm), die toten fluoreszieren rot (b, Anregungswellenlänge: 530-560 nm). Vergrößerung: x 300

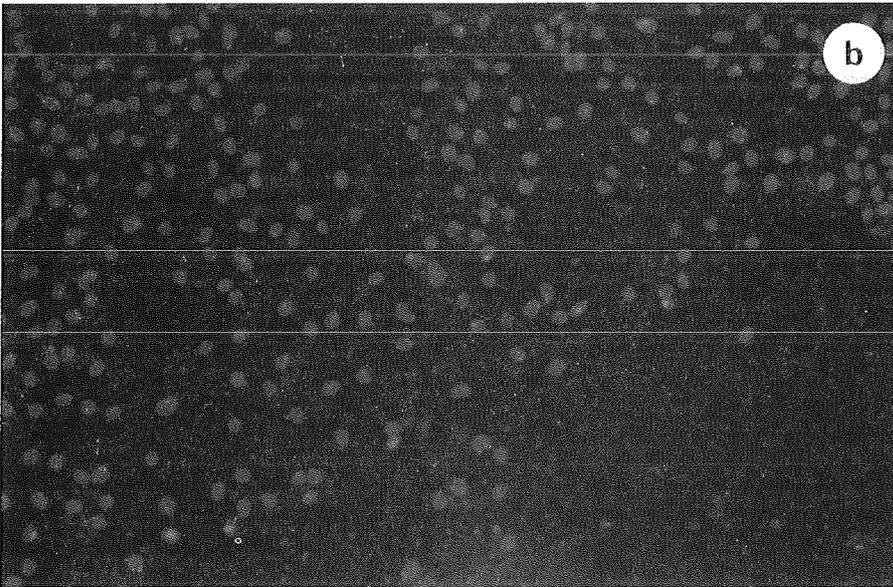
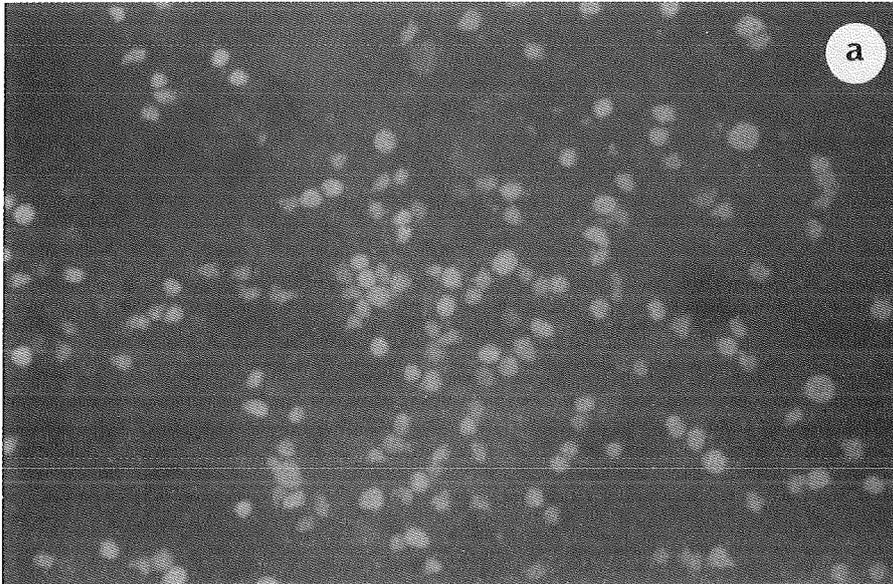


Abb. 58a und b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von RAM nach vierstündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in der Voisin-Kammer. Die lebenden Zellen fluoreszieren grün-gelblich (a, Anregungswellenlänge: 450-490 nm), die toten fluoreszieren rot (b, Anregungswellenlänge: 530-560 nm). Vergrößerung: x 300

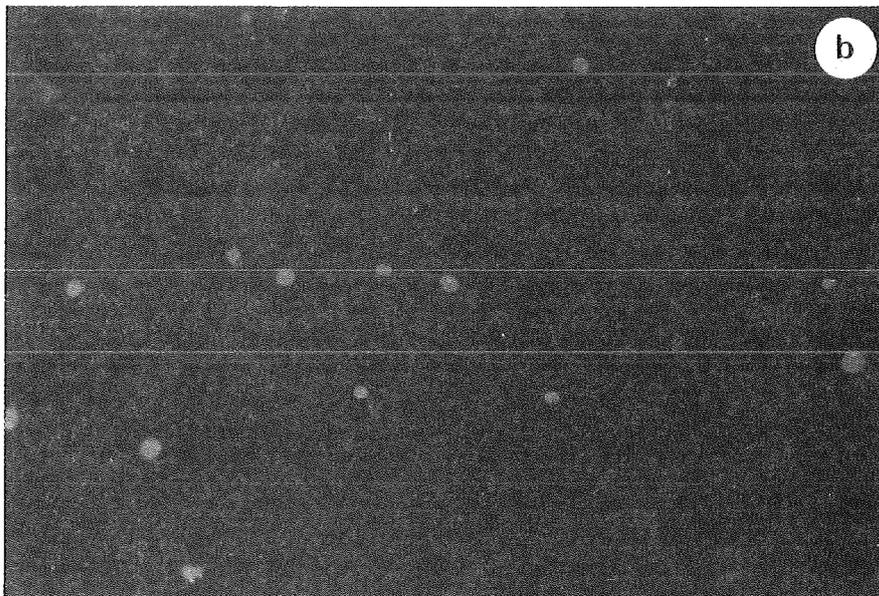
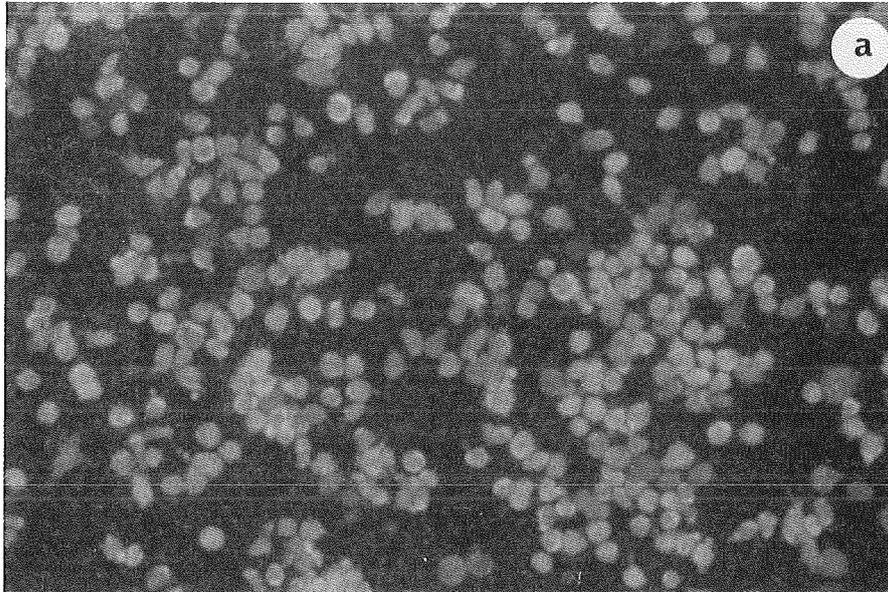


Abb. 59a und b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von RAM nach vierstündiger Exposition mit 0.5 ppm Ozon in Kombination mit DPL (100 µg/ml) in der Voisin-Kammer. Die lebenden Zellen fluoreszieren grün-gelblich (a, Anregungswellenlänge: 450-490 nm), die toten fluoreszieren rot (b, Anregungswellenlänge: 530-560 nm). Vergrößerung: x 300

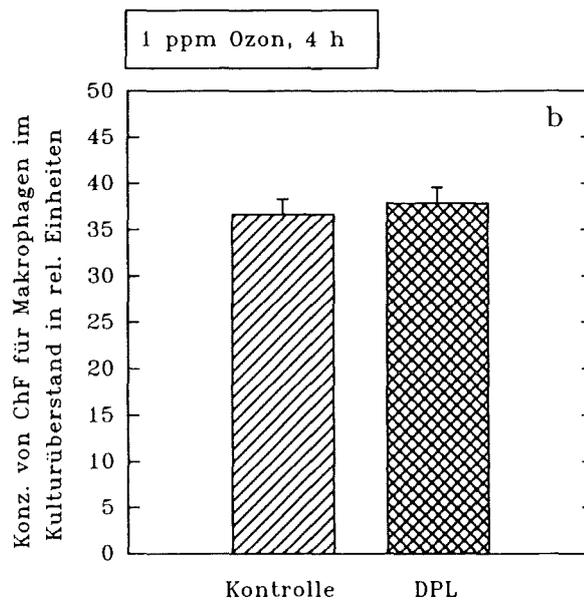
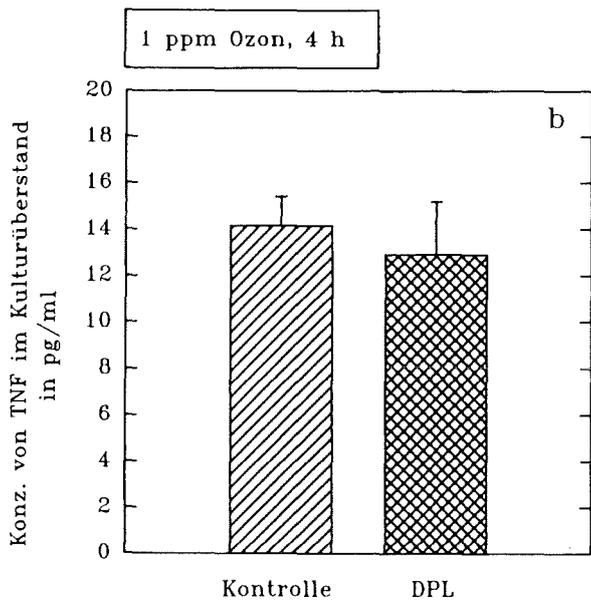
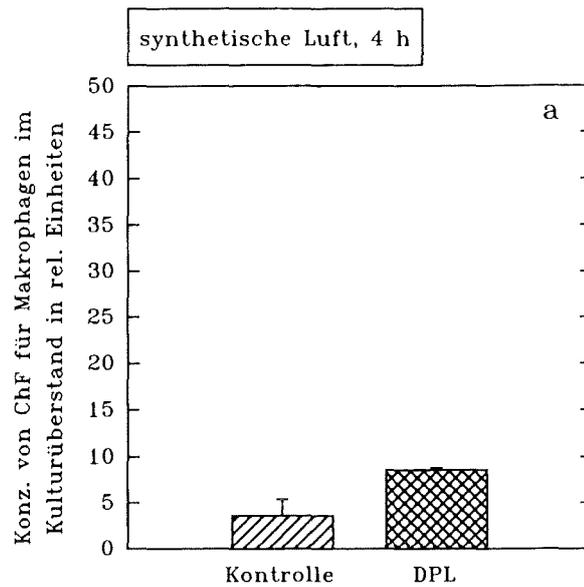
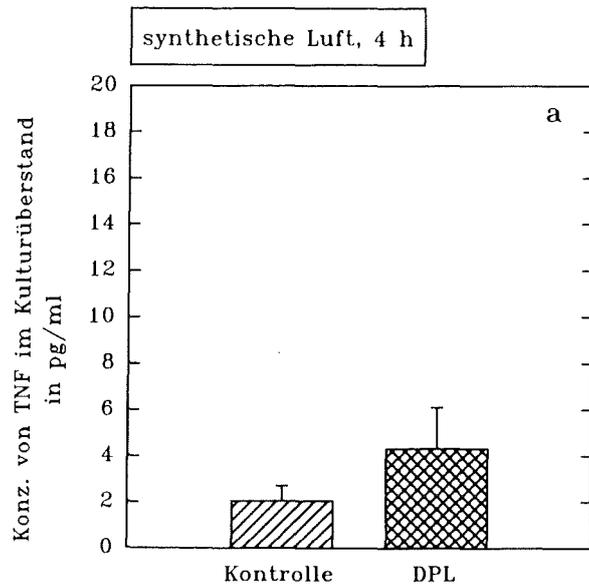


Abb. 60a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 61a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

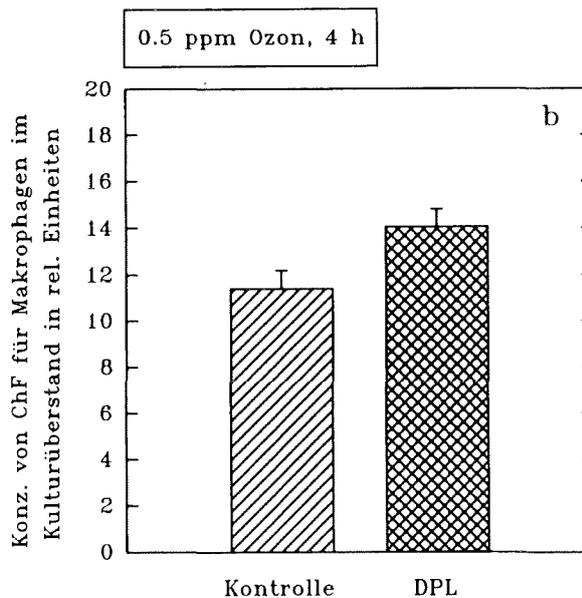
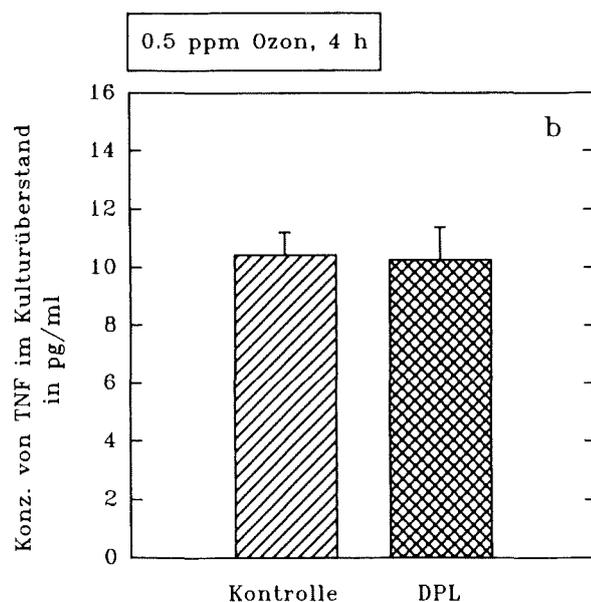
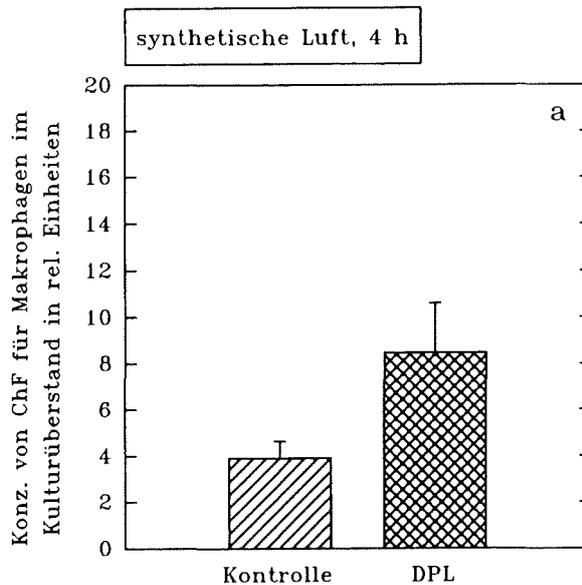
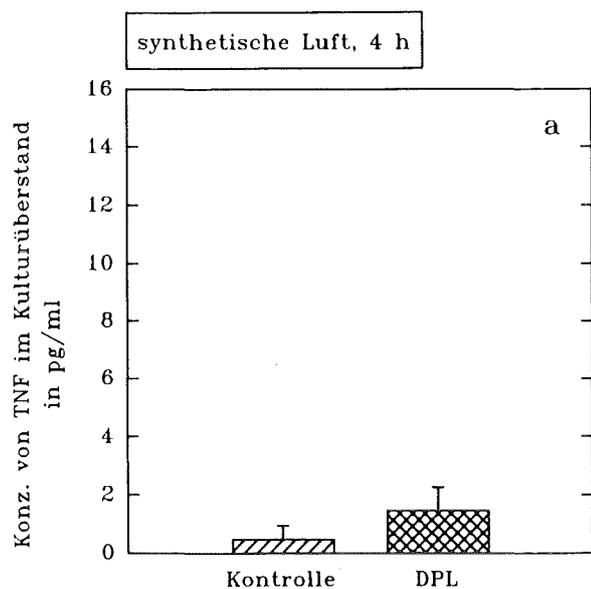


Abb. 62a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

Abb. 63a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Wippe. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

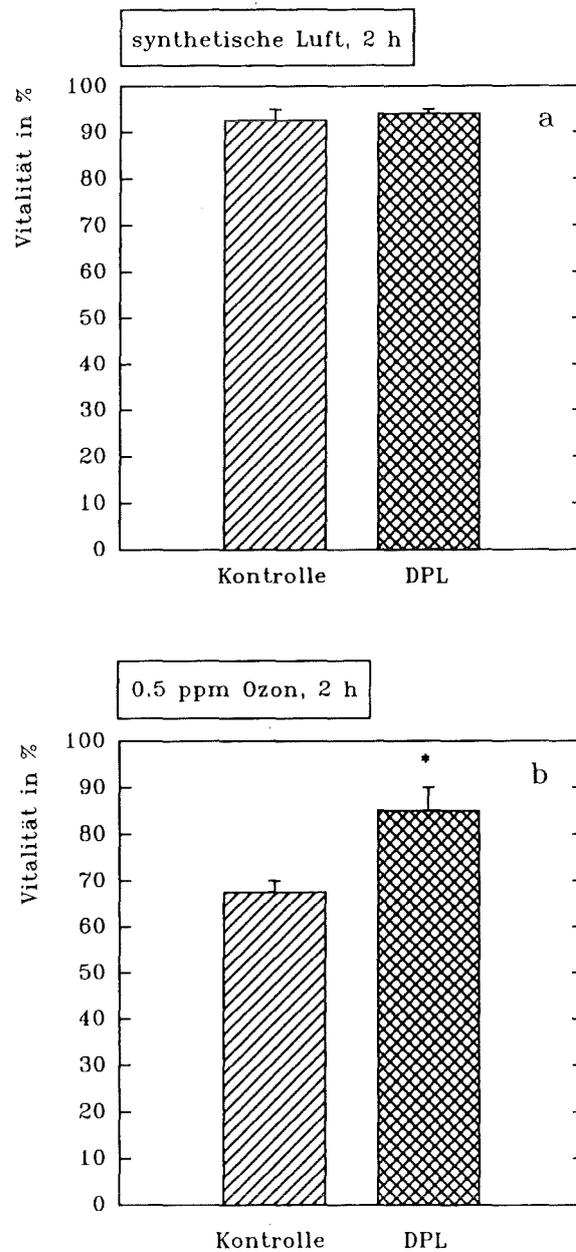


Abb. 64: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die Vitalität von RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer. Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

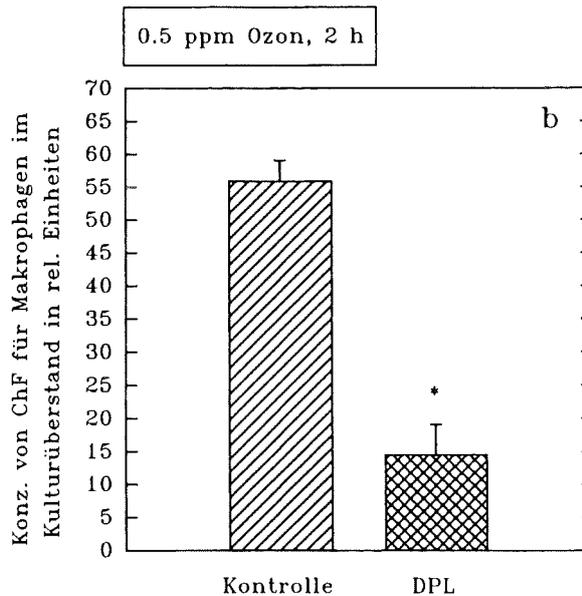
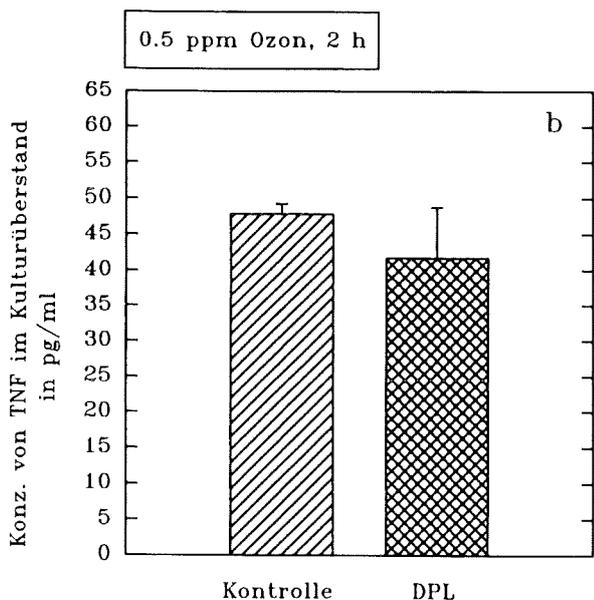
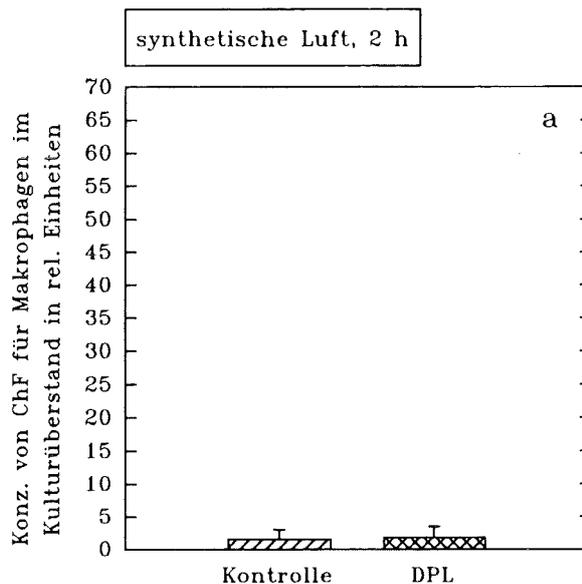
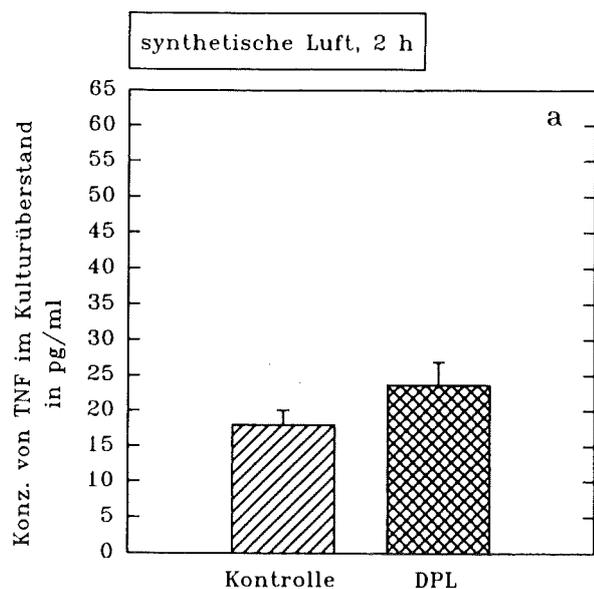


Abb. 65a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

Abb. 66a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

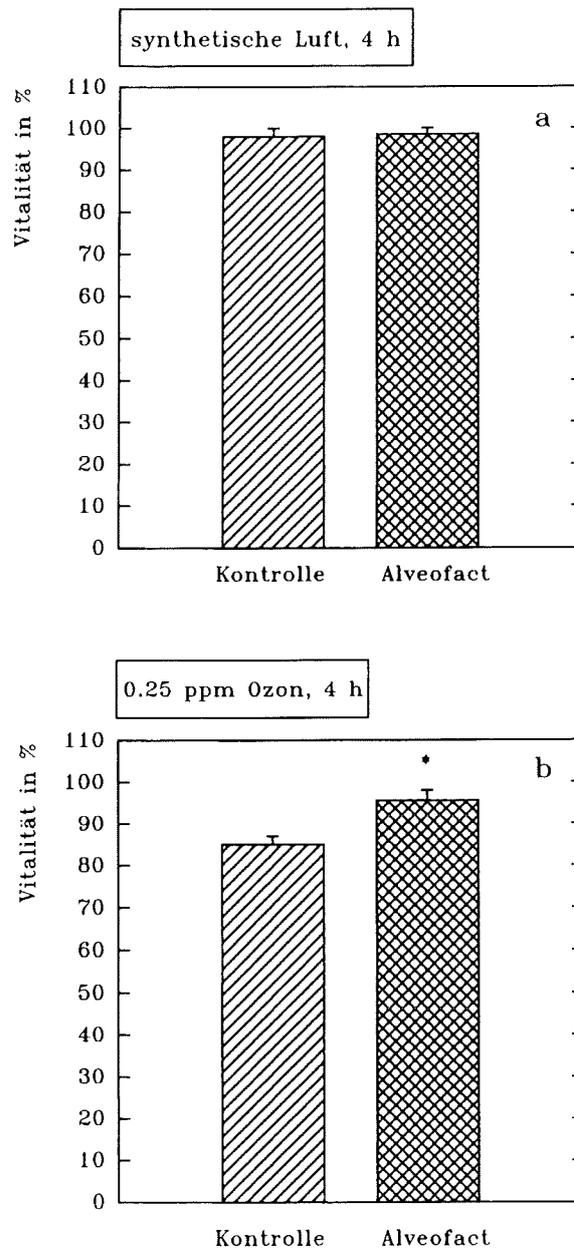


Abb. 67a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.25 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit Alveofact (100 µg/ml) auf die Vitalität von RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

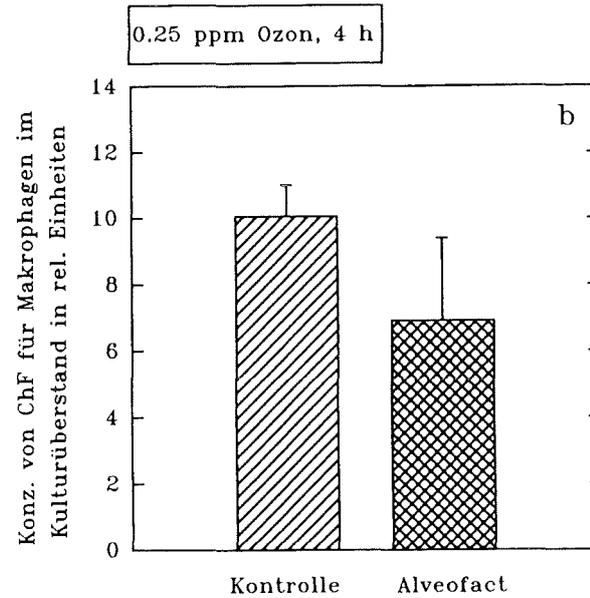
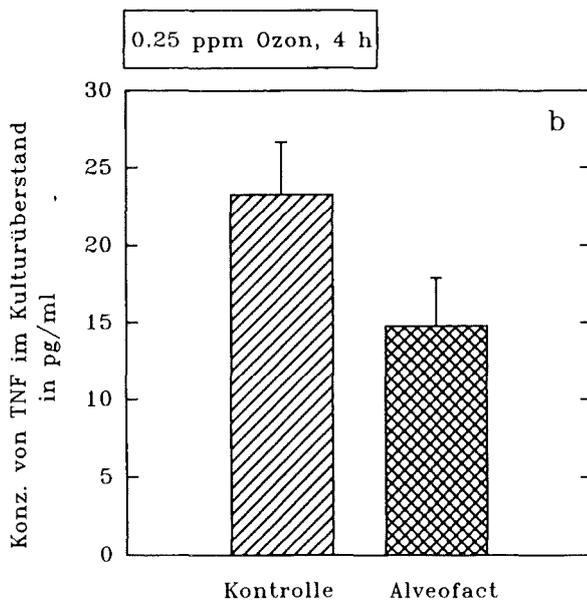
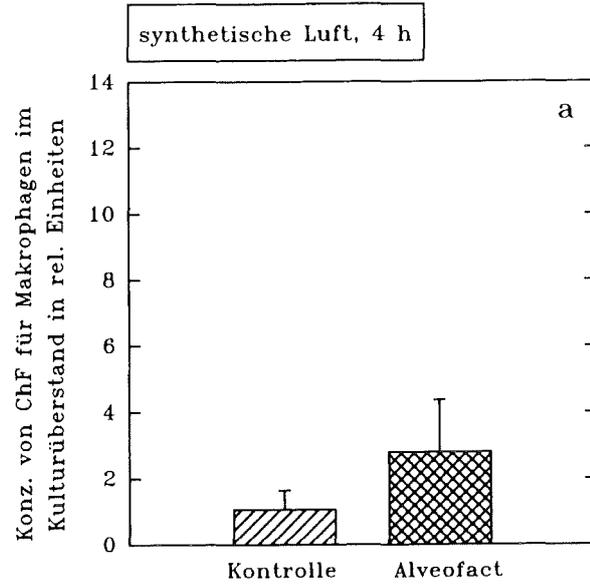
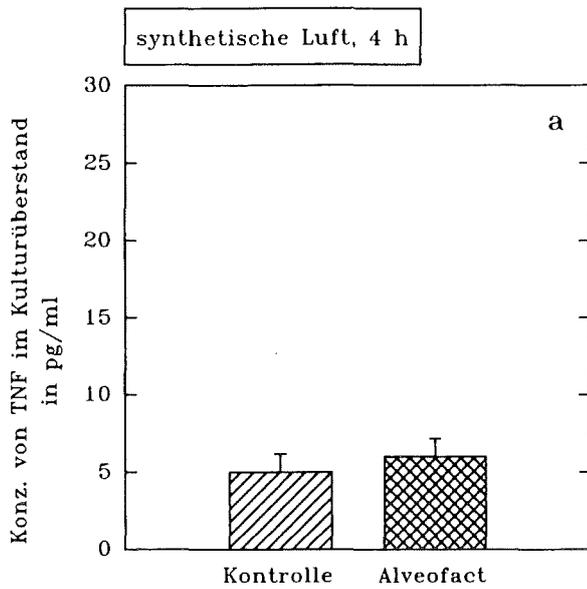


Abb. 68a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.25 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit Alveofact (100 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 69a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.25 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit Alveofact (100 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4
* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

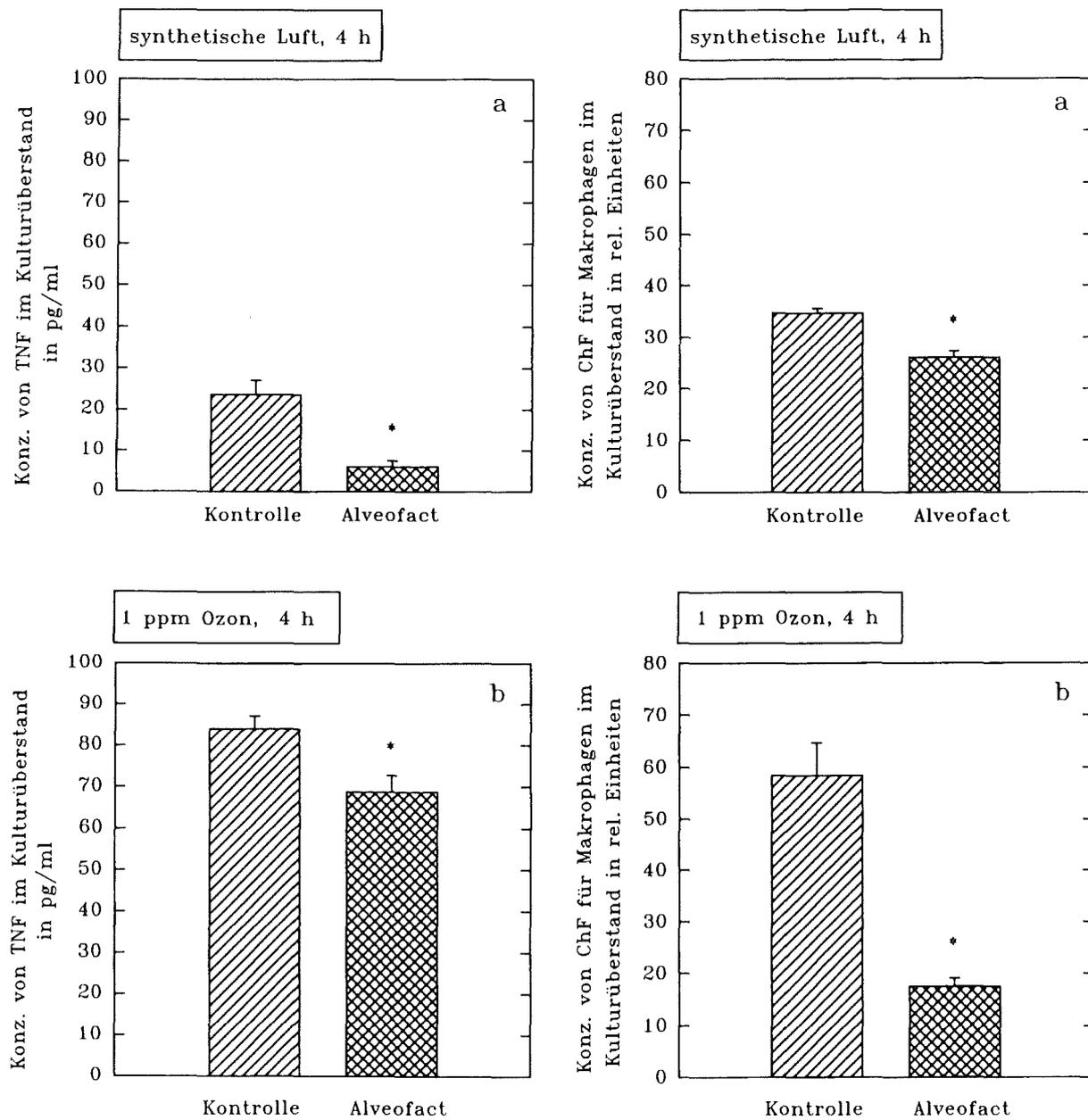


Abb. 70a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit Alveofact (100 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6
 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Abb. 71a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit Alveofact (100 µg/ml) auf die Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6
 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

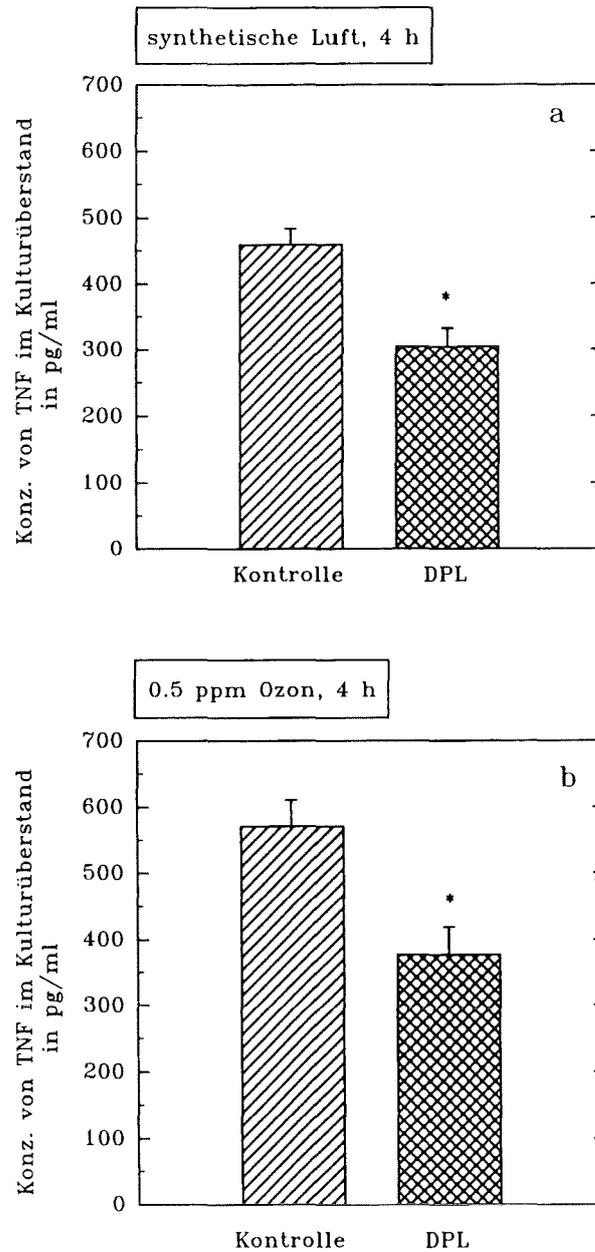


Abb. 72a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die TNF-Freisetzung von HAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer.

Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=4

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

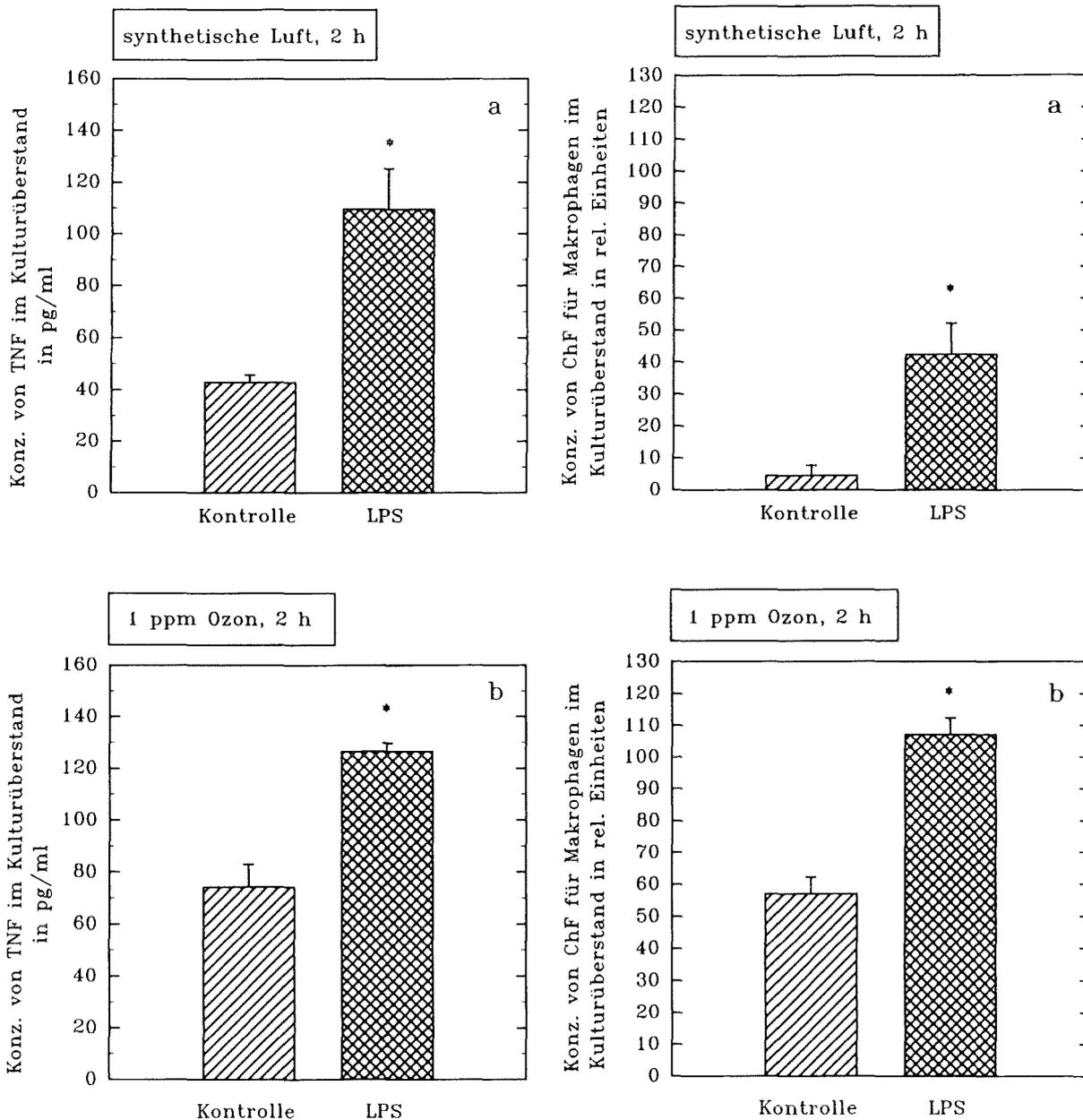


Abb. 73a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden auf die LPS (10 µg/ml)-induzierte TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer. Arithm. Mittelwerte ± Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

Abb. 74a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden auf die LPS (10 µg/ml)-induzierte Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer. Arithm. Mittelwerte ± Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

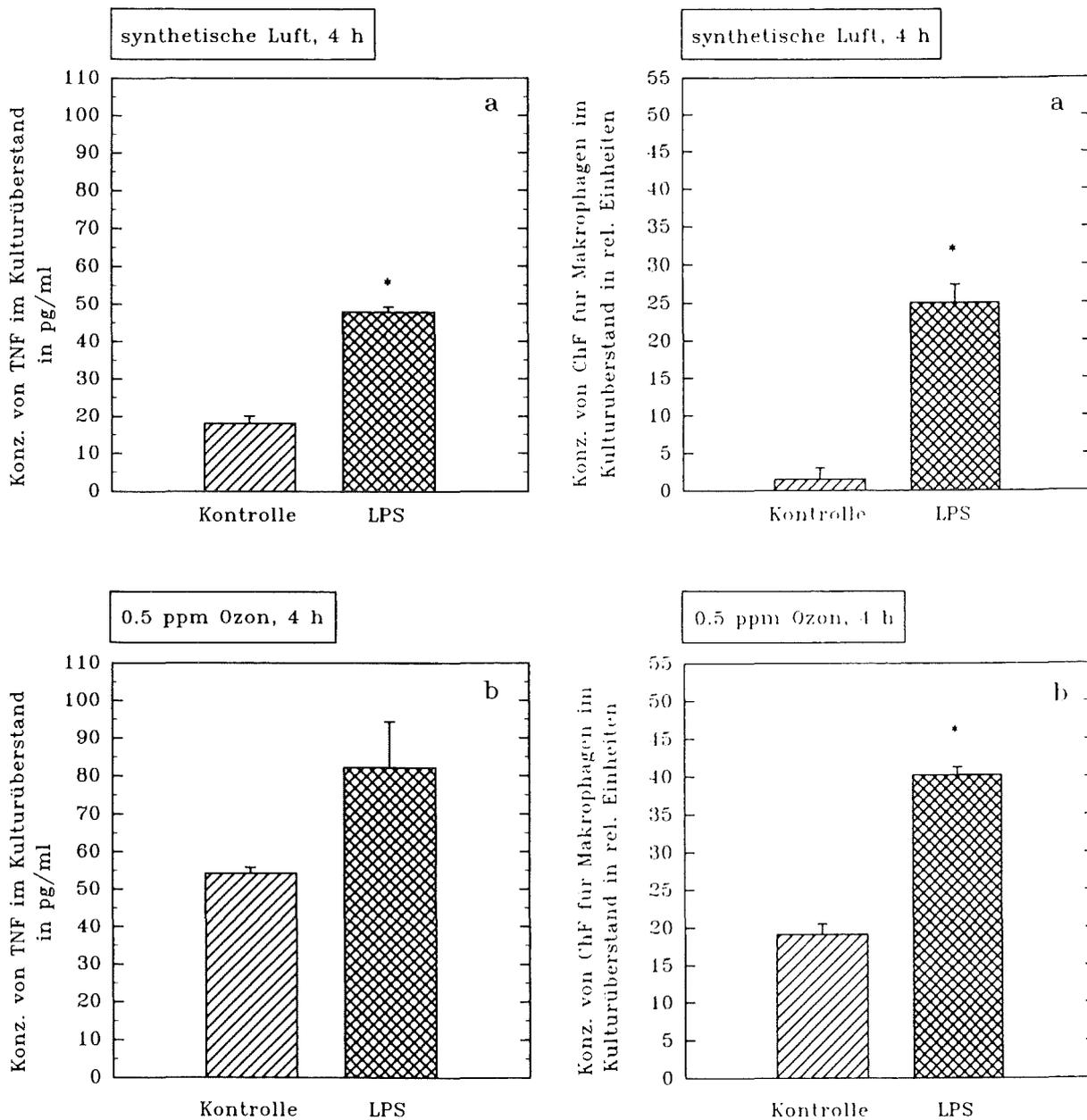


Abb. 75a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 4 Stunden auf die LPS (10 µg/ml)-induzierte TNF-Freisetzung von RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

Abb. 76a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 4 Stunden auf die LPS (10 µg/ml)-induzierte Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer. Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=6 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für p<0.05

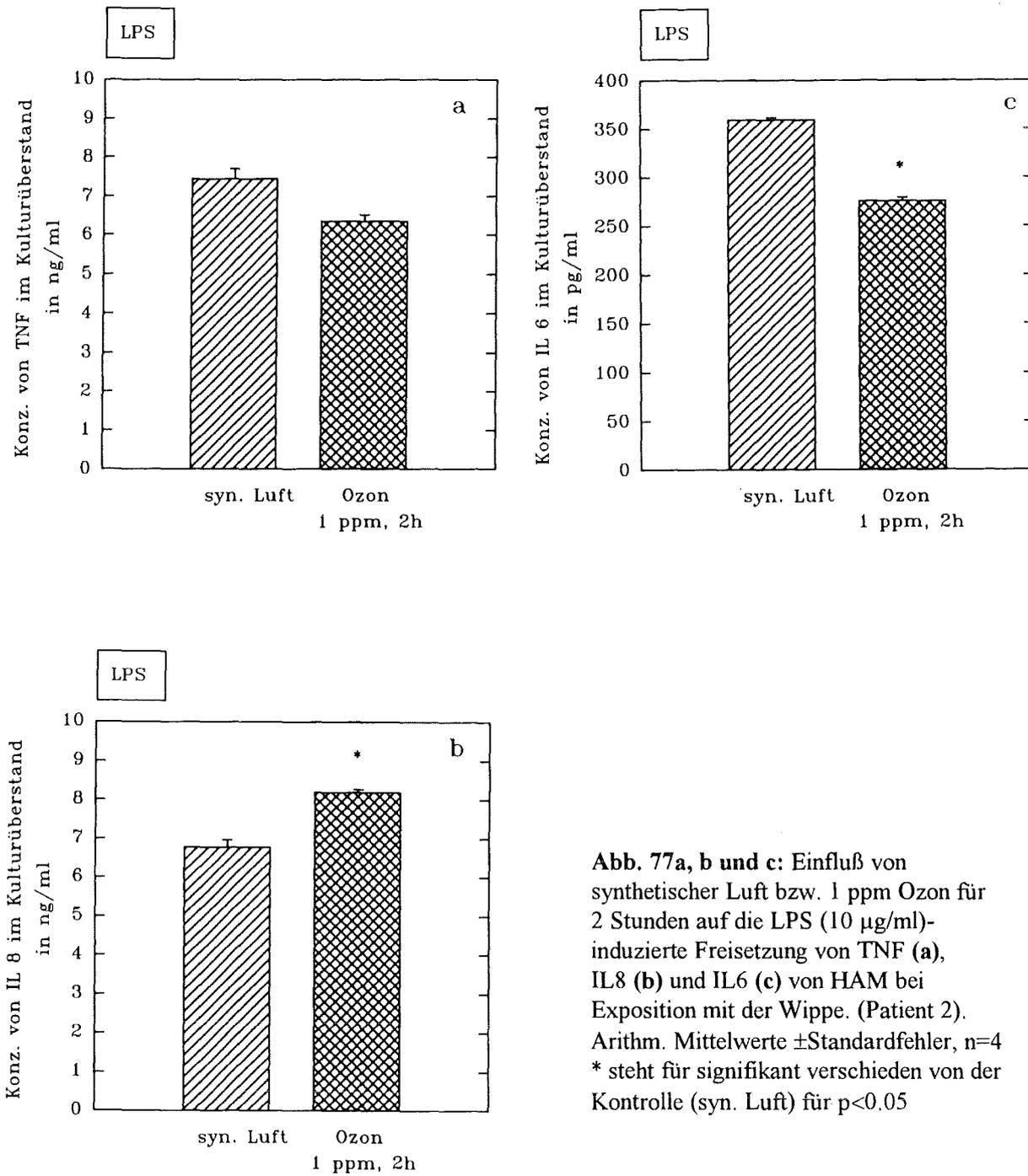


Abb. 77a, b und c: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden auf die LPS (10 µg/ml)-induzierte Freisetzung von TNF (a), IL8 (b) und IL6 (c) von HAM bei Exposition mit der Wippe. (Patient 2). Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

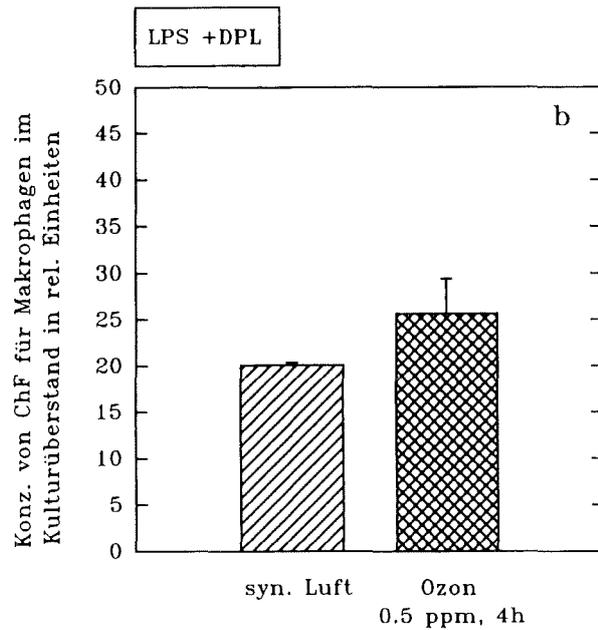
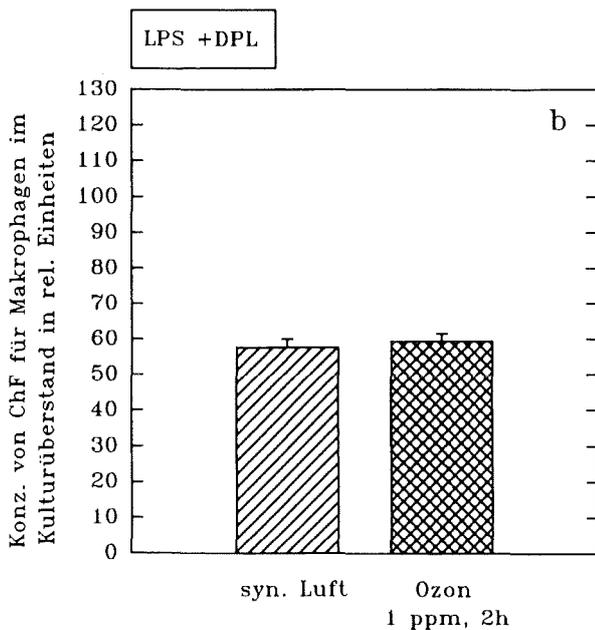
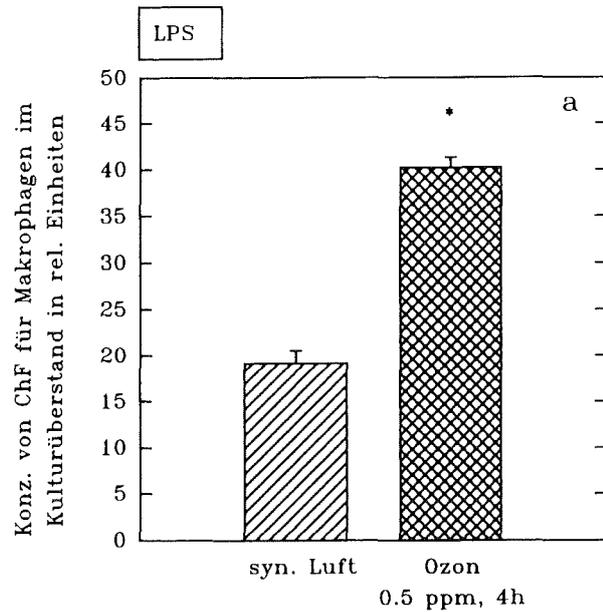
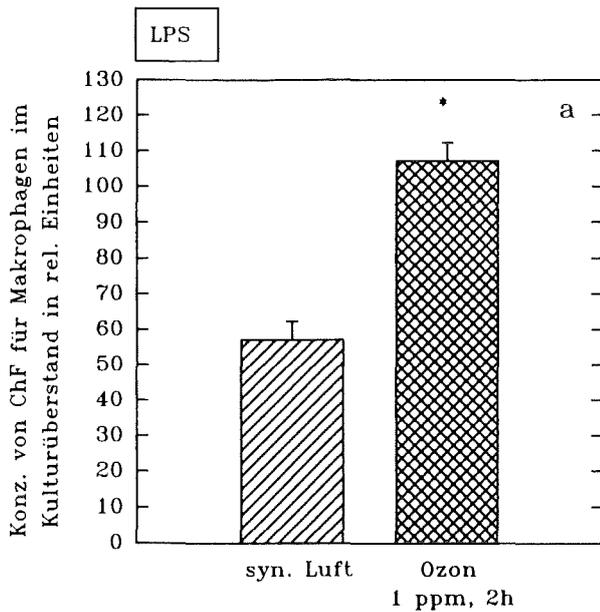


Abb. 78a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die LPS (10 µg/ml)-induzierte Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer. Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

Abb. 79a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 0.5 ppm Ozon für 4 Stunden in Kombination mit DPL (100 µg/ml) auf die LPS (10 µg/ml)-induzierte Freisetzung von ChF für RAM bei Exposition mit der Voisin-Kammer. Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4 * steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

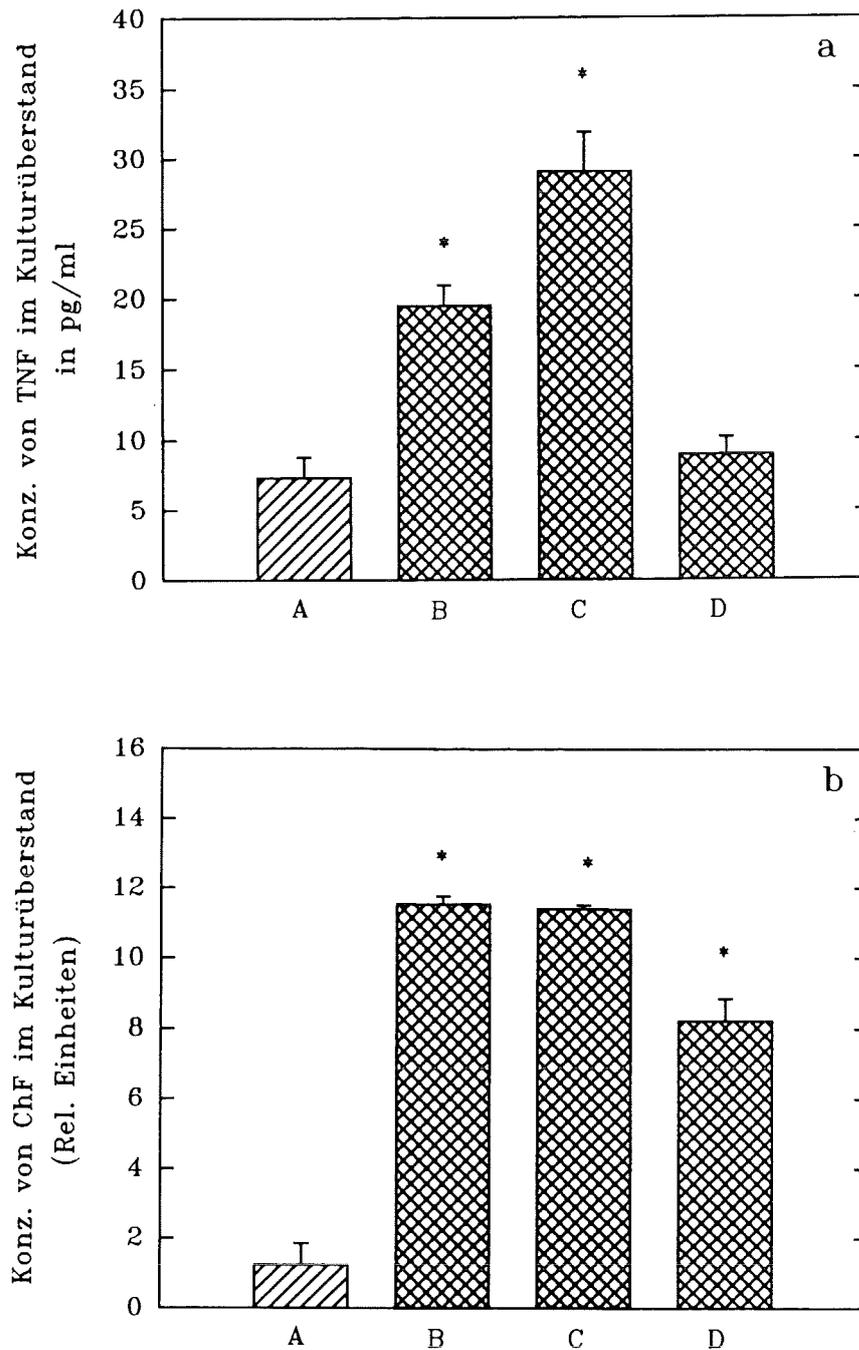


Abb. 80a und b: Einfluß von synthetischer Luft bzw. 1 ppm Ozon für 2 Stunden in Kombination mit Vitamin E auf die Freisetzung von TNF (a) und ChF (b) von RAM bei Exposition mit der Wippe.

A: Kontrolle mit synthetischer Luft

B: 1 ppm Ozon für 2 Stunden

C: Vitamin E während der Exposition zugesetzt

D: Vitamin E-Vorinkubation (24 Stunden vor Exposition zugesetzt)

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=4$

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle (syn. Luft) für $p < 0.05$

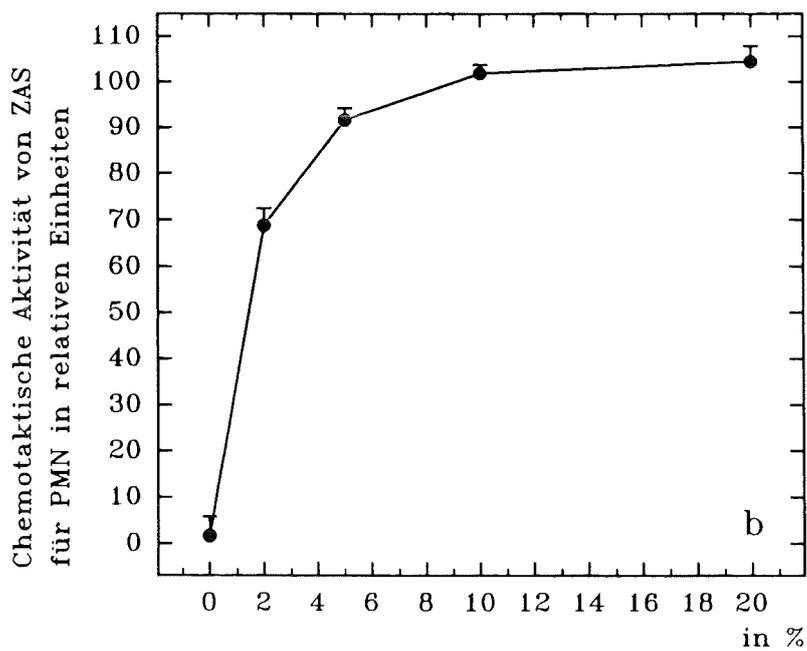
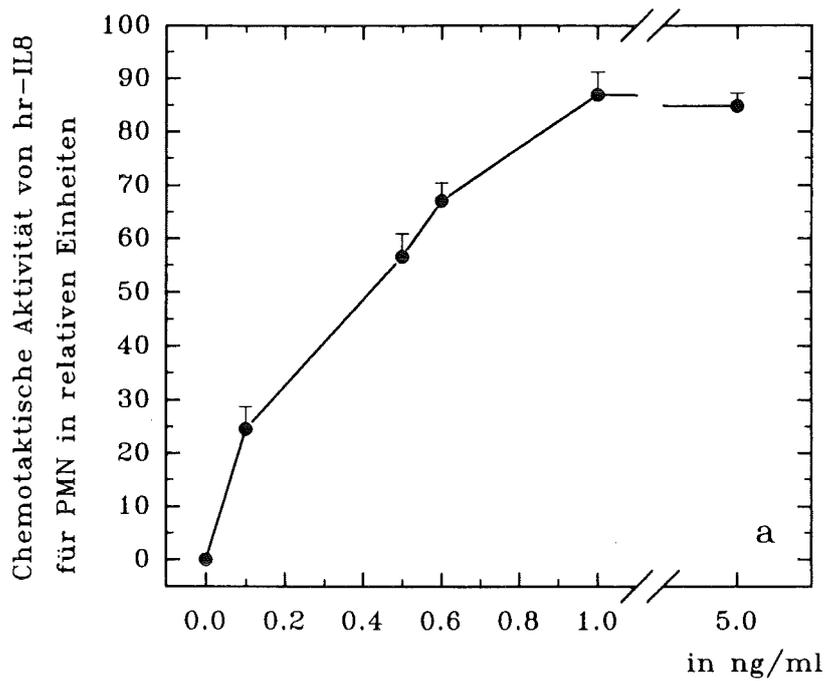


Abb. 81a und b: Chemotaktische Aktivität von hr-IL8 (a) und Zymosan aktiviertem Serum (ZAS) (b) für bovine polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten (PMN) in Abhängigkeit von der Konzentration.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=4

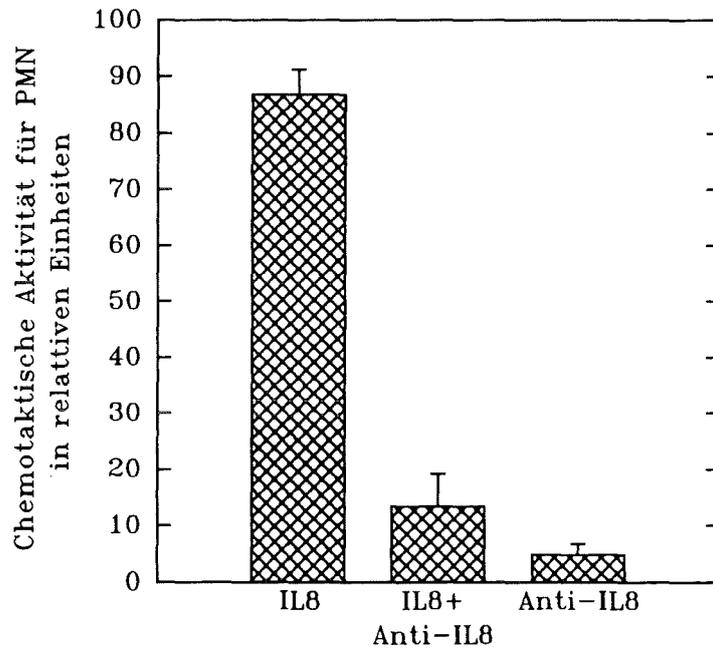


Abb. 82: Chemotaktische Aktivität von hr-IL8 (1 ng/ml) für bovine polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten (PMN) in Kombination mit Anti-hr-IL8 (2 µg/ml). Arithm. Mittelwerte ±Standardfehler, n=4

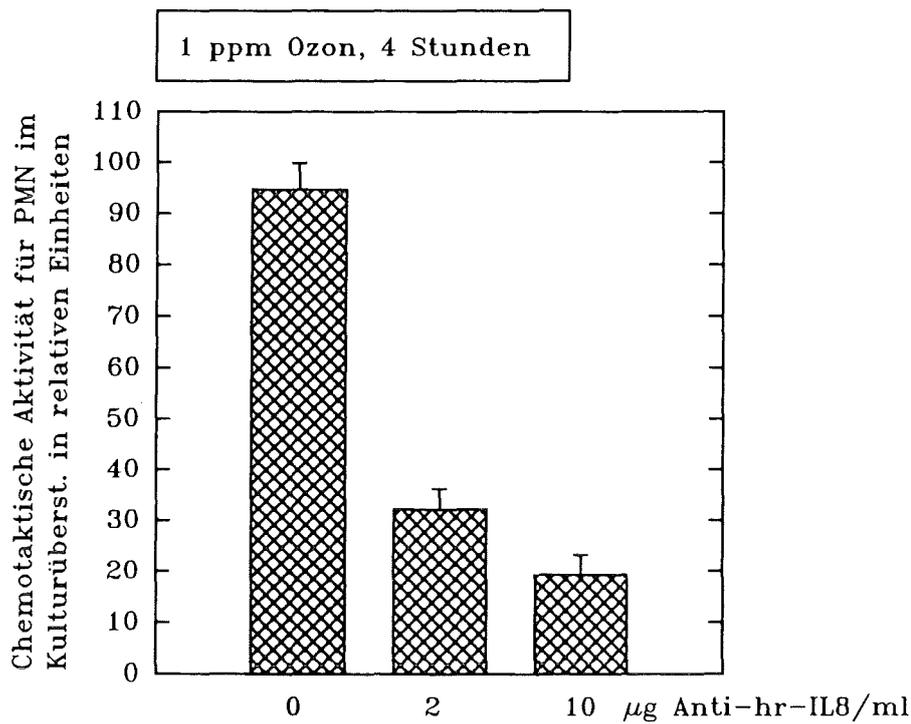


Abb. 83: Chemotaktische Aktivität von RAM-Überständen (nach vierstündiger Exposition mit 1 ppm Ozon auf der Wippe) für bovine polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten (PMN) vor und nach Inkubation mit Anti-hr-IL8 (2 bzw. 10 µg/ml).

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6

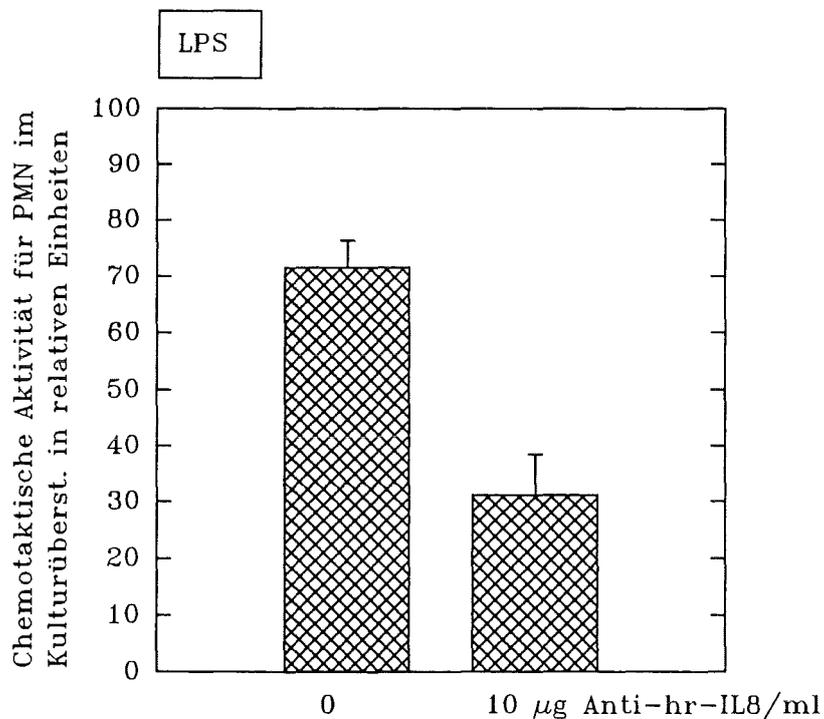


Abb. 84: Chemotaktische Aktivität von RAM-Überständen nach LPS-Stimulation für bovine polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten (PMN) vor und nach Inkubation mit Anti-hr-IL8 (10 µg/ml).

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6

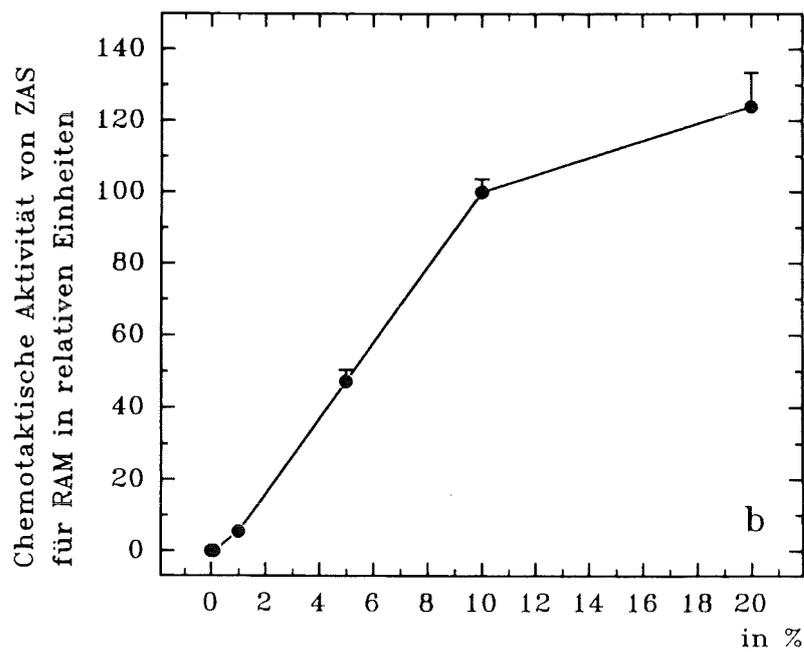
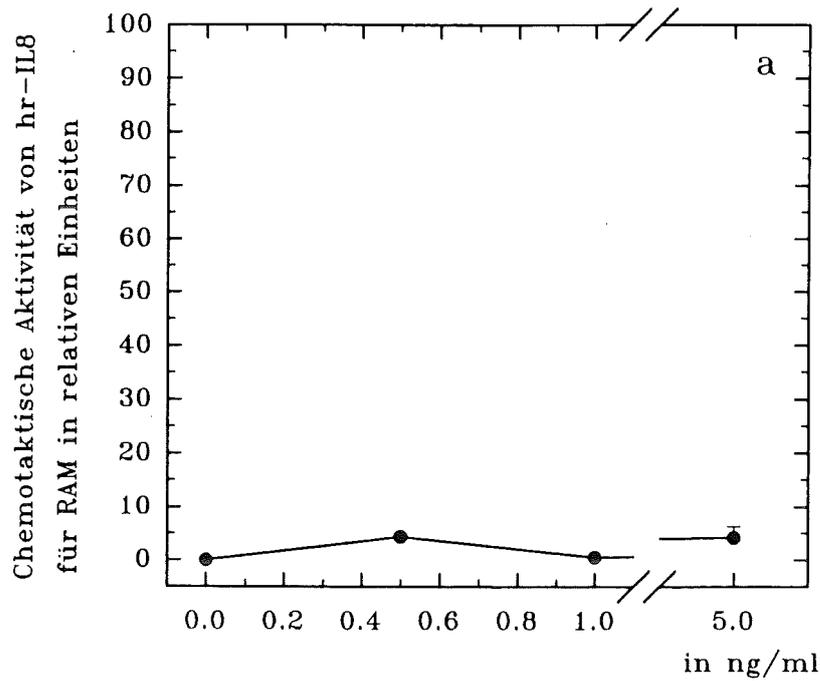


Abb. 85a und b: Chemotaktische Aktivität von hr-IL8 (a) und Zymosan aktiviertem Serum (ZAS) (b) für Rinderalveolarmakrophagen (RAM) in Abhängigkeit von der Konzentration.

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=6$

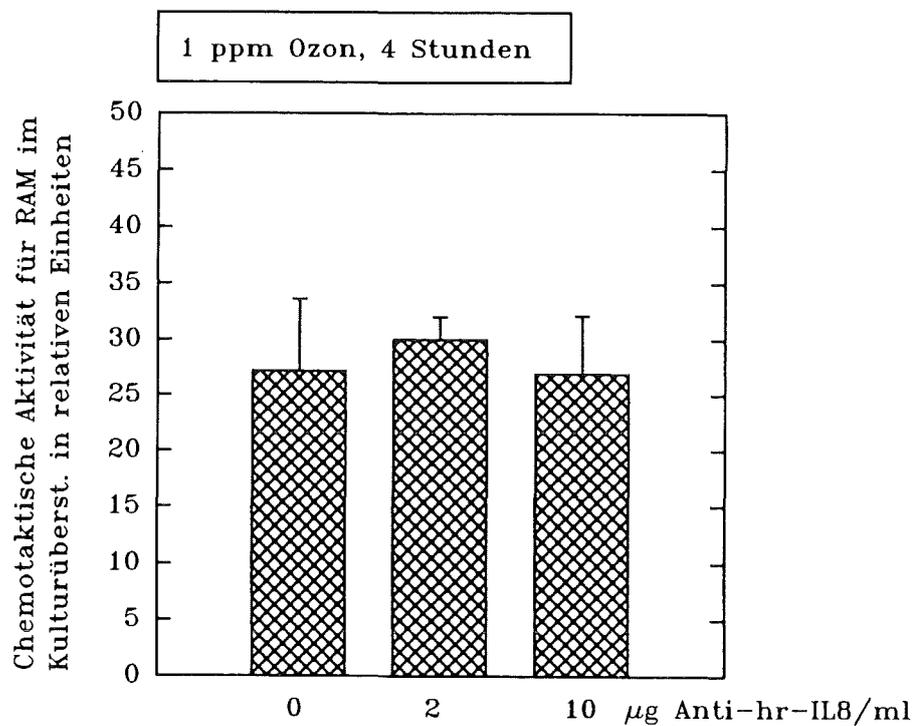


Abb. 86: Chemotaktische Aktivität von RAM-Überständen (nach vierstündiger Exposition mit 1 ppm Ozon auf der Wippe) für Rinderalveolarmakrophagen (RAM) vor und nach Inkubation mit Anti-hr-IL8 (2 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$).
Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=6$

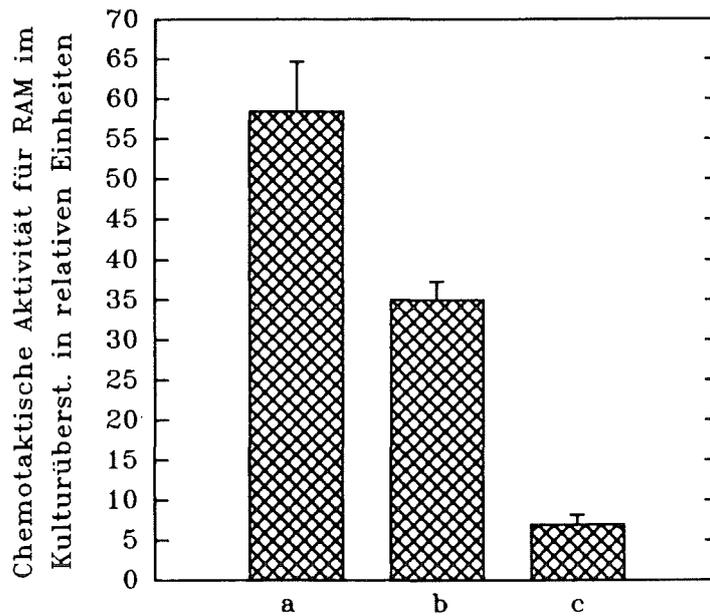


Abb. 87: Chemotaktische Aktivität von RAM-Überständen (nach vierstündiger Exposition mit 1 ppm Ozon in der Voisin-Kammer) für Makrophagen in Kombination mit Antikörpern gegen den humanen Komplementfaktor C5 .

a: Überstand von Ozon-exponierten RAM

b: Anti-C5

c: Überstand von Ozon-exponierten RAM nach einstündiger Inkubation mit Anti-C5

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6

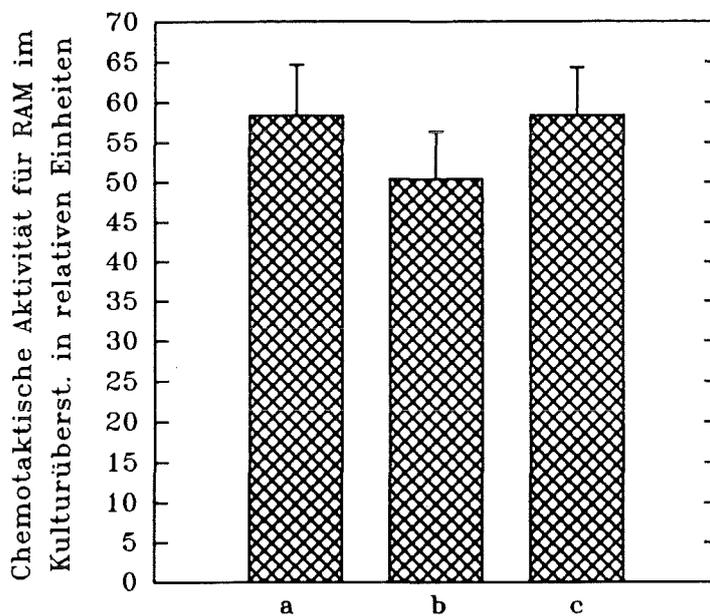


Abb. 88: Chemotaktische Aktivität von RAM-Überständen (nach vierstündiger Exposition mit 1 ppm Ozon in der Voisin-Kammer) für Makrophagen in Kombination mit Antikörpern gegen hr-MIP 1 α (monocyte inflammatory protein, 10 μ g/ml).

a: Überstand von Ozon-exponierten RAM

b: Anti-MIP 1 α

c: Überstand von Ozon-exponierten RAM nach einstündiger Inkubation mit Anti-MIP 1 α

Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6

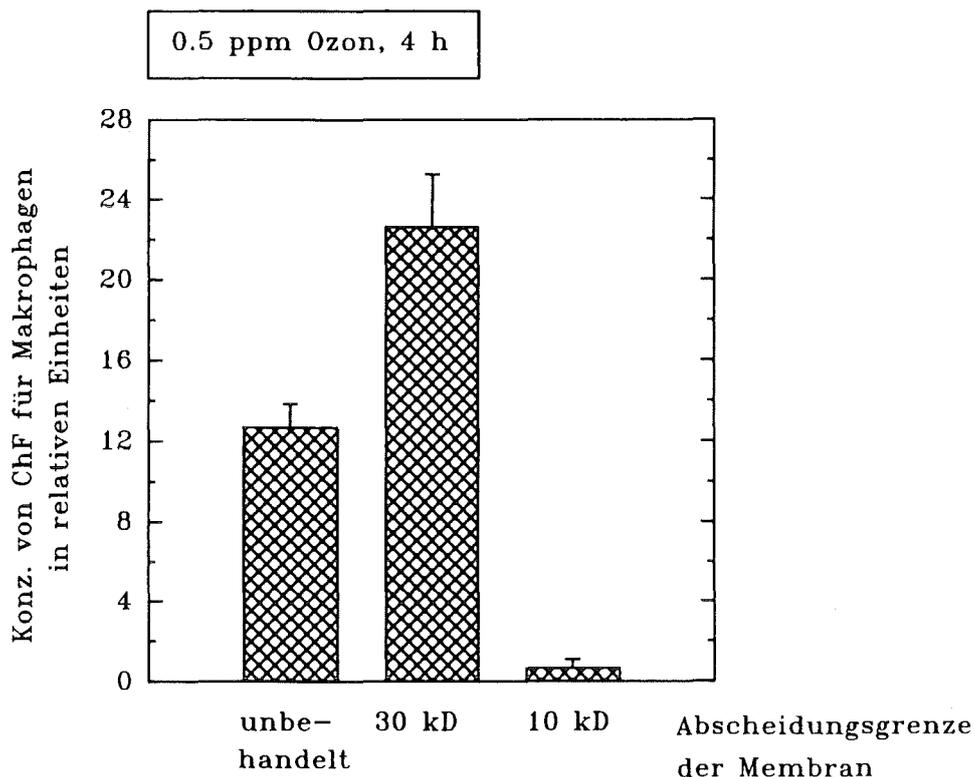


Abb. 89: Chemotaktische Aktivität eines Überstandes von Ozon-exponierten (0.5 ppm, 4h) RAM nach Membranfiltration mit 30 und 10 kD Abscheidungsgrenze der Membran. Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6

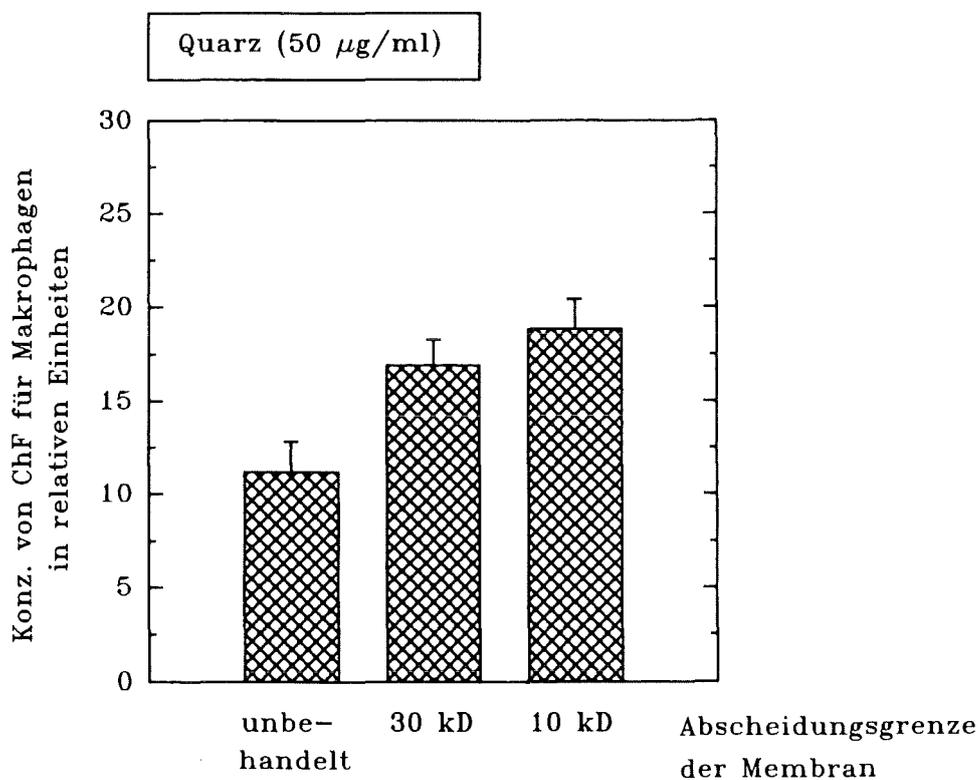


Abb. 90: Chemotaktische Aktivität eines Überstandes von Quarz-inkubierten (50 μ g/ml, 3h) RAM nach Membranfiltration mit 30 und 10 kD Abscheidungsgrenze der Membran. Arithm. Mittelwerte \pm Standardfehler, n=6