

KfK 5098 B
Oktober 1992

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

A. M. Schmidt
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5098 B

**DIE WIRKUNG VON QUARZ
AUF
DIE LYSOSOMEN
UND DIE
"TUMOR NEKROSE FAKTOR"-PRODUKTION
VON
ALVEOLARMAKROPHAGEN**

Angela M. Schmidt

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, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Untersuchungen waren weitere Aufklärungen zum Mechanismus in der Pathogenese von silikotischen Lungenerkrankungen, die durch die Inhalation von fibrogenen Quarzstäuben verursacht werden.

Zum einen wurde in dieser in vitro-Studie der Einfluß von phagozytierten Quarzpartikeln auf den lysosomalen Apparat von Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) untersucht. Dazu wurden die RAM nach der Quarzphagozytose mit Acridinorange angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Nach erfolgter Phagozytose wurden die einzelnen Partikel in rot fluoreszierenden und somit fluoreszenzoptisch intakten Phago-Lysosomen wiedergefunden. Durch die Quarzphagozytose kam es zusätzlich zu einer stufenweise Degranulierung der Zellen. Das Endstadium dieses Prozesses markierten ausschließlich grün fluoreszierende Zellen. Die Quarzpartikel lagen anscheinend frei im Zytoplasma der noch vitalen Zellen. Dieses Erscheinungsbild deutete auf eine Veränderung des lysosomalen Apparates der RAM hin. Wurden die Quarzpartikel vor der Phagozytose mit Dipalmitoyl-Lecithin beschichtet, so konnte die Entstehung dieser degranulierten und grün fluoreszierenden Zellen in den Kulturen fast vollständig unterbunden werden. Ob das Ausmaß der lysosomalen Veränderung funktionell oder morphologisch bedingt war, konnte nicht bestimmt werden. Wird die Fusion zwischen den quarzhaltigen Phagosomen und den primären Lysosomen durch den Fusionshemmstoff Ammoniumchlorid unterbunden, so konnte die beobachtete Reduktion in der Gesamtaktivität des lysosomalen Enzyms Cathepsin B aufgehoben und die Zellvitalitäten gesteigert werden.

Das zweite Ziel dieser Studie bestand in der Analyse der Freisetzung des Zytokins Tumor Nekrose Faktor (TNF) durch die RAM nach Quarzphagozytose. Die Bestimmung der freigesetzten TNF-Aktivität wurde anhand eines Biotestes mit L929-Zellen durchgeführt. Als Standardstimulus für die TNF-Sekretion durch die RAM wurde Lipopolysaccharid eingesetzt. Nach Quarzphagozytose setzten RAM eine TNF-artige Aktivität in die Kulturüberstände frei. Der eindeutige Nachweis, daß es sich bei diesen Aktivitäten tatsächlich um den Mediator TNF- α handelt, konnte nicht geführt werden. Es sprechen jedoch mehrere Indizien dafür, daß es sich bei den gefundenen Aktivitäten um TNF- α handelt.

Effects of quartz on the lysosomes and on the production by alveolar macrophages of "Tumor Necrosis Factor".

The aim of this study is the further clarification of steps in the pathogenesis of silicotic lung disease caused by inhalation of fibrogenic quartz particles. In this in-vitro study the influence of phagocytosed quartz particles on the lysosomal apparatus of bovine alveolar macrophages (BAM) was investigated. After phagocytosis of quartz particles BAM were labelled with acridine orange and were visualized by fluorescence microscopy. After phagocytosis, quartz particles were found in red fluorescent phago-lysosomes which were considered as intact phago-lysosomes. Due to phagocytosis of the quartz particles a gradual degranulation of the cells took place. At the end of this process only green fluorescent cells were observed. The ingested particles seemed to lie free in the cytoplasm of the cells which were still alive. This observations suggest a modification of the lysosomal apparatus of the BAMs. After phagocytosis of quartz particles which had been coated with dipalmitoyl-lecithin the appearance of these degranulated and green fluorescent cells could be prevented. It could not be clarified whether this lysosomal modification was caused by functional or by morphological processes. The inhibition of the fusion between the quartz containing phagosomes with the primary lysosomes through the inhibitor ammoniachloride leads to the abrogation of the quartz induced reduction of the lysosomal Cathepsin B activity and an increase in cell viability.

The second aim of this study was to analyse the release of the cytokine tumor necrosis factor (TNF) by BAM after phagocytosis of quartz particles. The bioassay with L-929 cells was used to estimate the released TNF activities. Lipopolysaccharide was taken as a standard stimulant for the secretion of TNF. After the phagocytosis of the quartz particles by BAM a TNF-like activity in the culture supernatants could be demonstrated. Though unequivocal evidence that these activities are due to the mediator TNF- α is still missing several arguments are in favour of the assumption that they are indeed the effect of TNF- α .

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Isolierung der Rinder-Alveolarmakrophagen.....	10
2.1.1.	Primärkultur der Rinder Alveolarmakrophagen.....	10
2.1.2.	Medienzusammensetzung für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	11
2.1.3.	Medienzusammensetzung für die Untersuchungen zur TNF-Freisetzung.....	11
2.2.	Inkubationen mit Staubsuspensionen und löslichen Metallverbindungen	12
2.2.1.	Quarz (SiO ₂).....	12
2.2.2.	Phospholipid-Vorbehandlung von Quarz.....	12
2.2.3.	Anreicherung von Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit.....	13
2.2.4.	Latex	13
2.2.5.	Titan(IV)oxid	13
2.2.6.	Hochtemperatursupraleiter	13
2.2.7.	Inkubationen mit Seltenen Erden.....	14
2.3.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Acridinorange.....	14
2.4.	Biochemische Untersuchungen.....	15
2.4.1.	Laktatdehydrogenase (LDH)	16
2.4.2.	N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG).....	16
2.4.3.	Cathepsin B	17
2.4.4.	Proteinbestimmung	18
2.5.	Einfluß der extrazellulären Kalziumionen auf die Quarztoxizität	19

2.6.	Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion.....	19
2.7.	Auswertung und Präsentation der fluoreszenzmikroskopischen und biochemischen Daten.....	20
2.8.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen und HL-60-Zellen.....	21
2.8.1	Gewinnung TNF-haltiger Kulturüberstände von Alveolarmakrophagen	21
2.8.2.	Gewinnung TNF-haltiger Kulturüberstände von HL-60-Zellen	24
2.8.2.1	Kultivierung und Differenzierung von HL-60-Zellen	24
2.8.2.2.	Gewinnung TNF-haltiger Kulturüberstände von differenzierten HL-60-Zellen	24
2.8.3.	Der TNF-Bioassay.....	25
2.8.3.1.	Kultivierung der L-929-Zellen.....	25
2.8.3.2.	Kryokonservierung der L-929-Zellen.....	26
2.8.3.3.	Wachstum der L-929-Zellen.....	26
2.8.3.4.	Test auf Mykoplasmen.....	26
2.8.4.	Durchführung des TNF-Bioassays.....	27
2.8.5.	Standardisierung des TNF-Bioassays mit rhu-TNF- α	28
2.8.6.	Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung mit MTT	28
2.8.7.	Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung mit Neutralrot	29
2.8.8.	Neutralisierung der zytotoxischen Wirkung mit einem humanen monoklonalen Antikörper	30
2.8.9.	Auswertung und Präsentation der Daten zur TNF-Freisetzung.....	30
3.	ERGEBNISSE.....	32
3.1.	Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Vitalfärbung mit Acridinorange.....	32
3.1.1.	Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose: Zeitabhängigkeiten	33

3.1.2.	Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Phagozytose von DPL-beschichtetem Quarz und Latex	35
3.1.3.	Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose: Dosiseffekt	37
3.1.3.1.	Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose: Vergleich zweier Partikelgrößenverteilungen.....	38
3.2.	Der Einfluß von extrazellulären Kalziumionen auf den Zelloid der Rinder-Alveolarmakrophagen nach der Quarzphagozytose	39
3.3.	Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion	40
3.4.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen.....	41
3.4.1.	Wachstumscharakteristik der L-929-Zellen.....	41
3.4.2.	Standardisierung des TNF-Bioassays mit rhu-TNF- α	41
3.4.3.	Vergleich zwischen dem MTT-Test und der Neutralrotmethode	42
3.4.4.	Versuche zum Nachweis von TNF- α in den Kulturüberständen der Rinder-Alveolarmakrophagen.....	42
3.4.5.	Die Freisetzung von TNF aus unstimulierten Rinder-Alveolarmakrophagen und nach deren Stimulation mit LPS	43
3.4.6.	Der TNF-Gehalt von unstimulierten Rinder-Alveolarmakrophagen und nach deren Stimulation mit LPS	44
3.4.7.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarzstäuben	44
3.4.8.	Der Einfluß des DPL-vorbehandelten Quarzes auf die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen.....	47
3.4.9.	Der Einfluß von Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen.....	48
3.4.10.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Lanthan und Cer.....	49
3.4.11.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit dem Hochtemperatursupraleiter YBa ₂ Cu ₃ O _{7-x}	49
3.4.12.	Die Freisetzung von TNF aus HL-60-Zellen.....	50
3.4.12.1.	Die Freisetzung von TNF nach Differenzierung der HL-60-Zellen mit TPA.....	50
3.4.12.2.	Die Freisetzung von TNF aus dfferenzierten HL-60-Zellen nach Inkubation mit LPS, Quarz, Latex und Titandioxid	50

3.4.12.3.	Der TNF-Gehalt von differenzierten HL-60-Zellen nach Inkubation mit LPS, Quarz, Latex und Titandioxid.....	51
4.	DISKUSSION.....	53
4.1.	Allgemeine Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Vitalfärbung mit Acridinorange	53
4.2.	Reaktionen von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarzpartikel.....	55
4.3.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen.....	63
4.3.1.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarzstäben	68
4.3.2.	Phospholipid-Schutzeffekt	69
4.3.3.	Der TNF-Gehalt von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit LPS	71
4.3.4.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Lanthan und Cer.....	71
4.3.5.	Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit dem HTS $YBa_2Cu_3O_{7-x}$	72
4.4.	Die Freisetzung von TNF aus HL-60-Zellen.....	73
5.	ZUSAMMENFASSUNG	75
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	78
7.	TABELLEN UND ABBILDUNGEN	92

Abkürzungen:

AM	Alveolarmakrophagen
AMAD	Activity median aerodynamic diameter
AO	Acridinorange
AUC	Area und the curve
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPL	L- α Dipalmitoy-Lezithin
FCS	Foetales Kälberserum
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating-factor
GM-CSF	Granulocyte-monocyte-colony-stimulating-factor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HTS	Hochtemperatursupraleiter
IL	Interleukin
Ko	Kontrolle
La	Latex
LC ₅₀	Letale Konzentration (50%)
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MTT	3 -(4,5)dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
NAG	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
PBS	Phosphate buffered saline
Q	Quarz
RAM	Rinder-Alveolarmakrophagen
rhu-TNF- α	human rekombinants TNF- α
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
Ü	zellfreier Kulturüberstand
Z	adhärente Zellen
ZÜ	Zellen im Kulturüberstand

1. EINLEITUNG

Die Menschen werden heute in zunehmenden Maße mit Schadstoffen konfrontiert. Dabei spielen die Luftschadstoffe eine zentrale Rolle. Unter den berufsbedingten und entschädigungspflichtigen Erkrankungen der Atmungsorgane stehen die Staublungenerkrankungen mit über 90% an erster Stelle (Morr, 1986).

Diese Pneumokoniosen entstehen durch die Inhalation und Speicherung anorganischer und organischer Stäube im Lungengewebe. Medizinisch werden die Pneumokoniosen in die benigne, nicht-kollagenerzeugende und in die maligne, kollagenerzeugende Form eingeteilt (Morr, 1986).

Zu den nicht-kollagenerzeugenden Pneumokoniosen zählen die Lungenverstaubungen, die u.a. durch Schwerspatstaub (Barytose), reinen Kohlenstaub (Anthrakose) und Eisenstaub (Siderose) hervorgerufen werden. Pathologisch zeichnen sich diese benignen Formen durch eine nur minimale Gewebsreaktionen und ihre potentielle Reversibilität aus (Morr, 1986).

Dagegen führt die Inhalation von mineralischen Stäuben wie Quarz (Silikose) aber auch Asbest (Asbestose), Talkum (Talkose) oder Beryllium (Berylliose) zu fibrotischen Veränderungen des Lungengewebes. Darüberhinaus kommt es zu irreversiblen Schädigungen der alveolaren Architektur und zu permanenten Narben in der Lunge (Morr, 1986).

Unter den entschädigungspflichtigen Pneumokoniosen hat die Silikose, die durch die Inhalation und Speicherung von Quarzfeinstaub hervorgerufen wird, in unserem Land die größte Bedeutung. In der BRD wurden im Jahre 1982 etwa 1000 zu entschädigende Fälle registriert (Thiele, 1986) und dem amerikanischen New Jersey Departement of Health wurden in den Jahren von 1979 bis 1987 insgesamt 529 Silikotiker gemeldet (Valiante & Rosenman 1989).

Betroffen von silikotischen Lungenerkrankungen sind Menschen, die am Arbeitsplatz hohen Quarzstaubbelastungen ausgesetzt sind, z.B. im Bergbau, in der Stein- und Bauindustrie, in der Keramischen Industrie (Herstellung von Porzellan und Fliesen), in der Gießerei- und Metallindustrie (Verwendung von Schleifmitteln, Sandstrahlen) und in der Rohstoffgewinnung (Thiele, 1986, Ziskind et al., 1976). Seit der Antike wird von Lungenerkrankungen berichtet, die bei der Exposition der Menschen durch Stäube entstehen und schon die alten Ägypter litten, bedingt durch die Bauarbeiten für die Pyramiden, unter Silikose (Richards & Curtis, 1984).

Das pathologische Bild der Silikose ist durch die fibrotischen Knötchen mit hyalinem Kern charakterisiert, die sich vorwiegend in den mittleren bis oberen

lateralen Lungenpartien etablieren. Im Frühstadium kommt es zu einer gesteigerten Ansammlung der quarz-beladenen Alveolarmakrophagen in den Alveolen. Fibroblasten und Kollagen umgeben zunehmend die Makrophagen und bilden so einen ersten fibrotischen Knoten. Im weiteren Verlauf verliert der fibrotische Knoten seinen zellulären Charakter und es bilden sich Retikulinfasern, Kollagen, Proteine und Phospholipide aus, die in konzentrischer Form abgelagert werden. Dadurch entsteht das für die Silikose typische Zwiebelschalenmuster. Bei längerer Staubexposition verschmelzen die benachbarten Knötchen und bilden größere Gruppen und Schwielen, die auch verkalken können (Begin et al., 1989, Hilscher et al., 1987, Thiele, 1986).

Im allgemeinen setzt man für die Entstehung der Silikose eine etwa 10 bis 20jährige Expositionszeit voraus. Der Verlauf der Silikose ist auch dann progredient, wenn nach ihrem Ausbruch kein neuer Staub mehr eingeatmet wird (Thiele, 1986). Rückbildungen kommen nicht vor. Die Patienten leiden mit fortschreitender Entwicklung unter Atembeschwerden, Husten und Schmerzen im Bereich der Brust und des Rückens. Ventilationsstörungen treten auf. Durch Emphysembildung kommt es zum Druckanstieg in der Arteria pulmonalis, der schließlich zum Tod durch Rechts Herzversagen führen kann (Begin et al., 1989, Morr, 1986, Richards & Curtis, 1984, Thiele, 1986).

Als lungengängig gelten Staubpartikel, deren Durchmesser $\leq 5 \mu\text{m}$ beträgt (Kysela et al., 1973, Thiele, 1986). Arbeitsmedizinisch gilt ein MAK-Wert (maximal zulässige Arbeitsplatz-Konzentration) von 0,15 mg Quarzfeinstaub/m³ (Thiele, 1986). Der Quarzgehalt einer silikotischen Lunge kann zwischen 2% und 20% des Trockengewichtes der Lunge betragen (Begin et al., 1989).

Auch Metalle und ihre Verbindungen können Pneumokoniosen auslösen. So führt beispielsweise die Inhalation von Wolfram- und Kobaltkarbiden zu fibrotischen Veränderungen in der Lunge (Thiele, 1986). Auch die Inhalation des Seltenen Erdmetalls Cer (z.B. in Kupferschmelzen) kann pneumokoniotische Reaktionen in der Lunge auslösen (Evans, 1990).

In diesem Zusammenhang erhalten auch die Hochtemperatursupraleiter (HTS) eine neue Bedeutung. Diese hochoxidierten Metallmischoxide (Bednorz & Müller, 1986) werden zunehmend wirtschaftlich genutzt. Die HTS enthalten in der Regel das Element Kupfer, ein Element der Seltenen Erden oder alternativ dazu Yttrium sowie ein Erdalkalimetall. Die zytotoxische Wirkung der Supraleiter, u.a. $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ auf Rinder-Alveolarmakrophagen wurde von Wilczek (1991) intensiv untersucht. Untersuchungen zur Toxizität der Einzelbestandteile lassen vermuten, daß das Kupfer für die zytotoxischen Effekte die größte Bedeutung hat.

Der klassische, silikogene Feinstaub besteht aus Quarz (SiO_2), ein Silikat, das ein wesentlicher Bestandteil der Urgesteine Gneis und Granit ist (Schmidt, 1967, Silicosis and Silicate Disease Committee, 1988, Ziskind et al., 1976). Neben dem Quarz existieren in der Natur noch zwei weitere, ebenfalls dreidimensionale Kristallstrukturen der Kieselsäure: Tridymit und Cristobalit. Beide haben ebenfalls silikogenen Charakter. Unter medizinischen Gesichtspunkten spielen sie aufgrund ihrer sehr begrenzten geologischen Verbreitung nur eine untergeordnete Rolle (Silicosis and Silicate Disease Committee, 1988). Bei allen drei kristallinen Modifikationen bilden die Silizium- und Sauerstoffatome ein Atomgitter, in dem jedes Siliziumatom mit vier Sauerstoffatomen verbunden ist (Christen, 1977).

In-vivo und in-vitro-Untersuchungen zur Pathogenese der Silikose konzentrieren sich in erster Linie auf die Reaktion der Alveolarmakrophagen (AM) durch die Quarzstäube.

Allgemein hat sich die Auffassung durchgesetzt, daß eine Schädigung der AM durch den Quarzstaub eine der Voraussetzungen für die silikotische Fibroseentwicklung ist (Allison et al., 1966, Münch et al., 1971). Diesen Zellen wird wegen ihrer phagozytotischen und sekretorischen Aktivitäten in den Alveolen die größte Aufmerksamkeit geschenkt.

In den Alveolen reagieren auch die Epithelzellen auf die eingedrungenen Quarzpartikel. Die Pneumozyten Typ I werden teilweise zerstört (Hilscher et al., 1987). In-vivo Studien belegen eine verstärkte Proliferation der Typ II Pneumozyten und deren gesteigerte Surfactant-Produktion, die sich in einer Lungen-Lipidose manifestieren kann (Adachi et al., 1989, Heppleston, 1984, Miller et al., 1990).

Der Surfactant kleidet die Oberflächen der Alveolen aus. Er vermindert die Oberflächenspannung der Wasser-Luft-Grenzschicht und verhindert so den expiratorischen Kollaps der Alveolen. Surfactant besteht zu 10% aus Proteinen und zu 90% aus Lipiden. Unter den Lipiden ist Dipalmitoyl-Lezithin (syn. Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin) mit über 50% der wichtigste Bestandteil (Fagan & Keough, 1988, Miles et al., 1988, Tierney, 1989).

Das primäre Ereignis im pathogenetischen Prozess ist, nach Inhalation der Quarzstäube und deren Eindringen in die Peripherie der Lunge, die Phagozytose der Partikel durch die AM (Hilscher et al., 1987, Klosterkötter & Robock, 1975). Die Deposition der Partikel erfolgt in den Phagosomen, die anschließend mit den Lysosomen der Zellen fusionieren. In-vitro-Untersuchungen ergaben, daß die AM nach der Phagozytose der Quarzpartikel innerhalb weniger Stunden absterben (Pätzold, 1989). Dieser Zelltod bedingt die Freisetzung lysosomaler und

zytoplasmatischer Enzyme, aber auch die Freisetzung der aufgenommenen Quarzpartikel. Durch die Sekretion chemotaktisch wirksamer Substanzen werden weitere AM angezogen und damit ein Circulus vitiosus eingeleitet. Begleitend kommt es zur Produktion und Deposition von Kollagen und damit zu der beschriebenen Knötchenbildung (Allison et al., 1966, Heppleston, 1984, Richards & Curtis, 1984, Ziesche et al., 1985, Ziskind et al., 1976).

Der Mechanismus, der nach der Phagozytose der Quarzpartikel zum Absterben der AM führt, ist nach wie vor nicht bekannt.

Favorisiert wird die Ruptur der Phago-Lysosomenmembran durch eine Interaktion der freien Quarzoberfläche mit den Phosphatestergruppen der Membranphospholipide (Allison et al., 1966, Comoli, 1967, Hilscher et al., 1987). Lysosomen stellen das intrazelluläre Verdauungssystem aller eukaryotischen Zellen dar. Für diese Organellen sind mittlerweile etwa 50 saure Hydrolasen beschrieben worden, die beinahe alle Klassen von Makromolekülen hydrolysieren können (Bainton, 1981). Eine Ruptur der lysosomalen Membran würde somit einen intrazellulären Schädigungsprozess in Gang setzen, der den Zelltod herbeiführt. Kane et al. (1980) postulieren dagegen, daß das primäre Schadensereignis nicht die Lysosomenruptur ist. Vielmehr sei der Einstrom von Kalziumionen durch die ebenfalls geschädigte Zellmembran für den Zelltod der Makrophagen verantwortlich.

In-vivo werden die Quarzpartikel in den Alveolen von Dipalmitoyl-Lezitin (DPL) einem Hauptbestandteil des Lungensurfactants umkleidet, ehe sie von den AM phagozytiert werden. Pätzold (1989) konnte durch in-vitro-Untersuchungen zeigen, daß eine Vorbehandlung des Quarzes mit DPL Rinder-Alveolarmakrophagen bis zu 90 Stunden vollständig vor der zytotoxischen Wirkung des Quarzes schützt. Schutz vor der zytotoxischen Quarzwirkung (bis 20 Stunden) auf Rinder-Alveolarmakrophagen ist in-vitro auch durch die Zugabe von Phospholipiden, die direkt aus der Lungen-Lavageflüssigkeit isoliert werden können, gegeben (Schimmelpfeng, 1989).

Biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung der Lysosomen aus Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) und ihre Antwort auf die phagozytierten Quarzpartikel sind in der Vergangenheit von Pätzold (1989) durchgeführt worden. Danach kommt es in den RAM nach Inkubation mit Quarz zu einer drastischen Abnahme der lysosomalen Cathepsin B Gesamttätigkeit. Cathepsin B, ein Glycoprotein, ist eine saure Protease, die zu den wichtigsten elastinolytischen Enzymen gehört (Chapman & Stone, 1984). Weitere Untersuchungen zur Latenz und zu den Dichteigenschaften isolierter, quarzhaltiger Phago-Lysosomen

erbrachten keinen Hinweis auf eine verminderte Stabilität der Organellen. Auch mit elektronenmikroskopischen Methoden konnte Wilczek (1991) einen Austritt lysosomalen Materials aus den quarzhaltigen Organellen der RAM nicht nachweisen.

Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen an der humanen, promyelozytären Zelllinie HL-60. Diese Zellen, die noch weitgehendst undifferenzierten Stammzellen entsprechen, können mit dem Tumorpromotor TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) zu makrophagenähnlichen Zellen ausdifferenziert werden. Diese zeigen sich gegenüber der Wirkung der Quarzpartikel vollständig resistent. Nieder (1989) konnte weder mit biochemischen noch mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine zytotoxische Wirkung des Quarzes auf diese Zellen und deren Lysosomen nachweisen.

Eine klassische und weitverbreitete Methode, die zu Untersuchungen der Morphologie, Aktivität und Stabilität von Phagosomen und Lysosomen in Zellen eingesetzt wird, ist die Anfärbung dieser Organellen mit fluoreszierenden Vitalfarbstoffen (eine Übersicht geben Goren & Mor, 1988). So wird neben den fluoreszierenden Farbstoffen Lissamin Rhodamin und Lucifer Gelb überwiegend der Vitalfarbstoff Acridinorange (AO) bevorzugt zu Untersuchungen von Lysosomen und der Phagosomen-Lysosomen-Fusion in Makrophagen eingesetzt (Allison & Young, 1964, Capo et al., 1983, Goren & Mor, 1988, Kielian & Cohn, 1980).

In diesen Zusammenhang stellte sich eine der Aufgaben der vorliegenden Arbeit. Die Vitalfärbung der RAM mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange und somit die Anwendung einer fluoreszenzmikroskopischen Methode sollte ergänzende Aspekte zur Quarztoxizität auf den lysosomalen Apparat der RAM liefern. Dabei war insbesondere der DPL-Schutzeffekt und der Einfluß von extrazellulären Kalziumionen auf die Reaktion der RAM nach Quarzphagozytose zu erfassen.

Der Vitalfarbstoff AO wird von den Lysosomen lebender Zellen aufgrund ihres niedrigen pH-Wertes selektiv angereichert. Unter UV-Bestrahlung sind die Lysosomen in den Zellen anhand ihrer rot-orangen Fluoreszenz zu identifizieren. Das Zytoplasma der angefärbten Zellen, der Kern und die Mitochondrien fluoreszieren grün (Darzynkiewicz & Kapuscinski, 1990). Veränderungen in der Fluoreszenz dieser Kompartimente erlauben somit Rückschlüsse auf eine eventuell verminderte Stabilität der lysosomalen Membran (Decker et al., 1985).

Neue Impulse erhielt die Silikose-Forschung durch die Entdeckung der Zytokine. Diese Mediatoren, die hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen sezerniert werden, vermitteln eine Vielzahl von entzündlichen und immunologischen Prozessen.

Untersuchungen der Lungenlavage-Flüssigkeiten quarz-exponierter Menschen und Ratten ergaben im Differential-Zellbild eine drastische Zunahme an neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen (Begin et al., 1987, Lusardi et al., 1990, Miller, 1979).

Diese Befunde weisen darauf hin, daß der Fibroseentstehung ein initiales Stadium der Entzündung vorausgeht. Diese Entzündungsreaktionen werden durch den Kontakt der Quarzpartikel mit den AM und anderen Zellen eingeleitet und durch die Freisetzung von Mediatoren weiter vermittelt (Bowden, 1987, Hilscher et al., 1987).

Die Mediatoren die von den AM sezerniert werden können, umfassen u.a. die Zytokine Interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, den Tumor Nekrose Faktor- α , die "colony-stimulating-factors" (CSF) für die Granulozyten (G-CSF), für die Granulozyten und die Monozyten (GM-CSF) und für die Monozyten (M-CSF), den "Platelet-derived-growth-factor" (PDGF) und den "Transforming-growth-factor- β " (TGF- β , Kelly, 1990, Keshav et al., 1990).

Unter diesen Mediatoren sind die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1- α/β) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) am intensivsten untersucht worden. Die Aktivitäten von IL-1 und TNF- α sind sehr ähnlich:

Beide Zytokine stimulieren die Fibroblastenproliferation und die Kollagenproduktion der Fibroblasten (Elias & Reynolds, 1990, Elias et al., 1990). Beide wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Die Rekrutierung und Aktivierung von T-Lymphozyten wird hauptsächlich IL-1 zugeschrieben, während TNF- α u.a. für die Ausdifferenzierung von Monozyten und wiederum deren Freisetzung von IL-1 (α/β) verantwortlich ist (Le & Vilcek, 1987, Sibille & Reynolds, 1990).

Bisher ist nur wenig bekannt über die Induktion der Mediatorenfreisetzung aus Makrophagen durch mineralische Stäube und Metalle. Eine fibrogene Aktivität der Kulturüberstände von quarz-exponierten Ratten-Peritonealmakrophagen beschrieben schon 1967 Heppleston & Styles.

Die Arbeitsgruppe von Oghiso und Kubota (1986, 1987) zeigte in-vitro die IL-1 Freisetzung aus Hunde- und Ratten-AM nach Stimulation mit Quarz und Asbest. Diese Freisetzung war dosisabhängig und die Kulturüberstände induzierten zudem

die Proliferation von Fibroblasten und T-Zellen. Durch die Zugabe von Lipopolysacchariden (LPS) konnte die Mediatorenfreisetzung bei beiden Tierarten noch gesteigert werden (Oghiso et al., 1985). Auch ex-vivo-Studien an Ratten-AM belegten eine Il-1-Aktivität nach Inhalation von Asbest (Hartmann et al., 1984, Kagan et al., 1985).

Rinder-Alveolarmakrophagen setzen in-vitro nach Inkubation mit Quarz auch die Arachidonsäure-Metaboliten Thromboxan B₂ (TXB₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Leukotrien B₄ (LTB₄) frei. Von diesen Lipid-Mediatoren wirkt vor allem LTB₄ chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Monozyten (Englen et al., 1989).

In diesem Zusammenhang erschien es erfolgversprechend zu prüfen, ob die in unserem Labor gut charakterisierten RAM nach Inkubation mit Quarz und verschiedenen Metallverbindungen den fibrogenen und proinflammatorischen Mediator Tumor Nekrose Faktor- α sezernieren. Wie schon für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen beschrieben, sollte auch in diesen Experimenten der Einfluß der DPL-Vorbehandlung des Quarzes und zusätzlich der Einfluß der aus der Lungen-Lavageflüssigkeit isolierten Phospholipide Berücksichtigung finden.

Die Effekte des Tumor Nekrose Faktors wurden schon vor etwa hundert Jahren von William Coley beschrieben. Die Applikation eines bakteriellen Toxins (abgeleitet von *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens*, Coley's Toxin) führte bei Krebspatientenen zur Tumorregression (siehe hierzu DeForge et al., 1990, Herrmann, 1986). Die Identifizierung des TNF gelang 1975 Carswell und Mitarbeitern.

Während TNF- α von Makrophagen und Monozyten gebildet wird, erfolgt die Sezernierung von TNF- β (syn. Lymphotoxin) durch die T-Zellen (Wakefield et al., 1991). Humanes TNF hat ein Molekulargewicht von 17.000 Dalton und ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert (Beutler & Cerami, 1987). Als klassischer und wirksamster Stimulus für die in-vivo und in-vitro Freisetzung von TNF aus Makrophagen gelten die Lipopolysaccharide (LPS), Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien (Beutler & Cerami, 1987, Old, 1985, Rietschel et al., 1982).

Die biologischen Effekte von TNF sind vielseitig und komplex. Die immunomodulatorischen Aktivitäten von TNF zeigen sich in-vitro durch eine verstärkte Proliferation der T-Lymphozyten, in einer Aktivierung neutrophiler Granulozyten, einer Erhöhung der zytotoxischen Wirkung von Eosinophilen und der zytolytischen Funktion von aktivierten Makrophagen. Darüberhinaus induziert TNF in autokriner Wirkungsweise die Makrophagen/Monozyten zur Freisetzung

von IL-1, Platelet-activating-factor (PAF), Prostaglandin E₂ und zeigt zudem selbst auch eine antivirale Aktivität (DeForge et al., 1990, Patton et al., 1989, Schleuning & Munker, 1990).

TNF ist auch der Mediator des septischen Schocks. Blutdruckabfall, Störungen im Fett- und Glukosestoffwechsel und eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führen zum Tod des Organismus (Beutler & Cerami, 1988). Nach in-vitro-Applikation von TNF wird u.a. ein erhöhter Plasmaspiegel der Hormone Glucagon und Insulin beobachtet (Evans et al. 1989). Die Wirkung von TNF zeigt sich u.a. auch in Fieberschüben, der Resorption von Knochen und Knorpel, in einer Hemmung der Lipoprotein Lipase, in einem Anstieg der Akutphasen-Proteine und der Komplementfaktoren, einer Leukopenie sowie in einer lokalen Gewebsnekrose (Dinarello, 1989). Auch die kachektische Verfassung von Krebspatienten, die durch eine Abnahme der Gesamtkörper-Fett- und Proteinreserven im Körper charakterisiert ist, wird durch TNF vermittelt (Evans et al., 1989, Tracey et al., 1988)

Die multiplen Wirkungen von TNF sind direkt von der jeweils sezernierten Konzentration des Mediators abhängig. Geringe Sekretionsraten wirken sich fördernd auf die Gewebsneu- und umbildung aus und dienen der Infektabwehr. Die chronische und permanente Freisetzung hoher TNF-Konzentrationen im Organismus führt dagegen zu Kachexie und Tod (Wakefield et al., 1991).

Die Möglichkeiten der Isolierung und Kultivierung von Lungenzellen hat in den vergangenen Jahren große Fortschritte gemacht. Die Technik der bronchoalveolären Lavage erlaubt die Gewinnung einer fast reinen Population von AM, die so unter streng standardisierten Bedingungen in-vitro für inhalationstoxikologische Fragestellungen eingesetzt werden können (Müller-Quernheim & Strausz, 1988, Seemayer, 1985).

In unserem Labor werden seit einigen Jahren Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) für toxikologische Studien zur Quarzwirkung eingesetzt (Seidel et al., 1989). Die Isolierung und Kultivierung von RAM wurde zuerst von Fox (1973) beschrieben. Durch Interspeziesvergleiche konnte Schimmelpfeng (1989) zeigen, daß die Antwort der AM verschiedener Spezies (Rind, Hund, Ratte, Affe, Mensch) auf Quarzpartikel qualitativ gleich ist. Aus Rinderlungen können 1 bis 3×10^9 vitale AM pro Lunge isoliert werden. So steht für biochemische, morphologische und immunologische in-vitro-Untersuchungen ein genetisch homogenes Testmaterial zur Verfügung.

Zusammenfassend können die Ziele der Arbeit folgendermaßen formuliert werden:

1. Untersuchungen zum Zustand des lysosomalen Apparates von Rinder-Alveolarmakrophagen nach der Quarzphagozytose. Dazu sollten die RAM mit dem Vitalfarbstoff Acridinorange angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Begleitend dazu sollte die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH), des lysosomalen Enzyms N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) und des Gesamtproteins aus den quarzexponierten RAM bestimmt werden.
2. Prüfung des Einflusses der extrazellulären Kalziumionen auf den Zelltod der RAM nach Quarzphagozytose.
3. Untersuchungen zur Auswirkung der Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion auf die Quarztoxizität.
4. Analyse der TNF-Freisetzung aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit LPS, Quarz und Metallverbindungen.
5. Prüfung der Auswirkungen einer Oberflächenbehandlung von Quarz mit DPL auf die Lysosomenmorphologie und die TNF-Freisetzung.
6. Untersuchungen zur TNF-Freisetzung aus HL-60-Zellen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Isolierung der Rinder-Alveolarmakrophagen

Die Alveolarmakrophagen (AM) wurden post mortem durch bronchoalveoläre Lavage aus Rinderlungen gewonnen. Als Spendertiere dienten gesunde Rinder beiderlei Geschlechts, unbekannter Herkunft und Rasse.

Innerhalb einer Stunde nach dem Tod der Tiere wurden die Lungen 3-5 mal mit bis zu 20l physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) gespült. Die Lavageflüssigkeit wurde durch Mull und Nylongaze mit einer Maschenweite 100 μ m (Fa. E. Eckert, Seidengazefabrik, Waldkirch) filtriert und anschließend bei 250g/4°C für 10 min. zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich, Rotixa, RP). Die Zellsedimente wurden vereinigt und nochmals mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Geringfügige Kontaminationen mit Erythrozyten wurden durch vorsichtiges Abspülen der Sedimente mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt, deutlich verunreinigte Sedimente jedoch verworfen.

Die weitere Anreicherung der vitalen AM erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation. Jeweils 10 ml Zellsuspension wurden mit 15 ml Ficoll-Paque (Pharmacia) unterschichtet und für 20 min. bei 250g/4°C zentrifugiert. Die sich in der Trennschicht zwischen Ficoll und physiologischer Kochsalzlösung angereicherten AM wurden mit einer Pipette entnommen, nochmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in kaltem Standardmedium resuspendiert.

Die Bestimmung der Vitalität und Gesamtzellzahl erfolgte durch das Trypanblau-Ausschlußverfahren (0.5%, w/v Trypanblau in 0.9% NaCl, Sigma). Pro Lunge konnten 1 bis 3×10^9 vitale AM isoliert werden. Die Vitalitäten lagen in der Regel zwischen 90 und 95%. Zellpräparationen, die eine Vitalität von weit unter 90% aufwiesen, wurden verworfen.

2.1.1. Primärkultur der Rinder-Alveolarmakrophagen

Die AM wurden in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml Kulturmedium in Plastik Kulturschalen (Greiner) mit 3.5 cm Durchmesser ausgesät.

Als Medium wurde RPMI-1640 (Sigma) benutzt. Je nach Dauer und Art der in-vitro Kulturen wurde das Medium mit folgenden Zusätzen supplementiert:

2.1.2 Medienzusammensetzung für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

In-Vitro Kultur ≤ 20h:

RPMI-1640-Medium (Sigma)
50 Einheiten Penicillin/ml (Gibco)
50 µg Streptomycin/ml (Gibco)

In-Vitro-Kultur > 20h

RPMI-1640-Medium (Sigma)
200 µg Ampicillin/ml (Boehringer)
20 µg Tetracyclin/ml (Boehringer)
10 µg Amphotericin B/ml (Boehringer)
50 ml Foetales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert, 56°C, 30 min., Gibco)

Nach einer Inkubationsdauer von 2h (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium mit den nicht adhärenen Zellen entfernt und- je nach Versuchsansatz- durch frisches Kulturmedium oder durch mit den entsprechenden Testsubstanzen angereicherte Medien ersetzt.

Die Inkubationen mit den Staubsuspensionen wurden in serumfreiem Medium durchgeführt.

2.1.3. Medienzusammensetzung für die Untersuchungen zur TNF-Freisetzung

Für die Primärkultur der AM wurde RPMI-1640-Medium benutzt, das mit 50 Einheiten Penicillin/ml und 50 µg Streptomycin/ml supplementiert worden war. Die Inkubationen mit den zu testenden Substanzen wurden, unabhängig von der Inkubationsdauer, in folgendem Medium durchgeführt:

RPMI-1640-Medium (Sigma)
50 Einheiten Penicillin/ml (Gibco)
50 µg Streptomycin/ml (Gibco)
2% Foetales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert, 56°C, 30 min., Gibco).

Bei diesem FCS handelt es sich um eine besonders endotoxinarme Charge (Charge 6HO1) der Fa. Biochrom, Berlin. Der Endotoxingehalt liegt nach Angabe des Herstellers bei 0.183 ng/ml.

2.2. Inkubationen mit Staubsuspensionen und löslichen Metallverbindungen

2.2.1. Quarz (SiO₂)

Alle Versuche wurden mit Sikron F 600 (Pallas GmbH, Karlsruhe) durchgeführt, ein Quarzfeinstmehl, das durch mehrstufige Sichtung von Quarzmehlen gewonnen wurde. Die Röntgenstrukturanalyse (Prof. Politis, IEKP, KfK) zeigt, daß es sich um α -kristallines Siliziumdioxid mit einer Reinheit von 99.0% handelt.

Die chemische Analyse (Pallas GmbH) ergab:

SiO ₂ : 99.00%	CaO, MgO: 0.1%
Al ₂ O ₃ : 0.30%	Na ₂ O, K ₂ O: 0.2%
Fe ₂ O ₃ : 0.05%	

Die spezifische Oberfläche des Quarzes wurde mit dem Brunnaur-Emmett-Teller (BET)-Stickstoffadsorptionsverfahren (Fr.Dr.E. Drosselmeyer, IGT, KfK) ermittelt und beträgt 2.72 m²/g. Die Dichte des Quarzes beträgt 2,65 g/cm³.

Verwendet wurde eine Subfraktion des Quarzes, die mit Hilfe eines five stage cyclone (Southern Research Inst., Alabama) bei der Fa. Pallas hergestellt wurde und eine Partikelgrößenverteilung im Bereich von 0,92-1,6 μ m aufweist. Der Median des geometrischen Durchmessers beträgt 1,03 μ m, der AMAD 1,7 μ m.

Der Quarz wurde in den entsprechenden Konzentrationen (25 bis 500 μ g/ml) in Medium aufgenommen und anschließend für 2 min. auf Eis mit Ultraschall (Branson Sonifier B 15, Einstellung 50%) resuspendiert.

2.2.2. Phospholipid-Vorbehandlung von Quarz

Die Behandlung des Quarzes mit L- α -Phosphatidylcholin-Dipalmitoyl (DPL) erfolgte nach der Methodik von Wallace et al. (1985).

DPL (Sigma) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml RPMI-1640 mit Ultraschall emulgiert (2x je 5 min. auf Eis) und anschließend bei 300g 5 min. zentrifugiert, um nicht emulgierte DPL-Bestandteile zu entfernen.

Je 1 ml dieses Überstandes wurde mit 7,5 mg nativem Quarz resuspendiert (dies entsprach einer Konzentration von 1.33 mg DPL/mg Quarz) und für eine Stunde im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde bei 1000g 10 min. zentrifugiert, der DPL-vorbehandelte Quarz in Kulturmedium aufgenommen und

vor Inkubationsbeginn mit Ultraschall resuspendiert.

2.2.3. Anreicherung von Phospholipiden aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die erste Kochsalzspülung einer Rinderlunge wurde zunächst zentrifugiert (250g/4°C, 10 min.). Die resultierenden Überstände wurden bei 3000g für 10 min. zentrifugiert, um Zelltrümmer aus der Lösung zu entfernen.

Die Phospholipide wurden durch eine weitere Zentrifugation bei 190000g angereichert (4°C, 30 min., Kontron Ultrazentrifuge). Die Sedimente (Ausgangsvolumen 30 ml) wurden in 1,5 ml Medium aufgenommen.

In Untersuchungen von Dr. W. Bernhardt, Universitätsklinik Marburg (zitiert nach Schimmelpfeng, 1989) wurde ein Gehalt von $14 \pm 4 \mu\text{g}$ disaturierten Phosphatidylcholinen/ml Lavageflüssigkeit ermittelt, die zu 70-86% aus DPL bestanden. Die Endkonzentration in den Kulturansätzen betrug $7 \pm 2 \mu\text{g/ml}$.

2.2.4. Latex

Als biologisch inerte Testpartikel wurden Latexpartikel (Dow-Latex, Serva) in einer Konzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ Kulturmedium verwendet. Der Durchmesser der Latexpartikel betrug $1,1 \mu\text{m}$.

2.2.5. Titan(IV)oxid

Als Kontrollstaub wurde Titandioxid der Konfiguration Anatase (Aldrich) in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ Kulturmedium verwendet. Die Reinheit (lt. Hersteller) betrug 99,9%, die Dichte $3,9 \text{ g/cm}^3$.

2.2.6. Hochtemperatursupraleiter

Bei dem verwendeten Hochtemperatursupraleiter (HTS) handelt es sich um ein metallisches Mischoxid mit der Summenformel $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ (Fa. HITEC, Karlsruhe).

Der Hersteller gibt eine Reinheit von 99,999% an. Die Korngrößenverteilung liegt zwischen $1 \mu\text{m}$ und $5 \mu\text{m}$, die Dichte beträgt $6,32 \text{ g/cm}^3$.

Vor Versuchsbeginn wurde der HTS in den entsprechenden Konzentrationen in

Kulturmedium aufgenommen und zweimal je 5 min. auf Eis mit Ultraschall dispergiert.

2.2.7. Inkubationen mit Seltenen Erden

Als Seltene Erd-Metallverbindungen wurden die löslichen Chloride von Lanthan ($\text{LaCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, Merck) und Cer (CeCl_3 , Sigma) benutzt.

Aus den Chloriden wurde eine 10 mM Stammlösung in 0,9%-iger NaCl hergestellt (mit 1N HCL auf pH 3 eingestellt) und autoklaviert. Kurz vor Applikation wurden die Stammlösungen mit Kulturmedium auf eine Endkonzentration von 100 μM verdünnt.

2.3. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Acridinorange

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die AM in Kulturschalen (Greiner) ausgesät, die mit einem in 70% Ethanol sterilisiertem Deckglas bestückt worden waren.

Da sich mit zunehmender Dauer der in-vitro-Kultur das fluoreszenzoptische Bild der unbehandelten AM veränderte, wurden zwei verschiedene Zeitpunkte für den Beginn der Inkubationen mit den Staubsuspensionen gewählt:

1. 22h nach Gewinnung der Alveolarmakrophagen

Die AM wurden in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml ausgesät. Pro Vertiefung wurden insgesamt 2 ml Zellsuspension ausgesät. Nach einer Adhärenzzeit von 2h wurde der Überstand mit den nicht adhärenen Zellen verworfen und durch frisches Standardmedium ersetzt (s.2.1.2.).

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20h wurde wiederum der Kulturüberstand entfernt und durch die in Medium aufgenommenen Staubsuspensionen ersetzt.

2. 94h nach Gewinnung der Alveolarmakrophagen

Für die Experimente, bei denen die Staubexpositionen erst 94h nach der Lavage begannen, wurden die AM nach einer Inkubationszeit von 22h (s.oben) in Kulturmedium gehalten, das mit 10% FCS angereichert worden war (s.2.1.2.).

Nach einer Gesamt-Inkubationszeit von 94h wurde das serumhaltige Medium entfernt und durch Standardmedium ersetzt, das die Testsubstanzen enthielt.

Die Markierung der AM mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange (3,6-bis {dimethylamino}-acridinium chlorid) erfolgte mit geringen Modifikationen nach der Methodik von Kane et al. (1980).

Das Acridinorange (AO) wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml in phosphatgepufferten, physiologischer Kochsalzlösung (PBS) aufgenommen und maximal 2 Wochen bei 4°C gelagert.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde das Kulturmedium über den Zellen entfernt und durch die 37°C warme AO-Lösung ersetzt. Nach einer Färbedauer von 15 min. (37°C, 5% CO₂) wurde die AO-Lösung entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 15 min. mit frischem Standardmedium inkubiert. Dieser Schritt diente zur weiteren Anreicherung des Vitalfarbstoffes in den Lysosomen der Zellen. Das Deckglas mit den Zellen wurde dann umgekehrt auf einen Objektträger gelegt, mit Medium unterschichtet und mikroskopisch ausgewertet.

Zusätzlich wurden auch die abgelösten Zellen in den Kulturüberständen mit AO angefärbt. Hierzu wurden die Kulturüberstände bei 250g/4°C zentrifugiert und die Sedimente mit der angewärmten AO-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden noch zweimal mit PBS gewaschen und in Medium aufgenommen.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Leitz Diaplan, Filterblock I2, Anregungswellenlänge: 450-490 nm, Emissionswellenlänge: 530 nm). Photographiert wurde mit einer Photoausrüstung der Fa. Wild (Photoautomat MPS 45, Kamera MPS 51, Film: Kodak Ektachrome, 400 ASA).

2.4. Biochemische Untersuchungen

Parallel zu den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Freisetzungen des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) und des lysosomalen Enzyms N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG) aus den RAM gemessen. Bei den Untersuchungen zur Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion wurde zusätzlich die Aktivität des lysosomalen Enzyms Cathepsin B bestimmt. Bei allen Proben wurde auch der Gesamtproteingehalt gemessen.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Kulturüberstände abgenommen und bei 250g/4°C für 10 min. zentrifugiert. Der klare Überstand (Ü) wurde dekantiert, die Sedimente (ZÜ) in Medium resuspendiert und die adhärenen Zellen (Z) in Medium mit einem Zellschaber abgeschabt. Bis zur Messung der

Enzymaktivitäten wurden die Proben bei -20°C eingefroren. Vor Beginn der Messungen wurden die Proben zunächst auf Eis 15 sec. lang mit Ultraschall behandelt, um ein homogenes Untersuchungsgut zu erhalten.

2.4.1. Laktatdehydrogenase (LDH)

Reaktionsprinzip:



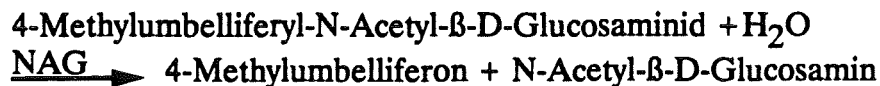
Die Bestimmung der LDH wurde mit dem Monotest LDH opt. (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Die Extinktionsabnahme wurde über 3 min. bei 340 nm im Beckmann DU-65 Spektrophotometer gemessen. Die LDH-Aktivität (Units/l) wurde aus der Extinktionsabnahme pro Minute errechnet.

Als interner Standard wurde das Kontrollserum Precinorm E (Boehringer, Mannheim) verwendet.

2.4.2. N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG)

Das lysosomale Enzym N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase wurde nach der von Andersen et al. (1982) beschriebenen fluoreszenzphotometrischen Methodik gemessen. Die Aktivität des Enzyms wurde anhand einer Endpunkteichkurve mit 4-Methylumbelliferon (Sigma) bestimmt.

Reaktionsprinzip:



Substrat:

4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid
Konz.: 1mM in Laktatpuffer

Laktatpuffer:

40 mM Na-Laktat
mit Milchsäure auf pH 3.7 eingestellt

Carbonat-Bicarbonat-Puffer:

Lösung A: 0.2 M Na₂CO₃
Lösung B: 0.2 M NaHCO₃
Lösung A mit Lösung B auf pH 10.5 einstellen

Reaktionsansatz:

10 µl Triton X-100 (10%, Serva)
100 µl Probe
100 µl Substrat

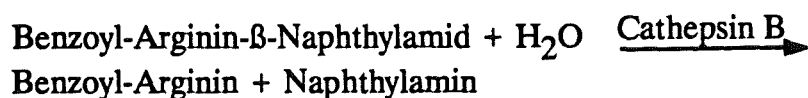
Der Reaktionsansatz wird gemischt und bei 37 °C im Wasserbad 30 min. inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird mit 1 ml des Carbonat-Bicarbonat-Puffers gestoppt.

Die Zunahme an 4-Methylumbelliferon wird bei einer Anregungswellenlänge von 371 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm gemessen (LS-5B Luminescence Spectrometer von Perkin Elmer).

2.4.3. Cathepsin B

Die Aktivität des lysosomalen Enzyms Cathepsin B wurde nach der von Andersen et al. (1982) beschriebenen fluoreszenzphotometrischen Methodik bestimmt. Die Aktivität des Enzyms wurde anhand einer Endpunkteichkurve mit β-Naphthylamin (Sigma) gemessen.

Reaktionsprinzip:



Substrat:

1 mM Benzoyl-Arginin- β -Naphthylamid, in 1 ml DMSO
lösen und in Phosphatpuffer aufnehmen

Phosphatpuffer:

Lösung A: 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Lösung B: 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
Lösung A mit Lösung B auf pH 5.2 einstellen

Zu 1000 ml Phosphatpuffer werden zugegeben:

1.2 mM EDTA
4.0 mM Cysteamin
mit Phosphorsäure auf pH 5.2 eingestellt

Reaktionsansatz:

10 μl Triton X-100 (1%)
100 μl Probe
100 μl Substrat

Der Reaktionsansatz wird gemischt und bei 37 °C im Wasserbad 60 min. inkubiert. Die Reaktion wird mit 1 ml des Carbonat-Bicarbonat-Puffers (2.4.2.) gestoppt. Die Zunahme an β -Naphthylamin wird bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 406 nm gemessen (LS-5B Luminescence Spectrometer von Perkin Elmer).

2.4.4. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Bio-Rad-Protein Assay (Bio-Rad, München) bestimmt.

Die Messung beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Comassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffes an Protein

Als Eichstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

2.5. Einfluß der extrazellulären Kalziumionen auf die Quarztoxizität

Die Untersuchungen zum Einfluß von extrazellulären Kalziumionen auf den Zelltod der AM nach Quarzphagozytose wurden mit geringen Abweichungen nach der Methodik von Kane et al. (1980) durchgeführt.

Nach einer Inkubationsdauer der AM von 94h (s.2.3.) wurden die Zellen in normalem, Ca^{2+} -haltigem RPMI-Medium inkubiert. Auch der Quarz (Konz.: 250 $\mu\text{g/ml}$) wurde in diesem Medium resuspendiert.

Ein Teil der Zellen wurde in Ca^{2+} -freiem RPMI (Gibco) aufgenommen. Die Inkubation der Zellen mit dem Quarz (Konz.: 250 $\mu\text{g/ml}$) wurde ebenfalls in dem Ca^{2+} -freien Medium durchgeführt.

Nach Inkubationszeiten von 2h, 4h und 20h wurden die AM mit Acridinorange (s.2.3.) angefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

Ferner wurde die Freisetzung der Enzyme LDH und NAG und der Gesamtproteingehalt der Proben bestimmt (s.2.4.).

2.6. Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion

Die Untersuchungen zur Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion in den AM wurden mit geringen Abweichungen nach der Methodik von Gordon et al. (1980) durchgeführt.

Als Hemmstoff wurde Ammoniumchlorid (NH_4Cl) in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt.

Nach einer Inkubationsdauer von 22h (s.2.3.) wurden die Zellen für 1h in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) kultiviert, das mit 10 mM NH_4Cl supplementiert worden war.

Zusammensetzung HBSS (Sigma):

$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$:	0.185g/l	NaCl :	8.0 g/l
MgSO_4 :	0.1 g/l	Na_2HPO_4 :	0.448 g/l
KCl :	0.4 g/l	K_2HPO_4 :	1.0 g/l
D-Glucose:	1.0 g/l		

Zu 1000 ml HBSS werden 0.35g/l NaHCO_3 zugesetzt und der pH-Wert auf 7.4 mit 1N HCl oder 1N NaOH eingestellt.

Die anschließende Inkubation der AM mit der Quarzsuspension (Konz.: 150 µg/ml) wurde in Standardmedium durchgeführt, das ebenfalls mit 10 mM NH₄Cl angereichert worden war.

Nach einer Inkubationszeit von 20h wurde die Vitalität der Zellen mit Trypanblau bestimmt und die Freisetzung des lysosomalen Enzyms Cathepsin B gemessen (s.2.4.3.).

2.7. Auswertung und Präsentation der fluoreszenzmikroskopischen und biochemischen Daten

Die Auswertung der mit AO angefärbten AM erfolgte durch die Beurteilung von mindestens 10 verschiedenen Blickfeldern. Es wurden von jedem Ansatz zweimal 250 Zellen ausgezählt und dabei nach folgenden fluoreszenzoptisch differenzierbaren Gruppen eingeteilt:

Kontroll-Zellen:

1. Kontrolle: nur rot fluoreszierende Lysosomen
AM, die nur rot fluoreszierende Lysosomen enthielten.
2. Kontrolle: rot und gelb fluoreszierende Lysosomen
AM, die neben rot fluoreszierenden Lysosomen auch gelb fluoreszierende Lysosomen enthielten.
3. Kontrolle: nur grün fluoreszierende Zellen
AM, die ausschließlich grün fluoreszierten und bis auf den Kern keinerlei intrazelluläre Strukturierung mehr erkennen ließen.

Dieser Zelltyp trat nur in den Kulturüberständen, niemals bei der adhären Population auf.

Zellen nach Quarzphagozytose:

1. Quarz: nur rot fluoreszierende Lysosomen
AM, die den phagozytierten Quarz in rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen eingeschlossen hatten. Die übrigen Lysosomen der Zellen fluoreszierten ebenfalls rot.

2. Quarz: rot und gelb fluoreszierende Lysosomen

AM, die den phagozytierten Quarz in rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen eingeschlossen hatten. Die Zellen zeigten neben weiteren rot fluoreszierenden Lysosomen zusätzlich gelb fluoreszierende Lysosomen, die niemals Quarz enthielten.

3. Quarz: nur grün fluoreszierende Zellen

AM, die ausschließlich eine intensive grüne Fluoreszenz aufwiesen. Der Quarz schien frei im Zytoplasma zu liegen. Zuweilen waren in diesen Zellen noch vereinzelte rot fluoreszierende Lysosomen zu erkennen.

Die Summe der jeweiligen ausgezählten fluoreszenzoptischen Erscheinungsbildern der AM wurde zu 100% gesetzt und der Berechnung der prozentualen Verteilung zugrunde gelegt.

Die Ergebnisse der biochemischen Messungen wurden als Prozentwerte aufgetragen.

Als Gesamtaktivität der Kontrolle wurde die Summe der Werte aus zellfreiem Kulturüberstand (Ü), Zellen im Kulturüberstand (ZÜ) und adhärennten Zellen (Z) gebildet.

Diese Werte wurden zu 100% gesetzt und davon die prozentuale Verteilung in den Proben berechnet. Bei verschiedenen Inkubationszeiten innerhalb eines Versuches wurde die 2h-Kontrolle für die prozentualen Verteilungen der Proben zu unterschiedlichen Inkubationszeiten zugrunde gelegt.

2.8. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen und HL-60-Zellen

2.8.1. Gewinnung TNF-haltiger Kulturüberstände von Alveolarmakrophagen

Die AM wurden nach Gewinnung und Reinigung der Zellen in der Standardkonzentration von 3×10^6 Zellen/ml in Plastik Kulturschalen (Greiner) ausgesät (s.2.1.3.).

Pro Vertiefung wurden 2 ml Zellsuspension ausgesät. Nach einer Adhärenzzeit von exakt 2h wurde der Überstand verworfen und durch die in Medium aufgenommenen Testsubstanzen ersetzt.

Folgende Stäube und Metallverbindungen wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die RAM zur TNF-Freisetzung zu stimulieren.

1. Lipopolysaccharid (LPS):

Als Standardstimulus für die TNF-Freisetzung aus den AM wurde das Lipopolysaccharid von Salmonella abortus equi (Sigma) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

2. Quarz:

Der native Quarz (s.2.2.1.) wurde in den Konzentrationen von 25, 50, 100, 150, 200, 250 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Medium verwendet.

3. Phospholipid-behandelter Quarz:

Der DPL-behandelte Quarz (s.2.2.2.) wurde in den Konzentrationen von 100, 250 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Medium getestet.

4. Quarz in Kombination mit Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit:

Der Quarz wurde zusammen mit den aus der Lavageflüssigkeit angereicherten Phospholipiden (s.2.2.3.) in den beiden Konzentrationen von 250 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Medium verwendet. Zusätzlich wurde auch die Lavageflüssigkeit auf ihre mögliche Stimulatioswirkung untersucht. Die konzentrierte Lavageflüssigkeit wurde 1:2 mit Medium verdünnt eingesetzt.

5. Latex:

Der biologisch inerte Testpartikel Latex (s.2.2.4.) wurde in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

6. Titan(IV)dioxid:

Titandioxid (s.2.2.5.) wurde in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Medium verwendet.

7. Hochtemperatursupraleiter (HTS):

Der Hochtemperatursupraleiter $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ (s.2.2.6.) wurde in den

Konzentrationen von 10, 50, 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Medium getestet.

Zusätzlich mußte ausgeschlossen werden, daß die zytotoxische Wirkung des HTS-Kulturüberstandes im TNF-Bioassay nicht auf einer Toxizität der gelösten Einzelbestandteile des HTS im Inkubationsmedium beruhte. Dazu wurde der HTS in den angegebenen Konzentrationen in Medium aufgenommen und im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 4h wurde das HTS-Medium-Gemisch bei 3000g 15 min. abzentrifugiert, der klare Überstand bei -20°C eingefroren und im TNF-Bioassay wie ein Kulturüberstand behandelt.

8. Lanthan und Cer:

Die Seltenen Erden, Lanthan und Cer (s.2.2.7.) wurden in der Konzentration von 100 μM verwendet.

Um eine mögliche Interferenz des lanthan- bzw. cerhaltigen Kulturüberstandes mit dem MTT-Test (s.2.8.6.) auszuschließen, wurde ein MTT-Test mit einer lanthan-bzw. cerhaltigen MTT-Lösung (Endkonzentration: 100 μM) durchgeführt. Zusätzlich wurde auch ein möglicher Einfluß der Seltenen Erden auf die zytotoxische Wirkung des TNF- α auf die L-929-Zellen ausgeschlossen.

Alle zu testenden Substanzen wurden sowohl allein als auch in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentration verwendet. Die Inkubationszeiten betragen 4h und 20h (37 °C, 5% CO₂).

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Kulturüberstände in sterile Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und bei 250g 15 min. zentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus). Die Überstände wurden dekantiert und aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

Bei einigen Untersuchungen wurde auch der TNF-Gehalt der mit LPS-stimulierten RAM bestimmt. Hierzu wurden die Überstände von den RAM entfernt (s.oben) und die adhärenen Zellen in den Kulturschalen in 2 ml Medium mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt. Das Untersuchungsgut wurde auf Eis 15 Sek. lang mit Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifer B 15, Einstellung 50%), die Zelltrümmer bei 3000g 15 min. abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und aliquotiert bei -20°C eingefroren.

Alle Proben wurden innerhalb von 3 Wochen auf ihren TNF-Gehalt hin untersucht.

2.8.2. Gewinnung TNF-haltiger Kulturüberstände von HL-60-Zellen

2.8.2.1. Kultivierung und Differenzierung von HL-60-Zellen

Die HL-60 Zellen wurden von Herrn Dr.H.Krug (IGT/KfK) zur Verfügung gestellt. Das Standardmedium für die Kultur der undifferenzierten HL-60-Zellen setzte sich wie folgt zusammen:

- 450 ml RPMI-1640-Medium (Sigma)
- 75 ml Foetales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert, 56 °C, 30 min., Gibco)
- 7,5 ml 200 mM L-Glutamin (Gibco)
- 5,0 ml MEM 100 (Non essential amino acid, Gibco)
- 5,0 ml 100 mM Natrium-Pyruvat
- 55 Einheiten Penicillin/ml (Gibco)
- 55 µg Streptomycin/ml (Gibco)

Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^6 Zellen in 20 ml Medium in Gewebekulturflaschen (Greiner) kultiviert (37°C, 5% CO₂) und alle drei bis vier Tage umgesetzt.

Der Tumorpromoter TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat, Sigma) wurde in einer Konzentration von 0.2 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Zur Ausdifferenzierung wurden die HL-60-Zellen in Standardmedium überführt, das mit TPA (Endkonzentration von 10 ng/ml) supplementiert worden war. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 6×10^6 Zellen/2ml in Gewebekulturschalen (Greiner) ausgesät und 48h inkubiert (37 °C, 5% CO₂).

2.8.2.2. Gewinnung TNF-haltiger Kulturüberstände von differenzierten HL-60-Zellen

Nach einer Differenzierungsdauer von 48h (s.2.8.2.1.) wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und für 48h durch das HL-60-Standardmedium ersetzt.

Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen (Quarz, TiO₂, Latex). Die einzelnen Stäube wurden sowohl allein als auch in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen

appliziert. Als Inkubationsmedium wurde das für die Stimulierung der AM angesetzte Medium (2.1.3.) benutzt. Die Inkubationszeiten betragen 4h und 20h. Die Gewinnung der Überstände und Zellhomogenate erfolgte wie für die AM beschrieben (s.2.8.1.).

Zusätzlich wurde auch die TNF-Freisetzung und der TNF-Gehalt aus den undifferenzierten HL-60-Zellen bestimmt. Hierzu wurden die HL-60-Zellen in einer Dichte von $6 \times 10^6/2\text{ml}$ in Gewebekulturschalen ausgesät und 48h inkubiert (37°C , 5% CO_2). Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (250g, 15 min.) und der Kulturüberstand aliquotiert eingefroren. Die Zellsedimente wurden mit der entsprechenden Mediummenge resuspendiert. Die weitere Gewinnung der TNF-haltigen Zellhomogenate erfolgte wie für die RAM beschrieben (s.2.8.1.).

2.8.3. Der TNF-Bioassay

Der TNF-Bioassay wurde nach der von Ruff & Gifford 1981 etablierten Methode durchgeführt. Dieser Bioassay macht sich die zytotoxische Wirkung des Tumor Nekrose Faktor auf die Fibroblasten-Zelllinie L-929 zunutze.

2.8.3.1. Kultivierung der L-929-Zellen

Die L-929-Zellen, (ATCC CCL1, NCTC clone 929) eine adhärent wachsende murine Tumorzelllinie wurden 1948 von Sanford et al. etabliert. Der L-Zell-Stamm ist einer der ersten Zellstämme, die in kontinuierlicher Kultur gehalten werden konnten und der Klon 929 gilt als der erste Zellklon überhaupt.

Die L-929-Zellen stammen aus normalen subkutanem Binde- und Fettgewebe von 100 Tage alten $\text{C}_3\text{H}/\text{An}$ Mäusen und gelten als klassische Zielzellen für den TNF-Bioassay.

Die L-929-Zellen wurden aus dem Institut für Angewandte Zellkultur (Prof.Dr.T.Lindl), München bezogen. Das Standardmedium für die Kultur der L-929-Zellen setzte sich wie folgt zusammen:

- Dulbecco's Medium (Sigma)
- 50 Einheiten Penicillin/ml (Gibco)
- 50 μg Streptomycin/ml (Gibco)
- 10% Foetales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert, 56°C , 30 min., Gibco)

Als Anzuchtgefäße dienten Gewebekulturflaschen von Greiner (50 bzw. 250 ml). Bei Konfluenz der adhärent wachsenden Zellen wurde der Zellrasen durch Trypsinbehandlung (0,25% Trypsin, Gibco) von den Kulturflaschen gelöst, die Zellen einmal in Medium gewaschen und in einer Verdünnung von 1:5 in neue Kulturflaschen überführt.

2.8.3.2. Kryokonservierung der L-929-Zellen

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro ml Einfriermedium in Kryoröhrchen (Nalgene) eingefroren.

Das Einfriermedium bestand aus Standardmedium, dem Dimethylsulfoxid (DMSO, Seva) in einer Endkonzentration von 10 Vol.% zugegeben worden war. Die Zellen wurden zunächst in einem Styroporbehälter für 24h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen geschah im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurden die Zellen sofort in Kulturflaschen mit angewärmten Medium überführt. Ein Mediumwechsel nach 24h entfernte nicht adhärente Zellen und Reste des DMSO-haltigen Einfriermediums.

2.8.3.3. Wachstum der L-929-Zellen

Die L-929-Zellen zeigen in der logarithmischen Wachstumsphase maximale Sensitivität gegenüber TNF (Ruff & Gifford, 1981). Es wurden mehrere Wachstumskurven mit unterschiedlichen Zellzahlen erstellt und die Kulturen (je zwei Ansätze) über 5 Tage beobachtet.

Als besonders geeignet erwiesen sich Kulturen, die mit einer Ausgangsdichte von 1×10^5 Zellen pro 5 ml und pro Kulturflasche (50 ml) angesetzt worden waren. Diese Kulturen konnten nach 3 bzw. 4 Tagen geerntet und für den Bioassay eingesetzt werden.

2.8.3.4. Test auf Mykoplasmen

In regelmäßigen Abständen wurden die L-929-Zellen durch Fluorochromierung mit DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) auf Kontamination durch Mykoplasmen untersucht. Dieser Test beruht auf der Anfärbung der Mykoplasmen-DNA mit dem speziell an DNA bindenden Fluorochrom DAPI.

Jeweils 0.2 ml der DAPI-Stammlösung (5 µg/ml in Aqua.dest, Serva) werden mit 9.8 ml Methanol gemischt. Ein zu 70% konfluenter Zellrasen von L-929-Zellen wurde einmal mit PBS und einmal mit dem DAPI-Methanolgemisch gewaschen. Nach einer Inkubation von 15 min. bei 37 °C im Brutschrank mit dem DAPI-Methanolgemisch erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Mikroskop: Leitz Diaplan, Filterblock A, Anregungswellenlänge: 340 nm, Emissionswellenlänge: 488 nm).

Als Positivkontrollen wurden Dauerpräparate eines Mykoplasmen-Testkits (Biochrom, Berlin) herangezogen.

2.8.4. Die Durchführung des TNF-Bioassays

Für den TNF-Bioassay wurden die L-929-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (s.2.8.3.3.) von den Kulturflaschen durch Trypsinbehandlung abgelöst.

Die Zellen wurden einmal in Medium gewaschen und in einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/120 µl/Vertiefung in 96er-Mikrotiterplatten (Greiner) ausplattiert. Diese Zellzahl bildete nach einer Adhärenzzeit von 20 bis 24h (37 °C, 5% CO₂) einen konfluenten Zellrasen.

Anschließend wurde das L-929-Kulturmedium durch die zu testenden Proben ersetzt. Die eingefrorenen Kulturüberstände und Zellhomogenate wurden am Versuchstag bei Raumtemperatur aufgetaut und in logarithmischen Schritten seriell verdünnt (bis 1:10³). Zum Verdünnen wurde das Standardmedium für die Kultur der AM benutzt (s.2.1.3.).

Jeweils 100 µl der entsprechenden Probe wurde in die Vertiefungen der 96er-Mikrotiterplatte pipettiert. Die erste senkrechte Reihe der Vertiefungen wurde bei allen Versuchen und auf jeder Platte als Kontrolle mitgeführt und dementsprechend mit jeweils 100 µl Medium (s.2.1.3.) beschickt.

Die zweite senkrechte Reihe der Vertiefungen auf der Platte erhielt je 100 µl der unverdünnten Probe, die Vertiefungen der dritten senkrechten Reihe entsprechend 100 µl der 1:10 verdünnten Probe, u.s.w. Die fünfte Reihe wurde mit der höchsten Verdünnung (1:10³) des zu testenden Untersuchungsgutes beschickt. Pro Platte wurden entweder 4 (n=4) oder 8 (n=8) Replikate der entsprechenden Verdünnung angesetzt.

Zusätzlich erhielten alle Vertiefungen je 100 µl Medium, das mit Actinomycin D (Sigma) in einer Konzentration von 2 µg/ml Medium supplementiert worden war.

Actinomycin D, ein Inhibitor der Transkription verhindert das weitere Wachstum der L-929-Zellen und verstärkt so den zytostatischen bzw. zytotoxischen Effekt des TNF auf die Zielzellen.

Nach einer Inkubationszeit von 20h (37°C, 5% CO₂) wurden die Überstände durch Ausschlagen der Platten entfernt und die Anzahl der überlebenden L-929-Zellen spektrophotometrisch bestimmt.

Zur Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung der Proben auf die L-929-Zellen wurde der MTT-Test (2.8.6.) herangezogen. Zur Validierung dieses Testes wurde bei einigen Untersuchungen zusätzlich die Neutralrotmethode verwendet (2.8.7.).

2.8.5. Standardisierung des TNF-Bioassays mit rhu-TNF- α

Die Standardisierung des TNF-Bioassays wurde mit human rekombinatem TNF- α (rhu-TNF- α) durchgeführt.

Das Lyophilisat (Reinheit >95 %; lt. Hersteller, Boehringer Mannheim) wurde in Medium verdünnt (Endkonzentration: 5 ng/ml), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für den Bioassay (s.2.8.4.) wurden die TNF-Aliquots seriell in logarithmischen Schritten verdünnt. Die getesteten Konzentrationen lagen im Bereich zwischen 2,5 ng/ml und 0,25 pg/ml Medium.

2.8.6. Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung mit MTT

Die Durchführung des MTT-Testes zur Quantifizierung der überlebenden L-929-Zellen wurde mittels einer Kombination der Methodiken von Denizot & Lang (1986), Kasugai et al. (1990) und Mosman (1983) erreicht.

Der MTT-Test mißt die Aktivität der mitochondrialen, succinatabhängigen Dehydrogenasen lebender Zellen. Der Tetrazoliumring des schwach gelben 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) wird von den Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen und es entsteht das in Dimethylsulfoxid (DMSO) lösliche, dunkelblaue Formazan, dessen Intensität photometrisch bestimmt wird.

Das MTT (Sigma) wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gelöst, sterilfiltriert und maximal 2 Wochen bei 4 °C gelagert. Diese Stammlösung wurde vor Inkubationsbeginn 1:10 mit RPMI-1640-Medium (ohne FCS) verdünnt.

In jede Vertiefung der zuvor ausgeschlagenen Mikrotiterplatte wurden 200 μ l dieses MTT-Medium-Gemisches pipettiert. Eine leere senkrechte Reihe erhielt ebenfalls 200 μ l der Farbstofflösung und wurde als photometrischer Leerwert mitgeführt. Die Platten wurden für exakt zwei Stunden (37°C, 5% CO₂) inkubiert, anschließend bei 250g 5 min. zentrifugiert (Hettich, Rotixa RP mit Mikrotiterplattenrotor) und der Überstand entfernt.

Das Formazan wurde pro Vertiefung in 100 μ l DMSO (Serva) aufgenommen und die Platten auf einem Schüttler (IKA-Schüttler, MTS 2) 3 min. lang bewegt. Die Absorption wurde auf einem ELISA-Reader (Titertek Multiskan Plus) bei einer Wellenlänge von 550 nm gegen DMSO gemessen.

Das Absorptionsmaximum von 550 nm des in DMSO gelösten Formazans war zuvor photometrisch bestimmt worden.

Die zytotoxische Wirkung der untersuchten Proben in ihrer entsprechenden Verdünnung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{Ex. Kontrolle} - \text{Ex. Probe}}{\text{Ex. Kontrolle}} \times 100$$

(Ex. = Extinktion)

Eine Eichkurve belegte die Linearität dieses Testes zwischen der eingesetzten Zellzahl und der Absorption des in DMSO gelösten Formazans.

2.8.7. Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung mit Neutralrot

Die Neutralrotmethode basiert auf der Inkorporation des Vitalfarbstoffes in die Lysosomen lebender Zellen und wurde mit geringen Modifikationen nach der Methodik von Borenfreund (1984) etabliert.

Von dem Neutralrot (Serva) wurde eine 0,4%ige (w/v) wässrige Lösung hergestellt und autoklaviert. Etwa 18 bis 20h vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1:80 mit Medium (s.2.1.3.) verdünnt (Endkonzentration 50 μ g/ml) und in sterilen Zentrifugenröhrchen im Wasserbad bei 37°C im Dunkeln vorinkubiert. Diese Lösung wurde kurz vor Gebrauch bei 3000g 15 min. zentrifugiert, um Präzipitate des ungelösten Farbstoffes zu sedimentieren.

Pro Vertiefung wurden 100 μ l des Farbstoffes in die ausgeschlagene Mikrotiterplatte pipettiert. Eine leere senkrechte Reihe wurde ebenfalls mit der

Neutralrot-Lösung beschickt und diente als photometrischer Leerwert.

Nach einer Inkubationszeit von 3h (37°C, 5% CO₂) wurden die Platten bei 250g 5 min. zentrifugiert, das Neutralrot-Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Der Farbstoff wurde mit je 100 µl eines Ethanol/Eisessiggemisches (1.0 ml Eisessig in 100 ml 50% Ethanol) aus den Zellen extrahiert. Die Platten wurden 15 min. auf einem Schüttler bewegt und die Absorption bei 550 nm gegen das Eisessig-Ethanolgemisch auf einem ELISA-Reader gemessen.

Für die Zytotoxizitätsberechnung wurde die gleiche Formel wie bei dem MTT-Test angewandt (s.2.8.6.).

2.8.8. Neutralisierung der zytotoxischen Wirkung mit einem humanen monoklonalen Antikörper

Zur Neutralisierung der zytotoxischen Wirkung der Kulturüberstände wurde Anti-TNF- α aus Maus-Maus-Hybridzellen (Klon 195) der IgG3-Subklasse (Boehringer, Mannheim) benutzt. Der neutralisierende Antikörper wurde in sterilem Aqua bidest. gelöst und in seriellen logarithmischen Verdünnungen (200 µg/ml bis 0,2 ng/ml) mit einem Kulturüberstand von LPS-stimulierten RAM zugesetzt (je 10 µl des verdünnten Antikörpers plus 90 µl des Kulturüberstandes).

Die Neutralisation wurde im TNF Bioassay (s.2.8.4.) gemessen.

2.8.9. Auswertung und Präsentation der Daten zur TNF-Freisetzung

Aus den Absorptionen (n=8 bzw. n=4) im MTT-Test (s.2.8.6.) wurden Zytotoxizitäten der Proben in ihren Verdünnungsstufen berechnet und als Zytotoxizitätskurven (arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardfehlern) dargestellt. Da die Meßschwankungen z.T. sehr gering sind, gehen sie in den Symbolen auf.

Zusätzlich wurde als vereinfachte Auswertung und Präsentation der TNF-Freisetzung die "AREA UNDER THE CURVE"-Methode (AUC-Methode nach Houde & Arora, 1990) angewandt.

Durch Verwendung der Trapezregel wurde die Fläche unter der Zytotoxizitätskurve einer Probe durch numerische Teilintegration bestimmt.

Aus den Zytotoxizitäten der einzelnen Verdünnungsstufen einer Probe wurden nach folgender Formel die einzelnen Trapeze berechnet:

$$\text{Trapez} = (r_1 + r_2)/2$$

Dabei bedeuten r_1 und r_2 jeweils die Zytotoxizitäten zweier aufeinanderfolgender, in logarithmischen Schritten verdünnter Proben. Da im TNF-Bioassay pro Probe immer 4 Verdünnungsstufen ausgemessen wurden, konnten insgesamt 3 Trapeze pro Probe berechnet werden.

Die Gesamtfläche unter der Zytotoxizitätskurve wurde durch Addition der jeweils 3 korrespondierenden Trapeze bestimmt und als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC, arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardfehlern) dargestellt.

In vielen Versuchsansätzen konnte die maximale TNF-Freisetzung der RAM durch Applikation von LPS erreicht werden. Dieser Wert entspricht der Antwort der RAM auf einen Standardstimulus. Um die Reaktion der AM nach Inkubation mit den verschiedenen Stäuben und Metallverbindungen mit dieser Standardantwort vergleichen zu können, wurde der AUC-Wert der LPS-Antwort als 100 % gesetzt. Davon wurden die prozentualen Anteile der AUC-Werte der einzelnen Proben der zeitlich entsprechenden Inkubationen mit den Staubsuspensionen und Metallverbindungen berechnet.

Anhand des T-Testes nach Student wurden die Mittelwerte der AUC-Berechnung auf statistisch abzusichernde Unterschiede hin geprüft. Die Signifikanzschranke wurde auf $2p < 0,05$ festgelegt.

Aus den Konzentrations-Wirkungskurven für rhu-TNF- α wurde mit Hilfe der Probit-Analyse (Computerprogramm: S.Uhlig, Hardware- Software- Brainware, Konstanz) für den MTT-Test und die Neutralrotmethode die entsprechenden letalen Konzentrationen (LC_{50}) ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an Rinder- Alveolarmakrophagen nach Vitalfärbung mit Acridinorange

Die Anfärbung der Alveolarmakrophagen (AM) mit dem Vitalfarbstoff Acridinorange (AO) führte zu einer grünen Fluoreszenz des Zytoplasmas (Abb. 1 und 2). Der meist peripher gelegene Kern der Zelle fluoreszierte ebenfalls intensiv grün und war in dieser Fluoreszenzintensität von dem dunkleren Zytoplasma zu unterscheiden. Den größten Teil des Zytoplasmas nahmen die Lysosomen ein, die anhand ihrer intensiven roten Fluoreszenz zu identifizieren waren. In den meisten Zellen waren die Lysosomen gut als einzelne Organelle zu erkennen. Oft lagen die Lysosomen auch als kompakte Gruppe von Organellen dicht beieinander (Abb. 3 und 4).

Zusätzlich zu den rot fluoreszierenden Lysosomen traten in vielen Zellen auch Organelle auf, die eine gelbliche Fluoreszenz zeigten (Abb. 1 und 2). Durch eine subzelluläre Fraktionierung der AM (Methodik nicht aufgeführt, siehe Pätzold, 1989), und Anfärbung der Mitochondrien-Lysosomen-Fraktion mit AO, konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den gelb fluoreszierenden Organellen auch um Lysosomen handelte.

Diese gelb fluoreszierenden Lysosomen wurden verstärkt bei den AM beobachtet, die direkt nach der Gewinnung der Zellen für die Experimente eingesetzt worden waren (Abb. 1 und 2). Die Zellpopulationen zeigten sich insgesamt sehr heterogen, sowohl in Bezug auf die Anzahl der Lysosomen als auch auf deren Fluoreszenz.

So konnten bei den Zellen einer Population in insgesamt 39% der Makrophagen sowohl rote als auch gelb fluoreszierende Organellen beobachtet werden. Es traten aber auch Zellpräparationen aus anderen Lungen auf, bei denen 80% der Zellen beide fluoreszenzoptisch unterscheidbare Lysosomen enthielten.

Interessanterweise etablierten sich bei längeren Inkubationszeiten (ab 94h) Zellpopulationen, die fast nur noch rot fluoreszierende Lysosomen enthielten (Abb. 3 und 4). Nach der Phagozytose von Quarzpartikeln nahm in vielen Fällen die Anzahl der Zellen zu, die diese gelb fluoreszierende Lysosomen aufwiesen (Abb. 7 und 10). Um diesen Aspekt zu quantifizieren, wurden viele Untersuchungen erst nach längeren in-vitro Kulturen der AM angesetzt. Die in-vitro Kultivierung der AM vor Quarzzugabe betrug 22h bzw. 94h (s.2.3.). Eine Kulturdauer von 94h erbrachte in vielen Fällen eine fluoreszenzoptisch

einheitliche (nur rot fluoreszierende Lysosomen) Ausgangspopulation (Abb. 3 und 4).

Nach der Quarzphagozytose wurden die Quarzpartikel grundsätzlich in den rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen wiedergefunden (Abb. 5, 6, 8, 9, 10 und 11). Schon nach kurzen Inkubationszeiten (2h) und geringen Quarzkonzentrationen hatten alle AM zumindest einen Quarzpartikel phagozytiert. Die meisten Zellen hatten jedoch, unabhängig von der Dauer der Inkubationszeit, eine große Anzahl von Quarzpartikeln aufgenommen (Abb. 5, 6, 8, 9, 10 und 11). Niemals konnten Quarzpartikel in den gelb fluoreszierenden Lysosomen beobachtet werden.

Nach der Phagozytose der Quarzpartikel wurde ein weiterer Zelltypus gefunden. Diese Zellen wiesen im fluoreszenzoptischen Bild eine ausschließlich intensive grüne Fluoreszenz auf. Bis auf den hellgrün fluoreszierenden Kern waren keine weiteren Organelle erkennbar. Die phagozytierten Quarzpartikel lagen scheinbar frei im grün fluoreszierenden Zytoplasma der einzelnen Zellen (Abb. 6 und 12).

Nach Kane et al. (1980) ist das fluoreszenzoptische Erscheinungsbild dieser Zellen auf die intrazelluläre lysosomale Ruptur nach der Quarzphagozytose zurückzuführen. Doppelmarkierungen der AM mit AO und Trypanblau zeigten, daß diese Zellen noch vital waren.

Einige dieser Zellen erschienen regelrecht degranuliert und es konnte unter den grün fluoreszierenden AM oft noch Zellen beobachtet werden, die noch wenige, rot fluoreszierende (sowohl mit als auch ohne eingeschlossene Quarzpartikel) Lysosomen enthielten (Abb. 6, 9, 10, 14, 15 und 17).

Bei diesen Kulturen fielen oft große mehrkernige Zellen auf. Bis auf die hellgrün fluoreszierenden Kerne waren keine weiteren Organelle erkennbar (Abb. 12 und 13).

3.1.1. Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose: Zeitabhängigkeiten

In den Tabellen 1 bis 4 sind die fluoreszenzoptischen Reaktionen der RAM auf den Quarz, den DPL-vorbehandelten Quarz und auf die Latexpartikel in Abhängigkeiten der verschiedenen Inkubationszeiten aufgeführt. Alle Tabellen (Tab. 1 bis 7) zeigen die Reaktion der AM aus jeweils einer Lunge.

Die AM wurden nach einer in-vitro Kulturdauer von 22h bzw. 94h mit den Stäuben inkubiert und nach Ablauf der einzelnen Inkubationszeiten mit AO angefärbt und ausgewertet (s.2.3.).

Wie Tabelle 1 zeigt, wiesen nach einer Inkubationszeit von 2h 47% aller unbehandelter Kontroll-AM nur rot fluoreszierende Lysosomen auf. Bei 53% der Zellen waren sowohl rot als auch gelb fluoreszierende Organellen erkennbar.

Nach der Phagozytose des Quarzes (2h) waren bei noch 25% der Zellen die rot fluoreszierenden Lysosomen zu beobachten. Der Anteil der AM mit den gelb fluoreszierenden Lysosomen blieb im Vergleich zur Kontrolle (49%) fast konstant. 26% der Zellen wiesen die ausschließlich grüne Fluoreszenz auf und zeigten somit eine durch den Quarz induzierte lysosomale Veränderung. Der Quarz lag scheinbar frei im Zytoplasma der Zellen, zumindest war er nicht mehr in den rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen eingeschlossen (Abb. 5, 8 und 11).

Nach Inkubationszeiten von 4h stieg bei den unbehandelten Kontroll-Zellen der Anteil der AM mit den gelb fluoreszierenden Lysosomen auf 62% an. Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm dieser Anteil wieder ab und zwei Drittel der Population zeigten die ausschließlich rot fluoreszierenden Lysosomen.

Die Phagozytose des Quarzes führte hier ebenfalls zur Entstehung der grün fluoreszierenden Zellen (27%). Im weiteren Verlauf der in-vitro-Kultivierung nahm auch dieser Anteil der grün fluoreszierenden Zellen ab, es überwogen die AM, die den Quarz in rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen eingeschlossen hatten (Abb. 5).

Bei den Zellen, die aus den Kulturüberständen isoliert worden waren (Werte in Klammern), fiel auf, daß auch bei den unbehandelten AM die grün fluoreszierenden Zellen auftraten (Tab. 1). Bei der 2h-Kontrolle wiesen etwa zwei Drittel der vorgefundenen und noch vitalen Zellen diesen Typus auf. Diese unbehandelten, aber ebenfalls grün fluoreszierenden Zellen wurden niemals bei der adhären, unbehandelten Kontroll-Population beobachtet.

Nach einer Quarzexposition von 2h wurden 51% grün fluoreszierender Zellen im Überstand vorgefunden, nach 4h noch 29%. Diese Zellen lösten sich bevorzugt von den Kulturschalen ab und es war davon auszugehen, daß dieser Zelltypus anschließend im Kulturüberstand abstarb.

Nach Inkubationszeiten von 30h konnten bei den Kontrollen keine Zellen im Überstand gefunden werden. Der Überstand der quarzexponierten Zellen (30h) wies nur noch Zelltrümmer auf.

Nach langen Inkubationszeiten (48h und 55h) mit Quarz wurden in den Überständen Zellen beobachtet, die verstärkt die gelb fluoreszierenden Lysosomen aufwiesen. Diese Organellen enthielten grundsätzlich niemals Quarzpartikel.

Parallel zu den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an den AM, wurde die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) und

des lysosomalen Enzyms N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) sowie der Gesamtproteingehalt der unbehandelten und quarzexponierten AM bestimmt. Wie die Abb. 21a bis 21c zeigen, kam es mit zunehmenden Inkubationszeiten zu einer deutlichen Freisetzung von LDH, NAG und des Gesamtproteins in die Kulturüberstände. Auch die Kontrollen setzten mit zunehmender Kulturdauer Enzyme und Protein in die Überstände frei. Insgesamt stieg im zeitlichen Verlauf der Inkubationen bei den unbehandelten Kontroll-Zellen und den quarzinkubierten AM die Gesamtmenge an LDH an, während die Gesamtmenge an NAG und Protein konstant blieb.

Ein anderes Bild der Reaktivität der AM nach Quarzphagozytose zeigten die Zellen, denen der Quarz erst nach einer Vor-Inkubationszeit von 94h (mit serumhaltigen Medium, s.2.3.) angeboten wurde (Tab. 2).

Bei den unbehandelten AM traten bei den frühen Inkubationszeiten noch Zellen auf, die sowohl rot als auch gelb fluoreszierende Lysosomen enthielten. Nach 48h wurde diesbezüglich eine fluoreszenzoptisch einheitliche Zellpopulation erreicht. Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, zeigten nach einer Phagozytosezeit von 2h fast die Hälfte (42%) der adhärennten Zellen eine grüne Fluoreszenz und erfuhren somit eine deutliche Veränderung des lysosomalen Apparates, die nach 4h sogar auf 75% anstieg, aber im weiteren zeitlichen Verlauf wieder abfiel. Bei den längeren Inkubationszeiten ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede im fluoreszenzoptischen Bild. Es stellte sich ein Gleichgewicht zwischen den zu differenzierenden Morphen ein.

Die fluoreszenzoptische Auswertung der abgelösten Zellen im Überstand (Werte in Klammern) ergab bei den Inkubationszeiten bis 20h, daß sich auch hier bevorzugt die lysosomal veränderten Zellen von den Kulturschalen abtrennten. Dieser Prozess trat bei den späteren Inkubationszeiten nicht mehr auf. Die Überstände enthielten nur noch Zellen, deren Lysosomen auch nach der Quarzphagozytose keinerlei fluoreszenzoptisch erfassbare Veränderung erfahren hatten.

3.1.2. Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Phagozytose von DPL-beschichtetem Quarz und Latex

Mit biochemischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Vorbehandlung des Quarzes mit Dipalmitoyl-Lecithin (DPL), dem Hauptbestandteil des Lungensurfactants, zu einer Verringerung der Quarztoxizität

fürhte (Pätzold, 1989, Wiczek, 1991). Diese Befunde konnten auch fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden.

In Tabelle 3 ist die Reaktivität der AM gezeigt, die (94h nach ihrer Gewinnung) mit Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) und dem DPL-vorbehandeltem Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert worden waren.

Die Exposition mit dem nativen Quarz induzierte bei allen gewählten Inkubationszeiten eine deutlich erkennbare lysosomale Veränderung der AM in Form der auftretenden grün fluoreszierenden Zellen. Diese machten innerhalb der ersten 4h etwa 50% der adhärennten Zellpopulation aus und stiegen bei Inkubationszeiten von 30h sogar auf 63% an.

Das Auftreten der grün fluoreszierenden Zellen wurde durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL fast vollständig unterbunden (s. auch Abb. 18 bis 20). Es war bei den Zellen nur eine geringfügige Zunahme an AM mit den gelb fluoreszierenden Lysosomen zu verzeichnen.

Auch bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der abgelösten Zellen in den Kulturüberständen war, vor allem bei einer Inkubationszeit von 20h, die Schutzwirkung des DPL's deutlich zu erkennen (Tab. 3). Im Überstand der Ansätze mit nativem Quarz wurden nur noch Zelltrümmer vorgefunden (nicht aufgeführt). Dagegen waren im Überstand des DPL-Quarz-Ansatzes morphologisch intakte AM zu finden. Erst nach einer Expositionszeit von 48h waren im Kulturüberstand auch nach der Phagozytose des DPL-Quarzes die grün fluoreszierenden Zellen zu erkennen. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Pätzold (1989), die eine gewisse Retoxifizierung des DPL-Quarzes nach einer Inkubationsdauer der AM von 16h feststellte (zunehmende Freisetzung von LDH und NAG in die Kulturüberstände).

Tabelle 4 zeigt einen Vergleich in der Reaktivität der AM nach der Phagozytose von Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$), DPL-vorbehandeltem Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) und den Latexpartikeln (250 $\mu\text{g/ml}$).

Die Quarzexposition über die verschiedenen Inkubationszeiten führte bei ca. 10% der AM zu einer Veränderung des lysosomalen Apparates in Form der grün fluoreszierenden Zellen. Dieser Vorgang konnte auch in diesem Fall durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL vollständig unterbunden werden. Ein geringer Prozentsatz (4-8%) der Zellen reagierte zusätzlich durch das Auftreten von gelb fluoreszierenden Lysosomen (s.auch Abb. 19).

Auch die Phagozytose der Latexpartikel induzierte keine intrazelluläre Veränderung der AM. Erst Inkubationszeiten von 20h führten auch bei dem biologisch inerten Latex zu der Entstehung der grün fluoreszierenden Zellen (9%). Auch der Beginn der Retoxifizierung des DPL-Quarzes konnte nach einer Kulturdauer der Zellen von 20h durch eine Lysosomenveränderung (9% grün

fluoreszierende Zellen) beobachtet werden. Damit war die fluoreszenzoptische Reaktion der AM auf die Latexpartikel mit derjenigen des DPL-vorbehandelten Quarzes vergleichbar.

Diese fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen wurden durch die begleitenden biochemischen Untersuchungen unterstützt (Abb. 22a bis 22c). Eine verstärkte Freisetzung der Enzyme LDH, NAG und des Gesamtproteins über die verschiedenen Inkubationszeiten war bei den Experimenten mit dem nativen Quarz zu beobachten. Diese Vorgänge konnten durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL fast völlig unterbunden werden. Auch die Phagozytose der Latexpartikel führte zu keiner nennenswerten Freisetzung der untersuchten Parameter in die Kulturüberstände.

3.1.3. Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose: Dosisseffekt

Tabelle 5 zeigt das fluoreszenzoptische Erscheinungsbild der Zellen, die 20h mit 50, 150, 250 und 500 μg Quarz/ml inkubiert worden waren. Das fluoreszenzoptische Erscheinungsbild der einen unbehandelten Kontrolle, die für sämtliche Quarzkonzentrationen mitgeführt wurde, erwies sich als morphologisch einheitlich (nur rot fluoreszierende Lysosomen).

Bei den Quarzkonzentrationen von 50 bis 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ war bei der adhärennten Zell-Population keinerlei Veränderung des lysosomalen Apparates zu beobachten. Auch bei der niedrigsten Quarzkonzentration (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hatten alle AM zumindest einen Quarzpartikel phagozytiert, der in den rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen wiedergefunden wurde. Erst die Exposition der AM mit 500 μg Quarz/ml führte zu einer eindeutigen lysosomalen Veränderung der gesamten Zell-Population (grün fluoreszierende Zellen: 100%).

Ein völlig anderes Bild in der Reaktivität der AM, auch bei geringen Quarzkonzentrationen, ergab die Auswertung der abgelösten Zellen in den Überständen (Werte in Klammern). Hier induzierten alle eingesetzten Quarzkonzentrationen das Auftreten der grün fluoreszierenden Zellen, die bei alleiniger Untersuchung der adhärennten Population nicht festzustellen gewesen waren. Auch bei den unbehandelten Kontroll-Zellen traten im Überstand die grün fluoreszierenden Zellen auf.

3.1.3.1. Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose: Vergleich zweier Partikelgrößenverteilungen:

Der Einfluß der Phagozytose verschiedener Quarzkonzentrationen und zweier Partikelgrößenverteilungen (0,92- 1,6 μm und 1 bis 10 μm) des Quarzes auf die AM ist in Tabelle 6 gezeigt. Das fluoreszenzoptische Erscheinungsbild der einen unbehandelten Kontrolle, die für sämtliche Quarzkonzentrationen und Partikelgrößen mitgeführt wurde, erwies sich auch hier als morphologisch einheitlich (nur rot fluoreszierende Lysosomen).

Die adhärennten AM reagierten auf die verschiedenen Quarzkonzentrationen beider Partikelgrößen u.a. durch das Auftreten von zusätzlich gelb fluoreszierenden Lysosomen. Ansonsten waren keine nennenswerten Unterschiede in der Reaktivität der adhärennten Zellpopulation auf die Phagozytose der beiden Partikelgrößen gegeben (Tab. 6).

Die Untersuchung der abgelösten Zellen im Überstand ergab, daß der Prozentsatz an grün fluoreszierenden Zellen bei der Quarzfraktion mit der feineren Partikelgrößenverteilung (0,92-1,6 μm) in Abhängigkeit der Quarzkonzentration zunahm. Bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ erreichte die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen sogar 96% der vorgefundenen Zellen (Tab. 6).

Die begleitenden biochemischen Untersuchungen ergaben für den Vergleich der beiden Partikelgrößenverteilungen erst bei einer Konzentration von 500 μg Quarz/ml messbare Unterschiede. Hier erwies sich der Quarz mit der feineren Partikelgrößenverteilung (0,92-1,6 μm) als wesentlich toxischer, wie an der verstärkten Freisetzung der bestimmten Parameter (LDH, NAG und Protein) abzulesen ist (Abb. 23a bis 23c).

Bei allen Untersuchungen dieser Art mußte berücksichtigt werden, daß die fluoreszenzoptische Auswertung der noch adhärennten Zellpopulation und der sich im Kulturüberstand befindenen Zellen eine Momentaufnahme darstellte. Insgesamt konnte der Vorgang der Quarzphagozytose und die intrazelluläre Veränderung der AM folgendermaßen festgehalten werden:

1. Es wurden in Bezug auf die fluoreszenzoptische Reaktion der AM auf den Quarz interindividuelle Unterschiede der einzelnen Rinderlungen beobachtet.
2. Alle AM phagozytierten sofort nach Zugabe den Quarz. Auch bei kurzen Inkubationszeiten und geringen Quarzkonzentrationen hatten alle Zellen mindestens einen Quarzpartikel aufgenommen.

3. Der Quarz wurde nach der Phagozytose der Partikel in rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen wiedergefunden. In den gelb fluoreszierenden Organellen konnten niemals Quarzpartikel beobachtet werden.

4. Die Phagozytose des Quarzes führte zu einer lysosomalen Veränderung der Zellen. Dieser Vorgang war in Form der grün fluoreszierenden Zellen erkennbar. Die Zellen erschienen anfänglich regelrecht degranuliert, der Quarz schien frei im Zytoplasma zu liegen. Vereinzelt waren Quarzpartikel noch in rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen eingeschlossen (Abb. 6, 9, 10, 15 und 17). Doppelmarkierungen mit Trypanblau und AO zeigten, daß die grün fluoreszierenden Zellen noch vital waren.

5. Die grün fluoreszierenden Zellen lösten sich bevorzugt von den Kulturschalen ab. Es war davon auszugehen, daß diese Zellen anschließend im Kulturüberstand abstarben.

6. Die Entstehung der grün fluoreszierenden Zellen konnte, vor allem bei kurzen Inkubationszeiten (bis 20h), durch die Exposition der AM mit DPL-behandeltem Quarz unterbunden werden. Die Bildung grün fluoreszierender und somit lysosomal veränderten AM war direkt auf die toxische Wirkung des nativen Quarzes zurückzuführen.

7. Fluoreszenzoptische Übergänge zwischen den quarzhaltigen, rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen zu den scheinbar frei im Zytoplasma der Zelle liegenden Quarzpartikel (grüne Fluoreszenz der Zellen) konnten niemals beobachtet werden. Die toxische, lysosomen-verändernde Wirkung des Quarzes schien sich relativ schnell in einem "Alles-oder-Nichts"- Geschehen abzuspielen.

8. Da nach langen Inkubationszeiten (48h und 55h) der größte Teil der noch vorhandenen Population immer noch aus Zellen mit quarzhaltigen, rot fluoreszierenden und somit intakten Phago-Lysosomen bestand, schien sich hier eine besonders resistente Zellpopulation zu etablieren (Abb. 16). Oft traten in den Kulturen vielkernige Riesenzellen auf (Abb. 12 und 13).

3.2. Der Einfluß von extrazellulären Kalziumionen auf den Zelltod der Rinder-Alveolarmakrophagen nach der Quarzphagozytose

Mit diesen Experimenten sollte überprüft werden, in welchem Umfang den extrazellulären Kalziumionen eine Bedeutung für den Zelltod der AM nach der

Quarzphagozytose zukam.

Hierzu wurden ein Teil der AM in normalem, Ca^{2+} -haltigem Medium inkubiert. Auch der Quarz (Konz. $250 \mu\text{g/ml}$) wurde in diesem Medium resuspendiert. Weitere AM wurden in Ca^{2+} -freiem Medium inkubiert und bekamen den Quarz (Konz. $250 \mu\text{g/ml}$) entsprechend in Ca^{2+} -freiem Medium angeboten. Nach Ablauf der verschiedenen Inkubationszeiten wurden die AM mit AO (s.2.3.) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Zusätzlich wurde auch die Freisetzung der LDH, der NAG und des Gesamtproteins in die Kulturüberstände bestimmt.

Wie Tabelle 7 zeigt, waren keine Unterschiede in der fluoreszenzoptischen Reaktion der AM zu erkennen, die den Quarz sowohl in Ca^{2+} -haltigen als auch in Ca^{2+} -freien Medium angeboten bekamen.

Auch die Verteilung des zytoplasmatischen Enzyms LDH, des lysosomalen Enzyms NAG und des Gesamtproteingehaltes in den Kulturüberständen bzw. in den Zellen ergab keinen Hinweis auf eine zusätzliche Beteiligung der Kalziumionen an der Quarztoxizität. Die Freisetzung der Enzyme bzw. des Gesamtproteins aus den quarzinkubierten Zellen in dem Ca^{2+} -haltigen Medium entsprach der Freisetzung der AM nach Quarzinkubation in Ca^{2+} -freien Medium (Abb. 24a bis 24c).

3.3. Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion

Phagozytierte Partikel werden von den Makrophagen zunächst in Phagosomen eingeschlossen, die anschließend mit den Lysosomen fusionieren und dabei ihre Enzyme in die gebildeten Phago-Lysosomen abgeben. Eine Unterbindung dieses Prozesses könnte weiteren Aufschluß über die Rolle der Lysosomen im pathogenetischen Prozess der Quarztoxizität geben. Als Hemmstoff der Phagosomen-Lysosomen-Fusion wurde Ammoniumchlorid (10 mM) eingesetzt.

Wie Abb. 25 zeigt, kam es bei der Bestimmung der Gesamtaktivität des lysosomalen Enzyms Cathepsin B nach Quarzphagozytose ($150 \mu\text{g/ml}$, 20h) durch die AM zu einer signifikanten Hemmung dieses Enzyms (siehe auch Pätzold, 1989). Diese Hemmung konnte durch die Zugabe des Fusionshemmstoffes NH_4Cl in das Kulturmedium aufgehoben werden, die Verteilung der Aktivität des Cathepsin B in den Zellen und im Kulturüberstand entsprach derjenigen der unbehandelten Kontrolle. Die Vitalitäten der AM nach Quarzphagozytose lagen bei Inkubation in NH_4Cl -freiem Medium bei 69% und konnten durch Zugabe des Fusionshemmstoffes auf 90% gesteigert werden. Die Vitalitäten der unbehandelten Kontrollen lag in beiden Fällen bei 100%.

3.4. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen

3.4.1. Wachstumscharakteristik der L-929-Zellen

Die L-929-Zellen zeigen während der logarithmischen Wachstumsphase ein Maximum an Sensitivität gegenüber TNF (Ruff & Gifford, 1981). Es wurden mehrere Wachstumskurven mit unterschiedlichen Zellzahlen erstellt und die Kulturen über 5 Tage beobachtet.

Kulturen, die mit einer Ausgangsdichte von 1×10^5 Zellen pro 5 ml angesetzt worden waren, erreichten unter Umgehung der lag-Phase nach 5 Tagen eine Zelldichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen pro 5 ml. Die Verdopplungszeit der L-929-Zellen betrug 24h. Unter diesen Kulturbedingungen erreichten die L-929-Zellen nach 3 bzw. 4 Tagen die logarithmische Wachstumsphase und konnten für den TNF-Bioassay eingesetzt werden.

Durch die regelmäßige Anfärbung der L-929-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (s.2.8.3.4.) konnte sichergestellt werden, daß die L-929-Zellen nicht mit Mykoplasmen kontaminiert waren.

3.4.2. Standardisierung des TNF-Bioassays mit rhu-TNF- α

Der TNF-Bioassay wurde nach der von Ruff & Gifford 1981 etablierten Methode durchgeführt. Dieser Bioassay macht sich die zytotoxische Wirkung des TNF auf die Fibroblasten Zelllinie L-929 zunutze. Hierzu wurden die L-929-Zellen mit den seriell und in logarithmischen Schritten verdünnten Kulturüberständen der RAM inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der überlebenden L-929-Zellen (MTT-Test bzw. Neutralrot-Methode, s.2.8.6. und 2.8.7.).

Die Zytotoxizitäten, welche die Kulturüberstände der RAM im Bioassay zeigten, waren somit ein direktes Maß für den TNF-Gehalt der untersuchten Proben, d.h. ein hoher TNF-Gehalt der jeweils ausgemessenen Probe erzielte im Bioassay einen entsprechend hohen Zytotoxizitätswert.

Die Standardisierung des TNF-Bioassays wurde mit human-rekombinantem TNF- α (rhu-TNF- α) durchgeführt. Die Quantifizierung der überlebenden L-929-Zellen wurde mit dem MTT-Test durchgeführt. Zur Validierung des MTT-Testes wurde zusätzlich die Neutralrotmethode etabliert.

Die typischen Konzentrations-Wirkungskurven in ihrem sigmoiden Verlauf für rhu-TNF- α zeigt Abb. 26. Aufgetragen ist die Wirkung des TNF auf die L-929-Zellen (ausgedrückt in der Zytotoxizität der entsprechenden Konzentration) gegen

die TNF-Konzentration. Bei allen Experimenten und mit beiden Methoden wurden durch eine Konzentration von 2500 pg TNF/ml alle L-929-Zellen abgetötet. Dies entsprach im Bioassay einer zytotoxischen Wirkung von 100%. Die Anwendung beider Methoden zur Quantifizierung der L-929-Zellen führte zu nahezu identischen Kurvenverläufen (Abb. 26).

Die mit Hilfe der Probit-Analyse berechnete LC_{50} beträgt für den MTT-Test 64 pg TNF/ml (Regressionskoeffizient: 0,934). Für die Neutralrotmethode errechnet sich eine LC_{50} von 95 pg/ml (Regressionskoeffizient: 0,954).

Beide Methoden waren damit geeignet, die zytotoxische Wirkung von TNF auf die Zielzellen zu quantifizieren. Alle Experimente zum Nachweis von TNF in den Kulturüberständen der RAM und der HL-60-Zellen wurden mit der MTT-Methode durchgeführt.

3.4.3. Vergleich zwischen dem MTT-Test und der Neutralrot-Methode

Der Vergleich zwischen dem MTT-Test und der Neutralrotmethode wurde auch im TNF-Bioassay bei der Quantifizierung der TNF-Freisetzung aus den RAM angewendet.

Abb. 27 zeigt die zytotoxische Wirkung der unverdünnten Kulturüberstände auf die L-929-Zellen im TNF-Bioassay bei Anwendung des MTT-Testes und der Neutralrotmethode. Die Kulturüberstände wurden durch Inkubation der RAM (20h) mit LPS (10 μ g/ml), Quarz (100 μ g/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen gewonnen.

Bei Applikation des MTT-Testes war noch eine schwache TNF-Aktivität der unstimulierten Kontrollen nachzuweisen. Dieser Nachweis konnte bei Anwendung der Neutralrotmethode nicht geführt werden. Die Zytotoxizitäten der Kulturüberstände aus den reinen Quarzansätzen erreichten bei beiden Methoden identische Werte. Die Quantifizierung der TNF-Sekretion mit Hilfe des MTT-Testes führte im Vergleich zur Neutralrotmethode bei Messung der LPS- sowie Quarz plus LPS-Überstände zu leicht niedrigeren Zytotoxizitätswerten.

Beide Methoden waren somit geeignet die zytotoxische Wirkung der Kulturüberstände der RAM auf die L-929-Zellen im TNF-Bioassay nachzuweisen.

3.4.4. Versuche zum Nachweis von TNF- α in den Kulturüberständen der Rinder-Alveolarmakrophagen

Da ein Antikörper gegen bovines TNF nicht zur Verfügung stand, wurde versucht, mit Hilfe eines humanen, neutralisierenden Antikörpers die TNF-artige Aktivität

der Kulturüberstände der RAM zu neutralisieren.

Die zytotoxische Wirkung eines nach LPS-Stimulation gewonnenen Kulturüberstandes der RAM konnte im Bioassay durch diesen neutralisierenden Antikörper (aus Maus-Maus-Hybridzellen, Klon 195, Subklasse IgG3) um 33% reduziert werden. Der eindeutige Nachweis, daß es sich bei den beschriebenen Aktivitäten tatsächlich um bovines TNF- α handelt, fehlt. Dieser Befund deutete aber darauf hin, daß es sich bei diesen Aktivitäten mit größter Wahrscheinlichkeit um TNF- α handelte (s. auch 4.3.).

3.4.5. Die Freisetzung von TNF aus unstimulierten Rinder-Alveolarmakrophagen und nach deren Stimulation mit LPS

Fast alle unbehandelten Kontroll-AM der untersuchten Individuen zeigten auch ohne Stimulation mit LPS eine spontane TNF-Freisetzung.

Die Zytotoxizitäten der unverdünnten Kulturüberstände der RAM schwankten im TNF-Bioassay bei den unstimulierten Kontrollen nach 4-stündiger Inkubation zwischen 5% und 53%. Trotz dieser Vorstimulation konnte durch Zugabe des Standardstimulus LPS (10 μ g/ml) die TNF-Sekretion durch die AM in den meisten Fällen noch verstärkt werden. Diese unverdünnten Kulturüberstände erreichten im TNF-Bioassay Zytotoxizitäten um 62%.

Die TNF-Freisetzung der AM nach LPS-Stimulation war dabei unabhängig vom Grad der Vorstimulation der Kontrollen. Weitere Experimente zeigten, daß die TNF-Sekretion der RAM unabhängig von den eingesetzten LPS-Konzentrationen war. Es wurden LPS-Konzentrationen im Bereich von 1-100 μ g/ml getestet (ohne Abbildung). Darüberhinaus war es nicht möglich, einmal mit LPS stimulierte RAM nach anschließenden Inkubationen in nicht mit LPS supplementierten Medien durch eine erneute Zugabe von LPS zur weiteren TNF-Sekretion anzuregen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Abb. 28 zeigt die spontane TNF-Freisetzung aus den unstimulierten RAM nach Inkubationszeiten von 4h und 20h. Die Angabe der TNF-Freisetzung aus dem AM von 7 verschiedenen Individuen erfolgt durch die Berechnung und Darstellung von "AREA UNDER THE CURVE"-Werten (AUC-Werte). Diese Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven der Kulturüberstände der RAM im TNF-Bioassay. Sie wurden als Prozentsatz des jeweiligen AUC-Wertes berechnet und dargestellt, der sich durch die Zytotoxizitätskurve der zeitlich entsprechenden LPS-Inkubation (100%) ergab (s. 2.8.9.).

Bei 4 der dargestellten Individuen (Nr. 3, 4, 6 und 7) entsprach die spontane TNF-Freisetzung nach einer Inkubationszeit von 4h derjenigen, die auch nach einer

Kulturdauer der RAM von 20h erzielt werden konnte. Bei drei der Individuen (Nr. 1, 2 und 5) lag die spontane TNF-Sekretion nach Inkubationszeiten von 20h weit über derjenigen, die nach einer 4h-Inkubation erreicht wurde. Diese spontane Freisetzung entsprach z.T. nahezu derjenigen, die durch LPS zu induzieren war, die AUC-Werte (in % der LPS-Stimulation) liegen bei 80%. Insgesamt wurden große interindividuelle Schwankungen beobachtet.

3.4.6. Der TNF-Gehalt von unstimulierten Rinder-Alveolarmakrophagen und nach deren Stimulation mit LPS

Ein Vergleich des TNF-Gehaltes von unstimulierten RAM und RAM, die mit LPS inkubiert worden waren, ergab für beide Inkubationszeiten (4h und 20h) keine Unterschiede (Abb. 29). Die AUC-Werte (in % der LPS-Stimulation) lagen für die unstimulierten Kontrollen zwischen 80 und 100% .

3.4.7. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarzstäuben

Für diese Experimente wurden die RAM noch am Tag der Isolierung und nach einer Adhärenzzeit von 2 Stunden mit den unterschiedlichen Quarzkonzentrationen inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der Standardstimulus LPS in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Der Quarz wurde sowohl allein als auch in Kombination mit LPS appliziert. Die Inkubationszeiten betragen 4h und 20h. Anschließend wurden die Kulturüberstände der RAM im TNF-Bioassay untersucht. Die Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung der Überstände auf die L-929-Zellen erfolgte mit dem MTT-Test (s.2.8.6.).

Im folgenden werden die unverdünnten Zytotoxizitätswerte aus dem TNF-Bioassay für die entsprechenden 4 Parallelansätze (unstimulierte Kontrolle, LPS, Quarz sowie die Co-Stimulation aus Quarz plus LPS) mit denen aus der AUC-Berechnung (in % des AUC-Wertes der LPS-Stimulation) errechneten TNF-Sekretion verglichen (Abb. 30 bis 36).

Im TNF-Bioassay war der unverdünnte Überstand der unstimulierten Kontrollen, der nach 4h in Kultur gewonnen wurde in der Lage, 5% der L-929-Zellen abzutöten (Abb. 30a). Die 4-stündige Inkubation der AM mit LPS führte zu einem Kulturüberstand, der unverdünnt eine Zytotoxizität von 57% erreichte (Abb. 30a).

Alle Kulturüberstände, die nach 4-stündiger Inkubation der AM mit den verschiedenen Quarzkonzentrationen gewonnen wurden, erreichten im TNF-

Bioassay unverdünnt Zytotoxizitätswerte, die oberhalb des Zytotoxizitätswertes der zeitlich entsprechenden Kontrolle lagen. Somit waren alle getesteten Quarzkonzentrationen in der Lage, die RAM zur TNF-Sekretion zu stimulieren.

Durch die beiden niedrigen Quarzkonzentrationen von 25 und 50 $\mu\text{g/ml}$ konnte eine TNF-Sekretion durch die RAM bestimmt werden, die unterhalb derjenigen lag, die durch LPS zu induzieren war (Abb. 30a und 31a). Der Zytotoxizitätswert im Bioassay lag für die Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ (unverdünnt) bei 15%, der Wert für die Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ bei 38% (LPS: 57%).

Die TNF-Sekretion der RAM durch die Inkubation der Zellen mit 100 und 150 $\mu\text{g/ml}$ Quarz erreichte in diesem System die TNF-Freisetzung, die durch die Stimulierung der RAM mit LPS erzielt werden konnte (unverdünnte Zytotoxizitätswerte: 100 μg Quarz/ml: 60%, 150 μg Quarz/ml: 56%, Abb. 32a und 33a). Die Applikation von 200 und 250 μg Quarz/ml führte zu einer TNF-Sekretion durch die RAM, die noch oberhalb der durch LPS zu bewirken war (unverdünnte Zytotoxizitätswerte: 200 μg Quarz/ml: 69%, 250 μg Quarz/ml: 64%, Abb. 34a und 35a). Durch die höchste getestete Konzentration von 500 μg Quarz/ml war eine TNF-Sekretion zu bestimmen, die weit unterhalb der durch LPS zu erzielenden Freisetzung lag (unverdünnter Zytotoxizitätswert: 44%, Abb. 36a).

Im Bereich der Konzentrationen von 25 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ Quarz war mit steigenden Quarzkonzentrationen auch ein Ansteigen der Zytotoxizitäten der unverdünnten Überstände im Bioassay zu verzeichnen, d.h. die RAM setzten durch die Inkubationen mit steigenden Quarzkonzentrationen entsprechend ansteigende Mengen an TNF in die Kulturüberstände frei (Abb. 30a, 31a und 32a). Ein weiteres Ansteigen der TNF-Sekretion war nochmals bei einer Quarzkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ zu beobachten. (Abb. 34a).

Eine 4-stündige Co-Stimulation der RAM durch die einzelnen Quarzkonzentrationen mit LPS führte zu Kulturüberständen, die im TNF-Bioassay Zytotoxizitätskurven ergaben, die fast immer parallel zu den Zytotoxizitätskurven der reinen LPS-Überstände verliefen. Die unverdünnten Überstände der Co-Stimulationen aus Quarz und LPS erreichten (mit Ausnahme der 500 $\mu\text{g/ml}$ Quarz plus LPS-Stimulation) die Zytotoxizitätswerte, die durch die alleinige LPS-Inkubation gegeben war (Abb. 30a bis 36a).

Die Co-Stimulation der AM mit 500 μg Quarz/ml und LPS ergab eine TNF-Freisetzung durch die RAM, die noch weit oberhalb der TNF-Freisetzung lag, die durch LPS allein zu induzieren war (Abb. 36a).

Bei allen untersuchten Quarzkonzentrationen wurde die LPS-induzierbare TNF-Sekretion der RAM durch die Phagozytose der Quarzpartikel nicht messbar

beeinflusst. Die Quarzpartikel hemmten auch nicht die basale TNF-Sekretion, die durch die unstimulierten Kontrollen beobachtet wurde.

In der AUC-Berechnung wurde die "area under the curve", die sich aus der Zytotoxizitätskurve des Kulturüberstandes nach Inkubation der RAM mit dem Standardstimulus LPS ergab, als 100% gesetzt (s. 2.8.9.). Hiervon wurden die AUC-Werte der zeitlich entsprechenden Inkubationen mit den einzelnen Quarzkonzentrationen, aber auch diejenigen der unstimulierten Kontrollen, berechnet.

Diese Berechnung ergab für die Kontrollen einen relativ hohen AUC-Wert (in % der LPS-Stimulation) von 39%, der durch die leicht ansteigenden Zytotoxizitätswerte der drei Verdünnungsstufen bedingt war. Die AUC-Werte für die einzelnen Quarzkonzentrationen lagen (mit Ausnahme von 25 µg/ml) immer signifikant höher als der AUC-Wert der unstimulierten Kontrollen.

Die AUC-Berechnung ergab für den Konzentrationsbereich zwischen 25 und 200 µg/ml Quarz einen deutlichen Konzentrationseffekt (Abb. 30b bis 34b). Dieser Effekt bestand bei alleiniger Berücksichtigung der (unverdünnten) Zytotoxizitätswerte nur im Bereich von 25 bis 100 µg Quarz/ml (Abb. 30a bis 32a). Für die Co-Stimulation der RAM mit Quarz und LPS wurden mit der AUC-Methode Werte berechnet, die in etwa dem AUC-Wert des LPS-Überstandes entsprachen. Auch die AUC-Berechnung ergab, daß durch die Quarzphagozytose sowohl die LPS-induzierbare TNF-Freisetzung der RAM als auch die basale TNF-Sekretion durch die unstimulierten Kontrollen nicht messbar beeinflusst wurde (Abb. 30b bis 36b).

Eine durch den Quarz noch zu steigernde LPS-induzierbare TNF-Sekretion der RAM war bei einer Konzentration von 500 µg Quarz/ml zu verzeichnen. Für diese Co-Stimulation ergab sich ein AUC-Wert (in % der LPS-Stimulation) von 135% (Abb. 36b).

Durch eine 20 stündige Inkubation der RAM mit den einzelnen Quarzkonzentrationen und/oder LPS konnte (im Vergleich zu den 4h-Inkubationen) in den meisten Fällen kein weiteres Ansteigen der TNF-Sekretion beobachtet werden. Alle Zytotoxizitätskurven im TNF-Bioassay verliefen meistens sehr flach (ohne Abbildungen). Die unverdünnten Zytotoxizitätswerte der LPS- und Quarzansätze lagen oftmals nur im Bereich der Zytotoxizitätswerte der unstimulierten Kontrollen (um 15%). Damit konnte die maximale TNF-Freisetzung durch die RAM in den ersten 4h der in-vitro-Kultivierung erzielt werden.

3.4.8. Der Einfluß des DPL-vorbehandelten Quarzes auf die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen

Die RAM zeigten eine relativ hohe Vorstimulierung der unstimulierten Kontrollen. Der Zytotoxizitätswert des unverdünnten Überstandes im Bioassay betrug 24%. Die Stimulierung der RAM mit LPS führte zu einer Steigerung des Zytotoxizitätswertes (unverdünnter Überstand) auf nur 39% (Abb. 37a bis 37c). Die Graphiken (Abb. 37a bis 37c) zeigen nur die Zytotoxizitätswerte der jeweils unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay.

Durch alle Quarzkonzentrationen konnte nach einer Inkubation der RAM von 20h eine TNF-Freisetzung erzielt werden, die oberhalb der spontanen Freisetzung durch die unstimulierten Kontrollen lag. Ein gewisser Konzentrationseffekt war sowohl für die TNF-Freisetzung durch die Applikation des Quarzes allein, als auch durch die gemeinsame Inkubation des Quarzes mit LPS zu beobachten (Abb. 37a bis 37c).

Die TNF-Freisetzung durch die Inkubation der RAM mit dem DPL-beschichteten Quarz ergab für die Konzentrationen von 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Quarz keine Veränderung im Vergleich zu den Inkubationen mit dem nativen Quarz, die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Überstände wiesen identische Werte auf (Abb. 37a und 37c).

Durch Applikation von 250 μg DPL-beschichteten Quarz/ml konnte im Vergleich zu dem nativen Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) eine erhöhte TNF-Freisetzung festgestellt werden (Abb. 37b). Der native Quarz induzierte eine TNF-Sekretion, die im Bioassay durch einen Zytotoxizitätswert von 35% angegeben werden konnte. Der Zytotoxizitätswert des beschichteten Quarzes lag dagegen bei 46% (Abb. 37b).

Die Co-Stimulation der RAM durch den beschichteten Quarz und LPS induzierte eine TNF-Sekretion, die derjenigen durch den beschichteten Quarz allein entsprach. Eine Steigerung der TNF-Sekretion, wie sie durch die Inkubation der RAM mit dem nativen Quarz plus LPS gegeben war, konnte nicht beobachtet werden (Abb. 37a bis 37c).

Dieser Vorgang wurde vor allem für die Konzentrationen von 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Quarz in der AUC-Berechnung verdeutlicht (Abb. 38). Die TNF-Freisetzung der RAM durch den nativen Quarz entsprach derjenigen durch den beschichteten Quarz. Die Applikation von DPL/Quarz plus LPS induzierte bei allen getesteten Konzentrationen eine signifikant geringere TNF-Freisetzung, als sie durch die Applikation des nativen Quarzes mit LPS zu erzielen war.

3.4.9. Der Einfluß von Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit auf die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen

Die Phospholipide, die die RAM in-vitro bis zu 20h vor der toxischen Quarzwirkung zu schützen vermögen (Schimmelpfeng, 1989) wurden durch Ultrazentrifugation aus der ersten Lungen-Lavageflüssigkeit gewonnen.

Die Zugabe dieser Phospholipidpräparation aus der Lavageflüssigkeit (Lav) in das Inkubationsmedium führte bei den Quarzkonzentrationen von 250 und 500 $\mu\text{g/ml}$ (Inkubationszeit: 4h) zu einer leicht verringerten TNF-Freisetzung, als sie für die alleinige Inkubation mit den beiden Quarzkonzentrationen beobachtet wurde (Abb. 39a und 40a, die Graphiken zeigen nur die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay). Der Zytotoxizitätswert des unverdünnten Überstandes betrug für 250 μg nativen Quarz/ml 32%, zusammen mit den Phospholipiden nur noch 20% (Abb. 39a). Der Zytotoxizitätswert des unverdünnten Überstandes von 500 μg nativen Quarz/ml erreichte 43%, mit den Phospholipiden nur noch 26% (Abb. 40a). Auch die Lavageflüssigkeit allein zeigte eine geringe stimulatorische Wirkung, die allerdings noch unterhalb derjenigen der unstimulierten Kontrollen lag (Abb. 39a und 40a).

Im Gegensatz zu den Experimenten mit dem DPL/Quarz war die TNF-Sekretion durch die Co-Stimulation von Quarz und LPS identisch mit derjenigen Co-Stimulation, bei der zusätzlich die Phospholipide aus der Lavageflüssigkeit Berücksichtigung fanden.

Die AUC-Berechnung für die Quarz/LPS/Phospholipid-Inkubationen ergab für beide Quarzkonzentrationen eine leicht erhöhte TNF-Freisetzung (Abb. 41 und 42). Dies war durch die relativ flach abfallende Zytotoxizitätskurve des Quarz/LPS/Phospholipid-Überstandes bedingt (Zytotoxizitätskurven nicht gezeigt). Eine signifikant höhere TNF-Freisetzung durch die zusätzliche Applikation der Phospholipide konnte nur für die Konzentration von 500 μg Quarz/ml (4h) berechnet werden.

Auch nach Inkubationen von 20h konnte durch Zugabe der Phospholipide die TNF-Sekretion der RAM verringert werden (Abb. 39b und 40b). Die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten, reinen Quarz-Überstände lagen für beide Konzentrationen höher als diejenigen der Quarz/Phospholipid-Überstände. Die TNF-Freisetzung durch zusätzliche Applikation von LPS blieb mit und ohne Phospholipide konstant.

In der AUC-Berechnung lag der Quarz/LPS/Phospholipid-Überstand für 250 $\mu\text{g/ml}$ signifikant oberhalb des Quarz/LPS-Überstandes (Abb. 41 und 42).

3.4.10. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Lanthan und Cer

Die Inkubation der RAM mit den Seltenen Erdmetallen Lanthan und Cer ($100\ \mu\text{M}$, 4h) stimulierte die Zellen zu keiner messbaren TNF-Sekretion (Abb. 43a und 44a). Beide Elemente hemmten aber auch nicht die (relativ hohe) basale TNF-Sekretion der unstimulierten Kontroll-Zellen. Die Co-Stimulation durch Cer und Lanthan mit LPS führte dagegen zu einer deutlichen TNF-Freisetzung, der Zytotoxizitätswert des unverdünnten Überstandes betrug für Lanthan 64% (Abb. 43a) und für Cer 56% LPS: 40%).

Die spontane TNF-Freisetzung durch die unstimulierte Kontrolle zeigte sich in einem AUC-Wert (in % der LPS-Stimulation) von 96%. Der AUC-Wert für die Lanthaninkubation berechnete sich zu 80% (Cer: 70%) und stieg für die Kombinationsinkubation auf 160% (Cer: 130%) an (Abb. 43b und 44b).

3.4.11. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit dem Hochtemperatursupraleiter $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$

Die AM, die für die Experimente zur TNF-Freisetzung durch Inkubation mit dem Hochtemperatursupraleiter $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ herangezogen wurden, zeigten im TNF-Bioassay keinerlei Vorstimulierung durch die Kontrollen (Abb. 45 und 46). Die Inkubationsdauer der AM mit $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ betrug 4h. Für alle Konzentrationen konnte ausgeschlossen werden, daß die Zytotoxizitäten, welche die Kulturüberstände im TNF-Bioassay zeigten, nicht auf einer zytotoxischen Wirkung von $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ -Bestandteilen beruhten, die sich während der Inkubationen mit den RAM im Kulturmedium gelöst hatten (s. 2.8.1.).

Die Zytotoxizitätswerte der HTS-Kulturüberstände im Konzentrationsbereich von 10 und $50\ \mu\text{g/ml}$ lagen mit 5% im Bioassay sehr niedrig. Somit war nur eine sehr geringfügige TNF-Sekretion durch diese Konzentrationen gegeben (Abb. 45). Erst durch die Inkubationen der RAM mit den HTS-Konzentrationen von 100 und $500\ \mu\text{g/ml}$ kam es zu einer deutlichen Freisetzung von TNF durch die RAM in die Kulturüberstände, die Zytotoxizitäten der unverdünnten Überstände betragen 25% bzw. 23% (Abb. 45).

Bei allen untersuchten Konzentrationen wurde die durch LPS-induzierbare TNF-Freisetzung der AM durch die Phagozytose der HTS-Partikel nicht messbar beeinflusst. Die gemeinsame Applikation der HTS-Konzentrationen mit LPS ergab Kulturüberstände, deren Zytotoxizitätskurven sich kaum von der Kurve des reinen LPS-Überstandes unterschieden (Abb. 45). Einen gewissen Anstieg der TNF-

Produktion ergab sich aus der Co-Stimulation durch 500 μg HTS/ml mit LPS. Der Zytotoxizitätswert des unverdünnten Überstandes erreichte 52% (LPS-Überstand: 42%).

Die Berechnung von AUC-Werten ergab für die TNF-Freisetzung durch die getesteten HTS-Konzentrationen einen Konzentrationseffekt (Abb. 46).

Die Freisetzung durch die Konzentrationen von 10 und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HTS erreichte fast 50% der durch LPS induzierbaren TNF-Sekretion. Die TNF-Freisetzung durch die Konzentrationen von 100 und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HTS entsprach mit einem AUC-Wert von 108 und 99% der durch LPS zu stimulierenden TNF-Menge. Die Co-Stimulation durch die HTS-Konzentrationen mit LPS führte bei den beiden niedrigen Konzentrationen (10 und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zu einer TNF-Freisetzung, die derjenigen durch LPS zu stimulierenden Freisetzung gleich. Durch die Co-Stimulation der AM mit den HTS Konzentrationen von 100 und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mit LPS konnten AUC-Werte (in % der LPS-Stimulation) von 140% bzw. 160% berechnet werden (Abb. 46).

3.4.12. Die Freisetzung von TNF aus HL-60-Zellen

3.4.12.1. Die Freisetzung von TNF nach Differenzierung der HL-60-Zellen mit TPA

Die HL-60-Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml in Standardmedium ausgesät, das mit 10 ng/ml TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) supplementiert worden war. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Überstände entfernt und im TNF-Bioassay untersucht. Der zellfreie (unverdünnte) Kulturüberstand erreichte im Bioassay eine Zytotoxizität von 88%, das Zellhomogenat der nicht adhären gewordenen Zellen (Zellen im Überstand) eine Zytotoxizität von 41% (Abb. 47a). Das Zellhomogenat der ausdifferenzierten (adhären) HL-60-Zellen wies unverdünnt eine Zytotoxizität von 65% auf.

Auch die nicht ausdifferenzierten Promyelozyten setzten TNF in die Kulturüberstände frei und zeigten selbst auch einen gewissen TNF-Gehalt (Zytotoxizität: 55%, Abb. 47b) auf.

3.4.12.2. Die Freisetzung von TNF aus differenzierten HL-60-Zellen nach Inkubation mit LPS, Quarz, Latex und Titandioxid

Nach der Inkubation der HL-60-Zellen mit TPA (48h) wurde das

Differenzierungsmedium mit den nicht adhärenen Zellen entfernt und durch das HL-60-Standardmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 48h erfolgte die Stimulation der HL-60-Zellen mit LPS und den entsprechenden Stäuben (s.2.8.2.2.). Das Medium bestand aus RPMI-1640, das mit den entsprechenden Antibiotika und 2% endotoxinarmen FCS supplementiert worden war. Die Inkubationszeiten betragen 4h und 20h.

Die ausdifferenzierten HL-60-Zellen setzten im Vergleich zu den RAM etwa 100 mal mehr TNF nach einer 4-stündigen LPS-Stimulation in die Kulturüberstände frei. Der unverdünnte LPS-Überstand zeigte im TNF-Bioassay einen Zytotoxizitätswert von fast 100% (Abb. 48). Eine 1:100- Verdünnung dieses Überstandes erreichte immer noch einen Zytotoxizitätswert von 56%. Zytotoxizitätswerte zwischen 50% und 60% erreichten in den meisten Versuchen die unverdünnten LPS-Überstände der RAM.

Auch die unstimulierten Kontrollen der HL-60-Zellen setzten, wie fast alle untersuchten RAM-Populationen spontan TNF in die Kulturüberstände frei (Abb. 48).

Die 4h-Inkubationen mit den einzelnen Quarzkonzentrationen und Latex erbrachte bei den ausdifferenzierten HL-60-Zellen eine kaum nennenswerte TNF-Freisetzung (Abb. 48, 50, 52 und 56). Nur TiO₂ stimulierte die HL-60-Zellen, der unverdünnte Überstand erreichte im Bioassay einen Zytotoxizitätswert von 66% (Abb. 54).

Die Co-Stimulation der HL-60-Zellen durch den Quarz mit LPS führte (mit Ausnahme der 50 µg/ml Konzentration) zu einer wesentlich höheren TNF-Freisetzung als bei den RAM zu beobachten war. (Abb. 48, 50 und 52). Die Zytotoxizitäten der unverdünnten Überstände lagen im Bereich zwischen 93 bis 100%. Erst mit einer Verdünnung dieser Überstände von 1:100 wurden Zytotoxizitätswerte erzielt, die in vielen Fällen für die Quarz/LPS-Überstände der RAM erreicht werden konnten (50-60%).

Im Gegensatz zu den RAM, war bei den HL-60-Zellen auch nach Inkubationszeiten von 20h noch eine deutliche TNF-Sekretion zu messen. Insgesamt lagen die Zytotoxizitätswerte der einzelnen Kulturüberstände im Bioassay leicht unterhalb derjenigen, die nach einer 4h-Inkubation erreicht worden waren.

3.4.12.3. Der TNF-Gehalt von differenzierten HL-60-Zellen nach Inkubation mit LPS, Quarz, Latex und Titandioxid

Wie die Abb. 49, 51, 53 55 und 57 zeigen, waren deutliche Unterschiede in den

TNF-Gehalten der HL-60-Zellen nach den Inkubationen mit LPS bzw. Staubsuspension/LPS zu beobachten. Die Zytotoxizitätskurven der Zellhomogenate der HL-60-Zellen verliefen für die einzelnen Staubkonzentrationen und Inkubationszeiten sehr ähnlich. Der TNF-Gehalt der unstimulierten Kontrollen entsprach dem TNF-Gehalt der Staub-Inkubationen. Der TNF-Gehalt der Zellen nach LPS-Stimulation glich, insbesondere bei den 4h-Inkubationen, demjenigen der Co-Stimulation der HL-60-Zellen durch die Staubinkubationen mit LPS.

4. DISKUSSION

Eines der Ziele dieser Arbeit war, die Reaktion der Lysosomen von Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) auf Quarzpartikel zu untersuchen. Es sollte geprüft werden, in welchem Umfang den Quarzpartikeln eine Bedeutung für die Toxizität gegenüber den Lysosomen zukommt.

Nach wie vor ist die Hypothese von Allison & Morgan (1979) gültig, wonach eine Permeabilitätsänderung der Membran sekundärer Lysosomen durch die Quarzpartikel ein Freisetzen der sauren Hydrolasen in das Zytoplasma der Zelle bedingt und somit den Zelltod der Makrophagen auslöst. Die Untersuchungen von Kane et al. (1980) an der Makrophagen-Zelllinie P388D₁ zeigten sogar, daß die Deposition der Quarzpartikel in den Phago-Lysosomen direkt die Ruptur der Phago-Lysosomenmembran zur Folge hat.

Die biochemische Charakterisierung der Lysosomen aus RAM und ihre Reaktion auf Quarz ist bereits von Pätzold (1989) durchgeführt worden. Doch weder Untersuchungen zur Latenz und zu Dichteigenschaften isolierter quarzhaltiger Phago-Lysosomen noch Inkubationsversuche isolierter Lysosomen mit Quarz erbrachten Hinweise auf eine verminderte Stabilität dieser Organellen. Auch Wilczek (1991) gelang es nicht, mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen den Austritt des lysosomalen Enzyms Saure Phosphatase aus den quarzhaltigen Phago-Lysosomen der RAM in das Zytoplasma zu beobachten und die postulierte Schädigung der Lysosomenmembran als Primärursache der Quarz-Zytotoxizität nachzuweisen.

Anhand von Vitalfärbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange (AO) sollte eine mögliche Beteiligung der Lysosomen am toxischen Geschehen nach Quarzphagozytose analysiert und die Untersuchungen von Allison & Morgan (1979) sowie Kane et al. (1980) überprüft werden.

4.1. Allgemeine Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Vitalfärbung mit Acridinorange

Die Anfärbung der AM mit dem Fluoreszenzfarbstoff AO zeigte ein leuchtend grünes Zytoplasma der Zellen, in dem die rot fluoreszierenden Lysosomen teilweise einzeln gut zu identifizieren waren (Abb. 1 bis 4).

Der Vitalfarbstoff AO ist eine schwache Base, die frei durch biologische Membranen permeiert und je nach Konzentration eine unterschiedliche Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung zeigt (Allison & Young, 1975). In den Lysosomen findet aufgrund des niedrigen pH-Wertes eine Anreicherung des Farbstoffes statt, die Base AO wird protoniert und positiv geladen. Solange der

niedrige pH-Wert der Organellen beibehalten wird, kann das AO in dieser Form die Lysosomen nicht mehr verlassen. (Goren et al., 1984, Olsson et al., 1987). Wegen dieser selektiven Anreicherung des lysosomotropen Farbstoffs werden in den Lysosomen Polymere gebildet, welche die rote Fluoreszenz der Lysosomen bedingen. Der Kern, die Mitochondrien und das Zytoplasma fluoreszieren grünlich, da der Farbstoff hier in monomerer Form auftritt. (Khavkin et al., 1977). Als erste beschrieben Allison & Young (1964) und Robbins & Marcus (1963) die Konzentrierung von AO in den Lysosomen lebender Zellen unter in-vitro Bedingungen. Diese Technik wird nicht nur zur Identifizierung dieser Organellen (Poole, 1977) und als nicht-enzymatischer Marker für die Lysosomen (Canonic & Bird, 1969) herangezogen, sondern auch zu Untersuchungen zur Stabilität von Lysosomen (Decker et al., 1985, Olsson et al., 1989, Redai & Halmy, 1980) eingesetzt.

Die Anfärbung der RAM mit AO zeigte, vor allem bei den Untersuchungen kurz nach der Gewinnung der AM, eine starke morphologische Heterogenität (Abb. 1 und 2). Ebenso heterogen präsentierten sich die einzelnen Populationen von AM aus den verschiedenen Lungen. In vielen Zellen waren die Lysosomen als einzelne Organellen zu identifizieren, die fast das ganze Zellumen einnahmen. In anderen Zellen erschienen die Lysosomen als kompakte rot fluoreszierende Gruppe (Abb. 4).

Diese Heterogenität der Makrophagenmorphologie steht im Einklang mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Peritonealmakrophagen der Maus (Freidlin et al., 1977, Khavkin et al., 1977). Diese Unterschiede sind entweder durch den unterschiedlichen Differenzierungsgrad der jeweils untersuchten Population bedingt, oder sie sind auf die stoffwechselphysiologische Aktivität der Zellen zurückzuführen (Khavkin et al., 1977).

Vor allem bei Untersuchung der AM direkt nach Gewinnung der Zellen, waren zusätzlich zu den rot fluoreszierenden Lysosomen auch intrazelluläre Strukturen zu beobachten, die eine gelbe Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 1 und 2). Eine subzelluläre Fraktionierung der Zellen durch differentielle Zentrifugation (siehe Pätzold, 1989) und Anfärbung der Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion mit AO ergab, daß die gelb fluoreszierenden Organellen zusammen mit den rot fluoreszierenden Lysosomen darstellbar waren und diesen auch in der Größe entsprachen. Insofern war davon auszugehen, daß es sich bei diesen Strukturen auch um Lysosomen handelte.

Möglicherweise stellen diese gelb fluoreszierenden Organellen gerade Lysosomen dar, die zuvor phagozytierte (Bakterien, Pilze, Sporen u.ä.) abbauen.

Untersuchungen von Goren et al. (1984) und Wang & Goren (1987) zeigten, daß die primären Lysosomen im Prozess der Phagosomen-Lysosomen-Fusion mehrmals mit den Phagosomen fusionieren und dabei immer nur einen Teil ihres Inhaltes an die Phago-Lysosomen abgeben. Es ist nicht auszuschließen, daß es sich bei diesen Organellen entweder um Phago-Lysosomen handelt, die durch den häufiger stattfindenden Fusionsprozess erst einen Teil der Hydrolasen enthalten oder um Lysosomen, die schon einen Teil ihrer Enzyme an ein Phago-Lysosom abgegeben haben. In beiden Fällen ist die Konzentration an Hydrolasen in dem entsprechenden Organell geringer. Da AO an die Hydrolasen der Lysosomen bindet (Khavkin et al., 1977) wäre in den genannten Fällen die Menge dieser Enzyme in den Organellen geringer und dementsprechend würden diese Lysosomen keine rote Fluoreszenz aufweisen.

Diese Interpretation wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß bei älteren in-vitro-Kulturen der AM (ab 48h, Abb. 3 und 4, Tab. 2) die Zellen mit den gelb fluoreszierenden Lysosomen verschwanden und sich Kulturen etablierten, die nur noch die rot fluoreszierenden Lysosomen enthielten.

4.2. Reaktionen von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarzpartikel

Nach Inkubation mit Quarz lagen die Partikel in den rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen (Abb. 5, 6, 8, 9, 10 und 11). Wie verschiedene Autoren übereinstimmend feststellten, wird der Nachweis von phagozytierten Partikeln in rot fluoreszierenden Lysosomen als erfolgreich stattgefundene Phagosomen-Lysosomen-Fusion angesehen. (D'Arcy Hart & Young, 1975, Eissenberg & Wyrick, 1981, Goren & Mor, 1988, Kilian & Cohn, 1980). Die fusionierten Vesikel (sekundäre Lysosomen) können anhand ihrer enzymatischen Aktivität für Saure Phosphatase identifiziert werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an RAM ergaben, daß es auch nach der Phagozytose von Quarzpartikeln zur Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen kommt. Die quarzhaltigen Lysosomen zeigen eine positive Reaktion für Saure Phosphatase (Wilczek, 1991).

Nach der erfolgten Quarzphagozytose reagierten die AM verstärkt mit dem Auftreten der gelb fluoreszierenden Lysosomen (Abb. 7 und 10). Interessanterweise konnten in diesen gelb fluoreszierenden Lysosomen niemals Quarzpartikel gefunden werden.

Möglicherweise handelt es sich auch hier um Lysosomen, die zum Teil schon mit den quarzhaltigen Phago-Lysosomen fusioniert und dabei jeweils einen Teil ihres enzymatischen Inhaltes abgegeben haben. Eine Verringerung des Gehaltes an sauren Hydrolasen dieser Organellen würde sich in einem Verlust der intensiven roten Fluoreszenz manifestieren.

der einzelnen Populationen. Wie in Tab. 2 aufgeführt, reagierten die AM in den ersten 20h nach der Quarzexposition verstärkt durch das Auftreten der grün fluoreszierenden Zellen. Dies zeigte die Anfärbung der adhären Population, aber auch die Anfärbung der Zellen im Kulturüberstand. Nach längeren Inkubationszeiten (30h bis 55h) nahm die Anzahl der grünen Zellen sowohl bei der adhären Population als auch bei den Zellen im Überstand ab. Die Rate der Zellen mit quarzhaltigen, aber ausschließlich rot fluoreszierenden Lysosomen unterschied sich nicht von der unbehandelten Kontrolle.

Bei längeren Inkubationszeiten (ab 30h) bildeten sich relativ resistente Subpopulationen an AM heraus. Diese Zellen hatten große Mengen an Quarzpartikeln phagozytiert, zeigten aber im fluoreszenzmikroskopischen Bild keinerlei intrazelluläre Veränderungen. Der Mechanismus, mit denen die Zellen sich vor der toxischen Quarzwirkung schützen, ist unbekannt.

Ähnliche Resultate nach Quarzexposition beschrieb Nieder (1989) an makrophagenähnlichen Zellen, die durch den Tumorpromotor TPA (12,0-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) aus den humanen, promyelozytären HL-60-Zellen differenziert wurden. Diese Zellen sind gegenüber den Quarzpartikeln resistent. Sie zeigten nach Quarzphagozytose weder Vitalitätsverlust noch eine Freisetzung von Enzymen in die Kulturüberstände.

Insgesamt schien sich über die gesamten Inkubationszeiten ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen, fluoreszenzoptisch zu differenzierenden Morphen herauszubilden. Dabei vollzog sich der Übergang von den Zellen, die den Quarz in den rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen enthielten, zu den ausschließlich grün fluoreszierenden Zellen sehr schnell. Es handelte sich hier möglicherweise um einen sehr raschen "Alles oder Nichts"-Prozess, der mit dieser Methode nicht zu erfassen war.

Mit den in Tab. 3 und 4 dargestellten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Entstehung der grün fluoreszierenden Zellen direkt auf den Einfluss des nativen Quarzes zurückzuführen war. Durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL, einem Bestandteil des Lungensurfactants, konnte die Entstehung der grün fluoreszierenden Zellen fast vollständig unterbunden werden (Abb. 18, 19 und 20). Dies ergaben auch die Untersuchungen der Zellen in den Kulturüberständen (Tab. 3). Erst nach Inkubationszeiten von 48h wurden in den Kulturüberständen der DPL-Quarz-Ansätze grün fluoreszierende Zellen gefunden.

Durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL verliert der Quarz zunächst seine Toxizität (Wallace et al., 1986). So können die Partikel, ohne Membranschäden zu verursachen, phagozytiert werden. Die sauren Hydrolasen dauern nach der Fusion der quarzhaltigen Phagosomen mit den Lysosomen die DPL-Schutzschicht ab und

der einzelnen Populationen. Wie in Tab. 2 aufgeführt, reagierten die AM in den ersten 20h nach der Quarzexposition verstärkt durch das Auftreten der grün fluoreszierenden Zellen. Dies zeigte die Anfärbung der adhären Population, aber auch die Anfärbung der Zellen im Kulturüberstand. Nach längeren Inkubationszeiten (30h bis 55h) nahm die Anzahl der grünen Zellen sowohl bei der adhären Population als auch bei den Zellen im Überstand ab. Die Rate der Zellen mit quarzhaltigen, aber ausschließlich rot fluoreszierenden Lysosomen unterschied sich nicht von der unbehandelten Kontrolle.

Bei längeren Inkubationszeiten (ab 30h) bildeten sich relativ resistente Subpopulationen an AM heraus. Diese Zellen hatten große Mengen an Quarzpartikel phagozytiert, zeigten aber im fluoreszenzmikroskopischen Bild keinerlei intrazelluläre Veränderungen. Der Mechanismus, mit denen die Zellen sich vor der toxischen Quarzwirkung schützen, ist unbekannt.

Ähnliche Resultate nach Quarzexposition beschrieb Nieder (1989) an makrophagenähnlichen Zellen, die durch den Tumorpromotor TPA (12,0-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) aus den humanen, promyelozytären HL-60-Zellen differenziert wurden. Diese Zellen sind gegenüber den Quarzpartikeln resistent. Sie zeigten nach Quarzphagozytose weder Vitalitätsverlust noch eine Freisetzung von Enzymen in die Kulturüberstände.

Insgesamt schien sich über die gesamten Inkubationszeiten ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen, fluoreszenzoptisch zu differenzierenden Morphen herauszubilden. Dabei vollzog sich der Übergang von den Zellen, die den Quarz in den rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen enthielten, zu den ausschließlich grün fluoreszierenden Zellen sehr schnell. Es handelt sich hier möglicherweise um einen sehr raschen "Alles oder Nichts"-Prozess, der mit dieser Methode nicht zu erfassen war.

Mit den in Tab. 3 und 4 dargestellten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Entstehung der grün fluoreszierenden Zellen direkt auf den Einfluss des nativen Quarzes zurückzuführen war. Durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL, einem Bestandteil des Lungensurfactants, konnte die Entstehung der grün fluoreszierenden Zellen fast vollständig unterbunden werden (Abb. 18, 19 und 20). Dies ergaben auch die Untersuchungen der Zellen in den Kulturüberständen (Tab. 3). Erst nach Inkubationszeiten von 48h wurden in den Kulturüberständen der DPL-Quarz-Ansätze grün fluoreszierende Zellen gefunden.

Durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL verliert der Quarz zunächst seine Toxizität (Wallace et al., 1986). So können die Partikel, ohne Membranschäden zu verursachen, phagozytiert werden. Die sauren Hydrolasen dauern nach der Fusion der quarzhaltigen Phagosomen mit den Lysosomen die DPL-Schutzschicht ab und

stellen somit die toxische Quarzwirkung wieder her. Auch mit Latex ließen sich im Vergleich zu dem nativen Quarz keine grün fluoreszierenden Zellen induzieren, die fluoreszenzoptische Reaktion der AM auf Latex entsprach der Reaktion der Zellen auf den DPL-Quarz.

Diese fluoreszenzmikroskopischen Resultate werden durch die biochemischen Ergebnisse von Pätzold (1989) bestätigt. So führte die Exposition von DPL-vorbehandeltem Quarz weder zu einer Vitalitätsabnahme noch zu einer Freisetzung von zytoplasmatischen und lysosomalen Enzymen in die Kulturüberstände (Abb. 22a bis 22c). Auch die elektronenmikroskopischen Resultate von Wilczek (1991) unterstützen diese Befunde.

Kane et al. (1980) zeigten an P388D₁-Makrophagen eine Dosisabhängigkeit zwischen dem Auftreten von grün fluoreszierenden Zellen nach der Quarzphagozytose. Diese Dosisabhängigkeit konnte bei unseren Untersuchungen der adhärennten Zellpopulation nicht beobachtet werden.

Wie Tab. 5 zeigt, traten erst bei einer Konzentration von 500 µg Quarz/ml bei der adhärennten Population die grün fluoreszierenden Zellen auf. Die Ergebnisse von Kane et al. (1980) lassen sich möglicherweise durch die vor der Inkubation erfolgte Hitzesterilisierung des Quarzes erklären, die nach Nolan et al. (1987) zu einer Erhöhung der Zytotoxizität führt.

Auch in dem in Tab. 6 dargestellten Versuch war der Prozentsatz an grün fluoreszierenden AM nach der Phagozytose der einzelnen Quarzkonzentrationen relativ gering. Ein Vergleich der Reaktivität der AM auf die beiden verwendeten Partikelgrößen (0,92-1,6 µm und 1-10 µm) ergab bei Untersuchung der adhärennten Population im Konzentrationsbereich von 50 bis 500 µg/ml nur geringfügige Unterschiede. Auch das Muster der Enzym- und Proteinfreisetzung in die Überstände zeigte, daß keine Differenzen in der Toxizität der beiden Partikelgrößen festzustellen waren (Abb. 23a bis 23c). Erst bei einer Konzentration von 500 µg/ml erwies sich die Quarzfraktion Q2 (0,92-1,6 µm) als geringfügig toxischer, wie an der verstärkten Freisetzung der Enzyme LDH und NAG und des Proteins abzulesen ist. Ein morphologisches Korrelat fand dieser Befund nicht. Werden auch die abgelösten Zellen in den Kulturüberständen mit in die Untersuchungen einbezogen, zeigte sich, daß schon bei geringen Quarzkonzentrationen die grün fluoreszierenden Zellen auftraten. Es ist davon auszugehen, daß sich die grün fluoreszierenden Zellen bevorzugt von den Kulturschalen ablösten und im Überstand abstarben.

Nach Kane et al. (1980) soll nicht die Lysosomenruptur zum Tod der Zellen führen, vielmehr sei der Einstrom von extrazellulären Kalziumionen durch die ebenfalls geschädigte Zellmembran für den Zelltod verantwortlich. P388D₁-

Makrophagen, die in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen mit Quarz exponiert worden waren, blieben trotz Lysosomenruptur vital (Kane et al., 1980).

Die interstitiellen Körperflüssigkeiten enthalten relativ hohe Ca^{2+} -Konzentrationen (10^{-3} M), dagegen beträgt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nur 10^{-7} bis 10^{-8} M. Dieser Gradient wird durch eine Reihe von ATP-abhängigen Enzymen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, aufrecht erhalten (Boobis et al., 1989). Wird eine Zellmembran durch Quarz oder andere Noxen geschädigt, kommt es somit zum unkontrollierten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Es wird allgemein angenommen, daß ein erhöhter zytosolischer Ca^{2+} -Spiegel eine Reihe von lytischen Enzymen aktiviert, was zum Absterben der Zellen führt (Boobis et al., 1989).

Unsere Untersuchungen zeigten in Übereinstimmung mit Kane et al. (1980), daß das Ausmaß der intrazellulären, fluoreszenzoptischen Veränderungen der AM durch die Quarzphagozytose unabhängig von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration war (Tab. 7). Der Befund von Kane et al. (1980), daß der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen den Zelltod herbeiführt, konnte nicht nachvollzogen werden. Eine Erhöhung der Zell-Vitalität oder eine Veränderung im Muster der Enzymfreisetzungen durch die Inkubation der Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium war nicht zu beobachten (Abb. 24a bis 24c).

Fraglich bleibt, ob die Plasmamembran der RAM tatsächlich durch die Quarzpartikel geschädigt wird. Es ist nicht auszuschließen, daß dieser von Kane et al. (1980) favorisierte Prozess bei einem Teil der RAM tatsächlich zum Absterben der Zellen führte, was möglicherweise mit unserer Methodik nicht zu erfassen war. So zeigte auch Wilczek (1991) elektronenmikroskopische Aufnahmen von quarzexponierten RAM, bei denen es zu einem partiellen Verlust der Zellmembran gekommen war. Andererseits spricht die Ausbildung resistenter Subpopulationen von RAM nach langen Quarz-Expositionszeiten gegen die Ausschließlichkeit dieser Resultate von Kane et al. (1980), die zudem die P388D₁-Makrophagen nur max. 3h der Quarzwirkung aussetzten.

Auch werden in-vivo die Quarzpartikel, die in die Lunge eindringen, dort von dem Lungensurfactant umkleidet, ehe sie von den AM phagozytiert werden. Durch diese Umkleidung der Quarzpartikel kann es kaum zu Schädigungen der Zellmembran kommen. Auf die Reduzierung der Quarztoxizität durch Zugabe von "Surfactant" bzw. DPL unter in-vitro Bedingungen wurde schon hingewiesen (Pätzold, 1989, Schimmelpfeng, 1989, Wilczek, 1991, diese Arbeit). Da der lysosomale, hydrolytische Abbau des DPL in den quarzhaltigen, fusionierten Phago-Lysosomen zu einer Retoxifizierung des Quarzes führt, kann die toxische Wirkung des Quarzes nicht allein auf den unkontrollierten Ca^{2+} -Einstrom durch eine geschädigte Zellmembran zurückzuführen sein. Diese, die in-vivo vorhandenen und primär schützenden Einflüsse durch den Surfactant fanden bei

den Untersuchungen von Kane et al. (1980) keine Berücksichtigung. Insofern müssen diese, unter sehr artifiziellen Kulturbedingungen gewonnenen, Resultate von Kane et al. (1980) sehr kritisch gesehen werden.

Die Entstehung grün fluoreszierender Zellen nach Anfärbung mit AO wird auch von anderen Autoren als Zeichen einer lysosomalen Schädigung gedeutet. So berichteten Abok et al. (1983) von einer Destabilisierung der lysosomalen Membran, die durch Inkubation von Maus-Peritonealmakrophagen mit Fe^{3+} hervorgerufen werden kann. Einen vergleichbaren Effekt erzielten Olsson et al. (1989) nach der Inkubation von Peritonealmakrophagen mit Silberlaktat. Das Verschwinden der roten, lysosomalen Fluoreszenz und das Auftreten grün fluoreszierender Zellen wird als Schädigung der lysosomalen Membran gedeutet, die nicht mehr in der Lage ist, den niedrigen pH-Wert der Organellen aufrecht zu erhalten. Dies führt zur Konvertierung des AO in die schwache, unprotonierte Base, die frei in das Zytoplasma diffundiert. So wird z.B. auch die Freisetzung lysosomaler Enzyme aus SV40-transformierten Fibroblasten durch das Auftreten grün fluoreszierender Zellen nachgewiesen (Redai & Halmy 1980,).

Fraglich bleibt jedoch, ob die Entstehung der grün fluoreszierenden Zellen direkt als Folge der von Kane et al. (1980) postulierten Lysosomenruptur anzusehen sind. Denn Wilczek (1991) konnte mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen ein Austritt der lysosomalen Säuren Phosphatase aus den quarzhaltigen Phago-Lysosomen nicht beobachten. Möglicherweise manifestieren sich hier Unterschiede in der Reaktivität in der von Kane et al. (1980) eingesetzten Makrophagen-Zell-Linie P388D₁ und der hier verwandten Primär-Zellkultur. So zeigte Kielian (1986), daß bei Maus-Peritonealmakrophagen erst nach einer in-vitro-Kultur von 4 Tagen der Prozess der Phagosomen-Lysosomen-Fusion die gleiche Rate wie in den P388D₁-Zellen erzielt. Eventuell fusionieren auch in den RAM die quarzhaltigen Phagosomen erst relativ spät mit den Lysosomen. Dies könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen nach längerer in-vitro-Kultur aufzeigen.

Die Entstehung grün fluoreszierender Zellen könnte auch als Effekt des Quarzes auf die lysosomale Protonenpumpe verstanden werden. Die Existenz einer Mg-ATP-abhängigen lysosomalen Protonenpumpe wird mittlerweile von vielen Autoren bestätigt (Dell'Antone, 1979, Moriyama et al., 1982, Ohkuma et al., 1982, Schneider, 1987). Durch eine Interaktion des Quarzes mit der lysosomalen Membran, aber auch mit der Phagosomenmembran, z.B. in Form einer durch den Quarz katalysierten Lipid Peroxidation (Shi et al., 1989), kann es zu Störungen in der Aufrechterhaltung des ATP-abhängigen Protonengradienten kommen. Damit

ist die Retention der roten lysosomalen Fluoreszenz nicht mehr möglich. Kane et al. (1985) konnten an den P388D₁-Makrophagen zeigen, daß es durch die Quarzphagozytose zu einer zeit- und dosisabhängigen Abnahme im intrazellulären ATP-Gehalt kam. Diese Abnahme bedingte in den Untersuchungen auch den Verlust der lysosomalen Integrität und führte (nach Färbung mit AO) zum Auftreten von grün fluoreszierenden Zellen.

Wie die Untersuchung der Kulturüberstände der Kontroll-Ansätze ergab, zeigte auch ein Teil der unbehandelten AM die grüne Fluoreszenz, die aber niemals bei der adhären Population auftrat. Ebenso wenig konnte eine stufenweise Degranulierung der AM, wie sie nach der Quarzphagozytose eintrat, beobachtet werden. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang ein spontaner Verlust von Lysosomen, wie sie von Zanetti et al. (1987) für bovine Leukozyten nach in-vitro Kultur und Anfärbung mit AO beschrieben worden sind. Die Freisetzung lysosomaler Enzyme entspricht der normalen sekretorischen Aktivität von Makrophagen (Rich, 1988). So könnte die grüne Fluoreszenz der unbehandelten Kontroll-Zellen auf diesen Vorgang zurückgeführt werden.

Möglich wäre auch eine verminderte oder nicht mehr stattfindende ATP-Synthese dieser Zellen. So zeigten Kane et al. (1985) den Verlust der lysosomalen Integrität bei Hepatozyten und P388D₁-Makrophagen nach Inkubation mit Antimycin A und anderen Inhibitoren der Atmungskette. Auch solche Zellen wiesen nach Vitalfärbung mit AO eine völlig grüne Fluoreszenz auf, sie waren noch vital und regenerierten nach Inkubation in frischem Medium die rot fluoreszierenden Lysosomen.

Die Experimente zur Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion ergaben, daß die von Pätzold (1989) beschriebene Reduktion der Cathepsin B Aktivität nach Quarzphagozytose durch die Unterbindung des Fusionsprozesses aufgehoben werden kann (Abb. 25). Die Vitalitäten der quarzexponierten Zellen wurde von 69% auf 90% gesteigert.

Ammoniumchlorid gilt als ein klassischer Hemmstoff der Phagosomen-Lysosomen-Fusion (Decker et al., 1985, Gordon et al., 1980, Jordan et al., 1985) und verändert als lysosomotropes Reagens die Struktur und Funktion der Lysosomen (Ohkuma & Poole, 1981). NH₄Cl unterbindet auch die saltatorischen Bewegungen der Lysosomen und verhindert so den Fusionsprozess (D'Arcy Hart et al., 1983). Decker et al. (1985) wiesen darauf hin, daß das lysosomale Cathepsin B oberhalb eines pH-Wertes von 6 instabil und irreversibel denaturiert wird. Sollte es durch den Quarz zu einer Schädigung bzw. Beeinträchtigung der Phago-Lysosomenmembran und damit zu einem Anstieg des pH-Wertes dieser Organellen kommen (grüne Fluoreszenz der Zellen), wäre die verringerte

Aktivität dieses Enzyms nach Quarzphagozytose durchaus plausibel.

Sowohl die Aufhebung der Reduktion der Cathepsin B-Aktivität, als auch die Steigerung der Vitalitäten der Zellen durch die Unterbindung des Fusionsprozesses deuten auf eine direkte Beteiligung der Lysosomen im toxischen Geschehen nach der Quarzphagozytose.

Da viele AM nach langen Quarz-Inkubationszeiten noch vital blieben, bildeten sich hier offenbar verschiedene Subpopulationen heraus. Die Existenz verschiedener Subpopulationen wurde von Seidel et al. (1990) für RAM und von Nakstad et al. (1989) für humane AM beschrieben. Es wird vermutet, daß die einzelnen Subpopulationen unterschiedliche Reifestadien der Makrophagen darstellen, die sich in u.a. in unterschiedlicher Größe, Migration und Interleukin-1 Produktion manifestieren (Nakstad et al. 1989). In diesem Zusammenhang ist auch die Entstehung der vielkernigen Riesenzellen zu sehen (Abb. 12, 13 und 14). Diese Zellen sind nach Lemaire (1991) als hochstimulierte, völlig ausgereifte Makrophagen anzusehen, die u.a. große Mengen an Superoxid-Anionen produzieren. Gerade den vielkernigen Riesenzellen wird eine Beteiligung an chronischen Entzündungsreaktionen in der Lunge zugeschrieben, wobei der Verlauf des inflammatorischen Prozesses von einer Veränderung in der Zusammensetzung der AM-Population begleitet wird (Lemaire, 1991).

In den fibrotischen Knötchen, die charakteristisch für das pathologische Erscheinungsbild der Silikose sind, kommt es zur vermehrten Ansammlung von AM und zur Anheftung von Fibroblasten, die verstärkt Kollagen synthetisieren (Richards & Curtis, 1984, Thiele 1986). Neben Interleukin-1 (IL-1), Platelet-derived-growth-factor (PDGF), Basic-fibroblast-growth-factor und Transforming-growth-factor- β (TGF- β) gilt TNF- α als fibrogenes Zytokin, das auch von Lungen-Makrophagen freigesetzt wird (Piguet et al., 1990). Durch in situ Hybridisierung gelang der Nachweis der TNF- α mRNA in den fibrotischen Knötchen der silikotischen Lunge (Piguet et al., 1990).

Die mitogene Wirkung des TNF- α auf Fibroblasten ist mittlerweile von vielen Autoren nachgewiesen worden (Le & Vilcek, 1987, Lynch & Toews, 1989, Sugerman et al., 1985, Vilcek et al., 1986). Dabei ist die Stimulierung der Proliferation von humanen Lungenfibroblasten durch rekombinantes TNF- α dosisabhängig (Elias et al., 1990).

Die Fibroblasten ihrerseits werden durch die Mediatoren TNF und IL-1 stimuliert, die Zytokine IL-1 und IL-6 zu produzieren und verstärken so den entzündlichen Prozess in der Lunge (Elias et al., 1990). Dabei wirken IL-1 und TNF synergistisch auf die IL-1- α Produktion der Fibroblasten (Elias & Reynolds, 1990). Auch die

Freisetzung der Mediatoren G-CSF und GM-CSF durch die Fibroblasten wird der induzierenden Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ zugeschrieben (Zucali et al., 1990). Diese hämatopoetischen Wachstumsfaktoren regulieren die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen, aber auch die Aktivität der ausgereiften Zellen (Rosenthal et al., 1991). So kommt es u.a. zur Stimulierung der Proliferation der Knochenmarkszellen und damit des Monozyten/Makrophagen-Systems. Dadurch ist ein weiterer Einstrom von AM in die silikotische Lunge möglich. Ferner bedingt GM-CSF die Freisetzung von Arachidonsäure und die Synthese von Lipidmediatoren wie Leukotriene und "Platelet-activating-factor" (PAF) durch neutrophile Granulozyten (Gasson 1991). Die Arachidonsäure-Metaboliten werden auch direkt von RAM nach Inkubation mit Quarz freigesetzt (Englen et al., 1989) und induzieren somit zusätzliche allergische Prozesse in der Lunge. Aber auch $\text{TNF-}\alpha$ selbst induziert den Arachidonsäuremetabolismus in Fibroblasten (Burch & Tiffany, 1989, Beutler & Cerami, 1987). Die Freisetzung von TNF durch die AM wirkt darüberhinaus chemotaktisch auf die neutrophilen Granulozyten und stimuliert deren phagozytotische Aktivitäten (Beutler & Cerami, 1988).

TNF verstärkt auch die Produktion von Superoxidanionen durch die neutrophilen Granulozyten (Humbert & Winsor, 1990). Durch eine verstärkte und permanente Superoxidanionen-Produktion treten Gewebs- und Zellschäden in der Lunge auf (Baird et al., 1986).

Aus diesem Zusammenhang heraus definierte sich die zweite Zielsetzung dieser Arbeit. Es sollte geprüft werden, ob die hier verwandten RAM in der Lage sind nach Inkubation mit Quarz und den Metallverbindungen, den fibrogenen und proinflammatorischen Mediator TNF zu sezernieren. Dieser Zielsetzung konnte für die Quarzstäube und für den Hochtemperatursupraleiter entsprochen werden.

4.3. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen

Die TNF-Sekretion aus den RAM wurde anhand des von Ruff & Gifford (1981) beschriebenen Bioassays durchgeführt. Dieser Test macht sich die zytotoxische Wirkung des $\text{TNF-}\alpha$ auf die Fibroblasten-Zelllinie L-929 zunutze (s.2.8.2.). Die zytotoxische Wirkung der Kulturüberstände der RAM auf die L-929-Zellen im Bioassay war dabei ein direktes Maß für die sezernierte TNF-Aktivität, d.h. ein hoher TNF-Gehalt der ausgemessenen (unverdünnten) Probe erzielte im Bioassay einen entsprechend hohen Zytotoxizitätswert. Als Standardstimulus für die TNF-Freisetzung wurde das Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella abortus equi* eingesetzt.

Bei allen Untersuchungen konnte eine TNF-artige Aktivität der Kulturüberstände der RAM auf die L-929-Zellen gefunden werden. Da ein Antikörper gegen bovines TNF- α nicht zur Verfügung stand, konnte die zytotoxische Wirkung der Kulturüberstände nicht direkt der Wirkung von TNF- α zugeordnet werden. Es sprachen jedoch mehrere Tatsachen dafür, daß es sich bei den gemessenen Aktivitäten tatsächlich um den Mediator TNF handelte:

1. Die Zell-Linie L-929 gilt als klassische Zielzell-Linie für den TNF-Bioassay (Ruff & Gifford, 1981). Wie Abb. 26 zeigt, reagierten auch die in dieser Arbeit eingesetzten L-929-Zellen konzentrationsabhängig auf human-rekombinantes TNF- α . Die in der Literatur (Ruff & Gifford, 1981) beschriebenen sigmoiden Konzentrations-Wirkungskurven konnten sowohl mit der Neutralrotmethode als auch mit dem MTT-Test (Abb. 26) erzielt werden.

2. Die murine Zelllinie L-929 wird nicht nur zur Quantifizierung von humanem TNF eingesetzt (Okubo et al., 1990), sondern auch zum Nachweis von TNF verschiedenster tierischer Spezies, wie Ratte (Dubois et al., 1989), Maus (Lefkowitz et al., 1989), Kaninchen (Matthews & Watkins, 1978), Pferd (Mackay et al., 1991) und Schwein (Mozes et al., 1991).

3. Nach Inkubation der RAM mit LPS konnte die zytotoxische Wirkung des entsprechenden Kulturüberstandes auf die L-929-Zellen gezeigt werden (Abb. 30a). LPS gilt als das wirksamste Stimulans, das Makrophagen zur TNF-Sekretion anregen kann (Beutler & Cerami, 1987).

Mit den beiden Methoden (MTT-Test und Neutralrotmethode), die zur Quantifizierung der überlebenden L-929-Zellen im TNF-Bioassay etabliert wurden, war es möglich, die zytotoxischen Wirkungen der Überstände der RAM auf die L-929-Zellen zu demonstrieren. Wie Abb. 27 zeigt, wurden mit beiden Methoden sehr gute Übereinstimmungen erzielt. Mit dem MTT-Test konnte sogar noch eine schwache TNF-Aktivität der unstimulierten Kontroll-AM nachgewiesen werden. Der MTT-Test erwies sich vor allem bei der Quantifizierung geringer TNF-Mengen sensitiver als die Neutralrotmethode. Da dieser Test zudem schnellere und reproduzierbarere Resultate lieferte, wurde diese Methode bei allen weiteren Messungen bevorzugt angewandt.

4. Die Reaktion der Kulturüberstände von LPS-stimulierten RAM auf die L-929-Zellen konnte auch mit den WEHI 164-Zellen, einer ebenfalls TNF-sensitiven Zell-Linie, gezeigt werden (Matejka, 1992). Die Reaktionen beider Zell-Linien zeigen eine gute Übereinstimmung.

5. Die Freisetzung bzw. Existenz von bovinem TNF ist bereits von anderen Autoren nachgewiesen worden (Adams & Czuprynski, 1990, Bielefeldt Ohmann et al, 1990, Kenison et al, 1990,). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen humanem und bovinem TNF- α beträgt 80% (Kenison et al., 1989). Eine quantitative Bestimmung der TNF-Freisetzung aus den RAM anhand eines ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay, Fa. Biermann) für humanes TNF gelang nicht.

6. Der Zytotoxizitätswert eines (nach LPS-Stimulation gewonnenen) Kulturüberstandes der RAM konnte durch einen humanen monoklonalen Antikörper (Konz.: 200 μ g/ml) im TNF-Bioassay um 30% zu reduziert werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Adams & Czuprynski (1990), die ebenfalls mit einem humanen Antikörper die zytotoxische Wirkung eines Überstandes von LPS-stimulierten RAM reduzierten.

Die Quantifizierung der TNF-Freisetzung durch die AM erfolgte in dieser Arbeit zum einen durch die vollständige Darstellung der Zytotoxizitätskurven, die die einzelnen Proben im TNF-Bioassay zeigten.

Für die Beurteilung der TNF-Sekretion (durch die RAM) waren dagegen nur die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Überstände relevant. In vielen Versuchsansätzen erzielten die unverdünnten Proben Zytotoxizitäten unterhalb 50%. Daher konnte anhand dieser Werte eine Berechnung der TNF-Freisetzung in Units/ml nicht erfolgen, da der Zytotoxizitäts-Titer (Units/ml) als der reziproke Wert der höchsten Verdünnung der Probe definiert ist, bei der 50% der L-929-Zellen im TNF-Bioassay absterben (Ruff & Gifford, 1981, Matthews & Neale, 1987). Sehr ähnliche Resultate beschrieben Adams & Czuprynski (1990) mit ihren Untersuchungen an RAM und gaben als Maß für die TNF-Freisetzung ebenfalls nur die (unverdünnten) Zytotoxizitätswerte an.

Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit die TNF-Freisetzung zusätzlich durch die "area under the curve" Berechnung (AUC-Berechnung nach Houde & Arora, 1990) quantifiziert und dargestellt. In dieser Berechnung wird der vollständige Verlauf der Zytotoxizitätskurven berücksichtigt. Diese, aus der Pharmakokinetik bekannte Methode, wird vor allem bei Bioverfügbarkeitstudien eingesetzt (Meier et al., 1981, Forth et al., 1987). Die Möglichkeit mit der AUC-Methode die TNF-Freisetzung durch die RAM zu quantifizieren soll im folgenden diskutiert werden.

In den meisten Versuchsansätzen konnte die maximale TNF-Freisetzung der RAM durch die Applikation von LPS erreicht werden. Der Zytotoxizitätswert dieser Überstände im Bioassay entspricht der Antwort der RAM auf einen sehr wirksamen Standardstimulus. Um die Reaktion der RAM nach Inkubation mit den

verschiedenen Stäuben und Metallverbindungen mit dieser Standardantwort vergleichen zu können, wurde der AUC-Wert der LPS-Antwort als 100 % gesetzt. Davon wurden die prozentualen Anteile der AUC-Werte der einzelnen Proben der zeitlich entsprechenden Inkubationen mit den Staubsuspensionen und Metallverbindungen berechnet.

Die TNF-Freisetzung der AM, die mit der AUC-Methode berechnet werden konnte, korrelierte sehr gut mit der TNF-Freisetzung, die nur durch die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Proben gegeben waren. So war z.B. nach der Inkubation der RAM mit den einzelnen Quarzkonzentrationen im Bereich von 25 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ mit steigenden Konzentrationen auch im TNF-Bioassay ein Ansteigen der Zytotoxizitäten der unverdünnten Überstände zu verzeichnen (Abb. 30a, 31a und 32a). Diese Dosisabhängigkeit spiegelte auch die AUC-Berechnung wider und konnte sogar bis auf eine Konzentration von 200 μg Quarz/ml ausgedehnt werden (Abb. 30b, 31b, 32b, 33b und 34b). Wurden die AM zusammen mit LPS und den verschiedenen Quarzkonzentrationen inkubiert, wiesen die Überstände im Bioassay Zytotoxizitätskurven auf, die fast immer identisch zu den reinen LPS-Zytotoxizitätskurven verliefen. Entsprechend ergaben sich AUC-Werte, die eine sehr gute Übereinstimmung mit dem AUC-Wert der LPS-Inkubation (100%) zeigten.

Schwierigkeiten in der Beurteilung der TNF-Freisetzung anhand der AUC-Berechnung ergaben sich, wenn die zugrunde liegenden Zytotoxizitätskurven nicht gleichförmig verliefen. So steigt z.B. die Kurve des Überstandes von unstimulierten Kontroll-AM (Abb. 30a) trotz steigender Verdünnung sogar leicht an. Dieser nicht zu erklärende Anstieg ergab in der AUC-Berechnung relativ hohe Werte für die Kontroll-AM. Insofern erlaubte die AUC-Berechnung hauptsächlich dann vergleichende Aussagen, wenn die zugrunde liegenden Zytotoxizitätskurven der zu vergleichenden Stimuli möglichst gleichförmig oder sogar parallel verliefen.

Fast alle Kulturüberstände von unstimulierten AM zeigten im TNF-Bioassay auch einen zytotoxischen Effekt. Die Zytotoxizitäten der unverdünnten Kontroll-Überstände (4h) lagen zwischen 5% und 35%. Durch die Applikation von LPS konnten Überstände gewonnen werden, deren Zytotoxizitätswerte im Bioassay bis zu 62% anstiegen. Die teilweise hohe Rate der Vorstimulierung der unbehandelten Kontroll-Zellen (Abb. 28) ist u.a. durch die nicht vollständig unter sterilen Bedingungen durchzuführende bronchoalveoläre Lavage der Rinderlungen zu erklären. Auch war der immunologische Zustand des entsprechenden Spendetieres unbekannt. So muß die teilweise hohe Vorstimulierung der Kontrollen bzw. die gelegentlich beobachtete schwach ausgeprägte Antwort der AM auf LPS auf eine unbekannt in-vivo Stimulierung des entsprechenden Tieres zurückgeführt werden. Ruhende, d.h. nicht stimulierte

Makrophagen sezernieren kein TNF (Beutler & Cerami, 1988).

Ohne Stimulierung setzen RAM auch spontan Superoxidanionen frei und Lind (1989) konnte zeigen, daß die RAM kurz nach der Gewinnung der Zellen eine wesentlich stärkere Oberflächenstrukturierung aufweisen. Dies ist ein Charakteristikum aktivierter Makrophagen (Lind, 1989).

Bei älteren in-vitro-Kulturen nahm die LPS-induzierbare TNF-Sekretion durch die AM ab (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher wurden die Zellen stets noch am Tag der Gewinnung mit den entsprechenden Stimulantien inkubiert.

Die vorliegenden Resultate werden durch die in-vitro-Untersuchungen an RAM von Adams & Czuprynski (1990) bestätigt. Diese Autoren berichteten ebenfalls von einer spontanen TNF-Freisetzung durch die unstimulierten Kontroll-AM. Auch nach Stimulation mit LPS entsprechen unsere TNF-Aktivitäten denjenigen von Adams & Czuprynski (1990). Die Autoren führten den TNF-Bioassay mit der murinen Fibrosarcoma-Linie WEHI-164 durch, da ihnen die Bestimmung der TNF-Aktivitäten mit den L-929-Zellen nicht gelang. Da den WEHI-Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber TNF zugeschrieben wird, (Eskandari et al., 1990) scheint der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Klon der L-929-Zellen sehr sensitiv gewesen zu sein.

Durch Inkubationszeiten der RAM von 20h konnte die LPS- induzierbare TNF-Freisetzung nicht noch weiter gesteigert werden. Wie Abb. 28 zeigt, stieg bei 3 der dargestellten Individuen (Nr. 1, 2 und 5) die TNF-Sekretion der unstimulierten Kontroll-AM nach 20h (im Vergleich zu den 4h-Werten) noch stark an. Die AUC-Werte für die spontane TNF-Freisetzung lagen bei diesen Individuen nach 20h schon bei 70% bis 80% der durch LPS zu induzierenden Aktivitäten.

Bei anderen Individuen (Nr. 3, 4, 6 und 7) waren zwischen der spontanen TNF-Sekretion nach 4 und 20 stündiger Inkubation keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen. Dieser Befund bezog sich auch auf die TNF-Freisetzung, die durch Applikation von LPS zu erzielen war. Insgesamt wurden große interindividuelle Unterschiede in der Reaktivität der AM-Populationen beobachtet.

Auch die Kulturüberstände, die nach Inkubationen der RAM mit Quarz sowie Quarz plus LPS nach einer Kulturdauer von 20h gewonnen wurden, zeigten im Bioassay sehr viel niedrigere Zytotoxizitäten, als diejenigen, die nach einer Kulturdauer der AM von 4h gewonnen worden waren (Ergebnisse nicht dargestellt). Dabei konnte ausgeschlossen werden, daß diese Abnahme durch einen Aktivitätsverlust des bereits freigesetzten TNF bedingt war. In Kulturmedium aufgenommenes und seriell verdünntes rhu-TNF- α blieb über einen Zeitraum von 20h und 37°C stabil (Ergebnisse nicht gezeigt).

Diese Resultate bestätigen auch die Untersuchungen von Adams & Czuprynski (1990) an bovinen Monozyten. Der Verlust der TNF-Aktivität wird der unspezifischen Adsorption des TNF an die Kulturschalen zugeschrieben. Vermutet wird auch eine Freisetzung von TNF-Inhibitoren und Proteasen durch die Monozyten. Da insbesondere eine 20 stündige Inkubation der AM mit Quarz zur Freisetzung zytoplasmatischer und lysosomaler Enzyme führt (Abb. 21a bis 21c und 23a bis 23c, siehe auch Pätzold, 1989), erschien zumindest der Verlust der TNF-Aktivität nach derartigen Quarz-Inkubationen plausibel.

4.3.1. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarzstäuben

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, daß RAM, nach Inkubation mit Quarz und dem Supraleiterstaub, das Zytokin TNF in die Kulturüberstände sezernieren.

Vergleichende in-vitro Daten zur TNF-Freisetzung nach Stimulation mit Quarz liegen nur von Bissonnette et al. (1990) und von Dubois et al. (1989) mit ihren Untersuchungen an Ratten-AM vor.

Wie die begleitende Inkubation mit LPS zeigte, lag die TNF-Sekretion der RAM (4h) durch Quarz-Konzentrationen von 25 und 50 µg/ml unter der durch LPS-induzierbaren Freisetzung (Abb. 30a und 31a). Die TNF-Freisetzung der RAM durch 100 und 150 µg Quarz/ml erreichte die durch LPS-induzierbare Freisetzung (Abb. 32a und 33a). Die Konzentrationen von 200 und 250 µg Quarz/ml überstiegen sogar die durch LPS-induzierbare TNF-Sekretionen (Abb. 34a und 35a). Die Applikation der Quarzkonzentration von 500 µg/ml führte zu einer geringeren TNF-Sekretion durch die Zellen, als sie durch LPS allein zu induzieren war. Bei dieser Konzentration wird nach einer Inkubationszeit von 4h nur noch eine Vitalität der AM von 60% beobachtet. Hier überwog mit Sicherheit die zellschädigende Wirkung des Quarzes, die sich in einer verringerten Freisetzung von TNF zeigte. Weitere Untersuchungen ergaben, daß TiO₂ und der biologisch inerte Partikel Latex die RAM nicht zur Sekretion von TNF stimulieren konnten (Ergebnisse nicht dargestellt). Diese Kontroll-Versuche sollten ausschließen, daß die TNF-Sekretion der RAM durch den Quarz und den HTS nicht als ein reiner Phagozytoseeffekt anzusehen waren.

Die Antwort der AM auf die Co-Stimulation durch Quarz mit LPS war nicht immer einheitlich. In den meisten Fällen führte die Co-Stimulation im Vergleich zur LPS-Stimulation zu einer leicht erhöhten TNF-Aktivität oder war zumindestens mit ihr identisch. Trotz dieser Unterschiede zeigten diese

Ergebnisse, daß die Phagozytose des Quarzes die durch LPS zu induzierende TNF-Sekretion nicht beeinflusste. Andere Resultate erzielten Dubois et al. (1989). Diese Autoren stellten nach Co-Stimulation von Ratten-AM mit dem Quarz Min-U-Sil 5 (50 µg/ml) und LPS eine additive TNF-Freisetzung fest. Direkte Vergleiche waren problematisch, da Dubois et al. (1989) die TNF-Aktivitäten zwar auch mit L-929-Zellen bestimmten, die Resultate jedoch in Units/ml angaben.

Die meisten Kulturüberstände, die nach 20 stündiger Inkubation der AM mit Quarz gewonnen wurden, zeigten im Bioassay sehr niedrige Zytotoxizitäten (Ergebnisse nicht aufgeführt). Somit waren Aussagen über Dosisabhängigkeiten zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Im Gegensatz dazu zeigen Ratten-AM nach Inkubationszeiten von 24h eine dosisabhängige TNF-Sekretionen durch den Quarz, die auch für den Asbest Chrysotil A gilt (Dubois et al., 1989). Auch die an Ratten-AM beobachtete Kinetik der TNF-Sekretion durch den Quarz (maximale TNF-Freisetzung nach 24h, Dubois et al., 1989) konnte mit den RAM nicht nachvollzogen werden. Hier wirken sich offenbar u.a. speziesspezifische Unterschiede in der Sensitivität der untersuchten AM aus. Interspeziesvergleiche ergaben, daß RAM vor allem auf geringe Quarzkonzentrationen (50 bis 100 µg/ml) und bei Inkubationszeiten von 20h empfindlicher als Ratten-AM reagieren (Schimmelpfeng, 1989). Darüberhinaus sind die unterschiedlichen Ergebnisse sehr wahrscheinlich auf die von Dubois et al. (1989) verwandten pathogen-freien Ratten erklären.

Insgesamt waren die von den RAM sezernierten TNF-Raten nicht besonders hoch. Wie bereits erwähnt, konnte daher eine Berechnung der Aktivitäten in Units/ml nicht erfolgen (s. oben). Da sich aber insbesondere geringe TNF-Raten fördernd auf die Gewebsneu- und -umbildung auswirken (Wakefield et al., 1991) wurden diese in-vitro-Befunde als durchaus realitätsnah angesehen.

4.3.2. Phospholipid-Schutzeffekt

Die Reduzierung der Quarztoxizität durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL unter in-vitro Bedingungen ist durch die vorliegenden fluoreszenzmikroskopischen und biochemischen Untersuchungen an quarzexponierten RAM bereits gezeigt und diskutiert worden (siehe auch die Arbeiten von Pätzold, 1989, Wallace et al., 1985, 1986 und Wilczek, 1991). Auch die Phospholipide, die durch Zentrifugation aus der Lungen-Lavageflüssigkeit isoliert werden können ("Surfactant"), reduzieren in-vitro die Quarztoxizität (Schimmelpfeng, 1989).

Wie die Abb. 37a bis 37c zeigen, entsprach die TNF-Sekretion der RAM durch den nativen Quarz derjenigen durch den DPL-beschichteten Quarz. Die Co-

Stimulation durch den nativen Quarz mit LPS führte zu einer sezernierten TNF-Menge, die oberhalb der durch LPS allein zu induzierenden Mengen lag. Diese hohen TNF-Aktivitäten waren durch die Co-Stimulation der Zellen mit DPL-Quarz und LPS nicht zu erreichen. Die Zytotoxizitäten der Überstände wiesen im Bioassay konstante Werte auf. Sie entsprachen zumindest bei den Konzentrationen von 250 und 500 $\mu\text{g/ml}$ den Zytotoxizitätswerten, die durch LPS allein zu erzielen waren.

Die Inkubation der AM mit Quarz in Kombination mit den Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit führte zu einer direkten Verminderung der TNF-Aktivitäten (Abb. 39, 40, 41 und 42). Die sezernierten TNF-Aktivitäten durch die Quarz/Phospholipid-Ansätze lagen niedriger als die der reinen Quarzinkubation. Sie mußten schon wegen des stimulatorischen Effektes, die die Lavageflüssigkeit allein zeigte, als ausgeprägt angesehen werden.

Da TNF mitogen auf Fibroblasten wirkt (Elias et al., 1990), wäre eine Reduzierung des fibrogenen Potentials durch die Beschichtung des Quarzes mit DPL bzw durch die Zugabe von Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit ("Surfactant") gegeben.

In diesem Zusammenhang wäre es relevant, die Wirkung der von den AM freigesetzten Zytokine auf die Typ II Pneumozyten zu untersuchen. Nach intratrachealen Instillationen von Quarz in Rattenlungen wird eine gesteigerte Surfactantproduktion beobachtet (Miller et al., 1990, Miller & Hook, 1988). Es ist bekannt, daß Leukotriene die Typ II Zellen zu einer gesteigerten Surfactantproduktion anregen (Dobbs, 1989). Leukotrien B_4 wird zusammen mit TNF von Ratten-AM nach Inkubation mit Quarz und Asbest freigesetzt (Dubois et al., 1989), so daß hier eine direkte stimulatorische Wirkung auf die Typ II Pneumozyten abzuleiten wäre. Die Wirkung eines Zytokins ist u.a. von der Aktivierung der entsprechenden Zielzellen abhängig. Weitere Abhängigkeiten sind durch die gleichzeitige Anwesenheit anderer Zytokine gegeben (Elias et al., 1990). So könnte in-vivo eine verminderte TNF-Sekretion durch den primär vorhandenen Schutz der Phospholipide eine gesteigerte Leukotrien B_4 -Freisetzung und damit eine gesteigerte Surfactantproduktion durch die Typ II Pneumozyten in den quarzgeschädigten Alveolen bedingen. Zusätzlich müssten auch die von den Lungen-Fibroblasten freigesetzten Zytokine Berücksichtigung finden, da diesen zumindest in der Entwicklung der Typ II Zellen eine wichtige Rolle zugesprochen wird (Kelly, 1990). So zeigt z.B. der von stimulierten Makrophagen freigesetzte und mitogen auf Fibroblasten wirkende Platelet-derived-growth-factor auch auf fötale Typ II Zellen eine proliferative Wirkung (Kelly, 1990). Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um die Einflüsse von TNF auf die Zellen der Alveolen im entzündlichen Geschehen abzuklären.

4.3.3. Der TNF-Gehalt von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit LPS

Parallel zu der Bestimmung der TNF-Sekretion aus den RAM wurde der Versuch unternommen, den intrazellulären Gehalt an TNF in den adhären RAM zu bestimmen. Wie Abb. 29 zeigt, entsprach der TNF-Gehalt der unstimulierten Kontrollen (für beide Inkubationszeiten) nahezu dem Gehalt, den die Zellen aufwiesen, die mit LPS inkubiert worden waren. Die AUC-Werte (in % der LPS-Stimulation) der unstimulierten Kontrollen lagen zwischen 80 und 100%. Dagegen kommt es bei Maus-Peritonealmakrophagen zu einer Reduktion des intrazellulären TNF-Gehaltes nach LPS-Stimulation, der direkt mit der entsprechenden TNF-Freisetzung korrelierte (Chensue et al., 1988). Allerdings kamen auch hier Spendertiere zum Einsatz, die unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen gehalten wurden. Es wird angenommen, daß TNF von den Zellen nicht intrazellulär gespeichert wird, sondern erst bei Bedarf rasch synthetisiert und freigesetzt wird (Luettig et al., 1989). Damit sind sowohl die spontan sezernierten TNF-Mengen als auch die hohen Aktivitäten in den unstimulierten RAM auf die teilweise hohen in-vivo Vorstimulierungen der AM zurückzuführen. Brown & Fishman (1990) wiesen darauf hin, daß der TNF-Gehalt von Ratten-AM nach Stimulation mit LPS sehr schnell ansteigt, während sich der TNF-Gehalt von Peritoneal- und Milz- Makrophagen nach der Stimulation nicht erhöht. Die Methodik der Bestimmung des TNF-Gehaltes der AM durch einfache Homogenisation der Zellen wurde bereits von Dubois et al. (1989) durchgeführt. Allerdings erlaubt diese Methode keine Differenzierung zwischen den beiden TNF-Formen, deren Existenzen Luettig et al. (1989) an Peritonealmakrophagen der Maus nachwiesen. Demnach zeigen die Makrophagen zusätzlich eine rein membran-assoziierte TNF-Aktivität. Diese erlaubt den Makrophagen einen weiteren zellvermittelnden zytotoxischen Mechanismus auch ohne Stimulierung zu entfalten.

4.3.4. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Lanthan und Cer

Durch Autoabgase und durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe (z.B. Kohlekraftwerke) gelangen große Mengen der Seltenen Erdmetalle Lanthan und Cer in die Atmosphäre (siehe hierzu Evans, 1990). Da insbesondere die Inhalation von Cer zur Entstehung von Pneumokoniosen führt (Evans, 1990), war die Möglichkeit einer fibroseerzeugenden Wirkung dieser Metalle zu prüfen. Die Applikation von Lanthan und Cer führte zu keiner nennswerten TNF-

Sekretion durch die AM (Abb. 43a und 44a). Erst durch die Co-Stimulation der AM mit LPS und diesen Elementen war ein gewisser synergistischer Effekt gegeben. Die LPS-induzierbare TNF-Freisetzung der AM wurde durch beide Elemente nicht meßbar beeinflusst. Lanthan und Cer Elemente hemmten auch nicht die basale TNF-Sekretion, die die unstimulierten Kontrollen zeigten.

Die vorliegenden Befunde deuten an, daß die biologische Wirkung von Lanthan und Cer nicht durch den Mediator TNF vermittelt werden. Diese Ergebnisse werden auch durch die Untersuchungen von Matejka (1992) an HL-60-Zellen bestätigt, die durch Calcitriol ($1\alpha,25$ -dihydroxy-Vitamin D_3) zu makrophagenähnlichen Zellen ausdifferenziert wurden. Kontrollversuche zeigten, daß durch Lanthan und Cer weder Interferenzen mit dem MTT-Test noch mit der zytotoxischen Wirkung des TNF auf die L-929-Zellen gegeben sind (s. 2.8.1. und Baierl, persönliche Mitteilung, 1992).

In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse zur TNF-Sekretion der RAM durch den Hochtemperatursupraleiter (HTS) $YBa_2Cu_3O_{7-x}$ zu sehen. Diese Metallmischoxide enthalten Kupfer, ein Element der Seltenen Erden (Lanthan oder Yttrium) und ein Erdalkalimetall.

4.3.5. Die Freisetzung von TNF aus Rinder-Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit dem HTS $YBa_2Cu_3O_{7-x}$

Durch die Inkubation der RAM mit HTS wurden die Zellen zur TNF-Sekretion stimuliert (Abb. 45). Somit entfaltet sich die Wirkung inhalierter HTS-Stäube auch über den Mediator TNF. Das Ausmaß dieser Freisetzung entsprach derjenigen, die durch die Quarzstäube zu induzieren war (Vergleiche nicht dargestellt). Auch die LPS-induzierbare TNF-Sekretion wurde durch die HTS-Stäube nicht beeinflusst. Eine Steigerung der TNF-Freisetzung durch die Konzentration von $500 \mu\text{g}$ HTS/ml war durch Co-Stimulation mit LPS verzeichnen. Diese Befunde machten deutlich, daß die AM trotz der zytotoxischen HTS-Wirkung in der Lage waren, diese immunologische Funktion zu entfalten. Da TNF von den AM auch zur Infektabwehr sezerniert wird (Beutler & Cerami, 1988), scheint sowohl der HTS als auch der Quarz (unter diesen Kulturbedingungen) diesen Mechanismus nicht meßbar zu beeinflussen.

Im Gegensatz dazu zeigten RAM eine nur sehr geringfügig ausgeprägte Superoxid-anionen-Freisetzung nach Inkubation mit HTS (Lind, 1989). Hier unterbindet der HTS offensichtlich eine der wichtigen Abwehrfunktion (z.B. Zerstörung lebender Parasiten und Mikroorganismen) der RAM. Eine Analyse zur Toxizität der Einzelbestandteile des HTS ließ die Vermutung zu, daß das Element Kupfer für die zytotoxischen Effekte die größte Bedeutung hat (Lind, 1989, Wilczek, 1991).

4.4. Die Freisetzung von TNF aus HL-60-Zellen

Die Ausdifferenzierung der humanen, promyelozytären HL-60-Zellen durch den Tumorpromoter TPA zu makrophagenähnlichen Zellen wurde von einer spontanen TNF-Freisetzung begleitet (Abb. 47a). Diesen Befund bestätigen die Daten von Aggarwal & Kohr (1985) und Wang et al. (1985). Auch die undifferenzierten Promyelozyten setzten TNF in das Kulturmedium frei.

Die TNF-Sekretion durch die differenzierten HL-60-Zellen nach LPS-Stimulation lag in etwa um den Faktor 100 höher als diejenige der RAM (Abb. 48, 50 und 51). Die unverdünnten LPS-Überstände erreichten im Bioassay Zytotoxizitätswerte von fast 100%. Erst eine Verdünnung dieser Überstände von 1:100 führte zu Zytotoxizitätswerten um 56%. Diese Werte erzielten in den meisten Untersuchungen die unverdünnten LPS-Überstände der RAM.

Die TNF-Sekretion durch die getesteten Quarzkonzentration stimmte mit derjenigen der unstimulierten Kontroll-Zellen überein. Wurden die HL-60-Zellen mit Quarz und LPS co-stimuliert, entsprach die TNF-Sekretion der nur durch LPS allein zu erzielenden Freisetzung.

Mit TPA ausdifferenzierte HL-60-Zellen zeigten sich bezüglich der Parameter Vitalität und Enzymfreisetzung gegenüber der Quarzwirkung resistent (Nieder, 1989). Auch produzierten diese Zellen nach Stimulation mit Quarz und/oder Zymosan keine Superoxidanionen (Lind, 1989).

Die Resistenz der ausdifferenzierten HL-60-Zellen gegenüber der Quarzwirkung spiegelt möglicherweise auch die durch den Quarz nicht zu induzierende TNF-Freisetzung wider. Nur durch die Inkubation der HL-60-Zellen mit TiO_2 war eine recht hohe Sekretion zu verzeichnen (Abb. 54), die durch Inkubation der RAM mit diesem Staub nicht zu erzielen war. Auch durch Latex waren die HL-60-Zellen, wie auch die RAM nicht zur TNF-Sekretion zu stimulieren (Abb. 56). Die Bestimmung des TNF-Gehaltes in den RAM ergab keine Unterschiede nach Inkubation der Zellen mit LPS und den einzelnen Noxen (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Untersuchungen zum TNF-Gehalt der HL-60-Zellen zeigten dagegen durchaus nennenswerte Differenzen (Abb. 49, 51, 53, 55 und 57). Der TNF-Gehalt nach Inkubation mit den Stäuben entsprach dem Gehalt der unstimulierten Kontroll-Zellen. Erst durch die Co-Stimulation Zellen durch die Stäube mit LPS wurde ein TNF-Gehalt ermittelt, der demjenigen nach alleiniger Stimulation mit LPS glich (für diese Ergebnisse gilt auch der bereits für den TNF-Gehalt der RAM diskutierte Abschnitt, s.oben).

Diese Ergebnisse deuten an, daß die zu makrophagenähnlichen differenzierten, humanen HL-60-Zellen kein geeignetes Modell für Untersuchungen zur TNF-Freisetzung durch die Quarzstäube sind.

Abschließend soll die von Dubois et al. (1989) aufgezeigte Möglichkeit erwähnt

werden, die durch TNF vermittelten entzündlichen und fibrotischen Prozesse durch Quarzstäube zu unterbinden.

Ratten-AM setzen in-vitro nach Inkubation mit Quarz und Asbest nicht nur TNF sondern auch Leukotrien B₄ in die Kulturüberstände frei. Die Freisetzung von Leukotrien B₄ kann durch die Inkubation der Ratten-AM mit AA861, einem Inhibitor der Leukotrien-Synthese, gehemmt werden. Diese Hemmung unterbindet auch reversibel und dosisabhängig die durch Quarz und Asbest zu induzierende TNF-Sekretion (Dubois et al., 1989). Damit wäre eine erfolgsversprechende Zielsetzung für zukünftige Untersuchungen gegeben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zwei Ziele. Zum einen sollte der Einfluß von phagozytierten Quarzpartikeln auf den lysosomalen Apparat von Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) untersucht werden und die Hypothese der Permeabilitätsänderung (Allison & Morgan, 1979) dieser Organellen bzw. die der Ruptur (Kane et al., 1980) der Lysosomen durch die Quarzpartikel untersucht werden. Dazu wurden die RAM nach der Quarzphagozytose mit dem Vitalfarbstoff Acridinorange (AO) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

1. Die Anfärbung der RAM mit AO führte zu einem grün fluoreszierenden Zytoplasma, in dem die Lysosomen als rot fluoreszierende Organellen identifiziert werden konnten.
2. Nach der Quarzphagozytose wurden die Partikel in rot fluoreszierenden und somit fluoreszenzoptisch intakten Phago-Lysosomen wiedergefunden. In den Zellen wurden auch gelb fluoreszierende Lysosomen beobachtet, die niemals Quarz enthielten.
3. Durch die Phagozytose des Quarzes wurden im fluoreszenzoptischen Bild zusätzlich ausschließlich grün fluoreszierende Zellen gefunden. Die Quarzpartikel lagen scheinbar frei im Zytoplasma der Zellen. Dieses Erscheinungsbild deutete auf eine lysosomale Veränderung der Zellen hin.
4. Die Entstehung dieser grün fluoreszierenden Zellen war direkt auf den Einfluß des nativen Quarzes zurückzuführen, da sie durch die Phagozytose von DPL-vorbehandeltem Quarz unterbunden werden konnte.
5. Fluoreszenzoptische Übergänge zwischen den quarzhaltigen, rot fluoreszierenden Phago-Lysosomen zu den ausschließlich grün fluoreszierenden Zellen konnten nicht beobachtet werden.
6. Die Hypothese, daß der Einstrom von extrazellulären Kalziumionen durch die eine ebenfalls quarzgeschädigte Zellmembran für den Zelltod verantwortlich sei, konnte für die RAM nicht bestätigt werden.
7. Die Phagosomen-Lysosomen-Fusion quarzexponierter RAM wurde durch den Fusionshemmstoff Ammoniumchlorid unterbunden. Dadurch konnte nach Quarzphagozytose die beobachtete Reduktion der lysosomalen Cathepsin B-

Aktivität aufgehoben und die Zell-Vitalitäten gesteigert werden.

8. Nach langen Inkubationszeiten (ab 48h) wurden nach der Quarzexposition die Entstehung resistenter Subpopulationen beobachtet, die den Quarz in fluoreszenzoptisch intakten Lysosomen eingeschlossen hatten. Zusätzlich kam es zum Auftreten vielkerniger Riesenzellen.

Diese Befunde zeigten, daß die phagozytierten Quarzpartikel einen direkten und verändernden Einfluß auf den lysosomalen Apparat der RAM ausübten. Ob das Ausmaß dieser Veränderungen rein funktionell und/oder morphologisch bedingt war, konnte nicht erfasst werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand in der Analyse der TNF- α -Freisetzung durch die RAM und durch die humane Zelllinie HL-60 nach Inkubation dieser Zellen mit Quarzstäuben und verschiedenen Metallmischoxiden. Als Standardstimulus für die TNF-Sekretion durch diese Zellen wurde Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt. Die TNF-Sekretion wurde anhand eines Bioassays bestimmt, der sich die zytotoxische Wirkung von TNF auf die Zelllinie L-929 zunutze macht. Die freigesetzten TNF-Aktivitäten wurden als Zytotoxizitätskurven dargestellt, welche die Kulturüberstände im Bioassay aufwiesen und zusätzlich (unter Berücksichtigung der Zytotoxizitätskurven) durch Anwendung der "Area under the curve"-Berechnung quantifiziert und dargestellt. Es konnte bei allen Untersuchungen eine TNF-artige Aktivität der ausgemessenen Kulturüberstände der RAM auf die L-929-Zellen gefunden werden. Da ein Antikörper gegen bovines TNF- α nicht zur Verfügung stand, konnte die zytotoxische Wirkung der Kulturüberstände nicht direkt der Wirkung von TNF- α zugeordnet werden. Es sprachen jedoch mehrere Tatsachen dafür, daß es sich bei den gemessenen Aktivitäten tatsächlich um das Zytokin TNF handelte, die im Abschnitt 4.3. diskutiert werden.

1. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß RAM durch die Quarzstäube zur TNF-Freisetzung stimuliert wurden. Die TNF-Sekretion nach einer Inkubationszeit der RAM von 4h durch die getesteten Quarzkonzentrationen im Bereich von

25, 50 und 500 $\mu\text{g/ml}$ lag unterhalb,
100 und 150 $\mu\text{g/ml}$ entsprach der
200 und 250 $\mu\text{g/ml}$ lag oberhalb der durch LPS zu induzierenden TNF-Sekretion.

Die TNF-Sekretion aller getesteten Quarzkonzentrationen lag oberhalb

derjenigen der unstimulierten Kontrollen.

2. Die Co-Stimulation der RAM durch Quarz mit LPS führte fast immer zu einer TNF-Freisetzung, die derjenigen der allein durch LPS zu induzierenden Freisetzung entsprach.

3. Die Phagozytose der Quarzpartikel durch die RAM unterband nicht messbar die basale TNF-Sekretion der unstimulierten Kontrollen und beeinflusste nicht die LPS-induzierbare TNF-Sekretion.

4. Die Analyse der TNF-Sekretion nach einer Inkubationszeit der RAM von 20h durch den DPL-vorbehandelten Quarz ergab für die Quarzkonzentrationen von 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$ keine Unterschiede im Vergleich zu dem nativen Quarz. Bei einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ DPL-vorbehandeltem Quarz lag die TNF-Freisetzung durch die RAM höher als im Vergleich zu dem nativen Quarz. Durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL wurde die LPS-induzierbare TNF-Sekretion verringert.

5. Die Analyse der TNF-Sekretion nach Inkubationszeiten der RAM von 4h und 20h durch die zusätzliche Zugabe von Phospholipiden, die aus der Lungen-Lavageflüssigkeit isoliert wurden, in das Quarz-Inkubationsmedium ergab eine Verringerung in der TNF-Freisetzung. Auf das Ausmaß der TNF-Freisetzung durch die Co-Stimulation durch Quarz mit LPS hatte die Zugabe der Phospholipide keinen Einfluß.

6. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß der Hochtemperatursupraleiter (HTS) $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ die RAM zur TNF-Sekretion stimuliert. Durch die Co-Stimulation der Zellen durch den HTS mit LPS konnte gezeigt werden, daß der HTS die LPS-induzierbare TNF-Sekretion nicht messbar beeinflusst.

7. Die Seltenen Erdmetalle Lanthan und Cer stimulierten die RAM nicht zur Freisetzung von TNF. Durch diese Elemente war keine Hemmung der basalen TNF-Sekretion durch die unstimulierten Kontrollen gegeben. Die Co-Stimulation durch Lanthan/Cer mit LPS führte zu einem Ansteigen in der TNF-Produktion, die oberhalb der durch LPS zu induzierenden Produktion lag.

8. Die TNF-Sekretion durch TPA differenzierte HL-60-Zellen lag im Vergleich zu den RAM nach LPS-Stimulation etwa um den Faktor 100 höher.

9. Ausdifferenzierte HL-60-Zellen setzten nach Inkubation mit Quarz kein TNF frei.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abok, K., Hirth, T., Ericsson, J.L.E., Brunk, U., 1983
Effect of iron on the stability of macrophage lysosomes.
Virchows Archiv B Cell. Pathol., Vol. 43, 85-101

Adachi, H., Hayashi, H., Sato, H., Dempo, K., Akino, T., 1989
Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica.
Biochem.J., Vol. 262, 781-786

Adams, J.L., Czuprynski, C.J., 1990
Bacterial lipopolysaccharide induces release of tumor necrosis faktor- α from bovine alveolar peripheral blood monocytes and alveolar macrophages in vitro.
J.Leukocyte Biol., Vol. 48, 549-556

Aggarwal, B.B., Kohr, W.J., 1985
Human tumor necrosis factor.
Methods Enzymol., Vol. 116, 448-456

Allison, A.C., Harington, J.S., Birbeck, M., 1966
An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages.
J.Exp.Med., Vol. 124, 141-154

Allison, A.C., Morgan, D.M.L., 1979
Effects of silica, asbestos, and other particles on macrophage and neutrophil lysosomes.
in: Lysosomes in Applied Biology and Therapeutics, Eds.: J.T. Dingle, P.J. Jaques, I.H. Shaw, North Holland Publishing Comp., Amsterdam, Vol. 6, 149-159

Allison, A.C., Young, M.R., 1964
Uptake of dyes and drugs by living cells in culture.
Life Science, Vol. 3, 1407-1414

Allison, A.C., Young, M.R., 1975
Vital staining and fluorescence microscopy of lysosomes.
in: Lysosomes in Biology and Pathology 2, Eds.: J.T.Dingle, H.B.Fell, North Holland Publishing Comp., Amsterdam, Vol. 22, 600-628

Andersen, O.K., Stenvolds, S.E., Volden, G., 1982
Optimalised assay conditions of 3T3 cell lysosomal hydrolases.
Europ.Rev.Med.Pharmacol.Sci. IV, 265-272

Baierl, T., 1992
Institut für Genetik und Toxikologie von Spaltstoffen (IGT),
Kernforschungszentrum Karlsruhe

Bainton, D., 1981
The discovery of lysosomes.
J.Cell Biol., Vol. 91, 66-76

Baird B.R., Cheronis, J.C., Sandhaus, R.A., White, C.W., Repine, J.E., 1986
O₂-metabolites and neutrophil elastase synergistically cause edematous injury in isolated rat lungs.

J.Appl.Physiol., Vol. 61, 2224-2229

Bednorz J.G., Müller, K.A., 1986

Possible high-*tc* superconductivity in the ba-la-cu-o system.

Z.Phys., Vol. B64, 189

Begin, R.O., Cantin, A.M., Boileau, R.D., Bisson, G.Y., 1987

Spectrum of alveolitis in quartz-exposed human subjects.

Chest, Vol. 92, 1061-1067

Begin, R.O., Cantin, A., Masse, S., 1989

Recent advances in the pathogenesis and clinical assessment of mineral dust pneumoconiosis: asbestosis, silicosis, and coal pneumoconiosis.

Eur.Respir.J., Vol. 2, 988-1001

Beutler, B., Cerami, A., 1987

Cachectin: more than a tumor necrosis factor.

N.Engl.J.Med., Vol. 316, 379-385

Beutler, B., Cerami, A., 1988

Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator.

Ann.Rev.Biochem., Vol. 57, 505-518

Bielefeldt Ohmann H., Campos, M., McDougall, L., Lawman, M.J.P., Babiuk, L.A., 1990

Expression of tumor necrosis factor- α receptors on bovine macrophages, lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes, internalization of receptor-bound ligand and some functional effects.

Lymphokine Research, Vol. 9, 43-58

Bissonnette, E., Carre, B., Dubois, C., Rola-Pleszczynski, 1990

Inhibition of alveolar macrophage cytotoxicity by asbestos: possible role of prostaglandins.

J.Leukocyte Biol., Vol. 47, 129-134

Boobis, A.R., Fawthrop J., Davies, D.S., 1989

Mechanisms of cell death.

TiPS, Vol. 10, 275-280

Borenfreud, E., Puerner J.A., 1984

A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HDT/NR-90).

J.Tissue Culture Methods., Vol. 9, 7-9

Bowden, D.H., 1987

Macrophages, dust, and pulmonary diseases.

Exp.Lung Res., Vol. 12, 89-107

Brown, A.R., Fishman, M., 1990

Tumor necrosis factor- α analyzed within individual macrophages by combined immunocytochemistry and computer-aided image analysis.

Cell.Immunol., Vol. 130, 352-363

- Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938**
Adsorption of gases in multimolecular layers.
J.Amer.Chem.Soc., Vol. 60, 309-319
- Burch, R.M., Tiffany, C.W., 1989**
Tumor necrosis factor causes amplification of arachidonic acid metabolism in response to interleukin 1, bradykinin, and other antagonists.
J.Cell Physiol., Vol. 141, 85-89
- Canonico, P.G., Bird, J.W., 1969**
The use of acridine orange as a lysosomal marker in rat skeletal muscle.
J.Cell.Biol., Vol. 43, 367-371
- Capo, C., Farnarier, C., Benoniel, A.M., Bongrand, P., Depieds, R., 1983**
Dissociation between phagocytosis and phagosome-lysosome fusion.
J.Reticuloendothel.Soc., Vol. 34, 359-369
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975**
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, Vol. 72, 3666-3670
- Chapman H.A., Stone, O.L., 1984**
Comparison of live human neutrophil and alveolar macrophages elastinolytic activity in vitro: relative resistance of macrophage elastinolytic activity to serum and alveolar proteinase inhibitors.
J.Clin.Invest., Vol. 74, 1639-1700
- Chensue, S.W., Remick, D.G., Shmyr-Forsch, C., Beals, T.F., Kunkel, S.L., 1988**
Immunohistochemical demonstration of cytoplasmic and membrane-associated tumor necrosis factor in murine macrophages.
Am.J.Pathol., Vol. 133, 564-572
- Christen, H.R., 1977**
Chemie
Verlag Sauerländer, Aarau und Verlag Diesterweg, Frankfurt
- Comolli, R., 1967**
Cytotoxicity of silica and liberation of lysosomal enzymes.
J.Path.Bact., Vol. 93, 241-253
- D'Arcy Hart, P., Young, M.R., 1975**
Interference with normal phagosome-lysosome fusion in macrophages, using ingested yeast cells and suramin.
Nature, Vol. 256, 47-49
- D'Arcy Hart, P., Young, M.R., Jordan, M.M., Perkins, W.J., Geisow, M.J., 1983**
Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements.
J.Exp.Med., Vol. 158, 477-492
- Darzynkiewicz, Z., Kapuscinski, J., 1990**
Acridine orange: a versatile probe of nucleic acids and other cell constituents.
in: Flow Cytometry and Sorting, Eds.: Myron & Melamed
Wiley-Liss.Inc., New York

- Decker, R.S., Decker, M.L., Thomas, V., Fuseler, J.W., 1985**
Responses of cultured cardiac myocytes to lysosomotropic compounds and methylated amino acids.
J.Cell Sci., Vol. 74, 119-135
- DeForge, L.E., Nguyen, D.T., Kunkel, S.L., Remick, D.G., 1990**
Regulation of the pathophysiology of tumor necrosis factor.
J.Lab.Clin.Med., Vol. 116, 429-438
- Dell'Antone, P., 1979**
Evidence for an ATP-driven "proton pump" in rat liver lysosomes by basic dyes uptake.
Biochem.Biophys.Res.Comm., Vol. 86, 180-189
- Denizot, F., Lang, R., 1986**
Rapid colorimetric assay for cell growth and survival:
Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.
J.Immunol.Methods., Vol. 89, 271-277
- Dinarello, C.A., 1989**
Interleukin-1 and related cytokines.
in: Macrophage-derived cell regulatory factors. Cytokines. Ed.: C.Sorg, Vol. 1, 105-154, Karger, Basel
- Dobbs, L.G., 1989**
Pulmonary surfactant.
Ann.Rev.Med., Vol.40, 431-446
- Dubois, C.M., Bissonette, B., Rola-Pleszczynski, M., 1989**
Asbestos fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor.
Am.Rev.Respir Dis., Vol. 139, 1257-1264
- Eissenberg, L.G., Wyrick, P.B., 1981**
Inhibition of phagolysosome fusion is localized to Chlamydia psittaci-laden vacuoles.
Infection
and Immunity, Vol. 32, 889-896
- Elias, J.A., Freundlich, B., Kern, J.A., Rosenbloom, J., 1990**
Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung.
Chest, Vol. 97, 1439-1445
- Elias, J.A., Reynolds, M.M., 1990**
Interleukin-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate lung fibroblast interleukin 1 α production.
Am.Rev.Respir.Cell Mol.Biol., Vol. 3, 13-20
- Englen, M.D., Taylor, S.M., Laegreid, W.W., Liggitt, H.D., Silflow, R.M., Breeze, R.G., Leid, R.W., 1989**
Stimulation of arachidonic acid metabolism in silica-exposed alveolar macrophages.
Exp.Lung Res., Vol. 15, 511-526

Eskandari, M.K., Nguyen, D.T., Kunkel, S.L., Remick, D.G., 1990
WEHI 164 subclone 13 assay for TNF: sensitivity, specificity and reliability.
Immunol.Invest., Vol. 19, 69-79

Evans, C.H., 1990
Biochemistry of the lanthanides.
Plenum Press, New York

Evans, R.D., Argiles, J.M., Williamson, D.H., 1989
Metabolic effects of tumour necrosis factor- α (cachectin) and interleukin-1.
Clinical Science, Vol. 77, 357-364

Fagan, S.M., Keough, K.M.W., 1988
Models of pulmonary surfactant: monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and phosphatidylinositol.
Chemistry and Physics of Lipids, Vol. 48, 59-67

Fok, A.F., Ueno, M.S., Azada, E.A., Allen, R.D., 1987
Phagosomal acidification in *Paramecium*: effects on lysosomal fusion.
Europ.J.Cell.Biol., Vol. 43, 412-420

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., 1987
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
BI Wissenschaftsverlag, Mannheim

Fox, M.L., 1973
The bovine alveolar macrophage. 1. Isolation, in vitro cultivation, ultrastructure, and phagocytosis.
Can.J.Microbiol., Vol. 19, 1207-1010

Freidlin, I.S., Khavkin, T.N., Artemenko, N.K., Sakharova, I.Y., 1977
Vital fluorescence microscopy of lysosomes in cultured mouse peritoneal macrophages during their interactions with microorganisms and active substances. II. Interactions of macrophages with a non-pathogenic strain of *Escherichia Coli*.
Acta microbiol.Acad.Sci.hung., Vol. 24, 293-302

Galloway, C.J., Dean, G.E., Marsh, M., Rudnik, G., Mellman, I., 1983
Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol. 80, 3334-3338

Gasson, J.C., 1991
Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood, Vol. 77, 1131-1145

Geisow, M.J., D'Arcy Hart, P., Young, M.R., 1981
Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy.
J.Cell Biol., Vol. 89, 645-652

Gordon, A.H., D'Arcy Hart, P.D., Young, M.R., 1980
Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages.
Nature, Vol. 286, 79-80

Goren, M.B., Mor, N., 1988

Recent developments in studies on cultured phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages.

in: Virulence mechanisms of bacterial pathogens, Ed.: J.A.Roth
American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Goren, M.B., Swendsen, C.L., Fiscus, J., Miranti, C., 1984

Fluorescent markers for studying phagosome-lysosome fusion.
J.Leukocyte Biol., Vol. 36, 273-292

Hartmann, D.P., Georgian, M.M., Oghiso, Y., Kagan, E., 1984

Enhanced interleukin activity following asbestos inhalation.
Clin.exp.Immunol., Vol. 55, 643-650

Herrmann, F., 1986

Tumornekrosefaktor

Münch.med.Wschr., Vol. 128, 630-632

Heppleston, A.G., 1984

Pulmonary toxicology of silica, coal and asbestos.

Environmental Health Perspectives, Vol. 55, 111-127

Heppleston, A.G., Styles J.A., 1967

Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica.

Nature, Vol. 214, 521-522

Hilscher, W., Behrendt, H., Idel, H., Seemayer, N.H., 1987

Ätiologie und Pathogenese der Anthrakosilikose.

in: Bericht des medizinischen Institutes für Umwelthygiene, Düsseldorf,
Umwelthygiene, Band 19, 102-130

Houde, M., Arora, D.J.S., 1990

Application of the "area under the curve" method to measure the tumor necrosis factor activity.

J.Immunol.Methods, Vol. 132, 297-298

Humbert, J.R., Winsor, E.L., 1990

Tumor necrosis factor primes neutrophils by shortening the lag period of the respiratory burst.

Am.J.Med.Sci., Vol. 300, 209-213

Jacques, Y.V., Bainton, D.F., 1978

Changes in pH within the phagocytic vacuoles of human neutrophils and monocytes.

Lab.Invest., Vol. 39, 179-185

Jordan, M.M., Perkins, W.J., Young, M.R., D'Arcy Hart, P., 1985

Computer graphics and numerical techniques in the measurement of movements within cells.

Med.& Biol.Eng.& Comput., Vol. 23, 48-54

Kagan, E., Georgian, M.M., Hartmann, D.P., 1985

Enhanced interleukin production and alveolar macrophage Ia expression after asbestos inhalation.
in: In vitro effects of mineral dusts, Eds.: E.G. Beck, J.Bignon, Springer Verlag Berlin, Heidelberg

Kane, A.B., Petrovich, D.R., Stern, R.O., Farber, J.L., 1985

ATP depletion and loss of cell integrity in anoxic hepatocytes and silica-treated P388D₁ macrophages.
Am.J.Physiol., Vol. 249, C256-C266

Kane, A.B., Stanton, R.P., Raymond, E.G., Dobson, M.E., Knafelc, M.E., Farber, J.L., 1980

Dissociation of intracellular lysosomal rupture from cell death caused by silica.
J.Cell Biol., Vol. 87, 643-651

Kasugai, S., Hasegawa, N., Ogura, H., 1990

A simple in vitro cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A).
Japan.J.Pharmacol., Vol. 52, 95-100

Kelly, J., 1990

Cytokines of the lung.
Am.Rev.Respir.Dis., Vol. 141, 765-788

Kenison, D.C., Elsasser, T.H., Fayer, R., 1990

Radioimmunoassay for bovine tumor necrosis factor: concentration and circulating molecular forms from bovine plasma.
J.Immunoassay, Vol.11, 177-198

Keshav, S., Chung, L.P., Gordon, S., 1990

Macrophage products in inflammation.
Diagn.Microbiol.Infect.Dis., Vol. 13, 439-447

Khavkin, T.N., Freidlin, I.S., Sakharova, Y., Ioffe, V.A., 1977

Vital fluorescence microscopy of lysosomes in cultured mouse peritoneal macrophages during their interactions with microorganisms and active substances.
I. Vital staining and fluorescence microscopy of macrophages.
Acta microbiol.Acad.Sci.hung., Vol. 24, 281-291

Kielian, M., 1986

Assay of phagosome-lysosome fusion.
Methods Enzymol., Vol. 132, 257-267

Kielian, M.C., Cohn, Z.A., 1980

Phagosome-lysosome fusion: characterization of intracellular membrane fusion in mouse macrophages.
J.Cell Biol., Vol. 85, 754-765

Klosterkötter, W., Robock, K., 1975

New aspects on dust and pneumoconiosis research.
Am.Ind.Hyg.Assoc.J., Vol. 36, 659-668

Kysela, B., Jirakova, D., Holusa, R., Skoda, V., 1973

The influence of the size of quartz dust particles on the reaction of lung tissue.
Ann.occup.Hyg., Vol. 16, 103-109

Le, J., Vilcek, J., 1987

Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities.

Lab.Invest., Vol. 56, 234-248

Lefkowitz, D.L., Mone, J., Mills, K., Hsieh, T.C., Lefkowitz, S.S., 1989

Peroxidase enhance macrophage-mediated cytotoxicity via induction of tumor necrosis factor (42841).

P.S.E.B.M., Vol. 190, 144-149

Lemaire, 1991

Selective differences in macrophage populations and monokine production in resolving pulmonary granuloma and fibrosis.

Am.J.Pathol., Vol. 138, 487-495

Lind, I., 1989

Untersuchungen zur Superoxidationenproduktion durch Makrophagen: Einfluß von Kulturbedingungen und Stäuben.

Diplomarbeit, Universität Karlsruhe

Luettig, B., Decker, T., Lohmann-Matthes, M.L., 1989

Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor.

J.Immunol., Vol. 143, 4034-4038

Lusardi, M., Capelli, A., Carli, S., Donner, C.F., 1990

Inflammatory and immune reactions associated with inorganic dust exposure: comparison between patients with and without clinical involvement.

Eur.Respir.J., Vol. 3, 365-367

Lynch, J.P., Toews, G.B., 1989

Tumor necrosis factor- α : a multifaceted mediator of inflammation.

Chest, Vol. 96, 457-459

MacKay, R.J., King, R.R., Dankert, J.R., Skelly, L.A., 1991

Cytotoxic tumor necrosis factor activity produced by equine alveolar macrophages: preliminary characterization.

Vet.Immunol.Immunopathol., Vol. 29, 15-30

McNeil, P.L., Tanasugarn, L., Meigs, J.B., Taylor, D.L., 1983

Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected.

J.Cell. Biol., Vol. 97, 692-702

Matejka, M., 1992

Einfluß von Lanthan und Cer auf die Freisetzung von Tumornekrosefaktor durch Makrophagen.

Diplomarbeit, Universität Karlsruhe

Matthews, N, Neale, M.L., 1987

Cytotoxicity assays for tumour necrosis factor and lymphotoxin.
in. Lymphokines and interferons, a practical approach, Eds.: M.J.Clemens,
A.G.Morris, A.J.H.Gearing, IRL Press, Oxford

Matthews, N., Watkins, J.F., 1978

Tumour-necrosis factor from the rabbit: mode of action, specificity and
physiochemical properties.
Br.J.Cancer, Vol. 38, 302-309

Meier, J., Rettig, H., Hess, H., 1981

Theorie und Praxis der Pharmakokinetik
Thieme Verlag, Stuttgart

Miller, K., 1979

Alteration in the surface-related phenomena of alveolar macrophages following
inhalation of crocidolite asbestos and quartz dusts: an overview.
Environ.Res., Vol. 20, 162-182

Miller, B.E., Bakewell, W.E., Katyal, S.L., Singh, G., Hook, G.E.R., 1990

Induction of surfactant protein (SP-A) biosynthesis and SP-A mRNA in activated
type II cells during acute silicosis in rats.
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., Vol. 3, 217-226

Miller, B.E., Hook, G.E.R., 1988

Stimulation of surfactant phospholipid biosynthesis in the lung of rats treated with
silica.
Biochem.J., Vol. 253, 659-665

Miles, P.R., Ma, J.Y.C., Bowman, L., 1988

Degradation of pulmonary surfactant disaturated phosphatidylcholines by alveolar
macrophages.
J.Appl.Physiol., Vol. 64, 2474-2481

Moriyama, Y., Takano, T., Ohkuma, S., 1982

Acridine orange as a fluorescent probe for lysosomal proton pump.
J.Biochem., Vol. 92, 1333-1336

Morr, H., 1986

Erkrankungen der Atmungsorgane
Urban & Schwarzenberg, München

Mosman, T., 1983

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to
proliferation and cytotoxicity assays.
J.Immunol.Methods., Vol. 65, 55-63

**Mozes, T., Ben-Efraim, S., Tak, C.J.A.M., Heiligers, J.P.C., Saxena, P.R., Bonta,
I.L., 1991**

Serum levels of tumor necrosis factor determine the fatal or non fatale course of
endotoxic shock.
Immunol.Letters, Vol. 27, 157-162

Müller-Quernheim, J., Strausz, J., 1988

Die bronchoalveoläre Lavage: ein Zugang zur Immunpathogenese der interstitiellen Lungenerkrankungen.
medwelt, Vol. 39, 990-994

Münch, R., Beck, E.G., Manojlovic, 1971

Untersuchungen über die Reaktion in vitro gezüchteter Zellen nach kurzzeitiger Inkubation mit SiO₂-Staub.
Beitr.Silikose-Forsch.(Pneumokon.), 23, 175-205

Nakstad, B., Lyberg, T., Skjörten, F., Boye, N.P., 1989

Subpopulations of human alveolar macrophages: ultrastructure features.
Ultrastructural Pathology, Vol. 13, 1-13

Nolan, R.P., Langer, A.M., Eskenazi, R.A., Herson, G.B., Foster, K.W., 1987

Membranolytic activities of quartz standards.
Toxic.in Vitro, Vol. 1, 239-245

Nieder, U., 1989

Morphologische und biochemische Studien zur Differenzierung von HL-60-Zellen und deren Reaktion auf Quarz.
Diplomarbeit, Universität Karlsruhe

Nyberg, K., Johansson, A., Camner, P., 1989

Intraphagosomal pH in alveolar macrophages studied with fluorescein-labeled amorphous silica particles.
Exp.Lung Res., Vol. 15, 49-62

Oghiso, Y., Kubota, Y., 1986

Interleukin 1-like thymocyte and fibroblast activating factors from rat alveolar macrophages exposed to silica and asbestos particles.
Jpn.J.Vet.Sci., Vol. 48, 461-471

Oghiso, Y., Kubota, Y., 1987

Interleukin 1 production and accessory cell function of rat alveolar macrophages exposed to mineral dust particles.
Microbiol.Immunol., Vol. 31, 275-287

Oghiso, Y., Kubota, Y., Fukuda, S., Iida, H., 1985

Interleukin1 released from beagle alveolar macrophages exposed to dust particles.
Jpn.J.Vet.Sci., Vol. 47, 851-854

Ohkuma, S., Moriyama, Y., Takano, T., 1982

Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol. 79, 2758-2762

Ohkuma, S., Poole, B., 1981

Cytoplasmatic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances.
J.Cell Biol., Vol. 90, 656-664

Okubo, A., Sone, S., Singh, S.M., Ogura, T., 1990

Production of tumor necrosis factor- α by alveolar macrophages of lung cancer patients.

Jpn.J.Cancer Res., Vol. 81, 403-409

Old, L.J., 1985

Tumor necrosis factor.

Science, Vol. 230, 630-632

Olsson, G.M., Rundquist, I., Brunk, U., 1987

Flow cytofluorometry of lysosomal acridine orange uptake by living cultured cells.

Acta path.microbiol.immunol.scand.Sect.A, Vol. 95, 159-165

Olsson, G.M., Rungby, J., Rundquist, I., Brunk, U.T., 1989

Evaluation of lysosomal stability in living macrophages by cytofluorometry.

Virchows Archiv B Cell.Pathol., Vol. 56, 263-269

Patton, J.S., Rice, G.C., Ranges, G.E., 1989

Biology of tumor necrosis factor.

in: Macrophage-derived cell regulatory factors. Cytokines. Ed.: C.Sorg, Vol. 1, 89-104, Karger, Basel

Pätzold, S., 1989

Morphologische und biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Quarz auf Rinderalveolarmakrophagen und deren Organellen.

Dissertation, Universität Karlsruhe

Piguet, P.F., Collart, M.A., Grau, G.E., Sappino, A.P., Vasalli, P., 1990

Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis.

Nature, Vol. 344, 245-247

Poole, A.R., 1977

The detection of lysosomes by vital staining with acridine orange.

in: Lysosomes: a laboratory handbook, Ed.: J.T.Dingle, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam

Redai, I., Halmy, M., 1980

Lysosomal acridine orange uptake in fibroblasts transformed by SV40 or human cytomegalovirus.

Acta microbiol.Acad.Sci.hung., Vol. 27, 41-45

Rich, I.N., 1988

The macrophage as a production site for hematopoietic regulator molecules: sensing and responding to normal and pathophysiological signals.

Anticancer Res., Vol. 8, 1015-1040

Richards, R.J., Curtis, C.G., 1984

Biochemical and cellular mechanisms of dust-induced lung fibrosis.

Environmental Health Perspectives, Vol. 55, 393-416

Rietschel, E.T., Schade, U., Jensen, M., Wollenweber, H.W., Lüderitz, O., Greisman, S.G., 1982
Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicæmia.
Scand.J.Infect.Dis., Suppl., 31, 8-21

Robbins, E., Marcus, P.I., 1963
Dynamics of acridine orange-cell interaction: Interrelationships of acridine orange particles and cytoplasmic reddening.
J.Cell Biol., Vol. 18, 237-250

Rosenthal, F.M., Lindemann, A., Herrmann, F., Mertelsmann, R., 1991
Cytokines as possible effector molecules in human cancer therapy.
Immunology and Allergy Clinics of North America, Vol. 11, 445-456

Ruff, M.R., Gifford, G.E., 1981
Tumor Necrosis Factor.
in: Lymphokines, Ed.: E.Pick, Academic Press, New York

Sanford, K.K., Earle, W.R., Likely, G.D., 1948
The growth in vitro of single isolated tissue cells.
J.Nat.Canc.Inst., Vol. 9, 229-246

Schimmelpfeng, J., 1989
Zytotoxische Wirkungen von Quarz und Asbest: Ein in vitro Interspeziesvergleich mit Alveolarmakrophagen.
Dissertation, Universität Karlsruhe

Schleuning, M., Munker, R., 1990
Tumor necrosis factor: an update on basic research and clinical applications.
Klin.Wochenschr., Vol. 68, 841-846

Schmidt, M., 1967
Anorganische Chemie
Bibliographisches Institut Mannheim

Schneider, D., 1987
The proton pump ATPase of lysosomes and related organelles of the vacuolar apparatus.
Biochim.Biophys.Acta, Vol. 895, 1-10

Seemayer, N.H., 1985
Grundlagen der Inhalationstoxikologie.
in: Umwelthygiene, Band 18, Ed.: Gesellschaft zur Förderung der Lufthygiene und Silikoseforschung e.V.

Seidel, A., Drosselmeyer, E., Hofheinz, V., Kreyling, W.G., Krombach, F., Pätzold, S., Schimmelpfeng, J., Würtemberger, G., 1989
Interaction of quartz with bovine alveolar macrophages: studies on cytotoxicity, electrophoretic mobility and subcellular components.
in: Effects of mineral dusts on cells. Eds.: B.T. Mossman, R.O. Begin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Seidel, A., Hammer, G., Polzer, G., 1990

Separation by carrier-free electrophoresis of subpopulations of bovine alveolar macrophages.

Vet.Immunol.Immunopathol., Vol. 24, 285-291

Shi, X., Dalal, N.S., Hu, X.N., Vallyathan, V., 1989

The chemical properties of silica particle surface in relation to silica-cell interactions.

J.Toxicol.EnvIRON.Health, Vol. 27, 435-454

Sibille, Y., Reynolds, H.Y., 1990

Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury.

Am.Rev.Respir.Dis., Vol. 141, 471-501

Silicosis and Silicate Disease Committee, 1988

Diseases associated with the exposure to silica and nonfibrous silicate minerals.

Arch.Pathol.Lab.Med., Vol. 112, 673-720

Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P., Figari, I.S., Palladino, M.A., Shepard, H.M., 1985

Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro.

Science, Vol. 230, 943-945

Tierney, D.F., 1989

Lung surfactant: some historical perspectives leading to its cellular and molecular biology.

Am.J.Physiol., Vol. 257, L1-L12

Thiele, H., 1986

Berufskrankheiten: verhüten-erkennen-betreuen

Urban & Schwarzenberg, München

Tracey, K.J., Lowry, S.F., Cerami, A., 1988

Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia.

J.Infect.Dis., Vol. 157, 413-420

Valiante, D.J., Rosenman, K.D., 1989

Does silicosis still occur?

JAMA, Vol. 262, 3003-3007

Vilcek, J., Palombella, V.J., Henriksen-DeStefano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hirai, M., Tsujimoto, M., 1986

Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors.

J.Exp.Med., Vol. 163, 632-643

Wakefield, P.E., James, W.D., Samlaska, C.P., Meltzer, M.S., 1991

Tumor necrosis factor.

J.Am.Acad.Dermatol., Vol. 24, 675-685

Wallace, W.E., Keane, M.J., Vallyathan, V., Ong, T.M., Castranova, V., 1986

Pulmonary surfactant interaction with respirable dust.

Proc.: Coal Mine Dust conf., Ed.: S.Peng, Natl.Tech.Conf.Serv., Report BP86, 169380/AS, 180-187

- Wallace , W.E., Vallyathan, V., Keane , M.J., Robinson, V., 1985**
In vitro biologic toxicity of nativ and surface modified silica and kaolin.
J.Toxicol.EnvIRON.Health., Vol. 16, 415-424
- Wang, A.M., Creasey, A.A., Ladner, M.B., Lin, L.S., Strickler, J., Van Arsdell, J.N., Yamamoto, R., Mark, D.F., 19885**
Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor.
Science, Vol. 228, 149-154
- Wang, Y., Goren, M.B., 1987**
Differential and sequential delivery of fluorescent lysosomal probes into phagosomes in mouse peritoneal macrophages.
J.Cell Biol., Vol. 104, 1749-1754
- Wilczek, W., 1991**
Reaktionen von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz und Hochtemperatursupraleiterstäube.
Dissertation, Universität Karlsruhe
- Yamashiro, D.J., Fluss, S.R., Maxfield, F.R., 1983**
Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump.
J.Cell.Biol., Vol. 97, 929-934
- Zanetti, M., Schmitt, M., Lazary, S., 1987**
Bovine leukocyte phagocytosis and bacteria killing monitored by intracellular acridine orange fluorescence and extracellulaar fluorescence quenching.
Vet.Immunol.Immunopathol., Vol. 16, 185-199
- Ziesche, R., Wenners, J., Beherndt, H., 1985**
Morphologische Untersuchungen zur initialen Membranwirkung von Quarz DQ 12 in vitro.
Silikose-Bericht, Nordrhein-Westfalen, Band 15, 331-344
- Ziskind, M., Jones, R.N., Weill, H., 1976**
Silicosis
Am.Rev.Respir.Dis., Vol. 113, 643-665
- Zucali, J.R., Morse, C., Dinarello, C.A., 1990**
The role of protein kinase C in interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha induction of fibroblasts to produce and release granulocyte-macrophage colony-stimulating activity.
Exp.Hematol., Vol. 18, 888-892

7. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Abbildungen 1 bis 20:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) nach Anfärbung mit dem Vitalfarbstoff Acridinorange (AO).

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die RAM in Kulturschalen ausgesät, die mit einem mit 70% Ethanol sterilisierten Deckglas bestückt worden waren. Nach einer Adhärenzzeit von 2h wurde der Überstand verworfen und durch frisches Kulturmedium ersetzt.

Nach Inkubationszeiten von 22 bzw. 94h erfolgte die Exposition der RAM mit den Quarzpartikeln. Nach Ablauf der verschiedenen Inkubationszeiten wurde das Kulturmedium über den RAM entfernt und durch die 37°C warme Acridinorange-Lösung (10 µg/ml in PBS) ersetzt. Nach einer Färbedauer von 15 min. wurde der Überstand entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 15 min. mit Standardmedium inkubiert.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm (s.2.3.).

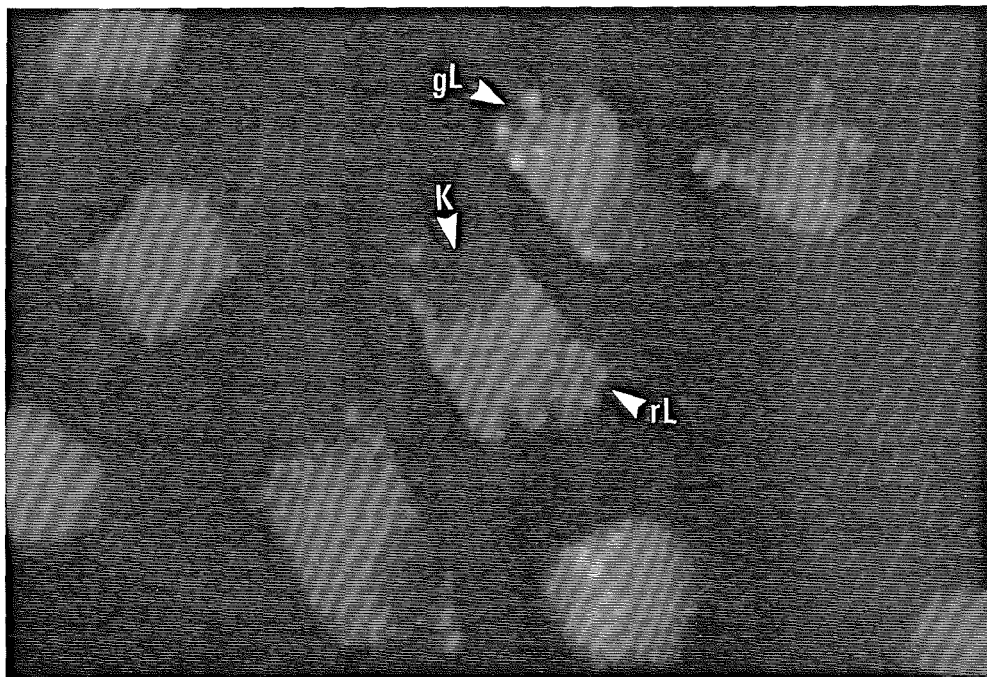


Abb. 1:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; unbehandelte Kontroll-Zellen nach 2h-Kultur; (x1600)

Pfeil K: grün fluoreszierender Kern

Pfeil rL: rot fluoreszierende Lysosomen

Pfeil gL: gelb fluoreszierende Lysosomen

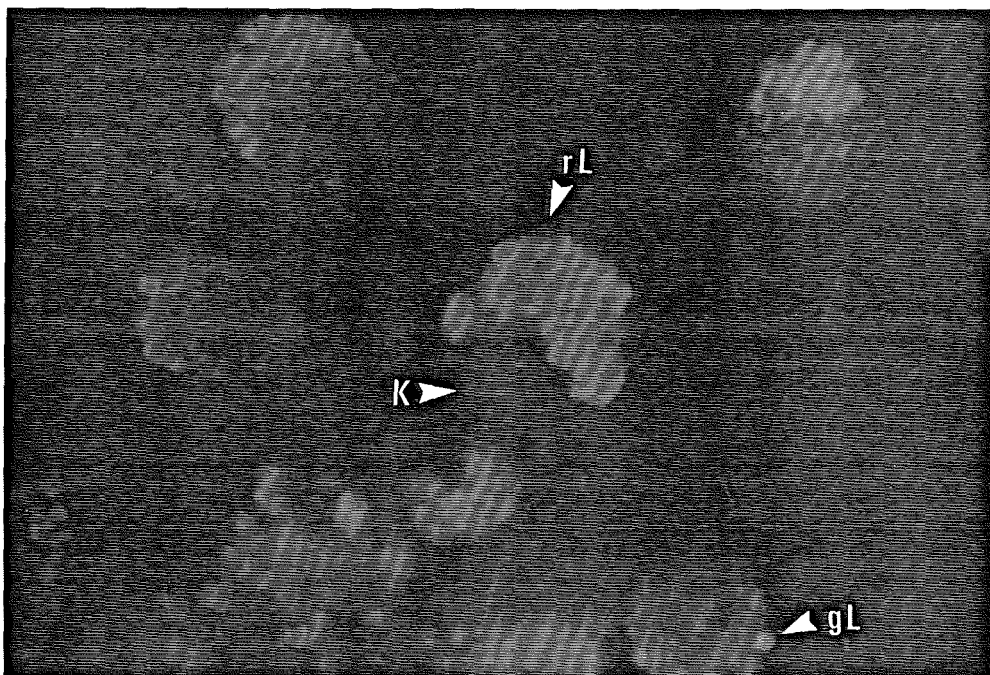


Abb. 2:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; unbehandelte Kontroll-Zellen nach 2h-Kultur; (x1600)

Pfeil K: grün fluoreszierender Kern

Pfeil rL: rot fluoreszierende Lysosomen

Pfeil gL: gelb fluoreszierende Lysosomen

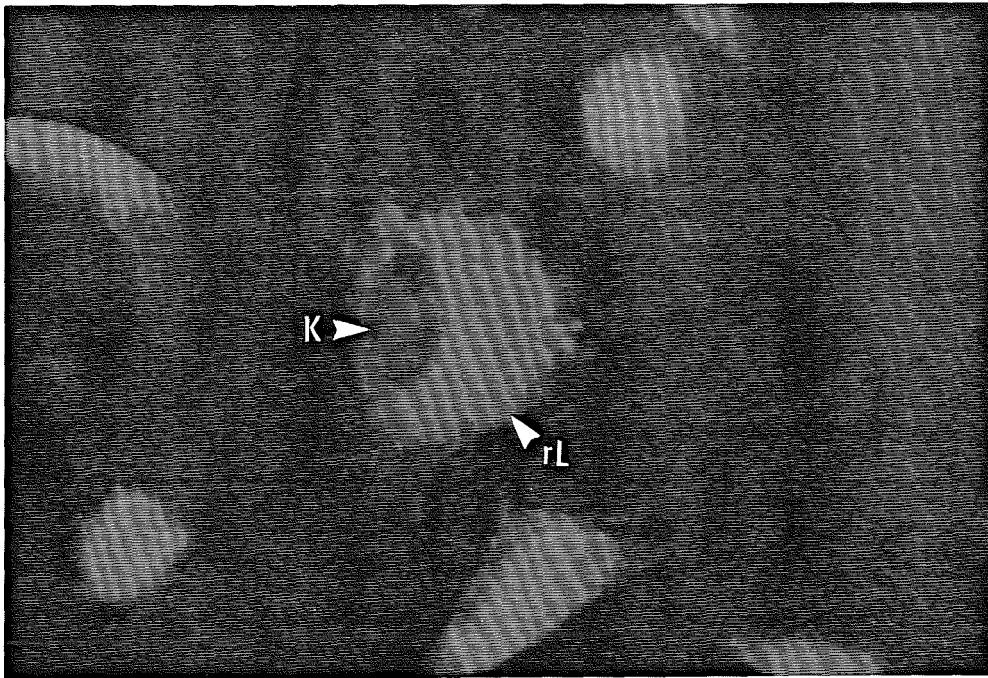


Abb. 3:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; unbehandelte Kontroll-Zellen nach 94h-Kultur; (x1600)
Pfeil K: grün fluoreszierender Kern
Pfeil rL: rot fluoreszierende Lysosomen

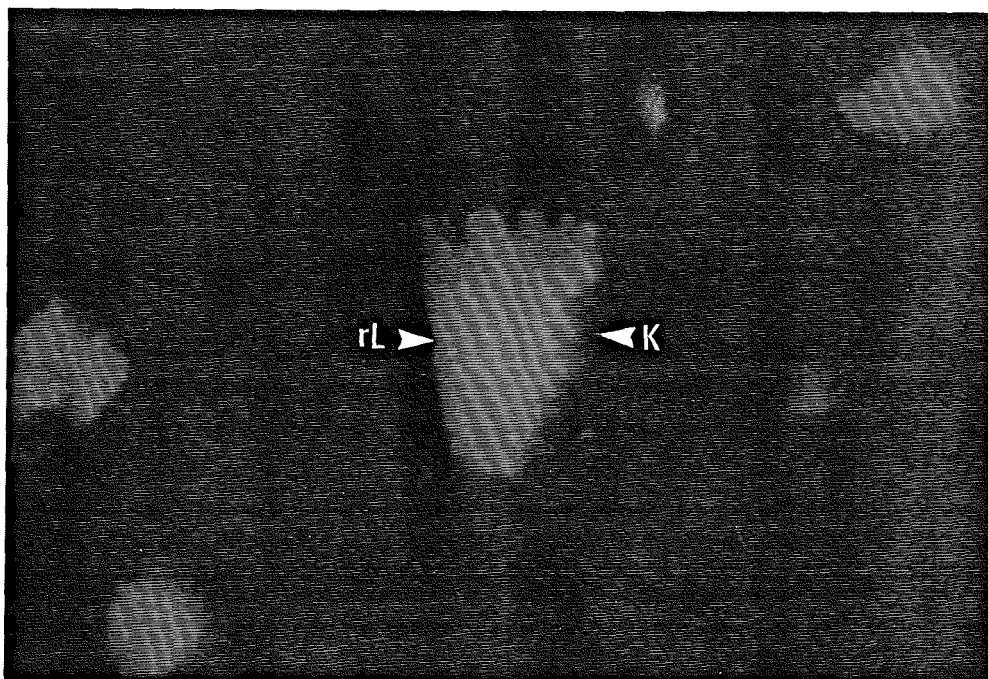


Abb. 4:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; unbehandelte Kontroll-Zellen nach 94h-Kultur; (x1600)
Pfeil K: grün fluoreszierender Kern
Pfeil rL: rot fluoreszierende Lysosomen

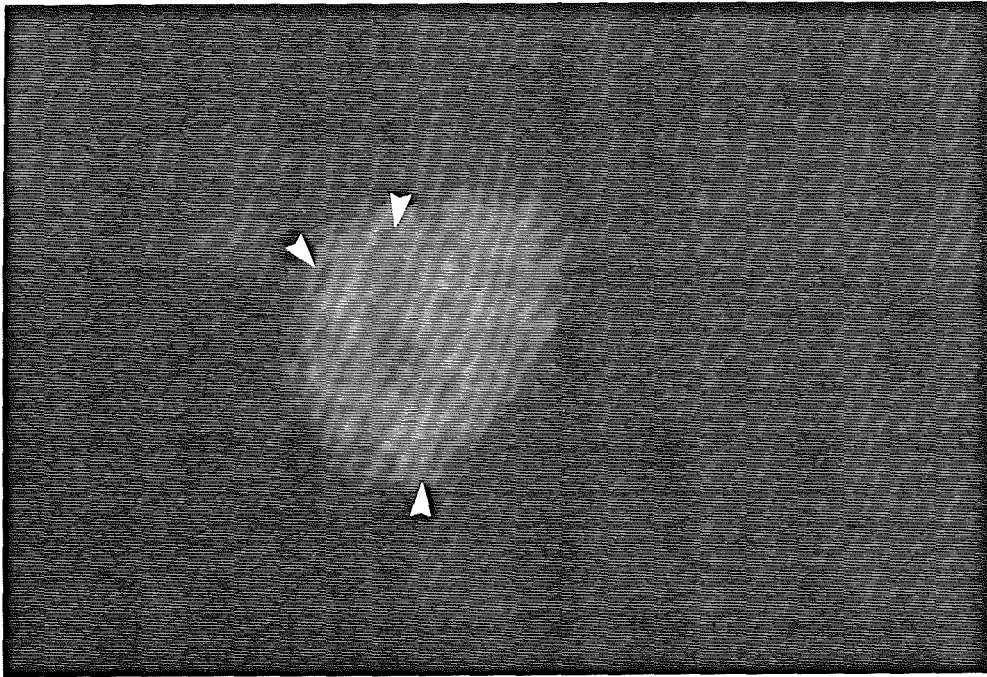


Abb. 5:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2h; (x1600)
Pfeile: phagozytierte Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen

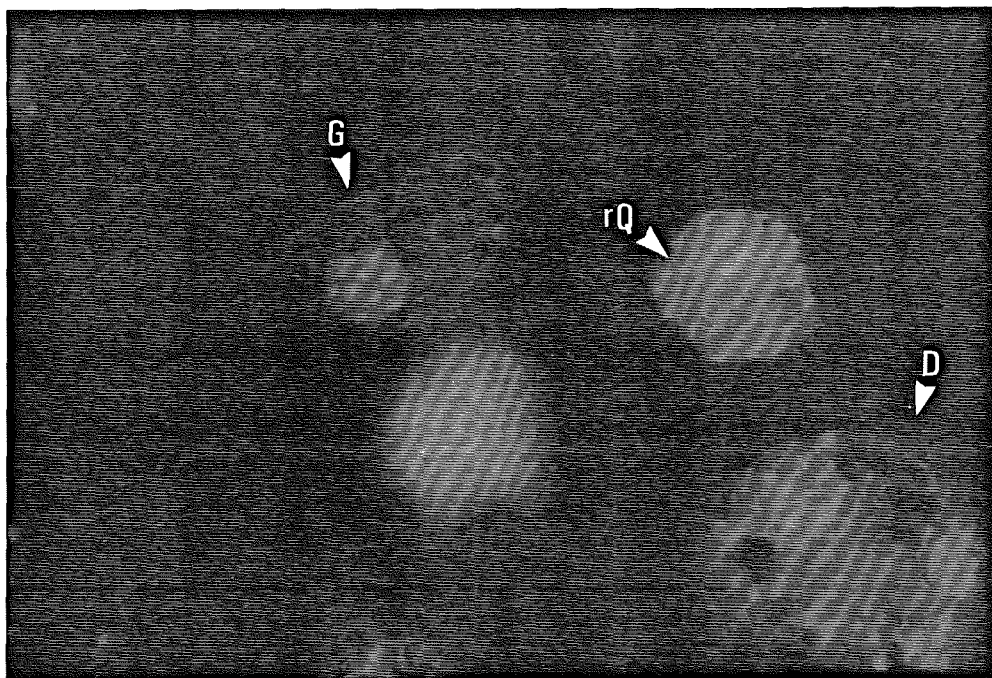


Abb. 6:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2h; (x1600)
Pfeil rQ: phagozytierte Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen
Pfeil G: grün fluoreszierende Zelle, die phagozytierten Quarzpartikeln liegen scheinbar frei im Zytoplasma
Pfeil D: teilweise degranulierte Zelle, noch mit wenigen rot fluoreszierenden Lysosomen, die phagozytierten Quarzpartikel liegen scheinbar frei im Zytoplasma

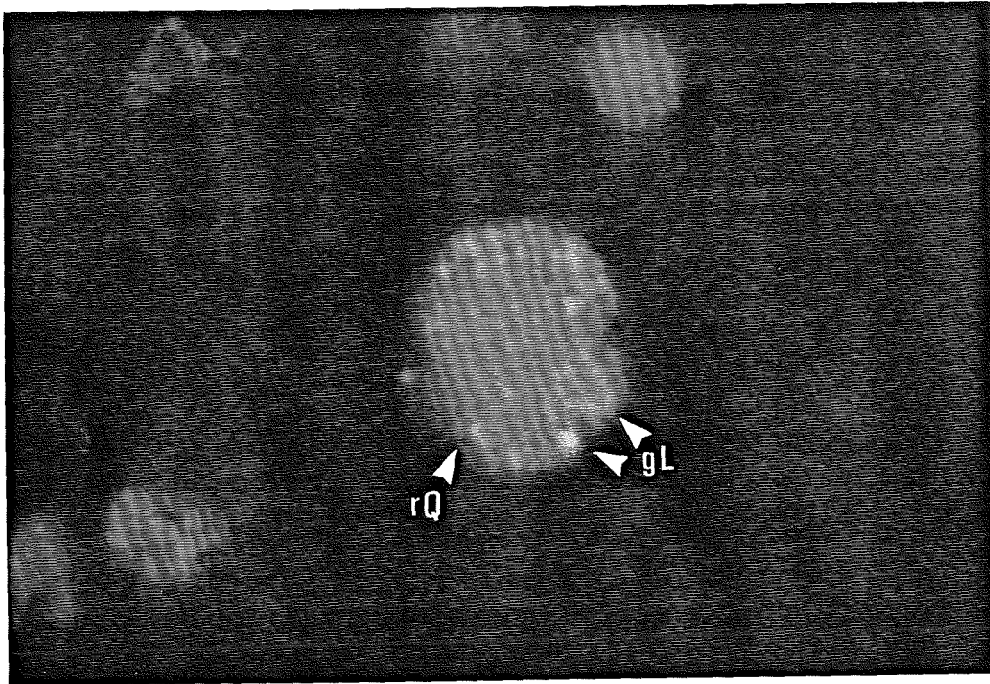


Abb. 7:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 $\mu\text{g/ml}$, 20h; (x1600)
Pfeil rQ: phagozytierter Quarzpartikel in einem rot fluoreszierenden Lysosom
Pfeile gL: gelb fluoreszierende Lysosomen, enthalten niemals Quarz;

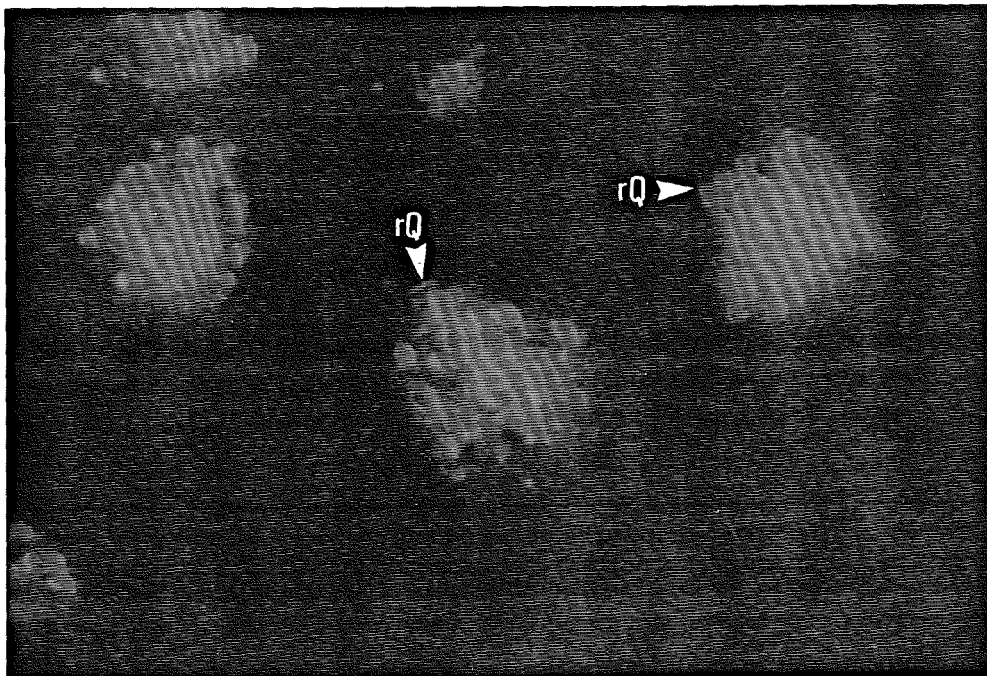


Abb. 8:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 $\mu\text{g/ml}$, 2h; (x1600)
Pfeile rQ: phagozytierte Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen;

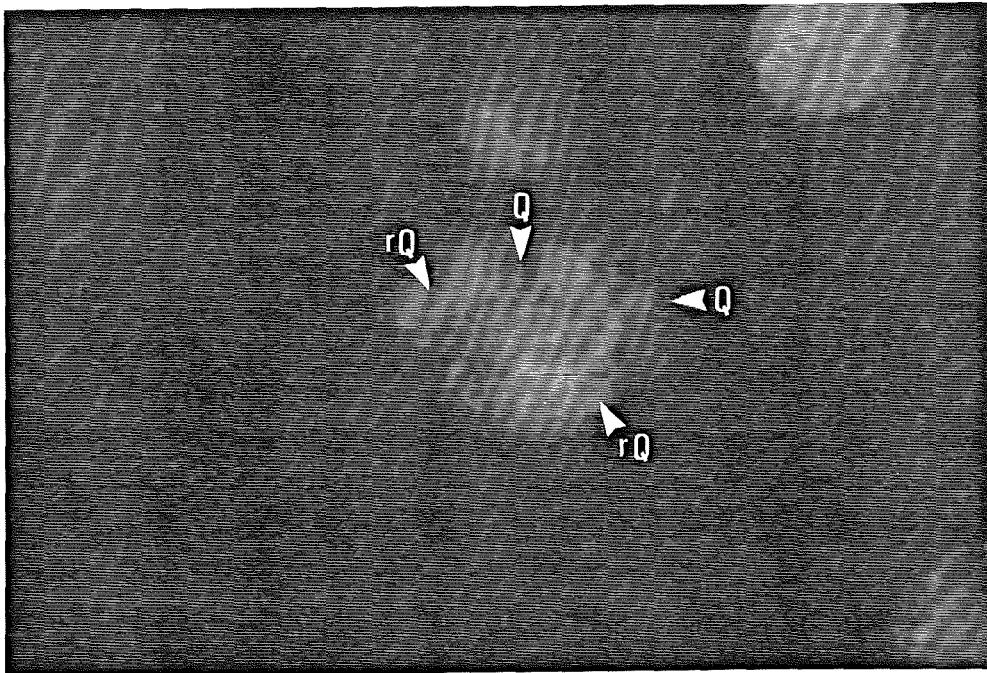


Abb. 9:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 μ g/ml, 2h; (x1600) stark degranulierte Zelle;
Pfeile rQ: phagozytierte Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen;
Pfeile Q: phagozytierte Quarzpartikel, liegen scheinbar frei im Zytoplasma

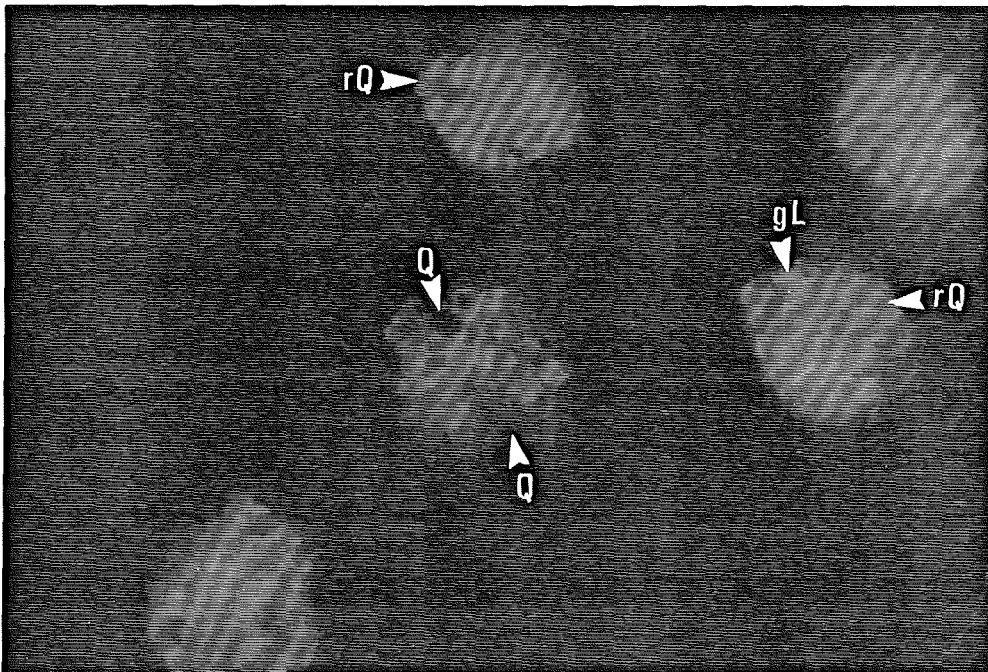


Abb. 10:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 μ g/ml, 2h; (x1600)
Pfeile rQ: phagozytierte Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen;
Pfeile Q: phagozytierte Quarzpartikel, liegen scheinbar frei im Zytoplasma der degranulierten Zelle;
Pfeil gL: gelb fluoreszierendes Lysosom

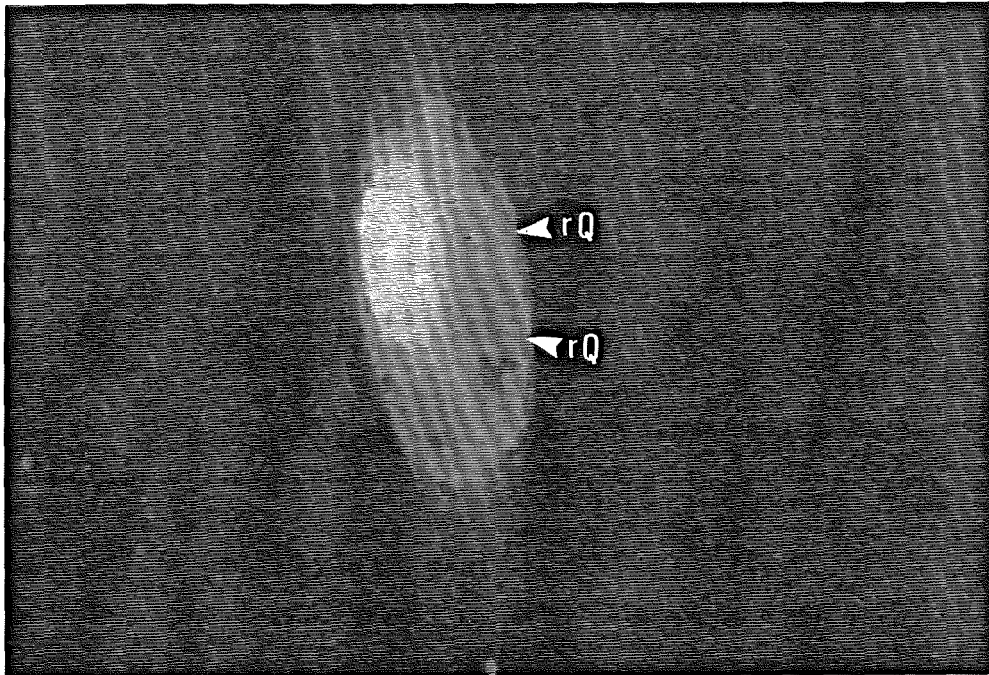


Abb. 11:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 500 $\mu\text{g/ml}$, 2h; (x1600)
Pfeile rQ: phagozytierte Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen;

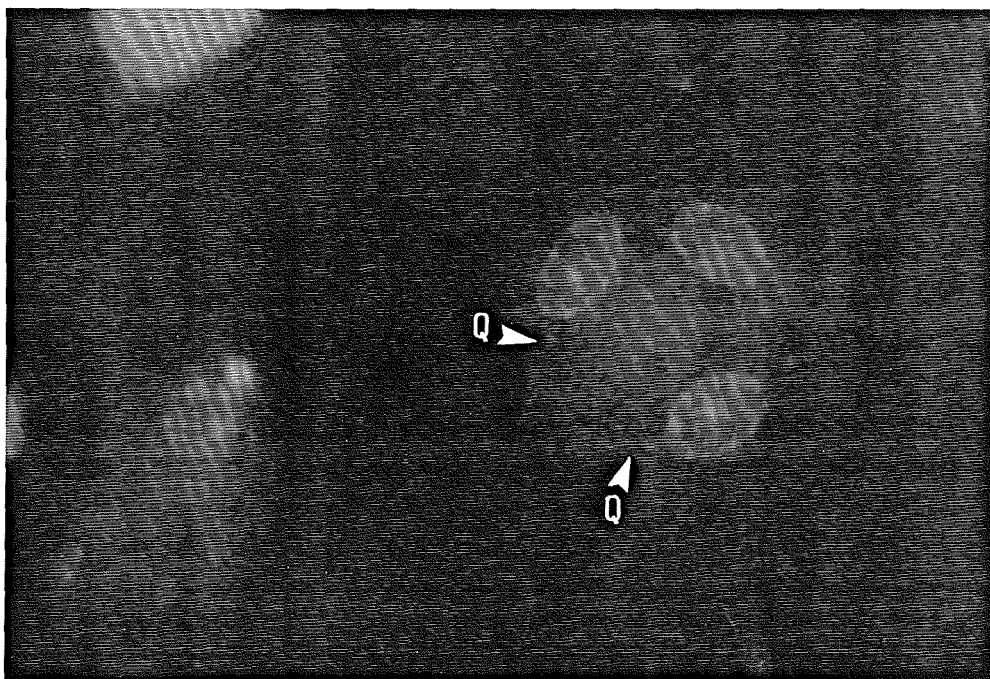


Abb. 12:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 $\mu\text{g/ml}$, 2h; (x1600)
grün fluoreszierende, vielkernige Riesenzelle;
Pfeile Q: scheinbar frei im Zytoplasma liegende Quarzpartikel der vollständig degranulierten Zelle;

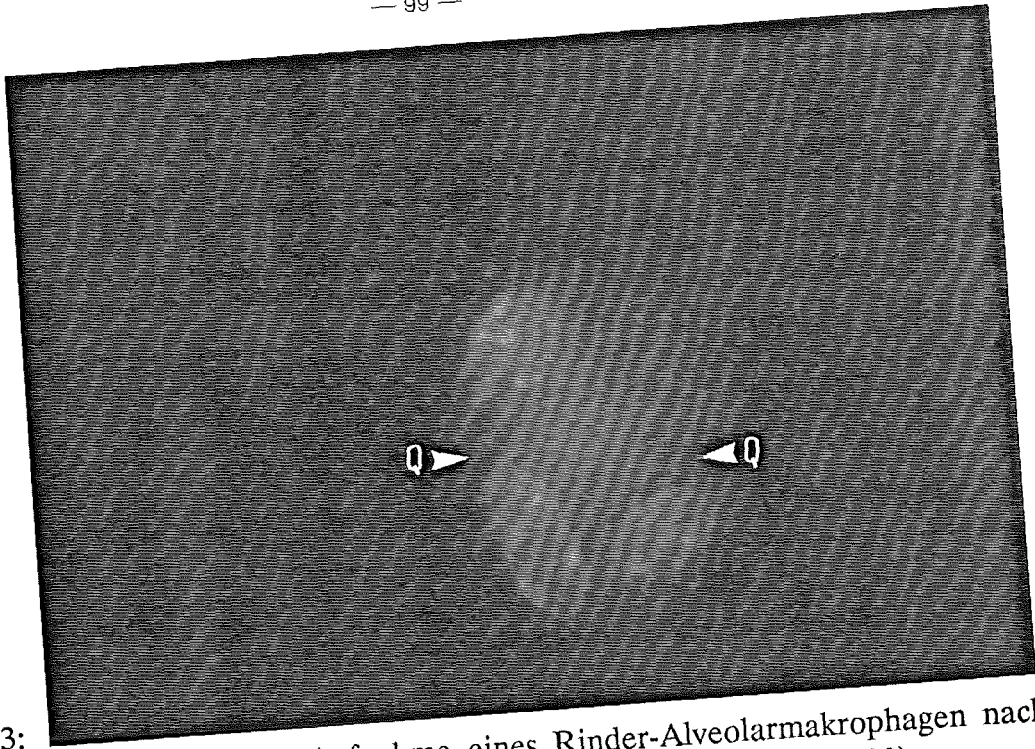


Abb. 13:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20h; (x1600)
grün fluoreszierende, vielkernige Riesenzelle;
Pfeile Q: scheinbar frei im Zytoplasma liegende Quarzpartikel der vollständig degranulierten Zelle;

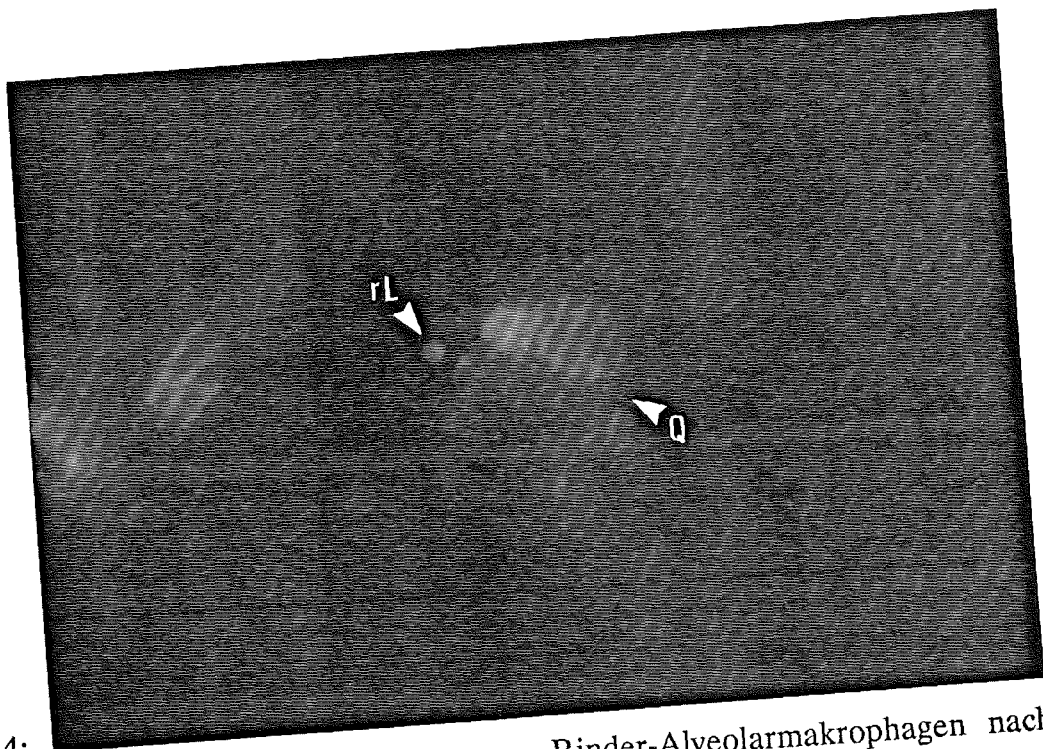


Abb. 14:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20h; (x1600)
fast vollständig degranulierte Zelle mit noch wenigen rot fluoreszierenden Lysosomen, die phagozytierten Quarzpartikel liegen scheinbar frei im Zytoplasma;
Pfeil rL: rot fluoreszierendes Lysosom
Pfeil Q: scheinbar frei im Zytoplasma liegende Quarzpartikel

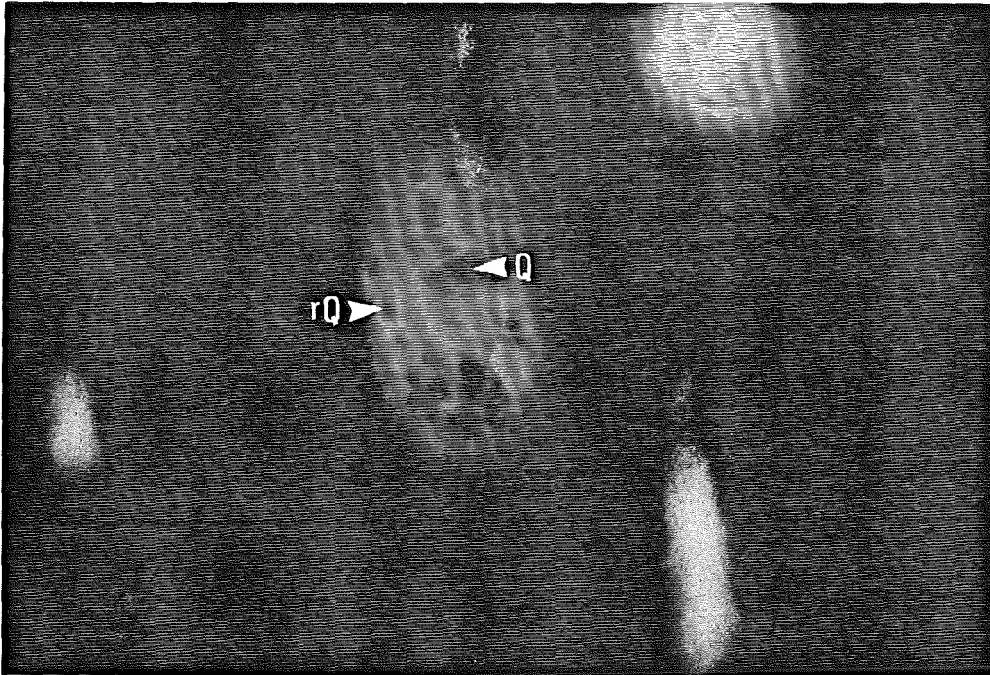


Abb. 15:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 48h; (x1600)
degranulierte Zelle mit noch wenigen Lysosomen;
Pfeil rQ: phagozytierte Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen;
Pfeil Q: scheinbar frei im Zytoplasma liegende Quarzpartikel

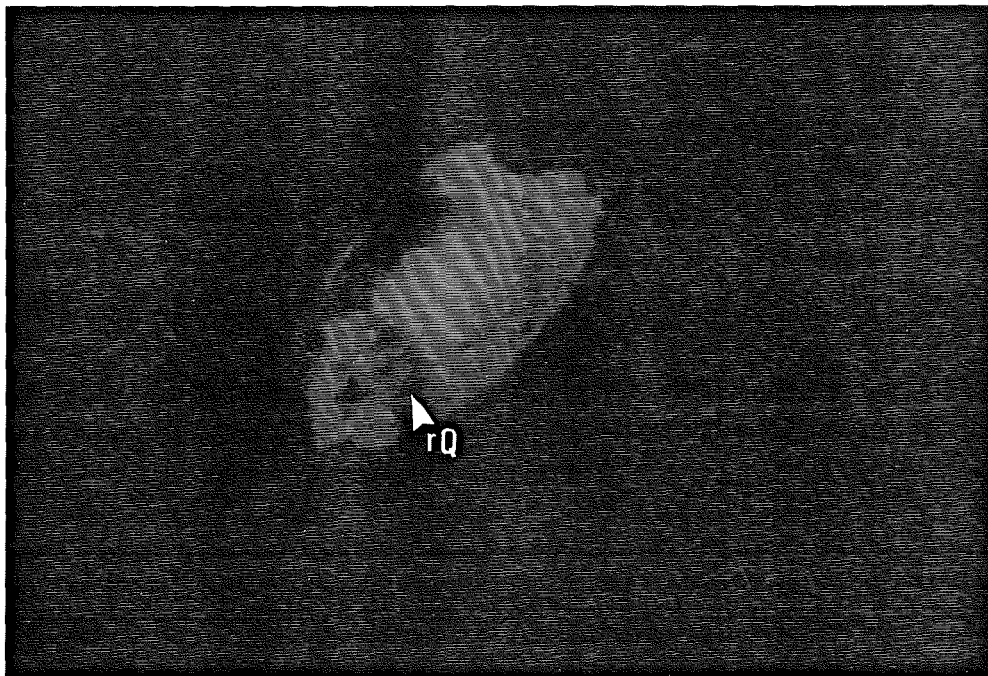


Abb. 16:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 48h; (x1600)
Pfeil rQ: phagozytierte Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen;

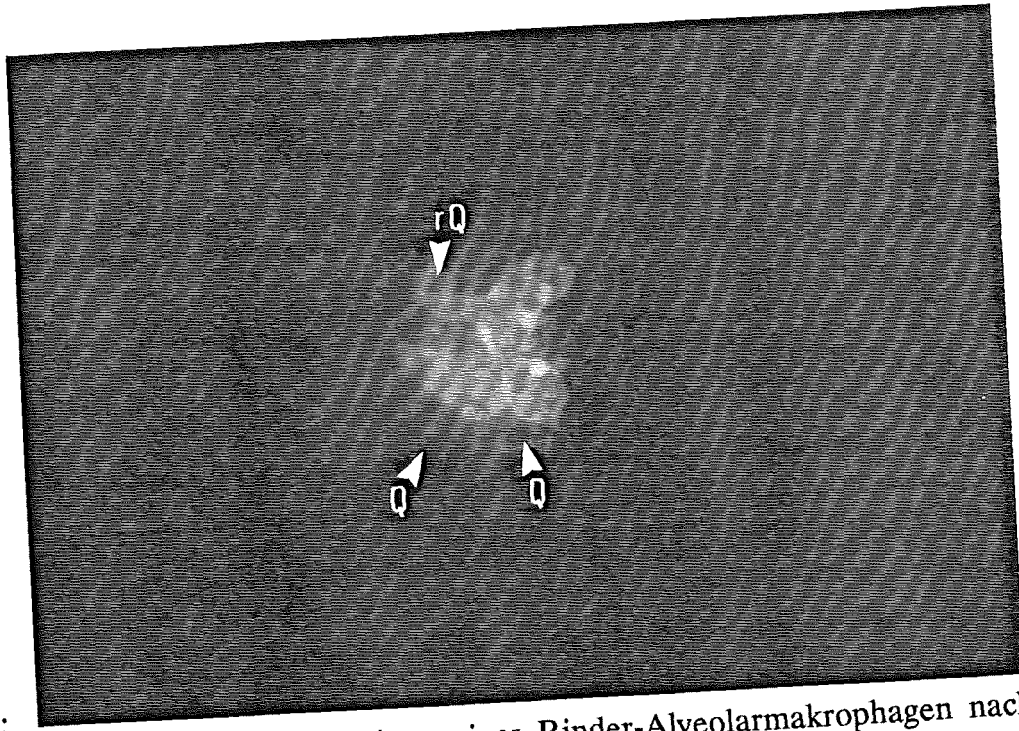


Abb. 17:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; Quarzexposition: 250 μ g/ml, 20h; (x1600) teilweise degranulierte Zelle;
Pfeil rQ: phagozytierter Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosom;
Pfeile Q: scheinbar frei im Zytoplasma liegende Quarzpartikel

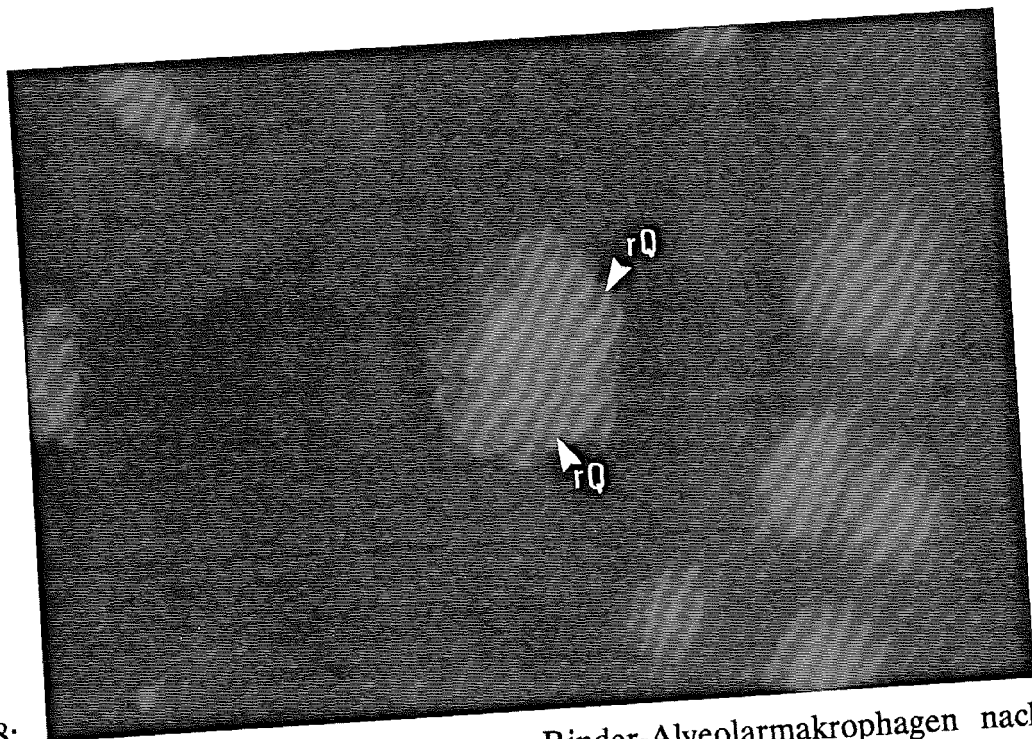


Abb. 18:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; DPL-Quarzexposition: 250 μ g/ml, 20h; (x1600)
Pfeile rQ: phagozytierte DPL-Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen;

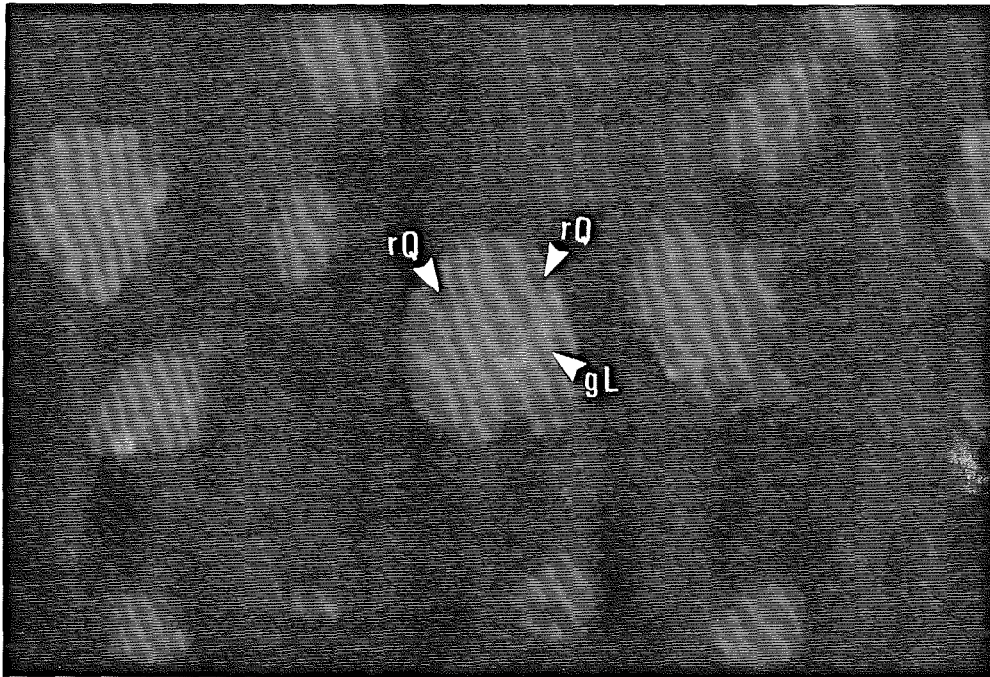


Abb. 19:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; DPL-Quarzexposition: 250 μ g/ml, 20h; (x1600)
Pfeile rQ: phagozytierte DPL-Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen;
Pfeil gL: gelb fluoreszierende Lysosomen

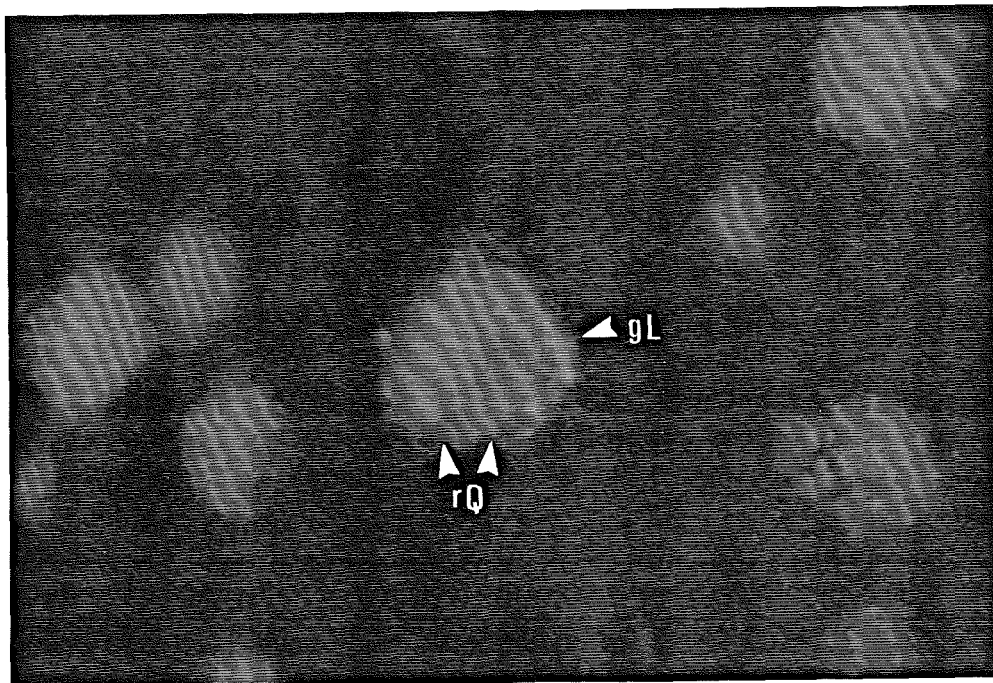


Abb. 20:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach Anfärbung mit Acridinorange; DPL-Quarzexposition: 250 μ g/ml, 20h; (x1600)
Pfeile rQ: phagozytierte DPL-Quarzpartikel in rot fluoreszierenden Lysosomen
Pfeil gL: gelb fluoreszierende Lysosomen

Tabellen 1 bis 7:

Einfluß der Quarzphagozytose auf die fluoreszenzoptisch zu differenzierenden Erscheinungsbilder der Lysosomen in den Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) nach Vitalfärbung mit Acridinorange (AO).

Für diese fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die RAM in Kulturschalen ausgesät, die mit einem sterilisierten Deckglas bestückt worden waren (s.2.3). Nach einer Adhärenzzeit von 2h wurde der Überstand verworfen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nach Inkubationszeiten von 22h bzw. 94h erfolgte die Exposition der RAM mit den Staubpartikeln.

Nach Ablauf der verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Kulturmedien mit den Staubsuspensionen über den RAM entfernt und durch die 37°C warme Acridin-orange-Lösung (10 µg/ml in PBS) ersetzt. Nach einer Färbedauer von 15 min. wurde der Überstand entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 15 min. mit Standardmedium inkubiert (s. 2.3.).

Zusätzlich wurden bei einigen Untersuchungen auch die abgelösten Zellen in den Kulturüberständen mit AO angefärbt (s.2.3). Hierzu wurden die Kulturüberstände abzentrifugiert und die Sedimente mit der angewärmten AO-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden noch zweimal mit PBS gewaschen und in Medium aufgenommen.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm und einer Emmissionswellenlänge von 530 nm.

Die fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der Lysosomen aus den angefärbten RAM wurden durch die Auswertung von mindestens 10 Blickfeldern festgehalten. Von jedem Ansatz wurden zweimal 250 Zellen ausgezählt und in folgende Gruppen eingeteilt:

Kontroll-Zellen (unbehandelte RAM):

1. Kontrolle: nur rot fluoreszierende Lysosomen:

AM, die nur rot fluoreszierende Lysosomen enthielten.

2. Kontrolle: rot + gelb fluoreszierende Lysosomen:

AM, die neben den rot fluoreszierenden Lysosomen auch gelb fluoreszierende Lysosomen enthielten.

3. Kontrolle: nur grün fluoreszierende Zellen:

AM, die ausschließlich grün fluoreszierten und bis auf den Kern keinerlei intrazelluläre Strukturierung mehr erkennen liessen.

Dieser Zelltyp trat nur in den Kulturüberständen, niemals bei der adhärennten Zell-Population auf.

RAM nach Quarzphagozytose:

1. Quarz: nur rot fluoreszierende Lysosomen:

AM, die den phagozytierten Quarz in rot fluoreszierende Phago-Lysosomen eingeschlossen hatten. Die übrigen Lysosomen der Zellen fluoreszierten ebenfalls rot.

2. Quarz: rot + gelb fluoreszierende Lysosomen:

AM, die den phagozytierten Quarz in rot fluoreszierende Phago-Lysosomen eingeschlossen hatten. Die Zellen zeigten neben weiteren rot fluoreszierenden Lysosomen zusätzlich gelb fluoreszierende Lysosomen, die niemals Quarz enthielten.

3. Quarz: nur grün fluoreszierende Zellen:

AM, die eine ausschließlich grüne Fluoreszenz aufwiesen. Die Quarzpartikel lagen scheinbar frei im Zytoplasma.

In jeder Tabelle sind die fluoreszenzoptischen Reaktionen der RAM aus jeweils einer Lunge dargestellt.

Tabelle 1:

Inkub. zeiten	2h	4h	20h	30h	48h	55h
<u>KONTROLLE:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	47 (51)	38 (68)	65 (59)	67 (-)	65 (36)	69 (41)
<u>KONTROLLE:</u> rot + gelb fluoresz. Lysosomen	53 (11)	62 (19)	35 (37)	33 (-)	35 (64)	31 (58)
<u>KONTROLLE:</u> nur grün fluoresz. Zellen	-(38)	-(13)	-(4)	-(-)	-(-)	-(1)
Summe	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<u>QUARZ:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	25 (37)	50 (34)	67 (38)	86 (-)	81 (-)	74 (21)
<u>QUARZ:</u> rot + gelb fluoresz. Lysosomen	49 (12)	23 (37)	27 (58)	11 (-)	15 (100)	23 (76)
<u>QUARZ:</u> nur grün fluoresz. Zellen	26 (51)	27 (29)	6 (4)	3 (-)	4 (-)	3 (3)
Summe	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabelle 1:

Einfluß der Quarzphagozytose auf die Erscheinungsformen der Lysosomen in Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) nach Vitalfärbung mit Acridinorange. Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der RAM.

Arithmetische Mittelwerte von jeweils zweimal 250 ausgezählten Zellen;

Werte in Klammern: Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der abgelösten RAM im Kulturüberstand

Quarzkonzentration: 250 µg/ml

Beginn der Quarzexposition: 22h nach Gewinnung der Zellen;

Repräsentativ für 3 Versuche

Tabelle 2:

Inkub. zeiten	2h	4h	20h	30h	48h	55h
<u>KONTROLLE:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	73 (89)	81 (85)	95 (71)	91 (87)	100 (88)	100 (89)
<u>KONTROLLE:</u> rot + gelb fluoresz. Lysosomen	27 (1)	19 (8)	5 (17)	9 (9)	- (5)	- (1)
<u>KONTROLLE:</u> nur grün fluoresz. Zellen	- (10)	- (7)	- (12)	- (4)	- (7)	- (10)
Summe	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<u>QUARZ:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	54 (-)	23 (-)	62 (-)	74 (75)	73 (83)	77 (76)
<u>QUARZ:</u> rot + gelb fluoresz. Lysosomen	3 (2)	2 (2)	10 (5)	18 (11)	17 (8)	13 (3)
<u>QUARZ:</u> nur grün fluoresz. Zellen	42 (98)	75 (98)	27 (95)	8 (14)	10 (9)	10 (21)
Summe	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabelle 2:

Einfluß der Quarzphagozytose auf die Erscheinungsformen der Lysosomen in Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) nach Vitalfärbung mit Acridinorange.

Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der RAM.

Arithmetische Mittelwerte von jeweils zweimal 250 ausgezählten Zellen;

Werte in Klammern: Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der abgelösten RAM im Kulturüberstand

Quarzkonzentration: 250 µg/ml

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen;

Repräsentativ für 3 Versuche

Tabelle 3:

Einfluß der Phagozytose von Quarz und der Phagozytose von DPL-vorbehandeltem Quarz (DPL-Quarz) auf die Erscheinungsformen der Lysosomen in Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) nach Vitalfärbung mit Acridinorange.

Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der RAM.

Arithmetische Mittelwerte von jeweils zweimal 250 ausgezählten Zellen;

Werte in Klammern: Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der abgelösten RAM im Kulturüberstand

Quarzkonzentration: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

DPL-Quarzkonzentration: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen;

Repräsentativ für 3 Versuche

Tabelle 4:

Einfluß der Phagozytose von Quarz, DPL-vorbehandeltem Quarz (DPL-Quarz) und Latex auf die Erscheinungsformen der Lysosomen in Rinder-Alveolar-makrophagen (RAM) nach Vitalfärbung mit Acridinorange.

Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der RAM.

Arithmetische Mittelwerte von jeweils zweimal 250 ausgezählten Zellen;

Quarzkonzentration: 250 µg/ml

DPL-Quarzkonzentration: 250 µg/ml

Latexkonzentration: 200 µg/ml

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen;

Einzelversuch

Tabelle 4:

Inkub. zeiten	2h	4h	20h
<u>KONTROLLE:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	100	100	100
<u>QUARZ:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	78	80	85
<u>QUARZ:</u> rot+gelb fluoresz. Lysosomen	12	6	7
<u>QUARZ:</u> nur grün fluoresz. Zellen	10	14	8
Summe	100%	100%	100%
<u>DPL-QUARZ:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	92	95	87
<u>DPL-QUARZ:</u> rot+gelb fluoresz. Lysosomen	8	5	4
<u>DPL-QUARZ:</u> nur grün fluoresz. Zellen	-	-	9
Summe	100%	100%	100%
<u>LATEX:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	100	96	91
<u>LATEX:</u> rot+gelb fluoresz. Lysosomen	-	4	-
<u>LATEX:</u> nur grün fluoresz. Zellen	-	-	9
Summe	100%	100%	100%

Tabelle 5:

KONTROLLE (= unbehandelte RAM) gültig für alle Quarz-
konzentrationen: nur rot fluoreszierende Lysosomen = 100(-)

Quarz- konzentrationen:	50 µg/ml	100 µg/ml	250µg/ml	500µg/ml
<u>QUARZ:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	100 (-)	97(16)	97(9)	-(-)
<u>QUARZ:</u> rot+gelb fluoresz. Lysosomen	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
<u>QUARZ:</u> nur grün fluoresz. Zellen	-(100)	3(84)	3(91)	100(-)
Summe	100%	100%	100%	100%

Tabelle 5:

Einfluß der Phagozytose verschiedener Quarzkonzentrationen (50, 100, 250 und 500 µg/ml) auf die Erscheinungsformen der Lysosomen in Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) nach Vitalfärbung mit Acridinorange.

Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der RAM.

Arithmetische Mittelwerte von jeweils zweimal 250 ausgezählten Zellen;

Werte in Klammern: Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der abgelösten RAM im Kulturüberstand

Kontrolle: unbehandelte RAM;

Inkubationszeit: 20h

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen;

Repräsentativ für 3 Versuche

Tabelle 6:

KONTROLLE (= unbehandelte RAM) gültig für alle Quarz-konzentrationen: nur rot fluoreszierende Lysosomen =100 (-)

Quarz-konzentrationen:	50 µg/ml	100 µg/ml	250µg/ml	500µg/ml
<u>QUARZ Q1:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	77 (37)	73 (16)	77 (31)	73 (61)
<u>QUARZ Q1:</u> rot+gelb fluoresz. Lysosomen	22 (6)	16 (-)	15 (-)	11 (-)
<u>QUARZ Q1:</u> nur grün fluoresz. Zellen	1 (57)	11 (84)	8 (69)	16 (39)
Summe	100%	100%	100%	100%
<u>QUARZ Q2:</u> nur rot fluoresz. Lysosomen	89 (81)	73 (72)	82 (15)	80 (4)
<u>QUARZ Q2:</u> rot+gelb fluoresz. Lysosomen	10 (-)	15 (5)	12 (-)	- (-)
<u>QUARZ Q2:</u> nur grün fluoresz. Zellen	1 (19)	12 (23)	6 (85)	20 (96)
Summe	100%	100%	100%	100%

Tabelle 6:

Einfluß der Phagozytose verschiedener Quarzkonzentrationen und Partikelgrößen auf die Erscheinungsformen der Lysosomen in Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) nach Vitalfärbung mit Acridinorange.

Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der RAM.

Arithmetische Mittelwerte von jeweils zweimal 250 ausgezählten Zellen;

Werte in Klammern: Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der abgelösten RAM im Kulturüberstand

Inkubationszeit: 20h

Q1: Partikelgrößen 1-10 µm

Q2: Partikelgrößen: 0,92-1,6 µm

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen;

Repräsentativ für 3 Versuche

Tabelle 7:

Inkubationszeiten:	2h	4h	20h
Medium plus Ca ²⁺ : <u>KONTROLLE:</u> nur rot fluoresz.Lysosomen	74	76	85
Medium plus Ca ²⁺ : <u>KONTROLLE:</u> rot+gelb fluoresz.Lysosomen	26	24	15
Summe	100%	100%	100%
Medium plus Ca ²⁺ : <u>QUARZ:</u> nur rot fluoresz.Lysosomen	53	55	61
Medium plus Ca ²⁺ : <u>QUARZ:</u> rot+gelb fluoresz.Lysosomen	21	24	24
Medium plus Ca ²⁺ : <u>QUARZ:</u> nur grün fluoresz.Zellen	26	21	15
Summe	100%	100%	100%
Medium minus Ca ²⁺ : <u>QUARZ:</u> nur rot fluoresz.Lysosomen	62	53	60
Medium minus Ca ²⁺ : <u>QUARZ:</u> rot+gelb fluoresz.Lysosomen	17	17	22
Medium minus Ca ²⁺ : <u>QUARZ:</u> nur grün fluoresz.Zellen	21	30	18
Summe	100%	100%	100%

Tabelle 7:

Einfluß von Ca²⁺-freiem Kulturmedium auf die Phagozytose von Quarz und auf die Erscheinungsformen der Lysosomen in Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) nach Vitalfärbung mit Acridinorange.

Prozentuale Verteilung der fluoreszenzoptisch differenzierbaren Erscheinungsbilder der RAM.

Arithmetische Mittelwerte von jeweils zweimal 250 ausgezählten Zellen;

Quarzkonzentration: 250 µg/ml

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen;

Repräsentativ für 2 Versuche

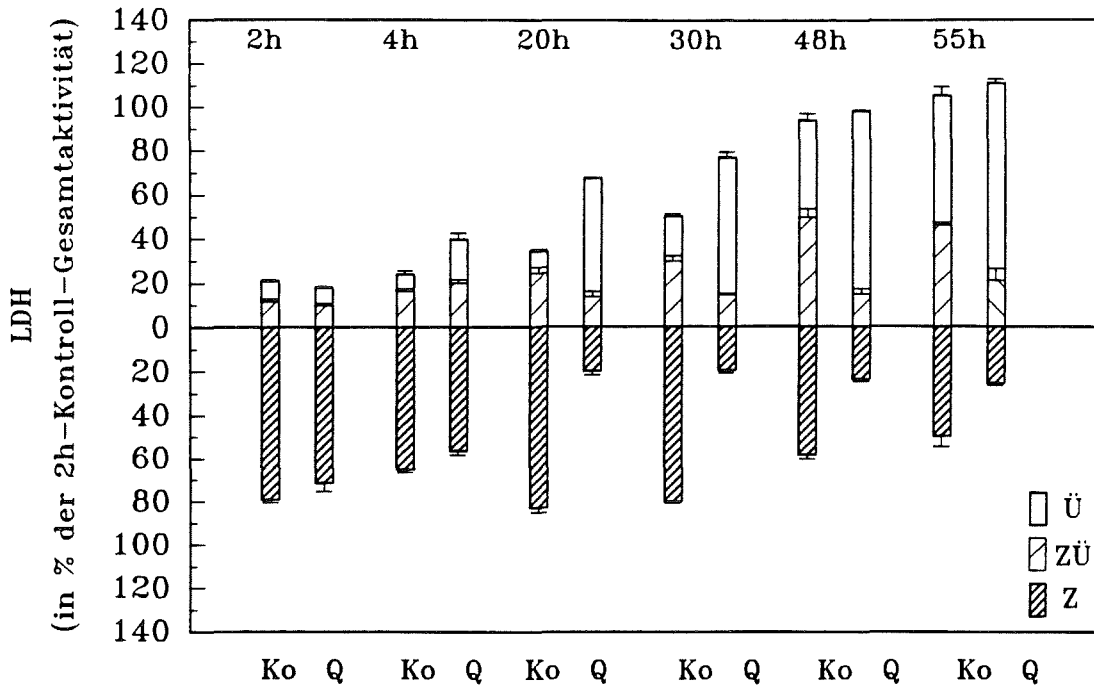


Abb. 21a:

Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die Verteilung der LDH der Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) im zellfreien Kulturüberstand (Ü), den Zellen im Kulturüberstand (ZÜ) und in den adhärennten Zellen (Z);

Beginn der Quarzexposition: 22h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, $n=3$

Repräsentativ für 3 Versuche

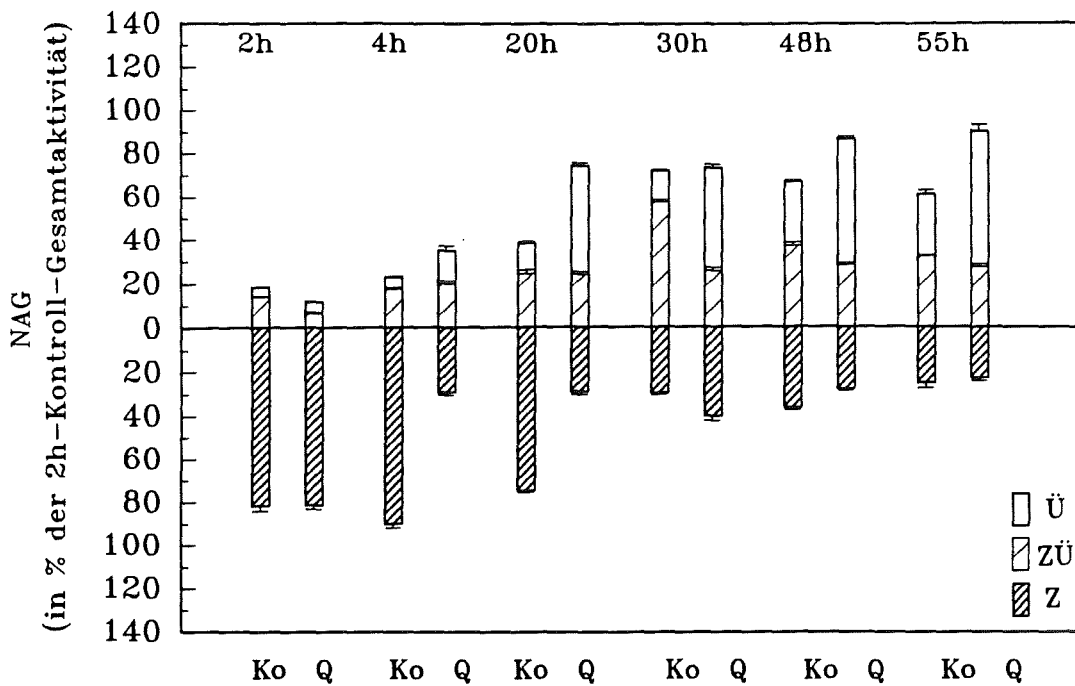


Abb. 21b:

Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die Verteilung der NAG der Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) im zellfreien Kulturüberstand (Ü), den Zellen im Kulturüberstand (ZÜ) und in den adhärenen Zellen (Z);

Beginn der Quarzexposition: 22h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, $n=3$

Repräsentativ für 3 Versuche

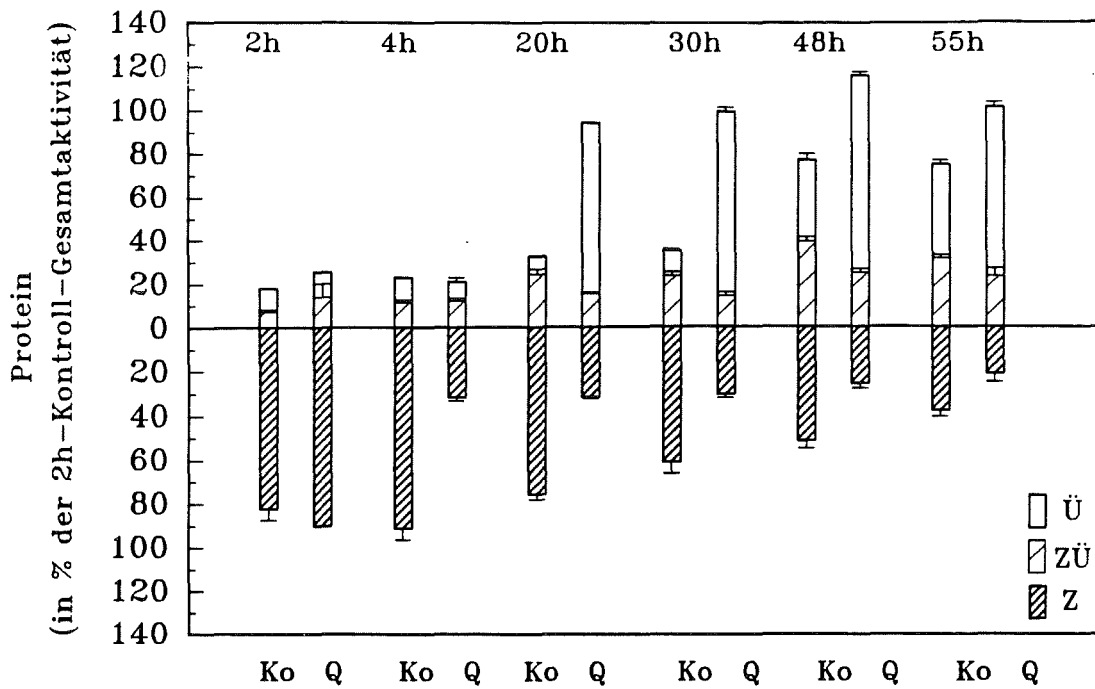


Abb. 21c:

Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die Verteilung des Gesamtproteins der Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) im zellfreien Kulturüberstand (Ü), den Zellen im Kulturüberstand (ZÜ) und in den adhärennten Zellen (Z);

Beginn der Quarzexposition: 22h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, $n=3$

Repräsentativ für 3 Versuche

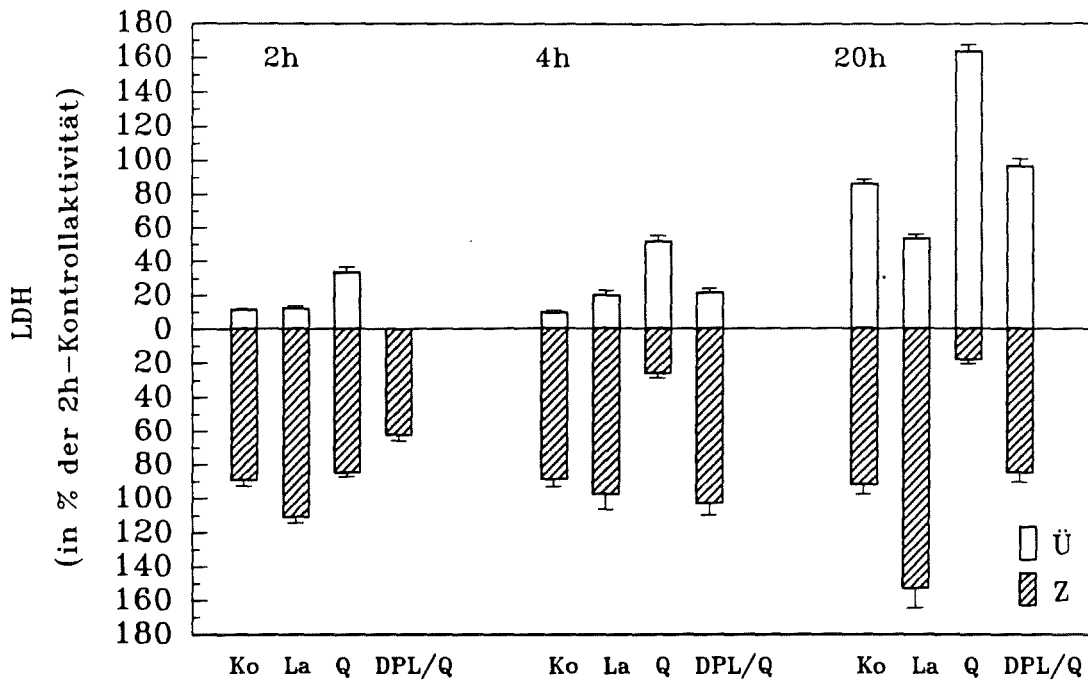


Abb. 22a:

Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die Verteilung der LDH der Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Latex ($200 \mu\text{g/ml}$), Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) und DPL-Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adhärennten Zellen (Z);

Beginn der Staubexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, $n=3$

Repräsentativ für 3 Versuche

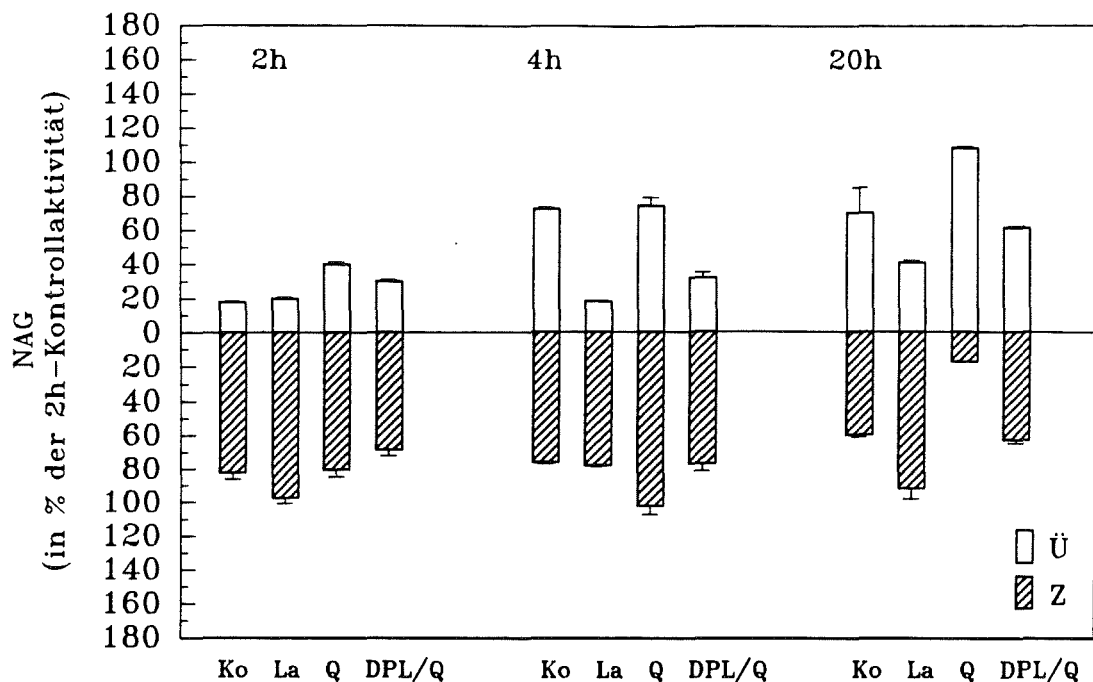


Abb. 22b:

Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die Verteilung der NAG der Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Latex ($200 \mu\text{g/ml}$), Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) und DPL-Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) und im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adherenten Zellen (Z);

Beginn der Staubexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, $n=3$

Repräsentativ für 3 Versuche

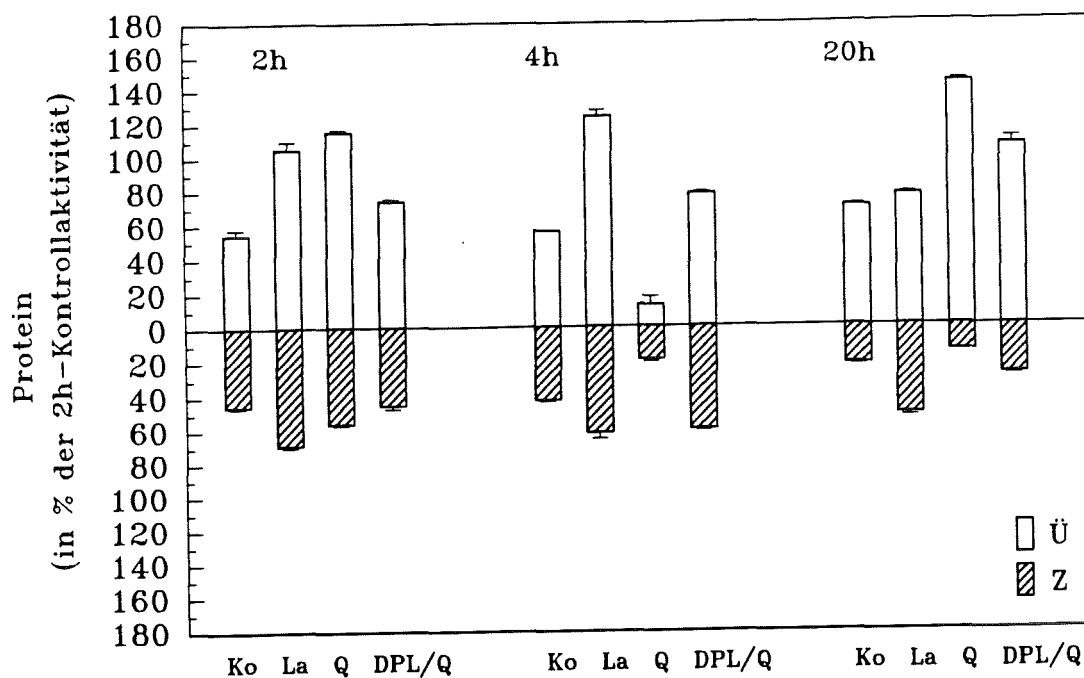


Abb. 22c:

Einfluß verschiedener Inkubationszeiten auf die Verteilung des Gesamtproteins der Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Latex ($200 \mu\text{g/ml}$); Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) und DPL-Quarz ($250 \mu\text{g/ml}$) im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adhärennten Zellen (Z);

Beginn der Staubexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, $n=3$

Repräsentativ für 3 Versuche

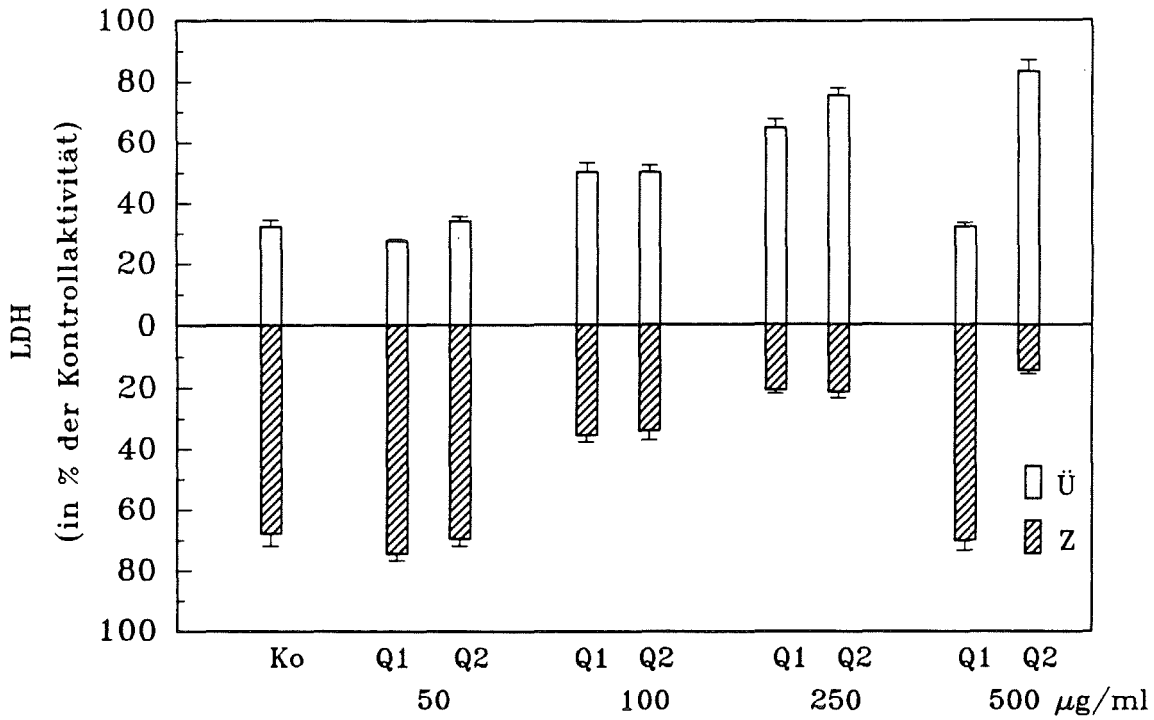


Abb. 23a:
Einfluß verschiedener Quarzkonzentrationen und Partikelgrößen Q1 (1-10 µm) und Q2 (0,92-1,6 µm) auf die Verteilung der LDH der Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20h-Inkubation im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adhärennten Zellen (Z);
Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen
Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, n=3
Einzelversuch

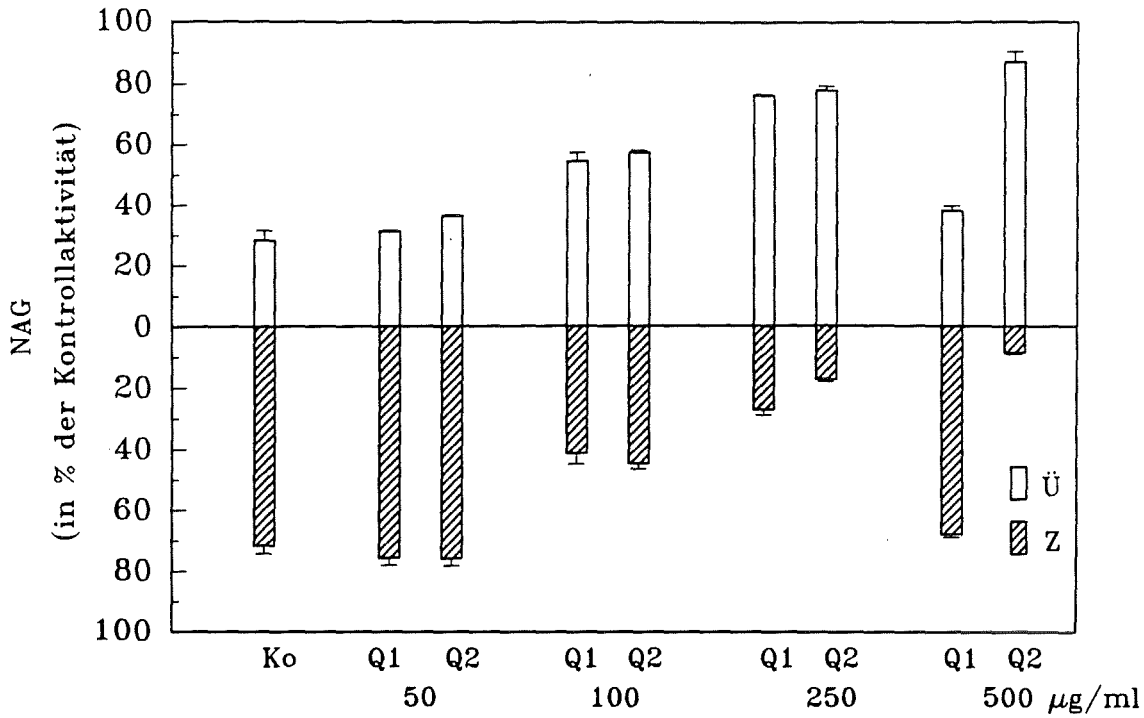


Abb. 23b:

Einfluß verschiedener Quarzkonzentrationen und Partikelgrößen Q1 (1-10 µm) und Q2 (0,92-1,6 µm) auf die Verteilung der NAG der Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20h-Inkubation im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adhärenen Zellen (Z);

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, n=3

Einzelversuch

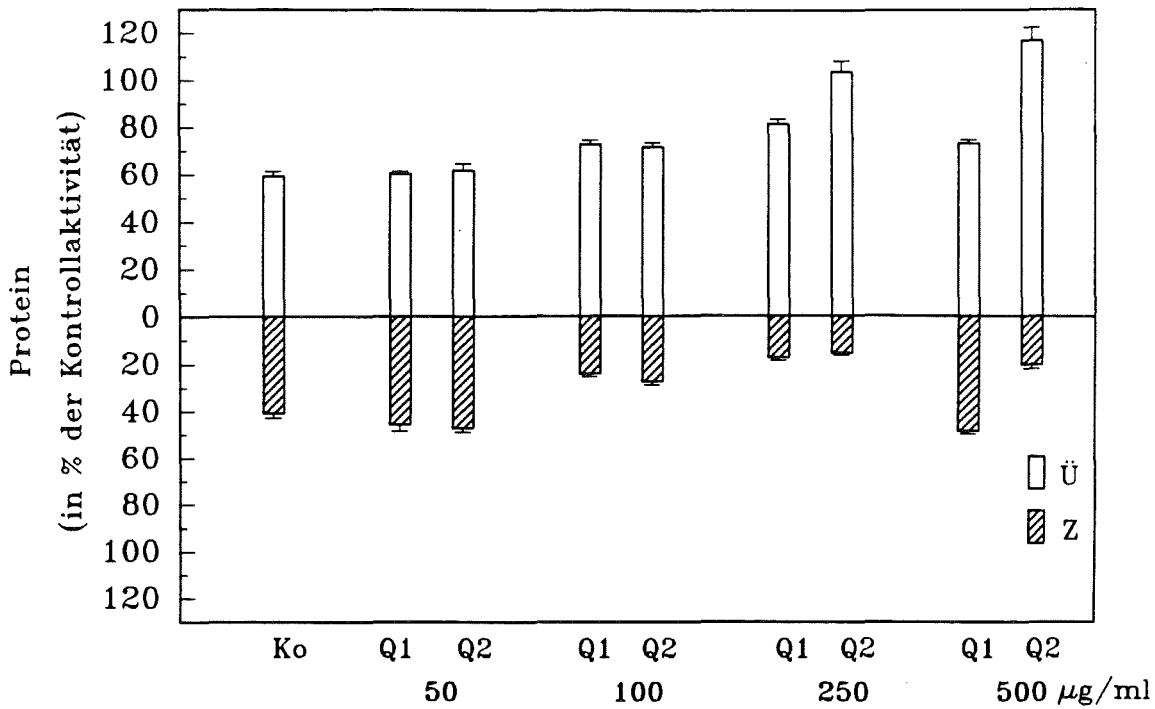


Abb. 23c:

Einfluß verschiedener Quarzkonzentrationen und Partikelgrößen Q1 (1-10 µm) und Q2 (0,92-1,6 µm) auf die Verteilung des Gesamtproteins der Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20h-Inkubation im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adhärenen Zellen (Z);

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, n=3

Einzelversuch

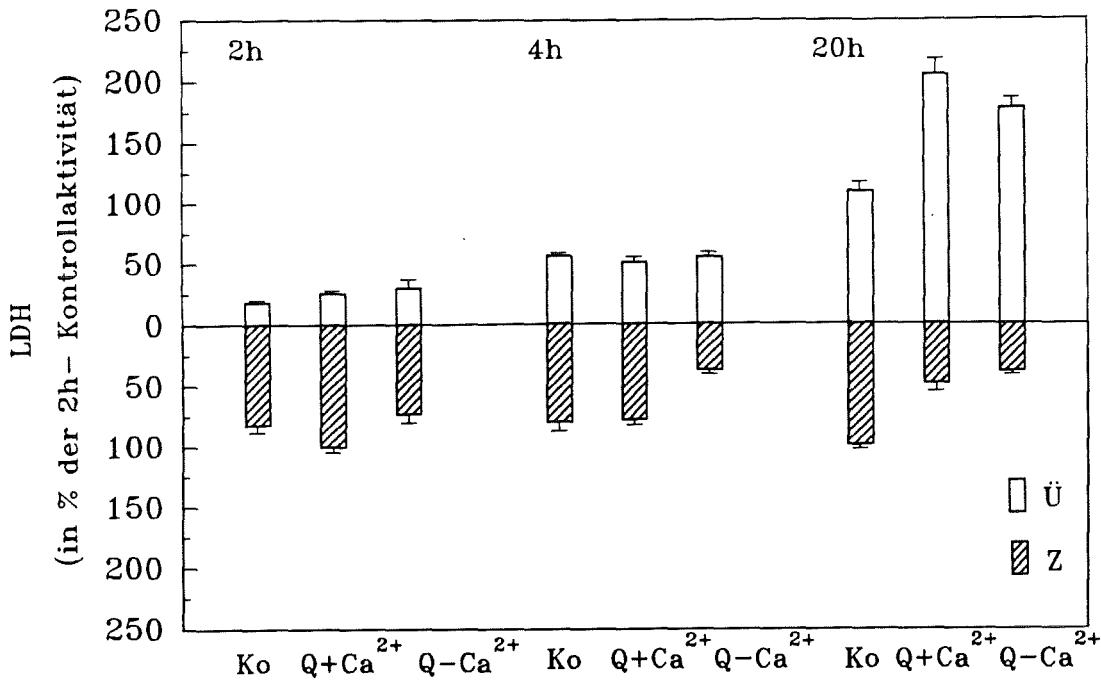


Abb. 24a:

Einfluß von Ca^{2+} -freiem und normalem, Ca^{2+} -haltigem Kulturmedium auf die Phagozytose von Quarz: Verteilung der LDH der Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose ($250 \mu\text{g/ml}$) und verschiedenen Inkubationszeiten im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adherenten Zellen (Z);

Kontrolle: unbehandelte AM in normalem, Ca^{2+} -haltigem Medium

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, $n=3$

Repräsentativ für 2 Versuche

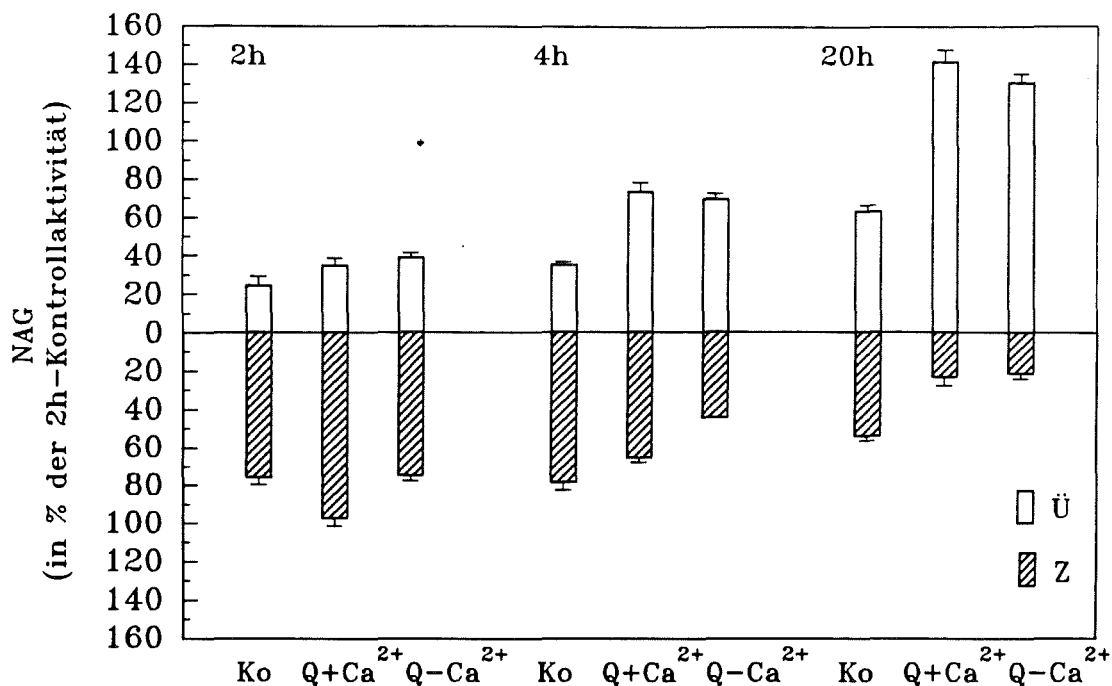


Abb. 24b:

Einfluß von Ca²⁺-freiem und normalem, Ca²⁺-haltigem Kulturmedium auf die Phagozytose von Quarz: Verteilung der NAG der Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose (250 µg/ml) und verschiedenen Inkubationszeiten im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adhärenen Zellen (Z);

Kontrolle: unbehandelte AM in normalem, Ca²⁺-haltigem Medium

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, n=3

Repräsentativ für 2 Versuche

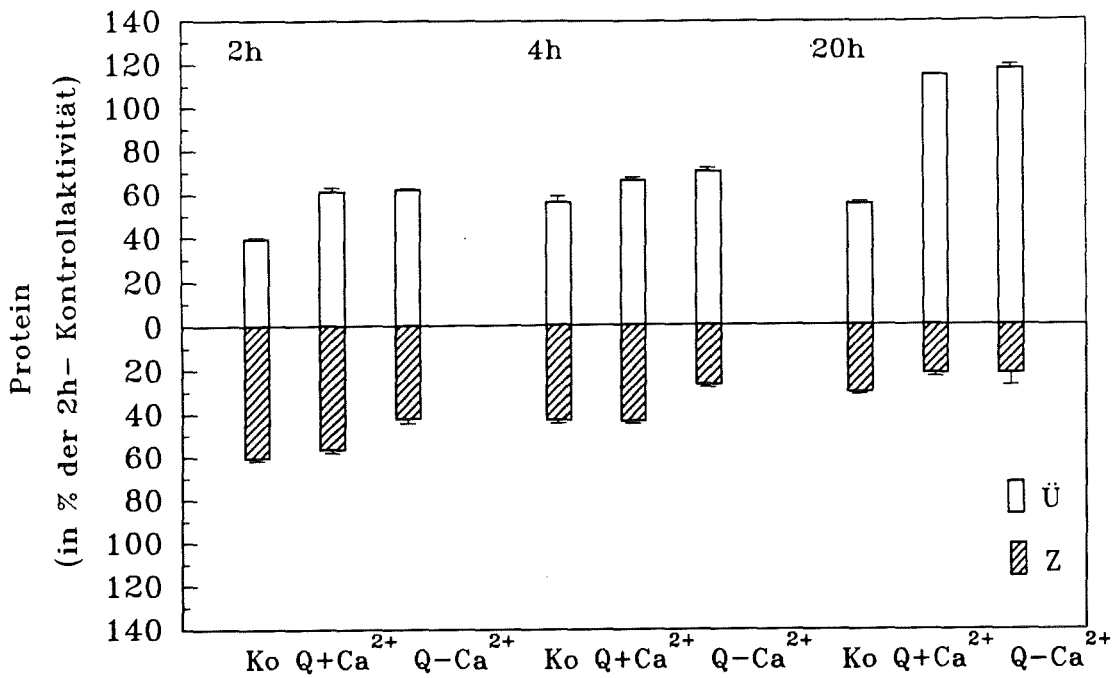


Abb. 24c:

Einfluß von Ca^{2+} -freiem und normalem, Ca^{2+} -haltigem Kulturmedium auf die Phagozytose von Quarz: Verteilung des Gesamtproteins der Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose ($250 \mu\text{g/ml}$) und verschiedenen Inkubationszeiten im zellfreien Kulturüberstand (Ü) und in den adherenten Zellen (Z);

Kontrolle: unbehandelte AM in normalem, Ca^{2+} -haltigem Medium

Beginn der Quarzexposition: 94h nach Gewinnung der Zellen

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, $n=3$

Repräsentativ für 2 Versuche

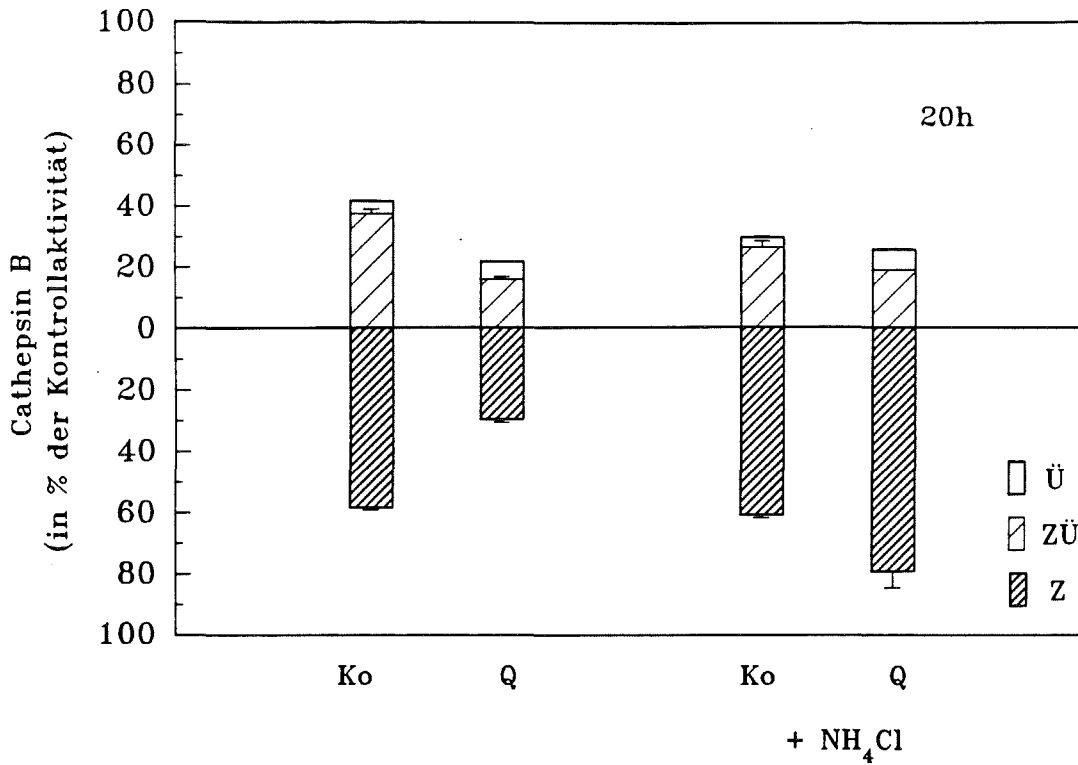


Abb. 25:

Einfluß des Phagosomen-Lysosomen-Fusions-Hemmstoffes Ammoniumchlorid (10 mM NH₄Cl) auf die Verteilung von Cathepsin B in den Rinder-Alveolarmakrophagen nach Quarzphagozytose (150 µg/ml, 20h) im zellfreien Kulturüberstand (Ü), den Zellen im Kulturüberstand (ZÜ) und in den adhärennten Zellen (Z);

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, n = 3

Repräsentativ für 2 Versuche

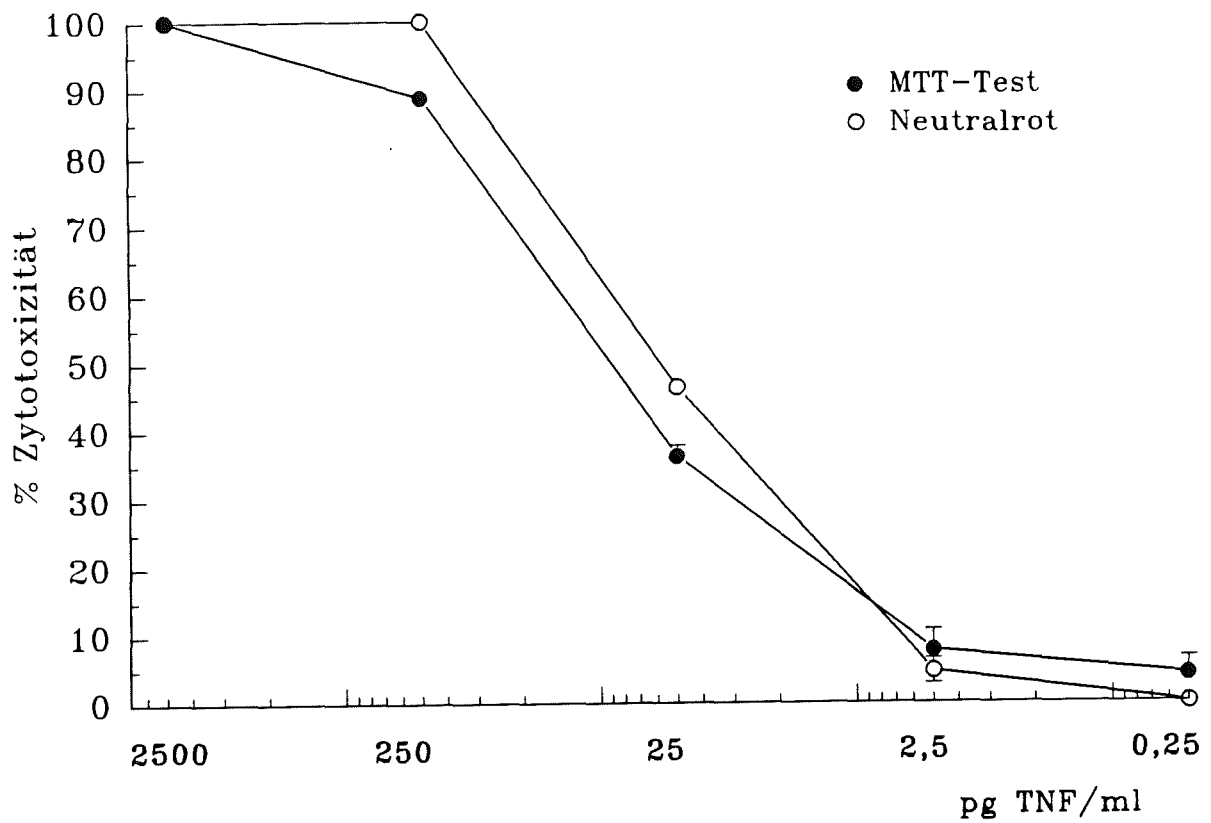


Abb. 26:
Konzentrations-Wirkungskurve für **rhu-TNF- α** : Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung von **TNF- α** auf die L-929-Zellen im TNF-Bioassay mit dem MTT-Test und der Neutralrotmethode; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4).

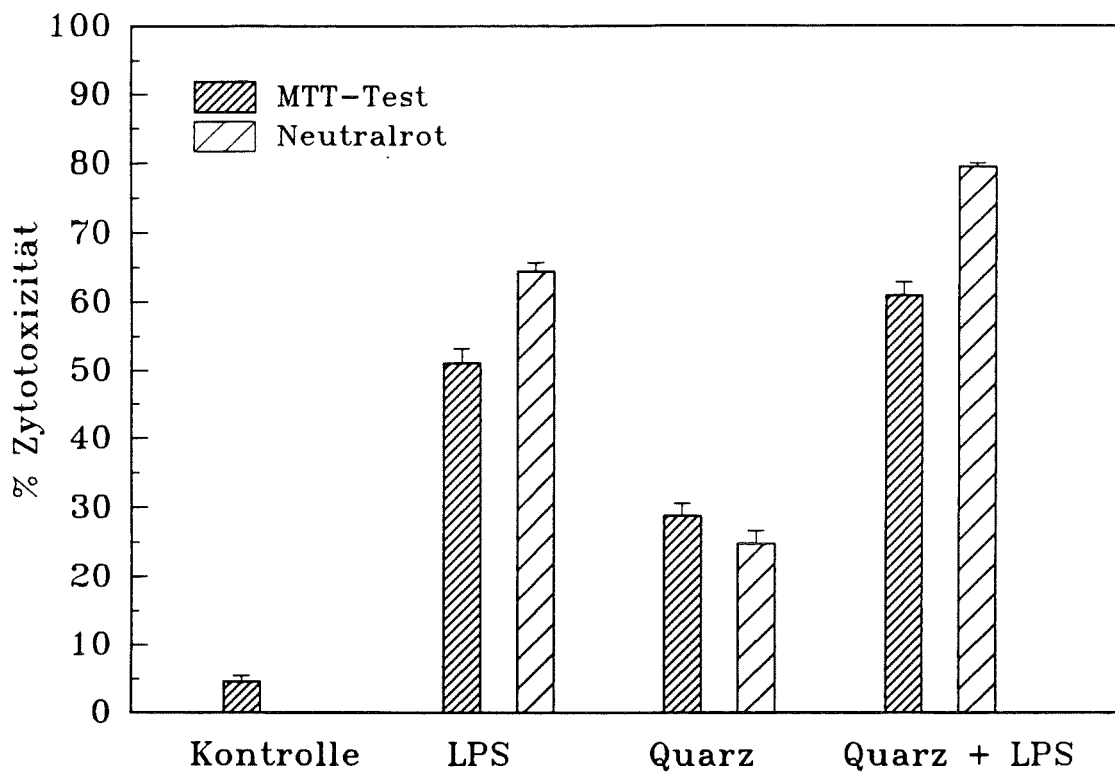


Abb. 27:

Freisetzung von TNF aus RAM: Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung der Kulturüberstände auf die L-929-Zellen im TNF-Bioassay: Vergleich zwischen dem MTT-Test und der Neutralrotmethode;

Die RAM wurden für 20h mit LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), Quarz (100 $\mu\text{g/ml}$) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und die Kulturüberstände im TNF-Bioassay untersucht.

Darstellung der zytotoxischen Wirkung der unverdünnten Kulturüberstände auf die L-929-Zellen im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8).

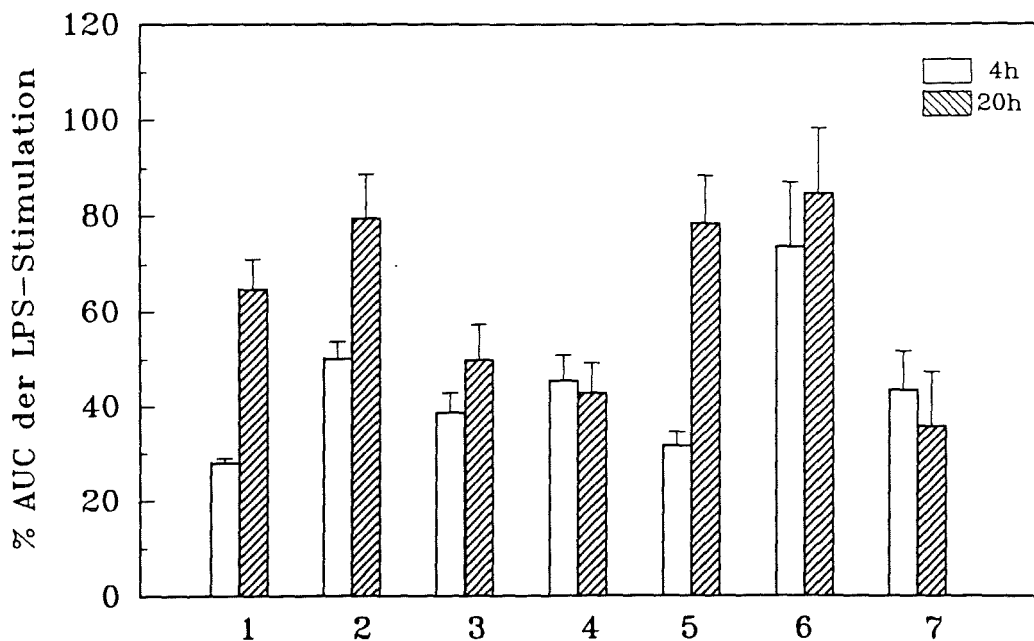


Abb. 28:
Vergleich zwischen der spontanen TNF-Freisetzung aus unstimulierten RAM und der TNF-Freisetzung aus RAM nach Stimulation mit LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) aus 7 verschiedenen Individuen. Jedes Säulenpaar entspricht einem untersuchten Individuum. Inkubationszeiten: 4h und 20h

AUC-Berechnung (mit Standardfehlern) aus den Zytotoxizitätskurven der 4 Verdünnungsstufen im TNF-Bioassay ($n=4$); dargestellt als Prozentwert des AUC-Wertes der entsprechenden LPS-Stimulation (100%).

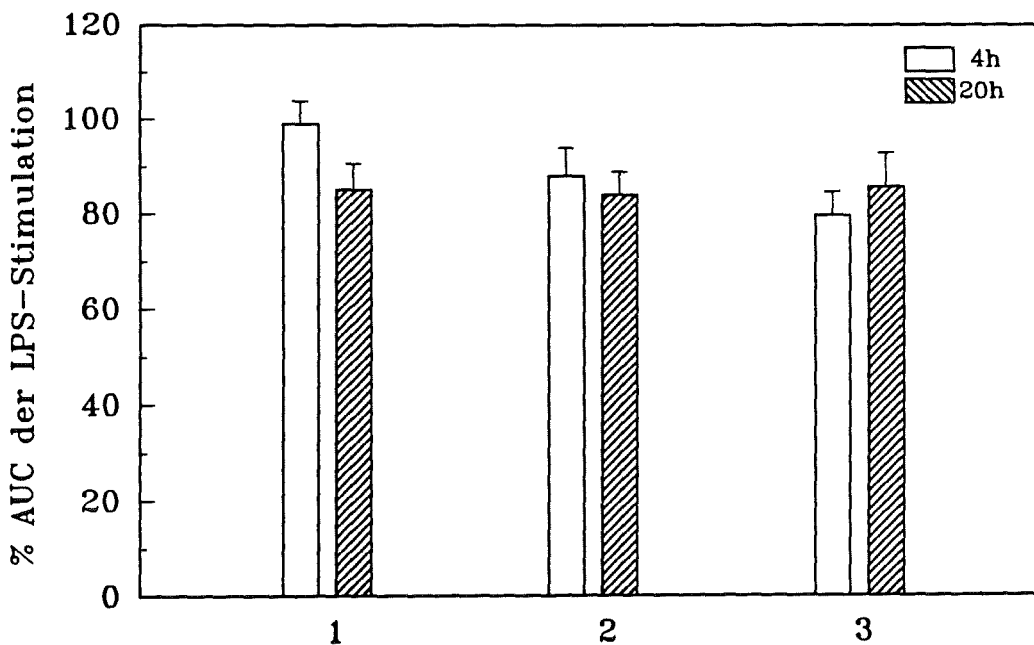


Abb. 29:
Vergleich zwischen dem TNF-Gehalt von unstimulierten RAM und dem TNF-Gehalt von RAM nach Stimulation mit LPS ($10 \mu\text{g/ml}$, Inkubationszeiten: 4h und 20h) von 3 verschiedenen Individuen. Jedes Säulenpaar entspricht einem untersuchten Individuum. AUC-Berechnung (mit Standardfehlern) aus den Zytotoxizitätskurven der 4 Verdünnungsstufen im TNF-Bioassay ($n=4$); dargestellt als Prozentwert des AUC-Wertes der entsprechenden LPS-Stimulation (100%).

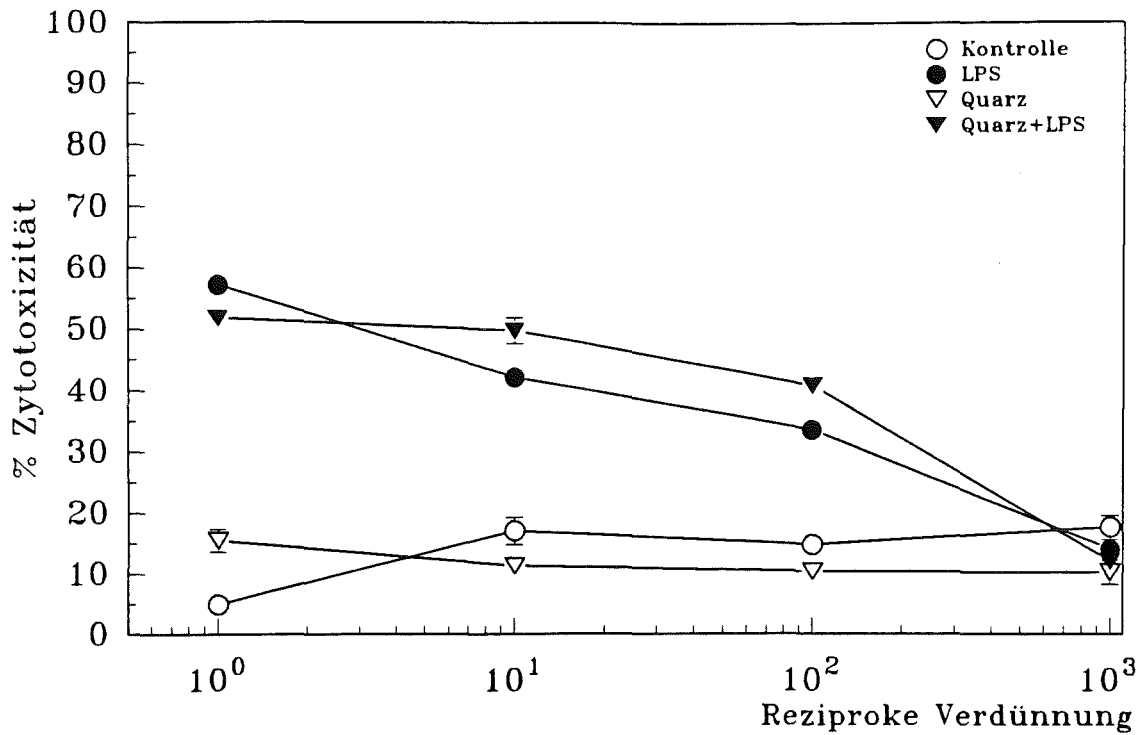


Abb. 30a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (25 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8); repräsentativ für 2 Versuche

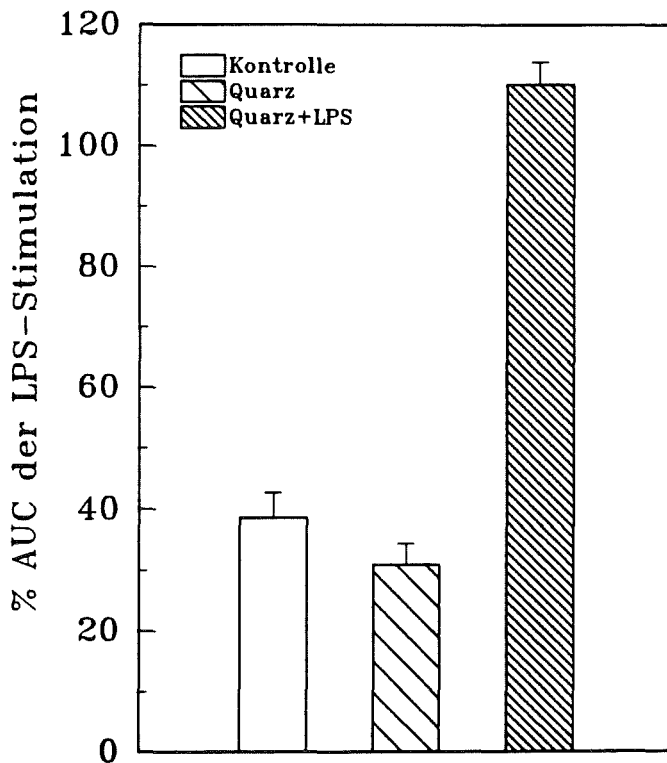


Abb. 30b:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (25 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 30a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

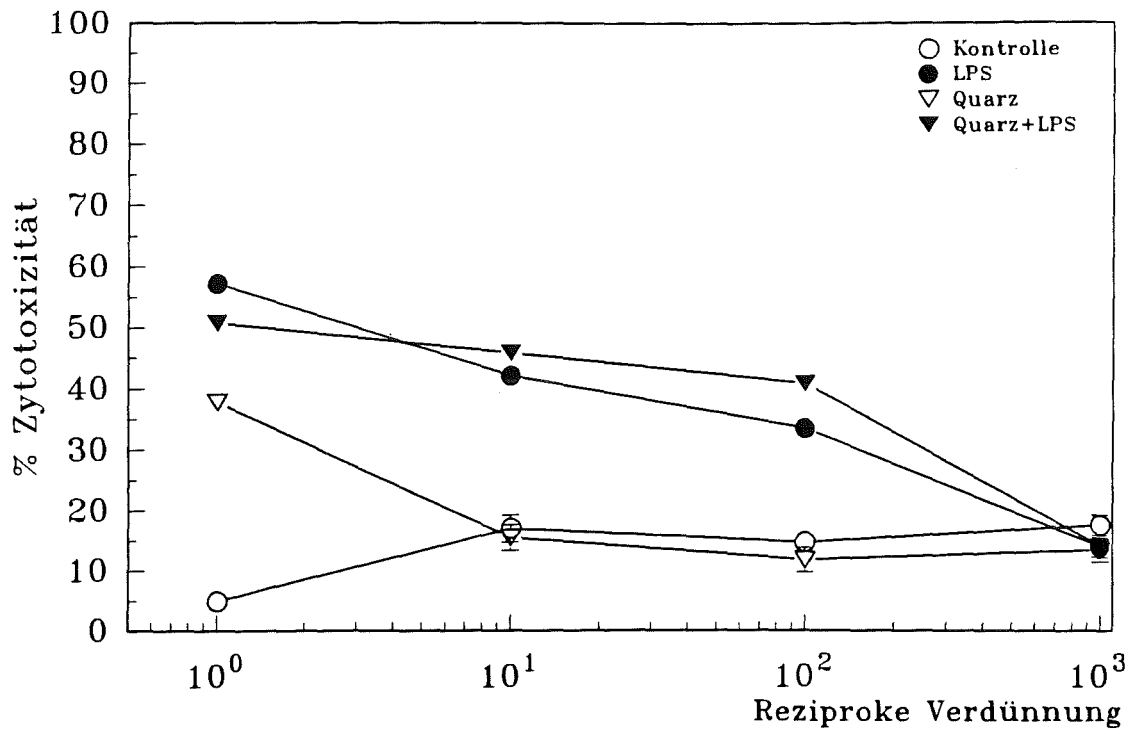


Abb. 31a:
 Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (50 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8); repräsentativ für 3 Versuche

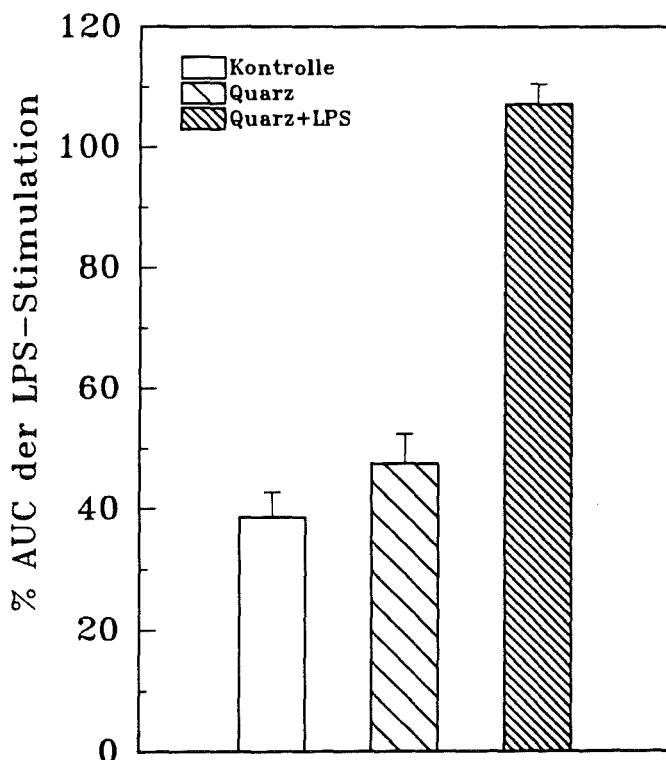


Abb. 31b:
 Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (50 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 31a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

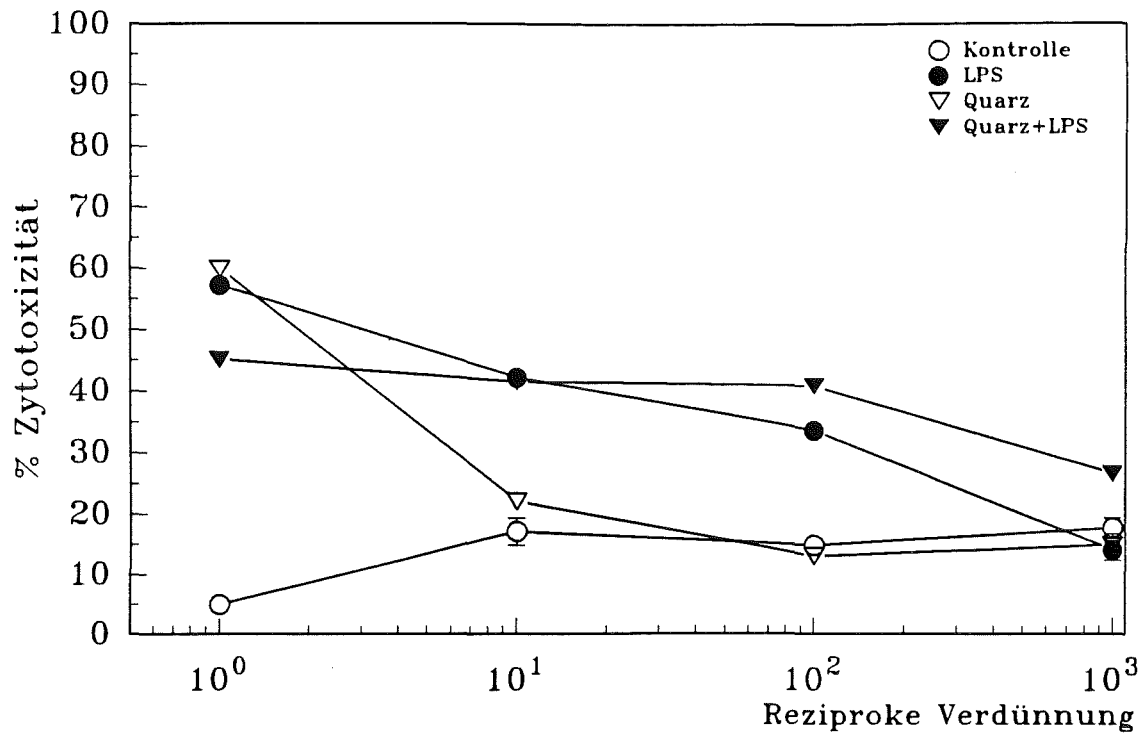


Abb. 32a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (100 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8); repräsentativ für 3 Versuche

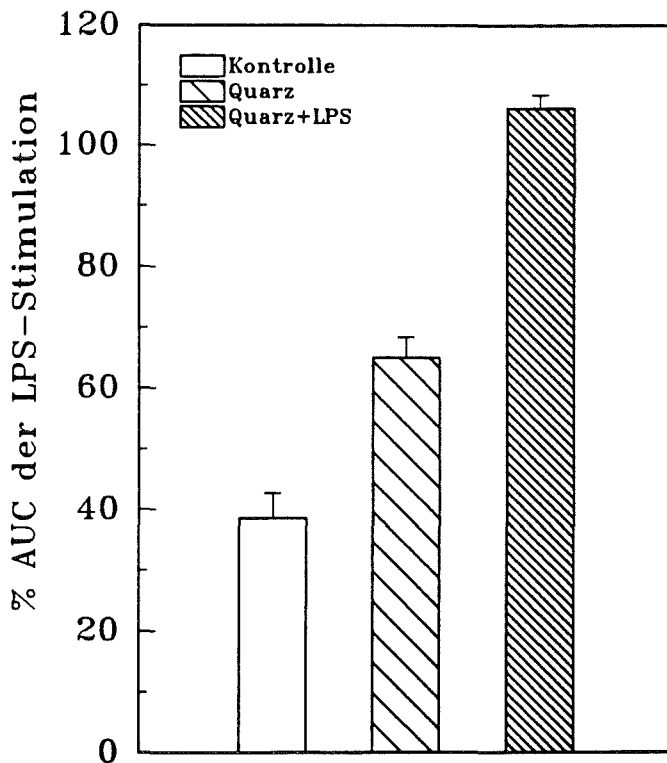


Abb. 32b:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (100 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 32a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

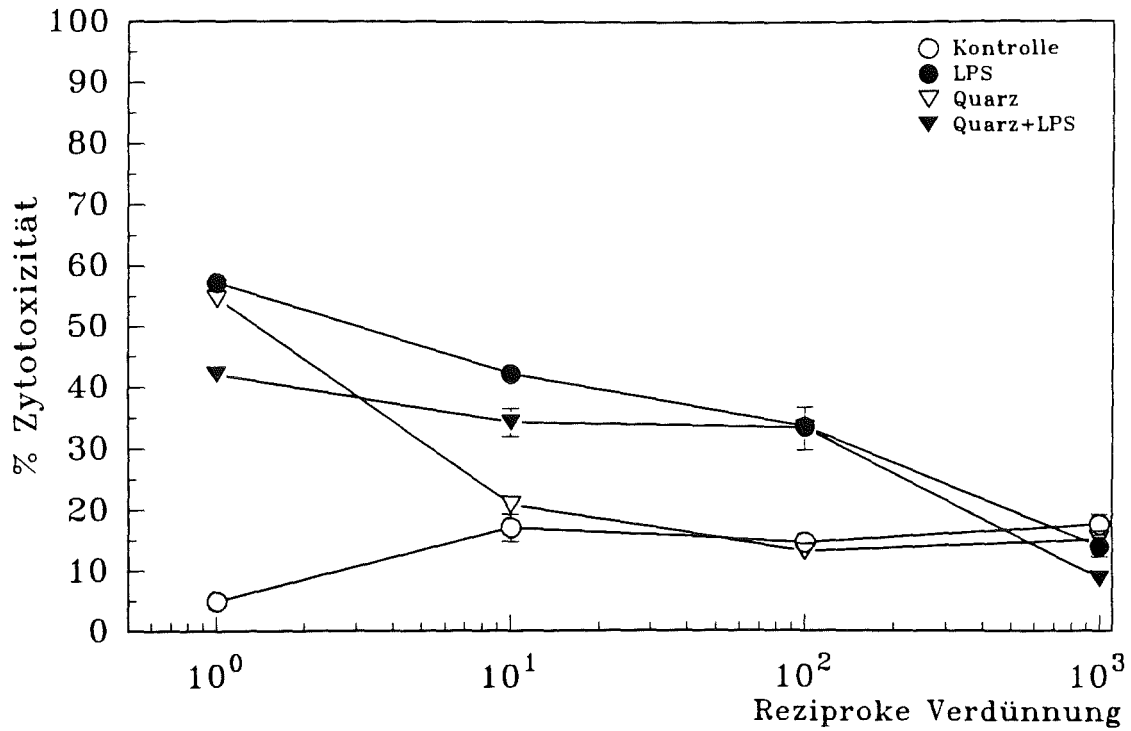


Abb. 33a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (150 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle = unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8); Einzelversuch

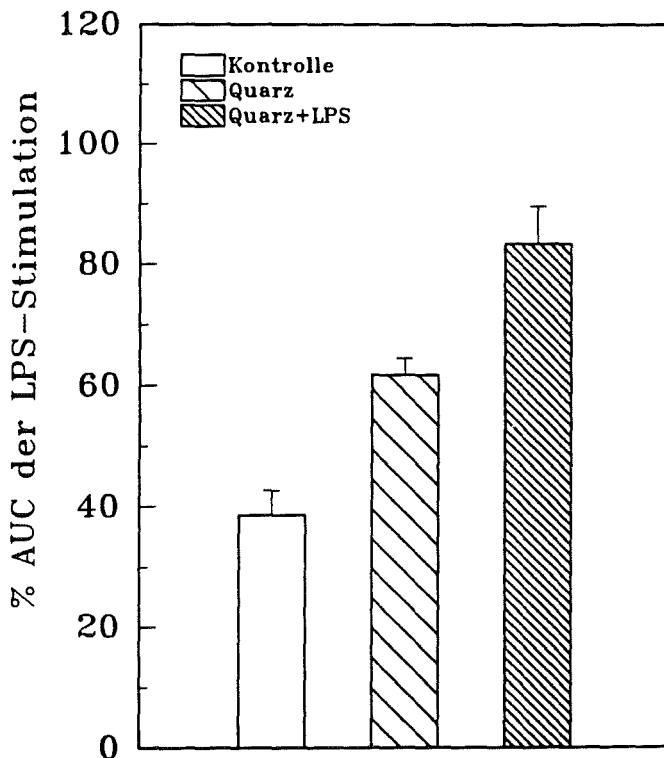


Abb. 33b:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (150 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle = unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 33a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

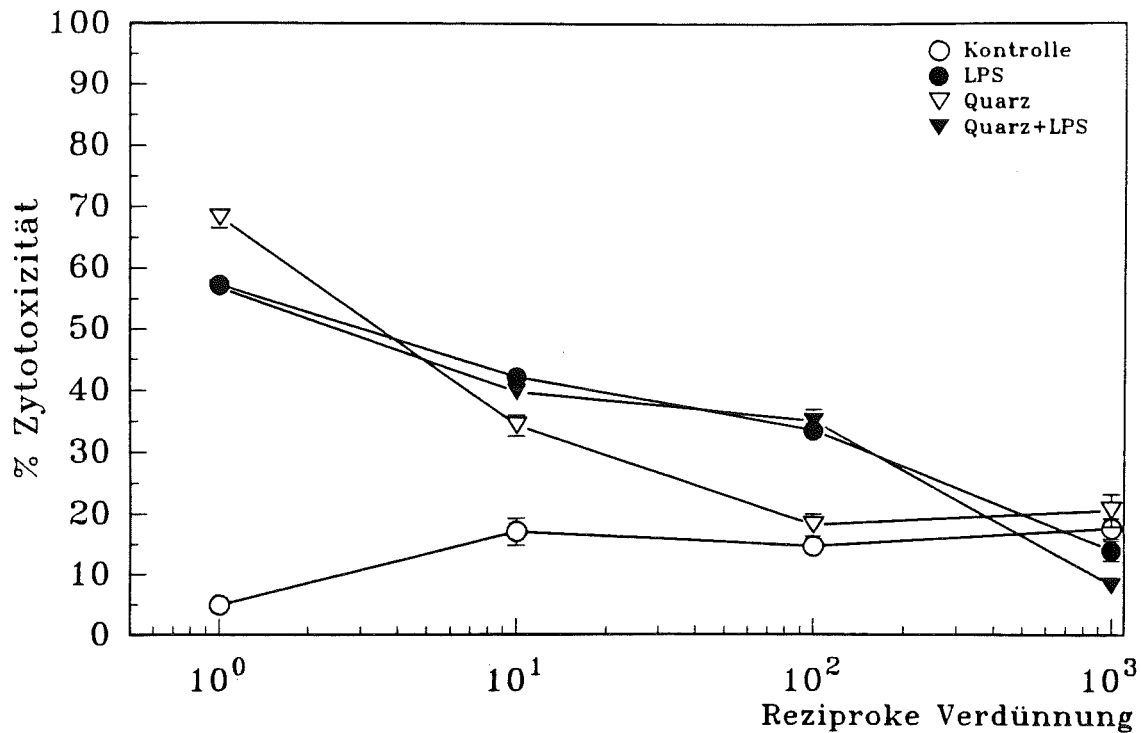


Abb. 34a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (200 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8); Einzelversuch

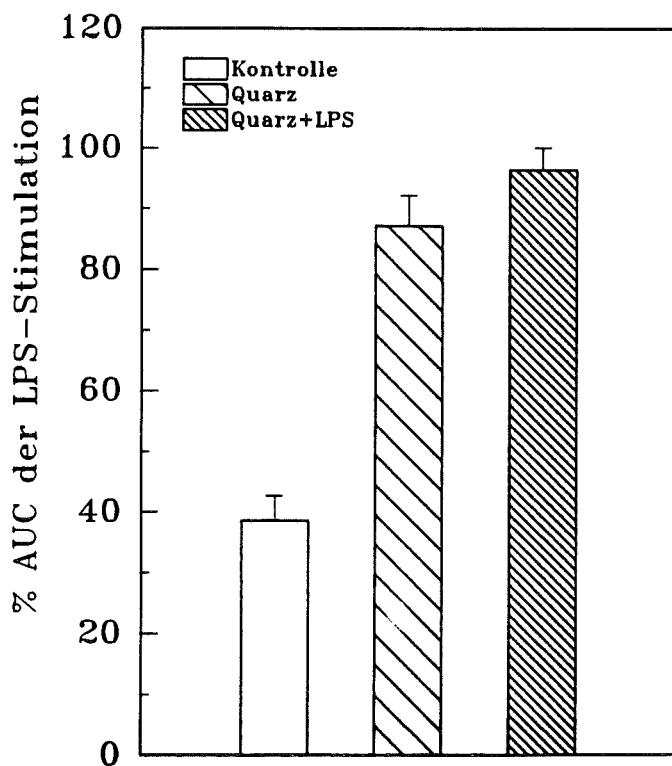


Abb. 34b:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (200 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 34a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

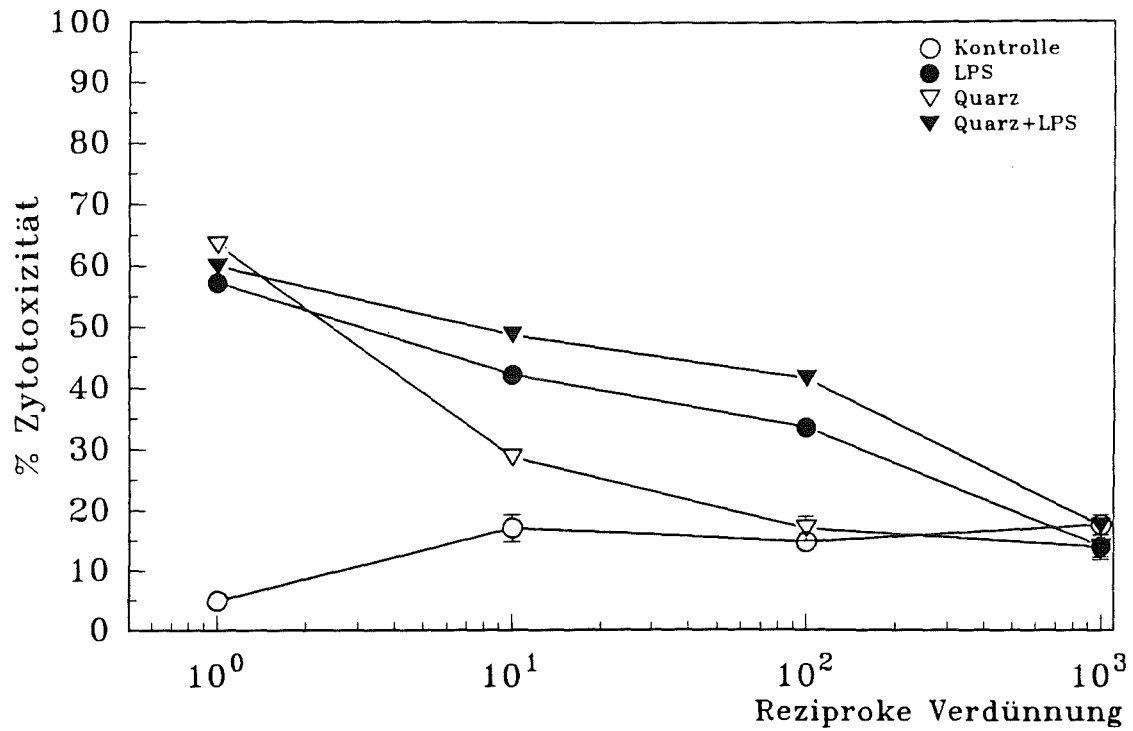


Abb. 35a:
 Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (250 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8); repräsentativ für 2 Versuche

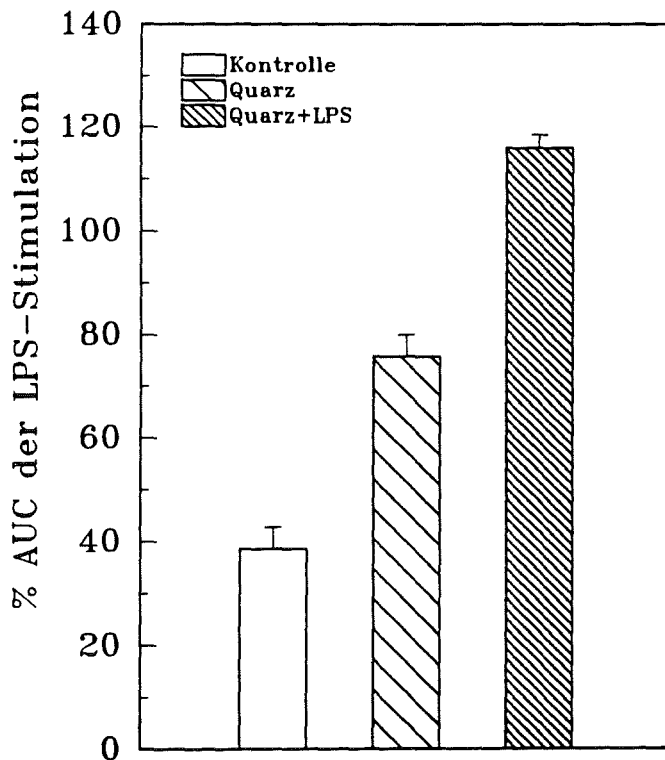


Abb. 35b:
 Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (250 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 35a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

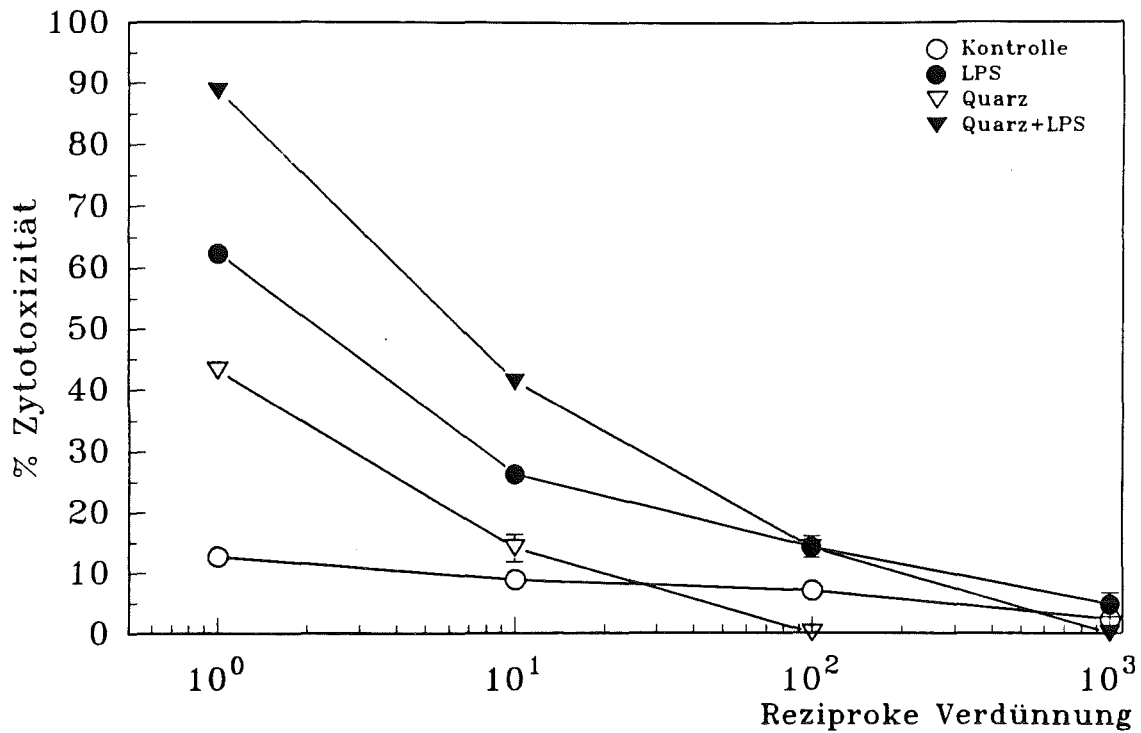


Abb. 36a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (500 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8); repräsentativ für 2 Versuche

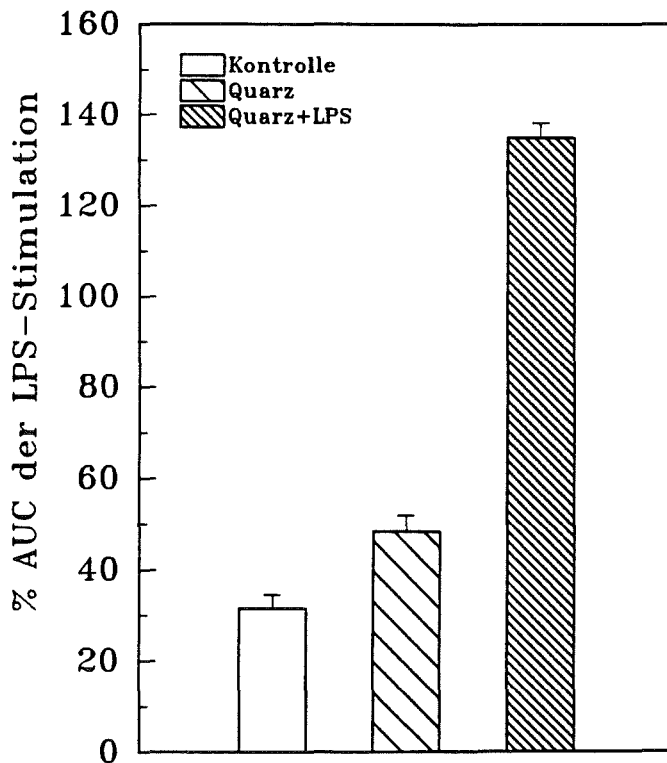


Abb. 36b:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (500 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 36a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

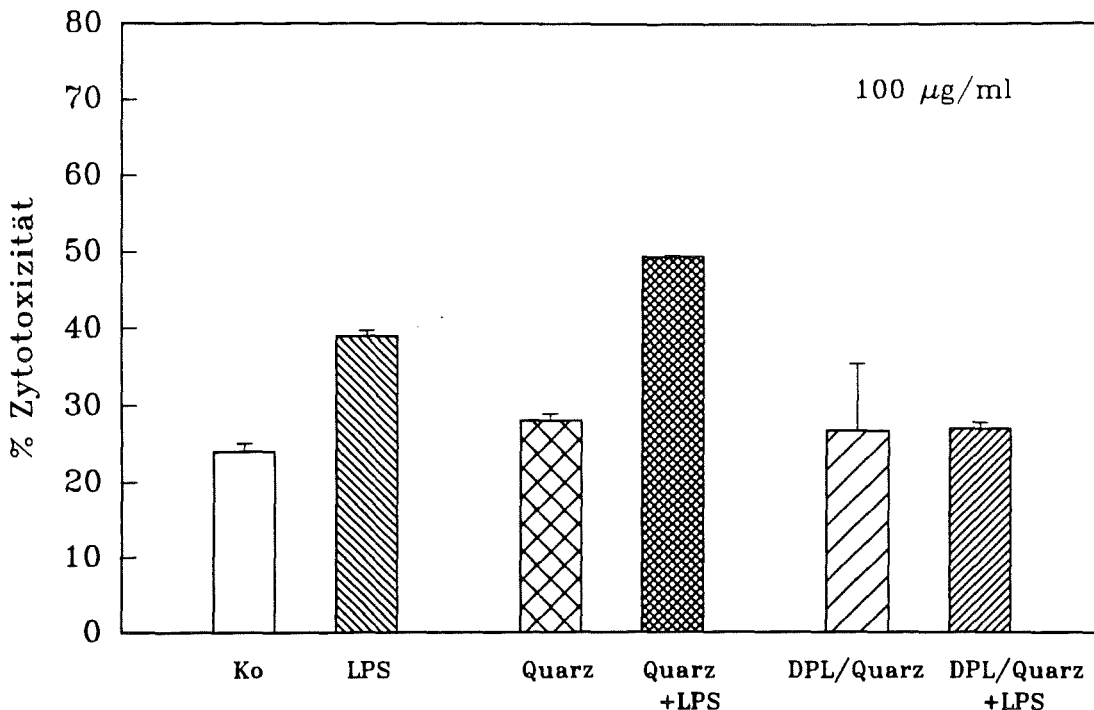


Abb. 37a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 20h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml) sowie Quarz (100 µg/ml) und DPL/Quarz (100 µg/ml), jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle = unstimulierte RAM); Dargestellt sind die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8), Einzelversuch

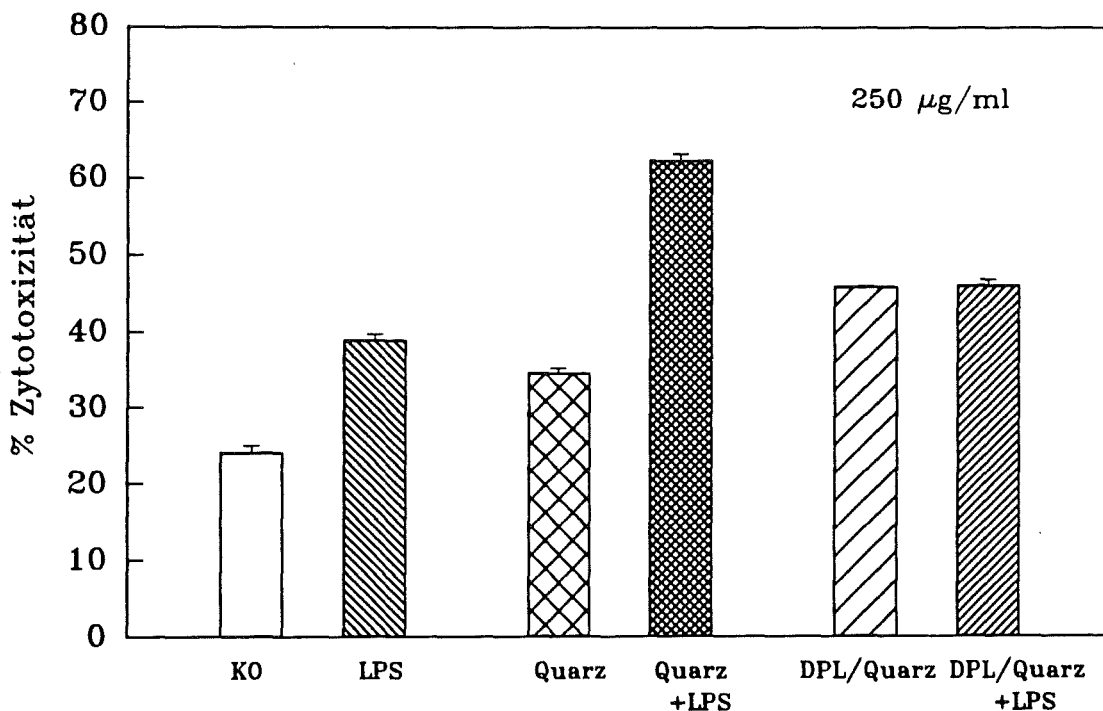


Abb. 37b:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 20h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml) sowie Quarz (250 µg/ml) und DPL/Quarz (250 µg/ml), jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle = unstimulierte RAM); Dargestellt sind die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8), Einzelversuch

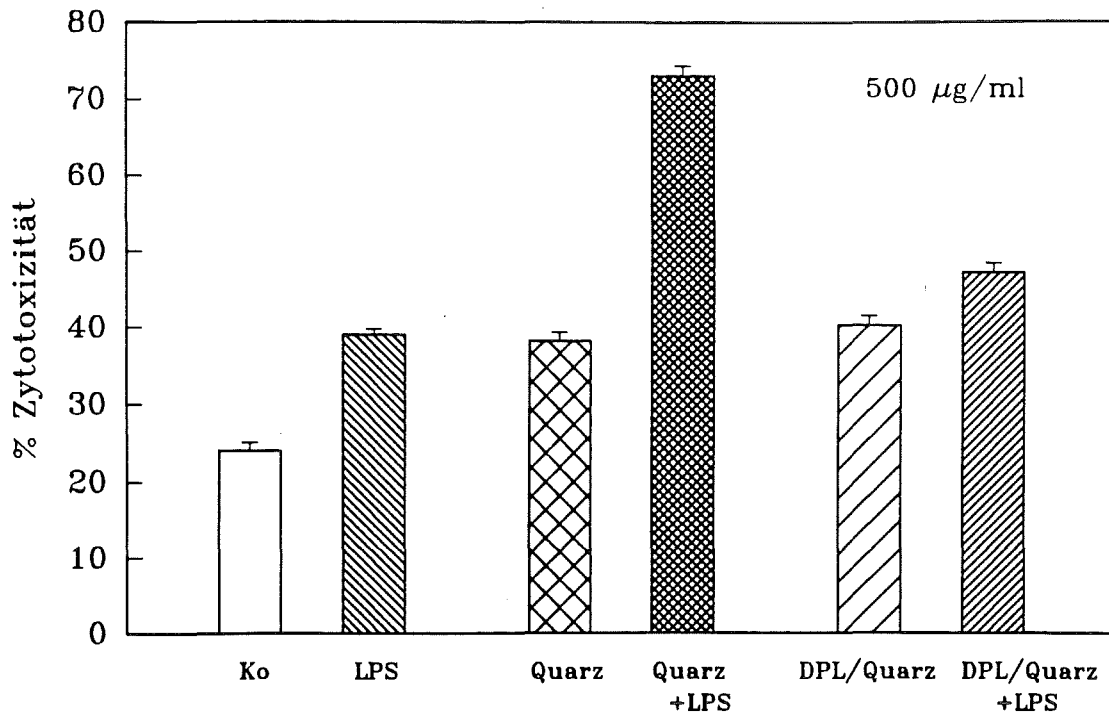


Abb. 37c:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 20h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml) sowie Quarz (500 µg/ml) und DPL/Quarz (500 µg/ml), jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle = unstimulierte RAM); Dargestellt sind die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 8), Einzelversuch

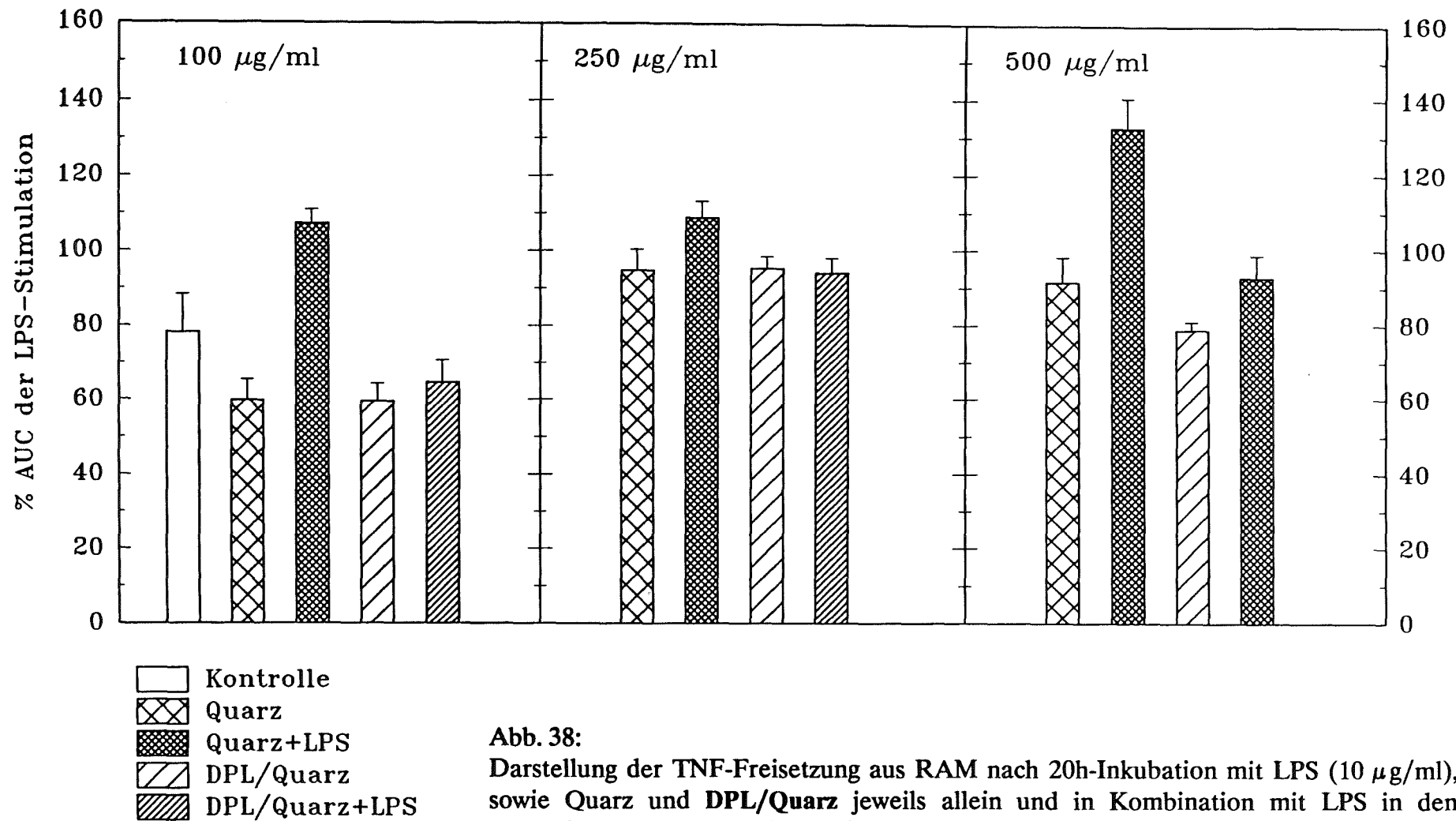


Abb. 38:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 20h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), sowie Quarz und DPL/Quarz jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (nicht gezeigt) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

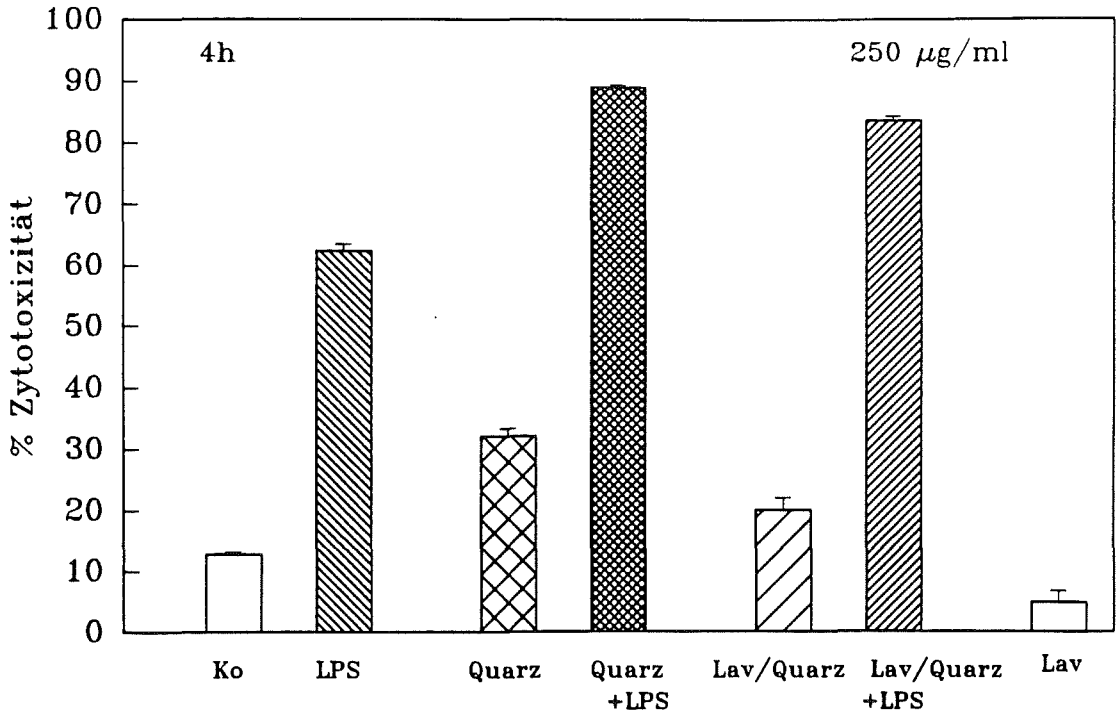


Abb. 39a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) sowie Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) und Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) mit Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit (Lav), jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Dargestellt sind die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8), Einzelversuch

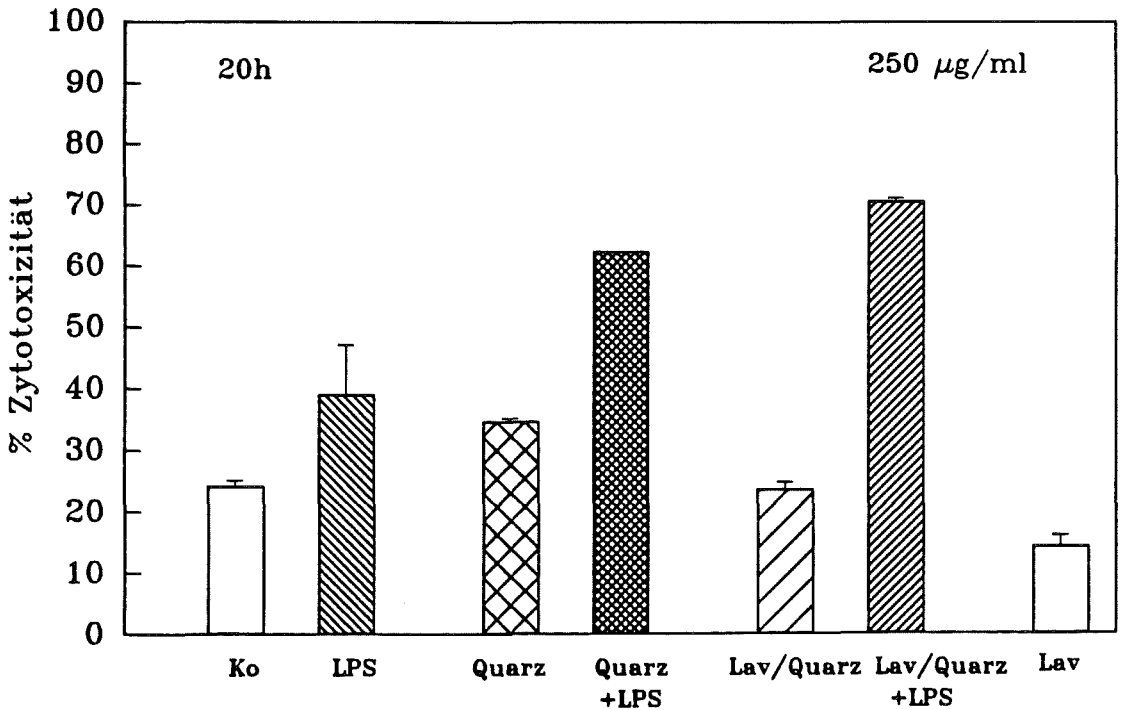


Abb. 39b:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 20h-Inkubation mit LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) sowie Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) und Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) mit Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit (Lav), jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Dargestellt sind die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8), Einzelversuch

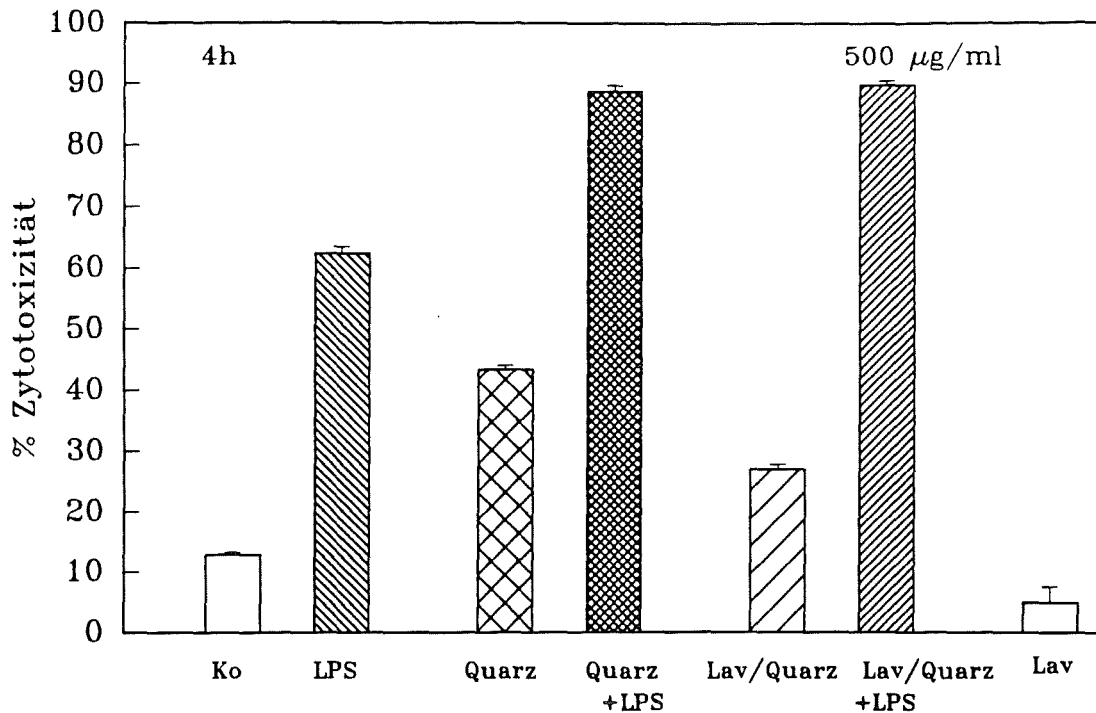


Abb. 40a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) sowie Quarz ($500 \mu\text{g/ml}$) und Quarz ($500 \mu\text{g/ml}$) mit Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit (Lav), jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Dargestellt sind die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n=8$), Einzelversuch

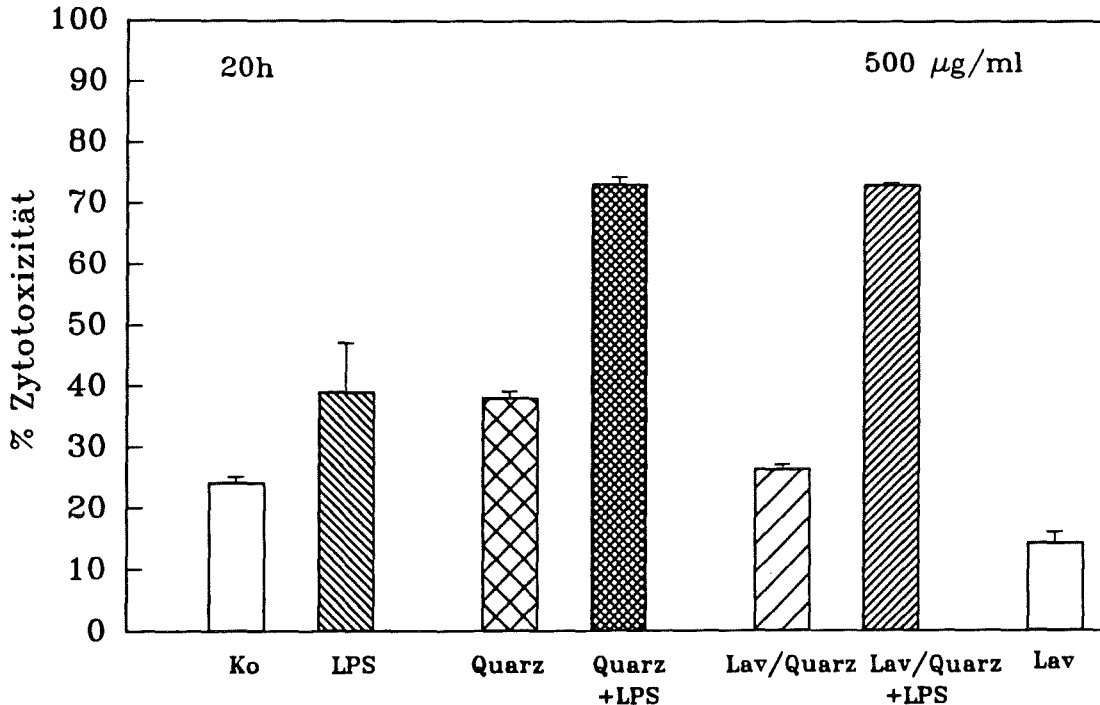


Abb. 40b:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 20h-Inkubation mit LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) sowie Quarz ($500 \mu\text{g/ml}$) und Quarz ($500 \mu\text{g/ml}$) mit Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit (Lav), jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Dargestellt sind die Zytotoxizitätswerte der unverdünnten Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n=8$), Einzelversuch

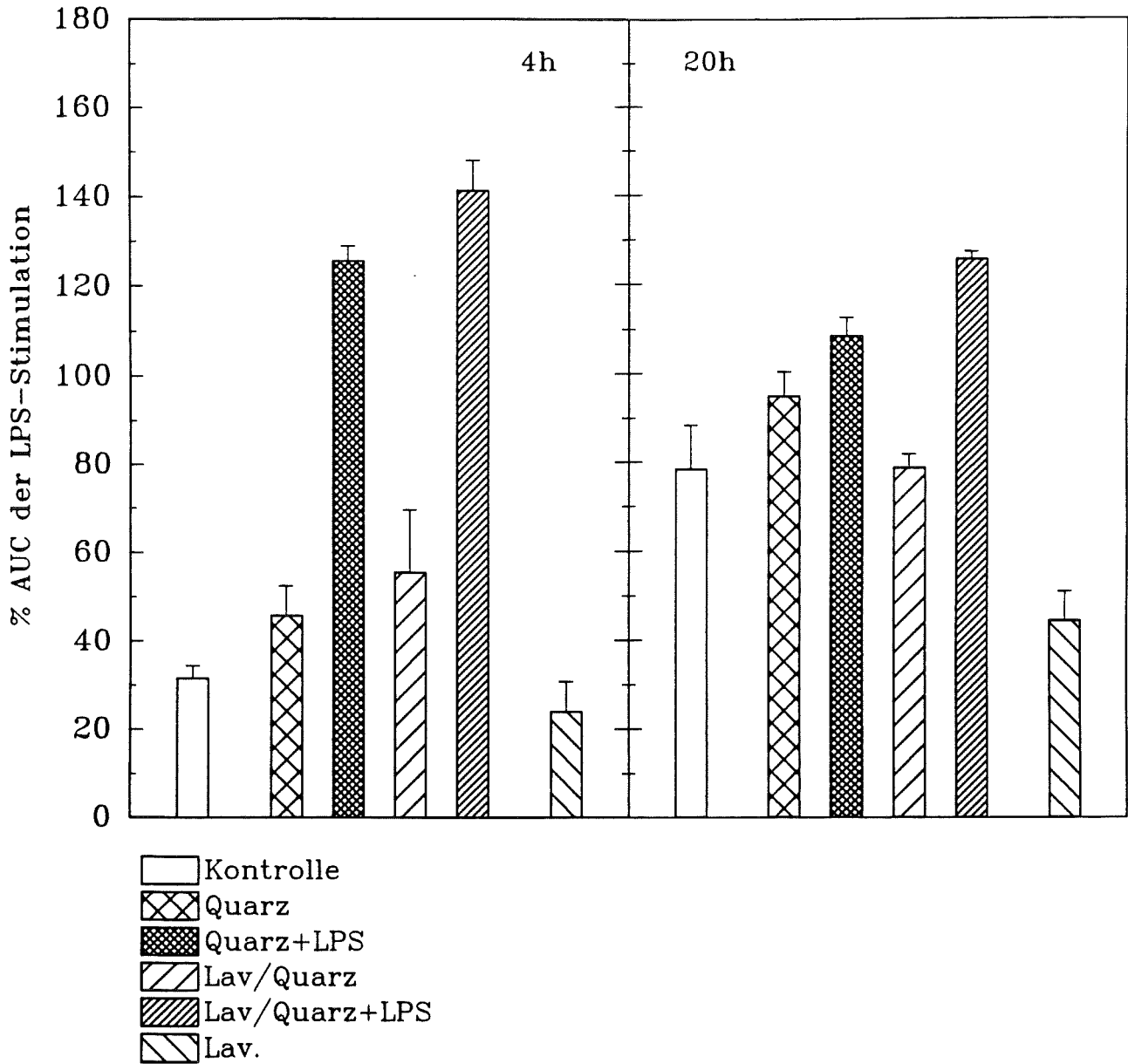


Abb. 41:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), sowie Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) und Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$) mit Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit (Lav) jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (nicht gezeigt) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

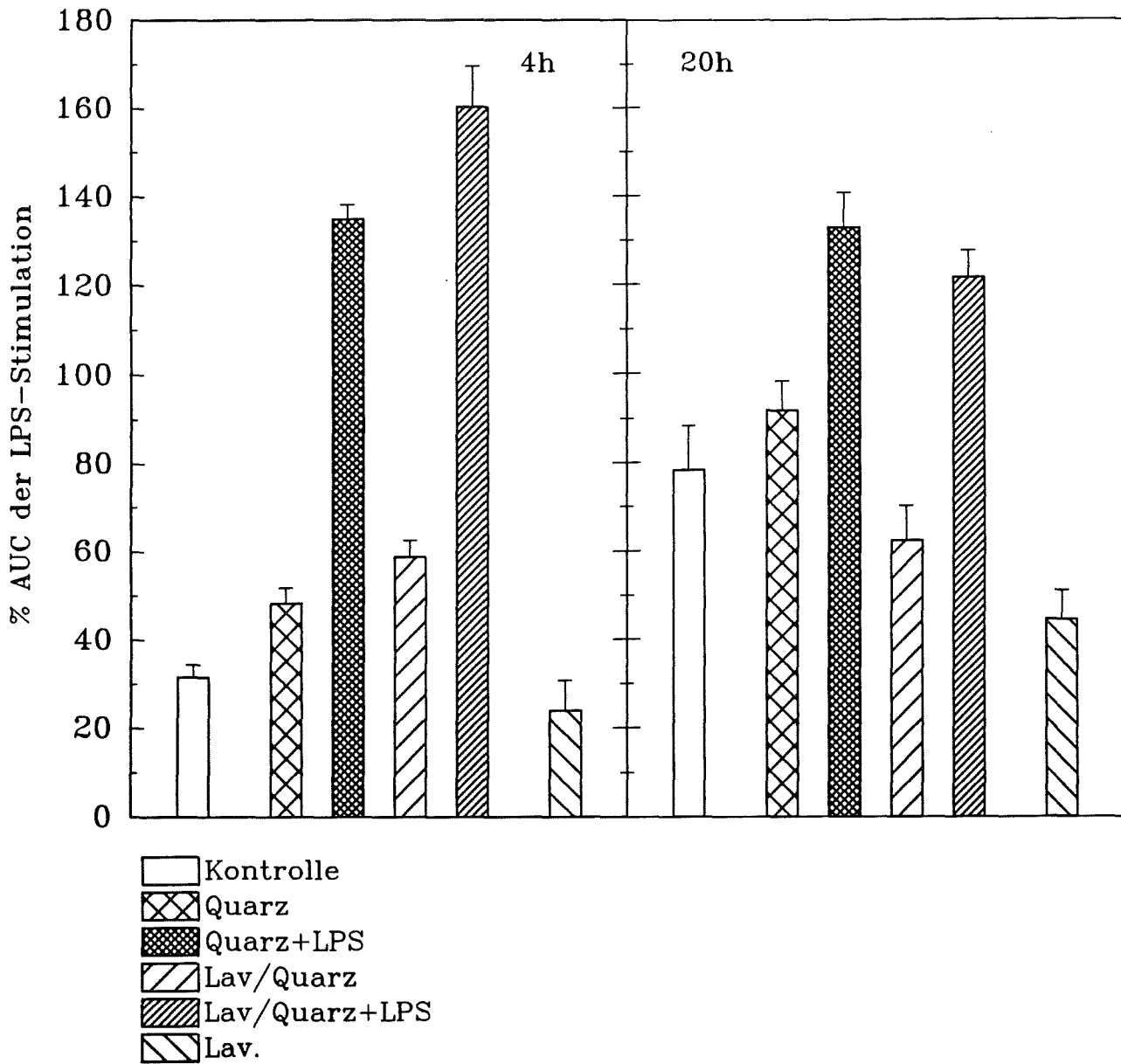


Abb. 42:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 μ g/ml), sowie Quarz (500 μ g/ml) und Quarz (500 μ g/ml) mit Phospholipiden aus der Lavageflüssigkeit (Lav) jeweils allein und in Kombination mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (nicht gezeigt) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

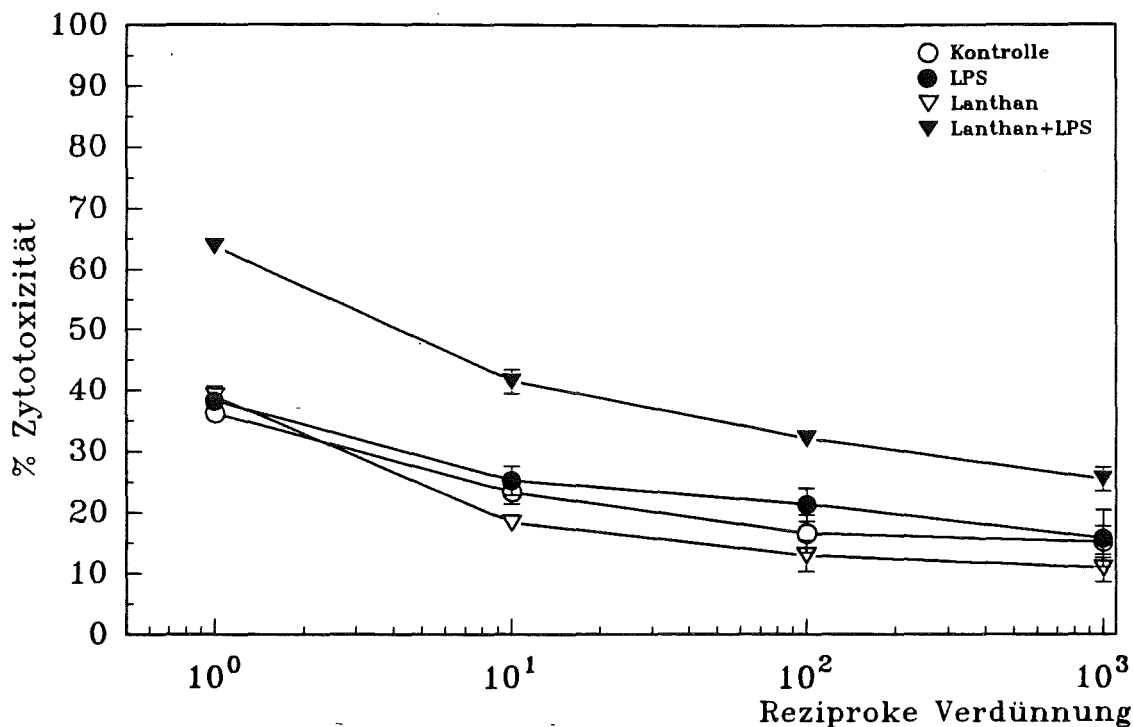


Abb. 43a:
 Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Lanthan (100 µM) und Lanthan plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

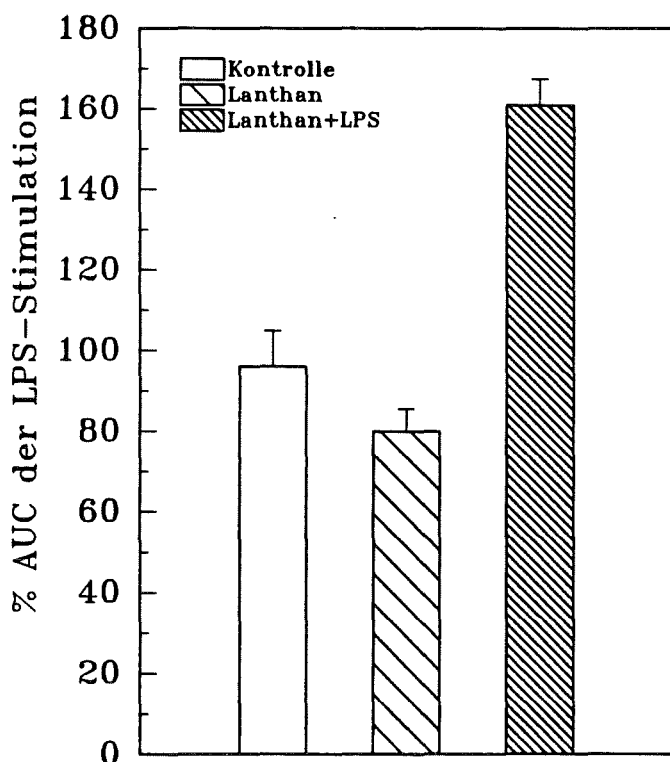


Abb. 43b:
 Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Lanthan (100 µM) und Lanthan plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 43a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

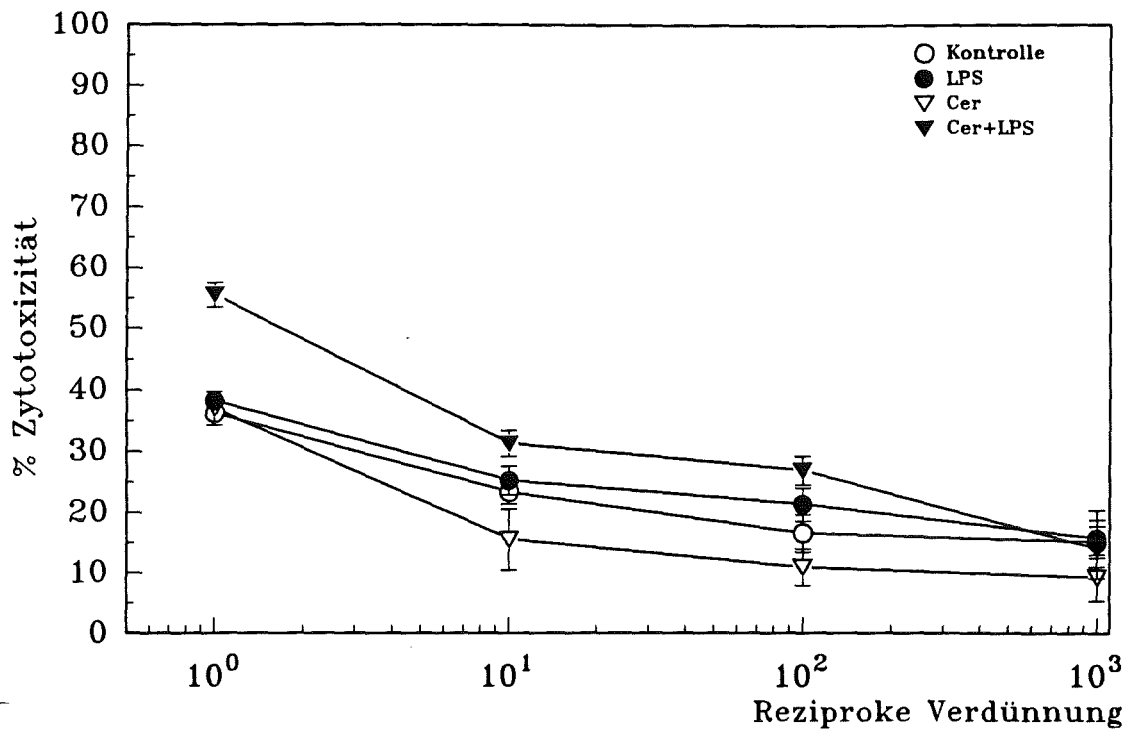


Abb. 44a:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Cer (100 µM) und Cer plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

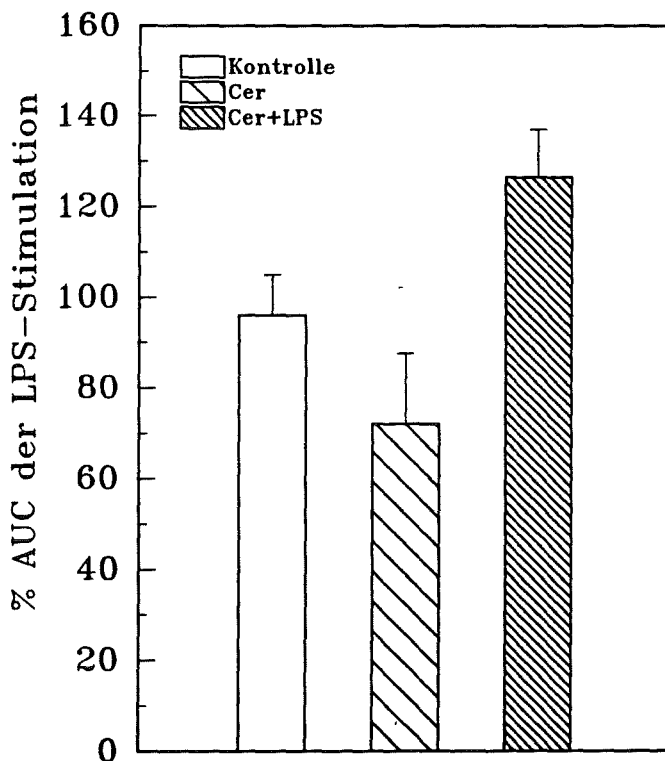


Abb.44b:

Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Cer (100 µM) und Cer plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte RAM) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 44a) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

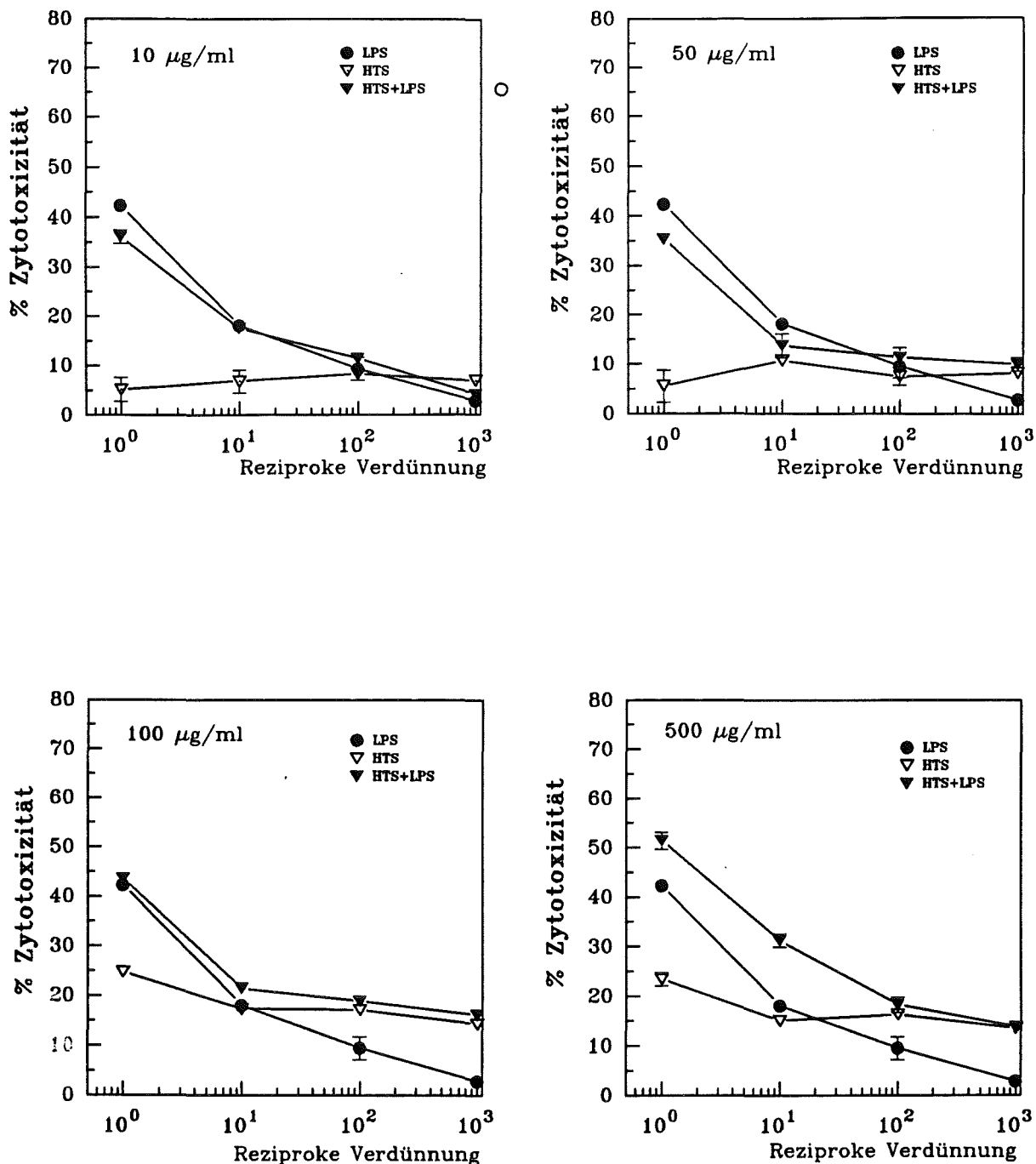


Abb. 45:

Freisetzung von TNF aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS (10 µg/ml) sowie dem HTS $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ und dem HTS $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ plus LPS in den angegebenen Konzentrationen; (unstimulierte Kontroll-RAM zeigten keine TNF-Freisetzung); Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

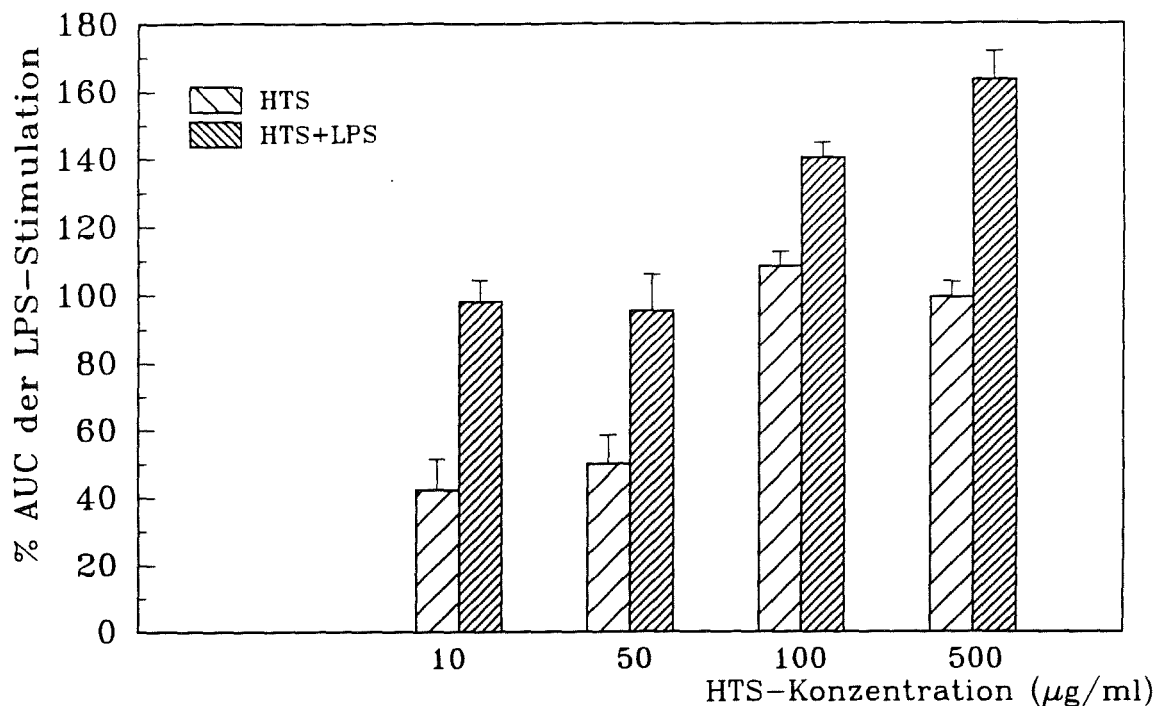


Abb. 46:
Darstellung der TNF-Freisetzung aus RAM nach 4h-Inkubation mit LPS ($10\mu\text{g/ml}$) sowie dem HTS $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ und dem HTS $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (unstimulierte Kontroll-RAM zeigten keine TNF-Freisetzung) als "AREA UNDER THE CURVE" (AUC) mit Standardfehlern. Die AUC-Werte entsprechen den Flächen unter den jeweiligen Zytotoxizitätskurven (s. Abb. 45) und wurden als Prozentwerte des AUC-Wertes der LPS-Stimulation (100%) dargestellt.

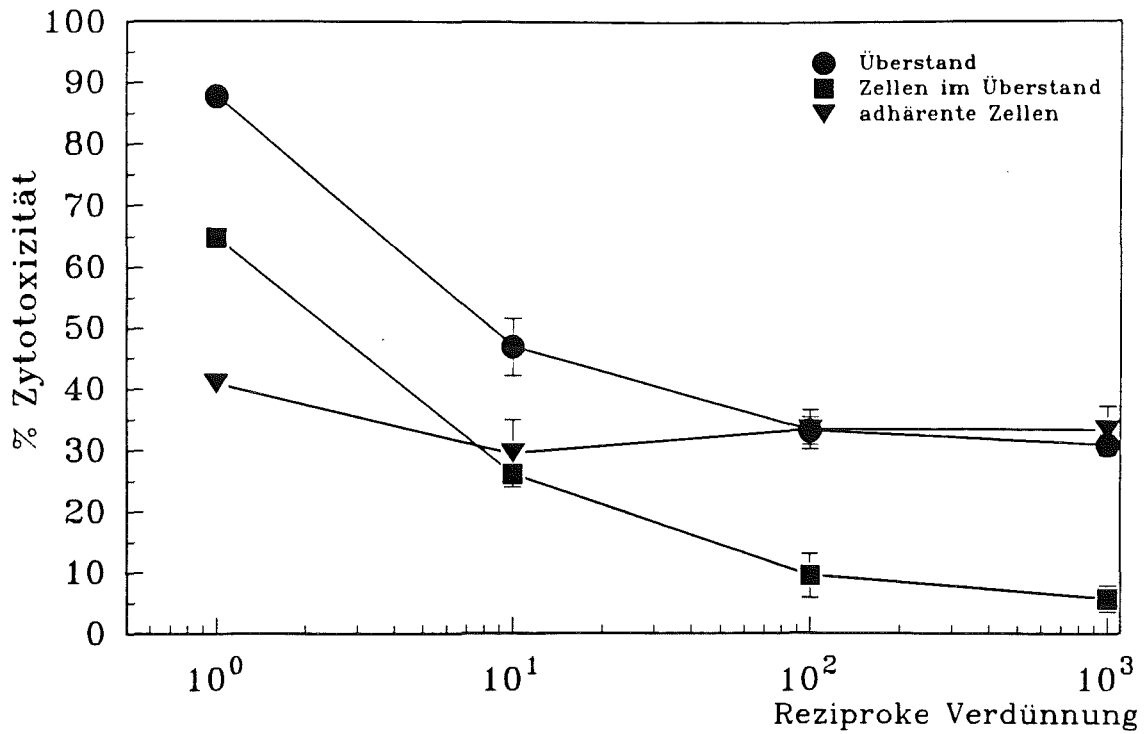


Abb. 47a:

Freisetzung von TNF aus **TPA-differenzierten HL-60-Zellen**. Die HL-60-Zellen wurden 48h mit dem Tumorpromotor TPA differenziert (s.2.8.2.1.); im TNF-Bioassay wurden der zellfreie Kulturüberstand sowie die Zellhomogenate der Zellen im Kulturüberstand und die Zellhomogenate der adhärennten Zellen untersucht. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände und Zellhomogenate im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=8); Einzelversuch

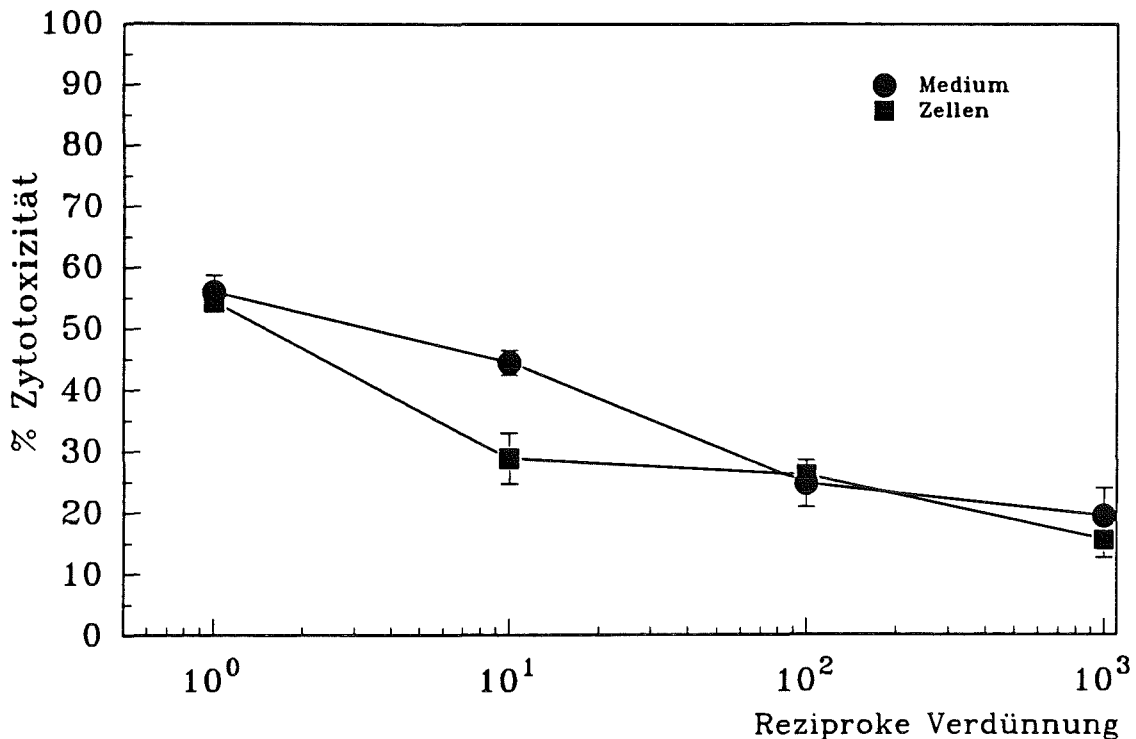


Abb. 47b:

Freisetzung von TNF aus **promyelozytären HL-60-Zellen**. Die HL-60-Zellen wurden in Suspension 48h in Standardmedium inkubiert (s.2.8.2.1.); im TNF-Bioassay wurden das Standardmedium der Suspensionskultur und die Zellhomogenate der HL-60-Zellen untersucht. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) des Standardmediums und der Zellhomogenate im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

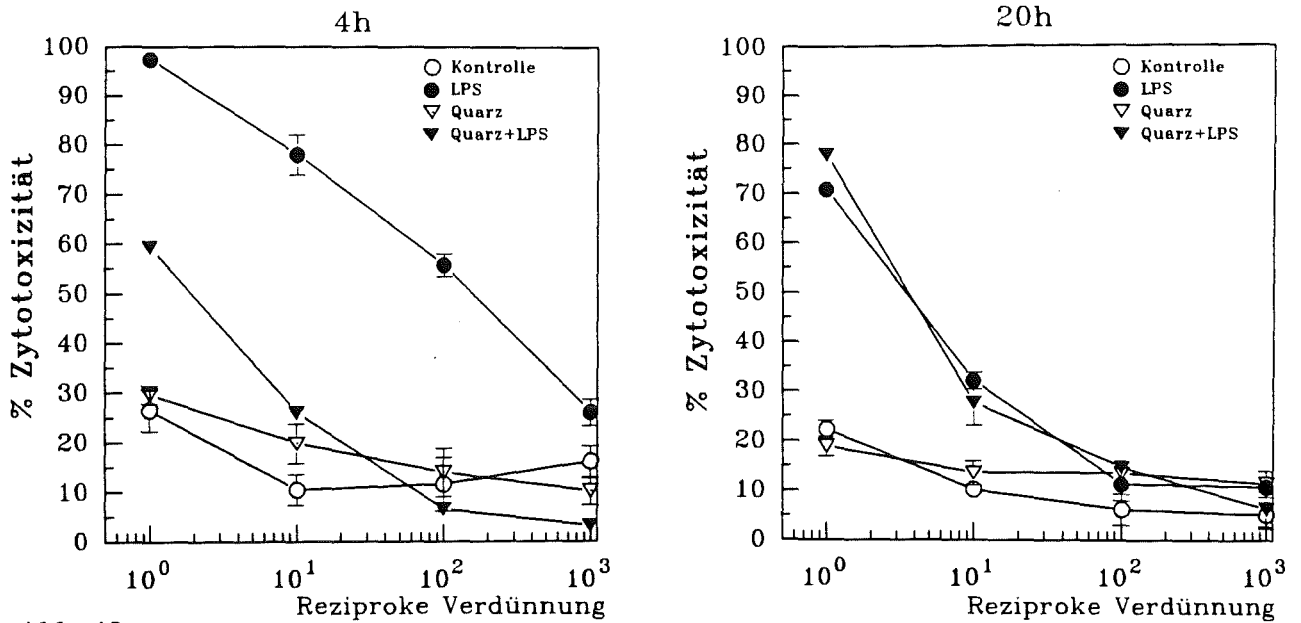


Abb. 48:

Freisetzung von TNF aus TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (50 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

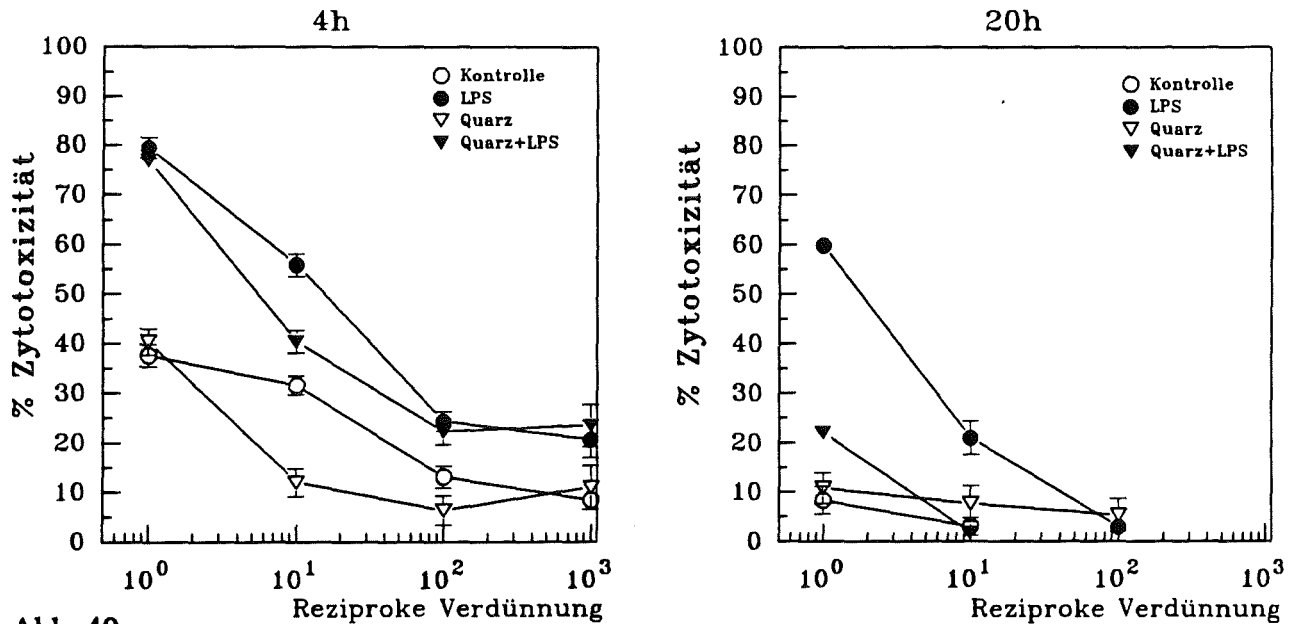


Abb. 49:

TNF-Gehalt von TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (50 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Zellhomogenate TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

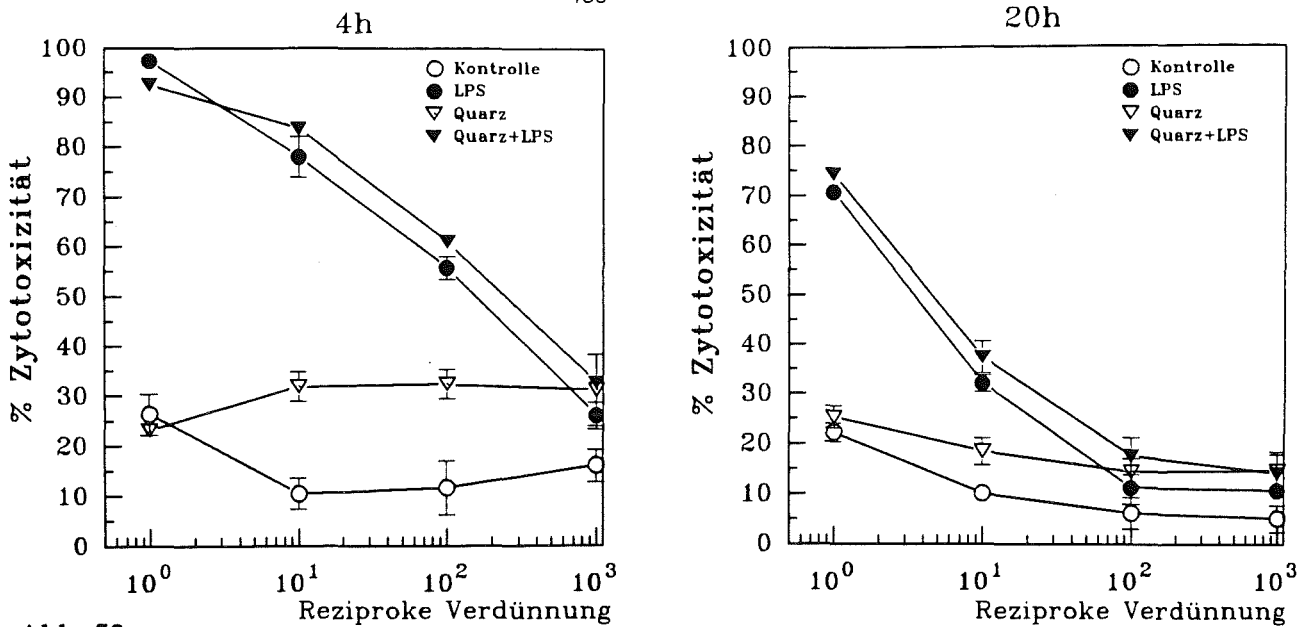


Abb. 50:

Freisetzung von TNF aus TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (250 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

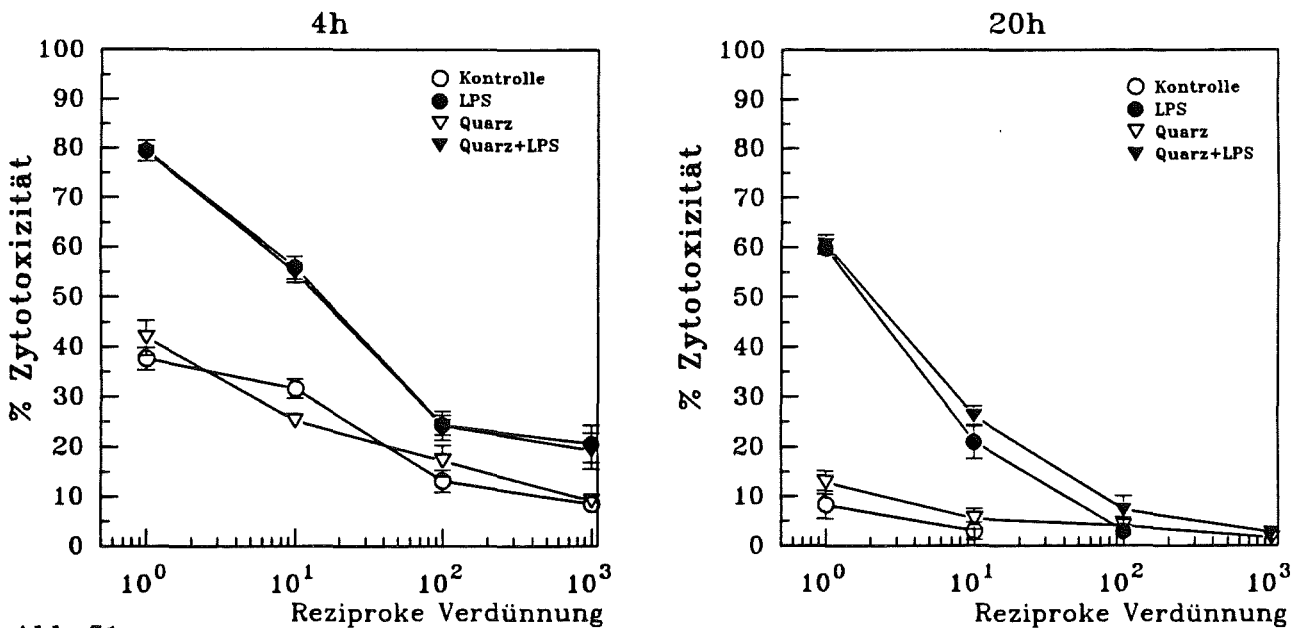


Abb. 51:

TNF-Gehalt von TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (250 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Zellhomogenate im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

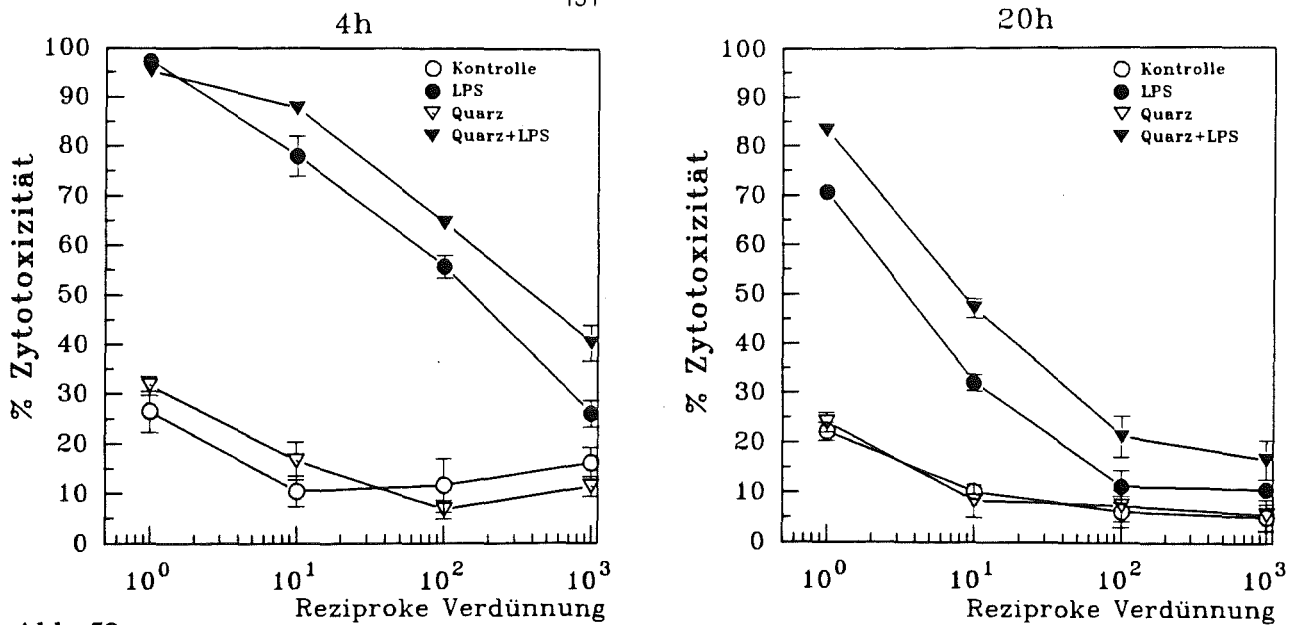


Abb. 52:

Freisetzung von TNF aus TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (500 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

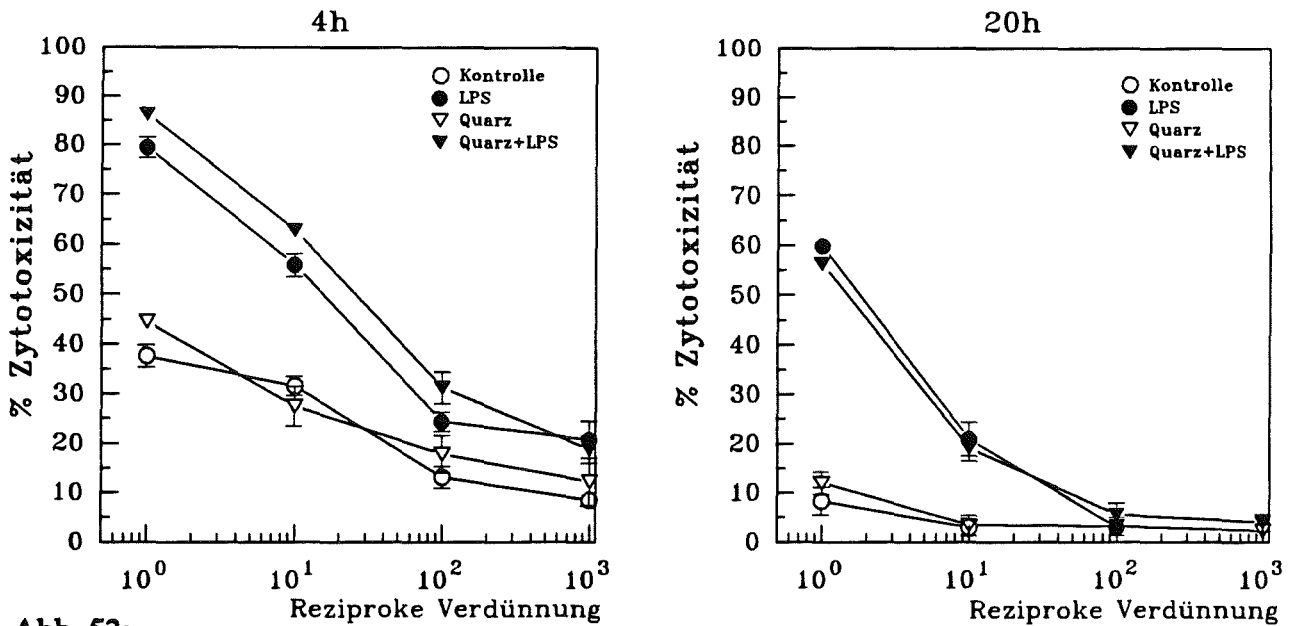


Abb. 53:

TNF-Gehalt von TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Quarz (500 µg/ml) und Quarz plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Zellhomogenate im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

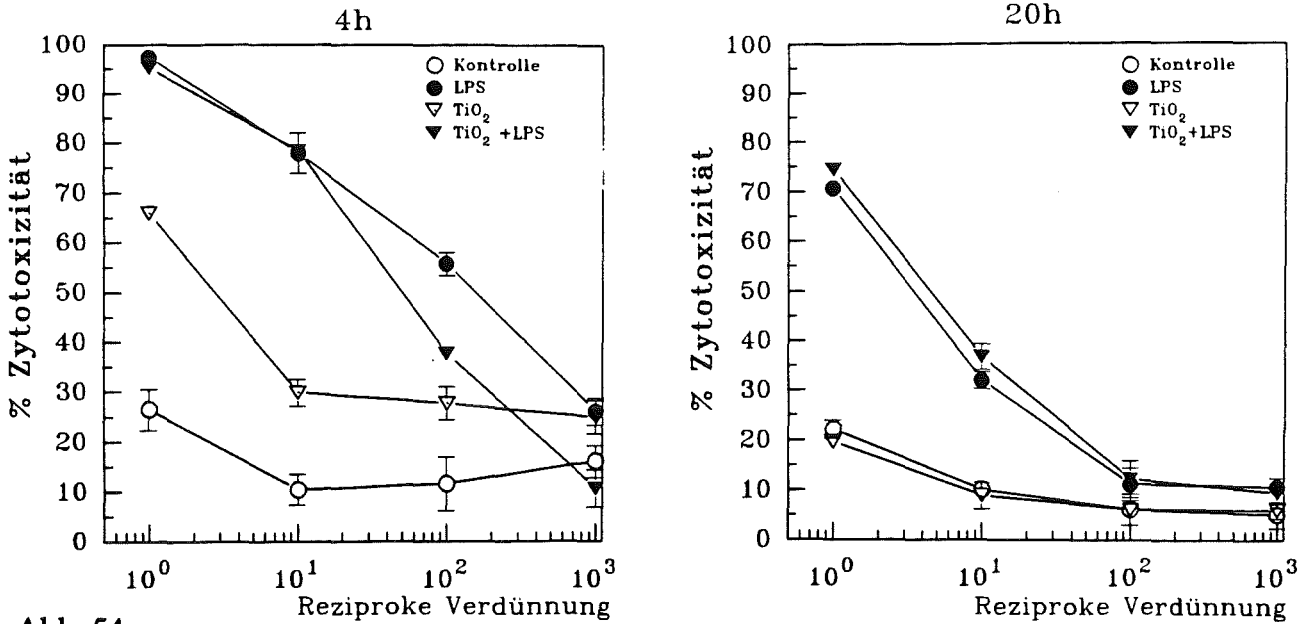


Abb. 54:

Freisetzung von TNF aus TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), TiO₂ (100 µg/ml) und TiO₂ plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhären Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

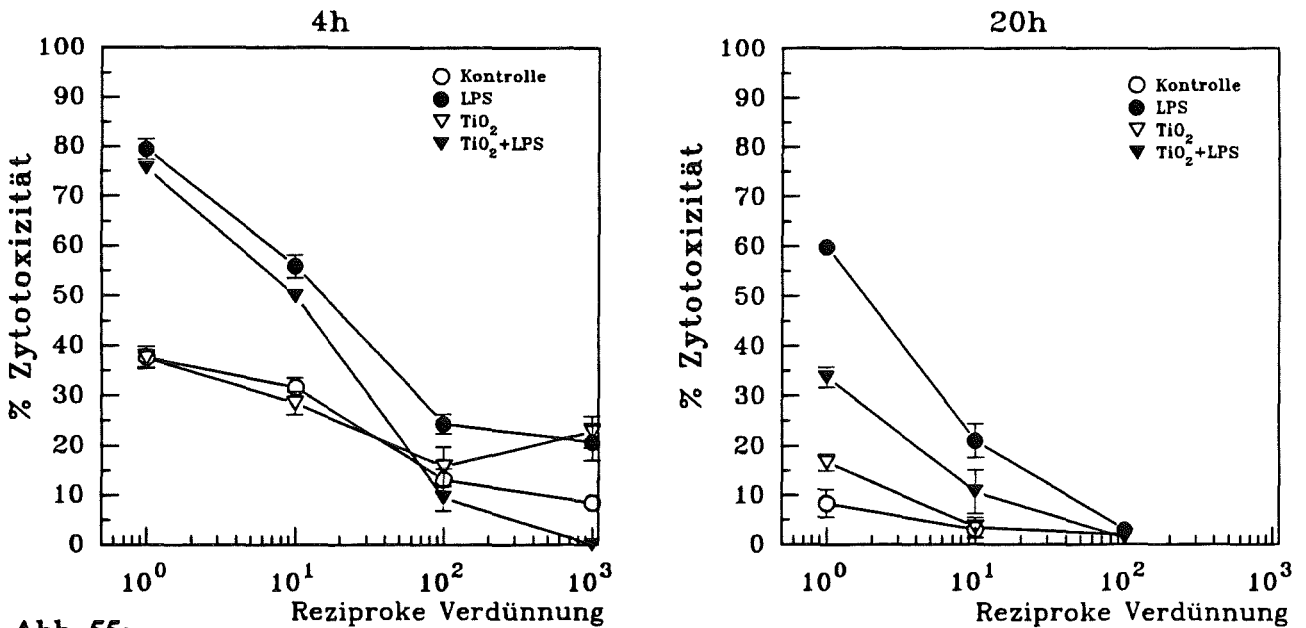


Abb. 55:

TNF-Gehalt von TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), TiO₂ (100 µg/ml) und TiO₂ plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhären Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Zellhomogenate im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

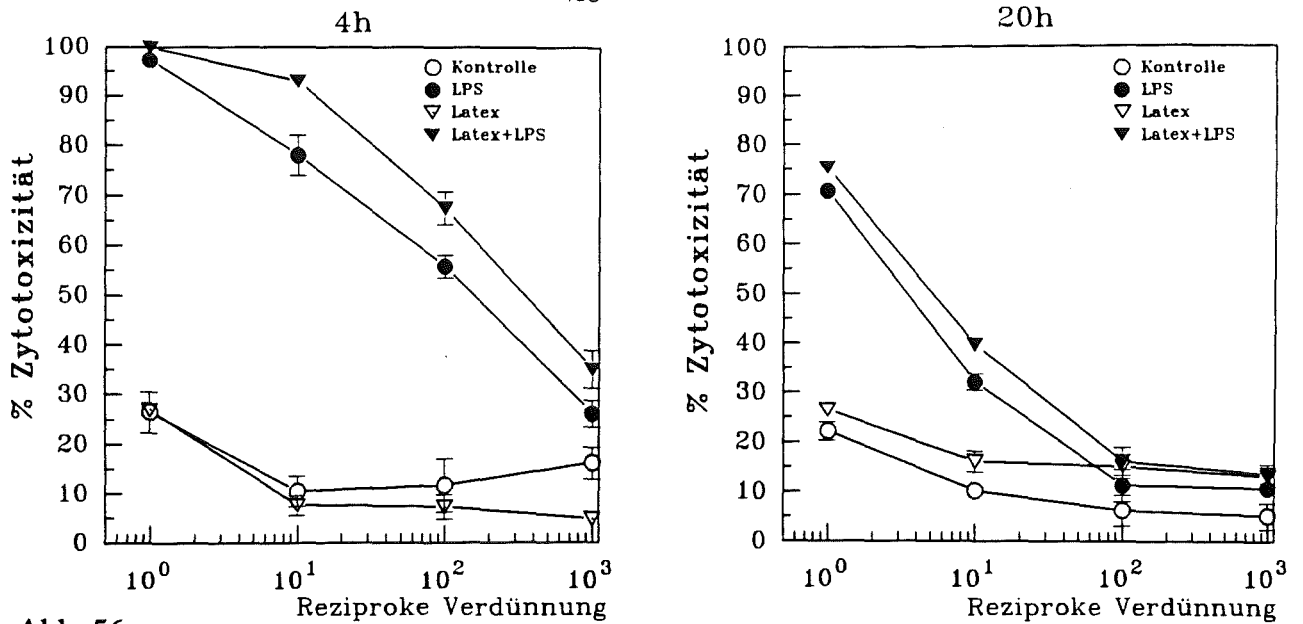


Abb. 56:

Freisetzung von TNF aus TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Latex (200 µg/ml) und Latex plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Kulturüberstände im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch

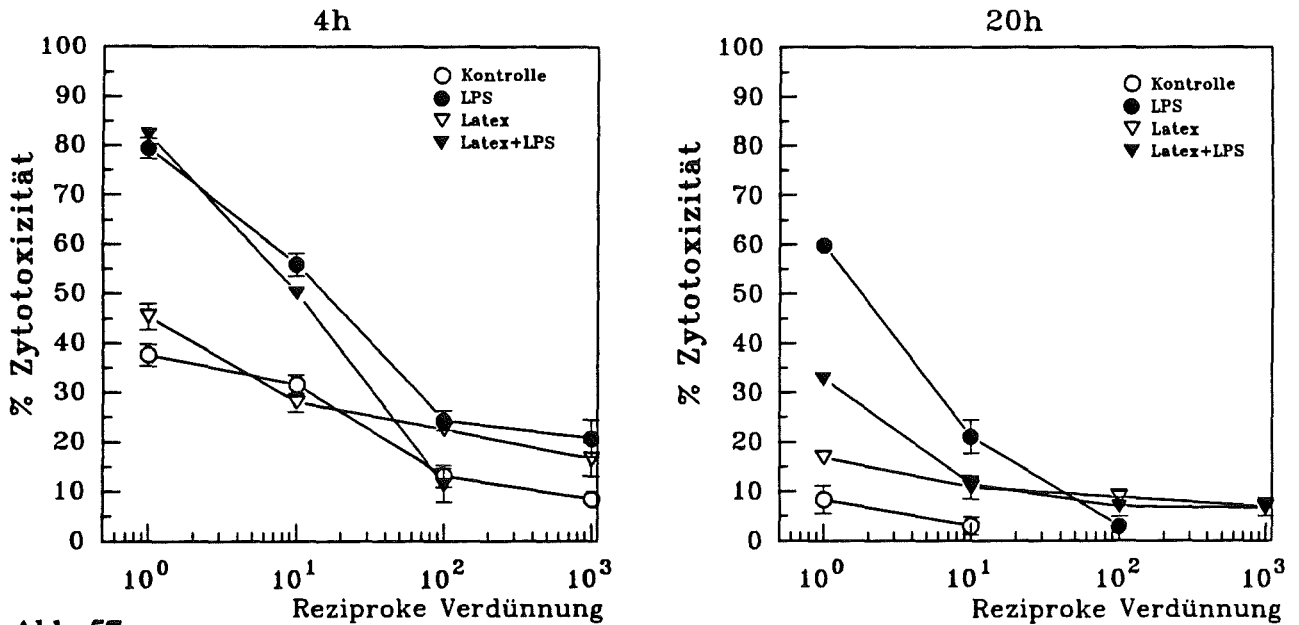


Abb. 57:

TNF-Gehalt von TPA-differenzierten HL-60-Zellen nach 4h und 20h Inkubation mit LPS (10 µg/ml), Latex (200 µg/ml) und Latex plus LPS in den angegebenen Konzentrationen (Kontrolle=unstimulierte HL-60-Zellen). Nach einer Differenzierungsdauer von 48h mit TPA wurden die Kulturüberstände über den adhärennten Zellen abgenommen und durch das Standardmedium ersetzt (s.2.8.2.2.). Anschließend erfolgte die Stimulierung der Zellen mit LPS und den Staubsuspensionen. Verlauf der Zytotoxizitätskurven (jeweils 4 Verdünnungsstufen) der Zellhomogenate im TNF-Bioassay; Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n=4); Einzelversuch