

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6150

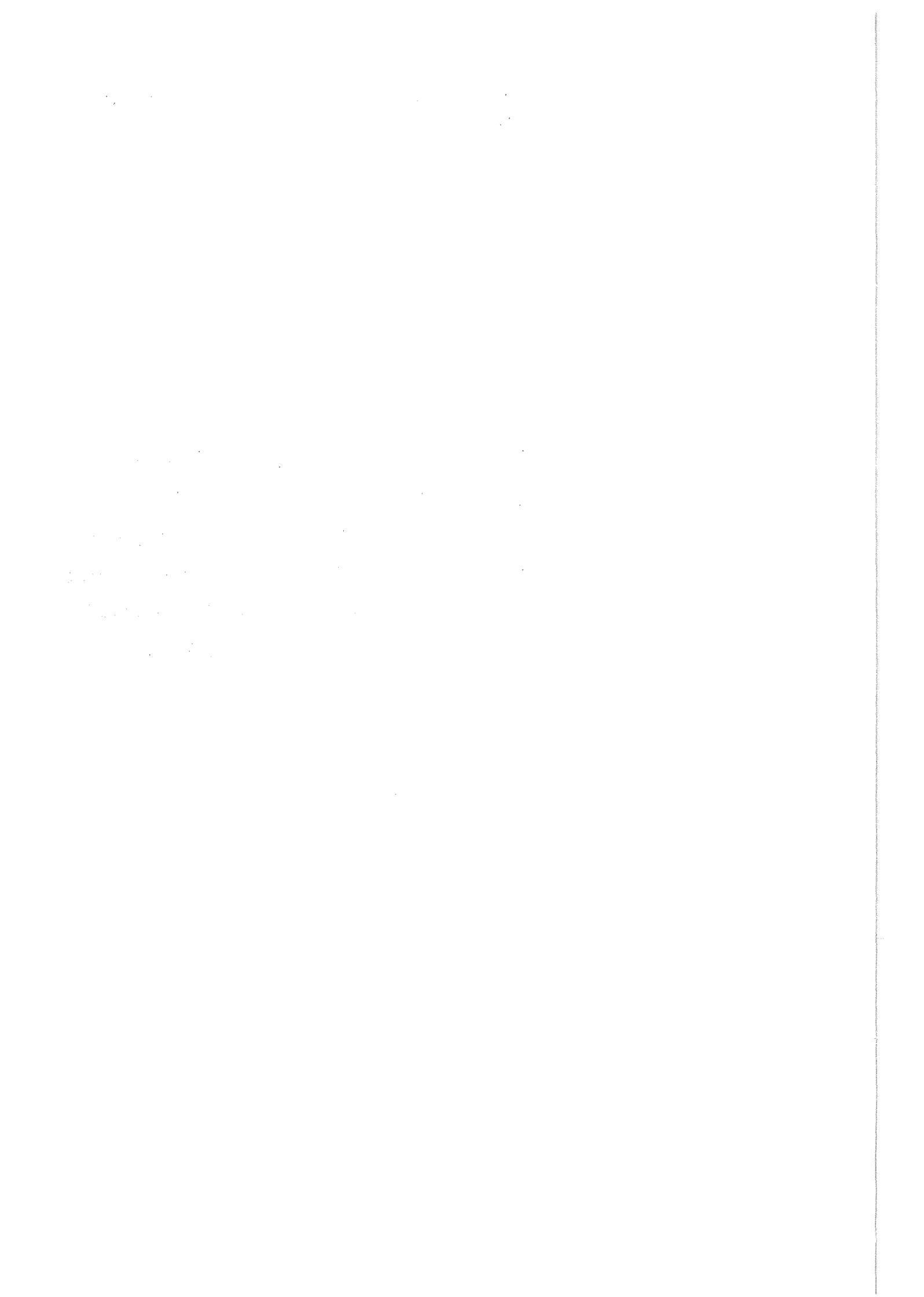
**Partikel- und ozoninduzierte  
Entzündungsreaktionen  
in der Lunge: Wechselwir-  
kungen und Reaktionen von  
Bronchialepithelzellen und  
Endothelzellen *in vitro***

**M. Mögel**

Institut für Toxikologie

Juli 1998

---



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6150

Partikel- und ozoninduzierte  
Entzündungsreaktionen in der Lunge:  
Wechselwirkungen und Reaktionen von  
Bronchialepithelzellen und Endothelzellen *in vitro*

Marion Mögel

Institut für Toxikologie

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften  
der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1998

**Als Manuskript gedruckt**  
**Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**  
**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH**  
**Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**  
**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft**  
**Deutscher Forschungszentren (HGF)**  
**ISSN 0947-8620**

---

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Ozon und Quarzstaub (DQ12) bzw. atmosphärischen Schwebstaubextrakten (GEX) auf die Freisetzung der Entzündungsmediatoren Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) sowie auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) anhand einer humanen Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B) untersucht. Eine 90-minütige Exposition der Zellen mit 0,15 ppm Ozon bewirkte eine erhöhte IL-6- und IL-8-Freisetzung sowie eine verstärkte ICAM-1-Expression. Während Inkubationen mit Schwebstaubextrakten (GEX) nur Einfluß auf die ICAM-1-Expression der Zellen nahmen, bewirkte die Behandlung mit Quarzstaub eine zeit- und dosisabhängige Bildung der untersuchten Entzündungsparameter.

Von weiterem Interesse war die Frage nach immunmodulierenden Wirkungen der Ozonexposition im Hinblick auf eine vorangegangene oder sich anschließende Stimulierung der Zellen mit den Standardstimuli Lipopolysaccharid (LPS) und Zymosan sowie den Zytokinen Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Es zeigte sich für alle Stimuli ein immunsuppressiver Effekt des Ozons im Sinne einer verminderten Bildung der Entzündungsparameter IL-6, IL-8 und ICAM-1.

Außerdem wurde der Einfluß einer kombinierten Exposition der Zellen mit Ozon und Quarzstaub bzw. Ozon und Schwebstaubextrakten überprüft. Ozonbehandelte BEAS-2B reagierten auf eine nachfolgende Aktivierung mit Quarzstaub eher mit einer verminderten Bildung der untersuchten Entzündungsmarker verglichen mit luftbehandelten Kontrollen. Dagegen konnten für Expositionen mit Schwebstaubextrakten keine derartigen Effekte beobachtet werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde ein Kokultursystem aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304) entwickelt, in dem eine Gasexposition der Epithelzellen und somit die Untersuchung inhalationstoxikologischer Fragestellungen unter Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen Epithelzellen und Endothelzellen möglich war.

Anschließend erfolgte die Überprüfung der Anwendbarkeit des Systems anhand der schon für BEAS-2B durchgeführten Versuche. Eine Ozonbegasung des Systems für 90 min mit 0,15 ppm führte zu einer erhöhten Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-8. Dabei überstieg die Menge an freigesetztem Zytokin in der Kokultur die Summe der von den einzeln kultivierten, sonst aber gleich behandelten Zellarten freigesetzten Zytokinmengen. Außerdem zeigten ECV304, die mit BEAS-2B kokultiviert worden waren, eine höhere ICAM-1-Expression als die entsprechenden einzeln kultivierten Zellen. Dies wies auf Wechselwirkungen zwischen den beiden Zelltypen hin.

---

Bei einer kombinierten Exposition des Kokultursystems mit Ozon und Quarzstaub bzw. Ozon und Schwebstaubextrakten bewirkte die Ozonbehandlung wiederum einen Trend zu einer verminderten Bildung der Entzündungsmarker, was im Sinne einer immunsuppressiven Eigenschaft des Ozons gedeutet wurde.

In einem letzten Abschnitt wurden die genotoxischen Eigenschaften von Ozon anhand der Bildung von Schwesterchromatidaustauschen bei BEAS-2B überprüft. Bei den vorliegenden Expositionsbedingungen konnte eine geringfügige Erhöhung der Chromatidaustauschrate nach Ozonexposition gefunden werden.

Insgesamt ist zu bemerken, daß die in dieser Arbeit verwendeten niedrigen Ozonkonzentrationen nur selten zu signifikanten Effekten führten. Die Bedeutung dieser Arbeit konnte somit lediglich in dem Aufzeigen von Trends bezüglich des Verhaltens der Zellen liegen.

---

## Abstract

In the present work the influence of ozone, quartz dust (DQ12) and global extracts of atmospheric dust (GEX) on the release of the inflammatory mediators interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) as well as the expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was investigated by use of a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B). Exposure of the cells with 0.15 ppm ozone for 90 minutes resulted in an elevated IL-6- and IL-8-release and an increased expression of ICAM-1. On the other hand, incubations with extracts of atmospheric dust (GEX) only affected the ICAM-1-expression of the cells. The treatment with quartz dust, however, induced a time- and dose-dependent formation of the investigated markers of inflammation.

Further investigations dealt with possible immunomodulating effects of ozone determined after a preceding or a subsequent stimulation of the cells with the standard stimuli lipopolysaccharide (LPS) and zymosan or the cytokines tumor-necrosis-factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ . For all those stimuli an immunosuppressive effect of ozone, manifested in decreased amounts of IL-6, IL-8 and ICAM-1, could be demonstrated.

Additionally, the influence of a combined exposure of cells with ozone and quartz dust or ozone and GEX has been investigated. Ozone-treated BEAS-2B cells showed a diminished formation of all investigated markers of inflammation, when treated subsequently with quartz dust, compared with the air-treated control cells. Concerning successive incubations with GEX these effects could not be observed.

In the second part of this work a coculture-system of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and endothelial cells (ECV304) has been established. The new culture-system offers the possibility by gas exposure of the epithelial cells to answer questions within the field of inhalation toxicology with respect to possible interactions between different cell types, e.g. epithelial and endothelial cells.

The practicability of the new culture-system was examined applying the experimental design of the former monoculture-system BEAS-2B to the coculture-system. Ozone exposure of the coculture-system with 0.15 ppm for 90 minutes resulted in an elevated release of the mediators IL-6 and IL-8. The amounts released by the cells within the coculture-system exceeded the sum of the amounts produced by each of the cell types when exposed separately. Furthermore ECV304 which had been cocultured with BEAS-2B showed a higher expression of ICAM-1 compared with the isolated cultured cells. This could be a hint for interactions between the two cell types.

---

In experiments with a combined exposure of the coculture-system with ozone and quartz dust or ozone and GEX the ozone-treatment also led to a decreased formation of the inflammatory mediators which could be interpreted as an immunosuppressive effect of ozone.

In the last part of this work the genotoxic effect of ozone on BEAS-2B has been investigated by examining the formation of sister chromatid exchanges. Underlying the present exposure conditions only a small elevation of the sister chromatid exchange rate could be found after treatment with ozone.

Generally it should be mentioned that the ozone concentrations used in this work rarely led to significant effects. Thus this work only documents trends concerning the reaction of cells after low-level ozone exposure: quiescent cells were stimulated to enhanced production of inflammatory mediators, and in preactivated cells this production was moderately reduced, indicating an immunosuppressive effect.

## Abkürzungsverzeichnis

A549	Humane Alveolarepithelzelllinie
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)]diammoniumsalz
AK	Antikörper
B[a]P	Benzo[a]pyren
BEAS-2B	Humane Bronchialepithelzelllinie
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CAM	Zelluläres Adhäsionsmolekül
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DQ12	Dörentruper Quarzkristallmehl der Mahlung Nr. 12
ECV304	Humane Nabelschnurendothelzelllinie
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EPA	US-Umweltbehörde ( <i>Environmental Protection Agency</i> )
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GEX	Globalextrakt aus atmosphärischen Schwebstäuben
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
H292	Humane Lungenepithelzelllinie
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung ( <i>HEPES buffered saline</i> )
HBSS	Gepufferte Salzlösung ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )
HEPES	N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HUVEC	Humane Nabelschnurendothelzellen ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (CD54)
IL	Interleukin
KGM	Keratinozyten-Wachstumsmedium ( <i>keratinocyte growth medium</i> )
LFA-1	Leukozyten-Funktionsantigen-1 (CD11a/CD18)
LfU	Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
M199	Medium 199
Mac-1	Leukozyten-Integrin (CD11b/CD18)
MIP-2	Makrophagen-inflammatorisches Protein-2
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
O	Atomarer Sauerstoff
O <sub>2</sub>	Molekularer Sauerstoff
O <sub>3</sub>	Ozon
OD	Optische Dichte
PAC	Partikel-assoziierte Kanzerogene
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe ( <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i> )

---

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PET	PVP- und EGTA-haltige Trypsinlösung
PG	Prostaglandin
PM	Partikel ( <i>particulate matter</i> )
PMA	Phorbol-myristat-acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PMT	Photomultiplier Tube
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RPMI	Kulturmedium, entwickelt im Roswell Park Memorial Institute, USA
SBIT	Trypsin-Inhibitor ( <i>soy bean trypsin inhibitor</i> )
SCE	Schwesterchromatidaustausch ( <i>sister chromatide exchange</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
sICAM-1	lösliches ICAM-1 ( <i>soluble ICAM-1</i> )
SiO <sub>2</sub>	Siliciumdioxid
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Thromboxan
VOC	Flüchtige organische Kohlenwasserstoffe ( <i>volatile organic carbons</i> )

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Zellmaterial und Zellkultur.....</b>	<b>9</b>
2.1.1	Puffer und Lösungen .....	9
2.1.2	Bronchialepithelzellen: BEAS-2B.....	10
2.1.2.1	Lösungen und Medien für die Kultur der BEAS-2B-Zellen.....	11
2.1.2.2	Kultur der BEAS-2B-Zellen.....	11
2.1.3	Endothelzellen: ECV304 .....	13
2.1.3.1	Lösungen, Medien und Puffer für die Kultur der ECV304-Zellen.....	13
2.1.3.2	Kultur der ECV304-Zellen.....	14
<b>2.2</b>	<b>Versuche mit BEAS-2B.....</b>	<b>15</b>
2.2.1	Stimulierungsversuche.....	15
2.2.1.1	Verwendete Reagenzien für die Stimulierungsversuche .....	15
2.2.1.2	Durchführung der Stimulierungsversuche.....	16
2.2.1.3	Gewinnung der Schwebstaubextrakte .....	18
2.2.1.4	Gewinnung der Überstände DQ12-stimulierter menschlicher Makrophagen.....	19
2.2.2	Begasungsexperimente .....	19
2.2.2.1	Exposition der Zellen .....	19
2.2.2.2	Aufbau des Expositionssystems .....	21
2.2.3	Versuche zur Kombinationswirkung von Ozon und verschiedenen Stimuli .....	23
2.2.3.1	Stimulierung der Zellen mit anschließender Begasung .....	23
2.2.3.2	Begasung der Zellen mit anschließender Stimulierung .....	24
<b>2.3</b>	<b>Kokulturversuche.....</b>	<b>24</b>
2.3.1	Begasungsexperimente .....	24
2.3.2	Kokulturversuche unter Verwendung von Antikörpern.....	25
2.3.3	Versuche zur Kombinationswirkung von Ozon und verschiedenen Stimuli im Kokultursystem.....	26
2.3.3.1	Stimulierung der Zellen mit anschließender Begasung .....	26
2.3.3.2	Begasung der Zellen mit anschließender Stimulierung .....	26
<b>2.4</b>	<b>Aufnahme von Wachstumskurven mit ECV304.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Untersuchungen zur Zytokinfreisetzung mittels ELISA .....</b>	<b>28</b>
2.5.1	Allgemeines Prinzip .....	28
2.5.2	Verwendete Materialien und Reagenzien .....	28
2.5.3	Durchführung des Interleukin-6- bzw. Interleukin-8-ELISA .....	29
2.5.4	Durchführung des TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -ELISA.....	30
<b>2.6</b>	<b>Untersuchungen zur ICAM-1-Expression.....</b>	<b>30</b>
2.6.1	Durchflußzytometrische Bestimmung von ICAM-1.....	30
2.6.1.1	Allgemeines Prinzip .....	30
2.6.1.2	Verwendete Reagenzien .....	31
2.6.1.3	Anti-ICAM-1-Färbeprozedur .....	31
2.6.1.4	Auswertung der durchflußzytometrischen Messung .....	32
2.6.2	Messung der ICAM-1-Expression im ELISA.....	35
2.6.2.1	Allgemeines Prinzip .....	35
2.6.2.2	Verwendete Reagenzien .....	35
2.6.2.3	Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA.....	36
2.6.3	Immunhistochemische Anti-ICAM-1-Färbung.....	36
2.6.3.1	Verwendete Reagenzien.....	36
2.6.3.2	Durchführung der immunhistochemischen Anti-ICAM-1-Färbung.....	37

<b>2.7</b>	<b>Morphologische und biochemische Untersuchungen</b> .....	<b>37</b>
2.7.1	Lichtmikroskopie.....	37
2.7.1.1	Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl .....	37
2.7.1.2	Hämatoxyllin-Eosin-Färbung.....	38
2.7.1.3	Morphologie quarzstaub-beladener BEAS-2B.....	38
2.7.1.4	Morphologie der ECV304 in verschiedenen Medien .....	39
2.7.2	Rasterelektronenmikroskopie .....	39
2.7.2.1	Allgemeines Prinzip .....	39
2.7.2.2	Verwendete Reagenzien .....	39
2.7.2.3	Morphologie der ECV304 in verschiedenen Medien .....	40
<b>2.8</b>	<b>Untersuchung von Schwesterchromatidaustauschen</b> .....	<b>41</b>
2.8.1	Metaphasenpräparation der BEAS-2B.....	41
2.8.2	Differentialfärbung der Chromatiden .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
2.8.3	Auszählung der Schwesterchromatidaustausche .....	42
<b>2.9</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>42</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Wirkungen von Luftschadstoffen (Ozon, Stäube) auf die Bildung von Entzündungsparametern bei Bronchialepithelzellen (BEAS-2B)</b> .....	<b>43</b>
3.1.1	Beeinflussung der Bildung von Entzündungsparametern bei BEAS-2B durch Ozon .....	43
3.1.2	Beeinflussung der Immunantwort von BEAS-2B auf verschiedene Stimuli durch Ozon.....	45
3.1.2.1	Stimulierung mit TNF- $\alpha$ .....	46
3.1.2.2	Stimulierung mit Zymosan.....	57
3.1.2.3	Stimulierung mit LPS.....	70
3.1.2.4	Stimulierung mit IL-1 $\beta$ .....	77
3.1.3	Einfluß von Stäuben und Staubextrakten.....	81
3.1.3.1	Beeinflussung der Bildung von Entzündungsparametern bei BEAS-2B durch Quarzstaub (DQ12) .....	81
3.1.3.2	Beeinflussung der Bildung von Entzündungsparametern bei BEAS-2B durch Stimulierung mit Überständen DQ12-exponierter Makrophagen .....	87
3.1.3.3	Beeinflussung der Bildung von Entzündungsparametern bei BEAS-2B durch Schwebstaubextrakte .....	88
3.1.4	Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Stäuben bzw. Staubextrakten und Ozon.....	91
3.1.4.1	Kombinationswirkung Quarzstaub (DQ12) und Ozon .....	91
3.1.4.2	Kombinationswirkung Schwebstaubextrakte und Ozon.....	94
<b>3.2</b>	<b>Entwicklung eines Kokultursystems aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304)</b> .....	<b>96</b>
3.2.1	Aufnahme von Wachstumskurven der ECV304 in verschiedenen Medien .....	96
3.2.2	Prüfung auf morphologische Veränderungen der ECV304 in verschiedenen Medien .....	98
3.2.3	Versuche zur Diffusion von Transmittern durch das Membransystem.....	104
<b>3.3</b>	<b>Wirkungen von Luftschadstoffen (Ozon, Stäube) auf die Bildung von Entzündungsparametern bei einem Kokultursystem aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304)</b> .....	<b>105</b>
3.3.1	Beeinflussung der Bildung von Entzündungsmediatoren durch Ozon .....	105
3.3.2	Beeinflussung der Immunantwort auf verschiedene Stimuli durch Ozon.....	110
3.3.2.1	Stimulierung mit TNF- $\alpha$ .....	111
3.3.2.2	Stimulierung mit Zymosan nach Luft- bzw. Ozonbegasung .....	115
3.3.3	Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Stäuben bzw. Staubextrakten und Ozon.....	117
3.3.3.1	Stimulierung mit Quarzstaub (DQ12) nach Luft- bzw. Ozonbegasung .....	117
3.3.3.2	Begasung mit Luft bzw. Ozon nach Vorstimulierung der BEAS-2B mit Schwebstaubextrakten.....	121
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zur Genotoxizität</b> .....	<b>126</b>

---

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>129</b>
4.1	Ozon und Entzündung in der Lunge .....	129
4.2	Immunmodulierende Eigenschaften von Ozon.....	133
4.3	Stäube und Entzündung in der Lunge.....	136
4.4	Kombinationswirkungen verschiedener Umwelttoxene .....	139
4.5	Geeignete Zellsysteme: Notwendigkeit von komplexeren Systemen .....	142
4.6	Zusammenhang Entzündung – Kanzerogenese.....	144
4.7	Partikel und Kanzerogenese.....	145
4.8	Ozon und Krebs.....	147
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>151</b>

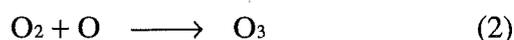
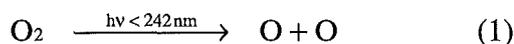
## 1. Einleitung

Der Mensch atmet täglich ca. 15 000 Liter Luft ein. Unter körperlicher Belastung kann sich das aufgenommene Luftvolumen auf bis zu 40 000 Liter erhöhen. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, daß der Qualität der eingeatmeten Luft eine besondere Bedeutung zukommen muß, können doch in der Atemluft enthaltene Schadstoffe, wie toxische Gase oder Partikel, die Gesundheit des Menschen negativ beeinflussen. So stellt die Inhalation einen wichtigen Weg dar, über den die verschiedensten Schadstoffe in den Körper gelangen können. Dabei ist zu beachten, daß die eingeatmeten Noxen nicht nur temporär auf das Zielorgan Lunge wirken, sondern unter Umständen jahrelang im Körper verbleiben können. Dies gilt in besonderem Maße für partikelförmige Luftverunreinigungen. So ist es Aufgabe der inhalationstoxikologischen Forschung, epidemiologische Befunde, Dosis-Wirkungs-Beziehungen und Daten zu möglichen Wirkmechanismen zusammenzutragen, die eine objektive Risikoabschätzung ermöglichen und letztlich auch als Grundlage legislativer Maßnahmen zur Luftreinhaltung seitens der Umweltpolitik dienen können.

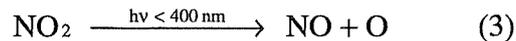
Einen der meistdiskutierten Umweltschadstoffe unserer Zeit stellt zweifelsohne das Ozon dar. Gerade durch die in den Sommermonaten von den Medien verbreiteten Ozonwarnungen wird die Aufmerksamkeit der Bevölkerung vermehrt auf die wachsende Gefahr zunehmender Ozonbelastungen gelenkt. Neben den direkten gesundheitlichen Auswirkungen auf den Menschen stehen die Wirkungen von Ozon im Zusammenhang mit dem Waldsterben oder dem sogenannten Treibhauseffekt schon seit langem im Blickpunkt der Öffentlichkeit. Einen weiteren Risikofaktor in der Atemluft stellen die partikelförmigen Schadstoffe dar. Epidemiologische Studien dokumentieren eine Korrelation zwischen der Morbidität und Mortalität der Menschen und dem Anteil kleiner Partikel in der Luft. Besonders bekannt wurde in diesem Zusammenhang die von Dockery *et al.* (1993) veröffentlichte „Six-cities-study“.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkungen dieser Luftschadstoffe geleistet werden. Dabei standen vor allem mögliche entzündungsfördernde Effekte im Mittelpunkt. Jedoch wurden auch Fragestellungen zur Beurteilung der Genotoxizität, d.h. der Schädigung des Erbgutes, bearbeitet.

Ozon entsteht in der Stratosphäre durch die photolytische Spaltung von Sauerstoffmolekülen zu atomarem Sauerstoff (1), welcher mit molekularem Sauerstoff zu Ozon weiterreagiert (2).



Dieser Vorgang spielt sich hauptsächlich in einer Höhe von 20-30 km ab und ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Ozonschicht, die das Leben auf der Erde vor der schädlichen UV-Strahlung schützt (Ma und Guicherit, 1997). Anders verhält es sich mit der Ozonbildung in bodennahen Schichten der Troposphäre, die fast ausschließlich anthropogen ist. Hier reicht die Strahlungsintensität des Lichtes nicht aus, um Sauerstoffmoleküle zu atomarem Sauerstoff zu spalten. Stattdessen wird der für die Ozonbildung nötige atomare Sauerstoff aus der Photolyse von Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) geliefert (3).



Die bedeutendsten Emittenten für Stickoxide stellen der Kraftfahrzeugverkehr, Kraftwerke sowie andere Benutzer fossiler Brennstoffe dar. Neben  $\text{NO}_2$  spielen jedoch noch bestimmte organische Verbindungen, sogenannte VOCs (*volatile organic carbons*), wie Olefine und Aromaten, eine wesentliche Rolle bei der Ozonentstehung (Finlayson-Pitts und Pitts, 1997). Diese bilden Radikale mit stark oxidierenden Eigenschaften, welche die Oxidation des von den Stickstoffquellen primär emittierten Stickstoffmonoxids ( $\text{NO}$ ) zu dem für die Ozonbildung erforderlichen  $\text{NO}_2$  erheblich beschleunigen. Das Anlaufen der photochemischen Reaktion am Morgen benötigt eine gewisse Zeit, was sich daraus erklärt, daß schon entstandenes Ozon nach der Gleichung (4)



durch  $\text{NO}$  inaktiviert wird. Deshalb findet man in verkehrsreichen Ballungsgebieten in den frühen Morgenstunden, während der sogenannten „Rush hour“, ein Minimum der Ozonkonzentrationen. Die Spitzenkonzentrationen der drei Schadstoffe  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$  und Ozon treten im Verlauf der Vormittagsstunden reaktionsbedingt nacheinander auf: In den frühen Morgenstunden dominiert das frisch emittierte Stickstoffmonoxid, woraus mit zeitlicher Verzögerung das Oxidationsprodukt  $\text{NO}_2$  entsteht. Erst nach Erreichen des  $\text{NO}_2$ -Maximums steigen die Ozonkonzentrationen an und erreichen um die Mittagszeit Höchstwerte, die über mehrere Stunden erhalten bleiben können. Wie bereits erwähnt, benötigt die für die Ozonbildung wichtige Vorläuferreaktion des  $\text{NO}_2$  zu  $\text{NO}$  und atomarem Sauerstoff UV-Strahlung. Daraus ergibt sich, daß die Ozonentstehung stark von der Lichtintensität und damit von der Sonneneinstrahlung abhängt. Entsprechend findet man nennenswert erhöhte Ozonkonzentrationen hauptsächlich in den Sommermonaten.

Betrachtet man die regionale Verteilung der Ozonkonzentrationen, so erstaunt zunächst, daß es gar nicht die Ballungsgebiete sind, in denen die höchsten Werte gemessen werden. Dort findet man hingegen hohe Konzentrationen der Vorläuferverbindungen wie  $\text{NO}$ . Da aber, wie oben dargelegt, erst nach einiger Verzögerung daraus  $\text{NO}_2$  und damit letztendlich Ozon entstehen kann und die Luft ständig in Bewegung ist, konzentrieren sich die höchsten Ozon-

werte auf die Randgebiete der Ballungszentren. Des Weiteren nehmen, auf Deutschland bezogen, die Immissionskonzentrationen von Norden nach Süden hin zu. So können am nördlichen und südlichen Alpenrand, wo sich die mit Oxidantien beladenen Luftmassen stauen, zum Teil außergewöhnlich hohe Ozonkonzentrationen entstehen. Vergleichbares gilt für Talkessel oder breite Flußebenen. Erhöhte Ozonwerte finden sich aber auch in sogenannten Reinluftgebieten bei stabilen Inversionswetterlagen. Dabei werden die oxidantienhaltigen Luftmassen in geringer Höhe über Hunderte von Kilometern transportiert, ohne dabei bezüglich ihres Oxidantiengehaltes verdünnt zu werden. Erst einmal in den Reinluftgebieten angekommen, halten sich die erhöhten Ozonwerte relativ lange stabil, da dort die Konzentrationen ozonzerstörender Vorläuferverbindungen wie NO oder ungesättigter Kohlenwasserstoffe sehr gering sind.

Schwellenwerte der Ozonkonzentrationen sind in der „EU-Richtlinie über Luftverschmutzung durch Ozon“ festgelegt. Danach soll bei Stundenmittelwerten ab  $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (0,09 ppm) eine Information der Bevölkerung, bei Werten ab  $360 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (0,18 ppm) eine Warnung der Bevölkerung erfolgen. Ende Juli 1995 trat in Deutschland das Sommersmog-Gesetz in Kraft, wonach ab Ozonkonzentrationen von  $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (0,12 ppm) nur noch Autos mit geregelterm 3-Wege-Katalysator fahren dürfen. Im August 1997 kletterten die Ozonwerte in Deutschland bei intensiver Sonneneinstrahlung und schwachen Luftbewegungen vielerorts auf Werte über  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Spitzenkonzentrationen konnten mit  $243 \mu\text{g}/\text{m}^3$  im Hochschwarzwald gemessen werden. Dort lag mit einem Monatsdurchschnitt von  $157 \mu\text{g}/\text{m}^3$  auch die höchste Dauerbelastung vor (Deutsches Ärzteblatt, 1997). Derart hohe Konzentrationen von über  $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$  werden in Deutschland jedoch selten gemessen. Die wohl höchsten Ozonbelastungen weltweit sind in Mexico City zu finden. Die Plateaulage der von Bergen umrahmten Stadt ermöglicht das lange Verweilen der von den über 15 Millionen Einwohnern produzierten Schadstoffe. So wurden im Jahre 1986 und 1992 an 71% bzw. 98% der Tage Ozonwerte gemessen, die den für Mexiko geltenden 1h-Richtwert von 0,11 ppm überschritten. Am 16. März 1992 wurden Spitzenwerte von bis zu 0,48 ppm Ozon erreicht (Blake und Rowland, 1995).

Die gesundheitlichen Auswirkungen von Ozon sind in seiner Eigenschaft als Reizgas begründet. Wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit wird Ozon in viel geringerem Maße als andere Schadgase wie  $\text{NO}_2$  oder  $\text{SO}_2$  in den oberen Atemwegen zurückgehalten. Dies bedeutet, daß es vermehrt in die Lungenperipherie, also bis zu den terminalen Bronchiolen und Alveolen, vordringen und dort seine schädliche Wirkung entfalten kann. Diese umfaßt neben lokalen Irritationen hauptsächlich die Induktion von Entzündungsreaktionen. Zielzellen sind dabei Alveolarmakrophagen sowie die Epithelzellen der Lunge.

Lange Zeit wurde das Epithel nur als physikalische Barriere betrachtet, die das darunterliegende Gewebe vor dem Eindringen schädlicher Noxen schützt. Wenngleich dies eine wichtige Aufgabe dieser Zellen darstellt, wird man ihnen, wenn man sie auf diese Funktion

reduziert, in ihren vielfältigen Möglichkeiten nicht gerecht. In der letzten Zeit häuften sich Hinweise darauf, daß Epithelzellen immunkompetente Zellen darstellen, die nicht nur ihr eigenes Wachstum und Differenzierungsvorgänge regulieren können, sondern auf schädigende Ereignisse, Infektionen oder von anderen Zelltypen freigesetzte Mediatoren selbst mit der Sekretion von Transmittern wie Zytokinen oder Eicosanoiden reagieren und somit Signale an andere Zellen weitergeben können (Devalia und Davies, 1993; Simon und Paine III, 1995; Stadnyk, 1994; Thompson *et al.*, 1995). Damit sind Epithelzellen direkt am Immungeschehen beteiligt.

In dieser Arbeit sollte die Beteiligung des Lungenepithels an der Entstehung einer ozon-induzierten Entzündungsreaktion untersucht werden. Dazu wurden Zellen einer humanen Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B) mit Ozon exponiert und die Auswirkungen dieser Exposition auf die Bildung der Entzündungsparameter Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) sowie des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) beobachtet. Mit einer Ozonkonzentration von 0,15 ppm wurden Expositionsbedingungen gewählt, wie sie tatsächlich während Sommersmogperioden in unseren Breiten auftreten können.

Da Ozon als entzündungsförderndes Agens Einfluß auf das Immunsystem ausübt, bestand die Möglichkeit, daß auch die normalen immunologischen Reaktionen des Organismus auf Stimulierungsreize mit immunologisch wirksamen Agenzien wie Zytokinen oder Bakterienbestandteilen von dem Schadgas nicht unbeeinflusst bleiben. Deshalb war eine weitere Aufgabenstellung dieser Arbeit die Ermittlung der Auswirkungen von Ozon auf die normale Immunantwort stimulierter Zellen. Als Zellsystem wurden wiederum die Bronchialepithelzellen BEAS-2B herangezogen. Untersucht wurden immunmodulierende Effekte von Ozon auf Aktivierungen mit Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, Zymosan, einem Standardstimulus, der aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*, der Bäckerhefe, gewonnen wird, sowie den Zytokinen Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), die typische Makrophagenprodukte darstellen, und somit, von diesen sezerniert, auf das Epithel gelangen können.

Neben gasförmigen Schadstoffen, wie Ozon, NO<sub>2</sub> oder SO<sub>2</sub>, enthält die Atemluft partikuläre Verunreinigungen, deren schädliches Potential auf den Respirationstrakt in den letzten Jahren immer mehr publik wurde. Dabei wird den Feinstäuben mit einem Partikeldurchmesser < 10  $\mu$ m (PM<sub>10</sub>) bzw. < 2,5  $\mu$ m (PM<sub>2,5</sub>) besondere Bedeutung zugemessen, da diese als lungengängig gelten. Größere Partikel dagegen werden entweder gar nicht eingeatmet oder, falls sie in den oberen Atemtrakt gelangen, durch die Selbstreinigungsmechanismen der Lunge zumindest teilweise wieder ausgeschieden, weshalb ihre toxikologische Bedeutung eher als gering einzustufen ist. Den größten Anteil an den Staubemissionen in Baden-Württemberg haben der Verkehr, der Hausbrand, die Industrie und die öffentlichen Kraftwerke. Ein nicht zu unterschätzender Anteil stammt jedoch auch aus

natürlichen Emissionsquellen, wie z. B. lokalen Bodenerosionen und Ferntransporten aus den ariden Gebieten Süd- und Osteuropas (LfU, 1996). Immerhin konnten die Staubemissionen in Baden-Württemberg, nicht zuletzt durch technische Vorschriften, in den letzten zwanzig Jahren deutlich reduziert werden. Je nach Korngröße verhalten sich die Stäube in der Luft unterschiedlich: Grobe Stäube werden mit der Luft nur über kurze Strecken transportiert und setzen sich rasch ab. Dagegen legen feinere Stäube größere Strecken zurück. Die feinsten Stäube mit einem Durchmesser  $< 5 \mu\text{m}$  sedimentieren kaum oder nur sehr langsam und können somit als Schwebstaub mehrere Tage in der Atmosphäre verweilen, über große Entfernungen transportiert und durch Transmissionsvorgänge modifiziert werden (Seemayer, 1989). Dabei lagern sich gasförmige und anorganische Stoffe an die Aerosole an, wobei letztere eine Trägerfunktion übernehmen (Nettesheim *et al.*, 1981). Auf diese Art und Weise kann eine Vielzahl von schädlichen Adsorbaten in den Bronchial- und Alveolarraum gelangen. Da immer klarer wurde, daß an der Partikelwirkung mindestens zwei Komponenten beteiligt sind, nämlich zum einen die Wirkung, die auf der Physik, also der Partikelform, -größe und -oberfläche beruht, und zum anderen die, die durch adsorbierte chemische Substanzen hervorgerufen wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl reine Stäube in Form von Quarzstaub (DQ12) als auch Extrakte gesammelter Luftstaubproben (GEX) auf ihr entzündungsförderndes Potential bei Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) untersucht. Dabei dienten als Entzündungsparameter wiederum die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) sowie das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1).

Wie bereits oben erwähnt, hat man es bei der Atemluft mit einem Gemisch der vielfältigsten gasförmigen, partikulären sowie auf den Partikeln adsorbierten chemischen Komponenten zu tun. Da es wahrscheinlich ist, daß diese Komponenten sich auch gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen, sind Untersuchungen zur Kombinationswirkung dieser Substanzen von besonderer Bedeutung. In dieser Arbeit sollten deshalb Versuche an menschlichen Bronchialepithelzellen durchgeführt werden, bei denen die Zellen nacheinander mit Ozon und Stäuben bzw. Staubextrakten exponiert wurden. Ziel war es, zu ermitteln, ob sich die beiden Komponenten in ihrer Wirkung auf die zu untersuchenden Entzündungsparameter Interleukin-6, Interleukin-8 und ICAM-1 gegenseitig verstärkten, abschwächten oder aber unbeeinflusst ließen.

Betrachtet man die Symptomatik ozoninduzierter Beschwerden beim Menschen wie Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter, Atemnot oder Brustenge sowie ernsthafter Erkrankungen wie Pneumonien, Fibrosen oder Ödeme, so wird deutlich, daß derartige Phänomene nicht nur auf eine Beeinträchtigung der Epithelzellschicht zurückzuführen sein können, liegen diesen Erscheinungen doch unter anderem Auswirkungen auf die Blutgefäße und die Muskulatur zugrunde. Deshalb war die Frage von Interesse, wie die anfängliche Schädigung des Epithels derart Kreise ziehen kann, daß letztendlich ein ganzes Gewebe davon betroffen ist. Eine wichtige Möglichkeit für die Zellen, miteinander zu kommunizieren,

stellen lösliche Transmitter wie Zytokine und Eicosanoide dar. Somit wäre es denkbar, daß Bronchialepithelzellen die Information einer erfolgten Schädigung über die Freisetzung von Mediatoren an darunterliegende Zelltypen weitergeben, welche dann ihrerseits Stoffe sezernieren, die wieder andere Zellen beeinflussen, so daß sich letztlich ein ganzes Gewebe derart umorganisiert, daß sich die oben genannten klinischen Symptome ausbilden. Von besonderer Bedeutung sind dabei mögliche Wechselwirkungen zwischen Epithelzellen und Endothelzellen, die, gerade im Alveolarbereich wegen des dort stattfindenden Gasaustausches, nur durch einen minimalen Abstand voneinander getrennt sind.

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit beinhaltete die Entwicklung eines Kokultursystems aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen, anhand dessen die vermuteten Wechselwirkungen zwischen Epithel- und Endothelzellen untersucht werden sollten. Da pulmonale Endothelzellen nicht zur Verfügung standen, sollten menschliche Nabelschnurendothelzellen (ECV304) als Modell für das Lungenendothel dienen.

Der nächste Schritt bestand darin, die Anwendbarkeit des Systems für inhalationstoxikologische Fragestellungen zu überprüfen. Dazu wurden die Experimente, die bereits für die einzeln kultivierten Bronchialepithelzellen durchgeführt worden waren, auch auf das Kokultursystem übertragen. Diese beinhalteten die Luft- bzw. Ozonbegasung des Systems, die Prüfung auf immunmodulierende Eigenschaften von Ozon, eine Exposition mit Stäuben bzw. Staubextrakten sowie Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Ozon und Stäuben oder Staubextrakten. Als Entzündungsparameter dienten wiederum die Zytokine IL-6 und IL-8. Die Bestimmung des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) konnte bei BEAS-2B und ECV304 getrennt erfolgen.

Im Jahre 1996 sorgte eine amerikanische Studie für Aufsehen, in der anhand von Langzeitversuchen an Mäusen eine kanzerogene Wirkung von Ozon nachgewiesen wurde (Herbert *et al.*, 1996). Zwar erlauben derartige Ergebnisse keine Rückschlüsse auf eine potentielle Gefährdung des Menschen, die Unsicherheit in der Bevölkerung aber blieb. Um auch diesem Aspekt der Ozonwirkung gerecht zu werden, sollten in einem letzten Teil dieser Arbeit Prüfungen zur Genotoxizität von Ozon an Bronchialepithelzellen durchgeführt werden. Biologischer Endpunkt war dabei die als sehr empfindlich geltende Bestimmung von Schwesterchromatidaustauschen.

**Zusammenfassend können die Ziele der vorliegenden Arbeit wie folgt formuliert werden:**

1. Untersuchungen zur ozoninduzierten Bildung von Entzündungsparametern bei humanen Bronchialepithelzellen.
2. Prüfung auf immunmodulierende Eigenschaften von Ozon bezüglich der Bildung von Entzündungsmarkern bei zymosan-, LPS-, IL-1 $\beta$ - bzw. TNF- $\alpha$ -stimulierten Bronchialepithelzellen.
3. Überprüfung der gebildeten Entzündungsparameter bei Bronchialepithelzellen nach Exposition mit Stäuben bzw. Staubextrakten.
4. Untersuchung der Kombinationswirkung von Ozon und Stäuben bzw. Staubextrakten auf die Bildung von Entzündungsmarkern bei Bronchialepithelzellen.
5. Entwicklung eines Kokultursystems aus Bronchialepithelzellen und Endothelzellen zur Untersuchung von Wechselwirkungen der beiden Zelltypen.
6. Überprüfung der Anwendbarkeit des Systems für inhalationstoxikologische Fragestellungen: Exposition mit Ozon und Stäuben bzw. Staubextrakten.
7. Untersuchungen zur Genotoxizität von Ozon.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellmaterial und Zellkultur

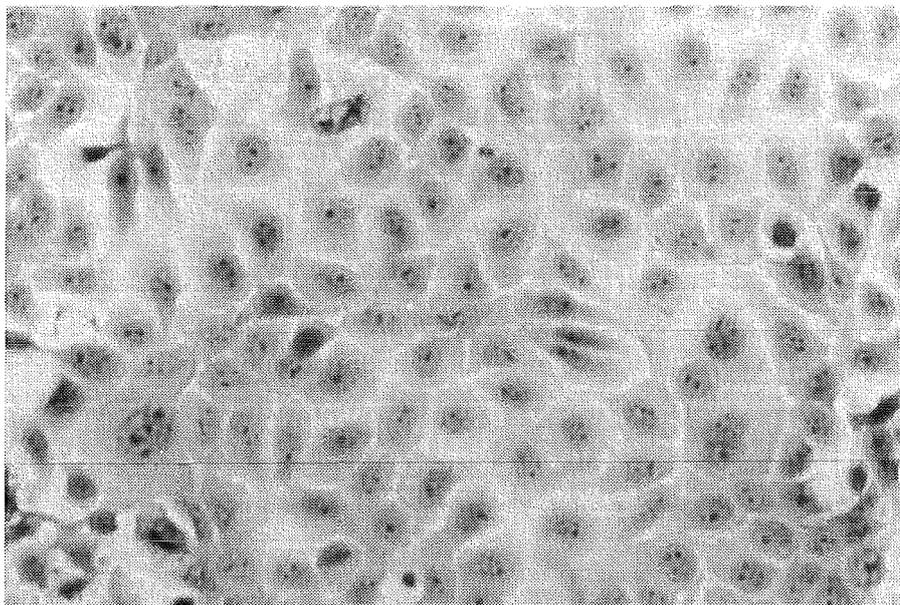
#### 2.1.1 Puffer und Lösungen

HBS ( <i>HEPES buffered saline</i> )	4,76 g HEPES (Sigma) 7,07 g Natriumchlorid 0,20 g Kaliumchlorid 1,70 g Glucose 1,29 g Natriumdihydrogenphosphat · 2 H <sub>2</sub> O Aqua bidest. ad 1,0 Liter pH 7,4
HBSS ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )	0,185 g Calciumchlorid · 2 H <sub>2</sub> O 0,098 g Magnesiumsulfat anhydr. 0,4 g Kaliumchlorid 0,06 g Kaliumhydrogenphosphat anhydr. 8,0 g Natriumchlorid 0,048 g Natriumdihydrogenphosphat anhydr. 1,0 g D-Glucose 0,35 g Natriumhydrogencarbonat Aqua bidest. ad 1,0 Liter pH 7,4
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Life Technologies) 1,0 g Calciumchlorid anhydr. 2,0 g Kaliumchlorid 2,0 g Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 g Magnesiumchlorid · 6 H <sub>2</sub> O 80,0 g Natriumchlorid 21,6 g Natriumdihydrogenphosphat · 7 H <sub>2</sub> O Aqua bidest. ad 1,0 Liter Vor Gebrauch wurde die Lösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt und pH 7,4 eingestellt.
Physiologische Kochsalzlösung	9,0 g Natriumchlorid Aqua bidest. ad 1,0 Liter

Sörensen-Puffer	4,539 g Kaliumdihydrogenphosphat 5,938 g Natriumhydrogenphosphat · 2 H <sub>2</sub> O Aqua bidest. ad 1,0 Liter pH 6,8
Trypanblaulösung	0,5% Trypanblau (Sigma) in physiologischer Kochsalz- lösung

### 2.1.2 Bronchialepithelzellen: BEAS-2B

BEAS-2B sind Zellen einer humanen Bronchialepithelzelllinie. Sie wurden aus gesundem Bronchialepithel gewonnen und durch SV40-Transformation immortalisiert (Reddel *et al.*, 1988). Dabei behielten sie wichtige epitheliale Charakteristika wie die typische Zellmorphologie des Epithels (Ke *et al.*, 1988), Zytokeratinexpression (Hornberg, 1996) und eine polare Freisetzung von Eicosanoiden (Noah *et al.*, 1991) bei. Die Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. D. Lang (Pneumologisches Forschungslabor, Krankenhaus Großhansdorf) unter Genehmigung von Herrn Dr. C. Harris (Laboratory of Human Carcinogenesis, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt. Abb. 1 zeigt einen Monolayer Hämatoxyllin-Eosin-gefärbter BEAS-2B.



**Abb. 1: Hämatoxyllin-Eosin-gefärbte BEAS-2B.**

BEAS-2B wurden in Chamber Slides ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Fixierung der Zellen in Bouin'scher Lösung sowie eine Hämatoxyllin-Eosin-Färbung. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop bei einer 312,5-fachen Vergrößerung fotografiert.

### 2.1.2.1 Lösungen und Medien für die Kultur der BEAS-2B-Zellen

KGM ( <i>keratinocyte growth medium</i> )	KBM ( <i>keratinocyte basal medium</i> ), das eine Modifikation von MCDB 153-Medium darstellt, supplementiert mit Epidermal Growth Factor (0,1 ng/ml) Insulin (5 µg/ml) Hydrocortison (0,5 µg/ml) Bovine Pituitary Extract (0,4%) Gentamicin (50 µg/ml) Amphotericin-B (50 ng/ml). Die Angaben in Klammern stellen die Endkonzentrationen im Medium dar. Bezug: Cell Systems, Remagen
PET-Lösung	Polyvinylpyrrolidon (10 mg/ml) EGTA (40 µg/ml) Trypsin (200 µg/ml) Kaliumchlorid (200 µg/ml) Glucose (1,7 mg/ml) HEPES (4,8 mg/ml) Natriumchlorid (7,0 mg/ml) Phenolrot (1,0 µg/ml) Die Zusammensetzung der PET-Lösung gewährleistete ein schonendes Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen. Insbesondere PVP übte einen besonderen Schutz auf die Zellmembran während der Dissoziation aus. Bezug: Biological Research Faculty & Facility, Ijamsville (USA)
SBIT-Lösung ( <i>soy bean trypsin inhibitor</i> )	10 mg Trypsin-Inhibitor (Sigma) 50 ml HBS

### 2.1.2.2 Kultur der BEAS-2B-Zellen

BEAS-2B bildeten in Zellkulturflaschen aus Plastik (Greiner) einen Monolayer aus. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit 2 ml PET-Lösung gespült und anschließend, mit 2 ml PET-Lösung bedeckt, für ca. 15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Eine optimale Einwirkungszeit der trypsinhaltigen Lösung wurde durch Beobachten des Ablösevorgangs der Zellen im Mikroskop gewährleistet. Mit der Zugabe von 0,4 ml SBIT-Lösung wurde die Trypsinwirkung

aufgehoben. Nach Aufnahme, mehrfachem Resuspendieren und Überführen der Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) wurden am Flaschenboden noch anhaftende Zellen mit etwas KGM-Medium ab gespült und mit der Suspension vereinigt. Es folgte eine Zentrifugation bei 250 g und 4°C für 10 min (Rotixa / RP, Fa. Hettich, Tuttlingen). Die Flüssigkeit über den Zellen wurde verworfen und das Pellet in 5 bis 10 ml KGM resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblaulösung verdünnt und zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität (siehe 2.7.1.1) in der Neubauer-Kammer benutzt. 20 ml einer Zellsuspension, die zuvor auf  $2 \cdot 10^4$  Zellen je Milliliter Medium eingestellt worden war, wurden in eine neue Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche gegeben und dienten damit der Weiterkultivierung der Zellen.

Für Stimulierungsversuche (siehe 2.2.1) wurden BEAS-2B in 6-Well-Kulturplatten (Greiner) ausgesät. Dabei wurden in jede Vertiefung  $2 \cdot 10^5$  Zellen, suspendiert in 2,5 ml KGM, pipettiert. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> hatten die Zellen einen dichten Monolayer ausgebildet und konnten für Versuche verwendet werden.

Für Begasungsexperimente (siehe 2.2.2) erfolgte die Aussaat von  $2 \cdot 10^5$  Zellen, suspendiert in 1,5 ml KGM, in spezielle Membraneinsätze (Transwell<sup>®</sup>-COL, Costar), die ihrerseits in 6-Well-Kulturplatten saßen. Durch diese Zweiteilung des Kultursystems ergaben sich zwei Kompartimente, eines unterhalb der Membran (basolaterales Kompartiment) und eines oberhalb der Membran (apikales Kompartiment), auf der die Zellen kultiviert wurden (siehe Abb. 3). In das basolaterale Kompartiment wurden 2,5 ml KGM gegeben. Derart kultivierte Zellen erreichten nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Konfluenz und konnten zu Begasungsversuchen herangezogen werden.

Für die Prüfung auf Schwesterchromatidaustausche nach Begasung (siehe 2.8) wurden die Zellen wie für Begasungsexperimente ausgesät. Der Versuchsbeginn erfolgte jedoch bereits nach 3 Tagen Kultivierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Zur Bestimmung der Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) auf stimulierten BEAS-2B mittels zellständigem ELISA wurden die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten (Primaria<sup>®</sup>, Falcon) kultiviert. Mit der Aussaat von 200 µl einer Zellsuspension der Konzentration  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml in jedes Well waren die Zellen am nächsten Tag konfluent und konnten stimuliert werden (siehe 2.2.1).

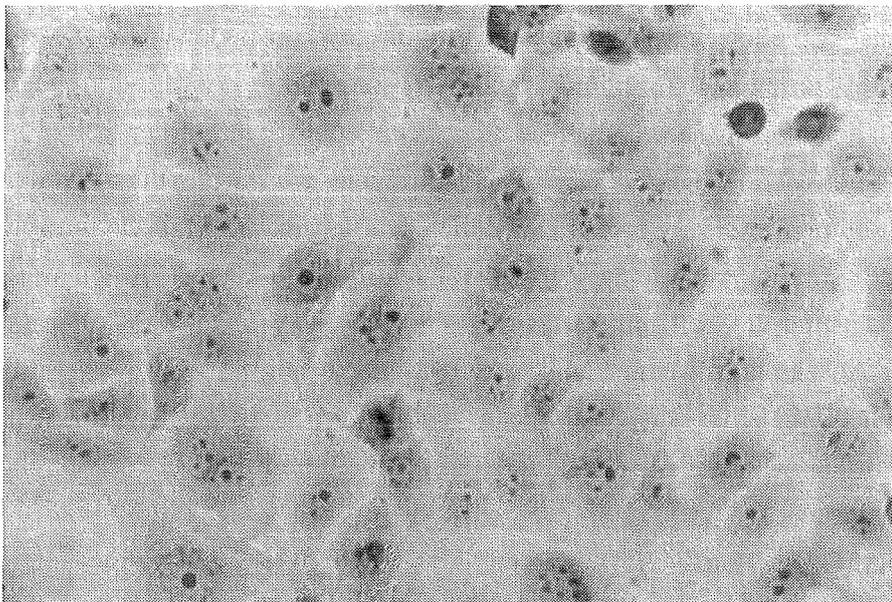
Stimulierungsversuche mit nicht-opsoniertem Zymosan, Schwebstaubextrakten (GEX) und Makrophagenüberständen wurden ebenfalls in Mikrotiterplatten durchgeführt (siehe 2.2.1).

Die Aussaat der Zellen für immunhistochemische Anti-ICAM-1-Färbungen (siehe 2.6.3), Hämatoxyllin-Eosin-Färbungen (siehe 2.7.1.2) sowie für die morphologische Untersuchung quarzstaub-beladener Zellen (siehe 2.7.1.3) wurde in Chamber Slides (Lab-Tek<sup>®</sup>, Nunc) vorgenommen. Die Zellsuspension wurde hierfür auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Wurden 2 ml dieser Suspension in jede Kammer pipettiert, waren die Zellen am dritten Tag nach Aussaat konfluent.

Für Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passagezahlen 115 bis 145 verwendet.

### 2.1.3 Endothelzellen: ECV304

ECV304 ist eine Zelllinie humanen Ursprungs. Es handelt sich dabei um spontan transformierte Endothelzellen aus der Umbilikalvene eines neugeborenen japanischen Mädchens. Wegen ihrer leichten Handhabbarkeit und der starken Ausprägung endothelialer Merkmale (Takahashi *et al.*, 1990) werden ECV304 neben den entsprechenden Primärzellen (HUVEC) häufig für Fragestellungen eingesetzt, in denen das Endothel im allgemeinen, unabhängig von dessen Herkunft, untersucht werden soll. In der vorliegenden Arbeit dienten ECV304 als Modell für das pulmonale Endothel. Die Zellen wurden von der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, UK) bezogen und mit einer Passagezahl von 137 geliefert. Für Experimente wurden Zellen der Passagezahlen 140 bis 165 verwendet. Abb 2 zeigt einen Monolayer Hämatoxyllin-Eosin-gefärbter ECV304.



**Abb. 2: Hämatoxyllin-Eosin-gefärbte ECV304.**

ECV304 wurden in Chamber Slides ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Fixierung der Zellen in Bouin'scher Lösung sowie eine Hämatoxyllin-Eosin-Färbung. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop bei einer 312,5-fachen Vergrößerung fotografiert.

#### 2.1.3.1 Lösungen, Medien und Puffer für die Kultur der ECV304-Zellen

Medium 199

Bezug: Life Technologies

Zugesetzt wurden

10% FCS (Myoclon Super Plus<sup>®</sup>, Life Technologies) aus einer Charge mit besonders niedrigem Endotoxingehalt, das vor Gebrauch hitzeinaktiviert wurde, und 2 mM Glutamin (Life Technologies).

Trypsinlösung	4,4 g Natriumcitrat
	10,0 g Kaliumchlorid
	2,5 g Trypsin (Nordwald, Hamburg)
	1 ml 1%ige Phenolrotlösung (Fluka)
	Aqua bidest. ad 1,0 Liter
	pH 7,6

### 2.1.3.2 Kultur der ECV304-Zellen

Die ECV304-Zellen wurden in Plastikflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> (Greiner) kultiviert und wuchsen darin als Monolayer. Einmal pro Woche erfolgte eine Passage: Die Zellen wurden mit 1 ml einer 0,25%igen Trypsinlösung gespült und anschließend, mit 1,5 ml Trypsinlösung bedeckt, für 2-3 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Die Zellsuspension wurde in 10 ml vorgelegten Mediums pipettiert, wobei die Trypsinwirkung durch das im Medium enthaltene Serum aufgehoben wurde. Nach Zentrifugation der Zellen bei 250 g und 4°C für 10 min (Rotixa / RP, Fa. Hettich, Tuttlingen) wurde die Flüssigkeit oberhalb des Pellets abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in ca. 5 ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Ein Aliquot der Suspension wurde zu gleichen Teilen mit Trypanblaulösung gemischt und die Zellzahl pro Milliliter sowie die Vitalität der Zellen (siehe 2.7.1.1) mit Hilfe der Auszählung in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Zur Weiterkultivierung der Zellen wurden 20 ml einer Suspension, die zuvor auf 1,5 · 10<sup>4</sup> Zellen je Milliliter Medium eingestellt worden war, in eine Zellkulturflasche pipettiert und die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für Kokulturversuche (siehe 2.3) wurden die Zellen in 6-Well-Kulturplatten (Primaria<sup>®</sup>, Falcon) in einer Konzentration von 5 · 10<sup>4</sup> Zellen/Well in jeweils 2,5 ml Medium 199 ausgesät. Dabei erreichten ECV304 nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Konfluenz und konnten zum Versuch verwendet werden.

Zur Aufnahme von Wachstumskurven (siehe 2.4) sowie für die Durchführung morphologischer Untersuchungen der ECV304 in verschiedenen Medien mittels Lichtmikroskopie (siehe 2.7.1.4) wurden die Zellen in 6-Well-Makroplatten (Primaria<sup>®</sup>, Falcon) in einer Konzentration von 3 · 10<sup>4</sup> Zellen je Well in jeweils 2 ml Medium 199 ausgesät.

Die Darstellung der Endothelzellen im Rasterelektronenmikroskop (siehe 2.7.2.3) erfolgte nach Aussaat auf Polyestermembranen (Transwell<sup>®</sup>-CLEAR, Costar): In das apikale Kompartiment wurden jeweils 3 · 10<sup>4</sup> Zellen, suspendiert in 2 ml Medium 199, und in das basolaterale Kompartiment 2,5 ml Medium gegeben.

Hämatoxyllin-Eosin-Färbungen (siehe 2.7.1.2) wurden in Chamber Slides (LabTek<sup>®</sup>, Nunc) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von 5 · 10<sup>4</sup> Zellen je Kammer in einem Milliliter Medium 199 ausgesät.

## 2.2 Versuche mit BEAS-2B

### 2.2.1 Stimulierungsversuche

#### 2.2.1.1 Verwendete Reagenzien für die Stimulierungsversuche

TNF- $\alpha$	Humaner rekombinanter Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , der aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> gewonnen wurde (Boehringer Mannheim)
IL-1 $\beta$	Humanes rekombinantes Interleukin-1 $\beta$ , aus <i>Escherichia coli</i> gewonnen (Sigma)
LPS	Lipopolysaccharid von <i>Salmonella abortus equi</i> (Sigma)
Zymosan	Zymosan A, aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> gewonnen (Sigma)
Opsoniertes Zymosan	Opsoniertes Zymosan wurde wie folgt hergestellt: 1 g Zymosan A aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sigma) wurde in ca. 100 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und im Wasserbad 1h unter Rühren gekocht. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 2000 g, einem Waschschrift mit physiologischer Kochsalzlösung und erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in 20 ml Kochsalzlösung aufgenommen. Nun erfolgte die eigentliche Opsonierung, indem ein Teil der Zymosansuspension mit drei Teilen FCS 20 min bei 37°C unter gelegentlichem Umrühren inkubiert wurde. Einem Zentrifugations- und einem Waschschrift folgte nach erneuter Zentrifugation die Aufnahme des Sediments in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung, woraus sich eine Suspension der Konzentration 10 mg/ml ergab, die aliquotiert bei -20°C gelagert wurde.
Quarzstaub (DQ12)	Dörentruper Quarzkristallmehl der Mahlung Nr. 12 (Robock, 1973) mit einer Korngröße < 5 $\mu\text{m}$ (Steinkohlenbergbauverein Essen), das freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. N. H. Seemayer (Med. Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde.

Schwebstaubextrakte (GEX)	Globale Schwebstaubextrakte der Probennummern 65-68 (siehe 2.2.1.3), die ebenfalls freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. N. H. Seemayer (Med. Institut für Umwelt-hygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurden.
Makrophagenüberstände	Die Überstände DQ12-stimulierter menschlicher Makro-phagen (siehe 2.2.1.4) wurden freundlicherweise von Herrn Dipl. Biol. H. Olbrück (Med. Institut für Umwelt-hygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.1.2 Durchführung der Stimulierungsversuche

Für Stimulierungsversuche wurden konfluent gewachsene, in 6-Well-Makroplatten (Greiner) kultivierte BEAS-2B verwendet (siehe 2.1.2.2). Das über den Zellen befindliche Medium wurde abgesaugt und durch 2,5 ml Stimulierungsmedium bzw. Kontrollmedium ersetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Es wurde sowohl die Zeit- als auch die Dosisabhängigkeit eines bestimmten Effektes überprüft. Während bei der Überprüfung der Zeitabhängigkeit eine fixe Konzentration des Stimulus eingesetzt und der Effekt nach unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht wurde, wurde bei den Versuchen zur Dosisabhängigkeit die Stimulierungsdauer vorgegeben und der Einfluß verschiedener Konzentrationen des Stimulus auf eine bestimmte Wirkung betrachtet. Für Untersuchungen zu Kombinationswirkungen von Ozon und verschiedenen Stimuli (siehe 2.2.3 und 2.3.3) wurde stets nur eine Konzentration des Stimulus und eine Stimulierungsdauer von 24h eingesetzt. Die Stimulierungszeiten und -konzentrationen sind für die entsprechenden Stimuli in Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1: Für Stimulierungsversuche verwendete Stimuli und eingesetzte Konzentrationen bzw. Inkubationszeiten.**

	Untersuchung der Zeitabhängigkeit		Untersuchung der Dosisabhängigkeit		Versuche zur Kombinationswirkung Ozon / Stimuli
	Konzentration	Inkubationszeiten	Konzentrationen	Inkubationszeit	
TNF- $\alpha$	1000 pg/ml	2h, 4h, 24h, 48h	100, 200, 500, 1000, 2000 pg/ml	24h	1000 pg/ml
IL-1 $\beta$					1000 pg/ml
LPS					10 $\mu$ g/ml
Zymosan	1000 $\mu$ g/ml	2h, 4h, 24h, 48h	100, 200, 500, 1000, 2000 $\mu$ g/ml	24h	1000 $\mu$ g/ml
DQ12	1000 $\mu$ g/ml	2h, 4h, 24h, 48h	100, 200, 500, 1000, 2000 $\mu$ g/ml	24h	1000 $\mu$ g/ml

Die Stimulierungsmedien wurden durch Verdünnung mit Medium aus entsprechenden höher konzentrierten Stammlösungen hergestellt. Stammlösungen partikulärer Stimuli wie DQ12 wurden nach der Herstellung mit Ultraschall behandelt (Sonopuls GM 70, Fa. Bandelin, Berlin), um möglicherweise vorhandene Keime zu zerstören und eine Feinverteilung der Partikel zu gewährleisten. Dabei wurde eine Mikrospritze aus Titan in eine Suspension von 5 bis 10 Millilitern mindestens 10 mm tief eingetaucht und die Suspension in der Standardeinstellung (cont.; Power = MS72/D; Cycle = 50%) mit 10 Pulsen von je 1-2 Sekunden Dauer beschallt. Während die Stammlösungen von TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , LPS und Zymosan bei -20°C aliquotiert gelagert werden konnten, wurden die Stammlösungen partikulärer Stimuli wie DQ12 vor Gebrauch jeweils frisch angesetzt. Tab. 2 zeigt die Lösungsmittel und Stammkonzentrationen der verschiedenen Stimuli.

**Tab. 2: Stammlösungen der Stimuli und ihre Lösungsmittel.**

	Lösungsmittel	Konz. der Stammlösung
TNF- $\alpha$	PBS mit 0,1% BSA	10 $\mu$ g/ml
IL-1 $\beta$	PBS mit 0,1% BSA	10 $\mu$ g/ml
LPS	0,9% NaCl-Lsg.	0,1 mg/ml
Zymosan	0,9% NaCl-Lsg.	10 mg/ml
DQ12	KGM-Medium	10 mg/ml

Nach Ablauf der vorgesehenen Inkubationszeit wurde das Medium über den Zellen gut durchgemischt, abgenommen und bis zur Zytokinbestimmung (siehe 2.5) portioniert bei -20°C gelagert. Die am Plattenboden anhaftenden Zellen wurden zur durchflußzytometrischen Bestimmung des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) wie unter 2.6.1 beschrieben weiterbehandelt.

Für Stimulierungsversuche mit anschließender Messung von ICAM-1 im zellständigen ELISA wurden die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten (siehe 2.1.2.2) 24h mit je 200  $\mu$ l

Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium pro Well bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dabei wurde für jeden Stimulus jeweils eine aus acht Vertiefungen bestehende senkrechte Reihe belegt. Nach Inkubationsende wurde der zellständige ICAM-1-ELISA wie unter 2.6.2.3 beschrieben durchgeführt.

Stimulierungsversuche mit nicht-opsoniertem Zymosan, Schwebstaubextrakten (GEX) und Makrophagenüberständen wurden ebenfalls in Mikrotiterplatten durchgeführt (siehe 2.1.2.2). Die Stimulierung erfolgte mit je 200 µl Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium pro Well bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24h. Nach Inkubationsende wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C bis zur Zytokinbestimmung (siehe 2.5) tiefgefroren. Anschließend erfolgte die Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA wie unter 2.6.2.3 beschrieben.

Die Stimulierungsmedien für Versuche mit Schwebstaubextrakten wurden wie folgt hergestellt: Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe der Stammlösung mit Verdünnungen von 1:2 bis 1:32 in Dimethylsulfoxid (DMSO, Fluka) erstellt. Diese Lösungen wurden nun jeweils wiederum 1:100 mit KGM-Medium verdünnt. Somit war in allen Stimulierungsmedien eine konstante DMSO-Konzentration, die 1% nicht überschritt, gewährleistet. Der unstimulierten Kontrolle wurde ebenfalls der entsprechende Anteil DMSO zugesetzt. Alle Gesamtextrakte wurden zur Vermeidung photochemischer Abbauprozesse im Dunkeln aufbewahrt und unter Ausschluß von direktem Licht gehandhabt. Die Angaben der Schwebstaubkonzentrationen im Ergebnisteil beziehen sich jeweils auf das entsprechende Luftsammelvolumen der Proben (siehe 2.2.1.3) und wurden in der Einheit Kubikmeter Luft je Milliliter Medium gemacht.

Stimulierungsmedien unterschiedlicher Konzentrationen für die Stimulierung mit Makrophagenüberständen (siehe 2.2.1.4) wurden durch Zupipettieren von 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600 bzw. 800 µl der Stammlösung auf ein Gesamtvolumen von 1 ml KGM-Medium hergestellt.

### 2.2.1.3 Gewinnung der Schwebstaubextrakte

Die verwendeten Schwebstaubextrakte wurden aus atmosphärischen Feinstaubproben gewonnen, die simultan in zwei Städten des Rhein-Ruhr-Gebietes, Düsseldorf und Duisburg, zu verschiedenen Jahreszeiten gesammelt worden waren. Die Sammlung erfolgte mit Hilfe eines High Volume Samplers (HVS 150, Fa. Ströhlein Instruments, Kaarst) auf Glasfaserfiltern. Die Filter wurden mit Dichlormethan oder Methanol im Soxhlet-Apparat extrahiert und die Extrakte quantitativ in Dimethylsulfoxid (DMSO) überführt. Die Proben wurden als Gesamtextrakte (GEX) bezeichnet und mit fortlaufenden Nummern versehen. Zur näheren Charakterisierung wurden die Proben fluorimetrisch auf ihren Benzo[*a*]pyren-Gehalt untersucht (Dehnen *et al.*, 1977; Tomingas *et al.*, 1977; Tomingas und Voltmer, 1978). Benzo[*a*]pyren diente dabei als Leitsubstanz der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH). Für Dosisangaben in den Zellkulturversuchen wurden, wie bereits oben erwähnt, die extrahierten Substanzen des Schwebstaubes auf die Sammelluftvolumina

bezogen und in Kubikmeter Luft per Milliliter Medium angegeben. Eine Übersicht über die verwendeten Schwebstaubextrakte, ihre Herkunft, Benzo[*a*]pyren-Konzentrationen und das zugehörige Luftsammelvolumen ist in Tab. 3 gegeben.

**Tab. 3: Verwendete Schwebstaubextrakte und ihre Herkunft, Sammelluftvolumina bzw. Benzo[*a*]pyren-Gehalte.**

	GEX65	GEX66	GEX67	GEX68
Sammelort	Duisburg	Düsseldorf	Duisburg	Düsseldorf
Sammelzeitraum	Okt.-Dez. 1990	Okt.-Dez. 1990	Jan.-März 1991	Jan.-März 1991
Gesammeltes Luftvolumen [m <sup>3</sup> ]	33 067	32 555	33 775	49 378
Benzo[ <i>a</i> ]pyren-Gehalt [ng/m <sup>3</sup> Luft]	5,41	2,77	6,73	3,13
Luft [m <sup>3</sup> ]/ml DMSO in der Stammlösung	1 570	1 627	1 604	2 344
Benzo[ <i>a</i> ]pyren [µg]/ml DMSO in der Stammlösung	8,49	4,51	10,79	7,33

#### 2.2.1.4 Gewinnung der Überstände DQ12-stimulierter menschlicher Makrophagen

Monozyten wurden über einen Dichtegradienten aus dem menschlichen peripheren Blut gewonnen und zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Isolierung und Ausdifferenzierung der Zellen kann genauer nachgelesen werden unter Seemayer und Braumann (1988). Nach 12 Tagen in Kultur wurden die Makrophagen mit Quarzstaub DQ12 in einer Konzentration von 30 µg/ml in serumfreiem RPMI 1640 beimpft. 24h nach Inkubation wurde der Überstand abgenommen und für Stimulierungsversuche verwendet.

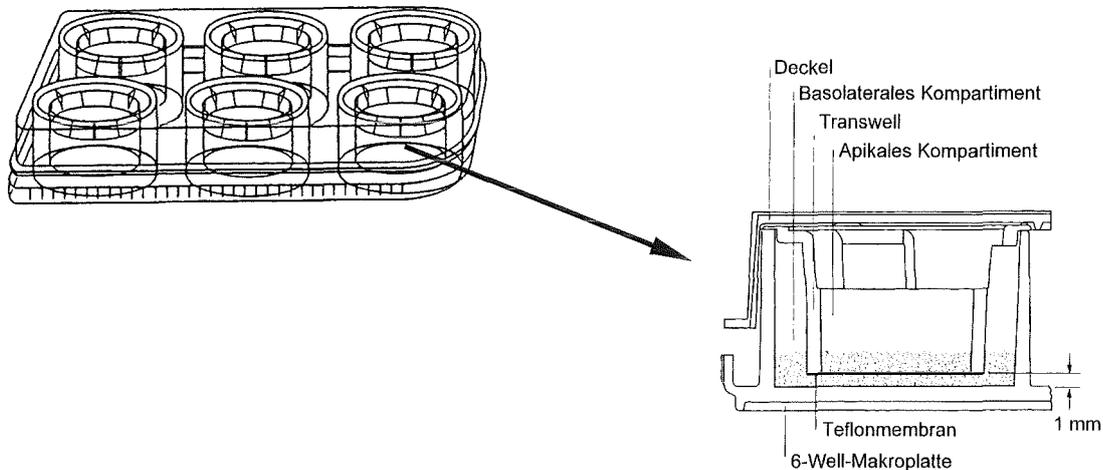
### 2.2.2 Begasungsexperimente

#### 2.2.2.1 Exposition der Zellen

Bei der Durchführung von Begasungsexperimenten mit Zellen muß folgende Schwierigkeit bedacht werden: Einerseits muß das Gas in direkten Kontakt mit den Zellen treten können, d.h. die Zelloberfläche sollte weitestgehend trocken sein. Besonders Ozon mit seiner hohen Reaktionsfähigkeit und geringen Wasserlöslichkeit würde bei Vorhandensein eines Flüssigkeitsfilms auf den Zellen höchstwahrscheinlich die Zelloberfläche gar nicht erreichen. Andererseits muß für die Zelle während der Gasexposition eine gewisse Befeuchtung gewährleistet sein, damit sie ihren normalen Stoffwechsel aufrechterhalten kann.

Eine Lösung dieses Problems bietet die Kultivierung der Zellen in Membransystemen. Die Zellen wurden in speziellen Membraneinsätzen (Transwell<sup>®</sup>-COL, Costar) kultiviert (siehe 2.1.2.2), die ihrerseits wieder in 6-Well-Kulturplatten gesetzt werden konnten (Abb. 3). Die

Membran teilte die Vertiefung der Kulturplatte in ein apikales Kompartiment (oberhalb der Zellen) und ein basolaterales Kompartiment (unterhalb der Zellen).



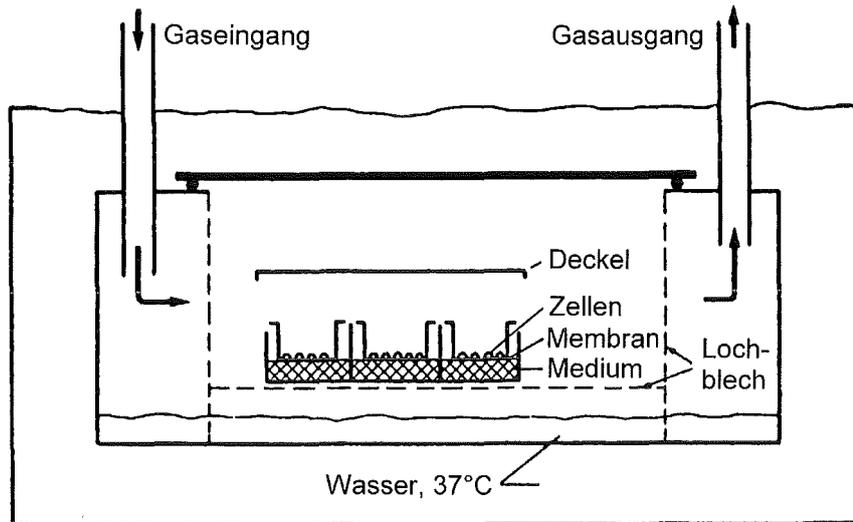
**Abb. 3:** Schematische Darstellung der für die Begasungsexperimente verwendeten Transwell®-Membransysteme.  
Erläuterungen siehe Text.

Während der Kultivierung der Zellen befand sich in beiden Kompartimenten KGM-Medium. Waren die Zellen auf den Membranen konfluent gewachsen, konnten sie für Begasungsversuche genutzt werden: Die Medien ober- und unterhalb der Membran wurden abgesaugt, beide Seiten der Membran jeweils mit 1 ml HBSS gewaschen, und lediglich in das untere, basolaterale Kompartiment erfolgte die Zugabe von 1,6 ml HBSS. Somit wurden die Zellen von unten durch die Teflonmembran mit Flüssigkeit versorgt, während die Zelloberfläche weitestgehend trocken blieb und mit dem Gas in Wechselwirkung treten konnte. HBSS wurde statt KGM-Medium verwendet, um mögliche Interaktionen zwischen Mediumbestandteilen und Ozon und eine Bildung von Intermediärprodukten ausschließen zu können. Mit Hilfe kleiner Plättchen aus Glas, die als Abstandhalter eingesetzt wurden, wurde der Deckel der Kulturplatte lose aufgesetzt und „schwebte“ gewissermaßen über der Platte, so daß ungehindert Gas über die Zellen strömen konnte, eine Kontamination aber vermieden wurde. Derart vorbereitete Kulturplatten wurden dann in die Expositionskammern (siehe 2.2.2.2) gestellt. Die Begasung erfolgte mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon für 90 min. Nach der Begasung wurde die Flüssigkeit im basolateralen Kompartiment abgenommen und verworfen. In beide Kompartimente wurden nun jeweils 1,5 ml KGM pipettiert und die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ende der entsprechenden Inkubationszeiten von 1h, 4h bzw. 24h wurden die Flüssigkeiten des apikalen und basolateralen Kompartiments abgenommen, vereinigt und aliquotiert bei -20°C bis zur Durchführung der Zytokinbestimmung (siehe 2.5) gelagert. Die auf der Membran anhaftenden Zellen wurden zur durchflußzytometrischen

Bestimmung des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) wie unter 2.6.1 beschrieben weiterverwendet.

### 2.2.2.2 Aufbau des Expositionssystems

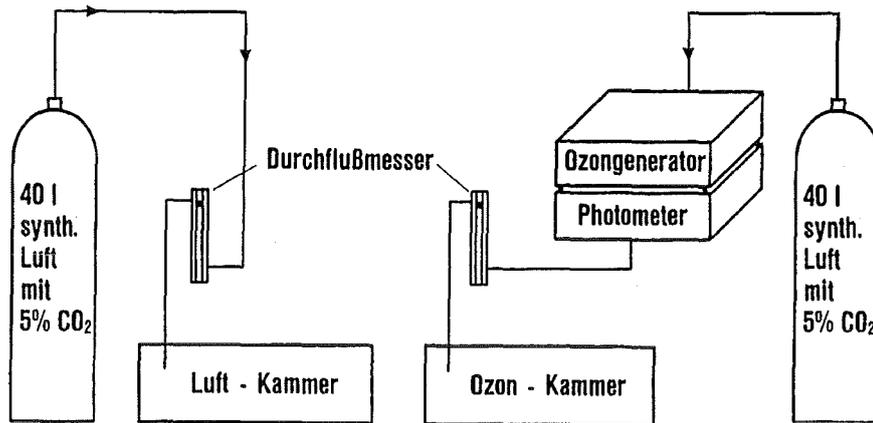
Die Expositionskammern, in welche die Zellen zur Begasung eingebracht wurden, waren in Anlehnung an ein Modell von Voisin *et al.* (1977) speziell angefertigt worden (Fa. Maton, Lille, Frankreich) und werden deshalb als Voisin-Kammern bezeichnet. Entsprechend der parallelen Begasung mit Luft und Ozon wurden zwei dieser Kammern mit identischem Aufbau benötigt. Die Kammer selbst bestand wiederum aus einer Außenkammer und einer in diese einsenkbaren Innenkammer. Die Außenkammer war mit Wasser gefüllt, welches auf 37°C beheizt werden konnte, und diente somit lediglich der Temperierung der Innenkammer, in welcher die eigentliche Gasexposition stattfand. Ein Lochblecheinsatz in der Innenkammer diente als Standfläche für die eingebrachten Zellkulturplatten. Der Zwischenraum zwischen Boden der Innenkammer und Lochblecheinsatz wurde mit Wasser befüllt, womit eine ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit für die Zellkultur während der Exposition gewährleistet blieb. Die Ein- und Austrittsstutzen für das Gas befanden sich an der Oberseite der Innenkammer jeweils an den schmalen Seiten des rechteckig aufgebauten Systems. Nach Einströmen durch den Eintrittsstutzen gelangte das Gas durch ein Lochblech in den eigentlichen Expositionsraum, überströmte die darin befindlichen Zellen und gelangte auf der gegenüberliegenden Seite durch ein weiteres Lochblech und den Austrittsstutzen über einen Schlauch in die Außenluft. Nach oben war die Innenkammer durch einen fest anschraubbaren Deckel mit Gummidichtung abgeschlossen. Dieser wurde zur Beschickung der Kammer geöffnet und vor Beginn der Exposition fest verschlossen. Dies war von entscheidender Bedeutung, da die gesamte Innenkammer während der Exposition in das Wasserbad der Außenkammer abgesenkt und dort fixiert wurde. Der Deckel der Ozonkammer besaß in Gasflußrichtung im Abstand von jeweils 9 cm vier luftdicht verschließbare Austrittsstellen, an denen Gas aus der Innenkammer abgenommen und von Zeit zu Zeit auf die Ozonkonzentration überprüft werden konnte. Sämtliche Teile der Kammer sowie Schläuche, die mit Ozon in Berührung kamen, waren aus ozonresistentem Material wie Teflon gefertigt. In Abb. 4 ist eine schematische Darstellung der Außen- und Innenkammer gegeben.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Expositionsaußen- und -innenkammer.  
Erläuterungen siehe Text.

Ozon wurde von einem Ozongenerator (Ozomat<sup>®</sup>-COM, Fa. Anseros, Tübingen) durch Spannungsentladung aus synthetischer Luft mit 5% CO<sub>2</sub> bereitgestellt. Die Ozonerzeugung erfolgte dabei in einer Hochspannungsgasentladungsröhre durch kurze Hochspannungspulse. Dem Ozongenerator war ein Analysator (Ozomat<sup>®</sup>-MP, Fa. Anseros, Tübingen) angeschlossen, welcher die gelieferte Ozonkonzentration laufend bestimmte und auf einem Display anzeigte. Das Meßprinzip des Analysators beruhte auf der Absorption von UV-Strahlung durch Ozon: Zwei Küvetten wurden von UV-Licht durchstrahlt. Während die Referenzküvette die UV-Strahlung unabgeschwächt durchließ, absorbierte das Ozon in der Meßküvette einen von seiner Konzentration abhängigen Anteil der UV-Strahlung. Nach dem Lambert-Beer-Gesetz wurde aus dem Verhältnis der Intensitäten in der Meßküvette und der Referenzküvette die Ozonkonzentration errechnet. Mit Hilfe eines Reglers wurde über einen „feed-back“-Mechanismus eine konstante Ozonkonzentration gewährleistet.

Der Eintrittsstutzen der Luftexpositions-kammer war durch ein Schlauchsystem über einen Druckminderer und einen Durchflußmesser mit einer Gasflasche, die synthetische Luft mit 5% CO<sub>2</sub> enthielt, verbunden. Der Durchflußmesser an der Entnahmestelle senkte den schwankenden Vordruck des Leitungssystems auf 1 bar. Für die Beschickung der Ozon-expositions-kammer mit Gas mußte die synthetische Luft vor Eintritt in die Kammer erst über den Ozongenerator mit nachgeschaltetem Ozonanalysator geführt werden, um über einen zweiten Durchflußmesser, der einen konstanten Gasfluß von 0,5 l/min gewährleistete, schließlich in die Expositions-kammer zu gelangen. Die Ozonkonzentration des einströmenden Gases konnte durch kontinuierliche Anzeige auf dem Display des Analysators während des Versuches verfolgt werden. In Abb. 5 ist der Aufbau der gesamten Anlage zur Luft- bzw. Ozonexposition schematisch dargestellt.



**Abb. 5:** Aufbau der Gasanlage zur Luft- bzw. Ozonexposition der Zellen.  
Erläuterungen siehe Text.

In regelmäßigen Abständen wurde auch die Konzentration innerhalb der Kammer mit Hilfe von Ozonteststreifen (Fa. Anseros, Tübingen) überprüft bzw. ein zweiter Ozonanalysator (O<sub>3</sub> 41 M, Fa. Environnement, Poissy, Frankreich), der freundlicherweise von Herrn J. Weppner (IMK, FZK) zur Verfügung gestellt wurde, an die Öffnungen im Deckel der Ozoninnenkammer oder an den Gasaustrittsstutzen angeschlossen. Das Prinzip der Teststreifen beruhte auf der ozonvermittelten Oxidation eines Kaliumiodidpapiers zu Iod und der damit einhergehenden Violettfärbung des Papiers. Eine Farbskala ermöglichte die ungefähre Zuordnung zu einem bestimmten Konzentrationsbereich und bestätigte damit das tatsächliche Vorhandensein von Ozon in der Kammer.

### 2.2.3 Versuche zur Kombinationswirkung von Ozon und verschiedenen Stimuli

Bei den Experimenten zur Kombinationswirkung von Ozon und verschiedenen Stimuli muß unterschieden werden zwischen Versuchen, in denen die Stimulierung vor einer sich anschließenden Begasung und solchen, bei denen die Stimulierung nach vorangegangener Begasung erfolgte.

#### 2.2.3.1 Stimulierung der Zellen mit anschließender Begasung

Für diese Versuche wurden in Membraneinsätze ausgesäte, konfluent gewachsene BEAS-2B (siehe 2.1.2.2) eingesetzt. Das Medium ober- und unterhalb der Membran wurde abgesaugt und durch jeweils 1,5 ml Stimulierungsmedium bzw. Kontrollmedium ersetzt. Die Stimulierungsmedien wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben hergestellt. Erfolgte eine Stimulierung mit partikulären Stimuli wie DQ12 oder Zymosan, wurde das Stimulierungsmedium lediglich im apikalen Kompartiment zugesetzt, während das basolaterale Kompartiment KGM erhielt.

Die Inkubation mit den Stimuli erfolgte über 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurde das Medium im apikalen und basolateralen Kompartiment abgesaugt und weiter wie unter 2.2.2.1 verfahren.

### **2.2.3.2 Begasung der Zellen mit anschließender Stimulierung**

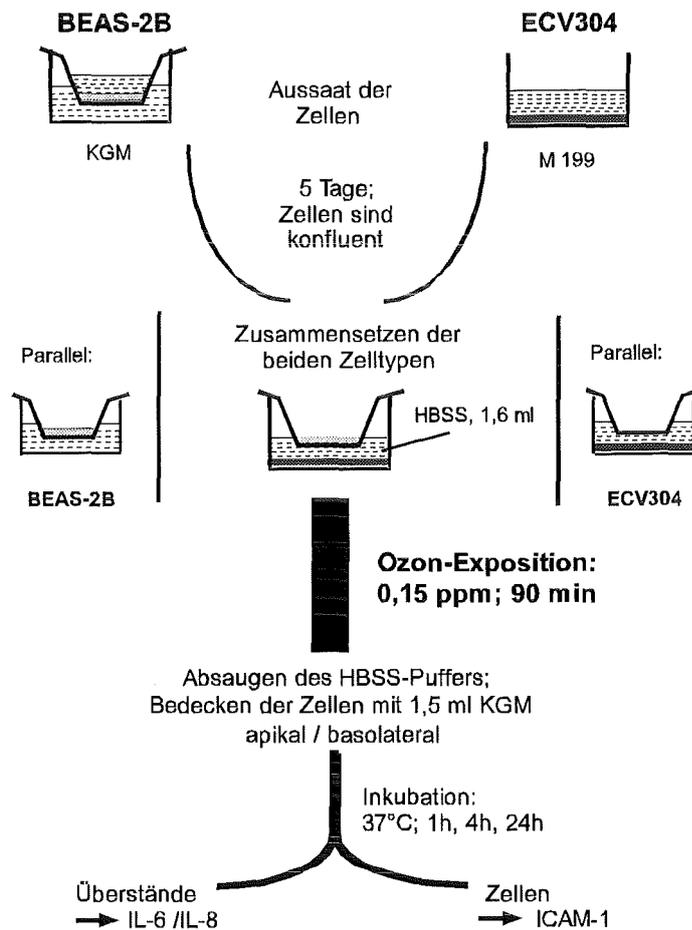
Für derartige Experimente wurden die Zellen wie unter 2.2.2.1 beschrieben behandelt. Nach der Begasung wurden die Zellen statt in KGM-Medium mit dem entsprechenden Stimulierungsmedium bzw. Kontrollmedium (siehe 2.2.1) für 24h inkubiert. Erfolgte eine Stimulierung mit partikulären Stimuli wie DQ12 oder Zymosan, wurde das Stimulierungsmedium lediglich im apikalen Kompartiment zugesetzt, während das basolaterale Kompartiment KGM erhielt.

## **2.3 Kokulturversuche**

### **2.3.1 Begasungsexperimente**

Für Kokulturexperimente mußten BEAS-2B und ECV304 jeweils so ausgesät werden, daß sie am gleichen Tag konfluent gewachsen waren. BEAS-2B wurden in Membraneinsätzen (Transwell<sup>®</sup>-COL, Costar) kultiviert (siehe 2.1.2.2), während die Endothelzellen in 6-Well-Makroplatten (Primaria<sup>®</sup>, Falcon) wuchsen (siehe 2.1.3.2). Unmittelbar vor der Gasexposition wurde das Medium über den Endothelzellen abgesaugt, der Zellrasen mit 1 ml HBSS gewaschen und mit genau 1,6 ml HBSS bedeckt. Die Epithelzellen wurden nach Absaugen des Mediums mit je 1 ml HBSS auf der Oberseite sowie auf der Unterseite der Membran gewaschen. Anschließend wurden die Membraneinsätze mit den BEAS-2B in die Vertiefungen der 6-Well-Platte, auf deren Boden sich die ECV304-Zellen befanden, gesetzt. Wie unter 2.2.2.1 bereits beschrieben, wurden nun mit Hilfe der Abstandhalter aus Glas die Deckel der Kulturplatten lose aufgesetzt und die Zellen zur Exposition in die Begasungskammern (siehe 2.2.2.2) gegeben. Es erfolgte eine 90-minütige Exposition mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon. Anschließend wurde die Flüssigkeit im basolateralen Kompartiment abgesaugt und durch jeweils 1,5 ml KGM-Medium im apikalen sowie im basolateralen Kompartiment ersetzt. Die Zellen inkubierten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Für einige Kokulturexperimente wurden parallel folgende Kontrollen durchgeführt: BEAS-2B-Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt, dann jedoch nicht mit den Endothelzellen zusammengesetzt, sondern in 6-Well-Platten, in denen sich lediglich 1,6 ml HBSS befanden, eingebracht. Der entsprechende Kontrollansatz für die ECV304-Zellen bestand aus 6-Well-Platten mit darin kultivierten ECV304, die mit 1,6 ml HBSS und einem Membraneinsatz, auf dem sich jedoch keine Epithelzellen befanden, bedeckt wurden. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten von 1h, 4h bzw. 24h wurden die Flüssigkeiten des apikalen und basolateralen Kompartiments abgenommen, vereinigt und bis zur Zytokinbestimmung (siehe 2.5) bei -20°C tiefgefroren

gelagert. Die auf der Membran befindlichen BEAS-2B bzw. die am Plattenboden anhaftenden ECV304 wurden gemäß 2.6.1 zur durchflußzytometrischen Analyse des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) weiterverarbeitet. Eine Übersicht über Aufbau und Zeitablauf der Kokulturrexperimente ist in Abb. 6 gegeben.



**Abb. 6: Aufbau und zeitlicher Ablauf der Kokulturrexperimente.**  
Erläuterungen siehe Text.

### 2.3.2 Kokulturrexperimente unter Verwendung von Antikörpern

Derartige Versuche wurden wie unter 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Jedoch wurde den 1,6 ml HBSS, die für die Zeit der Exposition in das basolaterale Kompartiment gegeben wurden, ein Antikörper gegen IL-6 bzw. IL-8 in der Konzentration  $5 \mu\text{l/ml}$  zugesetzt. Die 24-stündige Inkubation nach der Begasung erfolgte in KGM-Medium, das ebenfalls mit den Antikörpern in einer Konzentration von  $5 \mu\text{l/ml}$  versetzt worden war. Eingesetzt wurden die biotinylierten Antikörper, die im ELISA als Detektorantikörper verwendet wurden (siehe 2.5.2).

### **2.3.3 Versuche zur Kombinationswirkung von Ozon und verschiedenen Stimuli im Kokultursystem**

#### **2.3.3.1 Stimulierung der Zellen mit anschließender Begasung**

Bei Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Ozon und verschiedenen Stimuli im Kokultursystem muß beachtet werden, daß eine gezielte Stimulierung der BEAS-2B mit löslichen Stimuli wie TNF- $\alpha$  oder Schwebstaubextrakten gar nicht möglich ist, da diese durch das Membransystem diffundieren und so auch die Endothelzellen erreichen würden. Somit könnten Effekte im Kokultursystem nicht mehr als Folge einer Kommunikation der beiden Zelltypen interpretiert werden, sondern würden schlichtweg auf der direkten Stimulierung der Endothelzellen durch den zugegebenen Stimulus beruhen. Dieses Problem wurde, zumindest teilweise, durch getrennte Vorstimulierung der Zellen umgangen: Im Falle der Schwebstäube wurden BEAS-2B 24h vor der Begasung stimuliert: Das Medium ober- und unterhalb der Membran wurde abgenommen und durch jeweils 1,5 ml Stimulierungs- bzw. Kontrollmedium (siehe 2.2.1.2) ersetzt. Die Zellen inkubierten 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Vor der Begasung wurde das Stimulierungsmedium abgenommen, die Membran gewaschen und weiter wie unter 2.3.1 verfahren. Für Vorstimulierungsversuche mit TNF- $\alpha$  wurden auch ECV304 in Medium 199 für 24h mit TNF- $\alpha$  vorbehandelt. Das Zusammensetzen der Kokultur vor der Begasung ermöglichte dann verschiedene Kombinationen, nämlich Kokultursysteme, in denen beide Zelltypen unstimuliert, vorstimuliert, bzw. nur einer der beiden vorstimuliert war.

#### **2.3.3.2 Begasung der Zellen mit anschließender Stimulierung**

Kokulturversuche zur Kombinationswirkung von Ozon und verschiedenen Stimuli in dieser Reihenfolge konnten nur mit partikulären Stimuli wie Quarzstaub (DQ12) und Zymosan, die das Membransystem nicht durchdringen konnten, durchgeführt werden. Die Versuche erfolgten wie unter 2.3.1 beschrieben. Nach der Exposition wurde den Zellen statt KGM-Medium das entsprechende Stimulierungsmedium (siehe 2.2.1.2) bzw. Kontrollmedium zugesetzt. Die Stimulierungen erfolgten lediglich im apikalen Kompartiment, während in das basolaterale Kompartiment KGM pipettiert wurde. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 24h Inkubationszeit wurden die Flüssigkeiten ober- und unterhalb der Membran abgenommen, vereinigt und bis zur Durchführung der Zytokinbestimmung (siehe 2.5) bei -20°C tiefgefroren. Die auf der Membran bzw. dem Kulturplattenboden anhaftenden Zellen wurden nach 2.6.1 zur durchflußzytometrischen Analyse des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) vorbereitet.

## 2.4 Aufnahme von Wachstumskurven mit ECV304

Wachstumskurven mit ECV304 wurden nach zwei verschiedenen Zeitschemata durchgeführt:

- a) Nach Aussaat in Medium 199 (siehe 2.1.3.2) wurden die Zellen vier Tage in 6-Well-Makroplatten (Primaria<sup>®</sup>, Falcon) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am vierten Tag wurde bei einem Teil der Zellen die Zellzahl und Vitalität bestimmt (siehe unten). Außerdem erfolgte ein Mediumwechsel, wobei ein Teil der Zellen wiederum je 2 ml Medium 199 erhielt, ein anderer 2 ml einer Mischung aus Medium 199 und KGM-Medium zu gleichen Teilen, ein dritter Teil der Zellen wurde mit je 2 ml KGM und ein vierter schließlich mit 2 ml PBS versetzt. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen über weitere drei Tage, wobei an jedem Tag eine Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität für jeden der vier unterschiedlich behandelten Ansätze durchgeführt wurde: Nach Absaugen des Überstandes und Zugeben von 0,5 ml Trypsinlösung in jedes Well wurden die Zellen für 2-3 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Ablösevorgang unter dem Mikroskop beobachtet, wobei genau darauf geachtet wurde, daß sich alle Zellen von der Oberfläche gelöst hatten. Erst dann wurde die Zellsuspension abgenommen und in 5 ml vorgelegten Mediums aufgenommen. Nach zweimaligem Spülen der Kulturplatte mit jeweils 1 ml Medium 199 wurden die Zellen bei 250 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 1 ml Medium 199 aufgenommen. Aus dieser Suspension erfolgte nun die Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl nach 2.7.1.1.
- b) Bereits 24h nach Aussaat der Zellen in Medium 199 (siehe 2.1.3.2) wurde ein Mediumwechsel wie unter a) vorgenommen, wobei die Zellen jeweils entweder 2 ml Medium 199, eine Mischung von Medium 199 und KGM im Verhältnis 1:1, KGM-Medium oder PBS erhielten. Die Zellen inkubierten für weitere vier Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Am fünften Tag, gerechnet ausgehend vom Zeitpunkt der Aussaat, wurde bei einer Hälfte der kultivierten Zellen ein weiterer Mediumwechsel vorgenommen, bei dem lediglich das jeweilige Inkubationsmedium erneuert wurde, während die andere Hälfte der Zellen weiterhin in dem alten Medium kultiviert wurde. Nun erfolgte eine neuerliche Inkubation der Zellen über weitere vier Tage. Vom zweiten Tag an, also einen Tag nach dem ersten Mediumwechsel, wurden täglich Bestimmungen der Vitalität und der Zellzahl für jeden der vier unterschiedlichen Ansätze durchgeführt, wobei ab dem fünften Tag außerdem unterschieden werden mußte zwischen Zellen, die einen zusätzlichen Mediumwechsel erhalten hatten und denen, die über den gesamten Zeitraum von acht Tagen im selben Medium kultiviert worden waren. Das Vorbereiten der Zellen für die Zellzählung nach 2.7.1.1 geschah wie unter a) bereits beschrieben.

## 2.5 Untersuchungen zur Zytokinfreisetzung mittels ELISA

### 2.5.1 Allgemeines Prinzip

Bei den durchgeführten Tests handelte es sich um sogenannte Sandwich-ELISAs, die nach folgendem allgemeinen Prinzip funktionieren: Mikrotiterplatten werden mit einem spezifischen Antigen gegen den zu untersuchenden Parameter beschichtet. Nach Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit einer serumalbuminhaltigen Lösung wird die Probe hinzugefügt und das gebundene Antigen anschließend durch Zugabe eines biotinylierten Antikörpers, der wiederum spezifisch für das gebundene Antigen ist und als Detektorantikörper bezeichnet wird, nachgewiesen. Nach Zupipettieren von peroxidase-gekoppeltem Streptavidin, das an das biotinylierte Ende des Detektorantikörpers hochaffin bindet, wird nun mit Tetramethylbenzidin oder einem ähnlichen Substrat ein Farbstoff gebildet, dessen Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge photometrisch gemessen werden kann und nach dem Lambert-Beer-Gesetz direkt mit der Konzentration des zu bestimmenden Parameters korreliert. Durch Auftragen von Standards mit bekannter Zytokinkonzentration kann die Konzentration des zu bestimmenden Zytokins in der Probe errechnet werden.

### 2.5.2 Verwendete Materialien und Reagenzien

ELISA-Platten	MaxiSorp <sup>®</sup> C96 (Nunc) mit Qualitätszertifikat für eine homogene IgG-Adsorption
Tris-Puffer	Aqua bidest. mit 20 mM Trizma Base (Sigma) 150 mM Natriumchlorid pH 7,3
Waschpuffer	PBS (pH 7,4) mit 0,05% Tween 20 (Boehringer Mannheim)
Phosphat-Citrat-Puffer	25,7 ml einer 0,2 M Lösung von Natriumdihydrogenphosphat (Merck) 24,3 ml einer 0,1 M Lösung von Zitronensäure (Merck) 50 ml Aqua bidest. pH 5
Blockierungslösung	PBS (pH 7,4) mit 1,5% BSA (Sigma) 5% Sucrose (Sigma) 0,05% Natriumazid (Merck)

Beschichtungsantikörper	Monoklonaler Anti-human-IL-6- bzw. IL-8-Antikörper (R&D Systems) in einer Konzentration von 500 µg/ml, gelöst in sterilem PBS. Die Antikörper wurden von einem Maushybridom aus Mäusen, die mit gereinigtem humanen rekombinanten IL-6 bzw. IL-8 aus <i>Escherichia coli</i> immunisiert worden waren, produziert.
Detektorantikörper	Biotinylierter Anti-human-IL-6- bzw. IL-8-Antikörper in einer Konzentration von 50 µg/ml, gelöst in Tris-Puffer mit 0,1% BSA. Die Antikörper stammten aus Ziegen, die mit gereinigtem humanen rekombinanten IL-6 bzw. IL-8 aus <i>Escherichia coli</i> immunisiert worden waren, und wurden anschließend biotinyliert.
Standards	Humanes rekombinantes IL-6 (R&D Systems) bzw. IL-8 (Boehringer Mannheim) aus <i>Escherichia coli</i> in einer Stammkonzentration von 10 µg/ml, gelöst in PBS mit 0,1% BSA. Mit KGM-Medium wurden folgende Verdünnungen hergestellt: IL-6: 300, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 3,125 pg/ml IL-8: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 und 31,25 pg/ml
Streptavidin-HRP-Lösung	Meerrettich-peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (Sigma) in einer Konzentration von 125 ng/ml, gelöst in PBS
Substratlösung	Eine Tetramethylbenzidindihydrochlorid-Tablette (Sigma), gelöst in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 2 µl einer 30%igen Hydrogenperoxidlösung (Merck) zugegeben.
Stopplösung	2 M Schwefelsäure

### 2.5.3 Durchführung des Interleukin-6- bzw. Interleukin-8-ELISA

In eine 96-Well-ELISA-Platte wurden in jede Vertiefung 100 µl des Beschichtungsantikörpers pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit jeweils 360 µl Waschlösung je Well sorgfältig gewaschen. Nun erfolgte der Blockierungsschritt, bei dem 300 µl des Blockierungspuffers in jede Vertiefung gegeben wurden. Es schloß sich eine Inkubationszeit von 2h bei Raumtemperatur an. Nach einem weiteren Waschlösungsvorgang wie oben konnten nun 100 µl der

Proben bzw. Standards auf die Platte gegeben werden. Die Proben waren vorher auf Raumtemperatur gebracht und eventuell verdünnt worden, um zu gewährleisten, daß die gemessenen Absorptionen innerhalb des linearen Standardbereichs lagen. Zusätzlich zu den Proben und Standards wurde KGM-Medium als Leerwert aufgetragen, der später von allen gemessenen Werten abgezogen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2h bei Raumtemperatur und einem erneuten Waschschriff wurde nun ein Volumen von 100 µl des Detektorantikörpers in jede Vertiefung pipettiert und eine weitere zweistündige Inkubationszeit angeschlossen. Danach wurde die Platte wieder gewaschen und jedes Well mit 100 µl der Streptavidin-Peroxidase-Lösung versetzt. Nach nur 20 min Einwirkungszeit und einem letzten Waschschriff wurden 100 µl der Substratlösung in jede Vertiefung gegeben. Über die nächsten 20-30 min wurde die Farbentwicklung beobachtet und zum Zeitpunkt optimaler Färbung die Reaktion mit der Zugabe von je 50 µl Stopplösung abgebrochen. Innerhalb der nächsten 20 min erfolgte nun die photometrische Messung der Absorption mit einem ELISA-Reader (Thermo max<sup>®</sup> microplate reader, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm. Mit Hilfe eines speziellen Auswerteprogramms (SOFTmax<sup>®</sup>, Molecular Devices) wurde eine Standardkurve mittels 4-Parameter-Analyse erstellt. Darauf bezogen konnten die entsprechenden Zytokinkonzentrationen in den Proben errechnet werden.

#### **2.5.4 Durchführung des TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -ELISA**

Die Bestimmung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aus Zellkulturüberständen erfolgte mit kommerziell erhältlichen ELISA-Kits von R&D Systems (TNF- $\alpha$ ) bzw. Endogen (IL-1 $\beta$ ). Die Tests wurden entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt.

### **2.6 Untersuchungen zur ICAM-1-Expression**

#### **2.6.1 Durchflußzytometrische Bestimmung von ICAM-1**

##### **2.6.1.1 Allgemeines Prinzip**

Durchflußzytometer sind opto-elektronische Meßsysteme, die optische Signale unterschiedlicher Qualität wie Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale detektieren. Ein Durchflußzytometer besteht im wesentlichen aus drei Elementen: Einer Lichtquelle, der Durchflußzelle und einem opto-elektronischen Detektionssystem. Als Lichtquelle werden heute hauptsächlich kleine, luftgekühlte Laser verwendet, früher waren auch Quecksilber- oder Xenondampflampen gebräuchlich. Die Durchflußzelle stellt die eigentliche Analysenküvette des Flußzytometers dar. In ihr werden einzelne Zellen, die zuvor aus einem Probenröhrchen angesaugt werden, von Flüssigkeit umspült, perlschnurartig hintereinander aufgereiht und nacheinander durch den Laserstrahl geführt. Im opto-elektronischen Detektionssystem

schließlich werden die Fluoreszenz- und Streulichtwerte jeder einzelnen Zelle, die die Durchflußzelle passiert, quantifiziert. Das System besteht aus einer Reihe von optischen Filtern, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge voneinander trennen, und den Detektoren, sogenannten Photomultiplier Tubes (PMTs). Die PMTs wandeln Licht in elektrische Impulse um, die, noch einmal elektronisch nachverstärkt, digitalisiert und an den Rechner weitergeleitet werden. Dabei korreliert die Höhe des erzeugten Impulses mit der Stärke des Lichtsignals. Durch spezifische Anfärbung von Zellen mit einem gegen einen bestimmten Oberflächenmarker gerichteten fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper kann so über die Messung der Fluoreszenzintensität auf die Stärke der Expression dieses Oberflächenmarkers auf Einzelzellebene geschlossen werden.

### 2.6.1.2 Verwendete Reagenzien

PBS azid	PBS mit 1% Natriumazid (Merck)
Antikörper für die Isotypkontrolle	FITC-konjugierter Anti-Maus-IgG1-Antikörper (Coulter-Immunotech) in einer Konzentration von 50 µg/ml in PBS mit 0,2% BSA und 0,1% Natriumazid. Der Antikörper wurde aus Hybridomzellen der Maus, die mit einem nicht-biologischen Hapten immunisiert worden waren, gewonnen und anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt.
Anti-ICAM-1-Antikörper	FITC-konjugierter Anti-human-ICAM-1-Antikörper (Coulter-Immunotech) in einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS mit 0,2% BSA und 0,1% Natriumazid. Dieser Antikörper wurde von Hybridomzellen der Maus nach Immunisierung mit Zellen der K562-Zelllinie, die eine hohe ICAM-1-Expression aufweisen, produziert und anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt.

### 2.6.1.3 Anti-ICAM-1-Färbeprozedur

Um die Zellen einer durchflußzytometrischen Bestimmung zugänglich zu machen, mußten sie zunächst von der Membran oder der Kulturplatte abgelöst und in Suspension gebracht werden. Während die Endothelzellen ohne Trypsineinwirkung einfach mit 1 ml PBS azid von der Platte abgespült und in ein Eppendorf-Gefäß überführt werden konnten, wurden die

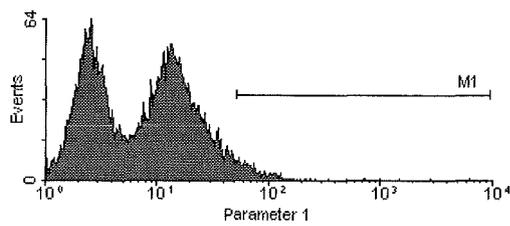
BEAS-2B-Zellen in den 6-Well-Kulturplatten bzw. bei Begasungsversuchen auf den Membraneinsätzen mit 1 ml PET-Lösung (siehe 2.1.2.1) bedeckt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach ca. 10 min Einwirkungszeit ließen sich die Zellen gut ablösen. Nach Resuspendierung wurden sie zur Aufhebung der Trypsinwirkung in ein Eppendorf-Gefäß mit 100 µl vorgelegter SBIT-Lösung (siehe 2.1.2.1) gegeben. Die sich anschließenden Schritte waren nun für beide Zellarten gleich und wurden ausnahmslos bei 4°C durchgeführt. Des Weiteren wurde ausschließlich PBS mit einem Anteil von 1% Natriumazid verwendet, da Azid die Internalisierung von Oberflächenmolekülen durch die Zelle hemmt. Die Zellen wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge (5417 R) 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS azid resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl PBS azid aufgenommen. Nun wurde jede Probe in zwei Probensuspensionen von je 50 µl geteilt. Die eine Hälfte wurde mit 5 µl des Antikörpers für die Isotypkontrolle, die andere Hälfte mit 5 µl des Anti-ICAM-1-Antikörpers versetzt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen bei 4°C im Dunkeln. Danach wurden die Proben jeweils mit 1 ml PBS azid versetzt und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die erneute Aufnahme der Zellen in 750 µl PBS azid und die Überführung in die Probenröhrchen für die durchflußzytometrische Bestimmung (Sarstedt). An dieser Stelle wurde stets durch Abnahme eines Aliquots der Zellsuspension, Trypanblaufärbung und Auszählung in der Neubauer-Kammer die Vitalität überprüft (siehe 2.7.1.1), um einen hohen Anteil toter Zellen, sei es durch die vorangegangene Stimulierung oder die Färbeprozedur, auszuschließen.

Die Messung erfolgte an einem PAS-III Durchflußzytometer (Partec, Münster). Gemessen wurde die Intensität der Grünfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 500-560 nm.

#### **2.6.1.4 Auswertung der durchflußzytometrischen Messung**

Bei einer einparametrischen Messung der Grünfluoreszenz erhielt man zunächst ein einfaches Diagramm, in dem die Fluoreszenzintensität gegen die Zahl der Ereignisse dargestellt war. Ein Beispiel ist in Abb. 7 gegeben. Um nun aber tatsächlich Aussagen treffen zu können über die Größe der Fluoreszenzintensität, die ja mit der Expression des zu messenden Oberflächenmarkers korreliert, mußte zuvor der Anteil der Grünfluoreszenz abgezogen werden, der durch die Eigenfluoreszenz der Zellen oder durch eine unspezifische Bindung des Antikörpers hervorgerufen wurde. Diese Größe erhielt man durch Messung der entsprechenden Isotypkontrolle, also der Probe, die mit einem unspezifischen FITC-konjugierten Antikörper gegen Maus-IgG1 gefärbt worden war. Eine solche Messung ist in Abb. 7a gezeigt. Den Anteil der Grünfluoreszenz, der tatsächlich durch spezifische Bindung des FITC-konjugierten Anti-ICAM-1-Antikörpers an die Zelle hervorgerufen wurde, könnte man nun durch Subtraktion der beiden Kurven erhalten. Eine einfachere Variante war das Setzen von sogenannten Markern. Durch Definieren eines Markers M1 im Diagramm der Isotyp-

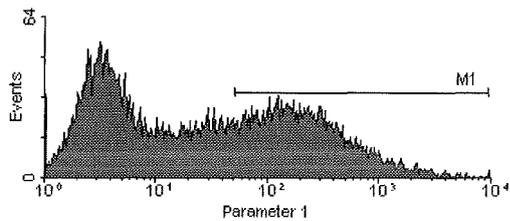
kontrollenmessung (Abb. 7a) und Kopieren dieses Markers in das Diagramm der Probenmessung (Abb. 7b) erhielt man den Intensitätsbereich, in dem sich ausschließlich ICAM-1-positive Zellen befanden. Der prozentuale Anteil dieser ICAM-1-positiven Zellen, bezogen auf die Zahl der Gesamtereignisse, wurde in Prozent angegeben und, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, als Meßgröße verwendet. Nun war aber zu beachten, daß mit diesem Wert keine Aussage über die Stärke der Expression auf der einzelnen Zelle gemacht werden konnte. Erfasst wurden alle ICAM-1-positiven Zellen, unabhängig davon, ob sie eine starke Intensität zeigten, sich also weit rechts auf der Ordinate befanden, oder nur geringfügig stärker als die unspezifische Isotypkontrolle fluoreszierten, also ganz links auf der Ordinate lagen. Eine Bewertung der Stärke der ICAM-1-Expression, bezogen auf die einzelne Zelle, konnte durch Angabe der Lage des Peaks, definiert über das Geometrische Mittel, gemacht werden. Je weiter rechts sich der Peak auf der Ordinate befand, desto mehr ICAM-1-Moleküle waren im Mittel pro Zelle exprimiert. Im allgemeinen korrelierten die beiden Meßparameter miteinander: Zeigten sich insgesamt mehr ICAM-1-positive Zellen, so war auch der Peak nach rechts verschoben, exprimierte also auch die einzelne Zelle im Mittel mehr ICAM-1-Moleküle. Im Ausnahmefall konnte jedoch eine starke Rechtsverschiebung des Peaks beobachtet werden, ohne daß der prozentuale Anteil der ICAM-1-positiven Zellen ebenfalls zunahm. Ein solches Beispiel ist in Abb. 7 unter Angabe der entsprechenden prozentualen Anteile ICAM-1-positiver Zellen und des Geometrischen Mittels des Peaks gezeigt. ECV304-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an TNF- $\alpha$  stimuliert. Nach 24h Stimulierungsdauer wurden die Anti-ICAM-1-Färbungen durchgeführt und die Proben durchflußzytometrisch vermessen. Betrachtete man als Meßgröße lediglich den Anteil ICAM-1-positiver Zellen, so ließe sich kaum ein stimulatorischer Effekt feststellen, während sich das Geometrische Mittel des Peaks mit ansteigenden TNF- $\alpha$ -Konzentrationen deutlich nach rechts verschob (Abb. 7b-e). In diesem Versuch wurde durch die Stimulierung also weniger die Zahl der ICAM-1-exprimierenden Zellen erhöht als vielmehr die Stärke der Expression pro Zelle. In solchen Fällen wurde im Ergebnisteil als Meßparameter das Geometrische Mittel angegeben und gesondert darauf hingewiesen. Auch bei Stimulierungsversuchen mit kleinen Partikeln, wie z.B. DQ12, war es bisweilen nötig, auf die Angabe des Geometrischen Mittels statt des prozentualen Anteils ICAM-1-positiver Zellen zurückzugreifen, da noch vorhandene Partikel in der Probe bei der Messung vom Gerät als Ereignisse mit aufgenommen wurden und somit jeder Auswertungsparameter, der sich prozentual auf die Gesamtheit der Ereignisse bezieht, zu starken Verfälschungen des Ergebnisses geführt hätte. Dieses Problem konnte durch Angabe des Geometrischen Mittels elegant umgangen werden.



## a) Isotypkontrolle

ICAM-1-pos. Zellen: 2,63%

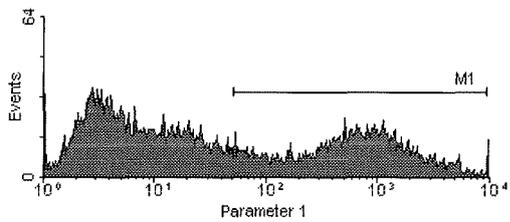
Geometrisches Mittel: 77,74



## b) Unstimulierte Kontrolle

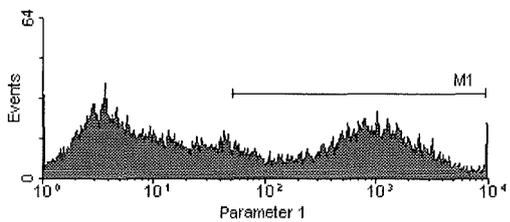
ICAM-1-pos. Zellen: 41,13%

Geometrisches Mittel: 219,77

c) TNF- $\alpha$ : 250 pg/ml

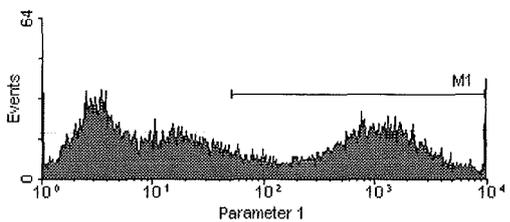
ICAM-1-pos. Zellen: 41,46%

Geometrisches Mittel: 571,35

d) TNF- $\alpha$ : 500 pg/ml

ICAM-1-pos. Zellen: 46,13%

Geometrisches Mittel: 678,27

e) TNF- $\alpha$ : 1000 pg/ml

ICAM-1-pos. Zellen: 45,99%

Geometrisches Mittel: 769,25

**Abb. 7: TNF- $\alpha$ -stimulierte ECV304 als Beispiel für eine durchflußzytometrische ICAM-1-Messung.** Die Achsenbeschriftung wurde von dem Meßgerät automatisch vorgenommen. Auf der Ordinate ist die Intensität der Grünfluoreszenz, als Parameter 1 bezeichnet, logarithmisch aufgetragen. Die Abszisse zeigt die Zahl der aufgenommenen Zellen. Der Marker M1 bezeichnet den Bereich ICAM-1-positiver Zellen. Nähere Erläuterungen siehe Text.

## 2.6.2 Messung der ICAM-1-Expression im ELISA

### 2.6.2.1 Allgemeines Prinzip

Die Messung der ICAM-1-Expression im zellständigen ELISA erfolgte nach dem gleichen Prinzip, wie unter 2.5.1 bereits für die Zytokinbestimmung beschrieben. Während bei dem Zytokin-ELISA der erste Antikörper als Beschichtungsantikörper an die ELISA-Platte gebunden wurde, erfolgte die Bindung des Antikörpers hierbei spezifisch an dem zu bestimmenden Oberflächenmarker auf den zuvor fixierten Zellen. In diesem Test wurde als Detektorantikörper bereits ein peroxidase-gekoppeltes Antigen verwendet, so daß der Umweg über die Streptavidin-Peroxidase, wie sie bei einem biotinylierten Detektorantikörper nötig war, umgangen werden konnte.

### 2.6.2.2 Verwendete Reagenzien

Blockierungslösung	2% BSA in Aqua bidest.
Erster Antikörper	Anti-human-ICAM-1-Antikörper (Boehringer Mannheim) in einer Konzentration von 50 µg/ml. Eingesetzt wurde die 1:1000-Verdünnung des Antikörpers mit PBS/0,1% BSA.
Zweiter Antikörper	Meerrettich-peroxidase-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG1, der aus immunisierten Ziegen gewonnen wurde (Sigma), mit einem Gesamtproteingehalt von 0,5 mg/ml in 0,01 M PBS mit 1% BSA und 0,1% Thimerosal. Eingesetzt wurde die 1:1000-Verdünnung des Antikörpers mit PBS/0,1% BSA.
Antikörper für die Isotypkontrolle	Anti-Maus-IgG1-Antikörper (Coulter-Immunotech) in einer Konzentration von 50 µg/ml in PBS mit 0,2% BSA und 0,1% Natriumazid. Der Antikörper wurde aus Hybridomzellen der Maus, die mit einem nicht-biologischen Hapten immunisiert worden waren, gewonnen. Eingesetzt wurde die 1:1000-Verdünnung des Antikörpers mit PBS/0,1% BSA.
Substratlösung	ABTS <sup>®</sup> -Lösung (Boehringer Mannheim)

### 2.6.2.3 Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA

Die Durchführung des ELISA war für ECV304 und BEAS-2B völlig identisch. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und verworfen, und die in 96-Well-Mikrotiterplatten kultivierten Zellen wurden dreimal mit je 360 µl PBS/Well gewaschen. Anschließend wurden in jede Vertiefung 100 µl eiskalter 70%iger Ethanol gegeben und die Zellen 30 min bei -20°C fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wie oben beschrieben wurde die Platte mit 100 µl Blockierungslösung pro Vertiefung versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen wiederum gewaschen. Während eine Hälfte der Platte nun mit 100 µl des ersten Antikörpers in jede Vertiefung versetzt wurde, wurden auf die andere Hälfte jeweils 100 µl des Antikörpers für die Isotypkontrolle gegeben. Im Anschluß an eine weitere 60-minütige Inkubation bei 37°C und einen erneuten Waschschrift wurden auf die Zellen nun 100 µl des zweiten Antikörpers pipettiert. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurde ein letztes Mal gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von je 150 µl der ABTS<sup>®</sup>-Farblösung pro Well und eine Inkubation von 30-60 min bei Raumtemperatur. Gemessen wurde im ELISA-Reader (Thermo max<sup>®</sup> microplate reader, Molecular Devices) bei 405 nm, wobei die Werte der Isotypkontrolle von denen der mit dem Anti-ICAM-1-Antikörper behandelten Zellen abgezogen wurden.

### 2.6.3 Immunhistochemische Anti-ICAM-1-Färbung

#### 2.6.3.1 Verwendete Reagenzien

PBS azid	PBS mit 0,1% Natriumazid
Blockierungslösung	2% BSA in Aqua bidest.
Erster Antikörper	Anti-human-ICAM-1-Antikörper (Boehringer Mannheim) in einer Konzentration von 50 µg/ml. Eingesetzt wurde die 1:1000-Verdünnung des Antikörpers mit PBS/0,1% BSA.
Zweiter Antikörper	Meerretich-peroxidase-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG1, der aus immunisierten Ziegen gewonnen wurde (Sigma), mit einem Gesamtproteingehalt von 0,5 mg/ml in 0,01 M PBS mit 1% BSA und 0,1% Thimerosal. Eingesetzt wurde die 1:1000-Verdünnung des Antikörpers mit PBS/0,1% BSA.

Antikörper für die Isotypkontrolle	Anti-Maus-IgG1-Antikörper (Coulter-Immunotech) in einer Konzentration von 50 µg/ml in PBS mit 0,2% BSA und 0,1% Natriumazid. Der Antikörper wurde aus Hybridomzellen der Maus, die mit einem nicht-biologischen Hapten immunisiert worden waren, gewonnen. Eingesetzt wurde die 1:1000-Verdünnung des Antikörpers mit PBS/0,1% BSA.
DAB-Chromogenlösung	5 Tropfen Diaminobenzidin-Chromogen-Konzentrat (Coulter-Immunotech) 2 Tropfen 3%ige Hydrogenperoxidlösung 5 ml PBS.

### 2.6.3.2 Durchführung der immunhistochemischen Anti-ICAM-1-Färbung

In Chamber Slides (Lab-Tek<sup>®</sup>, Nunc) ausgesäte konfluente BEAS-2B (siehe 2.1.2.2) wurden für 24h mit 1 ml Stimulierungs- bzw. Kontrollmedium (siehe 2.2.1.2) pro Kammer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt, die Zellen dreimal mit je 2 ml PBS azid gewaschen und für 30 min mit je 2 ml eiskaltem 70%igen Ethanol bei -20°C fixiert. Nach Abnehmen des Fixativs und einem erneuten Waschschrift wie oben wurden die Zellen jeweils mit einem Milliliter Blockierungslösung versetzt und 60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluß an einen weiteren Waschschrift wurde je ein Ansatz mit 1 ml des ersten Antikörpers bzw. mit dem Antikörper für die Isotypkontrolle für 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und weitere 2h mit der zweiten Antikörperlösung inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe von je 2 ml der DAB-Chromogenlösung in jeden Ansatz. Über die folgenden 20-40 min wurde die Farbentwicklung beobachtet. War eine optimale Färbung erreicht, wurden die Präparate unter fließendem Wasser gewaschen, bei Raumluft getrocknet und mit Eukitt<sup>®</sup> (Kindler, Freiburg) eingedeckelt. Die Zellen wurden bei 50- und 125-facher Vergrößerung im Mikroskop betrachtet (Aristoplan, Leitz) und mit Hilfe eines automatischen Kamerasystems (Orthomat E, Leitz) fotografiert.

## 2.7 Morphologische und biochemische Untersuchungen

### 2.7.1 Lichtmikroskopie

#### 2.7.1.1 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl aus einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer durchgeführt. Zur parallelen Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde die

Trypanblau-Ausschlußmethode nach Hanks und Wallace (1958) angewendet. Sie beruht auf der Tatsache, daß Trypanblau die Zellmembranen intakter Zellen nicht durchdringen kann, wohl aber die toter Zellen, so daß diese eine tiefblaue Färbung annehmen. Ein Aliquot der in Suspension vorliegenden Zellen wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblaulösung (siehe 2.1.2.1) gemischt und in die Neubauer-Kammer eingebracht. Gegebenenfalls mußte die Suspension zuvor noch in geeigneter Weise verdünnt werden. Die Netzteilung der Kammer bestand aus neun großen Quadraten mit einer Fläche von jeweils  $1 \text{ mm}^2$ . Dies ergab bei einer Tiefe von  $0,1 \text{ mm}$  ein Volumen von  $0,1 \mu\text{l}$ . Nach Auszählen der lebenden und der toten Zellen in mindestens 4 Quadraten bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Leitz Diaplan) und Bilden des Mittelwertes konnte die Zellzahl pro Milliliter durch Multiplikation des Mittelwertes mit  $2 \cdot 10^4$  errechnet werden. War die Suspension vor Einbringen in die Neubauer-Kammer verdünnt worden, so mußte der Verdünnungsfaktor in der Berechnung entsprechend berücksichtigt werden. Die Vitalität der Zellen ergab sich schließlich nach der Formel

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Zahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \times 100\%.$$

### 2.7.1.2 Hämatoxyllin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxyllin-Eosin-Färbung wurde in Chamber Slides (Lab-Tek<sup>®</sup>, Nunc) durchgeführt. Konfluente BEAS-2B (siehe 2.1.2.2) bzw. ECV304 (siehe 2.1.3.2) wurden in Bouin'scher Lösung (15 Teile gesättigte Pikrinsäurelösung (Merck), 5 Teile Formalin, 1 Teil Eisessig) für ca. 2h fixiert. Anschließend erfolgte die Hämatoxyllin-Färbung der Zellen mit Accustain<sup>®</sup> (Sigma) für 7-10 min. Dann wurden die Präparate mit Aqua bidest. gespült, 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und wiederum mit Aqua bidest. gespült. Daran schloß sich für 1-2 min die Eosin-Gegenfärbung in einer 1%igen wäßrigen Lösung von Eosin (Sigma) mit einem Tropfen Eisessig auf 100 ml an. Nach Differenzieren in Wasser wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol getaucht und mit Eukitt<sup>®</sup> (Kindler, Freiburg) eingedeckelt. Die Zellen wurden bei 312-facher Vergrößerung im Mikroskop betrachtet (Aristoplan, Leitz) und mit Hilfe eines automatischen Kamerasystems (Orthomat E, Leitz) fotografiert.

### 2.7.1.3 Morphologie quarzstaub-beladener BEAS-2B

In Chamber Slides (Lab-Tek<sup>®</sup>, Nunc) ausgesäte, konfluente BEAS-2B (siehe 2.1.2.2) wurden mit 1 ml Stimulierungsmedium (siehe 2.2.1.2) pro Kammer bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt, die Zellen dreimal mit je 2 ml PBS gewaschen und in Bouin'scher Lösung fixiert (siehe 2.7.1.2). Die Betrachtung und

photografische Dokumentation der Zellen erfolgte mit und ohne Verwendung eines Polarisationsfilters im Lichtmikroskop (Dialux 20 EB, Leitz) bei 1000-facher Vergrößerung unter Öl.

#### **2.7.1.4 Morphologie der ECV304 in verschiedenen Medien**

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen zur Morphologie der ECV304 in verschiedenen Medien wurde nach Aussaat der Zellen (siehe 2.1.3.2) nach den gleichen Zeitschemata wie bei der Durchführung der Wachstumskurven (siehe 2.4) verfahren. Anstelle der Bestimmung von Vitalität und Zellzahl wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten die Morphologie der Zellen in einem Inversmikroskop (Leitz Fluovert) beobachtet und bei einer 125-fachen Vergrößerung fotografisch dokumentiert. Hierfür diente eine Fotoausrüstung der Firma Wild (Photoautomat MPS 45, Kamera MPS 51 S).

### **2.7.2 Rasterelektronenmikroskopie**

#### **2.7.2.1 Allgemeines Prinzip**

Die Rasterelektronenmikroskopie stellt eine Sonderform der Elektronenmikroskopie dar. Dabei wird das darzustellende Objekt zeilenweise durch einen feinen Elektronenstrahl abgetastet. Die Intensität der rückgestreuten Elektronen oder der vom Präparat aufgenommene Elektronenstrom steuert die Helligkeit eines Fernsehmonitors, dessen Elektronenstrahl synchron zum Elektronenstrahl im Rasterelektronenmikroskop abgelenkt wird, so daß sich eine Punkt-zu-Punkt-Zuordnung zwischen Objekt und Bild ergibt. Wegen des geringen Öffnungswinkels des Elektronenstrahls im Rasterelektronenmikroskop haben die Bilder große Tiefenschärfe. Die Methode eignet sich deshalb besonders zur dreidimensionalen Darstellung von Oberflächenstrukturen, wobei die Bilder durch ihre Plastizität bestechen.

#### **2.7.2.2 Verwendete Reagenzien**

0,2 M Cacodylatpuffer	21,4 g Natriumcacodylat · 3 H <sub>2</sub> O (Serva) Aqua bidest. ad 500 ml pH 7,0
25% Glutaraldehyd	Serva, durch Aktivkohle filtriert
4%ige Osmiumtetroxidlösung	1,0 g Osmiumtetroxid (Roth) Aqua bidest. ad 25 ml

Puffer A	10 ml 0,2 M Cacodylatpuffer 4 ml 25% Glutaraldehyd (Roth) 6 ml Aqua bidest.
Puffer B	10 ml 0,2 M Cacodylatpuffer 10 ml Aqua bidest. 7% Sucrose
Puffer C	10 ml 0,2 M Cacodylatpuffer 10 ml 4%ige Osmiumtetroxidlösung
Hexamethyldisilazan	Sigma

### 2.7.2.3 Morphologie der ECV304 in verschiedenen Medien

Die Zellen wurden wie unter 2.1.3.2 beschrieben in Medium 199 in Membraneinsätze mit Polyestermembranen (Transwell<sup>®</sup>-CLEAR, Costar) ausgesät. Mediumwechsel erfolgten in Anlehnung an die Zeitschemata für die Wachstumskurven (siehe 2.4):

- a) Vier Tage nach Aussaat wurde das Medium ober- und unterhalb der Membran abgesaugt und bei einem Teil der Zellen durch frisches Medium 199, jeweils 2 ml im apikalen und 2,5 ml im basolateralen Kompartiment, ersetzt. Ein weiterer Teil der Zellen erhielt eine Mischung aus Medium 199 und KGM im Verhältnis 1:1, während ein dritter Teil mit KGM-Medium versetzt wurde. Nun erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für weitere drei Tage, wobei an jedem Tag aus jedem der drei unterschiedlich behandelten Ansätzen eine Membran für die Rasterelektronenmikroskopie fixiert wurde (siehe unten).
- b) Nach Aussaat der Zellen wurden diese 24h in Medium 199 kultiviert. Danach erfolgte wie unter a) ein Mediumwechsel: Ein Drittel der Zellen erhielt wiederum Medium 199, 2 ml im apikalen und 2,5 ml im basolateralen Kompartiment. Die beiden anderen Drittel wurden entsprechend mit einer Mischung aus gleichen Teilen Medium 199 und KGM bzw. mit KGM versetzt. Die Zellen wurden weitere vier Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und am fünften Tag nach der Aussaat für die Rasterelektronenmikroskopie fixiert.

Die Membran wurde aus den Einsätzen mit einem Skalpell herausgeschnitten. Nun erfolgte die Fixierung und Präparation der Zellen für die Rasterelektronenmikroskopie: Die Membran wurde dreimal mit 2 ml PBS gewaschen und auf Eis nacheinander jeweils 30 min mit Puffer A, B und C behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Aqua bidest. gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe von 35, 70, 85, 95 und schließlich 100% mit jeweils 5 min Einwirkungszeit entwässert. Zum Schluß erfolgte eine 5-minütige Überschichtung der

Zellen mit Hexamethyldisilazan. Die Membranen wurden kurz an der Luft getrocknet und bis zur Goldbedampfung im Exsikkator aufbewahrt. Die rasterelektronischen Aufnahmen wurden von Herrn H. Thiele (Europäisches Institut für Transurane, Karlsruhe) an einem Philips SEM 515 angefertigt.

## **2.8 Untersuchung von Schwesterchromatidaustauschen**

### **2.8.1 Metaphasenpräparation der BEAS-2B**

BEAS-2B wurden wie unter 2.1.2.2 beschrieben in Transwell<sup>®</sup>-Membransystemen ausgesät. Am dritten Tag nach der Aussaat erfolgte eine 90-minütige Exposition mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon (siehe 2.2.2.1). Nach der Begasung wurde wie gewohnt die Flüssigkeit im basolateralen Kompartiment abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit je 1,5 ml KGM-Medium ober- und unterhalb der Membran versetzt und für 24h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem im apikalen wie im basolateralen Kompartiment je 1,5 ml KGM-Medium mit Bromdesoxyuridin (BrdU, Calbiochem) in einer Endkonzentration von 15 µg/ml zugesetzt wurden. Es schloß sich eine weitere Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 72h an. Die Inkubationszeit von 72h wurde gewählt, um einen möglichst hohen Anteil an Metaphasen zu erhalten, die bereits zwei Zellzyklen durchlaufen hatten. Während der letzten drei Stunden vor Kulturende wurde den Zellen zur Akkumulierung von Metaphasen Colcemid (Sigma) in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugesetzt. Dann wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen unter Einwirkung von 1 ml PET-Lösung (siehe 2.1.2.1) von den Membranen abtrypsiniert und in vorgelegte 100 µl SBIT-Lösung (2.1.2.1) pipettiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm für 15 min. Danach begann die eigentliche Chromosomenpräparation nach Speit (1987). Die Überstände über den Pellets wurden abgesaugt, die Zellen mit 3,5 ml einer auf 37°C vorgewärmten 0,075 M Kaliumchloridlösung aufgewirbelt und 10 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> hypotonisch behandelt. Im Anschluß daran wurde die Zellsuspension erneut für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment mit einer frisch angesetzten, eiskalten Methanol-Eisessig-Mischung im Verhältnis 3:1 fixiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde erneut Fixierlösung zugegeben. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, bevor das gereinigte Zellsediment in 200 µl eiskaltem Fixativ aufgenommen und die Suspension zur Anfertigung der mikroskopischen Präparate auf Objektträger aufgetropft wurde. Die Objektträger waren zuvor 1h freistehend in eine mit einem Ether-Alkohol-Gemisch im Verhältnis 1:1 gefüllte Küvette eingestellt, im Anschluß daran mindestens 1h unter fließendem Leitungswasser gespült und letztlich in kaltem Aqua bidest. bis zum Auftropfen der Zellen aufbewahrt worden. Nach einer Trocknungszeit der Objektträger von 1 bis 2 Tagen bei Raumluft erfolgte die Differentialfärbung der Präparate wie im folgenden beschrieben.

### 2.8.2 Differentialfärbung der Chromatiden

Für die Differentialfärbung der Chromatiden wurde eine modifizierte Fluoreszenz-plus-Giemsa-Methode (FPG-Methode) nach Goto *et al.* (1978) angewendet, die bei Wolff *et al.* (1984) und Speit (1989) nachgelesen werden kann. Ein bis zwei Tage alte Metaphasenpräparate wurden 20 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H 33258 (Riedel de Haën) in einer mit Aluminiumfolie umhüllten Küvette behandelt. Der Farbstoff war in Aqua bidest. in einer Endkonzentration von 5 µg/ml gelöst. Nach der Fluoreszenzfärbung wurden die Präparate mit Aqua bidest. gespült, mit einigen Tropfen Sörensen-Puffer überschichtet, einem Deckglas bedeckt und für 5 min auf einer auf 45°C vorgeheizte Wärmeplatte mit zwei Schwarzlichtlampen (Philips TL, 20W/08, F20T12 BLB) bei einer Wellenlänge von 360 nm und einem Abstand der Lampen zum Präparat von 2 cm bestrahlt. Nach dem Abspülen der Deckgläser mit Aqua bidest. wurden die Präparate direkt mit einer frisch hergestellten 5%igen Giemsa-Lösung (Stammlösung: Merck) in Sörensen-Puffer für 5 min gefärbt, mit drei Portionen Aqua bidest. gespült, 24h luftgetrocknet und, mit Xylol befeuchtet, schließlich in Eukitt® (Kindler, Freiburg) eingedeckelt.

### 2.8.3 Auszählung der Schwesterchromatidaustausche

Pro Probe wurden 30 gut gespreitete Metaphasen analysiert. Diese mußten sich in der zweiten Teilung befinden und die artspezifische Zentromerenzahl aufweisen. Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop (Dialux 20 EB, Leitz) bei 1250-facher Vergrößerung, wobei jeder Farbwechsel von einer Chromatide auf die andere als Schwesterchromatidaustausch (SCE) gewertet wurde. SCEs am Chromatidenende wurden nur gezählt, wenn gegenüber dem dunklen Segment am Ende der hellen Chromatide auch tatsächlich ein helles Segment am Ende der dunklen Chromatide zu erkennen war. Farbwechsel im Zentromerenbereich wurden nur dann gezählt, wenn ein "Twist", das heißt eine Überschlagung der Chromosomenarme im Zentromerenbereich, auszuschließen war.

## 2.9 Statistik

Bei allen in den Abbildungen dargestellten Meßdaten handelt es sich um arithmetische Mittelwerte. Die Anzahl der Versuche und die entsprechenden Stichprobenzahlen können den Abbildungslegenden entnommen werden. Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder, welcher der Standardabweichung, dividiert durch die Wurzel der Stichprobenzahl, entspricht. Die statistische Signifikanzanalyse des Unterschiedes zweier Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Tests nach Student durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde dann angenommen, wenn  $p < 0,05$  war.

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen mit Luft, Ozon, Quarzstaub und Staubextrakten sowie mit den Stimuli Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Lipopolysaccharid und Zymosan behandelt. Für sämtliche dieser durchgeführten Inkubationen wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Dabei zeigte keiner der verwendeten Stimuli bei den eingesetzten Konzentrationen und Inkubationszeiten einen Einfluß auf die Zellvitalität. Diese lag stets bei Werten > 98%.

#### 3.1 Wirkungen von Luftschadstoffen (Ozon, Stäube) auf die Bildung von Entzündungsparametern bei Bronchialepithelzellen (BEAS-2B)

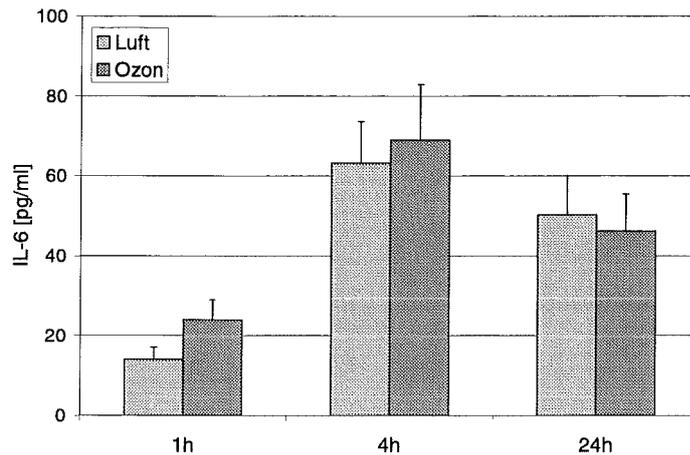
Gegenstand des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) nach Exposition mit Luftschadstoffen. Schwerpunktmäßig wurde dabei die Wirkung von Ozon, aber auch die von Stäuben und Staubextrakten, untersucht. Repräsentativ für eine Vielzahl freigesetzter Entzündungsmarker wurde die Interleukin-6- (IL-6-) und Interleukin-8- (IL-8-) Freisetzung der Zellen sowie die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) gemessen. Des weiteren wurde die Frage nach immunmodulierenden Eigenschaften des Ozons sowie die nach Kombinationswirkungen zwischen Stäuben bzw. Staubextrakten und Ozon bearbeitet.

##### 3.1.1 Beeinflussung der Bildung von Entzündungsparametern bei BEAS-2B durch Ozon

Für Begasungsexperimente mit Ozon wurde stets eine Konzentration des Schadgases von 0,15 ppm eingesetzt. Dies entspricht durchaus umweltrelevanten Konzentrationen. Die Expositionszeit betrug 90 min.

##### *IL-6-Sekretion*

In Abb. 8 ist die IL-6-Freisetzung bei BEAS-2B 1h, 4h und 24h nach 90-minütiger Begasung mit Luft bzw 0,15 ppm Ozon dargestellt. Ozonbegaste Zellen sezernierten erhöhte Mengen an IL-6 verglichen mit luftbegasteten Kontrollzellen. Das Maximum der IL-6-Freisetzung war 24h nach Begasung bereits überschritten.

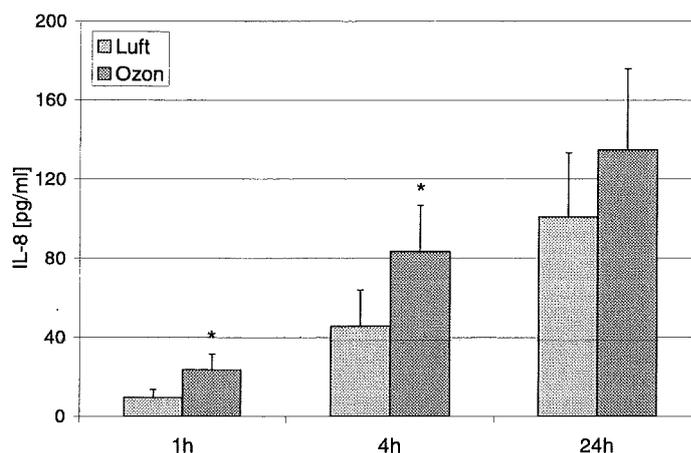


**Abb. 8: IL-6-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 1h, 4h und 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

### IL-8-Sekretion

Die ozoninduzierte Erhöhung der IL-8-Freisetzung bei BEAS-2B ist in Abb. 9 gezeigt. Dieser Ozoneffekt war 1h und 4h nach 90-minütiger Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon statistisch signifikant. Anders als bei der Interleukin-6-Freisetzung (siehe Abb. 8) stiegen die IL-8-Mengen 24h nach Begasung weiter an.

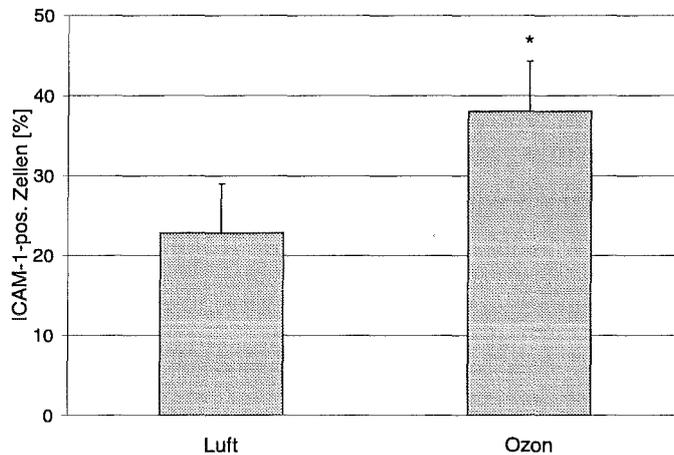


**Abb. 9: IL-8-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 1h, 4h und 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler ( $\pm$  SEM) der Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=4). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen luftexponierter Zellen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### ICAM-1-Expression

Wie in Abb. 10 dargestellt, führte die 90-minütige Exposition von BEAS-2B mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon nach 24h Inkubation zu einem statistisch signifikanten Anstieg der ICAM-1-Expression verglichen mit der Expression auf luftexponierten Kontrollzellen.



**Abb. 10: ICAM-1-Expression auf luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen von den Membranen unter Trypsineinwirkung abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten (n=7). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen luftexponierter Zellen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

Es kann festgestellt werden, daß eine 90-minütige Exposition der Bronchialepithelzellen mit 0,15 ppm Ozon eine verstärkte Bildung der Entzündungsparameter Interleukin-6, Interleukin-8 und ICAM-1, verglichen mit luftexponierten Zellen, bewirkt.

### 3.1.2 Beeinflussung der Immunantwort von BEAS-2B auf verschiedene Stimuli durch Ozon

Um mögliche immunmodulierende Eigenschaften von Ozon auf Bronchialepithelzellen feststellen zu können, wurde zunächst die dosis- und zeitabhängige Bildung der Entzündungsparameter IL-6, IL-8 und ICAM-1 als Antwort auf Stimulierungen mit Zytokinen wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie mit Standardstimuli wie Zymosan und Lipopolysaccharid (LPS) überprüft. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  waren in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, da sie typische Makrophagenprodukte darstellen, die im Falle eines beginnenden Entzündungsgeschehens in der Lunge von diesen freigesetzt werden, und somit zum Bronchialepithel gelangen können. Dagegen stellen Zymosan, ein Zellwandbestandteil von *Saccharomyces cerevisiae*, und LPS, das eine Zellwandkomponente

gramnegativer Bakterien ist, Standardstimuli dar, die wegen ihrer hohen Antigenität häufig eingesetzt werden.

### 3.1.2.1 Stimulierung mit TNF- $\alpha$

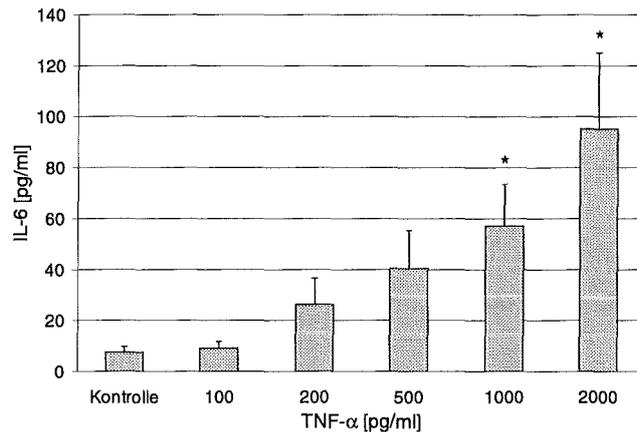
TNF- $\alpha$  wurde, wie bereits oben erwähnt, als Stimulus ausgewählt, da er, von Alveolar-makrophagen ausgeschüttet, eine wichtige Rolle für das Epithel der Atemwege spielt. Letzteres gilt besonders auch im Zusammenhang mit Ozon. So zeigte Mosbach (1994) signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Werte bei ozonexponierten Rinderalveolarmakrophagen. Doch gehen viele andere immunologisch wirksame Ereignisse in der Lunge ebenfalls mit erhöhten TNF- $\alpha$ -Freisetzungen einher, was dessen herausragende Rolle im Immunsystem unterstreicht. Somit gewinnt auch die Frage an Interesse, inwieweit durch Ozon die immunologische Wirkung des Tumor-Nekrose-Faktors- $\alpha$  auf Bronchialepithelzellen verstärkt oder abgeschwächt werden kann.

#### *Stimulierung mit TNF- $\alpha$ ohne Begasung*

Zunächst wurden Stimulierungsversuche mit TNF- $\alpha$  ohne die Begasung der Zellen mit Luft oder Ozon durchgeführt, um die Zeit- und Dosisabhängigkeit des TNF- $\alpha$ -Effektes auf die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 sowie die ICAM-1-Expression bei BEAS-2B zu überprüfen.

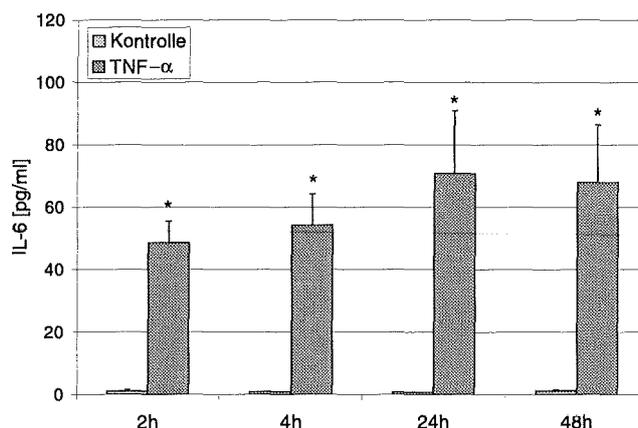
#### a) IL-6-Sekretion

Abb. 11 zeigt die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 nach 24-stündiger Inkubation von BEAS-2B mit steigenden Konzentrationen an TNF- $\alpha$ . Dabei war eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung zu beobachten. Stimulierungen mit Konzentrationen von 1000 pg/ml und 2000 pg/ml führten zu IL-6-Freisetzungen, die sich statistisch signifikant von denen der unstimulierten Kontrollzellen unterschieden.



**Abb. 11: Dosisabhängige Freisetzung von IL-6 bei BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit TNF- $\alpha$ .** Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert bis sich ein konfluenter Monolayer gebildet hatte. Danach wurde das Kulturmedium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium mit steigenden Konzentrationen an TNF- $\alpha$  ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Abnahme der Überstände und deren IL-6-Analyse mit ELISA. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=6) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittels ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

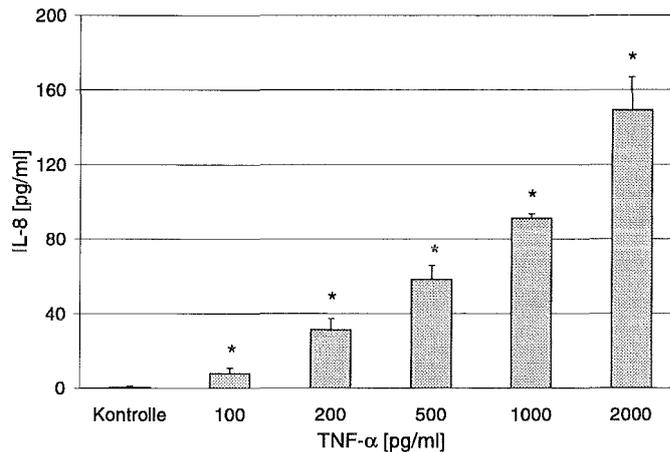
In Abb. 12 ist der Zeitverlauf der TNF- $\alpha$ -induzierten IL-6-Freisetzung bei BEAS-2B dargestellt. Die Zellen wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  inkubiert. Unstimulierte Kontrollzellen zeigten über die Zeit gleichbleibend niedrige IL-6-Konzentrationen. Zu allen Zeitpunkten wiesen TNF- $\alpha$ -aktivierte Zellen signifikant erhöhte IL-6-Werte auf verglichen mit denen der zugehörigen Kontrollen. Dabei schien ein Maximum der IL-6-Sekretion nach 24h Stimulierung erreicht zu sein. Interessanterweise waren bereits nach 2-stündiger Inkubation mit TNF- $\alpha$  69% der maximalen IL-6-Freisetzung zum Zeitpunkt 24h erreicht.



**Abb. 12: Zeitabhängige Freisetzung von IL-6 bei BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$ .** Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten abgenommenen Überstände wurden mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen zugehöriger Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

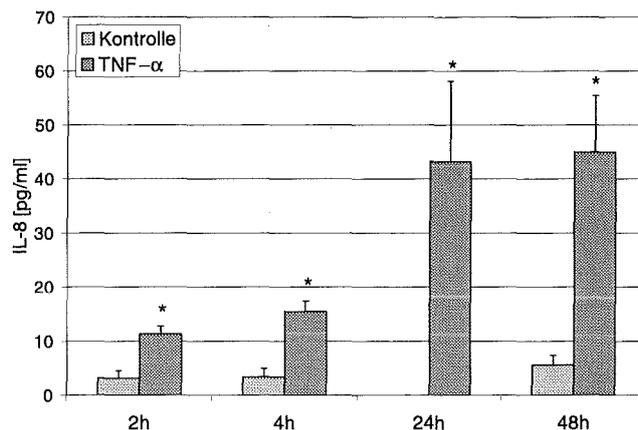
## b) IL-8-Sekretion

Die konzentrationsabhängige Interleukin-8-Sekretion bei TNF- $\alpha$ -stimulierten BEAS-2B ist in Abb. 13 zu sehen. Genauso wie die TNF- $\alpha$ -induzierte IL-6-Freisetzung (siehe Abb. 11) folgte die IL-8-Sekretion einer strengen Dosis-Wirkungs-Beziehung. Bereits die geringste eingesetzte TNF- $\alpha$ -Konzentration von 100 pg/ml führte zu signifikant erhöhten IL-8-Freisetzungen verglichen mit den Werten der unstimulierten Kontrolle.



**Abb. 13: Dosisabhängige Freisetzung von IL-8 bei BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit TNF- $\alpha$ .** Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert bis sich ein konfluenter Monolayer gebildet hatte. Danach wurde das Kulturmedium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium mit steigenden Konzentrationen an TNF- $\alpha$  ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Abnahme der Überstände und deren Untersuchung auf IL-8 mit ELISA. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=6) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittels ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

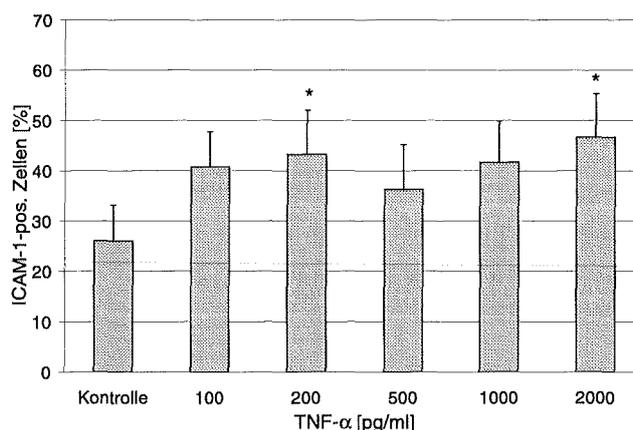
Wird der zeitliche Verlauf der TNF- $\alpha$ -induzierten IL-8-Freisetzung betrachtet, der in Abb. 14 gezeigt ist, so stellt man zu allen gemessenen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der IL-8-Sekretion bei stimulierten Zellen, verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen, fest. Ein Maximum der IL-8-Freisetzung schien nach 24h Stimulierung erreicht. Verglichen mit der IL-6-Freisetzung (siehe Abb. 12) erfolgte der Anstieg der IL-8-Mengen langsamer. Zum Zeitpunkt 2h waren erst 26% der maximalen Konzentration zum Zeitpunkt 24h erreicht.



**Abb. 14: Zeitabhängige Freisetzung von IL-8 bei BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$ .** Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten abgenommenen Überstände wurden mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen zugehöriger Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### c) ICAM-1-Expression

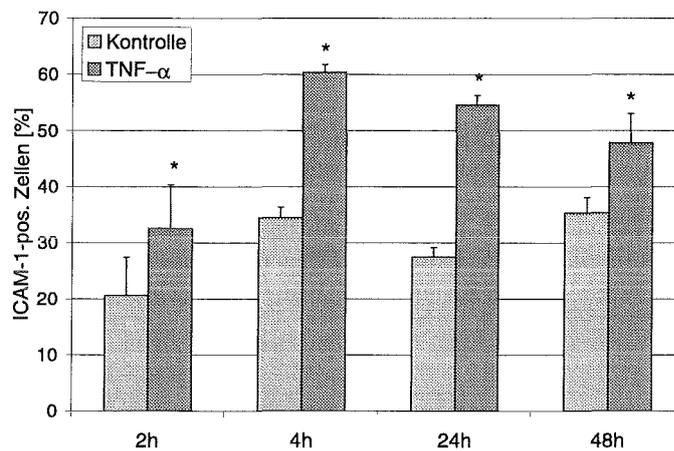
Wie in Abb. 15 dargestellt, führte die Stimulierung von BEAS-2B mit TNF- $\alpha$  zu einer Induktion der ICAM-1-Expression. Für TNF- $\alpha$ -Konzentrationen von 200 pg/ml und 2000 pg/ml war eine statistisch signifikante Erhöhung der ICAM-1-Expression, verglichen mit der Kontrolle, feststellbar. Jedoch konnte, anders als bei den Freisetzungen der Zytokine IL-6 und IL-8, keine eindeutige Dosisabhängigkeit gezeigt werden. Bemerkenswert war auch die verhältnismäßig hohe ICAM-1-Expression von 26% bereits in der unstimulierten Kontrolle.



**Abb. 15: Dosisabhängige ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit steigenden Konzentrationen an TNF- $\alpha$ .**

Die Zellen wurden in 6-Well-Makroplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Medium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte das Ablösen der Zellen unter Trypsinwirkung und deren durchflußzytometrische Untersuchung auf ICAM-1. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=4) mit den entsprechenden Standardfehlern ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

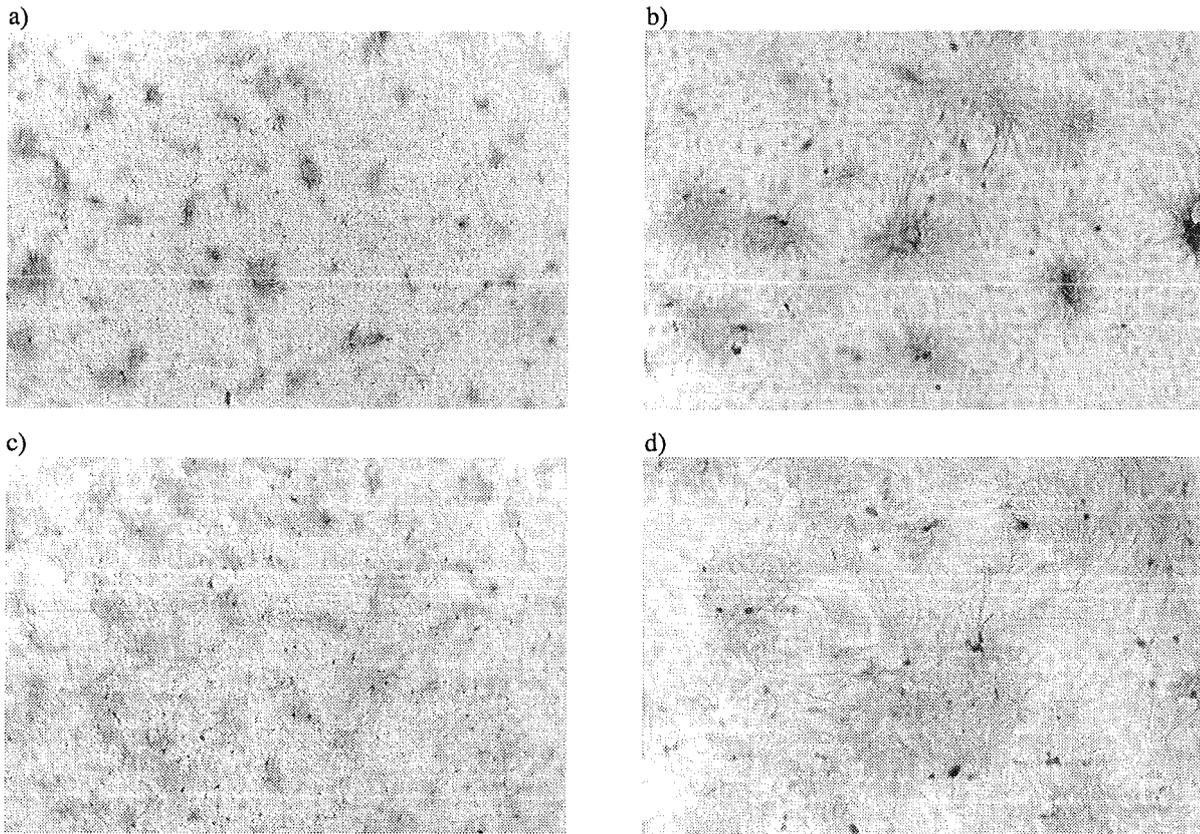
Abb. 16 demonstriert die ICAM-1-Expression auf TNF- $\alpha$ -behandelten BEAS-2B nach 2h, 4h, 24h und 48h Stimulierungsdauer. Zu jedem dieser Zeitpunkte war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikant erhöhte ICAM-1-Expression auf TNF- $\alpha$ -stimulierten BEAS-2B zu beobachten. Gleichzeitig zeigten die unstimulierten Zellen aber eine nicht unbeträchtliche konstitutive ICAM-1-Expression von 29% im Durchschnitt. Eine maximale ICAM-1-Expression wurde nach 4h Stimulierung erreicht.



**Abb. 16: Zeitabhängige ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$ .**

Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Platten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der zugehörigen Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

In Abb. 17 ist eine immunhistochemische ICAM-1-Färbung auf TNF- $\alpha$ -aktivierten BEAS-2B und den zugehörigen Kontrollzellen gezeigt. In der unstimulierten Kontrolle war deutlich, daß ICAM-1, erkennbar an der Bildung von braunem DAB-Präzipitat, nicht gleichmäßig über den gesamten Monolayer verteilt vorlag, sondern einzelne Gruppierungen von Zellen Areale stärkerer ICAM-1-Expression formten (Abb. 17a,b). Nach 24h Stimulierung mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  war die ICAM-1-Expression auf den Zellen deutlich erhöht. Dies zeigte sich neben einer insgesamt stärkeren Braunfärbung des Präparates in einer höheren Dichte und Größe der oben erwähnten Foci stärkerer ICAM-1-Expression (Abb. 17c,d).



**Abb. 17: ICAM-1-Expression auf TNF- $\alpha$ -stimulierten BEAS-2B.**

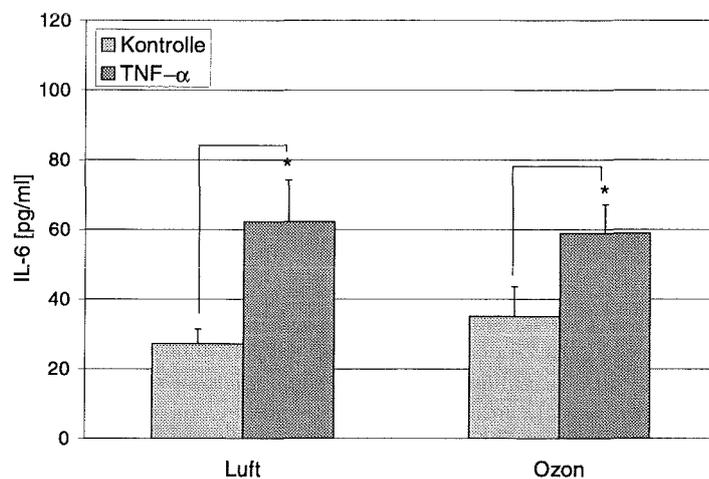
BEAS-2B wurden in Chamber Slides ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  für 24h stimuliert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen und eine immunhistochemische ICAM-1-Färbung. In Abb. 17a und b sind jeweils die unstimulierten Kontrollzellen gezeigt, aufgenommen bei einer 50- bzw. 125-fachen Vergrößerung. Abb. 17c und d stellen die TNF- $\alpha$ -stimulierten Zellen bei den entsprechenden Vergrößerungen dar.

#### *Begasung mit Luft bzw. Ozon und anschließende Stimulierung mit TNF- $\alpha$*

Den folgenden Versuchen lag die Fragestellung zugrunde, inwieweit eine vorangegangene Exposition des Bronchialtraktes mit Ozon eine veränderte Immunreaktion auf immunologisch wirksame Agenzien wie TNF- $\alpha$  bedingen kann. Zu diesem Zweck wurden BEAS-2B zunächst 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Die folgende 24-stündige Inkubation geschah dann in Gegenwart von Kontrollmedium bzw. TNF- $\alpha$ -haltigem Medium. Im Anschluß an die Inkubation wurden IL-6 und IL-8 im Überstand sowie die ICAM-1-Expression auf den Zellen bestimmt.

## a) IL-6-Sekretion

Abb. 18 zeigt die IL-6-Sekretion bei BEAS-2B, die 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast und anschließend für 24h mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  stimuliert worden waren. TNF- $\alpha$ -aktivierte Zellen reagierten mit erhöhten IL-6-Freisetzen verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen. Diese Unterschiede waren sowohl bei luft- als auch bei ozonbegasteten Zellen statistisch signifikant. Die Ozonbegasung führte bei unstimulierten Kontrollzellen zu einer verstärkten IL-6-Freisetzung verglichen mit der luftexponierter Zellen. Wurde jedoch zusätzlich mit TNF- $\alpha$  behandelt, so konnte keine ozonvermittelte Erhöhung der IL-6-Freisetzung mehr beobachtet werden. Vielmehr schien nach vorangegangener Ozonbehandlung die Fähigkeit der Zellen, auf den Stimulus TNF- $\alpha$  mit einer verstärkten IL-6-Sekretion zu reagieren, geringfügig abgeschwächt.

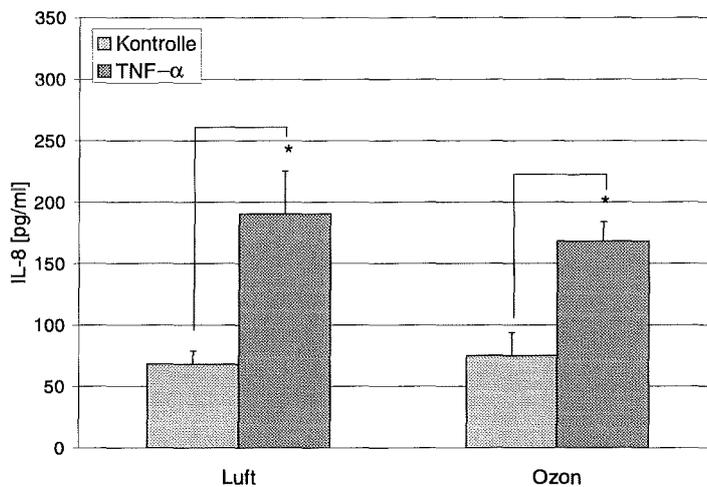


**Abb. 18: IL-6-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$ .**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen (n=12). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## b) IL-8-Sekretion

Bezüglich der IL-8-Sekretion nach Begasung der BEAS-2B mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon und anschließender 24-stündiger Aktivierung mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  konnten ähnliche Effekte wie bei IL-6 gefunden werden. Wie in Abb. 19 dargestellt, bewirkte die TNF- $\alpha$ -Stimulierung bei luft- wie ozonvorbehandelten Zellen signifikant erhöhte IL-8-Freisetzungen verglichen mit denen unstimulierter Kontrollzellen. Die Ozonbegasung resultierte in einer verstärkten IL-8-Freisetzung der unstimulierten Zellen verglichen mit den entsprechenden luftbegasteten Zellen. Bezüglich der TNF- $\alpha$ -induzierten IL-8-Erhöhung reagierten ozonbegaste Zellen dagegen deutlich schwächer als luftbegaste Zellen.

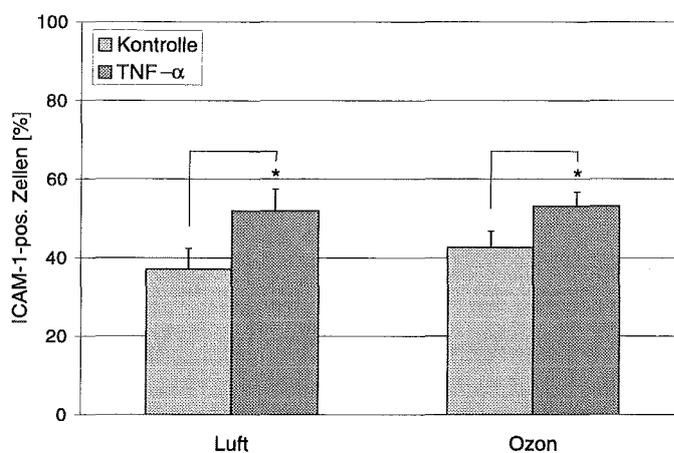


**Abb. 19: IL-8-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$ .**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen (n=12). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## c) ICAM-1-Expression

Wie in Abb. 20 gezeigt, reagierten BEAS-2B nach einer 90-minütigen Exposition mit 0,15 ppm Ozon und anschließender 24-stündiger Inkubation mit einer erhöhten ICAM-1-Expression verglichen mit luftbegasteten Kontrollzellen. Wurde nach der Begasung zusätzlich mit TNF- $\alpha$  behandelt, exprimierten sowohl luft- als auch ozonbegaste Zellen verstärkt ICAM-1 verglichen mit den unstimulierten Kontrollen. Zwar zeigten ozonbehandelte Zellen nach TNF- $\alpha$ -Stimulierung nach wie vor eine höhere ICAM-1-Expression als die luftbehandelten stimulierten Zellen, jedoch war die TNF- $\alpha$ -induzierte Erhöhung der ICAM-1-Expression nach Ozonvorbehandlung schwächer ausgeprägt.



**Abb. 20: ICAM-1-Expression auf luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$ .**

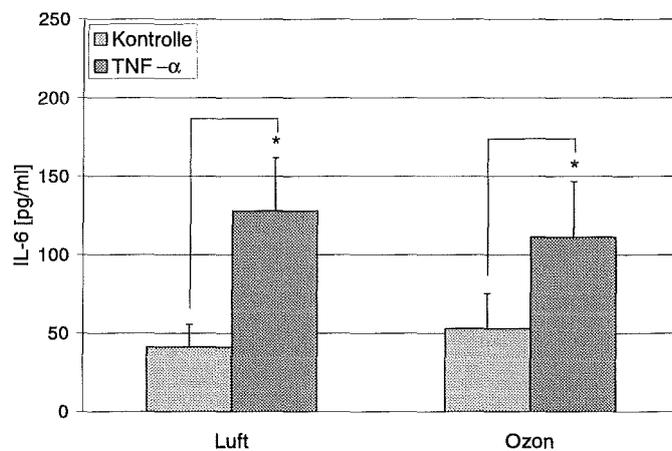
Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Membranen abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen (n=12). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

#### *Stimulierung mit TNF- $\alpha$ und anschließende Begasung mit Luft bzw. Ozon*

Im folgenden sollte nun auch die umgekehrte Reihenfolge einer möglichen Exposition untersucht werden, nämlich die Frage, inwieweit eine immunmodulierende Wirkung des Ozons nach vorangegangener Aktivierung der Zellen mit TNF- $\alpha$  besteht. Dazu wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  24h vorstimuliert. Nach Entfernen des Stimulierungsmediums wurden sie gewaschen und einer 90-minütigen Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon unterzogen. Es folgte eine weitere 24-stündige Inkubationszeit, nach deren Ablauf die IL-6- und IL-8-Konzentrationen im Überstand und die ICAM-1-Expression auf den Zellen untersucht wurden.

## a) IL-6-Sekretion

Eine 24-stündige Vorstimulierung der BEAS-2B mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  resultierte bei luft- wie ozonbegasten Zellen in signifikant erhöhten IL-6-Freisetzen verglichen mit denen unstimulierter Kontrollzellen. Des weiteren bewirkte die Ozonexposition bei unstimulierten Zellen eine erhöhte IL-6-Sekretion verglichen mit luftbegasten unstimulierten Zellen. Dagegen zeigten bei den TNF- $\alpha$ -voraktivierten Zellen die ozonbegasten geringere IL-6-Freisetzen als die luftbegasten Zellen, was im Sinne einer abgeschwächten Immunantwort auf den Stimulus TNF- $\alpha$  durch die anschließend erfolgte Ozonbehandlung gedeutet werden könnte (Abb. 21).

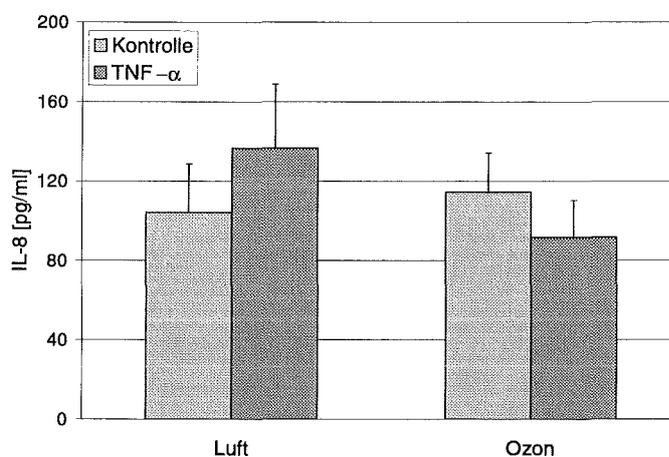


**Abb. 21: IL-6-Freisetzung bei TNF- $\alpha$ -vorbehandelten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. TNF- $\alpha$ -haltigem Stimulierungsmedium (1000 pg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände über den Zellen abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=7). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## b) IL-8-Sekretion

Die IL-8-Freisetzung bei TNF- $\alpha$ -vorbehandelten BEAS-2B nach anschließender Luft- bzw. Ozonbegasung und 24h Inkubation ist in Abb. 22 dargestellt. Die Ozonbegasung führte bei unstimulierten Zellen zu einer Erhöhung der IL-8-Freisetzung verglichen mit der Freisetzung luftbegaster Kontrollen. Während die TNF- $\alpha$ -Vorstimulierung bei anschließender Luftbegasung der Zellen zu erhöhten IL-8-Sekretionen führte, war die IL-8-Freisetzung nach TNF- $\alpha$ -Stimulierung und anschließender Ozonbehandlung nicht nur niedriger als die der unstimulierten ozonbehandelten Zellen, sondern auch niedriger als die der luftbegasten Kontrollzellen.

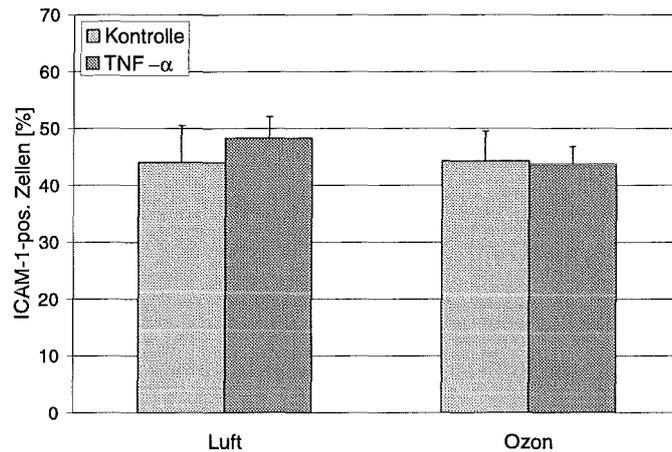


**Abb. 22: IL-8-Freisetzung bei TNF- $\alpha$ -vorbehandelten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. TNF- $\alpha$ -haltigem Stimulierungsmedium (1000 pg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände über den Zellen abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=7). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

## c) ICAM-1-Expression

Abb. 23 zeigt die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B, die vor der Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon und anschließender 24-stündiger Inkubation mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  vorstimuliert worden waren. Hierbei konnten weder Effekte der TNF- $\alpha$ -Voraktivierung noch der Ozonbegasung beobachtet werden. Allenfalls war eine Tendenz zu einer abgeschwächten ICAM-1-Expression auf TNF- $\alpha$ -vorbehandelten BEAS-2B nach Ozonbegasung, verglichen mit der Expression auf den entsprechenden luftbegasten Zellen, zu erahnen.



**Abb. 23: ICAM-1-Expression auf TNF- $\alpha$ -vorbehandelten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. TNF- $\alpha$ -haltigem Stimulierungsmedium (1000 pg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsinwirkung von den Membranen gelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=7). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

Die Stimulierungsversuche mit TNF- $\alpha$  betreffend kann zusammenfassend gesagt werden, daß eine Stimulierung mit dem Zytokin zeit- und dosisabhängig zu einer vermehrten Bildung der Entzündungsmarker Interleukin-6, Interleukin-8 und ICAM-1 bei BEAS-2B führte.

Eine Ozonexposition der Zellen bewirkte, unabhängig davon, ob sie vor oder nach der TNF- $\alpha$ -Aktivierung erfolgte, eine verminderte Bildung der untersuchten Parameter auf den Stimulus TNF- $\alpha$ .

### 3.1.2.2 Stimulierung mit Zymosan

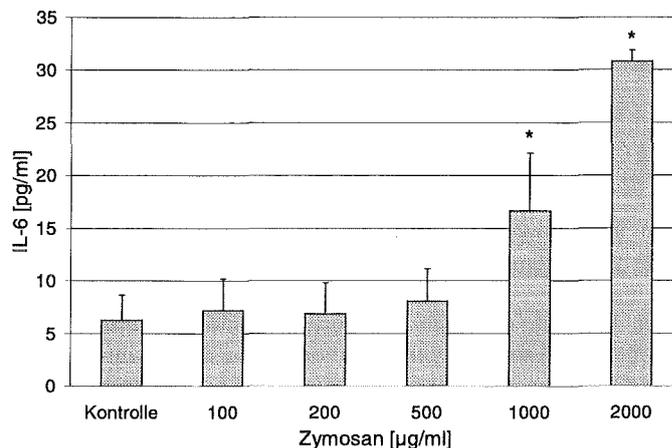
Oponiertes Zymosan stellt eigentlich einen Phagozytose-Stimulus dar und wird daher vorwiegend zur Aktivierung phagozytierender Zellen wie Makrophagen eingesetzt. Überraschenderweise induzierte es jedoch auch bei BEAS-2B eine verstärkte Superoxid-anionen-Bildung (Hofer, 1996). Die Oponierung des Zymosans bewirkt zudem eine hohe Antigenität und läßt daher eine Verwendung als Standardstimulus geeignet erscheinen.

#### *Effekt von Zymosan ohne Begasung*

Vor der Durchführung von Experimenten zur Kombinationswirkung von Zymosan und Luft bzw. Ozon wurde zunächst der Einfluß einer Zymosanbehandlung allein auf die Bildung der zu untersuchenden Entzündungsparameter ermittelt. Dabei wurde sowohl die Dosisabhängigkeit als auch die Zeitabhängigkeit der Effekte überprüft.

## a) IL-6-Sekretion

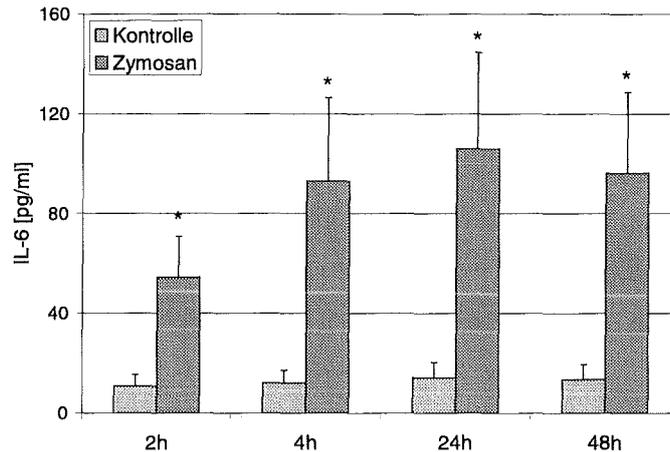
Abb. 24 zeigt die Freisetzung von IL-6 bei BEAS-2B nach 24h Inkubation mit verschiedenen Zymosankonzentrationen. Stimulierungen mit Zymosan in den Konzentrationen 1000  $\mu\text{g/ml}$  und 2000  $\mu\text{g/ml}$  führten zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der IL-6-Freisetzung verglichen mit der unstimulierten Kontrollzellen.



**Abb. 24: Dosisabhängige Freisetzung von IL-6 bei BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit Zymosan.**

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert bis sich ein konfluenten Monolayer gebildet hatte. Danach wurde das Kulturmedium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium mit steigenden Konzentrationen an Zymosan ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Abnahme der Überstände und deren Untersuchung auf IL-6 mit ELISA. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (n=4) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittels ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

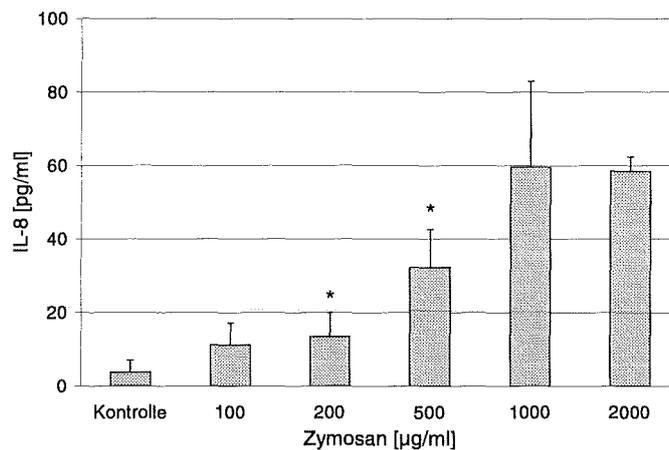
Bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der zymosaninduzierten IL-6-Freisetzung, der in Abb. 25 für eine konstante Zymosankonzentration von 1000  $\mu\text{g/ml}$  dargestellt ist, erkennt man eine deutliche Abhängigkeit der IL-6-Sekretion von der Zeit. Bei gleichbleibend niedrigen IL-6-Werten in den unstimulierten Kontrollzellen stiegen die Werte bei den zymosanaktivierten Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer an, wobei zwischen 24h und 48h wieder eine leichte Abnahme erfolgte. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt unterschieden sich die IL-6-Freisetzungen der stimulierten Zellen von denen der unstimulierten Zellen statistisch signifikant. Der Anstieg der IL-6-Freisetzung bei den zymosanbehandelten Zellen erfolgte rasch: Zum Zeitpunkt 2h waren bereits 51%, zum Zeitpunkt 4h 88% der maximalen IL-6-Freisetzung zum Zeitpunkt 24h erreicht.



**Abb. 25: Zeitabhängige Freisetzung von IL-6 bei BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000 µg/ml Zymosan.** Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten abgenommenen Überstände wurden mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen zugehöriger Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

#### b) IL-8-Freisetzung

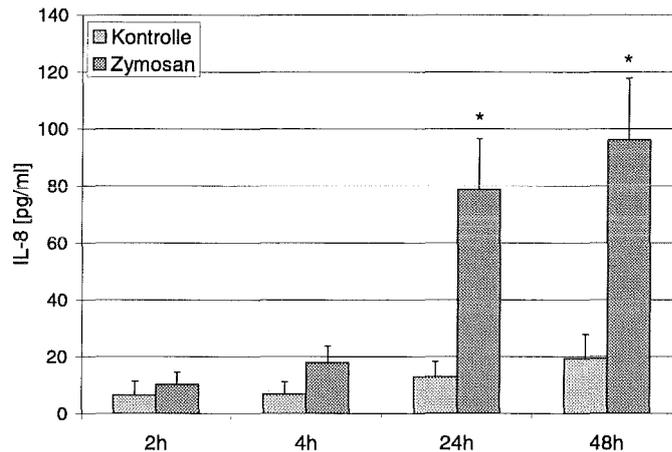
Wie in Abb. 26 dargestellt, folgte die Interleukin-8-Freisetzung nach 24h Stimulierung mit steigenden Konzentrationen an Zymosan einer Dosis-Wirkungs-Beziehung. Im Gegensatz zur zymosaninduzierten IL-6-Freisetzung (siehe Abb. 24) genügten hierbei schon Zymosankonzentrationen von 200 µg/ml für einen statistisch signifikanten Anstieg der IL-8-Freisetzung.



**Abb. 26: Dosisabhängige Freisetzung von IL-8 bei BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit Zymosan.**

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert bis sich ein konfluenter Monolayer gebildet hatte. Danach wurde das Kulturmedium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium mit steigenden Konzentrationen an Zymosan ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Abnahme der Überstände und deren Untersuchung auf IL-8 mit ELISA. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (n=4) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittels ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

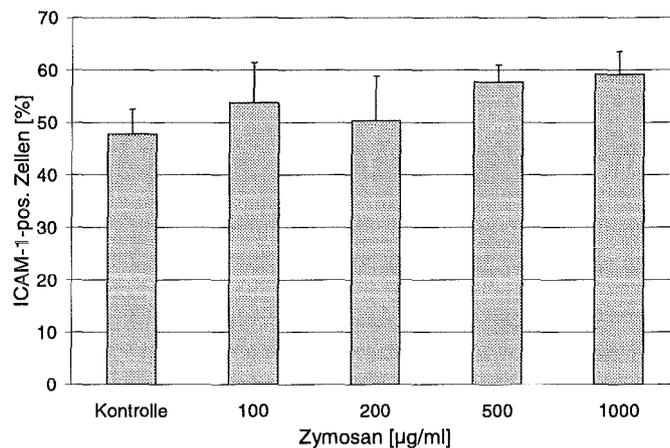
Der zeitliche Verlauf der zymosaninduzierten IL-8-Freisetzung bei BEAS-2B ist für eine Zymosankonzentration von 1000  $\mu\text{g/ml}$  in Abb. 27 dargestellt. Zu jedem der gemessenen Zeitpunkte war die IL-8-Freisetzung bei den zymosanstimulierten Zellen, verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen, erhöht. Nach 24h und 48h Stimulierung waren diese Erhöhungen statistisch signifikant. Verglichen mit der zymosaninduzierten IL-6-Freisetzung (siehe Abb. 25) erfolgte der Anstieg hier langsamer. Nach 2h bzw. 4h Inkubation waren erst 13% bzw. 23% der maximalen IL-8-Konzentration zum Zeitpunkt 24h erreicht.



**Abb. 27: Zeitabhängige Freisetzung von IL-8 bei BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000  $\mu\text{g/ml}$  Zymosan.** Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten abgenommenen Überstände wurden mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Experimenten ( $n=8$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen zugehöriger Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## c) ICAM-1-Expression

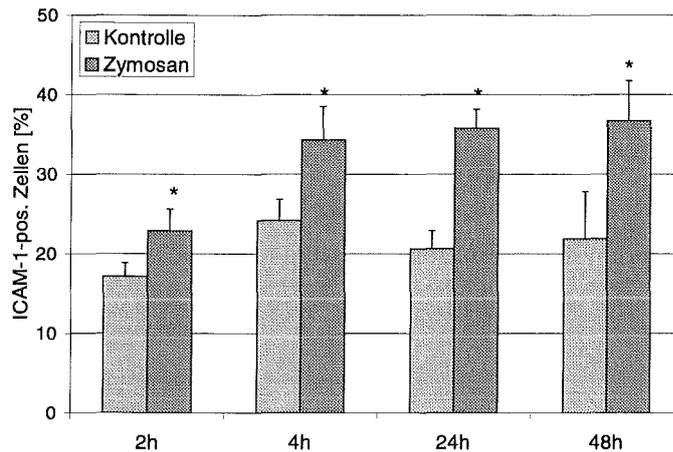
Abb. 28 zeigt die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24h Stimulierung mit steigenden Konzentrationen an Zymosan. Zwar ließ sich mit zunehmenden Zymosankonzentrationen ein Trend zu erhöhten ICAM-1-Expressionen beobachten, jedoch unterschieden sich diese nicht statistisch signifikant von denen unstimulierter Zellen.



**Abb. 28: Dosisabhängige ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit steigenden Konzentrationen an Zymosan.**

Die Zellen wurden in 6-Well-Makroplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Medium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Kulturplatten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=4) mit den entsprechenden Standardfehlern ( $\pm$  SEM).

Wurden BEAS-2B-Zellen mit einer Zymosankonzentration von 1000 µg/ml und Inkubationszeiten von 2h, 4h, 24h und 48h behandelt, so konnte man zu jedem dieser Zeitpunkte eine statistisch signifikante Erhöhung der ICAM-1-Expression auf den stimulierten Zellen, verglichen mit der Expression auf unstimulierten Kontrollzellen, feststellen (Abb. 29). Zwischen 2h und 4h Inkubationsdauer erfolgte insgesamt eine Erhöhung der ICAM-1-Expression, die sowohl stimulierte als auch unstimulierte Zellen betraf. Nach 24h und 48h Inkubationszeit war keine weitere Erhöhung, aber auch keine Abnahme der ICAM-1-Expression zu beobachten. Bemerkenswert war die insgesamt verhältnismäßig hohe konstitutive ICAM-1-Expression von 21% im Durchschnitt auf den unstimulierten Zellen.



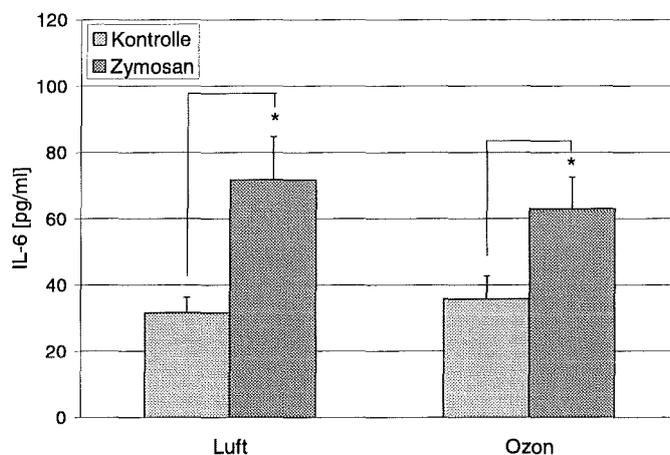
**Abb. 29: Zeitabhängige ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000 µg/ml Zymosan.** Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Platten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der zugehörigen Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

#### *Begasung mit Luft bzw. Ozon und anschließende Behandlung mit Zymosan*

Mit folgenden Experimenten sollten nun, wie bereits für Stimulierungen mit TNF- $\alpha$  geschehen, immunmodulierende Eigenschaften des Ozons bei einer Exposition vor der Aktivierung der Zellen mit 1000 µg/ml Zymosan überprüft werden.

## a) IL-6-Sekretion

In Abb. 30 ist die IL-6-Freisetzung bei BEAS-2B, die 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast und anschließend für 24h mit 1000 µg/ml Zymosan aktiviert worden waren, dargestellt. Ozon- wie auch luftbegaste zymosanaktivierte Zellen zeigten signifikant erhöhte IL-6-Freisetzungen verglichen mit denen unstimulierter Zellen. Des weiteren sezernierten ozonbegaste unstimulierte Zellen größere Mengen an IL-6 als die entsprechenden luft-exponierten Zellen. Vergleicht man die IL-6-Werte bei den luft- bzw. ozonvorbehandelten zymosanstimulierten Zellen, so erkennt man eine Verminderung der Zytokinfreisetzung bei den Zellen, die zuvor mit Ozon begast worden waren.

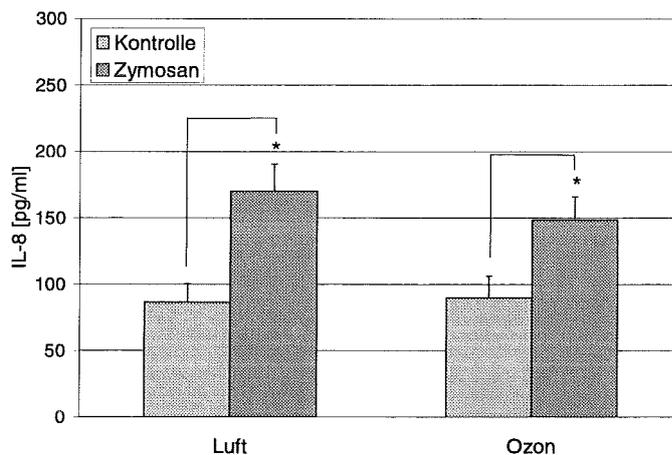


**Abb. 30: IL-6-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 µg/ml Zymosan.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Versuchen (n=16). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## b) IL-8-Freisetzung

Betrachtet man die IL-8-Sekretion bei BEAS-2B, die 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast und anschließend 24h mit 1000 µg/ml Zymosan inkubiert worden waren, so erkennt man signifikante Erhöhungen der Zytokinfreisetzung bei zymosanstimulierten verglichen mit unstimulierten Zellen. Dies galt sowohl für luft- als auch für ozonvorbehandelte Zellen. Mit Ozon vorbehandelte und anschließend zymosanaktivierte Zellen setzten jedoch verminderte IL-8-Mengen frei, werden diese mit luftexponierten zymosanstimulierten Zellen verglichen (Abb. 31).

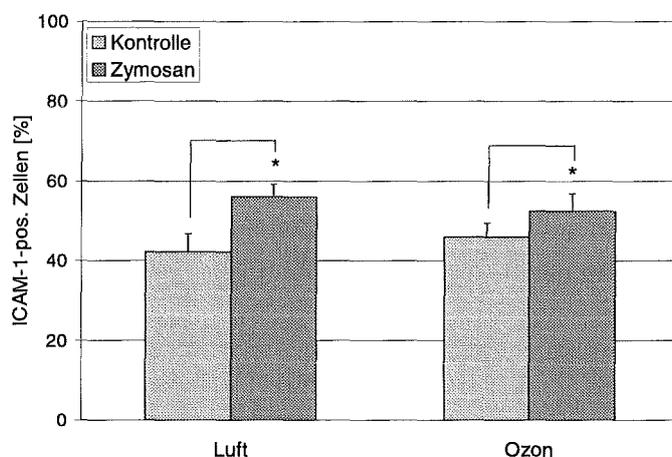


**Abb. 31: IL-8-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 µg/ml Zymosan.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Versuchen (n=16). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## c) ICAM-1-Expression

Die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 90 min Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon und anschließender 24-stündiger Stimulierung mit 1000 µg/ml Zymosan ist in Abb. 32 dargestellt. Luft- wie ozonbegaste Zellen zeigten nach Zymosanaktivierung signifikant erhöhte ICAM-1-Expressionen verglichen mit denen unstimulierter begaster Zellen. Ozonbegaste unstimulierte Zellen exprimierten verstärkt ICAM-1 verglichen mit der Expression auf den entsprechenden luftbegasten Zellen. Dagegen war die ICAM-1-Expression nach Stimulierung mit Zymosan bei den ozonbegasten Zellen geringfügig vermindert gegenüber derjenigen auf luftbegasten zymosanbehandelten Zellen.



**Abb. 32: ICAM-1-Expression auf luft- bzw. ozonbegasten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 µg/ml Zymosan.**

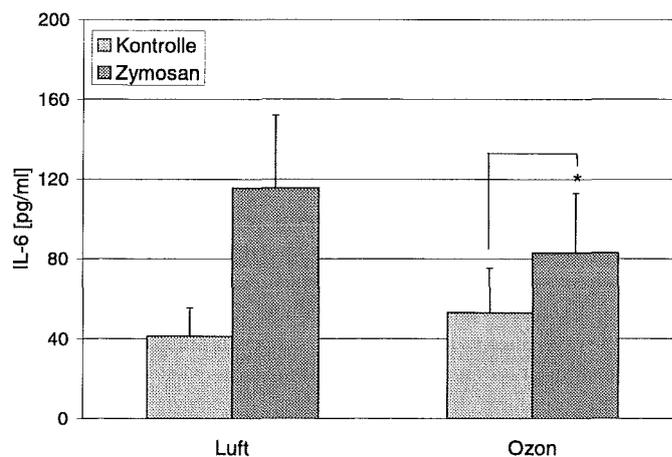
Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Membranen abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Versuchen (n=16). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### Stimulierung mit Zymosan und anschließende Begasung mit Luft bzw. Ozon

Anhand weiterer Experimente wurde untersucht, ob die Reihenfolge, in der die beiden Behandlungen mit Zymosan und mit Luft bzw. Ozon durchgeführt werden, einen Einfluß auf das Ergebnis hat. Dazu wurden die Zellen vor der Gasexposition 24h mit Zymosan vorstimuliert.

#### a) IL-6-Freisetzung

Nach Voraktivierung der Zellen mit 1000 µg/ml Zymosan, anschließender 90-minütiger Luft- bzw. Ozonbegasung und 24h Inkubation war eine deutliche Erhöhung der IL-6-Freisetzung bei zymosanstimulierten verglichen mit unstimulierten Zellen zu erkennen. Dies galt sowohl für luft- als auch für ozonbegaste Zellen. Bei letzteren war dieser Effekt statistisch signifikant. Allerdings bewirkte die Ozonbehandlung eine abgeschwächte Reaktion auf den Stimulus Zymosan verglichen mit Zellen, die nach der Stimulierung luftexponiert worden waren. Dagegen führte die Ozonbehandlung der Kontrollzellen, verglichen mit den luftexponierten Kontrollen, zu einer Erhöhung der IL-6-Sekretion (Abb. 33).

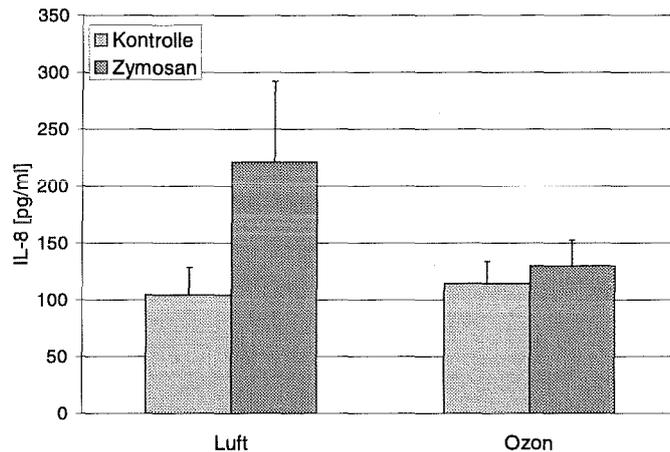


**Abb. 33: IL-6-Freisetzung bei zymosanvorbehandelten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. zymosanhaltigem Stimulierungsmedium (1000 µg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände über den Zellen abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=7). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## b) IL-8-Freisetzung

In Abb. 34 ist die IL-8-Freisetzung bei zymosanvorstimulierten luft- bzw. ozonbegasten BEAS-2B dargestellt. Wiederum war eine ozoninduzierte IL-8-Freisetzung bei unstimulierten Kontrollzellen feststellbar. Des weiteren führte die Voraktivierung mit Zymosan bei den luft-behandelten Zellen zu deutlich erhöhten IL-8-Konzentrationen, was durch eine Ozonbehandlung nach der Stimulierung fast völlig unterdrückt wurde.

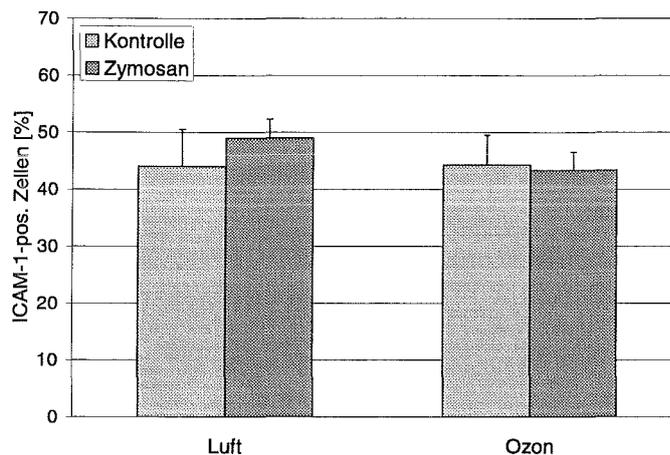


**Abb. 34: IL-8-Freisetzung bei zymosanvorbehandelten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. zymosanhaltigem Stimulierungsmedium (1000 µg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände über den Zellen abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=7). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

## c) ICAM-1-Expression

Abb. 35 zeigt die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B, die nach einer 24-stündigen Vorbehandlung mit 1000 µg/ml Zymosan für 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast und anschließend 24h inkubiert worden waren. Es zeigten sich keine deutlichen Effekte bezüglich der ICAM-1-Expression. Allenfalls kann von einer Tendenz zu einer erniedrigten ICAM-1-Expression bei zymosanaktivierten Zellen gesprochen werden, wenn diese im Anschluß an die Stimulierung mit Ozon behandelt worden waren.



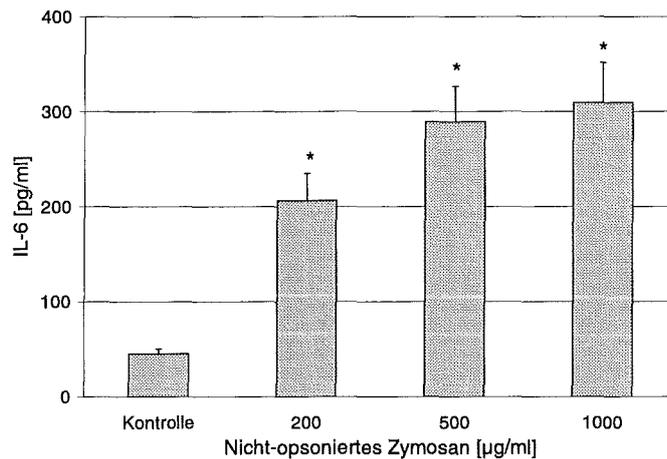
**Abb. 35: ICAM-1-Expression auf zymosanvorbehandelten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. zymosanhaltigem Stimulierungsmedium (1000 µg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsinwirkung von den Membranen gelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=7). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

#### *Stimulierung mit nicht-opsoniertem Zymosan*

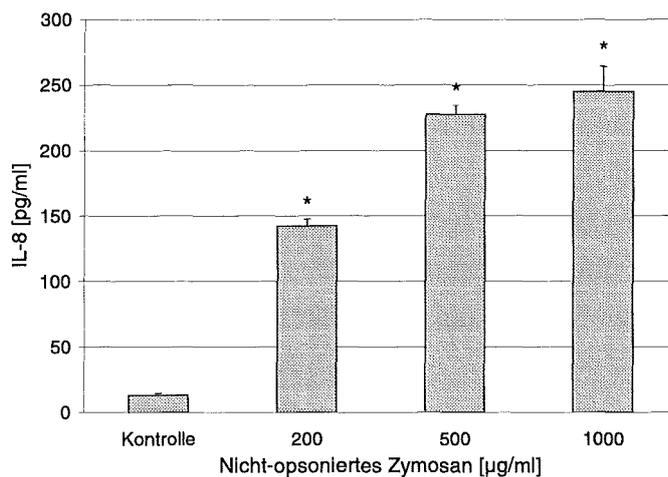
Um zu klären, ob die stimulatorische Wirkung des Zymosans auf die IL-6- und IL-8-Freisetzung sowie auf die ICAM-1-Expression von BEAS-2B auf der Opsonierung beruhte und somit letztendlich nur ein Serum-Effekt war, wurden entsprechende Kontrollversuche mit nicht-opsoniertem Zymosan durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Zytokinfreisetzung als auch die ICAM-1-Expression bei BEAS-2B dosisabhängig durch nicht-opsoniertes Zymosan induziert wird (Abb. 36 bis Abb. 38). Dies bedeutet, daß es sich bei der zymosaninduzierten Bildung von Entzündungsparametern um einen echten Partikeleffekt handelte, unabhängig von der Adsorption von Substanzen auf der Partikeloberfläche.



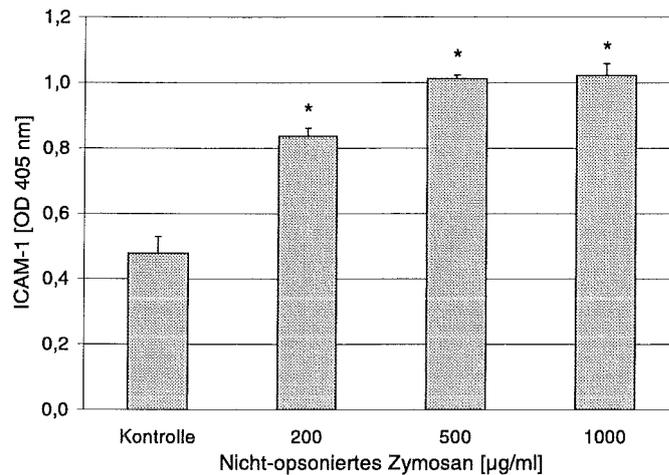
**Abb. 36: Dosisabhängige IL-6-Freisetzung bei BEAS-2B nach Stimulierung mit nicht-opsoniertem Zymosan.**

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit ansteigenden Konzentrationen an nicht-opsoniertem Zymosan für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen ( $n=7$ ) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 37: Dosisabhängige IL-8-Freisetzung bei BEAS-2B nach Stimulierung mit nicht-opsoniertem Zymosan.**

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit ansteigenden Konzentrationen an nicht-opsoniertem Zymosan für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen ( $n=7$ ) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 38: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit nicht-opsoniertem Zymosan.**

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit ansteigenden Konzentration an nicht-opsoniertem Zymosan für 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA. Dabei korreliert die auf der Abszisse aufgetragene optische Dichte bei 405 nm mit der Stärke der ICAM-1-Expression auf den Zellen. Dargestellt sind die Werte aus 2 Versuchen ( $n=7$ ) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

In den Stimulierungsversuchen mit Zymosan konnte eine zeit- und dosisabhängige Bildung von Interleukin-6, Interleukin-8 und ICAM-1 bei BEAS-2B gezeigt werden. Diese war unabhängig von der Opsonierung des Zymosans.

Eine Ozonbehandlung der Zellen vor bzw. nach der Zymosanaktivierung bewirkte bei diesen eine Abschwächung der Immunantwort auf den Stimulus im Sinne einer verminderten Bildung der oben genannten Entzündungsparameter.

### 3.1.2.3 Stimulierung mit LPS

Neben  $\text{TNF-}\alpha$  und Zymosan wurde LPS als Stimulus eingesetzt. Seine Lipidkomponente, das Lipid A, bewirkt eine Aktivierung immunkompetenter Zellen, die bis zum septischen Schock und Multiorganversagen führen kann (Rietschel *et al.*, 1982; Tracey und Cerami, 1989; Tschakowsky und Georgieff, 1990). Stimulierungsversuche mit LPS als Bestandteil gramnegativer Bakterien lassen wichtige Schlüsse auf die Reaktion von Zellen bei bakterieller Exposition zu.

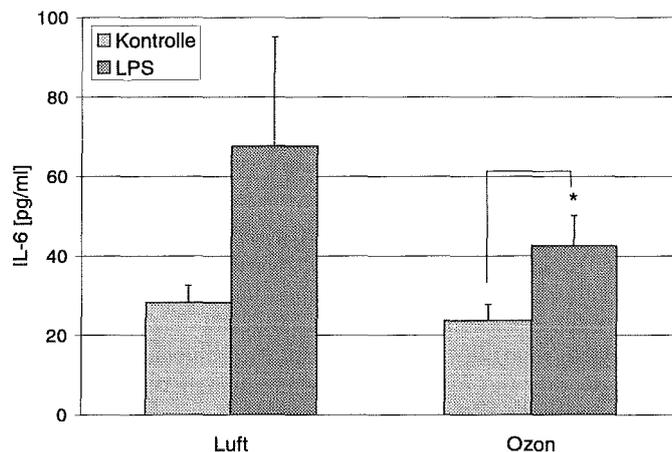
#### *Begasung mit Luft bzw. Ozon und anschließende Stimulierung mit LPS*

Von besonderem Interesse war die Fragestellung nach möglichen Interaktionen zwischen LPS und Ozon, kann doch eine LPS-Stimulierung als Simulation einer bakteriellen Exposition betrachtet werden und somit im Zusammenhang mit einer kombinierten Ozonbegasung wichtige Hinweise für ein mögliches Zusammenspiel von Umweltbelastung und Infekt-

anfälligkeit liefern. Im folgenden wurden BEAS-2B für 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon vorbehandelt und im Anschluß 24h mit LPS-haltigem Medium inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit stand die Bestimmung der Zytokinfreisetzung sowie der ICAM-1-Expression der Zellen.

#### a) IL-6-Sekretion

In Abb. 39 ist die IL-6-Freisetzung luft- bzw. ozonbegaster BEAS-2B nach anschließender 24-stündiger Aktivierung mit LPS gezeigt. Zwar führte eine Inkubation der Zellen mit LPS bei luft- wie ozonbehandelten Zellen zu einer Erhöhung der IL-6-Freisetzung, die für letztere statistisch signifikant war, jedoch konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen luft- und ozonexponierten BEAS-2B festgestellt werden. Allenfalls zeigte sich ein Trend in Richtung einer verminderten IL-6-Sekretion der Zellen auf den Stimulus LPS nach vorangegangener Ozonbehandlung.

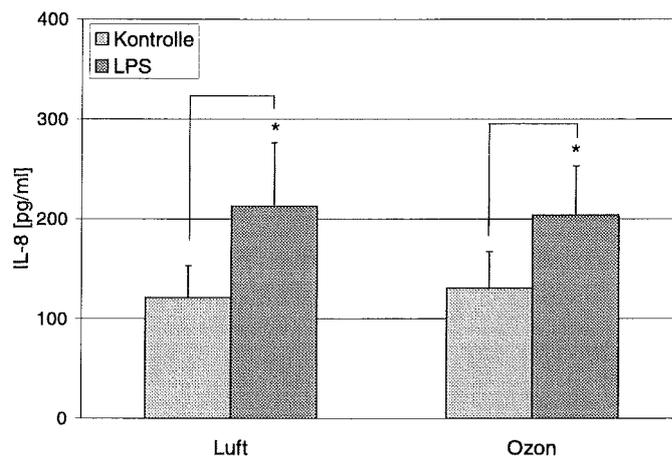


**Abb. 39: IL-6-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 10 µg/ml LPS.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen (n=8). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## b) IL-8-Sekretion

Ähnliche Verhältnisse waren bezüglich der Interleukin-8-Sekretion festzustellen, die in Abb. 40 dargestellt ist: Ozonexponierte unstimulierte Zellen sezernierten höhere Mengen IL-8 als die luftbegasten Kontrollen. Unabhängig von einer vorangegangenen Luft- bzw. Ozonbegasung führte die Stimulierung mit LPS zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der IL-8-Freisetzung. Jedoch waren die Unterschiede zwischen den Freisetzungen unstimulierter und LPS-aktivierter Zellen bei der Ozongruppe geringer als bei den luftbehandelten Zellen.

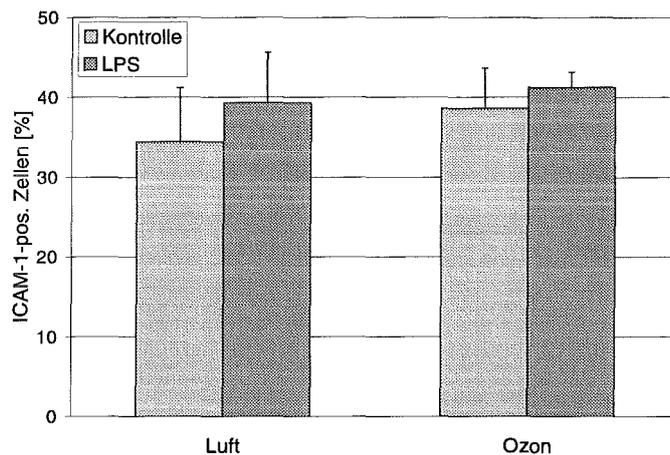


**Abb. 40: IL-8-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 10 µg/ml LPS.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 Versuchen (n=10). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

## c) ICAM-1-Sekretion

Eine 90-minütige Exposition der BEAS-2B mit 0,15 ppm Ozon bewirkte eine Steigerung der ICAM-1-Expression verglichen mit der Expression auf den entsprechenden luftbehandelten Kontrollzellen. Wurden die Zellen im Anschluß an die Begasung noch zusätzlich mit LPS stimuliert, reagierten luft- wie ozonbehandelte Zellen mit einer geringfügigen Erhöhung der Expression, wobei diese bei ozonvorbehandelten Zellen schwächer ausgeprägt war als bei den luftbehandelten Zellen (Abb. 41).



**Abb. 41: ICAM-1-Expression auf luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 10 µg/ml LPS.**

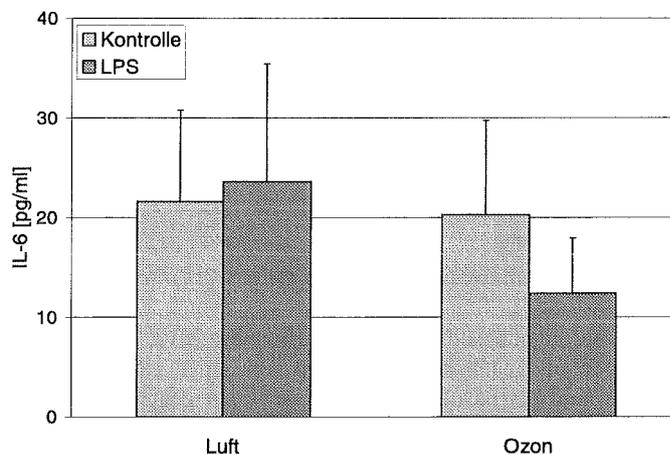
Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Membranen abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 Versuchen (n=10). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

### *Stimulierung mit LPS und anschließende Begasung mit Luft bzw. Ozon*

Analog wurde die umgekehrte Reihenfolge der Expositionen, nämlich eine Vorstimulierung mit LPS mit anschließender Luft- bzw. Ozonbegasung, untersucht.

#### a) IL-6-Sekretion

Versuche mit vorangegangener LPS-Stimulierung und anschließender Luft- bzw. Ozonbegasung zeigten ein anderes Ergebnis bezüglich der IL-6-Freisetzung: Die LPS-induzierte IL-6-Erhöhung konnte nicht mehr gesehen werden. Ozonexponierte Zellen synthetisierten nach vorangegangener LPS-Aktivierung eventuell sogar geringere Mengen IL-6 als die zugehörigen unstimulierten Kontrollen (Abb. 42).

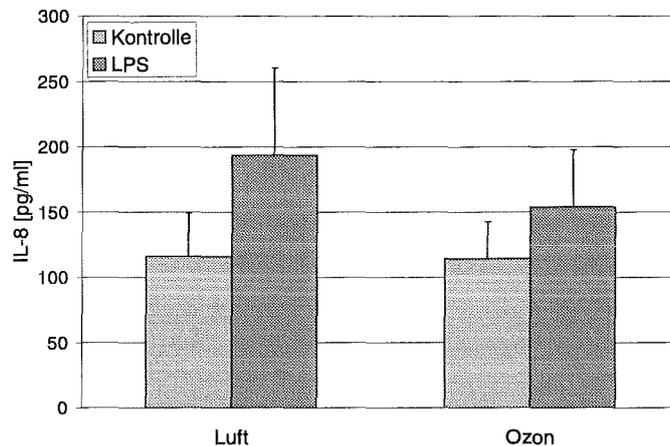


**Abb. 42: IL-6-Freisetzung bei LPS-vorstimulierten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. LPS-haltigem Stimulierungsmedium (10 µg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (n=5). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

## b) IL-8-Sekretion

Die Stimulierung der BEAS-2B mit LPS bewirkte, unabhängig von einer sich anschließenden Begasung, eine Erhöhung der IL-8-Freisetzung verglichen mit unstimulierten Kontrollen. Diese schien jedoch nach vorangegangener Ozonbehandlung etwas schwächer ausgeprägt als nach Luftexposition der Zellen (Abb. 43).

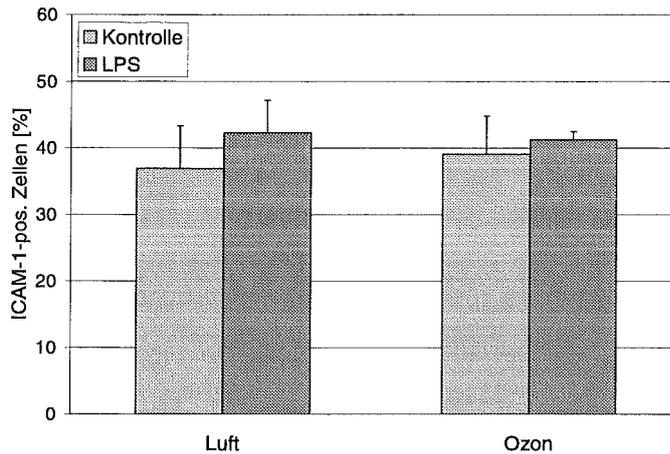


**Abb. 43: IL-8-Freisetzung bei LPS-vorstimulierten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. LPS-haltigem Stimulierungsmedium (10 µg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (n=5). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

## c) ICAM-1-Expression

Wie schon bei der Durchführung der Stimulierungen in umgekehrter Reihenfolge deutlich (siehe Abb. 41), führte auch eine vorangegangene Aktivierung mit LPS zu einer geringfügigen Erhöhung der ICAM-1-Expression auf BEAS-2B (Abb. 44). Diese war bei Zellen, die anschließend mit Ozon behandelt worden waren, nicht mehr so deutlich ausgeprägt wie bei den entsprechenden luftbegasteten Zellen.



**Abb. 44: ICAM-1-Expression auf LPS-vorstimulierten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasteten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. LPS-haltigem Stimulierungsmedium (10 µg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Membranen gelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (n=5).

Die LPS-Stimulierung der BEAS-2B bewirkte eine Erhöhung der Interleukin-6- und Interleukin-8-Sekretion der Zellen. Wurden die Zellen vor oder nach der Stimulierung mit Ozon exponiert, war die LPS-induzierte Wirkung auf die Zytokinfreisetzungen weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu derjenigen bei luftexponierten Zellen.

### 3.1.2.4 Stimulierung mit IL-1 $\beta$

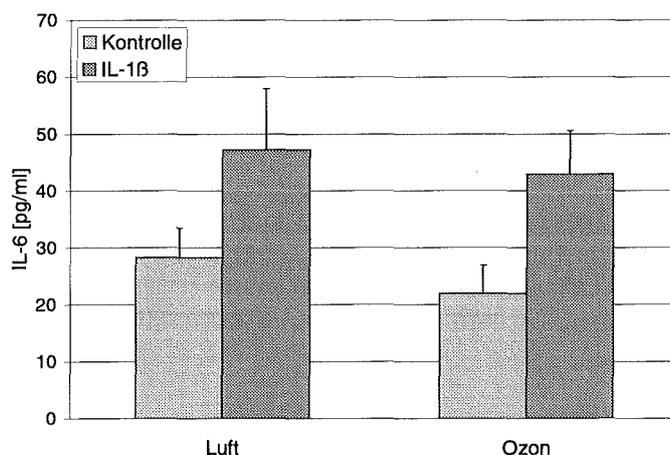
IL-1 $\beta$  wurde als Stimulus gewählt, da es, wie auch TNF- $\alpha$ , zu den sogenannten „frühen“ Zytokinen gehört und somit eine Schlüsselstellung bei einer sich entwickelnden Entzündung einnimmt. Es wird ebenfalls von Alveolarmakrophagen gebildet.

#### *Begasung mit Luft bzw. Ozon und anschließende Stimulierung mit IL-1 $\beta$*

Mit Hilfe der folgenden Experimente sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine 90-minütige Exposition der Bronchialepithelzellen mit 0,15 ppm Ozon die immunologische Reaktion der Zellen auf den Stimulus IL-1 $\beta$  beeinflusst.

#### a) IL-6-Sekretion

Eine Stimulierung von BEAS-2B mit IL-1 $\beta$  führte, unabhängig von einer vorangegangenen Luft- oder Ozonbehandlung, zu einer Erhöhung der IL-6-Sekretion. Unterschiede zwischen luft- und ozonbehandelten Zellen konnten nicht festgestellt werden (Abb. 45).

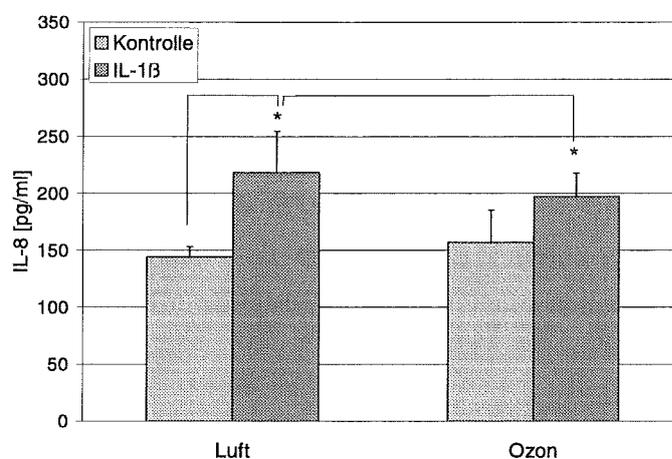


**Abb. 45: IL-6-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 pg/ml IL-1 $\beta$ .**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen (n=8).

## b) IL-8-Sekretion

Die Ozonbegasung der BEAS-2B führte, verglichen mit luftexponierten Zellen, zu einer Erhöhung der IL-8-Sekretion. Des weiteren bewirkte die zusätzliche Stimulierung der Zellen mit IL-1 $\beta$  nach Luft- wie Ozonbegasung eine Erhöhung der IL-8-Freisetzung, welche für luftbegaste Zellen statistisch signifikant war. Die IL-1 $\beta$ -induzierte IL-8-Erhöhung war bei ozonvorbehandelten Zellen zwar vorhanden, aber, verglichen mit der luftbegaster Zellen, abgeschwächt. So sezernierten ozonvorbehandelte IL-1 $\beta$ -stimulierte BEAS-2B geringere Mengen an IL-8 als die entsprechenden luftbehandelten Zellen. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Abb. 46).

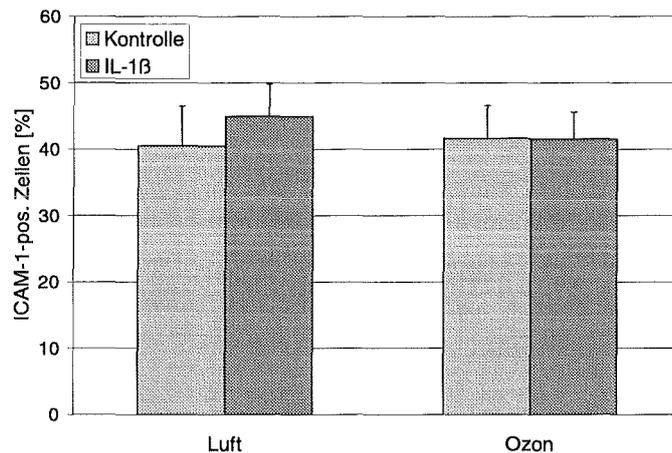


**Abb. 46: IL-8-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 pg/ml IL-1 $\beta$ .**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen (n=8).

## c) ICAM-1-Expression

Bezüglich der ICAM-1-Expression nach Luft- bzw. Ozonbegasung und anschließender Stimulierung mit IL-1 $\beta$  konnten keine deutlichen Effekte gezeigt werden (Abb. 47). Allerdings war eine Tendenz zu ähnlichen Verhältnissen wie bei der IL-8-Freisetzung (siehe Abb. 46) zu erahnen, nämlich eine Abschwächung des IL-1 $\beta$ -induzierten Effektes bei ozonvorbehandelten Zellen.



**Abb. 47: ICAM-1-Expression auf luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 pg/ml IL-1 $\beta$ .**

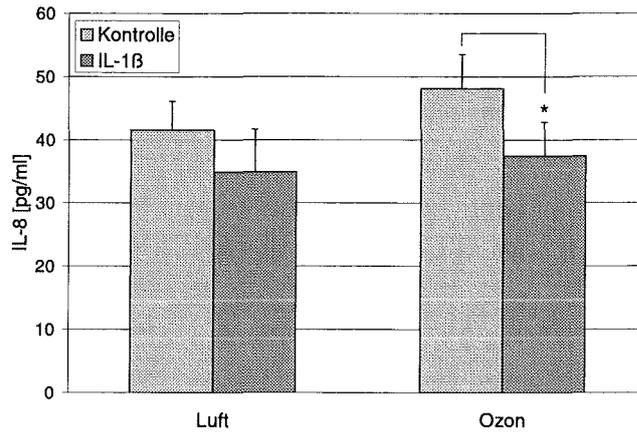
Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Membranen abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen (n=8).

*Stimulierung mit IL-1 $\beta$  und anschließende Begasung mit Luft bzw. Ozon*

Ob die Reihenfolge der Expositionen einen Einfluß auf die Effekte hat, wurde in Versuchen mit 24-stündiger IL-1 $\beta$ -Vorstimulierung und sich anschließender Luft- bzw. Ozonbegasung überprüft.

## a) IL-8-Sekretion

In Abb. 48 ist die IL-8-Sekretion bei IL-1 $\beta$ -vorbehandelten BEAS-2B nach anschließender Luft- bzw. Ozonbegasung und 24-stündiger Inkubation gezeigt. Interessanterweise konnte hier der stimulatorische Effekt von IL-1 $\beta$  auf die IL-8-Freisetzung nicht mehr gezeigt werden. IL-1 $\beta$  bewirkte sogar eine Verminderung der IL-8-Freisetzung verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen. Diese Verminderung war bei BEAS-2B, die anschließend mit Ozon behandelt worden waren, statistisch signifikant.

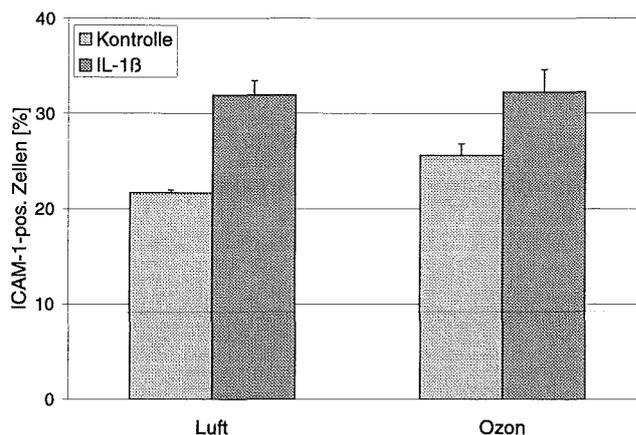


**Abb. 48: IL-8-Freisetzung bei IL-1 $\beta$ -vorbehandelten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. IL-1 $\beta$ -haltigem Stimulierungsmedium (1000 pg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem Versuch (n=2). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

#### b) ICAM-1-Expression

Eine Ozonbegasung der unstimulierten Zellen führte zu einer Erhöhung der ICAM-1-Expression verglichen mit luftexponierten Zellen. Durch eine Vorbehandlung mit IL-1 $\beta$  konnte die ICAM-1-Expression, unabhängig von der Begasung, deutlich gesteigert werden, wobei diese IL-1 $\beta$ -induzierte Zunahme der ICAM-1-Expression bei Zellen, die anschließend mit Ozon behandelt worden waren, schwächer ausfiel (Abb. 49).



**Abb. 49: ICAM-1-Expression auf IL-1 $\beta$ -vorbehandelten und im Anschluß mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begasten BEAS-2B.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 24h mit Kontrollmedium bzw. IL-1 $\beta$ -haltigem Stimulierungsmedium (1000 pg/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsinwirkung von den Membranen gelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem Versuch (n=2).

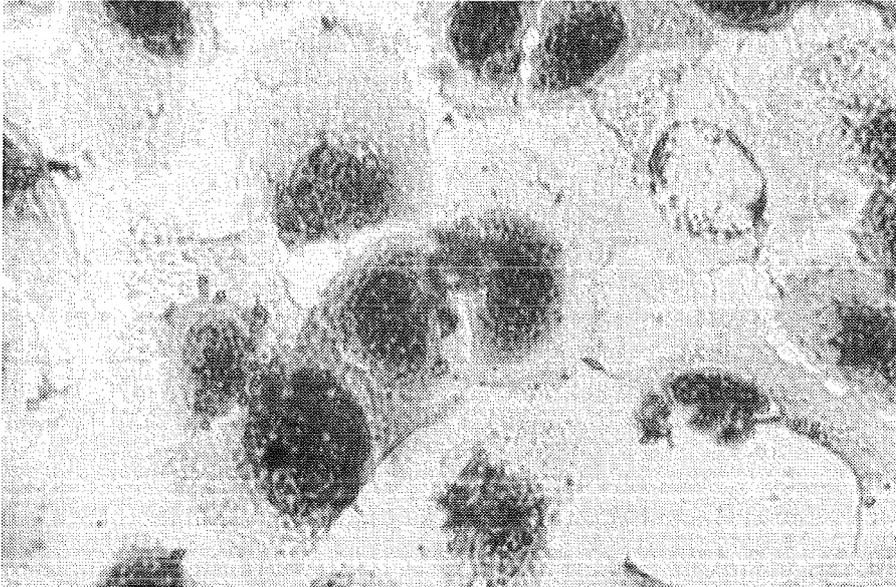
IL-1 $\beta$ -stimulierte BEAS-2B zeigten, abgesehen von der IL-8-Freisetzung nach IL-1 $\beta$ -Vorstimulierung und anschließender Begasung, eine erhöhte Bildung der Entzündungsmarker Interleukin-6, Interleukin-8 und ICAM-1. Eine Ozonexposition vor oder nach der IL-1 $\beta$ -Stimulierung supprimierte die IL-1 $\beta$ -induzierte Bildung der Entzündungsparameter verglichen mit den entsprechenden luftbegasten Kontrollen.

### **3.1.3 Einfluß von Stäuben und Staubextrakten**

Neben gasförmigen Schadstoffen enthält unsere Atemluft auch partikuläre Verunreinigungen, deren Einfluß auf die Bildung von Entzündungsparametern bei Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) im folgenden untersucht wurde. Dabei wurde berücksichtigt, daß eine mögliche Wirkung dieser Partikel sowohl auf rein physikalischen Effekten durch die Partikelform und -oberfläche als auch auf chemischen Interaktionen von adsorbierten Substanzen beruhen könnte. Deshalb kamen sowohl Quarzstaub (DQ12) als Inertstaub sowie Schwebstaubextrakte (GEX) bei den Experimenten zur Anwendung. Des weiteren wurden in Versuchen mit Überständen DQ12-exponierter Makrophagen auch mittelbare Wirkungen des Staubes auf Bronchialepithelzellen untersucht.

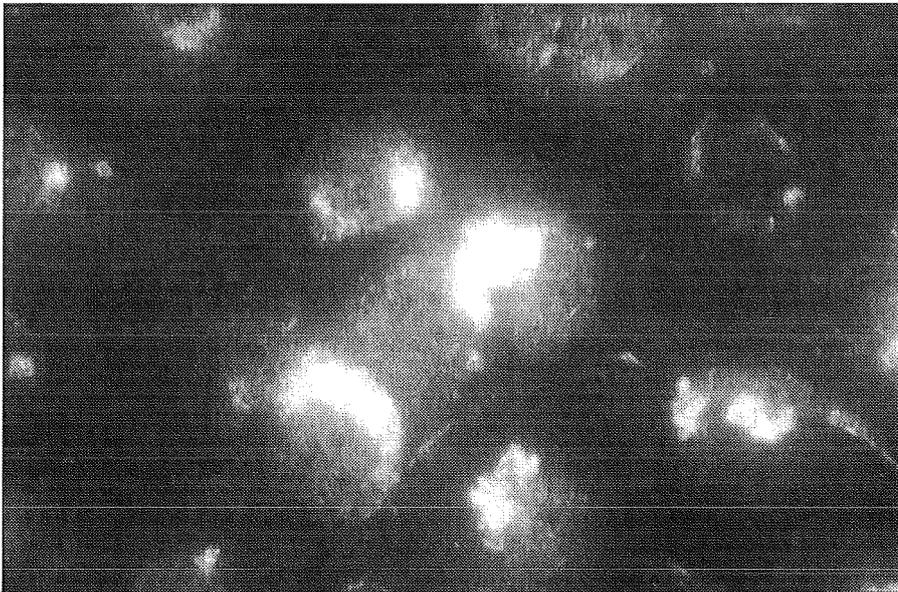
#### **3.1.3.1 Beeinflussung der Bildung von Entzündungsparametern bei BEAS-2B durch Quarzstaub (DQ12)**

Der hier verwendete Quarzstaub (DQ12) stellte Inertstaub dar, das heißt, er bestand ausschließlich aus Silikat (Robock, 1973) und eignete sich daher ausgezeichnet für die Untersuchung von reinen Partikeleffekten auf Zellen. Ein Beitrag möglicher adsorbierter chemischer Substanzen auf der Partikeloberfläche zu den beobachteten Effekten konnte damit sicher ausgeschlossen werden. DQ12 heftete sich nach 24-stündiger Inkubation derart stark an die Zelloberfläche an, daß die Partikel auch unter extremer mechanischer Einwirkung nicht mehr von den Zellen abgespült werden konnten. Abb. 50 und Abb. 51 zeigen mit DQ12 beladene BEAS-2B bei Betrachtung im Durchlicht bzw. polarisiertem Licht, welches von den Quarzpartikeln aufgrund ihres hohen Brechungsindex stärker reflektiert wird.



**Abb. 50: BEAS-2B nach 24-stündiger Inkubation mit 1000 µg/ml DQ12.**

Die Zellen wurden in Chamber Slides ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für 24h mit DQ12 stimuliert. Nach Fixierung mit Bouin'scher Lösung wurden die Zellen im Lichtmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung unter Öl betrachtet und fotografiert.

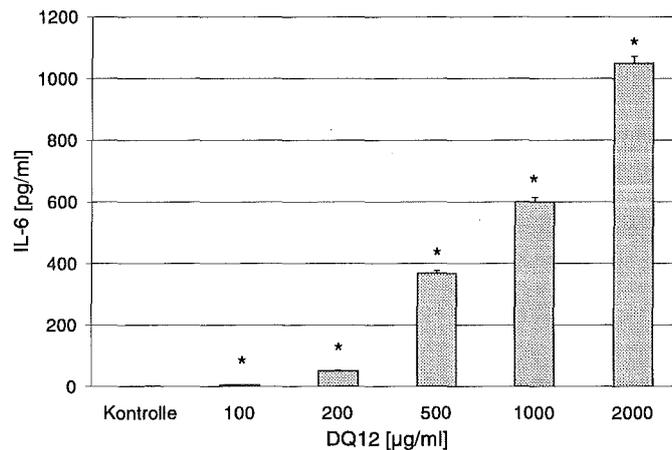


**Abb. 51: BEAS-2B nach 24-stündiger Inkubation mit 1000 µg/ml DQ12 bei Betrachtung in polarisiertem Licht.**

Die Zellen wurden in Chamber Slides ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für 24h mit DQ12 stimuliert. Nach Fixierung mit Bouin'scher Lösung wurden die Zellen unter Verwendung eines Polarisationsfilters im Lichtmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung unter Öl betrachtet und fotografiert.

*IL-6-Sekretion*

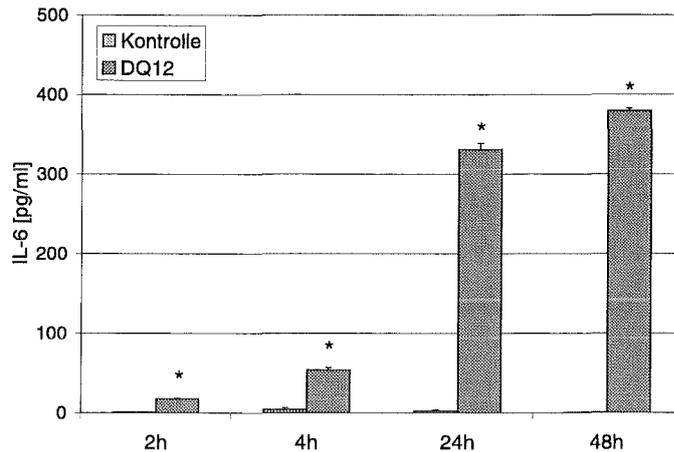
Abb. 52 zeigt die Dosis-Wirkungskurve von DQ12 auf BEAS-2B bezüglich der IL-6-Freisetzung. Bereits die geringste eingesetzte Quarzstaubkonzentration von 100 µg/ml führte zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6-Sekretion verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Bei Vergleich der Absolutwerte der freigesetzten IL-6-Mengen mit denen bei TNF- $\alpha$ - oder zymosanstimulierten BEAS-2B (siehe Abb. 11 und Abb. 24), wird ersichtlich, daß DQ12 die Zellen zu einer weitaus höheren IL-6-Sekretion zu stimulieren vermochte.



**Abb. 52: Dosisabhängige Freisetzung von IL-6 bei BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit DQ12.**

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert bis sich ein konfluenter Monolayer gebildet hatte. Danach wurde das Kulturmedium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium mit steigenden Konzentrationen an DQ12 ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Abnahme der Überstände und deren Untersuchung auf IL-6 mit ELISA. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Versuch (n=2) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittels ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

Die Zeitabhängigkeit der DQ12-induzierten IL-6-Freisetzung bei BEAS-2B ist in Abb. 53 für eine DQ12-Konzentration von 1000 µg/ml und Inkubationszeiten von 2h, 4h, 24h und 48h dargestellt. Bei nahezu gleichbleibend niedrigen IL-6-Werten bei den unstimulierten Kontrollen stiegen die IL-6-Freisetzungen bei den aktivierten Zellen mit zunehmender Inkubationszeit an. Der stärkste Anstieg erfolgte im Zeitraum zwischen 4h und 24h Inkubation. Zu allen gemessenen Zeitpunkten unterschieden sich die Werte der stimulierten Proben statistisch signifikant von denen der unstimulierten Kontrollen.

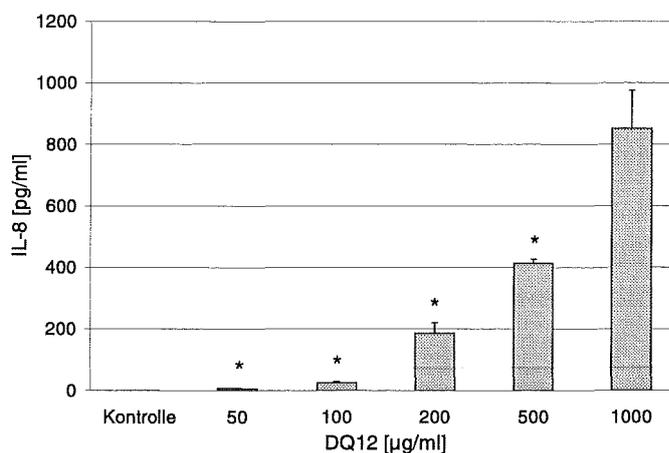


**Abb. 53: Zeitabhängige Freisetzung von IL-6 bei BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000 µg/ml DQ12.**

Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten abgenommenen Überstände wurden mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem Experiment (n=3). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen zugehöriger Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### IL-8-Sekretion

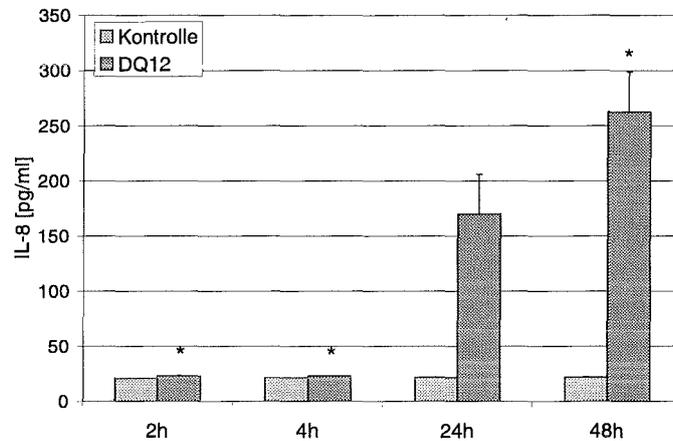
Auch bezüglich der IL-8-Freisetzung zeigte Quarzstaub bei BEAS-2B einen deutlichen dosisabhängigen Effekt (Abb. 54). Insgesamt waren die hohen sezernierten Zytokinmengen, verglichen mit denen TNF- $\alpha$ - oder zymosanstimulierter BEAS-2B (siehe Abb. 13 und Abb. 26), auffällig.



**Abb. 54: Dosisabhängige Freisetzung von IL-8 bei BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit DQ12.**

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert bis sich ein konfluenter Monolayer gebildet hatte. Danach wurde das Kulturmedium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium mit steigenden Konzentrationen an DQ12 ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 1-2 Versuchen (n=2-5) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittels ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

Abb. 55 zeigt den zeitlichen Verlauf der DQ-12-induzierten IL-8-Freisetzung bei einer Quarzstaubkonzentration von 1000 µg/ml. Während die unstimulierten Kontrollzellen über die Zeit hinweg gleichbleibend niedrige Mengen IL-8 sezernierten, erfolgte ein starker Anstieg der IL-8-Sekretion bei DQ12-exponierten BEAS-2B.

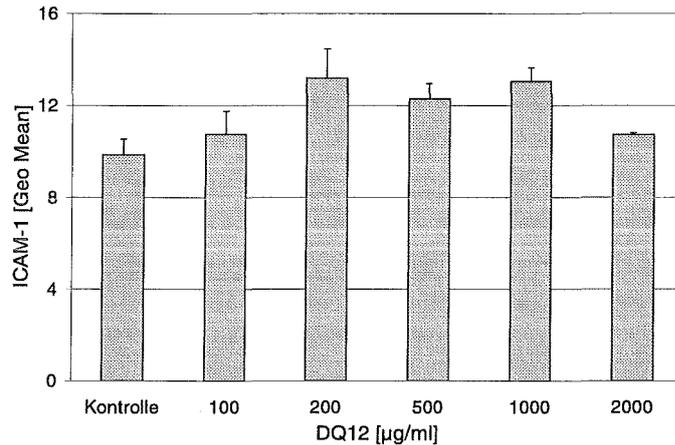


**Abb. 55: Zeitabhängige Freisetzung von IL-8 bei BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000 µg/ml DQ12.**

Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten abgenommenen Überstände wurden mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem Experiment (n=3). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen zugehöriger Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### ICAM-1-Expression

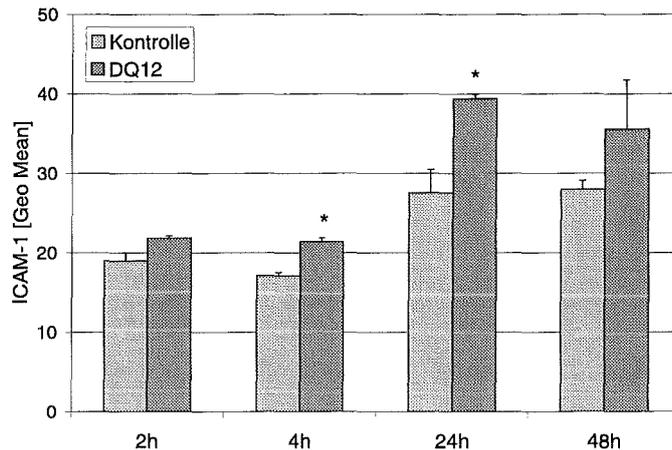
Die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B-Zellen nach 24h Stimulierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an DQ12 ist in Abb. 56 gezeigt. Dabei konnte lediglich eine Tendenz zu einer erhöhten ICAM-1-Expression auf DQ12-behandelten BEAS-2B, verglichen mit der Expression auf unstimulierten Kontrollen, festgestellt werden. Man beachte, daß in Abb. 56 als Maß für die ICAM-1-Expression das Geometrische Mittel aufgetragen ist (siehe 2.6.1.4).



**Abb. 56: Dosisabhängige ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit steigenden Konzentrationen an DQ12.**

Die Zellen wurden in 6-Well-Makroplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Medium über den Zellen durch 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium ersetzt. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Kulturplatten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte aus 1-2 Experimenten (n=2-5) mit den entsprechenden Standardfehlern ( $\pm$  SEM).

In Abb. 57 ist der Zeitverlauf der DQ12-induzierten ICAM-1-Expression auf BEAS-2B zu sehen. Als Maß für die ICAM-1-Expression ist wiederum das Geometrische Mittel aufgetragen (siehe 2.6.1.4). Nach 4h und 24h Stimulierung mit 1000 µg/ml DQ12 war eine statistisch signifikante Erhöhung der ICAM-1-Expression, verglichen mit der Expression auf unstimulierten Kontrollen, festzustellen. Mit zunehmenden Inkubationszeiten zeigten jedoch auch die Kontrollzellen ansteigende ICAM-1-Expressionen.



**Abb. 57: Zeitabhängige ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach Stimulierung mit 1000 µg/ml DQ12.**

Konfluente Monolayer in 6-Well-Kulturplatten wurden für 2h, 4h, 24h und 48h mit 2,5 ml Kontroll- bzw. Stimulierungsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Platten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem Experiment (n=3). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm$  SEM) an. Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der zugehörigen Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

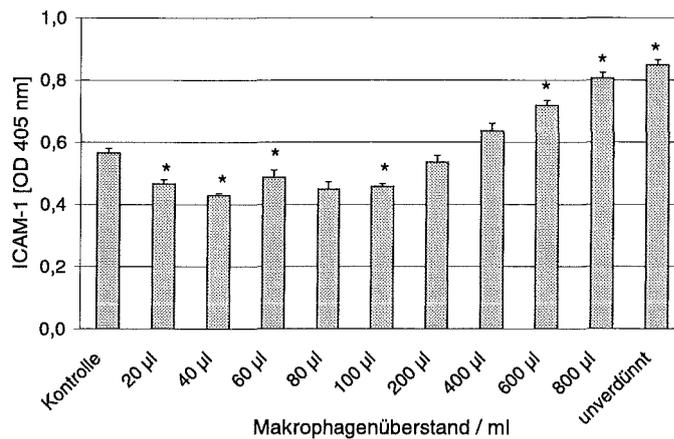
DQ12-stimulierte BEAS-2B zeigten eine zeit- und dosisabhängige verstärkte Interleukin-6- und Interleukin-8-Freisetzung sowie eine erhöhte ICAM-1-Expression.

### 3.1.3.2 Beeinflussung der Bildung von Entzündungsparametern bei BEAS-2B durch Stimulierung mit Überständen DQ12-exponierter Makrophagen

Eine entzündungsfördernde Wirkung von Stäuben auf das menschliche Bronchialepithel könnte neben einer unmittelbaren Einwirkung der Partikel auf die Zellen auch indirekt über exponierte Alveolarmakrophagen ausgeübt werden. Aus diesem Grunde wurden BEAS-2B mit Überständen DQ12-exponierter Makrophagen versetzt und bezüglich der Bildung von Entzündungsparametern untersucht. Da die Makrophagenüberstände selbst jedoch bereits beträchtliche Mengen an IL-6 und IL-8 enthielten, wurde lediglich die ICAM-1-Expression bei BEAS-2B nach Stimulierung mit den Überständen bestimmt.

#### *ICAM-1-Expression*

Abb. 58 veranschaulicht die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24h Behandlung mit Überständen DQ12-stimulierter Makrophagen. Bis zu Konzentrationen von 200 µl Überstand je Milliliter Medium war noch keine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erkennen, wohingegen bei höheren Konzentrationen eine deutliche Stimulierung der ICAM-1-Expression durch die Überstände festgestellt werden konnte.



**Abb. 58: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24h Stimulierung mit abnehmenden Verdünnungen von Überständen DQ12-exponierter Makrophagen.**

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit 200 µl von Verdünnungen des Makrophagenüberstandes für 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA. Dabei korreliert die auf der Abszisse aufgetragene optische Dichte bei 405 nm mit der Stärke der ICAM-1-Expression auf den Zellen. Dargestellt sind die Werte aus einem Versuch (n=8) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

Eine Stimulierung von BEAS-2B mit Überständen DQ12-stimulierter menschlicher Makrophagen bewirkte eine dosisabhängige Zunahme der ICAM-1-Bildung.

### 3.1.3.3 Beeinflussung der Bildung von Entzündungsparametern bei BEAS-2B durch Schwebstaubextrakte

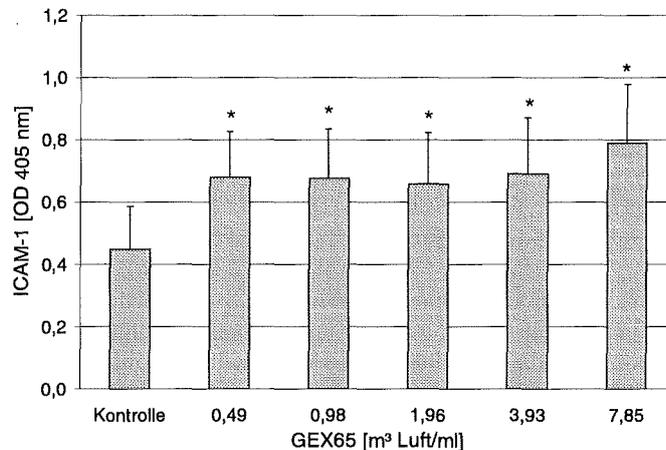
Um Aussagen über mögliche entzündungsfördernde Wirkungen von Schwebstaubextrakten auf Bronchialepithelzellen zu gewinnen, wurden BEAS-2B mit abnehmenden Verdünnungen der Schwebstaubextraktproben GEX65, GEX66, GEX67 und GEX68 für 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die Abnahme der Überstände, in denen jeweils die IL-6- und IL-8-Konzentrationen bestimmt wurden. Die ICAM-1-Expression wurde mittels zellständigem ELISA ermittelt. Durchflußzytometrische Messungen konnten nicht durchgeführt werden, da Schwebstaubproben Substanzen mit chromophoren Gruppen enthalten, welche schnell in die Zelle eindringen und eine fluoreszenzanalytische Messung wie die der FACS-Analyse stören.

#### *IL-6- und IL-8-Sekretion*

Es konnte kein Einfluß einer 24-stündigen Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit den Schwebstaubproben GEX65, GEX66, GEX67 bzw. GEX68 auf die IL-6- und IL-8-Sekretion festgestellt werden.

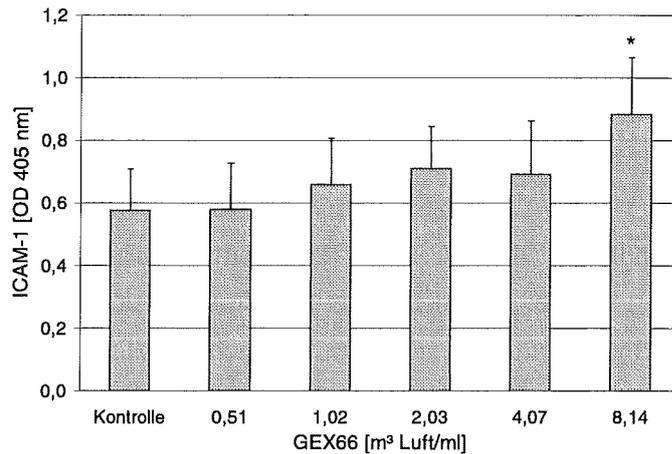
*ICAM-1-Expression*

Abb. 59 bis Abb. 62 zeigen die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit den Schwebstaubextrakten GEX65, GEX66, GEX67 und GEX68, gemessen im zellständigen ICAM-1-ELISA. GEX65 führte bei allen eingesetzten Verdünnungen zu einer signifikanten Erhöhung der ICAM-1-Expression verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 59). Dabei war kein stetiger Anstieg der ICAM-1-Expression mit zunehmenden GEX65-Konzentrationen sichtbar. Vielmehr erreichten die Zellen bereits bei GEX65-Verdünnungen von 1:32, dies entspricht einem Sammelluftvolumen von nur 0,49 m<sup>3</sup> Luft je Milliliter Medium, eine ähnlich hohe ICAM-1-Expression wie bei der 1:4-Verdünnung, die einem Luftvolumen von 3,93 m<sup>3</sup> je Milliliter entspricht. In vergleichbarem Maße gilt diese Feststellung auch für die ICAM-1-Expression der GEX67-behandelten Zellen, wobei hier lediglich die 1:4- und die 1:2-Verdünnung (entspricht Sammelluftvolumina von 4,01 m<sup>3</sup> bzw. 8,02 m<sup>3</sup> je Milliliter Medium) zu signifikant erhöhten Werten führten (Abb. 61). Dagegen zeigten Stimulierungen mit Schwebstäuben aus Düsseldorf, GEX66 und GEX68, bei einer vergleichbaren optischen Dichte bei 405 nm eine deutlichere Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der ICAM-1-Expression. Behandlungen mit der 1:2- bzw. der 1:2- und der 1:4-Verdünnung bewirkten eine signifikante Zunahme der ICAM-1-Expression (Abb. 60 und Abb. 62).



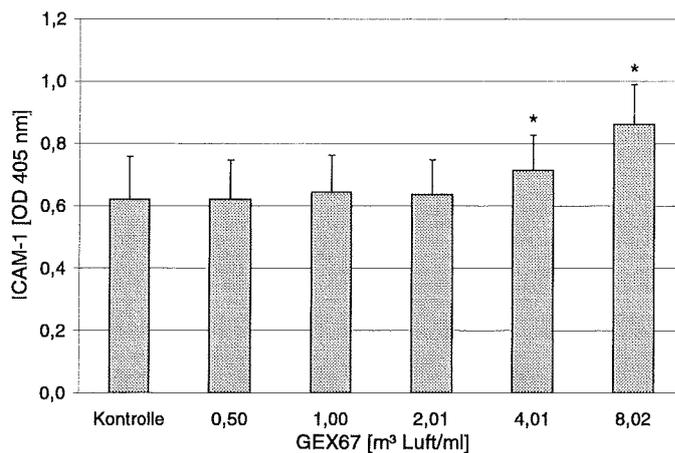
**Abb. 59: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit GEX65.**

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit Verdünnungen des Schwebstaubextraktes für 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA. Dabei korreliert die auf der Abszisse aufgetragene optische Dichte bei 405 nm mit der Stärke der ICAM-1-Expression auf den Zellen. Dargestellt sind die Werte aus 2 Versuchen (n=8) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).



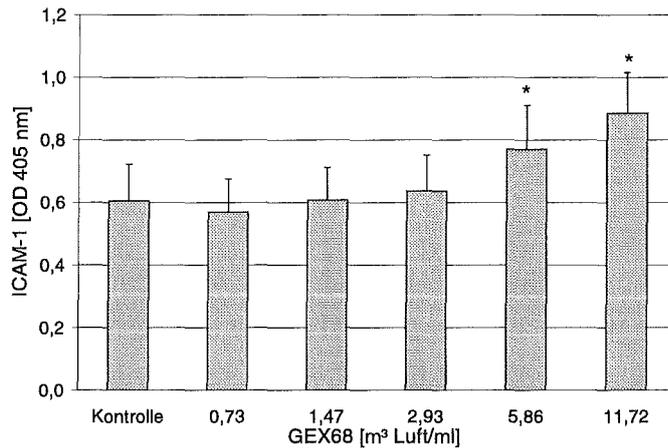
**Abb. 60: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulation mit GEX66.**

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit Verdünnungen des Schwebstaubextraktes für 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA. Dabei korreliert die auf der Abszisse aufgetragene optische Dichte bei 405 nm mit der Stärke der ICAM-1-Expression auf den Zellen. Dargestellt sind die Werte aus 2 Versuchen (n=8) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 61: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulation mit GEX67.**

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit Verdünnungen des Schwebstaubextraktes für 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA. Dabei korreliert die auf der Abszisse aufgetragene optische Dichte bei 405 nm mit der Stärke der ICAM-1-Expression auf den Zellen. Dargestellt sind die Werte aus 2 Versuchen (n=8) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 62: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit GEX68.**

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit Verdünnungen des Schwebstaubextraktes für 24h inkubiert. Anschließend erfolgte die Durchführung des zellständigen ICAM-1-ELISA. Dabei korreliert die auf der Abszisse aufgetragene optische Dichte bei 405 nm mit der Stärke der ICAM-1-Expression auf den Zellen. Dargestellt sind die Werte aus 2 Versuchen (n=8) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der unstimulierten Kontrolle unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

Während durch die Schwebstaubextrakte GEX65, GEX66, GEX67 und GEX68 keine Induktion der Interleukin-6- und Interleukin-8-Freisetzung bei BEAS-2B beobachtet werden konnte, führten diese doch zu einer dosisabhängigen Erhöhung der ICAM-1-Expression auf den Zellen.

### 3.1.4 Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Stäuben bzw. Staubextrakten und Ozon

Wie bereits oben erwähnt, treten gasförmige und partikuläre Verunreinigungen in der Atemluft niemals getrennt voneinander auf, sondern stets in einem komplexen Gemisch verschiedenster Komponenten. Umso wichtiger ist es, die Wirkungen dieser Komponenten nicht nur einzeln zu untersuchen, sondern den sehr wahrscheinlich vielfältigen Wechselwirkungen Rechnung zu tragen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Kombinationseffekte von Ozon und Stäuben bzw. Staubextrakten auf die Zytokinfreisetzung und die ICAM-1-Expression von Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) berücksichtigt.

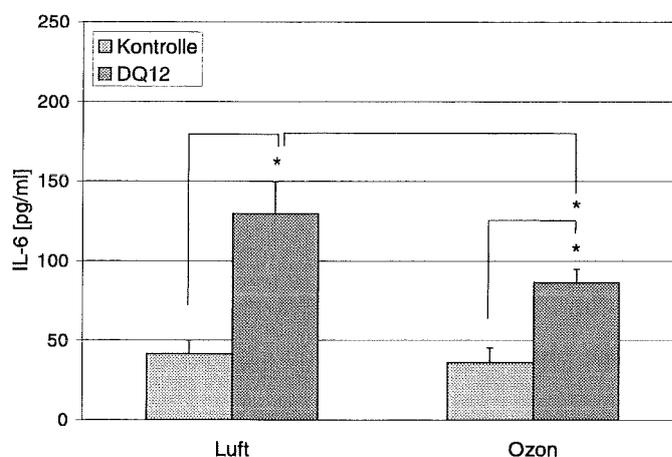
#### 3.1.4.1 Kombinationswirkung Quarzstaub (DQ12) und Ozon

In den folgenden Experimenten sollte geprüft werden, inwieweit Effekte partikulärer Luftverunreinigungen wie DQ12 auf Bronchialepithelzellen durch Ozon moduliert werden können. Dazu wurden BEAS-2B 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon exponiert und anschließend für 24h mit Kontrollmedium bzw. quarzstaubhaltigem Stimulierungsmedium inkubiert. Danach erfolgte die Abnahme der Überstände, aus denen die Zytokine IL-6 und

IL-8 bestimmt wurden sowie das Abtrypsinieren der Zellen mit anschließender durchflußzytometrischer Bestimmung der ICAM-1-Expression.

### *IL-6-Sekretion*

Eine 24-stündige Aktivierung mit DQ12 in einer Konzentration von 1000 µg/ml führte bei luft- wie ozonbegasten BEAS-2B zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6-Sekretion verglichen mit den entsprechenden unstimulierten Kontrollzellen. Nach vorangegangener Ozonbehandlung reagierten die stimulierten Zellen allerdings mit einer abgeschwächten Antwort auf den Stimulus DQ12. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Abb. 63).

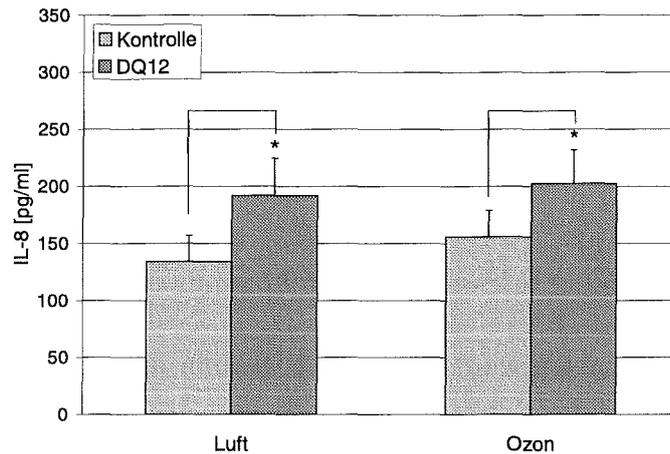


**Abb. 63: IL-6-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasten BEAS-2B nach 24-stündiger Inkubation mit 1000 µg/ml DQ12.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### *IL-8-Sekretion*

Bezüglich der IL-8-Freisetzung führte die Ozonexposition der Zellen zu erhöhten Werten verglichen mit denen luftbegaster Kontrollzellen. Eine zusätzliche DQ12-Stimulierung bewirkte bei luft- wie ozonexponierten Zellen eine signifikante Erhöhung der IL-8-Freisetzung. Die Differenz zwischen den Zytokinmengen stimulierter und unstimulierter Proben war bei den ozonbehandelten Zellen etwas geringer (Abb. 64).

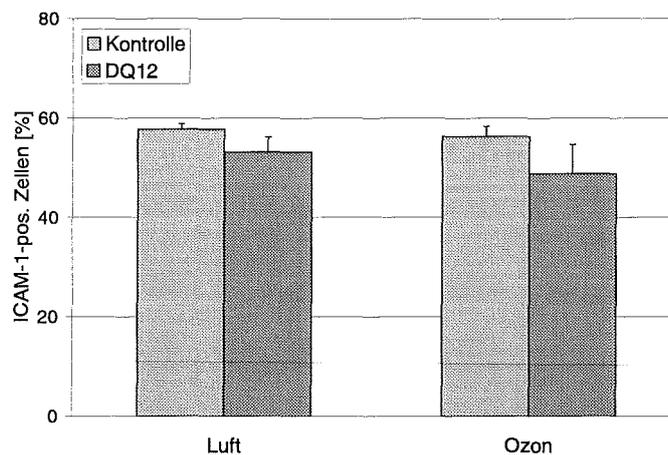


**Abb. 64: IL-8-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Inkubation mit 1000 µg/ml DQ12.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### ICAM-1-Expression

Die ICAM-1-Expression betreffend konnten, nach vorangegangener Begasung, keine DQ12-induzierten Effekte auf BEAS-2B-Zellen festgestellt werden (Abb. 65).



**Abb. 65: ICAM-1-Expression auf luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24-stündiger Stimulierung mit 1000 µg/ml DQ12.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen unter Trypsineinwirkung von den Membranen abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

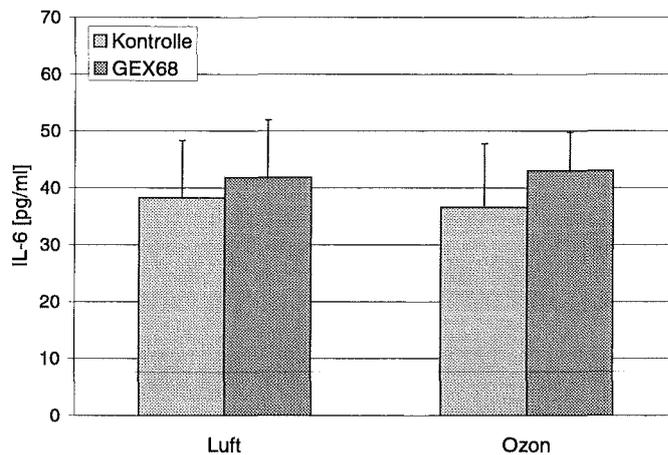
Wurden BEAS-2B mit Ozon begast und anschließend mit DQ12 stimuliert, so führte die Ozonbegasung zu einer Abschwächung der DQ12-induzierten Freisetzung der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8 verglichen mit derjenigen luftexponierter und stimulierter Kontrollen.

### 3.1.4.2 Kombinationswirkung Schwebstaubextrakte und Ozon

Bei den folgenden Experimenten wurden BEAS-2B 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon exponiert und anschließend für 24h mit dem Schwebstaubextrakt GEX68 in einer 1:2-Verdünnung inkubiert. Diese Verdünnung entspricht einem Sammelluftvolumen von 11,72 m<sup>3</sup> je Milliliter Stimulierungsmedium. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und auf IL-6 bzw. IL-8 untersucht. Mit diesen Versuchen sollte geprüft werden, inwieweit schwebstaubinduzierte Effekte auf Bronchialepithelzellen durch Ozon moduliert werden können.

#### *IL-6-Sekretion*

Eine 24-stündige Stimulierung von BEAS-2B mit einer 1:2-Verdünnung von GEX68, welche einem Luftvolumen von 11,72 m<sup>3</sup> je Milliliter Stimulierungsmedium entspricht, hatte keine nennenswerten Auswirkungen auf die IL-6-Freisetzung der Zellen (Abb. 66). Es konnten auch keine Unterschiede zwischen luft- und ozonbehandelten Zellen nachgewiesen werden.

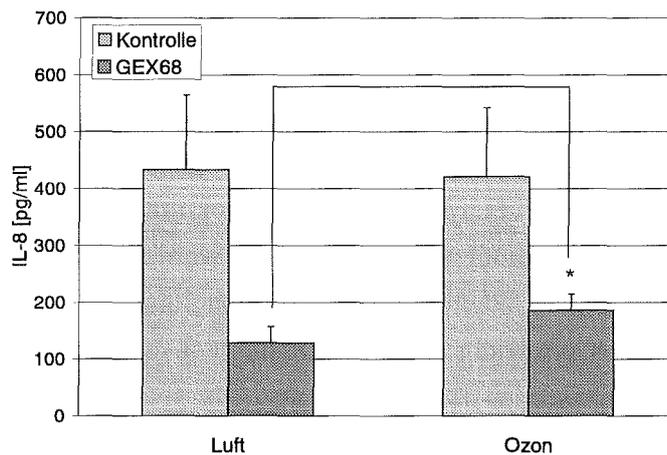


**Abb. 66:** IL-6-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24h Inkubation mit GEX68 in der Verdünnung 1:2.

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (n=5). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

### IL-8-Sekretion

BEAS-2B, die nach Luft- bzw. Ozonbehandlung für 24h mit GEX68 stimuliert worden waren, zeigten stark erniedrigte IL-8-Freisetzung verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 67). Dies war nach vorangegangener Luft- sowie nach Ozonbegasung gleichermaßen ausgeprägt. Dennoch setzten ozonvorbehandelte Zellen nach zusätzlicher Stimulierung mit GEX68 höhere IL-8-Mengen frei als nach vorangegangener Luftbegasung. Dieser Unterschied war 24h nach Stimulierung statistisch signifikant.



**Abb. 67:** IL-8-Freisetzung bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B nach 24h Inkubation mit GEX68 in der Verdünnung 1:2.

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium bzw. Stimulierungsmedium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen (n=5). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden.

### ICAM-1

Durchflußzytometrische Bestimmungen der ICAM-1-Expression auf schwebstaubstimulierten begasteten BEAS-2B waren aus den oben erwähnten Gründen der hohen Eigenfluoreszenz der Schwebstaubextrakte nicht möglich.

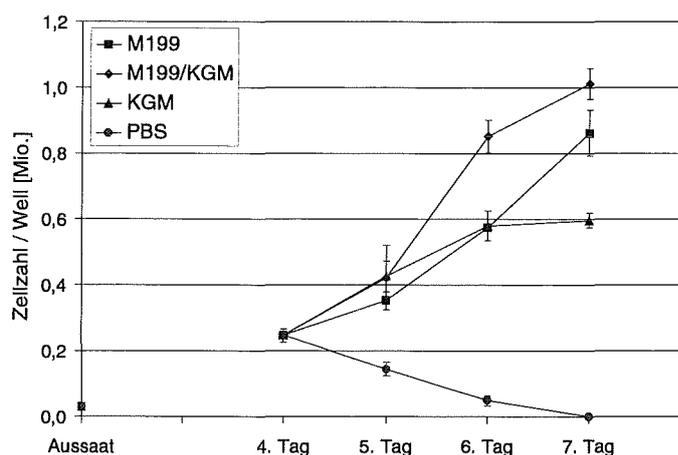
Eine Behandlung der BEAS-2B mit GEX68 nach der Begasung mit Luft bzw. Ozon hatte keine Auswirkungen auf die Interleukin-6-Freisetzung der Zellen. Die Interleukin-8-Sekretion betreffend bewirkte die GEX68-Stimulierung dagegen eine deutliche Verminderung bei luft- wie ozonbegasteten Zellen.

### 3.2 Entwicklung eines Kokultursystems aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304)

Eine wichtige Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten Kokulturmodelles aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304), anhand dessen inhalationstoxikologische Fragestellungen unter Berücksichtigung der Beteiligung des Endothels angemessen untersucht werden können. Grundlage des Systems war die Verwendung von Transwell®-Membransystemen, bei denen die Epithelzellen auf der Membran und die Endothelzellen auf dem Boden der Kulturplatte kultiviert werden konnten (siehe Abb. 6).

#### 3.2.1 Aufnahme von Wachstumskurven der ECV304 in verschiedenen Medien

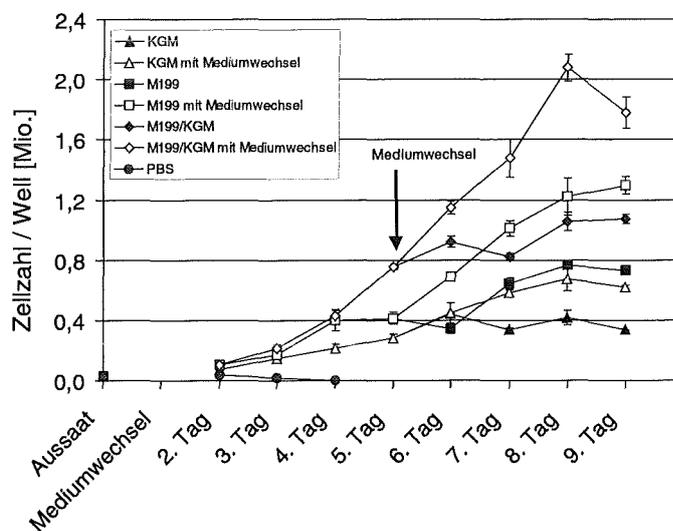
Da die ECV304 nach konfluentem Wachstum für Kokulturversuche mit BEAS-2B in KGM-Medium gehalten werden mußten, sollte geprüft werden, inwieweit diese Mediumumstellung zu Veränderungen im Wachstum der ECV304 führte. Der zeitliche Verlauf der Wachstumskurven in Abb. 68 entspricht dem Zeitschema, wie es bei den Begasungsversuchen in Kokultur vorlag: ECV304 wurden für Kokulturversuche maximal 24h in KGM-Medium inkubiert. Während dieser Zeitspanne ergaben sich keine bedeutenden Unterschiede im Zellwachstum bei Verwendung von Medium 199, KGM bzw. einer 1:1-Mischung der beiden Medien, wohingegen Kultivierung in PBS zu einem starken Absinken der Zellzahl führte. Somit stellte KGM ein geeignetes Medium für die Kokultur dar, das sowohl BEAS-2B als auch ECV304 für den entsprechenden Zeitraum von 24h zufriedenstellte.



**Abb. 68:** Wachstumskurven von ECV304, die ab dem 4. Tag nach Aussaat in verschiedenen Medien bzw. Puffer kultiviert worden waren.

ECV304 wurden in 6-Well-Kulturplatten 4 Tage in Medium 199 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am 4. Tag nach Aussaat erfolgte eine Zellzahlbestimmung sowie ein Mediumwechsel, wobei die Zellen entweder wiederum mit Medium 199 oder mit KGM, einer 1:1-Mischung aus KGM und Medium 199 bzw. mit PBS inkubiert wurden. Über 3 weitere Tage hinweg erfolgte täglich eine Bestimmung der Zellzahl. Dargestellt sind Werte aus einem Versuch (n=2) mit den jeweiligen Fehlerbalken (± SEM).

In einem weiteren Versuch wurde nochmals das Wachstumsverhalten von ECV304 in unterschiedlichen Medien bzw. Puffer überprüft. Diesmal wurden die Zellen bereits 24h nach Aussaat mit den verschiedenen Medien inkubiert. Während die Zellen in PBS innerhalb von 4 Tagen bereits abstarben, zeigten sie in KGM und Medium 199 bzw. Mischungen daraus gutes Wachstum. Der steilste Anstieg der Wachstumskurve war unter Verwendung der 1:1-Mischung von KGM und Medium 199 mit zusätzlichem Mediumwechsel am 5. Tag zu beobachten. Eine Kultivierung in KGM führte zu vermindertem Zellwachstum gegenüber der in Medium 199. Dennoch waren die Unterschiede nicht sehr stark ausgeprägt. Ein zusätzlicher Mediumwechsel am 5. Tag bewirkte bei allen Inkubationsmedien ein verstärktes Zellwachstum (Abb. 69).



**Abb. 69: Wachstumskurven von ECV304, die ab dem 1. Tag nach Aussaat mit unterschiedlichen Medien bzw. Puffer kultiviert worden waren und Einfluß eines Mediumwechsels am 5. Tag.**

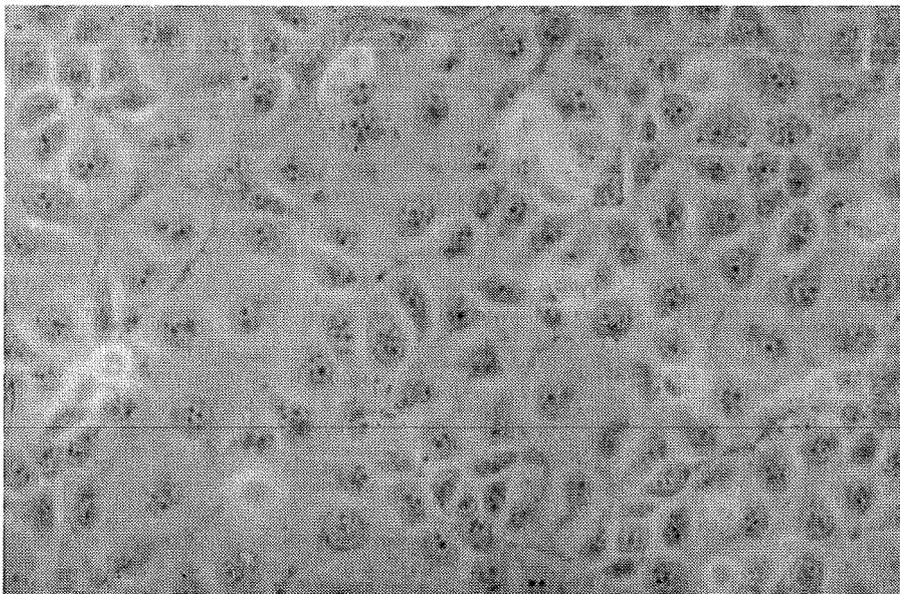
ECV304 wurden in 6-Well-Kulturplatten in Medium 199 ausgesät und 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Zellen entweder wiederum mit Medium 199 oder mit KGM, einer 1:1-Mischung aus KGM und Medium 199 bzw. mit PBS inkubiert wurden. Bei einem Teil der Zellen wurde zusätzlich am 5. Tag nach Aussaat ein Mediumwechsel durchgeführt. Insgesamt wurden die Zellen über einen Zeitraum von 9 Tagen nach der Aussaat kultiviert, wobei täglich Bestimmungen der Zellzahl für die verschiedenen Ansätze durchgeführt wurden. Dargestellt sind die Werte aus einem Versuch (n=3) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM).

### 3.2.2 Prüfung auf morphologische Veränderungen der ECV304 in verschiedenen Medien

Neben dem Wachstumsverhalten der Zellen liefert auch deren Morphologie wichtige Hinweise auf geeignete oder ungeeignete Kulturbedingungen. Deshalb wurde diese bei ECV304, die jeweils in verschiedenen Testmedien kultiviert worden waren, licht- und raster-elektronenmikroskopisch überprüft.

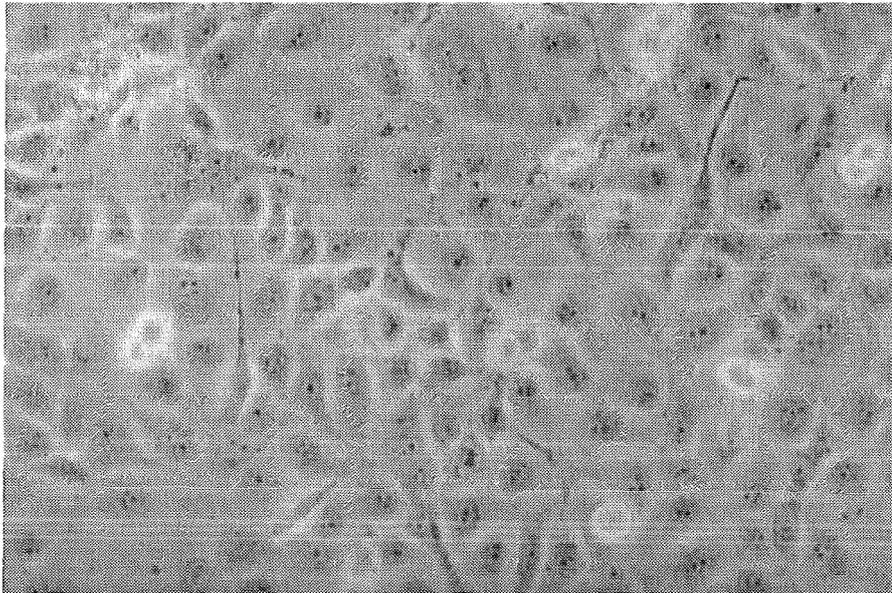
#### *Lichtmikroskopische Untersuchungen*

In Abb. 70 bis Abb. 72 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der ECV304 nach 4 Tagen Kultivierung in Medium 199 (Abb. 70), in einer 1:1-Mischung aus Medium 199 und KGM-Medium (Abb. 71) sowie in reinem KGM (Abb. 72) dargestellt. Unter allen Kulturbedingungen zeigten die Zellen gutes Wachstum und die Ausbildung eines dichten Monolayers. Jedoch bewirkte der Anteil KGM-Medium in der Mischung eine morphologische Veränderung der Zellen in Richtung eines spindelförmigeren Aussehens. Noch deutlicher war dieser Effekt bei Kultivierung der Zellen in reinem KGM. Dieses Phänomen beruht auf dem verminderten Serumgehalt des Mischungsmediums bzw. dem völligen Fehlen von Serum in dem reinen KGM-Medium und wurde bereits in der vom Hersteller gelieferten Beschreibung der Zelllinie erwähnt.



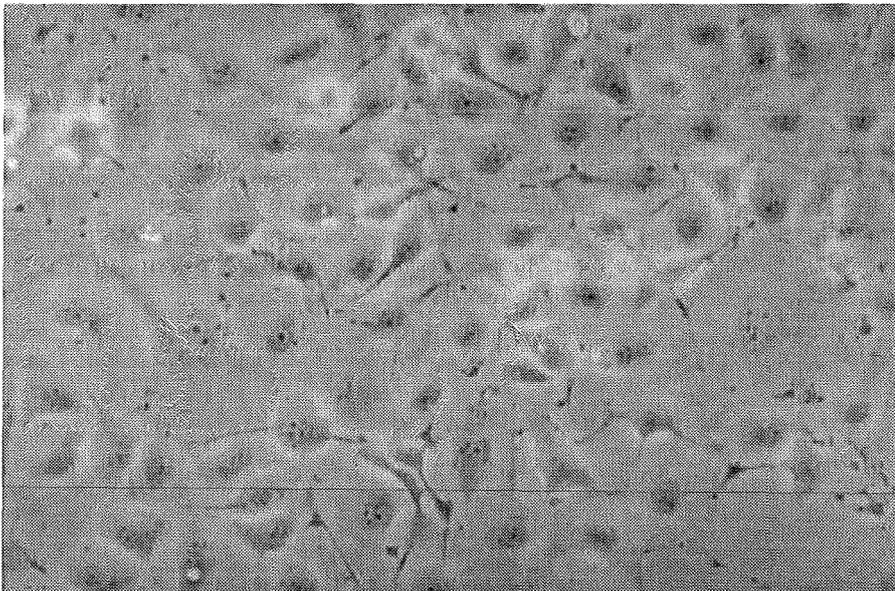
**Abb. 70:** Lichtmikroskopische Aufnahme von ECV304 nach Kultivierung in Medium 199.

ECV304 wurden in 6-Well-Kulturplatten in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen frisches Medium 199 gegeben wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen im Lichtmikroskop bei einer 125-fachen Vergrößerung betrachtet und fotografiert.



**Abb. 71: Lichtmikroskopische Aufnahme von ECV304 nach 4-tägiger Kultur in einer 1:1-Mischung aus Medium 199 und KGM.**

ECV304 wurden in 6-Well-Kulturplatten in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen eine Mischung aus Medium 199 und KGM zu gleichen Teilen gegeben wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen im Lichtmikroskop bei einer 125-fachen Vergrößerung betrachtet und fotografiert.

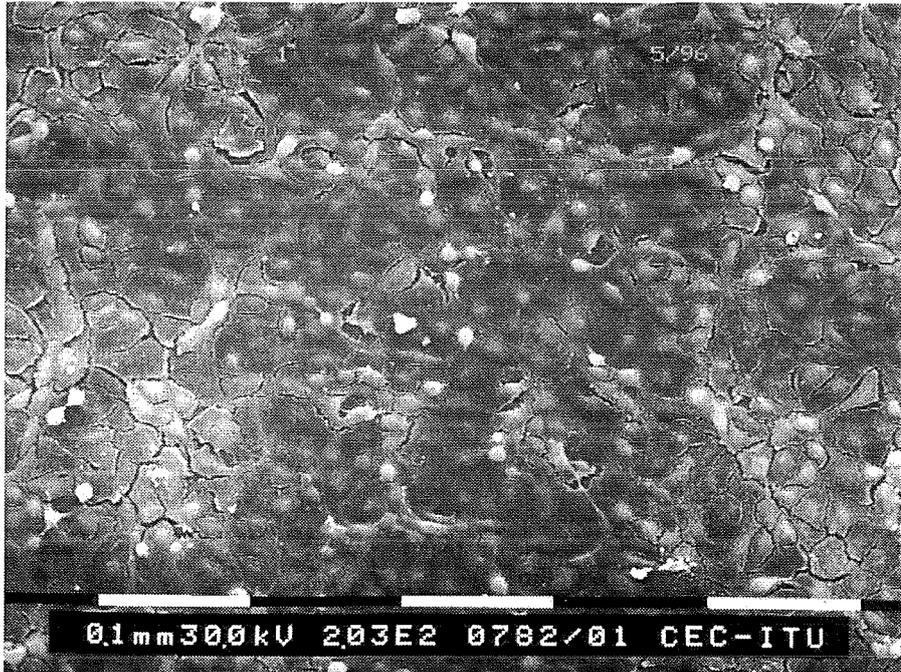


**Abb. 72: Lichtmikroskopische Aufnahme von ECV304 nach 4-tägiger Kultur in KGM-Medium.**

ECV304 wurden in 6-Well-Kulturplatten in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen KGM-Medium gegeben wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen im Lichtmikroskop bei einer 125-fachen Vergrößerung betrachtet und fotografiert.

### *Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen*

Die bereits unter dem Lichtmikroskop beobachteten Auswirkungen der unterschiedlichen Kulturmedien auf die Morphologie der ECV304 zeigte sich auch bei Betrachtung der Zellen im REM. Mit abnehmendem Serumgehalt des Mediums differenzierten sich die Zellen in Richtung eines spindelförmigeren Aussehens aus. Gleichzeitig nahm die Zahl der abgerundeten Zellen zu (Abb. 73 bis Abb. 75).



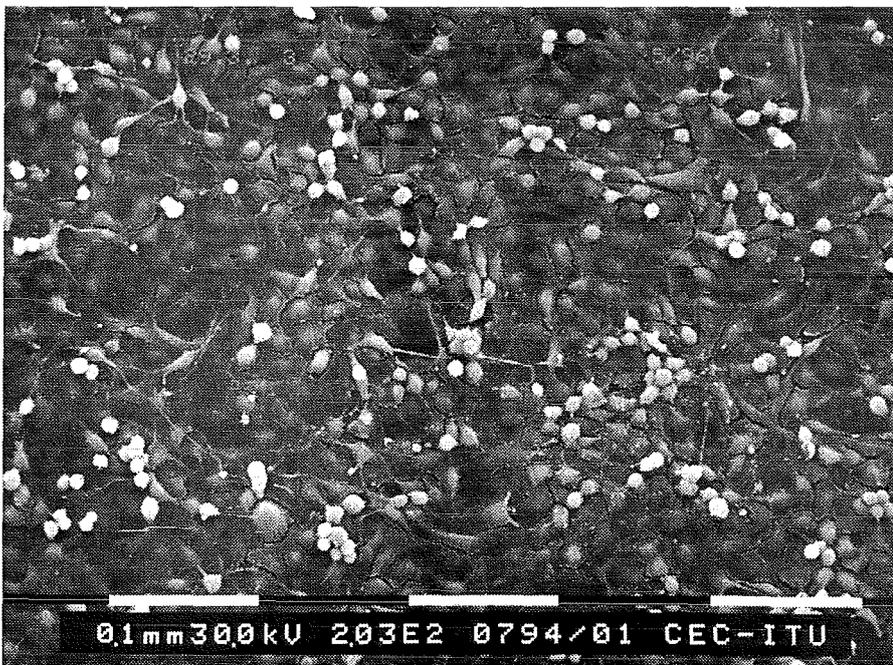
**Abb. 73: REM-Aufnahme von ECV304 nach Kultivierung in Medium 199.**

ECV304 wurden in Transwell®-Membransystemen in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen frisches Medium 199 zugesetzt wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Der angegebene Maßbalken entspricht einer Länge von 0,1 mm.



**Abb. 74: REM-Aufnahme von ECV304 nach 4-tägiger Kultur in einer 1:1-Mischung aus Medium 199 und KGM.**

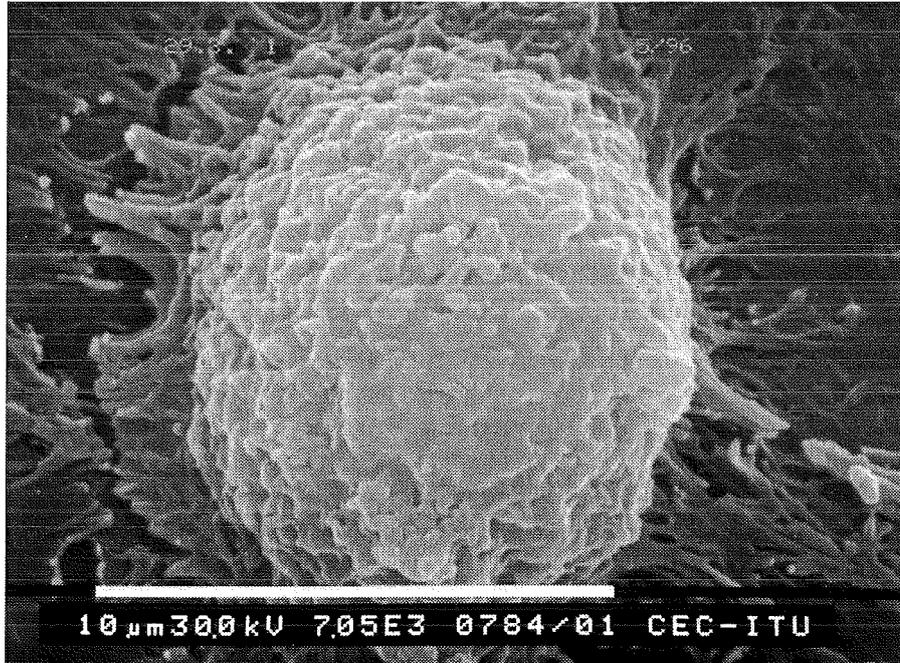
ECV304 wurden in Transwell®-Membransystemen in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen eine Mischung aus Medium 199 und KGM zu gleichen Teilen zugesetzt wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Der angegebene Meßbalken entspricht einer Länge von 0,1 mm.



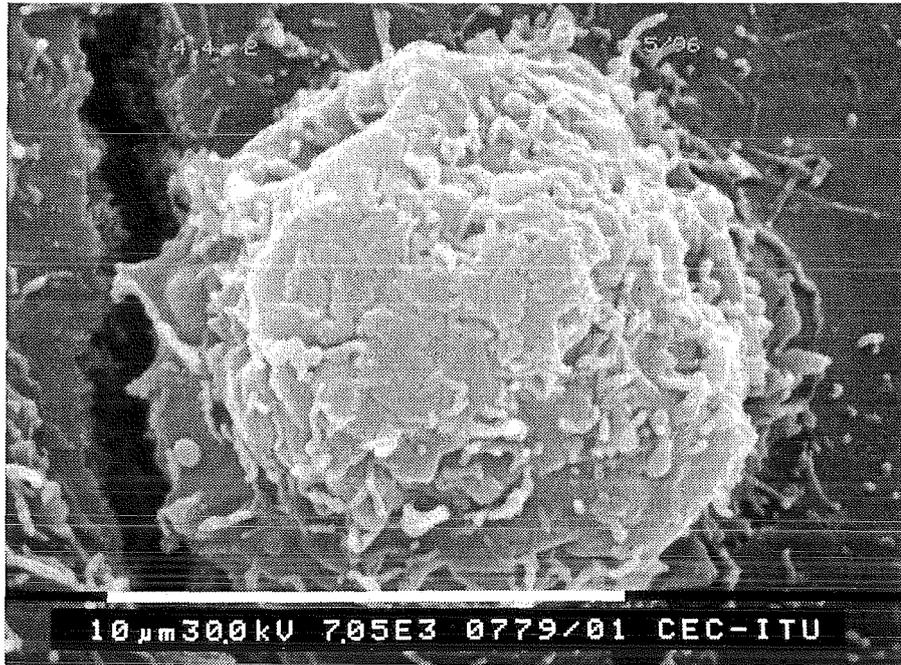
**Abb. 75: REM-Aufnahme von ECV304 nach 4-tägiger Kultur in KGM-Medium.**

ECV304 wurden in Transwell®-Membransystemen in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen KGM-Medium zugesetzt wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Der angegebene Meßbalken entspricht einer Länge von 0,1 mm.

Abb. 76 bis Abb. 78 zeigen in Ausschnittsvergrößerungen die Oberfläche einer Endothelzelle nach 4-tägiger Kultur in den drei getesteten Kulturmedien. Es war eine deutliche Veränderung der Oberflächenstruktur mit abnehmendem Serumgehalt des Mediums zu beobachten. Möglicherweise bewirkte dabei das verminderte Angebot von Wachstumsfaktoren eine Vergrößerung der Zelloberfläche.

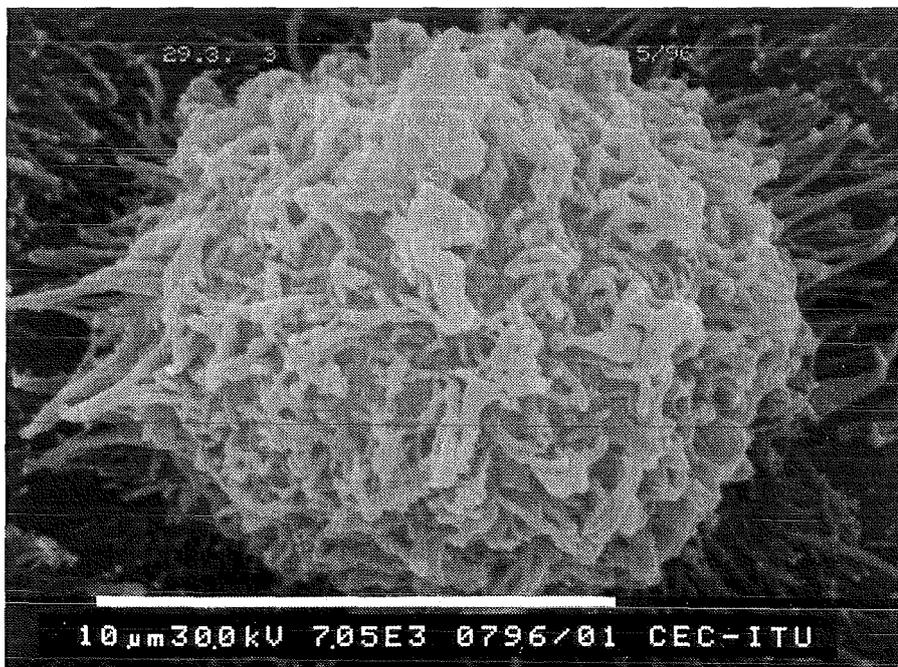


**Abb. 76: REM-Aufnahme einer Endothelzelle (ECV304) nach Kultivierung in Medium 199.**  
ECV304 wurden in Transwell®-Membransystemen in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen frisches Medium 199 zugesetzt wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Dargestellt ist die Oberfläche einer Endothelzelle. Die Länge des Meßbalkens entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 77: REM-Aufnahme einer Endothelzelle (ECV304) nach 4-tägiger Kultur in einer 1:1-Mischung aus Medium 199 und KGM.**

ECV304 wurden in Transwell®-Membransystemen in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen eine Mischung aus Medium 199 und KGM zu gleichen Teilen zugesetzt wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Dargestellt ist die Oberfläche einer Endothelzelle. Die Länge des Meßbalkens entspricht 10 µm.



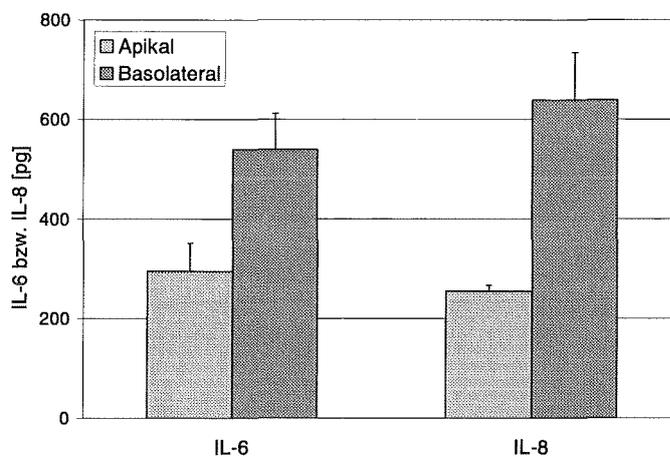
**Abb. 78: REM-Aufnahme einer Endothelzelle (ECV304) nach 4-tägiger Kultur in KGM-Medium.**

ECV304 wurden in Transwell®-Membransystemen in Medium 199 ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, wobei den Zellen KGM-Medium zugesetzt wurde. Nach weiteren 4 Tagen Kultivierung wurden die Zellen fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Dargestellt ist die Oberfläche einer Endothelzelle. Die Länge des Meßbalkens entspricht 10 µm.

### 3.2.3 Versuche zur Diffusion von Transmittern durch das Membransystem

Eine weitere wichtige Problemstellung im Zusammenhang mit dem für die Kokultur verwendeten Membransystem war die Frage, inwieweit von den BEAS-2B freigesetzte Transmitter ungehindert durch die Membran durchdiffundieren konnten, stellte diese Diffusion doch die Grundlage für eine Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen des Systems dar. Aus diesem Grunde wurden Versuche zur Diffusion von IL-6 und IL-8 durch das Membransystem ohne Zellen durchgeführt.

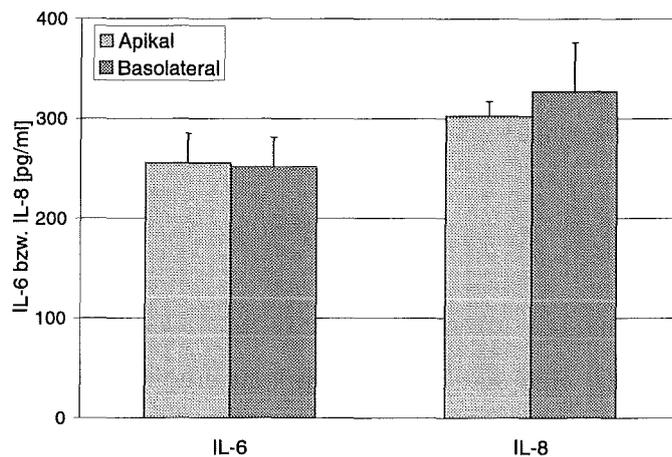
Abb. 79 zeigt die Diffusion von IL-6 und IL-8 durch die Membran während eines Zeitraums von 24h. Zu Beginn des Versuchs befanden sich im apikalen Kompartiment 1,5 ml Medium mit einer IL-6- bzw. IL-8-Konzentration von 1000 pg/ml. Dies entsprach in absoluten Zahlen einer Zytokinmenge von 1500 pg. Im basolateralen Kompartiment befanden sich 1,5 ml Medium. Wie in der Abbildung deutlich zu sehen, waren nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> beträchtliche Zytokinmengen durch die Membran hindurch in das basolaterale Kompartiment diffundiert. Die höheren Zytokinmengen im basolateralen Kompartiment lassen sich mit Verschiebungen des Flüssigkeitsvolumens in den beiden Kompartimenten erklären. So fand man im Durchschnitt nach Ablauf der Inkubationszeit im apikalen Kompartiment nur noch ca. 0,8 ml, im basolateralen dagegen 2,1 ml Flüssigkeit.



**Abb. 79: Diffusionsversuch: Absolute Mengen an IL-6 und IL-8 im apikalen und basolateralen Kompartiment.**

In Transwell-COL<sup>®</sup>-Membransystemen wurden 1,5 ml KGM in das basolaterale und 1,5 ml Medium mit einer IL-6- bzw. IL-8-Konzentration von 1000 pg/ml in das apikale Kompartiment pipettiert. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Abnahme der Überstände nach Kompartimenten getrennt. Gleichzeitig wurde das Flüssigkeitsvolumen in beiden Kompartimenten bestimmt. Die Überstände wurden mit ELISA auf IL-6 bzw. IL-8 untersucht und die erhaltenen Konzentrationen in die Absolutmengen Zytokin im jeweiligen Kompartiment umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte aus einem Versuch (n=3) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM).

Betrachtet man jedoch die Konzentrationsverhältnisse, die in Abb. 80 dargestellt sind, so sieht man, daß sich über die Zeit die Konzentrationen in beiden Kompartimenten aneinander angleichen.



**Abb. 80: Diffusionsversuch: Konzentrationen an IL-6 und IL-8 im apikalen und basolateralen Kompartiment.**

In Transwell-COL<sup>®</sup>-Membransystemen wurden 1,5 ml KGM in das basolaterale und 1,5 ml Medium mit einer IL-6- bzw. IL-8-Konzentration von 1000 pg/ml in das apikale Kompartiment pipettiert. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Abnahme der Überstände nach Kompartimenten getrennt. Die Überstände wurden mit ELISA auf IL-6 bzw. IL-8 untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte aus einem Versuch (n=3) mit den jeweiligen Fehlerbalken ( $\pm$  SEM).

Eine 24-stündige Kultivierung der ECV304 in KGM-Medium im Rahmen der Kokultursysteme hatte keinen nennenswerten Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Dagegen konnten gewisse morphologische Veränderungen der Oberflächenstruktur im Rasterelektronenmikroskop beobachtet werden. Durch das für die Kokultur eingesetzte Transwell<sup>®</sup>-Membransystem konnten die Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8 ungehindert durchdiffundieren.

### 3.3 Wirkungen von Luftschadstoffen (Ozon, Stäube) auf die Bildung von Entzündungsparametern bei einem Kokultursystem aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304)

In einem dritten Teil dieser Arbeit sollte die Anwendbarkeit des entwickelten Kokultursystems für Untersuchungen zur Wirkung von Ozon überprüft werden. Dabei war neben den Ergebnissen zur Ozonwirkung auf das System auch die Unterschiedlichkeit des Verhaltens einzeln kultivierter und kokultivierter Zellen von Interesse. Endpunkte der Messungen waren wiederum die Zytokine IL-6 und IL-8 sowie die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B und ECV304. Analog zu den Versuchen im ersten Teil wurden Versuche zu Kombinationswirkungen von Ozon mit Stimuli wie TNF- $\alpha$  und Zymosan bzw. Stäuben und Staubextrakten im Kokultursystem durchgeführt.

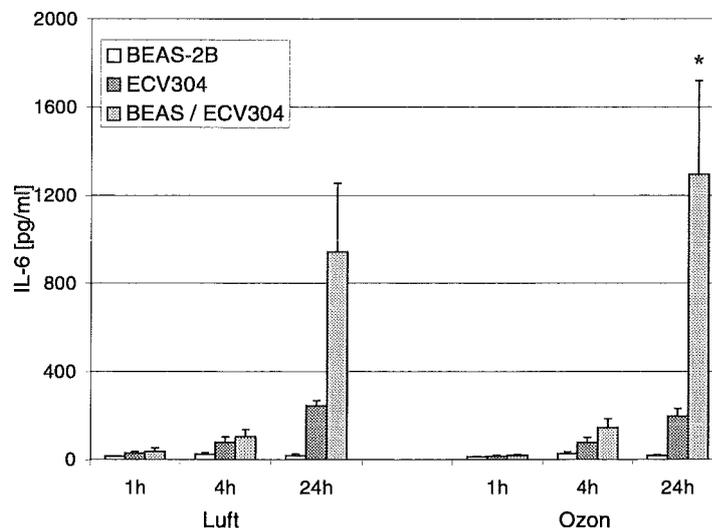
#### 3.3.1 Beeinflussung der Bildung von Entzündungsmediatoren durch Ozon

Begasungsversuche mit dem Kokultursystem sollten mögliche Wechselwirkungen zwischen Bronchialepithelzellen und Endothelzellen und deren Bedeutung bei einer ozoninduzierten

Entzündung aufdecken. Man beachte, daß bei derartigen Begasungsversuchen lediglich die Epithelzellen in Kontakt mit dem Gas kamen und somit Wirkungen auf das Endothel nur indirekt, also über die Freisetzung von Transmittern, ausgelöst werden konnten.

### IL-6-Sekretion

Zunehmende Inkubationszeiten führten im Kokultursystem zu ansteigenden IL-6-Freisetzungen. Es zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte IL-6-Freisetzung 24h nach Ozonexposition verglichen mit derjenigen luftexponierter Zellen. Die Menge an freigesetztem Zytokin in der Kokultur überstieg jedoch im luft- wie ozonexponierten System die bloße Addition der freigesetzten Mengen der isoliert kultivierten, sonst aber gleich behandelten Zellarten (Abb. 81).

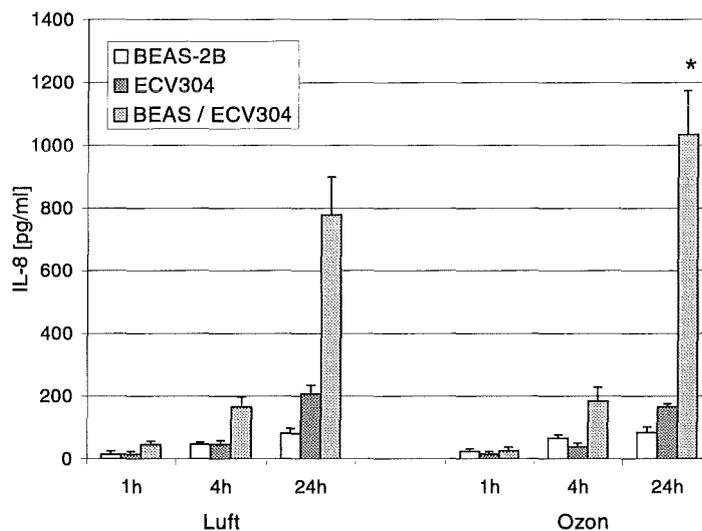


**Abb. 81: IL-6-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304.**

Die Zellen wurden entweder einzeln oder in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 1h, 4h und 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2-5 Versuchen (n=3-10). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen luftexponierter Zellen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

*IL-8-Sekretion*

Die IL-8-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem entsprach im wesentlichen der IL-6-Freisetzung. Insgesamt war über die Zeit hinweg ein Anstieg der Zytokinmengen zu messen. Zum Zeitpunkt 24h nach Begasung war eine signifikant erhöhte IL-8-Freisetzung im ozonbegasteten Kokultursystem, verglichen mit dem luftbegasteten System, festzustellen. Die Menge an freigesetztem Zytokin in der Kokultur überstieg bei weitem die bloße Addition der Zytokinmengen, die von den einzeln kultivierten Zellarten produziert worden waren (Abb. 82).

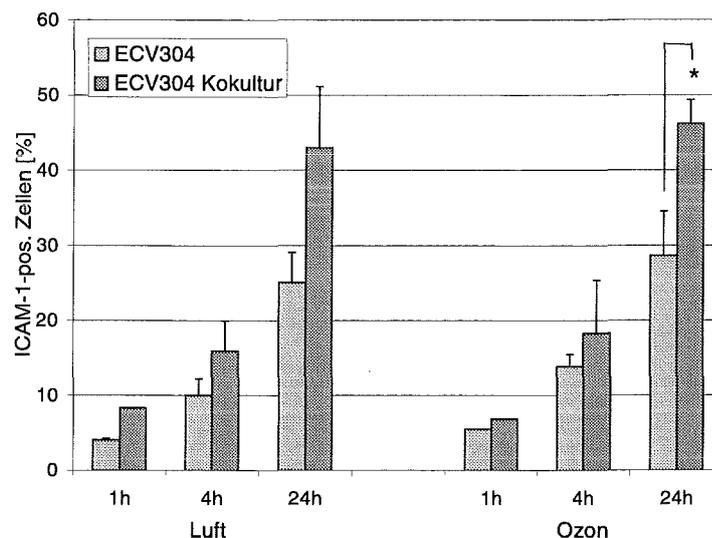


**Abb. 82: IL-8-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304.**

Die Zellen wurden entweder einzeln oder in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 1h, 4h und 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-6 Versuchen (n=5-11). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen luftexponierter Zellen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### ICAM-1-Expression auf ECV304

Bezüglich der ICAM-1-Expression auf ECV304 konnte eine Zunahme der Expression über die Zeit hinweg beobachtet werden. Signifikante Unterschiede zwischen ECV304 aus dem luftbegasteten System und ECV304 aus dem ozonbegasteten System wurden nicht beobachtet. Dagegen zeigten Endothelzellen, die in Kokultur kultiviert worden waren, verglichen mit den einzeln kultivierten Zellen, erhöhte ICAM-1-Expressionen. Zum Zeitpunkt 24h war dieser Unterschied im ozonbegasteten System statistisch signifikant (Abb. 83).



**Abb. 83: Zeitabhängige ICAM-1-Expression auf kokultivierten bzw. einzeln kultivierten ECV304 im luft- und ozonbegasteten System.**

Die Zellen wurden entweder einzeln oder in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 1h, 4h und 24h nach der Exposition wurden die ECV304 von den Kulturplatten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=3). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen luftexponierter Zellen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

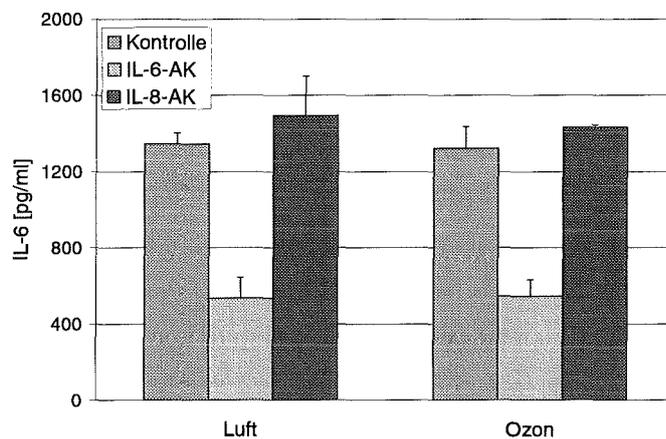
### IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ -Sekretion

Da in früheren Experimenten mit ECV304 gezeigt werden konnte, daß diese auf eine Stimulierung mit TNF- $\alpha$  dosisabhängig mit erhöhten IL-6- und IL-8-Freisetzungen sowie einer verstärkten ICAM-1-Expression reagieren, lag die Frage nahe, ob TNF- $\alpha$  an der überschießenden IL-6- und IL-8-Sekretion in der Kokultur und der gesteigerten ICAM-1-Expression kokultivierter ECV304 beteiligt war. Gleiches gilt für IL-1 $\beta$ , das ebenfalls in Vorversuchen ECV304 zu einer verstärkten Bildung der genannten Entzündungsparameter zu stimulieren vermochte. Aus diesem Grunde wurden Überstände aus Kokulturversuchen auf ihre Gehalte an TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  untersucht. Dabei zeigte sich, daß keines der beiden Zytokine im System nachweisbar vorhanden war und somit nicht für die erwähnten Kokultureffekte verantwortlich gemacht werden konnte.

### Versuche mit Antikörpern gegen Interleukin-6 bzw. Interleukin-8

Das parallele Vorhandensein der beiden Zytokine IL-6 und IL-8 sowie deren überschießende Freisetzung im Kokultursystem legten die Vermutung nahe, daß ein Zytokin die Freisetzung des anderen stimulierte und so zu einem gegenseitigen „Hochschaukeln“ der Zytokin-freisetzungen führte. Eine andere Möglichkeit wäre die, daß einmal gebildetes IL-6 oder IL-8 seine eigene Synthese förderte und dadurch zu der überschießenden Reaktion führte. Derartige Fragestellungen konnten unter Anwendung von Antikörpern gegen IL-6 bzw. IL-8 geklärt werden.

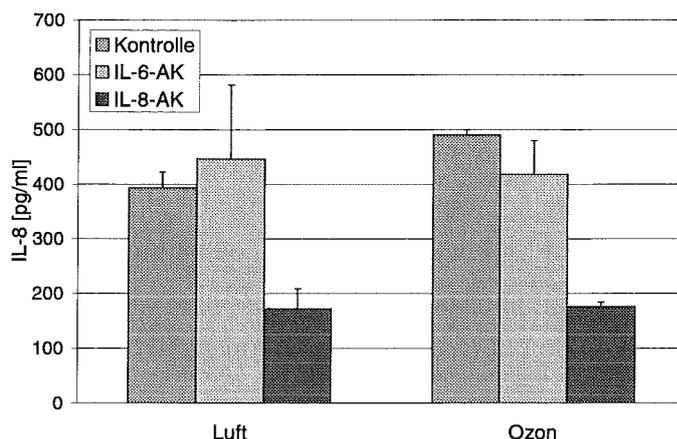
Abb. 84 zeigt die IL-6-Freisetzung im begasten Kokultursystem bei Anwesenheit eines Antikörpers gegen IL-6 bzw. IL-8. Während der Antikörper gegen IL-6 bewirkte, daß im ELISA verminderte Mengen an IL-6 gemessen werden konnten, war die Interleukin-6-Sekretion von der Anwesenheit des Antikörpers gegen IL-8 unbeeinflusst.



**Abb. 84: IL-6-Freisetzung im begasten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 unter Koinkubation mit einem Antikörper gegen IL-6 bzw. IL-8.**

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Sowohl während der Luft- bzw. Ozon-begasung als auch während der sich anschließenden Inkubation wurde ein Antikörper gegen IL-6 bzw. IL-8 in einer Endkonzentration von 5 µl/ml mitinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Abnahme der Überstände und deren Untersuchung auf IL-6 mit ELISA. Dargestellt sind die Werte aus einem Versuch (n=2). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

Entsprechende Beobachtungen ergaben sich, wenn während des Versuchs ein Antikörper gegen IL-8 zugesetzt wurde: Da der Antikörper auch in den abgenommenen Überständen enthalten war, konnte im ELISA nur ein Teil der tatsächlich freigesetzten Menge an IL-8 erfaßt werden. Dagegen blieb die IL-6-Freisetzung von der Antikörperinkubation unabhängig (Abb. 85).



**Abb. 85: IL-8-Freisetzung im begasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 unter Koinkubation mit einem Antikörper gegen IL-6 bzw. IL-8.**

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Sowohl während der Luft- bzw. Ozonbegasung als auch während der sich anschließenden Inkubation wurde ein Antikörper gegen IL-6 bzw. IL-8 in einer Endkonzentration von 5 µl/ml mitinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Abnahme der Überstände und deren Untersuchung auf IL-8 mit ELISA. Dargestellt sind die Werte aus einem Versuch (n=2). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

Eine Ozonbegasung des Kokultursystems führte nach 24h Inkubation zu erhöhten Interleukin-6- und Interleukin-8-Freisetzungen verglichen mit den entsprechenden luftbegasteten Kontrollzellen. Dabei überstieg im luft- wie ozonbegasteten System die Menge an freigesetztem Zytokin in der Kokultur bei weitem die bloße Addition der Zytokinmengen, die von den einzeln kultivierten, sonst aber gleich behandelten Zellarten produziert worden waren.

Kokultivierte ECV304 zeigten eine höhere ICAM-1-Expression als die entsprechenden einzeln kultivierten Zellen.

Es konnte kein Interleukin-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  im System nachgewiesen werden.

Die überschießende IL-6- bzw. IL-8-Freisetzung im System beruhte nicht auf einem gegenseitigen „Hochschaukeln“ der beiden Zytokine oder einer Eigenstimulierung der Zytokine.

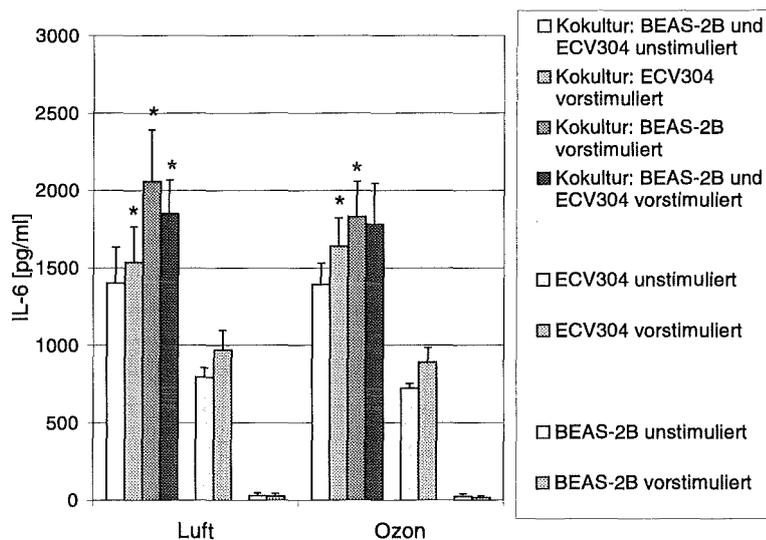
### 3.3.2 Beeinflussung der Immunantwort auf verschiedene Stimuli durch Ozon

Wie bei den Versuchen mit einzeln kultivierten BEAS-2B im ersten Teil der Arbeit sollte eine 24-stündige Vorstimulierung des Kokultursystems mit TNF- $\alpha$  vor der Luft- bzw. Ozonexposition Aufschluß über immunmodulierende Eigenschaften des Ozons geben. Entsprechende Versuche wurden auch mit Zymosan nach vorangegangener Begasung durchgeführt.

### 3.3.2.1 Stimulierung mit TNF- $\alpha$

#### IL-6-Sekretion

Abb. 86 zeigt die IL-6-Freisetzung im begasten Kokultursystem, wobei vor der Luft- bzw. Ozonbegasung entweder BEAS-2B, ECV304 oder beide Zelltypen für 24h mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  vorinkubiert worden waren. Parallel wurden entsprechende Ansätze der einzeln kultivierten Zellarten durchgeführt. Deutlich waren wiederum die hohen Zytokinfreisetzungen im Kokultursystem verglichen mit denen der einzeln kultivierten, sonst aber gleich behandelten Zellarten. Sowohl die Vorstimulierung der Epithelzellen als auch die der Endothelzellen führte im luft- wie ozonexponierten System zu signifikanten Erhöhungen der IL-6-Sekretion gegenüber den unstimulierten Kontrollen. Interessanterweise bewirkte die Voraktivierung beider Zelltypen keine weitere Steigerung der IL-6-Freisetzung. Eine Vorstimulierung mit TNF- $\alpha$  führte auch bei isoliert kultivierten ECV304 zu einer erhöhten IL-6-Sekretion. Insgesamt konnten jedoch keine Unterschiede in den Zytokinfreisetzungen zwischen luft- und ozonexponierten Zellen beobachtet werden.



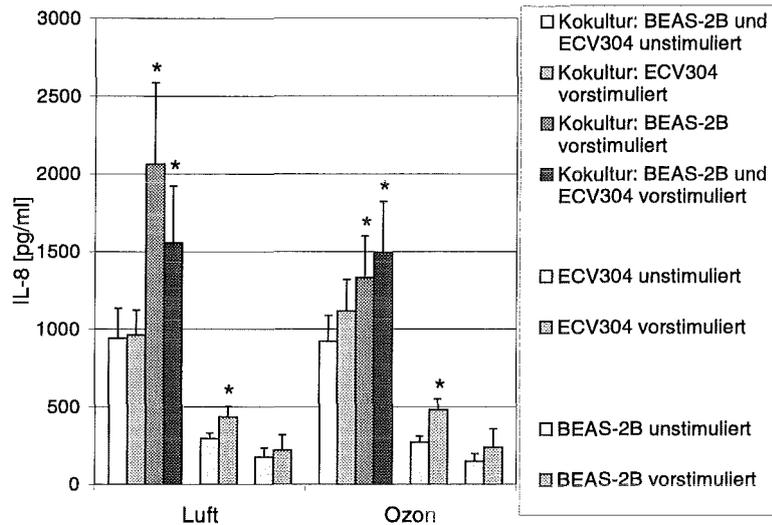
**Abb. 86: IL-6-Freisetzung im TNF- $\alpha$ -vorstimulierten luft- bzw. ozonbegasten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304.**

ECV304 und/oder BEAS-2B wurden mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  für 24h vorinkubiert und entweder einzeln oder in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=4). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

#### IL-8-Sekretion

Entsprechende Daten sind für die IL-8-Sekretion in Abb. 87 gezeigt. Während die Vorstimulierung der Endothelzellen nur geringfügige Erhöhungen der IL-8-Freisetzung im Kokultursystem bewirkte, wurden nach Vorbehandlung der BEAS-2B sowie beider Zelltypen

im luft- wie ozonbegasteten System signifikant erhöhte IL-8-Werte, verglichen mit den Werten im unstimulierten Kontrollsystem, festgestellt. Dabei schien die Vorstimulierung der BEAS-2B bei anschließender Ozonbehandlung weniger effektiv bezüglich der Induktion zur IL-8-Freisetzung verglichen mit derjenigen im luftbegasteten System. Luft- wie ozonbegaste isoliert kultivierte ECV304 synthetisierten nach Voraktivierung mit TNF- $\alpha$  signifikant erhöhte IL-8-Mengen. Auch die Vorbehandlung der einzeln kultivierten BEAS-2B mit TNF- $\alpha$  resultierte in erhöhten IL-8-Freisetzungen der Zellen.

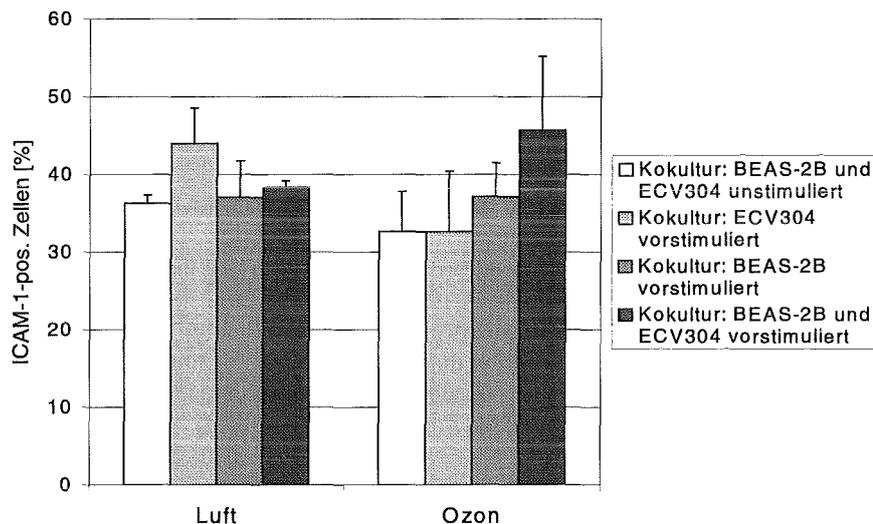


**Abb. 87: IL-8-Freisetzung im TNF- $\alpha$ -vorstimulierten luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304.**

ECV304 und/oder BEAS-2B wurden mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  für 24h vorinkubiert und entweder einzeln oder in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 3 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

### ICAM-1-Expression auf BEAS-2B

Bezüglich der ICAM-1-Expression auf BEAS-2B, die in Abb. 88 gezeigt ist, konnten keine eindeutigen Effekte durch die Vorbehandlung mit TNF- $\alpha$  gefunden werden. Zwar war ein Anstieg der ICAM-1-Expression im ozonbegasteten System durch Voraktivierung der BEAS-2B sowie Vorstimulierungen beider Zelltypen sichtbar. Dieser Effekt fehlte jedoch im luftbegasteten System völlig.

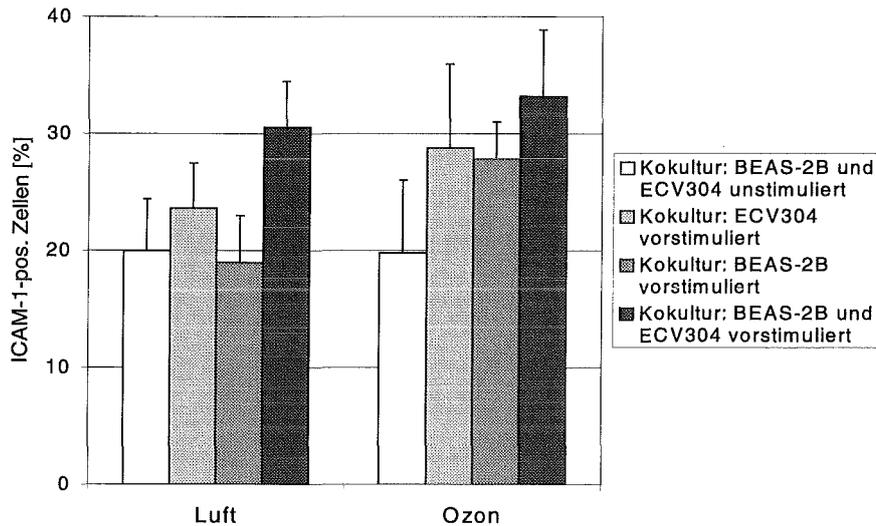


**Abb. 88: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B im TNF- $\alpha$ -vorstimulierten luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304.**

ECV304 und/oder BEAS-2B wurden mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  für 24h vorinkubiert und in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die BEAS-2B unter Trypsineinwirkung von den Membranen abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=4). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

### ICAM-1-Expression auf ECV304

Die ICAM-1-Expression auf kokultivierten ECV304 ist in Abb. 89 für das unstimulierte Kokultursystem sowie für Ansätze, bei denen entweder die ECV304, BEAS-2B oder beide Zelltypen mit TNF- $\alpha$  voraktiviert worden waren, dargestellt. Den deutlichsten Effekt im Sinne einer erhöhten ICAM-1-Expression auf den Zellen wurde durch Voraktivierung beider Zelltypen erreicht. Interessanterweise genügte die Vorstimulierung der BEAS-2B, um ECV304 zu einer erhöhten ICAM-1-Expression zu stimulieren. Dies muß bedeuten, daß die Epithelzellen nach Vorbehandlung mit TNF- $\alpha$  lösliche Faktoren an das Endothel abgaben, die auf diesen dann die ICAM-Expression induzierten.



**Abb. 89: ICAM-1-Expression auf ECV304 im TNF- $\alpha$ -vorstimulierten luft- bzw. ozonbegasten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304.**

ECV304 und/oder BEAS-2B wurden mit 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  für 24h vorinkubiert und in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die ECV304 von den Kulturplatten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=4). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM).

Bezüglich der Interleukin-6- und Interleukin-8-Freisetzung in der Kokultur zeigten Ansätze, bei denen die BEAS-2B, ECV304 oder beide Zelltypen mit TNF- $\alpha$  vorstimuliert worden waren, erhöhte Werte verglichen mit den unstimulierten Kontrollen. Obgleich dies für luft- wie ozonbegaste Zellen galt, schien die Ozonbegastung den stimulatorischen Effekt der TNF- $\alpha$ -Vorinkubation, zumindest auf die IL-8-Sekretion, geringfügig abzuschwächen, was im Sinne einer Immunsuppression gedeutet werden könnte.

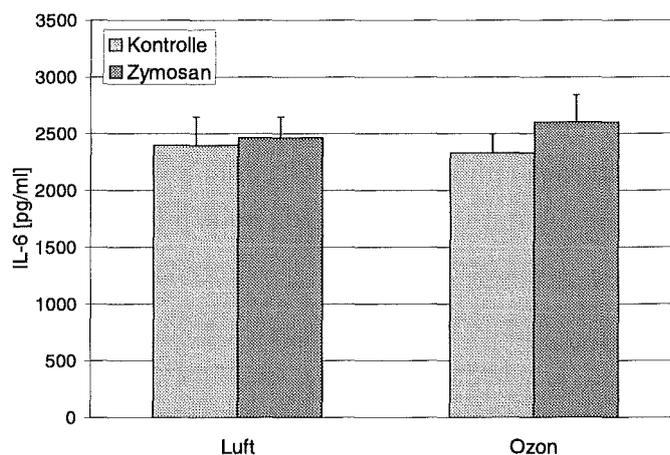
Die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B betreffend können keine eindeutigen Aussagen gemacht werden. Dagegen wurde die ICAM-1-Expression auf ECV304 durch Vorstimulierung der ECV304 bzw. beider Zelltypen deutlich gesteigert, wobei diese Effekte im ozonbegasten System deutlicher waren. In letzterem führte sogar die alleinige Voraktivierung der BEAS-2B zu einer Erhöhung der ICAM-1-Expression auf ECV304.

### 3.3.2.2 Stimulierung mit Zymosan nach Luft- bzw. Ozonbegasung

Mit Hilfe folgender Experimente sollte der Einfluß von Ozon auf zymosanvermittelte Reaktionen des Kokultursystems überprüft werden: Das System wurde 90 min mit 0,15 ppm Ozon bzw. Luft begast. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Stimulierung mit Zymosan im apikalen Kompartiment. Die Überstände wurden auf IL-6 und IL-8 sowie die Zellen auf ihre ICAM-1-Expression untersucht.

#### *IL-6-Sekretion*

Abb. 90 zeigt die Interleukin-6-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem nach 24-stündiger Aktivierung mit 1000 µg/ml Zymosan im apikalen Kompartiment. Es konnten weder zymosan- noch ozoninduzierte Effekte auf die IL-6-Freisetzung gefunden werden. Während BEAS-2B allein nach 24-stündiger Zymosanstimulierung mit einer erhöhten IL-6-Sekretion reagierten (siehe Abb. 24), war dieser Effekt in der Kokultur nicht mehr sichtbar, was durch eine Überlagerung durch die insgesamt starke Zytokinfreisetzung im Kokultursystem erklärt werden könnte.

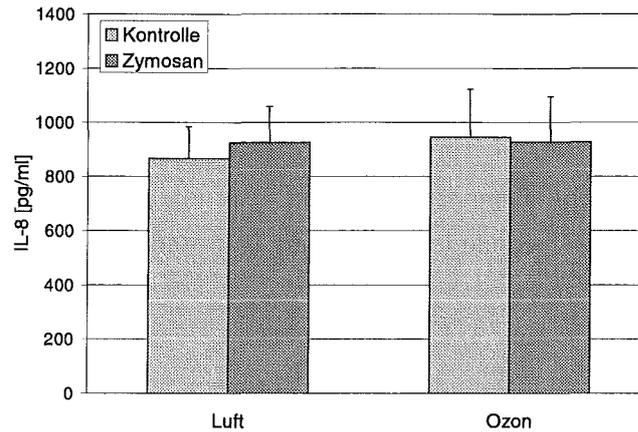


**Abb. 90:** IL-6-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 nach anschließender 24-stündiger Stimulierung mit Zymosan (1000 µg/ml).

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM). Dargestellt sind Werte aus 3 Versuchen (n=6).

#### *IL-8-Sekretion*

Vergleichbares wie für die IL-6-Sekretion kann auch bezüglich der IL-8-Freisetzung, die in Abb. 91 gezeigt ist, gesagt werden. Bei insgesamt sehr hohen Zytokinfreisetzungen waren stimulatorische Effekte von Zymosan auf das System nicht feststellbar, obgleich BEAS-2B allein nachgewiesenermaßen eine zymosaninduzierte IL-8-Freisetzung zeigen (siehe Abb. 26).

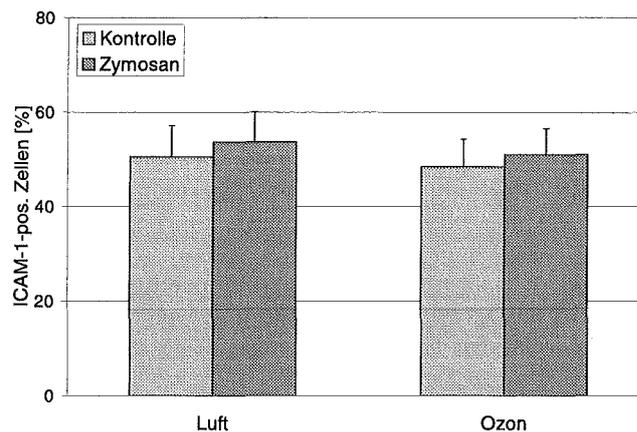


**Abb. 91: IL-8-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 nach anschließender 24-stündiger Stimulierung mit Zymosan (1000 µg/ml).**

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM). Dargestellt sind Werte aus 3 Versuchen (n=6).

#### *ICAM-1-Expression auf BEAS-2B*

Abb. 92 zeigt die ICAM-1-Expression auf kokultivierten BEAS-2B nach Luft- bzw. Ozonbegasung und anschließender Stimulierung mit Zymosan. Eine geringfügige Erhöhung der ICAM-1-Expression im zymosanstimulierten System konnte allenfalls geahnt werden. Des weiteren hatte die Vorbehandlung mit Luft bzw. Ozon keinen Einfluß auf die Expression von ICAM-1.

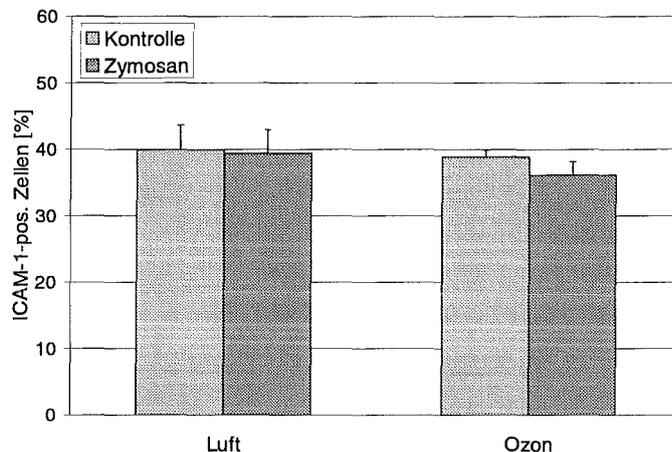


**Abb. 92: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 nach anschließender 24-stündiger Stimulierung mit Zymosan (1000 µg/ml).**

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen von den Membranen unter Trypsineinwirkung abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 5 Versuchen (n=10). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

### ICAM-1-Expression auf ECV304

Erwartungsgemäß zeigten auch ECV304 keinen Effekt bezüglich ihrer ICAM-1-Expression nach Begasung und Stimulierung des Systems mit Zymosan, da die Zellen gar nicht mit dem Stimulus in Kontakt gekommen waren (Abb. 93).



**Abb. 93: ICAM-1-Expression auf ECV304 im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 nach anschließender 24-stündiger Stimulierung mit Zymosan (1000 µg/ml).**

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen von den Kulturplatten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 3 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

In Versuchen zur Begasung des Kokultursystems mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon und anschließender Zymosanstimulierung im apikalen Kompartiment konnten weder Zymosaneffekte noch Ozoneffekte bezüglich der Parameter Interleukin-6, Interleukin-8 und ICAM-1 festgestellt werden.

### 3.3.3 Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Stäuben bzw. Staubextrakten und Ozon

Ergänzend zu den Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Stäuben bzw. Staubextrakten und Ozon an einzeln kultivierten Bronchialepithelzellen (siehe 3.1.4) wurden solche nun auch in dem Kokultursystem durchgeführt.

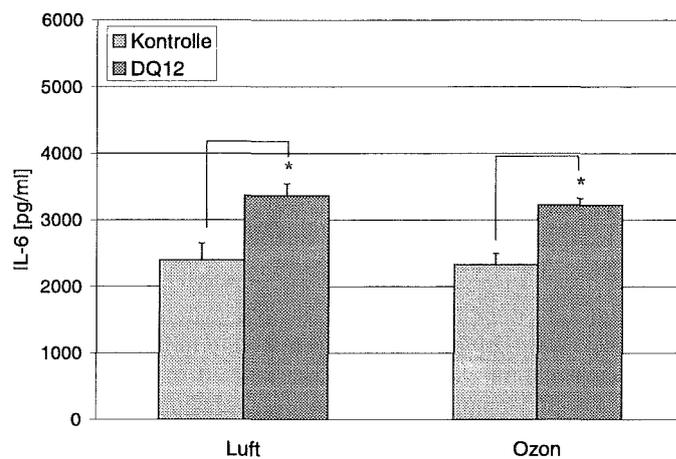
#### 3.3.3.1 Stimulierung mit Quarzstaub (DQ12) nach Luft- bzw. Ozonbegasung

Zur Untersuchung möglicher Kombinationswirkungen von Ozon und Quarzstaub (DQ12) im Kokultursystem wurde den Zellen nach 90-minütiger Luft- bzw. Ozonbegasung Quarzstaub im apikalen Kompartiment zugesetzt. Dies bedeutet, daß lediglich die Epithelzellen direkten

Kontakt mit den Stäuben hatten. Nach 24-stündiger Inkubation wurden aus den Überständen die Zytokine IL-6 und IL-8 sowie auf den Zellen die ICAM-1-Expression bestimmt.

### IL-6-Sekretion

Bezüglich der IL-6-Sekretion konnten keine Unterschiede zwischen luft- und ozonexponierten Zellen festgestellt werden. Dagegen führte bei beiden die Stimulierung mit DQ12 zu einer signifikanten Zunahme der IL-6-Freisetzung (Abb. 94).

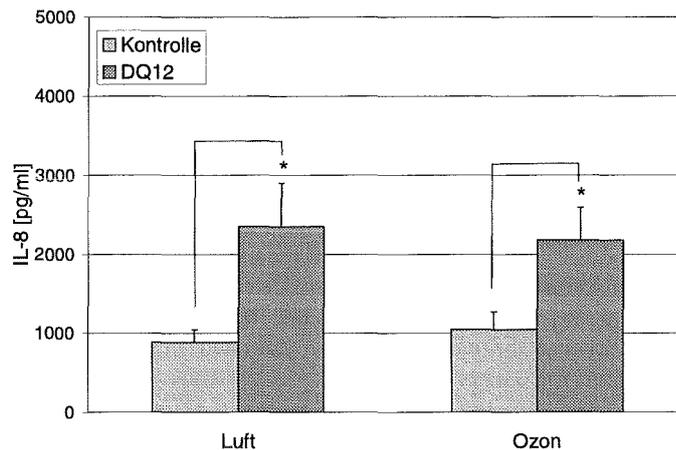


**Abb. 94: IL-6-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 nach anschließender 24-stündiger Stimulierung mit DQ12 (1000 µg/ml).**

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Dargestellt sind Werte aus 3 Versuchen (n=6). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden.

*IL-8-Sekretion*

Wie in Abb. 95 gezeigt, führte eine Stimulierung mit DQ12 im apikalen Kompartiment des Kokultursystems zu signifikant erhöhten IL-8-Freisetzungen verglichen mit den unstimulierten Kontrollzellen. Dieser Effekt war bei luft- wie ozonbehandelten Zellen sichtbar. Eine Ozonbegasung führte bei unstimulierten Zellen zu einer leichten Erhöhung der IL-8-Sekretion gegenüber der Sekretion luftbegaster Zellen. Dagegen schien die DQ12-induzierte IL-8-Freisetzung nach vorangegangener Ozonbehandlung etwas abgeschwächt gegenüber derjenigen luftbehandelter Zellen

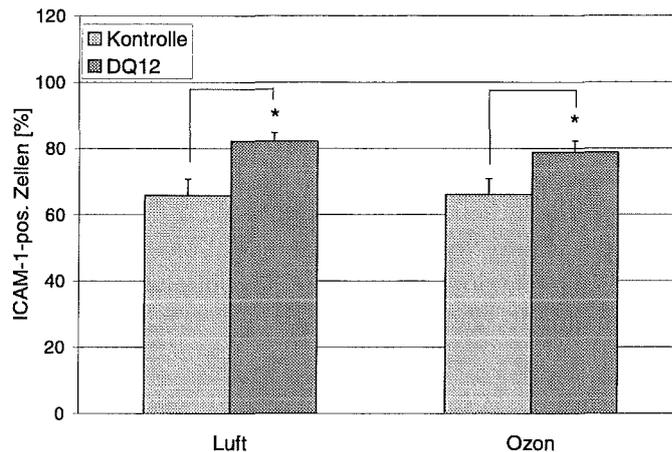


**Abb. 95:** IL-8-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 nach anschließender 24-stündiger Stimulierung mit DQ12 (1000 µg/ml).

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 3 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen unstimulierter Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

*ICAM-1-Expression auf BEAS-2B*

Abb. 96 zeigt die ICAM-1-Expression auf luft- bzw. ozonbegasteten kokultivierten BEAS-2B, die nach der Begasung mit DQ12 aktiviert worden waren. Die Stimulierung mit Quarzstaub führte bei luft- wie ozonexponierten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der ICAM-1-Expression. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen luft- und ozonbegasteten Zellsystemen gefunden werden. Allenfalls bewirkte die Vorexposition mit Ozon eine geringfügige Abnahme der DQ12-induzierten ICAM-1-Expression.

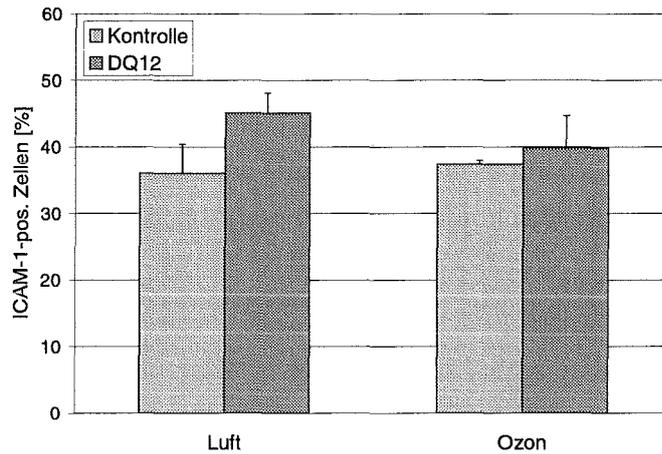


**Abb. 96: ICAM-1-Expression auf BEAS-2B im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 nach anschließender 24-stündiger Stimulierung mit DQ12 (1000 µg/ml).**

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen von den Membranen unter Trypsineinwirkung abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=4). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen unstimulierter Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

#### *ICAM-1-Expression auf ECV304*

Bezüglich der ICAM-1-Expression auf ECV304 konnte gezeigt werden, daß eine Stimulierung mit DQ12 im apikalen Kompartiment des Kokultursystems zu einer Erhöhung der Expression führt. Dies war sowohl bei luft- wie ozonbegasteten Zellen feststellbar und insofern bemerkenswert, als die Endothelzellen gar nicht mit dem Stimulus DQ12 in Kontakt kamen, da Quarzstaub nur im apikalen Kompartiment zugesetzt wurde. Dies muß bedeuten, daß ECV304 indirekt über einen löslichen Faktor, der von den BEAS-2B-Zellen auf den Stimulus DQ12 hin freigesetzt wurde, zur Verstärkung der ICAM-1-Expression angeregt wurden. Eine Vorstimulierung der Zellen mit Ozon bewirkte eine geringfügige Abnahme der DQ12-induzierten ICAM-1-Expression (Abb. 97).



**Abb. 97: ICAM-1-Expression auf ECV304 im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem aus BEAS-2B und ECV304 nach anschließender 24-stündiger Stimulierung mit DQ12 (1000 µg/ml).**

Die Zellen wurden in Kokultur 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale bzw. 1,5 ml Stimulierungsmedium in das apikale und 1,5 ml Medium in das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Zellen von den Kulturplatten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=4). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an (± SEM).

Eine Stimulierung mit DQ12 nach vorangegangener Luft- bzw. Ozonexposition des Kokultursystems führte bei luft- wie ozonbehandelten Zellen zu einer erhöhten Interleukin-6- und Interleukin-8-Freisetzung sowie einer verstärkten ICAM-1-Expression auf BEAS-2B und ECV304. Die Ozonbehandlung bewirkte eine geringe Abschwächung der DQ12-induzierten Effekte auf die IL-8-Sekretion und die ICAM-1-Expression der Zellen.

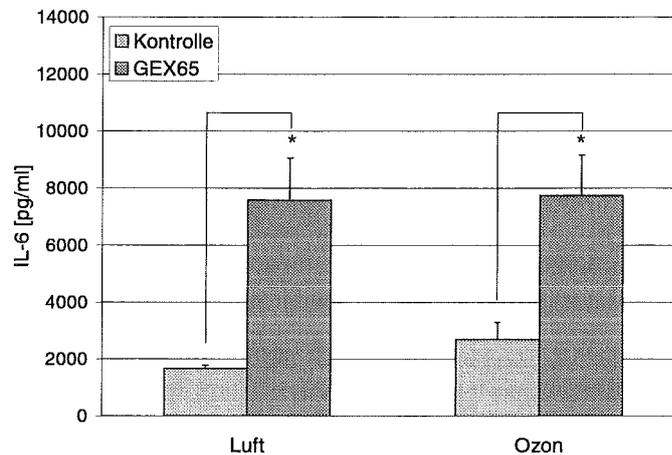
### 3.3.3.2 Begasung mit Luft bzw. Ozon nach Vorstimulierung der BEAS-2B mit Schwebstaubextrakten

In den folgenden Experimenten wurden BEAS-2B vor dem Zusammensetzen mit ECV304 zum Kokultursystem für 24h mit Schwebstaubextrakt stimuliert. Durch die anschließende Begasung in Kokultur sollte geprüft werden, inwieweit Ozon die Reaktion der Zellen auf die Schwebstaubaktivierung modulieren kann.

#### *IL-6-Freisetzung*

Abb. 98 zeigt die IL-6-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem nach Vorstimulierung der BEAS-2B mit Schwebstaubextrakt Nr. 65 (GEX65) in einer Verdünnung, die einem Luftvolumen von 7,85 m<sup>3</sup> je Milliliter Stimulierungsmedium entspricht. Die Ozonbegasung des Systems führte zu einer erhöhten IL-6-Freisetzung verglichen mit der Sekretion der luftbegasteten Kontrolle. Die Vorbehandlung der BEAS-2B mit Schwebstaubextrakt bewirkte bei luft- wie ozonbegasteten Zellen eine starke Zunahme der IL-6-Freisetzung um den Faktor 4,5 bei luftbegasteten bzw. den Faktor 2,9 bei ozonbegasteten

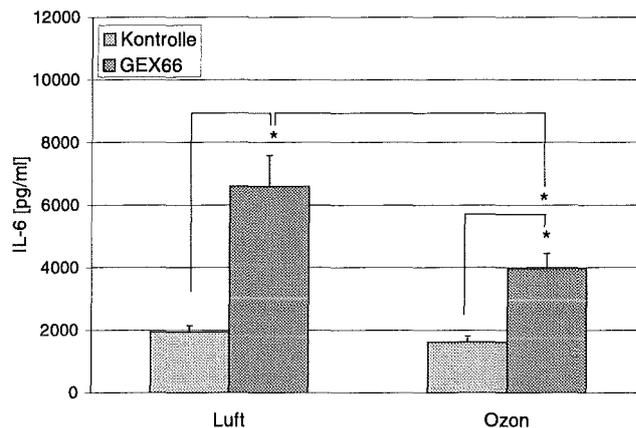
Zellen. Somit konnte eine geringfügige Abschwächung des Schwebstaubeffektes auf die IL-6-Freisetzung des Systems nach vorangegangener Ozonbehandlung festgestellt werden. Interessant war außerdem die Tatsache, daß durch den Schwebstaubextrakt im Kokultursystem eine verstärkte Zytokinsekretion induziert wurde, was bei einzeln kultivierten BEAS-2B nicht beobachtet werden konnte (Abb. 66 und Abb. 67).



**Abb. 98: IL-6-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasten Kokultursystem nach vorangegangener 24-stündiger Stimulierung der BEAS-2B mit GEX65.**

BEAS-2B wurden vor Zusammensetzen in die Kokultur für 24h mit GEX65 in der Verdünnung 1:2, dies entspricht einem Sammelluftvolumen von  $7,85 \text{ m}^3$  je Milliliter Medium, stimuliert. Nach Zusammensetzen der Kokultur und 90 min Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon folgte eine Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen ( $n=6$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm \text{SEM}$ ). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen unstimulierter Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

Abb. 99 zeigt die IL-6-Freisetzung für entsprechende Experimente mit GEX66. Die verwendete 1:2-Verdünnung entsprach einem Sammelluftvolumen von  $8,14 \text{ m}^3$  je Milliliter Stimulierungsmedium. Während eine ozoninduzierte Erhöhung der IL-6-Sekretion nicht sichtbar war, konnten doch deutliche Effekte der Schwebstaubprobe auf die Zytokin-freisetzung bei luft- wie ozonbegasten Zellen festgestellt werden. Des weiteren zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der schwebstaubinduzierten IL-6-Freisetzung nach Ozonvorbehandlung verglichen mit der Freisetzung im luftbegasten System.

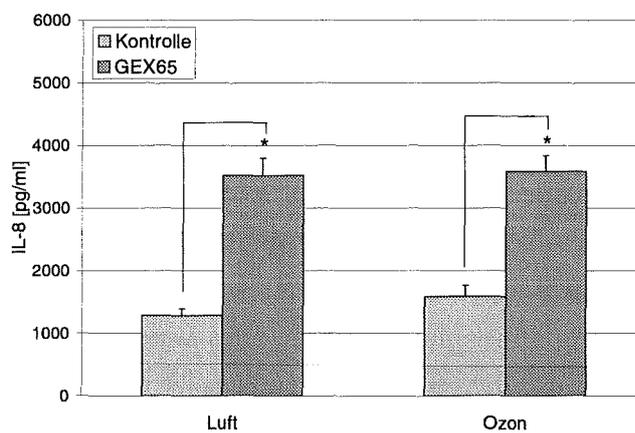


**Abb. 99: IL-6-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem nach vorangegangener 24-stündiger Stimulierung der BEAS-2B mit GEX66.**

BEAS-2B wurden vor Zusammensetzen in die Kokultur für 24h mit GEX66 in der Verdünnung 1:2, dies entspricht einem Sammelluftvolumen von 8,14 m<sup>3</sup> je Milliliter Medium, stimuliert. Nach Zusammensetzen der Kokultur und 90 min Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

### IL-8-Sekretion

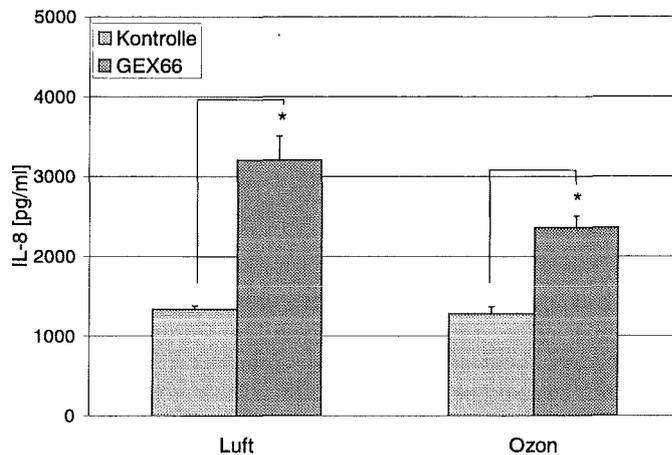
Die Voraktivierung der BEAS-2B mit GEX65 führte im luft- wie ozonbegasteten Kokultursystem zu einer signifikanten Erhöhung der IL-8-Freisetzung verglichen mit der Sekretion der unstimulierten Kontrollzellen. Des weiteren sezernierten ozonbegaste unstimulierten Zellen mehr IL-8 als die entsprechenden luftexponierten Zellen (Abb. 100).



**Abb. 100: IL-8-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem nach vorangegangener 24-stündiger Stimulierung der BEAS-2B mit GEX65.**

BEAS-2B wurden vor Zusammensetzen in die Kokultur für 24h mit GEX65 in der Verdünnung 1:2, dies entspricht einem Sammelluftvolumen von 7,85 m<sup>3</sup> je Milliliter Medium, stimuliert. Nach Zusammensetzen der Kokultur und 90 min Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen unstimulierter Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

Die entsprechenden Daten für GEX66 sind in Abb. 101 gezeigt. Die Vorstimulierung der BEAS-2B mit GEX66 führte im Kokultursystem bei luft- wie ozonbegasteten Zellen zu einer signifikanten Zunahme der IL-8-Sekretion. Allerdings war die schwebstaubinduzierte Erhöhung der IL-8-Sekretion bei ozonbehandelten Zellen deutlich schwächer ausgeprägt als bei den entsprechenden luftbehandelten Zellen.



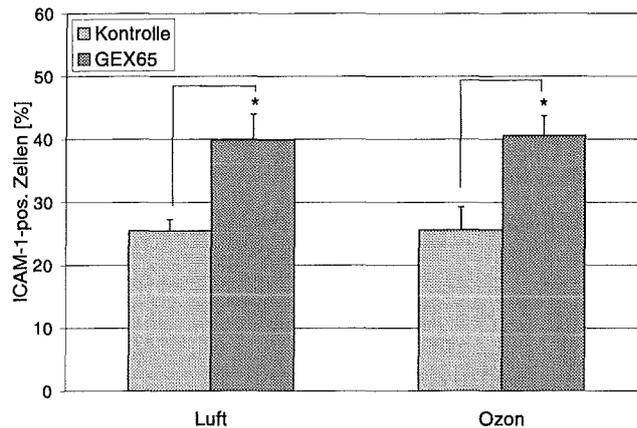
**Abb. 101: IL-8-Freisetzung im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem nach vorangegangener 24-stündiger Stimulierung der BEAS-2B mit GEX66.**

BEAS-2B wurden vor Zusammensetzen in die Kokultur für 24h mit GEX66 in der Verdünnung 1:2, dies entspricht einem Sammelluftvolumen von 8,14 m<sup>3</sup> je Milliliter Medium, stimuliert. Nach Zusammensetzen der Kokultur und 90 min Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24h nach der Exposition wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA auf IL-8 untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen (n=6). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels an ( $\pm$  SEM). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen unstimulierter Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

#### *ICAM-1-Expression auf ECV304*

Abb. 102 zeigt die ICAM-1-Expression auf kokultivierten ECV304 nach Luft- bzw. Ozonbegasung und Vorstimulierung der BEAS-2B mit GEX65.

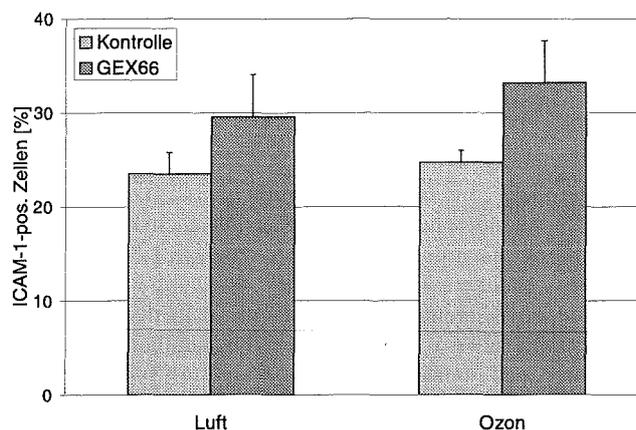
Eine Vorbehandlung der BEAS-2B mit GEX65 führte zu signifikant erhöhten ICAM-1-Expressionen auf ECV304, was insofern interessant war, als die Endothelzellen selbst gar nicht mit der Schwebstaubprobe in Kontakt kamen. Dies weist auf Mediatoren hin, die von den BEAS-2B auf den Stimulus GEX65 verstärkt freigesetzt wurden und die Endothelzellen zu einer vermehrten ICAM-1-Expression anregten.



**Abb. 102: ICAM-1-Expression auf ECV304 im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem nach vorangegangener 24-stündiger Stimulierung der BEAS-2B mit GEX65.**

BEAS-2B wurden vor Zusammensetzen in die Kokultur für 24h mit GEX65 in der Verdünnung 1:2, dies entspricht einem Sammelluftvolumen von  $7,85 \text{ m}^3$  je Milliliter Medium, stimuliert. Nach Zusammensetzen der Kokultur und 90 min Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon folgte eine Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . 24h nach der Exposition wurden die Endothelzellen von den Kulturplatten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen ( $n=6$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm \text{SEM}$ ). Sterne bezeichnen Werte, die sich signifikant von denen unstimulierter Kontrollen unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

In Abb. 103 sind die entsprechenden Ergebnisse für Stimulierungen mit GEX66 dargestellt. Eine Ozonbegasung des unstimulierten Systems führte zu einer erhöhten ICAM-1-Expression auf ECV304 verglichen mit der Expression auf luftbegasteten Kontrollzellen. Die Vorbehandlung der BEAS-2B mit GEX66 bewirkte eine Erhöhung der ICAM-1-Expression auf ECV304. Dieser Effekt war bei luft- wie ozonbegasteten Zellen feststellbar.



**Abb. 103: ICAM-1-Expression auf ECV304 im luft- bzw. ozonbegasteten Kokultursystem nach vorangegangener 24-stündiger Stimulierung der BEAS-2B mit GEX66.**

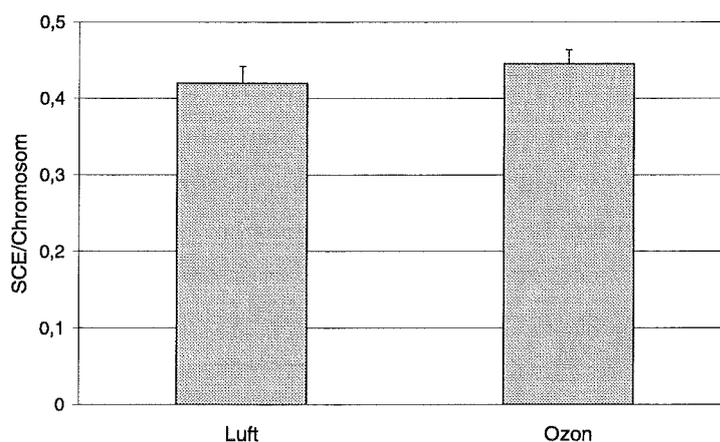
BEAS-2B wurden vor Zusammensetzen in die Kokultur für 24h mit GEX66 in der Verdünnung 1:2, dies entspricht einem Sammelluftvolumen von  $8,14 \text{ m}^3$  je Milliliter Medium, stimuliert. Nach Zusammensetzen der Kokultur und 90 min Begasung mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon folgte eine Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . 24h nach der Exposition wurden die Endothelzellen von den Kulturplatten abgelöst und durchflußzytometrisch auf ihre ICAM-1-Expression untersucht. Dargestellt sind Werte aus 2 Versuchen ( $n=6$ ). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels ( $\pm \text{SEM}$ ).

Eine Vorstimulierung der BEAS-2B mit den Schwebstaubextrakten Nr. 65 und 66 bewirkte im Kokultursystem eine erhöhte Freisetzung der Entzündungsmarker Interleukin-6 und Interleukin-8 sowie eine verstärkte ICAM-1-Expression auf ECV304. Während die Ozonbehandlung des Systems bezüglich IL-6 und IL-8 eher zu einer Abschwächung der schwebstaubinduzierten Effekte führte, blieb die ICAM-1-Expression der ECV304 davon unbeeinflusst.

### 3.4 Untersuchungen zur Genotoxizität

Der letzte Teil dieser Arbeit befaßte sich mit mutagenen Wirkungen von Ozon auf BEAS-2B. Als Endpunkt dieser Untersuchungen diente die Erfassung von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) nach Einwirkung des Schadgases.

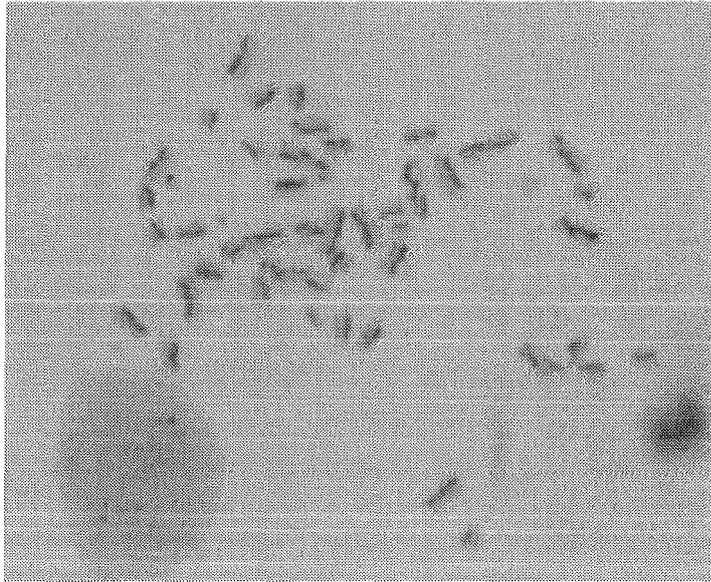
Nach 90-minütiger Begasung von BEAS-2B mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon zeigte sich eine geringfügige Zunahme der Schwesterchromatidaustauschrate bei den ozonbegasteten Zellen, die jedoch nicht statistisch signifikant war (Abb. 104).



**Abb. 104: Schwesterchromatidaustausche bei luft- bzw. ozonbegasteten BEAS-2B.**

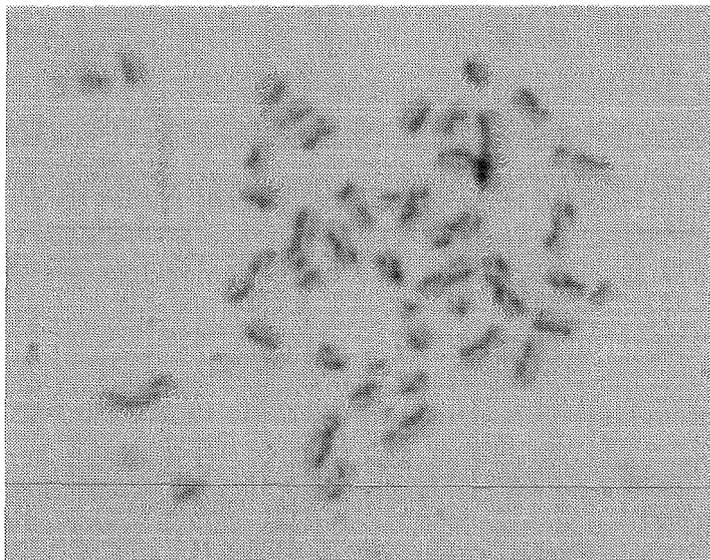
Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft bzw. 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Flüssigkeiten ober- und unterhalb der Membran durch je 1,5 ml BrdU-haltiges Medium ersetzt. Die Zellen wurden weitere 72h inkubiert, wobei dem Medium 3h vor Ende der Inkubationszeit Colcemid zugesetzt wurde. Nach Abtrypsinieren der Zellen erfolgte die Metaphasenpräparation mit anschließender Differentialfärbung der Chromatiden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen.

Abb. 105 und Abb. 106 zeigen Metaphasen luft- bzw. ozonbehandelter BEAS-2B in der Differentialfärbung. In beiden Aufnahmen können vereinzelt Schwesterchromatidaustausche anhand der unterschiedlichen Chromatidenfärbung erkannt werden, wobei die ozonbehandelten Zellen eventuell eine geringfügig höhere Chromatidaustauschrate aufwiesen.



**Abb. 105: Metaphase von luftbegasten BEAS-2B in differentieller Darstellung der Schwesterchromatiden.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit Luft begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Flüssigkeiten ober- und unterhalb der Membran durch je 1,5 ml BrdU-haltiges Medium ersetzt. Die Zellen wurden weitere 72h inkubiert, wobei dem Medium 3h vor Ende der Inkubationszeit Colcemid zugesetzt wurde. Nach Abtrypsinieren der Zellen erfolgte die Metaphasenpräparation mit anschließender Differentialfärbung der Chromatiden. Die Metaphase wurde bei einer 1000-fachen Vergrößerung betrachtet und fotografiert.



**Abb. 106: Metaphase von ozonbegasten BEAS-2B in differentieller Darstellung der Schwesterchromatiden.**

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Filtermembranen kultiviert und 90 min mit 0,15 ppm Ozon begast. Direkt nach der Exposition wurden je 1,5 ml Medium in das apikale und das basolaterale Kompartiment gegeben. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Flüssigkeiten ober- und unterhalb der Membran durch je 1,5 ml BrdU-haltiges Medium ersetzt. Die Zellen wurden weitere 72h inkubiert, wobei dem Medium 3h vor Ende der Inkubationszeit Colcemid zugesetzt wurde. Nach Abtrypsinieren der Zellen erfolgte die Metaphasenpräparation mit anschließender Differentialfärbung der Chromatiden. Die Metaphase wurde bei einer 1000-fachen Vergrößerung betrachtet und fotografiert.



## 4. Diskussion

### 4.1 Ozon und Entzündung in der Lunge

Schon seit langem ist bekannt, daß Ozon den Gesundheitsstatus des Menschen beeinflusst. Neben extrapulmonalen Effekten auf Blut (Foster *et al.*, 1996), Sympathikus (Cottet-Emard *et al.*, 1997) und Nervensystem (Custodio-Ramírez und Paz, 1997; Gonzalez-Piña und Paz, 1997; Paz, 1997) ist davon vorrangig der Respirationstrakt betroffen. Während Sommermogperioden mit erhöhten Ozonwerten in der Atmosphäre leiden Menschen unter Kurzatmigkeit, Verschlechterung von Asthma (Kurata *et al.*, 1976), Husten, verstärkter Schleimproduktion, Brustschmerzen oder Brustenge, Symptome, die ihre Ursache in klinischen Manifestationen wie verschlechterten Lungenfunktionsparametern (Bromberg und Koren, 1995; Castillejos *et al.*, 1995), Lungenödem, bronchialer Hyperreagibilität und Entzündungsreaktionen haben. Studien von Kinney und Özkaynak (1991 und 1992) lieferten erste Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen Sterblichkeit und Ozonkonzentrationen in Los Angeles und New York. Sartor *et al.* (1995 und 1997) beschrieben eine positive Korrelation zwischen Ozon in der Atmosphäre und der Sterblichkeit älterer Menschen im Sommer 1994 in Belgien. Kanadische Studien wiesen auf eine Koinzidenz von erhöhten Ozonkonzentrationen und Krankenhausconsultationen aufgrund respiratorischer Erkrankungen oder Asthma hin (Burnett *et al.*, 1997a; Stieb *et al.*, 1996). Jedoch ist noch immer unklar, warum die Lunge auf Ozon in dieser Weise reagiert und welche Zellen der Lunge hauptsächlich dafür verantwortlich sind.

Mit Hilfe geeigneter Testsysteme wurden in den vergangenen Jahren Zellen oder Organismen mit Ozon exponiert und vielfältige Effekte, wie eine erhöhte Permeabilität der Lunge (Foster und Stetkiewicz, 1996; Piecyk *et al.*, 1994; Schultheis und Bassett, 1994; Young und Bhalla, 1995), histopathologische Veränderungen (Alink *et al.*, 1980; Alpert *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 1994; Rombout *et al.*, 1991), eine Abnahme der Vitalität der Zellen (Devlin *et al.*, 1997), die Beeinflussung des Oxidantienstatus (Devlin *et al.*, 1997; Kodavanti *et al.*, 1995; Mudway *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 1997), eine Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Chen und Qu, 1997; Kelly *et al.*, 1995; Kudo *et al.*, 1996; Pryor und Church, 1991; Stevens *et al.*, 1995), die Modifizierung von Surfactant-Proteinen (Putman *et al.*, 1995 und 1997; Su und Gordon, 1996) sowie erhöhte Kollagen-Gehalte in der Lunge (Last *et al.*, 1984), um nur einige wichtige zu nennen, beschrieben. In diesem Zusammenhang ist außerdem die ozoninduzierte Modifizierung der Zytokin- oder Eicosanoidfreisetzung von Zellen von besonderem Interesse, stellen derartige Mediatoren doch ein Kommunikationsmedium dar, welches der betroffenen Zelle ermöglicht, nach einer Schädigung diese Information weiterzureichen und dadurch Veränderungen in einem größeren Areal der Lunge zu bewirken. So könnte dann das Entstehen klinischer Symptome, wie ein erhöhter Atemwegwiderstand, chronische Bronchitis oder Ödeme, erklärt werden.

In zahlreichen Veröffentlichungen wurde über die ozoninduzierte Freisetzung löslicher Mediatoren berichtet. Während für derartige Studien früher gewöhnlich sehr hohe und damit unrealistische Ozonkonzentrationen verwendet wurden, beschränken sich neuere Untersuchungen auf umweltrelevante Konzentrationen des Schadgases. So beschrieben Madden *et al.* (1991) eine erhöhte Freisetzung diverser Arachidonsäuremetaboliten wie Hydroxysäuren, Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) und LTD<sub>4</sub> nach 2-stündiger Exposition von Rattenalveolarmakrophagen mit 1,0 ppm Ozon. Eine entsprechende Ozonexposition menschlicher Alveolarmakrophagen bewirkte eine erhöhte Sekretion der Arachidonsäuremetaboliten PAF (Plättchen-aktivierender Faktor) und PGE<sub>2</sub> (Friedman *et al.*, 1992). Vergleichbare Daten erhielten Schlesinger *et al.* (1990) bei *in vivo*-Experimenten mit Kaninchen, denen nach 2-stündiger Ozonexposition die Alveolarmakrophagen zur Untersuchung entnommen wurden. Ozoninduzierte Freisetzungen von Arachidonsäuremetaboliten wie 15-HETE sind auch für Epithelzellen des Respirationstraktes beschrieben (Alpert und Walenga, 1995). Diesbezüglich sind besonders die in dieser Arbeit verwendeten BEAS-2B-Zellen sehr gut charakterisiert. So bewirkte deren einstündige Begasung mit 1,0 ppm Ozon unter anderem eine Bildung der Metaboliten TXB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, und LTE<sub>4</sub> sowie eine starke Erhöhung der PAF-Sekretion (McKinnon *et al.*, 1993; Samet *et al.*, 1992).

Neben den Arachidonsäuremetaboliten spielen Zytokine eine entscheidende Rolle als lösliche Transmitter mit vielfältigen Wirkungen. Sowohl Alveolarmakrophagen als auch Lungenepithelzellen können Zytokine synthetisieren, was sie letztendlich auch dazu befähigt, untereinander zu kommunizieren. Arsalane *et al.* (1995) zeigten bei menschlichen Alveolarmakrophagen nach einstündiger Exposition mit 0,4 ppm Ozon erhöhte Freisetzungen der Zytokine IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$ . Eine Induktion der TNF- $\alpha$ -Sekretion konnte auch bei Rinderalveolarmakrophagen nach 4h Exposition mit 1,0 ppm Ozon demonstriert werden (Mosbach *et al.*, 1996). In der bronchoalveolären Flüssigkeit von ozonexponierten Probanden wurden von Devlin *et al.* (1997) ebenfalls erhöhte IL-6- und IL-8-Konzentrationen gefunden. Epithelzellen setzen nach Ozonexposition ein ähnliches Spektrum von Zytokinen frei. So sezernierten die Alveolarepithelzellen A549 nach 5-stündiger Exposition mit 0,1 ppm Ozon erhöhte Mengen an IL-8 (Jaspers *et al.*, 1997), die Bronchialepithelzellen BEAS-2B nach einstündiger Exposition mit Ozonkonzentrationen von 0,1 bis 1,0 ppm erhöhte Mengen an IL-6 und IL-8 (Devlin *et al.*, 1994). Devalia *et al.* (1996) zeigten anhand von Experimenten mit primären humanen Bronchialepithelzellen neben einer ozoninduzierten IL-6- und IL-8-Freisetzung auch eine erhöhte Sekretion des Tumor-Nekrose-Faktors- $\alpha$  und des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF). Zwischen Arachidonsäuremetaboliten und Zytokinen sind zahlreiche Interaktionen beschrieben, so daß diese keine voneinander unabhängigen Netzwerke darstellen (Amandi-Burgermeister *et al.*, 1997; Gormand *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997; Nettesheim und Bader, 1996; Newton *et al.*,

1996; Peplow, 1996). Aus dieser bei weitem nicht vollständigen Aufzählung der Effekte von Ozon auf das Sekretionsverhalten der Lungenepithelzellen wird deutlich, daß diesen im Rahmen der ozoninduzierten Entzündung eine wichtige Rolle zukommt (Leikauf *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit konnte an Zellen einer humanen Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B) gezeigt werden, daß Bronchialepithelzellen nach nur 90 min Exposition mit 0,15 ppm Ozon zu einer erhöhten Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8, verglichen mit luftbegasteten Kontrollzellen, stimuliert werden (Abb. 8 und Abb. 9). Diese erhöhte Zytokinsekretion war bereits 1h nach der Exposition deutlich ausgeprägt. Während das Maximum der IL-6-Freisetzung 24h nach Begasung bereits überschritten war, konnten zu diesem Zeitpunkt die höchsten IL-8-Konzentrationen gefunden werden.

Interleukin-6 und Interleukin-8 spielen sehr unterschiedliche, jedoch gleichermaßen wichtige Rollen bei der Entzündung. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, dessen bekannteste Wirkungen die Induktion der B-Zell-Differenzierung und der Immunglobulinproduktion (Van Damme *et al.*, 1987) sowie die Einleitung der Akut-Phase-Antwort sind (Heinrich *et al.*, 1990). Es stimuliert wie IL-1 $\beta$  die IL-2-abhängige T-Zell-Proliferation durch die Bildung von IL-2 sowie die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber (Wong und Clark, 1988). Dagegen wird aber auch eine antiinflammatorische Wirkungskomponente von überexprimiertem IL-6 durch inhibitorische Effekte auf die IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Sekretion von Zellen diskutiert (Denis, 1992; Mantovani, 1997; Ulich *et al.*, 1991; van der Poll *et al.*, 1997). Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß IL-6 auch eine Rolle bei der Induktion von Chemokinen und damit der Leukozytenrekrutierung zukommt (Romano *et al.*, 1997). Interleukin-8, das auch zur Klasse der Chemokine gerechnet wird, zeichnet sich dagegen hauptsächlich durch seine chemoattraktiven Eigenschaften aus und ist somit neben den Adhäsionsmolekülen, auf die später noch eingegangen werden soll, und chemoattraktiven Metaboliten wie PAF (Shaw *et al.*, 1981) oder LTB<sub>4</sub> (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980; Nohgawa *et al.*, 1997) sowie Komplement C5a (Fernandez *et al.*, 1978; Foreman *et al.*, 1996) hauptverantwortlich für die Einwanderung von Entzündungszellen in das umliegende Gewebe (Carolan und Casale, 1996). Dieses Ereignis wird als Voraussetzung für die Verstärkung und Ausweitung der Entzündung angesehen (Baggiolini, 1993; Baggiolini *et al.*, 1994; Hébert und Baker, 1993; Hoch *et al.*, 1996). Liu *et al.* (1996) konnten an frisch isolierten menschlichen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) sowie an H292-Zellen eindrücklich zeigen, wie stark Interleukin-8 die Migration von Neutrophilen durch Monolayer dieser Zellen fördert. Dabei wurde insbesondere das Endothel gut von den Neutrophilen durchwandert.

Erhöhte IL-6- oder IL-8-Sekretionen konnten auch bei anderen respiratorischen Erkrankungen wie der Sarkoidose (Takizawa *et al.*, 1997), einer Infektion mit Influenza-Virus A (Adachi *et al.*, 1997; Khair *et al.*, 1994 und 1996; Matsukura *et al.*, 1996) bzw. Rhinoviren (Zhu *et al.*, 1996), Asthma und chronischer Bronchitis (Chanez *et al.*, 1996; Nocker *et al.*, 1996),

zystischer Fibrose (Bédard *et al.*, 1993) sowie dem Lungenemphysem (Kanazawa *et al.*, 1996) beobachtet werden. Allen zuletzt genannten pathologischen Zuständen ist ein Krankheitsbild mit einer verstärkten Einwanderung von Neutrophilen oder Eosinophilen in das Gewebe gemeinsam.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit 24h nach 90-minütiger Exposition mit 0,15 ppm Ozon eine verstärkte Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) auf Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) gefunden (Abb. 10). Letzteres ist für das Entstehen von Entzündungsprozessen besonders wichtig, stellt doch ICAM-1 eine Bindungsstelle für neutrophile Granulozyten dar, die sich über ihre Gegenrezeptoren, z.B. LFA-1 (CD11a/CD18) oder Mac-1 (CD11b/CD18), somit verstärkt am Epithel anlagern und durch Freisetzung lysosomaler Enzyme die Entzündung in Gang setzen können. Die Tatsache, daß Interleukin-8, welches auf den Stimulus Ozon vermehrt gebildet wird, eine Zunahme der Mac-1-Expression auf Neutrophilen induziert (Detmers *et al.*, 1990) unterstreicht außerdem den Zusammenhang zwischen einer Ozonexposition und dem vermehrten Influx neutrophiler Granulozyten. Bloemen *et al.* (1996) wiesen darauf hin, daß eine Stimulierung sowohl des Bronchialepithels als auch der Neutrophilen für eine maximale Adhäsion nötig ist. Die Expression von ICAM-1 auf Epithelzellen spielt auch bei der Pathogenese von Asthma und Allergien eine wichtige Rolle (Bloemen *et al.*, 1997; Papi, 1997; Sato *et al.*, 1997; Wegner *et al.*, 1990), denn auch der Influx von Eosinophilen wird, zumindest teilweise, über ICAM-1 gesteuert (Abdelaziz *et al.*, 1995).

Während zahlreiche Studien eine zytokininduzierte Erhöhung der ICAM-1-Expression auf Lungenepithelzellen belegen (Atsuta *et al.*, 1997; Barton *et al.*, 1995; Cunningham und Kirby, 1995; Kang *et al.*, 1996; Look *et al.*, 1992; Tosi *et al.*, 1992), gibt es nur wenige Daten zu einer entsprechenden ozoninduzierten Wirkung: Auf dem Lungenepithel von Mäusen, die zuvor 3 Stunden gegenüber 2,0 ppm Ozon exponiert worden waren, wurde von Takahashi *et al.* (1995) eine verstärkte ICAM-1-Expression sowie ein damit einhergehender verstärkter Influx von Neutrophilen beobachtet. Li *et al.* (1992) konnten die Anreicherung von Neutrophilen und Eosinophilen in der Lavageflüssigkeit ozonexponierter Hunde durch Behandlung mit einem gegen CD11b/CD18 gerichteten Antikörper verhindern. Dagegen beschrieben Tosi *et al.* (1994) eine ozoninduzierte verstärkte Adhäsion von Neutrophilen auf menschlichen Trachealepithelzellen, die zwar CD18-abhängig, jedoch ICAM-1-unabhängig war, was durch Versuche mit Antikörpern gezeigt werden konnte. Letzteres muß bedeuten, daß wahrscheinlich noch andere Adhäsionsmoleküle an der durch Ozon bewirkten erhöhten Adhäsion von Neutrophilen beteiligt sind. Die verstärkte Expression eines anderen Adhäsionsmoleküls, des P-Selektins, in den Gefäßen konnte von Krishna *et al.* (1997) am Menschen nach kurzzeitiger Ozonexposition gezeigt werden. Selektine bewirken ein Abbremsen der Entzündungszellen im Blutstrom und schaffen damit die Voraussetzung für eine sich anschließende feste Bindung der Zellen an die CAMs der Gefäße (Crockett-Torabi

und Fantone, 1995; Rossiter *et al.*, 1997; Whelan, 1996). Auch Makrophagen exprimieren ICAM-1, welches einer Modifizierung durch Ozon zugänglich ist (Bhalla, 1996).

Neben Entzündungszellen wie Neutrophilen, die über Gegenrezeptoren, sogenannte Integrine, an ICAM-1 binden, nutzen auch die meisten Rhinoviren das durch Entzündungsmediatoren aktivierte ICAM-1, um in Schleimhautepithelzellen einzudringen (Terajima *et al.*, 1997). Wahrscheinlich binden sie direkt an die Kopplungsstelle für LFA-1 oder eine unmittelbar benachbarte Region am Molekül (Staunton *et al.*, 1989). Viren benutzen aber nicht nur ICAM-1 als Bindungsstelle, sondern induzieren gleichzeitig die Expression des Adhäsionsmoleküls (Stark *et al.*, 1996), womit ein erhöhter Influx von Entzündungszellen einhergeht. Huguenel *et al.* (1997) konnten Schimpansen vor einer Rhinovirusinfektion durch Applikation des löslichen interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (sICAM-1) schützen. Diese Beobachtungen machen eine Beteiligung des Adhäsionsmoleküls bei der Entstehung von Infektionen im Respirationstrakt wahrscheinlich und könnten auch die häufig beschriebene gesteigerte Infektanfälligkeit nach vorangegangener Ozonexposition zumindest teilweise erklären.

#### 4.2 Immunmodulierende Eigenschaften von Ozon

Immer wieder wurde eine Beeinflussung der systemischen Immunität von Organismen durch Ozon diskutiert (Gilmour, 1995). Deshalb kommt Untersuchungen zur Beeinflussung von immunkompetenten Zellen durch das Schadgas eine besondere Bedeutung zu. Die erste „Front“ der Immunabwehr in der Lunge wird von den Alveolarmakrophagen gebildet, welche fremdartige Substanzen phagozytieren und dadurch teilweise eliminieren sowie durch die Freisetzung sogenannter „früher“ Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) das Immungeschehen in Gang setzen. Deshalb konzentrieren sich Studien zu immunmodulierenden Wirkungen von Ozon vorwiegend auf die Untersuchung der Beeinflussung sekretorischer und phagozytotischer Eigenschaften von Alveolarmakrophagen.

Zahlreiche, zum Teil kontroverse Veröffentlichungen beschreiben Effekte einer Ozonexposition auf die Phagozytose und die Zytokinfreisetzung von Makrophagen. Eine verminderte Phagozytoseleistung ozonbegaster Alveolarmakrophagen wurde von Wenzel und Morgan (1983) sowie von Valentine (1985) beobachtet. Eine Ozonexposition mit 0,5 ppm von Mäusen, die nach der Begasung mit Aerosolen von *Staphylococcus aureus* provoziert wurden, führte bei bis zu drei Tagen Expositionsdauer zu einer verminderten Fähigkeit der Zellen, diese Keime abzutöten. Erfolgte die Ozonexposition dagegen länger, so normalisierte sich die bakterizide Kapazität der Makrophagen wieder (Gilmour *et al.*, 1991). Vergleichbare Ergebnisse zeigte Jakab (1987) für Expositionen mit NO<sub>2</sub>. Auch Becker *et al.* (1991) fanden nach einer 2-stündigen Exposition menschlicher Alveolarmakrophagen mit 1,0 ppm Ozon eine verringerte Phagozytoseleistung der Zellen. Weiterhin bewirkte die Ozonbegasung bei

anschließender 18-stündiger Stimulierung der Zellen mit LPS eine Abschwächung der LPS-induzierten Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. Dagegen konnte Mosbach (1994) bei ozonbegasten Rinderalveolarmakrophagen keine verminderte Immunantwort auf eine nachfolgende LPS-Aktivierung oder eine Provokation mit Latexbeads bezüglich der TNF- $\alpha$ -Freisetzung feststellen. Ähnliche Effekte wie für Ozon wurden auch für eine Exposition mit NO<sub>2</sub> beobachtet: So berichteten Erroi *et al.* (1996) über eine Abschwächung der endotoxinstimulierten Freisetzung von IL-6 und TNF- $\alpha$  bei NO<sub>2</sub>-exponierten Alveolarmakrophagen. Die genannten Beispiele illustrieren die im Zusammenhang mit oxidativen Luftschadstoffen häufig diskutierte verminderte Fremdstoffabwehr des Organismus (Van Loveren *et al.*, 1995).

Entsprechende Untersuchungen zu einer ozoninduzierten Modulierung der Immunantwort auf Stimuli wie LPS, Zymosan oder Zytokine liegen für Lungenepithelzellen bis dato nicht vor. Deshalb war ein Ziel dieser Arbeit, Einflüsse einer 90-minütigen Exposition mit 0,15 ppm Ozon vor bzw. nach einer Stimulierung mit Standardstimuli auf Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) zu untersuchen. Nachdem in Vorversuchen die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die zu untersuchenden Entzündungsparameter überprüft worden war (Abb. 11 bis Abb. 16), zeigte sich, daß die 90-minütige Vorexposition von BEAS-2B mit 0,15 ppm Ozon sehr wohl Einfluß auf eine nachfolgende TNF- $\alpha$ -induzierte Zytokin-freisetzung nahm: Mit Ozon vorbehandelte Zellen synthetisierten auf den Stimulus TNF- $\alpha$  hin geringere Mengen an IL-6 und IL-8 verglichen mit Zellen, die vorher mit Luft behandelt worden waren (Abb. 18 und Abb. 19). Ähnliche Effekte zeigten sich auch bezüglich der Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1, wobei hier die stimulierten und ozonbegasten Zellen zwar immer noch mehr ICAM-1 exprimierten als die entsprechenden luftbegasten Kontrollen, jedoch war der absolute Betrag der TNF- $\alpha$ -induzierten ICAM-1-Expression nach vorangegangener Ozonbegasung vermindert (Abb. 20). Entsprechende Versuche in umgekehrter Reihenfolge, also mit vorangehender 24-stündiger TNF- $\alpha$ -Behandlung und sich anschließender Luft- bzw. Ozonbegasung, zeigten ebenfalls eine durch Ozon bewirkte Abschwächung des stimulusinduzierten Effektes auf die IL-6- und IL-8-Freisetzung sowie auf die ICAM-1-Expression der Zellen (Abb. 21 bis Abb. 23). Analoge Experimente unter Verwendung von IL-1 $\beta$  oder Zymosan als Stimuli führten qualitativ zu den gleichen Ergebnissen (Abb. 30 bis Abb. 35 bzw. Abb. 45 bis Abb. 49). Im Zusammenhang mit letzterem war die Frage von Interesse, ob die beobachteten Effekte auf den Partikeleigenschaften oder vielleicht nur auf der Serumopsonierung des Zymosans beruhten. Daher wurden Stimulierungsversuche mit opsoniertem und nicht-opsoniertem Zymosan durchgeführt, wobei sich zeigte, daß auch nicht-opsoniertes Zymosan die IL-6-, IL-8- und ICAM-1-Bildung bei BEAS-2B induzieren konnte (Abb. 24 bis Abb. 29 bzw. Abb. 36 bis Abb. 38). Dieser Befund sprach für eine Sensibilität der BEAS-2B für partikuläre

Stimuli, was letztendlich auch den Grund für weitere Versuche zur Partikelwirkung im Rahmen dieser Arbeit darstellte.

Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung von Ozon waren entsprechende Versuche mit LPS, da diese Aussagen über Zusammenhänge zwischen einer Ozonbelastung und dem Auftreten bakterieller Infekte ermöglichen könnten. Die LPS-Stimulierung bewirkte bei luft- wie ozonbegasteten Zellen eine Erhöhung der IL-6- und IL-8-Freisetzung sowie der ICAM-1-Expression. Letzteres deckt sich mit den Daten von Beck-Schimmer *et al.* (1997), die in der Rattenlunge nach Instillation von LPS eine erhöhte ICAM-1-Expression, die mit einem verstärkten Neutrophileninflux einherging, fanden. Verglich man nun die Werte luft- bzw. ozonexponierter Zellen, so konnten teilweise deutliche immunsuppressive Effekte des Ozons auf die LPS-stimulierte IL-6- und IL-8-Freisetzung der Epithelzellen festgestellt werden, wohingegen die ICAM-1-Expression höchstens einen Trend zu einer Verminderung nach Ozonvorbehandlung aufwies (Abb. 39 bis Abb. 44).

Derartige Ergebnisse könnten eine mögliche Erklärung für erhöhte Anfälligkeiten gegenüber Infekten oder unspezifischen Reizen durch eine ozoninduzierte mangelnde Bereitschaft des Immunsystems liefern (Steerenberg *et al.*, 1996).

Ergänzend zu den Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung von Ozon bei Bronchialepithelzellen wurden auch solche in einem Kokultursystem aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304) für Stimulierungen mit Zymosan und TNF- $\alpha$  durchgeführt. Erstaunlicherweise bewirkte eine Zymosanbehandlung im apikalen Kompartiment des Kokultursystems weder bei vorhergehender Luft- noch bei Ozonbegasung eine Induktion der untersuchten Entzündungsparameter IL-6, IL-8 und ICAM-1 (Abb. 90 bis Abb. 93). Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die bei den entsprechenden Versuchen mit BEAS-2B allein erzielt wurden. Mögliche Gründe dafür sind vermutlich in der Natur des Kokultursystems zu suchen und werden daher unter Abschnitt 4.5 diskutiert. Versuche zur immunmodulierenden Wirkung von Ozon auf die TNF- $\alpha$ -stimulierte Immunantwort im Kokultursystem wurden derart durchgeführt, daß entweder BEAS-2B, ECV304 oder beide Zelltypen vor der Gasexposition mit TNF- $\alpha$  vorinkubiert wurden. Es zeigte sich, daß eine TNF- $\alpha$ -Vorstimulierung der BEAS-2B-Zellen, der ECV304 sowie beider Zelltypen zu erhöhten IL-6-Freisetzungen im luft- wie ozonbegasteten System führten, wobei keine Unterschiede zwischen luft- und ozonbegasteten Zellen sichtbar waren (Abb. 86). Dagegen bewirkte bezüglich der IL-8-Freisetzung nur die Vorbehandlung der BEAS-2B bzw. beider Zelltypen einen Effekt. Dabei schien die Voraktivierung der BEAS-2B bei anschließender Ozonbehandlung weniger effektiv bezüglich der Induktion zur IL-8-Sekretion zu sein als bei anschließender Luftbegasung des Systems (Abb. 87). Für die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B konnten keine eindeutigen Wirkungen durch TNF- $\alpha$  oder Ozon

festgestellt werden, während die ICAM-1-Expression auf den Endothelzellen durch Vorstimulierungen mit TNF- $\alpha$  induziert werden konnte (Abb. 88 und Abb. 89). Bei Vergleich der Expressionen luft- bzw. ozonbegaster Zellen kann festgestellt werden, daß die Ozonbehandlung eher eine Verstärkung des stimulatorischen Effektes von TNF- $\alpha$  bewirkte.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß in dieser Arbeit mit 0,15 ppm eine sehr niedrige Ozonkonzentration eingesetzt wurde. Dies geschah in der Absicht, Daten zu erhalten, die problemlos auf die herrschenden Umweltbedingungen in Deutschland übertragen werden könnten, da eine Extrapolation von Ergebnissen mit hohen Konzentrationen auf zu erwartende Effekte bei geringen Konzentrationen stets problematisch ist. Jedoch liegen die Nachteile dieses Konzeptes auf der Hand. So konnten, trotz der Durchführung ausreichender Versuche, bestimmte Effekte lediglich als Tendenzen beschrieben werden, da die statistische Signifikanz fehlte. Des weiteren muß für Überlegungen zur Relevanz der vorliegenden Ergebnisse auch die für diese Arbeit gewählte kurze Expositionszeit von nur 90 min berücksichtigt werden, die durch die zeitlich begrenzte Lebensfähigkeit der Zellen unter Expositionsbedingungen bedingt war. Eine Bewertung im Sinne einer Risikoabschätzung für den Menschen sollte von wesentlich längeren und wiederholten Expositionen des Individuums ausgehen, wobei wahrscheinlich ist, daß sich die hier gefundenen Effekte mit zunehmender Einwirkungszeit des Schadgases verstärken.

### 4.3 Stäube und Entzündung in der Lunge

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien dokumentiert einen Zusammenhang zwischen hohen Partikelbelastungen der Atemluft und einer erhöhten Morbidität sowie Mortalität (EPA, 1996; Moolgavkar und Luebeck, 1996). Dabei scheinen Partikel eines Durchmessers  $< 10 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) eine besondere Rolle zu spielen, da diese tiefere Kompartimente der Lunge zu erreichen vermögen und dort Schäden an alveolären Makrophagen und dem Lungenparenchym verursachen können (Lippmann *et al.*, 1980). Während die  $\text{PM}_{10}$ -induzierte Sterblichkeit vorwiegend ältere Menschen mit schon vorher bestehenden kardiopulmonalen Erkrankungen betraf, äußerte sich die Zunahme der Morbidität in einer erhöhten Zahl der Krankenhausaufnahmen von Patienten mit Asthma und Pneumonien (Delfino *et al.*, 1997; Pope III und Dockery, 1992; Schwartz, 1994; Schwartz und Dockery, 1992; Thurston *et al.*, 1992 und 1994; Tseng *et al.*, 1992). Bei vielen dieser Studien erfolgte die Einschätzung der Luftbelastung sowie die Charakterisierung der verunreinigten Luft lediglich unter Zugrundelegung ihres Gehaltes an  $\text{PM}_{10}$ . Jedoch zeigten andere Untersuchungen (Schwartz *et al.*, 1996) eine engere Korrelation zwischen der oben beschriebenen Mortalität und Morbidität und dem Luftgehalt an Partikeln eines aerodynamischen Durchmessers  $< 2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ), so daß die Hypothese aufgestellt wurde, daß der  $\text{PM}_{2,5}$ -Anteil der  $\text{PM}_{10}$ -Fraktion die eigentliche Ursache für die beobachteten Effekte darstellte (Seaton *et al.*, 1995). Ein Defizit in vielen Studien

bestand auch darin, daß die Chemie der Partikel, nämlich die auf der Oberfläche adsorbierten Substanzen, nicht in die Untersuchungen Eingang fanden. In neueren Veröffentlichungen wurde versucht, all diese Einflüsse wie die absolute Partikelbelastung der Atemluft, die Größenverteilung unter besonderer Berücksichtigung der PM<sub>2.5</sub> (Peters *et al.*, 1996) sowie die Chemie der Partikel, möglicherweise auch noch unter Miteinbeziehung gasförmiger Luftschadstoffe wie Ozon, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> und CO, in die epidemiologischen Untersuchungen mit einzubinden (Borja-Aburto *et al.*, 1997; Braun-Fahrlander *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1997b; Delfino *et al.*, 1997).

Die oben angeführten Probleme stellen sich dagegen nicht bei der Bearbeitung der Fragestellung mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten. Hierbei können Expositionen mit Partikeln definierter Größe und Zusammensetzung durchgeführt werden. Bei Verwendung von gesammelten Partikeln aus der Luft ist, nach Extraktion der Partikel mit geeigneten Lösungsmitteln, sogar eine getrennte Untersuchung der reinen Partikelwirkung sowie des Einflusses der chemischen Komponente möglich. Zudem können fast beliebig weitere Einflußgrößen, wie eine Ozonbelastung oder eine Endotoxinprovokation, in das System mit eingeschlossen werden.

Derartige Experimente sind beispielsweise zum Einfluß einer Quarzstimulierung auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion von Rinderalveolarmakrophagen bei Mosbach (1994) beschrieben. Die Exposition mit Quarzstaub führte bei den Rinderalveolarmakrophagen zu einer erhöhten Freisetzung von TNF- $\alpha$  sowie eines nicht näher charakterisierten chemotaktischen Faktors. Gosset *et al.* (1991) berichteten von einer verstärkten IL-6- und TNF- $\alpha$ -Sekretion bei quarzstaub- bzw. grubenstaubexponierten Makrophagen, Yang *et al.* (1997) von einer IL-1- und TNF- $\alpha$ -Freisetzung bei Rattenalveolarmakrophagen, die mit Dieselabgaspartikeln inkubiert worden waren. Dagegen konnten Griwatz und Seemayer (1995) bei menschlichen Makrophagen nur mit endotoxinhaltigen Grubenstäuben eine Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Sekretion finden. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Arbeiten von Borm *et al.* (1988). Darin wurde die spontane und die induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion von Monozyten aus dem peripheren Blut von Grubenarbeitern und Patienten mit Grubenstaub-Pneumokoniose untersucht. Dabei führten Stimulierungen mit Grubenstaub bzw. Quarz zu dramatischen TNF- $\alpha$ -Freisetzungen. Sehr umfangreiche Untersuchungen zur Sekretion von IL-6, TNF- $\alpha$  und reaktiven Sauerstoffspezies nach Aktivierung von menschlichen Alveolarmakrophagen und Rattenalveolarmakrophagen mit Latex, SiO<sub>2</sub>, Dieselabgaspartikeln sowie UAPs (*urban environmental particulates*) aus verschiedenen Städten wurden von Becker *et al.* (1996) durchgeführt. Goldsmith *et al.* (1997) wiesen einen erhöhten intrazellulären oxidativen Streß in Makrophagen nach Exposition mit ROFA (*residual oil fly ash*) nach. Eine Bildung freier Radikale konnte von Kadiiska *et al.* (1997) in partikelexponierten Rattenlungen gezeigt werden. Auch Li *et al.* (1996) betonten die hohe Radikalbildungsaktivität von PM<sub>10</sub> *in vitro* und *in vivo*. In neueren Studien wurde bei partikelstimulierten Makrophagen vermehrt über eine verstärkte

Bildung des Transmitters NO berichtet (Blackford *et al.*, 1997; Iguchi *et al.*, 1996). Neben einer erhöhten Freisetzung von Entzündungsmarkern nach Staubexposition kann auch die Phagozytoseleistung der Alveolarmakrophagen betroffen sein. So demonstrierten Hadnagy und Seemayer (1994) eine Abnahme der phagozytotischen Aktivität und Kapazität menschlicher Makrophagen nach Exposition mit Schwebstaubextrakten.

Aus den bisherigen Ausführungen wird offensichtlich, daß die Mehrzahl der Experimente zur Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren oder Sauerstoffspezies nach Partikelexposition an Alveolarmakrophagen durchgeführt wurde. Vor dem Hintergrund, daß Makrophagen phagozytierende Zellen sind und Partikel stets einen Phagozytosereiz darstellen, wird diese etwas einseitige Betrachtung verständlich. Jedoch sollte beachtet werden, daß Partikel geringen Durchmessers möglicherweise das Bronchialepithel erreichen, bevor sie von Makrophagen phagozytiert werden. Gerade der oben erwähnte Befund einer verringerten Phagozytoseleistung von partikelexponierten Makrophagen macht dies sehr wahrscheinlich. Driscoll *et al.* (1997a) hielten die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von Makrophagen zwar für den wichtigsten initialen Schritt bei einer partikelinduzierten Entzündung, schlossen aber nicht aus, daß beispielsweise Quarz auch direkt das Lungenepithel zur Freisetzung von Chemokinen wie IL-8 aktivieren und damit einen zusätzlichen oder alternativen Weg der Entzündungseinleitung beschreiten könnte. In einer anderen Veröffentlichung beschrieben Driscoll *et al.* (1996) eine quarzstaubinduzierte Erhöhung der mRNA für MIP-2, das sogenannte Makrophagen-inflammatorische Protein, in Lungenepithelzellen. Auch Finkelstein *et al.* (1997) berichteten über eine frühe Freisetzung der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 nach Inkubation von Lungenepithelzellen mit verschiedenen Partikeln und betonten die Bedeutung des Epithels neben den Alveolarmakrophagen bei der partikelinduzierten Entzündung. Simeonova *et al.* (1997) dokumentierten eine verstärkte IL-6-Freisetzung bei asbestexponierten A549-Zellen. Li *et al.* (1997) fanden nach Instillation von PM<sub>10</sub> in Rattenlungen einen verstärkten Influx von Entzündungszellen, eine Zunahme der Permeabilität des Epithels sowie eine Abnahme des Antioxidans Glutathion, was sich mit den Daten von Dye *et al.* (1997) deckt, die bei ROFA-stimulierten Rattentrachealepithelzellen ebenfalls verminderte Mengen an Glutathion feststellten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zytokinfreisetzung und die ICAM-1-Expression bei Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) nach Stimulierung mit Quarzstaub (DQ12) sowie mit Extrakten luftgetragener Stäube (GEX) untersucht. Beide Proben stammten aus dem Rhein-Ruhr-Gebiet. Die hauptsächliche Emissionsquelle für Quarzstäube ist der Steinkohlenbergbau, der sich in Deutschland fast ausschließlich auf das Ruhrgebiet konzentriert. Die verwendeten Globalextrakte GEX65 und GEX67 wurden aus Schwebstäuben, die im Winter und Frühjahr 1990/1991 in Duisburg gesammelt worden waren, extrahiert, während GEX66 und GEX68 Extrakte aus Schwebstäuben der Sammelstelle Düsseldorf, ebenfalls aus den Perioden Winter und Frühjahr 1990/1991, darstellen.

Duisburg repräsentierte dabei eine hochindustrialisierte Region mit Eisen-, Kohle- und Stahlindustrie sowie einem gehäuftem Vorkommen von Ö raffinerien, wohingegen Düsseldorf eine typisch großstädtisch geprägte Region mit sehr hohem Verkehrsaufkommen vertrat.

Es zeigte sich für DQ12 eine deutliche Zeit- und Dosisabhängigkeit der Freisetzung von Interleukin-6, Interleukin-8 und der Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (Abb. 52 bis Abb. 57). Diese Befunde stehen in Einklang mit Ergebnissen von Carter *et al.* (1997), die eine erhöhte Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  nach Exposition humaner Bronchialepithelzellen mit ROFA beschrieben, sowie mit Nario und Hubbard (1996 und 1997), die nach intratrachealer Instillation von Silica-Partikeln bei Mäusen eine verstärkte ICAM-1-Expression in der Lunge beobachteten. Ergänzend wurden Inkubationsversuche mit Überständen DQ12-stimulierter menschlicher Makrophagen durchgeführt. Diese bewirkten bei BEAS-2B ebenfalls eine dosisabhängige Zunahme der ICAM-1-Expression (Abb. 58), was wiederum dem von Driscoll *et al.* (1997a) beschriebenen Entzündungsschema einer initialen Reaktion der Makrophagen mit sich anschließenden sekundären Auswirkungen auf das Bronchialepithel entsprach. Die Versuche mit DQ12-aktivierten BEAS-2B zeigten jedoch, daß auch einer unmittelbaren Antwort der Epithelzellen auf den Stimulus Quarzstaub eine Bedeutung zukommt. Entsprechende Inkubationen von BEAS-2B mit Schwebstaubextrakten (GEX65-68) hatten keinen Einfluß auf die Zytokinfreisetzung, wohl aber einen dosisabhängigen Effekt auf die ICAM-1-Expression der Zellen (Abb. 59 bis Abb. 62).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des Bronchialepithels bei der Entstehung partikelinduzierter Entzündungsvorgänge. Insbesondere die Erhöhung von IL-8 und ICAM-1 könnte durch den damit verbundenen verstärkten Influx neutrophiler Granulozyten einen entscheidenden Schritt in der Entzündungskaskade darstellen. Die Tatsache, daß auch Schwebstaubextrakte ohne das zugehörige Vehikel zu einer ICAM-1-Induktion auf Bronchialepithelzellen befähigt waren, macht deutlich, daß Effekte partikulärer Luftverunreinigungen auf Zellen nicht ausschließlich auf physikalische Phänomene zurückzuführen sind.

#### 4.4 Kombinationswirkungen verschiedener Umweltnoxen

Bei der Beurteilung möglicher schädlicher Auswirkungen von Schadstoffen auf den menschlichen Organismus muß stets bedacht werden, daß der Mensch niemals nur einer Komponente allein ausgesetzt ist, sondern stets einem komplexen Gemisch verschiedenster Umweltnoxen. Bei Betrachtung nur derjenigen Schadstoffe, die inhalativ, also über die eingeatmete Luft, in den Organismus gelangen können, begegnet man gasförmigen Verbindungen wie Ozon, NO<sub>2</sub> und SO<sub>2</sub>, partikulären Verunreinigungen verschiedenster Genese sowie einer Vielzahl möglicher chemischer Substanzen, die der Partikeloberfläche anhaften können. Daneben sind physikalische Parameter wie die Temperatur und die

Feuchtigkeit der Luft sowie UV-Strahlung mögliche Einflußgrößen. Diese Tatsache stellt den Toxikologen vor nahezu unüberwindliche Schwierigkeiten, wenn es um eine Risikoabschätzung gehen soll. Aus diesem Grunde werden vermehrt Untersuchungen zur Kombinationswirkung verschiedener Schadstoffe gefordert (Farman *et al.*, 1997; Last und Pinkerton, 1997; Linn *et al.*, 1997), kann die gleichzeitige Einwirkung zweier Stoffe hinsichtlich einer bestimmten Wirkung doch zu einer Aufhebung, Abschwächung, Addition oder gar Potenzierung der Effekte führen. Von besonderem Interesse sind dabei Untersuchungen zur Kombinationswirkung solcher Komponenten, die, z.B. weil sie der gleichen Emissionsquelle entstammen, gepaart auftreten. Ein Beispiel dafür wäre das aneinander gekoppelte Vorhandensein von NO<sub>2</sub> und Ozon. Des weiteren sind erhöhte Ozonkonzentrationen und eine verstärkte Emission von Partikeln in Gebieten starker Verkehrsdichte meist gemeinsam anzutreffen. Neueste Veröffentlichungen diskutieren sogar die Entstehung partikulärer Verunreinigungen aus gasförmigen Komponenten in der Atmosphäre (Meng *et al.*, 1997). Zur Erklärung von Kombinationseffekten zweier Substanzen sind verschiedene Ansätze denkbar. Um bei dem Beispiel Ozon und Partikel zu bleiben, wäre es möglich, daß Ozon zu einer Vorschädigung der Zellen führt und somit deren normale Reaktion auf eine Partikelexposition im Sinne einer Immunsuppression abschwächt oder aber in einer additiven oder überadditiven Immunantwort verstärkt (Gerrity, 1995; Schlesinger, 1995). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß Ozon, aber auch Partikel und NO<sub>2</sub> sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, zu denen das Benzo[a]pyren gehört, die mukoziliäre Clearance der Bronchien beeinflußt (Warheit *et al.*, 1997). Im Falle des Ozons geschieht dies unter anderem durch morphologische Veränderungen der für die Clearance wichtigen Becher- und Zilienzellen durch den Schadstoff (Mellick *et al.*, 1977; Schwartz *et al.*, 1976). Erfolgt nach einer derartigen Vorschädigung der Zellen eine zusätzliche Exposition, z.B. mit Partikeln, können diese nicht mehr effektiv entfernt werden, der Organismus wird empfindlicher für die Partikelwirkung bzw. die Wirkung assoziierter chemischer Substanzen. So beschrieben Churg *et al.* (1996) eine erhöhte Aufnahme mineralischer Partikel wie Titandioxid und Asbest bei tracheobronchialen Epithelzellen, die zuvor mit Ozon exponiert worden waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kombinationswirkungen von Ozon und Quarzpartikeln (DQ12) sowie Extrakten aus Schwebstaubproben (GEX) untersucht. Hinsichtlich einer Kombinationswirkung zwischen Ozon und Quarzstaub konnte bei ozonvorbehandelten menschlichen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) nach anschließender Exposition mit Quarzstaub eine abgeschwächte Interleukin-6-Freisetzung, verglichen mit der luftvorbehandelter Zellen, gezeigt werden. Dies bedeutet, daß eine nur 90 min dauernde Begasung mit 0,15 ppm Ozon bereits Auswirkungen auf die Immunreaktion bzw. die Reaktionsfähigkeit von Zellen hatte, was sich in diesem Falle in einer Immunsuppression, also einer „schlechteren Abwehr“ auf die Noxe Quarzstaub, manifestierte (Abb. 63). Während hinsichtlich der Interleukin-8-

Sekretion noch ein gewisser immunsuppressiver Effekt der Ozonvorbehandlung erahnt werden konnte, blieb die ICAM-1-Expression davon unbeeinflusst (Abb. 64 und Abb. 65). Ähnliche Daten können bei Mosbach (1994) und Lind (1994) gefunden werden: Eine Exposition mit Quarzstaub führte bei Rinderalveolarmakrophagen zu einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Wurde dagegen nach der Quarzstaubphagozytose der Zellen 2h mit Ozon oder mit NO<sub>2</sub> begast, konnte der quarzstaubinduzierte Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion der Zellen nicht mehr beobachtet werden.

Entsprechende Ergebnisse konnten bei Versuchen zur kombinierten Wirkung von Ozon und Schwebstaubextrakt (GEX68) bei BEAS-2B nicht erzielt werden. Es zeigten sich keine ozon-induzierten Veränderungen in der IL-6- bzw. IL-8-Sekretion der Zellen. Während die Exposition mit Schwebstaub keinen Einfluß auf die IL-6-Freisetzung der Zellen nahm, bewirkte sie bezüglich der IL-8-Sekretion eine deutliche Verminderung (Abb. 66 und Abb. 67). Für dieses Phänomen konnte bisher keine Erklärung gefunden werden.

Neben Versuchen zu Kombinationseffekten von Ozon und Quarzstaub bzw. Ozon und Schwebstaubextrakten auf Bronchialepithelzellen wurden solche auch im Kokultursystem aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304) durchgeführt. Eine nach der Luft- bzw. Ozonexposition durchgeführte Stimulierung des Kokultursystems im apikalen Kompartiment mit DQ12 bewirkte eine Erhöhung der Sekretion der Zytokine Interleukin-6, Interleukin-8 sowie der ICAM-1-Expression auf BEAS-2B und ECV304. Im ozonbegasteten System konnte auf den Stimulus DQ12 außerdem eine geringfügig abgeschwächte Reaktion bezüglich der IL-8-Freisetzung und der ICAM-1-Expression auf ECV304 beobachtet werden, was für die IL-6-Sekretion und die ICAM-1-Expression auf BEAS-2B nicht gesehen werden konnte (Abb. 94 bis Abb. 97). Diese Ergebnisse decken sich gut mit den Daten der entsprechenden Untersuchungen an Bronchialepithelzellen allein

Eine Vorbehandlung der BEAS-2B mit den Schwebstaubextrakten GEX65 und GEX66 vor der Begasung im Kokultursystem bewirkte eine verstärkte IL-6- und IL-8-Freisetzung im System sowie eine erhöhte ICAM-1-Expression auf ECV304 (Abb. 98 bis Abb. 103). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der entsprechenden Versuche mit BEAS-2B allein, wo keine schwebstaubinduzierten Effekte auf die IL-6- und IL-8-Freisetzung der Zellen gefunden worden waren (Abb. 66 und Abb. 67). Die Ozonbegasung des Systems führte bei GEX66-stimulierten Zellen zu einer verminderten IL-6- und IL-8-Sekretion verglichen mit den Freisetzungen im luftbehandelten System (Abb. 99 und Abb. 101). Dieser immunsuppressive Effekt war weder für die ICAM-1-Expression auf den Endothelzellen noch für Stimulierungen mit GEX65 zu sehen. Eine mögliche Erklärung, warum GEX65 und GEX66 in diesem Falle unterschiedlich reagierten, muß in den verschiedenen Sammelstandorten und der damit verbundenen unterschiedlichen qualitativen Beschaffenheit der Stäube gesucht werden.

#### 4.5 Geeignete Zellsysteme: Notwendigkeit von komplexeren Systemen

Am Anfang jeder Planung toxikologischer Experimente steht die Frage nach dem geeigneten Testsystem. Zweifellos eine der besten Möglichkeiten zur Untersuchung von Schadstoffeinflüssen auf Organismen stellt nach wie vor der Tierversuch dar. Jedoch ist dieser, nicht zuletzt aus ethischen Gründen, mit zahlreichen Problemen behaftet, die insbesondere die Übertragbarkeit auf den Menschen betreffen. Epidemiologische Studien leisten einen wichtigen Beitrag zur Einschätzung von Gesundheitsrisiken bestimmter Schadstoffe auf den Menschen, bleiben in ihrer Aussage aber eher deskriptiv und vermögen somit wenig zu einer Aufklärung der den Schadstoffen zugrundeliegenden Mechanismen beizutragen. *In vitro*-Studien bieten den Vorteil, im menschlichen System arbeiten zu können. Des weiteren können Zelltypen verschiedenster Herkunft je nach Schadstoff und durch diesen belastetem Gewebe zu Untersuchungen herangezogen werden. So wurden in der Vergangenheit zahlreiche *in vitro*-Studien zur Toxizität von Luftschadstoffen durchgeführt. Jedoch beschränkte sich die Mehrzahl dieser Studien auf die Exposition von Lungenepithelzellen oder Alveolarmakrophagen, die als Zielzellen eingeatmeter Schadstoffe im Respirationstrakt angesehen werden. Derart gewonnene Ergebnisse liefern wichtige Hinweise auf Wirkungen, beispielsweise von Ozon, auf die exponierten Zellen und bilden die Grundlage weitergehender Überlegungen. Doch ebenso wie die Umweltexposition des Menschen niemals auf eine einzelne Komponente beschränkt ist, ist es auch wahrscheinlich, daß ein Effekt, der durch Ozon im Alveolarmakrophagen oder der Lungenepithelzelle ausgelöst wurde, nicht auf diese Zellen begrenzt bleibt, sondern Auswirkungen auf das umliegende Gewebe mit seinen vielfältigen Zelltypen haben wird. Mit der Freisetzung von löslichen Transmittern wie Zytokinen oder Arachidonsäuremetaboliten ist den Zellen die Möglichkeit zur Kommunikation innerhalb des Gewebes gegeben, welche die Grundlage der Weiterleitung oder Verstärkung von Effekten darstellen könnte. In diesem Zusammenhang ist die indirekte Aktivierung des Endothels durch aufliegende Zelltypen von besonderem Interesse. Dies wird vor allem im alveolären Bereich anschaulich, wo, begründet durch den dort stattfindenden Gasaustausch, ein nur minimaler Abstand zwischen dem Alveolarepithel, das den Alveolarraum bedeckt, und den Endothelzellen, die die kleinen Blutgefäße auskleiden, besteht.

In dieser Arbeit wurde ein Kokultursystem aus Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Endothelzellen (ECV304) entwickelt, in dem eine Begasung der Epithelzellen sowie ein freier Austausch von löslichen Mediatoren und damit eine Kommunikation zwischen den Zellen möglich war. Der Entwicklung zugrundegelegt wurde ein von Lang *et al.* (1996) beschriebenes Kokultursystem aus Bronchialepithelzellen und Lungenfibroblasten, das auf der Verwendung von Transwell<sup>®</sup>-Membraneinsätzen beruht. Unter Beobachtung des Wachstums und möglicher morphologischer Veränderungen der Zellen wurde ein geeignetes Medium gesucht, in dem beide Zelltypen zufriedengestellt werden konnten. Dabei erwies sich das serumfreie KGM für geeignet und führte, zumindest für die Dauer der Kokultivierung, die

24h nie überschritt, zu keinen wesentlichen Veränderungen in der Morphologie oder dem Wachstumsverhalten der Zellen (Abb. 68 und Abb. 69). Während bezüglich der im Kokultursystem gefundenen Zytokine nicht gesagt werden konnte, von welcher der beiden Zellarten sie sezerniert worden waren, konnte die Bestimmung der Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) für BEAS-2B wie ECV304 getrennt durchgeführt werden. Es wurde überprüft, ob Wechselwirkungen zwischen den beiden Zelltypen bestehen und inwieweit diesen eine Rolle bei der Entwicklung und Verstärkung einer luftschadstoff-induzierten Entzündungsreaktion zukommt.

Dabei zeigte sich, daß die Kokultivierung von BEAS-2B mit ECV304 zu einer um ein Vielfaches erhöhten Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8, unabhängig von einer Luft- bzw. Ozonbegasung oder einer Exposition mit sonstigen Stimuli, führte. Diese hohe Sekretion setzte sich keinesfalls nur additiv aus der Summe der freigesetzten Zytokinmengen der einzeln kultivierten, sonst aber gleich behandelten Zellarten zusammen (Abb. 81 und Abb. 82). Dies weist auf eine Kommunikation der beiden Zelltypen über lösliche Mediatoren hin. Im Bestreben, diese Mediatoren näher zu charakterisieren, wurden die Überstände neben IL-6 und IL-8 auch auf ihren Gehalt an TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  untersucht. Die Vermutung, daß gerade diese Zytokine für die genannten Effekte verantwortlich sein könnten, begründete sich darin, daß beide in Vorversuchen eine erhöhte IL-6- und IL-8-Sekretion und eine verstärkte ICAM-1-Expression bei BEAS-2B sowie bei ECV304 induzieren konnten. Jedoch konnte keines der beiden Zytokine in dem System nachgewiesen werden. Eine andere Möglichkeit wäre gewesen, daß die beiden Zytokine IL-6 und IL-8 ihre eigene Freisetzung bzw. die des anderen Zytokins stimulierten und dadurch zu der überschießenden Antwort im Kokultursystem führten. Mit Kokulturversuchen unter Koinkubation mit Antikörpern gegen IL-6 oder IL-8 konnte auch diese Erklärungsmöglichkeit ausgeschlossen werden: Die Hemmung von IL-6 durch einen Antikörper führte nicht zur Unterdrückung der IL-8-Freisetzung und umgekehrt (Abb. 84 und Abb. 85).

Des weiteren zeigten Endothelzellen, die über 24h mit Epithelzellen zusammen kultiviert worden waren, eine höhere ICAM-1-Expression als Endothelzellen, die unter gleichen Bedingungen, aber allein, gehalten worden waren (Abb. 83). Dies bedeutet, daß die Bronchialepithelzellen, möglicherweise über die Ausschüttung eines Zytokins, das die darunterliegende Endothelzelle erreichte, diese zu einer verstärkten ICAM-1-Expression anregen konnten, was sich letztlich in einem Influx von Neutrophilen in das Gewebe und einer nachfolgenden Entzündung auswirken könnte. Da Watson *et al.* (1996) über eine Interleukin-6-induzierte ICAM-1-Expression auf humanen Nabelschnurendothelzellen berichteten, lag die Vermutung nahe, daß die verstärkte ICAM-1-Expression der ECV304 im Kokultursystem eine Folge der ebenfalls erhöhten IL-6-Mengen im System sein könnten. Dies bestätigte sich jedoch nicht, konnte auf ECV304 doch gar keine Induktion der ICAM-1-Bildung durch IL-6 gefunden werden.

Einen weiteren Hinweis auf das Zusammenwirken von Bronchialepithel und Endothel lieferte die Tatsache, daß Endothelzellen, die mit DQ12-aktivierten BEAS-2B kokultiviert worden waren, eine höhere ICAM-1-Expression zeigten als solche, die mit unstimulierten BEAS-2B in Kokultur inkubiert worden waren, obgleich die Endothelzellen keinen Kontakt mit dem Stimulus DQ12 hatten (Abb. 97). Somit synthetisierten die Bronchialepithelzellen unter dem Einfluß von DQ12 einen Faktor, der das Endothel wiederum zur ICAM-1-Expression anregte. Vergleichbare Phänomene konnten auch bezüglich einer TNF- $\alpha$ -Stimulierung gesehen werden. So bewirkte die Vorbehandlung der BEAS-2B mit TNF- $\alpha$  bei mit diesen kokultivierten ECV304 eine höhere ICAM-1-Expression verglichen mit der Expression auf ECV304, die mit unstimulierten BEAS-2B kokultiviert worden waren (Abb. 89).

Neben der Möglichkeit zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den beiden Zelltypen bestand ein weiterer Vorteil des Kokultursystems darin, daß Effekte teilweise deutlicher zum Vorschein kamen als bei einzeln kultivierten Zellen, das System also empfindlicher war. So führte die Begasung der Bronchialepithelzellen in Kokultur mit Luft bzw. Ozon nach 24h zu deutlich verstärkten IL-6- und IL-8-Freisetzungen im ozonexponierten, verglichen mit denjenigen im luftexponierten System (Abb. 81 und Abb. 82), ein Effekt, der bei einzeln kultivierten BEAS-2B wegen der insgesamt sehr geringen Zytokinfreisetzungen nicht so eindeutig gesehen werden konnte (Abb. 8 und Abb. 9). Jedoch trat auch der umgekehrte Fall ein, daß gerade durch die überschießende Zytokinfreisetzung im Kokultursystem Effekte verdeckt wurden, die bei einzeln kultivierten Bronchialepithelzellen deutlicher ausgeprägt waren, so z.B. die zymosaninduzierte IL-6- bzw. IL-8-Sekretion (Abb. 90 und Abb. 91 bzw. Abb. 30 und Abb. 31).

#### 4.6 Zusammenhang Entzündung – Kanzerogenese

Ein Zusammenhang zwischen Entzündungsvorgängen und neoplastischen Ereignissen wird in der Medizin schon seit längerer Zeit beobachtet. Dabei sind die Übergänge von einer Entzündungsreaktion der Lunge über fibrotische Veränderungen bis hin zu Neoplasien oft fließend (Saffiotti, 1996). Janssen *et al.* (1994) zeigten, daß reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie sie von Entzündungszellen wie Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten (PMNs), aber auch von Epithelzellen, gebildet werden, eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Proto-Onkogenen durch kanzerogene Fasern spielen. Des weiteren vermögen ROS über radikalische Mechanismen Kanzerogene in ihre Wirkform zu überführen (Kehrer *et al.*, 1988). Somit könnten Partikel auch über inflammatorische Ereignisse und die damit einhergehende Entstehung von ROS assoziierte Kanzerogene bioaktivieren. Borm *et al.* (1997) dokumentierten eine verstärkte Benzo[a]pyren-induzierte Bildung von DNA-Addukten bei Epithelzellen aus Rattenlungen, wenn diese mit Neutrophilen koinkubiert worden waren. Wurden die Neutrophilen mit PMA aktiviert, so erhöhte sich die Zahl der DNA-Addukte in

den Lungenepithelzellen weiter. Driscoll *et al.* (1997b) zeigten eine vermehrte Mutationsrate bei Alveolarepithelzellen von Ratten, die mit Entzündungszellen aus der Lavageflüssigkeit partikelexponierter Ratten kokubiert wurden. Bei diesen Überlegungen sollte auch die Bedeutung von IL-8 als starkes Chemoattraktans für Neutrophile bedacht werden, bedeutet die Einwanderung von PMNs in das Gewebe doch wiederum eine verstärkte Bildung von ROS. Durch diesen Mechanismus könnten bei Entzündungsprozessen ausgeschüttete Zytokine zu einer Kanzerogenese beitragen. Multifunktionelle Zytokine wie TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  bewirken zudem eine Induktion von Zellwachstum und mitogener Aktivität, Ereignisse, die im Zusammenhang mit einer Kanzerogenese ebenfalls relevant sein dürften. Außerdem müssen durch Entzündungsgeschehnisse geschädigte Zellen wieder neu gebildet werden, was eine verstärkte Proliferation der Zellen erfordert. Proliferationsreize aber können als kokanzerogen angesehen werden. So zeigten Dupuit *et al.* (1995), daß sich regenerierende Zellen des menschlichen respiratorischen Epithels bevorzugte Zielzellen eines rekombinanten Adenovirus darstellen.

#### 4.7 Partikel und Kanzerogenese

Im Zusammenhang mit der partikelinduzierten Kanzerogenese ist die Frage, ob die Kanzerogenität partikulärer Luftverunreinigungen primär auf der Partikelstruktur *per se* oder der Adsorption kanzerogener Verbindungen auf der Oberfläche beruht, noch immer nicht geklärt. Vermutlich spielen beide Komponenten bzw. deren Zusammenwirken im Sinne eines Synergismus eine entscheidende Rolle. Es existieren zahlreiche Studien, die genotoxische bzw. kanzerogene Effekte von Staubextrakten beschreiben. So induzieren Extrakte partikulärer Automobilabgase (Lewtas, 1983; Lockard *et al.*, 1982) sowie partikulärer Luftschadstoffe (Hornberg *et al.*, 1996 und 1997; Hornberg und Seemayer, 1995) dosisabhängig Schwesterchromatidaustausche in Säugerzellen. Auch Chromosomenaberrationen wurden im Zusammenhang mit Extrakten partikulärer Luftschadstoffe beschrieben (Hadnagy *et al.*, 1986). Neben einer kanzerogenen Wirkung zeigen Feinstaubextrakte auch zytotoxische Effekte, die sich in einer Verminderung der Zellproliferation und der DNA-Synthese, Zellzyklusstörungen und einer Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit äußern (Behmer und Seemayer, 1983; Giebel und Seemayer, 1984; Krampitz und Seemayer, 1979; Seemayer und Krampitz, 1979). Außerdem wurden aneugene Wirkungen an Lungenzellen des Chinesischen Hamsters beschrieben (Hader *et al.*, 1996). Ungeachtet einer selbständigen kanzerogenen Wirkung stellen Partikel ein wichtiges Transportmedium dar, mittels dessen potentielle Schadstoffe über die Atemluft in den Organismus des Menschen eintreten können. Eventuell könnte diese Transportfunktion der Partikel sogar noch weiter gefaßt werden, indem angenommen wird, daß diese die Aufnahme kanzerogener Substanzen in die Zelle fördern. Des weiteren wird die Rolle von Partikeln als Kofaktoren bei der Entstehung maligner Erkrankungen im Atemwegssystem diskutiert. Dabei wird die Hypothese aufgestellt, daß

partikel-assoziierte Kanzerogene (PAC) zu Veränderungen toxikokinetischer Parameter wie der Deposition, Retention und Clearance von Substanzen führen und somit deren kanzerogenes Potential erhöhen. So wurde von Brüggens (1992) gezeigt, daß eine 5-stündige Inhalation eines Feinstaubextraktes bei Wistar-Ratten zu bemerkenswerten strukturellen Veränderungen der Trachealzilien führte. Diese waren stark angeschwollen und damit in ihrer Motilität und Funktionstüchtigkeit eingeschränkt. Derart geschädigte Zellen wären somit viel empfindlicher gegenüber partikulären kanzerogenen Einflüssen, da durch die Beeinträchtigung des Reinigungssystems die Verweildauer der Partikel stark erhöht wird und eine Akkumulierung der Schadstoffe erfolgen kann. Auch die Elutionsrate, ein Maß dafür, wie leicht die adsorbierte Substanz von der Partikeloberfläche abdiffundiert, scheint von entscheidender Bedeutung für das kanzerogene Potential luftgetragener Partikel zu sein. Nettesheim *et al.* (1981) lieferten Hinweise auf letzteren Mechanismus mit einem Experiment, in dem mit Benzo[*a*]pyren beschichtete Kohlenstoffpartikel verschiedener Größe intratracheal instilliert wurden. Bei identischer instillierter Benzo[*a*]pyren-Dosis hatten die großen Partikel nur geringe kanzerogene Aktivität. Während Partikel aller Größen die Retention des Kanzerogens erhöhten, war die Dissoziationsrate bei den größeren Partikeln dagegen geringer als bei den kleinen.

In dieser Arbeit wurden repräsentativ für die Vielzahl partikulärer Luftverunreinigungen Quarzstaub (DQ12) und Globalextrakte von atmosphärischen Schwebstäuben (GEX) untersucht. Die genaue chemische Zusammensetzung der verwendeten Schwebstaubextrakte war nicht bekannt, handelte es sich dabei doch schätzungsweise um einige hundert verschiedene Substanzen. Jedoch waren die Proben bezüglich ihres Benzo[*a*]pyren-Gehaltes als Leitsubstanz für die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) charakterisiert (Tab. 3). Die kanzerogene Wirkung von Benzo[*a*]pyren auf die Atemwege ist im Tierversuch nachgewiesen. Benzo[*a*]pyren steht außerdem im Verdacht, auch beim Menschen krebserregend zu wirken (Hammond *et al.*, 1976). Van Agen *et al.* (1997) konnten an BEAS-2B-Zellen für Benzo[*a*]pyren eine dosisabhängige Bildung von DNA-Addukten zeigen. Die genotoxischen Wirkungen der Schwebstaubextrakte auf verschiedene Säugerzellen wurden von Hornberg und Seemayer (1994) anhand der Bestimmung der Schwesterchromatidaustausche bereits ausführlich untersucht. Dabei ergab ein Vergleich der linearen Regressionen, daß die Proben aus dem industrialisierten Stadtgebiet von Duisburg eine größere Aktivität bezüglich der Induktion von Schwesterchromatidaustauschen aufwiesen als die Proben aus der Innenstadt von Düsseldorf. Als mögliche Begründung dafür wurde das Auftreten zusätzlicher Emissionen zahlreicher industrieller Quellen in Duisburg diskutiert. Bereits geringe Mengen des Schadstoffes, die extrahierten Schwebstäuben aus weniger als einem Kubikmeter Luft entsprachen, waren wirksam (Hornberg, 1996). Dagegen ist für Quarzstaub (DQ12) eine kanzerogene bzw. genotoxische Wirkung nicht eindeutig belegt. In einer deutschen Fall-Kontrollstudie mit quarzstaubexponierten Arbeitern konnten keine

Hinweise auf eine Beziehung zwischen einer Quarzfeinstaubexposition und einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko gefunden werden (Ulm *et al.*, 1995). Zwar konnte von Olbrück *et al.* (1997) ein proliferativer Effekt auf humane Lungenfibroblasten, Pneumozyten sowie Tracheobronchialzellen durch Überstände DQ12-exponierter Makrophagen dokumentiert werden, doch kann dieses Phänomen lediglich als kokanzerogene, epigenetische Wirkung angesehen werden. Dagegen zeigten Nehls *et al.* (1997) bei DQ12-exponierten Ratten neben einer verstärkten Zellproliferation erhöhte Mengen an 8-Oxoguanin in der DNA, was auf kanzerogene Effekte hinweist. Außerdem wurden von Saffiotti und Ahmed (1995) nach Quarzinkubation neoplastische Transformationen in einer Mausembryozelllinie beschrieben.

#### 4.8 Ozon und Krebs

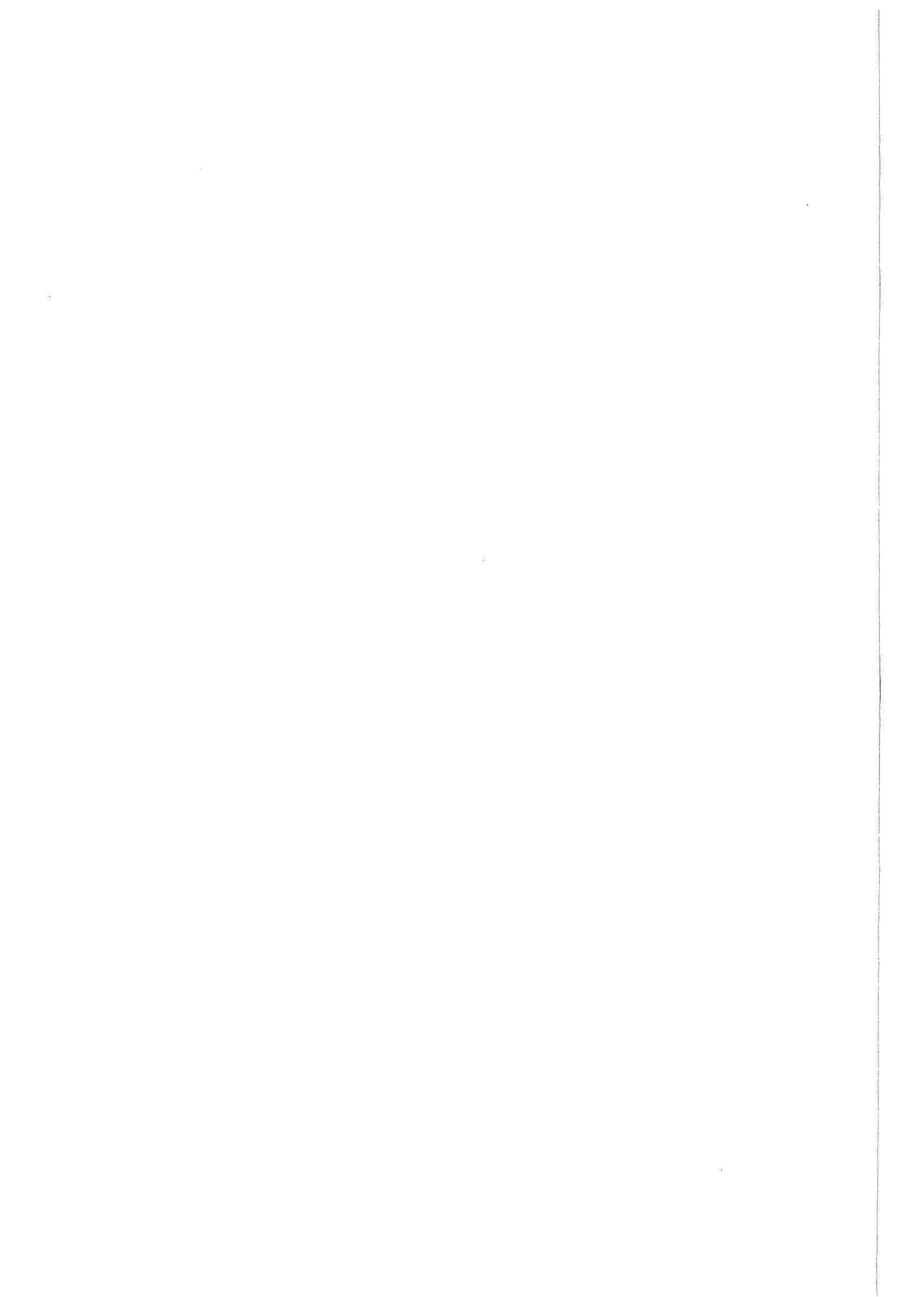
Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen Ozon und der Entstehung von Lungenkrebs wird heute sehr kontrovers diskutiert. Für eine kanzerogene Wirkung von Ozon konnte im Tierversuch, trotz zahlreicher durchgeführter Studien, bisher kein eindeutiger Nachweis erbracht werden. Dabei muß aber beachtet werden, daß die Mehrzahl der Untersuchungen zur Wirkung von Ozon anhand von Kurzzeitexperimenten durchgeführt wurde, während es sehr wahrscheinlich ist, daß für eine Kanzerogenese längere Expositionszeiten vonnöten sind. Bereits in sehr frühen Studien mit Mäusen (Gardner, 1966; Kotin *et al.*, 1958; Werthamer *et al.*, 1970) wurde eine Kanzerogenität von Ozon diskutiert. Durch spätere Untersuchungen konnten diese frühen Daten für bestimmte Mäusestämme teilweise bestätigt werden. So zeigten Hassett *et al.* (1985) eine leichte Zunahme pulmonaler Adenome in A/J-Mäusen nach Ozonexposition mit so geringen Konzentrationen wie 0,31 ppm und 0,5 ppm. Weiterhin berichteten Last *et al.* (1987) über eine verstärkte Bildung von Lungenneoplasien bei A/J-Mäusen, jedoch nicht bei Swiss-Webster-Mäusen, nach einer Ozonexposition von 0,8 ppm über 18 Wochen. In anderen Spezies als der Maus konnten jedoch keine derartigen Beobachtungen gemacht werden. So wurde nach 24 Monaten Ozonexposition keine erhöhte Inzidenz von Lungenneoplasien in Fischer-344-Ratten gefunden (Boorman *et al.*, 1994). Auch eine simultane Exposition mit einem Kokanzerogen hatte weder bei Fischer-344-Ratten noch bei syrischen Hamstern eine Auswirkung bezüglich der Bildung von Neoplasien (Boorman *et al.*, 1994; Witschi *et al.*, 1993). Wiederum war es eine Studie mit Mäusen, die im Jahre 1996 allgemeines Aufsehen erregte. Dabei handelte es sich um Untersuchungen zur Kanzerogenität von Ozon über einen Zeitraum von 24 Monaten bzw. 30 Monaten, was der Lebenszeit der Tiere entsprach. Herbert *et al.* (1996) dokumentierten eine signifikante Zunahme der Inzidenz von Adenomen und Karzinomen in den Alveolen und Bronchien von weiblichen Mäusen, die für 24 bzw. 30 Monate mit 1,0 ppm Ozon exponiert worden waren. Bei männlichen Mäusen waren entsprechende Effekte vorhanden, jedoch schwächer ausgeprägt.

Wenngleich gesicherte Daten, die eine kanzerogene Wirkung von Ozon belegen, fehlen, sei doch auf mögliche kokanzerogene Eigenschaften von Ozon hingewiesen: Die hohe Reizwirkung des Ozons mit der damit verbundenen Schädigung von Oberflächenzellen wie Pneumozyten erfordert das Nachbilden der geschädigten Zellen und somit eine erhöhte Proliferation. Es ist aber bekannt, daß verstärkte Proliferationsprozesse bei gleichzeitiger Anwesenheit von primären Kanzerogenen die Tumorbildung fördern können. Da solche Kanzerogene ubiquitär in der Luft vorhanden sind, kann ein tumorfördernder Effekt von Ozon nicht völlig ausgeschlossen werden. Des weiteren sei auf Abschnitt 4.6 verwiesen, in dem die Zusammenhänge zwischen Entzündung und Krebsentstehung diskutiert wurden. Eine entzündungsfördernde Wirkung von Ozon ist unbestritten, und gerade den unter Ozon-einwirkung gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies kommt bei Diskussionen zur Kanzerogenese als Folge einer Entzündung eine Schlüsselrolle zu.

Klar hingegen ist die Mutagenität und Genotoxizität von Ozon erwiesen. Hierbei sei auf eine Übersichtsarbeit von Victorin (1992) verwiesen. So konnte in mehreren Studien an Bakterienkulturen bereits bei sehr kurzen Expositionszeiten und niedrigen Ozonkonzentrationen wie 50 ppb eine erhöhte Mutationsrate beobachtet werden (Hamelin und Chung, 1975). Außerdem traten nach Ozoneinwirkung Chromosomenanomalien in embryonalen Hühnerfibroblasten (Sachsenmaier *et al.*, 1965) sowie Chromosomenbrüche in menschlichen Zellkulturen auf (Fetner, 1962). Nach 31-stündiger Ozonexposition von Ratten mit einer Konzentration von 1,0 ppm konnten DNA-Einzelstrangbrüche in Zellen der Lavageflüssigkeit gefunden werden (Hanley *et al.*, 1993). Da es sich bei letzteren hauptsächlich um Alveolarmakrophagen handelte, läßt dies den Schluß zu, daß das Gas bis in die Alveolen der Lunge penetrieren und dort seine genotoxische Wirkung entfalten kann. Ferng *et al.* (1997) berichteten über DNA-Doppelstrangbrüche in Tracheobronchialzellen ozonexponierter Meerschweinchen. Lee *et al.* (1997) fanden beim Menschen nach 2-stündiger Exposition in Ruhe mit 0,4 ppm Ozon keine erhöhten Werte für DNA-Einzelstrangbrüche im Bronchialepithel bzw. in Zellen aus der Lavageflüssigkeit. Dagegen führte eine entsprechende Ozonexposition unter Anstrengung der Probanden zu einer Zunahme der DNA-Einzelstrangbrüche in den Bronchialepithelzellen. Kozumbo *et al.* (1996) zeigten, daß Ozonisierungsprodukte der Arachidonsäure in Bronchialepithelzellen DNA-Einzelstrangbrüche induzieren. Rithidech *et al.* (1990) beschrieben das Auftreten von Chromatid-Deletionen in Zellen aus der Lavageflüssigkeit ozonexponierter Ratten.

In der vorliegenden Arbeit sollten genotoxische Wirkungen einer Ozonexposition auf Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) anhand der sehr empfindlichen Methode der Bestimmung von Schwesterchromatidaustauschen (SCEs) erfaßt werden. Positive Ergebnisse im SCE-Test korrelieren gut mit entsprechenden mutagenen Ereignissen wie Genmutationen oder Chromosomenaberrationen, weshalb der Test auch von der World Health Organization (1993) als empfindlicher zytogenetischer Endpunkt zum Nachweis des genotoxischen Potentials

verschiedener mutagener und kanzerogener Agenzien eingestuft wurde (Carrano *et al.*, 1978). Es zeigte sich, daß eine 90-minütige Begasung der Zellen mit 0,15 ppm Ozon zu einer geringfügigen Erhöhung der Schwesterchromatidaustauschrates führte. Somit konnte auch unter den in dieser Arbeit vorherrschenden Expositionsbedingungen eine genotoxische Wirkung von Ozon nachgewiesen werden.



## 5. Literaturverzeichnis

- Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Calderon M, Sapsford RJ & Davies RJ (1995). The effect of conditioned medium from cultured human bronchial epithelial cells on eosinophil and neutrophil chemotaxis and adherence *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13, 728-737.
- Adachi M, Matsukura S, Tokunaga H & Kokubu F (1997). Expression of cytokines on human bronchial epithelial cells induced by influenza virus A. *Int Arch Allergy Immunol* 113, 307-311.
- Alink GM, De Boer RM, Mol J & Temmink JHM (1980). Toxic effects of ozone on human cells *in vitro*, exposed by gas diffusion through teflon film. *Toxicology* 17, 209-218.
- Alpert SE, Kramer CM, Hayes MM & Dennery PA (1990). Morphologic injury and lipid peroxidation in monolayer cultures of rabbit tracheal epithelium exposed *in vitro* to ozone. *J Toxicol Environ Health* 30, 287-304.
- Alpert SE & Walenga RW (1995). Ozone exposure of human tracheal epithelial cells inactivates cyclooxygenase and increases 15-HETE production. *Am J Physiol* 269, L734-L743.
- Amandi-Burgermeister E, Tibes U, Kaiser BM, Friebe WG & Scheuer WV (1997). Suppression of cytokine synthesis, integrin expression and chronic inflammation by inhibitors of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Eur J Pharmacol* 326, 237-250.
- Arsalane K, Gosset P, Vanhee D, Voisin C, Hamid Q, Tonnel AB & Wallaert B (1995). Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13, 60-68.
- Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J, Schwiebert LM, Bochner BS & Schleimer RP (1997). Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 571-582.
- Baggiolini M (1993). Novel aspects of inflammation: interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *Clin Invest* 71, 812-814.
- Baggiolini M, Moser B & Clark-Lewis I (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *Chest* 105, 95S-98S.
- Barton WW, Wilcoxon S, Christensen PJ & Paine R (1995). Disparate cytokine regulation of ICAM-1 in rat alveolar epithelial cells and pulmonary endothelial cells *in vitro*. *Am J Physiol* 269, L127-L135.
- Becker S, Madden MC, Newman SL, Devlin RB & Koren HS (1991). Modulation of human alveolar macrophage properties by ozone exposure *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 110, 403-415.
- Becker S, Soukup JM, Gilmour MI & Devlin RB (1996). Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol* 141, 637-648.
- Beck-Schimmer B, Schimmer RC, Warner RL, Schmal H, Nordblom G, Flory CM, Lesch ME, Friedl HP, Schrier DJ & Ward PA (1997). Expression of lung vascular and airway ICAM-1 after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 344-352.
- Bédard M, McClure CD, Schiller NL, Francoeur C, Cantin A & Denis M (1993). Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 455-462.
- Behmer A & Seemayer NH (1983). Biologische Wirkung von atmosphärischen Feinstaubextrakten. VII. Schwere Störungen von Zellzyklus und Zyklusphasen in Nierenzellkulturen unter Einwirkung von Extrakt und Fraktionen atmosphärischen Feinstaubes eines industriellen Ballungsgebietes. *Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig B* 178, 340-363.
- Bhalla DK (1996). Alteration of alveolar macrophage chemotaxis, cell adhesion, and cell adhesion molecules following ozone exposure of rats. *J Cell Physiol* 169, 429-438.
- Blackford JA, Jones W, Dey RD & Castranova V (1997). Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. *J Toxicol Environ Health* 51, 203-218.
- Blake DR & Rowland FS (1995). Urban leakage of liquefied petroleum gas and its impact on Mexico City air quality. *Science* 269, 953-956.
- Bloemen PGM, Henricks PAJ & Nijkamp FP (1997). Cell adhesion molecules and asthma. *Clin Exp Allergy* 27, 128-141.
- Bloemen PGM, Van den Tweel MC, Henricks PAJ, Engels F, Van de Velde MJ, Blomjous FJ & Nijkamp FP (1996). Stimulation of both human bronchial epithelium and neutrophils is needed for maximal interactive adhesion. *Am J Physiol* 270, L80-L87.
- Boorman GA, Hailey R, Grumbein S, Chou BJ, Herbert RA, Goehl T, Mellick PW, Roycroft JH, Haseman JK & Sills R (1994). Toxicology and carcinogenesis studies of ozone and ozone 4-(N-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in Fischer-344/N rats. *Toxicol Pathol* 22, 545-554.
- Borja-Aburto VH, Loomis DP, Bangdiwala SI, Shy CM & Rascon-Pacheco RA (1997). Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico city. *Am J Epidemiol* 145, 258-268.

- Borm PJA, Knaapen AM, Schins RPF, Godschalk RWL & Van Schooten FJ (1997). Neutrophils amplify the formation of DNA adducts by benzo[a]pyrene in lung target cells. *Environ Health Perspect* 105, 1089-1093.
- Borm PJA, Palmen N, Engelen JJM & Buurman WA (1988). Spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor-alpha (TNF) from blood monocytes of miners with coal workers' pneumoconiosis. *Am Rev Respir Dis* 138, 1589-1594.
- Braun-Fahrlander C, Vuille JC, Sennhauser FH, Neu U, Kunzle T, Grize L, Gassner M, Minder C, Schindler C, Varonier HS & Wuthrich B (1997). Respiratory health and long-term exposure to air pollutants in Swiss schoolchildren. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1042-1049.
- Bromberg PA & Koren HS (1995). Ozone-induced human respiratory dysfunction and disease. *Toxicol Lett* 82, 307-316.
- Brüggen M (1992). Einwirkungen von Luftschadstoffen auf das respiratorische System der Ratte. Schriftliche Hausarbeit im Rahmen der ersten Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe I und II. Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Burck HC (1988). Histologische Technik. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Burnett RT, Brook JR, Yung WT, Dales RE & Krewski D (1997a). Association between ozone and hospitalization for respiratory diseases in 16 Canadian cities. *Environ Res* 72, 24-31.
- Burnett RT, Cakmak S, Brook JR & Krewski D (1997b). The role of particulate size and chemistry in the association between summertime ambient air pollution and hospitalization for cardiorespiratory diseases. *Environ Health Perspect* 105, 614-620.
- Carolan EJ & Casale TB (1996). Neutrophil transepithelial migration is dependent upon epithelial characteristics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 224-231.
- Carrano AV, Thompson LH, Lindl PA & Minkler JL (1978). Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271, 551-553.
- Carter JD, Ghio AJ, Samet JM & Devlin RB (1997). Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol* 146, 180-188.
- Castillejos M, Gold DR, Damokosh AI, Serrano P, Allen G, McDonnell WF, Dockery D, Velasco SR, Hernandez M & Hayes C (1995). Acute effects of ozone on the pulmonary function of exercising schoolchildren from Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 1501-1507.
- Chanez P, Enander I, Jones I, Godard P & Bousquet J (1996). Interleukin 8 in bronchoalveolar lavage of asthmatic and chronic bronchitis patients. *Int Arch Allergy Immunol* 111, 83-88.
- Chen LC & Qu QS (1997). Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during *in vitro* exposure to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol* 143, 96-101.
- Churg A, Brauer M & Keeling B (1996). Ozone enhances the uptake of mineral particles by tracheobronchial epithelial cells in organ culture. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 1230-1233.
- Cottet-Emard JM, Dalmaz Y, Pequignot J, Peyrin L & Pequignot JM (1997). Long-term exposure to ozone alters peripheral and central catecholamine activity in rats. *Eur J Physiol* 433, 744-749.
- Crockett-Torabi E & Fantone JC (1995). The selectins: insights into selectin-induced intracellular signaling in leukocytes. *Immunol Res* 14, 237-251.
- Cunningham AC & Kirby JA (1995). Regulation and function of adhesion molecule expression by human alveolar epithelial cells. *Immunology* 86, 279-286.
- Custodio-Ramírez V & Paz C (1997). Ozone produces functional deficits in the rat visual pathway. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 104, 269-273.
- Dehnen W, Pitz N & Tomingas R (1977). The mutagenicity of airborne particulate pollutants. *Cancer Lett* 4, 5-12.
- Delfino RJ, Murphy-Moulton AM, Burnett RT, Brook JR & Becklake MR (1997). Effects of air pollution on emergency room visits for respiratory illnesses in Montreal, Quebec. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 568-576.
- Denis M (1992). Interleukin-6 in mouse hypersensitivity pneumonitis: changes in lung free cells following depletion of endogenous IL-6 or direct administration of IL-6. *J Leukocyte Biol* 52, 197-201.
- Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggolini M & Cohn ZA (1990). Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 171, 1155-1162.
- Deutsches Ärzteblatt (1997). Ozonbelastung in Deutschland im August 1997. Nr. 94, Heft 37.
- Devalia JL & Davies RJ (1993). Airway epithelial cells and mediators of inflammation. *Respir Med* 87, 405-408.
- Devalia JL, Rusznak C, Abdelaziz MM & Davies RJ (1996). Nedocromil sodium and airway inflammation *in vivo* and *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol* 98, S51-S57.
- Devlin RB, Folinsbee LJ, Biscardi F, Hatch G, Becker S, Madden MC, Robbins M, Koren HS (1997). Inflammation and cell damage induced by repeated exposure of humans to ozone. *Inhalation Toxicol* 9, 211-235.
- Devlin RB, McKinnon KP, Noah T, Becker S & Koren HS (1994). Ozone-induced release of cytokines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells. *Am J Physiol* 266, L612-L619.

- Dockery DW, Pope III CA, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG & Speizer FE (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329, 1753-1759.
- Driscoll KE, Carter JM, Hassenbein DG & Howard B (1997a). Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect* 105, 1159-1164.
- Driscoll KE, Deyo LC, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG & Bertram TA (1997b). Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis* 18, 423-430.
- Driscoll KE, Howard BW, Carter JM, Asquith T, Johnston C, Detilleux P, Kunkel SL & Isfort RJ (1996).  $\alpha$ -quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells. Effects of *in vivo* and *in vitro* particle exposure. *Am J Pathol* 149, 1627-1637.
- Dupuit F, Zahm JM, Pierrot D, Brezillon S, Bonnet N, Imler JL, Pavirani A & Puchelle E (1995). Regenerating cells in human airway surface epithelium represent preferential targets for recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther* 6, 1185-1193.
- Dye JA, Adler KB, Richards JH & Dreher KL (1997). Epithelial injury induced by exposure to residual oil fly-ash particles: role of reactive oxygen species? *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 625-633.
- EPA (1996). Air quality criteria for particulate matter. EPA/600/P-95/001cF, Washington, DC.
- Erroi A, Pagani P, Sironi M & Salmona M (1996). *In vivo* exposure to NO<sub>2</sub> reduces TNF and IL-6 production by endotoxin-stimulated alveolar macrophages. *Am J Physiol* 15, L132-L138.
- Farman CA, Pinkerton KE, Rajini P, Witschi H & Last JA (1997). Evolution of lung lesions in rats exposed to mixtures of ozone and nitrogen dioxide. *Inhalation Toxicol* 9, 647-677.
- Fernandez HN, Henson PM, Otani A & Hugli TE (1978). Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis *in vitro* and under simulated *in vivo* conditions. *J Immunol* 120, 109-115.
- Ferng SF, Castro CE, Afifi AA, Bermudez E & Mustafa MG (1997). Ozone-induced DNA strand breaks in guinea pig tracheobronchial epithelial cells. *J Toxicol Environ Health* 51, 353-367.
- Fetner RH (1962). Ozone-induced chromosome breakage in human cell cultures. *Nature* 194, 793-794.
- Finkelstein JN, Johnston C, Barrett T & Oberdorster G (1997). Particulate-cell interactions and pulmonary cytokine expression. *Environ Health Perspect* 105, 1179-1182.
- Finlayson-Pitts BJ & Pitts JN (1997). Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276, 1045-1052.
- Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME & Smith MJH (1980). Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286, 264-265.
- Foreman KE, Glosky MM, Warner RL, Horvath SJ & Ward PA (1996). Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation* 20, 1-9.
- Foster WM & Stetkiewicz PT (1996). Regional clearance of solute from the respiratory epithelia: 18-20 h postexposure to ozone. *J Appl Physiol* 81, 1143-1149.
- Foster WM, Wills-Karp M, Tankersley CG, Chen X & Paquette NC (1996). Bloodborne markers in humans during multiday exposure to ozone. *J Appl Physiol* 81, 794-800.
- Friedman M, Madden MC, Samet JM & Koren HS (1992). Effects of ozone exposure on lipid metabolism in human alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 97, 95-101.
- Gardner MB (1966). Biological effects of urban air pollution. III. Lung tumors in mice. *Arch Environ Health* 12, 305-313.
- Gerrity TR (1995). Regional deposition of gases and particles in the lung: implications for mixtures. *Toxicology* 105, 327-334.
- Giebel P & Seemayer NH (1984). Biologische Wirkung von atmosphärischen Feinstäuben. VIII. Impulszytometrische Zellzyklusanalysen an synchronisierten Kulturen syrischer Hamsternierenzellen (Linie 14-1b). *Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig B* 179, 406-430.
- Gilmour MI (1995). The effects of ozone on immune function. *Environ Health Perspect* 103, 77-89.
- Gilmour MI, Hmieleski RR, Stafford EA & Jakob GJ (1991). Suppression and recovery of the alveolar macrophage phagocytic system during continuous exposure to 0.5 ppm ozone. *Exp Lung Res* 17, 547-558.
- Goldsmith CA, Frevert C, Imrich A, Sioutas C & Kobzik L (1997). Alveolar macrophage interaction with air pollution particulates. *Environ Health Perspect* 105, 1191-1195.
- Gonzalez-Piña R & Paz C (1997). Brain monoamine changes in rats after short periods of ozone exposure. *Neurochem Res* 22, 63-66.
- Gormand F, Chabannes B, Moliere P, Perrin-Fayolle M, Lagarde M & Pacheco Y (1996). Uptake of 12-HETE by human bronchial epithelial cells (HBEC): effects on HBEC cytokine production. *Prostaglandins* 51, 263-273.
- Gosset P, Lassalle P, Vanhée D, Wallaert B, Aerts C, Voisin C & Tonnel AB (1991). Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed *in vitro* to coal mine dust. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5, 431-436.

- Goto K, Maeda S, Kano Y & Sugiyama T (1978). Factors involved in differential Giemsa-staining of sister chromatids. *Chromosoma* 66, 351-359.
- Griwatz U & Seemayer NH (1995). Tumour necrosis factor- $\alpha$  induction by endotoxin-containing coal mine dusts in cultures of human macrophages and its effects on pneumocyte type II cells. *Toxicol in Vitro* 9, 403-409.
- Hader C, Hadnagy W & Seemayer NH (1996). A rapid method for detection of nongenotoxic carcinogens of environmental pollutants using synchronized V79 cells and flow cytometry. *Toxicol Lett* 88, 99-108.
- Hadnagy W & Seemayer NH (1994). Inhibition of phagocytosis of human macrophages induced by airborne particulates. *Toxicol Lett* 72, 23-31.
- Hadnagy W, Seemayer NH & Tomingas R (1986). Cytogenetic effects of airborne particulate matter in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat Res* 175, 97-101.
- Hamelin C & Chung YS (1975). Characterization of mucoid mutants of *Escherichia coli* K-12 isolated after exposure to ozone. *J Bacteriol* 122, 19-24.
- Hammond EC, Selikoff IJ, Lawther PL & Seidman H (1976). Inhalation of benzpyrene and cancer in man. *Ann NY Acad Sci* 271, 116-124.
- Hanks JH & Wallace JH (1958). Determination of cell viability. *Proc Soc Exp Biol Med* 98, 188-192.
- Hanley NM, Kozumbo WJ, Costa DL, Tice RR & Madden MC (1993). Induction of DNA single strand breaks in lung cells by ozone exposure *in vivo* and *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* 147, A670.
- Hassett C, Mustafa MG, Coulson WF & Elashoff RM (1985). Murine lung carcinogenesis following exposure to ambient ozone concentrations. *J Natl Cancer Inst* 75, 771-777.
- Hébert CA & Baker JB (1993). Interleukin-8: a review. *Cancer Invest* 11, 743-750.
- Heinrich PC, Castell JV & Andus T (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265, 621-636.
- Herbert RA, Hailey JR, Grumbein S, Chou BJ, Sills RC, Haseman JK, Goehl T, Miller RA, Roycroft JH & Boorman GA (1996). Two-year and lifetime toxicity and carcinogenicity studies of ozone in B6C3F1 mice. *Toxicol Pathol* 24, 539-548.
- Hoch RC, Schraufstatter IU & Cochrane CG (1996). *In vivo*, *in vitro*, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *J Lab Clin Med* 128, 134-145.
- Hofer T (1996). Partikel-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei Rinder-Alveolarmakrophagen und humanen Bronchialepithelzellen. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- Hornberg C (1996). Tracheobronchiale Epithelzellen als inhalationstoxikologisches *In-vitro*-Modell zur Analyse der Zytotoxizität und Genotoxizität von komplexen atmosphärischen Feinstäuben. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Hornberg C, Maciuleviciute L & Seemayer NH (1996). Sister chromatid exchanges in rodent tracheal epithelium exposed *in vitro* to environmental pollutants. *Toxicol Lett* 88, 45-53.
- Hornberg C, Maciuleviciute L & Seemayer NH (1997). Genotoxic effects induced by airborne particulates on tracheobronchial epithelial cells *in vitro*. *Ann Occup Hyg* 41, 24-31.
- Hornberg C & Seemayer NH (1994). Analysis of genotoxic activity of airborne particulates on rodent tracheal epithelial cells and human lymphocytes *in vitro*. *Eur Respir J* 7, 78s.
- Hornberg C & Seemayer NH (1995). Induction of sister chromatid exchanges in rodent tracheal epithelial cells as a sensitive bioassay for detection of genotoxic activity of airborne particulates. *Exp Toxicol Pathol* 47, 241-243.
- Huang ZH, Bates EJ, Ferrante JV, Hii CST, Poulos A, Robinson BS & Ferrante A (1997). Inhibition of stimulus-induced endothelial cell intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cellular adhesion molecule-1 expression by arachidonic acid and its hydroxy and hydroperoxy derivatives. *Circ Res* 80, 149-158.
- Huguenel ED, Cohn D, Dockum DP, Greve JM, Fournel MA, Hammond L, Irwin R, Mahoney J, McClelland A, Muchmore E, Ohlin AC & Scuderi P (1997). Prevention of rhinovirus infection in chimpanzees by soluble intercellular adhesion molecule-1. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1206-1210.
- Iguchi H, Kojo S & Ikeda M (1996). Nitric oxide (NO) synthase activity in the lung and NO synthesis in alveolar macrophages of rats increased on exposure to asbestos. *J Appl Toxicol* 16, 309-315.
- Ito T, Ikemi Y, Ohmori K, Kitamura H & Kanisawa M (1994). Airway epithelial cell changes in rats exposed to 0.25 ppm ozone for 20 months. *Exp Toxicol Pathol* 46, 1-6.
- Jakab GJ (1987). Modulation of pulmonary defense mechanisms by acute exposures to nitrogen dioxide. *Environ Res* 42, 215-228.
- Janssen YMW, Heintz NH, Marsh JP, Borm PJA & Mossman BT (1994). Induction of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogenes in target cells of the lung and pleura by carcinogenic fibers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11, 522-530.
- Jaspers I, Flescher E & Chen LC (1997). Respiratory epithelial cells display polarity in their release of the chemokine IL-8 after exposure to ozone. *Inflamm Res* 46, S173-S174.
- Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL & Ghio AJ (1997). *In vivo* evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem Res Toxicol* 10, 1104-1108.

- Kanazawa H, Kurihara N, Otsuka T, Fujii T, Tanaka S, Kudoh S, Hirata K & Takeda T (1996). Clinical significance of serum concentration of interleukin-8 in patients with bronchial asthma or chronic pulmonary emphysema. *Respiration* 63, 263-240.
- Kang BH, Manderschied BD, Huang YCT, Crapo JD & Chang LY (1996). Contrasting response of lung parenchymal cells to instilled TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ : the inducibility of specific cell ICAM-1 *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 540-550.
- Ke Y, Reddel RR, Gerwin BI, Miyashita M, McMenamin M, Lechner JF & Harris CC (1988). Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation* 38, 60-66.
- Kehrer JP, Mossman BT, Sevanian A, Trush MA & Smith MT (1988). Free radical mechanisms in chemical pathogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 95, 349-362.
- Kelly FJ, Mudway I, Krishna MT & Holgate ST (1995). The free radical basis of air pollution: focus on ozone. *Respir Med* 89, 647-656.
- Kemeny DM (1994). ELISA. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Khair OA, Davies RJ & Devalia JL (1996). Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 9, 1913-1922.
- Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Tarraf H & Davies RJ (1994). Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 7, 2109-2116.
- Kinney PL & Özkaynak H (1991). Associations of daily mortality and air pollution in Los Angeles County. *Environ Res* 54, 99-120.
- Kinney PL & Özkaynak H (1992). Associations between ozone and daily mortality in Los Angeles and New York City. *Am Rev Respir Dis* 145, A95.
- Kodavanti UP, Costa DL, Dreher KL, Crissman K & Hatch GE (1995). Ozone-induced tissue injury and changes in antioxidant homeostasis in normal and ascorbate-deficient guinea pigs. *Biochem Pharmacol* 50, 243-251.
- Kotin P, Falk HL & McCammon CJ (1958). III. The experimental induction of pulmonary tumors and changes in the respiratory epithelium in C57BL mice following their exposure to an atmosphere of ozonized gasoline. *Cancer* 11, 473-481.
- Kozumbo WJ, Hanley NM, Agarwal S, Thomas MJ & Madden MC (1996). Products of ozonized arachidonic acid potentiate the formation of DNA single strand breaks in cultured human lung cells. *Environ Mol Mutagen* 27, 185-195.
- Krampitz G & Seemayer N (1979). Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von atmosphärischem Feinstaubextrakt auf die DNS-Synthese und den Zellzyklus von Säugetieren *in vitro*. I. Wirkung von atmosphärischem Feinstaubextrakt auf die DNS-Synthese von Hamsternierenzellen und Hamsterembryonalzellen *in vitro*. *Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig B* 168, 239-255.
- Krishna MT, Blomberg A, Biscione GL, Kelly F, Sandstrom T, Frew A & Holgate S (1997). Short-term ozone exposure upregulates P-selectin in normal human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1798-1803.
- Kudo M, Nishikawa M, Ikeda H & Okubo T (1996). Involvement of superoxide anions in ozone-induced airway hyperresponsiveness in unanesthetized guinea pigs. *Environ Toxicol Pharmacol* 2, 25-30.
- Kurata JH, Glovsky MM, Newcomb RL & Easton JG (1976). A multifactorial study of patients with asthma. Part 2: air pollution, animal dander and asthma symptoms. *Ann Allergy* 37, 398-409.
- Lang D, Jörres R, Mücke M, Holz O & Magnussen H (1996). Etablierung und Ozonexposition eines humanen *in vitro*-Lungenorganoids als Modell der ozoninduzierten Lungenfibrose. *Forschungszentrum Karlsruhe FZKA-PUG* 22, 61-72.
- Last JA & Pinkerton KE (1997). Chronic exposure of rats to ozone and sulfuric acid aerosol: biochemical and structural responses. *Toxicology* 116, 133-146.
- Last JA, Reiser KM, Tyler WS & Rucker RB (1984). Long-term consequences of exposure to ozone. I. Lung collagen content. *Toxicol Appl Pharmacol* 72, 111-118.
- Last JA, Warren DL, Pecquet-Goad E & Witschi H (1987). Modification by ozone of lung tumor development in mice. *J Natl Cancer Inst* 78, 149-154.
- Lee JG, Madden MC, Hatch G, Bottei G, Peden D, Adler K & Devlin R (1997). Ozone-induced DNA single strand breaks in human and guinea pig lung cells *in vivo*. *Inhalation Toxicol* 9, 811-828.
- Leikauf GD, Simpson LG, Santrock J, Zhao QY, Abbinantenissen J, Zhou SY & Driscoll KE (1995). Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ Health Perspect* 103, 91-95.
- Lewtas J (1983). Evaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of motor vehicle emissions in short-term bioassays. *Environ Health Perspect* 47, 141-152.
- LfU (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg). Jahresbericht Luft, 1996.
- Li XY, Gilmour PS, Donaldson K & MacNee W (1996). Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM<sub>10</sub>) *in vivo* and *in vitro*. *Thorax* 51, 1216-1222.
- Li XY, Gilmour PS, Donaldson K & MacNee W (1997). *In vivo* and *in vitro* proinflammatory effects of particulate air pollution (PM<sub>10</sub>). *Environ Health Perspect* 105, 1279-1283.

- Li Z, Daniel EE, Lane CG, Arnaout MA & O'Byrne PM (1992). Effect of an anti-Mo1 MAb on ozone-induced airway inflammation and airway hyperresponsiveness in dogs. *Am J Physiol* 263, L723-L726.
- Lind I (1994). Untersuchungen der Wirkungen von NO<sub>2</sub> auf Immunfunktionen von Rinderalveolarmakrophagen in einem realitätsnahen *in vitro*-System. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Lindl T & Bauer J (1994). Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, 3. Auflage.
- Linn WS, Gong H, Shamoo DA, Anderson KR & Avol EL (1997). Chamber exposures of children to mixed ozone, sulfur dioxide, and sulfuric acid. *Arch Environ Health* 52, 179-187.
- Lippmann M, Yeates DB & Albert RE (1980). Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med* 37, 337-362.
- Liu L, Mul FPJ, Kuijpers TW, Lutter R, Roos D & Knol EF (1996). Neutrophil transmigration across monolayers of endothelial cells is regulated by different mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 796, 21-29.
- Lockard JM, Kaur P, Lee-Stephens C, Sabharwal PS, Pereira MA, McMillan L & Mattox J (1982). Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes by extracts of particulate emissions from a diesel engine. *Mutat Res* 104, 355-359.
- Look DC, Rapp SR, Keller BT & Holtzman MJ (1992). Selective induction of intercellular adhesion molecule-1 by interferon- $\gamma$  in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 263, L79-L87.
- Ma JZ & Guicherit R (1997). Effects of stratospheric ozone depletion and tropospheric pollution on UVB radiation in the troposphere. *Photochem Photobiol* 66, 346-355.
- Madden MC, Eling TE, Dailey LA & Friedman M (1991). The effect of ozone exposure on rat alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Exp Lung Res* 17, 47-63.
- Mantovani A (1997). The interplay between primary and secondary cytokines. Cytokines involved in the regulation of monocyte recruitment. *Drugs* 54, 15-23.
- Matsukura S, Kokubu F, Noda H, Tokunaga H & Adachi M (1996). Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J Allergy Clin Immunol* 98, 1080-1087.
- McKinnon KP, Madden MC, Noah TL & Devlin RB (1993). *In vitro* ozone exposure increases release of arachidonic acid products from a human bronchial epithelial cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 118, 215-223.
- Mellick PW, Dungworth DL, Schwartz LW & Tyler WS (1977). Short term morphologic effects of high ambient levels of ozone on lungs of rhesus monkeys. *Lab Invest* 36, 82-90.
- Meng Z, Dabdub D & Seinfeld JH (1997). Chemical coupling between atmospheric ozone and particulate matter. *Science* 277, 116-119.
- Moolgavkar SH & Luebeck EG (1996). A critical review of the evidence on particulate air pollution and mortality. *Epidemiology* 7, 420-428.
- Mosbach MM (1994). *In vitro*-Untersuchungen zum Einfluß von Ozon auf Immunfunktionen von Alveolarmakrophagen. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Mosbach M, Wiener-Schmuck M & Seidel A (1996). Influence of surfactant on cytokine release from ozone-exposed human and bovine alveolar macrophages *in vitro*. *Inhalation Toxicol* 8, 771-781.
- Mudway IS, Housley D, Eccles R, Richards RJ, Datta AK, Tetley TD & Kelly FJ (1996). Differential depletion of human respiratory tract antioxidants in response to ozone challenge. *Free Radical Res* 25, 499-513.
- Nario RC & Hubbard AK (1996). Silica exposure increases expression of pulmonary intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in C57Bl/6 mice. *J Toxicol Environ Health* 49, 599-617.
- Nario RC & Hubbard AK (1997). Localization of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lungs of silica-exposed mice. *Environ Health Perspect* 105, 1183-1190.
- Nehls P, Seiler F, Rehn B, Greferath R & Bruch J (1997). Formation and persistence of 8-oxoguanine in rat lung cells as an important determinant for tumor formation following particle exposure. *Environ Health Perspect* 105, 1291-1296.
- Nettesheim P & Bader T (1996). Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates arachidonic acid metabolisms and mucus production in rat tracheal epithelial cell cultures. *Toxicol Lett* 88, 35-37.
- Nettesheim P, Topping DC & Jamasbi R (1981). Host and environmental factors enhancing carcinogenesis in the respiratory tract. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 21, 133-163.
- Newton R, Kuitert LM, Slater DM, Adcock IM & Barnes PJ (1996). Cytokine induction of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells. *Life Sci* 60, 67-78.
- Noah TL, Paradiso AM, Madden MC, McKinnon KP & Devlin RB (1991). The response of a human bronchial epithelial cell line to histamine: intracellular calcium changes and extracellular release of inflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5, 484-492.
- Nocker RET, Schoonbrood DFM, van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM & Out TA (1996). Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 109, 183-191.

- Nohgawa M, Sasada M, Maeda A, Asagoe K, Harakawa N, Takano K, Yamamoto K & Okuma M (1997). Leukotriene B<sub>4</sub>-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. *J Leukocyte Biol* 62, 203-209.
- Olbrück H, Maciuleviciute L & Seemayer NH (1997). Stimulierung der Zellproliferation von menschlichen Lungenfibroblasten, Pneumozyten Typ II und Tracheobronchialzellen durch Überstände quarzstaubexponierter humaner Makrophagen. *Atemwegs Lungenkrankh* 23, 367-369.
- Papi A (1997). Epithelial ICAM-1 regulation and its role in allergy. *Clin Exp Allergy* 27, 721-724.
- Paz C (1997). Some consequences of ozone exposure on health. *Arch Med Res* 28, 163-170.
- Peplow PV (1996). Actions of cytokines in relation to arachidonic acid metabolism and eicosanoid production. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 54, 303-317.
- Peters A, Neas L, Tuch T, Heinrich J, Heyder J & Wichmann HE (1996). Contribution of ultra-fine particles to short-term effects of air pollution on asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 153, A16.
- Pieczyk A, Köhnlein T, Meidenbauer N, Kuttler E, Gillissen A, Hahn EG & Siegfried W (1994). Ozonexposition von humanen Bronchialepithelzellen führt bereits im MAK-Bereich von 0,1 ppm zur Steigerung der Zellmembranpermeabilität. *Atemwegs Lungenkrankh* 20, 460-461.
- Pope III CA & Dockery DW (1992). Acute health effects of PM<sub>10</sub> pollution on symptomatic and asymptomatic children. *Am Rev Respir Dis* 145, 1123-1128.
- Pryor WA & Church DF (1991). Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radicals as mediators of ozone toxicity. *Free Radical Biol Med* 11, 41-46.
- Putman E, Boere AJF, van Bree L, van Golde LMG & Haagsman HP (1995). Pulmonary surfactant subtype metabolism is altered after short-term ozone exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 134, 132-138.
- Putman E, Liese W, Voorhout WF, van Bree L, van Golde LMG & Haagsman HP (1997). Short-term ozone exposure affects the surface activity of pulmonary surfactant. *Toxicol Appl Pharmacol* 142, 288-296.
- Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS & Harris CC (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 48, 1904-1909.
- Rietschel ET, Schade U, Jensen M, Wollenweber HW, Lüderitz O & Greisman SG (1982). Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicemia. *Scand J Infect Dis* 31, 8-21.
- Rithidech K, Hotchkiss JA, Griffith WC, Henderson RF & Brooks AL (1990). Chromosome damage in rat pulmonary alveolar macrophages following ozone inhalation. *Mutat Res* 241, 67-73.
- Robock K (1973). Standard quartz DQ12 < 5 µm for experimental pneumoconiosis research projects in the federal republic of Germany. *Ann Occup Hyg* 16, 63-66.
- Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G & Mantovani A (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6, 315-325.
- Rombout PJA, Dormans JAMA, van Bree L & Marra M (1991). Structural and biochemical effects in lungs of Japanese quail following a 1-week exposure to ozone. *Environ Res* 54, 39-51.
- Rossiter H, Alon R & Kupper TS (1997). Selectins, T-cell rolling and inflammation. *Mol Med Today* 3, 214-222.
- Sachsenmaier W, Siebs W & Tan TA (1965). Wirkung von Ozon auf Mäuseascitestumorzellen und auf Hühnerfibroblasten in der Gewebekultur. *Z Krebsforsch* 67, 113-126.
- Saffiotti U (1996). Alveolar type II cells at the crossroad of inflammation, fibrogenesis, and neoplasia. *Am J Pathol* 149, 1423-1426.
- Saffiotti U & Ahmed N (1995). Neoplastic transformation by quartz in the BALB/3T3/A31-1-1 cell line and the effects of associated minerals. *Teratog Carcinog Mutagen* 15, 339-356.
- Samet JM, Noah TL, Devlin RB, Yankaskas JR, McKinnon K, Dailey LA & Friedman M (1992). Effect of ozone on platelet-activating factor production in phorbol-differentiated HL60 cells, a human bronchial epithelial cell line (BEAS S6), and primary human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 514-522.
- Sartor F, Demuth C, Snacken R & Walckiers D (1997). Mortality in the elderly and ambient ozone concentration during the hot summer, 1994, in Belgium. *Environ Res* 72, 109-117.
- Sartor F, Snacken R, Demuth C & Walckiers D (1995). Temperature, ambient ozone levels, and mortality during summer, 1994, in Belgium. *Environ Res* 70, 105-113.
- Sato M, Takizawa H, Kohyama T, Ohtoshi T, Takafuji S, Kawasaki S, Tohma S, Ishii A, Shoji S & Ito K (1997). Eosinophil adhesion to human bronchial epithelial cells: regulation by cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 113, 203-205.
- Schlesinger RB (1995). Interaction of gaseous and particulate pollutants in the respiratory tract: mechanisms and modulators. *Toxicology* 105, 315-325.
- Schlesinger RB, Driscoll KE, Gunnison AF & Zelikoff JT (1990). Pulmonary arachidonic acid metabolism following acute exposures to ozone and nitrogen dioxide. *J Toxicol Environ Health* 31, 275-290.
- Schultheis AH & Bassett DJP (1994). Guinea pig lung inflammatory cell changes following acute ozone exposure. *Lung* 172, 169-181.

- Schwartz J (1994). Air pollution and hospital admissions for the elderly in Birmingham, Alabama. *Am J Epidemiol* 139, 589-598.
- Schwartz J & Dockery DW (1992). Increased mortality in Philadelphia associated with daily air pollution concentrations. *Am Rev Respir Dis* 145, 600-604.
- Schwartz J, Dockery DW & Neas LM (1996). Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air & Waste Manage Assoc* 46, 927-939.
- Schwartz LW, Dungworth DL, Mustafa MG, Tarkington BK & Tyler WS (1976). Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone. Effects of 7-day intermittent or continuous exposure. *Lab Invest* 34, 565-578.
- Seaton A, MacNee W, Donaldson K & Godden D (1995). Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345, 176-178.
- Seemayer NH (1989). Schadstoffbelastungen in der Umwelt. In: Ministerium für Arbeit, Gesundheit, Familie und Sozialordnung des Landes Baden-Württemberg (Hrsg.). Gesundheitspolitik 9 / Allergie und Umwelt, 12-19.
- Seemayer NH & Braumann A (1988). Effects of particle size of coal mine dusts in experimental anthracosilicosis. *In vitro* studies on human macrophages. *Ann Occup Hyg* 32, 1178-1180.
- Seemayer N & Krampitz G (1979). Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von atmosphärischem Feinstaubextrakt auf die DNS-Synthese und den Zellzyklus von Säugetierzellen *in vitro*. II. Veränderungen des Zellzyklus von Hamsternierenzellen und Hamsterembryonalzellen in Gegenwart atmosphärischen Feinstaubextraktes. *Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig B* 168, 403-421.
- Shaw JO, Pinckard RN, Ferrigni KS, McManus LM & Hanahan DJ (1981). Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor). *J Immunol* 127, 1250-1255.
- Simeonova PP, Toriumi W, Kommineni C, Erkan M, Munson AE, Rom WN & Luster MI (1997). Molecular regulation of IL-6 activation by asbestos in lung epithelial cells – role of reactive oxygen species. *J Immunol* 159, 3921-3928.
- Simon RH & Paine III R (1995). Participation of pulmonary alveolar epithelial cells in lung inflammation. *J Lab Clin Med* 126, 108-118.
- Speit G (1987). In situ-Chromosomenpräparation. *GUM* 3/87, 7-9.
- Speit G (1989). Fluoreszenz plus Giemsa (FPG)-Färbung. *GUM* 3/89, 8-11.
- Stadnyk AW (1994). Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J* 8, 1041-1047.
- Stark JM, Godding V, Sedgwick JB & Busse WW (1996). Respiratory syncytial virus infection enhances neutrophil and eosinophil adhesion to cultured respiratory epithelial cells. Roles of CD18 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 156, 4774-4782.
- Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD & Springer TA (1989). A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* 56, 849-853.
- Steenberg PA, Garssen J, van Bree L & van Loveren H (1996). Ozone alters T-helper cell mediated bronchial hyperreactivity and resistance to bacterial infection. *Exp Toxicol Pathol* 48, 497-499.
- Stevens WHM, Conlon PD & O'Byrne PMO (1995). Ozone-induced oxygen radical release from bronchoalveolar lavage cells and airway hyper-responsiveness in dogs (1995). *J Physiol* 486, 257-265.
- Stieb DM, Burnett RT, Beveridge RC & Brook JR (1996). Association between ozone and asthma emergency department visits in Saint John, New Brunswick, Canada. *Environ Health Perspect* 104, 1354-1360.
- Su WY & Gordon T (1996). Alterations in surfactant protein A after acute exposure to ozone. *J Appl Physiol* 80, 1560-1567.
- Takahashi K, Sawasaki Y, Hata JI, Mukai K & Goto T (1990). Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 265-274.
- Takahashi N, Yu XY, Schofield BH, Kleeberger SR, Scott AL, Hasegawa S & Spannake EW (1995). Expression of ICAM-1 in airway epithelium after acute ozone exposure in the mouse. *J Appl Physiol* 79, 1753-1761.
- Takizawa H, Satoh M, Okazaki H, Matsuzaki G, Suzuki N, Ishii A, Suko M, Okudaira H, Morita Y & Ito K (1997). Increased IL-6 and IL-8 in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from patients with sarcoidosis: correlation with the clinical parameters. *Clin Exp Immunol* 107, 175-181.
- Terajima M, Yamaya M, Sekizawa K, Okinaga S, Suzuki T, Yamada N, Nakayama K, Ohri T, Oshima T, Numazaki Y & Sasaki H (1997). Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1 $\beta$ . *Am J Physiol* 17, L749-L759.
- Thompson AB, Robbins RA, Romberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H & Rennard SI (1995). Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 8, 127-149.
- Thurston GD, Ito K, Hayes CG, Bates DV & Lippmann M (1994). Respiratory hospital admissions and summertime haze air pollution in Toronto, Ontario: consideration of the role of acid aerosols. *Environ Res* 65, 271-290.
- Thurston GD, Ito K, Kinney PL & Lippmann M (1992). A multi-year study of air pollution and respiratory hospital admissions in three New York State metropolitan areas: results for 1988 and 1989 summers. *J Exposure Anal Environ Epidemiol* 2, 429-450.

- Tomingas R & Voltmer G (1978). Abscheidung von Benz(a)pyren aus der Atmosphäre auf Glasfaserfiltern. *Staub-Reinhalt Luft* 38, 216.
- Tomingas R, Voltmer G & Bednarik R (1977). Direct fluorometric analysis of aromatic polycyclic hydrocarbons on thin layer chromatograms. *Sci Total Environ* 7, 261-267.
- Tosi MF, Hamedani A, Brosovich J & Alpert SE (1994). ICAM-1-independent, CD18-dependent adhesion between neutrophils and human airway epithelial cells exposed *in vitro* to ozone. *J Immunol* 152, 1935-1942.
- Tosi MF, Stark JM, Smith CW, Hamedani A, Gruenert DC & Infeld MD (1992). Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 214-221.
- Tracey KJ & Cerami A (1989). Cachectin / tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. *Curr Opin Immunol* 1, 454-461.
- Tschaikowsky K & Georgieff M (1990). Zytokine – Immunmodulatoren in Sepsis, Schock und Organversagen. *Anästhesiol Intensivmed* 4, 114-119.
- Tseng RY, Li CK & Spinks JA (1992). Particulate air pollution and hospitalization for asthma. *Ann Allergy* 68, 425-432.
- Ulich TR, Watson LR, Yin S, Guo K, Wang P, Thang H & del Castillo J (1991). The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 138, 1485-1496.
- Ulm K, Kraus B, Ehnes H, Thomas B & Schwebig A (1995). Fall-Kontrollstudie zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Quarzfeinstaub und Lungenkarzinom. *Zbl Arbeitsmed* 45, 50-58.
- Valentine R (1985). An *in vitro* system for exposure of lung cells to gases: effects of ozone on rat macrophages. *J Toxicol Environ Health* 16, 115-126.
- Van Agen B, Maas LM, Zwingmann IH, Van Schooten FJ & Kleinjans JCS (1997). B[a]P-DNA adduct formation and induction of human epithelial lung cell transformation. *Environ Mol Mutagen* 30, 287-292.
- Van Damme J, Cayphas S, Van Snick J, Conings R, Put W, Lenaerts JP, Simpson RJ & Billiau A (1987). Purification and characterization of human fibroblast-derived hybridoma growth factor identical to T-cell-derived B-cell stimulatory factor-2 (interleukin-6). *Eur J Biochem* 168, 543-550.
- Van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M & Lowry SF (1997). Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 176, 439-444.
- Van Loveren H, Rombout PJA, Fischer PH, Lebret E & van Bree L (1995). Modulation of host defenses by exposure to oxidant air pollutants. *Inhalation Toxicol* 7, 405-423.
- Victorin K (1992). Review of the genotoxicity of ozone. *Mutat Res* 277, 221-238.
- Voisin C, Aerts C, Jakubczak E & Tonnel AB (1977). La culture cellulaire en phase gazeuse. Un nouveau modèle expérimental d'étude *in vitro* des activités des macrophages alvéolaires. *Bull Eur Physiopathol Respir* 13, 69-82.
- Warheit DB, Hansen JF, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr SI & Hartsky MA (1997). Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 10-22.
- Watson C, Whittaker S, Smith N, Vora AJ, Dumonde DC & Brown KA (1996). IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 105, 112-119.
- Wegner CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG & Rothlein R (1990). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 247, 456-459.
- Weller BL, Crapo JD, Slot J, Posthuma G, Plopper CG & Pinkerton KE (1997). Site- and cell-specific alteration of lung copper/zinc and manganese superoxide dismutases by chronic ozone exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 552-560.
- Wenzel DG & Morgan DL (1983). *In vitro* inhibition of alveolar macrophage phagocytosis by ozone: absence of a role for serum or mode of ozone administration. *Toxicol Lett* 18, 57-61.
- Werthamer S, Schwarz LH & Soskind L (1970). Bronchial epithelial alterations and pulmonary neoplasia induced by ozone. *Pathol Microbiol* 35, 224-230.
- Whelan J (1996). Selectin synthesis and inflammation. *Trends Biochem Sci* 21, 65-69.
- Wichmann HE, Schlipkötter HW, Fülgraff G (1994). Handbuch der Umweltmedizin. Ecomed Umweltinformation.
- Witschi H, Breider MA & Schuller HM (1993). Failure of ozone and nitrogen dioxide to enhance lung tumor development in hamsters. *Research Report No. 60, Health Effects Institute, Cambridge, Massachusetts.*
- Wolff S, Afzal V & Lindquist PB (1984). Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. *Mutat Res* 129, 207-213.
- Wong GG & Clark SC (1988). Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol Today* 9, 137-139.
- World Health Organization (1993). IPCS environmental health criteria 155. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *World Health Organization, Geneva.*
- Yang HM, Ma JYC, Castranova V & Ma JKH (1997). Effects of diesel exhaust particles on the release of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha from rat alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 23, 269-284.

- Young C & Bhalla DK (1995). Effects of ozone on the epithelial and inflammatory responses in the airways: role of tumor necrosis factor. *J Toxicol Environ Health* 46, 329-342.
- Zhu Z, Tang WL, Ray A, Wu Y, Einarsson O, Landry ML, Gwaltney J & Elias JA (1996). Rhinovirus stimulation of interleukin-6 *in vivo* and *in vitro* – evidence for nuclear faktor  $\kappa$ B-dependent transcriptional activation. *J Clin Invest* 97, 421-430.

---

## Danksagung

Viele Menschen haben mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. So ist es mir unmöglich, an dieser Stelle alle Personen namentlich zu nennen, die mich unterstützt haben. Doch gilt ihnen allen mein herzlichster Dank. Besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei

Herrn Prof. Dr. Arnulf Seidel, der leider vor der Fertigstellung dieser Arbeit verstorben ist, für die interessante Themenstellung,

Herrn PD Dr. Harald F. Krug, der bereitwillig und engagiert die Betreuung dieser Arbeit und damit die Rolle des Doktorvaters übernahm,

Herrn Prof. Dr. Norbert H. Seemayer für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seinen enormen persönlichen Einsatz,

Frau Dr. Verena Höcke, die mir eine wertvolle Diskussionspartnerin war,

Frau Gisela Kampmann, Frau Evelyn Krüger und Frau Christina Langguth für die technische Assistenz,

allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie für die freundliche Aufnahme und stetige Hilfsbereitschaft in allen Belangen,

dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Zusammenarbeit,

Frau Klara Ivanfy aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die mühevollen Auswertung der Schwesterchromatidaustausche,

dem Forschungszentrum Karlsruhe für die Gewährung eines Doktorandenstipendiums für die Dauer von drei Jahren,

Herrn Dipl.-Ing. Eckart Reicherter für die mit Worten nicht aufzuwiegende praktische und persönliche Unterstützung,

meinen Eltern, die mir das Studium und diese Promotion ermöglicht und mich immer ermutigt haben.

---

## Lebenslauf

Name	Marion Mögel
Geburtsdatum	23.04.1970
Geburtsort	Aalen / Württ.
Familienstand	ledig
Eltern	Werner Mögel, Apotheker Erika Mögel, Drogistin
Grundschule	1976-1980 Dreißentalschule, Oberkochen
Gymnasium	1980-1989 Gymnasium Oberkochen
Universität	1989-1994 Pharmaziestudium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Praktikum	Juni – August 1994 Kochertal-Apotheke, Oberkochen  September 1994 – Mai 1995 Löwen-Apotheke, München
Approbation als Apothekerin	Juni 1995
Promotion	ab Oktober 1995 am Institut für Toxikologie des Forschungszentrums Karlsruhe