

KfK 4172
EUR 10846 DE
Februar 1987

Zum biologischen Verhalten von Uran-Plutonium- Mischoxidaerosolen: Inhalationsversuche mit Ratten und in vitro-Studien mit Alveolarmakrophagen

H.-L. Müller, E. Drosselmeyer, G. Hotz, A. Seidel
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

H. Thiele, S. Pickering, I. L. Ray
Europäisches Institut für Transurane Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4172

EUR 10846 DE

ZUM BIOLOGISCHEN VERHALTEN VON URAN-PLUTONIUM-
MISCHOXIDAEROSOLEN: INHALATIONSVERSUCHE MIT RATTEN
UND IN VITRO-STUDIEN MIT ALVEOLARMAKROPHAGEN

H.-L. Müller

E. Drosselmeyer, G. Hotz, A. Seidel

H. Thiele(*), S. Pickering (*), I.L. Ray (*)

(*) Kommission der Europäischen Gemeinschaften
Gemeinsame Forschungsstelle
Forschungsanstalt Karlsruhe
Europäisches Institut für Transurane
Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland

Dieser Bericht ist die erweiterte Fassung einer
Dissertation, genehmigt von der Fakultät für Bio-
und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Studies on the biological behaviour of Uranium-Plutonium mixed oxide aerosols: Inhalation experiments with rats and in vitro studies with alveolar macrophages

Abstract

The retention of spherical and of irregularly shaped (U,Pu) mixed oxides in rat lung was analyzed after inhalation and intratracheal instillation. Their biological behaviour was relatively independent of particle shape and application route with only a few percent of radioactivity being transferred to other organs. In vivo and in vitro uptake and intracellular distribution in rat and bovine alveolar macrophages were analyzed as dependent on various parameters. In addition, detailed electron microscopic studies were performed demonstrating particles within membrane limited vacuoles as well as lying free in the cytoplasm. Under in vitro conditions the uptake process was finished after a few hours. After differential centrifugation of lung or macrophage homogenates the particles sedimented in the first (1000 g) fraction.

Zusammenfassung

Der Einfluß der Partikelform auf das biologische Verhalten von (U,Pu)-Mischoxidpartikeln nach Inhalation oder nach intratrachealer Instillation wurde vergleichend untersucht. Das biologische Verhalten der Teilchen in der Rattenlunge war weitgehend unabhängig von der Teilchenform und der Applikationsart. Die Translokation von Radioaktivität in andere Organe war minimal. Die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung der Partikel in Rattenmakrophagen in vivo sowie in Rinderalveolarmakrophagen in vitro wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern untersucht und elektronenmikroskopisch charakterisiert; die Partikel wurden teils frei im Cytoplasma, teils in Phago(-lyso-)somen nachgewiesen. Unter in vitro-Bedingungen war die Partikelaufnahme durch Rinderalveolarmakrophagen innerhalb weniger Stunden abgeschlossen. Nach differentieller Zentrifugation von Lungen- und Makrophagenhomogenaten sedimentierten die Partikel überwiegend in der ersten (1000 g) Fraktion.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1. Herstellung der Aerosole	9
2.1.1. (U,Pu)O ₂	9
2.1.1.1. Irreguläre Partikelform: AMAD: 1µm	9
2.1.1.2. Irreguläre Partikelform: AMAD: 0.7µm und 1.5µm	9
2.1.1.3. Sphärische Partikel; AMAD: 0.9µm	9
2.1.2. Co ₃ O ₄	11
2.1.3. Al ₂ O ₃ -In ₂ O ₃	11
2.2. Versuche mit Ratten	12
2.2.1. Versuchstiere	12
2.2.2. Intratracheale Instillation	12
2.2.3. Intravenöse und intramuskuläre Injektion	13
2.2.4. Inhalationsversuche	13
2.2.5. Bestimmung der Lungen- und Organretention	16
2.3. Bronchoalveoläre Lavage von Rattenlungen	17
2.4. Zellkulturen mit Rinderalveolarmakrophagen	17
2.4.1. Bronchoalveoläre Lavage von Rinderlungen	17
2.4.2. Kulturmedien	18
2.4.3. Kulturbedingungen	20
2.5. Bestimmung der Radioaktivität	22
2.5.1. Ganzkörpermessung	22
2.5.2. Messung der Gamma-Radioaktivität in den Organen	23
2.5.3. Messung der Alpha-Radioaktivität	24
2.6. Subzelluläre Fraktionierung von Rattenlunge und Rinderalveolarmakrophagen durch differentielle Zentrifugation	24
2.7. Dichtegradientenzentrifugation	26
2.7.1. Saccharose-Dichtegradienten	26
2.7.2. Metrizamid- und Nycodenz-Dichtegradienten	27
2.7.3. Percoll-Dichtegradienten	27
2.7.4. Ficoll-Dichtegradienten	28

	Seite
2.8. Enzymbestimmungen	28
2.9. Autoradiografie	32
2.10. Elektronenmikroskopie und energiedispersive Mikroanalyse	33
2.11. Auswertungsverfahren und Präsentation der Daten	34
 3. ERGEBNISSE	 37
3.1. Retention von $(U,Pu)O_2$ nach Instillation und nach Inhalation	37
3.1.1. Retention sphärischer Partikel	37
3.1.2. Retention irregulärer Partikel	39
3.1.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen im Anschluß an die intratracheale Instillation	41
3.1.4. Retention von Co_3O_4 - und Al_2O_3 - In_2O_3 -Partikeln nach Inhalation	43
3.1.5. Relative Radioaktivitätsverteilung in den ein- zelnen Lungenlappen der Ratte nach Inhalation	44
3.1.6. Intravenöse und intramuskuläre Injektion von $(U,Pu)O_2$ -Partikeln	46
3.2. Bronchoalveoläre Lavage von Rattenlungen	47
3.3. In vitro-Versuche mit Rinderalveolarmakrophagen	47
3.4. Ergebnisse nach differentieller Zentrifugation	53
3.4.1. Rattenlunge	53
3.4.2. Rinderalveolarmakrophagen	54
3.5. Dichtegradientenzentrifugation von intakten Makro- phagen, der N- und der ML-Fraktion	55
3.5.1. Verhalten von intakten Makrophagen	55
3.5.2. Untersuchungen zur Radioaktivitätsverteilung nach Dichtegradientenzentrifugation der N-Fraktion	57
3.5.3. Untersuchungen zur Radioaktivitäts- und Leitenzym- verteilung aus der Mirochondrien-Lysosomen- Fraktion (ML)	59

	Seite
4. DISKUSSION	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	88
6. LITERATURVERZEICHNIS	90
7. TABELLEN UND ABBILDUNGEN	107

Liste der Abkürzungen

Subzelluläre Fraktionen

BG	Bindegewebe der Lunge
N	Kernfraktion: mit Zellkernen, Zellbruchstücken und ganzen Zellen
E	Überstand der N-Fraktion
ML	Mitochondrien-Lysosomen-Fraktion
X	Überstand der ML-Fraktion
P	Mikrosomale Fraktion: mit Peroxisomen, Endoplasmatischem Reticulum und Plasmamembran-Bruchstücken
S	Überstand der P-Fraktion

Enzyme

AP	Alkalische Phosphodiesterase
AS	Arylsulfatase A, B
GDH	Glutamatdehydrogenase
LDH	Laktatdehydrogenase
NAG	N-Acetyl- β -Glucosaminidase
5'-N	5'-Nucleotidase
SP	Saure Phosphatase

Sonstige

AMAD	Medianer aerodynamischer Durchmesser ("Activity Median Aerodynamic Diameter")
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	"balanced salt solution" (siehe Material und Methoden)
GMD	Mittlerer geometrischer Durchmesser
HM	Homogenisationsmedium
IAD	Initiale alveoläre Dosis
NCS	"newborn calf serum"
SEM	Scanning Electron Microscopy
STEM	Scanning Transmissions Electron Microscopy

1. EINLEITUNG

Bei der Fertigung von Uran-Plutonium-Mischoxid $[(U,Pu)O_2]$ - Brennstoffen zur Verwendung in Schnellen Brutreaktoren besteht das Risiko einer unfallbedingten Freisetzung entsprechender Stäube in die Umgebungsluft am Arbeitsplatz. Die Inkorporation solcher Stäube erfolgt fast ausschließlich durch Inhalation. Die Inhalation dieser Stäube kann, wie dies vor allem mit PuO_2 in Tierversuchen gezeigt wurde (Muggenburg et al., 1982; Sanders, 1977), auch mit $(U,Pu)O_2$ (Mewhinney et al., 1983; Mewhinney et al., 1984) Lungenfibrosen und zu späten Zeiten Lungentumoren selbst bei niedrigen inhalierten Dosen hervorrufen. Die potentielle Gefährdung der Lunge oder der anderen Körperorgane wird wesentlich vom Löslichkeitsverhalten des inhalierten Materials beeinflusst. Während überwiegend unlösliches Material langsam aus der Lunge ausgeschieden wird und damit wegen der langen Verweilzeiten das Risiko für dieses Organ erhöhet ist, können Verbindungen mittlerer Löslichkeit, zum Beispiel $Pu(NO_3)_4$, von der Lunge ins Blut übertreten und sekundär für lange Zeiten in der Leber und besonders im Skelett abgelagert werden und sind so in der Lage, dort Schäden zu verursachen. Neben der Inhalation können Transuranverbindungen auch in geringer Menge durch offene Wunden inkorporiert werden. Diese Aufnahme in den Körper last sich experimentell durch intramuskuläre und intravenöse Injektionen simulieren.

Das Verhalten industrieller und im Labor erzeugter reiner PuO_2 -Stäube wurde in der Vergangenheit sehr ausgiebig untersucht (Lundgren et al., 1983; Mewhinney et al., 1976; Morgan et al., 1983; Priest und Haines, 1982; Smith et al., 1977; Stather et al., 1979). Gute Übersichten über das biologische Verhalten von

PuO₂ und anderen Pu-Verbindungen geben Bair et al. (1973) und Nenot und Stather (1979). Studien zum biologischen Verhalten von industriell erzeugten Mischoxiden wurden jedoch bisher nur von zwei Arbeitsgruppen durchgeführt: am "Inhalation Toxicology Research Institute" in Albuquerque, USA (Mewhinney et al., 1981b; Mewhinney et al., 1983; Stanley et al., 1982) und vom "National Radiological Protection Board" in Harwell, England (James et al., 1978; Stather et al., 1978). Stather et al. (1979) fanden eine schnelle Translokation von maximal 1% Pu ins Blut innerhalb der ersten Tage, die sie auf die Anwesenheit von Partikeln < 1 nm entsprechend Cooper et al. (1978) und Cooper et al. (1979) zurückführen. Zu späteren Zeiten wurde eine zweite, langsamere Translokationsphase beobachtet, die hauptsächlich auf Fragmentation und Auflösung von Partikeln in den alveolären Regionen der Lunge beruhte. Insgesamt wurde sehr wenig Pu und Am translokiert. Während von Stather et al. (1979) kein nennenswerter Unterschied in der Retention und Translokation von Pu und Am beobachtet wurden, berichten Mewhinney et al. (1981b) von einer geringfügig höheren Löslichkeit für Am in der Lunge.

Vor einer Verallgemeinerung der erwähnten Befunde schien es uns geboten, auch Untersuchungen mit Mischoxiden aus mitteleuropäischen Anlagen durchzuführen und diese auf das Verhalten unterschiedlicher Partikelformen und Applikationsarten zu erweitern. Neben irregulären Partikeln, die den industriell erzeugten Mischoxiden entsprechen, wurden künstlich hergestellte sphärische Partikel, die in vielerlei Hinsicht leichter handhabbar waren, in den Versuchen verwendet. Die Technik der intratrachealen Instillation führt im Vergleich zur Inhalation zu einer ungleichmäßigeren Verteilung der Partikel in der Lunge

(Brain et al., 1976; Pritchard et al., 1985), wobei die Deposition durch Umgehung des "nasopharyngealen Filters" (siehe ICRP-Lungenmodell; TGLD, 1966) wesentlich erhöht, die Lungenclearance in den ersten 48 Stunden wegen der weitaus geringeren Partikeldeposition in den mucociliären Lungenbereichen wesentlich geringer ist (Brain und Valberg, 1979; Watson et al., 1969). In bezug auf die alveolären Vorgänge wird ein prinzipiell gleiches Verhalten der Partikel nach Instillation und nach Inhalation postuliert, weshalb die experimentell aufwendige Inhalation durch die sehr viel weniger Aufwand erfordernde Instillation ersetzt werden kann. Die Gültigkeit dieser Annahme wurde auch in der vorliegenden Arbeit für (U,Pu)-Mischoxide untersucht.

Diese Studien stellen einen notwendigen und praktisch wichtigen Aspekt unserer Arbeit dar, deren Schwerpunkt aber im Gegensatz zu den meisten bisherigen Untersuchungen mit inhalierten Actiniden auf der Analyse der zellulären Aspekte des Verhaltens der (U,Pu)O₂-Partikel in der Lunge liegen sollte. Grundsätzlich konnten wir davon ausgehen, daß diese Partikel ebenso wie viele andere von Alveolarmakrophagen aufgenommen werden. Die Aufnahmekinetik von (U,Pu)O₂-Partikeln durch Alveolarmakrophagen in der Lunge kann beispielsweise nach bronchoalveolärer Lavage im Anschluß an die intratracheale Instillation durch Autoradiografie von Zellausstrichen bestimmt (Sanders, 1969) und mit der Partikelaufnahme durch Alveolarmakrophagen in vitro verglichen werden. Mit der Technik der bronchoalveolären Lavage lassen sich Alveolarmakrophagen in über 90%iger Reinheit ohne weitere Anreicherungsschritte erhalten.

Nach der Inhalation von $^{239}\text{PuO}_2$ -Partikeln wurden diese elektronenmikroskopisch oder autoradiografisch in Alveolarmakrophagen (Bair et al., 1973; Sanders und Adee, 1968; Sanders und Adee, 1970; Sanders et al., 1977) und nach intraperitonealer Injektion in Peritonealmakrophagen (Adee et al., 1968; Sanders, 1970) nachgewiesen. In Peritonealmakrophagen waren die Partikel zu frühen Zeiten entweder in membranbegrenzten Vesikeln (Sanders, 1970) oder in Vesikeln ohne erkennbare Membran (Adee und Laidler, 1973), in Alveolarmakrophagen anfangs ebenfalls in membranbegrenzten Vesikeln (Phagosomen), nach 7 Tagen in elektronendichten Vesikeln (Sanders und Adee, 1970). Daneben wurden PuO_2 -Partikel ebenso wie Latex-Partikel (0,1 und 1 μm ; Adamson und Bowden, 1981) zu frühen Zeiten in der Lunge auch in Typ-I-Alveolarzellen beobachtet. Mindestens 80 bis 90% des PuO_2 werden von Alveolarmakrophagen aufgenommen (Rhoads et al., 1982).

Neben elektronenmikroskopischen Methoden bot es sich an, das intrazelluläre Verhalten der $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ -Partikel mittels biochemischer Verfahren zu analysieren. Voraussetzung hierzu ist zunächst die Isolation und Identifizierung der einzelnen Zellorganellen, wofür es für die Leber inzwischen bewährte Methoden gibt. In diesem Organ wurde die lysosomale Bindung von ^{241}Am und ^{239}Pu mittels Dichtegradientenzentrifugation, Trägerfreier Elektrophorese und elektronenmikroskopischer Autoradiografie nachgewiesen (Boocock et al., 1970; Gruner, 1978; Sütterlin, 1982; Wiener, 1984; Seidel et al., 1985; Seidel et al., 1986). Jung et al. (1985) zeigten die lysosomale Bindung von ^{239}Pu auch mit isolierten Hepatocyten.

Grundsätzlich lassen sich die für Lebergewebe benutzten Zellaufschluß- und Trennmethode auch für die Lunge anwenden (Glück, 1982; Taya, 1986), jedoch ist es unmöglich, die erhaltenen Organellen einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen. Diese Schwierigkeit hofften wir durch Verwendung von Alveolarmakrophagen, die in guter Ausbeute durch bronchoalveoläre Lavage von zahlreichen Tierarten und aus menschlicher Lunge erhalten werden, umgehen zu können. Aus einer einzelnen Rattenlunge wird allerdings durch Lavage keine ausreichende Zellmasse erhalten, so daß die Lavage der Lungen größerer Tiere notwendig wird. Als brauchbar hierfür hat sich, wie bereits Desai und Richards (1983) an Schafen zeigten, Schlachtvieh erwiesen, sofern mit der Lungenlavage innerhalb von zwei Stunden nach dem Tod der Tiere begonnen werden kann. Schweine sind nach unseren Erfahrungen wegen der bei der Schlachtung üblichen Brühung der Tiere, wobei bis zu 70°C heißes Brühwasser in die Lunge eindringen kann, im Gegensatz zu Rindern wenig geeignet. Wir haben uns daher entschlossen, ein System mit postmortal gewonnenen Rinderalveolarmakrophagen auszuarbeiten.

Isolierte Alveolarmakrophagen können längere Zeit in Kultur genommen und mit (U,Pu)O₂ inkubiert werden. In der Lunge allgegenwärtige biologisch aktive Substanzen wie Serum- und Surfactantkomponenten, die den Phagozytoseprozeß beeinflussen können, lassen sich in bezug auf ihre Wirkungsweise in diesen Kulturen einzeln und unabhängig voneinander untersuchen. Auch die mögliche Freisetzung von Enzymen während der Phagozytose (z.B. Davies, 1980) ist in den Zellkulturüberständen wesentlich einfacher nachzuweisen als in der Lunge.

Grundsätzlich sind zwei Methoden der Kultivierung von Alveolarmakrophagen möglich. Nach der Auswaschung aus der Lunge können sie entweder nach der Adsorption an geeignete Kulturgefäßoberflächen als Monolayer-Kulturen oder durch Suspension in einem geeigneten Kulturmedium als Suspensionskulturen angelegt werden. Die Monolayer-Kultur ist die gebräuchlichere. Sie hat die Vorteile, daß adsorbierte Zellen höhere und zeitlich weitaus längere Überlebensraten besitzen (Hunninghake et al., 1980), und daß die Zellen nach der Festsetzung eine Differenzierung in funktionell unterschiedliche obere und untere Zelloberflächen infolge Polarisierung zeigen (Silverstein et al., 1977); diese Differenzierung ist auch für Alveolarmakrophagen in vivo wahrscheinlich. Die Phagocytoserate kann im Vergleich zur Suspensionskultur vierfach höher sein (Hunninghake et al., 1980). Die Suspensionskultur bietet die Vorteile, daß große Zellzahlen auf kleinem Raum inkubiert werden können und durch die ständige Bewegung der Kulturen eine homogene Verteilung partikulären Materials erzielbar ist. Das Schütteln hat aber wahrscheinlich in Analogie zu Beobachtungen an Monolayer-Kulturen (Hart und Pittman, 1980) eine verringerte Phagocytoseaktivität zur Folge und kann sich ungünstig auf die Überlebensrate der Zellen auswirken.

Zur Homogenisation und differentiellen Zentrifugation von Rattenlunge und Rinderalveolarmakrophagen wurden die für die Leber (Sütterlin, 1982) modifizierte Methoden von de Duve et al. (1955) verwendet, wobei ein Kompromiß zwischen der Freisetzung von Organellen und deren Zerstörung während der Homogenisation zu schließen war (siehe Diskussion).

Die Verwendung der Trägerfreien Elektrophorese zur Auftrennung von Organellen war wegen der hohen nahezu irreversiblen Adsorption freier (U,Pu) O_2 -Partikel an Glas nicht ratsam, wogegen die in unserem Institut für Organelltrennungen nach Deposition löslicher Pu-Verbindungen erfolgreich eingesetzte Dichtegradientenzentrifugation ohne allzugroße Radioaktivitätsverluste auch mit (U,Pu) O_2 erfolgreich war.

In Saccharose können die Lysosomen von den Mitochondrien nur nach Änderung ihrer Dichte, beispielsweise durch Einlagerung von Triton WR 1339 (Gruner et al., 1981), abgetrennt werden. Mit Metrizamid oder Nycodenz als Dichtemedium (Wattiaux et al., 1978; Rickwood, 1983) kann eine solche Trennung nativer Lysosomen von anderen Organellen mit Erfolg durchgeführt werden. Percoll und Ficoll eignen sich andererseits besonders zum Auftrennen intakter Zellen (Rickwood, 1984).

Biochemische Untersuchungen zur Ablagerung und zum Transport von Transuranen in der Lunge gibt es im Gegensatz zur Leber nur sehr wenige und auch nur für ultrafeine (Cooper et al., 1980; Stradling et al., 1978) oder kolloidale Partikel (Glück, 1982; Taya, 1986). Für uns bestand daher zunächst die Notwendigkeit, die grundsätzliche Eignung etablierter Methoden für Arbeiten mit (U,Pu) O_2 überhaupt nachzuprüfen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit können somit folgendermaßen formuliert werden:

1. Untersuchung des biologischen Verhaltens von lungengängigen (U,Pu) O_2 -Stäuben in der Ratte in Abhängigkeit von der Partikelform, Partikelgröße und von der Dosis. Vergleich von

Inhalation und intratrachealer Instillation. Vergleich der Retention von $(U,Pu)O_2$ mit anderen Partikeln wie Co_3O_4 und $Al_2O_3-In_2O_3$.

2. Untersuchung der Aufnahme von $(U,Pu)O_2$ -Partikeln durch Alveolarmakrophagen in vivo sowie der Möglichkeiten einer therapeutischen Entfernung des inhalierten Materials aus der Lunge durch bronchoalveoläre Lavage.

3. Untersuchung der $(U,Pu)O_2$ -Partikelaufnahme durch Alveolarmakrophagen in vitro: Quantitative Erfassung der Einflüsse des Inkubationsmediums sowie von Lungensurfaktant, Serum oder Serumalbumin auf die Phagocytoserate. Begleitende rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Partikelaufnahme in die Zelle.

4. Analytische subzelluläre Fraktionierung von nativen Rattenlungen und Rinderalveolarmakrophagen mit dem Ziel der Auftrennung einzelner Zellorganellen.

5. Untersuchungen zur intrazellulären Ablagerung von $(U,Pu)O_2$ -Partikeln in der Rattenlunge und in Rinderalveolarmakrophagen mittels Zentrifugation und Elektronenmikroskopie gekoppelt mit energiedispersiver Röntgenmikroanalyse.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Herstellung der Aerosole (Abkürzungen siehe Liste)

2.1.1. (U,Pu)O₂

2.1.1.1. Irreguläre Partikelform; AMAD: 1 µm

Eine (U,Pu)(NO₃)₄-Lösung, die aus der Wiederaufarbeitung von Kernbrennstoffen stammte, wurde mit NH₃ gesättigt. Die entstehenden Hydroxide wurden bei 900⁰C oder bei 650⁰C geglüht. Das entstehende Pulver wurde gepreßt und die Pellets erneut bei 1650⁰C geglüht. Die Pellets wurden vor Versuchsbeginn in einem Schüttelgenerator durch Vibration mit 50 Hz in einem siebartig durchbohrten Metallzylinder mit 5 cm Länge und mit 3 cm Durchmesser zerkleinert. Darauf folgte eine Auftrennung nach Partikelgrößen. Entweder wurden die Partikel in destilliertem Wasser suspendiert und die Suspension drei Tage lang ruhig stehen gelassen, wonach der daraus resultierende Überstand, der weniger als 1 % des suspendierten Materials enthielt, weiterverwendet wurde, oder die Größenfraktionierung erfolgte in einem Inertial-Spektrometer (V. Prodi, Lavoro i Ambiente, Bologna).

2.1.1.2. Irreguläre Partikelform; AMAD: 0.7µm und 1.5µm

Die Herstellung entsprach 2.1.1.1.; zur Auftrennung nach Partikelgrößen wurde ein Kaskaden-Impaktor ("Anderson Stack Impactor") eingesetzt.

2.1.1.3. Sphärische Partikel; AMAD: 0.9µm

Eine (U,Pu)(NO₃)₄-Lösung in Salpetersäure wurde in einem De Vilbiss-Nebulisator (hergestellt bei LHG/Hagsfeld) vernebelt und mit NH₃ gesättigt. Die entstandenen Hydroxide wurden bei

300°C getrocknet und bei 1150°C gegläht. Die so gewonnenen Oxidpartikel wurden im Kaskaden-Impaktor größenfraktioniert.

Die Herstellung sämtlicher (U,Pu)-Mischoxide erfolgte im Europäischen Institut für Transurane durch S. Pickering und S. Fourcaudot.

Die irregulären Mischoxide adsorbierten zu einem nicht unerheblichen Prozentsatz an vielen Oberflächen, besonders stark an Glas. Dies hatte teilweise sehr niedrige Radioaktivitätsausbeuten zur Folge. Zur Entnahme von Aliquots wurde die Stammsuspension gut geschüttelt und nach zehnmaligem Aufziehen der Suspension in die Spritze das gewünschte Volumen entnommen. Die Verwendung von 0,9%iger NaCl-Lösung anstatt destilliertem Wasser zur Suspendierung der Mischoxide führte zu starken Unterschieden im Radioaktivitätsgehalt einzelner Aliquots.

Das Adsorptionsverhalten sphärischer Mischoxide war deutlich geringer. Daraus resultierte eine gleichmäßigere Radioaktivitätsverteilung bei Entnahme mehrerer Aliquots aus der gleichen Stammsuspension; Abweichungen lagen in der Regel unterhalb 20%.

Das (U,Pu)O₂ setzte sich zusammen aus ungefähr 80% UO₂ und 20% PuO₂. Über 99% des im Mischoxid enthaltenen Urans war U-238. Das im Mischoxid enthaltene Plutonium setzte sich folgendermaßen zusammen (Werte in Gewichtsprozenten, gerundet): 0.07% Pu-238, 88.6% Pu-239, 10.3% Pu-240, 0.8% Pu-241 und 0.2% Pu-242. Während der Anteil der Uranisotope an der Gesamt-Alpha-Radioaktivität vernachlässigbar gering war, entfielen etwa 9% der Gesamt-Alpha-Radioaktivität auf Pu-238, etwa 62% auf Pu-239 und etwa 26% auf Pu-240. Am-241 hatte einen Anteil von etwa 3.5% an der Gesamt-Alpha-Radioaktivität.

2.1.2. Co_3O_4

Monodisperses Co-57 markiertes Co_3O_4 wurde bei der GSF in München hergestellt (Kreyling und Ferron, 1984). Kobaltnitrat-Tropfen wurden mittels eines "spinning top"-Aerosolgenerators vernebelt, die Tropfen bei 800°C geglüht und auf einem Filter gesammelt. Zwei Partikelgrößen wurden für Inhalationsversuche verwendet: eine Präparation mit $1.7\ \mu\text{m}$ und eine zweite mit $0.8\ \mu\text{m}$ geometrischem Durchmesser entsprechend 2.7 und $1.4\ \mu\text{m}$ aerodynamischem Durchmesser. Co-57 hat eine Halbwertszeit von 272 Tagen und eine gut meßbare Gamma-Linie bei 122 keV. Unmittelbar vor den Inhalationsversuchen wurden die Filter in jeweils 10 ml destilliertem Wasser mit 0,003% TWEEN 80 für fünf Minuten ultrabeschallt, um die Kobaltoxidpartikel zu suspendieren. Die Vernebelung erfolgte im De Vilbiss-Nebulisator.

2.1.3. $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-In}_2\text{O}_3$

Zur Dotierung mit Indium wurden Al_2O_3 -Pellets in eine $\text{In}_2(\text{NO}_3)_3$ -Lösung gelegt und anschließend getrocknet. Die Kalzinierung erfolgte eine Stunde bei 100°C und zwei Stunden bei $500\text{-}600^\circ\text{C}$. Die Pellets wurden vor Versuchsbeginn im Schüttelgenerator zerkleinert. Der so entstandene Staub zeigte eine polydisperse log-Normalverteilung der Aerosole mit $4\ \mu\text{m}$ AMAD und einer unregelmäßigen Oberfläche.

Durch Neutronenaktivierung des Oxides mit thermischen Neutronen im Forschungsreaktor TRIGA-HD II im Institut für Nuklearmedizin am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg entstand In-114m , das eine Halbwertszeit von 49,5 Tagen und eine gut meßbare Gamma-Linie von 192 keV hat. Durch Messung dieser Gammalinie konnte der $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-In}_2\text{O}_3$ -Gehalt der Proben berechnet werden.

Für die intratracheale Instillation wurde das Oxid vorher neutronenaktiviert, während die Inhalationsversuche mit inaktivem Oxid durchgeführt wurden. Nach der Inhalation wurden die getrockneten Rattenlungen und andere ausgewählte Organe neutronenaktiviert und daraus der Oxidgehalt in den Organen ermittelt.

Die Herstellung der Aluminiumoxide erfolgte durch die Ventron GmbH, die Dotierung mit Indium im Europäischen Institut für Transurane durch E. Drosselmeyer.

2.2. Versuche mit Ratten

2.2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Albino-Ratten vom Stamm Sprague-Dawley. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn etwa acht Wochen alt und wogen zwischen 180 und 240 Gramm. Als Nahrung diente eine ALTROMIN[®]-Standarddiät und Leitungswasser. Die Tiere hatten zu allen Zeiten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.2.2. Intratracheale Instillation

0,4 ml Suspension wurden entsprechend 2.1.1.3. aus einem Szintillationsgefäß mit einer 1 ml-Luerspritze entnommen. Der Stempel der Spritze wurde sodann auf 0,6 ml zurückgezogen, damit sich zwischen ihm und der Suspension ein Luftpolster ausbilden konnte. Nach leichter Äther-Narkose wurde je eine Ratte mit den oberen Schneidezähnen an einem Gummiband am oberen Ende eines um etwa 30° gegen die Horizontale gekippten Operationstisches in Dorsallage aufgehängt. Die Zunge wurde mit einer stumpfen Pinzette aus dem Rachenraum herausgezogen und eine um etwa 30°

abgebogene Stahlkanüle (0,8 x 120 mm), die an der Spitze abgeschliffen und mit einem Tropfen Zweikomponenten-Lack überzogen war, in die Trachea eingeführt. 0,4 ml Suspension wurden dem Tier in der Inspirationsphase durch schnelles Entleeren der Spritze in die Lunge instilliert. Anschließend wurde das Tier eine Minute lang senkrecht mit dem Kopf nach oben gehalten, um zu verhindern, daß ein Teil der Flüssigkeit vor deren Resorption in der Lunge in den Rachenraum zurücklief.

2.2.3. Intravenöse und intramuskuläre Injektion

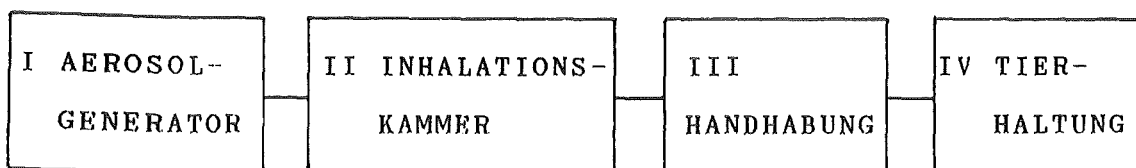
Intravenöse Injektionen erfolgten in die Schwanzvene. Diese wurde nach einem Längsschnitt in die Schwanzhaut freipräpariert. Mit einer 1ml-Spritze wurden 0,25 ml (U,Pu)O₂-Suspension injiziert und der Hautschnitt anschließend mit Histoacryl-Gewebekleber (B. Braun Melsungen AG, Spangenberg) verschlossen.

Die intramuskulären Injektionen erfolgten in den rechten Oberschenkelmuskel. 0,1 ml (U,Pu)O₂-Suspension wurde nach vorheriger Desinfektion der Injektionsstelle mit Ethanol etwa 0,5 cm tief in den Muskel injiziert.

2.2.4. Inhalationsversuche

Die Aufstellung der Inhalationsanlage erfolgte in einer Handschuhkasten-Kette im Europäischen Institut für Transurane.

Schema der Handschuhkasten-Kette:



In den Handschuhkästen (1170 x 870 x 770 mm) wurde ein von IV nach I ansteigender Unterdruck gegenüber der Caisson-Atmosphäre eingestellt.

Die einzelnen Handschuhkästen waren durch beidseitig mit einem abnehmbaren Deckel verschlossene Tunnelschleusen miteinander verbunden. Mit der Wechselsacktechnik konnte Material in die Kästen I, III und IV ein- und ausgeschleust werden.

Handschuhkasten I diente der Handhabung der Aerosole und enthielt den Aerosolgenerator, einen de Vilbiss-Nebulisator. Dieser war über einen Schlauch mit dem oberen Anschlußstutzen der Expositionskammer verbunden. Vor Versuchsbeginn wurde er mit 10 ml Aerosolsuspension gefüllt und im Falle der Al_2O_3 - In_2O_3 -Versuche 3,5 Liter Luft pro Minute, im Falle der Kobalt- und $(U,Pu)O_2$ -Versuche ein Liter Luft pro Minute hindurchgeleitet.

Handschuhkasten II enthielt die bei der Fraunhofer-Gesellschaft in Schmallingenberg angefertigte Inhalationskammer. Diese war ein quaderförmiger Kasten mit der Länge 500 mm, der Höhe 650 mm und der Tiefe 150 mm. An oberen und unteren Ende verlief über die gesamte Kammerlänge je ein Rohr aus Metall. Die Rohre waren mit in regelmäßigen Abständen angebrachten Bohrungen versehen, durch die die von außen oben eintretende Luft mit den Aerosolen in die Kammer übertrat, diese vertikal durchströmte und durch die Bohrungen des unteren Rohres die Kammer wieder verließ. Eine der Seitenflächen der Kammer war mit dreißig kreisrunden Öffnungen mit 55 mm Durchmesser versehen, die mit O-Ringen aus Gummi ausgestattet waren und in die die Inhalationsröhren aus

Plexiglas eingesetzt werden konnten. Bei Betrieb der Anlage herrschte an jeder Expositionsöffnung innerhalb weniger Minuten nach dem Einschalten der Pumpen eine homogene Aerosolkonzentration und -größenverteilung (gemessen mit Al_2O_3 , AMAD: 4 μm . Drosselmeyer et al., 1986).

Das Schema I zeigt den Aufbau der Inhalationsanlage: über eine elektrisch betriebene Kompressorpumpe (I) wurden bei den Aluminium-Versuchen 8,5 Liter, bei den Kobalt- und (U,Pu) O_2 -Versuchen 10 Liter Luft pro Minute aus der Kammer gepumpt; diese wurde über zwei Nuclepore-Filter (Durchmesser 5 cm, Porengröße 0,2 μm) vorgefiltert, bevor sie über ein Absolutfilter aus dem Handschukasten zur Pumpe geleitet wurde. Die Nuclepore-Filter wurden nach jedem Versuch erneuert. Die Förderleistung der Pumpe wurde mittels eines Durchflußmanometers überwacht und reguliert. Die Aerosole wurden im Nebulisator aus wässriger Suspension vernebelt und in die Kammer geblasen. Über eine mit einer Schlauchklemme versehene Zuleitung, die an eine der Expositionsöffnungen angeschlossen war, wurde ein Kammerunterdruck von etwa 20 mm Wassersäule eingestellt. Der Kammerunterdruck wurde mittels eines parallel zur Belüftung angeschlossenen U-Rohr-Flüssigkeitsmanometers gemessen.

Durch eine der Inhalationsröhren wurde ein Stahlrohr bis zur vorderen Öffnung geführt und durch dieses während der Versuchsdauer ein konstantes Luftvolumen von 0,1 Liter pro Minute gesaugt; durch ein Zellulosenitratfilter (Porenweite: 0,2 μm) wurden die abgesaugten Aerosole ausgefiltert. Der ausgefilterte Staub wurde gemessen und aus diesem Wert die Aerosolkonzentration berechnet.

Die Inhalationsröhren (225 x 55 mm) aus Plexiglas liefen vorn konisch zu und waren an der Spitze mit einer Öffnung versehen, durch die die Tiere gerade ihre Nase stecken konnten. Jede Röhre war mit einem verschiebbaren, durch einen O-Ring abgedichteten Stempel versehen; dieser konnte mit einer Klemmschraube in jeder Position arretiert werden. Dadurch wurden die Tiere während des Versuches im vorderen Teil der Röhre gehalten.

Im Handschuhkasten IV befanden sich vier Makrolon-Tierkäfige. Zwölf Tiere pro Versuch wurden im Anschluß an die Inhalation in Vierergruppen auf drei Käfige verteilt. Fellkontaminationsmessungen wurden mit einer Alphasonde und mit einem modifizierten Wischtest vorgenommen. Drei Tage nach Versuchsende lag die Radioaktivität in den Wischtests und die Raumluftmessung unter der Freigrenze, und die Tiere konnten aus dem Handschuhkasten entnommen werden.

2.2.5. Bestimmung der Lungen- und Organretention

Je 2 Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten nach Inhalation, je 1 bis 11 Tiere zu verschiedenen Zeiten nach Instillation, äthernarkotisiert, ausgeblutet und die Lunge mit Trachea, Leber, Milz, rechte Niere und linker Femur entnommen. Die Lungen der Inhalationstiere wurden aufgeteilt in Trachea, linke Lunge und in die vier morphologisch voneinander getrennten Lungenlappen der rechten Lunge (Raabe et al., 1977). Die Lungen der intratracheal instillierten Tiere wurden im Spektrometer Beckman Gamma 8000 gemessen (NaJ-Tl-Bohrloch-Kristall) und danach für die Messung der Alpha-Aktivität in 4 etwa gleichgroße Teile zerlegt und die Teile einzeln gemessen. Leber, Milz, Niere und Femur wurden

ebenfalls komplett im Beckman Gamma 8000 gemessen; Milz, Niere und Femur wurden danach in 2 etwa gleichgroße Teile zerlegt. Aus der Leber wurden 3 etwa 0,4 g schwere Stücke entnommen und die Alpha-Aktivität des Leberteilgewichts auf das Gesamtlebergewicht hochgerechnet. Die Meßwerte für die Niere wurden mit 2 multipliziert.

2.3. Bronchoalveoläre Lavage von Rattenlungen

Eine an der Spitze mit Zweikomponenten-Lack beschichtete gerade Stahlkanüle (0,8 x 120 mm) wurde mit einer 20 ml-Spritze fest verschraubt und pro Lavage 5 ml eiskalte 0,9% NaCl-Lösung langsam zehnmal nacheinander in die Lunge eines vorher ausgebluteten Tieres eingefüllt und in die Spritze zurückgezogen. Diese Prozedur wurde pro Tier drei- oder viermal ausgeführt. Die ausgewaschenen Zellen wurden bei 250 g 5 Minuten abzentrifugiert und anschließend gemessen. Rattenlungen wurden zu verschiedenen Zeiten nach (U,Pu)O₂-Instillation gewaschen.

2.4. Zellkulturen mit Rinderalveolarmakrophagen

2.4.1. Bronchoalveoläre Lavage von Rinderlungen

Rinderlungen von gesunden Tieren unterschiedlichen Alters und Geschlechts wurden vom Städtischen Schlachthof Karlsruhe bezogen und innerhalb von 2 Stunden nach dem Tod des Tieres mit 10 bis 15 Litern 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden in einer Beckman J2-21-B-Zentrifuge im Rotor JA10 bei 200 g für 10 Minuten sedimentiert und einmal mit Salzlösung gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 20 ml Medium resuspendiert und bis zum Ansetzen der Kulturen auf Eis aufbewahrt. Die Zellzahl wurde mit einer

Neubauer-Zählkammer ermittelt: 4×10^8 bis 10^9 Zellen konnten pro Lunge ausgewaschen werden. Bei Vorhandensein von mehr als 10% Erythrocyten wurden die Zellen nicht verwendet. Mehr als 85% der Zellen nahmen kein Trypanblau auf.

Für die differentielle Cytologie wurden Ausstriche der Zellpräparationen hergestellt, mit May-Grünwald-Giemsas gefärbt und im Lichtmikroskop analysiert. Neben mehr als 90% Alveolarmakrophagen fanden sich regelmäßig 1 bis 2% Epithelien und ein wechselnder Prozentsatz von 1 bis 8% Lymphocyten, sowie Spuren von Leukocyten und Erythrocyten. Unsere Ergebnisse der Ausstriche wurden vom Bronchialcytologischen Labor der Robert-Koch-Klinik in Freiburg nachgeprüft. Dort kam man zu den gleichen Ergebnissen.

2.4.2. Kulturmedien

Rinderalveolarmakrophagen wurden in folgenden Medien inkubiert: HEPES-Medium (Castranova et al., 1980) hatte folgende Zusammensetzung:

0,14 M NaCl

5 mM KCl

5 mM Glucose

1 mM HEPES = (N-2-Hydroxymethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure, Sigma)

Der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Waymouth MB 752/1:

Das von Gibco Europa, Schottland, hergestellte Pulver wurde in 10 Litern A.bidest, aufgelöst, 22 g NaHCO_3 zugesetzt und der Ansatz autoklaviert.

Waymouth-Medium enthält verschiedene Salze, Aminosäuren, Vitamine und 5 g Glucose pro Liter; die genaue Beschreibung kann dem Gibco-Produktekatalog entnommen werden. Als weiteres Puffersystem wurden dem Medium 10mM HEPES, pH 7,4, zugesetzt. Das Pilz- und Bakterienwachstum blieb bei Inkubationszeiten bis zu 3 Stunden gering; nach mehr als sechzehnständiger Inkubation fanden sich viele Bakterien in den Kulturen. Die Überlebensrate der Zellen sank innerhalb von 20 Stunden auf unter 20%. Zugabe von 50 Einheiten/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin verhinderte das Bakterienwachstum; die Überlebensrate der Zellen lag nach 20 Stunden bei über 50%.

Der die Alveolen auskleidende, hauptsächlich Phospho- und Sphingolipide enthaltende Lungensurfaktant wurde mit der Waschflüssigkeit aus der Lunge ausgewaschen; nach dem Abzentrifugieren der Zellen aus der ersten Lavage diente dieser erste Überstand als sogenannter "Lungensurfaktant". Ein Volumen dieses Überstandes wurde mit einem Volumen Waymouth-Medium vermischt und die Zellen darin inkubiert.

Als weitere Zusätze zum Waymouth-Medium wurden 4% (w/v) Rinderserumalbumin (Sigma) oder 20% (v/v) NCS (newborn calf serum, Gibco) verwendet.

In einem Teil der Versuche wurden je 0,5 ml einer zehnprozentigen Suspension sphärischer Latexpartikel (GMD 0,8 µm, Dow-Latex, Serva) in 45 ml Waymouth-Zellkultur suspendiert und die Zellen 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 Minuten bei 250 g sedimentiert, in 45 ml frischem

Waymouth-Medium resuspendiert und bei 37°C mit (U,Pu)O₂ inkubiert.

Der Einfluß der Vorinkubation von Makrophagen bei 37°C in Waymouth-Medium wurde untersucht, indem die Vorinkubation in einigen Kulturen von 15 Minuten auf eine Stunde ausgedehnt wurde.

Ein Teil der Rattenalveolarmakrophagen-Kulturen wurden in BSS (balanced salt solution) mit (U,Pu)O₂ inkubiert. BSS hatte folgende Zusammensetzung:

0,15 M NaCl
6 mM KCl
5 mM KH₂PO₄
5 mM Glucose
25 mM HEPES; pH auf 7,4

2.4.3. Kulturbedingungen

Zellkulturen mit 45 ml Volumen und Zellkonzentrationen von 1 bis 4 Millionen Zellen pro Milliliter wurden angesetzt; als Kulturgefäße dienten 100 ml-Urinbecher der Firma Sarstedt. Diese Suspensionskulturen wurden in einem Julabo-Schüttelwasserbad mit 80 linearen horizontalen Hin- und Herbewegungen pro Minute für 15 Minuten vorinkubiert. Dann wurde pro Kultur 1 ml wässriger (U,Pu)O₂-Partikelsuspension zupipettiert und der ²⁴¹Am-Gehalt in der Kultur im Berthold-Ganzkörperzähler gemessen; aus dieser Messung wurde der Alpha-Radioaktivitätsgehalt als 100% zugesetzte Radioaktivität errechnet und der Radioaktivitätsgehalt der Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Inkubation auf diesen Wert bezogen.

Zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe von $(U,Pu)O_2$ wurden mit einer Pipette je 5 ml Zellkultur entnommen, mit 250 g fünf Minuten in einer Laborzentrifuge mit Ausschwingrotor (Martin Christ, Osterrode/Harz) sedimentiert und das Zellpellet einmal mit frischem, eiskaltem Medium gewaschen. Das endgültige Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und die Radioaktivität gemessen.

Für alle Versuche wurden sphärische $(U,Pu)O_2$ -Partikel verwendet; für einen kleinen Teil der Versuche wurde eine Partikelsuspension benutzt, die bis zu zehn Prozent faserartiger Kristalle enthielt (rasterelektronenmikroskopischer Befund). Diese Fasern waren mit je einem oder wenigen sphärischen Partikeln aggregiert und traten nicht frei auf. Die Aufnahme dieses Materials *in vitro* erfolgte langsamer während der ersten halben Stunde verglichen mit den rein sphärischen Partikeln; nach spätestens zwei Stunden wurden gleiche Werte wie mit rein sphärischen Partikeln erreicht.

Für die Bestimmung freigesetzter Enzyme während der Inkubation wurden die Kulturüberstände sofort auf Eis gekühlt und am gleichen Tag bei $-20^\circ C$ bis zur Enzymbestimmung eingefroren. Für die Kontrollwerte der Enzymbestimmungen dienten Zellkulturen ohne $(U,Pu)O_2$. In jeder Inkubationsserie wurden Kulturen, die auf Eis inkubiert wurden, um die Phagocytose zu blockieren, mitgeführt. Die Entnahme von 5 ml-Aliquots erfolgte zu gleichen Zeiten wie bei den $37^\circ C$ -Kulturen; die aus den gewaschenen Zellpellets ermittelte Radioaktivität von 20 bis 30% der eingesetzten Gesamtradioaktivität zeigte während 10 Minuten bis 2,5 Stunden nach Inkubationsbeginn keinen zeitlichen Anstieg, so daß der

Mittelwert aller Einzelmessungen einer Inkubationskultur auf Eis gebildet und von den 37°C-Werten der entsprechenden Kultur aus der gleichen Inkubationsserie abgezogen wurde.

Um abzusichern, daß die oben erwähnte Methode zur Bestimmung der Phagocytoserate durch Sedimentation verläßliche Werte ergibt, wurden in Parallelversuchen 10 und 90 Minuten nach Inkubation bei 37°C, sowie auf Eis, je 5 ml Zellkultur bei 250 g 5 Minuten abzentrifugiert, in 1 ml frisches Medium aufgenommen und die Zellen über lineare Saccharose-Dichtegradienten bei 2000 g 30 Minuten im Schwingbecherrotor SW 27/2 in einer J2-65B Beckman-Ultrazentrifuge bei +4°C von nicht zellgebundener Radioaktivität abgetrennt. Nach Fraktionierung des Gradienten in einzelne 1,85 ml-Fraktionen wurden Fraktionen mit mehr als 5% der Gesamtradioaktivität im Gradienten und höherer Dichte als 1,10g/cm³ addiert und diese Summe als zellgebundene Radioaktivität definiert. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde sowohl durch Messung von NAG und LDH (2.8), die im gleichen Dichteintervall prominent waren, als auch durch zehnminütige Vorinkubation der Makrophagen mit Latexpartikeln (GMD:0,8µm; 2.4.2.) und daraus resultierender Verschiebung von Radioaktivitäts- und Enzymprofilen zu geringerer Dichte bestätigt (Abb. 16).

2.5. Bestimmung der Radioaktivität

2.5.1. Ganzkörpermessung

Zur Bestimmung der in den Tieren enthaltenen Gamma-Radioaktivität wurde ein Kleintier-Ganzkörperzähler (Laboratorium Prof. Dr. Berthold, Wildbad) verwendet.

Durch Verwendung eines speziellen Einsatzes konnten die nach Sektion entnommenen Lungen und anderen Organe in Szintillationsgefäßen auch in diesem Gerät gemessen werden.

Für die (U,Pu)O₂-Partikel wurde die 60 keV-Gamma-Linie des aus ²⁴¹Pu durch Beta-Zerfall entstandenen ²⁴¹Am gemessen.

Den Messungen lagen folgende Daten zugrunde:

Nuklid	Meßbereich (keV)	Meßeffectivität (%)
²⁴¹ Am	58 - 78	ca. 20
⁵⁷ Co	107 - 157	27

2.5.2. Messung der Gamma-Radioaktivität in den Organen

Die Bestimmung der Radioaktivität von ²⁴¹Am und von ⁵⁷Co erfolgte außerdem durch die Messung ihrer Emissionraten in einem Beckman Gamma 8000 Szintillationsspektrometer. Als Detektor diente ein NaJ(Tl)-Bohrlochkristall mit 7,6 cm Durchmesser. Folgende Einstellungen wurden gewählt:

Nuklid	Meßbereich (keV)	Meßeffectivität (%)
²⁴¹ Am	50 - 90	40
⁵⁷ Co	75 - 145	ca. 60

2.5.3. Messung der Alpha-Radioaktivität

Die Gesamt-Alpha-Radioaktivität von $(U,Pu)O_2$ in den verschiedenen Organen, Zellen, Zell- und Gradientenfraktionen wurde nach Naß-Veraschung (Seidel und Volf, 1972) summarisch in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Packard Tri Carb) gemessen. Die Proben wurden mit je einem Milliliter 70% $HClO_4$ und 30% H_2O_2 (1:1) versetzt und nach 24 Stunden bei $60^\circ C$ zweieinhalb Stunden lang im Trockenschrank erhitzt. Nach Abkühlung der Proben wurden 15 Milliliter Insta-Gel als Szintillator zugesetzt, gut geschüttelt und die Proben sofort gemessen.

2.6. Subzelluläre Fraktionierung von Rattenlunge und Rinder- alveolarmakrophagen durch differentielle Zentrifugation

Rattenlungen wurden zu verschiedenen Zeiten nach intratrachealer Instillation von $(U,Pu)O_2$ zusammen mit der Trachea aus den Tieren entnommen, mit einem Skalpell grob zerkleinert und durch ein Metallsieb mit zwei Millimeter Porendurchmesser gepreßt. Trachea, Bronchien und grobes Bindegewebe blieben auf dem Metallsieb zurück und wurden insgesamt als "Bindegewebe" bezeichnet. Die das Sieb passierenden Gewebestücke wurden in eiskaltem Homogenisationsmedium (HM: 0.25M Saccharose, gepuffert mit 10 mM Triäthanolamin-HCl, pH 7,4) suspendiert und durch dreimaliges Niederdrücken eines mit 500 Umdrehungen pro Minute rotierenden Teflonpistills in einem 30 ml Elvehjem-Potter (B. Braun, Melsungen) weiter zerkleinert. Das Homogenat wurde in einem 20 ml Dounce-Homogenisator (B. Braun, Melsungen) mit einem Pistill der Spaltweite "L" durch entweder 5- oder 10-maliges Niederdrücken von Hand zum endgültigen Homogenat verarbeitet. Alle Schritte

wurden auf Eis ausgeführt. Wegen der außerordentlichen Zähigkeit des Lungenhomogenates war eine weitere Zerkleinerung im Dounce-"S"-Homogenisator nicht möglich. Rinderalveolarmakrophagen wurden ebenfalls in eiskaltem Homogenisationsmedium suspendiert und durch zehnmaliges Homogenisieren in einem 20 ml Dounce-"S"-Homogenisator aufgebrochen. Bei Homogenisation im Dounce-"L"-Homogenisator blieben die Makrophagen weitgehend intakt. Das Homogenat aus je einer Lunge oder aus je 500 Millionen Makrophagen wurde mit Homogenisationsmedium auf 10 Milliliter aufgefüllt und in einem Beckman 60 Ti-Festwinkelrotor in einer Beckman-Spinco-L2-65B - Ultrazentrifuge bei +4°C mit 2100 g 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 10 Millilitern Homogenisationsmedium resuspendiert, fünfmal oder zehnmal im Dounce homogenisiert und bei 1100 g erneut 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml Homogenisationsmedium resuspendiert, fünfmal im Dounce homogenisiert und wird in der Folge mit "N" bezeichnet.

Die beiden Überstände wurden vereinigt und als "E" bezeichnet. Vor der Weiterverarbeitung wurde dieses "E" vollständig im Ganzkörperzähler und im Beckman Gamma 8000 gemessen. Dann wurden 18 ml "E" bei 40500 g 10 Minuten zentrifugiert, das Pellet "ML" in 5 Milliliter Homogenisationsmedium resuspendiert und fünfmal im Dounce homogenisiert. Der verbleibende Überstand "X" wurde meist nicht weiterverarbeitet, da er fast keine Radioaktivität mehr aufwies. Bei einem Teil der Rattenlungen - Homogenisationen wurde "X" für 40 Minuten mit 101 000 g zentrifugiert. Das Pellet "P" wurde mit Homogenisationsmedium auf 5 Milliliter aufgefüllt und fünfmal im Dounce homogenisiert; der verbleibende Überstand wurde "S" genannt.

2.7. Dichtegradientenzentrifugation

Alle verwendeten linearen Gradienten wurden mit Hilfe eines Zwei-Kammer-Gradientenformers gelegt. Für die Auftrennung der N- und ML-Fractionen wurden je 17 Milliliter der schweren und 21 Milliliter der leichten Komponente vorgelegt und der Gradient in einem Beckman-Quickseal^R-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen gelegt. Nach Überschichtung des Gradienten mit 2 Milliliter Probe wurde das Röhrchen zugeschweißt und 2 Stunden bei 60 000 g im Vertikalrotor VTi 50 in einer Beckman-L8-Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Für die Auftrennung von Zellmaterial und bei Verwendung von Percoll und Ficoll wurden 14 Milliliter der schweren und 17 Milliliter der leichten Komponente vorgelegt, der Gradient in einem offenen Zellulosenitrat-Zentrifugenröhrchen gelegt und mit 2 Milliliter Probe überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte mit 2000 g für 30 Minuten im Schwingbecherrotor SW 27/2 in der Beckman-L2-65B-Ultrazentrifuge mit ungebremstem Auslauf.

Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen unten angestochen und durch schrittweises Ausdrücken des Gradienten mit Paraffin in 22 bzw. 19 Fraktionen mit je 1,85 Milliliter Volumen fraktioniert.

Der Brechungsindex "c" dieser Fraktionen wurde bei 20°C im Abbe-Refraktometer gemessen. Die Fraktionen wurden für weitere Analysen bei -20°C eingefroren.

2.7.1. Saccharose-Dichtegradienten

Aus 62%iger Saccharose (w/w) (gelöst in A.bidest) als schwerer

Komponente und aus Homogenisationsmedium als leichter Komponente wurden lineare Gradienten gelegt. Der prozentuale Saccharosegehalt der einzelnen Fraktionen konnte im Abbe-Refraktometer direkt abgelesen werden. Die dazugehörige Dichte wurde den Int. Critical Tables of Numerical Data, Physical Chemistry and Technology (Vol. II, London, 1927) entnommen.

Nach Naßveraschung der saccharosehaltigen Proben wurden diese nur bis auf 50°C statt auf 60°C erhitzt.

2.7.2. Metrizamid- und Nycodenz-Dichtegradienten

Metrizamid (2-(3-Acetamido-5-N-Methyl-Acetamido-2,4,6-Triiodobenzamido)2-Deoxy-D-Glucose; Serva, Heidelberg) wurde in Konzentrationen von 9,1% (w/v) und 50,6% (w/v) in A.bidest gelöst verwendet. Die Fraktionsdichten konnten aus dem Brechungsindex "c" über die lineare Beziehung $\rho = 3,35c - 3,462$ (Rickwood, 1983) bestimmt werden.

Nycodenz (N,N-bis(2,3-Dihydroxypropyl)-5-N-(2,3-Dihydroxypropyl) Acetamido-2,4,6-Triiodo-Isophthalamid; Serva, Heidelberg) wurde wie Metrizamid verwendet. Die Fraktionsdichten wurden aus $\rho = 3,242c - 3,323$ (Rickwood, 1983) bestimmt. Die Alpha-Radioaktivität der Fraktionen konnte nur ohne Naßveraschung der Proben gemessen werden.

2.7.3. Percoll-Dichtegradienten

Bei Percoll (Pharmacia, Freiburg) handelt es sich um eine kolloidale Suspension aus Silikon-Partikeln (ca. 17 nm Durchmesser), die mit Polyvinylpyrrolidon beschichtet sind. 9 Teile Percoll-Stammlösung wurden mit einem Teil 2,5 M Saccharose

gemischt; diese Mischung wurde als schwere Komponente für die Herstellung linearer Percoll-Gradienten verwendet. Als leichte Komponente diente Homogenisationsmedium. Die Fraktionsdichten wurden aus $\rho = 7,0420 - 8,448$ ermittelt. Die Zentrifugation erfolgte im SW 27/2 Schwingbecherrotor mit 2000g für eine Stunde mit ungebremstem Auslauf.

2.7.4. Ficoll-Dichtegradienten

Ficoll (Typ 400, Sigma) ist ein hochmolekulares Copolymer aus Saccharose und Epichlorohydrin. Es zeichnet sich gegenüber Saccharose durch einen geringen osmotischen Druck aus. Eine 27%ige Lösung (w/w) in Homogenisationsmedium gelöst diente als schwere Komponente. Homogenisationsmedium diente als leichte Komponente. Die Zentrifugation linearer Gradienten erfolgte im Beckman SW 27/2 Schwingbecherrotor mit 2000g für eine Stunde mit ungebremstem Auslauf. Die Fraktionsdichten konnten über $\rho = 2,3810 - 2,175$ (Rickwood, 1984) bestimmt werden.

2.8. Enzymbestimmungen

Als Leitenzyme zum Nachweis von Lysosomen dienten N-Acetyl- β -Glucosaminidase, Saure Phosphatase und Arylsulfatase. Mitochondrien wurden anhand der Glutamatdehydrogenase-Aktivität, Plasmamembranen mit Alkalischer Phosphodiesterase nachgewiesen. Laktatdehydrogenase wurde als cytoplasmatisches Leitenzym gewählt. Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Proben wurde mit dem "BIO-RAD Protein Assay" (BIO-RAD-Laboratories GmbH, München) vorgenommen. Der Test beruht auf einer Verschiebung des Lichtabsorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm auf 595 nm nach Bindung an Proteine. Rinderserumalbumin (Sigma) diente als Proteinstandard. Der Test

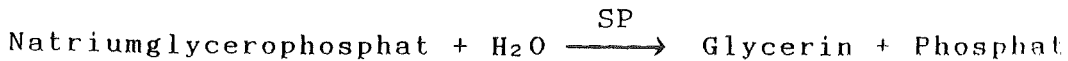
CH₃COONa/l; mit Essigsäure auf pH 6.0))

zwei Stunden bei 37°C inkubieren; mit 2 ml PTA (2 g Phosphorwolframsäure in 0.1 N HCl gelöst und mit 0.1 N HCl auf 100 ml aufgefüllt) stoppen und 15 Minuten auf Eis stellen; bei 2500 g 15 Minuten zentrifugieren.

1 ml des Überstandes + 2 ml frisch angesetzte Chinonlösung (1 ml Lösung I (=4% Hydrochinon in 0.1 N HCl) + 20 ml Lösung II (=10 g NaOH + 5 g Na₂SO₃, wasserfrei, in 100 ml A.bidest) solange rühren, bis die Grünfärbung verschwindet; Messung der Extinktion bei 515 nm im Photometer

(TX-100: Triton X-100, nichtionisches Detergenz)

Saure Phosphatase (Appelmans et al., 1955)



Ansatz: 0.2 ml Probe + 0.01 ml TX-100 (10% wässrige Lösung)
+1 ml Puffer (4.1 g Natriumacetat + 1.86 g Na₂-EDTA auf
1 Liter; pH auf 5.0 mit Essigsäure)
+0.1 ml Substrat (0.331 g Natriumglycerophosphat + 7 ml
A.bidest)

eine Stunde bei 37°C inkubieren; mit 0.2 ml 2.4 N HClO₄ stoppen und 15 Minuten auf Eis stellen; bei 2500 g 15 Minuten zentrifugieren.

1 ml des Überstandes + 2.5 ml Lösung A + 0.5 ml Lösung B + 0.1 ml TX-100 (10%ig) gut mischen.

Messung der Extinktion bei 660 nm im Photometer.

Lösung A: 5 g Ammoniummolybdat in A.bidest gelöst; 28 ml konz. H₂SO₄ in A.bidest gelöst; die Lösungen werden vereinigt und mit A.bidest auf 2 Liter aufgefüllt.

Lösung B: 5.7 g Natriumhydrogensulfit + 0,2 g Natriumsulfit + 0.1 g 1-2-4-Aminonaphtolsulfonsäure mit A.bidest auf 100 ml

Alkalische Phosphodiesterase (Beaufay et al., 1974)

2-Desoxythymidin-5'-p-Nitrophenylphosphat + H₂O $\xrightarrow{\text{AP}}$ 2-Desoxythymidin-5'-Phosphat + 4-Nitrophenol

Ansatz: 0.1 ml Probe (1:11 verdünnt für Rattenlunge, unverdünnt für BAM)

+ 0.5 ml Puffer (17.84 g Glycin-HCl + 0.72 g Zinkacetat in 1 Liter A.bidest lösen; pH auf 9.6 mit konz. NaOH)

+ 0.1 ml Substrat (189.3 g Thymidin-5'-Phosphat-4-Nitrophenol mit A.bidest auf 10 ml)

30 Minuten bei 37°C inkubieren; mit 0.5 ml eiskaltem Ethanol stoppen, Messung der Extinktion bei 400 nm im Photometer.

Laktatdehydrogenase (Bergmeyer und Bernt, 1970)

Pyruvat + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Laktat + NAD⁺

Lösung I: 7 g K₂HPO₄ + 900 mg KH₂PO₄ + 30 mg Na-Pyruvat auf 900 ml mit A.bidest; pH 7.5 mit KOH

Lösung II: 10 mg NADH + 1 ml H₂O + 0.5 ml einer Lösung aus 300

mg NaHCO₃ in 10 ml A.bidest

Ansatz: 1.5 ml Lösung I + 0.025 ml Lösung II

bei 25°C Reaktion mit 0.05 ml Probe starten und die
Extinktionsabnahme bei 365 nm 4 Minuten lang messen

Glutamatdehydrogenase (Williamson et al., 1967)

Alpha-Ketoglutarat + NH₃ + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{GDH}}$ Glutamat + NAD⁺ + H₂O

Ansatz: 1 ml Puffer (6.57 g Triethanolaminhydrochlorid + 3.72 g
Na₂-EDTA + 3.85 g Ammoniumacetat auf 1 l
mit A.bidest; pH auf 8.0 mit KOH

+ 0.4 ml Probe

+ 0.05 ml NADH+H⁺ (0.0178 g NADH+H⁺ auf 5 ml mit
A.bidest)

+ 0.03 ml ADP (0.133 g ADP auf 5 ml mit A.bidest)

Reaktion durch Zugabe von 0.1 ml Alpha-Ketoglutarat (0.285 g + 15
ml A.bidest) starten.

Extinktionsabnahme bei 365 nm 4 Minuten lang messen.

2.9. Autoradiografie

Ausstriche von Rattenalveolarmakrophagen, die durch Lavage von
zuvor mit (U,PU)O₂-Partikeln instillierten Lungen gewonnen
wurden, wurden kurzzeitig in Chromalaun-Gelatine-Lösung getaucht
und anschließend mit Kodak-Stripping-Film AR 10 überzogen. Nach
einwöchiger Exposition bei +4°C wurde der Film in Kodak D19-
Entwickler entwickelt, mit Kodak Unifix fixiert und die Zellen
mit der May-Grünwald-Giemsas-Standardfärbung gefärbt. Der Anteil

an freien und zellgebundenen Teilchen wurde im Lichtmikroskop durch Auszählung von 100 Tracks pro Ausstrich bestimmt, der Prozentsatz radioaktivitätshaltiger Zellen durch Auszählung von viermal 100 Zellen pro Ausstrich ermittelt.

2.10. Elektronenmikroskopie und energiedispersive Mikroanalyse

Einzelne Rattenlungen wurden 4, 111 und 473 Tage nach intratrachealer Instillation von 17, 12 und 20 kBq/kg sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln (AMAD: 0,9 µm) in 8 Teile zerlegt, die Teile im Ganzkörperzähler gemessen und der Teil mit der höchsten Radioaktivität bei +4°C in 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,4, fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M Cacodylatpuffer und 2 Stunden Nachfixierung in OsO₄ nach Palade wurden die Gewebstücke in der Alkoholreihe entwässert, zweimal eine Stunde in Propylenoxid gelegt und in Epon 812-Araldit eingebettet. Schnitte von 0,1-0,2 µm Dicke wurden mit einem Sorvall MT2-B Ultramikrotom hergestellt und mit Bleicitrat kontrastiert. Auf Uranylacetat als Co-Kontrastierungsmittel wurde verzichtet, da es beim Nachweis des (U,Pu)O₂ stören kann.

Mit (U,Pu)O₂-Partikeln in vitro-inkubierte Makrophagen von Ratte und Rind wurden in 2,5% Glutaraldehyd bei +4°C fixiert, in 3% Agar eingegossen und wie Lungengewebe eingebettet. Die Zellen für die Rasterelektronenmikroskopie wurden nach Fixierung in der Alkoholreihe entwässert und die Suspension direkt auf Nuclepore-Filter aufgetropft.

Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Philips SEM 515-Rasterelektronenmikroskop verwendet.

Ein Hitachi H700 H-ST-Elektronenmikroskop, das sowohl im Transmissions- als auch im Raster-Modus betrieben werden konnte, war mit einem Si-(Li)-Detektor für energiedispersive Röntgenspektroskopie (PGT, Princeton Gamma Tech, Princeton, New Jersey) ausgestattet. Der für Plutonium charakteristische Energiebereich der durch Beschuß der Probe mit Elektronen induzierten Röntgenstrahlung diente zum Nachweis des Plutoniums in der Probe. Einbetten und Schneiden der Proben wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Hotz (IGT), die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden im Institut für Transurane, Euratom-Karlsruhe von H. Thiele durchgeführt.

2.11. Auswertungsverfahren und Präsentation der Daten

Für die Retentionsdaten wurden die im Ganzkörperzähler ermittelten Gamma-Aktivitätswerte des ^{241}Am in den Tieren nach drei Tagen nach Instillation oder Inhalation zugrundegelegt (Meßwerte (A)). Zwei Tiere einer jeden Gruppe wurden nach 3 Tagen seziiert, die ^{241}Am -Gamma-Aktivität der beiden Lungen im Ganzkörperzähler (Meßwerte (B)) und im Beckman Gamma 8000 (Meßwerte (C)) und die Gesamt-Alpha-Aktivität der beiden Lungen im Packard Tri Carb (Meßwerte (D)) gemessen. Der Mittelwert des Quotienten aus den jeweils im Ganzkörperzähler ermittelten 3-Tage-Meßwerten der beiden Lungen und den 3-Tage-Meßwerten der zugehörigen Tiere ergab den Faktor F_2 . Der Mittelwert des Quotienten aus den im Beckman ermittelten beiden Lungenwerten ((C)) und den Ganzkörperwerten dieser Lungen ((B)) wurde mit $F(\gamma)$ bezeichnet; der entsprechende Mittelwert des Quotienten aus den im Packard Tri Carb ermittelten beiden Lungenwerten ((D)) (also Gesamt-Alpha-Radioaktivität) und den Ganzkörperwerten dieser Lungen ((B)) wurde $F(\alpha)$ genannt. Als Ausgangspunkt für die

Berechnung des 100%-Wertes für die Retention des ^{241}Am , gemessen im Beckman, und für die Gesamt-Alpha-Retention, gemessen im Packard, in der Lunge und den anderen untersuchten Organen standen naturgemäß jeweils nur die Ganzkörperzähler-Meßwerte aller Tiere nach 3 Tagen ((A)) zur Verfügung. Aus diesen und aus den berechneten Quotienten F_2 , $F(\gamma)$ und $F(\alpha)$ konnte der 100%-Wert für den Radioaktivitätsgehalt der Lungen nach 3 Tagen (hier definiert als die "initiale alveoläre Dosis" = IAD) errechnet werden durch Multiplikation des Meßwertes (A) des Tieres nach 3 Tagen im Ganzkörperzähler mit dem allgemeinen Faktor F_2 und des daraus resultierenden Wertes mit entweder $F(\gamma)$ für die ^{241}Am -Retention oder $F(\alpha)$ für die Gesamt-Alpha-Retention.

Formelmäßig läßt sich der oben beschriebene Rechengang folgendermaßen zusammenfassen:

100% IAD des ^{241}Am im Beckman Gamma 8000: $\text{IAD}(\gamma) = (A) \times F_2 \times F(\gamma)$

100% IAD der Gesamt-Alpha-Aktivität im Packard Tri Carb:

$\text{IAD}(\alpha) = (A) \times F_2 \times F(\alpha)$.

Für die Kobalt-Versuche wurden zwei Co_3O_4 -Standardproben in einem Germanium-Lithium-Halbleiterzähler (Canberra; Dr. Gantner, Institut für Radiochemie) quantitativ gemessen und mit den gleichen Standards die Meßeffectivität des Ganzkörperzählers für ^{57}Co mit 27% bestimmt. Aus diesem Wert und der Halbwertszeit von 271 Tagen für ^{57}Co wurden für alle Kobaltmessungen 100% Gamma-Radioaktivität am 1.3.1985 (definiert als $t = 0$) in Becquerel errechnet. Die IAD ließ sich aus der Formel: Ganzkörpermessung des Tieres nach 3 Tagen $\times F_2 \times 1/60 \times 100/27 \times e^{-\lambda t}$ (mit $t = 0$ für den 1.3.85) in Becquerel berechnen.

Die relativen Konzentrationen der Radioaktivität in den einzelnen Lungenlappen (Raabe et al., 1977) wurden für Co_3O_4 direkt aus den Beckman Gamma 8000-Meßwerten, für $(\text{U},\text{Pu})\text{O}_2$ direkt aus den Packard Tri Carb-Meßwerten und aus den Gewichten der einzelnen Lungenteile nach den Angaben in den Fußnoten der entsprechenden Tabellen berechnet.

Die Halbwertszeiten für die Lungen- und Ganztierretentionen wurden mit Hilfe eines Computer-Fitprogrammes (Dr. Thies und Dr. Haffner) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt. Die so ermittelten Halbwertszeiten sind insbesondere für die zweite Exponentielle infolge der relativ geringen Zahl der Meßdaten nur als Näherungswerte zu betrachten.

Die Verteilungsprofile der Radio- und Enzymaktivität aus den Dichtegradien wurden nach Beaufay et al. (1976) in der Form $\Delta Q / \Delta \rho$ (Ordinate) als Funktion der Dichte (Abszisse) aufgetragen. ΔQ entspricht dem prozentualen Anteil der Gesamt-Aktivität im Gradienten für die einzelne Fraktion. $\Delta \rho$ beschreibt die Zunahme der Dichte innerhalb der einzelnen Fraktion. Die Abbildungen wurden mit einem computergesteuerten Plotter angefertigt (Programme von Dr. Thies und Dr. Haffner).

Statistische Unterschiede zwischen einzelnen Mittelwerten wurden mit dem t-Test von Student geprüft. Bei Vorliegen von Signifikanzen wurden die zugehörigen Werte für Z_p im Text angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Retention von (U,Pu)O₂ nach Instillation und nach Inhalation

3.1.1. Retention sphärischer Partikel

Sphärische (U,Pu)O₂-Partikel in wässriger Suspension zeigt die rasterelektronenmikroskopische Abb. 27a.

Tab. 1a gibt Auskunft über die Radioaktivitätsverteilung in der Lunge und anderen ausgewählten Organen der Ratte nach intratrachealer Instillation. Die Ausscheidung aus der Lunge ging biexponentiell vonstatten (Tab. 4): 22% der Alpha-Radioaktivität wurden mit einer Halbwertszeit von 5 Tagen, die restlichen 78% der initialen alveolären Alpha-Dosis mit einer Halbwertszeit von 253 Tagen aus der Lunge ausgeschieden. Nach Inhalation einer vergleichbaren Dosis sphärischer Mischoxide verließen 56% der Alpha-Aktivität mit einer Halbwertszeit von 29 Tagen und 44% mit einer Halbwertszeit von etwa 169 Tagen die Lunge (Tab. 1b).

Eine fünffach niedrigere Dosis (Tab. 1c) führte in der Beobachtungszeit zu einem monoexponentiellen Ausscheidungsmodus mit einer Halbwertszeit von 68 Tagen.

Beim Vergleich der Instillation mit der Inhalation sphärischer Partikel (Abb. 1) führte die Inhalation bei gleicher und bei niedrigerer initialer alveolärer Dosis zu einer deutlich schnelleren Lungen-Clearance gegenüber der Instillation. In keinem der anderen untersuchten Organe Leber, Milz, Nieren und Femur ließen sich während des Untersuchungszeitraums mehr als 2% der initialen alveolären Alpha-Dosis nachweisen (tendenziell zeigte die Radioaktivität im Femur und somit im Skelett einen langsamen Anstieg über die Zeit).

Abb. 1a zeigt die Lungenretention nach Inhalation sphärischer Partikel (IAD: 13,1 kBq/kg) im Vergleich mit der Ganzkörperretention. Die Ganzkörperretention wurde über die Am-241-Gamma-Radioaktivität, die Lungenretention über die Gesamt-Alpha-Radioaktivität bestimmt. Die Unterschiede zwischen Ganzkörper- und Lungenretention waren für alle anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inhalations- und Instillationsversuche ähnlich. Die langsamere Ausscheidung der Radioaktivität aus den Tieren im Vergleich zur Ausscheidung aus der Lunge beruht auf der Translokation eines Teils der anfangs in der Lunge deponierten Radioaktivität in andere Organe (hauptsächlich Leber und Skelett).

Abb. 2 zeigt den Unterschied in der Retention nach intratrachealer Instillation einer hohen und einer um mehr als das Siebenfache niedrigeren Dosis von sphärischen Partikeln. Hier wurde die Gamma-Radioaktivität des ^{241}Am in den Tieren gemessen und somit die Ganztierretention für dieses Nuklid ermittelt. Die errechneten Halbwertszeiten (Tab. 4) betragen 25 Tage für 54% der Radioaktivität und 928 Tage für die restlichen 46% nach Instillation der höheren Dosis; für die niedrige Dosis waren es 20 Tage und 83% sowie 470 Tage und 16%. Die höhere Dosis hatte eine deutlich verlangsamte Ausscheidung der Radioaktivität aus dem Körper und wegen der geringen Translokation in andere Körperorgane auch in der Lunge zur Folge. Die Halbwertszeit für die zweite Exponentielle konnte wegen der starken Streuung der Meßwerte nur sehr ungenau bestimmt werden.

Die Abnahme der Gamma-Radioaktivität in den Tieren betrug während der ersten 3 Tage nach intratrachealer Instillation der

niedrigeren Dosis im Mittel 16% der instillierten Dosis und nach intratrachealer Instillation der hohen Dosis 22,7% der instillierten Dosis.

3.1.2. Retention irregulärer Partikel

Einen typischen Vertreter der für die Instillation verwendeten irregulären Partikel mit $1 \mu\text{m}$ AMAD zeigt die rasterelektronenmikroskopische Abbildung 28. Für die Inhalation verwendete irreguläre $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ -Partikel mit $1,5 \mu\text{m}$ AMAD unterschieden sich von diesen Partikeln nur in ihrer Größe.

Tab. 2a zeigt die Radioaktivitätsverteilung in den untersuchten Organen der Ratte nach intratrachealer Instillation von irregulären Partikeln. Tab. 2b und 2c zeigen die entsprechende Verteilung nach Inhalation einer etwa zweifach höheren und einer etwa dreifach niedrigeren Dosis. Während sich die Alpha-Lungenretention nach Instillation der Partikel mit zwei Exponentiellen am genauesten beschreiben ließ, hatte die Alpha-Retention nach Inhalation der Partikel für beide Dosen innerhalb der Beobachtungszeit einen monoexponentiellen Verlauf, der mit Halbwertszeiten von 45 Tagen für die höhere und 55 Tagen für die niedrigere Dosis in beiden Fällen sehr ähnlich war. Hinsichtlich der Absolutmenge irregulärer Partikel in der Lunge während der ersten 100 Tage ließ sich ein Unterschied zwischen Inhalation und Instillation nicht sichern (Abb.3). Bei Verwendung der Daten nur bis zum 159. Tag nach intratrachealer Instillation konnte eine monoexponentielle Retentionskinetik mit einer Halbwertszeit von 48 Tagen berechnet werden; bei Berücksichtigung aller Meßdaten bis zum 368. Tag war der biexponentielle Retentionsverlauf mit

Halbwertszeiten von 4 Tagen für 36% und von 95 Tagen für 64% des instillierten Materials zu errechnen.

Die Abnahme der Gamma-Radioaktivität in den Tieren betrug während der ersten 3 Tage im Mittel 21,1% der instillierten Dosis.

Die in Abb.3a dargestellten Ganzkörper-Retentionskurven machen deutlich, daß nach intratrachealer Instillation irregulärer Partikel eine nur geringfügig höhere Dosis bereits zu einer verzögerten Radioaktivitätsausscheidung führen kann. Während der ersten 100 Tage ist die Retention für beide Dosen annähernd gleich, danach nimmt die Alpha-Radioaktivität in der Lunge nach Instillation der niedrigeren Dosis schneller ab.

Die Deposition von Alpha-Radioaktivität nach Inhalation und Instillation irregulärer (U,Pu)O₂-Partikel in den anderen untersuchten Organen der Ratte betrug auch für dieses Material nicht mehr als 1% der initialen alveolären Dosis. Einzige Ausnahme war der Magen-Darm-Trakt, der 3 Tage nach Inhalation der höheren Dosis 3% der initialen alveolären Gamma-Aktivität enthielt.

Der Vergleich beider Partikelformen zeigte nach Inhalation (Abb.4 und Tab. 1c und 2b) eine etwas schnellere Ausscheidung des irregulären Materials.

Intratracheal instillierte irreguläre Partikel mit 0,7 µm AMAD, die im Anderson-Stack-Impaktor angereichert wurden (Tab. 3), verließen die Lunge langsamer als die im Inertial-Spektrometer

angereicherten 1 μm -Partikel (Abb.5); die Alpha-Radioaktivitätsabnahme in der Lunge war näherungsweise monoexponentiell mit einer Halbwertszeit von 98 Tagen. Im Vergleich zur Instillation einer neunfach höheren Dosis sphärischer 0,9 μm -Partikel (Abb. 5) erfolgte die Alpha-Aktivitätsabnahme in der Lunge schneller. Die Gamma- und Alpha-Radioaktivität in den anderen untersuchten Organen war zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung höher als 1% der initialen alveolären Dosis.

Während der ersten 3 Tage nach intratrachealer Instillation der irregulären Partikel mit 0,7 μm AMAD verließen im Mittel 32,8% der instillierten Gamma-Radioaktivität die Tiere; dieser Wert liegt deutlich höher im Vergleich zu dem für die sphärischen 0,9 μm -Partikel.

3.1.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen im Anschluß an die intratracheale Instillation

4 Tage nach intratrachealer Instillation von sphärischen $(\text{U},\text{Pu})\text{O}_2$ -Partikeln konnten die meisten Partikel in Lungenmakrophagen nachgewiesen werden. Größtenteils wurden die Partikel in Alveolarmakrophagen gefunden (Abb. 29-33). Ein Teil der $(\text{U},\text{Pu})\text{O}_2$ -haltigen Zellen in der Lunge war von mehr oder minder kompaktem Gewebe umgeben, in dem zahlreiche Kapillaren mit angeschnittenen Erythrozyten auffielen; Bindegewebsfasern waren in diesen Regionen nicht zu beobachten; deshalb ist nicht sicher zu entscheiden, ob es sich bei den $(\text{U},\text{Pu})\text{O}_2$ -haltigen Zellen um

interstitielle oder um ungünstig angeschnittene alveoläre Makrophagen handelte (Abb.34 und 35). Das Cytoplasma der Mehrzahl dieser Zellen war mit elektronendichten Vesikeln geringen Durchmessers angefüllt, wogegen in freien alveolären Makrophagen zusätzlich zahlreiche elektronendurchlässige Vesikel unterschiedlicher Durchmesser gefunden wurden.

Ähnlich sahen Alveolarmakrophagen aus, die im Anschluß an die intratracheale Instillation von $(U,Pu)O_2$ mit 0,9% NaCl aus der Rattenlunge ausgewaschen wurden: 2 Tage nach intratrachealer Instillation sphärischer Partikel ($0,9 \mu m$ AMAD; Abb.36) war das Cytoplasma mit sehr heterogenen Vesikeln unterschiedlicher Elektronendichte ausgefüllt. 8 Tage nach Instillation irregulärer Partikel ($0,7 \mu m$ AMAD; Abb.37) waren die Zellen mit elektronendurchlässigen Vesikeln angefüllt. Die Makrophagenoberfläche war zu beiden Zeitpunkten stark unregelmäßig.

Aus Rinderlunge ausgewaschene Alveolarmakrophagen ähnelten denjenigen, die nach 2 Tagen aus der Rattenlunge auswaschbar waren (Abb.38 und 39). Rinderalveolarmakrophagen, die mit der ersten Lavage ausgewaschen wurden (Abb.38) unterschieden sich morphologisch nicht von solchen, die mit einer späteren Lavage auswaschbar waren (Abb.39).

111 Tage nach $(U,Pu)O_2$ -Instillation ließen sich die Partikel einzeln (Abb.41; Abb.42; Abb.44) und oft auch zu mehreren (Abb.40a und b; Abb.43) innerhalb einzelner ausgedehnter Bereiche

im Cytoplasma von Zellen beobachten. Das die Partikel enthaltende elektronendichte Material war sehr stark eisenhaltig und deutlich gegen das übrige Cytoplasma abgegrenzt. Einige der (U,Pu)O₂-haltigen Zellen enthielten zahlreiche große Vesikel geringer Elektronendichte (Abb.42), ein Hinweis auf Zellschädigungen. Teilweise fanden sich Gruppen von Faserbündeln in der Nachbarschaft (U,Pu)O₂-haltiger Zellen (Abb.40; 41; 43; 44). Besonders aus der Übersichtsaufnahme 41 geht hervor, daß die Integrität des Lungengewebes weitgehend verlorengegangen war: Zwischen den unregelmäßig angeordneten Faserbündeln waren zahlreiche Zellbruchstücke, insbesondere einzelne und zusammengesetzte Vesikel, sichtbar.

473 Tage nach Instillation wurden die Partikel wie auch nach 111 Tagen ausnahmslos innerhalb eisenhaltiger Granula gefunden (Abb.45a und b; Abb.46a; Abb.47). Fast alle nach dieser Zeit noch in der Lunge vorhandenen (U,Pu)O₂-Partikel erschienen weit weniger elektronendicht und kompakt als zu den früheren Untersuchungszeiten (Abb.45b).

3.1.4. Retention von Co₃O₄- und Al₂O₃-In₂O₃-Partikeln nach

Inhalation

Die Ausscheidung des Markernuklids ⁵⁷Co aus der Rattenlunge im Anschluß an die Inhalation von Co₃O₄ ließ sich für beide Partikelgrößen am besten anhand je einer Exponentiellen mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen für die größeren und mit einer Halbwertszeit von 26 Tagen für die kleineren Co₃O₄-Partikel beschreiben (Abb. 6 und Tab. 5a und 5b). Während das Verhalten der größeren Co₃O₄-Partikel dem der (U,Pu)O₂-Partikel nach

Inhalation von 0,4 bis 2,9 kBq/kg ähnlich war (Abb.1 und 3), verließen die kleineren Kobaltoxid-Partikel die Lunge fast doppelt so schnell. In keinem der anderen untersuchten Organe konnte während der Versuchsdauer mehr als 1% der ^{57}Co -IAD gemessen werden. Eine Ausnahme hiervon machte nur der Magen-Darm-Trakt: nach Inhalation der größeren Partikel waren dort nach 3 Tagen immerhin 5 % der initialen alveolären Dosis meßbar. Nach 28 und nach 56 Tagen waren es noch 1% der initialen alveolären Dosis, so daß in diesem Zeitraum eine mucociliäre Clearance über die Trachea und den Magen-Darm-Trakt durch diese Messungen direkt bestätigt werden konnte.

Inhalations- und Instillationsversuche wurden auch mit irregulären Indium-dotierten Aluminiumoxid-Partikeln (AMAD:4 μm) durchgeführt; hier sollen nur die wichtigsten Ergebnisse angeführt werden:

Inhalation und Instillation von einem bis einigen mg/kg Aluminiumoxid-Partikeln hatten bei monoexponentieller Retentionskinetik während der Beobachtung bis zu 63 Tagen biologische Halbwertszeiten von weit über 100 Tagen für die Lunge zur Folge. Weniger als 2% der initialen alveolären Dosis konnten innerhalb von 60 Tagen nach Instillation in Leber, Milz, Nieren oder Femur nachgewiesen werden.

3.1.5. Relative Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Lungenlappen der Ratte nach Inhalation

Die entsprechenden Daten sind für Kobaltoxid in den Tabellen 6a und b, für sphärisches $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ in Tab. 7a und b und für irreguläres $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ in Tab. 8a und b dargestellt. Allen

Versuchen gemeinsam war eine deutlich erhöhte Deposition im apikalen Lungenlappen 2. Die Ausscheidungsrate dort war nach (U,Pu)O₂-Inhalation niedrig und führte infolgedessen zu einer langsamen Zunahme der relativen Konzentration über die Zeit in diesem Lungenteil. Nach Kobaltoxid-Inhalation war ein Anstieg der relativen Konzentration in Teil 2 nur innerhalb der ersten 2 bis 3 Monate zu verzeichnen; nach 180 Tagen lag die relative Radioaktivitätskonzentration im Bereich des mittleren Gesamtlungenwertes. Gleichzeitig nahm in beiden Kobaltversuchen die relative Radioaktivitätskonzentration im intermediären Lungenlappen 6 deutlich zu, das heißt, dort war zu späteren Zeiten als 90 Tage nach Inhalation die Kobaltoxid-Ausscheidung deutlich vermindert.

Der Unterschied der relativen Radioaktivitätskonzentration im apikalen Lungenlappen 2 zur Restlunge war nach Inhalation der größeren Kobaltoxid-Partikel ähnlich deutlich wie nach (U,Pu)O₂-Inhalation. Nach Inhalation der kleineren Kobaltoxid-Partikel war eine Erhöhung in Teil 2 nur zwischen 28 und 91 Tagen zu verzeichnen:

Die relativen Radioaktivitätskonzentrationen in den übrigen Lungenteilen waren einander relativ ähnlich und wichen nicht allzusehr vom Lungenmittelwert ab; etwas ausgeprägter waren die Unterschiede bei den Kobaltversuchen. Der relative Radioaktivitätsgehalt der Trachea mit den hilären Lymphknoten war bei allen Versuchen im allgemeinen um den Faktor 10 niedriger als in den einzelnen Lungenteilen.

3.1.6. Intravenöse und intramuskuläre Injektion von (U,Pu)O₂-Partikeln

Die intravenöse Injektion sphärischer Partikel (Tab. 9a) führte zu schneller Deposition von mehr als 90% der injizierten Alpha-Radioaktivität in der Leber; 4 bzw. 1% der injizierten Alpha-Dosis wurden nach einer Woche in Milz und Lunge gemessen. Der Radioaktivitätsgehalt des Femurs lag weit unter 1%. Im Blut lag die Radioaktivität einen Tag nach Injektion unter 1% und war dort nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar.

Ein ähnliches Depositionsverhalten war auch nach intravenöser Injektion irregulärer Partikel zu beobachten (Tab. 9b). Ein wesentlicher Unterschied war in bezug auf die Lunge zu beobachten; nach 4 Tagen waren 17% der injizierten Dosis in der Lunge deponiert.

In der Leber nahm nach intravenöser Injektion beider Partikelformen die Radioaktivität über die Zeit ab; in Lunge, Milz und Femur erfolgte über den gleichen Zeitraum eine Zunahme der Radioaktivität.

Nach intramuskulärer Injektion irregulärer (U,Pu)O₂-Teilchen (0,5 kBq/kg) in den linken Oberschenkelstrecker wurden innerhalb von 47 Tagen 5% der Alpha-Radioaktivität hauptsächlich in die Leber translokiert; Milz und Femur enthielten nach dieser Zeit weniger als 1% der injizierten Dosis.

3.2 Bronchoalveoläre Lavage von Rattenlungen

Abb. 7 und 8 geben Auskunft über die auswaschbare Radioaktivität und das Ausmaß der Bindung der Teilchen an die Zellen in der Lavage-Flüssigkeit. Unabhängig von der Art der Teilchen nahm die auswaschbare Radioaktivität innerhalb von 2 bis 3 Tagen auf 5% der instillierten Dosis ab. Der Prozentsatz der freien Teilchen nahm im gleichen Zeitraum ebenso drastisch ab, während jener der radioaktiven Zellen ungefähr gleichblieb. In dem in Abb. 8 beschriebenen Versuch wurde viermal statt dreimal gewaschen, wodurch der etwas höhere Prozentsatz an ausgewaschener Radioaktivität zustande kam.

3.3. In vitro-Versuche mit Rinderalveolarmakrophagen

Von den beiden untersuchten Kulturmedien HEPES und Waymouth (Abb. 9) wurde Waymouth der Vorzug gegeben, da dort die Aufnahme von Radioaktivität über die Zeit mit $2p < 0,001$ signifikant höher war.

Der Hauptunterschied in der Radioaktivität manifestierte sich innerhalb der ersten 10 Minuten nach $(U,Pu)O_2$ -Zugabe; danach war die Aufnahmerate in Waymouth-Medium nur noch geringfügig schneller als in HEPES-Medium. Bei Inkubation von Makrophagen in Gegenwart von 50% "Lungensurfaktant" erfolgte eine etwas schnellere Radioaktivitätsaufnahme in die Zellen innerhalb der ersten 10 Minuten (Abb. 10); der Unterschied zwischen den mit und ohne "Surfaktant" inkubierten Zellen blieb dann mit 3 bis 10% der Inkubations-Radioaktivität während der folgenden 2 Stunden gleich, die zugehörigen Kurven sind zwischen 10 und 150 Minuten parallelverschoben. Statistisch ließ sich ein Unterschied zu keiner Zeit sichern.

Zusatz von 20% Kälberserum aus neugeborenen Tieren führte zu einem sehr starken Anstieg der Phagocytoseaktivität (Abb. 11); während der ersten 10 Minuten wurde in Gegenwart des Serums mehr als dreimal soviel Radioaktivität in den Zellen gefunden als bei Inkubation mit Waymouth-Medium allein (untere Kurve). Der Unterschied war mit $2p < 0,01$ nach 10 und 45 Minuten und $2p < 0,025$ nach 90 Minuten zu sichern. Nach 150 Minuten bestand kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Kulturen. Zugabe von 4% Rinderserumalbumin zum Waymouth-Medium hatte fast den gleichen Effekt wie Kälberserum; die Streuung zwischen den einzelnen Versuchen war mit BSA aber größer, so daß sich ein Unterschied mit $2p < 0,025$ nur für den ersten Wert nach 10 Minuten sichern ließ.

Eine einstündige Vorinkubation von Rinderalveolarmakrophagen bei 37°C in zusatzfreiem Waymouth-Medium führte zu einer etwas geringeren Phagocytoserate nach $(\text{U}, \text{Pu})\text{O}_2$ -Inkubation. Nach 18 bis 20 Stunden ließ sich kein Unterschied zu den 15 Minuten vorinkubierten Zellen mehr feststellen. Die Phagocytoserate nach 18 bis 20 Stunden lag bei 50 bis 70% der Inkubationsdosis.

Mit den auf Eis inkubierten Rinderalveolarmakrophagen sedimentierten im Mittel 36% der Inkubations-Radioaktivität nach 10 bis 150 Minuten Inkubation in Waymouth- und 30% nach Inkubation in HEPES-Medium. Durch Unterschichtung von 0,1 ml einer 62%igen Saccharoselösung unter ein freie Partikel enthaltendes Medium im Zentrifugenröhrchen konnten aus Waymouth-Medium im Mittel 24%, aus HM-EDTA 18% der Gesamt-Radioaktivität sedimentiert werden. Somit waren ungefähr zwei Drittel der nach Inkubation auf Eis sedimentierbaren

Radioaktivität freie (U,Pu)O₂-Teilchen oder Aggregate.

Bei Inkubation von Rinderalveolarmakrophagen in Waymouth-Medium ergab sich sowohl bei Inkubation bei 37°C als auch bei Inkubation auf Eis eine lineare Beziehung zwischen Inkubationsdosis und zellgebundener Radioaktivität (Abb. 12). Eine Verdopplung der Dosis führte stets zu einer Verdopplung der absoluten sedimentierbaren Radioaktivität.

Die Bestimmung der Phagocytoserate nach der Dichtegradientenmethode führte zwar im Mittel zu nahezu 50% weniger phagocytierte Radioaktivität nach 10 Minuten (Abb. 13), ein Unterschied war jedoch statistisch nicht zu sichern. Nach 90 Minuten Inkubation wurden die gleichen Werte ermittelt wie bei der Zentrifugationsmethode.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von 30 Minuten in vitro mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln in BSS inkubierten Rattenalveolarmakrophagen sind in Abb. 48-55 gezeigt: Die Zellen besaßen eine unregelmäßige Zelloberfläche und häufig cytoplasmatische Fortsätze am Zellrand. Sowohl einzelne Partikel (Abb. 48a und b; 50c; 52; 54; 55) als auch Gruppen von Partikeln (Abb. 50b; 51; 53) waren an den Zelloberflächen gebunden. Diese erschienen mehr oder weniger tief in den Zelleib eingesenkt und meist von der Zellmembran überzogen.

Abb. 56-59 zeigen Rinderalveolarmakrophagen nach einstündiger in vitro-Inkubation mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln in

HEPES-Medium. Auch hier waren die $(U,Pu)O_2$ -Partikel sowohl einzeln (Abb.57: 58a und b; 59) als auch in Gruppen (Abb.56) mit Zellen assoziiert. Stellenweise sichtbare glatte Zelloberflächen wiesen lochartige Einsenkungen auf (Abb.58a rechts unten).

90 Minuten auf Eis mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln in HEPES- oder in Waymouth-Medium (Abb.60) inkubierte Rinderalveolarmakrophagen wiesen keine $(U,Pu)O_2$ -Partikel im Bereich der Zelloberfläche auf. Diese Zellen hatten eine deutlich rauhere Oberfläche als die bei $37^\circ C$ mit $(U,Pu)O_2$ inkubierten Zellen.

Im Rasterelektronenmikroskop ähnelten die 10 Minuten in Waymouth-Medium mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln bei $37^\circ C$ inkubierten Rinderalveolarmakrophagen (Abb.61a) den auf Eis inkubierten Makrophagen; bei zahlreichen Zellen wurde aber bereits nach dieser Inkubationszeit eine glattere Zelloberfläche festgestellt. Nach 45 Minuten Inkubation bei $37^\circ C$ wiesen viele Zellen ausgedehnte Bereiche mit glatter Zelloberfläche auf, die ebenfalls lochartige Einsenkungen erkennen ließen (Abb.61b); nach dieser Inkubationszeit wurden auch mehrere unterschiedlich große Zellaggregate beobachtet. Nach 18 Stunden Inkubation bei $37^\circ C$ (Abb.61c) hatte weit mehr als die Hälfte der Zellen eine glatte Zelloberfläche.

Elektronenmikroskopische Schnitte durch 3 Stunden *in vitro* inkubierte Rinderalveolarmakrophagen (Abb.62 und 63) zeigen, daß $(U,Pu)O_2$ -Partikel sowohl einzeln als auch in Gruppen phagozytiert werden können. In Abbildung 62a und b sind innerhalb jeweils einer Schnittebene 3 aggregierte und 4 einzeln liegende Partikel

und Partikelbruchstücke angeschnitten. Besonders in der zweiten Abbildung, ist gut zu erkennen, daß die Partikelgruppe von einer gemeinsamen Membran umschlossen war. Abbildung 63a und b zeigen eine einzelne Partikel in einer stark formveränderten Zelle. Eine Vakuole um die Partikel fehlte hier; eine eng anliegende membranartige Struktur umgab den größten Teil der Partikel.

Nach 18 Stunden Inkubation in vitro (Abb.64a-d) waren viele der (U,Pu)O₂-haltigen Zellen auseinandergebrochen (Abb.64b und c), wobei die (U,Pu)O₂-Partikel größtenteils von einer Membran umschlossen im Medium flottierten. Untersuchungen mit Trypanblau ergaben eine Abnahme der Überlebensrate um etwa 45%; dieser Wert wurde allerdings auch bei den Kontrollkulturen ohne (U,Pu)O₂ nach dieser Inkubationszeit gefunden. Die unzerbrochenen, (U,Pu)O₂-Partikel enthaltenden Zellen (Abb.64a) waren alle weitgehend bis völlig abgerundet und zeigten somit nicht mehr die für die frühen Inkubationszeitpunkte typischen Auffaltungen und Pseudopodienbildungen an der Zelloberfläche. Zellen ohne (U,Pu)O₂ hatten zumindest zum Teil auch nach dieser Inkubationszeit eine unregelmäßige Oberfläche (Abb.64d).

Nach 4 Tagen Inkubation in vitro (Abb.65) waren die meisten Zellen abgestorben. Die nach dieser Inkubationszeit noch zu beobachtenden Zellen waren kugelig abgerundet, hatten eine glatte Zelloberfläche und enthielten zahlreiche große Vesikel, welche elektronenmikroskopisch weitgehend leer erschienen.

Beim Vergleich von Waymouth-Medium mit und ohne Zusatz von Penicillin und Streptomycin in bezug auf die Freisetzung von Enzymen und Proteinen aus den Makrophagen (Abb. 14 und 15) konnten für das cytoplasmatische Markerenzym Laktatdehydrogenase sowie für die Proteinkonzentration im Kulturüberstand kein Unterschied festgestellt werden. Darüberhinaus lag die Enzym- und Proteinkonzentration während der Inkubationszeit von 10 bis 150 Minuten im Konzentrationsbereich der Kontrollen. Bei Inkubation von Rinderalveolarmakrophagen in Waymouth-Medium ohne Antibiotika-Zusatz (Abb. 14) mit $(U,Pu)O_2$ nahm die Enzymaktivität von Laktatdehydrogenase und die Konzentration von Proteinen im Medium nur unwesentlich zu und blieb im Bereich der Enzym- und Proteinfreisetzung der Kontrolle ohne $(U,Pu)O_2$. Zusatz von Penicillin und Streptomycin zum Kulturmedium änderte daran nichts (Abb. 15).

Unterschiede fanden sich hingegen bei der Freisetzung des lysosomalen Markerenzym N-Acetyl- β -Glucosaminidase: Während die Enzymaktivität im Medium in Gegenwart von Penicillin und Streptomycin gegenüber der Kontrolle kaum erhöht war, konnte im antibiotikafreien Waymouth-Medium eine deutlich höhere Enzymkonzentration gegenüber der Kontrolle mit einem Maximum nach 45 Minuten beobachtet werden. Die mittlere Phagocytoserate war insbesondere während der ersten 10 Minuten höher ohne Antibiotika-Zusatz. Die Überlebensrate der kultivierten Zellen ohne Antibiotika lag bei Kontrolle und $(U,Pu)O_2$ -Kultur nach 3 Stunden bei 85%, nach 18 Stunden bei 20%. In den Kulturen mit Penicillin und Streptomycin sank die Überlebensrate nach 20 Stunden Inkubation von 90% auf 50%.

3.4. Ergebnisse nach differentieller Zentrifugation

3.4.1. Rattenlunge

Tab. 10 zeigt die Alpha-Aktivitätsverteilung in der N- und E-Fraktion sowie im Bindegewebe nach Rattenlungenhomogenisation. Weitgehend unabhängig von der Zeit und der Partikelcharakteristik wurden 5 bis 74 Tage nach intratrachealer Instillation 87 bis 98% der nicht im Bindegewebe enthaltenen Radioaktivität in der N-Fraktion gefunden.

7 bis 26% der Gesamt-Lungenaktivität blieben im als Bindegewebe bezeichneten Siebquetschenmaterial zurück; die Unterschiede in den ersten beiden Gruppen der Tabelle sind auf verschiedene Chargen der gleichen Partikelart zurückzuführen. Die Radioaktivitätsausbeute zeigte merkliche Schwankungen und lag zwischen 49 und 86% der Aktivität in der Lunge bei Sektion.

60 Minuten Vorverdauung der Lunge durch intratracheale Instillation einer Enzymlösung in HM führte mit 0,3% Elastase plus 0,025% Trypsin zu einer unwesentlichen Erhöhung der Radioaktivität in E nach 3, 9 und 76 Tagen. 30 Minuten Vorverdauung mit 0,3% Kollagenase plus 0,1% Trypsin führte 5 Tage nach intratrachealer Instillation von $(U,Pu)O_2$ zu einer Verdopplung der Alpha-Radioaktivität in E. Die gleiche Wirkung hatte eine einstündige Vorverdauung der Rattenlungen mit 0,2% Kollagenase plus 0,3% Elastase 12 Tage nach intratrachealer Instillation von $(U,Pu)O_2$.

Nach Homogenisation von Rattenleber 11, 47 und 155 Tage nach intravenöser Injektion irregulärer $(U,Pu)O_2$ -Partikel ($1 \mu m$ AMAD) sedimentierten mehr als 90% der Alpha-Radioaktivität von N+E in der N-Fraktion.

Tab. 11 zeigt die subzelluläre Verteilung von Alpha-Radioaktivität und Leitenzymen nach Rattenlungenhomogenisation 7 bis 56 Tage nach Instillation irregulärer 1 μ m-Partikel. Von der Radioaktivität waren nur 4%, von den lysosomalen Enzymen fast zwei Drittel und von der mitochondrialen Enzymaktivität 50% in der E-Fraktion, zusammen mit 74% des Gesamtproteins. Mit Ausnahme der Proteine, die vorwiegend in der S-Fraktion zurückblieben, war der größte Anteil der Radio- und Enzymaktivität aus der E-Fraktion in der ML-Fraktion sedimentierbar.

3.4.2. Rinderalveolarmakrophagen

Homogenisation von in vitro-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen führte zu einer sehr ähnlichen Radioaktivitätsverteilung wie in den Ganzlungenversuchen (Tab. 12). Homogenisation mit dem Dounce "S" anstatt mit den Dounce "L" hatte einen prozentual höheren Aktivitätsgehalt in E zur Folge. Gleichartig wirkten höhere Sedimentationskräfte, wobei aber die Radioaktivitätsausbeute deutlich abnahm. Um einen Vergleich mit Rattenlunge zu ermöglichen, wurde der höheren g-Zahl zur Untersuchung der subzellulären Enzym- und Radioaktivitätsverteilung trotzdem der Vorzug gegeben (Tab. 13). Drei Viertel bis vier Fünftel der Enzymaktivitäten für Lysosomen, Mitochondrien und perizelluläre Membranen waren zusammen mit einem Viertel der Radioaktivität in der E-Fraktion nachweisbar.

3.5. Dichtegradientenzentrifugation von intakten Makrophagen, der N- und der ML-Fraktion

3.5.1. Verhalten von intakten Makrophagen

Dreißigminütige Zentrifugation mit 2000 g von zuvor 90 Minuten mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln inkubierten Rinderalveolarmakrophagen ergab im Saccharose-Gradienten ein ausgeprägtes Alpha-Radioaktivitätsmaximum bei 1,18 g/cm³ (Abb. 16). Ein schwächerer Peak war bei der niedrigsten Dichte im Bereich des Auftragungsortes nachweisbar. Die Markerenzyme N-Acetylglucosaminidase und Laktatdehydrogenase zeigten eine entsprechende Verteilung; der Nebenpeak für das lysosomale Enzym war nur schwach, der des cytoplasmatischen Enzymes Laktatdehydrogenase hingegen deutlich ausgeprägt. Zehnminütige Vorinkubation mit Latexpartikeln, die in Saccharose nicht schrumpfen können und ihre Dichte von 1,05 g/cm³ behalten, verschoben sowohl den Alpha-Aktivitätshauptpeak als auch die Enzymmaxima deutlich in den niedrigeren Dichtebereich von etwa 1,13 g/cm³. Dies beweist einerseits die Assoziation der Hauptradioaktivität mit den Alveolarmakrophagen und andererseits die Integrität des größten Teils der Zellen bei der Auftrennung im Gradienten. Die Dichtegradientenzentrifugation freier Teilchen in Waymouth-Medium und in Waymouth-Medium mit 20% Kälberserum aus neugeborenen Tieren ergab ein sehr deutliches α -Aktivitätsmaximum im Dichtebereich 1,05 g/cm³ und ein schwaches Nebenmaximum bei etwa 1,10 g/cm³, wobei die Radioaktivitätsausbeute mit weniger als 20% äußerst gering war. Der Großteil der in den Fraktionen fehlenden Radioaktivität konnte sowohl hier als auch bei den meisten anderen Gradientenzentrifugationen mit freien Teilchen im

unteren Drittel des leeren Gradientenröhrchens nachgewiesen werden, war also an der Wand haften geblieben. Vorinkubation freier (U,Pu)O₂-Teilchen mit Latexpartikeln in Waymouth-Medium änderte nichts am Alpha-Aktivitätsprofil nach Zentrifugation im Saccharose-Gradienten, doch war die Alpha-Ausbeute mit etwas mehr als 30% besser.

Makrophagen, die 2 Stunden, 2 Tage und 6 Tage nach intratrachealer Instillation sphärischer (U,Pu)O₂-Partikel aus der Rattenlunge ausgewaschen worden waren, zeigten im linearen Percoll-Gradienten nach einer Stunde Zentrifugation bei 2000 g ein Alpha-Aktivitätsmaximum bei 1,07 g/cm³ (Abb. 17). Aus der Rattenlunge ausgewaschene Zellen hatten nach 2,5 Stunden Inkubation in HM mit sphärischen Teilchen ein Alpha-Aktivitätsmaximum bei geringerer Dichte von 1,05 g/cm³ in Percoll. Ähnlich war die Radioaktivitätsverteilung nach Zentrifugation von Rinderalveolarmakrophagen nach fünfzehnminütiger Inkubation mit (U,Pu)O₂ in Waymouth-Medium. Freie Teilchen fanden sich nach Auftrennung in Percoll größtenteils auf dem Gradienten, die Alpha-Ausbeute war mit 26% schlecht.

Die Auftrennung des gleichen Zellmaterials wie in Abb. 17 im linearen Ficoll-Gradienten (Abb. 18) führte bei den gleichen Zentrifugationsbedingungen mit ausgewaschenen aktiven Rattenmakrophagen zu einem Alpha-Aktivitätsmaximum bei 1,06 bis 1,07 g/cm³. Dort fand sich auch das Radioaktivitätsmaximum der in vitro-inkubierten Rindermakrophagen und ein schwach ausgeprägter Peak für die in vitro-Rattenmakrophagen. Die beiden Maxima am Anfang und am Ende dieser Gradienten entsprechen der Verteilung

freier Partikel in Ficoll. Auf das Vorhandensein vieler (U,Pu) O_2 -Partikel in den in vitro-Rattenmakrophagen-Gradienten weist die niedrige Radioaktivitätsausbeute zusätzlich hin.

3.5.2. Untersuchungen zur Radioaktivitätsverteilung nach Dichtegradientenzentrifugation der N-Fraktion

Nach Homogenisation von Rattenlunge und Auftrennung der daraus gewonnenen N-Fraktion im linearen Saccharose-Dichtegradienten war fast die gesamte Alpha-Aktivität im Dichtebereich 1,20 bis 1,25 g/cm³ zu finden (Abb. 19). Die Untersuchungen der N-Fraktion im Elektronenmikroskop zeigten, daß das Homogenat zum großen Teil neben Zellkernen aus größeren Zellbruchstücken bestand.

Das Verhalten der Radioaktivität aus N entsprach nicht dem Verhalten freier Partikel im Saccharose-Gradienten, da diese nach gleichartiger Auftrennung mit weniger als 10% Ausbeute am Auftragungsort bei 1,05 g/cm³ und bei 1,10 g/cm³ zu finden waren. Die Auftrennung der N-Fraktion aus Rattenleber nach intravenöser Injektion von irregulärem (U,Pu) O_2 im Saccharose-Gradienten zeigte die gleiche Radioaktivitätsverteilung wie N aus der Lunge. Im linearen Metrizamid-Gradienten war das Verhalten freier Partikel sehr ähnlich wie in Saccharose. Nach Auftrennung von N lag das Alpha-Aktivitätsmaximum bei etwas geringerer Dichte als in Saccharose.

Percoll erwies sich als wenig geeignet für die Auftrennung der N-Fraktion, da bei den gewählten Zentrifugationsbedingungen die Radioaktivitätsprofile mit denen freier Teilchen interferierten.

Ähnlich lagen die Verhältnisse nach Auftrennung der N-Fraktion aus *in vitro*-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im Saccharose- und Metrizamid-Dichtegradienten (Abb. 20). Der entsprechende Alpha-Aktivitätspeak lag bei etwas höherer Dichte; gleichzeitig trat ein ausgeprägter zweiter Peak am Auftragungsort bei etwa $1,05 \text{ g/cm}^3$ auf. In Nycodenz lag der untere Aktivitätspeak bei etwas geringerer Dichte als in Saccharose und Metrizamid; das Nebenmaximum im Bereich des Auftragungsortes der Proben enthielt fast 50% der gesamten im Gradienten meßbaren Radioaktivität.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der N-Fraktion aus der Rattenlunge ergaben, daß der überwiegende Teil der Lungenzellen aufgebrochen war. Ein Teil der Organellen blieb in unterschiedlich großen Zellbruchstücken eingeschlossen und sedimentierte mit den Kernen in der N-Fraktion (Abb.66). Desweiteren enthielt die N-Fraktion Gruppen von Bindegewebsfasern. Nach Auftrennung dieser N-Fraktion im Saccharose-Dichtegradienten wurde diejenige Fraktion mit dem Radioaktivitätsmaximum elektronenmikroskopisch untersucht (Abb.67); sie bestand überwiegend aus stark geschrumpftem membranösem Material, Kernbruchstücken und Bindegewebsfasern und zeigte somit eine ähnliche Zusammensetzung wie die ursprüngliche N-Fraktion.

Die bei der Homogenisation von Rattenlunge anfallende ML-Fraktion ist im elektronenmikroskopischen Bild in Abbildung 68 gezeigt: Neben viel membranösem Material (Plasmamembranen, Endoplasmatisches Retikulum und Vesikel anderer Herkunft) sind nur wenige Mitochondrien vorhanden.

Zum Vergleich mit dem Rattenlungen-ML ist in Abbildung 69 eine ML-Fraktion aus isolierten Rinderalveolarmakrophagen gezeigt: Auffällige Unterschiede sind die geringere Größe eines Großteils der Vesikel sowie das gehäufte Auftreten multivesikulärer Körper; vermutlich handelt es sich dabei um sekundäre Lysosomen.

3.5.3. Untersuchungen zur Radioaktivitäts- und Leitenzym- verteilung aus der Mitochondrien-Lysosomen-Fraktion (ML)

Das ML aus der Lunge einer 29 Tage zuvor mit sphärischen (U,Pu)O₂-Teilchen instillierten Ratte (Abb. 21) zeigte nach Auftrennung im Nycodenz-Dichtegradienten eine relativ gleichmäßige Alpha-Radioaktivitätsverteilung über den gesamten Dichtebereich. Die Trennung der Mitochondrien von den Lysosomen und Membranen war nicht optimal. Bemerkenswert ist der Unterschied in der Verteilung der beiden lysosomalen Enzyme: während die Arylsulfatase - ähnlich wie die 5'-Nucleotidase - eine zweigipflige Verteilung aufwies, wurde für die N-Acetyl-Glucosaminidase nur ein Maximum bei 1,14 g/cm³ gemessen.

Die gleichartige Auftrennung von ML aus in vitro mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im Nycodenz-Dichtegradienten (Abb. 22) ergab für N-Acetyl-Glucosaminidase ebenfalls ein Maximum, allerdings bei der wesentlich geringeren Dichte von 1,06 g/cm³. Die Glutamatdehydrogenase als Mitochondrienleitenzym hatte eine dem Rattenlungen-ML entsprechende Verteilung, das Membranleitenzym Alkalische Phosphodiesterase war bei niedriger Enzymaktivität relativ gleichmäßig über den gesamten Dichtebereich verteilt mit

einem schwach angedeuteten "Maximum" im unteren Dichtebereich. Bei einer mittleren Alpha-Radioaktivitätsausbeute von 43% waren zwei Maxima bei 1,05 und bei 1,19 g/cm³ zu beobachten.

Nach Auftrennung eines ML aus in vitro mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im Metrizamid-Dichtegradienten (Abb. 23) war die Alpha-Radioaktivitätsverteilung bei 65% Ausbeute ebenfalls zweigipflig. Das Hauptmaximum im unteren Dichtebereich trat bei etwas höherer Dichte auf als in Nycodenz, das wenig ausgeprägte zweite Maximum war am unteren Ende des Gradienten zu beobachten.

Die Verteilung der Leitenzyme nach Zentrifugation einer ML-Fraktion aus frischen nicht inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im Metrizamid-Dichtegradienten (Abb. 24) war ähnlich wie in Nycodenz. Die Mitochondrien waren sehr gut von den Lysosomen und von den Membranen abgetrennt. Für beide lysosomale Enzyme war neben dem Hauptmaximum bei 1,07 g/cm³ ein weiterer Peak bei 1,12 g/cm³ angedeutet. Die Alkalische Phosphodiesterase hatte eine zweigipflige Verteilung ähnlich den lysosomalen Enzymen, nur wurde der zweite Peak bei 1,11 g/cm³ zum Hauptmaximum.

Auftrennung der ML-Fraktion aus nicht inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im Saccharose-Dichtegradienten (Abb. 25) führte zu einer schlechten Trennung der einzelnen Leitenzyme für Lysosomen, Mitochondrien und Membranen. Die Verteilung der lysosomalen Enzyme war zweigipflig mit Dichten von 1,05 und 1,16 g/cm³ für die Maxima. Das zweite Maximum der lysosomalen

Enzyme war an der gleichen Stelle wie das Glutamatdehydrogenase-Maximum. Zwei- bis dreimaliges Waschen des ML mit HM + 1 mM EDTA vor der Auftrennung führte zu einer leichten Verschiebung des zweiten Maximums der N-Acetyl-Glucosaminidase bei gleichzeitigem starken Abnehmen des ersten Maximums; Saure Phosphatase, Glutamatdehydrogenase und Alkalische Phosphodiesterase wurden in Bezug auf ihre Dichteverteilung durch das Waschen nicht beeinflusst. Das Membranleitenzym Alkalische Phosphodiesterase zeigte eine von den anderen Enzymen etwas abweichende Verteilung mit einer breiten Verteilung über das Dichteintervall von 1,10 bis 1,20 g/cm³ mit angedeuteter Zweigipfligkeit bei 1,13 und 1,20 g/cm³. Die Auftrennung von ML aus in vitro mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im Saccharose-Dichtegradienten (Abb. 26) ergab für alle drei Organellklassen eine maximale Enzymaktivität bei etwa gleicher Dichte von 1,18 g/cm³. Das Alpha-Radioaktivitätsmaximum war breiter und mit einem wesentlichen Anteil zu noch höherer Dichte verschoben. Die Alpha-Radioaktivitätsausbeute lag bei 37%.

4. DISKUSSION

Zu Beginn der Diskussion möchten wir nochmals auf die eingangs formulierten Ziele dieser Arbeit verweisen, die die Analyse von Lungenretention, Phagocytose und intrazellulärer Ablagerung von (U,Pu)O₂-Partikeln sowie die Isolation und Auftrennung von Organellen aus Lungenzellen betrafen. Entsprechend soll im Folgenden auch die Diskussion der Ergebnisse gestaltet werden.

Lungenretention

Ein Vergleich unserer Ergebnisse nach (U,Pu)O₂-Inhalation mit denen in der Literatur zeigt sehr große Ähnlichkeiten in bezug auf die Retention in der Lunge; dies gilt für beide untersuchten Partikelformen (Abb. 70). Bezüglich der Translokation in andere Organe sind unsere Werte etwas höher als die der anderen Autoren; allerdings ist zu berücksichtigen, daß unsere Mischoxide mit 80% mehr Uran enthielten; nach Stather et al. (1979) führt steigender Urangehalt im Mischoxid zu steigender Pu- und Am-Translokation. In vitro-Löslichkeitsuntersuchungen ergaben beispielsweise (Eidson et al., 1983) für Hanford- (U,Pu)O₂ mit 74% Uran und 2.5 µm AMAD Löslichkeiten von 2% für Pu, 3% für Am und 10% für U nach 100 Tagen in 0,1 M HCl. Mewhinney et al. (1981a) berichten über Löslichkeiten von 1% für Pu, 1,5% für Am und mehr als 50% (!) für U innerhalb von 4 Wochen in einem synthetischen Blutserumultrafiltrat. Das gleiche Mischoxid zeigte nach Inhalation durch Fischer-344-Ratten (Mewhinney et al., 1981b) weniger als 2% Deposition außerhalb der Lunge im Körper und keine signifikant unterschiedliche Retention für Am und Pu in der Lunge. Interessant an dieser Studie ist darüberhinaus, daß in den Faeces das 50- bis 100-fache des mit dem Urin ausgeschiedenen Pu innerhalb eines Jahres gefunden wurde, welches einen direkten Beweis für die ganz überwiegende mucociliäre Clearance solchen

unlöslichen Materials darstellt. Bei Hund und Affe fand Mewhinney eine höhere Löslichkeit für Am in der Lunge verglichen mit Pu; Stanley et al. (1982) bestätigen diesen Befund, nannten aber für die Ratte eine schnellere ^{241}Am -Lungenclearance und eine etwa zehnfach höhere Deposition in Leber plus Skelett nach einem Jahr. In unseren Versuchen ließ sich eine statistisch nicht zu sichernde schnellere Clearance für ^{241}Am nur nach Inhalation sphärischer Partikel beobachten, nicht aber für die irregulären Partikel. Die Unterscheidung zwischen beiden Nukliden wurde dadurch erschwert, daß die Meßeffectivität für die ^{241}Am -60 keV-Gammalinie um mehr als den Faktor 50 niedriger war als für die Alphamessungen. Insgesamt kann das in dieser Untersuchung verwendete Material ebenfalls als biologisch unlöslich angesehen werden.

Die Deposition von inhalierten Partikeln in den Alveolen wird unter anderem beeinflusst von der Partikelgröße (TGLD, 1966; Brain und Valberg, 1979). Die intratracheale Instillation umgeht dieses Problem; mit dieser Technik lassen sich auch größere, bei der Inhalation nicht lungengängige Partikel in den Alveolen deponieren. Wie wir aus unseren Befunden schließen, sind die Clearanceraten für beide Applikationstechniken nach mehr als 2 Tagen grundsätzlich gleich. Vorteile für die Instillationsmethode sind die Deposition einer vorher bestimmbaren Dosis innerhalb kürzester Zeit und - bei Verwendung gefährlicher Stoffe - ein weitaus geringeres Risiko für den Experimentator.

Einer der wesentlichen Nachteile ist die sehr inhomogene

Radioaktivitätsverteilung in der Lunge: Während nach Inhalation eine weitgehend homogene Verteilung der Alpha-Aktivität zu erzielen ist (siehe auch Tabellen zur relativen Radioaktivitätskonzentration in den einzelnen Lungenlappen), konnten in unseren Versuchen bis zu 80% des deponierten Materials in einem Areal gefunden werden, das etwa einem Viertel der Lungenmasse entsprach. Brain et al. (1976) fanden ebenfalls homogenere Aerosolkonzentrationen in der Lunge von Sprague-Dawley-Ratten nach Inhalation von $^{99m}\text{Tc}_2\text{S}_7$ -Kolloiden ($0,01-3\mu\text{m}$ GMD) als nach Instillation dieser Kolloide. Pritchard et al. (1985) beobachteten bei der Auswertung von Autoradiografien von Lungenschnitten eine bis viermal höhere lokale CeO_2 -Konzentration nach Instillation verglichen mit Inhalation; die höchste relative ^{141}Ce -Konzentration fanden sie nach Neutronenaktivierung des CeO_2 im apikalen Lungenlappen 2. Raabe et al. (1977) beobachteten nach Inhalation von ^{169}Yb -markierten Aluminiumsilikatpartikeln mit $0,5-3\mu\text{m}$ aerodynamischem Durchmesser die höchste Konzentration bei Ratte und Syrischem Goldhamster ebenfalls im apikalen Lungenlappen 2 mit steigender Deposition bei steigendem Durchmesser. Diese Befunde können wir für die Aerosolverteilung in der Lunge nach Inhalation von $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ und von Co_3O_4 bestätigen. Während zu frühen Zeiten nach Inhalation der größeren Co_3O_4 -Partikel ($2,7\mu\text{m}$ AMAD) relativ viel mehr ^{57}Co im Lungenteil 2 meßbar war als nach Inhalation der kleineren Co_3O_4 -Partikel (AMAD: $1,4\mu\text{m}$), war dieser Unterschied nach Inhalation irregulärer (AMAD: $1,5\mu\text{m}$) und sphärischer (AMAD: $0,9\mu\text{m}$) $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ -Partikel sehr gering. Grundsätzlich konnten die von Morgan et al. (1983) mit PuO_2 an Mäusen gewonnenen Ergebnisse, daß größere Partikeldurchmesser die

relative Konzentration in Lungenteil 2 erhöhen, bestätigt werden.

Wird nach Raabe et al. (1977) das Atemminutenvolumen der Ratte mit 111 ml angenommen, so sind 3 Tage nach der (U,Pu)O₂-Inhalation im Mittel 20±1% des mit diesem Atemminutenvolumen theoretisch inhalierten Mischoxides in der Lunge deponiert, nach intratrachealer Instillation aber etwa 80% der instillierten Dosis. Der Wert für die alveoläre Deposition nach Inhalation stimmt sehr gut mit der Literatur überein (ICRP, 1986: 25% für den Menschen).

Zu späteren Zeiten ist das Verhalten instillierten und inhalierten Materials kaum unterschiedlich in der Rattenlunge. Eine etwas höhere Clearance-Rate für größere Teilchen wurde von Mewhinney et al. (1976) für ²³⁸PuO₂ berichtet. Dort handelte es sich um Inhalationsversuche mit Hunden unter Verwendung sphärischer Partikel mit 0,8µm, 1,3µm, 1,9µm und 3,0µm AMAD.

Umgekehrt lagen die Verhältnisse für die Kobaltoxid-Retention: obwohl das bei 800°C geglühte Co₃O₄ nur schwer löslich war (Kreyling und Ferron, 1984), ist es am ehesten wahrscheinlich, daß die Retentionsunterschiede auf eine höhere Löslichkeit für die kleineren Partikel zurückzuführen sind. Ein weiterer Grund für die schnellere Clearance der kleineren Partikel dürfte deren homogenere Verteilung in der Lunge gewesen sein. Bailey et al. (1986) zeigen neben unseren Ergebnissen mit Sprague-Dawley-Ratten ähnliche Lungenretentionen des Kobaltoxids in anderen Rattenstämmen sowie den Vergleich mit anderen Säugerarten. Rhoads

und Sanders (1985) bestimmten für bei 600°C geglühtes Co_3O_4 nach intratrachealer Instillation von 1,5 μg pro Tier in Fischer-344-Ratten eine Halbwertszeit von 15 Tagen für die Lungenretention sowie keine nennenswerte Ablagerung in anderen Organen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ -Partikel sowohl nach Inhalation als auch nach Instillation in der Rattenlunge ähnlich verhalten, solange die Dosis relativ niedrig ist. Mit steigender Dosis zeigen die Clearance-Mechanismen nach Instillation wesentlich früher eine Verlangsamung als nach Inhalation. Als plausibelste Ursache können wir radiotoxische Effekte auf Alveolarmakrophagen und damit einen hemmenden Effekt auf die mechanische Clearance annehmen. Die Alveolarmakrophagen nehmen nach Sanders (1972) über 95% der in den Alveolen deponierten Mischoxide auf. Wahrscheinlich gelangen mit steigender Dosis und entsprechend höherer Partikelzahl auch mehr Partikel über Typ-I-Alveolarzellen (Sanders et al., 1977) in die Alveolarwände und können dort von interstitiellen Zellen aufgenommen werden. Dies würde zu einer wesentlich verlängerten Retention dieser Partikel führen. Sanders et al. (1977) fanden nach Inhalation von PuO_2 (AMAD: 2,5 μm) bei weniger als 9 bis 18 kBq/kg keine Aggregation von PuO_2 -Partikeln innerhalb einzelner Alveolarmakrophagen und ungefähr 50 Tage Halbwertszeit für die Rattenlungenretention. Bei höheren Dosen fanden sie Änderungen in der Lungenclearance infolge früher Makrophagen-Toxizität. Zahlreiche Autoren (z.B. Moores et al., 1983) berichten übereinstimmend von einer deutlichen Abnahme der Zellzahl und der Vitalität von Alveolarmakrophagen nach Inhalation von mehr als 20

Bq $^{239}\text{PuO}_2$ in der Mäuselunge. Bair et al. (1973) geben für einen $^{239}\text{PuO}_2$ -Partikel von $0,25\mu\text{m}$ Durchmesser eine Dosisbelastung von 5 rad/h für den diesen Partikel enthaltenden Phagocyten an.

Wie schon erwähnt, haben wir zur Ergänzung und als Kontrolle die Teilchen auch intravenös injiziert. Partikuläres Material im Blut gelangt normalerweise fast vollständig in die Leber (Priest und Haines, 1982); dies wurde von uns auch für $(\text{U},\text{Pu})\text{O}_2$ nach intravenöser Injektion gefunden. Smith et al. (1977) erhielten nach intravenöser Injektion von $^{239}\text{PuO}_2$ in die Ratte über 80% Deposition in der Leber für Partikelgrößen von $0,025$ bis $1,2\mu\text{m}$. Weniger als 10% injizierter $0,001\mu\text{m}$ -Partikel wurden in der Leber deponiert; über 60% dieses Materials wurden im Restkadaver und somit vermutlich hauptsächlich im Skelett abgelagert. Für keine der untersuchten Partikelgrößen betrug die Deposition in der Lunge allerdings mehr als 2%, während wir für irreguläres Material mehr als 10% fanden. Eine mögliche Erklärung für die hohe Deposition dieser Partikel in der Lunge geben Wilkins und Myers (1972): Für negativ geladene Kolloide geben sie als Depositionsort vorwiegend die Leber an, für positiv geladene Kolloide anfangs zum Teil die Lunge. Eine andere Erklärung wäre die Annahme, daß sich im Blut größere Aggregate bilden, die in den Lungenkapillaren abgefangen werden.

Unsere Ergebnisse mit intravenös injizierten Partikeln zeigen, daß aus der Lunge ins Blut übertretendes partikuläres Material vorwiegend in die Leber gelangt. Lösliches Pu wird vorwiegend im Skelett deponiert (Sütterlin, 1982). Die geringe und wenig unterschiedliche Deposition von Radioaktivität in Leber und Femur

und die langsame Radioaktivitätszunahme im Femur mit der Zeit sprechen für eine vorwiegende Translokation löslichen Materials aus den in der Lunge deponierten Mischoxiden ins Blut. Die elektronenmikroskopisch gefundene niedrige Elektronendichte angeschnittener Partikel in der Rattenlunge 473 Tage nach intratrachealer Instillation ist ein Hinweis für eine solche langsame Solubilisierung partikulären Materials.

Bronchoalveoläre Lavage und Autoradiografie dienten zur Untersuchung der $(U,Pu)O_2$ -Partikelaufnahme durch Alveolarmakrophagen in der Rattenlunge. Aus methodischen Gründen erwies sich drei- oder viermalige Lavage als optimal, obwohl damit nicht alle freien Zellen und nur ein Teil der alveolär deponierten Radioaktivität auszuwaschen waren. Brain und Frank (1968) beispielsweise wuschen aus Sprague-Dawley-Ratten mit zwölfmaliger Lavage die doppelte Makrophagenzahl aus im Vergleich zu viermaliger Lavage in der vorliegenden Studie. Mindestens 30% des instillierten Mischoxides waren mit viermaliger Lavage nach 2 Stunden auswaschbar (Abb. 8). Der Prozentsatz an auswaschbarer Radioaktivität nahm in den ersten Tagen viel schneller ab als der Radioaktivitätsgehalt der Lunge. Dies spricht für eine Translokation von Partikeln aus den Alveolen in die Alveolarsepten (siehe auch elektronenmikroskopische Befunde für Rattenlunge nach intratrachealer Instillation: Partikel in interstitiellen Makrophagen). Eine Therapie durch Lavage zur Reduzierung inhalierten unlöslichen Materials in der Lunge wäre somit auch im Falle der $(U,Pu)O_2$ -Partikel nur innerhalb der ersten Stunden sinnvoll, solange freie Partikel, die ins Interstitium gelangen können, in den Alveolen vorhanden sind. Die

für die Bestimmung der in vivo-Phagocytose benutzte Autoradiografie hat den Nachteil, daß bei zellassoziierter Radioaktivität nicht unterschieden werden kann zwischen Aufnahme von Partikeln in Makrophagen und Adsorption an deren Oberfläche. Die tatsächlichen Phagocytoseraten waren somit wahrscheinlich besonders zu frühen Zeiten etwas niedriger als die mit dieser Methode ermittelten Werte. 2 Stunden nach Instillation sphärischer Partikel war die Hälfte der auswaschbaren Partikel nicht zellgebunden; weniger als 10% der ausgewaschenen Zellen enthielten Radioaktivität. Sanders (1969) fand mit vier Lavages nach Inhalation wesentlich höherer Dosen von $^{239}\text{PuO}_2$ nach einer Stunde 51% der Partikel in 47% der ausgewaschenen Zellen, nach 3 Stunden 83% der Partikel in 74% der Zellen und nach 2 Tagen 91% der Partikel in 75% der Zellen mit autoradiografischer Bestimmung. Da die dort deponierte höhere Partikelzahl zu einem wesentlich höheren Prozentsatz von mit Radioaktivität beladenen Makrophagen führte, so ist es in unserem Falle wahrscheinlich, daß mehr als 10% phagocytotisch aktive Makrophagen in den Alveolen vorhanden waren, die instillierte Partikelzahl aber nicht ausreichte, alle zur Phagocytose zu veranlassen.

Das Vorkommen freier (U,Pu) O_2 -Partikel nach mehr als 2 Tagen geht möglicherweise auf die Freisetzung von Partikeln aus zerstörten Makrophagen in die Alveolen zurück. Die kurze biologische Halbwertszeit von 4 Tagen für Alveolarmakrophagen (Bowden, 1984) macht solche Partikelfreisetzungen und ihre Wiederaufnahme durch andere Alveolarmakrophagen erforderlich, um die weitaus längeren Halbwertszeiten der Lungenretention dieser Partikel zu erklären.

In vitro-Phagocytose

Zur Untersuchung der Phagocytose von (U,Pu)O₂-Partikeln wurde von uns ein in vitro-Modell mit Rinderalveolarmakrophagen entwickelt. Diese Zellen können in sehr hoher Ausbeute erhalten und für mindestens 20 Stunden problemlos in Kultur genommen werden.

Das Hauptproblem bei der Bestimmung der Phagocytoseraten in vitro ist die Unterscheidung in phagocytiertes und nur an die Zelloberflächen gebundenes Material. Unterhalb 18°C findet keine Phagocytose statt; die Bindung von Partikeln an den Zelloberflächen wird durch Temperaturabsenkung nicht beeinflusst (Silverstein et al., 1977). Durch Inkubation auf Eis läßt sich der nicht phagocytierte Anteil der Partikel bestimmen. Der Anteil co-sedimentierender freier Partikel wurde von Robinson und Schneider (1980) durch differentielle Zentrifugation von in vitro mit ²⁴¹AmO₂ inkubierten Kaninchenalveolarmakrophagen in 23%iger Rinderserumalbuminlösung bestimmt, wobei die intakten Zellen oben blieben, die freien Partikel aber sedimentierten. Hahn et al. (1977) benutzten ein ähnliches System für die Trennung von Kaninchenalveolarmakrophagen und ²³⁹PuO₂-Partikeln in 30% Ficoll. Beide obengenannten Methoden zur Quantifizierung nichtphagocytierter Partikel wurden in den Saccharose-Dichtegradientenbestimmungen kombiniert angewandt; für die Zentrifugationsmethode wurde die Phagocytosehemmung bei niedriger Temperatur zur Bestimmung der nichtphagocytierten Radioaktivität im Zellpellet verwendet.

Von den beiden Methoden ist die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation genauer. Erstens ist die Zellossoziation von

Mischoxidpartikeln durch die Überlagerung von zellulären Leitenzymen mit dem Radioaktivitätsprofil sowie deren Verschiebbarkeit durch Aufnahme von Latex in die Zellen (Abb. 16) direkt beweisbar. Zweitens ist die Überlagerung zellulären Materials mit freien Partikeln weitgehend auszuschließen, da sich nach Auftrennung freier Partikel in dem in Frage kommenden Dichtebereich so gut wie keine Radioaktivität nachweisen ließ. Die weitgehende Übereinstimmung der Resultate beider Methoden (Abb. 13) bestätigt, daß jede gut geeignet war, um die echte Phagocytoserate zu ermitteln.

Durch Hinzunahme der elektronenmikroskopischen Ergebnisse wird bewiesen, daß Phagocytose durch Rinderalveolarmakrophagen *in vitro* tatsächlich stattfand und die Partikel im Zellinnern deponiert wurden. Die Frage nach dem "Ort" der Deposition wird später im Zusammenhang mit differentieller und Dichtegradientenzentrifugation diskutiert.

Mit der Zentrifugationsmethode wurde während zweistündiger Inkubation von Rinderalveolarmakrophagen mit $(U,Pu)O_2$ in HEPES-Medium eine lineare Zunahme der in die Zellen aufgenommenen Radioaktivität gemessen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Robinson und Schneider (1980) und von Hahn et al. (1977). Bei Verwendung von Waymouth-Medium für die Inkubation (Desai und Richards, 1983) wurde eine schnelle Radioaktivitätsaufnahme innerhalb der ersten 10 Minuten beobachtet; danach erfolgte die weitere Zunahme der Radioaktivität bis zu 2 Stunden Inkubation sehr viel langsamer, aber stetig. Ähnlich ermittelten Warheit et al. (1984) das Phagocytosemaximum für Carbonyl-Eisen-Partikel in Gegenwart von Kälberserum mit 55% nach einer Stunde und danach

keine wesentliche Änderung mehr. Zeidler und Kim (1985) beobachteten ein Maximum der Aufnahme von "Oil Red O" (Sigma) durch Schweinealveolarmakrophagen nach Inkubation in BSS bereits nach wenigen Minuten Inkubation.

Alle weiterführenden Untersuchungen wurden mit Waymouth-Medium durchgeführt, da es sich durch wesentlich höhere Phagocytoseraten gegenüber HEPES-Medium auszeichnete (Abb. 9). Der Zusatz von Rinderserum (NCS) und von Rinderserumalbumin (BSA) führten zu einer deutlichen Phagocytosesteigerung während der ersten 10 Minuten (Abb. 11). Die von Robinson und Schneider (1980) beobachtete Verdopplung der Phagocytoserate nach BSA-Zugabe und 1 bis 2 Stunden Inkubation mit $^{241}\text{AmO}_2$ war in unseren Versuchen mit $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ nur bis zu einer Stunde Inkubation zu beobachten. 20% NCS im Medium hatten bei uns die gleiche Wirkung wie Albumin, wohingegen Robinson und Schneider mit 10% foetalem Kälberserum zwar eine Steigerung gegenüber der Kontrolle, aber eine deutlich niedrigere Phagocytoserate als mit Albumin erhielten.

Sowohl nach NCS- als auch BSA-Zusatz zum Kulturmedium ist eine Opsonierung der Partikel denkbar, die dazu führt, daß Partikel an Fc - oder/und C_3b -Rezeptoren der Makrophagen gebunden werden und somit über den immunspezifischen Phagocytosemechanismus in die Zelle gelangen können. Ein Anhaltspunkt für diese Vermutung ist die von Zeidler und Kim (1985) gefundene Verdreifachung der "Oil Red O"-Aufnahme durch Schweinealveolarmakrophagen nach Opsonierung der Partikel. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich, zumindest bei NCS-Zugabe, um eine Reaktion der Zellen auf irgendeinen im Serum enthaltenen

Makrophagen-stimulierenden Faktor handeln könnte, der für die Steigerung der Phagocytoserate verantwortlich zu machen ist.

Surfactantzusatz zum Waymouth-Medium hatte ebenfalls eine Zunahme der Radioaktivität in den Zellen zur Folge; die Steigerung war aber deutlich geringer als nach NCS- und BSA-Zusatz. Surfactant enthält offenbar keine Komponenten, die zu einer die Proteinwirkung übertreffenden Phagocytosesteigerung führen. Somit ist in der Anwesenheit von Proteinen am wahrscheinlichsten das phagocytoseaktivierende Prinzip zu vermuten.

Die Zellkulturen mit Rinderalveolarmakrophagen waren während der ersten 3 Stunden ohne und mit Penicillin/Streptomycin weitgehend stabil. Dies zeigte sowohl die hohe Überlebensrate während der Inkubation als auch die geringe Protein- und LDH-Aktivitätszunahme in den Kulturüberständen (Abb. 14 und 15). Nach 20 Stunden Inkubation waren die Unterschiede in der Überlebensrate der Zellen hingegen deutlich. In den Penicillin/Streptomycin-haltigen Kulturen überlebten weit mehr Zellen.

Da die Überlebensraten und die Protein- und LDH-Konzentrationen im Kulturüberstand von Kontrollen und mit (U,Pu)O₂-Partikeln inkubierten Kulturen während der ersten 3 Stunden nicht signifikant verschieden waren, können direkte cytotoxische Effekte durch die hier verwendeten (U,Pu)O₂-Konzentrationen als vernachlässigbar gering betrachtet werden. Anders verhält es sich mit der erhöhten Freisetzung lysosomaler Enzymaktivität in Abwesenheit von Penicillin/Streptomycin in den (U,Pu)O₂-haltigen

Kulturen. Eine erhöhte Freisetzung des lysosomalen Enzyms infolge Zelltod kann durch die gleichzeitig nur geringe Zunahme von LDH und Protein im Kulturüberstand ausgeschlossen werden. Da das Bakterienwachstum in diesen Kulturen nicht gehemmt war, könnte die erhöhte NAG-Freisetzung durch eine Makrophagen-Bakterien-Wechselwirkung, sei es durch Phagozytose derselben oder durch andere, unbekannte Effekte verursacht worden sein.

Keeling und Henson (1982) fanden eine fünffach erhöhte β -Glucosaminidase-Freisetzung nach einstündiger Inkubation von menschlichen Monocyten mit Latexpartikeln (5,7 μm) in Hanks-Medium mit 0,25% BSA in Abwesenheit von Penicillin/Streptomycin. Phagozytose opsonierter Zymosan-Partikel führte zu einer noch höheren Freisetzung dieses Enzyms. Im Gegensatz dazu beobachteten Pailes et al. (1984) keine erhöhte NAG-Freisetzung nach Inkubation von Kaninchenalveolarmakrophagen mit Latexpartikeln (1,09 μm) in Gegenwart von Penicillin/Streptomycin und Kanamycin in Medium 199. Mit Asbest (Chrysotil) hingegen fanden sie eine erhöhte NAG-Freisetzung ins Medium, die proportional mit der Asbestkonzentration anstieg.

Intrazelluläres Verhalten

Eine der wesentlichen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit betraf den Ablagerungsort der (U,Pu) O_2 -Partikel in der Zelle. Eine oft benutzte analytische Methode zur Klärung dieser Frage ist die subzelluläre Verteilung der zu untersuchenden Komponenten nach Homogenisation und differentieller Zentrifugation des biologischen Materials, deren Ergebnisse zunächst diskutiert werden sollen. Anschließend werden wir auf unsere

elektronenmikroskopischen Befunde zurückkommen.

Im Gegensatz zum Verhalten löslicher ^{239}Pu - und ^{241}Am -Verbindungen in der Leber verschiedener Säugerarten (Boocock et al., 1970; Bruenger et al., 1976; Gruner, 1978; Gruner et al., 1981; Winter und Seidel, 1982), die überwiegend in der E-Fraktion zu finden waren, sedimentierte der größte Teil der Alpha- und Gamma-Radioaktivität in der N-Fraktion. Dies galt für die Rattenlunge nach intratrachealer Instillation ebenso wie für in vitro-inkubierte Rinderalveolarmakrophagen und auch für die Rattenleber nach intravenöser Injektion von $(\text{U,Pu})\text{O}_2$. Subzelluläre Fraktionen aus der Rattenlunge zu verschiedenen Zeiten nach intratrachealer Instillation waren in bezug auf die Radioaktivitätsverteilung so wenig verschieden, daß eine zeitliche Änderung des Sedimentationsverhaltens ausgeschlossen werden kann (Tab. 10). Die subzelluläre Verteilung der Radioaktivität zeigte nach intratrachealer Instillation in die Rattenlunge für sphärische und für irreguläre $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ -Partikel keinen signifikanten Unterschied - ein Beweis für das gleichartige Verhalten beider Partikelformen in der Zelle.

Für den hohen Anteil der Radioaktivität in der N-Fraktion sind mehrere Ursachen denkbar:

1. Die meisten der Zellen, die die Radioaktivität enthalten, sind nach der Homogenisation noch unzerstört und sedimentieren in N.

So könnten Makrophagen, die nur 6% der Lungenzellen (Barry et al., 1979) und nur 1% des Lungenvolumens ausmachen (Sanders et

al., 1977), als überwiegend freibewegliche Zellen im Lungengewebe einer mechanischen Zerstörung bei der Homogenisation zu einem großen Teil entgehen. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung entsprechender N-Fractionen wurden mehrere nur leicht beschädigte Zellen sowie zahlreiche größere Zellbruchstücke beobachtet. Für eine überwiegend gute Homogenisation der Zellen spricht aber das Auftreten von 60 bis 75% der Rattenlungenlysosomen (Tab. 11) und von fast 80% der Lysosomen aus Rinderalveolarmakrophagen (Tab. 13) in der E-Fraktion (abgeleitet aus der subzellulären Verteilung der lysosomalen Leitenzyme). Das zu geringerer Dichte verschobene Radioaktivitätsmaximum nach Auftrennung von N aus Rattenlunge in Percoll (Abb. 19) im Vergleich zur Auftrennung intakter (U,Pu)O₂-haltiger Rattenalveolarmakrophagen in Percoll (Abb. 17, oben) ist ebenfalls ein Hinweis auf die überwiegende Zerstörung der Zellen infolge der Homogenisation.

2. Freie Partikel sedimentieren aufgrund ihrer hohen theoretischen Dichte als solche oder unspezifisch an schwere Komponenten des Homogenates gebunden in der N-Fraktion.

Freie Partikel waren in Gegenwart von HM oder von Kulturmedium nur zu maximal 30% sedimentierbar. Sowohl nach Inkubation von Rattenlungen-Homogenaten mit irregulären Partikeln in HM auf Eis als auch nach Inkubation von N und von ML aus Rinderalveolarmakrophagen in HM mit 1mM EDTA auf Eis sedimentierten 70% der Radioaktivität in N. Auftrennung des N-Pellets im Saccharose- und im Metrizamid-Dichtegradienten ergab im ersten Fall ein Radioaktivitätsmaximum bei etwa 1,20 g/cm³,

für die auf Eis inkubierten Rinderalveolarmakrophagen-Fraktionen ein Radioaktivitätsmaximum zwischen 1,05 und 1,10 g/cm³ und bei 1,20 g/cm³ nur ein schwaches Nebenmaximum für die Radioaktivität (Daten nicht gezeigt). Aus der hohen Sedimentationsrate für die Radioaktivität läßt sich eine ausgeprägte unspezifische Bindung freier Partikel an biologisches Material ableiten, die im ersten Fall sehr fest war, da die Radioaktivität überwiegend zusammen mit einem wesentlichen Teil biologischen Materials bei hoher Dichte in den Gradienten zu finden war. Da das Verhalten irregulärer Partikel nach intravenöser Injektion dem von positiv geladenen Partikeln entsprach (siehe oben) und nach Arborgh et al. (1974b) Kationen Verklumpung und Aggregation cytoplasmatischer Komponenten verursachen können, könnte diese feste Bindung zwischen irregulärem (U,Pu)O₂ mit zellulären Komponenten in den Dichtegradienten eine den Zentrifugationskräften widerstehende Ionenbindung an negativ geladene Strukturen der Zellen sein. Im zweiten Fall ähnelte die Dichteverteilung der Radioaktivität in den Gradienten eher derjenigen freier Partikel, worauf auch die dort beobachtete schlechte Radioaktivitätsausbeute von weniger als 20% hinweist.

Die Adsorptionsfähigkeit freier Partikel an biologisches Material könnte nach dem eben Gesagten tatsächlich zu einer Erhöhung der Radioaktivität in der N-Fraktion führen, sobald (U,Pu)O₂-Partikel während der Homogenisation entweder direkt aus dem Cytoplasma (siehe elektronenmikroskopische Befunde: Partikel frei im Cytoplasma) oder aus zerstörten Organellen freigesetzt werden. Die Frage nach primärer oder sekundärer Assoziation von Partikeln

mit Organellen ist mit den Ergebnissen der differentiellen und der Dichtegradientenzentrifugation nicht sicher zu beantworten; niedrige Radioaktivitätsausbeuten weisen aber auf sekundäre Bindungen hin, wobei ein Teil des freigesetzten Materials durch Adsorption an die Gefäßwände verlorengehen dürfte.

3. Das (U,Pu)O₂ ist zwar in den Phago(lyso)somen, ändert deren Dichte aber dahingehend, daß sie in der N- anstatt in der ML-Fraktion sedimentieren.

Für Dichteänderungen von zellulären Vesikeln nach Inkorporation von zellfremdem Material finden sich zahlreiche Hinweise in der Literatur. So wurde die Abnahme der Dichte isolierter Phagolysosomen aus Kaninchenalveolarmakrophagen (Werb und Cohn, 1974) und aus Amöben (Wetzel und Korn, 1969) nach Phagocytose von Latexpartikeln im Saccharose-Dichtegradienten nachgewiesen. Wir konnten diese Dichteänderung, wie gezeigt, sogar für intakte Zellen nachweisen (Abb. 16). Längere Inkubationszeiten bei Wetzel und Korn sowie BCG- (BCG=Bacillus Calmette Guerin; Sorber et al., 1974) statt Latex-Inkubation führte zu Dichteerhöhungen der Phagolysosomen. Entsprechend war die Dichte lysosomaler Enzyme nach Auftrennung eines Homogenates aus thioglycollatstimulierten Mäuseperitonealmakrophagen im Saccharose-Dichtegradienten erhöht, wobei eine erhöhte Fragilität der schweren Granula während der Homogenisation beobachtet wurde (Wiener und Curelaru, 1974). Eine Erhöhung der Dichte von Lysosomen der Leber ließ sich durch intravenöse Injektionen von Jectofer^R, einem Eisencitrat-Sorbitol-Komplex (Arborgh et al., 1974a; Winter, 1980) hervorrufen. Veränderungen in der Dichte von Phago(lyso)somen durch Einlagerung von (U,Pu)O₂-Partikeln sind

nach den oben genannten Beispielen als durchaus möglich anzunehmen.

Nach unserer Meinung ist die im 3. Punkt angesprochene Dichteerhöhung der Phago(lyso)somen hauptverantwortlich für die Sedimentation der Radioaktivität in N nach der Homogenisation von Rattenlunge. Durch die gründlichere Homogenisation von Rinderalveolarmakrophagen im Dounce-"S"-Homogenisator werden dort die unter 2. beschriebene Partikelfreisetzung und die sekundären Bindungsprozesse als weiterer wesentlicher Effekt angenommen. Die unvollständige oder fehlende Zellzerstörung spielt nur eine untergeordnete Rolle.

Die nach Auftrennung der N-Fractionen in Saccharose, Metrizamid und Nycodenz gefundenen Radioaktivitäts-Dichteprofile mit den Hauptmaxima bei hoher Dichte (Abb. 19 und 20) konnten mit keinem der Organelleitenzyme nach Auftrennung aktiver und inaktiver ML-Fractionen im jeweils gleichen Dichtemedium zur Deckung gebracht werden, womit gezeigt werden konnte, daß keine unverändert "normalen" Lysosomen, Mitochondrien oder Membranen als Bindungsorte der Partikel in Frage kommen konnten. Elektronenmikroskopische Präparate der radioaktiven Fractionen nach Auftrennung von N aus Rattenlunge im Saccharose-Dichtegradienten enthielten neben Zellkernen geschrumpftes vesikuläres Material und verschieden große Zellbruchstücke.

Das Auftreten eines Teils der Radioaktivität bei niedrigen Dichten nach Auftrennung der N-Fraktion aus in vitro-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen (Abb. 20) kann das Vorhandensein freier

(U,Pu)O₂-Partikel in den Gradienten als Ursache haben, die durch die verhältnismäßig kräftige Homogenisation durch den Dounce "S" sekundär freigesetzt wurden. Die niedrige Radioaktivitätsausbeute in Saccharose spricht für, die relativ hohen Ausbeuten in Metrizamid und Nycodenz gegen diese Annahme. Eine weitere Ursache könnte die Anwesenheit leichter Phago(lyso)somen mit (U,Pu)O₂ in diesen Fraktionen sein. Diese Möglichkeit soll anhand der Ergebnisse mit den ML-Fraktionen diskutiert werden.

Unsere Dichtegradientenuntersuchungen mit der ML-Fraktion haben aus zweierlei Gründen für die Bestimmung der intrazellulären Ablagerung von (U,Pu)O₂-Partikeln offenbar keine entscheidende Bedeutung erlangt. Erstens ist der in ML zu findende Prozentsatz an Radioaktivität so gering, daß er kaum repräsentativ für die gesamte deponierte Radioaktivität sein dürfte. Zweitens ist nach (U,Pu)O₂-Aufnahme in Zellorganellen mit einer Dichteänderung derselben zu rechnen; da wegen der geringen Partikelzahlen pro Zelle in vivo und in vitro nur ein Bruchteil dieser Organellen betroffen sein kann, ist nach Auftrennung der Organellen im Dichtegradienten mit einer deutlichen Diskrepanz zwischen Enzymhaupt- und Radioaktivitätsprofil zu rechnen. Steinman et al. (1983) geben für kultivierte Makrophagen über 1000 Lysosomen pro Zelle an, die mindestens 2 bis 5% des Zellvolumens ausmachen. Der (U,Pu)O₂-Partikelgehalt kann selbst bei optimistischer Schätzung in Anlehnung an elektronenmikroskopische und autoradiografische Befunde in vitro kaum mehr als 10 Partikel pro Zelle betragen. Auf ein Phagolysosom mit (U,Pu)O₂ kämen so 100 Lysosomen, ein Verhältnis, das obige Annahme vollauf bestätigt.

Saccharose-Dichtegradienten erwiesen sich als wenig geeignet zur Abtrennung der Mitochondrien von den Lysosomen. Für den leichten Anteil der Membranen war eine Abtrennung von den übrigen Organellen aber möglich (Abb. 25). Diese leichte Membrankomponente verschwand bei Auftrennung von ML aus mit $(U,Pu)O_2$ inkubierten Rinderalveolarmakrophagen (Abb. 26). Wegen der gleichzeitigen Überlagerung mit dem größten Teil des Radioaktivitätsprofils wird eine Bindung schwerer $(U,Pu)O_2$ -Partikel an diese Membrankomponente vermutet, die die Verschiebung bewirkte. Membrangebundene, aber noch nicht phagozytierte Partikel oder während der Homogenisation freigesetzte und sekundär an Membranbruchstücke gebundene Partikel können diese Membranverschiebungseffekte verursacht haben.

Mit Metrizamid und Nycodenz konnte eine gute Trennung der Mitochondrien von den Lysosomen erreicht werden. Lysosomen und Membranen waren infolge der ähnlichen Dichteverteilung nicht voneinander zu trennen. In Nycodenz stimmte die Dichteverteilung der Radioaktivität mit keinem der untersuchten Leitenzyme überein (Abb. 21 und 22), hatte aber Ähnlichkeiten mit der NAG-Verteilung im niedrigen Dichtebereich.

Im unteren Dichtebereich in Metrizamid zeigte das Radioaktivitäts-Dichteprofil nach Auftrennung von ML aus in vitro-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen (Abb. 23) eine gute Übereinstimmung mit der Dichteverteilung der lysosomalen Enzyme NAG und SP nach Auftrennung von ML aus nichtinkubierten Rinderalveolarmakrophagen (Abb. 24).

Für die Dichteverteilung der Mitochondrien wurde kein nennenswerter Unterschied zwischen ML aus Rinderalveolarmakrophagen und ML aus Rattenlunge nach Auftrennung in Metrizamid und Nycodenz gefunden. Ein wesentlicher Unterschied ergab sich aber in der Lage des Dichtemaximums für die NAG-Aktivität: für ML aus Rinderalveolarmakrophagen erschien dieses Maximum zwischen 1,05 und 1,08 g/cm³, während es für ML aus Rattenlunge bei wesentlich höherer Dichte zwischen 1,10 und 1,15 g/cm³ zu finden war (siehe auch Glück, 1982 und Taya, 1986). Diese Verschiebung des NAG-Maximums zu niedriger Dichte nach Auftrennung von ML aus Rinderalveolarmakrophagen kann zwei Ursachen haben: Erstens eine Zerstörung lysosomaler Membranen durch Homogenisation mit dem Dounce "S", woraufhin die überwiegend fest an die Lysosomenmembran gebundene NAG-Aktivität (Baccino et al., 1971) mit diesen Bruchstücken bei niedriger Dichte erscheint. Zweitens könnte es das Auftreten leichter Lysosomen bedeuten, sei es durch Einlagerung größerer Mengen von Phospholipid (Heath et al., 1976) durch Phagozytose von, möglicherweise denaturiertem, Surfactant in der Rinderlunge vor der Lavage oder durch Aufnahme großer Flüssigkeitsmengen aus dem Inkubationsmedium (vergleiche starke Vesikelbildung im Cytoplasma von in vitro-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im elektronenmikroskopischen Bild) mit anschließendem Abbau organischer Komponenten durch lysosomale Enzyme.

Es sei zum Schluß noch einmal darauf hingewiesen, daß in ML nicht mehr als 10% der im Homogenat vorhandenen Radioaktivität sedimentierten. Das bedeutet, daß mit den ML-Gradienten nur ein

kleiner, kaum als repräsentativ anzusehender Teil der tatsächlich in die Zelle aufgenommenen Radioaktivität untersucht wurde. Die eigentliche Bedeutung der Dichtegradientenversuche liegt unseres Erachtens darin, daß sich Möglichkeiten zur Isolation und Trennung von Organellen aus Alveolarmakrophagen ergeben. Wie wir zeigen konnten, sind Organellen auch nach Beschränkung auf einen einzigen von über 40 Zelltypen der Lunge nach der Wahl geeigneter Objekte in genügender Menge isolierbar, um damit solche Untersuchungen durchführen zu können.

Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung finden sich 4 Tage nach intratrachealer Instillation sphärischer Partikel neben (U,Pu)O₂-Partikeln in scharf begrenzten elektronendichten Vesikeln auch solche, die ohne erkennbare Membran frei im Cytoplasma der Zelle zu liegen scheinen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für ²³⁹PuO₂-Partikel in Rattenperitonealmakrophagen (Adee und Laidler, 1973) und für Thorotrast-Partikel (Thoriumoxid) in Kupfferzellen der menschlichen Leber gemacht (Irie und Mori, 1984). Eine denkbare Ursache im Falle von ²³⁹Pu-haltigen Teilchen ist die Zerstörung der Phagosomenmembran infolge der hohen Strahlendosis. Sanders (1970) berichtet von Zellschäden durch die hohe Strahlenbelastung in Makrophagen nach ²³⁹PuO₂-Aufnahme; auch sei nochmals auf die bereits oben zitierte Dosisbelastung von 5 rad/h für eine Zelle, die einen ²³⁹PuO₂-Partikel von 0,25 µm Durchmesser phagozytiert hat (Bair et al., 1973), erinnert.

Adee et al. (1968) wiesen intraperitoneal injizierte ²³⁹PuO₂-Partikel nach 1 und 2 Stunden in membranbegrenzten

Vakuolen von Peritonealmakrophagen nach. Sanders und Adee (1970) fanden im Anschluß an die Inhalation von $^{239}\text{PuO}_2$ -Partikeln diese in membranbegrenzten Vakuolen von Alveolarmakrophagen, nach 7 Tagen in elektronendichten lysosomalen Strukturen. Die frühen Befunde wurden mit Rinderalveolarmakrophagen in vitro bestätigt: nach 3 und 18 Stunden Inkubation mit sphärischen $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ -Partikeln waren diese eindeutig in membranbegrenzten Vakuolen in der Zelle deponiert (Abb. 62a,b, 63a,b, 64a) Rasterelektronenmikroskopische Studien machen neben der Aufnahme einzelner Partikel auch die gleichzeitige Aufnahme mehrerer Partikel nach deren Anhäufung an der Zelloberfläche wahrscheinlich (Abb. 48 - 59). In die Zelle inkorporierte Einzelpartikel ließen oft nur eine der Partikel eng anliegende Membran erkennen (Abb. 63a,b). Die Umwandlung elektronendurchlässiger großer Vesikel mit $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ in viel kleinere elektronendichte Vesikel zu späteren Zeiten wird bei Steinman et al. (1983) diskutiert: Die elektronendurchlässigen Vesikel stellen nach der dortigen Auffassung "Endosomen" dar, die noch nicht mit primären Lysosomen fusioniert sind. Im Anschluß an solche Fusionen wird verdaubares Material abgebaut, brauchbare Verbindungen ausgeschleust und unbrauchbares unverdauliches Material durch Schrumpfung der Vesikel konzentriert.

Bei der im Elektronenmikroskop mit energiedispersiver Röntgenmikroanalyse nachweisbaren hohen Eisenkonzentrationen in der Umgebung der $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ -Partikel zu späten Zeiten (Abb. 40-47)

handelt es sich vermutlich vorwiegend um Hämosiderin als Alterungsprodukt von Ferritin; die Granula wären somit als Siderosomen zu bezeichnen. Auch Priest und Haines (1982) weisen

darauf hin, daß in Makrophagen Plutonium in löslicher Form häufig zusammen mit Eisenablagerungen zu finden ist. Ob das gemeinsame Auftreten von hohen Eisenkonzentrationen und (U,Pu)O₂-Partikeln auf einer den polymeren Verbindungen ähnlichen Affinität von (U,Pu)O₂-Partikeln zu Ferritin beruhen könnte, ist eine außerordentlich interessante Frage, erscheint aber wegen der Größe und vor allem wegen der fast völlig fehlenden Löslichkeit der (U,Pu)O₂-Partikel sehr unwahrscheinlich. Weitaus wahrscheinlicher ist ein zufällig gleicher Ablagerungsort von (U,Pu)O₂ und organischen Eisenverbindungen in den Makrophagen. Die Ursache für die teilweise sehr große Ausdehnung dieser "Siderosomen" zu späten Zeiten nach intratrachealer Instillation (Abb. 40 - 47) ist uns nicht bekannt; wir vermuten aber einen direkten Zusammenhang mit der Anwesenheit des (U,Pu)O₂ für deren Entstehung, da Schnitte durch nicht (U,Pu)O₂ enthaltende Zellen Strukturen dieses Ausmaßes nicht zeigten. Costabel et al. (1984) berichten von hohen Ferritingehalten von bis zu 8,5 µg Ferritin in 10⁶ Humanalveolarmakrophagen und der Fähigkeit dieser Zellen zur Ferritinsynthese. Diese hohe Eigenproduktion könnte ein Hinweis darauf sein, daß Ferritin oder das Abbauprodukt Hämosiderin als eine Art Abschirmung gegen Stoffe, die für die Zelle gefährlich sein können, wirkt. So wurde Eisen in Endosomen von Alveolarmakrophagen in größerer Menge auch zusammen mit Crocidolit-Asbest beobachtet (Oghiso et al., 1984).

Versuchen wir abschließend eine zusammenfassende Schlußbetrachtung unserer Ergebnisse, so läßt sich feststellen, daß während der ersten 3 bis 4 Monate nach Inhalation die Lungenretention von (U,Pu)O₂-Teilchen bei Ratten erstaunlich

unabhängig von der Teilchenform (irregulär-sphärisch) und der Dosis (0,4 bis 13 kBq/kg) ist. Die Eliminationsrate aus der Lunge entspricht ungefähr jener, wie sie für dieses Material aus anderen Produktionsstätten von früheren Autoren gefunden wurde; ebenso können wir die sehr geringe Löslichkeit des Materials bestätigen.

Rinderalveolarmakrophagen können für in vitro-Studien mit (U,Pu)O₂-Teilchen erfolgreich eingesetzt werden. Aus diesen Zellen sind durch Dichtegradientenverfahren die einzelnen Organellen voneinander unterscheidbar und abtrennbar. Die Partikel werden, insbesondere in Anwesenheit von Serumbestandteilen, rasch phagozytiert und befinden sich anfangs in zum Teil relativ großen Phagosomen, die durch Einlagerung von Lungensurfactant oder Kulturflüssigkeit eine geringe Dichte aufweisen können. Bei der Homogenisation wird ein Großteil der Partikel freigesetzt, bindet sekundär an schwere Komponenten des Homogenats und erscheint damit in der N-Fraktion. Nach Fusion der Phagosomen mit Lysosomen und dem Abbau verdaubaren Materials schrumpfen diese nun als Phagolysosomen zu bezeichnenden Vesikeln. Dadurch und durch Akkumulation von zum Teil eisenhaltigen Komponenten erhöht sich deren Dichte. Die lokale hohe Strahlendosis führt zu teilweiser Zerstörung von Vesikelmembranen und gegebenenfalls auch zum Tod der Zelle mit erneuter Partikelfreisetzung. In vivo kommen die Mischoxide zu späten Zeiten in der Lunge in stark eisenhaltigen Zellregionen vor.

Die Analyse des intrazellulären Verhaltens der Partikel mittels konventioneller biochemischer Techniken ist sehr schwierig, da

bisher nicht eindeutig zwischen a priori frei im Cytoplasma befindlichen, artifiziell durch die Homogenisation freigesetzten und intralysosomalen Partikeln unterschieden werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde das biologische Verhalten von irregulären ("realistischen") und sphärischen ("künstlichen") (U,Pu)O₂-Partikeln (0,7 bis 1,5 µm AMAD) nach Inhalation und intratrachealer Instillation bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Die Retention war weitgehend unabhängig von der Partikelform und -größe. Intratracheale Instillation hatte gegenüber der Inhalation zu späten Zeiten eine verzögerte Ausscheidung der Radioaktivität aus der Lunge zur Folge. Durch Instillation hoher Dosen ließ sich eine Abnahme der Lungenclearance erzielen. Die biologische Löslichkeit des Materials in der Lunge war sehr gering.

2. Die Auswaschbarkeit instillierter (U,Pu)O₂-Partikel aus der Rattenlunge durch bronchoalveoläre Lavage nahm sehr schnell ab. Einen Tag nach Instillation waren über 90% der ausgewaschenen (U,Pu)O₂-Partikel in Alveolarmakrophagen nachweisbar; der Prozentsatz der Partikel-beladenen Zellen blieb zwischen dem 2. und 6. Tag konstant bei 10%.

3. Mit Rinderalveolarmakrophagen konnte ein in vitro-Zellsystem zum Studium der Phagozytose und des intrazellulären Verhaltens der Teilchen etabliert werden. Die Phagozytose von (U,Pu)O₂ in vitro war abhängig vom Kulturmedium und wurde durch Serum- und Surfactantkomponenten erhöht. Erhöhte Enzymfreisetzung ins Medium während der (U,Pu)O₂-Aufnahme wurde für N-Acetyl-β-Glucosaminidase in Abwesenheit von Penicillin und Streptomycin beobachtet.

4. Mit differentieller Zentrifugation von Lungen- oder Makrophagenhomogenaten sedimentierte der größte Teil der

Radioaktivität bei niedrigen g -Zahlen in der N-Fraktion unabhängig von der Verweilzeit der Partikel in der Lunge.

5. Organellen aus Rinderalveolarmakrophagen und Rattenlungen konnten mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt werden. Die Dichte des lysosomalen Enzyms N-Acetyl- β -Glucosaminidase aus Rinderalveolarmakrophagen war deutlich niedriger als diejenige aus Rattenlunge in Metrizamid und Nycodenz; die Dichten von Mitochondrien und perizellulären Membranen zeigten keine nennenswerten Unterschiede für Rattenlungen- und Rinderalveolarmakrophagen-Organellen.

6. Die Ablagerung der $(U,Pu)O_2$ -Partikel in der Zelle konnte keiner der untersuchten Organellen eindeutig zugeordnet werden, da nach Dichtegradientenzentrifugation keine Korrelation zwischen dem Verhalten der Partikel und der Verteilung von Lysosomen, Mitochondrien und perizellulären Membranen gefunden wurde.

7. Elektronenmikroskopisch ließen sich $(U,Pu)O_2$ -Partikel nach weniger als 24 Stunden Inkubation mit Rinderalveolarmakrophagen in membranbegrenzten Vakuolen in den Zellen nachweisen. In der Rattenlunge waren sie 4 Tage nach Instillation teilweise frei im Cytoplasma und teilweise in elektronendichten Vesikeln geringen Durchmessers in interstitiellen und Alveolarmakrophagen nachweisbar. Nach 111 und 473 Tagen wurden meist mehrere Partikel zusammen in auffällig großen elektronendichten und eisenhaltigen Bereichen in interstitiellen Zellen gefunden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMSON, I.Y.R., D.H. BOWDEN (1981)

Dose response of the pulmonary macrophagic system to various particulates and its relationship to transepithelial passage of free particles, *Exp. Lung Res.* 2, 165-175

ADEE, R.R., C.L. SANDERS, J.D. BERLIN (1968)

Subcellular localization and identification of alpha emitters by electron microscopic autoradiography, *Health Phys.* 15, 461-463

ADEE, R.R., J.J. LAIDLER (1973)

Subcellular identification of exogenous particles by high-voltage electron microscopy, *Amer. Ind. Hyg. Ass. J.* 34, 507-511

APPELMANS, F., R. WATTIAUX, C. DE DUVE (1955)

Tissue fractionation studies: 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver, *Biochem. J.* 59, 438-445

ARBORGH, B.A.M., H. GLAUMANN, J.L.E. ERICSSON (1974a)

Studies on iron loading of rat liver lysosomes: Effects on the liver and distribution and fate of iron, *Lab. Inv.* 30, 664-673

ARBORGH, B.A.M., H. GLAUMANN, J.L.E. ERICSSON (1974b)

Studies on iron loading of rat liver lysosomes: Chemical and enzymic composition, *Lab. Inv.* 30, 674-679

BACCINO, F.M., G.A. RITA, M.F. ZURETTI (1971)

Studies on the structure-bound sedimentability of some rat liver lysosome hydrolases, *Biochem. J.* 122, 363-371

BAILEY, M.R., W.G. KREYLING, S. ANDRE, A. BATCHELOR, A. BLACK, C.G. COLLIER, E. DROSSELMAYER, G.A. FERRON, P. FOSTER, B. HAIDER, A. HODGSON, H. METIVIER, S.R. MOORES, A. MORGAN, H.-L. MÜLLER, G. PATRICK, S. PICKERING, D. RAMSDEN, C. STIRLING, R.J. TALBOT (1986)

An interspecies comparison of the translocation of material from lung to blood, Ann. Occupat. Hyg., im Druck

BAIR, W.J., J.E. BALLOU, J.F. PARK, C.L. SANDERS (1973)
Plutonium in soft tissues with emphasis on the respiratory tract, Handbook of Experimental Pharmacology XXXVI, Springer, 503-568

BARRY, B.E., J.D. CRAPO, P. GEHR, M. BACHOFEN, E.R. WEIBEL (1979)
Population characteristics of the cells in normal human lung, Amer. Rev. Resp. Dis. 119, 287

BEAUFAY, H., A. AMAR-COSTESECC, E. FEYTMANS, D. THINES-SEMPOUX, M. WIBO, M. ROBBI, J. BERTHET (1974)
Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver: I. Biochemical methods, J. Cell Biol. 61, 188-200

BEAUFAY, H., A. AMAR-COSTESECC (1976)
Cell fractionation techniques, in: Methods in membrane biology (E.D. Korn, Ed.), Plenum Press, New York, 1-100

BERGMEYER, H.U., E. BERNT (1970)

In: Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie, Weinheim, S. 533

BOOCOCK, G., C.J. DANPURE, D.S. POPPLEWELL, D.M. TAYLOR (1970)

The subcellular distribution of plutonium in rat liver, Radiat.
Res. 42, 381-396

BOWDEN, D.H. (1984)

The alveolar macrophage, Environ. Health Persp. 55, 327-341

BRAIN, J.D., N.R. FRANK (1968)

Recovery of free cells from rat lungs by repeated washings, J.
Appl. Physiol. 25, 63-69

BRAIN, J.D., D.E. KNUDSON, S.P. SOROKIN, M.A. DAVIS (1976)

Pulmonary distribution of particles given by intratracheal
instillation or by aerosol inhalation, Environ. Res. 11, 13-33

BRAIN, J.D., P.A. VALBERG (1979)

State of the art - deposition of aerosol in the respiratory
tract, Amer. Rev. Resp. Dis. 120, 1325-1373

BRUENGER, F.W., W. STEVENS, D.R. ATHERTON, B.J. GRUBE (1976)

The subcellular distribution of some actinide elements in the
beagle liver, in: The health effects of plutonium and radium
(W.S.S. Jee, Ed.), J.W. Press, University of Utah, Salt Lake
City, 211-221

CASTRANOVA, V., L. BROWMAN, M.J. REASOR, P.R. MILES (1980)

Effects of heavy metal ions on selected oxidative metabolic processes in rat alveolar macrophages, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53, 14-23

COOPER, J.R., G.N. STRADLING, H. SMITH, S.E. BREADMORE (1978)

The reactions of 1 nm plutonium-238 dioxide particles in the lung of the rat, NRPB/R and D2, Harwell, 101-102

COOPER, J.R., G.N. STRADLING, H. SMITH, S.E. HAM (1979)

The reaction of 1 nm plutonium-238 dioxide particles with rat lung fluid in vitro and in vivo, NRPB/R and D3, Harwell, 69-71

COOPER, J.R., G.N. STRADLING, H. SMITH, S.E. HAM (1980)

The reactions of 1 nm particles of plutonium-238 dioxide and curium-244 dioxide with lung fluid, *Int. J. Radiat. Biol.* 38, 93-103

COSTABEL, U., J. OSTERHOLZ, H. BODEMANN, K.J. BROSS, H. MATTHYS, R. ANDREESEN (1984)

Transferrin receptors and intracellular ferritin in human alveolar macrophages, Abstract, *Amer. Rev. Respir. Dis.* 129, A 290

DAVIES, R. (1980)

The effect of dusts on enzyme release from macrophages, in: *The in vitro effects of mineral dusts* (R.C. Brown et al., Eds.) Academic press, 67-74

DE DUVE, C., B.C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX,
F. APPELMANS (1955)

Tissue fractionation studies: 6. Intracellular distribution
patterns of enzymes in rat-liver tissue, *Biochem. J.* 60,
604-617

DESAI, R., R.J. RICHARDS (1983)

Effects of chrysotile on a lysosomal enzyme preparation and on
the hydrolytic enzyme activity of cultured alveolar macrophages,
Environ. Health Persp. 51, 125-130

DROSSELMAYER, E., H.L. MÜLLER, S. PICKERING, A. SEIDEL (1986)

Indium-doped aluminum oxide as a non-radioactive test aerosol for
inhalation experiments, *J. Aerosol Sci.*, im Druck

EIDSON, A.F., J.A. MEWHINNEY (1983)

In vitro dissolution of respirable aerosols of industrial uranium
and plutonium mixed-oxide nuclear fuels, *Health Phys.* 45,
1023-1037

GLÜCK, M.G. (1982)

Untersuchung des Verhaltens von intratracheal verabreichten
polymeren Transuranen in der Rattenlunge, Diplomarbeit, Institut
für Radiochemie der Universität Karlsruhe

GRUNER, R. (1978)

Die Verwendung von Triton WR 1339 (TWR) zur quantitativen
Bestimmung der lysosomalen Bindung von Transuranen in der

Rattenleber, Dissertation, Fakultät für Bio- und
Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

GRUNER, R., A. SEIDEL, R. WINTER (1981)

The initial early distribution of monomeric ^{239}Pu and ^{241}Am in
rat liver as determined by Triton WR 1339 injection, Radiat. Res.
85, 367-379

HAHN, F.F., G.J. NEWTON, P.L. BRYANT (1977)

In vitro phagocytosis of respirable-sized monodisperse particles
by alveolar macrophages, ERDA Symp. Ser. 43, Conf. 760927,
424-435

HART, B.A., D.G. PITTMAN (1980)

The uptake of beryllium by the alveolar macrophage, J.
Reticuloendothel. Soc. 27, 49-58

HEATH, M.F., G. GANDY, W. JACOBSON (1976)

Lysosomes in the lung, in: Lysosomes in biology and pathology, 5,
(J.T. Dingle, R.T. Dean, Eds.), 33-58

HUNNINGHAKE, G.W., J.E. GADEK, S.V. SZAPIEL, I.J. STRUMPF,
O. KAWANAMI, V.J. FERRANS, B.A. KEOGH, R.G. CRYSTAL (1980)

Chapter 6: The human alveolar macrophage, in: Methods in cell
biology 21, (C.C. Harris, B.F. Trump, G.D. Stoner, Eds.)
Academic Press, 95-112

ICRP (1986)

International Commission on Radiological Protection, in press

IRIE, H., W. MORI (1984)

Long term effects of thorium dioxide (Thorotrast) administration on human liver, ultrastructural localization of thorium dioxide in human liver by analytical electron microscopy, Acta Pathol. Jpn. 34, 221-228

JAMES, A.C., J.W. STATHER, J.C. STRONG, J.E. HOSTFORD, P. RODWELL, A. HODGSON, P. KAY (1978)

Lung clearance and translocation in rats and hamsters of inhaled dust containing mixed actinide oxides from a fuel fabrication plant, NRPB/R and D2, Harwell, 57-64

JUNG, W., W.G. THIES, A. SEIDEL (1985)

The role of lysosomes in ^{239}Pu binding in rat liver: comparison of sucrose and metrizamide density gradient studies with whole liver and purified hepatocytes, Int. J. Radiat. Biol. 48, 807-810

KEELING, P.J., P.M. HENSON (1982)

Lysosomal enzyme release from human monocytes in response to particulate stimuli, J. Immunol. 128, 563-567

KREYLING, W.G., G.A. FERRON (1984)

Production of cobalt oxide aerosols with a modified spinning-top aerosol generator, J. Aerosol Sci. 15, 367-371

LUNDGREN, D.L., F.F. HAHN, J.H. DIEL (1983)

Repeated inhalation exposure of rats to aerosols of $^{239}\text{PuO}_2$. II,

Inhalation Toxicology Research Institute, Annual Progress Report
1982-1983, LMF-107, 274-277

MEWHINNEY, J.A., B.A. MUGGENBURG, R.O. McCLELLAN, J.J. MIGLIO
(1976)

The effect of varying physical and chemical characteristics of
inhaled plutonium aerosols on metabolism and excretion, in:
Diagnosis and treatment of incorporated radionuclides, Vienna
1975, IAEA-SR-6/29, 87-97

MEWHINNEY, J.A., A.F. EIDSON, R.A. GUILMETTE (1981a)

2. In vitro dissolution of mixed UO₂ and PuO₂ heat treated at
950°C, Inhalation Toxicology Research Institute, Annual Progress
Report July 1979 - June 1980, NUREG/CR-2246 LMF-86 RH, 10-20

MEWHINNEY, J.A., A.F. EIDSON, J.A. STANLEY, R.A. GUILMETTE
(1981b)

4. Radiation dose patterns in rats, dogs, and monkeys following
inhalation of industrial aerosols formed in fabrication of mixed
oxide nuclear fuel, Inhalation Toxicology Research Institute,
Annual Progress Report, July 1979 - June 1980, NUREG/CR-2246
LMF-86 RH, 28-41

MEWHINNEY, J.A., A.F. EIDSON, F.F. HAHN (1983)

4. Dose response studies in Fischer-344 rats, Radiation dose
estimates and hazard evaluations for inhaled airborne
radionuclides, Annual Progress Report July 1981 - June 1982,
NUREG/CR-3313, LMF-105 RH, 41-50

MEWHINNEY, J.A., A.F. EIDSON, F.F. HAHN (1984)

2. Dose-response studies in Fischer-344 rats, Radiation dose estimates and hazard evaluations for inhaled airborne radionuclides, Annual Progress Report July 1982- June 1983, NUREG/CR-3870, LMF-109, Vol. 1, 11-20

MOORES, S.R., R.J. TALBOT, N. EVANS, S.E. SYKES, A. BLACK, B.E. LAMBERT, J.E. COGGLE (1983)

The responses of pulmonary alveolar macrophages to inhaled plutonium dioxide particles, AERE-R 10635, HL 83/3705 (C2), Harwell, 1-34

MORGAN, A., A. BLACK, S.R. MOORES, J.N. PRITCHARD, M. WALSH, B.E. LAMBERT (1983)

Alveolar deposition of sized particles of $^{239}\text{PuO}_2$ in the mouse, Radiat. Res. 93, 85-92

MUGGENBURG, B.A., R.A. GUILMETTE, F.F. HAHN, B.B. BOECKER, R.O. MC CLELLAN, J.L. MAUDERLY, J.A. PICKRELL (1982)

Toxicity of inhaled $^{239}\text{PuO}_2$ in Beagle dogs: A. Monodisperse 0,75 μm AMAD particles. B. Monodisperse 1,5 μm AMAD particles. C. Monodisperse 3,0 μm AMAD particles. V, Inhalation Toxicology Research Institute Annual Report 1981-1982, LMF-102, UC-48, 336-343

NENOT, J.C., J.W. STATHER (1979)

The toxicity of plutonium, americium and curium, Published for the European Communities by Pergamon Press

OGHISO, Y., E. KAGAN, A.R. BRODY (1984)

Intrapulmonary distribution of inhaled chrysotile and crocidolite asbestos: ultrastructural features, Br. J. exp. Path. 65, 467-484

PAILES, W.H., D.J. JUDY, H. RESNICK, V. CASTRANOVA (1984)

Relative effects of asbestos and wollastonite on alveolar macrophages, J. Toxicol. Environ. Health 14, 497-510

PRIEST, N.D., J.W. HAINES (1982)

The release of plutonium from macrophages in rats: The effect of changes in iron status, Health Phys. 42, 415-423

PRITCHARD, J.N., A. HOLMES, J.C. EVANS, N. EVANS, R.J. EVANS, A. MORGAN (1985)

The distribution of dust in the rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation, Environ. Res. 36, 268-297

RAABE, O.G., H.-C. YEH, G.J. NEWTON, R.F. PHALEN, D.J. VELASQUEZ (1977)

Deposition of inhaled monodisperse aerosols in small rodents, Inhaled Particles IV (W.H. Walton, Ed.) Pergamon Press, Oxford

RHOADS, K., J.A. MAHAFFEY, C.L. SANDERS (1982)

Distribution of inhaled $^{239}\text{PuO}_2$ in rat and hamster lung, Health Phys. 42, 645-656

RHOADS, K., C.L. SANDERS (1985)

Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung, Environ. Res. 36, 359-378

RICKWOOD, D. (1983)

Iodinated density gradient media (D. Rickwood, Ed.) IRL Press, Oxford, Washington DC

RICKWOOD, D. (1984)

Centrifugation, 2nd Edition, IRL Press, Oxford, Washington DC

ROBINSON, A.V., R.P. SCHNEIDER (1980)

Phagocytosis, toxicity, and solubility of AmO₂ in alveolar macrophages, in: Pulmonary toxicology of respirable particles (C.L. Sanders, F.T. Cross, Eds.), Conf. 791002, 325-337

ROY, A.B. (1954)

The sulfatase of ox liver: 3. Further observations on sulphatase B and an investigation of the origin of fractions A and B, Biochem. J. 57, 465-470

SANDERS, C.L., R.R. ADEE (1968)

Phagocytosis of inhaled plutonium oxide-²³⁹Pu particles by pulmonary macrophages, Science 162, 918-920

SANDERS, C.L. (1969)

The distribution of inhaled plutonium-239 dioxide particles within pulmonary macrophages, Arch. Environ. Health 18, 904-912

SANDERS, C.L. (1970)

Maintenance of phagocytic function following $^{239}\text{PuO}_2$ particle administration, Health Phys. 18, 82-85

SANDERS, C.L., R.R. ADEE (1970)

Ultrastructural localization of inhaled $^{239}\text{PuO}_2$ particles in alveolar epithelium and macrophages, Health Phys. 18, 293-295

SANDERS, C.L. (1972)

Deposition patterns and the toxicity of transuranium elements in lung, Health Phys. 22, 607-615

SANDERS, C.L., R.R. ADEE, K. RHOADS, R.M. MADISON (1977)

Life history of plutonium dioxide in the lung: from macrophage to carcinoma, in: Pulmonary macrophage and epithelial cells, ERDA Symp. Ser. 43, Conf-760927, 451-462

SEIDEL, A., V. VOLF (1972)

Rapid determination of some transuranium elements in biological material by liquid scintillation counting, Int. J. Appl. Radiat. Isotopes 23, 1-4

SEIDEL, A., E. KRÜGER, M. WIENER, G. HOTZ, M. BALANI, W.-G. THIES
(1985)

Association of ^{239}Pu with lysosomes in rat, Syrian hamster, and
Chinese hamster liver as studied by carrier-free electrophoresis
and electron microscopic autoradiography with ^{241}Pu , Radiat. Res.
104, 191-199

SEIDEL, A., M. WIENER, E. KRÜGER, R. WIRTH, H. HAFFNER (1986)

Studies on the lysosomal binding of ^{141}Ce , ^{239}Np , ^{239}Pu and ^{241}Am
in rat and Syrian hamster liver using carrier-free
electrophoresis, Int. J. Nucl. Med. Biol., in press

SILVERSTEIN, S.C., R.M. STEINMAN, Z.A. COHN (1977)

Endocytosis, Ann. Rev. Biochem. 46, 669-722

SMITH, H., G.N. STRADLING, B.W. LOVELESS, G.J. HAM (1977)

The in vivo solubility of plutonium-239 dioxide in the rat lung,
Health Phys. 33, 539-551

SORBER, W.A., E.S. LEAKE, Q.N. MYRVIK (1974)

Isolation and characterization of hydrolase-containing granules
from rabbit lung macrophages, J. Reticuloendothel. Soc. 16,
184-192

STANLEY, J.A., A.F. EIDSON, J.A. MEWHINNEY (1982)

Distribution, retention and dosimetry of plutonium and americium
in the rat, dog and monkey after inhalation of an industrial-
mixed uranium and plutonium oxide aerosol, Health Phys. 43,
521-530

STATHER, J.W., J. BRIGHTWELL, P. RODWELL, M. ELLENDER (1978)

A study of the clearance of plutonium from the lungs of rodents after the inhalation of mixed oxide aerosols formed from the oxidation of plutonium in combination with uranium, NRPB/R and D2, Harwell, 55-56

STATHER, J.W., A.C. JAMES, J. BRIGHTWELL, P. RODWELL (1979)

The clearance of Pu and Am from the respiratory system of rodents after the inhalation of oxide aerosols of these actinides either alone or in combination with other metals, in: Biological implications of radionuclides released from nuclear industries, Vol. II, Proceedings of a Symposium, Vienna, 26-30 March 1979, IAEA-SM-237/5, 3-24

STEINMAN, R.M., I.S. MELLMAN, W.A. MULLER, Z.A. COHN (1983)

Endocytosis and the recycling of plasma membrane, J. Cell Biol. 96, 1-27

STRADLING, G.N., G.J. HAM, H. SMITH, J. COOPER, S.E. BREADMORE (1978)

Factors affecting the mobility of plutonium-238 dioxide in the rat, Int. J. Radiat. Biol. 34, 37-47

SÜTTERLIN, U. (1982)

Der Einfluß der Zeit auf die subzelluläre Verteilung von Transuranen und ⁵⁹Fe in der Leber von Ratte und Chinesischem Hamster, Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

TGLD: TASK GROUP ON LUNG DYNAMICS (1966)

Deposition and retention models for internal dosimetry of the human respiratory tract, *Health Phys.* 12, 173-207

TAYA, A. (1986)

Studies on the binding and transport processes of americium-241 hydroxide polymers in rat lung and bovine alveolar macrophages, Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

WARHEIT, D.B., L.H. HILL, A.R. BRODY (1984)

Surface morphology and correlated phagocytic capacity of pulmonary macrophages lavaged from the lungs of rats, *Exp. Lung Res.* 6, 71-82

WATSON, J.A., A.A. SPRITZER, J.A. AULD, M.A. GUETHOFF (1969)

Deposition and clearance following inhalation and intratracheal injection of particles, *Arch. Environ. Health* 19, 51-58

WATTIAUX, R., S. WATTIAUX-DE CONINCK, M.-F. RONVEAUX-DUPAL, F. DUBOIS (1978)

Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient, *J. Cell Biol.* 78, 349-368

WERB, Z., Z.A. COHN (1974)

The preparation of macrophage lysosomes and phagolysosomes, *Methods in enzymology*, Vol. XXXI, Biomembranes, Part A (S. Fleischer, L. Pacher, Eds.) Academic Press, 339-345

WETZEL, M.G., E.D. KORN (1969)

Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba Castellanii* (Neff):
III. Isolation of the phagocytic vesicles and their membranes, *J. Cell Biol.* 43, 90-104

WIENER, E., Z. CURELARU (1974)

The intracellular distribution of cathepsins and other acid hydrolases in mouse peritoneal macrophages, *J. Reticuloendothel. Soc.* 17, 319-332

WIENER, M. (1984)

Untersuchungen zur lysosomalen Bindung von ^{141}Ce , ^{239}Pu und ^{241}Am in der Leber von Ratte und Syrischem Hamster mittels Trägerfreier Elektrophorese, Diplomarbeit, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

WILKINS, D.J., P. MYERS (1972)

In: *The macrophage* (B. Vernon-Roberts, Ed.) University Press, Cambridge

WILLIAMSON, D.H., P. LUND, H.A. KREBS (1967)

The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver, *Biochem. J.* 103, 514-527

WINTER, R. (1980)

Die subzelluläre Bindung von ^{239}Pu in der Leber ausgewählter Nagetierspezies, Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

WINTER, R., A. SEIDEL (1982)

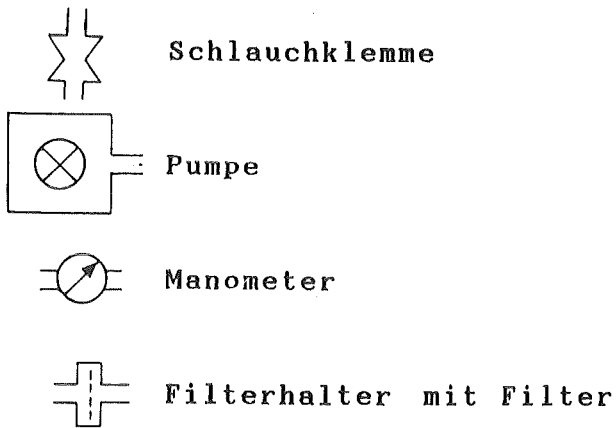
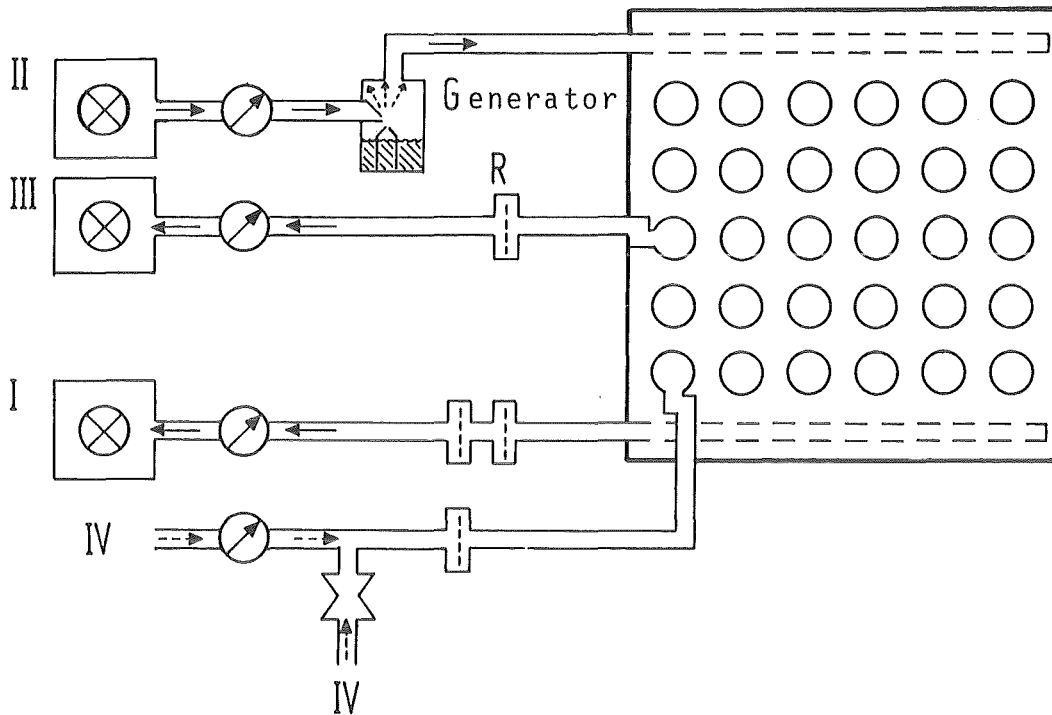
Comparison of the subcellular distribution of monomeric ^{239}Pu and ^{59}Fe in the liver of rat, mouse, and Syrian and Chinese hamsters, *Radiat. Res.* 89, 113-123

ZEIDLER, R.B., H.D. KIM (1985)

Phagocytosis, chemiluminescence, and cell volume of alveolar macrophages from neonatal and adult pigs, *J. Leukocyte Biol.* 37, 29-43

7. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Schema I



- I : Pumpe für Kammerunterdruck; 10 l/min
- II : Pumpe für Generatorzuluft; 1 l/min
- III: Pumpe für Referenzfilter "R"; 0,1 l/min
- IV : Kammerbelüftung

Anm.: "R" wurde nach Versuchsende entnommen und gemessen; daraus konnte die Aerosolkonzentration in der Kammer und die theoretisch eingeatmete Aerosolmenge berechnet werden.

Tab. 1a: Retention sphärischer (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD:0,9 μm; "Anderson Stack-Impactor"-Trennung) in der Ratte nach intratrachealer Instillation (initiale alveoläre α-Dosis 13,4 kBq/kg; 31,2 μg (U,Pu)O₂/kg)

Organ \ Zeit nach Instillation Tage	4(2)		21(2)		88(3)		146(2)		412(1)		473(2)	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lunge	97	97 (±1)	68	69 (±9)	71	68 (±11)	55	54 (±5)	30	26	32	21 (±3)
Leber	1	<1	2	<1	1	1	1	1	1	1	<1	1
Milz	<1	0	<1	0	<1	<1	<1	<1	<1	<1	0	<1
Nieren	<1	0	<1	0	<1	0	<1	0	0	<1	<1	<1
Femur	<1	0	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Einzelwerte oder Mittelwerte aus 2-3 Tieren (Tierzahl in Klammern)

a ²⁴¹Am-Aktivität
 b Gesamt-α-Aktivität (± Standardfehler)

Instillierte Gesamt-α-Dosis: 17,3 kBq/kg; 40 μg (U,Pu)O₂/kg

Tab. 1b: Retention sphärischer (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD: 0,9 µm; "Anderson-Stack-Impactor"-Trennung) in der Ratte nach vierstündiger Inhalation
 (initiale alveoläre α-Dosis: 13,1 kBq/kg; 30,5 µg (U,Pu)O₂/kg)
 Werte in % der initialen alveolären Dosis

Zeit nach Inhalation Tage Organ	3		7		28		63		91		181	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lunge	100	100	94	94	78	74	43	46	37	39	19	22
Leber	<1	<1	1	<1	1	<1	1	<1	1	<1	<1	<1
Milz	<1	0	<1	0	<1	0	0	0	<1	0	0	0
Nieren	0	0	<1	0	<1	0	<1	0	0	0	<1	0
Femur	<1	0	<1	0	<1	0	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Magen-Darm-Trakt	1	-	<1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mittelwerte aus je 2 Tieren pro Zeitpunkt

- a ²⁴¹Am-Aktivität
- b Gesamt-α-Aktivität

Tab. 1c: Retention sphärischer (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD: 0,9 µm; "Anderson-Stack-Impactor"-Trennung) in der Ratte nach zweistündiger Inhalation
 (initiale alveoläre α-Dosis: 2,7 kBq/kg; 6,2 µg (U,Pu)O₂/kg)
 Werte in % der initialen alveolären Dosis

Zeit nach Inhalation Tage Organ	3		7		28		63		91		182	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lunge	100	100	91	95	65	73	52	58	42	52	15	19
Leber	1	<1	1	<1	<1	<1	1	<1	1	<1	<1	<1
Milz	0	0	0	0	0	0	0	0	<1	0	<1	0
Nieren	1	<1	0	0	0	0	<1	<1	<1	<1	<1	0
Femur	1	0	0	0	0	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Magen-Darm-Trakt	1	-	≤1	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt

- a ²⁴¹Am-Aktivität
- b Gesamt-α-Aktivität

Tab. 2a: Retention irregulärer (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD: 1µm; Inertial-Spektrometer-Trennung) in der Ratte nach intratrachealer Instillation
 (initiale alveoläre α-Dosis: 1,4 kBq/kg; 3,3 µg (U,Pu)O₂/kg)
 Werte in % der initialen alveolären Dosis

Organ \ Zeit nach Instillation Tage	5(2)		24(2)		40(4)		56(4)		74(2)		159(2)		222(11)		319(4)		368(5)	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lunge	78	88 (±2)	76	76 (±8)	48	48 (±3)	35	33 (±8)	46	40 (±7)	14	12 (±1)	13	11 (±2)	8	7 (±1)	4	5 (±1)
Leber	<1	<1	1	1	2	0	<1	0	1	<1	<1	1	1	1	<1	<1	<1	1
Milz	0	0	<1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	<1	<1	<1	0	<1	0
Nieren	-	-	1	<1	1	0	<1	0	1	0	<1	0	-	-	<1	0	<1	<1
Femur	0	0	<1	0	1	0	<1	0	<1	0	<1	0	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Mittelwerte aus 2-11 Tieren (Tierzahl in Klammern)

- a ²⁴¹Am-Aktivität
- b Gesamt-α-Aktivität (± Standardfehler)
- nicht gemessen

Instillierte Gesamt-α-Dosis: 1,7 kBq/kg; 4 µg (U,Pu)O₂/kg

Tab. 2b: Retention irregulärer (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD: 1,5 µm; "Anderson-Stack-Impactor"-Trennung) in der Ratte nach vierstündiger Inhalation
 (initiale alveoläre α -Dosis: 2,9 kBq/kg; 6,7 µg (U,Pu)O₂/kg)
 Werte in % der initialen alveolären Dosis

Organ \ Zeit nach Inhalation Tage	3		7		*27		57		91		* 118	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lunge	100	100	98	100	67	65	48	47	25	27	16	16
Leber	<1	<1	<1	<1	0	<1	0	1	<1	<1	<1	<1
Milz	<1	0	0	0	0	0	0	<1	<1	0	<1	0
Nieren	0	0	0	0	1	0	0	<1	0	<1	<1	0
Femur	<1	0	<1	0	<1	0	<1	<1	<1	0	0	0
Magen-Darm-Trakt	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt (*ein Tier für 27 Tage und für 118 Tage)

- a ²⁴¹Am-Aktivität
- b Gesamt- α -Aktivität

Tab. 2c: Retention irregulärer (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD: 1,5 µm; "Anderson-Stack-Impactor"-Trennung) in der Ratte nach vierstündiger Inhalation
 (initiale alveoläre α-Dosis: 0,4 kBq/kg; 0,9 µg (U,Pu)O₂/kg)
 Werte in % der initialen alveolären Dosis

Zeit nach Inhalation Tage Organ	3(1)	7(2)	28(1)	64(2)	90(2)	97(1)
Lunge	100	95	57	50	36	31
Leber	0	2	<1	-	-	-
Milz	0	<1	0	-	-	-
Nieren	<1	<1	0	-	-	-
Femur	0	<1	<1	-	-	-

Einzelwerte oder Mittelwerte (Zahl der Tiere pro Zeitpunkt in Klammern)

Gesamt-α-Aktivität

Tab. 3: Retention irregulärer (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD: 0,7 µm; "Anderson-Stack-Impactor"-Trennung) in der Ratte nach intrarachealer Instillation
 (initiale alveoläre α-Dosis: 1,4 kBq/kg; 3,3 µg (U,Pu)O₂/kg
 Werte in % der initialen alveolären Dosis

Zeit nach Instillation Tage	3(2)		8(2)		22(2)		114(1)		204(3)		280(4)	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lunge	100	100	91	93 (±12)	91	92 (±3)	-	45	30	22 (±3)	24	17 (±5)
Leber	0	<1	0	0	1	<1	-	<1	<1	1	1	<1
Milz	<1	0	0	0	<1	0	-	<1	<1	0	<1	0
Nieren	<1	0	0	0	<1	0	-	<1	<1	0	1	0
Femur	<1	0	0	0	<1	0	-	<1	<1	<1	<1	<1

Einzelwerte oder Mittelwerte aus 2-4 Tieren (Tierzahl in Klammern)

- a ²⁴¹Am-Aktivität
- b Gesamt-α-Aktivität (± Standardfehler)
- nicht gemessen

Instillierte Gesamt-α-Dosis: 2,1 kBq/kg; 5 µg (U,Pu)O₂/kg

Tab. 4 : Daten zur Berechnung der biologischen Halbwertszeiten für die Lungen- und Ganztierretention der Radioaktivität nach intratrachealer Instillation oder nach Inhalation von (U,Pu)O₂-Partikeln

$$R(t) = a_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + a_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t}$$

Partikel- form	AMAD µm	initiale alveoläre Dosis kBq/kg	Ort der Retention	Darreichungs- form	gemessene Aktivität	a ₁ %	λ ₁	HWZ ₁ Tage	a ₂ %	λ ₂	HWZ ₂ Tage	Retentions- kurve darge- stellt in Abb.
sphärisch	0,9	13,4	Lunge	intratracheal	Gesamt-α	22	0,148	5±2	78	0,003	253±23	1
sphärisch	0,9	13,1	Lunge	Inhalation	Gesamt-α	56	0,024	29±11	44	0,004	169±121	
sphärisch	0,9	2,7	Lunge	Inhalation	Gesamt-α	99	0,010	68±7				
sphärisch	0,9	19,0	Ganztier	intratracheal	²⁴¹ Am	54	0,028	25±3	46	0,001	928±327	2
sphärisch	0,9	2,5	Ganztier	intratracheal	Am	83	0,035	20±3	16	0,001	470±485	
irregulär	1,0	1,4	Lunge	intratracheal	Gesamt-α	36	0,172	4±2	64	0,007	95±8	3
irregulär	1,5	2,9	Lunge	Inhalation	Gesamt-α	100	0,015	45±3				
irregulär	1,5	0,4	Lunge	Inhalation	Gesamt-α	100	0,013	55±7				
irregulär	1,0	1,3	Ganztier	intratracheal	²⁴¹ Am	50	0,045	16±5	52	0,007	105±28	5
irregulär	0,7	1,4	Lunge	intratracheal	Gesamt-α	100	0,007	98±6				

HWZ : biologische Halbwertszeit(en) ± Standardfehler

R(t) : Retention; zur Zeit t im Tier bzw. in der Lunge vorhandene Radioaktivität in % der initialen alveolären Dosis

Abkürzungen: siehe Liste

Tab. 5a : Retention von ⁵⁷Co-dotierten Co₃O₄-Partikeln (GMD: 1,7 µm) in der Ratte nach vierstündiger Inhalation
 (initiale alveoläre γ-Dosis: 0.5 kBq/kg)
 Werte in % der initialen alveolären Dosis

Zeit nach Inhalation Tage \ Organ	3	7	28	56	91	185
Lunge	100	91	82	48	39	15
Leber	1	0	0	<1	1	0
Milz	1	0	1	<1	<1	0
Nieren	<1	1	0	0	1	0
Femur	-	0	<1	0	1	0
Magen-Darm-Trakt	5	<1	1	1	-	-

Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt (- nicht gemessen)

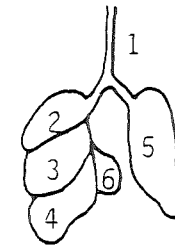
Tab. 5b: Retention von ⁵⁷Co-dotierten Co₃O₄-Partikeln (GMD: 0,8 µm) in der Ratte nach vierstündiger Inhalation (initiale alveoläre γ-Dosis: 4.9 kBq/kg)
Werte in % der initialen alveolären Dosis

Zeit nach Inhalation Tage Organ	3	7	28	56	91	183
Lunge	100	90	53	25	8	1
Leber	<1	<1	<1	<1	<1	0
Milz	0	<1	1	0	0	<1
Nieren	0	<1	<1	0	0	0
Femur	<1	<1	<1	0	0	<1
Magen-Darm-Trakt	<1	<1	-	-	-	-

Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt (- nicht gemessen)

Tab. 6a: Relative Konzentration (RK) der γ -Radioaktivität in den einzelnen Lungenlappen der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach Inhalation von ^{57}Co -dotierten Co_3O_4 -Partikeln (GMD: $1,7 \mu\text{m}$) (initiale alveoläre γ -Dosis: 0.5 kBq/kg)

Zeit nach Inhalation Tage / Lungenteil	3	7	28	56	*91	185
2	2,0	1,1	1,7	1,6	2,0	1,2
3	0,9	1,2	0,8	0,9	0,7	0,9
4	1,1	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9
5	0,8	1,0	1,1	1,0	1,0	0,8
6	0,7	1,0	0,6	0,9	0,9	1,7

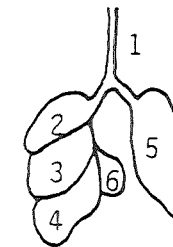


Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt (* ein Tier nach 91 Tagen)

$$\text{RK} = \frac{\% \text{ der Gesamt-Lungen-}\gamma\text{-Aktivität im betreffenden Lungenlappen}}{\% \text{ des Gesamt-Lungengewichtes des betreffenden Lungenlappens}}$$

Tab. 6b: Relative Konzentration (RK) der γ -Radioaktivität in den einzelnen Lungenlappen der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach Inhalation von ^{57}Co -dotierten Co_3O_4 -Partikeln (GMD: $0,8 \mu\text{m}$) (initiale alveoläre γ -Dosis: $4,9 \text{ kBq/kg}$)

Zeit nach Inhalation Tage \ Lungenteil	3	7	28	56	91	183
2	1,1	1,1	1,3	1,5	1,4	1,1
3	1,0	1,2	1,0	1,1	1,2	1,0
4	1,0	0,9	0,9	0,8	0,8	1,0
5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9
6	1,1	1,0	1,1	1,2	1,1	1,4

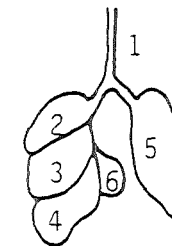


Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt

$$\text{RK} = \frac{\% \text{ der Gesamt-Lungen-}\gamma\text{-Aktivität im betreffenden Lungenlappen}}{\% \text{ des Gesamt-Lungengewichtes des betreffenden Lungenlappens}}$$

Tab. 7a: Relative Konzentration (RK) der α -Radioaktivität in den einzelnen Lungenlappen der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach vierstündiger Inhalation von sphärischen (U,Pu) O_2 -Partikeln (AMAD: 0,9 μ m) (initiale alveoläre α -Dosis: 13,1 kBq/kg; 30,5 μ g (U,Pu) O_2 /kg)

Zeit nach Inhalation Tage \ Lungenteil	3	7	28	63	91	181
2	1,3*	1,3	1,2	1,3	1,4	1,9
3	1,0*	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1
4	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9	0,8
5	1,1	0,9	1,0	1,0	0,9	1,0
6	0,8	0,9	1,0	0,9	0,9	0,9

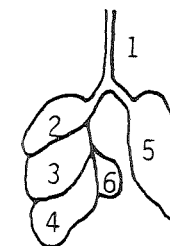


Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt (*Einzelwerte)

$$RK = \frac{\% \text{ der Gesamt-Lungen- } \alpha\text{-Aktivität im betreffenden Lungenlappen}}{\% \text{ des Gesamt-Lungengewichtes des betreffenden Lungenlappens}}$$

Tab. 7b: Relative Konzentration (RK) der α -Radioaktivität in den einzelnen Lungenlappen der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach zweistündiger Inhalation von sphärischen (U,Pu) O_2 -Partikeln (AMAD: 0,9 μ m) (initiale alveoläre α -Dosis: 2,7 kBq/kg; 6,2 μ g (U,Pu) O_2 /kg)

Zeit nach Inhalation Tage \ Lungenteil	3	7	28	63	91	182
2	1,5	1,3	1,2	1,3	1,3	1,5
3	0,9	0,9	1,0	1,1	1,1	1,1
4	0,9	1,0	0,9	0,9	0,9	0,8
5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6	1,1	1,1	1,0	0,9	1,0	0,9

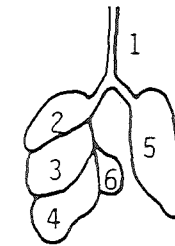


Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt

$$RK = \frac{\% \text{ der Gesamt-Lungen- } \alpha\text{-Aktivität im betreffenden Lungenlappen}}{\% \text{ des Gesamt-Lungengewichtes des betreffenden Lungenlappens}}$$

Tab. 8a: Relative Konzentration (RK) der α -Radioaktivität in den einzelnen Lungenlappen der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach vierstündiger Inhalation von irregulären (U,Pu) O_2 -Partikeln (AMAD: 1,5 μ m)
(initiale alveoläre α -Dosis: 2,9 kBq/kg; 6,7 μ g (U,Pu) O_2 /kg)

Zeit nach Inhalation Tage \ Lungenteil	3	7	27	57	91	118
2	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4	1,6
3	0,9	0,9	0,9	1,0	1,3	1,0
4	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7	0,9
5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6	0,9	0,9	1,1	1,0	1,0	0,9

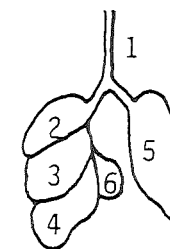


Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt

$$RK = \frac{\% \text{ der Gesamt-Lungen-}\alpha\text{-Aktivität im betreffenden Lungenlappen}}{\% \text{ des Gesamt-Lungengewichtes des betreffenden Lungenlappens}}$$

Tab. 8b: Relative Konzentration (RK) der α -Radioaktivität in den einzelnen Lungenlappen der Ratte zu verschiedenen Zeiten nach vierstündiger Inhalation von irregulären (U,Pu) O_2 -Partikeln (AMAD: 1,5 μ m) (initiale alveoläre α -Dosis: 0,4 kBq/kg; 0,9 μ g (U,Pu) O_2 /kg)

Zeit nach Inhalation Tage \ Lungenteil	3	7	28	64	90	97
2	1,5	1,6	1,6	1,6	1,8	1,7
3	0,8	0,9	0,9	1,0	1,2	1,0
4	0,8	0,9	1,0	0,9	0,9	0,9
5	1,1	1,0	0,8	1,0	0,8	1,0
6	1,0	0,8	1,1	0,9	1,0	0,9



Mittelwerte aus 2 Tieren pro Zeitpunkt

$$RK = \frac{\% \text{ der Gesamt-Lungen-}\alpha\text{-Aktivität im betreffenden Lungenlappen}}{\% \text{ des Gesamt-Lungengewichtes des betreffenden Lungenlappens}}$$

Tab. 9a: Retention sphärischer (U,Pu)₂O₂-Partikel (AMAD: 0,9 µm; "Anderson-Stack-Impactor"-Trennung) in der Ratte nach intravenöser Injektion
 (injizierte Gesamt-α-Dosis: 6,6 kBq/kg; 15,3 µg (U,Pu)₂O₂/kg)
 Werte in % der injizierten Dosis

Zeit nach Instillation Tage Organ	1(1)		7(3)		27(2)		75(2)		152(2)		234(2)	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lunge	1	<1	1	1	1	1	2	1	3	3	4	4
Leber	95	93	94	97	91	94	76	72	55	60	42	40
Milz	2	2	4	4	4	4	6	6	8	8	10	11
Nieren	0	0	0	0	<1	0	1	<1	0	<1	1	<1
Femur	<1	0	<1	<1	<1	<1	1	1	1	1	1	2

Einzelwerte oder Mittelwerte aus 2-3 Tieren (Tierzahl in Klammern)

a ²⁴¹Am-Aktivität
 b Gesamt-α-Aktivität

Tab. 9b: Retention irregulärer (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD: 1 µm; Inertial-Spektrometer-Trennung) in der Ratte nach intravenöser Injektion (injizierte Gesamt-α-Dosis: 1,7 kBq/kg; 4 µg (U,Pu)O₂/kg) Werte in % der injizierten Dosis

Zeit nach Injektion Tage / Organ	1(2)		4(2)		11(1)		47(1)		118(2)		155(1)		271(1)	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lunge	9	7	20	17	21	17	11	7	16	14	12	11	37	32
Leber	80	78	77	77	66	67	66	67	69	67	46	46	44	39
Milz	6	6	7	7	6	5	9	9	11	11	10	10	16	15
Nieren	1	0	<1	0	<1	0	0	0	<1	0	0	0	3	<1
Femur	1	<1	0	<1	<1	<1	1	<1	<1	1	1	1	1	1

Einzelwerte oder Mittelwerte aus 2 Tieren (Tierzahl in Klammern)

a ²⁴¹Am-Aktivität
 b Gesamt-α-Aktivität

Tab. 10: Relative subzelluläre Verteilung der α -Radioaktivität aus der Rattenlunge nach intratrachealer Instillation von $(U,Pu)O_2$ -Partikeln in Abhängigkeit von der Zeit nach der Instillation, von den Homogenisationsbedingungen und von der Partikelcharakteristik

Art der Homogenisation ^b	Teilchenform	Zeit nach Instillation Tage	% Lungenaktivität ^a				%N+E ^a		Zahl der Lungen pro Versuch
			im BG	in N	in E	%Ausbeute	in N	in E	
5 x "L"	irregulär AMAD: 1 μ m	7	13	70	3	86	96	4	4 x 1
		56	7	58	1	66	98	2	4
		74	14	41	1	56	97	3	2
10 x "L"	irregulär AMAD: 1 μ m	5	21	55	7	83	88	12	1
		10	26	23	3	52	87	12	1
		38	21	42	1	64	97	3	2 x 1
		53	20	51	4	75	94	6	1
10 x "L"	sphärisch AMAD: 0,9 μ m	14	9	58	3	70	95	5	2
		21	20	25	4	49	88	12	1
		29	17	64	2	83	98	2	2

a Lungenaktivität: α -Radioaktivitätsgehalt der Lunge(n) bei der Sektion;
100 % N+E entspricht der Summe der α -Radioaktivität in den beiden Fraktionen N und E

b Homogenisation in HM durch je 5 oder 10 Auf- und Abschläge mit dem Dounce-"L"-Homogenisator
Abkürzungen siehe Liste

Tab. 11: Relative subzelluläre Verteilung von α -Radioaktivität und Leitenzymen aus der Rattenlunge nach intratrachealer Instillation^d von irregulären (U,Pu)O₂-Partikeln (AMAD: 1 μ m) und differentieller Zentrifugation^b

	% N+E ^a			% E ^a			Ausbeute	
	in N	in E	n	in ML	in P	in S	% von E	n
α -Radioaktivität	97 \pm 1	4 \pm 1	6	84 \pm 12	3 \pm 1	2 \pm 1	89	6
N-Acetyl- β -Glucosaminidase	41 \pm 5	59 \pm 5	6	55 \pm 2	6 \pm 1	2 \pm 1	63	5
Arylsulfatase	41 \pm 8	59 \pm 8	6	46 \pm 4	6 \pm 3	33 \pm 3	85	5
Glutamatdehydrogenase	51 \pm 13	49 \pm 13	6	28 \pm 8	10 \pm 2	5 \pm 2	43	4
Protein	26 \pm 2	74 \pm 2	4	13 \pm 1	5 \pm 1	62 \pm 3	80	4

Mittelwerte \pm Standardfehler; n = Zahl der Versuche (eine oder vier Lungen pro Versuch)

- a 100 % N+E entspricht der Summe der Enzym- bzw. α -Radioaktivität in den beiden Fraktionen N und E
 100 % E entspricht der gesamten in E meßbaren Enzym- bzw. α -Radioaktivität
 α - Radioaktivitätsausbeute: 67 % der zum Zeitpunkt der Sektion in der Lunge meßbaren Radioaktivität sind in N+E nachweisbar
- b Homogenisation in HM durch je 5 Auf- und Abschlüge mit dem Dounce-"L"-Homogenisator; N-, ML- und P-Lauf wie in Material und Methoden beschrieben
- d Homogenisation 7 - 56 Tage nach intratrachealer Instillation;
 Abkürzungen siehe Liste

Tab. 12: Relative subzelluläre Verteilung der γ -Radioaktivität aus in vitro-inkubierten^c Rinderalveolarmakrophagen nach differentieller Zentrifugation in Abhängigkeit von den Homogenisations- und Zentrifugationsbedingungen und von der Partikelcharakteristik

Art der Homogenisation ^b	Art der Zentrifugation N-Lauf	% Radioaktivität im Zellpellet ^a			% N + E ^a		Partikelform 0,9 μ m AMAD	n
		in N	in E	%Ausbeute	in N	in E		
"L"	200 g/5 Minuten	87 \pm 5	3 \pm 1	90	97 \pm 1	3 \pm 1	sphärisch	2
"S"	200 g/5 Minuten	78 \pm 5	9 \pm 1	87	90 \pm 1	10 \pm 1	sphärisch	2
"S"	200 g/5 Minuten	68 \pm 3	17 \pm 1	85	81 \pm 0	20 \pm 0	sphärisch und faserartig	2
"S"	2000 g/5 Minuten	44 \pm 17	13 \pm 3	57	76 \pm 7	24 \pm 7	sphärisch	3

Mittelwerte \pm Standardfehler; n = Zahl der Versuche

a Radioaktivität im Zellpellet: γ -Radioaktivitätsgehalt einmal gewaschener Zellen nach Inkubation^c und Sedimentation; 100 % N + E entspricht der Summe der γ -Radioaktivität in den beiden Fraktionen N und E

b Homogenisation in HM + 1 mM EDTA durch je 10 Auf- und Abschläge mit dem Dounce "L" oder "S"-Homogenisator

c 1 - 3 Stunden Inkubation in Waymouth bei 37^oC mit (U,Pu)O₂-Partikeln

Abkürzungen siehe Liste

Tab. 13: Relative subzelluläre Verteilung von γ -Radioaktivität und Leitenzymen aus in vitro inkubierten^c Rinderalveolarmakrophagen nach differentieller Zentrifugation^b

	% N+E ^a			% E ^a		Ausbeute	
	in N	in E	n	in ML	in X	% von E	n
γ -Radioaktivität	76 \pm 7	24 \pm 7	3	68 \pm 9	30 \pm 27	98	2
N-Acetyl- β -Glucosaminidase	21 \pm 3	79 \pm 4	4	28 \pm 1	23 \pm 6	51	2
Glutamatdehydrogenase	22 \pm 4	78 \pm 4	4	34 \pm 0	41 \pm 4	75	2
Alkalische Phosphodiesterase	24 \pm 14	76 \pm 14	3	14 \pm 13	7 \pm 7	21	2

Mittelwerte \pm Standardfehler; n = Zahl der Versuche

- a 100 % N+E entspricht der Summe der Enzym- bzw. der γ -Radioaktivität in den beiden Fraktionen N und E
 100 % E entspricht der gesamten in E meßbaren Enzym- bzw. γ -Radioaktivität
 γ -Radioaktivitätsausbeute: 57 % der in den Zellen enthaltenen γ -Radioaktivität sind in N+E nachweisbar
- b Homogenisation in HM + 1 mM EDTA durch je 10 Auf- und Abschläge mit dem Dounce-"S"-Homogenisator; N- und ML-Lauf wie in Material und Methoden beschrieben
- c 1 - 3 Stunden Inkubation in Waymouth-Medium bei 37⁰C mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln (AMAD: 0,9 μ m); Abkürzungen siehe Liste

Tab. 14: Zusammenstellung der in der Literatur publizierten Studien mit (U,Pu)-Mischoxiden und PuO₂

Autoren	Material	Chemische Zusammen- setzung	Isotopen- zusammen- setzung	initiale alveoläre Dosis kBq/kg	AMAD Form	Rattenstamm	Definition IAD	Symbole in Abb.70
Stanley et al. (1982)	UO ₂ +PuO ₂ 750°C "ball milling"	77% UO ₂ 23% PuO ₂	0,069 Gew.% 238Pu 86,16 Gew.% 239Pu 11,61 Gew.% 240Pu 1,98 Gew.% 241Pu 0,18 Gew.% 242Pu	10,9	2,3 µm irregulär	Fischer-344	4d	
Mewhinney et al. (1981 b)	(U,Pu)O ₂ 1750°C "sintered"	75% UO ₂ 25% PuO ₂	0,58 Gew.% 238Pu 72,11 Gew.% 239Pu 19,25 Gew.% 240Pu 6,15 Gew.% 241Pu 1,91 Gew.% 242Pu	4	2,3 µm irregulär	Fischer-344	4d	
Mewhinney et al. (1983)	(U,Pu)O ₂ 1750°C "sintered"		wie bei Mewhinney et al. (1981 b)	1		Fischer-344	7d	●
Stather et al. (1978)	(U,Pu)O ₂ "exploding wire tech- nique"	75% UO ₂ 25% PuO ₂			1,3 µm	HMT		■
Lundgren et al. (1983)	PuO ₂		¹⁶⁹ Yb-markiertes PuO ₂	1	1 µm	Fischer-344		

initiale alveoläre Dosis (IAD) = Lungenaktivitätsgehalt am 4. usw. Tag

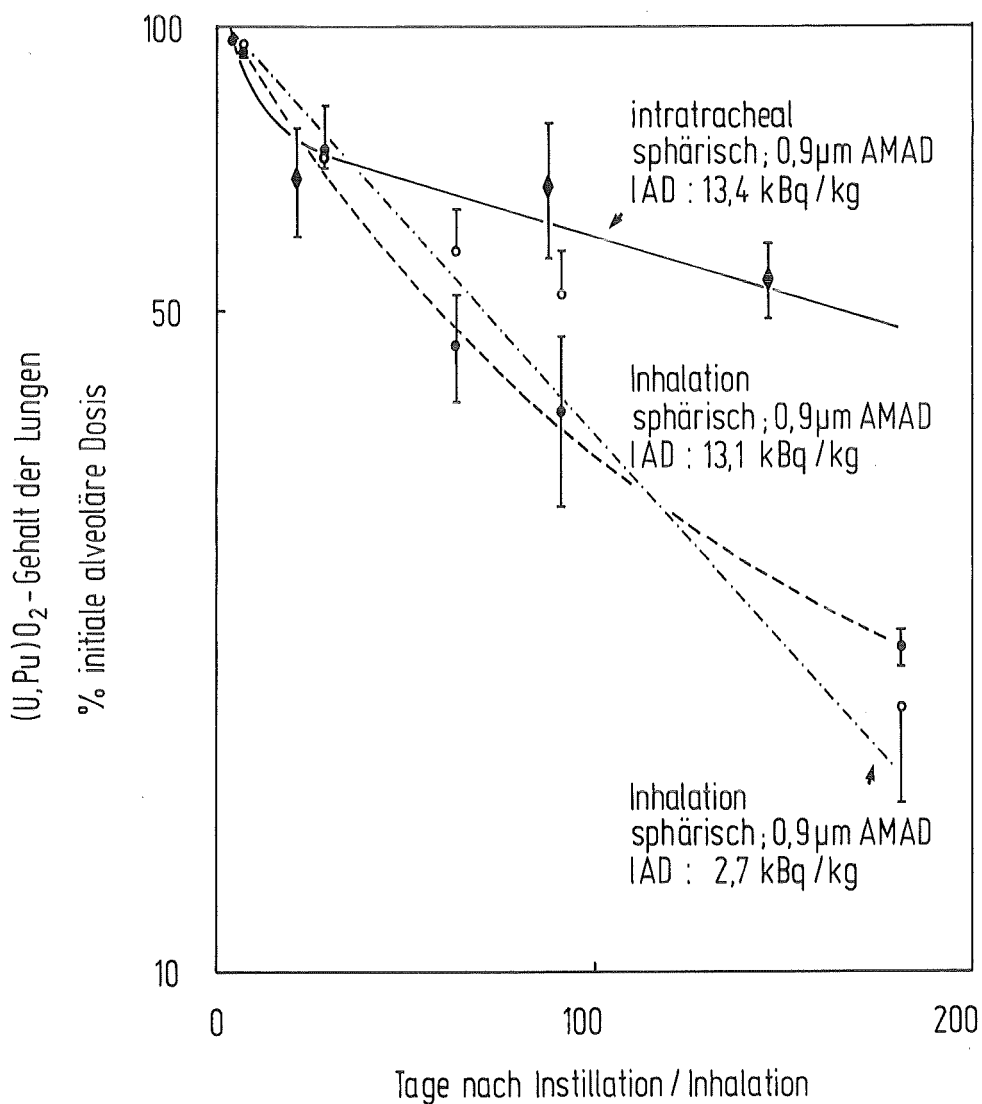


Abb.1: Vergleich der Lungenretention in der Ratte nach intratrachealer Instillation und nach Inhalation sphärischer (U,Pu)O₂-Partikel (Gesamt- α -Radioaktivität).

Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

Tierzahl siehe Tab. 1 und 2

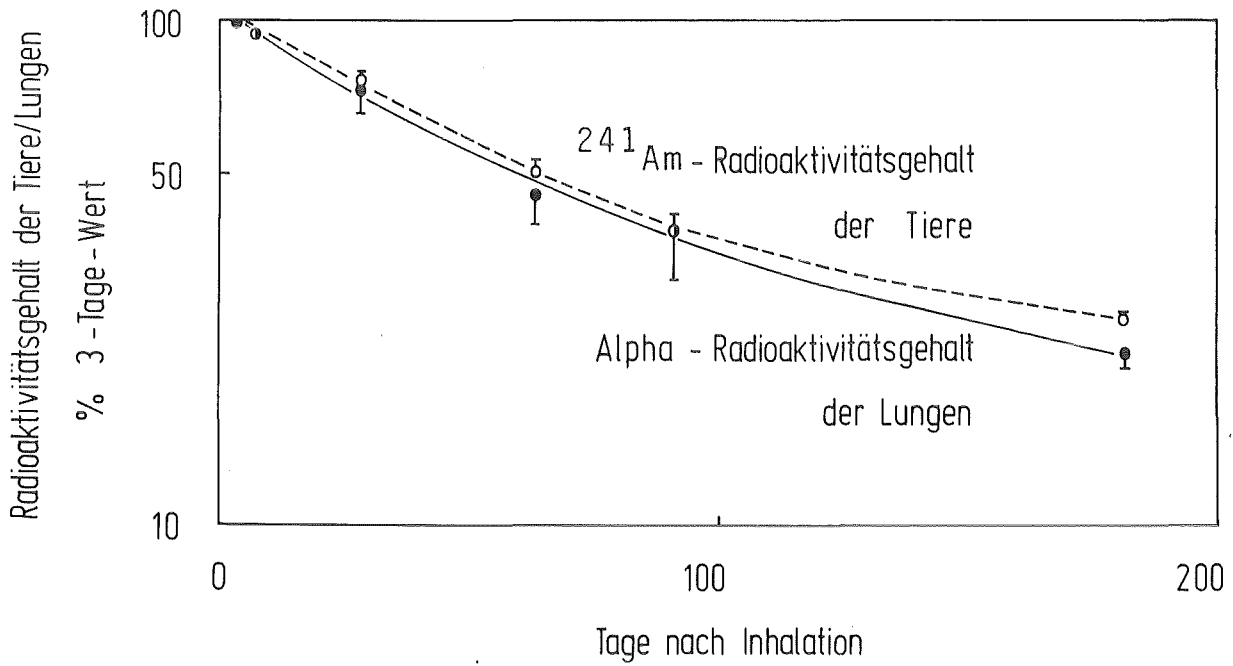


Abb. 1a: Vergleich der Gesamt-Alpha-Lungenretention mit der Am-241-Ganzkörperretention in der Ratte nach Inhalation sphärischer (U,Pu)O₂-Partikel (0,9 μm AMAD; IAD: 13,1kBq/kg Gesamt-Alpha-Radioaktivität).
 Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler
 2 Tiere pro Zeitpunkt

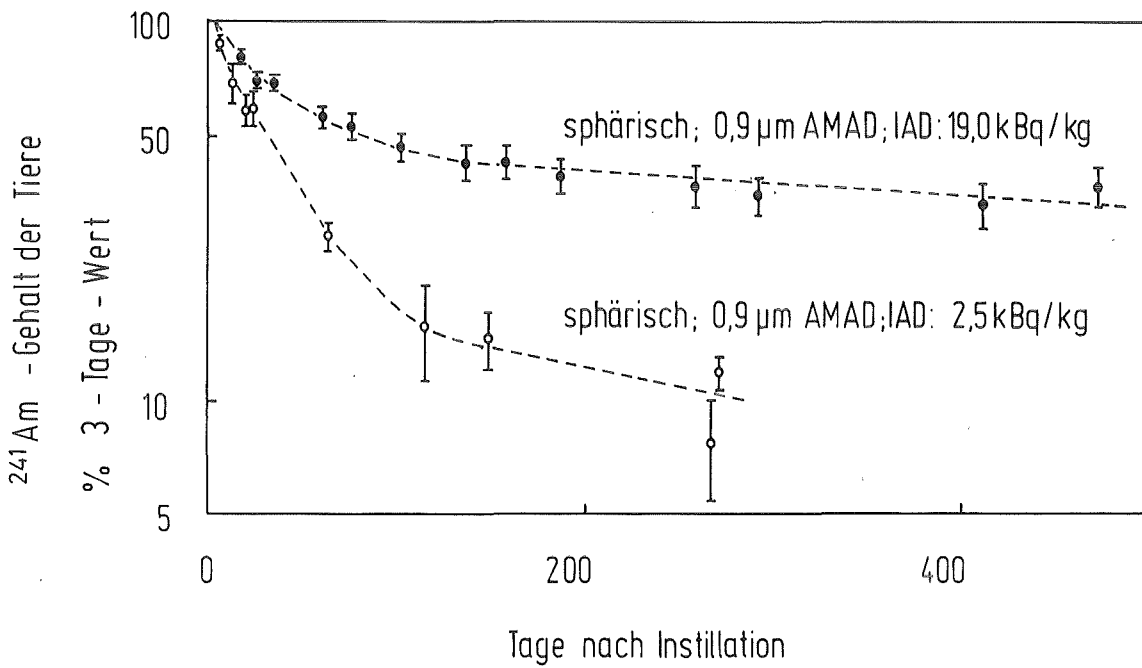


Abb. 2: Ganzkörperretention von ^{241}Am nach intratrachealer Instillation sphärischer $(\text{U}, \text{Pu})\text{O}_2$ -Partikel in die Rattenlunge; die Dosisangaben beziehen sich auf die Gesamt- α -Radioaktivität.

Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

4 Tiere pro Zeitpunkt

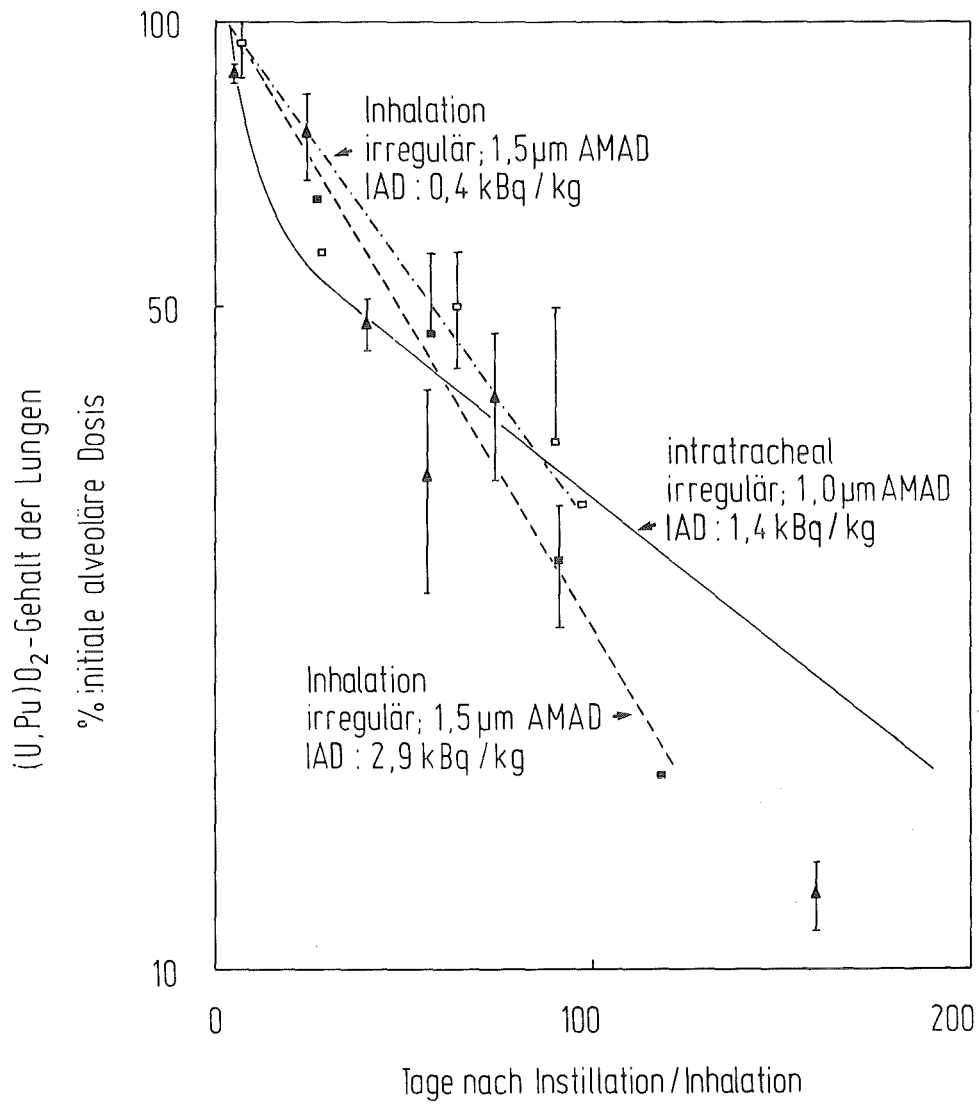


Abb.3: Vergleich der Lungenretention in der Ratte nach intra-trachealer Instillation und nach Inhalation irregulärer (U,Pu)O₂-Partikel (Gesamt- α -Radioaktivität).
Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler
Tierzahl siehe Tab. 1 und 2

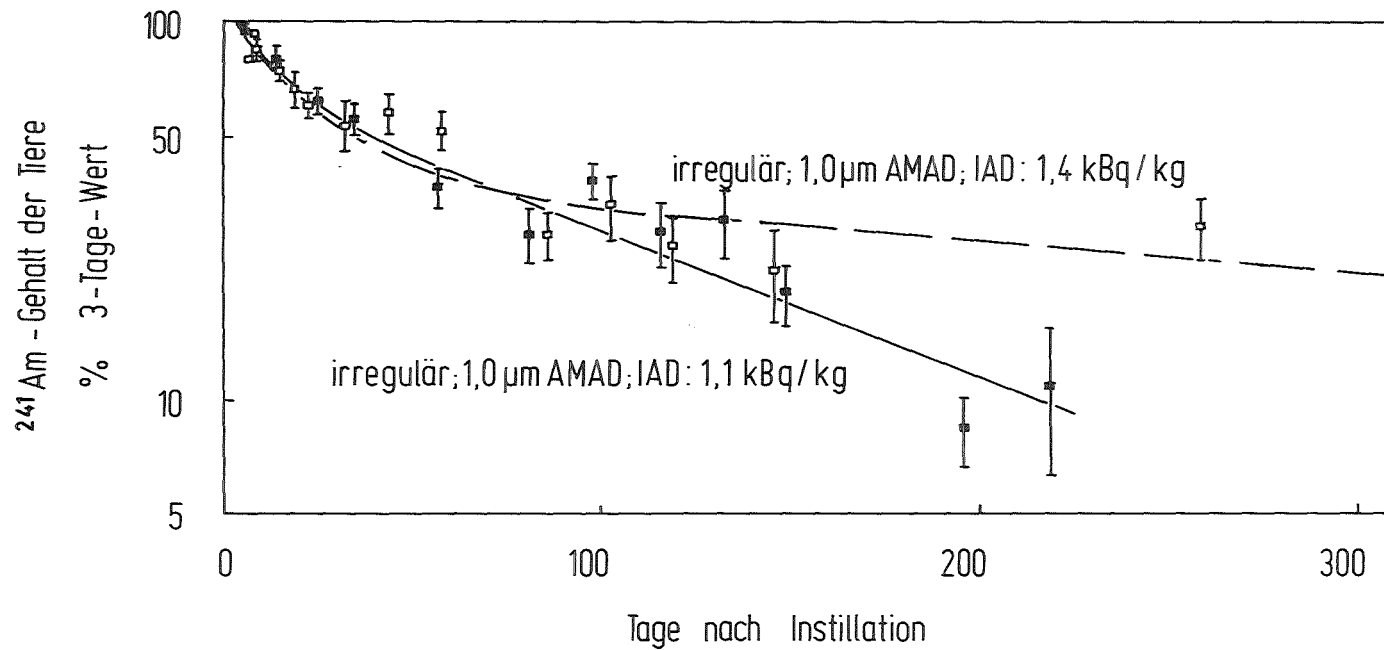


Abb. 3a: Ganzkörperretention von ^{241}Am nach intratrachealer Instillation irregulärer $(\text{U,Pu})\text{O}_2$ -Partikel in die Rattenlunge; die Dosisangaben beziehen sich auf die Gesamt-Alpha-Radioaktivität.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

8 Tiere für die niedrigere, 7 Tiere für die höhere Dosis

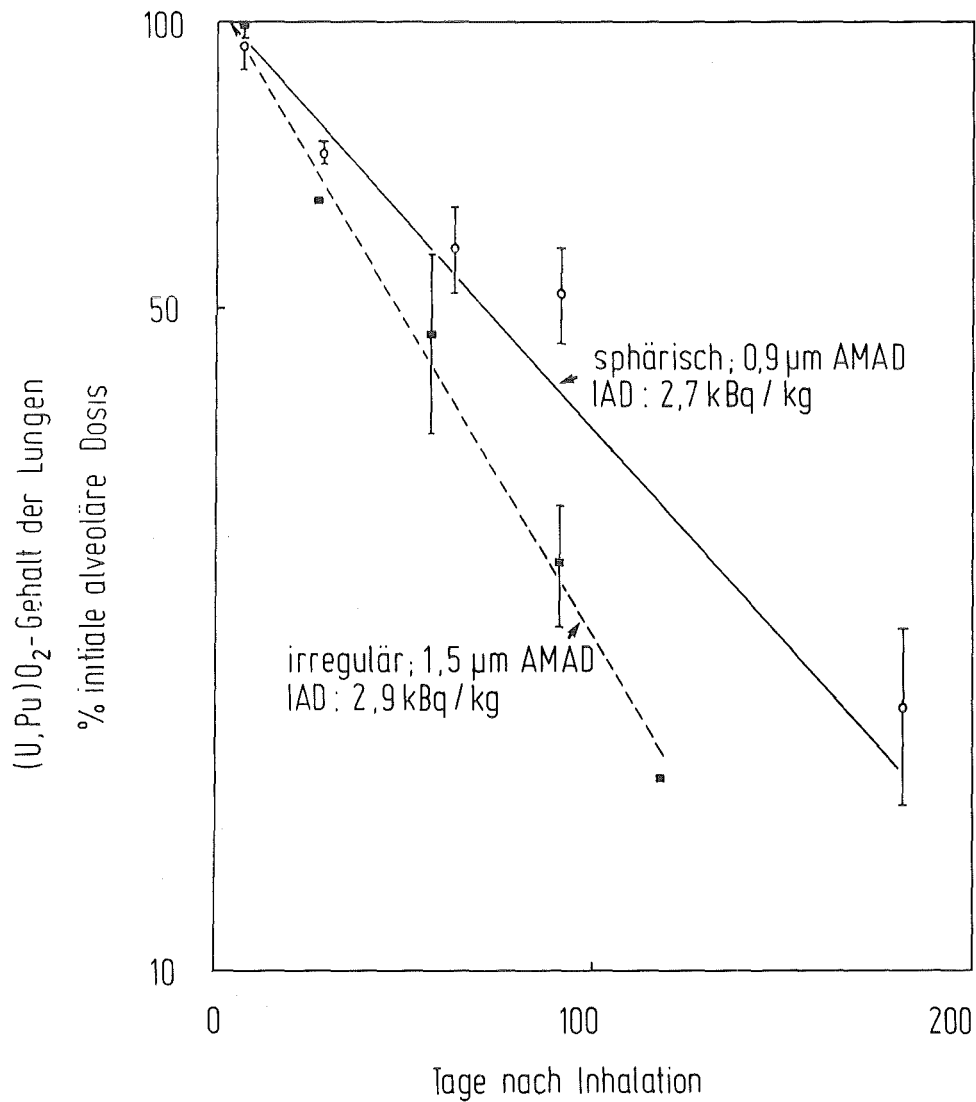


Abb.4: Vergleich der Lungenretention in der Ratte nach Inhalation von sphärischen und irregulären (U,Pu)O₂- Partikeln (Gesamt- α -Radioaktivität).

Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

Tierzahl siehe Tab. 1 und 2

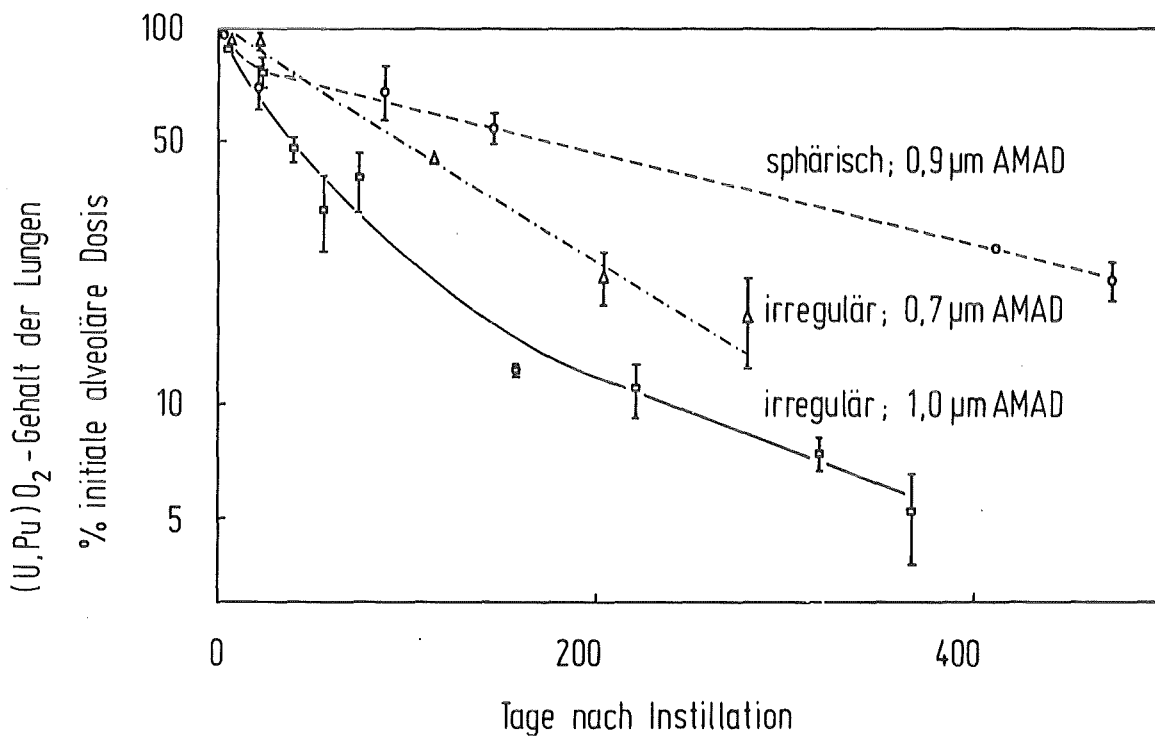


Abb.5: Vergleich der Lungenretention in der Ratte nach intratrachealer Instillation von irregulären (1,4 kBq/kg IAD für 1 µm-Partikel und für 0,7 µm-Partikel) und sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln (13,4 kBq/kg IAD für 0,9 µm-Partikel); die Dosisangaben beziehen sich auf die Gesamt-α-Radioaktivität.

Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

Tierzahl siehe Tab. 1 und 2

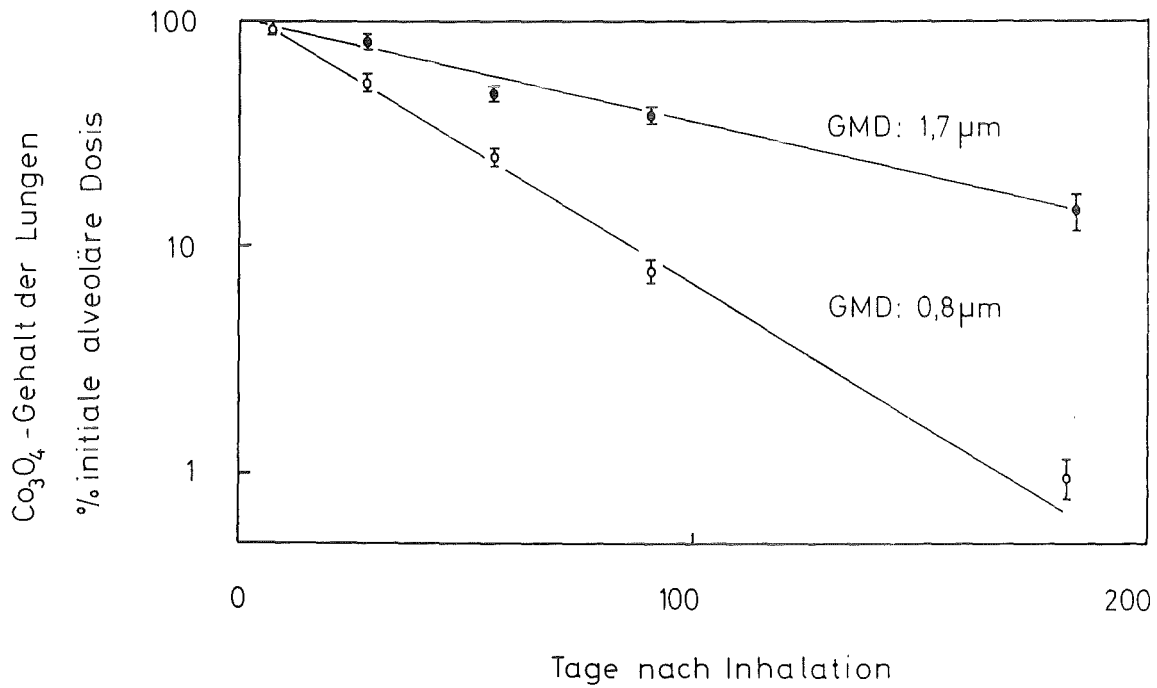


Abb.6: Vergleich der Lungenretention in der Ratte nach Inhalation von Co_3O_4 -Partikeln mit unterschiedlichem Durchmesser (γ -Radioaktivität; 0,5 kBq/kg IAD für $1,7 \mu\text{m}$ -Partikel und 4,9 kBq/kg IAD für $0,8 \mu\text{m}$ -Partikel).
Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

2 Tiere pro Zeitpunkt

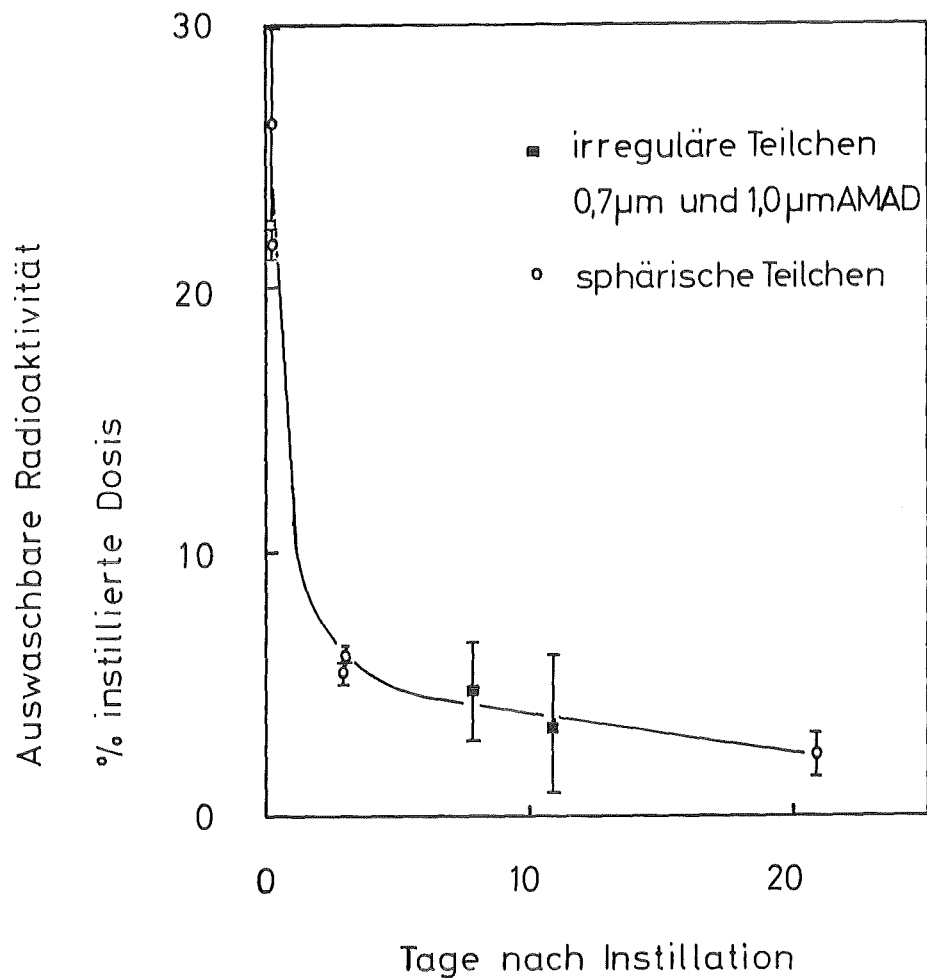


Abb. 7: ^{241}Am - γ -Radioaktivität in der Lavageflüssigkeit. Zu verschiedenen Zeiten nach intratrachealer Instillation von $(\text{U}, \text{Pu})\text{O}_2$ -Partikeln wurden je 2 oder 3 Rattenlungen dreimal mit 5 ml 0,9% NaCl gewaschen (Instillierte Gesamt- α -Radioaktivität: 13,0 kBq/kg für sphärische, 2,3 und 3,9 kBq/kg für irreguläre Partikel).
Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

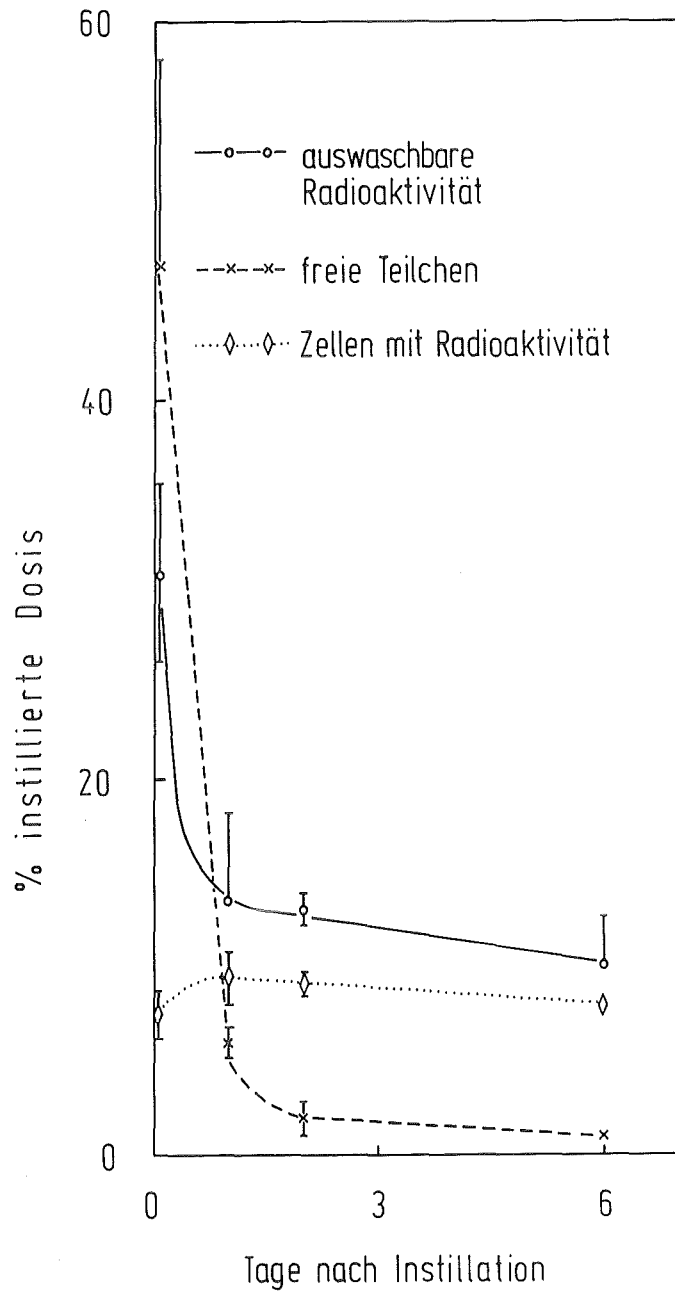


Abb.8: ^{241}Am - γ -Radioaktivität, freie Teilchen und Prozentsatz der mit Radioaktivität assoziierten Zellen in der Lavageflüssigkeit. Zu verschiedenen Zeiten nach intratrachealer Instillation von sphärischen $(\text{U}, \text{Pu})\text{O}_2$ -Partikeln wurden je 2 Rattenlungen viermal mit 5 ml 0,9% NaCl gewaschen (Instillierte Gesamt- α -Radioaktivität: 3,7 kBq/kg).
Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

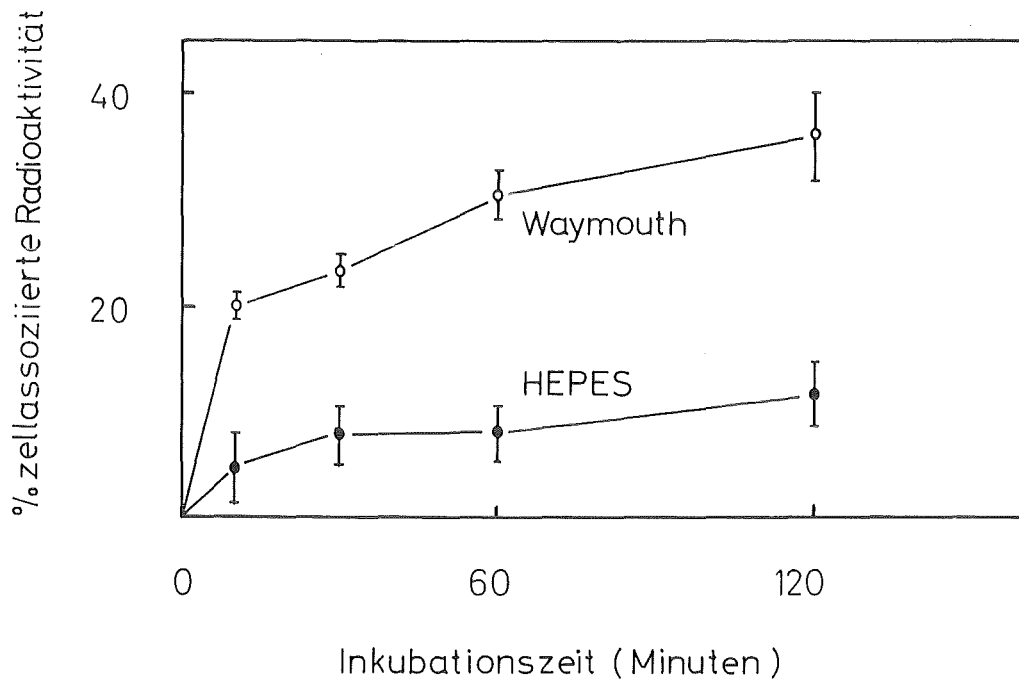


Abb. 9: Assoziation der Gesamt- α -Radioaktivität mit Rinderalveolarmakrophagen während zweistündiger Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln in Waymouth- und in HEPES-Medium in % der zugegebenen Radioaktivität ($10-132 \text{ Bq}/10^6$ Zellen für Waymouth; $8-53 \text{ Bq}/10^6$ Zellen für HEPES).

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

3 - 5 Versuche

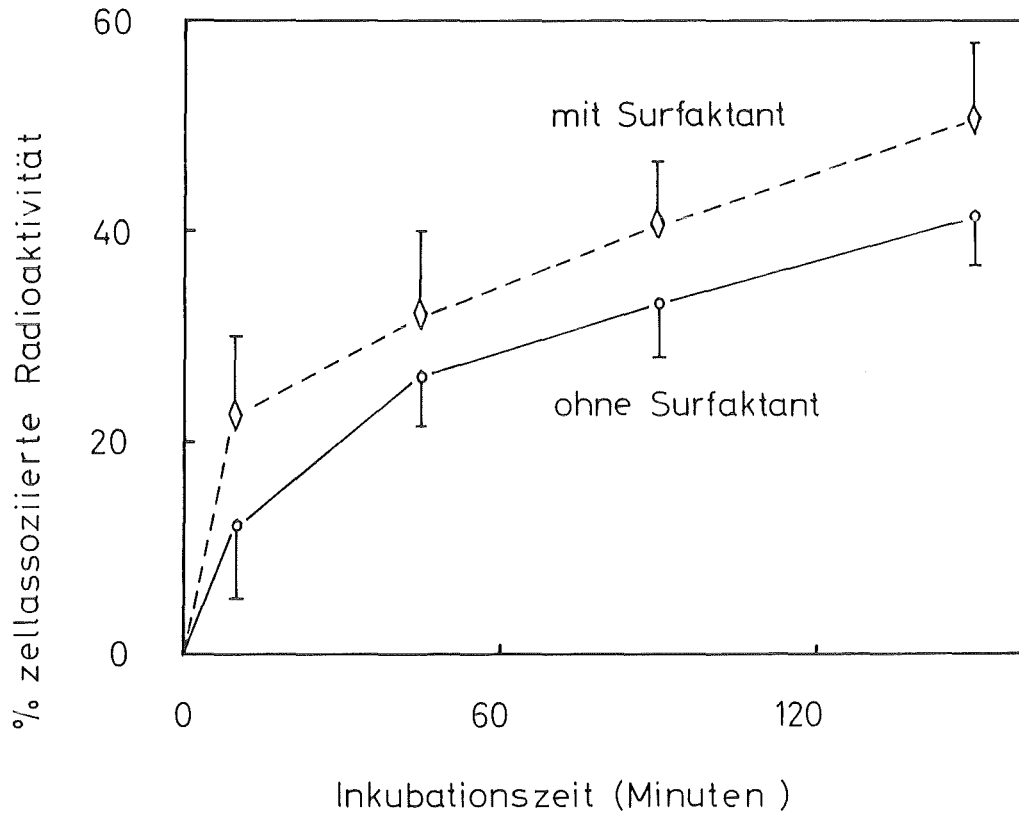


Abb.10: Assoziation der Gesamt- α -Radioaktivität mit Rinder-alveolarmakrophagen während zweieinhalbstündiger Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ohne und mit 50% Lungensurfaktant in Waymouth-Medium in % der zugegebenen Radioaktivität ($9-56 \text{ Bq}/10^6$ Zellen).

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

3 Versuche

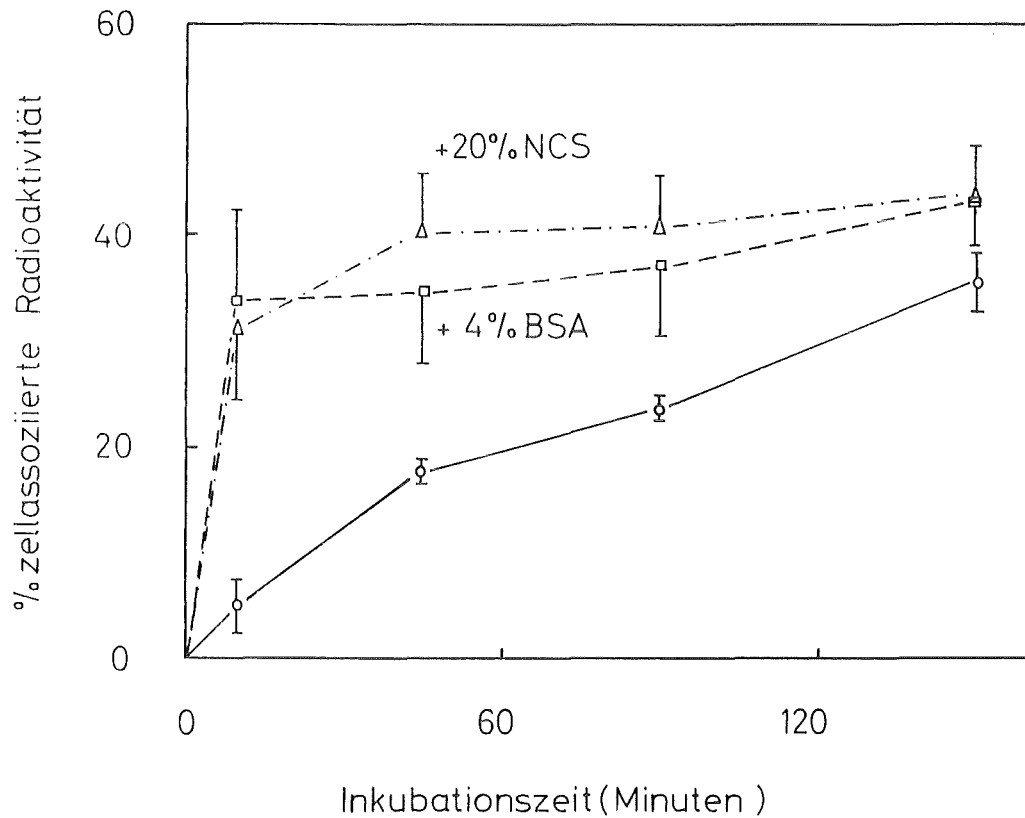


Abb. 11: Assoziation der Gesamt- α -Radioaktivität mit Rinder-alveolarmakrophagen während zweieinhalbstündiger Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln in Waymouth-Medium ohne Zusätze und mit 4% Rinderserumalbumin (BSA) oder mit 20% Kälberserum (NCS) in % der zugegebenen Radioaktivität ($52-78 \text{ Bq}/10^6$ Zellen).

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

3 Versuche

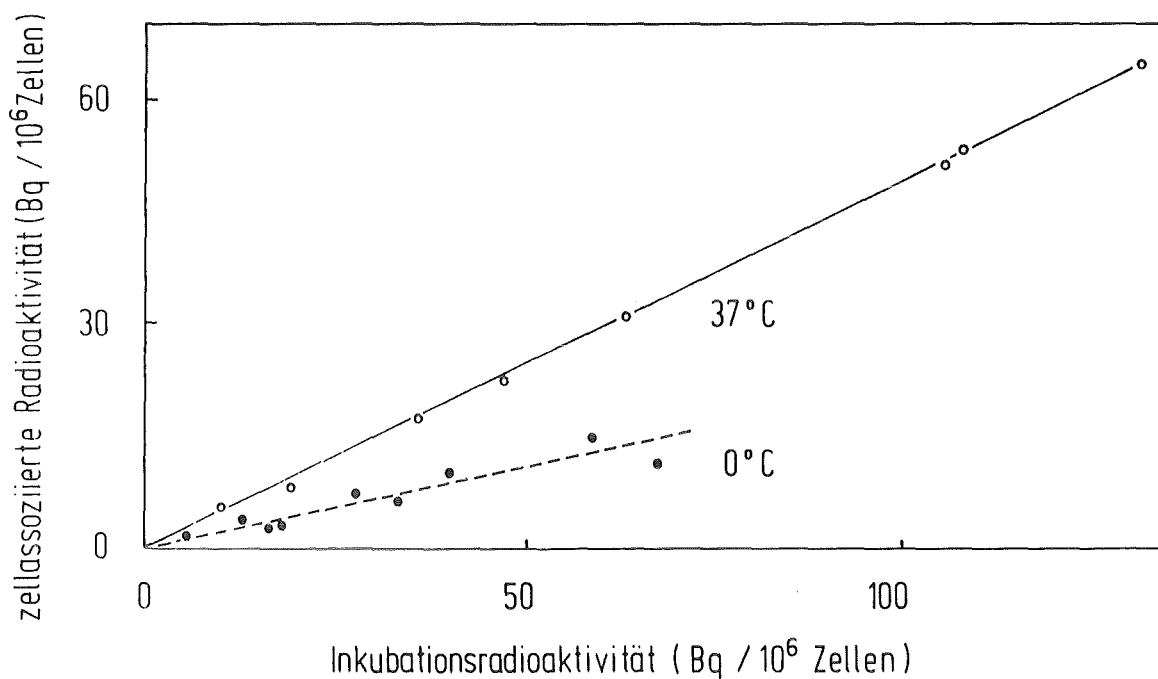


Abb.12: Assoziation der Gesamt- α -Radioaktivität mit Rinderalveolarmakrophagen nach einstündiger Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln in Waymouth-Medium in Abhängigkeit von der zugegebenen Radioaktivität.
Einzelwerte

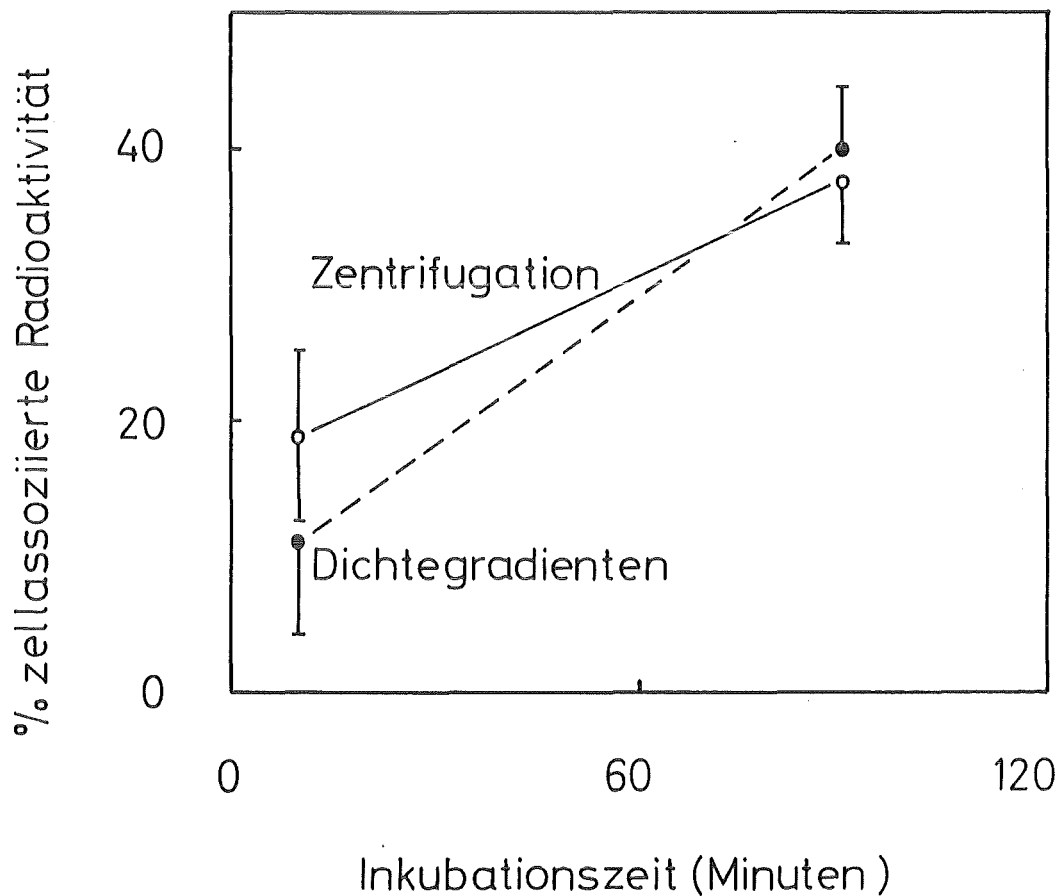


Abb.13: Vergleich der Bestimmungsmethoden (differentielle und Dichtegradientenzentrifugation, siehe Methodik) für die Assoziation der Gesamt- α -Radioaktivität mit Rinder-alveolarmakrophagen; 10 und 90 Minuten Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ - Partikeln in Waymouth-Medium (9-54 Bq/ 10^6 Zellen).

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler

3 Versuche

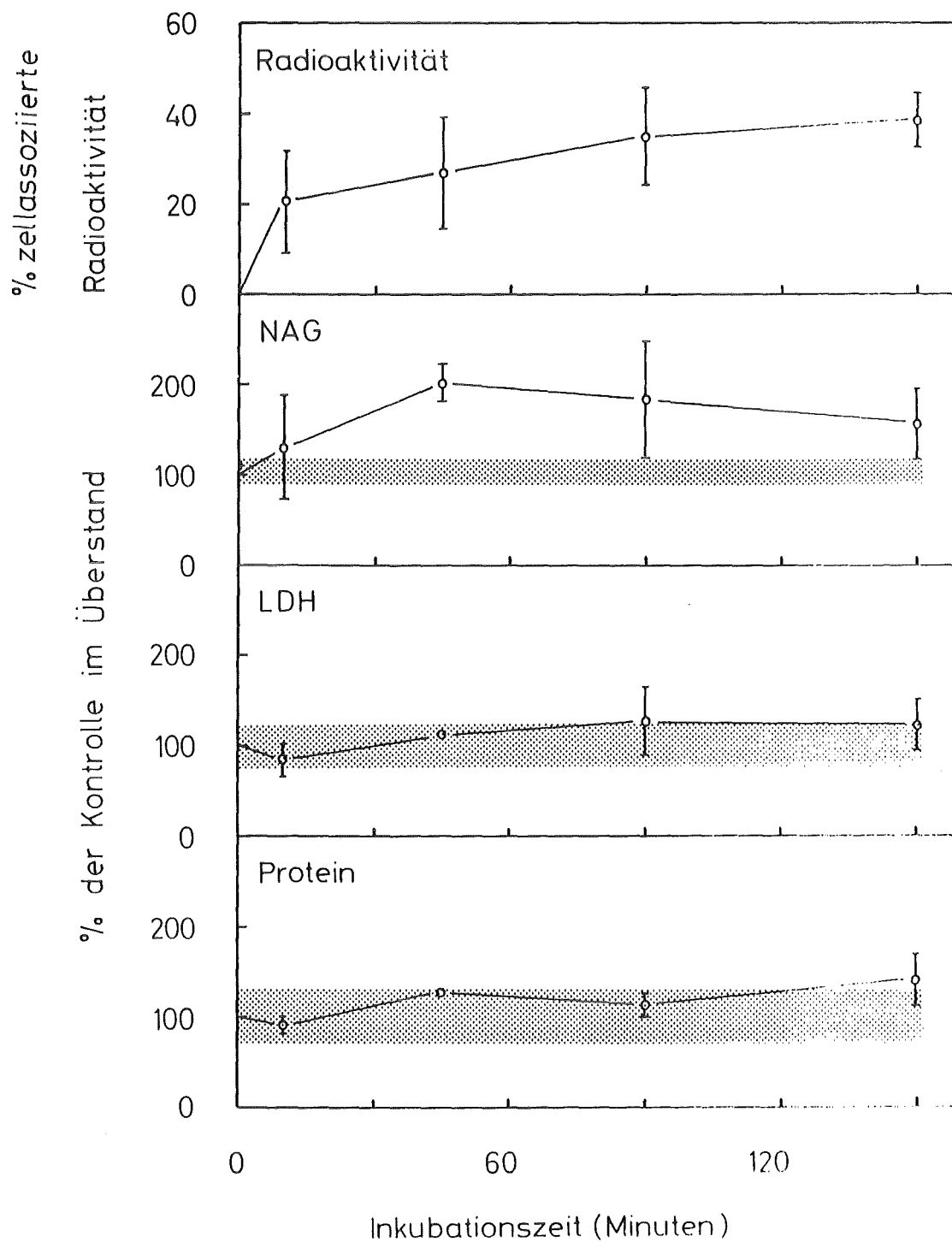


Abb. 14: Inkubation von Rinderalveolarmakrophagen mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln (11-12 Bq/10⁶ Zellen) in Waymouth-Medium ohne Zusatz von Penicillin/Streptomycin. Leitenzyme und Protein im Medium und zellassoziierte Gesamt- α -Radioaktivität.

Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler
2 Versuche

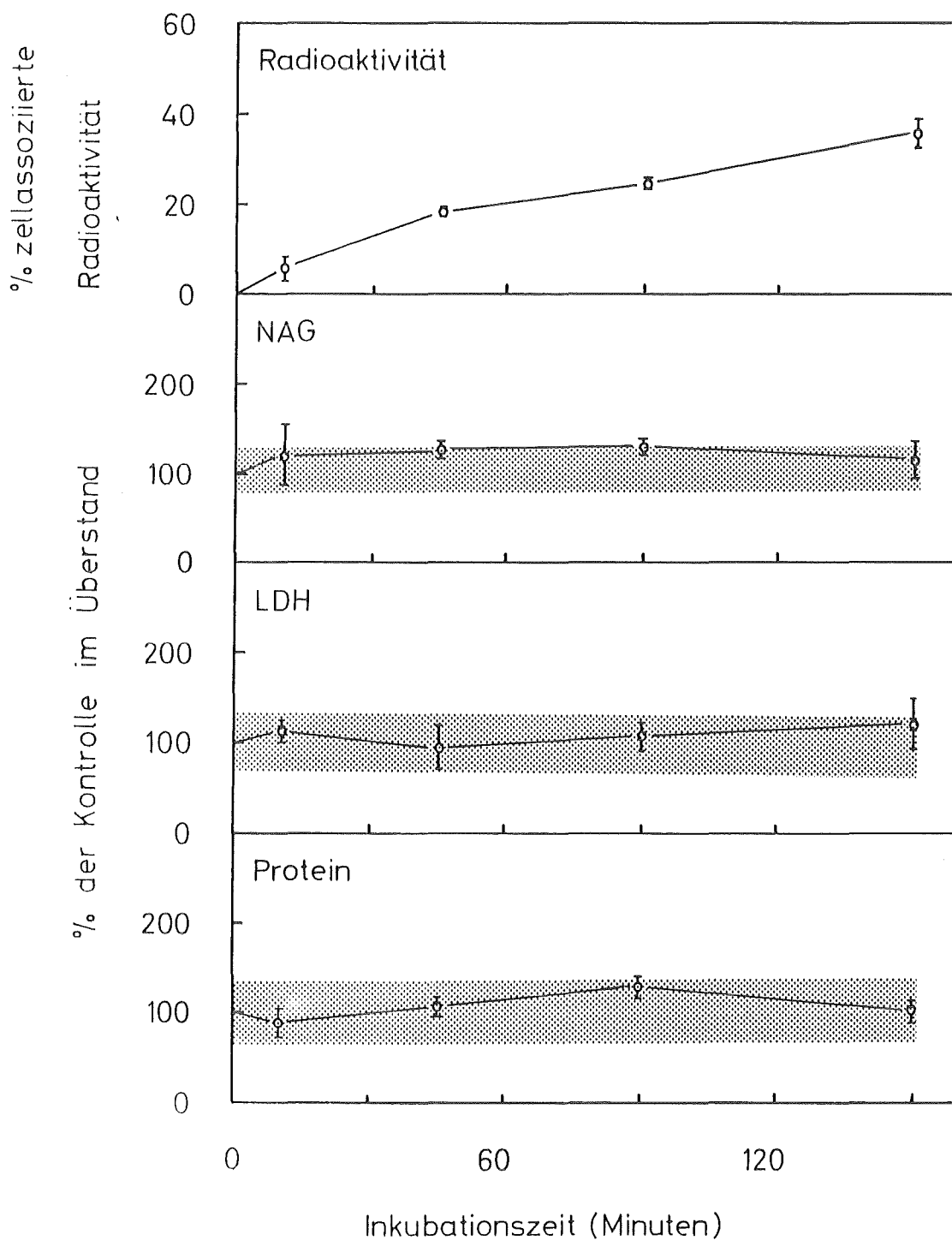


Abb. 15: Inkubation von Rinderalveolarmakrophagen mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($52-61 \text{ Bq}/10^6$ Zellen) in Waymouth-Medium mit Zusatz von Penicillin/Streptomycin. Leitenzyme und Protein im Medium und zellassozierte Gesamt- α -Radioaktivität.

Abkürzungen siehe Liste.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler
3 Versuche

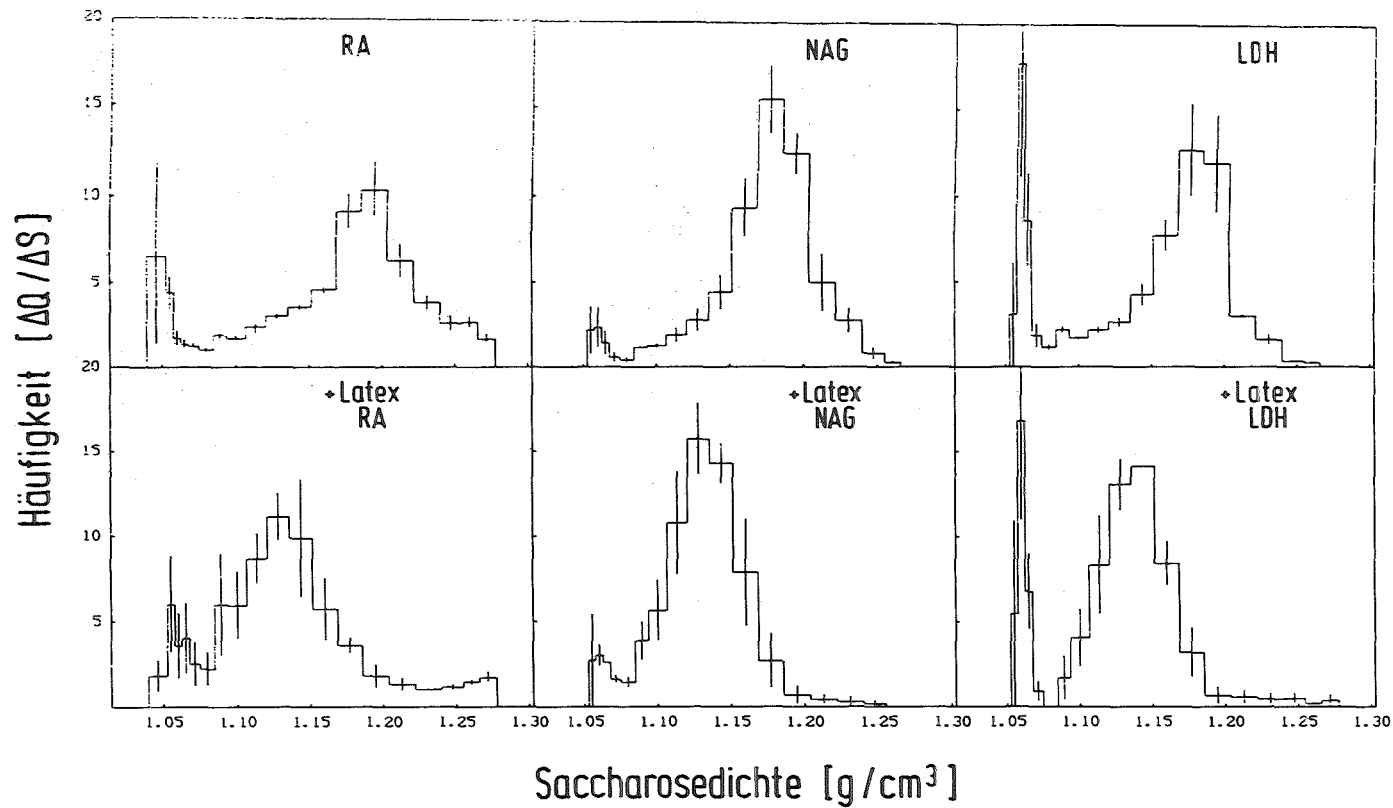


Abb.16: Verhalten von Rinderalveolarmakrophagen im Saccharose-Dichtegradienten nach 90 Minuten Inkubation mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln (AMAD: 0,9 μm) allein oder nach 10 Minuten Vorinkubation mit Latexteilchen (GMD: 0,8 μm) in Waymouth-Medium. α-Radioaktivitätsausbeute = 97%.
Abkürzungen siehe Liste.

3 Versuche

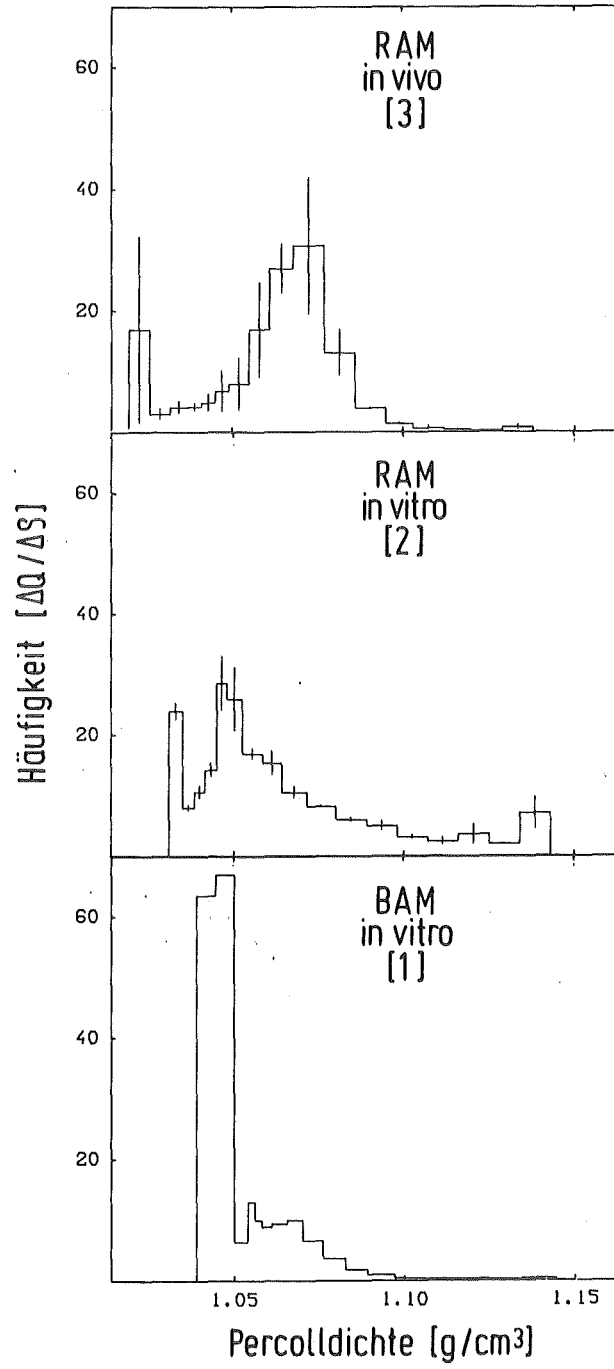


Abb. 17: Verteilung der Gesamt- α -Radioaktivität nach Zentrifugation von Ratten- und Rinderalveolarmakrophagen im linearen Percoll-Dichtegradienten (2000 g/l h; Schwingbecher).

RAM in vivo = Rattenalveolarmakrophagen 2 h, 2 Tage und 6 Tage nach intratrachealer Instillation sphärischer (U,Pu) O_2 -Partikel durch bronchoalveoläre Lavage isoliert.
 α -Radioaktivitätsausbeute = 81%.

RAM in vitro = Rattenalveolarmakrophagen 2,5 h bei 37°C mit sphärischen (U,Pu) O_2 -Partikeln in HM inkubiert.
 α -Radioaktivitätsausbeute = 43%.

BAM in vitro = Rinderalveolarmakrophagen 15 Minuten bei 37°C mit sphärischen (U,Pu) O_2 -Partikeln in HM inkubiert.
 α -Radioaktivitätsausbeute = 86%.

Zahl der Versuche in Klammern.

Abkürzungen siehe Liste.

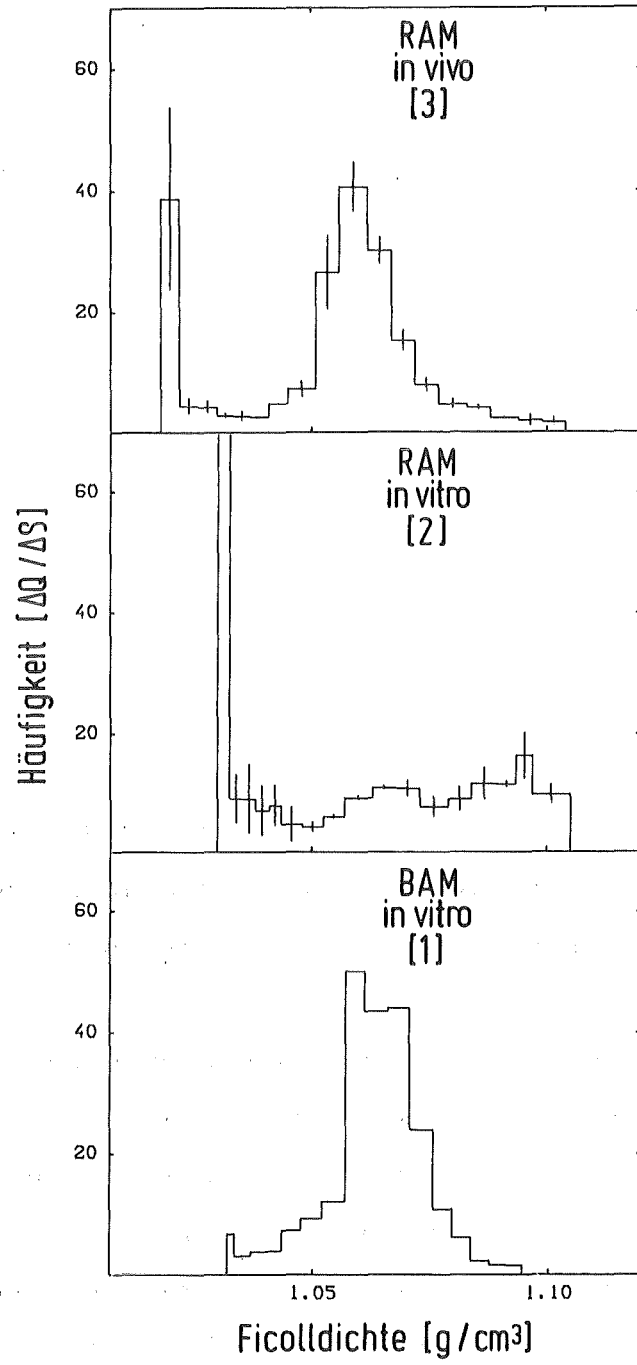


Abb.18: Verteilung der Gesamt- α -Radioaktivität nach Zentrifugation von Ratten- und Rinderalveolarmakrophagen im linearen Ficoll-Dichtegradienten (2000 g/l h; Schwingbecherrotor). Gleiche Zellen wie in Abb. 17 (Bedingungen siehe dort).

RAM in vivo: α -Radioaktivitätsausbeute = 42%

RAM in vitro: α -Radioaktivitätsausbeute = 27%

BAM in vitro: α -Radioaktivitätsausbeute = 82%.

Zahl der Versuche in Klammern.

Abkürzungen siehe Liste.

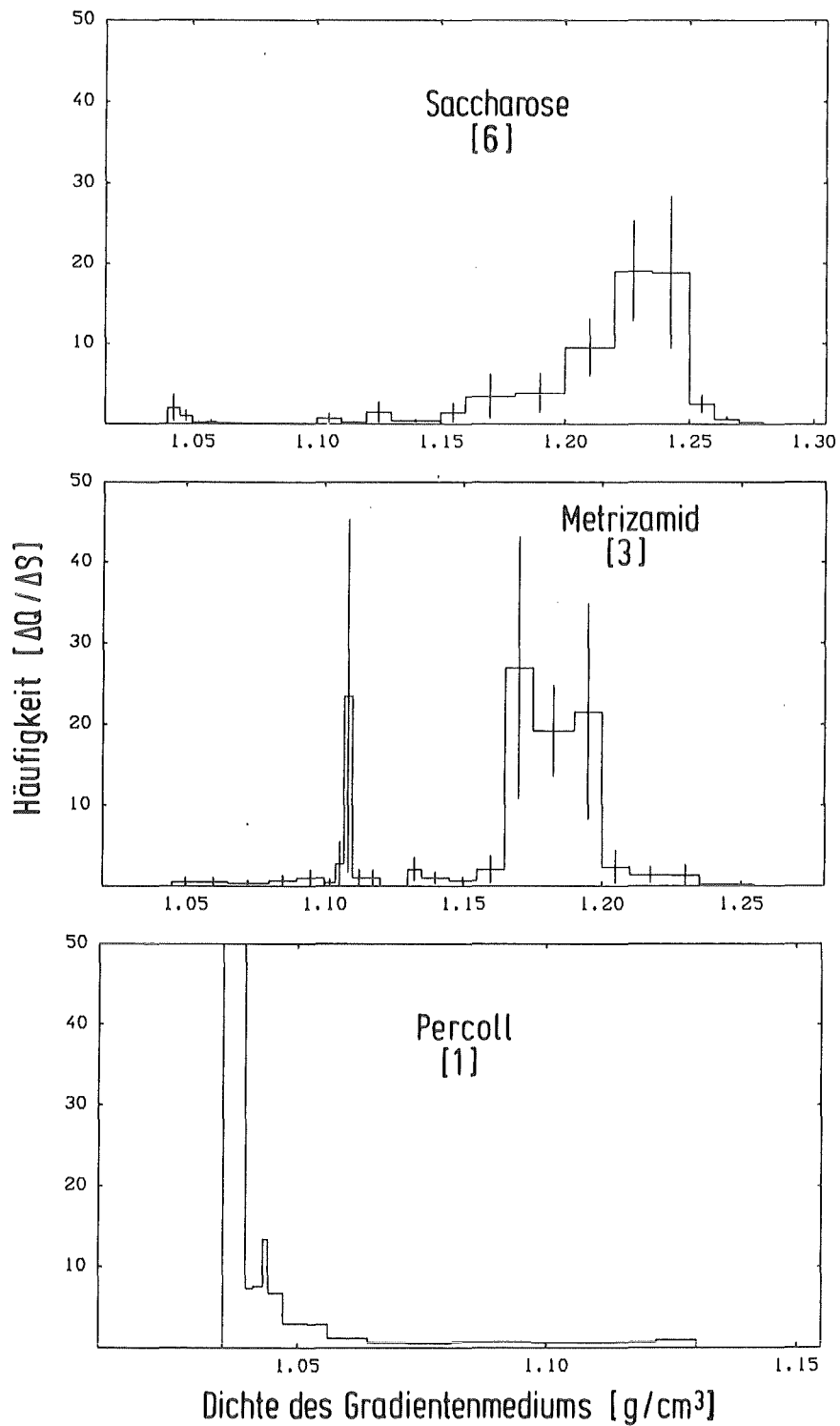


Abb.19: Verteilung der Gesamt- α -Radioaktivität nach Zentrifugation der N-Fraktion aus Rattenlunge im linearen Saccharose-, Metrizamid- (60 000 g/2 h; Vertikalrotor) und Percoll-Gradienten (2000 g/l h; Schwingbecherrotor) 3 bis 38 Tage nach intratrachealer Instillation von irregulären (U,Pu)O₂-Partikeln (AMAD: 1 μ m). Homogenisation in HM durch je 10 Auf- und Abschlüge mit dem Dounce-"L"-Homogenisator. α -Radioaktivitätsausbeuten: 53% für Saccharose, 54% für Metrizamid und 54% für Percoll.

Zahl der Versuche in Klammern; Percoll repräsentativ für 3 Versuche.

Abkürzungen siehe Liste.

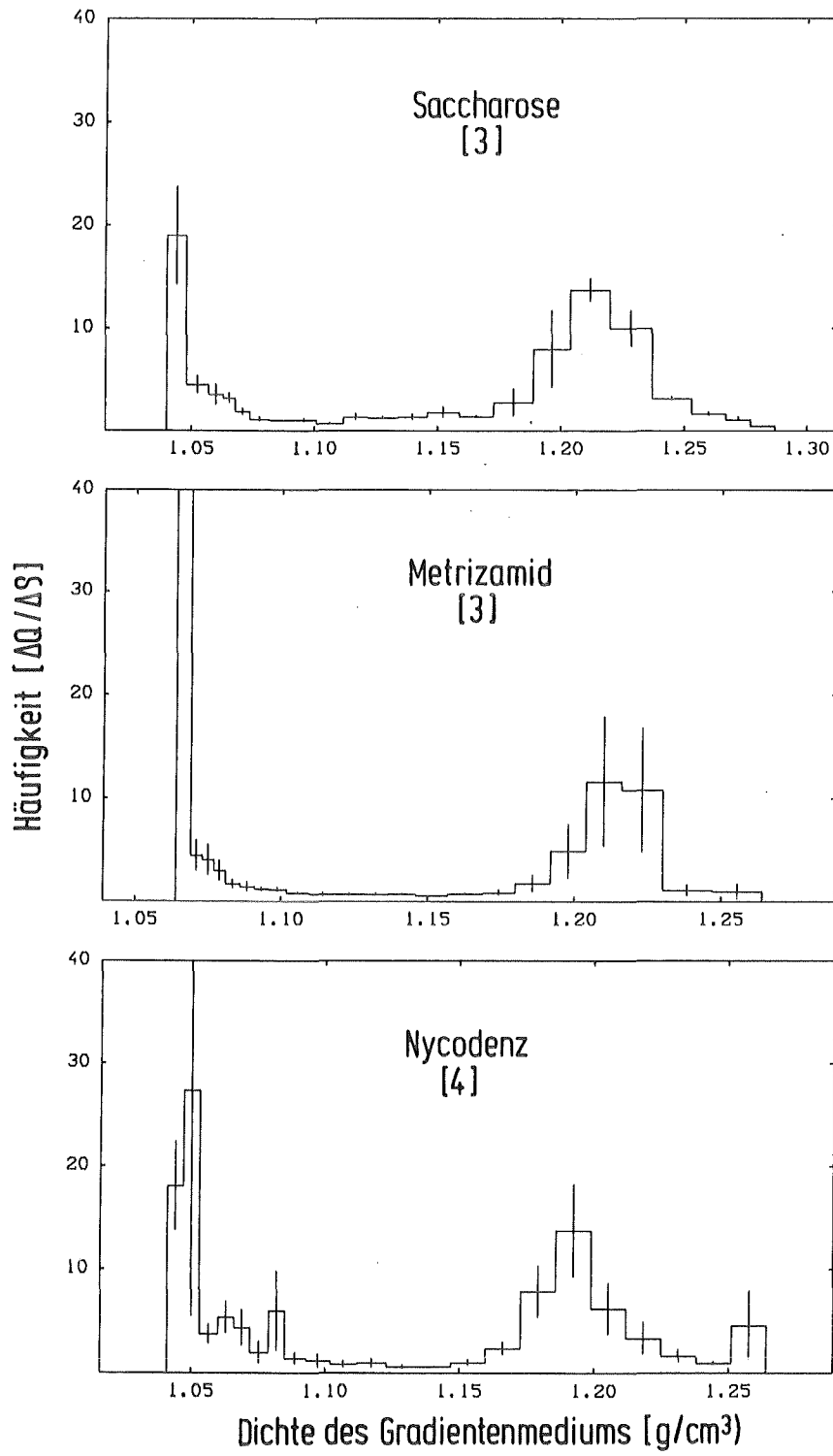


Abb.20: Verteilung der Gesamt- α -Radioaktivität nach Zentrifugation der N-Fraktion aus in vitro-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im linearen Saccharose-, Metrizamid- und Nycodenz-Dichtegradienten (60 000 g/2 h; Vertikalrotor). 1 bis 2,5 h Inkubation mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln (AMAD: 0,9 μ m) bei 37°C in Waymouth-Medium. Homogenisation in HM mit 1mM EDTA durch je 10 Auf- und Abschlüge mit dem Dounce-"S"-Homogenisator. α -Radioaktivitätsausbeuten: 19% für Saccharose, 69% für Metrizamid und 63% für Nycodenz. Zahl der Versuche in Klammern. Abkürzungen siehe Liste.

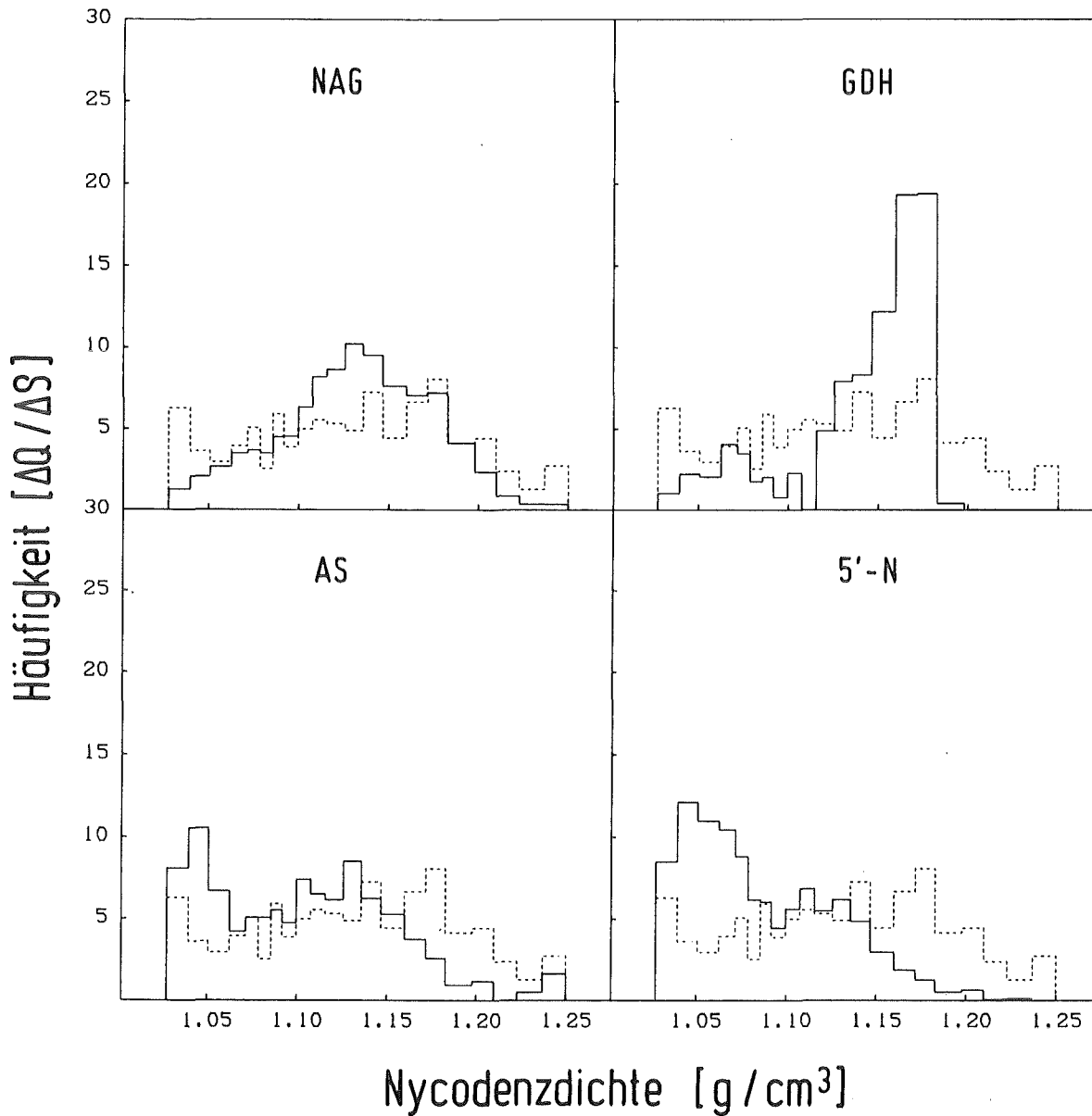


Abb.21: Verteilung von Gesamt- α -Radioaktivität (gestrichelt) und Leitenzymen nach Zentrifugation der ML-Fraktion aus Rattenlunge im linearen Nycodenz-Dichtegradienten (60 000 g/2 h; Vertikalrotor). Einzelversuch.

Homogenisation in HM durch je 10 Auf- und Abschlüge mit dem Dounce-"L"-Homogenisator; 29 Tage nach intratrachealer Instillation von sphärischen (U,Pu) O_2 -Partikeln. α -Radioaktivitätsausbeute = 39%.

Abkürzungen siehe Liste.

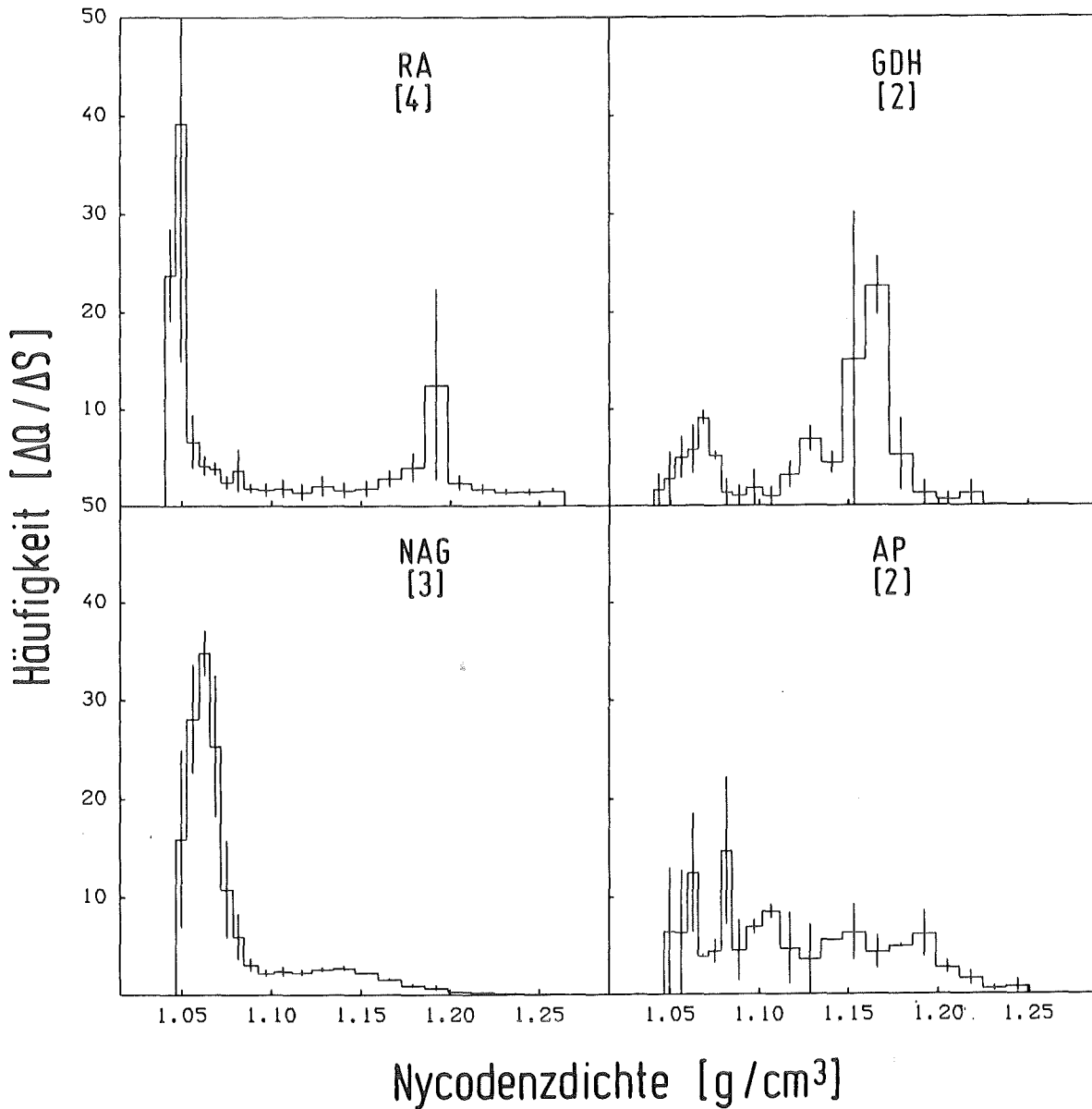


Abb.22: Verteilung von Gesamt- α -Radioaktivität (RA) und Leitenzymen nach Zentrifugation der ML-Fraktion aus in vitro-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im linearen Nycodenz-Dichtegradienten (60 000g, 2h; Vertikalrotor). α -Radioaktivitätsausbeute = 43%. Inkubations- und Homogenisationsbedingungen wie für Abb. 20 beschrieben; Inkubation mit sphärischen (U,Pu) O_2 -Partikeln. Zahl der Versuche in Klammern. Abkürzungen siehe Liste.

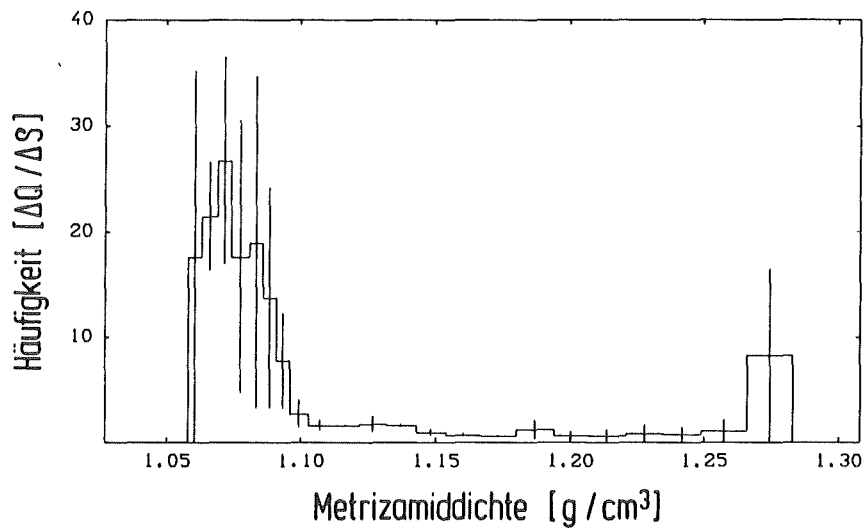


Abb.23: Verteilung der Gesamt- α -Radioaktivität nach Zentrifugation der ML-Fraktion aus in vitro-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im linearen Metrizamid-Dichtegradienten (60 000 g/2h; Vertikalrotor). 2 Versuche. α -Radioaktivitätsausbeute = 65%. Inkubations- und Homogenisationsbedingungen wie für Abb. 20 beschrieben; Inkubation mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln.

Abkürzungen siehe Liste.

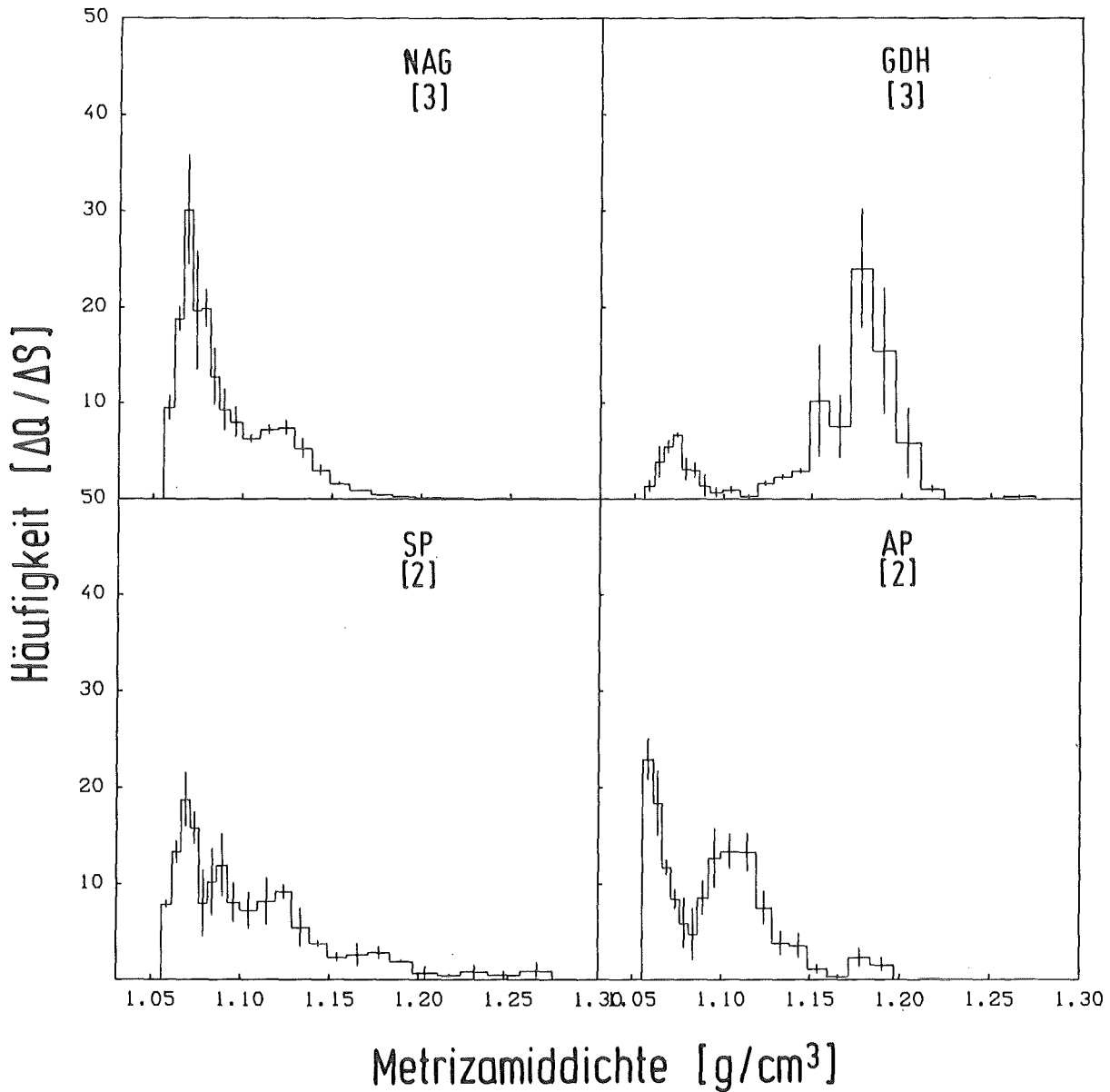


Abb.24: Verteilung von Leitenzymen nach Zentrifugation der ML-Fraktion aus frischen nichtinkubierten Rinderalveolar-makrophagen im linearen Metrizamid-Dichtegradienten (60 000 g/2h; Vertikalrotor). Homogenisationsbedingungen wie für Abb. 20 beschrieben.
Zahl der Versuche in Klammern.
Abkürzungen siehe Liste.

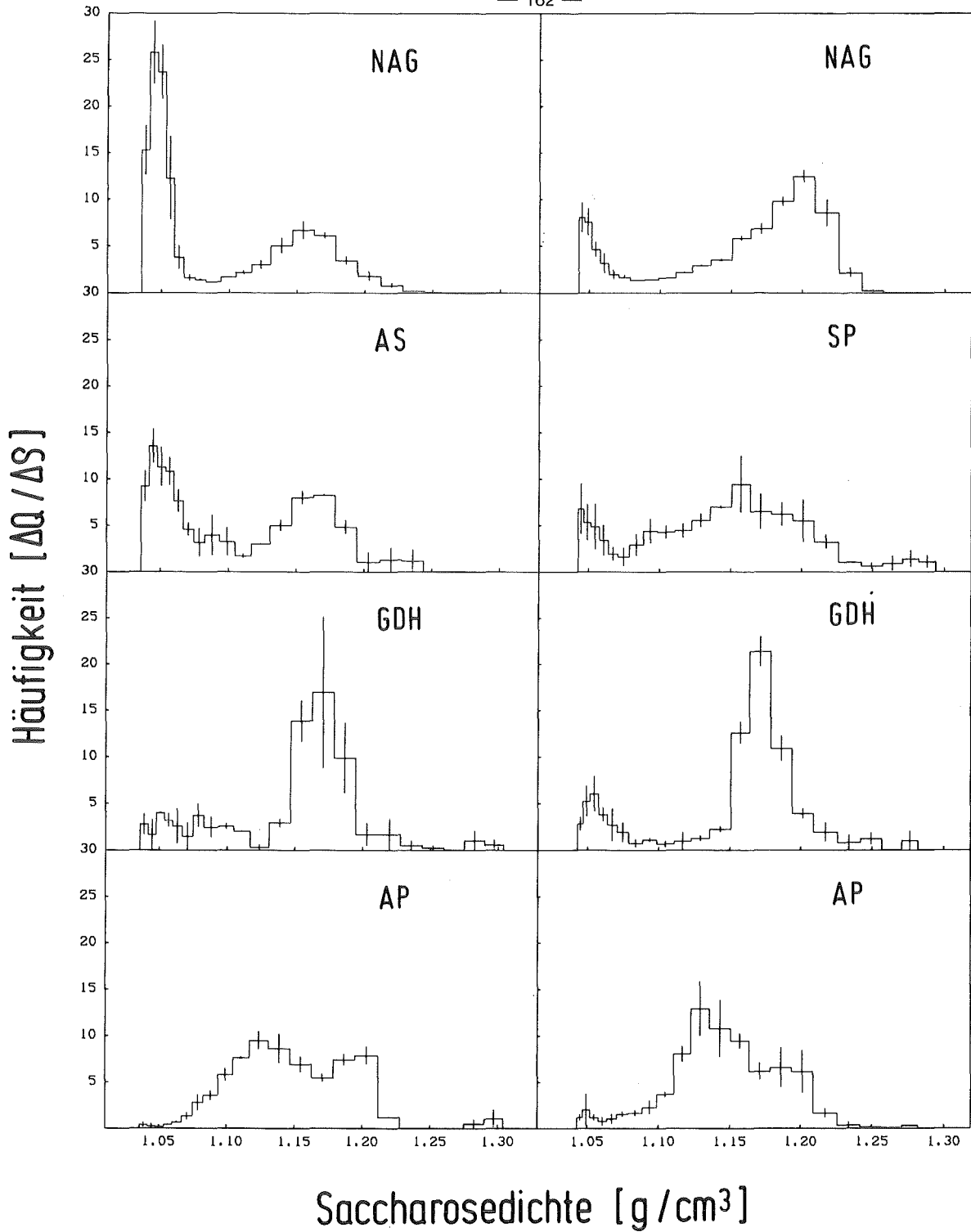


Abb.25: Verteilung von Leitenzymen nach Zentrifugation der ML-Fraktion aus frischen nichtinkubierten Rinderalveolar-makrophagen im linearen Saccharose-Dichtegradienten (60 000 g/2h; Vertikalrotor). Homogenisationsbedingungen wie für Abb. 20 beschrieben.

Links ungewaschenes ML (2 Versuche), rechts ML zwei- oder dreimal mit HM mit 1 mM EDTA gewaschen (3 Versuche).

Abkürzungen siehe Liste.

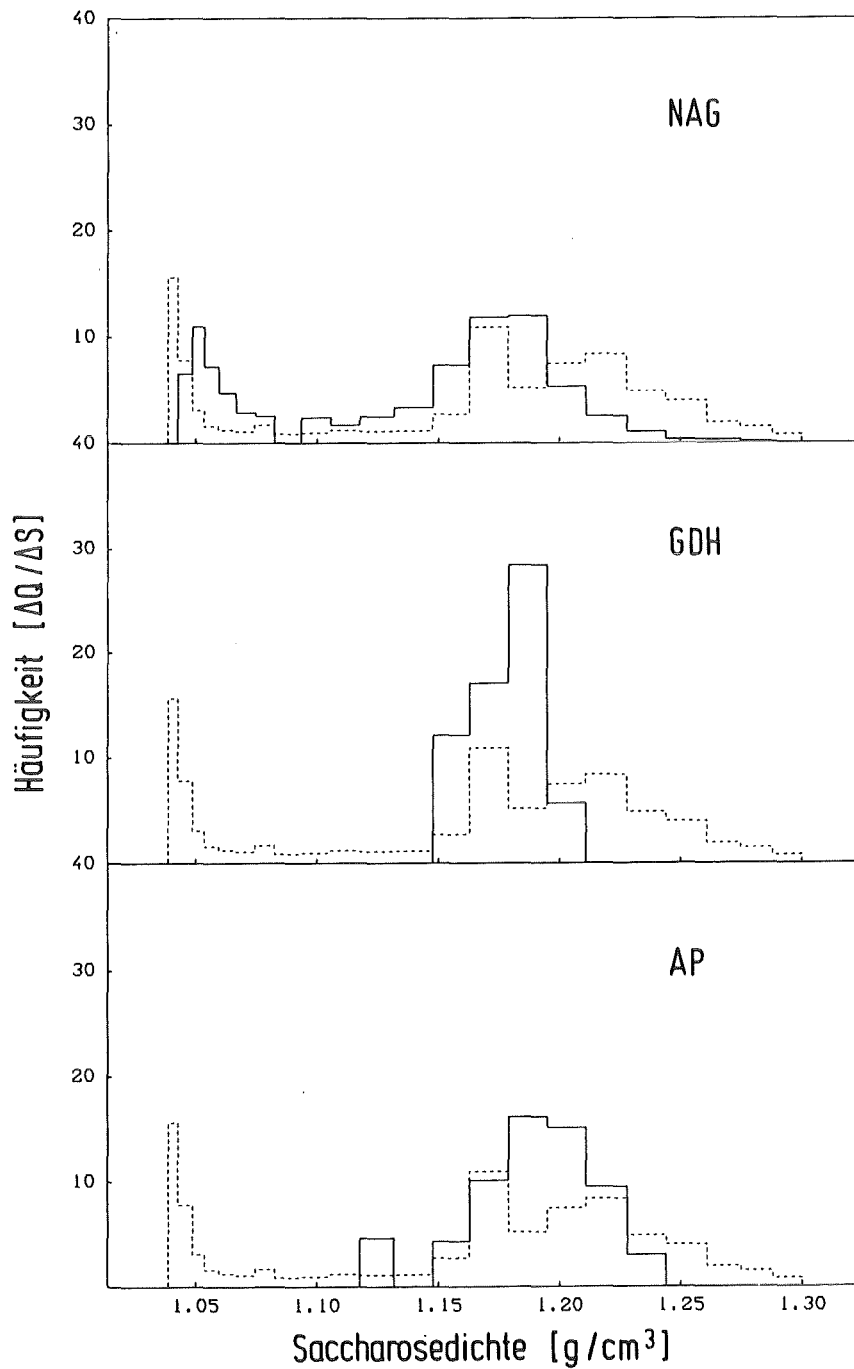


Abb.26: Verteilung von Gesamt- α -Radioaktivität (gestrichelt) und Leitenzymen nach Zentrifugation der ML-Fraktion aus in vitro-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen im linearen Saccharose-Dichtegradienten (60 000g/2h; Vertikalrotor). Einzelversuch. α -Radioaktivitätsausbeute = 37%. Inkubations- und Homogenisationsbedingungen wie für Abb.20 beschrieben; Inkubation mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln. Abkürzungen siehe Liste.

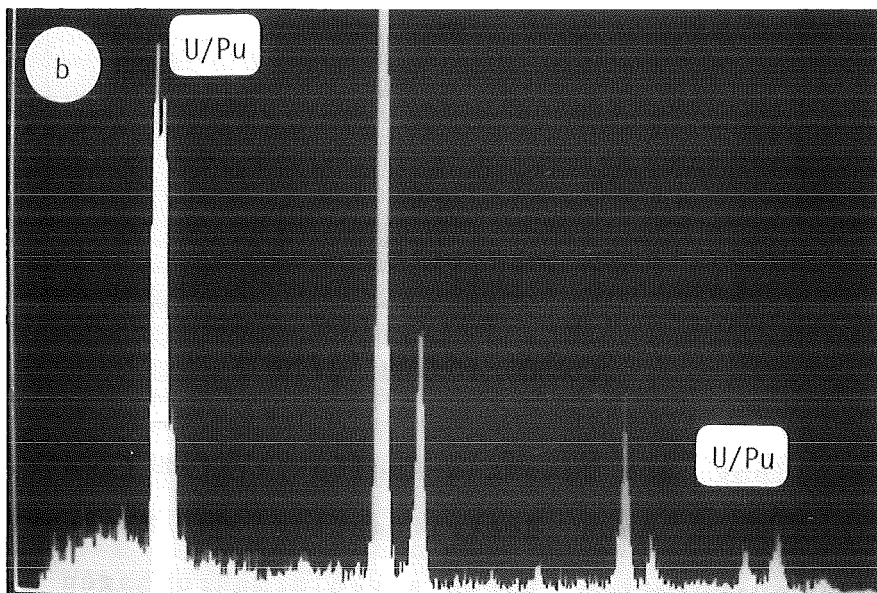
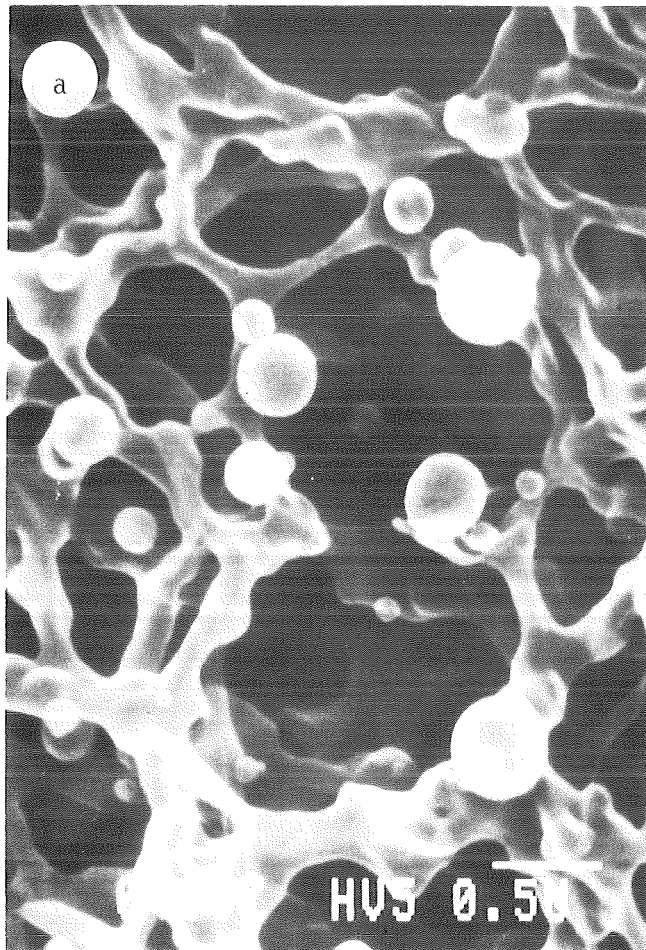


Abb.27a: Sphärische $(U,Pu)O_2$ -Partikel (AMAD: $0,9\mu m$) aus wässriger Suspension; SEM-Aufnahme (SEM = Scanning Electron Microscopy)

Abb.27b: Energiedispersives Röntgenspektrum der Partikel in Abb.27a.

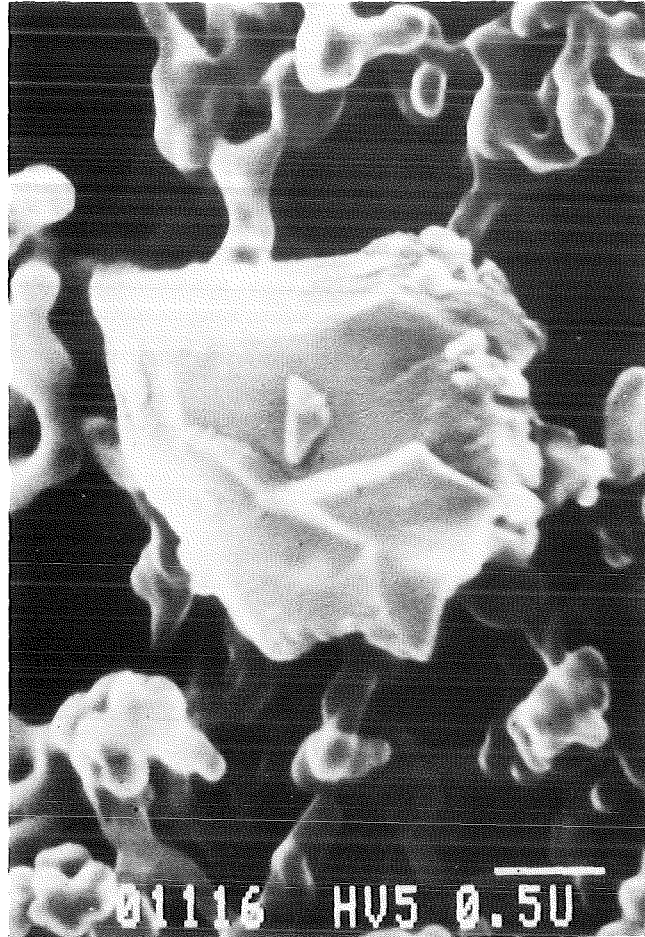


Abb.28: Irreguläre (U,Pu)O₂-Partikel (AMAD: 1µm) aus wässriger Suspension; SEM-Aufnahme

Abb.29 - 35: Rattenlunge 4 Tage nach intratrachealer Instillation von sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; instillierte Dosis: 17 kBq/kg Gesamt - Alpha - Radioaktivität). Die Pfeile markieren die $(U,Pu)O_2$ -Partikel.

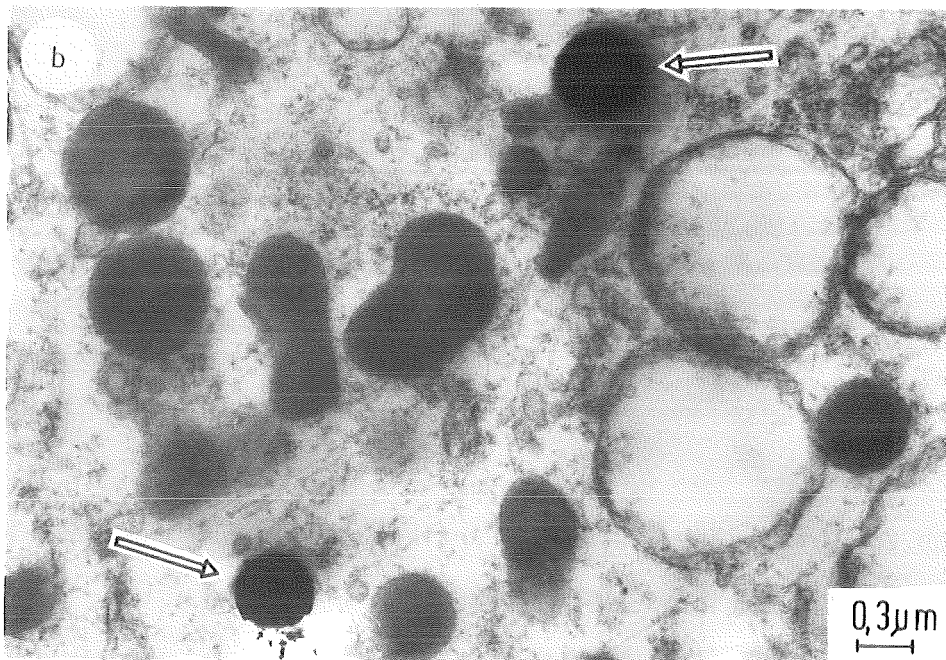
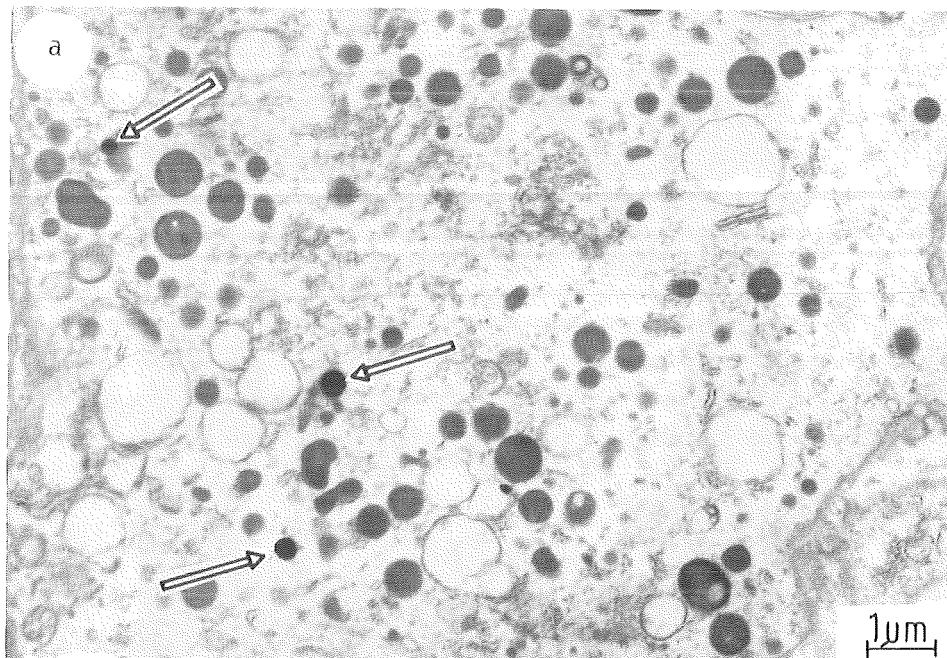


Abb.29a: 3 $(U,Pu)O_2$ -Partikel im Inneren einer Lungenzelle; Übersicht.

Abb.29b: Ausschnitt mit 2 der 3 Partikel.

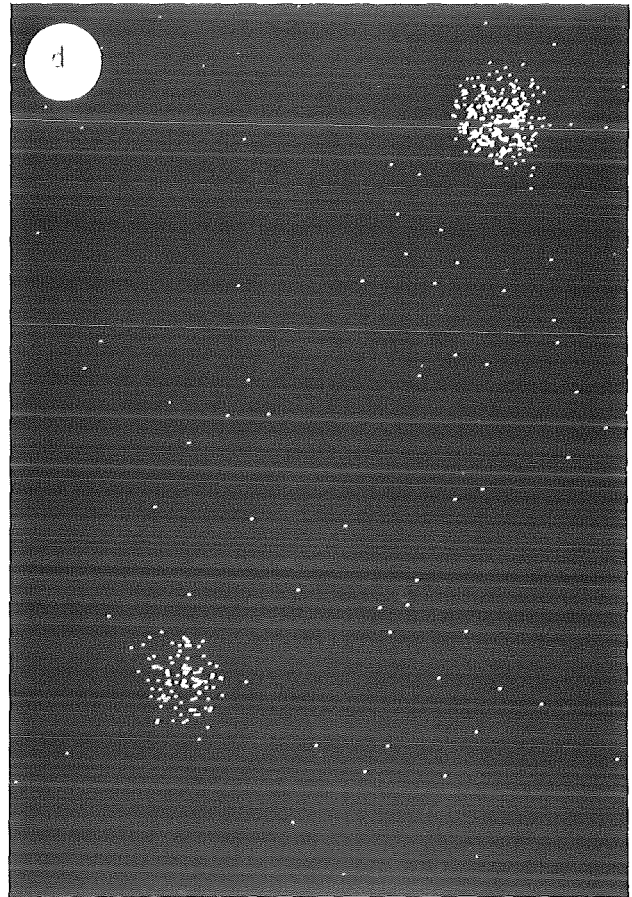
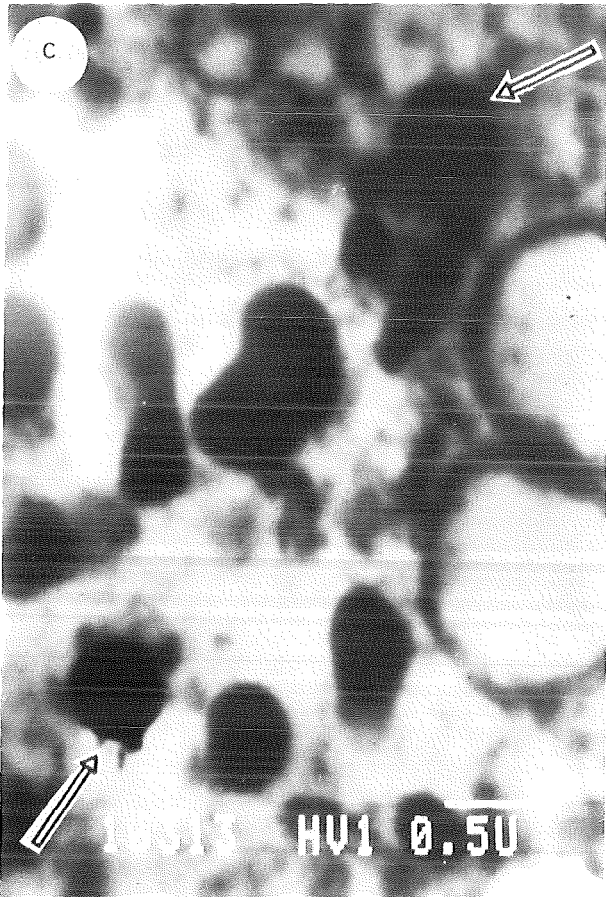


Abb.29c: STEM - Aufnahme dieses Ausschnitts (STEM = Scanning Transmission Electron Microscopy).

Abb.29d: Verteilung von Pu in der STEM-Aufnahme, sogenanntes 'mapping'.

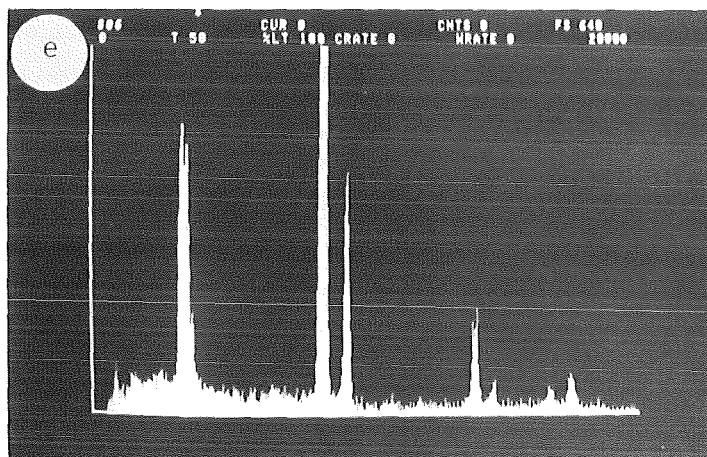


Abb.29e: Energiedispersives Röntgenspektrum einer der beiden (U,Pu)O₂-Partikel.

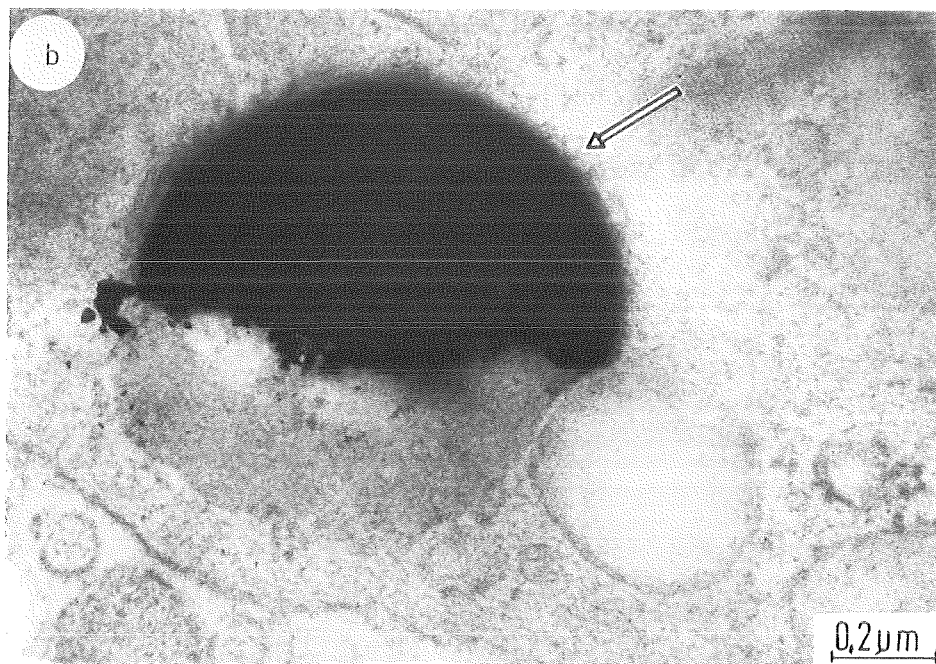
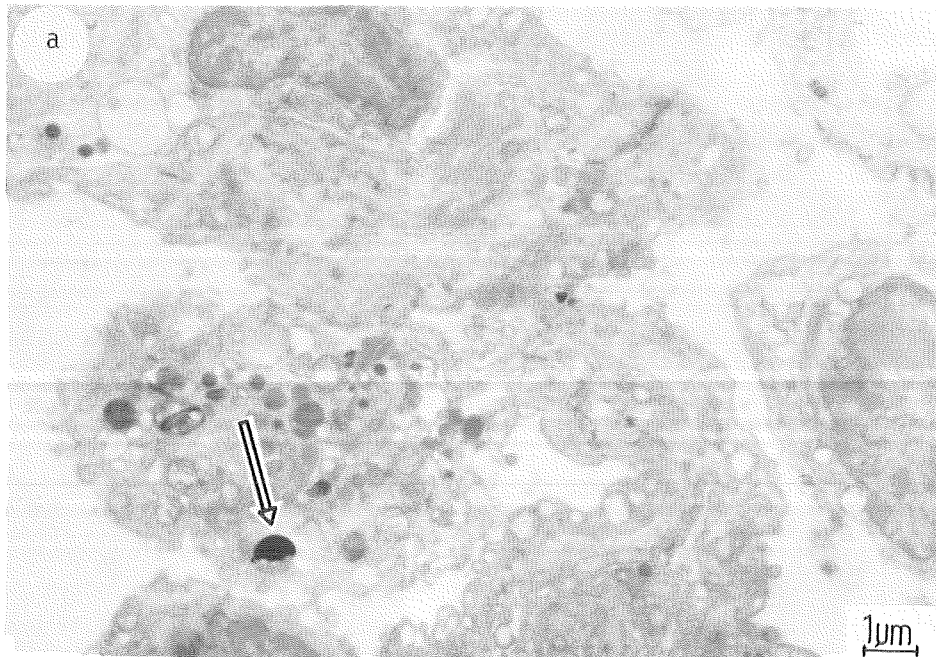


Abb.30a: Alveolarmakrophage mit $(U,Pu)O_2$ -Partikelbruchstück;
der Makrophage liegt frei auf der Alveolenoberfläche.

Abb.30b: Ausschnitt

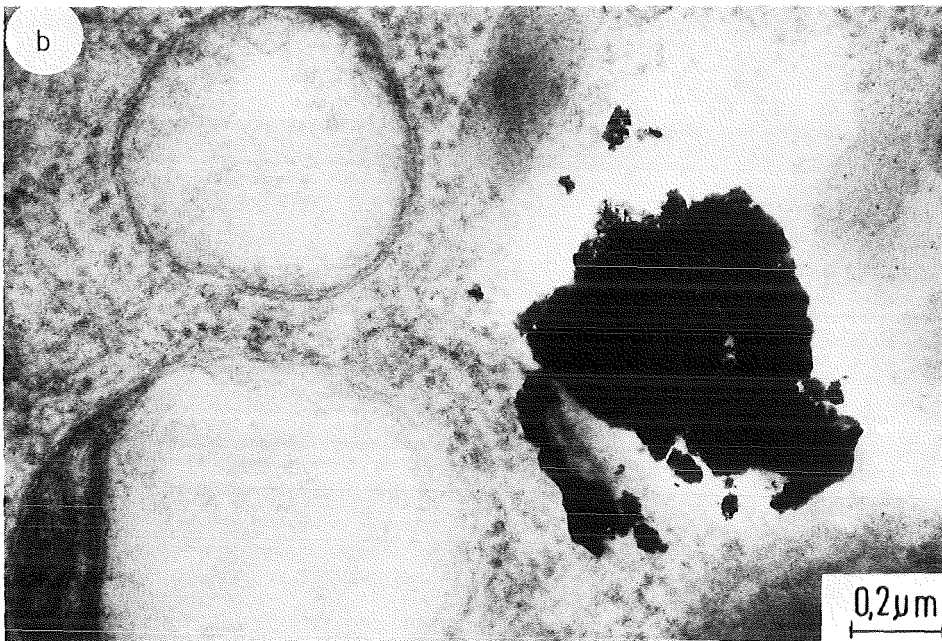
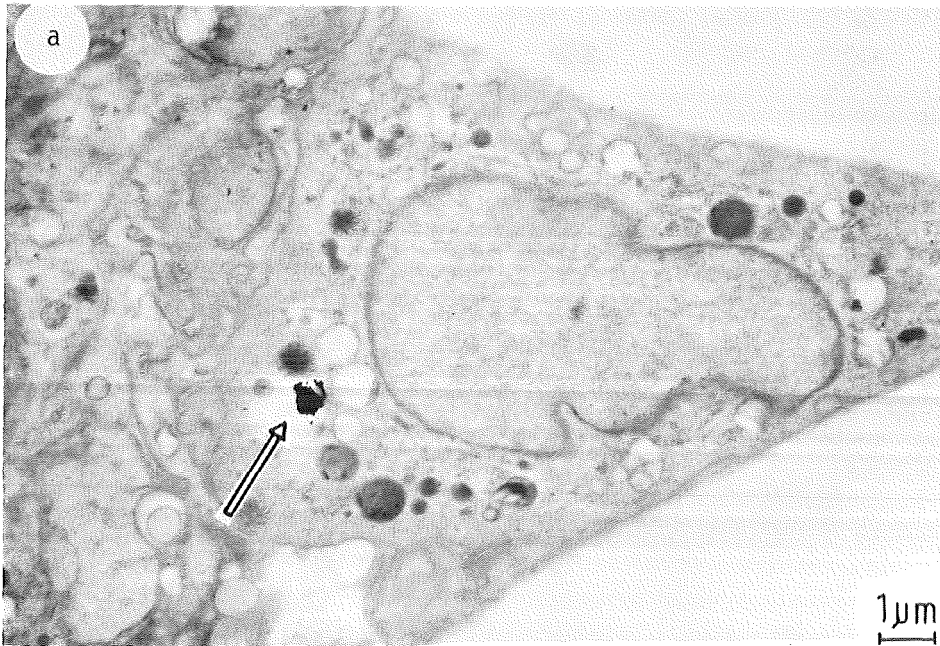


Abb.31a: Alveolarmakrophage mit (U,Pu)O₂-Partikelbruchstück.

Abb.31b: Ausschnitt

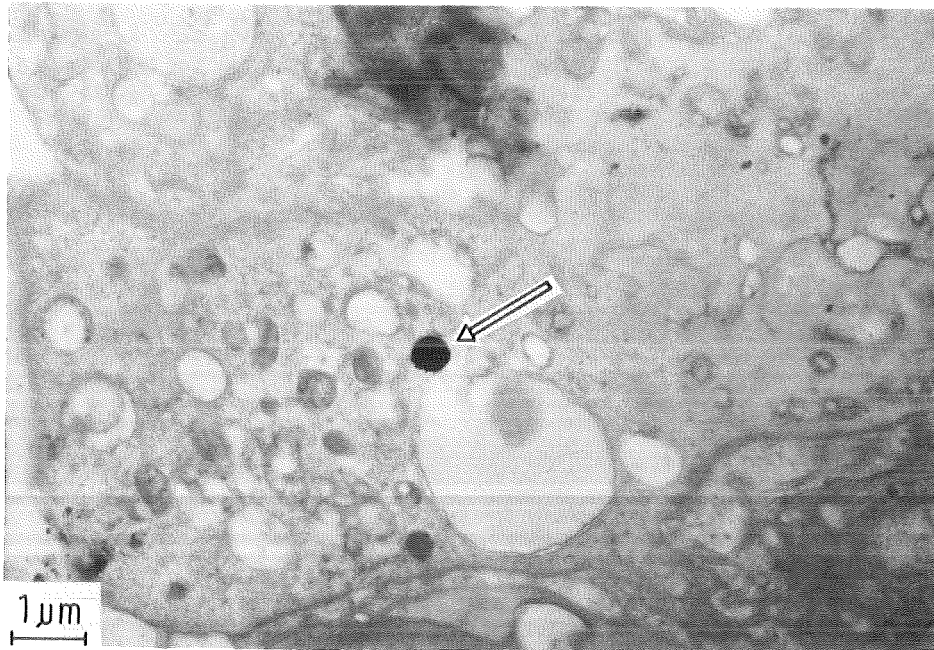


Abb.32: $(U,Pu)O_2$ -Partikel im Innern einer alveolären Zelle.

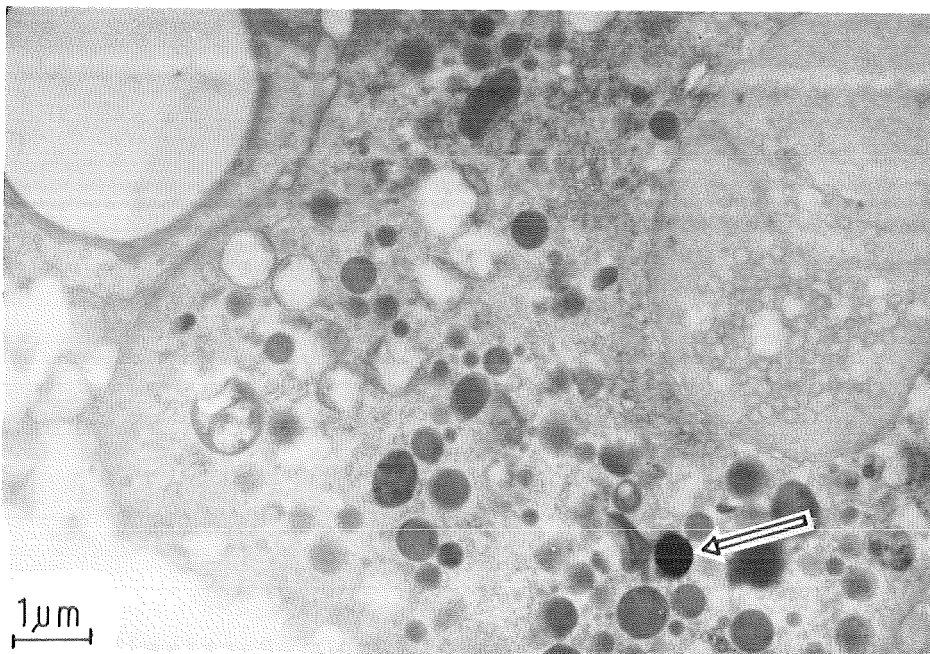


Abb.33: $(U,Pu)O_2$ -Partikel im Innern einer alveolären Zelle;
der Zellkern zeigt eine blasige Struktur.

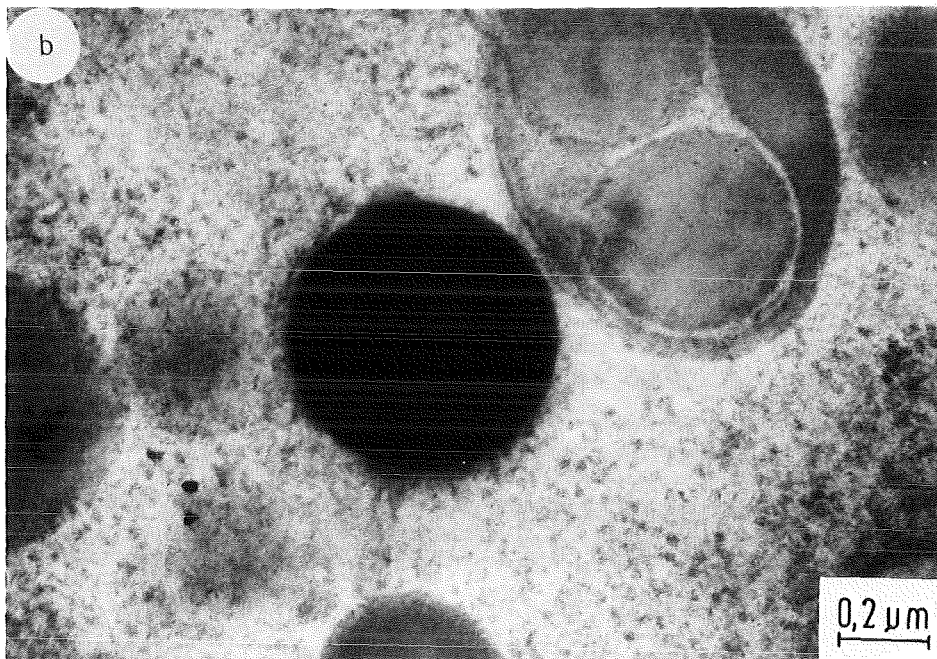
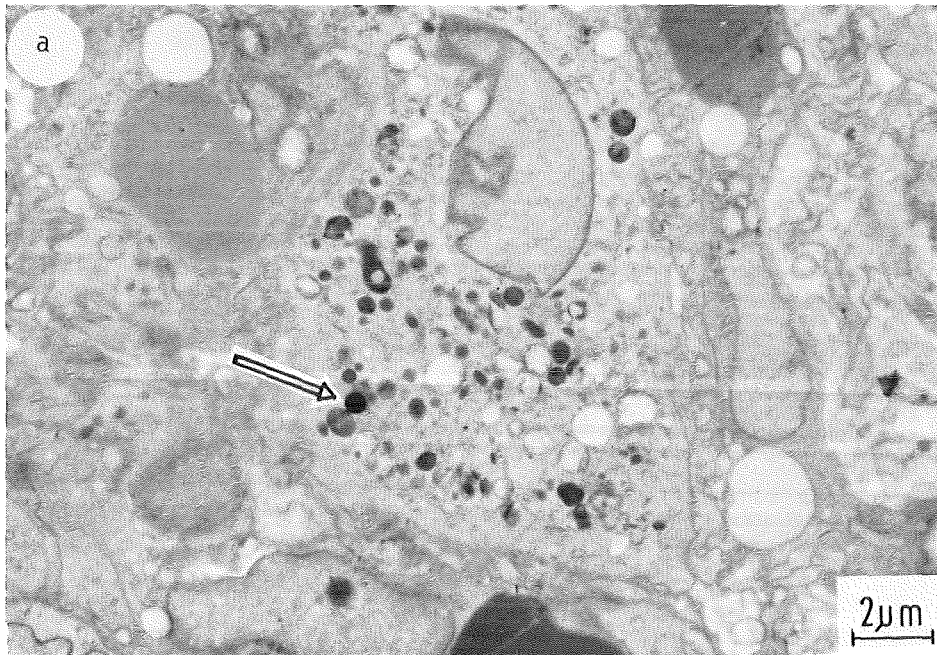


Abb.34a: Rattenlungenzelle mit sphärischer $(U,Pu)O_2$ -Partikel, von kompaktem Gewebe umgeben.

Abb.34b: Der Ausschnitt zeigt, daß die Partikel von einem elektronendichten Areal umgeben ist.

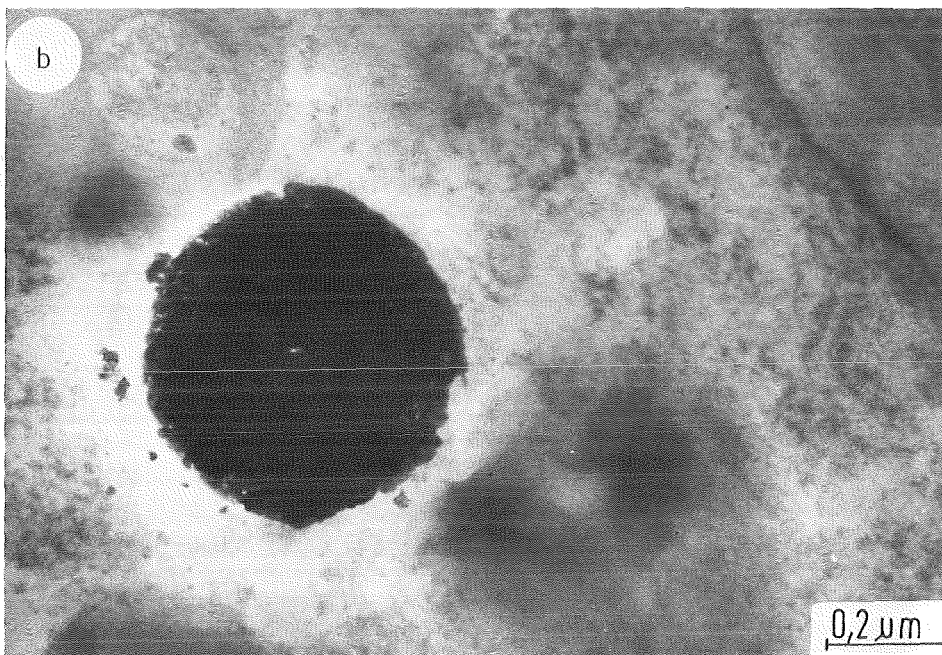


Abb.35a: Rattenlungenzelle mit sphärischer $(U,Pu)O_2$ -Partikel, von kompaktem Gewebe umgeben.

Abb.35b: Der Ausschnitt zeigt, daß die Partikel im Gegensatz zu der in Abb. 34 b frei im Cytoplasma liegt sowie weniger kompakt erscheint.

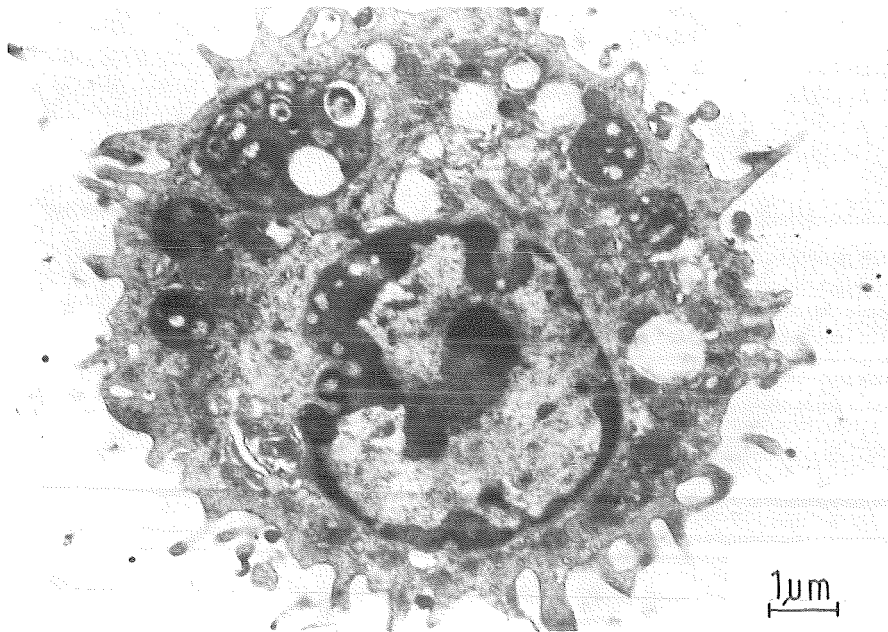


Abb.36: 2 Tage nach intratrachealer Instillation von sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; IAD: $2,7kBq/kg$ Gesamt-Alpha-Radioaktivität) aus der Rattenlunge ausgewaschener Alveolarmakrophage.

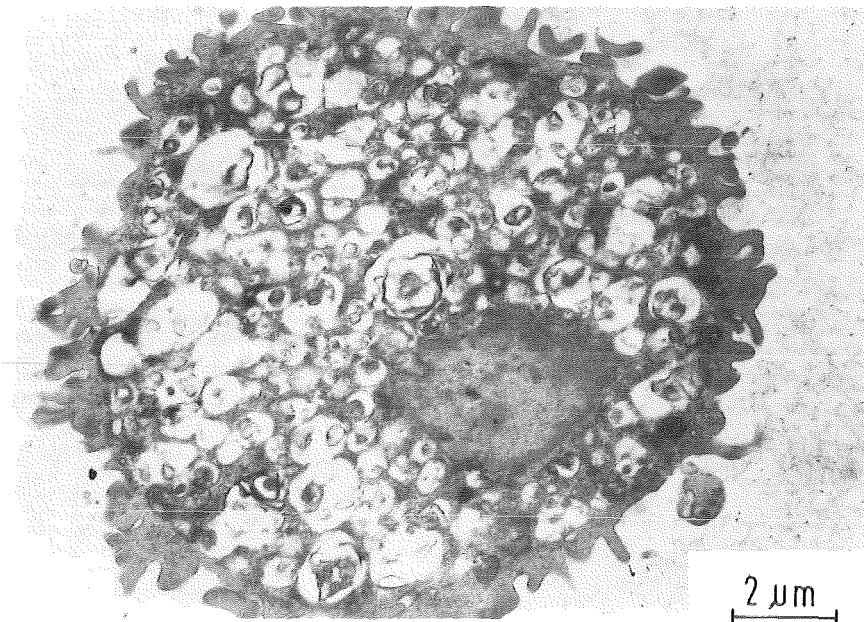


Abb.37: 8 Tage nach intratrachealer Instillation von irregulären $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,7\mu m$ AMAD; IAD: $1,4kBq/kg$ Gesamt-Alpha-Radioaktivität) aus der Rattenlunge ausgewaschener Alveolarmakrophage.

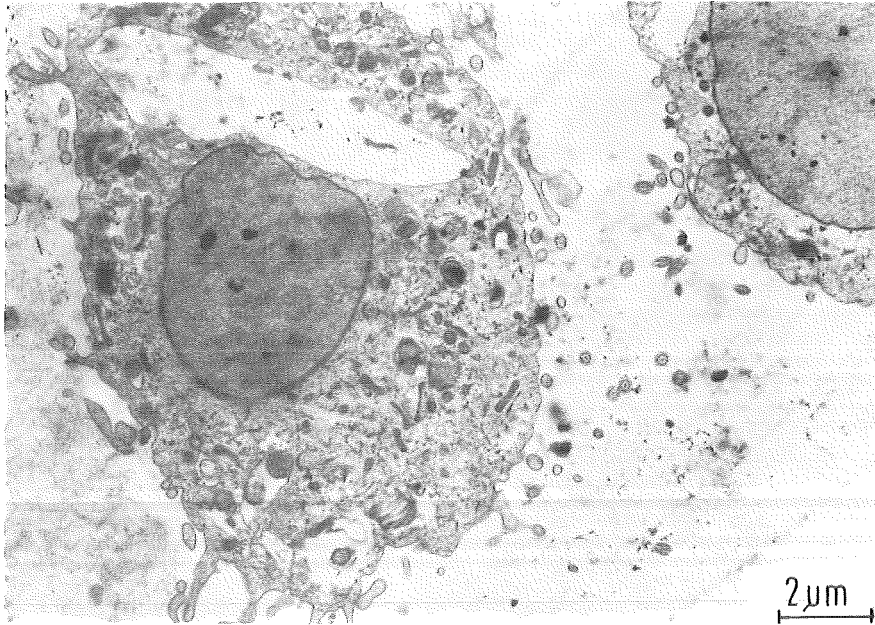


Abb.38: Mit der ersten Lavage (mit 3 Litern 0,9% NaCl) aus der Lunge eines etwa eine Stunde zuvor getöteten Rindes ausgewaschene Rinderalveolarmakrophagen.



Abb.39: Mit der dritten Lavage (mit 3 Litern 0,9% NaCl) aus der gleichen Rinderlunge wie in Abb.38 ausgewaschener Rinderalveolarmakrophage

Abb.40 - 44: Rattenlunge 111 Tage nach intratrachealer Instillation von sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; 17 kBq/kg Gesamt-Alpha-Radioaktivität). Die Pfeile markieren die $(U,Pu)O_2$ -Partikel.

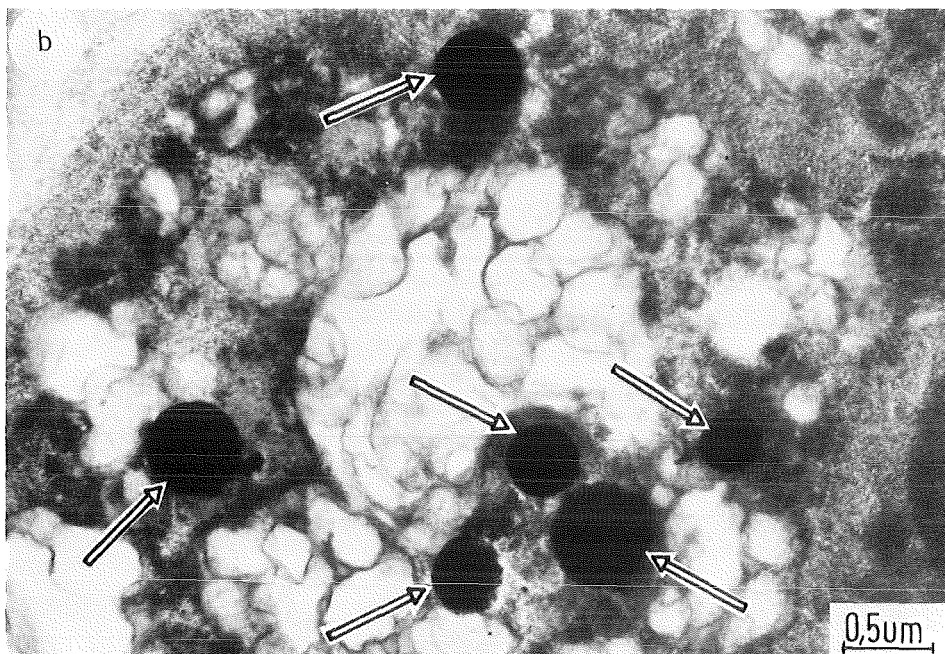
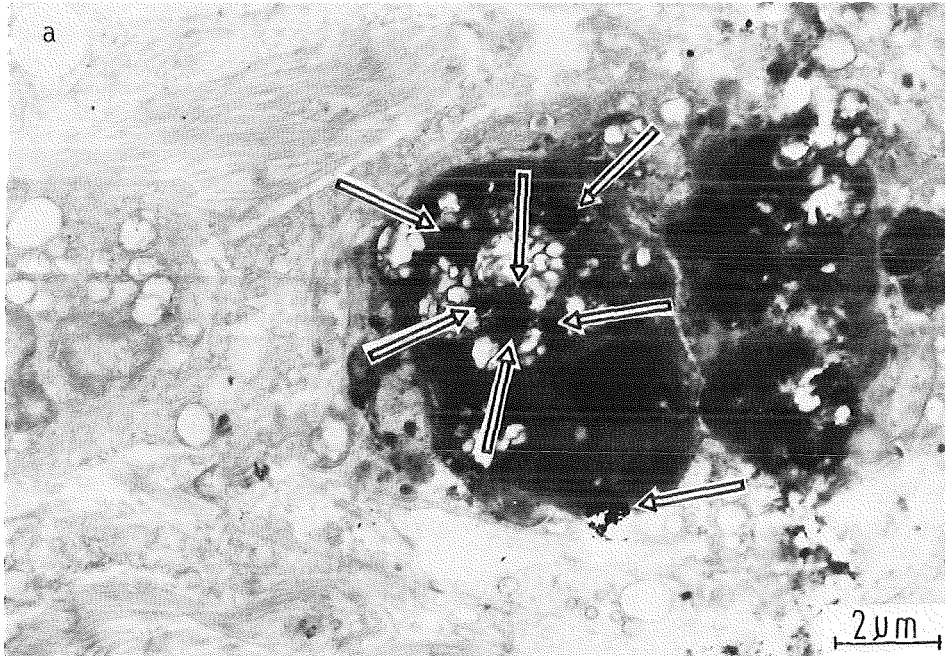


Abb.40a: Rattenlungenzelle mit 7 Partikeln, die im Innern eines elektronendichten Bereiches gelegen sind. Neben stark eisenhaltigen Bereichen ist denaturiertes membranöses Material sichtbar.

Abb.40b: Vergrößerter Ausschnitt

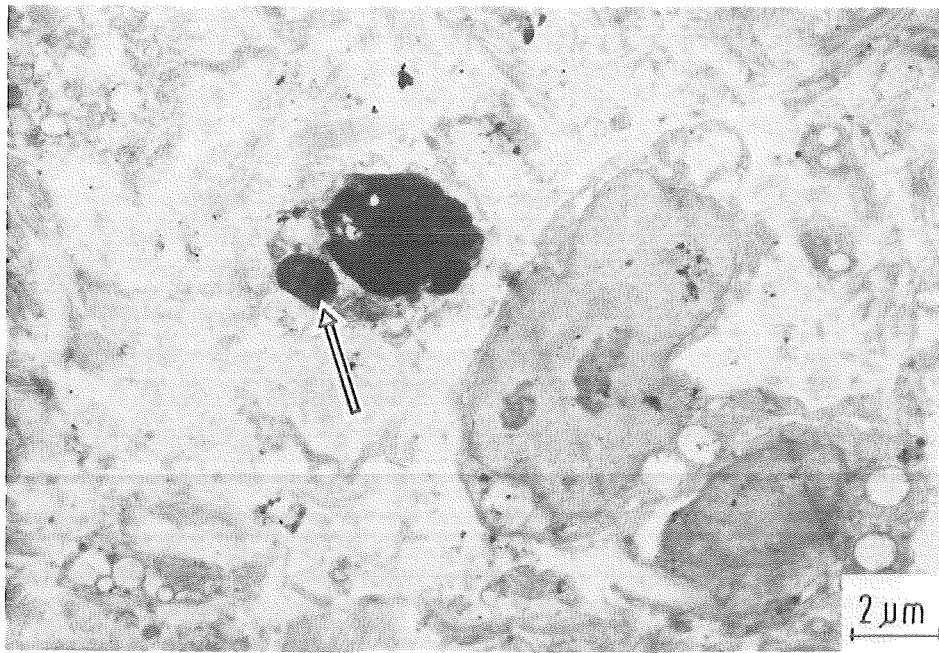


Abb.41: Rattenlungenzelle mit einer $(U,Pu)O_2$ -Partikel; in der Umgebung Gruppen von Fasern mit unterschiedlicher Orientierung.

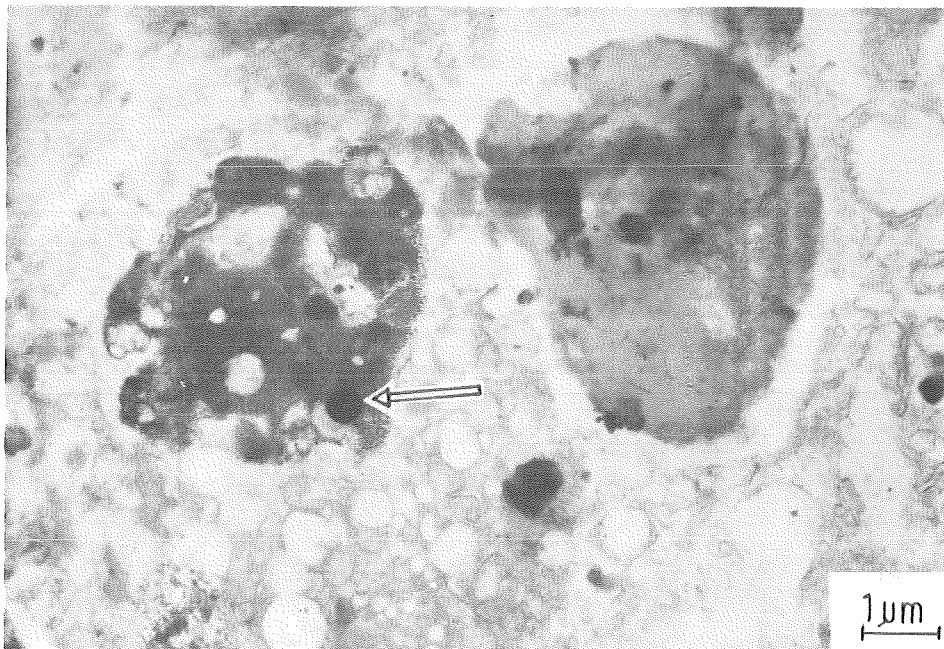


Abb.42: Rattenlungenzelle mit einer Partikel; außerhalb des eisenhaltigen dunklen Areales sind zahlreiche elektronendurchlässige Vesikel im Cytoplasma der Zelle vorhanden.



Abb.43: Rattenlungenzelle mit 4 $(U,Pu)O_2$ -Partikeln im Innern eines ausgedehnten elektronendichten Bereiches; dieser enthält Eisen und füllt fast die gesamte Zelle aus. In der Umgebung mehrere quer angeschnittene Faserbündel.



Abb.44: Rattenlungenzelle mit einer $(U,Pu)O_2$ -Partikel in der Nachbarschaft bindegewebiger Fasern.

Abb.45 - 47: Rattenlunge 473 Tage nach intratrachealer Instillation von sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; 17 kBq/kg Gesamt-Alpha-Radioaktivität) Die Pfeile markieren die $(U,Pu)O_2$ -Partikel.

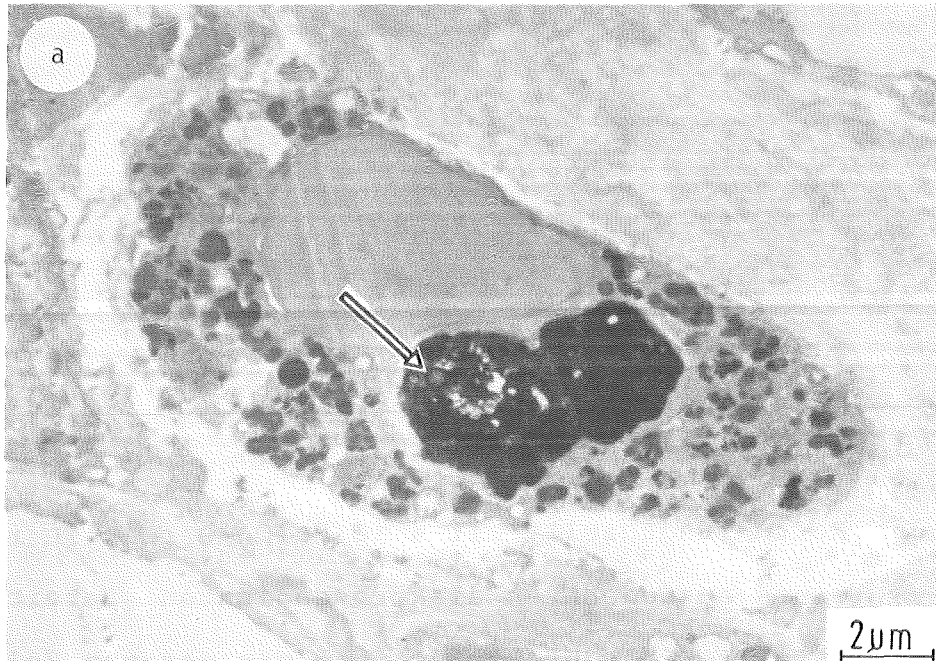


Abb.45a: Rattenlungenzelle mit einer $(U,Pu)O_2$ -Partikel im Alveolareseptum. Die Partikel ist von einem elektronendichten eisenhaltigen Areal umgeben.

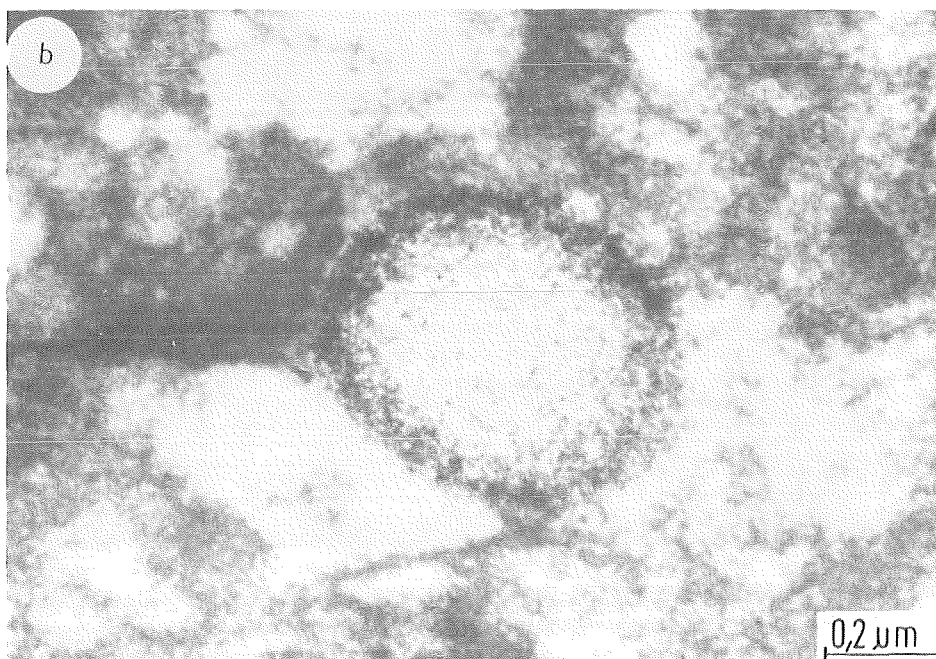


Abb.45b: Der vergrößerte Ausschnitt aus Abb.45a zeigt, daß die Elektronendichte der Partikel im Vergleich mit den frühen Zeitpunkten deutlich abgenommen hat.

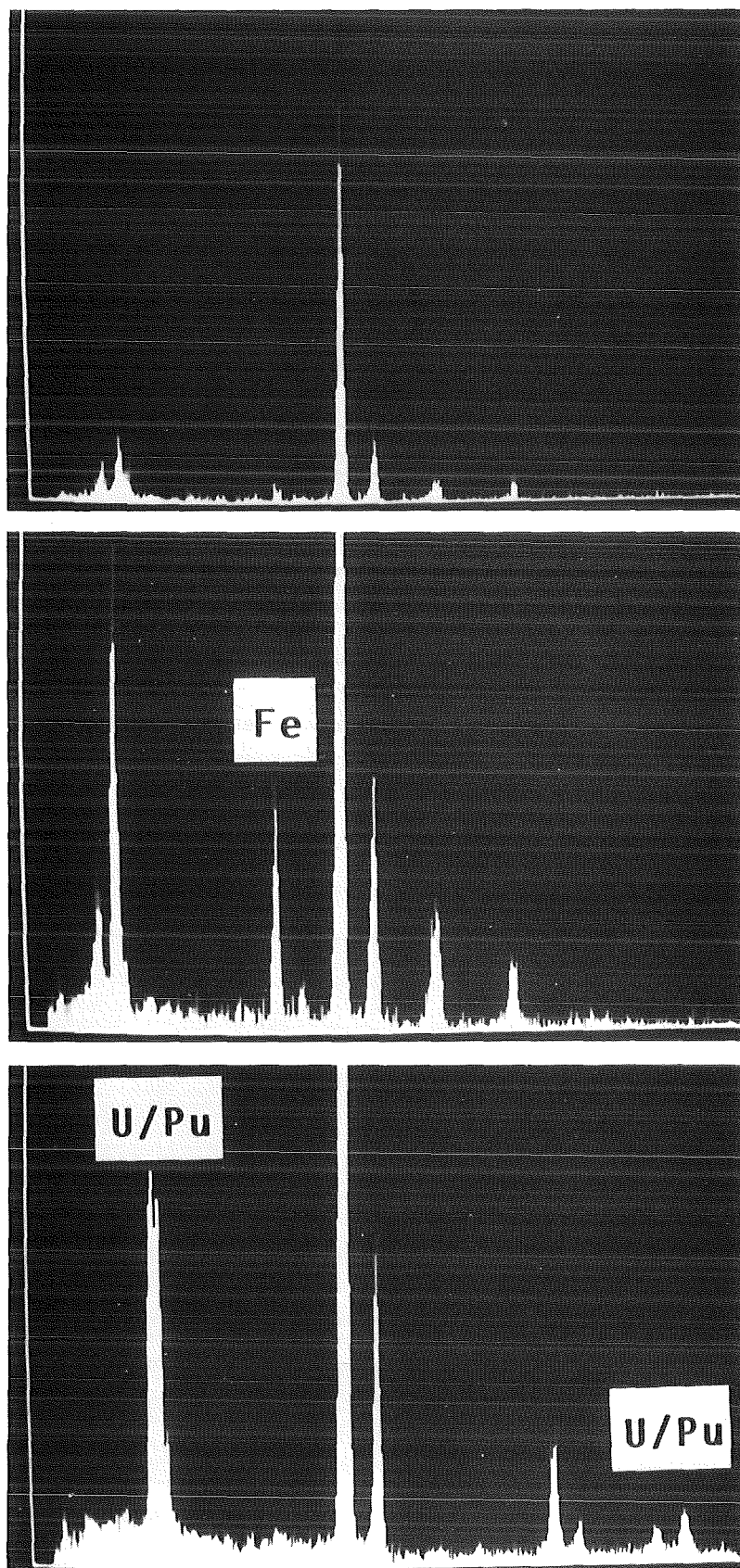


Abb.45c: Energiedispersive Röntgenspektren aus dem Präparat
in Abb.45a; von oben nach unten :
Cytoplasma der Zelle
Eisenhaltige Matrix
(U,Pu)O₂-Partikel

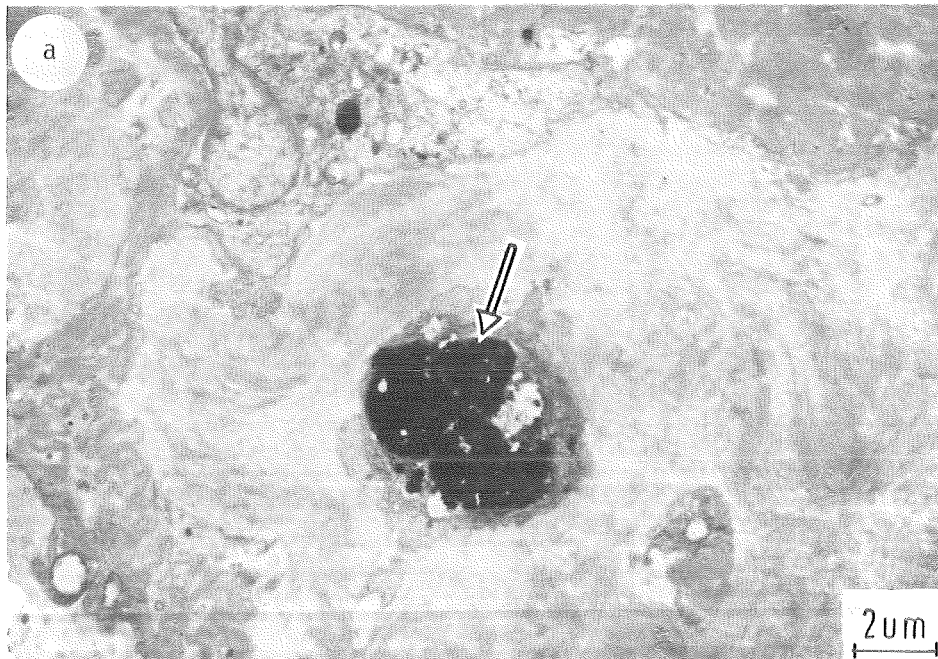


Abb.46a: Rattenlungenzelle mit einer $(U,Pu)O_2$ -Partikel in einer mit fasrigem Material angefüllten Alveole. Die Zelle ist größtenteils mit elektronendichtem eisenhaltigem Material ausgefüllt.

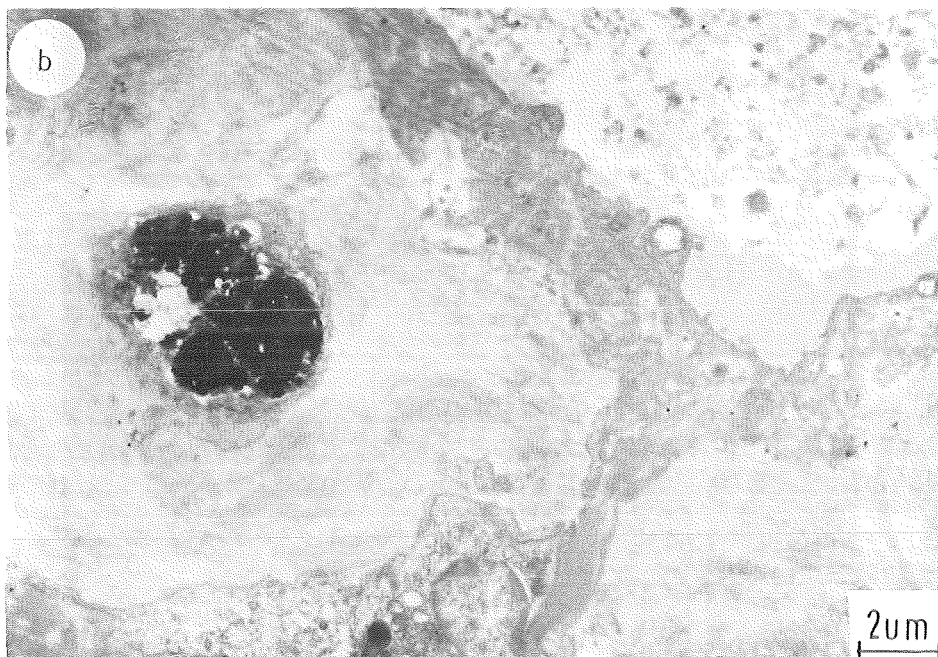


Abb.46b: Folgeschnitt der in Abb.46 a gezeigten Zelle. In diesem Schnitt ist kein $(U,Pu)O_2$ vorhanden; die elektronendichten Areale entsprechen in ihrer räumlichen Anordnung denen in Abb.46a und sind ebenfalls eisenhaltig. 3 Alveolen sind angeschnitten; die linke untere enthält keine Fasern, ist aber mit kontrastiertem Material angefüllt.

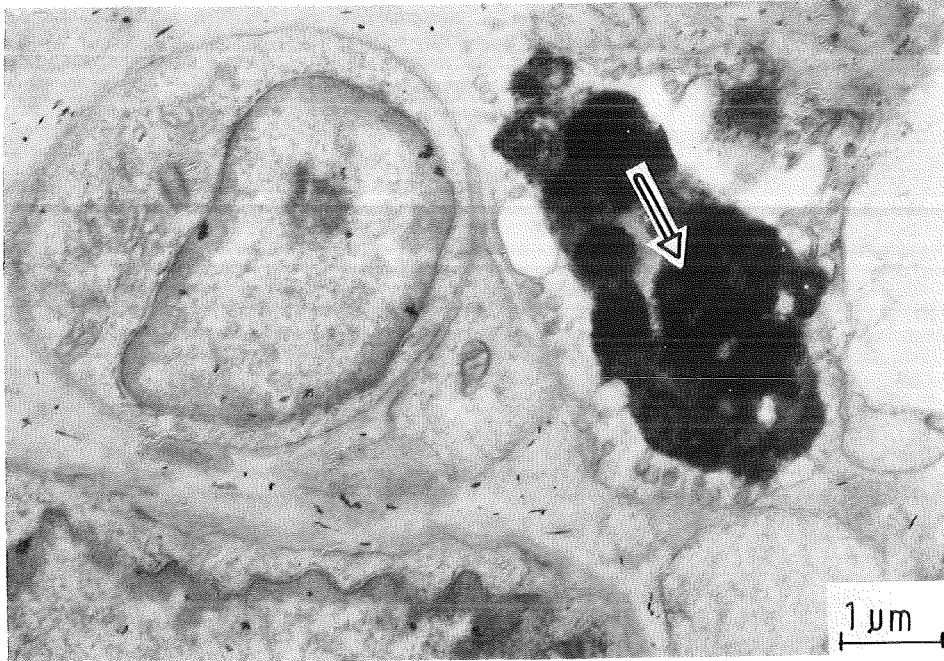


Abb.47: $(U,Pu)O_2$ -Partikel im Innern einer eisenhaltigen Zelle im Rattenlungen-Interstitium.

Abb.48 - 55: Rattenalveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; $131\text{ kBq}/10^6$ Zellen Gesamt-Alpha-Radioaktivität) in balancierter Salzlösung (BSS) bei $37^\circ C$.
(Abb. 48 - 55 sind SEM - Aufnahmen)

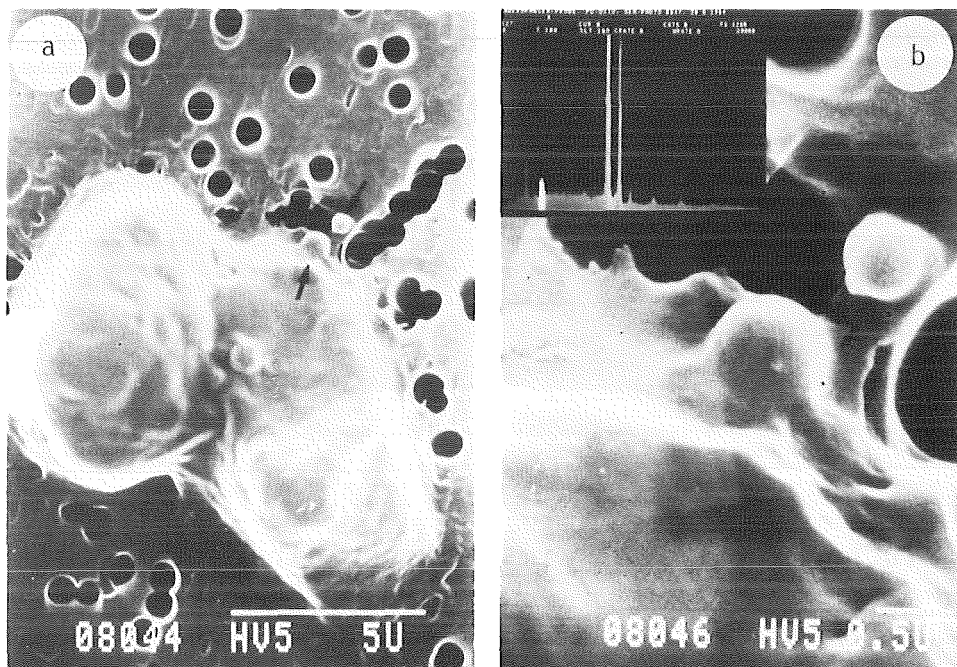


Abb.48a: Rattenalveolarmakrophage mit 2 $(U,Pu)O_2$ -Partikeln nach Auftropfen von fixierten Zellen auf einen Nuclepore-Filter.

Abb.48b: Ausschnitt der Zellregion mit den beiden assoziierten Partikeln.

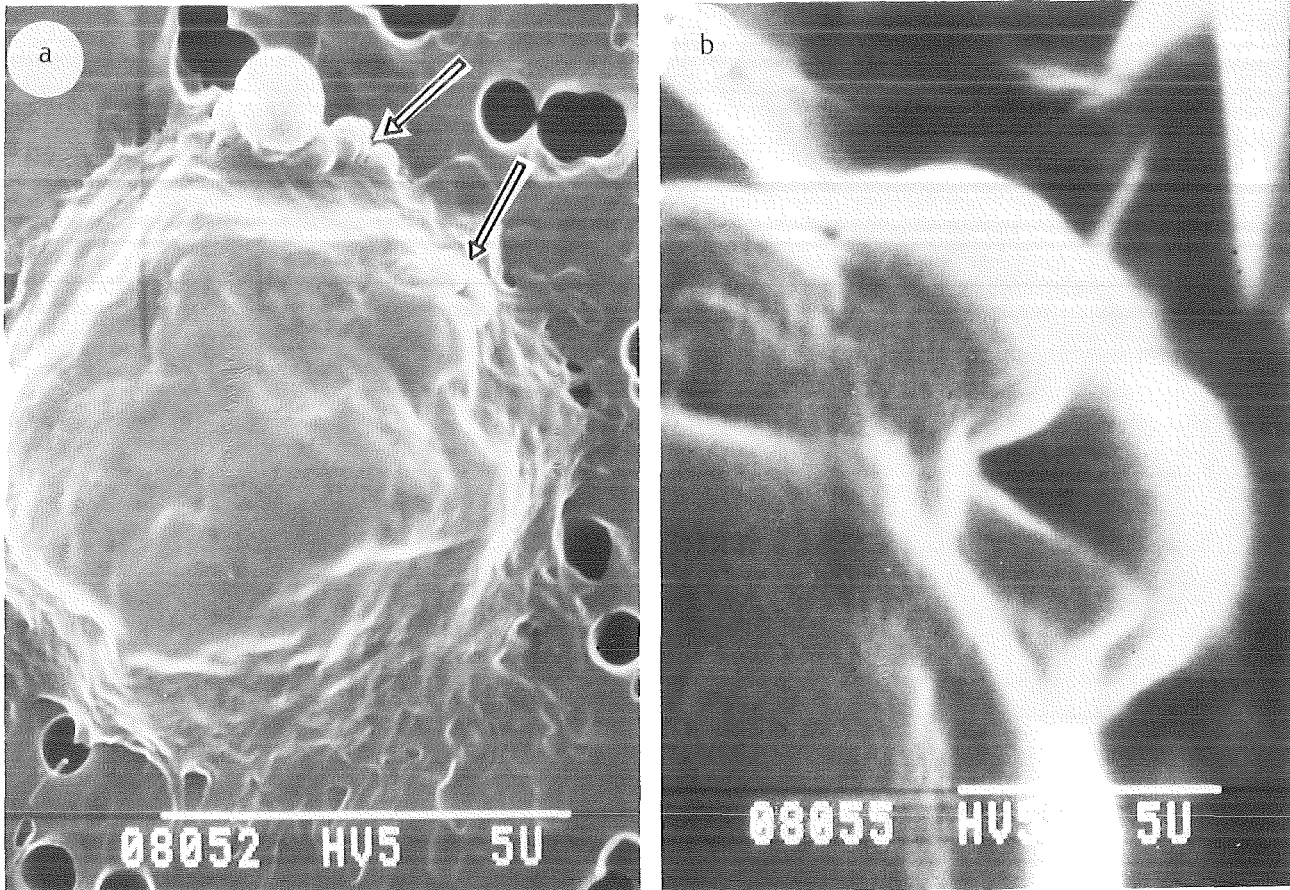


Abb.49a: Gruppen von $(U,Pu)O_2$ -Partikeln an der Zelloberfläche; in dem großen kugelförmigen Körper ist kein Pu nachweisbar.

Abb.49b: Ausschnitt aus dem rechten oberen Drittel der Zelloberfläche mit 3 Partikeln.

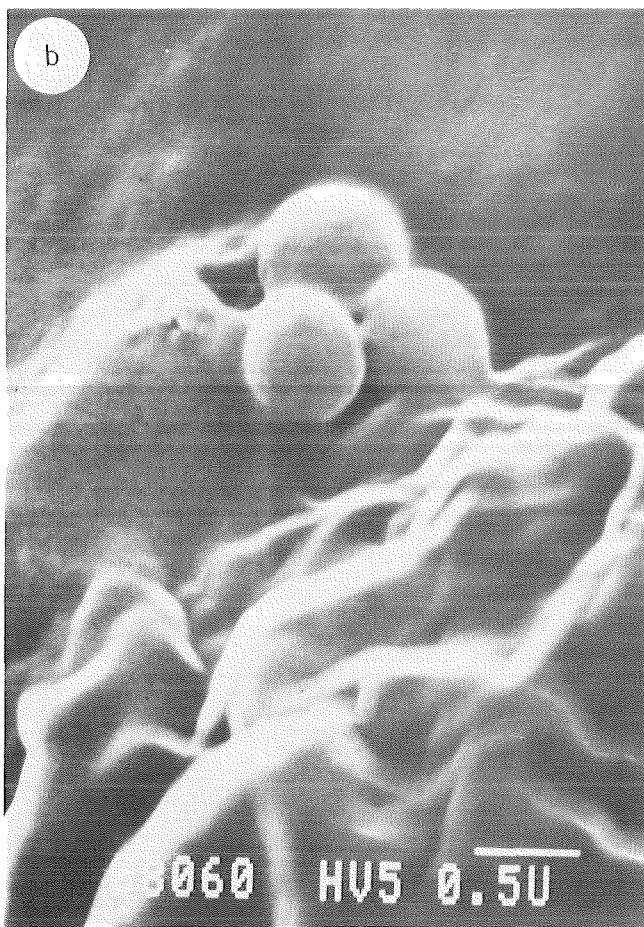
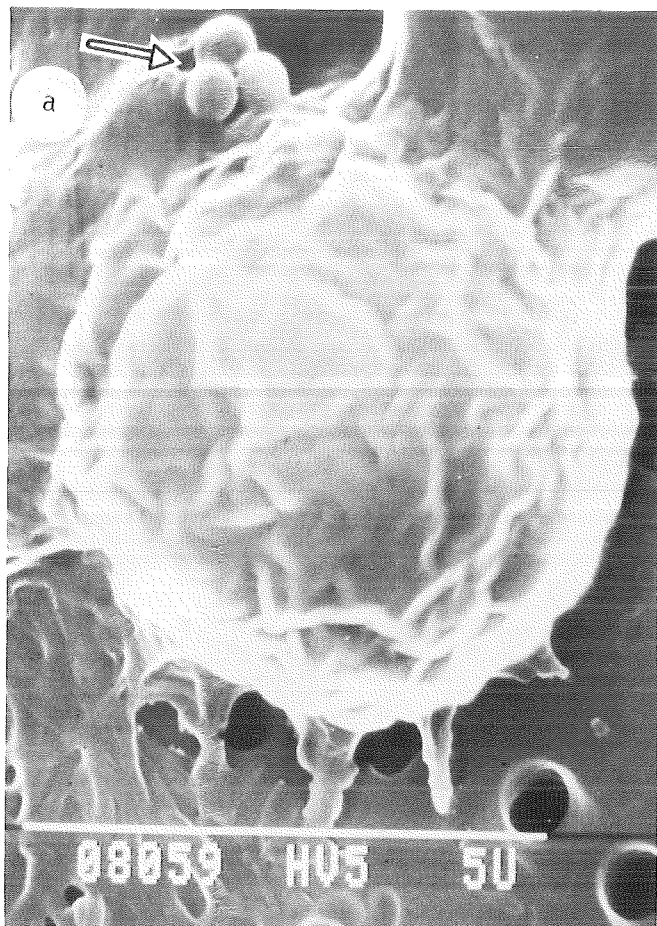


Abb.50a: Rattenalveolarmakrophage mit im Bereich des linken oberen Zellfortsatzes gebundenen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln.

Abb.50b: 3 an der Zelloberfläche gebundene Partikel, die teilweise in die Zelle eingesenkt erscheinen.

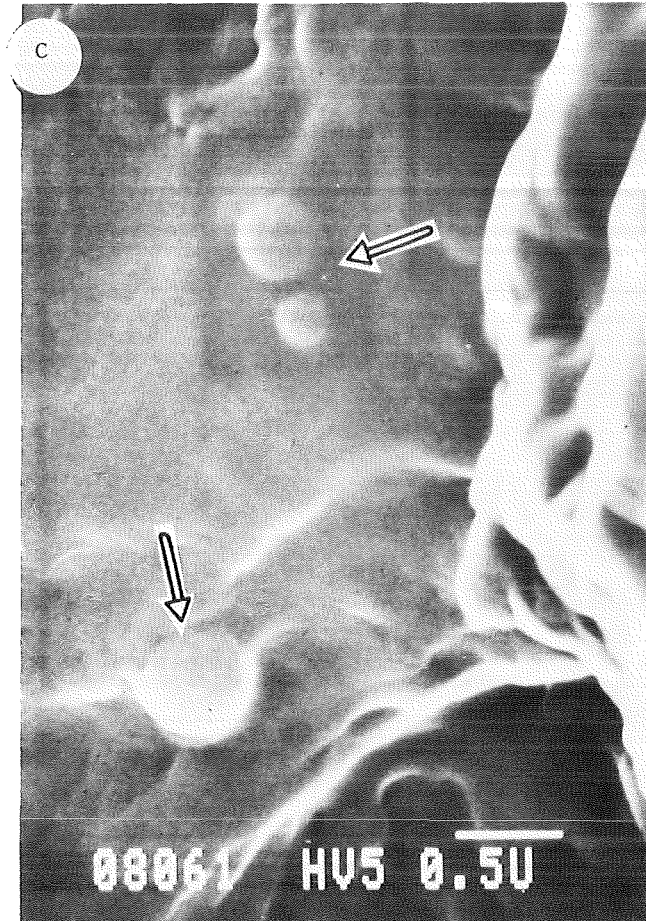


Abb.50c: 3 einzeln gebundene, teilweise in die Zelle eingesenkte Partikel.

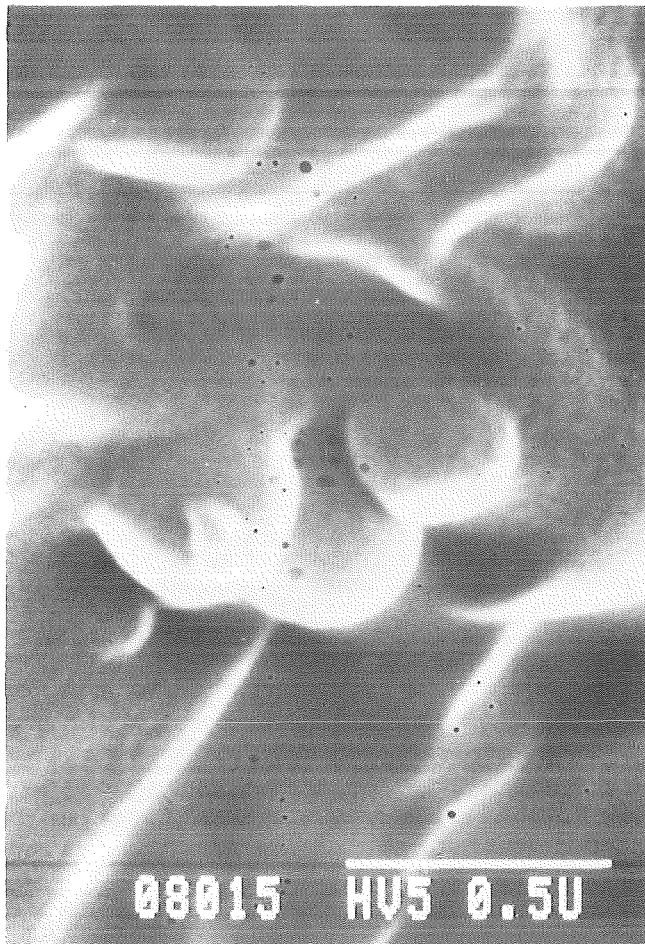


Abb.51: Gruppe von 3 teilweise in den Zelleib eingesenkten (U,Pu)O₂-Partikeln.



Abb.52: Einzelne (U,Pu)O₂-Partikel in einer Einsenkung der Zelloberfläche.

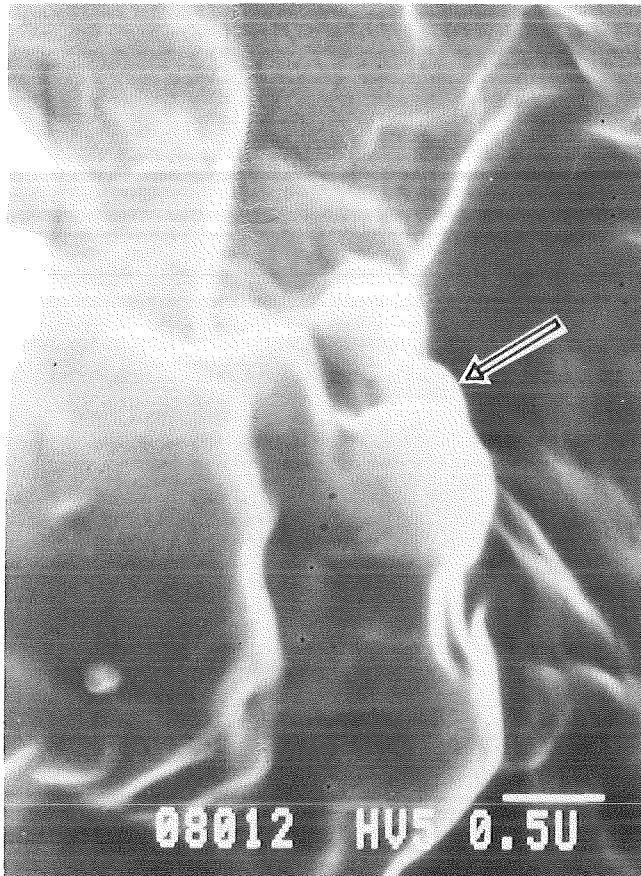


Abb.53: Gruppe von 3 (U,Pu)O₂-Partikeln an der Makrophagenoberfläche; diese sind zum Teil in den Zelleib eingesenkt; zumindest die untere rechte Partikel scheint von der Zellmembran überzogen zu sein.

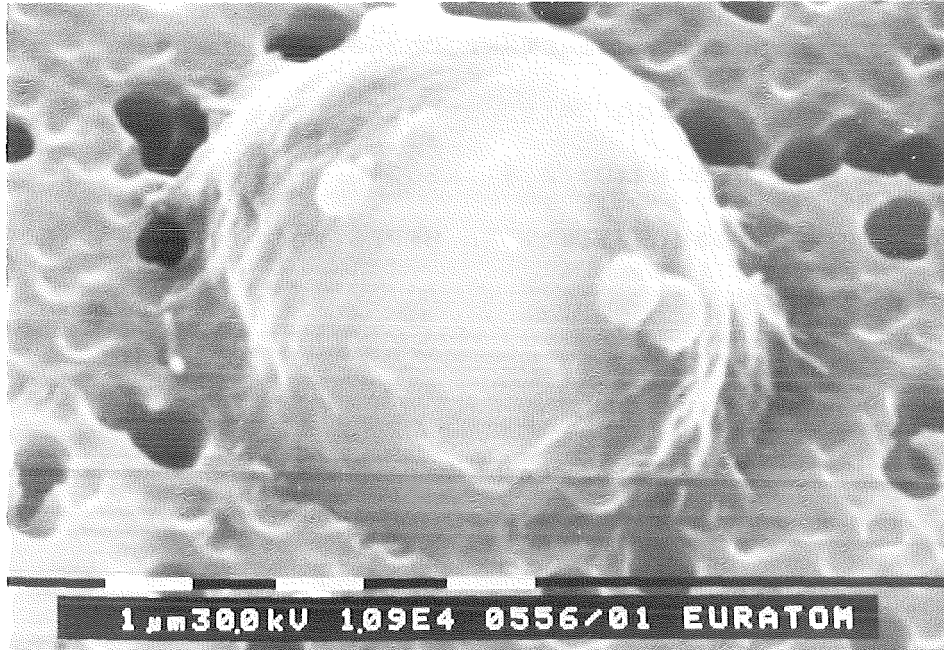


Abb.54: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Rattenalveolarmakrophagen mit mehreren teilweise in den Zelleib eingesenkten sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln an der Zelloberfläche.

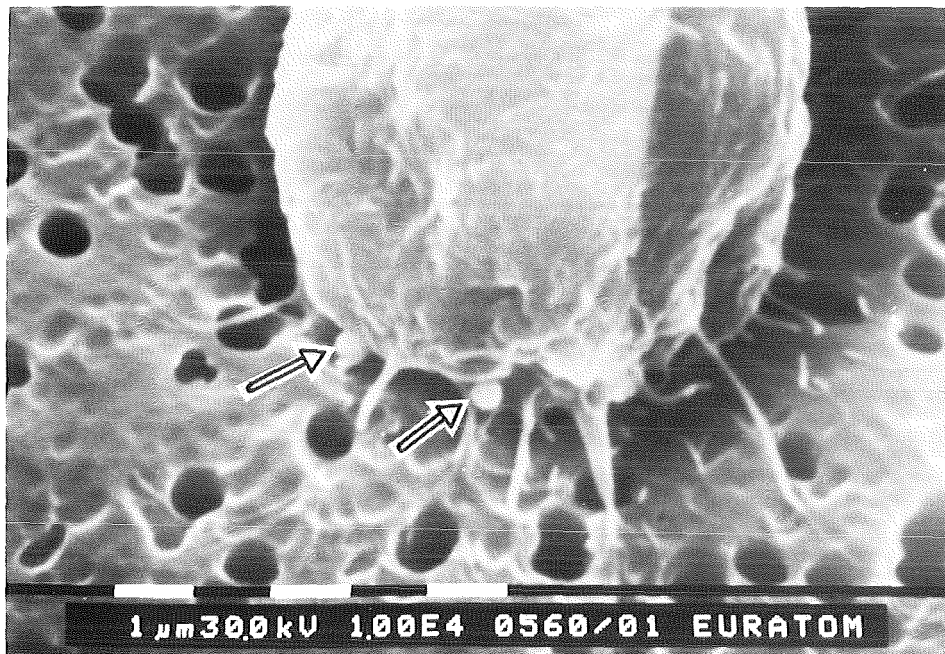


Abb.55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Rattenalveolarmakrophagen mit 2 sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln und zahlreichen Filopodien.

Abb.56 - 59: Rinderalveolarmakrophagen nach einstündiger Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; $2,9\text{ kBq}/10^6$ Zellen Gesamt-Alpha-Radioaktivität) in HEPES-Medium bei $37^\circ C$.
(SEM-Aufnahmen)

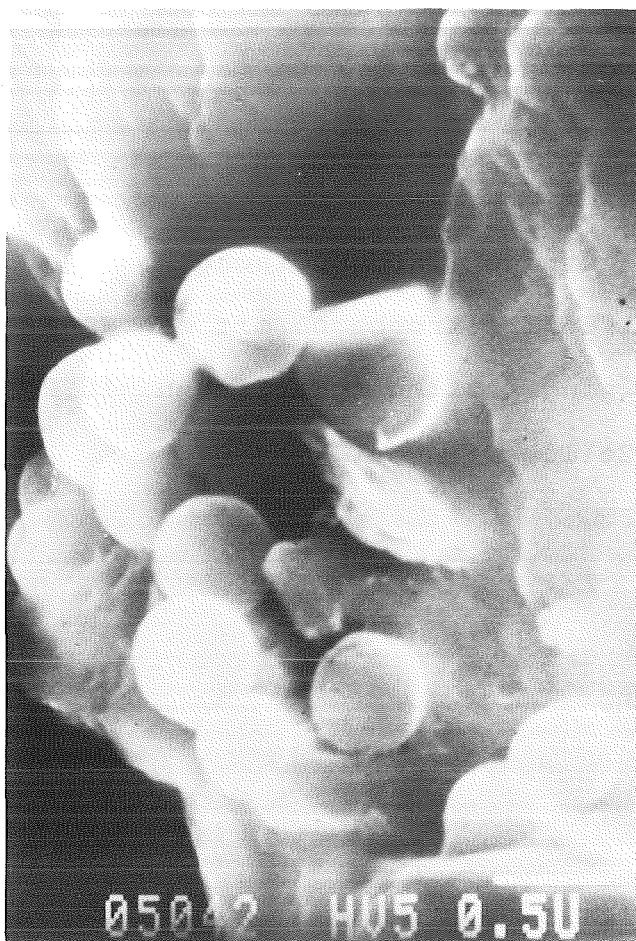


Abb.56: Ausschnitt aus der Zelloberfläche eines Rinderalveolarmakrophagen mit einer Gruppe zellassoziierter Partikel.

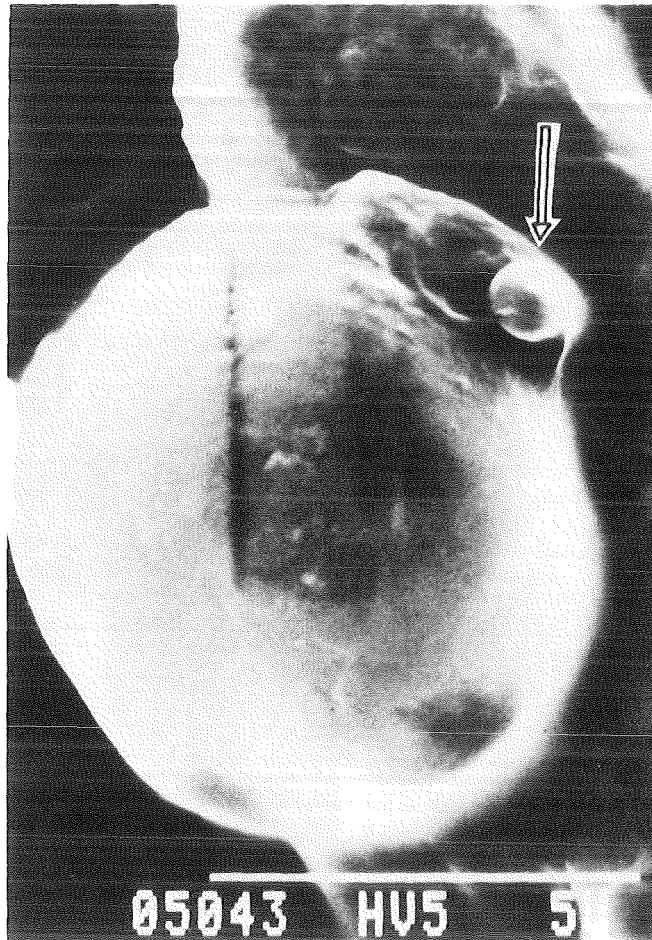


Abb.57: Rinderalveolarmakrophage mit einer $(U,Pu)O_2$ -Partikel an der Zellperipherie. Die größtenteils glatte Zelloberfläche ist ein Hinweis auf eine Schädigung der Zelle.

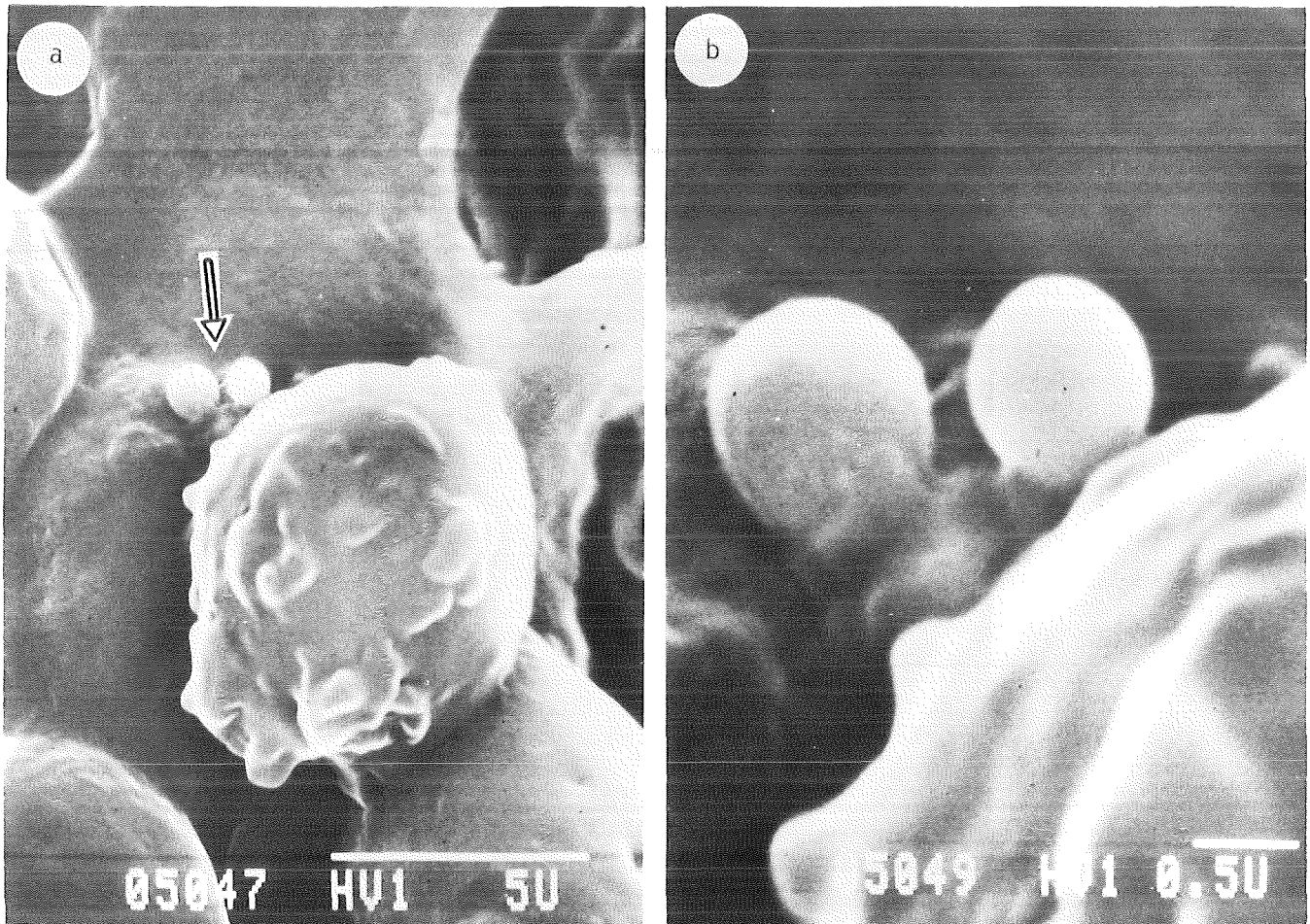


Abb.58a: Zellaggregat von Rinderalveolarmakrophagen mit 2 an der Zelloberfläche gelegenen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln.

Abb.58b: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb.58a

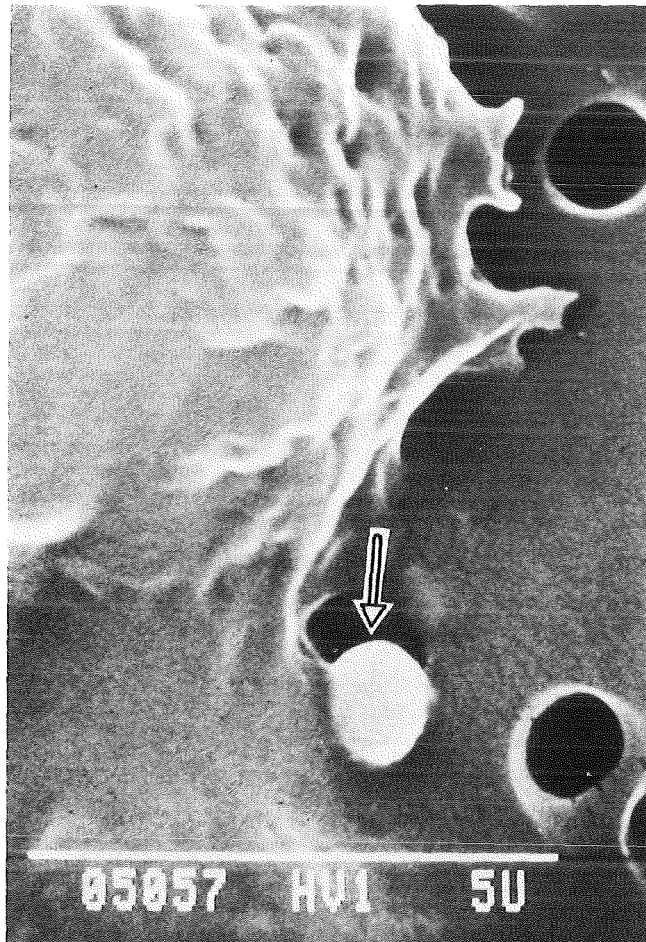


Abb.59: Rinderalveolarmakrophage mit an der Zelloberfläche gebundener $(U,Pu)O_2$ -Partikel.

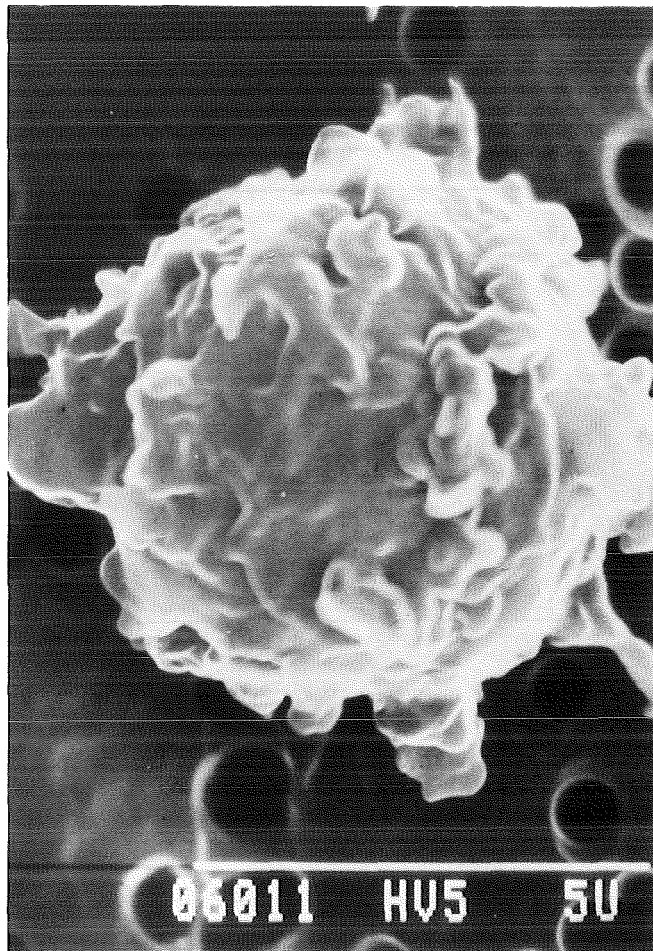


Abb.60: Rinderalveolarmakrophage nach 90 Minuten Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln in Waymouth-Medium auf Eis. Die Zelloberfläche weist deutliche Faltungen auf.

Abb.61a - c: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von bei 37°C mit sphärischen (U,Pu)O₂-Partikeln (0,9µm AMAD; 2,8 kBq/10⁶ Zellen Gesamt-Alpha-Radioaktivität) in Waymouth-Medium inkubierten Rinderalveolarmakrophagen.

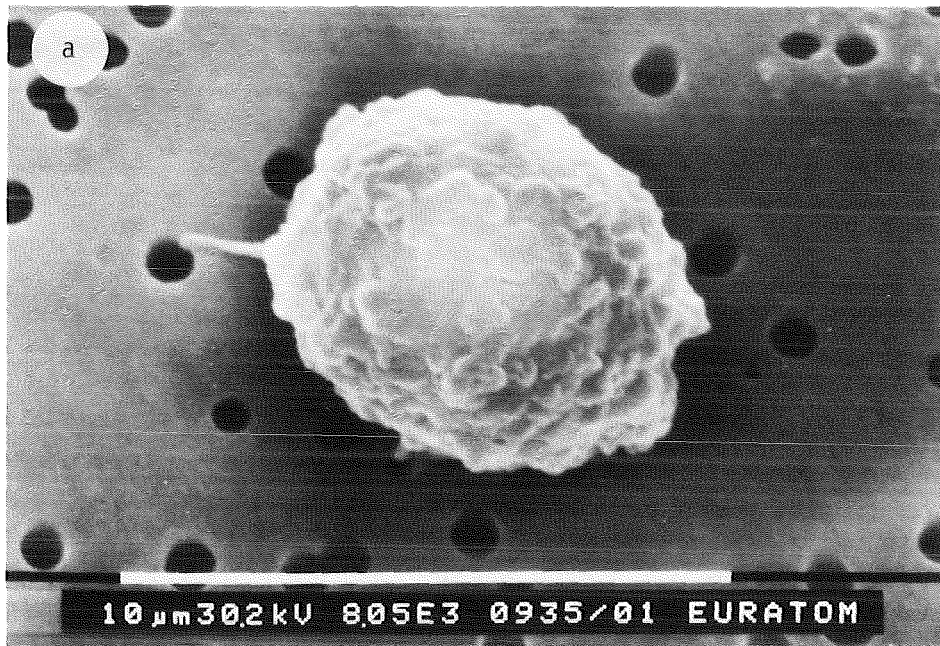


Abb.61a: Rinderalveolarmakrophage nach 10 Minuten Inkubation mit (U,Pu)O₂. Der größte Teil der Zellen besaß nach dieser Zeit eine überwiegend raue Zelloberfläche.

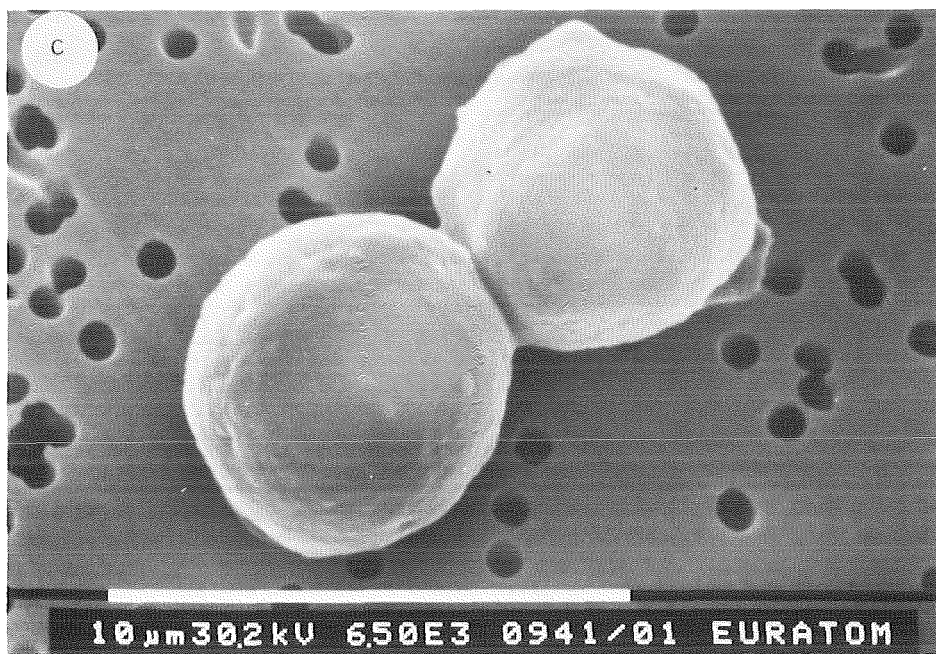
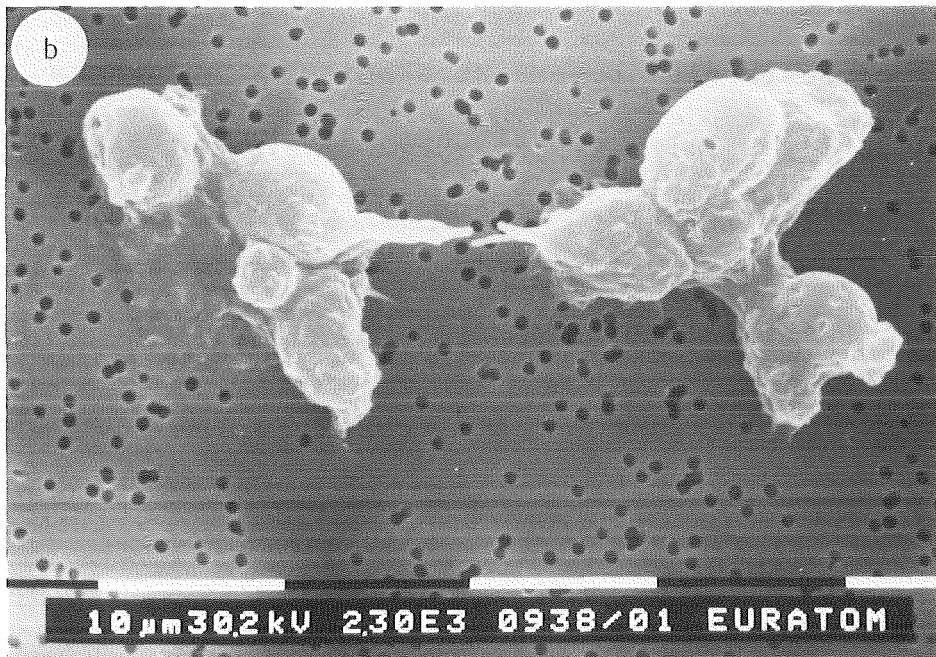


Abb.61b: Rinderalveolarmakrophagen nach 45 Minuten Inkubation mit $(U,Pu)O_2$. Die Abbildung zeigt 2 Zellaggregate; neben Zellen mit unregelmäßiger Oberfläche traten nach dieser Inkubationszeit gehäuft Zellen mit glatter Oberfläche und lochartigen Einsenkungen auf.

Abb.61c: Rinderalveolarmakrophagen nach 18 Stunden Inkubation mit $(U,Pu)O_2$. Ein sehr großer Teil der Zellen besaß nach dieser Inkubationszeit eine glatte Oberfläche.

Abb.62 - 63: Rinderalveolarmakrophagen nach 3 Stunden Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; $3,1kBq/10^6$ Zellen Gesamt-Alpha-Radioaktivität) bei $37^\circ C$ in HEPES-Medium mit Zusatz von 3 % Rinderserumalbumin.

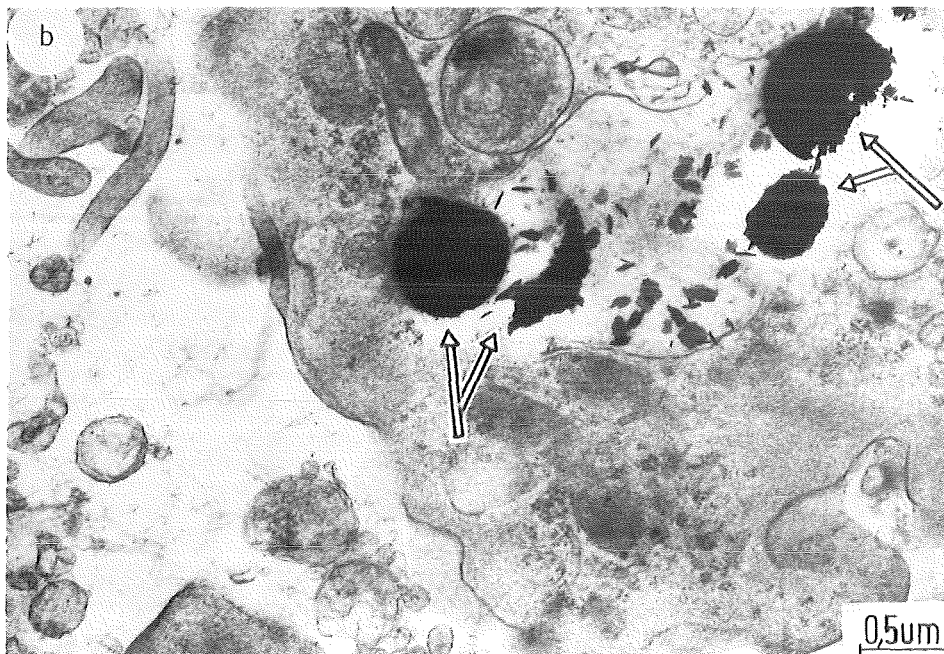


Abb.62a: Schnitt durch eine Zelle mit 3 aggregierten $(U,Pu)O_2$ -Partikeln im Innern einer Vakuole

Abb.62b: Schnitt durch eine Zelle mit vereinzelt $(U,Pu)O_2$ -Partikeln und Partikelbruchstücken im Innern einer membranbegrenzten Vakuole.

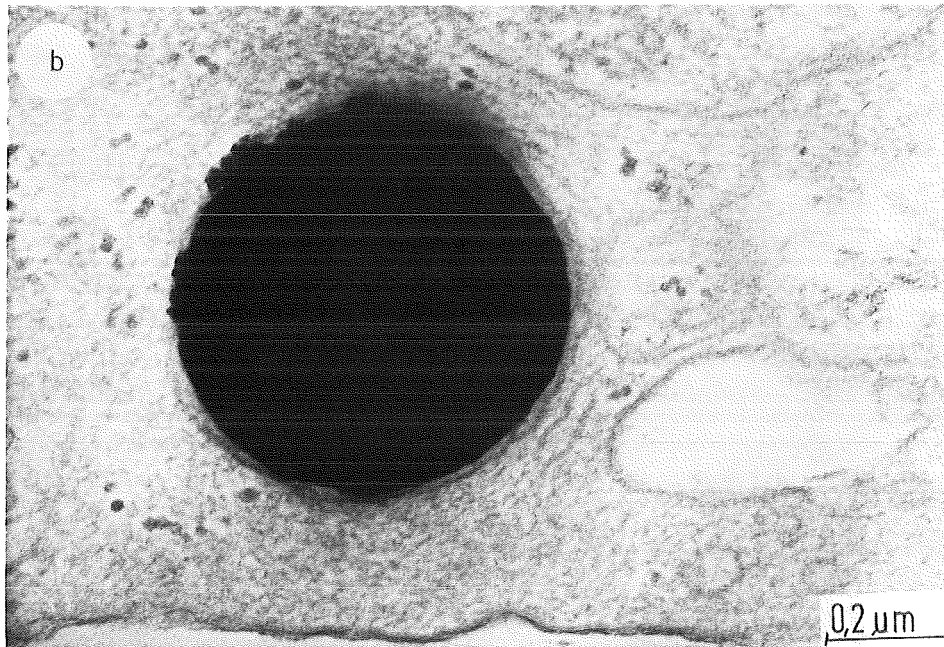


Abb.63a: Einzelne $(U,Pu)O_2$ -Partikel im Cytoplasma einer stark formveränderten Zelle.

Abb.63b: Ausschnitt aus Abb.63a

Abb.64a - d: Rinderalveolarmakrophagen nach 18 Stunden Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; $2,8\text{ kBq}/10^6$ Zellen Gesamt-Alpha-Radioaktivität) bei $37^\circ C$ in HEPES- gepuffertem Waymouth-Medium mit Penicillin- und Streptomycinzusatz.

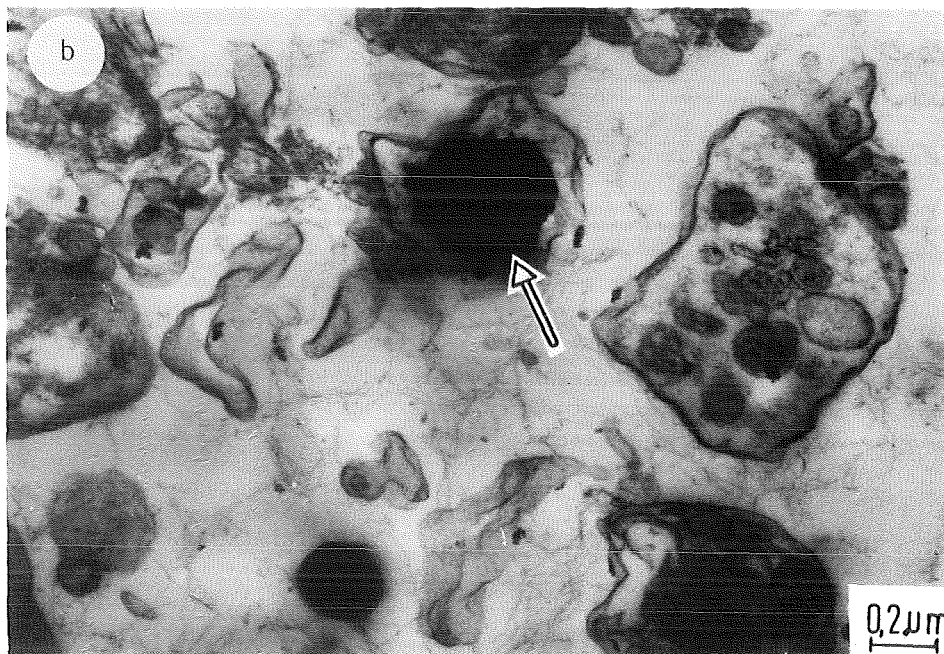
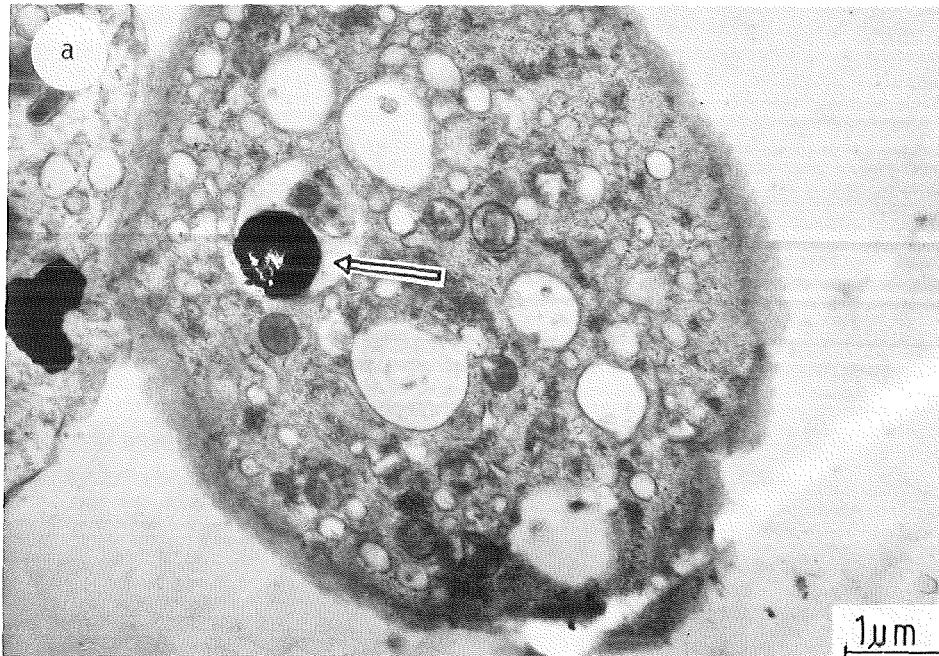


Abb.64a: Schnitt durch einen abgerundeten Rinderalveolarmakrophagen, der eine in einem Vesikel gelegene $(U,Pu)O_2$ -Partikel enthält.

Abb.64b: Zellbruchstücke aus der 18-Stunden-Kultur; in der Mitte eine von einer Membran umgebene $(U,Pu)O_2$ -Partikel.

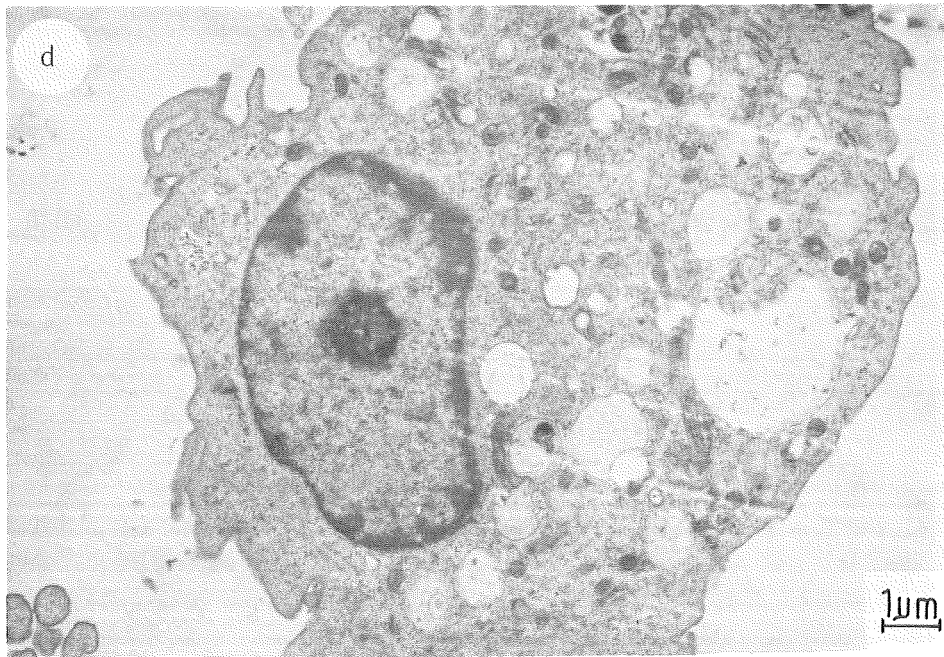
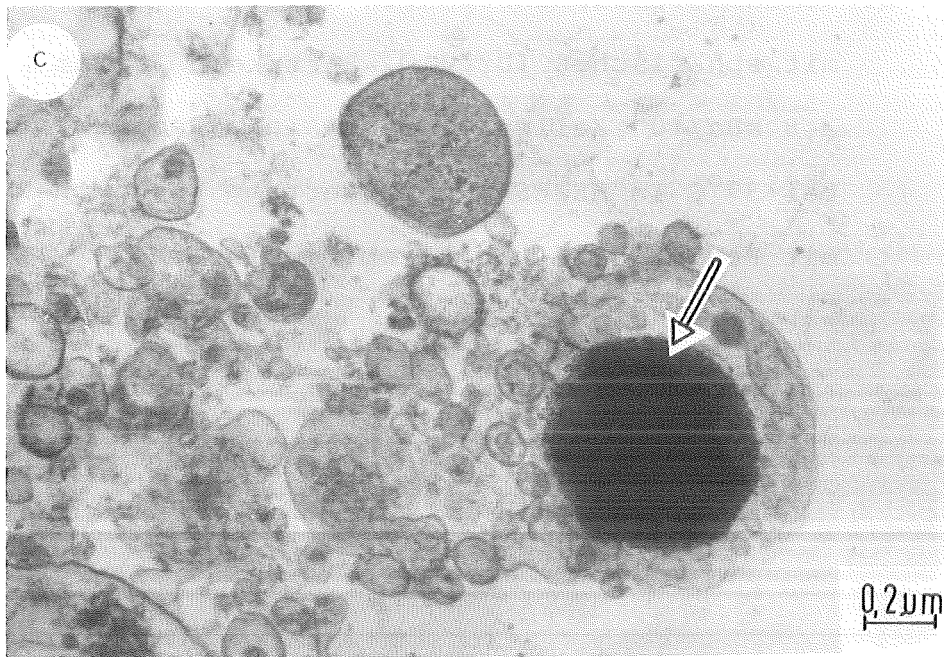


Abb.64c: In Auflösung begriffene Zelle nach 18 Stunden Inkubation; eine $(U,Pu)O_2$ -Partikel ist von einer Membran umschlossen.

Abb.64d: Weitgehend intakt erscheinender Rinderalveolarmakrophage nach 18 Stunden Inkubation mit $(U,Pu)O_2$ in vitro. In der Schnittebene ist kein $(U,Pu)O_2$ nachzuweisen; die Zelloberfläche erscheint unregelmäßig, das Cytoplasma enthält zahlreiche Vakuolen.

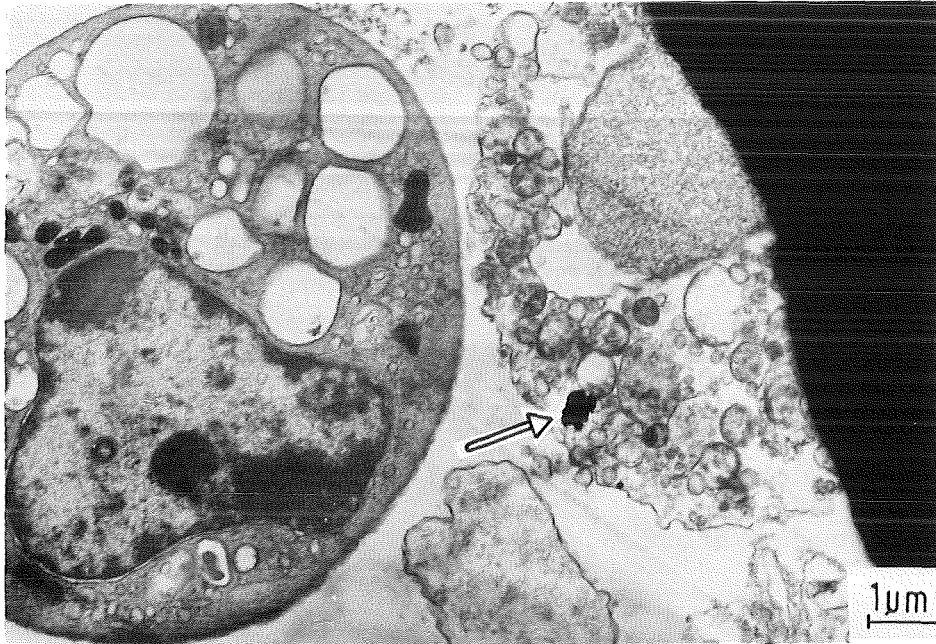


Abb.65: 2 Rinderalveolarmakrophagen nach 4 Tagen Inkubation mit sphärischen $(U,Pu)O_2$ -Partikeln ($0,9\mu m$ AMAD; $3\text{ kBq}/10^6$ Zellen Gesamt-Alpha-Radioaktivität) bei $37^\circ C$ in Waymouth-Medium mit 20% Kälberserum (NCS). Die linke der beiden Zellen erscheint abgerundet und stark vakuolisiert; die rechte $(U,Pu)O_2$ -haltige Zelle ist abgestorben und in Auflösung begriffen.

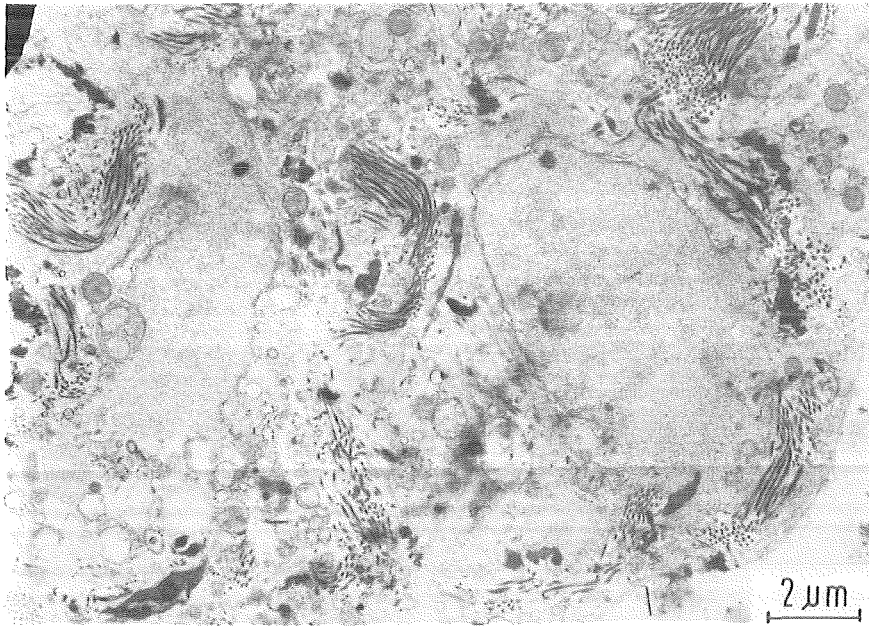


Abb.66: N-Fraktion aus Rattenlunge; Homogenisation 4 Tage nach intratrachealer Instillation irregulärer $(U,Pu)O_2$ -Partikel durch je 10 Auf- und Abschlüge mit dem Dounce-'L'-Homogenisator.

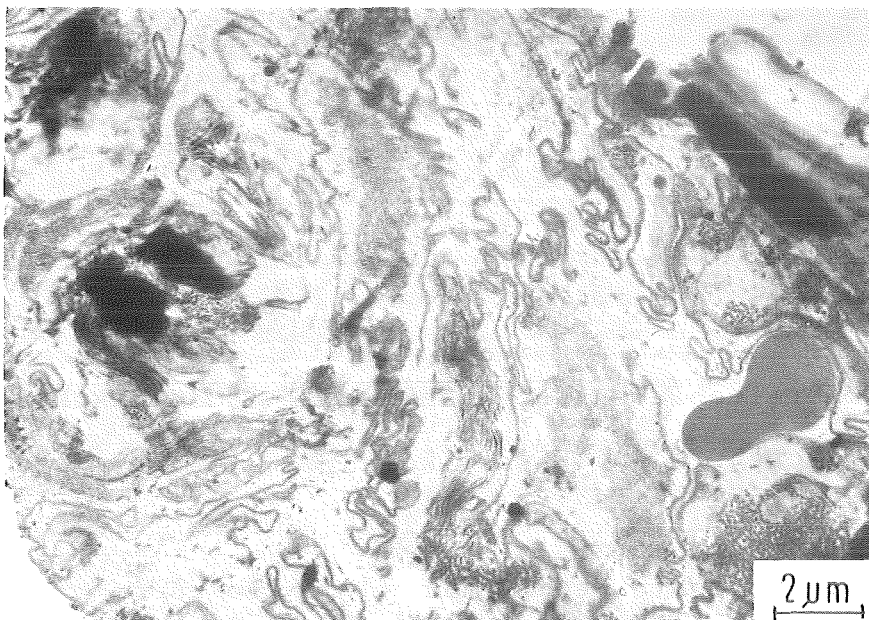


Abb.67: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Fraktion mit dem höchsten Radioaktivitätsgehalt aus der Auftrennung der N-Fraktion in Abb. 66 im linearen Saccharose-Dichtegradienten (Versuchsbedingungen siehe Abb.19).

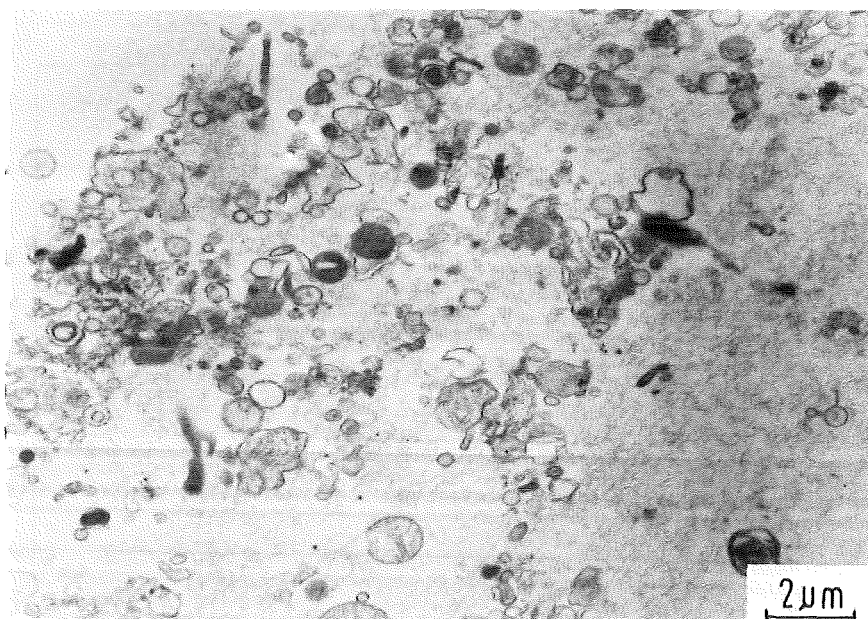


Abb.68: ML-Fraktion aus Rattenlunge; Homogenisation 4 Tage nach intratrachealer Instillation irregulärer $(U,Pu)O_2$ -Partikel durch je 10 Auf- und Abschlüge mit dem Dounce-'L'-Homogenisator.

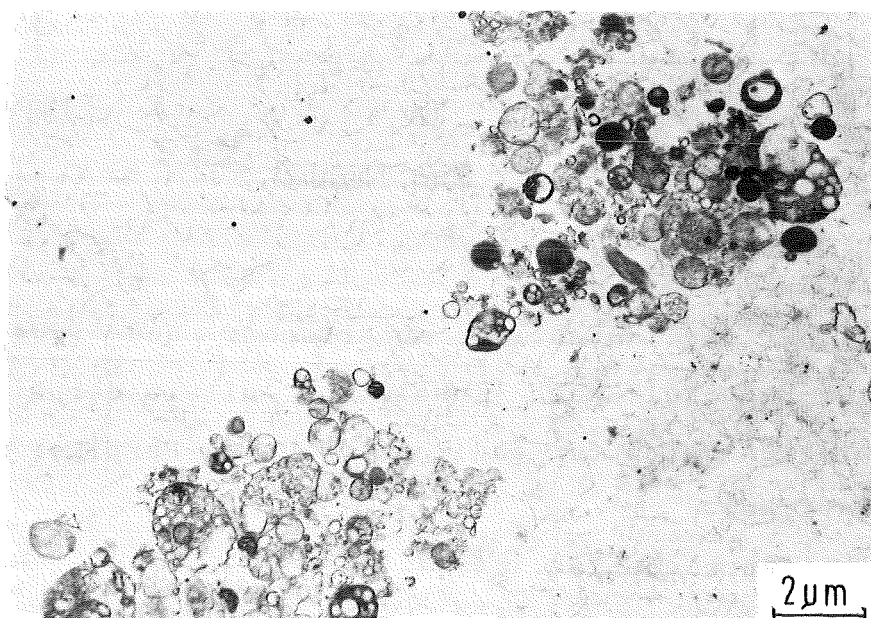


Abb.69: ML-Fraktion aus isolierten Rinderalveolarmakrophagen; Homogenisation durch je 10 Auf- und Abschlüge mit dem Dounce-'S'-Homogenisator.

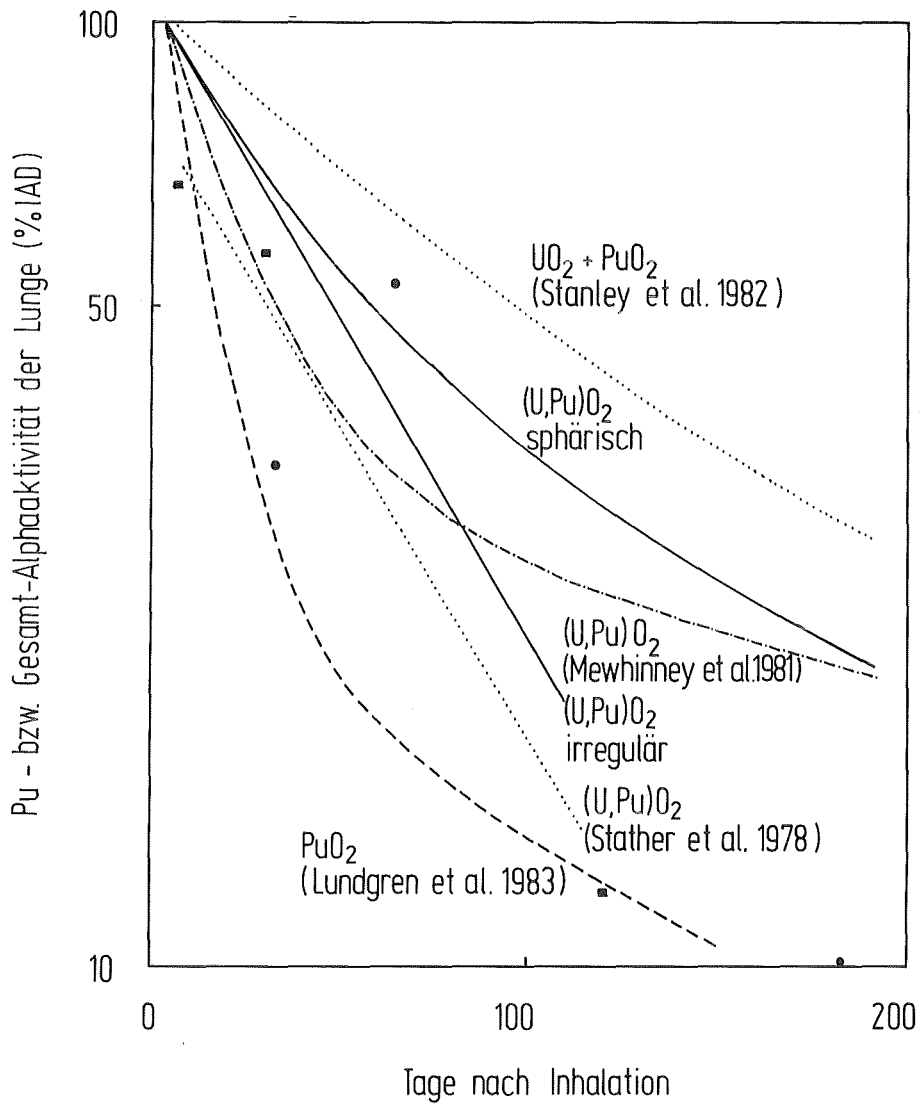


Abb.70: Vergleich der Retention sphärischer und irregulärer (U,Pu)O₂-Partikel nach Inhalation mit in der Literatur publizierte Daten für ähnliche (U,Pu)O₂-Partikel und für PuO₂-Partikel.

Einzelheiten siehe Tab. 14.

Den Institutsleitern Herrn Prof. Dr. D. M. Taylor (Institut für Genetik und für Toxikologie, IGT) und Herrn Prof. Dr. R. Lindner (Europäisches Institut für Transuranelemente, TU) sowie Herrn Dr. H. E. Schmidt als Projektleiter seitens des TU danken wir für ihr Interesse und ihre Unterstützung des Projekts.

Herrn S. Fourcaudot (TU) danken wir für die Präparation der Mischoxid-Aerosole, Frau B. Eggmann (IGT) für die Betreuung der Versuchstiere sowie Frau H. Culig, E. Krüger, R. Mauser und T. Regula (alle IGT) für technische Assistenz.

Herrn Prof. V. Volf (IGT) sowie Herrn Dr. Thies und Dr. Haffner danken wir ebenfalls für ihre bereitwillige Unterstützung.

Besonderen Dank schulden wir Frau U. Baltzer und Frau E. Hei-
nold und Frau M. Wiener (alle IGT) für Schreibarbeiten und
Durchsicht des Berichts.