



KfK 4924
November 1991

Reaktionen von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz und Hochtemperatursupraleiterstäube

W. Wilczek
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4924

**REAKTIONEN VON RINDER-ALVEOLARMAKROPHAGEN AUF QUARZ
UND HOCHTEMPERATURSUPRALEITERSTÄUBE**

Wolf Wilczek

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Reaktionen von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz und Hochtemperatursupraleiterstäube

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von Partikeln des Hochtemperatursupraleiters $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ und von Quarz auf Alveolarmakrophagen morphologisch und biochemisch untersucht und verglichen. Alveolarmakrophagen wurden aus Lungen frisch geschlachteter Rinder durch Lavage gewonnen und auf Nuclepore-Filtern kultiviert, um optimale Bedingungen für die Transmissionselektronenmikroskopie zu haben.

Elektronenmikroskopisch konnte die Phagozytose von Quarzpartikeln schon wenige Minuten nach Zugabe zu den Zellen nachgewiesen werden. Die Lysosomen konnten mittels der Cerphosphatmethode zum Nachweis der Sauren Phosphatase enzymhistochemisch demonstriert werden. Ebenso konnten Quarzpartikel in solchen Phagolysosomen nachgewiesen werden. Es war jedoch nicht möglich, den Austritt lysosomalen Materials aus den quarzhaltigen Lysosomen in das Zytoplasma zu beobachten. Die typische Reaktion der Zellen auf Quarz war eine starke Vergrößerung derjenigen Vakuolen, in denen sich die Partikel befanden. Nach Vorbehandlung mit Dipalmitoyl-lecithin wurden die Quarzpartikel untoxisch für die Zellen, gelangten aber ebenfalls in Saure-Phosphatase-haltige Lysosomen. Die Zellen waren 20 Stunden nach Quarzzugabe im Absterben begriffen, es war aber nicht möglich, die wiederholt postulierte Schädigung der Lysosomenmembran als Primärursache der Zytotoxizität nachzuweisen. Ebenso wie nach Inkubation von Quarzpartikeln führten Partikel von $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ zu einer Freisetzung von Enzymen in das Medium als Ausdruck einer zytotoxischen Wirkung. Im Gegensatz zu Quarz entstanden jedoch innerhalb mehrerer Stunden in den Zellen ungewöhnlich große, mit lamellarem Inhalt gefüllte Vakuolen ("Lamellarkörperchen"), was auf eine Hemmung des Phospholipidabbaus zurückgeführt wurden. Da die Partikel nach kurzer Zeit nicht mehr in den Zellen elektronenmikroskopisch gefunden wurde, wurde gefolgert, daß intralysosomal eine rasche Auflösung vor sich geht.

Es wurde gezeigt, daß im Gegensatz zum Quarz nicht die Teilchenoberfläche als solche membran- bzw. zytotoxisch ist. Weitere Versuche legten den Schluß nahe, daß das Kupfer für die zytotoxischen Effekte die größte Rolle spielt. Nicht nur $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ sondern auch $\text{YBaCuO}_{3,5}$ oder $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ sind für Alveolarmakrophagen zytotoxisch.

Effects of quartz and some high- T_c superconducting materials on bovine alveolar macrophages

Abstract

The morphological and biochemical effects of high- T_c superconducting particles towards alveolar macrophages have been investigated and compared with those of quartz particles. Alveolar macrophages were lavaged from lungs of freshly slaughtered cattle and cultivated on Nuclepore filters in order to achieve optimal conditions for the transmission electron microscopy. Even after a few minutes of incubation with quartz, electronmicroscopy showed that the quartz had been taken up by the cells. Lysosomes were enzyme cytochemically observed using the cerium-phosphate method to indicate the presence of acid phosphatase. In such phagolysosomes quartz particles were found. The liberation of lysosomal material through these phagolysosomes into the cytoplasm was, even after longer periods, not

observed. The typical cell reaction to quartz was an increase of the particle containing vacuoles. After coating with dipalmitoyl-lecithin the quartz particles were inert for the cells, but, nevertheless found in acid phosphatase containing lysosomes. 20 hours following the addition of the quartz particles the cells were considered to be dead. Nevertheless it was not possible to demonstrate, that the destruction of the lysosomal membrane was the primary cause for the cytotoxicity. Particles of $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ revealed their cytotoxicity, like quartz particles, by a liberation of enzymes into the medium. But, in contrast to quartz, after some hours great vacuoles filled with lamellar material (lamellar bodies) were evident. As no particles were found in the cells shortly after uptake it was concluded, that rapid intralysosomal dissolution occurred. In contrast to quartz, it was shown, that the surface is not cytotoxic. Other experiments showed, that the copper is probably responsible for the majority of the cytotoxic effects. Not only $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ but also $\text{YBaCuO}_{3.5}$ and $\text{LaBaCuO}_{3.5}$ are cytotoxic towards alveolar macrophages.

Abkürzungen:

{111}	YBaCuO _{3,5}
{123}	YBa ₂ Cu ₃ O _{7-x} (x ≤ 0,1)
{123} [*]	YBa ₂ Cu ₃ O _{7-x} (x ≤ 0,1) (feinere Fraktion)
AMAD	Activity median aerodynamic diameter
CMAD	Count median aerodynamic diameter
DPL	Di-palmitoyl-lecithin
EBr	Ethidiumbromid
FDA	Fluoresceindiacetat
fMLP	N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin
HTS	Hochtemperatursupraleiter
KM	Kulturmedium
HBSS	Hanks balanced salt solution
HPLC	High performance liquid chromatography
LaBaCuO	LaBaCuO _{3,5}
LDH	Laktatdehydrogenase
NAG	N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase
PE	Pellet (Sediment aus dem Kulturüberstand)
PBS	Phosphate buffered saline
RT	Raumtemperatur
SE	Saure Esterase
SP	Saure Phosphatase
TPA	12,0-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
ZE	Adhärente Zellen
ZÜ	Zellfreier Kultur-Überstand

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	13
2.1 Kulturmedien und Puffer.....	13
2.2 Kulturzusätze.....	14
2.2.1 Partikuläre Zusätze.....	14
2.2.2 Di-palmitoyl-lecithin-Behandlung.....	16
2.2.3 Ionische Zusätze.....	16
2.3 Zellkultur.....	17
2.3.1 Gewinnung der Rinder-Alveolarmakrophagen.....	17
2.3.2 Monolayer Kultur.....	18
2.3.3 Suspensionskultur.....	19
2.4 Morphologische Untersuchungen.....	20
2.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie.....	20
2.4.1.1 Einbettung.....	20
2.4.1.2 Saure Phosphatase-Zytochemie.....	22
2.4.1.3 Saure Esterase-Zytochemie.....	23
2.4.1.4 Schneiden, Kontrastieren und Mikroskopieren.....	25
2.4.2 Raster Elektronenmikroskopie.....	26
2.4.3 Vitalitätsbestimmungen.....	27
2.4.4 Hämocolor-Färbung.....	28
2.5 Biochemische Untersuchungen.....	28
2.5.1 Vorbereitung des Untersuchungsgutes.....	28
2.5.2 N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG).....	28
2.5.3 Proteinbestimmung.....	30
2.5.4 Laktatdehydrogenase (LDH).....	30
2.5.5 Lipidanalysen.....	31
2.5.5.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	31
2.5.5.1 Dünnschichtchromatographie.....	33
2.5.6 Hämolyse-Test.....	34
2.6 Auswertung und Präsentation der Daten.....	35
3. Ergebnisse	38
3.1 Kontroll-Rinder-Alveolarmakrophagen.....	38
3.2 Einfluß von Quarz.....	41
3.2.1 Quarz in Monolayerkultur.....	41
3.2.2 Quarz in Suspensionskultur.....	43
3.3 Effekte von {123}.....	45

3.3.1 Transmissionselektronenmikroskopische Morphologie	45
3.3.2 Rasterelektronenmikroskopische Morphologie	47
3.3.4 Einfluß auf die Vitalität.....	47
3.3.5 Biochemie.....	48
3.3.6 Lipidanalysen	51
3.3.7 Hämolyse	52
3.4 Effekte von Einzelbestandteilen von {123}.....	52
3.4.1 Löslichkeit von {123}	52
3.4.2 Ionische Bestandteile	53
3.4.3 Effekte von Kupferoxid	55
3.5 Vergleich verschiedener Stäube	56
3.5.1 Lichtmikroskopische Morphologie	56
3.5.2 Einfluß auf die Vitalität.....	56
3.5.3 Biochemie	57
4. Diskussion	59
5. Zusammenfassung.....	76
6. Literatur	77
7. Abbildungen.....	89

1. EINLEITUNG

Die Lunge stellt beim Menschen das Organ mit der größten Kontaktfläche zur Umwelt dar (zwischen 35 und 100 m² nach Menzel et al., 1986) und ist somit Luftverunreinigungen u.a. durch anorganische Stäube besonders stark ausgesetzt. Durch übermäßige Belastung mit bestimmten anorganischen, partikulären Schadstoffen, wie sie beispielsweise im Bergbau vorkommen, kann es zu Erkrankungen dieses Organes kommen. Daher werden seit dem 19. Jahrhundert bedeutende Anstrengungen unternommen, die Wirkungen von toxischen Stäuben genauer zu untersuchen und insbesondere die Entstehung von Staublungen zu verhindern. Die Bedeutung einer rechtzeitigen Abklärung der Toxizität bereits im Vorfeld der großtechnischen Verwendung von potentiell gefährlichen Stoffen zeigt das Beispiel Asbest. In diesem Fall hätte eine frühzeitige Restriktion der Anwendung viel Leiden und erhebliche Sanierungskosten verhindern können.

Die wichtigsten durch Umweltchemikalien ausgelösten Erkrankungen der Lunge sind neoplastische Veränderungen, Asthma und die Lungenfibrose, eine Erkrankung, die durch Bindegewebsproliferation und hyaline Ablagerungen in der Lunge gekennzeichnet ist. Zu den arbeitsmedizinisch bedeutendsten Lungenfibrosen gehören die Pneumokoniosen und hier vor allem die durch quarzhaltige Stäube ausgelöste Silikose, die seit 1929 in Deutschland als entschädigungspflichtige Berufskrankheit anerkannt wird (Arbeitsgruppen Aufstellung von MAK Werten, 1988). Die Silikose spielt auch heute noch eine bedeutende Rolle bei den Berufserkrankungen, so sind 6130 Bergleute im Bereich der Ruhrknappschaft in den Jahren 1978 bis 1982 an Silikose verstorben (Wohlberedt, 1983).

Eine ganz wesentliche Rolle bei der Entstehung arbeitsplatzbedingter Lungenerkrankungen spielen also quarzhaltige Stäube. Daher soll in dieser Arbeit Quarz als der immer noch bedeutendste toxische Staub, dessen genauer Wirkungsmechanismus

trotz guter Kenntnisse über sein fibrotisches Potential aber nach wie vor unklar ist, untersucht werden.

Es gibt bereits eine Reihe von *in vivo*-Inhalations- und Instillationsuntersuchungen zur Toxizität von Quarz, vorzugsweise an Ratten. Nach Gabe von Quarzstaub kommt es bei Ratten zu einer Phagozytose des Staubes durch Alveolarmakrophagen und u.a. deren zytotoxischer Lyse (Bignon et al., 1984), Vakuolisierung der Makrophagen (Miller, 1979) und der Ausbildung fibrotischen Gewebes (Tornling et al., 1987). In der silikotischen Lunge ist ferner nach intratrachealer Instillation von Quarz in Ratten eine Zunahme der Arachidonsäure zu verzeichnen (Eskelson et al., 1988).

Wenn Aerosole inhaliert werden, dann passieren sie zuerst die nasopharyngeale Region, um dann über die Bronchien in die Alveolen zu gelangen. Ein großer Teil der Partikel mit einem AMAD (activity median aerodynamic diameter) von mehr als 10 μm wird vor den Alveolen in der nasopharyngealen Region oder in den Bronchien abgefangen und durch die mukoziliäre Clearance aus der Lunge entfernt (Bégin et al., 1989; Menzel et al., 1986). Die maximale Deposition von lungengängigen Partikeln in den Alveolen liegt bei ca. 5 μm (Parkes, 1986).

In den Alveolen treten die Partikel zunächst mit dem Surfactant und den alveolären Zellen in Kontakt. Dies sind primär die Alveolarmakrophagen und Epithelzellen (Typ I- und Typ II-Zellen).

Es herrscht ein allgemeiner Konsens, der den Alveolarmakrophagen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von fibrotischen Lungenerkrankungen zuweist (Brain, 1986; Heppleston et al., 1967).

Die Bedeutung der Makrophagen für die Ausbildung fibrotischer Erkrankungen wird in ihrer Fähigkeit gesehen, abhängig von ihrem Aktivierungszustand und einer Schädigung, ein breites Spektrum an Substanzen zu sezernieren. So berichtet Heppleston

et al. (1967) von einem Faktor, der von Ratten-Peritonealmakrophagen nach Inkubation mit Quarz sezerniert wird und Fibroblasten aus Hühnerembryos zu vermehrtem Wachstum anregt. Nachgewiesen wurde, daß Makrophagen lipidlösliche Stoffe ("macrophage breakdown product") freisetzen, die für das weitere fibrotische Geschehen bedeutsam sind (Katsnelson et al., 1984). In letzter Zeit wird insbesondere den Arachidonsäuremetaboliten in der Fibroseforschung große Aufmerksamkeit zuteil.

So ist die Sekretion von Tumor Necrosis Factor und Leukotrien B₄, eines wichtigen Chemoattractants, als Reaktion auf die Inkubation mit Quarz bei Ratten-Alveolarmakrophagen nachgewiesen worden (Dubois et al., 1988). Auch Rinder-Alveolarmakrophagen sind in der Lage Leukotrien B₄ zu sezernieren (O'Sullivan et al., 1988). Interessant ist auch, daß die Stimulation humaner Alveolarmakrophagen mit Quarz, im Gegensatz zu der Stimulierung mit Endotoxin, nicht zu einer vermehrten Sekretion von Prostaglandin E₂, einem Inhibitor der Fibroblastenproliferation, führt (Brown et al., 1988).

Die Interaktion von Makrophagen mit bestimmten Stoffen führt auch zu Veränderungen des metabolischen Musters der Zelle in Richtung einer Verstärkung der Sauerstoffaufnahme und Sauerstoffradikal Produktion (Seidel et al., 1990b) ("respiratory burst") und der Enzymsekretion (Lock et al., 1987). Die Bedeutung der verstärkten Produktion von Sauerstoffradikalen liegt vor allem in der Infektabwehr. Diese metabolischen Veränderungen werden gelegentlich in der Literatur Aktivierung genannt. Der Terminus "Aktiviert" sollte allerdings für Makrophagen nur mit Vorsicht gebraucht werden, denn Karnovsky et al. (1978) zeigt deutliche Unterschiede zwischen *in vivo* mit immunologisch wirksamen Substanzen aktivierten Makrophagen und *in vitro* "elicited" Makrophagen auf, wobei der Terminus elicited für Makrophagen verwendet wurde, die z.B. mit Thioglykolat stimuliert wurden. Karnovsky postuliert daher, daß nur eine immunologische Stimulierung zu einem aktivierten Makrophagen führen kann.

Es sind ebenfalls bereits zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen zur Zytotoxizität von Quarz in unterschiedlichen Kultursystemen durchgeführt worden. Maus-Peritonealmakrophagen setzen nach Inkubation mit Quarz (DQ12, Min-U-Sil u.a.) Laktatdehydrogenase (LDH) und N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) frei (Lock et al., 1987). Diese Freisetzung der Enzyme wird von Lock et al. als ein Maßstab für die Zytotoxizität der Stäube und zur Klassifikation der Stäube im Vergleich zu dem relativ gering toxischen Staub Titandioxyd verwendet. Die toxische Wirkung von Quarz auf Rinder-Alveolarmakrophagen ist ebenfalls biochemisch sehr gut dokumentiert (Pätzold, 1989; Schimmelpfeng et al., 1989b; Seidel et al., 1989).

Schimmelpfeng et al. (1989b) vergleicht den Einfluss von DQ12-Quarz auf die Freisetzung lysosomaler und zytoplasmatischer Enzyme und auf die Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen mit der auf andere Säugerspezies (Ratte, Affe, Hund und Mensch). Schimmelpfengs Ergebnisse zeigen, daß die Alveolarmakrophagen aller untersuchten Spezies qualitativ gleich auf Quarz mit der Freisetzung von lysosomalen und zytoplasmatischen Enzymen und einem parallelem Vitalitätsverlust reagieren, die quantitative Antwort der Zellen unterscheidet sich hingegen. Die von Schimmelpfeng ebenfalls untersuchte Zelllinie U937 zeigte dagegen eine wesentlich geringere Reaktivität auf Quarz. Diese geringe Reaktivität der monozytären Zelllinie U937 ist in ähnlicher Weise auch von Nieder (1989) bei einer menschlichen promonozytären Zelllinie (HL-60) beobachtet worden. Obwohl diese Zellen nach *in vitro*-Differenzierung mit TPA (12,0-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) zu makrophagenähnlichen Zellen Quarz phagozytierten, stellte Nieder eine zytotoxische Reaktion weder biochemisch noch ultrahistologisch fest. Daß es sich bei der geringen Reaktion der aus den Zelllinien HL-60 und U937 auf Quarz differenzierten Makrophagen nicht um einen generellen Effekt aller Zelllinien handelt, zeigen Versuche von Kane et al. (1980) an der Maus-Makrophagen-Zelllinie P388D1, die auf Quarzinkubation mit einer intrazellulären Lysosomenruptur reagierte (Nachweis über Acridine Orange). Die Lysosomenruptur führte

interessanterweise allerdings in diesem System nur in Anwesenheit von Ca^{2+} zum Tod der P388D1 Zellen.

Wenn eine Partikel die Alveolen erreicht, tritt die Partikel in Kontakt mit dem hier vorhandenen Surfactant, der Benetzungsflüssigkeit der Lunge. Surfactant besteht aus Lipiden und Proteinen, wobei der größte Anteil der Lipide aus Dipalmitoyl-lecithin (DPL) (Harwood, 1987) besteht. DPL vermag aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften an anorganische Partikel wie Quarz zu binden und Alveolarmakrophagen vor anorganischen Stäuben zu schützen (Pätzold, 1989; Wallace et al., 1985; White et al., 1983). Da DPL die Toxizität von anorganischen Fremdstoffen wesentlich beeinflussen kann, war es erforderlich, diesen Einfluss ebenfalls zu erfassen.

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von *in vitro* mit Quarz kultivierten Alveolarmakrophagen wurden bisher relativ wenig durchgeführt. Die Studie von Behrendt et al. (1987) mit humanen Monozyten, die zu Makrophagen differenziert wurden, ist problematisch, da die von Behrendt et al. beobachteten, für dieses Zellsystem spezifischen Autophagosomen weder *ex vivo* noch bei *in vitro*-Zellversuchen bei anderen Spezies beobachtet wurden.

Mit Hilfe zytochemischer Methoden konnte Allison et al. (1966) zeigen, daß Quarzstaub bei Maus-Alveolarmakrophagen zur Lyse der Lysosomen und der Freisetzung von Saurer Phosphatase-Aktivität in das Zytosol führt. Nadler et al. (1970) konnte die Ergebnisse von Allison et al. mit histochemischen Methoden bei Maus-Peritonealmakrophagen bestätigen, denn Nadler et al. fand eine diffuse Anfärbung auf Saure Phosphatase (SP) nur von Maus-Makrophagen die mit Quarzstaub inkubiert worden waren, während Diamantstaub keine Veränderung der Anfärbung erbrachte. Die Diffusion der SP nach Quarzinkubation wurde histochemisch ebenfalls von Dogra et al. (1988) an Ratten-Alveolarmakrophagen nachgewiesen. Unklar ist jedoch, ob dieser Schaden so auch in Rinder-Alveolarmakrophagen wiedergefunden werden kann. Eben-

falls fehlen bis jetzt Daten über den Einfluß von DPL auf den lysosomalen Schaden.

Die zytochemischen Nachweise der SP beruhen im Regelfall auf Inkubation mit dem Substrat und dem folgenden Nachweis des freigesetzten Phosphates durch Fällung eines schwerlöslichen Metallphosphates. Seit Robinson et al. (1983) ist die Verwendung von Cer statt Blei als Fangion bei dem transmissionselektronenmikroskopischen Nachweis von Phosphatasen allgemein üblich, da Cerphosphat erheblich feinkristalliner als Bleiphosphat ausfällt und somit die Lokalisation der Enzymaktivität erheblich erleichtert ist. Auch in unserem Testsystem wurde daher die Cerphosphat-Nachweismethode angewendet.

In vitro-Studien zur Lysosomenruptur durch Quarz von Dehnen et al. (1967) zeigen, daß extrem hohe Quarzkonzentrationen *in vitro* aus Rattenlebern gewonnene Lysosomen zerstören können. Diese Befunde konnten von Pätzold (1989) an Lysosomen von Rinder-Alveolarmakrophagen mit niedrigeren Quarzkonzentrationen nicht nachvollzogen werden.

Zusammenfassend läßt sich folgendes zu den bisherigen transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen feststellen: Ratten-Alveolarmakrophagen nehmen Quarz *in vivo* und *in vitro* auf, der Quarz ist in SP-positiven Organellen nachzuweisen und es kommt nach einer Latenz zum Austritt von Enzymaktivität in das Zytoplasma der Zellen. Humane, aus Monozyten kultivierte Makrophagen reagieren hingegen mit der Bildung spezifischer Autophagolysosomen auf Quarz, und eine Schädigung ist ultrastrukturell nicht festzustellen. Ob die Reaktion der Rinder-Alveolarmakrophagen sich ebenfalls wie bei den Ratten-Alveolarmakrophagen oder eher wie bei den humanen Zellen vollzieht, ist nicht bekannt, und nach den biochemischen *in vitro* Lysosomen-Inkubations-Untersuchungen von Pätzold (1989) scheint es zweifelhaft, ob es zur Zerstörung von Lysosomen als primärem Schadensereignis kommt. Wenn es doch zu einer Zerstörung von Lysosomen in Rinder-Alveolarmakrophagen kommt, bleibt die Frage offen, ob es sich dann nur um einen kleinen Teil oder um die Mehrzahl der

Organellen handelt. Zur Klärung dieser Fragen sind zytochemische Untersuchungen mit Rinder-Alveolarmakrophagen erforderlich. Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Aufnahme von DPL-behandeltem Quarz fehlen bislang ebenfalls völlig, daher ist es erforderlich, die Schutzwirkung des DPL auf ultrastruktureller Ebene zu prüfen.

Pneumokoniosen können nicht nur durch Quarz, sondern auch durch Inhalation von Metallen und ihren Verbindungen ausgelöst werden. Hartmetallstäube (Ohori et al., 1989), Stäube, die Seltene Erden enthalten (Husain et al., 1980), und Kupfersulfatlösung (Pimentel et al., 1969) sind u.a. als Ursache von typischen pneumokoniotischen Veränderungen der menschlichen Lunge beschrieben worden. Diese durch Kupfer oder Seltene Erden ausgelösten Lungenerkrankungen erhalten eine neue Bedeutung durch die Entdeckung der Hochtemperatursupraleiter (HTS) vom Metallmischoxidtyp durch Bednorz et al. (1986) für deren Entdeckung 1987 der Physik Nobelpreis vergeben wurde. Es handelt sich bei diesen Metallmischoxiden um Stoffe, die noch bei Temperaturen oberhalb der Siedetemperatur des flüssigen Stickstoffs supraleitend sind. Sie bringen somit die Voraussetzung für eine wirtschaftliche Nutzung der Supraleitung in zahlreichen Bereichen mit sich und haben mittlerweile eine weite Verbreitung gefunden (Pool, 1989). Die Perspektiven ihrer Anwendung liegen sowohl im Bau medizinischer Geräte (z.B. zur Magnetoenzephalographie) als auch in der Großtechnik, beispielsweise in Kernfusionsreaktoren, Energiespeichern (Wolsky et al., 1989) oder Magnetscheidern für den Bergbau (Jüngst et al., 1988). HTS enthalten im Regelfall Kupfer, ein Element der Seltenen Erden oder alternativ dazu Yttrium und ein Erdalkalimetall. Sie sind so hoch oxidiert, daß dem Kupfer eine Wertigkeit von mehr als zwei zugesprochen wird (Liu et al., 1989). Aufgrund dieser Zusammensetzung ist die Möglichkeit einer fibroseerzeugenden Wirkung von HTS-Stäuben sorgfältig zu prüfen.

Bereits 1987 gab es eine erste Warnung vor einer Toxizität des HTS $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{6-7}$ ($\{123\}$), die allerdings noch jeglicher experimenteller Grundlage entbehrte (Barkatt et al., 1987). Erste tierexperimentelle Untersuchungen zeigten eine moderate orale Toxizität von $\{123\}$ in der Ratte; die LD_{50} beträgt etwa 3000 mg/kg Körpergewicht (London, 1988). Die wichtige Frage einer Toxizität von $\{123\}$ für die Lunge vermochte diese Arbeit jedoch nicht zu klären.

Einen anderen Hinweis auf die mögliche Gefährdung durch HTS-Stäube könnten die Untersuchungen von Hirano et al. (1990) zur Reaktion von Ratten auf die intratracheale Instillation von Yttriumchlorid liefern. Es kommt zur Akkumulation des Yttriums in Lysosomen von Alveolar- und Interstitialmakrophagen, wie es auch bereits für CeCl_3 , CrCl_3 und $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ von Berry et al. (1988) beschrieben wurde. Die Instillation von nur 50 μg YCl_3 in Ratten führte zu signifikanten Erhöhungen des zytoplasmatischen Enzyms LDH, des lysosomalen Enzyms NAG und des Proteingehaltes im Überstand der Lavageflüssigkeit der broncho-alveolären Lavage.

Die Bewertung der Toxizität eines unbekanntes Staubes erfordert einen bekannten zytotoxischen Standardstaub als Bezugspunkt. Quarz stellt als ein nahezu unlöslicher zytotoxischer und hämolysierender Staub eine hervorragende Positivkontrolle dar und wurde bereits bei zahlreichen biochemischen Untersuchungen zur Einordnung der Toxizität unbekannter Stoffe gegenüber Makrophagen wie z.B. der von Flugasche (Gulyas et al., 1988; Kaw et al., 1988b), Graphit (Anderson et al., 1989) und Metallrauchen (Pasanen et al., 1986) verwendet.

Aufgrund des sauren pH -Wertes der Lysosomen (nach Nyberg et al., 1989a etwa um 5,0) sind Alveolarmakrophagen in der Lage, säurelösliche Metallverbindungen wie Manganoxid (Lundborg et al., 1984) oder Arsentrisulfid (Marafante et al., 1987) intrazellulär aufzulösen. Daher müssen neben den intakten HTS-Partikeln die in den HTS-Stäuben enthaltenen Metalle auch einzeln

hinsichtlich ihrer toxikologischen Wirkung auf Rinder-Alveolarmakrophagen untersucht werden.

Während die toxikologische Untersuchung einfacher Metalloxide an Alveolarmakrophagen bereits für einige Elemente erfolgt ist, z.B. für Cadmium (Coin et al., 1986), Nickel (Benson et al., 1988), Mangan (Adkins et al., 1980), Kupfer, Zink und Arsen (Labeledzka et al., 1989), fehlen *in vitro*-Daten für HTS noch völlig. Daher muss zuerst die allgemeine Toxikologie der HTS-Stäube auf Rinder-Alveolarmakrophagen bestimmt werden (Einfluß auf Vitalität und Enzymfreisetzung). Als Modell für die HTS-Stäube diene uns {123}. Toxikologische Daten für die Einzelkomponenten der HTS liegen zwar zum Teil vor, jedoch wurden bisher diese nicht in einem Rinder-Alveolarmakrophagen-Testsystem ermittelt. Aus diesem Grund ist eine vergleichende Untersuchung der Einzelkomponenten mit gleicher Methodik wie bei den HTS-Stäuben sinnvoll. Ähnlich wie bei den Studien mit Quarz stellt die ultrastrukturelle Lokalisation der Schädigung des Rinder-Alveolarmakrophagen einen wichtigen Schritt bei der Bestimmung der Toxizität der HTS-Stäube dar.

Während nur sehr wenige Untersuchungen mit Yttrium-Verbindungen bekannt sind, liegen mehr zuverlässige Daten für das chemisch eng verwandte Lanthanid Cer vor. *In vitro*-Inkubationen mit 100 μM CeCl_3 führten bei Rinder-Alveolarmakrophagen zu einer drastischen Zunahme des NAG- und LDH-Gehaltes im Überstand (Wiener-Schmuck, 1988). Die Toxizität von CeCl_3 (LC_{50} 29 μM) in einem Ratten-Alveolarmakrophagen-Testsystem (Palmer et al., 1987) entsprach etwa der von Cadmiumchlorid mit einer LC_{50} von 28 μM . Interessant ist, daß in diesem System Cadmiumoxid eine LC_{50} von nur 15 μM besitzt, während Ceroxid nahezu untoxisch ist. Diese Arbeit zeigt allerdings auch, daß die Toxizität von Seltenen Erden für Ratten-Alveolarmakrophagen zwischen den einzelnen Elementen und der jeweilig verwendeten Verbindung große Unterschiede aufweist; für Neodymiumchlorid wurde eine (von Palmer et al. extrapolierte) LC_{50} von 1500 μM ermittelt. Von

Barium sind keine relevanten toxischen Effekte auf die Lunge bekannt (Parkes, 1986).

Ergebnisse zur Toxizität von Kupfer liegen bereits von verschiedenen Testsystemen vor. Johansson et al. (1983 und 1984) ließ Kaninchen $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Kupferchlorid inhalieren; ihre ultrastrukturellen und biochemischen Untersuchungen zeigen keine funktionellen Reaktionen der Alveolarmakrophagen auf Kupferchlorid, in einer der beiden Arbeiten wird allerdings die Ausbildung lamellarer Strukturen in Alveolarmakrophagen beschrieben. Diese geringe Toxizität von Kupferchlorid steht in Widerspruch zu Untersuchungen von Benson et al. (1988), der bei Ratten-Alveolarmakrophagen feststellte, daß die Toxizität von Nickel-Kupferoxiden nicht mit dem Nickel, sondern nur mit dem Kupfergehalt korrelierte; ebenfalls fand Aranyi et al. (1981) bei Kaninchen-Alveolarmakrophagen eine hohe Toxizität (LC_{50} für die Vitalität: $11 \mu\text{g}/\text{ml}$) von partikulären Emissionen einer Kupferhütte. Interessant ist bei der Arbeit von Aranyi die gute Korrelation der *in vitro*-Tests an Alveolarmakrophagen mit *in vivo*-Untersuchungen an Mäusen.

Auch bei den HTS-Stäuben ist, ebenso wie bei Quarz, zur Prüfung auf mögliche direkte membranolytische Fähigkeiten der Einsatz eines Hämolysetestsystems sinnvoll, vor allem in Hinblick auf die bekannte hämolytische Fähigkeit von Kupferverbindungen (Barnes et al., 1983).

Die Toxikologie der HTS-Stäube ist bis heute nicht ausreichend erforscht, während eine breite Anwendung zu erwarten ist. Insbesondere der hohe Oxidationsstatus und die besondere Elementzusammensetzung erfordern eine intensive toxikologische Betrachtung zum einen der kompletten Stäube, zum anderen ihrer Einzelbestandteile möglichst in demselben Testsystem.

Bei den untersuchten Stäuben wurde besonders auf eine umfangreiche Dokumentation der physikalischen und chemischen Daten der verwendeten Stäube geachtet, um eine gute Vergleichbarkeit mit anderen Untersuchungen zu sichern. Wichtige Para-

meter in diesem Zusammenhang sind vor allem die Löslichkeit, Partikelgrößenverteilung, Kristallinität, Größe und Beschaffenheit der Oberfläche, die einen wesentlichen Anteil am fibrotischen Potential eines Staubes besitzen (Wiessner et al., 1989).

Da zum einen *in vivo* mechanistische Untersuchungen kaum möglich sind (Allison, 1977) und zum anderen Tierversuche heute aus ethischen Gründen umstritten sind, fiel die Wahl auf ein *in vitro*-Testsystem.

Seit dem Fox (1973) eine einfache Methode zur Gewinnung von großen Mengen von Rinder-Alveolarmakrophagen (bis zu 10^9 Zellen aus einem Tier) beschrieben hat, wurden diese Zellen in zahlreichen Laboratorien verwendet. Bereits Fisher et al. (1983) schlug Rinder-Alveolarmakrophagen als Testsystem für Umweltchemikalien vor und mittlerweile sind diese Zellen sehr gut charakterisiert (Bielefeldt-Ohmann et al., 1986; Dyer et al., 1989; O'Sullivan et al., 1988; Wiener-Schmuck, 1988).

Problematisch ist, vor allem für die Bewertung der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder, die Heterogenität der Alveolarmakrophagen eines Rindes (Seidel et al., 1990a; Bielefeldt-Ohmann et al., 1986), die, wie auch bei anderen Spezies (Oghiso et al., 1987; Nakstad et al., 1989), aus mehreren morphologisch und immunologisch unterschiedlichen Subpopulationen bestehen.

Zusammenfassend können die Ziele der Arbeit wie folgt charakterisiert werden:

1. Charakterisierung der Morphologie von im Monolayer kultivierten Rinder-Alveolarmakrophagen.

2. Untersuchungen zu der ultrahistologischen Reaktion von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz, mit Schwerpunkt auf dem zeitlichen Verlauf der Schädigung der Zellen, der Lysosomenruptur und dem Einfluss von DPL hierauf.

3. Konzentrationseffekt und kinetische Untersuchungen zur Vitalität und biochemischen Reaktion von Rinder-Alveolarmakrophagen auf {123}, Vergleich mit anderen HTS und Quarz.

4. Ultrastrukturelle Untersuchungen zu der Wirkung von {123} auf Rinder-Alveolarmakrophagen mit und ohne Vorbehandlung des Staubes mit DPL.

5. Messung des Einflusses von {123} auf den Lipidstoffwechsel von Rinder-Alveolarmakrophagen.

6. Ermittlung des hämolytischen Potentials von {123} im Vergleich zu Quarz.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Kulturmedien und Puffer

Die folgenden Kulturmedien und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, verwendet:

KM1:

RPMI 1640 (Gibco)
50000 Einheiten/l Penicillin
50 mg/l Streptomycin

KM2:

RPMI 1640 (Gibco)
200,0 mg/l Amphothericin B
20,0 mg/l Tetracyclin
2,5 mg/l Ampicillin

Auf den Zusatz von fötalem Kälberserum wurde in den ersten 20 Stunden der Kultur verzichtet, da in den ersten 20 Stunden nach der Lavage auch ohne fötales Kälberserum keine Schädigung der Zellen bei unserem Testsystem beobachtet wurde und fötales Kälberserum die Enzym- und Proteinbestimmung gestört hätte. Im übrigen ist bekannt, daß fötales Kälberserum die Phagozytose-rate beeinflußt (Müller et al., 1987). Bei Inkubationen für mehr als 20 Stunden wurde 10% fötales Kälberserum zugesetzt.

Zum Waschen der Zellen wurde der folgende Phosphatpuffer verwendet:

Phosphatpuffer (PBS)

137,0 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
0,9 mM	CaCl ₂
0,5 mM	MgCl ₂ x 2 H ₂ O
6,5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

pH-Wert auf 7,4 einstellen.

2.2 Kulturzusätze

2.2.1 Partikuläre Zusätze

Eine Übersicht über die verwendeten Stäube gibt die Abb. 1.

Die Stäube wurden unmittelbar vor Beginn der Versuche für Suspensionskulturen in doppelter Konzentration in KM1, für Versuche im Monolayer in KM2 aufgenommen und 5 Minuten unter Eiskühlung mit einem Branson Sonifier B15, Einstellung 50%, dispergiert.

2.2.1.1 Quarz

Bei dem verwendeten Quarz Sikron F 600 (Palas, Karlsruhe) (Bezeichnung Q) handelt es sich nach Herstellerangaben um ein Quarzfeinstmehl nach DIN 55926, Qualitätsgruppe A. Herr Prof. Dr. C. Politis (KfK, INFP) hat mit Hilfe von Röntgendiffraktionsmessungen eine sehr gute Übereinstimmung mit einem Standard Low Quartz (National Bureau of Standards) festgestellt; dieses bedeutet, daß es sich um einen fast reinen Alphaquarz handelt. Die spezifische Oberfläche des Sikron F600 Quarzes Q wurde mit Hilfe des Brunauer-Emmet-Teller Stickstoffadsorptionsverfahrens bestimmt und beträgt $2,72 \text{ m}^2/\text{g}$. Die Dichte von Quarz beträgt 2650 kg/m^3 (Holleman und Wiberg, 1971). Aus dem Median des geometrischen Durchmessers von $11,4 \text{ }\mu\text{m}$ lässt sich ein AMAD von $18,5 \text{ }\mu\text{m}$ errechnen.

Chemische Zusammensetzung (Glühanalyse)¹:

SiO ₂	99%
Al ₂ O ₃	0,3%
Fe ₂ O ₃	0,05%
CaO + MgO	0,1%
Na ₂ O + K ₂ O	0,2%
Glühverlust	0,25%

Die in einigen Versuchen verwendete Subfraktion (Bezeichnung Qf) des Quarzes Q wurde mit einem five stage cyclone (Southern Research Inst. Alabama) bei der Fa. Palas, Karlsruhe

¹Angabe des Herstellers.

hergestellt. Die Partikelgrößenverteilung in Abb. 2 zeigt die gleichmässige Verteilung der Partikelgröße. Der Median des geometrischen Durchmessers von $1,03 \mu\text{m}$ führt zu einem errechneten AMAD von $1,7 \mu\text{m}$.

2.2.1.2 Hochtemperatursupraleiter-Stäube

Es handelt sich bei den untersuchten HTS um metallische Mischoxide, die kristallographisch dem Perowskittyp (Dietrich et al., 1987) entsprechen. Alle HTS wurden von der Firma HITEC, Karlsruhe bezogen, die für diese eine chemische Reinheit von 99,999% angibt. Herr Prof. Dr. Spurny (Fraunhoferinstitut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg) konnte deutliche Spuren von Si, Ca, Sr, Fe und Bi mit dem EDXA-Verfahren (electron dispersive X-ray analysis) feststellen, allerdings nicht quantifizieren.

Die Korngrößenverteilungen der HTS sind in den Abb. 3, 4, 5 und 6 vorgestellt. Es handelt sich in allen Fällen um Verteilungen, die in dem physiologisch wichtigen Bereich von $1 \mu\text{m}$ bis $5 \mu\text{m}$ deutliche Anteile aufweisen. Die Abb. 7, 8, 9, und 10 zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Stäube².

Bezeichnung	Summenformel
{123}	$\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ ($x \leq 0,1$), gröbere Fraktion
{123} [*]	$\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ ($x \leq 0,1$), feinere Fraktion
{111}	$\text{YBaCuO}_{3,5}$
LaBaCuO	$\text{LaBaCuO}_{3,5}$

Die meisten Untersuchungen mit HTS-Stäuben wurden mit {123} vorgenommen. Bei diesem HTS handelt es sich um eine Verbindung mit einer Sprungtemperatur (T_c) von 93 K, die Dichte beträgt 6316 kg/m^3 , die gleichen Werte gelten auch für {123}^{*}.

Für eine Prüfung auf lösliche toxische Anteile wurde ein Extrakt von {123} mit KM2 hergestellt. Hierzu erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Medium bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Suspension 15 Minuten auf Eis beschallt

²Diese Aufnahmen wurden für uns von Herrn Thiele, Europ. Inst. für Transurane, hergestellt. Herr Thiele führte ebenfalls eine Reinheitsprüfung mit EDXA durch.

(Branson Sonifier B15, Einstellung 50%) und abzentrifugiert (15 Minuten; RT (Raumtemperatur) ; 1000g). Das Pellet wurde als Rückstand, der Überstand als Extrakt bezeichnet.

2.2.1.3 Kupferoxid

Bei dem verwendeten Kupferoxid (Bezeichnung CuO) handelt es sich um ein ACS (American Chemical Society) Reagenz der Fa. Aldrich. Die spezifische Oberfläche von $20,7 \text{ m}^2/\text{g}$ und der geometrische Durchmesser der Partikel von $7,4 \text{ }\mu\text{m}$ sind mittels Granulometrie (Granulometer HR 850 211)³ bestimmt worden, die Korngrößenverteilung ist in Abb. 11 vorgestellt. Aus dem ermittelten geometrischen Durchmesser läßt sich der AMAD bei bekannter Dichte (6315 kg/m^3)⁴ errechnen. Er beträgt in diesem Fall $18,7 \text{ }\mu\text{m}$. Angaben über die Glühtemperatur waren von der Fa. Aldrich leider nicht zu erhalten.

2.2.2 Di-palmitoyl-lecithin-Behandlung

Die Behandlung der Stäube mit Di-palmitoyl-lecithin (DPL) erfolgte entsprechend den Angaben von Wallace et al. (1985). DPL wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml zweimal 5 Minuten auf Eis mit einem Branson Sonifier B15 (Einstellung 50%) emulgiert. Die entstandene Suspension wurde zentrifugiert (10 Minuten; RT; 500g) und anschließend der trockene Staub mit jener Menge DPL-Suspensionsüberstand überschichtet, welche das 1,33fache der Staubmasse an Lecithin enthielt. Der Staub wurde sodann eine Stunde im Wasserbad bei 37° C unter gleichmäßiger Bewegung inkubiert und abschließend zentrifugiert (15 Minuten; RT; 1000g). Der pelletierte Staub wurde sodann in der erforderlichen Menge Medium resuspendiert.

2.2.3 Ionische Zusätze

Es wurden die folgenden Chloride der metallischen Bestandteile des {123} verwendet:

³Ermittelt durch Herren Bürkin, KfK, IMF-I.

⁴Angabe des Herstellers.

YCl₃ (Aldrich)

BaCl₂ (Aldrich)

CuCl₂ x 2 H₂O (Merck)

Es war erforderlich die Metallsalze im sauren Milieu zu lösen um die Hydrolyse der betreffenden Metallionen zu verhindern, daher wurden die Stammlösungen in 0,1 N HCl hergestellt.

Als Stammkonzentrationen wurden die folgenden Konzentrationen verwendet:

76 mM YCl₃

150 mM BaCl₂

225 mM CuCl₂

Der {123} wurde in 1 N HCl gelöst, und sodann mit 0,1 N HCl verdünnt, so daß die Endkonzentration der Stammlösung hier die Hälfte der ionischen Lösungen betrug.

Von diesen Stammlösungen wurden die jeweiligen erforderlichen Mengen den Kulturmedien zugesetzt; sofern es durch den Zusatz der Stammlösung zum Kulturmedium zu einer Gelbverfärbung des Mediums kam (Umschlag des Indikators Phenolrot von Rot nach Gelb erfolgt nach Roth und Blaschke (1978) bei dem pH-Wert 6,8 - 8,4), wurde mit 0,1 N NaOH nach schwachrot zurücktitriert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Gewinnung der Rinder-Alveolarmakrophagen

Die Gewinnung der Alveolarmakrophagen erfolgte *post mortem* durch alveoläre Lavage von Rinderlungen (Müller et al., 1987). Nach Überprüfung der Lunge auf Bluteintritt, mechanische Unversehrtheit und offenkundige Emphyse wurde die Lunge 4 bis 6 mal mit 3 Litern 0,9% Kochsalzlösung, also bis zu einer Gesamtmenge von 12 Litern, in Einzelfällen bis zu 20 Litern gespült. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Lunge kräftig massiert. Die erzielten Rohzellsuspensionen wurden anschließend

durch Verbandmull (DIN 61630) und Nylongaze der Maschenweite 100 μm (Seidengazefabrik Eckert, Waldkirch) filtriert. Nach Zentrifugation (10 Minuten; 4° C; 250g, Hettich Rotixa; RP, Rotor Nr. 5096) wurden die Pellets in 0,9% Kochsalzlösung aufgenommen und vereinigt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation in Glaszentrifugenröhrchen. Geringe Mengen Erythrozyten und eine ebenfalls auf dem Makrophagenpellet befindliche, vermutlich aus Surfactantlipiden und -proteinen bestehende weiße Schicht wurden durch vorsichtiges Abspülen mit dem Überstand entfernt. Stärker durch Erythrozyten verunreinigte Pellets wurden verworfen. Die gereinigten Pellets wurden in 60 ml 0,9% Kochsalzlösung aufgenommen. Die Abtrennung der unerwünschten Begleitzellen und toten Zellen von den Rinder-Alveolarmakrophagen erfolgte durch eine Zentrifugation über Ficoll-Paque (Pharmacia) (Amoruso et al., 1982). Hierzu wurden jeweils 10 ml Zellsuspension mit 15 ml Ficoll-Paque unterschichtet und der Gradient zentrifugiert (20 Minuten; 4° C; 250g). Die lebenden Alveolarmakrophagen wurden an der Grenzschicht angereichert und konnten mit einer Transferpipette abgenommen werden. Nach Waschen mit 0,9% Kochsalzlösung wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und auf eine Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Vitalität lag zu diesem Zeitpunkt in der Regel über 90%. Bei Vitalitätsraten unter 80% wurden die Zellen dieses Tieres nicht verwendet. Die Zeitspanne von der Gewinnung der Zellen durch alveoläre Lavage bis zur Aussaat betrug etwa 3 bis 4 Stunden.

2.3.2 Monolayer Kultur

Die Monolayer Kultur der Makrophagen erfolgte für alle Versuche entweder in 6 x 35 mm Schalen (Greiner, Nr. 657160) oder für die Elektronenmikroskopie auf Nuclepore-Polycarbonat Membranen mit 0,8 μm Porendurchmesser in 60 mm Schalen (Greiner, Nr. 628160) mit einem Teflonring zur Vermeidung des Aufschwimmens der Membranen. Nach einer Anheftzeit von 2 Stunden wurde das Medium gewechselt und durch das entsprechende Inkubationsmedium ersetzt. Für die Ermittlung von Zeiteffekt-Abhängigkei-

ten wurden die Stäube jeweils zum Zeitpunkt (20-t), mit t = Zeitdauer der Staubexposition in Stunden, zugegeben. Hierdurch war gewährleistet, daß alle Zellen eine Gesamtinkubationsdauer von 20 Stunden aufwiesen. Verwendet wurde für die Monolayerkultur KM2.

Vergleich der Substrate Plastikkulturschale und Nuclepore-Membran

Das Kultursystem für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und für die biochemischen Messungen unterschied sich in dem verwendeten Anheftsubstrat. Um die Vergleichbarkeit der transmissionselektronenmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen morphologischen Daten mit den biochemischen Daten zu gewährleisten wurde ein Vergleich zwischen Kultur auf Plastikschaale (Greiner) und auf Polycarbonatmembran (Nuclepore) durchgeführt (Abb. 12 und 13). Da die Pellet NAG-Werte 12% und die Pellet Protein-Werte 8% höher als die entsprechenden Kontrollwerte waren, zeigt sich hier, daß sich die Zellen etwas leichter wieder von der Nuclepore-Membran ablösen als von der Plastikkulturschale. Die Freisetzung von Protein und NAG in den Medienüberstand weist jedoch weder beim Protein noch bei dem Enzym NAG einen deutlichen Unterschied auf, so daß im weiteren die beiden Substrate als funktionell gleichwertig angesehen werden.

2.3.3 Suspensionskultur

Die Suspensionskultur erfolgte in autoklavierten Einmalbechern aus Polypropylen (Sarstedt, Nümbrecht). Es wurden 2,5 ml Zellsuspension mit $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml verwendet, die mit KM1 Medium oder Staubsuspension (doppelt konzentriert) im Verhältnis eins zu eins verdünnt wurden. Die maximale Höhe des Mediums im Urinbecher betrug 5 mm.

2.4 Morphologische Untersuchungen

2.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie

2.4.1.1 Einbettung

Chemikalien und Puffer

Für die Einbettung der Rinder-Alveolarmakrophagen für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die folgenden Chemikalien und Puffer verwendet:

0,1 M Cacodylatpuffer

50,0 ml	0,2 M Cacodylatpuffer
50,0 ml	Aqua bidestillata

0,2 M Cacodylatpuffer pH-Wert 7,0

21,4 g	Natriumcacodylat x 3 H ₂ O (Serva)
5,3 ml	1 M HCl
3,6 g	Sucrose
ad 100 ml	Aqua bidestillata

Epon-Araldite

5 ml	Epon 812 (Serva)
11 ml	Araldite Härter HY 964 (Serva)
3 ml	Araldite CY 206 (Serva)

Sehr gut mischen, vor Benutzung 2% Araldite Beschleuniger DY 964 (Serva) zugeben.

Glutaraldehyd 1,0%

0,4 ml	Glutaraldehyd 25% EM Grade (Serva)
4,6 ml	Aqua bidestillata
5,0 ml	0,2 M Cacodylatpuffer

Glutaraldehyd 2,5%

1,0 ml	Glutaraldehyd 25% EM Grade (Serva)
4,0 ml	Aqua bidestillata
5,0 ml	0,2 M Cacodylatpuffer

Osmiumtetroxid-Veronalpuffer nach Palade

1,0 ml	Veronalpuffer
1,0 ml	0,1 M HCl
1,25 ml	4% wässrige OsO ₄ Lösung
1,75 ml	Aqua bidestillata

Veronalpuffer

2,94 g	Natriumdiäthylbarbitursäure (Balzer Union)
1,94 g	Natriumacetat x 3 H ₂ O
ad 100,0 ml	Aqua bidestillata

Uranylacetat 1 (Fluka)

Uranylacetat, gesättigte wässrige Lösung

Uranylacetat 2 (Fluka)

Uranylacetat, 2%ige wässrige Lösung

Alveolarmakrophagen aus Suspensionskultur wurden in 2,5% Glutaraldehyd über Nacht fixiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in Cacodylatpuffer gewaschen, zwei Stunden mit Palade-Puffer nachfixiert und für 30 Minuten in Wasser auf Eis stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren der Zellen (10 Minuten; RT; 250g) wurden die Proben in vorgewärmten (60° C) 3% Agar eingeschlossen, über die alkoholische Reihe (70%, 90%, 95%, 2x 100%, 2x 100% mit CuSO₄ je 15 Minuten auf Eis) (Ethanol absolut, Roth) entwässert und 2 x 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Propylenoxid (Serva) behandelt.

Die Einbettung erfolgte in den folgende Schritten:

1. Stufe: 1/3 Epon-Araldite : 2/3 Propylenoxid, ca. 8 Stunden, zugedeckt.
2. Stufe: 1/2 Epon-Araldite : 1/2 Propylenoxid, ca. 6 Stunden, zugedeckt.
3. Stufe: 2/3 Epon-Araldite : 1/3 Propylenoxid, ca. 8 Stunden, offen.
4. Stufe: Epon-Araldite, ca. 8 Stunden, zugedeckt.

Einbetten in Flachformen; Polymerisation drei Tage bei 60° C.

Die Einbettung der auf Nuclepore-Membran kultivierten Rinder-Alveolarmakrophagen wurde in Anlehnung an die Methodik von Cornell (1969) durchgeführt. Die Zellen wurden durch dreimaliges vorsichtiges Waschen mit PBS von überschüssigem Protein befreit. Aus der Mitte der Nuclepore-Membran wurde ein 1 cm x 1 cm Stück herausgeschnitten und in ca. 1 mm breite Streifen zerschnitten. Die Membranstreifen wurden in Wägegläschen transferiert und 1 Stunde mit 1% Glutaraldehyd auf Eis fixiert. Sodann wurden die Membranstreifen 3 x mit Cacodylatpuffer gewaschen, 2 Stunden mit Palade-Puffer nachfixiert und eine Stunde mit Uranylacetat 2 blockkontrastiert. Die Entwässerung über die alkoholische Reihe erfolgte in den folgenden Schritten:

50% Ethanol, 10 Minuten

95% Ethanol, 10 Minuten

2 x 100% Ethanol je 20 Minuten

Epon-Araldite/Ethanol 1 : 1, 20 Minuten

Die folgenden Durchtränkungsschritte wurden im Exsikkator unter vermindertem Druck ausgeführt.

Epon-Araldite, über Nacht, RT

Epon-Araldite, 24 Stunden, RT

Epon-Araldite, 60 Minuten, 60° C

Einbetten in Flachformen; Polymerisation drei Tage bei 60° C.

2.4.1.2 Saure Phosphatase-Zytochemie

Chemikalien und Puffer

Das Inkubationsmedium für die Saure Phosphatase (SP) besteht aus:

2-Glycerophosphat 2 mM

CeCl₃ 3 mM

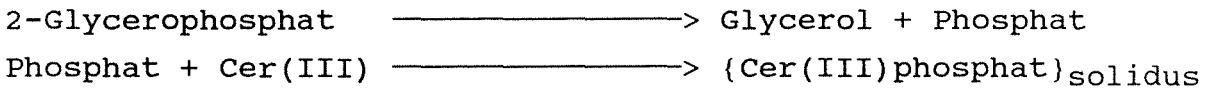
Acetatpuffer pH-Wert 5,0 mit 7% Sucrose

Das Inkubationsmedium wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert.

Reaktionsprinzip

Der zytochemische Nachweis der Sauren Phosphatase nach Robinson et al. (1983) beruht auf der Bildung eines schwerlöslichen und elektronendichten Cerphosphatniederschlages an der Lokalisationsstelle der Enzymaktivität in der Zelle.

[SP, pH 5]



Als Kontrollen dienten Inkubationen ohne das Substrat 2-Glycerophosphat.

Durchführung

Alveolarmakrophagen wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS zur Entfernung von überschüssigem Protein in 1% Glutaraldehyd für 10 Minuten bei 4° C vorfixiert. Anschließend wurde 3 x mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen. Sodann erfolgte zweimal eine je 30-minütige Inkubation mit Saure Phosphatase Inkubations Medium. Nach der Inkubation wurde je zweimal mit Acetatpuffer und dreimal mit Cacodylatpuffer gewaschen, hiernach wurden die Zellen in Epon wie beschrieben eingebettet. Zwischen den einzelnen Schritten war bei den Suspensionskulturen jeweils eine Zentrifugation (10 Minuten; 4° C; 250 g) mit nachfolgender Resuspendierung zwischengeschaltet.

2.4.1.3 Saure Esterase-Zytochemie

Chemikalien und Puffer

0,05 M Citratpuffer pH-Wert 6,0

41,5 ml 0,1 M Natriumcitratlösung

mit 0,1 M Citronensäure auf den pH-Wert 6,0 titrieren.

ad 100,0 ml Aqua bidestillata

Natriumnitrit 4%

1,0 g NaNO₂ (Sigma)

25,0 ml Aqua bidestillata

Pararosanilin 4%

1,0 g Pararosanilin (Sigma)
25,0 ml 2 M HCl (heiß) zugeben,
abkühlen, filtrieren.

Hexazotiertes Pararosanilin

je 250 µl Natriumnitritlösung 4% und Pararosanilinlösung 4% mischen. Nach 60 Sekunden ist die Diazotierung abgeschlossen.

Indoxylacetat Lösung 2%

20 mg Indoxylacetat
1,0 ml Aceton

Saure Esterase-Inkubationsmedium

200 µl Hexazotiertes Pararosanilin
0,1 ml Indoxylacetat
9,7 ml Citratpuffer

Saure Esterase-Kontrollmedium

200 µl Hexazotiertes Pararosanilin
9,8 ml Citratpuffer

Reaktionsprinzip

Die Prinzipien dieser Nachweismethode wurden von Holt et al. (1966) beschreiben. Durch die Saure Esterase (SE) wird Indoxylacetat hydrolysiert und das entstehende Indoxyl kann nun mit hexazotiertem Pararosanilin unter Bildung eines elektronendichten Farbstoffes reagieren. Zur Kontrolle wurden zum einen Inkubationen ohne das Substrat Indoxylacetat zum anderen die Inkubation bei 0° C durchgeführt, um so eine Enzymreaktion zu unterbinden.

Durchführung

Die Zellen wurden mit PBS dreimal gewaschen und danach sofort in 1% Glutaraldehyd für 10 Minuten auf Eis vorfixiert. Die Fixation wurde durch Verdünnung des Glutaraldehydes und anschließendes Waschen mit Cacodylatpuffer beendet. Anschließend erfolgte eine 120-minütige Inkubation (37° C Schüttelwasserbad 100 Hub/min) mit dem Saure Esterase-Inkubationsmedium, wobei

nach 60 Minuten das Inkubationsmedium gewechselt wurde. Bei Kontrollen wurde entweder das Substrat durch Citratpuffer ersetzt oder die Inkubation bei 0° C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und sodann in Epon Araldite eingebettet (siehe Seite 21). Die Spezifität der Reaktion für das Enzym Saure Esterase wurde in diesem Fall sowohl durch eine Inkubation bei 0° C, als auch durch Inkubation ohne das Substrat Indoxylacetat sichergestellt.

2.4.1.4 Schneiden, Kontrastieren und Mikroskopieren

Puffer und Chemikalien

Bleicitratlösung

1,33 g	Pb(NO ₃) ₂ (Merck)
2,11 g	Natriumcitrat x 5,5 H ₂ O
1,76 g	Natriumcitrat x 2 H ₂ O
30,0 ml	Aqua bidestillata CO ₂ -frei

5 Minuten schütteln, 30 Minuten stehen lassen,

8,0 ml 1 M NaOH zugeben,

einen Tag stehen lassen.

Durchführung

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser an einem Sorvall MT2-B Ultramikrotom (Dupont) hergestellt. Die teilweise in den transmissionselektronenmikroskopischen Abbildungen erkennbaren Riefen sind auf die große Härte der verwendeten Stäube zurückzuführen und nicht zu vermeiden. Anschließend wurden die Schnitte auf unbeschichteten Kupfernetzen aufgebracht und, sofern nicht anders vermerkt, mit Uranylacetat 1 für 60 Sek. und Pb-citrat für 5 Minuten kontrastiert. Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Siemens Elmiskop IA bei 80 kV Beschleunigungsspannung mit dem Polschuh III.

2.4.2 Raster Elektronenmikroskopie

Chemikalien und Puffer

Puffer A

50 ml	0,2 M Cacodylatpuffer
20 ml	25% Glutaraldehyd EM Grade
30 ml	Aqua bidestillata

Puffer B

50 ml	0,2 M Cacodylatpuffer
50 ml	Aqua bidestillata
adde 7,0 g	Sucrose

Puffer C

10,0 ml	0,2 M Cacodylatpuffer
10,0 ml	4% wässrige OsO ₄ Lösung

Durchführung

Die Präparation der Zellen für die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte nach Angaben von Millipore, Eschborn. Die auf Nucleopore-Membranen kultivierten Alveolarmakrophagen wurden bei 4° C dreimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurden die Zellen mit den Puffern A, B und C jeweils für 30 Minuten überschichtet. Nach mehrfachem Waschen der Zellen mit Aqua bidestillata bei Raumtemperatur wurden sie durch die alkoholische Reihe entwässert (35%, 70%, 85%, 95% und 100% jeweils für 5 Minuten). Als Ersatz für eine kritisch Punkttrocknung wurden die Alveolarmakrophagen 5 Minuten mit Hexamethyldisilizane behandelt (Nation, 1983). Nach 30 Minuten Trocknung an Luft wurden die Proben bis zur Goldbedampfung im Exsikkator über Blaugel aufbewahrt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden durch Herrn Schüler (KfK, IMT) an einem Philips 525 M Rasterelektronenmikroskop hergestellt.

2.4.3 Vitalitätsbestimmungen

Trypanblau-Methode

Die Bestimmung der Vitalitäten erfolgte lichtmikroskopisch auf Deckgläsern mit Trypanblau (Hanks et al., 1958). Die Vitalität wurde in der Mitte des Deckglases mit einem Inversmikroskop (Leitz Fluovert, Objektiv 32/0.4, 10x Okular) bestimmt. Das ausgezählte Gitternetz entspricht einer scheinbaren Kantenlänge von 150 μm . Für jeden Versuch erfolgten drei Zählungen aus drei Kulturschalen.

Fluoresceindiacetat-Ethidiumbromid-Methode

Die Kontrolle der Vitalität auf Nuclepore-Membranen wurde, da die Trypanblau-Methode infolge der Strukturierung der Nuclepore-Membran ungeeignet ist, mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid (EBr) nach (Aeschbacher et al., 1986) durchgeführt.

Prinzip der FDA/EBr Vitalitätsbestimmung

Die FDA/EBr-Vitalitätsbestimmung beruht auf der Doppelmarkierung sowohl lebender als auch toter Zellen durch die Fluoreszenzfarbstoffe. EBr färbt nur bei beschädigten oder toten Zellen den Zellkern rot, während von FDA intrazellulär durch Esterasen Acetat abgespalten wird. Das resultierende Fluorescein kann intakte Zellen nicht verlassen und färbt daher nur lebende Zellen grün an.

Chemikalien und Puffer

EBr Stammlösung (200 $\mu\text{g/ml}$ in HBSS)

FDA Stammlösung (5 mg/ml in Aceton)

Lösungen bei -20°C aufbewahren.

Durchführung der FDA/EBr Färbung

Ein Stück Membran mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm wurde aus der Nuclepore-Membran herausgeschnitten und in HBSS überführt. Zur Anfärbung wurde eine Mischung von 0,1 ml EBr-Stammlösung und 2 μl FDA-Stammlösung mit 4,9 ml HBSS verwendet, die

für 10 Minuten auf die Zellen bei Raumtemperatur aufgebracht wurde. Die Auswertung erfolgte in einem Leitz Diaplan-Fluoreszenzmikroskop mit dem Filter I2 (Anregungswellenlänge 450 - 490 nm, Emissionswellenlänge 530 nm).

2.4.4 Hämcolor-Färbung

Als Standardfärbung für die Rinder-Alveolarmakrophagen wurde die Hämcolor-Schnellfärbung (Merck) verwendet. Bei dieser Färbung handelt es sich um eine der May-Grünwald Färbung äquivalente Färbemethode. Zur Erstellung von Dauerpräparaten wurden die Deckgläser in Eukitt (Kindler, Freiburg) oder Entellan (Merck) eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem Leitz Diaplan Mikroskop, die photographische Dokumentation mit einer Photoausrüstung der Fa. Wild (Photoautomat MPS 45, Kamera PS 51, auf Kunstlichtfilm Kodak Ektachrome 50).

2.5 Biochemische Untersuchungen

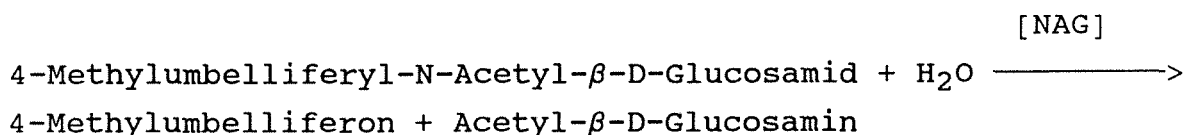
2.5.1 Vorbereitung des Untersuchungsgutes

Nach 20 Stunden Kultur wurden die Medienüberstände entnommen und zur Abtrennung der Zelltrümmer und abgelöster Zellen zentrifugiert (10 Minuten; 4° C; 250 g). Die entstandenen Pellets wurden in 2 ml PBS aufgenommen; die Zellen wurden mit einem Plastikschaber vom Untergrund abgelöst und in 0,9% NaCl aufgenommen. Zellen, Überstände und Pellets wurden sodann 10 Sekunden auf Eis in einem Branson Sonifier B15 bei 50% Pulsbeschallung aufgeschlossen und nach Messung der LDH bei -20° C eingefroren.

2.5.2 N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG)

Das lysosomale Enzym NAG wurde fluoreszenzphotometrisch nach der Methode von Andersen et al. (1982) bestimmt.

Reaktion



Chemikalien

Carbonat-Bicarbonat-Puffer

Lösung A: 0,2 M Na₂CO₃ (21,1 g/l)

Lösung B: 0,2 M NaHCO₃ (16,8 g/l)

Lösung A mit Lösung B auf den pH-Wert 10,5 titrieren.

Laktatpuffer

4,48 g Natriumlaktat

ad 1000,0 ml Aqua bidestillata

pH-Wert mit Milchsäure auf 3,7 einstellen.

Substrat

3,79 mg 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamid in 10 ml Laktatpuffer.

Durchführung

10 μ l Triton X 100 (10%)

100 μ l Probe (ggf. verdünnt mit 0,9% NaCl)

100 μ l Substrat

mischen und 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubieren. Reaktion mit 1 ml Carbonat-Bicarbonatpuffer stoppen. Die Messung erfolgte am Perkin-Elmer Luminiszenzphotometer LS 5B bei einer Anregungswellenlänge von 371 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm mit dem Filter 1% bei einer Spaltweite von 5 nm sowohl für die Anregung als auch für die Emission.

2.5.3 Proteinbestimmung

Reaktion

Die Proteinbestimmung beruht auf der Bildung eines Farbstoffkomplexes aus Comassie Brilliant Blue G250 und Protein, der das Absorptionsmaximum des Comassie Brilliant Blue G250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt (Bradford, 1976).

Durchführung

400 μ l Probe (ggf. verdünnt mit 0,9% NaCl)

100 μ l Biorad Protein Assay (Biorad, München)

sofort sehr gut mischen, 5 Minuten stehen lassen, Messung der Absorption bei 595 nm an einem Beckman-DU-65 Photometer innerhalb von 60 Minuten gegen den Eichstandard Rinderserumalbumin.

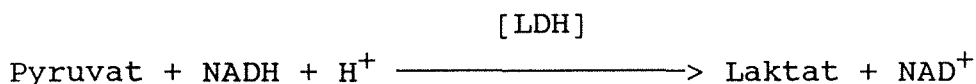
Eine Überprüfung der Messmethode mit Yttrium-, Barium- und Kupferchlorid in den 100 μ g/ml {123} entsprechenden Konzentrationen (150 μ M Y^{3+} , 300 μ M Ba^{2+} bzw. 450 μ M Cu^{2+}) zeigte keine Störungen der Proteinmessung durch diese Ionen.

2.5.4 Laktatdehydrogenase (LDH)

Chemikalien

Die Messung der Laktatdehydrogenase erfolgte nach der Methode der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (1972) mit einem kommerziell erhältlichen Testkit (Sigma) ohne vorheriges Einfrieren der Proben. Als Standardkontrolle wurde Precinorm E (Boehringer/Mannheim) verwendet.

Reaktion



Durchführung

Zu 20 μ l Probe wurden 500 μ l Reagenzlösung (25° C) zugegeben und sofort gut gemischt. Nach 30 Sekunden wurden für eine Zeitraum von 3 Minuten alle 60 Sekunden die Extinktion bei

340 nm gemessen. Die LDH Konzentration wurde aus der Extinktionsabnahme pro Minute errechnet.

2.5.4.1 Einfluss von Metallionen auf die LDH

Zur Überprüfung einer eventuell vorhandenen LDH-Hemmung wurde ein Kontrollversuch angesetzt. Hierfür wurde folgendermaßen vorgegangen:

Je 30 ml Rinder-Alveolarmakrophagen Suspension wurde in einer Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen auf 100 mm Schalen (Greiner) ausgesät. Nach 18 Stunden Kultur wurden die Zellen mit einem Gummischaber entfernt, in einem Branson Sonifier 15B aufgeschlossen und nach Abtrennung der Zelltrümmer (10 Minuten; 4° C; 1000g) das Zytosol durch Zentrifugation (40 Minuten; 4° C; 102000g) gewonnen.

Je 0,5 ml Zytosol und 0,5 ml der zu untersuchenden Lösung wurden gemischt, 20 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend die LDH Menge bestimmt. In dieser Inkubationslösung war die Konzentration an Yttriumchlorid, Bariumchlorid und Kupferchlorid jeweils 50 µM, die Konzentration der verwendeten {123}-Suspension betrug 100 µg/ml.

2.5.5 Lipidanalysen⁵

2.5.5.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie⁶

Chemikalien

Veresterungsreagenz

13,9 mg/ml p-Bromphenacylbromid (Serva)

1,32 mg/ml 18-crown-6 (Sigma)

in Acetonitril lösen.

Durchführung

Die Methodik ist weitgehend mit der von Krug et al. (1988) beschriebenen identisch. Rinder-Alveolarmakrophagen wurden in der mit {123} (10 bzw. 100 µg/ml) für 20 Stunden im Monolayer

⁵Für die Hilfe bei den chromatographischen Untersuchungen danken wir Herrn Dr. H. Krug und Frau H. Steegborn herzlich.

⁶Dies betrifft die Abbildungen 96 und 97.

inkubiert. Die Inkubation wurde mit 3,75 ml eiskaltem Chloroform gestoppt, anschließend wurden die Petrischalen zweimal mit je 2 ml Methanol gespült und das Methanol mit dem Chloroform vereinigt. Nach Zugabe weiterer 3,5 ml Methanol wurde gemischt und kurz auf Eis stehen gelassen. 2 μ g Tridecansäure pro $10 \cdot 10^6$ Zellen wurden als interner Standard zugegeben, mit 3,75 ml Chloroform und 3,75 ml 0,2% Ameisensäure versetzt, kurz stehen gelassen und zur Phasentrennung zentrifugiert (5 Minuten; RT; 1000g). Die untere, organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde erneut mit Chloroform ausgeschüttelt und die beiden vereinigten organischen Phasen sodann im Wasserbad bei 40° C unter Stickstoff eingedampft. Zur Fraktionierung der Lipide wurden 500 ng Aminopropyl-Festphasen-Kartuschen (Waters) verwendet. Diese wurden mit 2 ml Chloroform und 3 ml Hexan vorbeschickt. Sodann wurden die in 300 μ l Chloroform aufgenommen Lipide auf die Kartusche gegeben. Es erfolgte eine Trennung in die Neutrallipide (Fraktion 1), freie Fettsäuren (Fraktion 2) und Phospholipide (Fraktion 3). Fraktion 1 wurde durch Elution mit Chloroform/Isopropanol (2:1) gewonnen, Fraktion 2 durch Elution mit 2% Essigsäure in Diethylether und Fraktion 3 durch anschließendes Waschen mit Methanol. Die Fraktionen 1 und 3 wurden mit internem Standard (Tridecansäure, Roth) versetzt, alle Fraktionen wurden sodann im Wasserbad unter Stickstoff eingedampft.

Die Fraktionen 1 und 3 wurden mit Chloroform in ein gasdichtes Probengefäß überführt und wiederum getrocknet, danach wurden die Proben mit 1 ml 1,3 M KOH in 95% Methanol über Nacht unter Stickstoff bei 45° C hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit Aqua bidestillata und Petrolether versetzt, gemischt und zentrifugiert (5 Minuten; RT; 1000g). Die organische Phase wurde verworfen und das Hydrolysat mit 2 M HCl angesäuert (pH-Wert < 4), die obere organische Phase abgenommen und aufbewahrt. Die wässrige Phase wurde erneut extrahiert und die beiden organischen Phasen auf dem Wasserbad unter Stickstoff eingedampft.

Für die Derivatisierung wurden die drei Fraktionen in gasdichte Probengefäße mit Chloroform überführt und getrocknet, mit Veresterungsreagenz versetzt und in Acetonitril in Anwesenheit von Kaliumhydrogencarbonat 45 Minuten unter Stickstoff bei 85° C derivatisiert. Nach Filtration und Eindampfen der Proben wurden diese in Chloroform aufgenommen und mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysiert.

Die HPLC Auswertung aller drei Fraktionen erfolgte an einem Waters 712 WISP mit zwei Pumpen Modell 510 und einem Multiwavelength Detektor Waters 490 auf einer Spherisorb 3µ C6-Stahlsäule (Chromatographie Service, Eschweiler). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Durchflußgeschwindigkeit des Elutionsmittels (77% : 23% Acetonitril : Wasser) betrug 1,5 ml/Minuten; Registrierung und Auswertung der Spektren wurde mit der Waters MAXIMA 820 Software durchgeführt.

2.5.5.1 Dünnschichtchromatographie⁷

Chemikalien

1-¹⁴C-Arachidonsäure (Amersham)

Laufmittel für Neutrallipide (Lagarde et al., 1984)

Anteile	Stoff
80	Hexan
20	Diethylether
1	Essigsäure

Laufmittel für Phospholipide (Billah et al., 1980)

Obere Phase einer Mischung von

Anteile	Stoff
90	Ethylacetat
50	2,2,4-Trimethylpentan
20	Essigsäure
100	Wasser

⁷Dies betrifft die Abbildung 95.

Durchführung

Die Rinder-Alveolarmakrophagen wurden 24 Stunden mit weniger als 1 μCi $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (gelöst in 208 μl Dimethylsulfoxid) in RPMI 1640 Medium mit 15% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum radioaktiv markiert. Nach der folgenden Stimulierung für 3 Stunden mit 100 μM Triethylblei, 10 μM Calciumionophore A23187 oder 1 μM fMLP (N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin) wurden die Zellen mit Chloroform/Methanol extrahiert. Diese Extrakte der Zellen wurden nach Eindampfen zur Trockene mit Chloroform aufgenommen und auf Kieselgel-G Platten (Machery & Nagel) unter Stickstoff aufgetragen. Die erste Trennung erfolgte über eine Laufstrecke von 10 cm mit dem Laufmittel für Phospholipide. Nach Trocknung der Platte mit einem Fön erfolgte die zweite Trennung mit dem Laufmittel für Neutrallipide. Die Detektion der radioaktiv markierten Arachidonsäure wurde mit Hyperfilm MP (Amersham) für 3 Tage durchgeführt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Arachidonsäure im LKB 1219 Rackbeta.

2.5.6 Hämolyse-Test

Der Hämolyse Test wurde in Anlehnung an die Methodik von Nolan et al. (1981) durchgeführt. Menschliches venöses Blut von einem freiwilligen Spender wurde 3x mit steriler 0,9% NaCl resuspendiert und zentrifugiert (10 Minuten; 4° C; 1000g). Aus den gepackten roten Blutkörperchen wurde sodann eine 4,2%ige Erythrozyten-Lösung erstellt. Von dieser Lösung wurden 250 μl entnommen und mit Aqua bidestillata unter Lyse der Erythrozyten auf 5,0 ml verdünnt. Wenn die Absorption bei 530 nm nicht 0,3 betrug wurde die Erythrozyten Lösung entsprechend der folgenden Formel verdünnt:

$$V_f \times A_f = V_i \times A_i$$

V_f : finales Volumen

A_f : finale Absorption

V_i : initiales Volumen

A_i : initiale Absorption

Durch diesen Schritt war eine gleichbleibende Hämoglobin Endkonzentration gewährleistet.

Durchführung

4 ml Erythrozyten-Lösung und 4 ml Staubsuspension wurden für 2 Stunden im Wasserbad inkubiert. Alle 30 Minuten wurden die Röhren vorsichtig geschwenkt. Am Ende der Inkubation wurden die Röhren zentrifugiert (10 Minuten; 4° C; 1000g) und die Absorption des klaren Überstandes bei 530 nm an einem Beckman-DU-65 Photometer gemessen.

Als Negativkontrolle wurde 0,9%ige Kochsalzlösung (kein Effekt auf Erythrozyten) verwendet, als Positivkontrolle diente Aqua bidestillata, welches zu vollständiger Lyse der Erythrozyten führt. Eine Überprüfung der Ergebnisse mit humanem venösem Blut wurde mit venösem Rattenblut durchgeführt.

Berechnung der Hämolyse:

$$\%H = \frac{A_p}{A_f \times 10} \times 100$$

%H	Prozent Hämolyse
A _p	Absorption Probe
A _f	finale Absorption (s.o.)

2.6 Auswertung und Präsentation der Daten

Von den Ergebnissen aller Versuche, die in die Auswertung kamen, wurde der arithmetische Mittelwert und, sofern drei oder mehr Werte existierten, ein Standardfehler berechnet.

Vitalität

Die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmungen sind im Gegensatz zu den biochemischen Parametern nicht auf die Kontrollwerte bezogen worden, sondern direkt als Prozent lebende Zellen angegeben. Dies war möglich, da die Vitalitäten der Kontrolle immer über 80% lagen.

Enzyme und Protein

Für die biochemischen Parameter wurden die Werte für adhären-
te Zellen (ZE), zellfreie Überstände (ZÜ) und aus dem Kul-
turmedium sedimentierte Pellets (PE) auf die Summe der zu dem
jeweiligen Tier gehörenden Kontrolle (ZE+ZÜ+PE) bezogen.

Chromatographische Methoden

Die Ergebnisse der HPLC-Messungen wurden als prozentuale
Änderung für die jeweiligen Fettsäuren und Fraktionen gegenüber
der Kontrolle gemäß der folgenden Formel berechnet.

$$\% \text{Änderung} = \frac{(K_B - K_K)}{K_K} \times 100$$

K_B : Konzentration behandelte Zellen (ng/ml)

K_K : Konzentration Kontroll Zellen (ng/ml)

Die Auswertung der Dünnschichtchromatographie zeigt die
prozentuale Verteilung der gemessenen Radioaktivität zwischen
Phospholipiden, freier Arachidonsäure, Neutrallipiden und Eico-
sanoiden (Arachidonsäuremetaboliten).

Bewertung und Auswahl der transmissionselektronenmikro- skopischen Bilder

Für die Auswertung der transmissionselektronenmikroskopi-
schen Bilder wurde ein Schema erarbeitet, welches in einem ge-
wissen Umfang eine Standardisierung ermöglichte.

Statistik

Für die statistische Bewertung der biochemischen Ergebnisse
dienten statistische Standard-Tests. Nach einer graphischen
Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurden signifikante
Unterschiede entweder parametrisch mit Hilfe des T-Tests nach
Student oder nichtparametrisch ermittelt. Da für einen großen
Teil der Daten eine Normalverteilung nicht bewiesen werden
konnte wurden diese Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test (Sachs,
1984) untersucht. Obwohl die Teststärke dieses Testes geringer
ist als die Teststärke des entsprechenden T-Tests ist er als
verteilungsfreies Verfahren dem T-Test hier überlegen.

Die Ermittlung der LC₅₀-Werte aus der Konzentrations-Effekt Relation für die Toxizitätsbestimmung des {123}-Staubes wurde durch Probit Analyse (Unkelbach und Wolf, 1985) durchgeführt. Es konnte eine gute Übereinstimmung mit einem graphisch ermittelten LC₅₀-Wertes Wert festgestellt werden.

3. ERGEBNISSE

Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in die fünf Bereiche:

1. Vorstellung des Testsystems, vor allem von der morphologischen Seite.
2. Die Reaktion von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarzstaub.
3. Die Reaktion von Rinder-Alveolarmakrophagen auf {123}-Staub, sowie dazugehörige *in vitro*-Untersuchungen.
4. Die durch Bestandteile von {123} verursachten toxischen Effekte.
5. Ein Vergleich der Reaktion von Rinder-Alveolarmakrophagen auf verschiedener Stäube.

3.1 Kontroll-Rinder-Alveolarmakrophagen

3.1.1 Transmissionselektronenmikroskopische Morphologie

Im Transmissionselektronenmikroskop zeigt der Rinder-Alveolarmakrophage den typischen Habitus des mononukleären Phagozyten.

Nach 20 Stunden Monolayerkultur fällt die Polarisierung im Zytoplasma auf (Abb. 14), die sich vor allem in einer organellarmen bis organellfreien basalen Zone widerspiegelt (Abb. 14, Doppelpfeil). Die Rinder-Alveolarmakrophagen weisen ein im Regelfall gut entwickeltes ER auf (Abb. 15). Der Nukleus ist überwiegend rund bis oval und besteht zu ca. 3/4 aus Heterochromatin⁸.

Die Rinder-Alveolarmakrophagen zeigen rund um den Kern häufig Filamente (Abb. 16 und 17). Der meistens basalständige Zellkern (Abb. 18) ist im Regelfall nierenförmig (Abb. 14), häufig jedoch auch stark gebuchtet (Abb. 19). In einer Vielzahl von Schnitten ist ein Nukleolus im Kern deutlich erkennbar (u.a. Abb. 19). An Einschlüssen sind elektronenhelle Vakuolen mit und ohne Marmorierung (Abb. 19), Strukturen, die mikropino-

⁸Angaben im Bereich der Morphologie sind als orientierende Angaben anzusehen, da sie nur über eine semiquantitative Auswertung gewonnen wurden.

zytotischen Vesikeln ähneln (Abb. 19, Pfeil) und selten multivesikuläre Körperchen (Abb. 18, Pfeil) zu erkennen. In einzelnen Zellen sind Vakuolen mit lamellarem Inhalt wahrnehmbar (Abb. 14, Pfeil). Die Stärke der Lamellen beträgt hier etwa 30 nm. Im Regelfall ist in den Zellen eine Golgizone (Abb. 15) zu beobachten. Die Zellen bilden zahlreiche Pseudopodien aus, die meistens die ganze Zelle umfassen. Die vereinzelt zu beobachtenden elektronenhellen Ausstülpungen der Zellmembran ("Blebs") (Abb. 15, Pfeil) sind als Fixationsprodukte des Glutaraldehydes bekannt und sollten daher nicht als reale Erscheinung betrachtet werden. Zwischen einzelnen Zellen sind gelegentlich (Abb. 19, Pfeilspitze) Zell-Zell Kontakte zu beobachten. Entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen von Kontrollzellen zeigt Abb. 20; die Zellen sind weitgehend intakt und wenig vakuolisiert.

In Anwesenheit von DPL (50 μ l einer mit 1,33 mg DPL/ml gesättigten Suspension pro ml Medium) im Kulturmedium scheinen die Rinder-Alveolarmakrophagen eher abgerundet zu sein und zeigen wenige Pseudopodien, wie in Abb. 21 zu sehen ist. Auch in diesen Zellen ist der Kern meist basalständig, und es ist eine organellfreie Zone zu beobachten. Insgesamt sind im Vergleich zu den Zellen ohne Zusatz von DPL die zytoplasmatischen Prozesse etwas weniger zu erkennen. Die entsprechende lichtmikroskopische Kontrolle ist in Abb. 22 zu sehen. Die Zellen sind hier weitgehend intakt und wenig vakuolisiert, ein Unterschied zu der Kontrolle ohne DPL ist nicht festzustellen.

Rinder-Alveolarmakrophagen, die unmittelbar nach der alveolären Lavage fixiert wurden, adhäreren schon nach sehr kurzer Zeit auf Nuclepore-Membranen und bilden Plasmafortsätze in die Membranporen hinein (Abb. 23). Zu diesem Zeitpunkt ist ein etwas geringerer Anteil an rauhem ER im Vergleich zu den 20 Stunden inkubierten Zellen zu beobachten, auch ist die organellfreie basale Zone nicht so ausgeprägt wie bei Zellen, die 20 Stunden im Monolayer kultiviert waren. Ein ähnliches Bild bietet sich auch nach 10 Minuten Anheftzeit auf Abb. 24.

In Suspension weisen die Rinder-Alveolarmakrophagen zwar einen ähnlichen Durchmesser wie bei der Monolayerkultur auf, jedoch fehlt natürlich die im Monolayer zu beobachtende Polarisierung in apikale und basale Bereiche (Abb. 25). Die Morphologie des Kernes ist weitgehend mit der oben beschriebenen für die Monolayerkultur übereinstimmend. Im Bereich des Zytoplasmas treten jedoch Unterschiede auf, vor allem die Vakuolisierung ist geringer und mikropinozytische Vorgänge sind nicht erkennbar. Insgesamt ist die Erhaltung der Feinstruktur bei der Suspensionskultur deutlich schlechter als bei der Monolayerkultur. Dies zeigt ein Vergleich der Erhaltung der Feinstruktur direkt nach alveolärer Lavage bei Einbettung für Suspensionskulturen (Abb. 26) und für Monolayerkulturen (Abb. 23).

Bei dem zytochemischen Nachweis der Sauren Phosphatase ist sehr deutlich, daß es nur in wenigen der Vakuolen zu elektronendichten Niederschlägen kommt (Abb. 27). Eine Zuordnung aller unbekanntenen Vakuolen in Rinder-Alveolarmakrophagen zu den Lysosomen scheint daher problematisch. Die SP-positiven Vakuolen haben einen Durchmesser von 1 bis 2 μm . In nahezu allen Fällen handelt es sich bei den angefärbten Vakuolen um multivesikuläre Vakuolen, also um sekundäre Lysosomen (Abb. 27 und 28). Zwischen Zellen, die in Suspension und Zellen, die als Monolayer (Abb. 29) gezogen wurden, wurde kein Unterschied beobachtet.

Die Reaktion zum zytochemischen Nachweis der Sauren Esterase färbt den ektoplasmatischen Anteil der Sauren Esterase, eine Anfärbung mitochondrialer Esterasen erfolgte nicht (Abb. 30).

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Morphologie

Zusätzlich zu den transmissionselektronenmikroskopischen und lichtmikroskopischen morphologischen Beobachtungen wurden auch rasterelektronenmikroskopische Kontrollen durchgeführt. Die Abb. 31 und 32 zeigen Rinder-Alveolarmakrophagen, die nach

20 Stunden Kultur relativ gleichmäßig auf ihrem Substrat sitzen. Einige Zellen bilden Zell-Zell Kontakte aus (Abb. 32). Sehr deutlich ist in Abb. 31 die Heterogenität der Rinder-Alveolarmakrophagen zu erkennen. Besonders auffällig ist die tiefgebuchtete Oberfläche mit zahlreichen Filipodien der Rinder-Alveolarmakrophagen auf Nucleopore-Membran im Rasterelektronenmikroskop.

3.2 Einfluß von Quarz

3.2.1 Quarz in Monolayerkultur

In Monolayerkultur wird nativer Quarz (Qf, 250 µg/ml) innerhalb von 10 Minuten an der apikalen Seite der Zelle aufgenommen (Abb. 33). Er befindet sich zu diesem Zeitpunkt in kleinen, von einer einfachen Membran umschlossenen Vakuolen. Die Zellen zeigen eine zum Teil starke Bildung von Filipodien, wie in Abb. 33 zu sehen ist. Eine Aufnahme des Quarzes durch Einrollen von Filipodien, wie von Behrendt et al. (1987) beobachtet, ist ebenso wie eine Veränderung der übrigen Feinstruktur der Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht zu beobachten.

Abb. 34 und 35 zeigen Rinder-Alveolarmakrophagen, die 30 Minuten mit Quarz Kontakt hatten. Der aufgenommene Quarz befindet sich noch in Vakuolen, die von Membranen umschlossen sind. Insgesamt ist eine starke Vakuolisierung der Zellen zu beobachten. Veränderungen am Nukleus, der weiterhin zumeist gebuchtet ist und ein der Kontrolle entsprechendes Verhältnis Euchromatin zu Heterochromatin aufweist, waren nicht zu beobachten. Vereinzelt treten jedoch multivesikuläre Körperchen auf (Abb. 34).

Nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz können extrem stark geschädigte Zellen beobachtet werden, aber auch Zellen, die trotz langer Inkubationszeit mit Quarz noch weitgehend intakt erscheinen. Abb. 36 zeigt einen Makrophagen, bei dem es nach 20-stündiger Inkubation zu einem partiellen Verlust der Zellmembran gekommen ist, das Zytoplasma ist vollständig aufgelöst,

Zellorganellen sind praktisch nicht mehr zu erkennen und der Nukleus hat sich unter Verlust seiner Struktur abgerundet. Eine sehr wichtige Beobachtung ist, daß trotz dieser massiven Veränderungen immer noch ein großer Teil der Quarzpartikel offensichtlich von Membranen umschlossen ist (Pfeil). Die Abb. 37 und 38 zeigen ebenfalls geschädigte Zellen, kenntlich vor allem an den großen Vakuolen, verringerten Filipodien und aufgelösten Bereichen des Zytoplasmas (Abb. 38). Diese Auflösungen erfassen allerdings, im Gegensatz zu dem in Abb. 36 dargestellten Makrophagen, nur einen Teil der Zelle. Es sind auch zahlreiche Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum in der Zelle zu finden.

Eine nach 20-stündiger Inkubation mit Quarz kaum veränderte Zelle ist in Abb. 39 zu sehen. Die Zelle scheint, trotz Aufnahme von Quarz (Pfeil), weitgehend intakt. Lediglich eine größere Anzahl von Vakuolen deutet auf eine Veränderung der Ultrastruktur hin. Der Nukleus entspricht in seiner Struktur und Form ebenso wie die Anzahl der Filipodien weitgehend den Kontrollzellen.

Ein lichtmikroskopischer Vergleich zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist in Abb. 40 zu sehen. Die in dieser Abbildung gezeigten mit Hämacytofluor-gefärbten Rinder-Alveolarmakrophagen wurden 20 Stunden mit 100 μg Qf/ml inkubiert. Es sind nahezu alle Zellen stark vakuolisiert und kaum noch Zellen mit intaktem Zellkern und Zytoplasma zu finden. Abb. 41 zeigt Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Q (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im rasterelektronenmikroskopischen Bild. In Übereinstimmung mit den weiter unten vorgestellten biochemischen Daten ist Q in dieser Konzentration relativ wenig toxisch, so daß die Mehrzahl der Zellen morphologisch den Kontrollzellen entsprechen. Allerdings sind auch abgestorbene Zellen zu finden (Bildmitte).

Die zeitliche Entwicklung bei der Phagozytose von DPL-beschichtetem Quarz weist gegenüber dem nicht beschichteten Quarz keine erkennbaren Unterschiede auf. Quarz ist nach 30 Minuten in Vakuolen in den Rinder-Alveolarmakrophagen zu finden (Abb.

42). In dieser Zelle ist auch sichtbar, daß, wie auch bei den mit unbehandeltem Quarz beladenen Zellen, zu diesem Zeitpunkt keine bedeutenden Veränderungen der Ultrastruktur gegenüber der Kontrolle zu erkennen sind.

Nach 20-stündiger Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz (Abb. 43) besitzen die Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit nicht beschichtetem Quarz inkubiert waren, deutlich weniger und kleinere Vakuolen (vgl. Abb. 38). Zytoplasmatische Auflösungen konnten in keinem Fall festgestellt werden. Die Rinder-Alveolarmakrophagen zeigen ferner deutlich weniger zytoplasmatische Fortsätze als Kontrollzellen, sind aber im übrigen dem Erscheinungsbild der Kontrolle sehr ähnlich. Die Abb. 44, 45 und 46 zeigen Makrophagen, die nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Qf weitere 40 Stunden mit KM2 Medium unter Zusatz von 10% FCS inkubiert wurden. Auch bei diesen Zellen sind, abgesehen von einer starken Abflachung des Zellkörpers, keine Störungen der Ultrastruktur zu beobachten. Die Abb. 45 zeigt eine große membranumschlossene Vakuole, in der sich Quarz befindet. Als Kennzeichen aktiver Prozesse in den Zellen dürfen die zu beobachtenden mikropinozytoseähnlichen Vorgänge (Abb. 46, Pfeil) gewertet werden.

Diese Befunde für die Effekte von DPL sind durch lichtmikroskopische Untersuchungen voll bestätigt (Abb. 47). DPL-behandelter Quarz (Qf, 100 µg/ml) führt zu einer erheblich geringeren Schädigung als unbehandelter Quarz, erkennbar an dem überwiegend intaktem Zytoplasma und den gegenüber der Kontrolle unveränderten Zellkernen.

3.2.2 Quarz in Suspensionskultur

Die Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen in Suspensionskultur mit nativem Quarz führt innerhalb sehr kurzer Zeit zu der Aufnahme von Quarzpartikeln aus dem Medium. Selbst Quarz, der zu Zellen, die unmittelbar zuvor auf 0° C heruntergekühlt wurden, zugegeben wird, wird noch phagozytiert (Abb. 48). Zu diesem Zeitpunkt (unmittelbar nach Zugabe der Quarz-

staub Suspension) sind SP-haltige Lysosomen erkennbar (Abb. 49), die weitgehend dem Erscheinungsbild der Kontrolle entsprechen. Quarz enthaltende Vakuolen scheinen zu diesem Zeitpunkt noch Kontakt zum Ektoplasma zu besitzen, da an ihren Membranen noch, wenn auch sehr schwach, Saure Esterase-Aktivität zu erkennen ist (Abb. 50, Pfeil). Nach 10 Minuten befindet sich der Quarz allerdings schon in Vakuolen, die Saure Phosphatase-Aktivität aufweisen (Abb. 51, Pfeile). Nach 30 Minuten sind Quarzpartikel nicht mehr nur vereinzelt, sondern schon in größerer Zahl in den Zellen zu finden (Abb. 52).

Nach 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit Quarz (Q, 250 $\mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur ist die Zellantwort wie bei Monolayerkulturen nicht einheitlich. Sie reicht von völlig zerstörten Zellen (Abb. 53) bis zu wenig geschädigten Zellen, wie in Abb. 54 zu sehen ist. Ein herausragendes Charakteristikum der 20 Stunden mit Quarz inkubierten Zellen sind zahlreiche Vakuolen, in denen Quarzpartikel zu finden sind (Abb. 55, 56 und 57). Diese Vakuolen sind nun nicht mehr vollständig von einer klar erkennbaren Membran umschlossen (Abb. 55). Sehr bemerkenswert ist, daß sich zu diesem Zeitpunkt in Zellen, deren Zellmembran bereits aufgelöst ist, noch intakte Lysosomen finden (Abb. 53). In einigen wenigen Fällen ist ein "Auslaufen" der Saure Phosphatase-Aktivität aus Quarz enthaltenden Phagolysosomen zumindest nicht von der Hand zu weisen (Abb. 54). Hinweise dafür, daß als erstes Schadensereignis die Membran der Lysosomen leck wird und die Enzyme in das Zytoplasma austreten, haben wir aber nicht gefunden. Bei den auf Saure Esterase angefärbten Zellen findet sich die Enzymaktivität weiterhin nur an der Zellmembran lokalisiert, in den Quarz enthaltenden Vakuolen ist keine Enzymaktivität erkennbar (Abb. 58).

DPL-behandelter Quarz (Q, 250 $\mu\text{g/ml}$) zeigt in Suspension eine der Monolayerkultur analoge verringerte Zytotoxizität. Im Vergleich von DPL-behandeltem Quarz zu unbehandeltem Quarz besteht hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes der Phagozytose und

der Nachweisbarkeit der Enzyme SP und SE kein Unterschied. Wiederum ist wenige Sekunden nach Inkubationsbeginn bereits Quarz in der Zelle zu beobachten, wobei die Membran der Vakuole eine sehr schwache SE-positive Reaktion aufweist (Abb. 50). Nach 10 Minuten ist dann allerdings, wie oben erwähnt, SP-Enzymaktivität in den DPL-behandelten Quarz enthaltenden Vakuolen zu finden (Abb. 51, Pfeile). Diese Aktivität ist auch zu den späteren Zeitpunkten 30 Minuten (Abb. 59, Pfeil) und 90 Minuten (Abb. 60) nachzuweisen. Nach 20 Stunden befindet sich der DPL-behandelte Quarz in großen Vakuolen (Abb. 61), in denen sich keine SE-Aktivität mehr nachweisen läßt (Abb. 62), während sie an der Zellmembran noch eindeutig zu erkennen ist. Die biochemischen Befunde nach Quarz-Phagozytose werden im Zusammenhang mit den Effekten von {123} besprochen.

3.3 Effekte von {123}

3.3.1 Transmissionselektronenmikroskopische Morphologie

Im Gegensatz zu Quarz ist bei Inkubation mit 100 µg/ml {123} unmittelbar nach Inkubationsbeginn keine Anlagerung der Partikeln zu erkennen, wie Abb. 63 zeigt. Die Rinder-Alveolarmakrophagen sind zu diesem Zeitpunkt, ebenso wie nach 5 Minuten (Abb. 64) von den Kontrollen im transmissionselektronenmikroskopischen Bild nicht zu unterscheiden. 10 Minuten nach Inkubationsbeginn ist allerdings eine deutliche Veränderung gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen, denn zu diesem Zeitpunkt treten elektronenhelle Vakuolen mit einem sehr charakteristischen elektronendichten, relativ breiten (ca. 350 nm) Rand auf (Abb. 65).

Die Abb. 66, 67, 68 und 69 zeigen Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit {123}, in denen zum Teil große Vakuolen zu finden sind, die elektronenoptisch dichtes Material enthalten (Pfeile). Es ist davon auszugehen, daß es sich bei diesem Material um aufgenommenen HTS-Staub handelt. Die Zellen unterscheiden sich weder in Bezug auf die Nukleusform bzw.- Struktur, noch in Bezug auf die übrigen Organellen

von der Kontrolle. Auch mikropinozyseähnliche Vorgänge sind weiter zu beobachten (Abb. 69). Zwar haben einige Zellen (Abb. 66) die Adhärenz verloren, die Mehrzahl haftet jedoch weiter fest auf dem Substrat.

Nach 60 Minuten finden sich neben Zellen ohne erkennbare ultrastrukturelle Schäden (Abb. 70) auch weiterhin solche, die die zum Zeitpunkt 30 Minuten zum ersten Mal aufgetretenen Vakuolen (Abb. 71) enthalten. Außerdem kommen zu diesem Zeitpunkt erstmals lamellare Vakuolen hinzu (Abb. 72). Charakteristisch für diese Vakuolen ist, daß sie sehr groß werden (teilweise größer als $5 \mu\text{m}$) und ihre lamellare Struktur nicht einheitlich stark ist, sondern teilweise sogar verschwimmt und daß diese Vakuolen regelmäßig einen dunklen Rand (Stärke $< 100 \text{ nm}$) aufweisen. Sie sind nicht mit den lamellaren Strukturen, die zum Teil in Kontrollzellen gefunden werden (Abb. 14, Pfeil), identisch. Die Abb. 73 und 74 zeigen gleichartige Strukturen nach 2 Stunden Inkubation mit {123}. Auffällig ist, daß die Nuklei abgeflacht sind und nicht mehr die für Alveolarmakrophagen charakteristischen Einbuchtungen aufweisen. Ferner sind die Mitochondrien und Golgistapel deutlich aufgelockert (Abb. 73, Pfeil).

Nach 20 Stunden ist dann, wie Abb. 75 zeigt, eine massive Vergrößerung der gesamten Struktur des Zytoplasmas gegenüber Kontrollzellen neben den lamellaren Körperchen zu sehen. Des Weiteren zeigen sich auch weiterhin die charakteristischen lamellaren Körperchen mit Durchmessern bis zu $5 \mu\text{m}$ (Abb. 75 und 76). Diese finden sich auch bei Zellen, die im übrigen weitgehend intakt erscheinen. In Zellen, die starke Auflockerungen des Zytoplasmas aufweisen, fehlt im Regelfall die Nukleusmembran und der Nukleus ist häufig stark abgerundet (Abb. 75). Es sind auch vielfach geschädigte Mitochondrien zu finden, so daß diese Zellen wohl nicht mehr als vital anzusehen sind. Da die lamellaren Körperchen als Fixationsprodukte des Glutaraldehydes bekannt sind, wurde eine Fixation nur mit Osmiumtetroxid durchgeführt. Diese Zellen zeigen keine der lamellaren Körperchen

(Abb. 77), wenn auch weiterhin Vakuolen in der gleichen Größe zu beobachten sind.

Mit DPL behandelte {123} zeigt wesentlich geringere Auswirkungen auf die Zellen. Die sehr großen lamellaren Körperchen, wie sie ohne DPL auftreten, fehlen (Abb. 78). Der basalständige Zellkern hat überwiegend Nierenform und zeigt keine deutlichen Unterschiede, weder im Verhältnis Euchromatin zu Heterochromatin noch in deren Struktur, im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.2 Rasterelektronenmikroskopische Morphologie

Im Rasterelektronenmikroskop zeigt sich nach 5 Minuten Inkubation mit {123} noch kein Unterschied zur Kontrolle. Deutlich sind HTS-Partikel mit unterschiedlichen Korngrößen zu erkennen (Abb. 79, 80 und 81), die zum Teil auf den Filipodien der Makrophagen liegen. Nach 20 Stunden Kultur mit {123} treten Zellen mit einem schwammförmigen Erscheinungsbild (poröse Zellmembran) auf, wie Abb. 82 zeigt. Die Inkubation der Rinder-Alveolarmakrophagen mit DPL-behandeltem {123} führte zu ähnlichen Erscheinungen (Abb. 83).

3.3.4 Einfluß auf die Vitalität

Um die Frage der zeitlichen Entwicklung der Toxizität der HTS-Stäube zu klären, wurde hier beispielhaft {123} untersucht. Während der Quarzstaub Q in der verwendeten Konzentration von 100 µg/ml keine Änderungen bei der Vitalität bewirkt (soweit dies durch Trypanblau nachweisbar ist) (Abb. 84), ist der Anteil lebender Makrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit {123} auf ca. 70% verringert. Interessant ist vor allem die zu beobachtende Latenzzeit von 4 Stunden vor dem Eintreten eines zytotoxischen Effekts durch den HTS.

Bei der Konzentrations-Effekt-Beziehung der Vitalität für {123} ist der Verlauf der Abnahme der Vitalität nach 20-stündiger Inkubation in Abb. 85 dargestellt. Deutlich ist die geringere Zytotoxizität des DPL-behandelten {123} zu erkennen. Ab

der Konzentration 100 μg {123}/ml sind die zytotoxischen Effekte von DPL-behandeltem {123} (Vitalität 68%) gegenüber dem nicht mit DPL behandeltem {123} (Vitalität 40%) signifikant ($p < 0,05$) kleiner. Die gleichen Daten wurden zur Ermittlung einer EC_{50} verwendet. Diese beträgt nach der Probit Analyse für {123} $60 \pm 2 \mu\text{g}/\text{ml}$.

3.3.5 Biochemie

Zeiteffekt

Rinder-Alveolarmakrophagen zeigen eine zeitabhängige Freisetzung der LDH in den zellfreien Überstand, gekoppelt mit der Verringerung der Gesamtzymaktivität (Abb. 86) als Reaktion auf die Inkubation mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ {123}. Wiederum ist, wie schon bei der Vitalität, eine Latenzzeit von etwa vier Stunden zu beobachten.

Auch bei dem lysosomalen Enzym NAG läßt sich diese Latenzzeit von vier Stunden bei der Inkubation mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ {123} zeigen (Abb. 87). Nach dieser Zeit kommt es zu einer Erhöhung der Enzymaktivität im zellfreien Überstand. Eine DPL-Behandlung vermag die Wirkung des HTS bezüglich der Enzymfreisetzung in den Überstand deutlich zu vermindern. Die Inkubation mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Quarz Q führt zu einer eher kontinuierlichen, wenn auch nur geringeren, Freisetzung in den Überstand.

Bei der im Überstand gemessenen Gesamtproteinmenge (Abb. 88) zeigt sich, daß die Rinder-Alveolarmakrophagen nach der oben beschriebenen Latenzzeit von vier Stunden vermehrt Protein in den Überstand freisetzen. Die Behandlung des HTS mit DPL verringert die Freisetzung in den Überstand deutlich von 31% auf 19%. Quarz Q (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verursachte keine wesentliche Freisetzung von Protein in den zellfreien Kulturüberstand.

Einfluß der Konzentrationen von {123}

Abb. 89 zeigt die Verteilung der LDH-Aktivitäten nach Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Konzentrationen {123} in die Fraktionen ZE, ZÜ und PE. Da die

in den Pellets (PE) befindlichen Anteile systembedingt zum Teil stark unterschiedlich sind (zwischen 2% und 16%) und daher für eine Bewertung der Konzentrations-Effekt-Relation nicht aussagekräftig scheinen, ist auch die Abnahme der LDH in den adhären Zellen nur bedingt verwendbar. Für die Bewertung der zytotoxischen Wirkung wurde daher die Freisetzung in den zellfreien Kulturüberstand als der geeignete Parameter ausgewählt. Im Falle der LDH zeigen sich bei der Konzentrations-Effekt-Relation vor allem zwei Effekte: Zum einen wird die Gesamt-LDH konzentrationsabhängig gehemmt (auf 41% der Kontrolle bei 500 μg {123}/ml), zum anderen kommt es zu einer Verschiebung der noch vorhandenen LDH in den zellfreien Überstand. Diese tritt signifikant ($p < 0,05$) erstmals bei der Konzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf. Der Anstieg von 8% LDH-Aktivität im Überstand bei der Kontrolle auf 27% bei 50 μg {123}/ml ist so stark, daß von einer Schwellenkonzentration für die Freisetzung der LDH durch Rinder-Alveolarmakrophagen gesprochen werden kann. Die LDH Abnahme in den adhären Zellen ist nahezu kontinuierlich von 63% in der Kontrolle auf 4% bei der größten untersuchten Konzentration von 500 μg {123}/ml zu beobachten.

DPL-Behandlung von {123} (Abb. 90) führt zu einer deutlichen Reduzierung der Freisetzung von LDH in den Kulturüberstand. Auch die Hemmung der Gesamt-LDH-Aktivität in den Rinder-Alveolarmakrophagen durch {123} tritt nur in einem verringertem Maß auf.

In Abb. 91 sind die Ergebnisse für die NAG dargestellt. Im Gegensatz zur LDH tritt bei der NAG keine Hemmung der Gesamt-enzymaktivität auf. Auch eine vermehrte Bildung des lysosomalen Enzyms ist nicht zu beobachten. Wiederum fällt die Konzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ als eine Schwellenkonzentration auf. Oberhalb dieser Konzentration ist der Anteil im zellfreien Überstand signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle erhöht. Ein wesentlicher Unterschied zu den Ergebnissen der LDH-Freisetzung ist, daß es bei Konzentrationen größer als 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht zu

einer weiteren Abnahme der in adhärennten Zellen befindlichen NAG kam.

DPL-Behandlung von {123} vermag bis zu einer Konzentration von 100 μg {123}/ml die Rinder-Alveolarmakrophagen statistisch signifikant ($p < 0,05$) vor den Effekten von {123} zu schützen (Abb. 92). Für die Konzentration 250 μg {123}/ml ist jedoch kein Schutzeffekt mehr festzustellen.

Die Verteilung des zellulären Gesamtproteins in ZE, ZÜ, und PE (Abb. 93) entspricht tendenziell der oben beschriebenen LDH-Verteilung. Erst bei einer Konzentration von 50 μg {123}/ml zeigt sich eine Veränderung in der Verteilung des Proteins bei den Rinder-Alveolarmakrophagen zwischen adhärennten Zellen und dem zellfreien Überstand. Bei dieser Konzentration kommt es sowohl zu einer vermehrten Freisetzung von Protein in den Kulturüberstand als auch zu einer Verringerung der messbaren Gesamtproteinmenge. Die Verringerung des zellulären Gesamtproteins im Vergleich zur Kontrolle ist allerdings, im Gegensatz zu der Messung der LDH, nicht durch eine Störung der Bestimmungsmethode des Proteins zu erklären, da entsprechende Kontrollversuche negativ ausgefallen waren. Weder die Freisetzung in den Überstand, noch die Verringerung des Gesamtproteins (je 63% der Kontrolle) ist bei der Konzentration 500 μg {123}/ml höher als bei 250 μg {123}/ml, so daß es auch bei der Freisetzung des Proteins offensichtlich einen maximalen Effekt gibt.

Die Inkubation der Zellen mit DPL-behandeltem {123} (Abb. 94) führt zu nahezu identischen Proteinfreisetzungen wie die Inkubation mit unbehandeltem {123}. So beträgt die Proteinfreisetzung in den Überstand durch 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DPL-behandelten HTS 28%, im Vergleich zu 24% durch unbehandelten HTS. Daher ist ein modifizierender Effekt von DPL für den Parameter Freisetzung von Protein in den zellfreien Überstand nicht festzustellen.

3.3.6 Lipidanalysen

Um eine Beurteilung der unten vorgestellten, durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gewonnenen qualitativen Verteilungen der Fettsäuren in die Fraktionen Neutrallipide, Phospholipide und Freie Fettsäuren zu ermöglichen, wurde ein Stimulierungsversuch durchgeführt. Abb. 95 zeigt, daß es nur zu einer relativ schwachen Erhöhung der freien Arachidonsäure nach Stimulation mit Calciumionophore A23187 kommt, während sowohl fMLP als auch Triethylblei in den verwendeten Konzentrationen nicht in der Lage sind, eine wesentliche Veränderung im Verteilungsmuster der Arachidonsäure zu erzielen.

Untersuchungen mit HPLC haben ergeben, daß es zu Veränderungen in der Verteilung der Lipide in die untersuchten Fraktionen unter dem Einfluß von {123} kommt (Abb. 96 und 97). Bereits 10 µg {123}/ml führten zu Änderungen der Verteilungsmuster einer großen Zahl von Fettsäuren zwischen den Fraktionen Phospholipide, Neutrallipide und Freie Fettsäuren. Wir beschränken uns bei unseren Versuchen allerdings auf die für die Mediatoren wichtigen Arachidonsäure und Linolsäure und auf drei weitere ubiquitäre Fettsäuren (Palmitin-, Stearin- und Ölsäure).

Es kam bei allen betrachteten Fettsäuren zu einer Abnahme in den Phospholipiden, die von 5% für Arachidon- und Stearinsäure bis zu 11% bei der Ölsäure reichte. Diese Abnahme wurde durch eine Erhöhung der Fettsäuren in den Triglyceriden kompensiert, vor allem bei den ungesättigten Fettsäuren. Palmitinsäure und Stearinsäure als gesättigte Fettsäuren wurden eher in der Fraktion der Freien Fettsäuren nachgewiesen (Zunahme der Stearinsäure 6%), wobei bei der Stearinsäure eine Abnahme um 2% in den Triglyceriden bei der Konzentration 10 µg {123}/ml auffällig war. Während die Effekte bei 10 µg {123}/ml noch recht schwach ausgeprägt waren, wurden sie gleichsinnig, aber in einem stärkeren Ausmaß, bei der Konzentration 100 µg {123}/ml beobachtet. Wichtig ist gerade bei dieser höheren Konzentration die relativ geringe Freisetzung der Arachidonsäure in die

freien Fettsäuren, die nur 1-2% beträgt. Eine Veränderung der Gesamtlipidmasse war nicht zu verzeichnen.

3.3.7 Hämolyse

Abb. 98 zeigt repräsentativ für drei Versuche die durch {123} verursachte Hämolyse im Vergleich zu der Hämolyse, die durch Quarz Q verursacht wird. Während die von Quarz Q verursachte Hämolyse erwartungsgemäß linear mit der Konzentration Q steigt, ist ein derartiger Zusammenhang für {123} nicht zu beobachten, die Hämolyse ist hier nur sehr schwach und nicht linear von der Konzentration {123} abhängig.

3.4 Effekte von Einzelbestandteilen von {123}

3.4.1 Löslichkeit von {123}

Abb. 99 zeigt repräsentativ für zwei Versuche die Vitalität von Makrophagen, die zum einen mit 100 µg/ml {123}, zum anderen mit dem Extrakt bzw. dem Rückstand der Extraktion (siehe Seite 15) von 100 µg/ml {123} behandelt wurden. Während der Extrakt nahezu keinen Effekt auf die Vitalität der Rinder-Alveolarmakrophagen zeigt, wird sowohl durch den intakten Staub, als auch durch den Rückstand der Extraktion die Vitalität deutlich verringert.

Die Löslichkeit von {123} in Medium KM2 und in Aqua bidestillata wurde mit Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Bei dem ersten Ansatz wurden 100 µg {123}/ml analog der Kulturbedingungen 20 Stunden in KM2 bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und zentrifugiert (15 Minuten; RT; 1000g). Es sind 0,66 µg/ml Barium und 1,1 µg/ml Kupfer nachzuweisen. Yttrium liegt unter der Nachweisgrenze von 0,2 µg/ml. Für den zweiten Ansatz (Löslichkeit in Aqua bidestillata) wurden 5,07 g {123} in 10 ml Aqua bidestillata für eine Stunde unter Schütteln suspendiert. In dieser

Anordnung konnte 0,9 µg/ml Yttrium, 0,52 mg/ml Barium und 0,16 µg/ml Kupfer nachgewiesen werden⁹.

Die Messung der Solubilisierung durch Zellen erfolgte in KM2; für diese Messungen wurden Rinder-Alveolarmakrophagen in der bei den Zellversuchen verwendeten Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml in den Plastikschaalen ausgesät. Anschließend erfolgte eine 20-stündige Inkubation mit 100 µg {123}/ml bei 37° C, 5% CO₂. Es zeigte sich, daß es zu keiner im Vergleich zu der Kontrolle ohne Zellen erhöhten Konzentration an Ionen im Medium kam (Abb. 100).

3.4.2 Ionische Bestandteile

Die Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit Yttrium(III)chlorid, Barium(II)chlorid, Kupfer(II)chlorid oder in Salzsäure gelöstem {123} führten nur in den Fällen des Kupfer(II)chlorides (450 µM) und des gelösten {123} (100 µg/ml) zu einer drastischen Verminderung der Vitalität der Rinder-Alveolarmakrophagen auf 3% bei Kupferchlorid bzw. 1% bei dem gelösten {123}, wie in Abb. 101 zu sehen ist. Der Verlauf der Vitalitätsabnahme ist offenbar zweiphasig, mit einer raschen Abnahme der Vitalität bis zu einer Konzentration von ca. 100 µM Kupfer und einer langsameren Abnahme im Bereich oberhalb 100 µM Kupfer bis zu der größten untersuchten Konzentration von 450 µM Kupfer, die einer Konzentration von 100 µg/ml {123} entspricht. Sowohl Yttriumchlorid als auch Bariumchlorid führten in dem untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner deutlichen Abnahme der Vitalität (300 µM Barium 87%, 150 µM Yttrium 80% Vitalität).

Abb. 102 und 103 zeigen die durch Yttrium(III)chlorid, Barium(II)chlorid und Kupfer(II)chlorid verursachten Veränderungen der Verteilung der LDH von Rinder-Alveolarmakrophagen in PE, ZÜ und ZE. Die Ionen wurden jeweils in Konzentrationen eingesetzt, die 10 µg/ml (Abb. 99) bzw. 100 µg/ml {123} (Abb. 102) äquivalent waren, so daß die maximalen Konzentratio-

⁹Wir danken Frau Dr. Mainka (KfK, IRCh) für die Hilfe bei diesen Untersuchungen.

nen im Inkubationsmedium 15 bzw. 150 μM Yttrium, 30 bzw. 300 μM Barium und 45 bzw. 450 μM Kupfer betrogen. Schon bei der niedrigen Konzentration fällt deutlich auf, daß Kupferchlorid ebenso wie auch der aufgelöste {123} zum einen die Gesamt-LDH-Menge auf 53% der Kontrollgesamtaktivität (100%) verringert, zum anderen zu einer vermehrten Freisetzung in den Überstand führt. Bei der höheren Konzentration beträgt die insgesamt wiederfindbare LDH-Aktivität nur noch 23% der Gesamtaktivität der Kontrolle.

Die Verringerung der Gesamtaktivität an LDH durch Kupferionen konnte in einem Kontrollexperiment (Abb. 104) bestätigt werden. In diesem Experiment wurde zytosolische LDH mit den verschiedenen im HTS vorkommenden Metallionen in der Konzentration 50 μM versetzt. Nur Kupferionen waren in der Lage, die LDH auf 25% der Kontrollaktivität (Zusatz von 0,9%iger NaCl-Lösung) zu hemmen. Ungelöster {123}, der in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ebenfalls in einem Ansatz zugesetzt war, verursachte keine Hemmung der LDH.

Das Verteilungsmuster der NAG nach Inkubation der Rinder-Alveolarmakrophagen mit den Metallionen (Abb. 105 und 106) ist bei weitem nicht so charakteristisch wie das Verteilungsmuster der LDH. Aber auch hier zeigt sich, daß Kupfer(II)chlorid und der aufgelöste HTS zu einer Enzymfreisetzung in den Kulturüberstand führen. Allerdings ist die Freisetzung erst ab einer der Konzentration 100 μg {123}/ml entsprechenden Konzentration von 450 μM Kupferionen zu beobachten. Wie bei den Versuchen mit ungelöstem {123} kommt es weder zu einer Verringerung noch zu einer Erhöhung der Gesamt-NAG, die beispielsweise für 450 μM Kupfer 105% der Kontrolle beträgt.

Die Ergebnisse der Gesamtprotein-Bestimmungen nach Inkubation mit metallischen Ionen (Abb. 107 und 108) entsprechen in ihrer Tendenz dem Verteilungsmuster der NAG. Dies bedeutet, daß die 10 μg HTS 123(a)/ml entsprechenden Metallionen-Konzentrationen keine Änderung im Verteilungsmuster des Proteins verursachen. Erst die 100 μg {123}/ml entsprechende Konzentra-

tion führt zu einer deutlichen Freisetzung (41%) von Protein durch Kupfer in den Kulturüberstand. Ein wichtiger Unterschied zu dem Verteilungsmuster der NAG ist, daß es bei der 100 µg {123}/ml entsprechenden Konzentration von Kupfer(II)-chlorid zu einer Verringerung des Gesamtprotein Gehaltes auf 85%, im Falle des gelösten {123} auf 62% kommt.

3.4.3 Effekte von Kupferoxid

Das hier verwendete Kupferoxid (CAS Substanz der Fa. Aldrich) verursachte in der Konzentration 36 µg/ml, die vom Kupfergehalt 100 µg/ml {123} entspricht, nur eine Abnahme der Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen um weniger als 20% (Abb. 109). Zwischen DPL-behandelten und nicht DPL-behandelten CuO war kein Unterschied bei den toxischen Reaktionen der Rinder-Alveolarmakrophagen feststellbar; daher wurden die Werte des behandelten und des nicht behandelten Kupferoxidstaubes für alle untersuchten Parameter zusammengefaßt.

Die Verteilung der LDH bei CuO-inkubierten Zellen zwischen den Fraktionen ZE, PE und ZÜ unterscheidet sich nicht signifikant von der Verteilung bei unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 110). Während sich in der Kontrolle 16% der Enzymaktivität im Überstand befinden, sind es bei den CuO-inkubierten Zellen 18%. Auch der Verlust an Gesamt-LDH ist nur sehr schwach vorhanden (88% der Kontrollgesamtaktivität ist bei CuO-inkubierten Zellen wiederzufinden).

Auch für die Verteilung des lysosomalen Enzyms NAG (Abb. 111) und des zellulären Proteins (Abb. 112) in die drei Fraktionen ZE, ZÜ und PE zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Rinder-Alveolarmakrophagen, die mit Kupferoxid inkubiert wurden, und der Kontrolle.

3.5 Vergleich verschiedener Stäube

3.5.1 Lichtmikroskopische Morphologie

Die Abb. 113, 114, 115 und 116 zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von Hämacyolor-gefärbten Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit {123}, LaBaCuO, {123}* und {111} (je 100 µg/ml). Das Zytoplasma der Zellen ist aufgehellert und teilweise aufgelöst. Einen deutlichen Gegensatz zu diesen Bildern bilden die Ergebnisse der Versuche, bei denen 100 µg/ml DPL-behandelter HTS verwendet wurde: Die Abb. 117, 118, 119 und 120 zeigen die eindeutig geringere Schädigung bei diesem Versuchsansatz, kenntlich an dem intakten Zytoplasma und dem gut erkennbaren Zellkern.

3.5.2 Einfluß auf die Vitalität

Einen Vergleich der Effekte von 100 µg/ml der verschiedenen verwendeten Stäube auf die Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen gibt Abb. 121. Rinder-Alveolarmakrophagen zeigten hier eine ähnliche Empfindlichkeit für alle untersuchten HTS wie für den Quarz Qf, der zu einer Abnahme der Vitalität auf 41% führte. Beispielsweise nahm die Vitalität für {123} auf 45% ab. Die Behandlung der Stäube mit DPL hatte insgesamt einen bei allen HTS-Stäuben statistisch signifikanten ($p < 0,05$) protektiven Effekt (Abb. 122), der z.B. für {123} die Vitalitätsminderung auf 63% begrenzte. Deutlicher tritt der schützende Effekt allerdings bei dem Quarz Qf auf, dessen Zytotoxizität für den Zeitraum von 20 Stunden vollständig gehemmt wird (Vitalität nach 20 Stunden Kultur 84%). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den lichtmikroskopischen Befunden der Hämacyolor-Färbungen, die nur für Qf (Abb. 47) eine vollständige Hemmung der Schadwirkung durch DPL zeigen, während bei den HTS-Stäuben trotz eines deutlichen modifizierenden Effektes noch geschädigte Zellen zu erkennen sind (Abb. 117, 118, 119 und 120).

3.5.3 Biochemie

Bei der Bestimmung der Freisetzung von LDH durch Rinder-Alveolarmakrophagen infolge von Inkubation mit verschiedenen Stäuben (Abb. 123) zeigt sich, daß es bei allen Stäuben außer Quarz Q zu einer Verschiebung der LDH-Aktivität aus den Zellen in den zellfreien Überstand kommt. Auffällig ist die Verminderung der Gesamt-LDH in den Zellen durch {123} auf 58% der Aktivität in der Kontrolle. Wurden die Stäube vor Zugabe zu den Rinder-Alveolarmakrophagen mit DPL behandelt, so kam es bei allen Stäuben zu einem protektiven Effekt bezüglich der Enzymfreisetzungen in den Überstand, so daß die Enzymfreisetzung durch {123} statt 34% nur noch 18% betrug. Abb. 124 zeigt die Verteilungen der LDH-Aktivität in ZE, ZÜ, und PE von Rinder-Alveolarmakrophagen, die mit 100 µg/ml DPL-behandelter Stäube für 20 Stunden inkubiert wurden. Der Unterschied zwischen DPL-behandeltem und nicht DPL-behandeltem {123} ließ sich statistisch sichern ($p < 0,05$). Stärker ist jedoch die Schutzwirkung des DPL beim Quarz Qf nach dessen Einwirkung die Enzymfreisetzung von 44% bei unbehandeltem Staub auf 11% bei dem DPL-behandelten Staub absank (Kontrolle 12%).

Auch bei dem lysosomalen Enzym NAG zeigt sich (Abb. 125) nach Inkubation mit 100 µg/ml der HTS-Stäube {123}, LaBaCuO, {123}* und {111} eine verstärkte Freisetzung (34% bis 40%) in den Kulturüberstand. Diese ist vergleichbar mit dem Effekt von 100 µg/ml Qf (36%). Im Gegensatz zu den LDH-Werten kommt es bei der NAG nicht zum Verlust von Enzymaktivität, sondern nur zu einer Verschiebung aus den adhären Zellen in den zellfreien Überstand. So sind zwischen 112% (bei {123}) und 100% (bei {123}*) der Kontrollaktivität zu finden, wobei die Pellet-Werte weitgehend konstant bleiben. Die Befunde bei den mit DPL behandelten Stäuben in Abb. 126 lassen für {123} zwar eine Verringerung der NAG-Freisetzung in den Überstand erkennen (von 34% auf 22%), diese ist aber nicht so deutlich wie die bei der LDH gefundene Verringerung. Die Wirkung von Quarz Qf wird hingegen auf 15% Freisetzung in den Überstand abgeschwächt.

Die Freisetzung von Protein in den zellfreien Überstand erfolgt, wie in Abb. 127 zu erkennen ist, in einer der Freisetzung von LDH analogen Weise. Allerdings ist die Freisetzung von Protein durch den Quarz Qf stärker als durch die verschiedenen HTS-Stäube. Auffällig ist auch die auf 82% der Kontrolle verringerte Gesamtmenge Protein nach der Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit dem HTS {123}* . Abb. 128 zeigt, daß die DPL-Behandlung der HTS-Stäube ebenso wie die von Quarz, allerdings nicht in gleicher Höhe, zu einer Hemmung der Proteinfreisetzung aus den Zellen durch die Stäube führt. Während die Freisetzung durch DPL-behandeltem Qf auf 16% absinkt, setzt {123} nun noch 24% der Kontrollaktivität in den Überstand frei.

4. DISKUSSION

Ein Anliegen der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der ultrastrukturellen Komponente der Schädigung von Rinder-Alveolarmakrophagen durch Quarzstaub *in vitro* mit besonderem Augenmerk auf den potentiellen Schadensort Lysosom gerichtet. Dieser Teil stellte auch notwendiges Vergleichsmaterial für eine Bewertung der toxischen Wirkung der neuen HTS-Stäube auf Rinder-Alveolarmakrophagen dar, die sowohl biochemisch als auch ultrastrukturell dokumentiert werden soll. Vorab sollen jedoch einige Besonderheiten des Testsystems erörtert werden.

Als Testsystem für die Untersuchungen dienten Rinder-Alveolarmakrophagen, die für einen Zeitraum von bis zu 60 Stunden *in vitro* kultiviert wurden. Diese Kultur ist seit Jahren, auch in unserem Labor, etabliert (Fisher et al., 1983; Fox, 1973; Müller et al., 1987).

Ein wichtiger Parameter für die *in vitro*-Reaktivität des Makrophagen, auch auf mineralische Stäube, ist sein Aktivierungszustand (Davies et al., 1989). Es war daher erforderlich, Informationen über den Zustand der durch broncho-alveoläre Lavage gewonnenen Rinder-Alveolarmakrophagen für den Verlauf der Kultur zu erhalten. Lind (1989) zeigt, daß es durch die alveoläre Lavage zu einer, an der spontanen O_2^- -Freisetzung erkennbaren, Stimulierung der Rinder-Alveolarmakrophagen kommt; andererseits sinkt die durch Zymosan induzierbare O_2^- -Freisetzung nach 20 Stunden Kultur dramatisch ab. Da zudem eine bei einer längerdauernden Kultur erforderliche Zugabe von fötalem Kälberserum die biochemischen Messungen gestört hätte, schien es uns sinnvoll, die Versuche möglichst in den ersten 20 Stunden nach der Lavage durchzuführen. Der Aktivierungszustand der Makrophagen hat zudem keinen entscheidenden Einfluß auf die Zytotoxizität von Quarz auf diese Zellen, wie Untersuchungen von Kaw et al. (1988a) an Meerschweinchen-Peritonealmakrophagen zeigen. Gulyas et al. (1988) weist bei vergleichenden biochemischen Untersuchungen zur Zytotoxizität von Flugaschen an aktivierten und nicht-aktivierten Kaninchen-

Alveolarmakrophagen sogar nach, daß der Einsatz aktivierter Makrophagen sinnvoller ist, als der von nicht-aktivierten Zellen, da bei nicht-aktivierten Zellen die Reaktion nicht in der erwarteten Konzentrationsabhängigkeit erfolgte.

Die Kultivierung der Rinder-Alveolarmakrophagen für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde sowohl im Monolayer als auch in Suspension durchgeführt, denn beide Kulturformen weisen Vor- und Nachteile auf. Während Müller et al. (1989) zeigt, daß die Phagozytoserate von Hunde-Alveolarmakrophagen in Suspensionskultur den *in vivo*-Verhältnissen entspricht, führt die Monolayerkultur auf Nuclepore-Membranen zu einer Polarität der Zellen, die eher der natürlichen Topographie und Struktur in den Alveolen angeglichen ist. Außerdem ist diese Kulturform bei der Aufarbeitung der Zellen für die Transmissionselektronenmikroskopie den Suspensionskulturen deutlich überlegen.

Die Morphologie von durch broncho-alveoläre Lavage gewonnenen Rinder-Alveolarmakrophagen wurde bereits von Fox (1973) beschrieben. Die Erhaltung der Feinstruktur ist bei den bisher veröffentlichten transmissionselektronenmikroskopischen Bildern von Rinder-Alveolarmakrophagen (Fox, 1973; Müller et al., 1987) jedoch eher unbefriedigend, was überwiegend auf die Fixation aus Suspension und die damit verbundenen notwendigen Zentrifugationsschritte zurückzuführen sein dürfte. Im transmissionselektronenmikroskopischen Bild entspricht die Morphologie der Rinder-Alveolarmakrophagen der Morphologie anderer Makrophagen, wie Meerschweinchen-Peritonealmakrophagen (Daems et al., 1973) oder Maus-Peritonealmakrophagen (Santos et al., 1983). Die Rinder-Alveolarmakrophagen weisen im transmissionselektronenmikroskopischen Bild überwiegend ein gut entwickeltes Endoplasmatisches Retikulum auf und zeigen zahlreiche Oberflächenprozesse. Nach den Kriterien von Carr (1981) handelt es sich bei den von uns untersuchten Makrophagen in der Mehrzahl um reife Makrophagen. Die bei Zellen, die im Monolayer kultiviert wurden, auftretende Polarisierung in apikale und basale

Bereiche ist bereits für Makrophagen anderer Tierspezies beschrieben worden (Silverstein et al., 1977; McCombs et al., 1968). Die basale organellfreie Zone entspricht wahrscheinlich der bei lichtmikroskopischen Färbungen auf F-Actin gefundenen Anfärbung der Basalmembran (Polzer, persönliche Mitteilung, 1990). Ein Vergleich von Rinder-Alveolarmakrophagen, die auf Nuclepore-Membranen inkubiert wurden, mit Zellen, die auf Plastikkulturschalen inkubiert wurden, zeigt hinsichtlich der Freisetzung von Protein oder NAG in den Kulturüberstand keine Unterschiede, jedoch eine leicht verminderte Adhärenz auf dem Kultursubstrat.

Die in Rinder-Alveolarmakrophagen nach zytochemischer Darstellung der SP beobachteten gefärbten Lysosomen sind überwiegend sehr groß. Dabei handelt es sich fast immer um sekundäre Lysosomen, die an der Strukturierung der Organellen erkennbar sind und die in ihrem Erscheinungsbild den SP-positiven Organellen von Megakaryozyten des Rindes gleichen (Ménard et al., 1990). Auffällig ist die fehlende Färbung primärer Lysosomen, wie sie bei Makrophagen anderer Spezies beobachtet wurde (u.a. Meerschweinchen-Peritonealmakrophagen, Petty et al., 1985). Eventuell handelt sich um ein Problem der ohne vorherige Permeabilisierung arbeitenden SP-Färbung.

Die Erhöhung der Freisetzung von Arachidonsäure von Rinder-Alveolarmakrophagen durch das Calciumionophore A23187 im Kontrollexperiment (Abb. 95) entspricht prozentual der von Englen et al. (1990) ebenfalls an Rinder-Alveolarmakrophagen unmittelbar nach dem Anheften der Zellen gemessenen Erhöhung. Daher sind die nach 20 Stunden Kultur ermittelten Werte für die Freisetzung von Arachidonsäure mit denen unmittelbar nach Gewinnung der Zellen vergleichbar. Die fehlende Reaktion der Rinder-Alveolarmakrophagen auf fMLP wurde bereits für den Parameter O_2^- -Freisetzung bei Rinder-Alveolarmakrophagen nachgewiesen (Bielefeldt-Ohmann et al., 1984).

Biochemische Untersuchungen zur Reaktion von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz (Enzym- und Proteinfreisetzungen und Vitalitätsbestimmungen) sind, wie in der Einleitung dargelegt, bereits intensiv durchgeführt worden (Pätzold, 1989; Schimmelpfeng, 1989a; Seidel et al., 1989). Leider fehlen in den genannten Arbeiten ausführliche ultrahistologisch-morphologische Daten, welche die biochemischen Daten sinnvoll ergänzen würden. Daher schien vor allem eine Vertiefung der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen an Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarz wichtig.

Die ersten Quarz-Partikeln werden schon innerhalb der ersten 5 bis 10 Minuten nach Kontakt mit der Quarzsuspension aufgenommen. Dabei erfolgt die Aufnahme des Quarzstaubes Qf (Median des Partikeldurchmessers 1 μm) im Monolayer auf Nucleopore-Membran offenbar vor allem von oben, wie z.B. Abb. 33 nach 10 oder Abb. 34 nach 30 Minuten Inkubation mit Quarz (Qf) zeigen. Dies bedeutet zum einen, daß als wichtigster Parameter der Belastung der Rinder-Alveolarmakrophagen mit toxischem Staub dieser Partikelgröße nicht die Bodenbedeckung (Schimmelpfeng, 1989a) sondern die tatsächliche Staubkonzentration im Medium anzusehen ist und zum anderen, daß *in vivo* kein Kontakt zwischen den Epithelzellen und dem Quarz vor dessen Phagozytose durch Alveolarmakrophagen zu erfolgen braucht.

Nach 20 Stunden Inkubation mit nativem Quarz (Abb. 36, 37, 38, 39) treten große Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen auf. Während einige Alveolarmakrophagen bereits tot und z.T. schon aufgelöst sind (Abb. 36), zeigen andere Zellen kaum pathologische Veränderungen (Abb. 39). Die Verschiedenartigkeit der Reaktionen der Zellen gegenüber Quarz ist möglicherweise auf die in der Einleitung bereits erwähnte Heterogenität der Rinder-Alveolarmakrophagen zurückzuführen.

Ultrahistologische Untersuchungen zur Reaktion von Makrophagen auf Quarz wurden bisher überwiegend *ex vivo* durchgeführt; *in vitro*-Untersuchungen von Behrendt et al. (1987) an menschlichen, zu Makrophagen differenzierten, Monozyten mit Quarz

(100 μg DQ12/ml Medium für 48 Stunden) zeigen, daß diese Zellen Quarz durch Bildung spezifischer Autophagolysosomen unter Einrollen der Plasmamembran aufnehmen. Diese von Behrendt et al. beobachteten Ereignisse sind in unserem Rinder-Alveolarmakrophagen-Testsystem nicht aufgetreten. Daß bei den Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz ebenfalls noch eine Verbindung zwischen den Quarz enthaltenden Vakuolen und der äußeren Zellmembran existiert, scheint nach den auf Seite 65 diskutierten Saure Esterase-Untersuchungen unwahrscheinlich, könnte jedoch durch ultrahistologische Untersuchungen nach Färbung mit Rutheniumrot, einer Markierungssubstanz für die Zellwand, abschließend geklärt werden. Allerdings sind die Ergebnisse von Behrendt et al. nur bedingt mit den hier vorliegenden vergleichbar, da aus Monozyten differenzierte Makrophagen offenbar eine deutlich niedrigere Empfindlichkeit gegenüber Quarz aufweisen als Alveolarmakrophagen. Dies hat auch Nieder (1989) am Beispiel der zu makrophagenähnlichen Zellen differenzierten HL-60 Zellen (eine humane promonozytäre Zelllinie) gezeigt, die mit 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Quarz für 20 Stunden inkubiert wurden. Auch hier zeigten sich keine an der Enzymfreisetzung in das Kulturmedium oder ultrastrukturell nachweisbaren Schäden durch die Quarzinkubation. Ebenso zeigte sich die humane monozytäre Zelllinie U937 in den Parametern Enzymfreisetzung und Vitalität als wenig reaktiv gegenüber Quarz (Schimmelpfeng, 1989a).

Die in dieser Arbeit vorgestellten transmissionselektronenmikroskopischen Beobachtungen an Rinder-Alveolarmakrophagen entsprechen eher den von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten *ex vivo* Ergebnissen (Bowden et al., 1989; Takemura et al., 1989) für humane Alveolarmakrophagen nach Staubexposition. Rinder-Alveolarmakrophagen können daher eher als ein für ultrahistologische Studien geeignetes Modell für die Untersuchung von Stäuben dienen als *in vitro* zu Makrophagen differenzierte monozytäre Zellen.

Nach einer Zeit von 90 Minuten sind Quarzpartikel in SP-positiven Organellen zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine Schädigung der Organellen (Austritt von SP-Aktivität aus den Lysosomen) zu erkennen. Nach 20 Stunden kommt es vereinzelt zu Schäden an Lysosomen im ultrahistologischen Bild (Abb. 53), die Mehrzahl der Organellen scheint jedoch weiter intakt. Auch in offenkundig toten Zellen sind nach wie vor Quarzpartikel von einer Membran umgeben, und nur einzelne Quarzpartikel liegen frei im Zytoplasma (Abb. 36). Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Widerspruch zu den von Allison et al. (1966) berichteten Beobachtungen, der nach *in vitro*-Inkubation von Ratten-Alveolarmakrophagen mit dem Quarz "Fransil" in zahlreichen Zellen zytochemisch eine diffuse Verteilung des Enzymes SP fand. Aufgrund lichtmikroskopischer Untersuchungen mit Acridine Orange kommt Schmidt (persönliche Mitteilung, 1990) zu prinzipiell gleichen Ergebnissen wie Allison. Schmidt fand bei Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Hinweise darauf, daß geschädigte Lysosomen Acridine Orange in das umgebende Zytoplasma abgaben. Zudem fand Schmidt Zellen, die Acridine Orange nicht mehr in den Lysosomen akkumuliert, sondern diffus im Zytoplasma verteilt hatten. Dieser Effekt ist allerdings auch ohne eine Schädigung der Lysosomenmembran durch eine Veränderung des intralysosomalen pH-Wertes erklärbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen eher im Einklang mit den Beobachtungen von Pätzold (1989), die weder bei hochgereinigten, mit Quarz inkubierten Lysosomen von Rinder-Alveolarmakrophagen noch bei Lysosomen, die aus Quarz-inkubierten Rinder-Alveolarmakrophagen gewonnen wurden, eine erhöhte Fragilität und damit verbundene Enzymfreisetzung feststellen konnte.

Die Ergebnisse von Allison et al. (1966) lassen sich möglicherweise durch die extrem feine Partikelverteilung des verwendeten Quarzes "Fransil" mit Partikeldurchmessern kleiner als 0,3 μm erklären. Zudem wurde der Quarz vor seiner Verwendung hitzesterilisiert, eine Behandlung, die zu einer deutlichen Erhöhung der Zytotoxizität führen kann (Nolan et al.,

1987). Eine größere Empfindlichkeit von Ratten-Alveolarmakrophagen ist hingegen eher unwahrscheinlich, da diese bei *in vitro*-Untersuchungen von Schimmelpfung (1989a), zumindest im Parameter Zellvitalität, unempfindlicher gegenüber Quarz DQ12 waren als Rinder-Alveolarmakrophagen.

Die Beobachtung, daß bei vitalen, unfixierten Zellen die Saure Esterase-Reaktion auf die membrangebundenen Enzymanteile beschränkt ist, wurde bereits beschrieben (Radzun, 1985); daher ist dieser Nachweis der Sauren Esterase vor allem zur Erkennung der zytoplasmatischen Membran nützlich. Während unmittelbar nach Inkubation mit Quarz noch eine leichte Dunkelfärbung der Membran von Quarz enthaltenden Vakuolen zu erkennen ist, läßt sich diese zu späteren Zeitpunkten nicht mehr feststellen.

Rinder-Alveolarmakrophagen, die DPL-behandelten Quarz phagozytierten, wiesen im transmissionselektronenmikroskopischen Bild deutlich geringere ultrastrukturelle Schäden, wie Strukturverlust des Zytoplasmas und große, nicht membranbegrenzte Vakuolisierung auf, als diejenigen Zellen, die mit unbehandeltem Quarz inkubiert wurden. Auch nach 60 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz waren Zellen zu beobachten, die keine im Transmissionselektronenmikroskop erkennbaren Schäden aufwiesen. Der DPL-behandelte Quarz befindet sich in großen von einer Membran umschlossenen Vakuolen. Diese Ergebnisse decken sich mit den biochemischen Beobachtungen von Pätzold (1989), die Rinder-Alveolarmakrophagen bis zu 90 Stunden mit DPL-behandeltem Quarz inkubierte und ebenfalls keine signifikant veränderte Enzymfreisetzung gegenüber der Kontrolle fand. Eine Hemmung der Phagosom-Lysosom-Fusion, wie sie Pätzold postulierte, kann allerdings nicht die Ursache für den Schutzeffekt des DPL sein, denn Abb. 60 zeigt eindeutig SP-Aktivität in einem Organell, das DPL-behandelten Quarz enthält. Es liegt daher nahe, eine Hemmung der membranolytischen Fähigkeit von Quarz durch DPL, wie sie bereits Wallace et al. (1985) beschreibt, für die fehlende Toxizität verantwortlich zu machen. Die Bildung von vielkernigen Riesenzellen, die von Pät-

zold (1989) nach Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz lichtmikroskopisch gefunden wurden, konnte auf ultrahistologischer Ebene leider nicht nachvollzogen werden; die beobachteten Zellen wiesen die typische Morphologie von Alveolarmakrophagen auf.

Die Aufnahme des {123} scheint nach einer Verzögerung von einigen Minuten innerhalb der ersten 30 Minuten zu erfolgen, denn zu diesem Zeitpunkt sind erstmals charakteristische dunkle Partien in den Rinder-Alveolarmakrophagen zu finden. Diese elektronendichten Bereiche konnten wir nur bei Alveolarmakrophagen finden, die bis zu 60 Minuten mit {123} inkubiert wurden. Weder Kontroll-Alveolarmakrophagen, noch Alveolarmakrophagen, die mit Quarz inkubiert wurden, zeigten derartige Strukturen. Daher können wir von einer Aufnahme der Stäube durch die Makrophagen ausgehen, die allerdings langsamer als bei Quarz ist, der schon nach sehr kurzer Zeit in den Rinder-Alveolarmakrophagen nachzuweisen ist.

Innerhalb der nächsten Stunden bilden sich lamellare Strukturen in den Zellen aus. Derartige Strukturen (lysosomal lamellar bodies = LLB) wurden als Reaktion von Makrophagen auf zahlreiche Xenobiotika, z.B. Chlorphentermin (Lüllmann-Rauch, 1975) oder bei Rauchern (Müller et al., 1984) bereits gut dokumentiert. Interessant ist, daß auch Kupfer in Hepatozyten (Fuentealba et al., 1988) und Kaninchen-Alveolarmakrophagen (Johansson et al., 1983) zu ultrahistologisch ähnlichen Erscheinungen führen kann. Bei Chloroquin-induzierten LLB gibt es Hinweise, daß eine Hemmung der Phospholipase A₂ die Ursache für die Ausbildung dieser Strukturen darstellt (Hostetler et al., 1985). Eine derartige Hemmung der Phospholipase A₂ könnte zu Änderungen des Mediatorstoffwechsels führen.

Nach 20 Stunden Inkubation mit {123} konnten die nach 30 und 60 Minuten Inkubation beobachteten, charakteristischen elektronendichten Zonen nicht mehr gefunden werden. Da die Auflösung von Metalloxiden, wie von Mangandioxid durch Kaninchen-Alveolarmakrophagen (Lundborg et al., 1984) oder Cadmium-,

Blei- und Selenoxid (Rhoads et al., 1985) in Rattenlunge, bereits in der Literatur beschrieben wurde, kann der Verlust der charakteristischen elektronendichten Zonen als ein Indiz für die intrazelluläre Auflösung von {123} durch die Rinder-Alveolarmakrophagen *in vitro* gewertet werden. Morphologisch fällt im Vergleich zu Quarz zuerst das Verschwinden der Partikeln während der Kultur und die Ausbildung der lamellaren Strukturen nach 20 Stunden auf. Während es in Quarz-inkubierten Rinder-Alveolarmakrophagen zu einer fast vollständigen Auflösung aller Organellen und dem Verschwinden des Zytoplasmas kommen kann (Abb. 36), wurde ein vergleichbares Bild bei HTS-inkubierten Zellen nicht beobachtet. Hier sind auch in schwer geschädigten Zellen (Abb. 76) die Organellen in einem grobstrukturierten Zytoplasma noch zu erkennen.

Die Abnahme der Vitalität als Reaktion auf die Inkubation mit {123} erfolgt über einen weiten Bereich etwa logarithmisch. Eine auffällige Beobachtung ist, daß jedoch auch bei den höchsten untersuchten {123}-Konzentrationen einige Zellen nicht durch Trypanblau angefärbt wurden. Diese Zellen wurden, da sie nicht dem Kriterium für tote Zellen entsprachen, als vital angesehen. Möglicherweise handelt es sich hier um eine besonders resistente Subpopulation von Rinder-Alveolarmakrophagen, deren Bedeutung allerdings schwer abschätzbar ist. Derartige resistente Subpopulationen wurden auch schon früher beobachtet. So fand Palmer et al. (1987), daß der Anteil überlebender Ratten-Alveolarmakrophagen nach der Inkubation mit 60 bis 250 μM Cerchlorid relativ konstant bei 30% liegt. Teilweise werden solche überlebende Zellen für die Entstehung von Lungenfibrosen verantwortlich gemacht (Bégin et al., 1989; Pätzold, 1989), da diese Zellen möglicherweise andere Mediatoren freisetzen als unveränderte Makrophagen.

Verglichen mit anderen Metallverbindungen ist die Toxizität von {123} nicht übermäßig ausgeprägt. Während von einem Teil der Rinder-Alveolarmakrophagen 250 μg {123}/ml für 20 Stunden noch überlebt werden (Abb. 85), führen bereits 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Vana-

dium bei den Zellen innerhalb von 24 Stunden zum fast vollständigen Absterben (Wei et al., 1982). Auch im Vergleich mit anderen komplexen Metalloxiden ist die Vitalitätsminderung durch {123} nicht ganz so stark, so findet Hooftman et al. (1988) eine LC₅₀ für bestimmte Rauche (manual metall arc welding-stainless steel fume) von weniger als 30 µg/ml bei Rinder-Alveolarmakrophagen, während die LC₅₀ für {123} 60 µg/ml beträgt (s. Abb. 85).

Erstaunlich ist die geringe Toxizität des Yttriumchlorides in dem Rinder-Alveolarmakrophagen-System, die in Widerspruch zu der recht hohen Toxizität von Yttriumchlorid bei Ratten *in vivo* (Hirano et al., 1990) steht. Möglicherweise handelt es sich um einen Effekt der unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Spezies gegenüber Yttriumchlorid. Vergleichende Vitalitätsuntersuchungen zur Toxizität verschiedener HTS-Stäube zeigen, daß die Toxizität von HTS nicht nur auf {123} beschränkt ist, sondern auch die anderen untersuchten HTS-Stäube in gleicher Weise zytotoxisch auf Rinder-Alveolarmakrophagen wirkten. Ein gemeinsames Merkmal dieser Stäube ist der immer vorhandene Kupfergehalt.

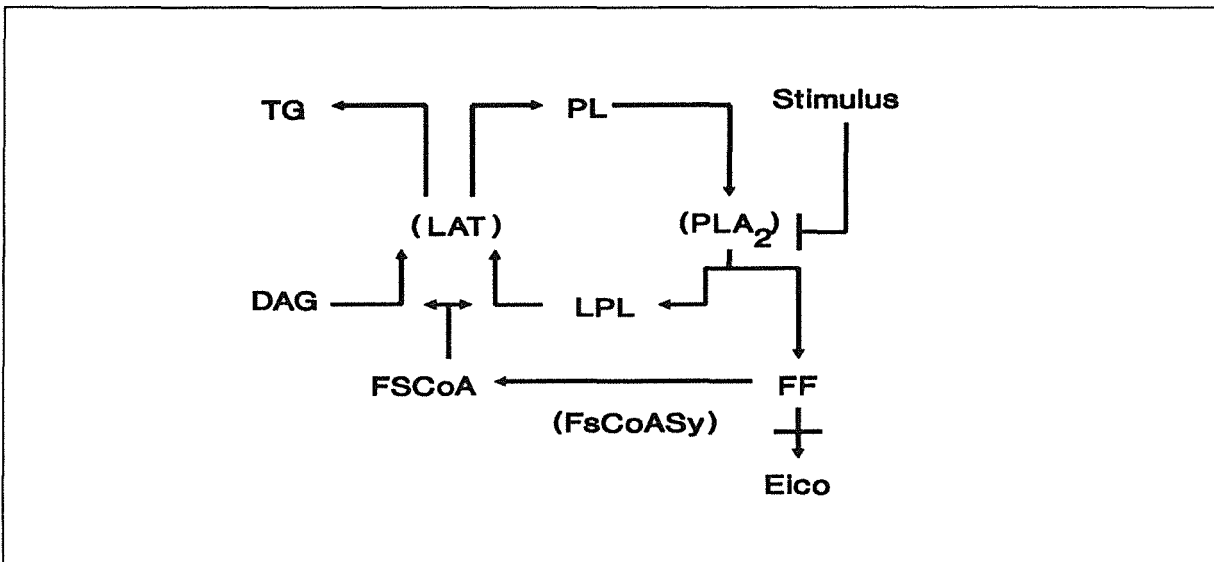
Die Freisetzung von lysosomalen und zytoplasmatischen Enzymen von Rinder-Alveolarmakrophagen durch {123} in den zellfreien Überstand erfolgt nach einer Verzögerung von ca. 4-6 Stunden. Dieses Intervall ist etwas größer als die beobachteten 2-4 Stunden nach Quarzinkubation, die auch von anderen Autoren gefunden wurden (Allison, 1977; Lock et al., 1987). Die längere Verzögerung unterstützt die oben genannte Hypothese einer intrazellulären Auflösung des HTS in den Rinder-Alveolarmakrophagen, bei der es erst im Verlauf einiger Stunden zu einer für die Zelle toxischen Situation kommt.

Sehr interessant ist der Befund, daß sich die nachweisbare Gesamtmenge der LDH während der Inkubation mit {123} verringert. Die Hemmung des Enzyms LDH durch Kupferionen ist bereits in der Literatur beschrieben (Vanni et al., 1979). Die Verringerung der nachweisbaren LDH durch {123} spricht sehr stark für

den Effekt von Kupferionen, da ein Kontrollexperiment mit zytosolischer LDH von Rinder-Alveolarmakrophagen zeigte, daß Yttriumchlorid, Bariumchlorid und der intakte HTS im Gegensatz zu Kupferchlorid nicht in der Lage sind, die LDH von Rinder-Alveolarmakrophagen zu hemmen. Da es sich bei der LDH um ein zyttoplasmatisches Enzym handelt, müssen Kupferionen das Zytoplasma erreicht haben, wo sie jedoch vermutlich gebunden wurden, da Kupferionen nicht vermehrt im zellfreien Überstand nach 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit {123} nachgewiesen werden konnten. Diese Befunde unterstützten die Hypothese einer intralysosomalen Auflösung von {123}. Der zu beobachtende Proteinverlust ist ebenfalls als eine Wirkung von Kupferionen für eine Ratten-Intestinal-Zelllinie beschrieben (Bises et al., 1989). Eine Störung des Protein-Bestimmungsverfahrens ist hingegen unwahrscheinlich, da entsprechende Kontrollen mit Rinder-Serum-Albumin und Kupferchlorid negativ verlaufen waren. In diese Befunde fügen sich die Ergebnisse von Lind (1989) sehr gut ein, die bei Zymosan-stimulierten Rinder-Alveolarmakrophagen eine drastische Reduktion der O_2^- -Produktion durch {123} oder durch Kupferionen feststellte, während weder Yttrium noch Barium ähnlich deutlich die O_2^- -Produktion hemmten.

Der Sättigungseffekt bei der Freisetzung der NAG durch Rinder-Alveolarmakrophagen in ZÜ nach Inkubation mit HTS könnte, ebenso wie die vergleichbaren Effekte bei den Vitalitätsuntersuchungen, ihre Begründung in partiell resistenteren Subpopulationen von Rinder-Alveolarmakrophagen haben.

Wir finden in dem Rinder-Alveolarmakrophagen-Testsystem nur eine geringe Freisetzung von Arachidonsäure sowohl bei der bei den Enzymfreisetzungen noch nicht deutlich toxischen Konzentration von $10 \mu\text{g}$ {123}/ml als auch bei der stark toxischen Konzentration von $100 \mu\text{g}$ {123}/ml. Stattdessen erfolgt ein Umbau der Fettsäuren in die Triglyceride. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen liefert das Modell von Lands (1979, zitiert nach Hornberger et al., 1990) für die Abläufe bei der Arachidonsäurefreisetzung.



Abkürzungen: *TG* = Triglycerid; *FF* = Freie Fettsäure; *LPL* = Lysophospholipid; *PL* = Phospholipid; *PLA₂* = Phospholipase A₂; *LAT* = Lysophospholipidacyltransferase; *Eico* = Eicosanoide; *FSCoA* = Fettsäure-Coenzym A; *FSCoASy* = Fettsäure Coenzym A Synthetase

Die durch den Stimulus (hier {123}-Partikeln) erhöhte Freisetzung von Arachidonsäure (FF) wird durch eine von der Lysophospholipidacyltransferase (LAT) katalysierte Reacylierung wiederum ausgeglichen. Nur wenn die Freisetzung der Arachidonsäure deutlich erhöht ist, werden vermehrt Eicosanoide (Eico) gebildet. Die von uns gefundene Freisetzung von Arachidonsäure reicht vermutlich nicht aus, diese Schwelle zu übersteigen (H. Krug, persönliche Mitteilung, 1990).

Die Enzymfreisetzung und Vitalitätsminderung durch {123}, für den die meisten Daten vorliegen, entspricht von der Größenordnung den Effekten des Quarzes Qf, einer sehr feinen und stark zytotoxischen Subfraktion des Sikron F 600, bei der 100 µg/ml bei Rinder-Alveolarmakrophagen zu einer Vitalitätsabnahme auf 40% führte. Im Vergleich dazu führen 100 µg/ml des oft verwendeten Quarzstaubes DQ12 bei Schimmelpfeng (1989a), ebenfalls im Rinder-Alveolarmakrophagen-Testsystem, nur zu einer Vitalitätsabnahme auf 75% der Kontrolle.

Wie bei Quarz konnte auch für {123} und die anderen untersuchten HTS-Stäube eine signifikante ($p < 0,05$) Verringerung der Zytotoxizität durch die Behandlung mit DPL festgestellt

werden (Siehe u.a. Abb. 85). Eine Erklärung für diese Minderung der Toxizität mag in einer Verringerung der Lipidperoxidation durch Kupferionen oder in einer niedrigeren Aufnahme rate der DPL-behandelten HTS-Partikeln liegen. Eine denkbare Erklärung wäre auch die Bildung einer Lipiddoppelmembran durch das DPL an der Oberfläche der HTS-Partikeln. Dies sollte aber eine verzögerte Freisetzung der Metallionen aus dem HTS-Staub zur Folge haben. Gegen diese verzögerte Freisetzung spricht jedoch, daß auch bei DPL-behandelten Stäuben nach 20 Stunden kein Staub mehr transmissionselektronenmikroskopisch gefunden werden konnte.

Da Minderungen der Toxizität durch DPL von anderen Metalloxiden nicht bekannt sind (White et al., 1983) und aufgrund des Widerspruches zwischen verringerter Toxizität und offenbar doch möglicher intrazellulärer Auflösung, bedürfen diese Ergebnisse einer Überprüfung. Eine Verifizierung des vorgeschlagenen Mechanismus der Verzögerung der Lösung von {123} durch DPL könnte beispielsweise durch Messungen der Freisetzung der Metallionen aus HTS bei einem pH-Wert von 5,0 in einem künstlichem Lysosomenpuffer mit und ohne Vorbehandlung mit DPL erfolgen.

Da Hämolyse ein empfindliches Testsystem für die membranolytischen Eigenschaften eines Stoffes darstellt, wurde die durch Quarz oder {123} verursachte Hämolyse untersucht. Die von Quarz verursachte Hämolyse ist aus der Literatur bekannt; so vergleicht Nolan et al. (1987) die durch unterschiedliche Standard-Quarze (u.a. Sikron F 600 und DQ12) erzeugten Hämolyse. Kupferionen sind ebenfalls in der Lage, Hämolyse auszulösen; diese Fähigkeit wird in Zusammenhang mit der Lipidperoxidation durch Kupferionen gesehen (Aaseth et al., 1986; Chahboun et al., 1990).

In unseren Versuchen zeigt Quarz die erwartete lineare Konzentrations-Effekt-Abhängigkeit für die Hämolyse und beweist somit die Validität des Testsystems. Die Möglichkeit einer peroxidativen Wirkung von HTS war zumindest denkbar. Der HTS-

Staub {123} ist allerdings nicht in der Lage, eine vergleichbare Hämolyse wie Quarz auszulösen, auch ist keine lineare Konzentrations-Effekt-Relation zu beobachten. Wenn HTS *in situ* zur Peroxidation von Membranen befähigt wäre, müsste es zur Hämolyse kommen. Dieses Ergebnis spricht daher gegen eine direkte membranolytische Wirkung von {123}-Stäuben in Makrophagen und ist sowohl konsistent mit den geringen Kupferionen-Konzentrationen, die in den Solubilisierungsversuchen gefunden wurden, als auch mit der beobachteten "lag-time" von 4-6 Stunden bei der LDH-Freisetzung.

Experimente mit Extrakten von {123} zeigten, daß nicht die in RPMI 1640-Medium löslichen Bestandteile die Ursache für die Toxizität darstellen, sondern daß diese durch die im Rückstand der Extraktion verbleibenden Anteile verursacht wird (Abb. 99). Dabei stimmten die Befunde über die Vitalität mit Daten für die Freisetzung von LDH und NAG überein (Daten hier nicht gezeigt). Auch die quantitativen chemischen Analysen (Abb. 100) sprechen nicht für eine Solubilisierung von {123} im Medium KM2.

Andererseits ist bekannt, daß sich {123} in saurer wässriger Suspension unter Blaufärbung und Gasbildung löst (Fraser et al., 1987; Liu et al., 1989). Diese Effekte können auch schon in 50 mM Citratpuffer bei einem pH-Wert von 5,0 und 37° C beobachtet werden (eigene Beobachtung). Derartige pH-Werte können in Lysosomen von Alveolarmakrophagen durchaus erreicht werden (Nyberg et al., 1989b; Ohkuma et al., 1978). Da die Fähigkeit von Alveolarmakrophagen, einfache Metalloxide aufzulösen bereits mehrfach beschrieben worden ist (Hadley et al., 1980; Lundborg et al., 1985; Marafante et al., 1987), sprechen diese biochemischen Befunde in Zusammenhang mit den bereits diskutierten ultrastrukturellen Beobachtungen in ihrer Summe für eine intrazelluläre Auflösung des HTS in den Makrophagen, die vermutlich in den Lysosomen stattfindet. Dies führt dann zu der Frage, welche der Einzelkomponenten der HTS-Stäube die Toxizität maßgeblich bestimmt. Im folgenden sollen daher die einzelnen in {123} vorkommenden Metallionen besprochen werden.

Yttrium ist nach den vorliegenden Ergebnissen für die Toxizität von $\{123\}$ gegenüber Rinder-Alveolarmakrophagen nicht von entscheidender Bedeutung. So zeigt Abb. 101 die Vitalitätsabnahme von Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit den Yttrium-, Barium- oder Kupferionen. Hier fällt die geringe Toxizität des Yttriumions auf, die nahezu keinen Einfluss auf die Vitalität der Rinder-Alveolarmakrophagen im untersuchten Konzentrationsbereich zeigt. Die Ergebnisse der Vitalitätsuntersuchungen sind vollkommen konsistent mit den biochemischen Untersuchungen (Abb. 102, 103, 105, 106, 107 und 108). Andererseits liegen *in vivo* Daten vor (Hirano et al., 1990), die zeigen, daß die Instillation von nur 100 μg Yttriumchlorid in Ratten bereits zu signifikanten Änderungen der Enzymgehalte im Überstand der Lungenlavageflüssigkeit Anlaß gaben; möglicherweise wird *in vivo* die Toxizität von $\{123\}$ durch seinen Yttriumgehalt noch verstärkt.

Die Toxizität von Barium ist in unserem Testsystem nur schwer abzuschätzen. Da Barium vermutlich erst intrazellulär aus dem HTS freigesetzt wird, besteht die Möglichkeit, daß Bariumionen, die in Lysosomen freigesetzt werden, als physiologische Kaliumantagonisten an Na^+/K^+ Kanälen wirken (Reeves, 1986). Allerdings konnte nach eigenen orientierenden Versuchen bei mikroskopischen Untersuchungen mit Acridine Orange keine auffällige Veränderung des pH-Wertes der Lysosomen durch Inkubation mit $\{123\}$ beobachtet werden. Es ist daher eher wahrscheinlich, daß auch intrazellulär die Bariumionen keine Rolle spielen.

Die Toxizität von Kupferionen auf Säugetierzellen ist recht gut untersucht. Die überwiegende Zahl der Autoren beschäftigt sich jedoch mit Reaktionen der Leber, vor allem in Hinblick auf die Wilson'sche Erkrankung. Es existieren allerdings Berichte von fibrotischen Lungenreaktionen, der sogenannten "vineyard sprayers lung" nach dem Einatmen einer Kupferchloridlösung (Bordeaux-Mixtur mit 5% CuCl_2 , neutralisiert mit Kalk) (Pimantel, 1969). Für Alveolarmakrophagen von Ratten, Hunden

oder Mäusen berichtet Benson et al. (1988), daß die Toxizität von Nickel-Kupfer-Mischoxiden durch ihre Kupfer- und nicht durch die Nickelgehalte bestimmt wird. Die Akkumulation von aufgenommenen Kupfer findet zumindest in Leberzellen primär in Lysosomen statt (Helman et al., 1985; Kumaratilake et al., 1989). In der Akkumulation von Kupfer in den Lysosomen der Leberzellen wird von Helman et al. ein Schutzmechanismus für die übrige Zelle gesehen. Eine ähnliche Insolubilisierung von anderen toxischen Metallen (Aluminium, Uran, Cer) wurde auch von Berry et al. (1988) für Alveolarmakrophagen und Typ II-Zellen berichtet.

Ebenfalls von Hepatozyten ist die Ausbildung lamellarer Körperchen beschrieben (Fuentealba et al., 1988), morphologisch ähnliche Organellen wurden von Johansson et al. (1983) in Kaninchen-Alveolarmakrophagen nach Inhalation von Kupferchlorid gefunden. Die lamellare Struktur dieser Vakuolen ist allerdings vermutlich als ein Produkt des Fixationsmittels Glutaraldehyd anzusehen (Crang et al., 1988). Die LLB können jedoch, wie Reasor (1989) in einem Übersichtsartikel zur Biologie der lysosomal lamellar bodies darlegt, als das transmissionselektronenmikroskopische Korrelat einer Änderung des Lipidmetabolismus angesehen werden.

Kupferionen vermögen über eine metallkatalysierte Fenton-Reaktion (Haber-Weiss Reaktion) eine Lipidperoxidation zu bewirken (Chahboun et al., 1990; Chevion, 1988). Diese Lipidperoxidation könnte möglicherweise zu einer Verstärkung der Makrophagenwachstum stimulierenden Aktivität von Lipiden führen (Yui et al., 1990). Durch unsere Lipidanalysen kann leider keine Aussage über die Bildung von Lipidperoxiden erfolgen. Interessant ist, daß auch bei der durch Quarz oder Asbest verursachten Lipidperoxidation diese primär in den Lysosomen nachzuweisen ist (Jajte et al., 1987 und 1988).

Die Messung der Lipidperoxidation durch Nachweis des Malondialdehydes wäre ein wichtiger möglicher Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Toxizität des HTS.

Als Modell für die intrazelluläre Applikation von Kupferionen sollte Kupferoxid dienen. Das von uns verwendete Kupferoxid der Firma Aldrich zeigte jedoch in der untersuchten Konzentration von 36 $\mu\text{g/ml}$ keine wesentliche Toxizität für Rinder-Alveolarmakrophagen, auch eine Verringerung der Gesamt-LDH (Abb. 110) war nicht festzustellen. Dieses negative Ergebnis ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß intrazellulär keine Auflösung des CuO erfolgte, und steht in einem scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen von Labedzka et al. (1989), die eine erhöhte Freisetzung von LDH durch CuO der Firma Fluka in den zellfreien Überstand des Kultursystems findet. Die Freisetzung erfolgte allerdings erst bei einer Konzentration von ca. 80 $\mu\text{g/ml}$, bei der von uns untersuchten Konzentration von 36 $\mu\text{g/ml}$ CuO sind auch ihre Werte kaum über die Kontrollwerte erhöht. Zudem fehlen in der Arbeit von Labedzka et al. Angaben über die Gesamt-LDH-Aktivität, denn eine intrazelluläre Freisetzung von Kupferionen sollte an einer Verringerung der Gesamt-LDH erkennbar (Siehe Abb. 104) sein.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von Partikeln des Hochtemperatursupraleiters $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ und von Quarz auf Alveolarmakrophagen morphologisch und biochemisch untersucht und verglichen. Alveolarmakrophagen wurden aus Lungen frisch geschlachteter Rinder durch Lavage gewonnen und auf Nucleopore-Filtern kultiviert, um optimale Bedingungen für die Transmissionselektronenmikroskopie zu haben.

Elektronenmikroskopisch konnte die Phagozytose von Quarzpartikeln schon wenige Minuten nach Zugabe zu den Zellen nachgewiesen werden. Die Lysosomen konnten mittels der Cerphosphatmethode zum Nachweis der Sauren Phosphatase enzymhistochemisch demonstriert werden. Ebenso konnten Quarzpartikel in solchen Phagolysosomen nachgewiesen werden. Es war jedoch nicht möglich, den Austritt lysosomalen Materials aus den quarzhaltigen Lysosomen in das Zytoplasma zu beobachten. Die typische Reaktion der Zellen auf Quarz war eine starke Vergrößerung derjenigen Vakuolen, in denen sich die Partikel befanden. Nach Vorbehandlung mit Dipalmitoyl-lecithin wurden die Quarzpartikel untoxisch für die Zellen, gelangten aber ebenfalls in Saure-Phosphatase-haltige Lysosomen. Die Zellen waren 20 Stunden nach Quarzzugabe im Absterben begriffen, es war aber nicht möglich, die wiederholt postulierte Schädigung der Lysosomenmembran als Primärursache der Zytotoxizität nachzuweisen. Ebenso wie nach Inkubation von Quarzpartikeln führten Partikel von $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ zu einer Freisetzung von Enzymen in das Medium als Ausdruck einer zytotoxischen Wirkung. Im Gegensatz zu Quarz entstanden jedoch innerhalb mehrerer Stunden in den Zellen ungewöhnlich große, mit lamellarem Inhalt gefüllte Vakuolen ("Lamellarkörperchen"), was auf eine Hemmung des Phospholipidabbaus zurückgeführt wurde. Da die Partikel nach kurzer Zeit nicht mehr in den Zellen elektronenmikroskopisch gefunden wurden, wurde gefolgert, daß intralysosomal eine rasche Auflösung vor sich geht.

Es wurde gezeigt, daß im Gegensatz zum Quarz nicht die Teilchenoberfläche als solche membran- bzw. zytotoxisch ist. Weitere Versuche legten den Schluß nahe, daß das Kupfer für die zytotoxischen Effekte die größte Rolle spielt. Nicht nur $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ sondern auch $\text{YBaCuO}_{3,5}$ oder $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ sind für Alveolarmakrophagen zytotoxisch.

6. LITERATUR

- Aaseth J., Norseth T.** (1986): Copper. in: Handbook on the Toxicology of Metals, 2nd edition (Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V. eds.) Amsterdam: Elsevier Sci. Publishers B.V., 233-254
- Adkins B., Luginbuhl G.H., Gardner D.E.** (1980): Biochemical changes in pulmonary cells following manganese oxide inhalation. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **6**, 445-454
- Aeschbacher M., Reinhardt C.A., Zbinden G.** (1986): A rapid cytotoxicity assay using dye retention and exclusion in two-parameter flow cytometry. *Fd. Chem. Toxic.* **24**, 467
- Allison A.C., Harrington J.S., Birbeck M.** (1966): An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J. Exp. Med.* **124**, 141-154
- Allison A.C.** (1977): Mechanisms of macrophage damage in relation to the pathogenesis of some lung diseases. in: Respiratory Defense Mechanisms Pt. 2 (Brain J.D., Proctor D.F., Reid L.M. eds.) New York: Dekker, 1075-1102
- Amoruso M.A., Witz G., Goldstein B.D.** (1982): Enhancement of rat and human phagocyte superoxide anion radical production by cadmium in vitro. *Toxicology Letters* **10**, 133-138
- Andersen O.K., Stenvold S.E., Volden G.** (1982): Optimized assay conditions of 3t3 cell lysosomal hydrolases. *European Review for Medical & Pharmacol. Sci.* **IV**, 265-274
- Anderson R.S., Thomson S.M., Gutshall L.L.** (1989): Comparative effects of inhaled silica or synthetic graphite dusts on rat alveolar cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **18**, 844-849
- Aranyi C., Bradof J., Gardner D.E., Huisingh J.L.** (1981): In vitro and in vivo evaluation of potential toxicity of industrial particles. *Environmental Science Research* **22**, 431-443
- Arbeitsgruppen Aufstellung von MAK Werten und Festlegung von Grenzwerten für Stäube der Kommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe** (1988): Quarz-Feinstaub. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe 1.-14. Lieferung 1988. Herausgeber: Henschler D., Weinheim: VCH
- Barkatt A., Hojaji H., Michael K.A.** (1987): Reactions of barium-yttrium-copper oxides with aqueous media and their applications in structural characterization. *Adv. Ceramic Materials* **2(3B)**, 701-709
- Barnes G., Frieden E.** (1983): Oxygen requirement for cupric ion induced hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **115**, 680-684

- Bednorz J.G., Müller K.A.** (1986): Possible high-*tc* superconductivity in the ba-la-cu-o system. *Z. Phys.* **B64**, 189
- Behrendt H., Seemayer N.H., Braumann A., Nissen M.** (1987): Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Wirkung von Quarzstaub DQ12 auf menschliche Monozyten/Makrophagen in vitro. *Silikosebericht NRW* **16**, 213-222
- Benson J.M., Henderson R.F., Pickrell A.** (1988): Comparative in vitro cytotoxicity of nickel oxides and nickel-copper oxides to rat, mouse, and dog pulmonary alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **24**, 373-383
- Berry J.P., Meignan M., Escaig F., Galle P.** (1988): Inhaled soluble aerosols insolubilised by lysosomes of alveolar cells - application to some toxic compounds; electron microprobe and ion microprobe studies. *Toxicology* **52**, 127-139
- Bégin R., Cantin A., Massé S.** (1989): Recent advances in the pathogenesis and clinical assessment of mineral dust pneumoconioses: asbestosis, silicosis and coal pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* **2**, 988-1001
- Bielefeldt-Ohmann H., Babiuk L.A.** (1984): In vitro generation of hydrogen peroxide and superoxide anion by bovine polymorphnuclear granulocytes, blood monocytes, and alveolar macrophages. *Inflammation* **8**, 251-275
- Bielefeldt-Ohmann H., Babiuk L.A.** (1986): Bovine alveolar macrophages: phenotypic and functional properties of subpopulations obtained by percoll density gradient centrifugation. *Journal of Leukocyte Biology* **39**, 167-181
- Bignon J., Le Maho S., Lambre C., Jaurand M.C., Massé R.** (1984): Cellular and biochemical acute alveolar responses to asbestos and quartz dusts in rats. in: Occupational Lung Disease (Bernard J., Gee L., Morgan W.K.C., Brook S.M. eds.) New York: Raven Press, 176-177
- Billah M.M., Lapetina E.G., Cuatrecasas P.** (1980): Phospholipase a2 and phospholipase c activities of platelets. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 10227-10234
- Bises G., Ranaldi G., Scarino M.L., Zucco F.** (1989): Toxicological responses to zinc, copper and cadmium in a rat intestinal cell line. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **17**, 8-15
- Bowden D.H., Hedgecock C., Adamson I.Y.R.** (1989): Silica-induced pulmonary fibrosis involves the reaction of particles with interstitial rather than alveolar macrophages. *Journal of Pathology* **158**, 73-80

- Bradford M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254
- Brain J.D.** (1986): Toxicological aspects of alterations of pulmonary macrophage function. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **26**, 547-565
- Brown G.P., Monick M., Hunninghake W.** (1988): Fibroblast proliferation induced by silica-exposed human alveolar macrophages. *American Review of Respiratory Disease* **138**, 85-89
- Carr I.** (1981): Morphological identification of macrophages. in: *Manual of Macrophage Methodology* (Herscowitz H.B., Holden H.T., Bellanti J.A., Ghaffar A. eds.) New York: Dekker, 187-197
- Chahboun S., Tallineau C., Pontcharraud R., Guettier A., Piriou A.** (1990): Polyunsaturated fatty acid profiles and alpha-tocopherol levels in plasma and whole blood incubated with copper - evidence of inhibition of lipoperoxidation in plasma by hemolysate. *Biochimica et Biophysica Acta* **1042**, 324-329
- Chevion M.** (1988): A site specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Biology & Medicine* **5**, 27-37
- Coin P., Stevens J.B.** (1986): Toxicity of cadmium chloride in vitro: indices of cytotoxicity with the pulmonary alveolar macrophage. *Toxicology and Applied Pharmacology* **82**, 140-150
- Cornell R.** (1969): The use of nucleopore filters in ultrastructural studies of cell cultures. *Experimental Cell Research* **56**, 156-158
- Crang R.F.E., Klomparens K.L.** (1988): *Artifacts in biological electron microscopy.* New York: Plenum Press
- Daems W.T., Brederoo P.** (1973): Electron microscopical studies on the structure, phagocytic properties, and peroxidatic activity of resident and exudate peritoneal macrophages in the guinea pig. *Z. Zellforsch.* **144**, 247-297
- Dehnen W., Fetzner J.** (1967): Zur Wirkung von Quarz auf Lysosomen in vitro. *Naturwissenschaften* **54**, 23
- Davies R., Erdogdu G.** (1989): Secretion of fibronectin by mineral dust derived alveolar macrophages and activated peritoneal macrophages. *Experimental Lung Research* **15**, 285-297
- Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie** (1972): Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.* **10**, 182-192

- Dietrich M.R., Fietz W.H., Ecke J., Runtsch B.** (1987): Herstellung, Charakterisierung und Strahlenresistenz dünner Filme der neuen oxidischen Hochtemperatursupraleiter. *KfK Nachrichten* **19**, 155-159
- DIN Deutsches Institut für Normung e V.** (1988): Natürliche Siliciumdioxide (Quarzmehl) DIN 55 926. in: DIN (DIN Deutsches Institut für Normung e.V.) Berlin: Beuth Verlag
- Dogra S., Kaw J.L.** (1988): Changes in some histochemically demonstrable enzymes in macrophages exposed to quartz dust in vitro. *Journal of Applied Toxicology* **8**, 23-27
- Dubois C., Bissonnette E., Rola-Pleszczynski M.** (1988): Asbestos fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. *American Review of Respiratory Disease* **139**, 1257-1264
- Dyer R.M., Erney S., Spencer P., Benson C.E.** (1989): Oxidative metabolism of the bovine alveolar macrophage. *Am. J. Vet. Res.* **50(4)**, 448-454
- Englen M.D., Taylor S.M., Laegreid W.W., Silflow R.M., Banks K.L., Leid R.W.** (1990): Production of arachidonic acid metabolites by caprine alveolar macrophages. *Inflammation* **14**, 239-245
- Eskelson C.D., Stiffel V., Owen J.A., Chvapil M., Vickers A., Brendel K.** (1988): Changes in the fatty acid profile of lung, liver and serum of rats intratracheally given silica. *Life Sciences* **42**, 1455-1467
- Fisher G.L., McNeill K.L., Democko C.J.** (1983): Application of bovine macrophage bioassays in the analysis of toxic agents in complex environmental mixtures. in: Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III (Waters M.D., Sandhu S.S., Lewtas J., Claxton L., Chernoff N., Nesnow S. eds.) New York: Plenum Press, 257-268
- Fox M.L.** (1973): The bovine alveolar macrophage. i. isolation, in vitro cultivation, ultrastructure, and phagocytosis. *Can. J. Microbiol.* **19**, 1207-1210
- Frase K.G., Liniger E.G., Clarke D.R.** (1987): Environmental and solvent effects on yttrium barium copper cuprate ($YBa_2Cu_3O_x$). *Adv. Ceramic Materials* **2(3B)**, 698-700
- Fuentealba I., Haywood S.** (1988): Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper loaded rat. i. ultrastructural changes in the liver. *Liver* **8**, 372-380

- Gulyas H., Labedzka M., Schmidt N., Gercken G. (1988): Effects of quartz, airborne particulates and fly ash fractions from a waste incinerator on elastase release by activated and nonactivated rabbit alveolar macrophages. *Arch. Env. Hlth.* **43**, 28-33
- Hadley J.G., Conklin A.W., Sanders C.L. (1980): Rapid solubilization and translocation of 109cd0 following pulmonary deposition. *Toxicology and Applied Pharmacology* **54**, 156-160
- Hanks J.H., Wallace J.H. (1958): Determination of cell viability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **98**, 188-192
- Harwood J.L. (1987): Lung Surfactant. *Prog. Lipid Res.* **26**, 211-256
- Helman R.G., Adams L.G., Pierce K.R., Bridges C.H., Bailey E.M. (1985): The role of lysosomes in the pathogenesis of copper-induced hepatotoxicity: morphological studies. *J. Comp. Path.* **95**, 25-35
- Heppleston A.G., Styles J.A. (1967): Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. *Nature* **214**, 521-523
- Hirano S., Kodama N., Shibata K., Suzuki K.T. (1990): Distribution, localization, and pulmonary effects of yttrium chloride following intratracheal instillation into the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **104**, 301-344
- Holleman A.F., Wiberg E. (1971): Lehrbuch der anorganischen Chemie. Berlin: Walter de Gruyter
- Holt S.J., Hicks R.M. (1966): The importance of osmiophilia in the production of stable azoindoxyl complexes of high contrast for combined enzyme cytochemistry and electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **29**, 361-366
- Hoofman R.N., Arkesteyn C.W.M., Roza P. (1988): Cytotoxicity of some types of welding fume particles to bovine alveolar macrophages. *Ann. Occup. Hyg.* **32**, 95-102
- Hornberger W., Patscheke H. (1990): Primary stimuli of icosanoid release inhibit arachidonoyl-coa synthetase and lysophospholipid acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **187**, 175-181
- Hostetler K.Y., Reasor M., Yazaki P.J. (1985): Chloroquine-induced phospholipid fatty liver. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 215-219
- Husain M.H., Dick J.A., Kaplan Y.S. (1980): Rare earth pneumoconiosis. *J. Soc. Occup. Med.* **30**, 15-19
- Jajte J., Lao I., Wisniewska-Knypel J.M. (1987): Enhanced lipid peroxidation and lysosomal enzyme activity in the lungs of rats with prolonged pulmonary deposition of crocidolite asbestos. *British Journal of Industrial Medicine* **44**, 180-186

- Jajte J., Lao I., Wisniewska-Knypel J.M., Wronska-Nover T. (1988): Silica earth provoked lung fibrosis with stimulation of lysosomal enzymes and lipid peroxidation in rats. *British Journal of Industrial Medicine* 45, 239-245
- Johansson A., Camner P., Jarstrand C., Wiernik A. (1983): Rabbit alveolar macrophages after inhalation of soluble cadmium, cobalt, and copper - a comparison with the effects of soluble nickel. *Environmental Research* 31, 340-354
- Johansson A., Curstedt T., Robertson B., Camner P. (1984): Lung morphology and phospholipids after experimental inhalation of soluble cadmium, copper and cobalt. *Environmental Research* 34, 295-309
- Jüngst K.P., Komarek P. (1988): Technische Anwendungen der Supraleitung und ihre Zukunftsaussichten. *KfK Nachrichten* 20(1), 16
- Kane A.B., Stanton R.P., Raymond E.G., Dobson M.E., Knafelc M.E., Farber J.L. (1980): Dissociation of intracellular lysosomal rupture from the cell death caused by silica. *J. Cell. Biol.* 87, 643-651
- Karnovsky M.L., Lazdins J.K. (1978): Biochemical criteria for activated macrophages. *Journal of Immunology* 12, 809-813
- Katsnelson B.A., Privalova L.I. (1984): Recruitment of phagocytizing cells into the respiratory tract as a response to the cytotoxic action of deposited particles. *Environmental Health Perspectives* 55, 313-325
- Kaw J.L., Waseem M. (1988a): Reaction of macrophages activated by agents in vivo to quartz dust in vitro. *Journal of Applied Toxicology* 8(3), 211-216
- Kaw J.L., Khanna A.K., Waseem M. (1988b): In vitro cytotoxic and hemolytic potential of coal fly ash. *J. Environ. Sci. Health* A23(7), 711-723
- Krug H.F., Culig H., Taylor D.M. (1988): Triethyl lead induced rearrangement of fatty acids in the triacylglycerol- and phospholipid fractions of hl-60 cells as measured by hplc. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 330, 436
- Krug H.F. (1990): Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen, Kernforschungszentrum Karlsruhe
- Kumaratilake J.S., Howell J.M. (1989): Intracellular distribution of copper in the liver of copper-loaded sheep - a subcellular fractionation study. *Journal of Comparative Pathology* 101, 161-176

- Labeledzka M., Gulyas H., Schmidt N., Gercken G.** (1989): Toxicity of metallic ions and oxides to rabbit alveolar macrophages. *Environmental Research* **48**, 225-274
- Lagarde M., Sicard B., Guichardant M., Felisi O., Dechavanne M.** (1984): Fatty acid composition in native and cultured human endothelial cells. *In Vitro* **20**, 33-37
- Lind I.** (1989): Untersuchungen zur Superoxidationenproduktion durch Makrophagen: Einfluß von Kulturbedingungen und Stäuben. Karlsruhe: Diplomarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
- Liu H.K., Dou S.X., Bourdillon A.J., Sorrell C.C.** (1989): Comparison of the stability of $Bi_2Sr_2CaCu_2O_{8+y}$ with $YBa_2Cu_3O_{6,5+y}$ in various solutions. in: Advances in Superconductivity (Kitazawa K., Ishiguro T. eds.) Tokyo: Springer Verlag, 635-639
- Lüllmann-Rauch R.** (1975): Chlorphentermine-induced abnormal cytoplasmic inclusions in peripheral blood cells of rats and guinea pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology* **32**, 32-39
- Lock S.O., Jones P.A., Friend J.V., Parish W.E.** (1987): Extracellular release of enzymes from macrophages in vitro for measuring cellular interaction with particulate and non-particulate materials. *Toxic. in Vitro* **1**, 77-83
- London J.E.** (1988): Preliminary toxicological study of yttrium barium copper oxide. *LA-11437-MS UC-408*
- Lundborg M., Lind B., Camner P.** (1984): Ability of rabbit alveolar macrophages to dissolve metals. *Experimental Lung Research* **7**, 11-22
- Lundborg M., Eklund A., Lind B., Camner P.** (1985): Dissolution of metals by human and rabbit alveolar macrophages. *British Journal of Industrial Medicine* **42**, 642-645
- Marafante E., Lundborg M., Vahter M., Camner P.** (1987): Dissolution of two arsenic compounds by rabbit alveolar macrophages in vitro. *Fundamental and Applied Toxicology* **8**, 382-389
- McCombs R.M., Benyesh-Melnick M., Brunschwig J.P.** (1968): The use of millipore filters in ultrastructural studies of cell cultures and viruses. *Journal of Cell Biology* **36**, 231-243
- Menzel D.B., Amdur M.O.** (1986): Toxic responses of the respiratory system. in: Toxicology (Casarett L.J., Doull J. eds.) New York: MacMillan, 330-358
- Miller K.** (1979): Alterations in the surface-related phenomena of alveolar macrophages following inhalation of crocidolite asbestos and quartz dusts: an overview. *Environmental Research* **20**, 162-182

- Müller H.L., Drosselmeyer E., Hotz G., Seidel A., Thiele H., Pickering S., Ray L. (1987): Zum biologischen Verhalten von Uran-Plutonium Mischoxidaersosolen: Inhalationsversuche mit Ratten und in vitro Studien mit Alveolarmakrophagen. Karlsruhe: KfK 4172
- Müller H.L., Guilmette R.A., Muggenburg B.A. (1989): Uptake of inert particles by dog alveolar macrophages in vitro - a comparison of monolayer and suspension techniques. *Journal of Applied Toxicology* 9(3), 135-143
- Müller K.L., Hirschberg M. (1984): Alveolar macrophages after chronic tobacco smoke inhalation and after artificial respiratory therapy for acute pulmonary failure. *Klin. Wochenschr.* 62(Suppl. II), 43-50
- Ménard M., Meyers K.M., Prieur D.J. (1990): Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent. *Thrombosis and Haemostasis* 63, 127-132
- Nadler S., Goldfischer S. (1970): The intracellular release of lysosomal contents in macrophages that have ingested silica. *Journal of Histochem. and Cytochem.* 18, 368-371
- Nakstad B., Lyberg T., Skjörten F., Boye N.P. (1989): Subpopulations of human lung alveolar macrophages: ultrastructural features. *Ultrastructural Pathology* 13, 1-13
- Nation J.L. (1983): A new method using hexamethyldisilizane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol.* 58, 347-351
- Nieder U. (1989): Morphologische und biochemische Studien zur Differenzierung von HL60-Zellen and deren Reaktion auf Quarz. Karlsruhe: Diplomarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
- Nolan R.P., Langer A.M., Harington J.S., Oster G., Selikoff I.J. (1981): Quartz hemolysis as related to its surface functionalities. *Environmental Research* 26, 503-520
- Nolan R.P., Langer A.M., Eskenazi R.A., Herson G.B., Foster K.W. (1987): Membranolytic activities of quartz standards. *Toxic. in Vitro* 1, 239-245
- Nyberg K., Johansson A., Camner P. (1989a): Intraphagosomal pH in alveolar macrophages studied with fluorescein-labeled amorphous silica particles. *Experimental Lung Research* 15, 49-62
- Nyberg K., Johansson U., Rundquist I., Camner P. (1989b): Estimation of ph in individual alveolar macrophage phagolysosomes. *Experimental Lung Research* 15, 499-510

- Oghiso Y. (1987): Morphologic and functional heterogeneity among rat alveolar macrophage fractions isolated by centrifugation on density gradients. *Journal of Leukocyte Biology* **42**, 188-196
- Ohkuma S., Poole B. (1978): Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 3327-3331
- Ohuri N.P., Sciruba F.C., Owens G.R., Hodgson M.J., Yousem S.A. (1989): Giant-cell interstitial pneumonia and hard-metal pneumoconiosis - a clinicopathologic study of 4 cases and review of the literature. *American Journal of Surgical Pathology* **13**, 581-587
- O'Sullivan M.G., Dobrowsky R.T., Fleisher L.N., Olson N.C., Brown T.T. (1988): Arachidonic acid metabolites produced by bovine alveolar macrophages. *Am. J. Vet. Res.* **49**(8), 1214-1217
- Pätzold S. (1989): Morphologische und biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Quarz auf Rinder-Alveolarmakrophagen und deren Organellen. Karlsruhe: Dissertation an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
- Palmer R.J., Butenhoff J.L., Stevens J.B. (1987): Cytotoxicity of the rare earth metals cerium, lanthanum, and neodymium in vitro: comparisons with cadmium in a pulmonary macrophage primary culture system. *Environmental Research* **43**, 142-156
- Parkes R. (1986): Occupational Lung Disorders London: Butterworths
- Pasanen J.T., Gustafsson T.E., Kalliomäki P.L., Tossavainen A., Jarvislo J.O. (1986): Cytotoxic effects of four types of welding fumes on macrophages in vitro: a comparative study. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **18**, 143-152
- Petty H.R., Hermann W., McConnell H.M. (1985): Cytochemical study of macrophage lysosomal inorganic trimetaphosphatase and acid phosphatase. *Journal of Ultrastructure Research* **90**, 80-88
- Pimentel J.C., Marques F. (1969): 'Vineyard sprayers lung': a new occupational disease. *Thorax* **24**, 678-688
- Polzer G. (1990): Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen, Kernforschungszentrum Karlsruhe
- Pool R. (1989): Superconductivity: Is the party over?. *Science* **246**, 914-916
- Radzun H.J. (1985): Immunohistochemie des menschlichen mononukleär-phagozytischen Systems. Stuttgart: Fischer

- Reasor M.J.** (1989): A review of the biology and toxicologic implications of the induction of lysosomal lamellar bodies by drugs. *Toxicology and Applied Pharmacology* **97** (1), 47-56
- Reeves A.L.** (1986): Barium. in: Handbook on the Toxicology of Metals, 2nd edition (Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V. eds.) Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 84-94
- Rhoads K., Sanders C.L.** (1985): Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung. *Environmental Research* **36**, 359-378
- Robinson J.M., Karnovsky M.J.** (1983): Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. *Journal of Histochem. and Cytochem.* **31**, 1197-1208
- Roth H.J., Blaschke G.** (1978): Pharmazeutische Analytik. Stuttgart: Thieme
- Sachs L.** (1984): Angewandte Statistik 6. Aufl. Berlin: Springer Verlag
- Santos A.B.S., De Souza W.** (1983): Surface charge and ultrastructure of the cell surface of resident and thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages. *J. Submicrosc. Cytol.* **15** (4), 897-911
- Schimmelpfeng J.** (1989a): Zytotoxische Wirkungen von Quarz und Asbest: Ein in vitro Interspeziesvergleich mit Alveolarmakrophagen. Karlsruhe: Dissertation an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
- Schimmelpfeng J., Drosselmeyer E., Hammer G., Polzer G., Seidel A.** (1989b): Effects of native and phospholipid treated quartz on bovine and rat alveolar macrophages. *Journal of Aerosol Medicine* **2** (1), 39
- Schmidt A.** (1990): Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen, Kernforschungszentrum Karlsruhe
- Seidel A., Drosselmeyer E., Hofheinz V., Kreyling W.G., Krombach F., Pätzold S., Polzer G., Schimmelpfeng J., Würtemberger G.** (1989): Interaction of quartz with bovine alveolar macrophages: studies on cytotoxicity, electrophoretic mobility and subcellular components. in: NATO ASI Series Vol.H30 (Mossman B.T., Bégin R.O. eds.) Heidelberg: Springer Verlag, 281-288
- Seidel A., Hammer G., Polzer G.** (1990a): Separation by carrier-free electrophoresis of subpopulations of bovine alveolar macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **24**, 285-291

- Seidel A., Wilczek W., Drosselmeyer E., Lind I., Polzer G.** (1990b): Alveolarmakrophagen und Stäube. *KfK Nachrichten* 22, 25-32
- Silverstein S.C., Steinman R.M., Cohn Z.A.** (1977): Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 669-722
- Takemura T., Rom W.N., Ferrans V.J., Crystal R.G.** (1989): Morphologic characterization of alveolar macrophages from subjects with occupational exposure to inorganic particles. *American Review of Respiratory Disease* 140, 1674-1685
- Tornling G., Eklung A., Engström-Laurent A., Hallgren R., Unge G., Westman B.** (1987): Hyaluronic acid in bronchoalveolar lavage in rats exposed to quartz. *British Journal of Industrial Medicine* 44, 443-445
- Unkelbach D., Wolf T.** (1985): Qualitative Dosis-Wirkungs-Analysen. Stuttgart: Gustav Fischer
- Vanni A., Amico P.** (1979): The hydrogen ion glass electrode as a sensor for enzyme assays of metal traces. *Ann. Chim.* 68, 165-174
- Wallace W.E., Vallyathan V., Keane M.J., Robinson V.** (1985): In vitro biologic toxicity of native and surface-modified silicia and kaolin. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 16, 415-424
- Wei C., Misra H.P.** (1982): Cytotoxicity of ammonium metavanadate to cultured bovine alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 9, 995-1006
- White L.R., Marthinsen A.B.L., Jakobsen K., Eik-Nes K.B.** (1983): Response of bovine alveolar macrophages in vitro to welding fume particles. *Environmental Health Perspectives* 51, 211-215
- Wiener-Schmuck M.** (1988): Untersuchungen zur Hepatotoxizität von Cer: In vivo - Versuche an Ratten und in vitro-Studien mit Hepatocyten und Makrophagen. Karlsruhe: Dissertation an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
- Wiessner J.H., Mandel N.S., Sohnle P.G., Mandel G.S.** (1989): Effect of particle size on quartz-induced hemolysis and on lung inflammation and fibrosis. *Experimental Lung Research* 15, 801-812
- Wohlberedt F.** (1983): Die Silikose im Bergbau der Bundesrepublik Deutschland. *Kompaß*, 377-393
- Wolsky A.M., Giese R.F., Daniels E.J.** (April 1989): Die neuen Supraleiter: Perspektiven für Anwendungen. *Spektrum der Wissenschaft*, 50

Yui S., Yamazaki M. (1990): Comparative studies on lipid and colony-stimulating factor-induced macrophage growth. *Journal of Immunology* **144**, 1461-1465

7. ABBILDUNGEN

Bezeichnung	Beschreibung	CMAD ¹ μm
Q	Quarz Sikron F 600	11,4 ²
Qf	Quarz Sikron F 600 feine Subfraktion von Q	1,03
{123}	HTS YBa ₂ Cu ₃ O _{7-x} (x ≤ 0,1)	8,34
{123} [*]	HTS YBa ₂ Cu ₃ O _{7-x} (x ≤ 0,1) (feiner)	5,9
LaBaCuO	HTS LaBaCuO _{3,5}	11,5
{111}	HTS YBaCuO _{3,5}	12,3
CuO	Kupferoxid	7,43

Abb. 1: Übersicht über die verwendeten Stäube.

¹Ermittelt durch Herren Bürkin, KfK, IMF-I mit dem Granulometer HR 850.

²Messung mittels APS Teilchengröße Analyser am Eur. Inst. für Transurane durch Frau Dr. Drosselmeyer.

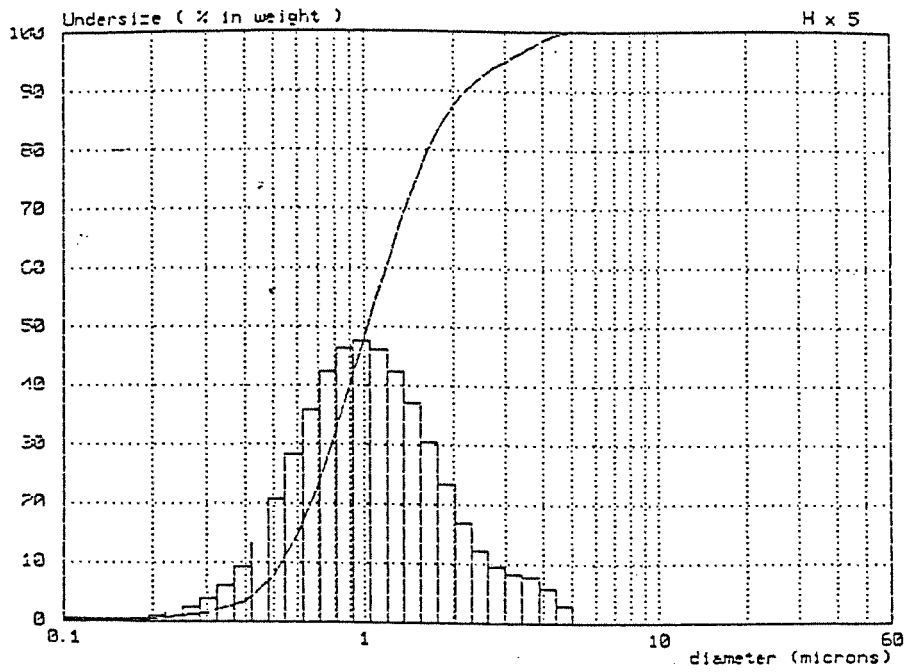


Abb. 2: Korngrößenverteilung der verwendeten feinen Subfraktion des Quarzes (Qf).

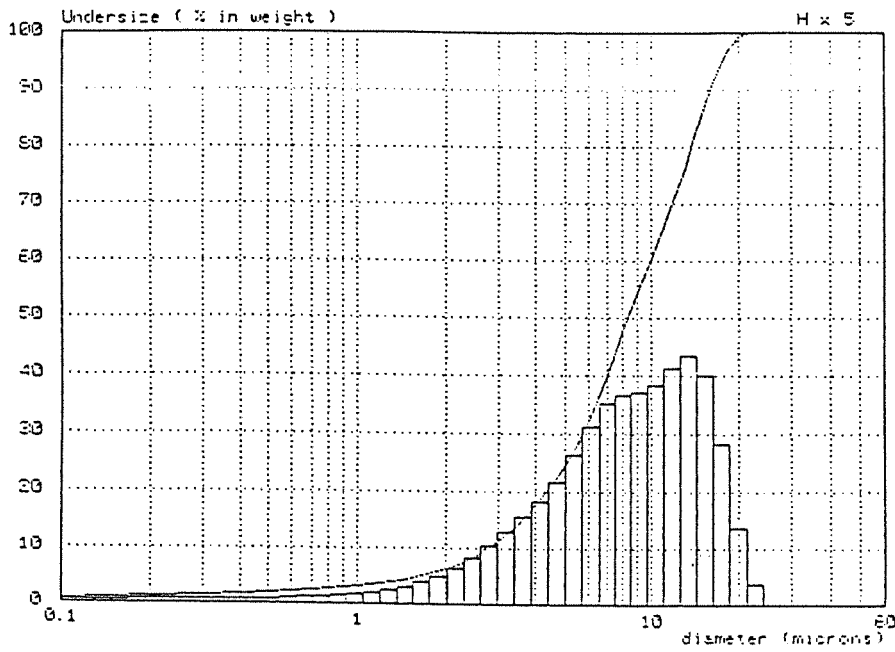


Abb. 3: Korngrößenverteilung von {123}.

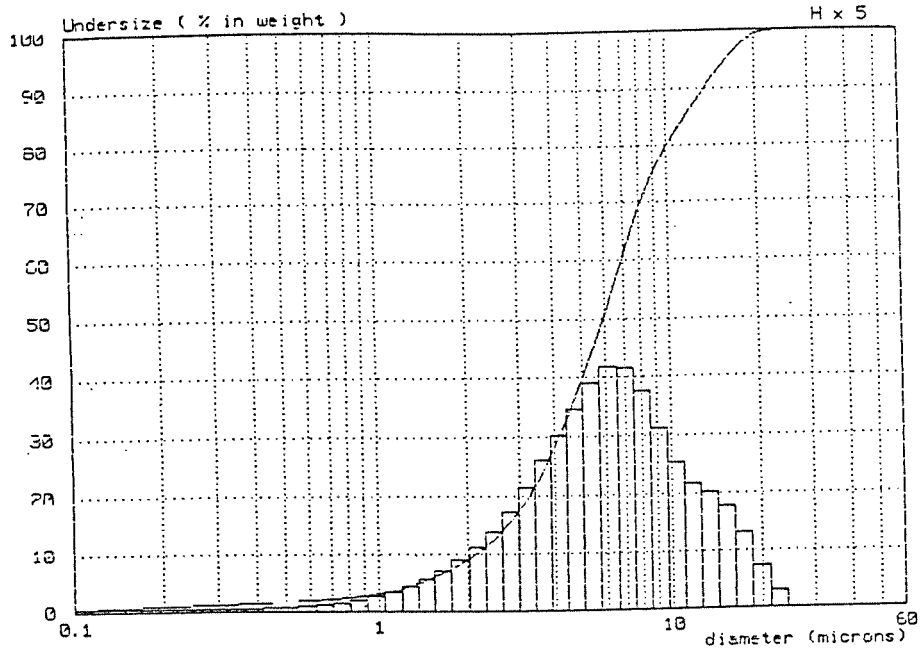


Abb. 4: Korngrößenverteilung {123}*

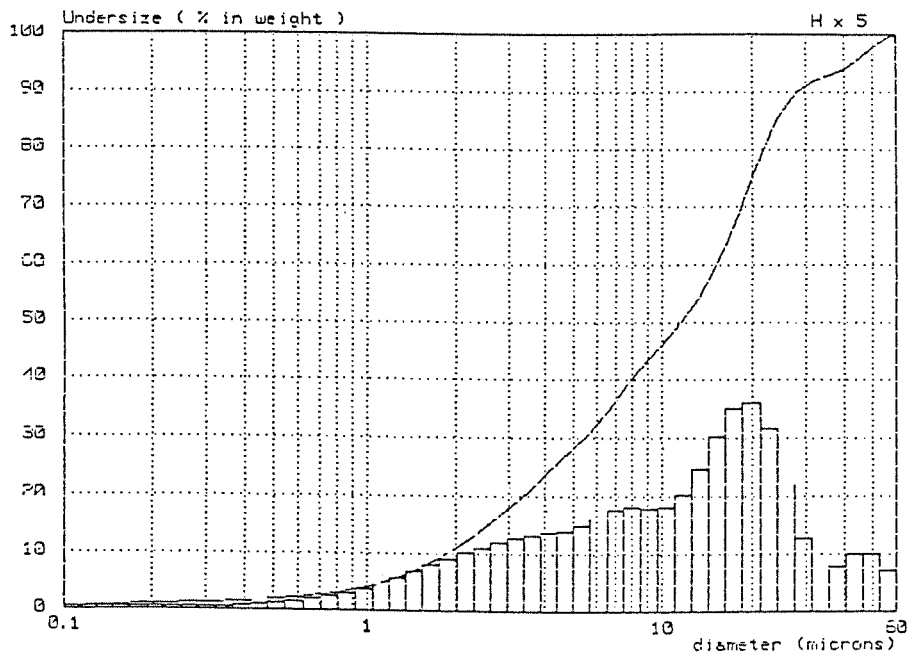


Abb. 5: Korngrößenverteilung von LaBaCuO.

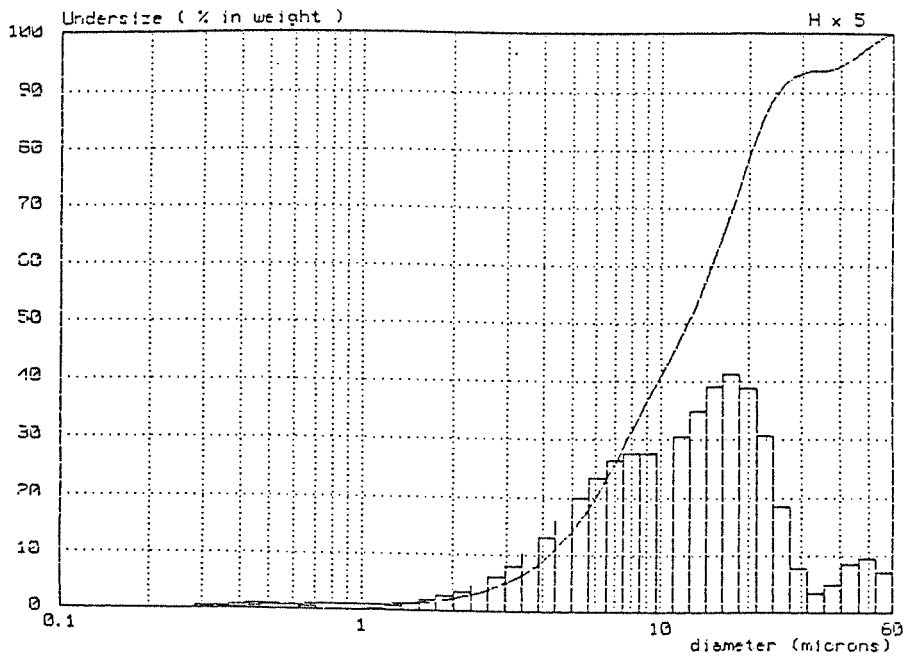


Abb. 6: Korngrößenverteilung {111}.

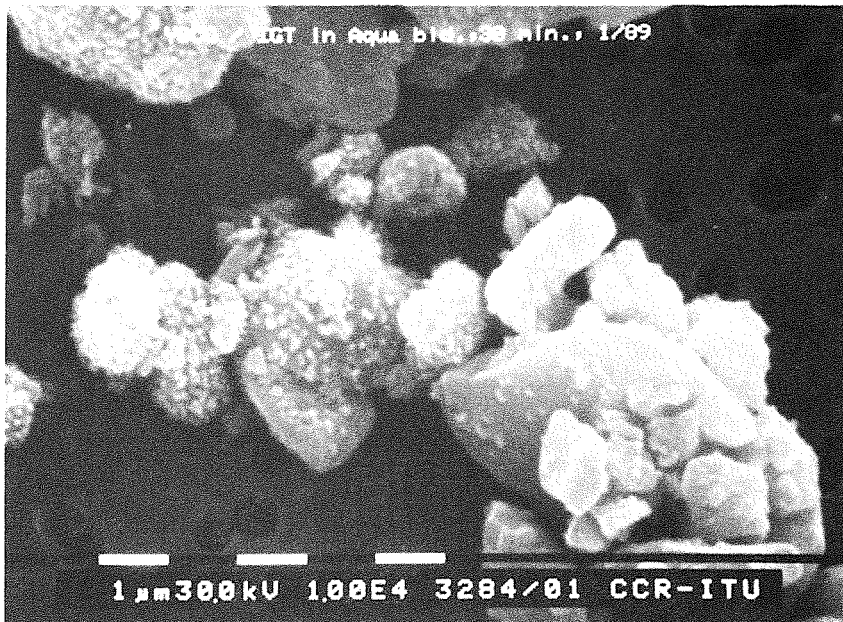


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von {123} nach 30 Minuten in Aqua bidest. Auch Teilchen kleiner als $1 \mu\text{m}$ wurden nicht aufgelöst, zeigen jedoch Ausblühungen.



Abb. 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von $\{123\}^*$.

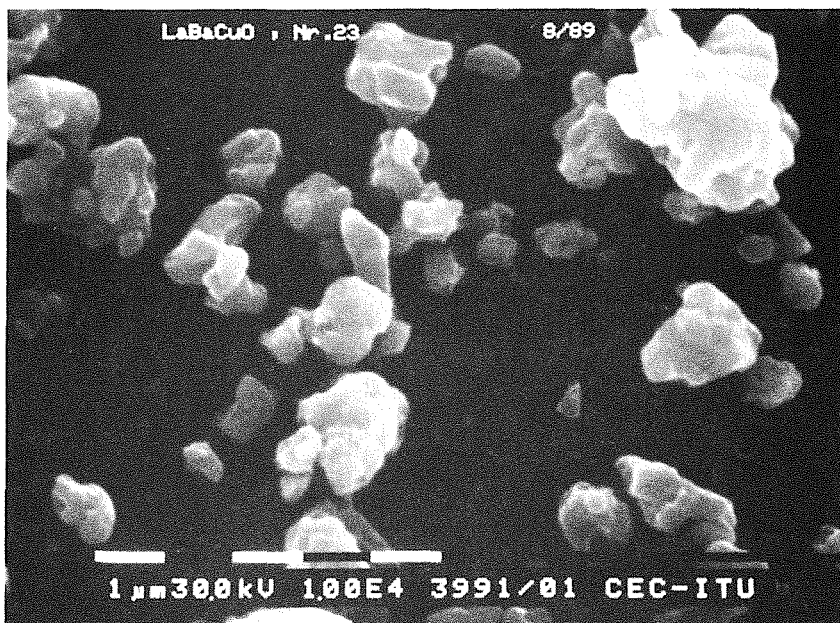


Abb. 9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von LaBaCuO.

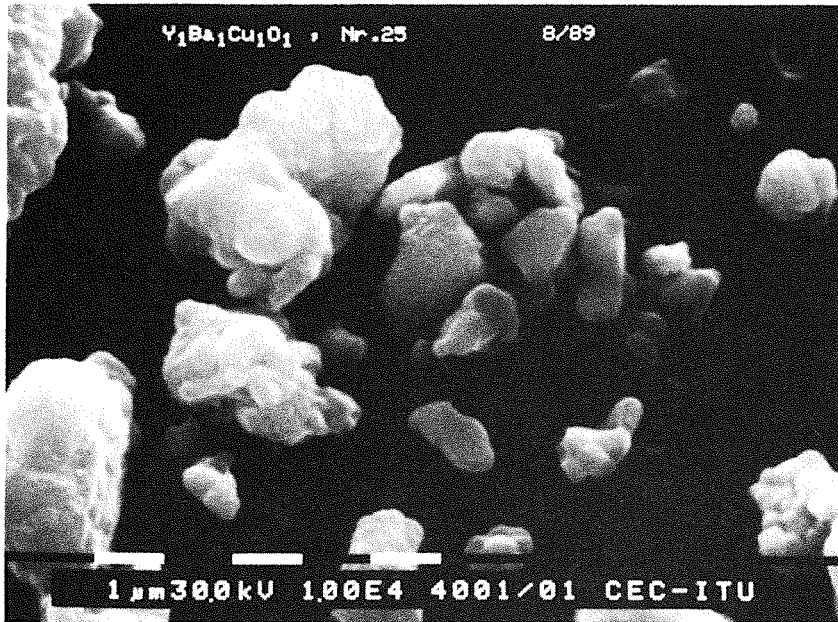


Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von {111}.

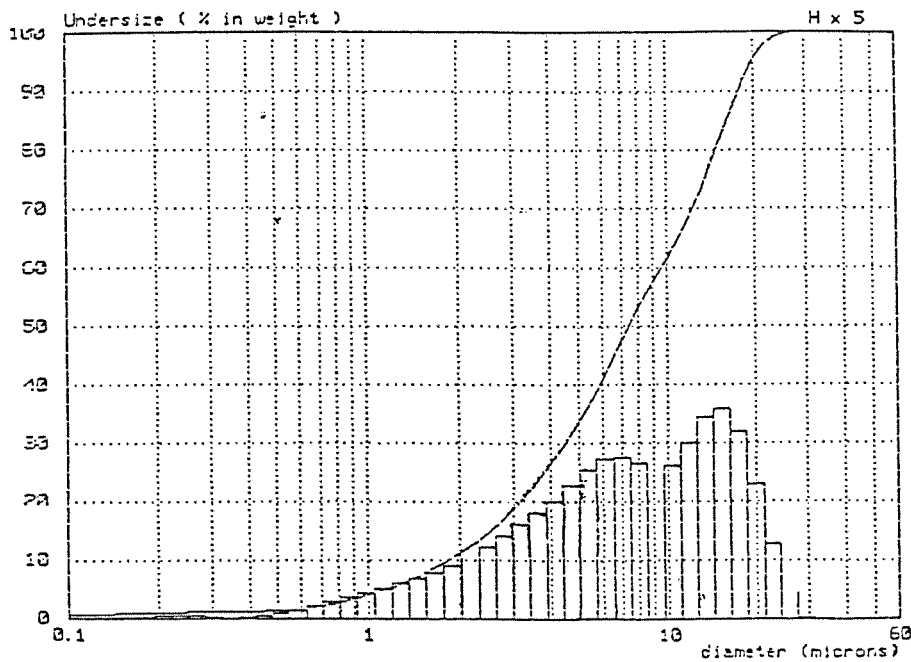


Abb. 11: Korngrößenverteilung des Kupferoxides.

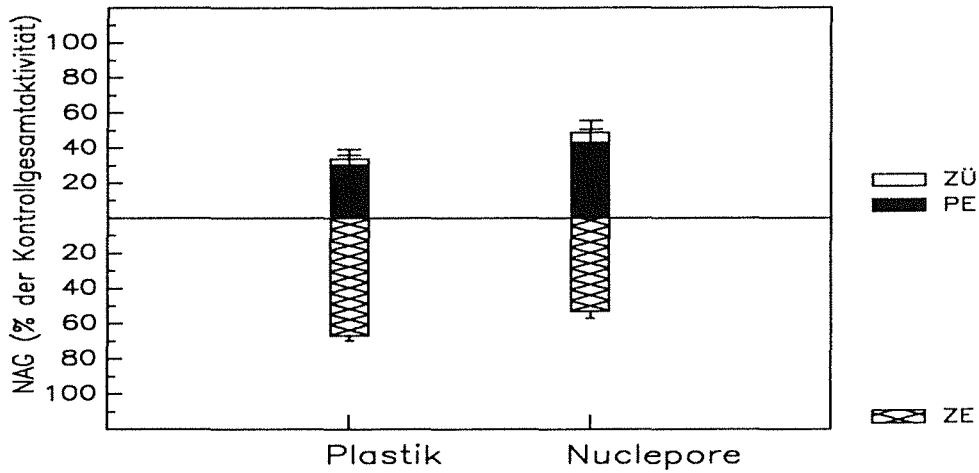


Abb. 12: Einfluß des Kultursubstrates auf die Verteilung von NAG aus Rinder-Alveolarmakrophagen in adhärenen Zellen (ZE), zellfreien Kulturüberstand (ZÜ) und Pellet (PE) (Pellet: Durch Zentrifugation (10 Minuten; 4° C; 250 g) abzentrifugierbare Zellen und Zelltrümmer aus dem Überstand). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3).

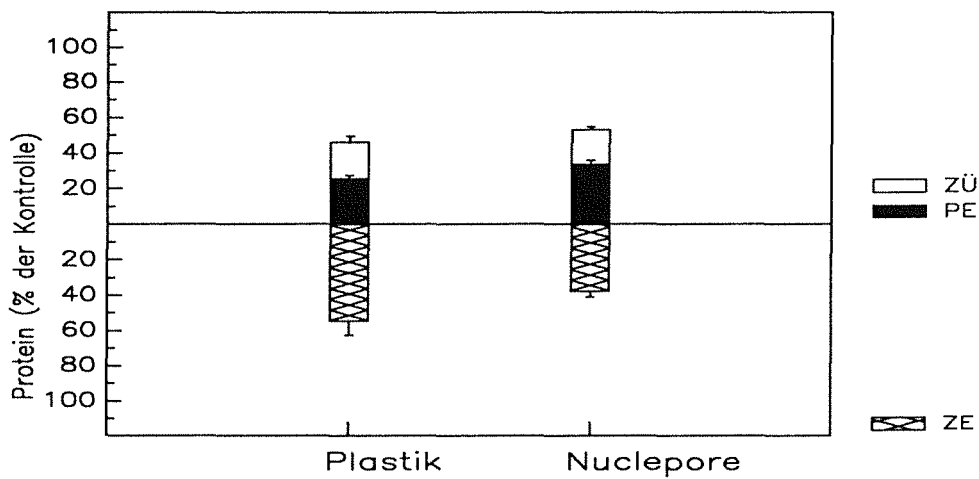


Abb. 13: Einfluß des Kultursubstrates auf die Verteilung des zellulären Proteins aus Rinder-Alveolarmakrophagen in die Fraktionen ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3).

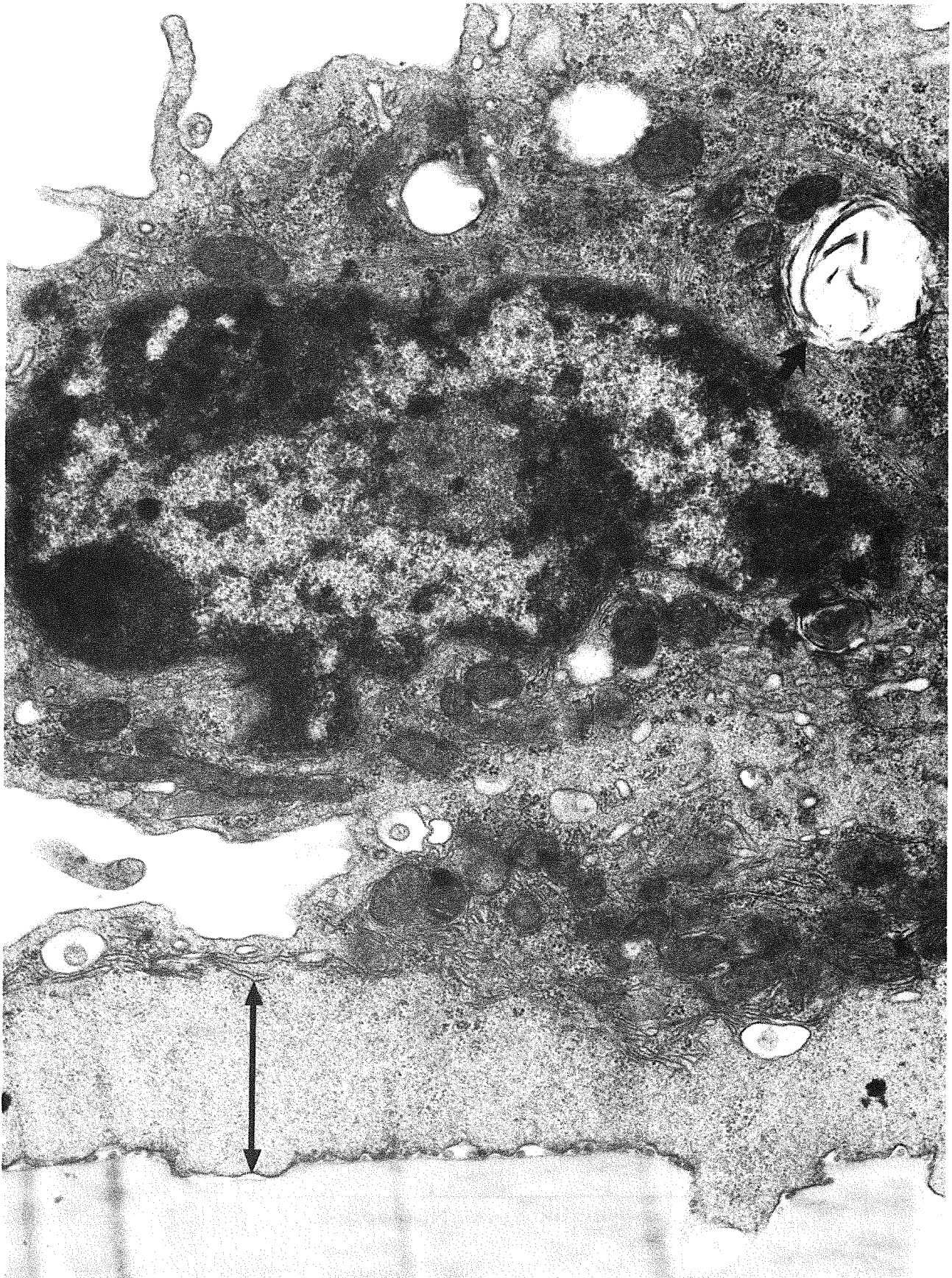


Abb. 14: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Nuclepore-Membran. Doppelpfeil: organellarme Zone. Pfeil: lamellare Vakuole. Vergrößerung: x 43200.

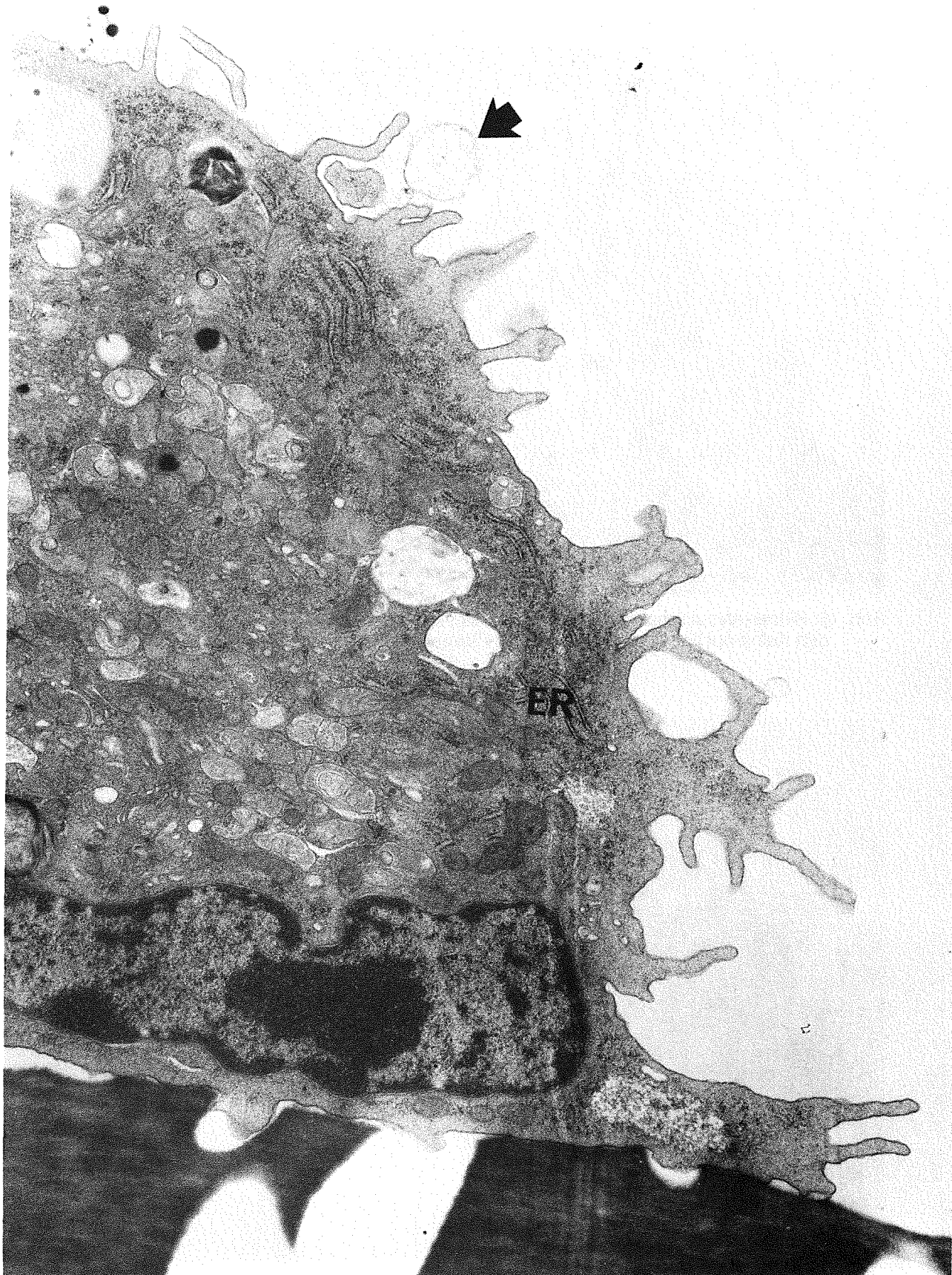


Abb. 15: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Nuclepore-Membran. ER: Endoplasmatisches Retikulum. Pfeil: Zytoplasmatische Ausstülpungen ("Blebs"). Vergrößerung: x 15300.

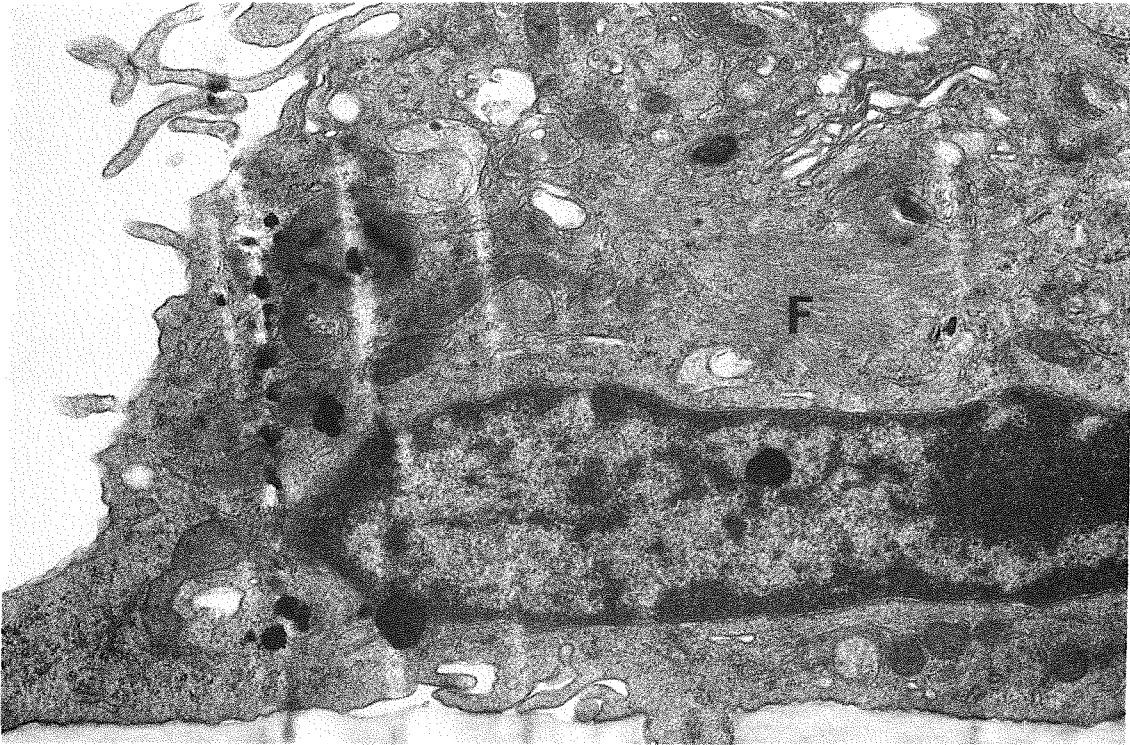


Abb. 16: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Nuclepore-Membran. F: Filamente in Kernnähe. Vergrößerung: x 17400.

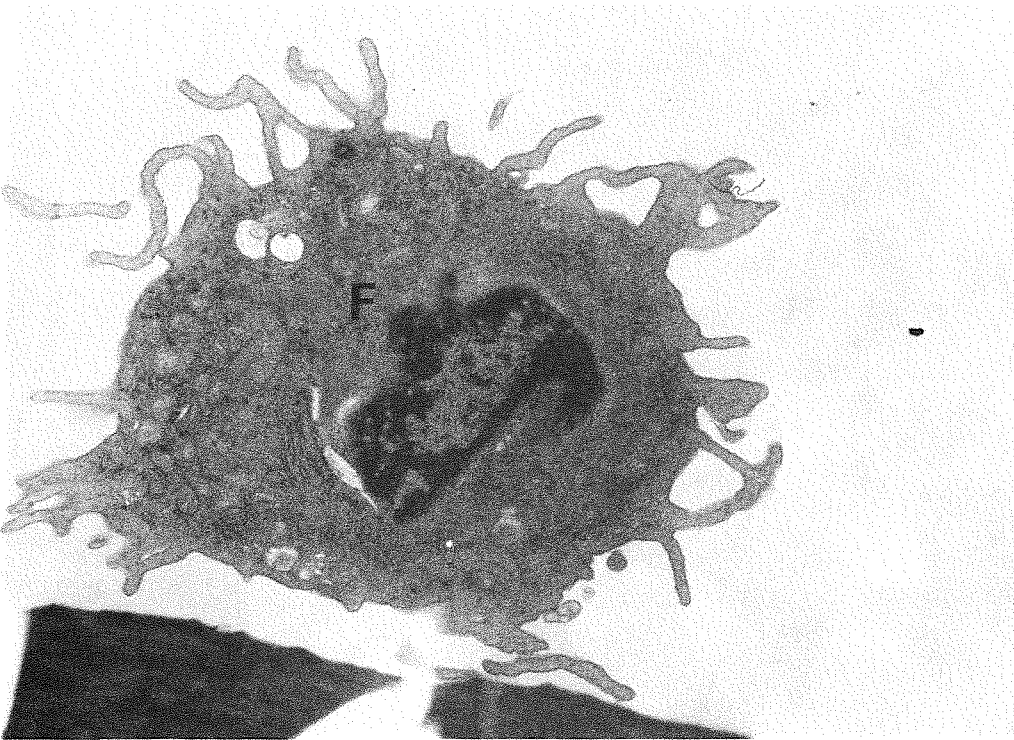


Abb. 17: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Nuclepore-Membran. F: Filamente in Kernnähe. Vergrößerung: x 9000.

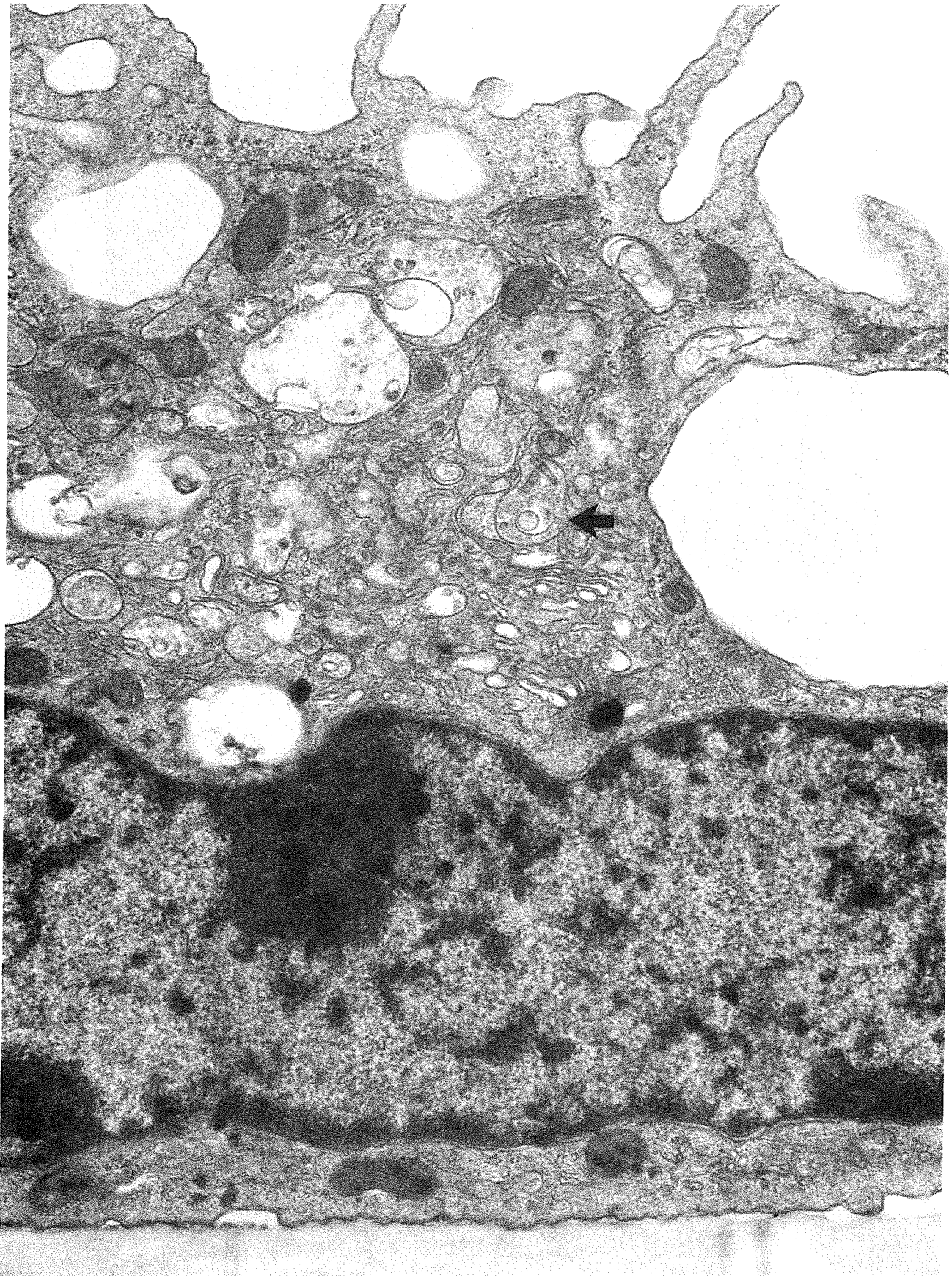


Abb. 18: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Nuclepore-Membran. Pfeil: multivesikuläres Körperchen. Vergrößerung: x 23800.

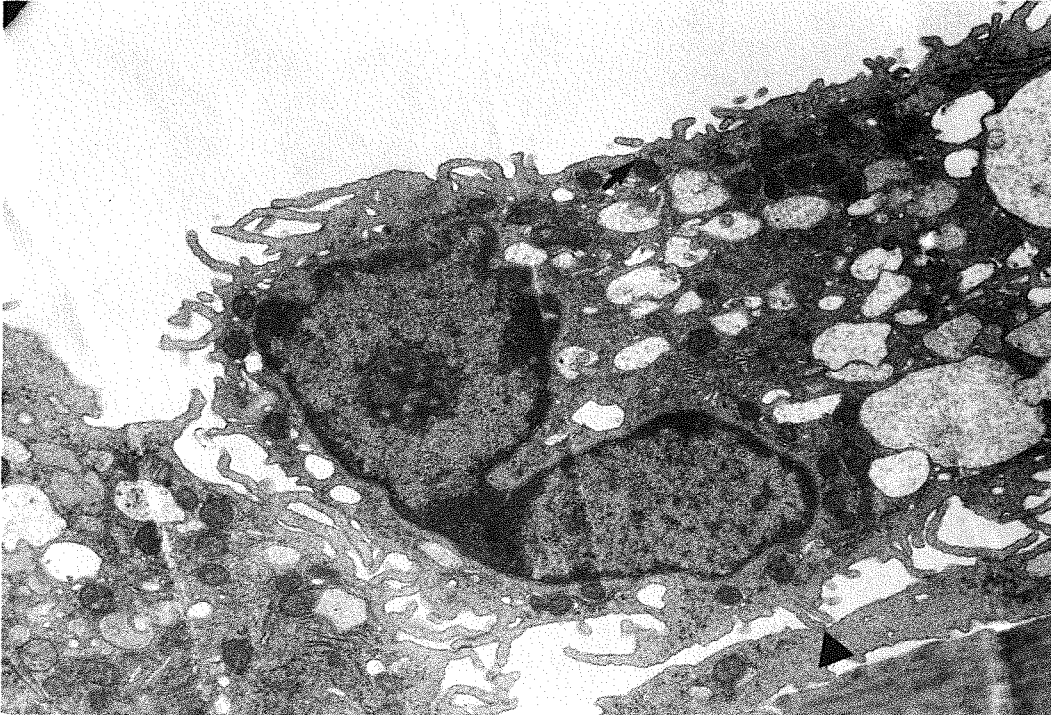


Abb. 19: Rinder-Alveolarmakrophagen, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Nuclepore-Membran. Pfeil: mikropinozytoseähnliches Vesikel. Pfeilspitze: Zell-Zell Kontakt. Vergrößerung: x 9000.

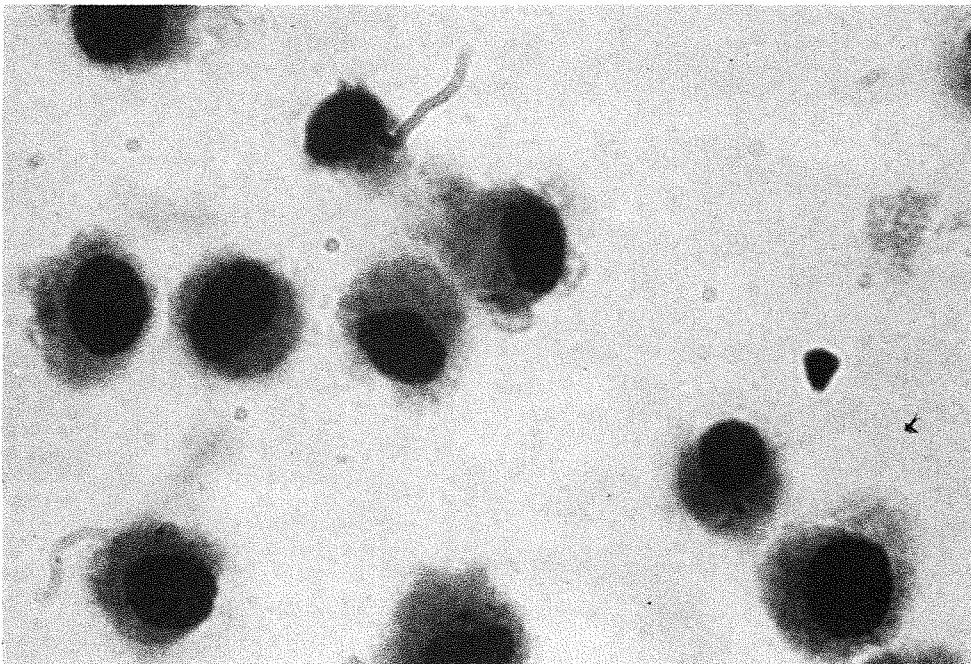


Abb. 20: Rinder-Alveolarmakrophagen, lichtmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

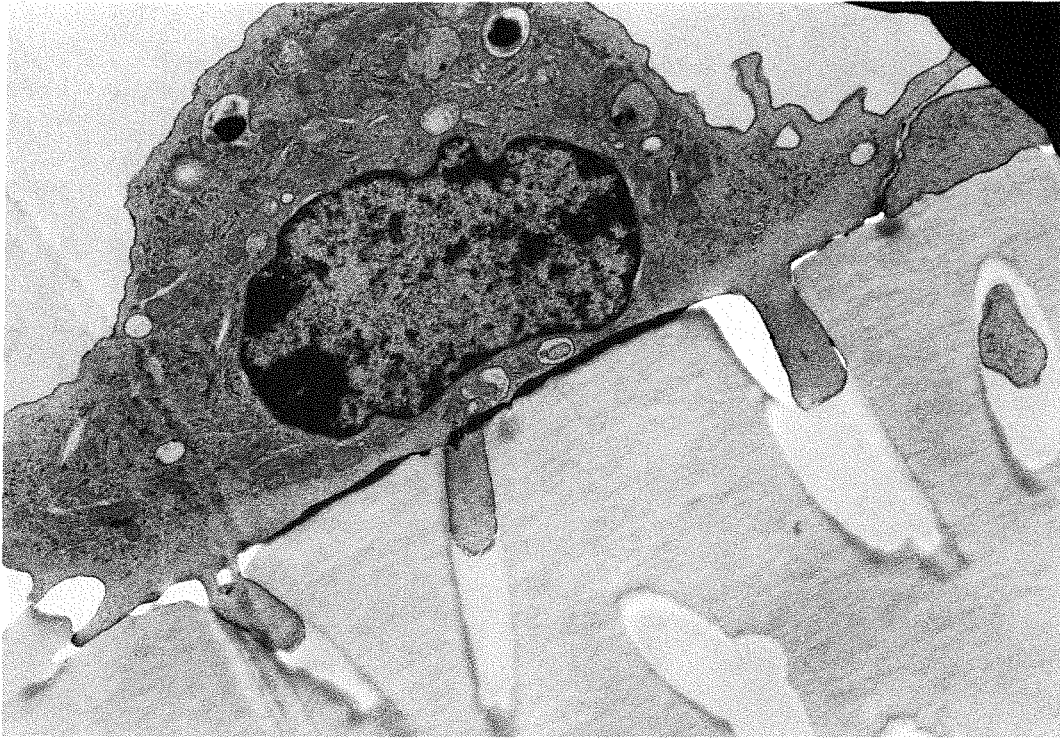


Abb. 21: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Nuclepore-Membran in Anwesenheit von $50 \mu\text{g/ml}$ DPL-Suspension. Vergrößerung: x 9100.

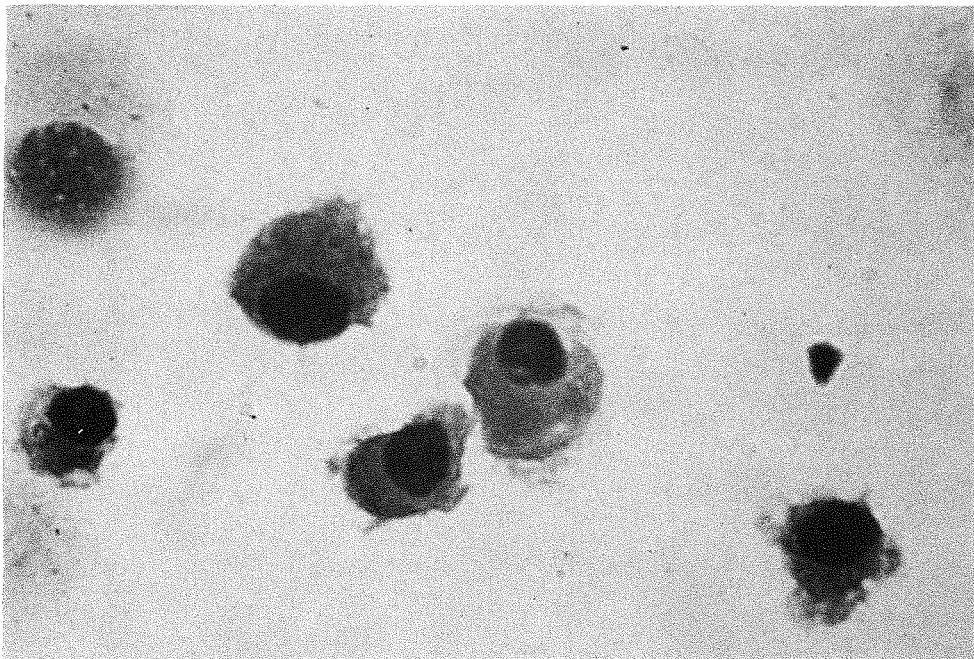


Abb. 22: Rinder-Alveolarmakrophagen, lichtmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur auf Deckglas in Anwesenheit von $50 \mu\text{g/ml}$ DPL-Suspension. Vergrößerung: x 1400.

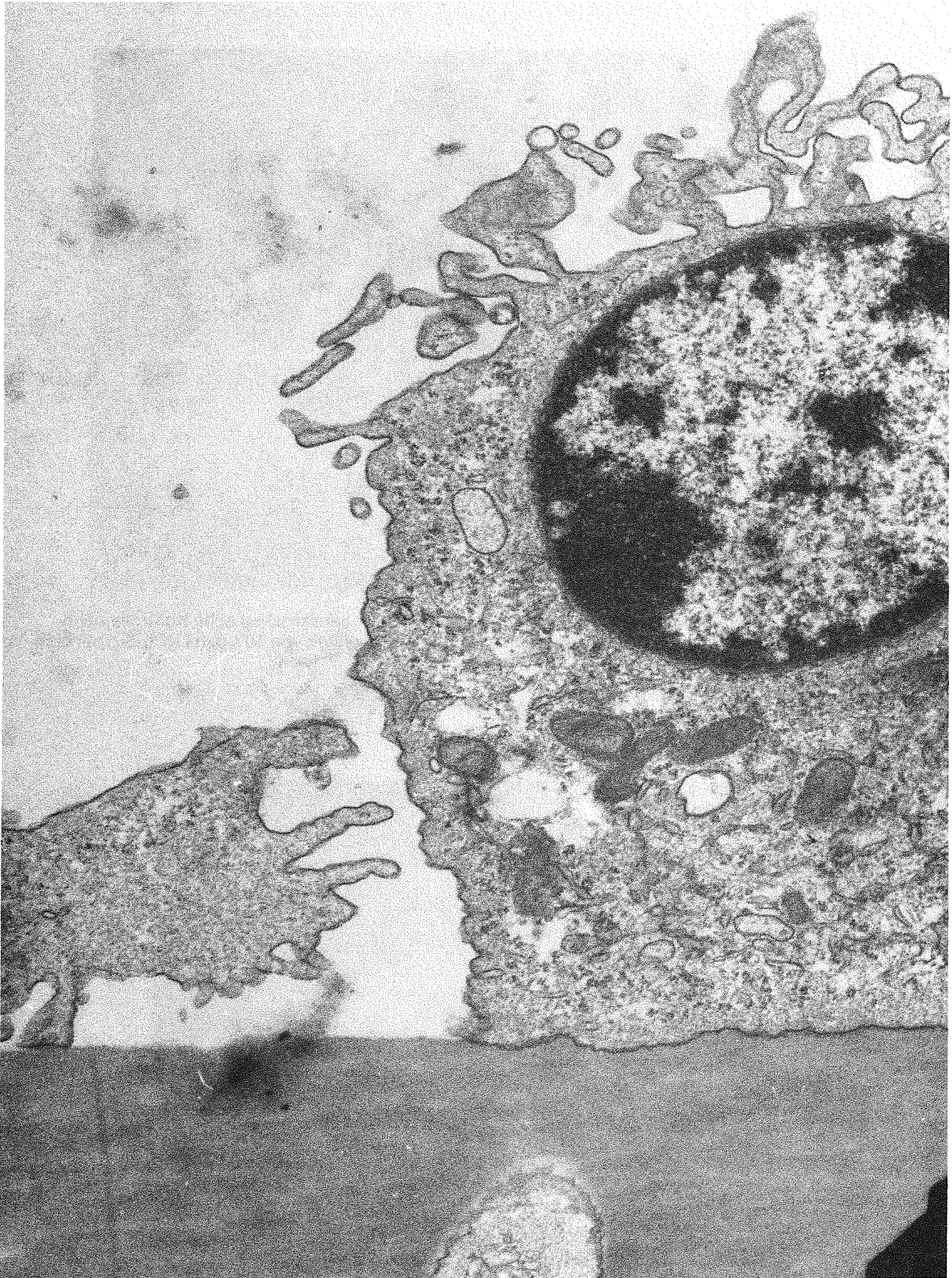


Abb. 23: Rinder-Alveolarmakrophagen, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle unmittelbar nach der alveolären Lavage auf Nuclepore-Membran fixiert. Vergrößerung: x 27200.

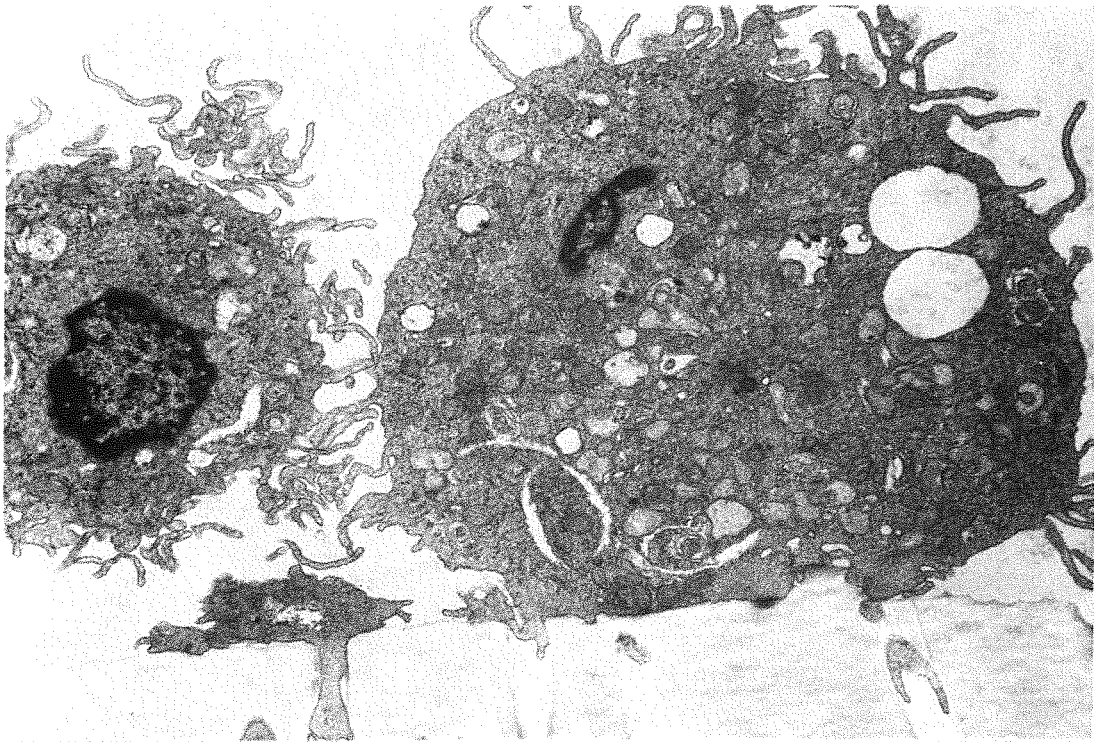


Abb. 24: Rinder-Alveolarmakrophagen, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle 10 Minuten nach Kulturbeginn auf Nuclepore-Membran fixiert. Vergrößerung: x 6900.

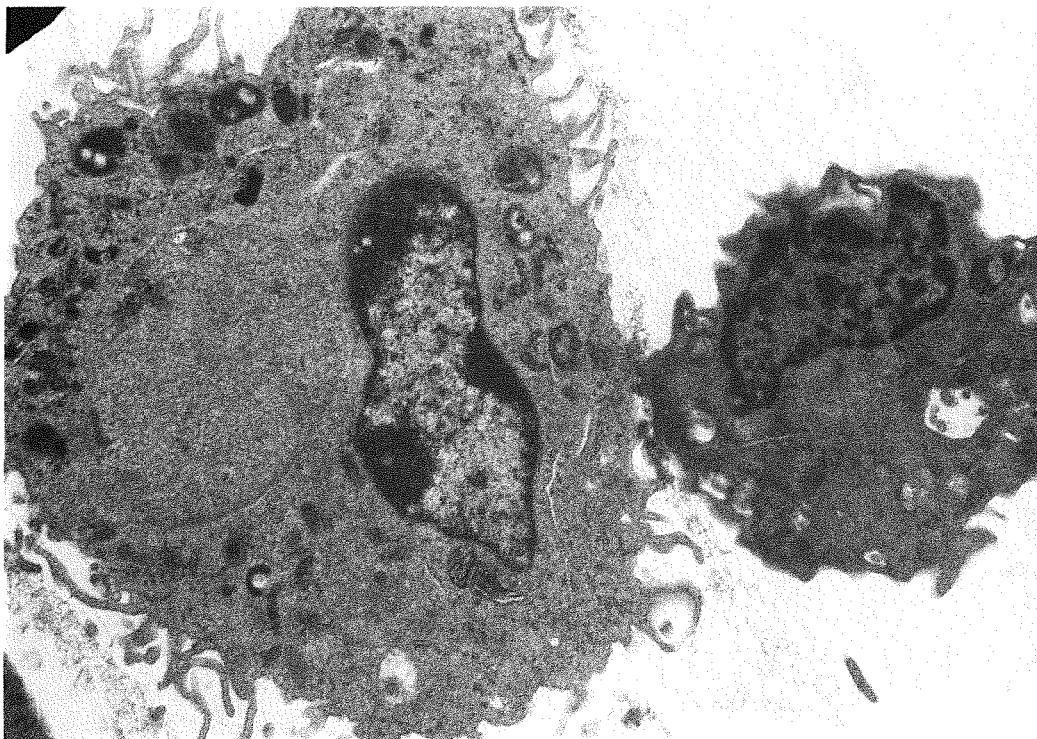


Abb. 25: Rinder-Alveolarmakrophagen, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur in Suspension. Vergrößerung: x 9100.

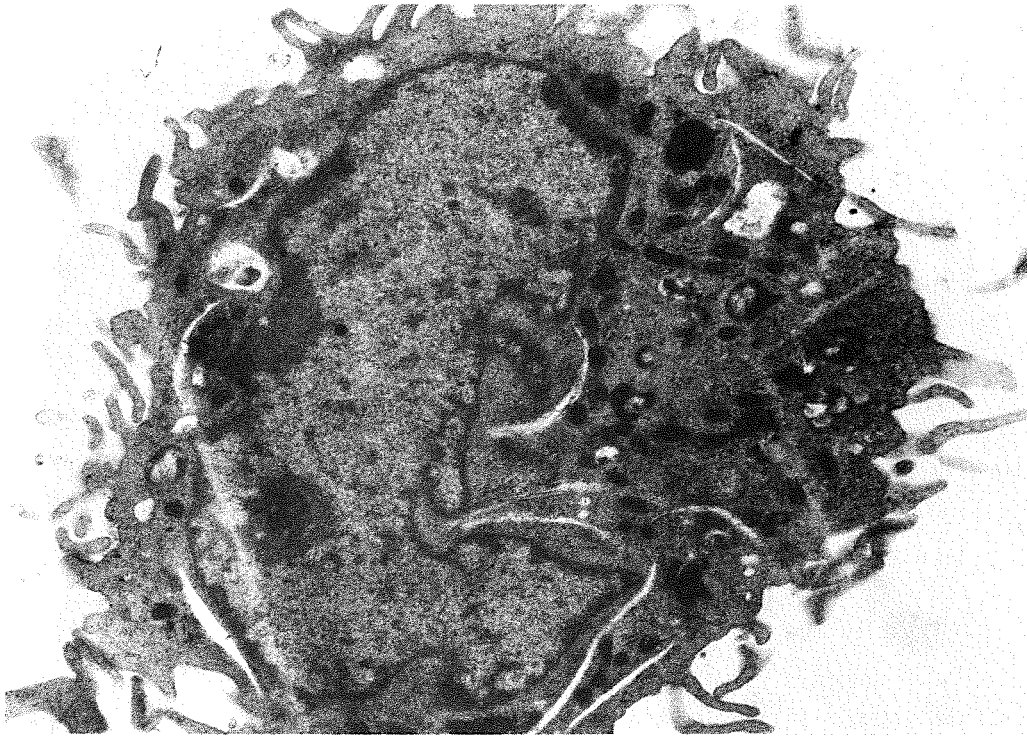


Abb. 26: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle, Einbettung unmittelbar nach der alveolären Lavage aus der Zellsuspension. Vergrößerung: x 9300.

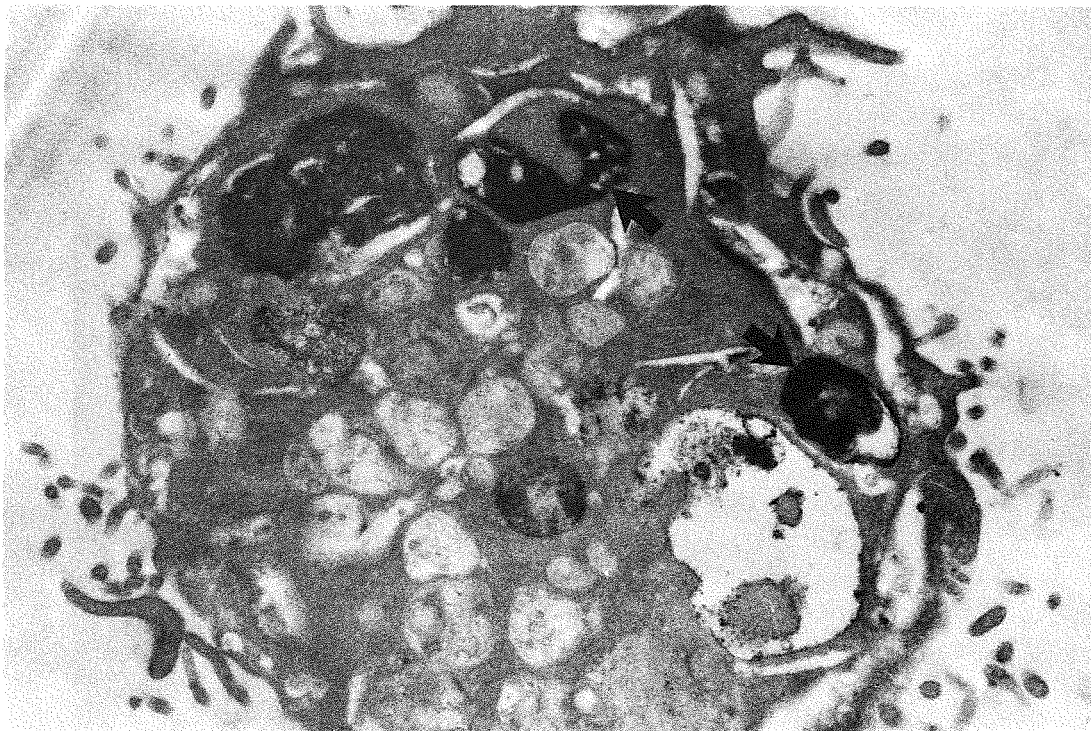


Abb. 27: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle nach 20 Stunden Kultur in Suspension mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase. Pfeile: SP-Aktivität. Vergrößerung: x 14600.

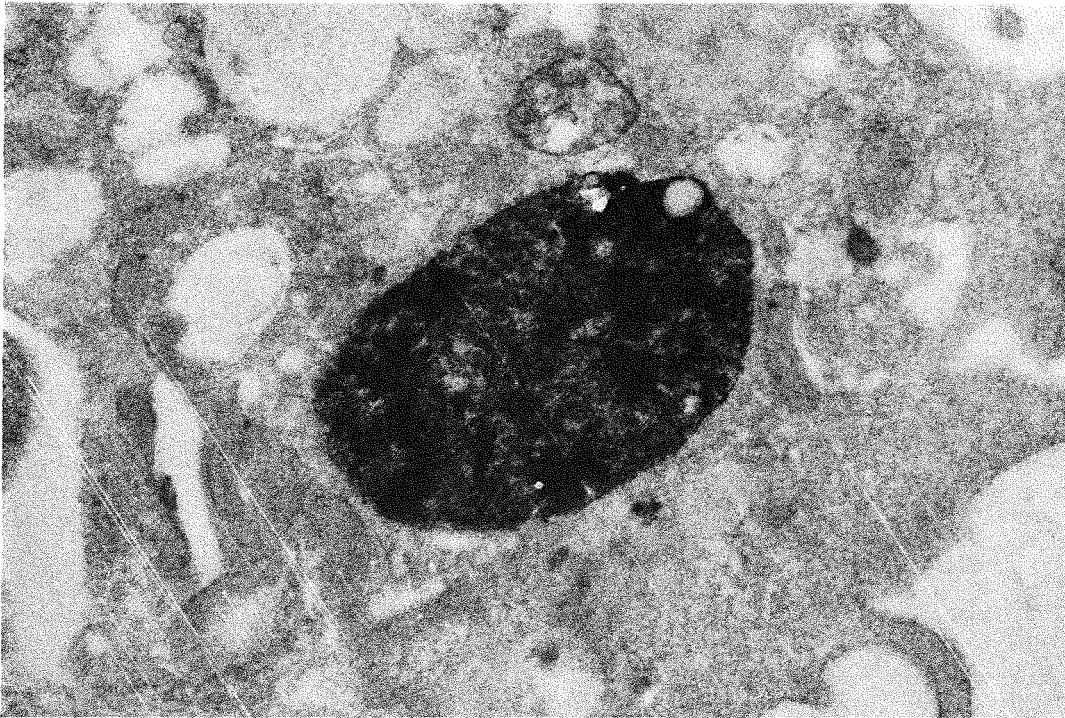


Abb. 28: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Lysosoms aus einem Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Kultur in Suspension mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase. Vergrößerung: x 31800.

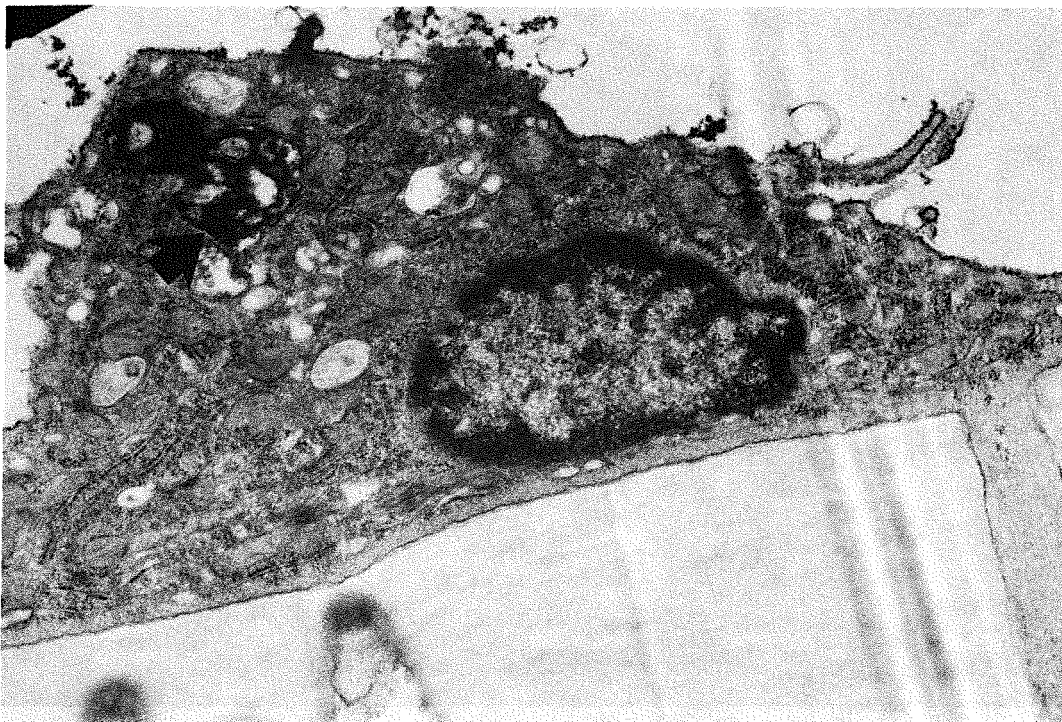


Abb. 29: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase auf Nuclepore-Membran. Pfeil: SP-Aktivität. Vergrößerung: x 15600.

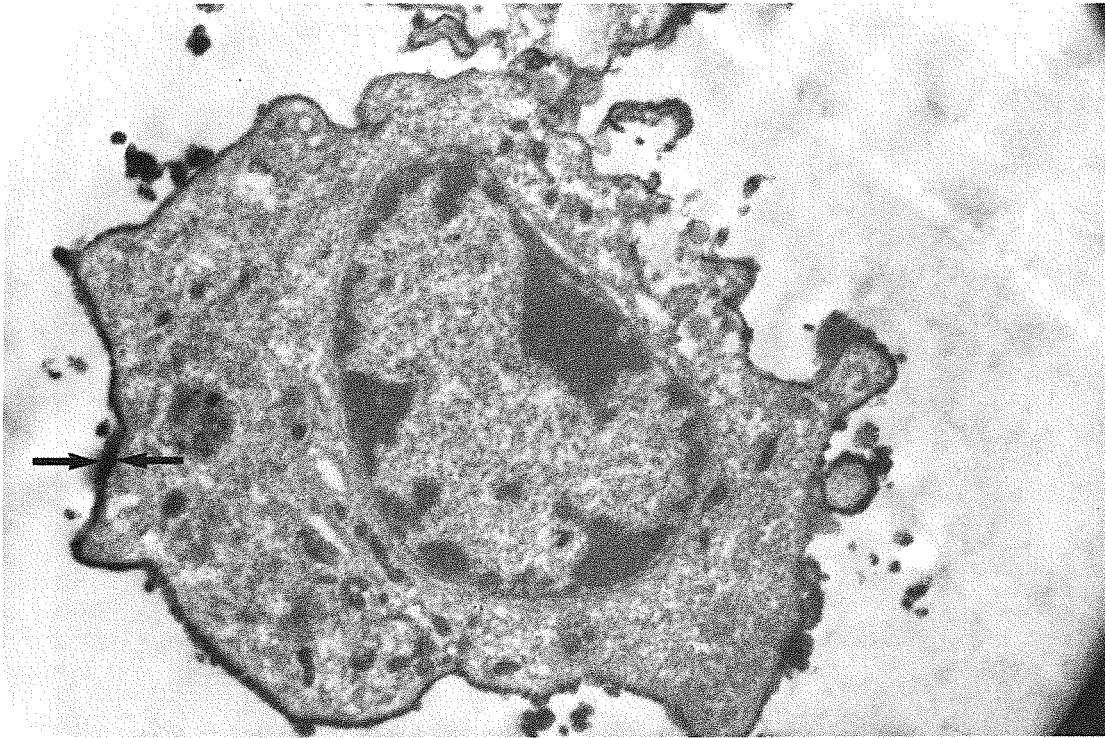


Abb. 30: Rinder-Alveolarmakrophage, transmissionselektronenmikroskopische Kontrolle mit zytochemischem Nachweis der Sauren Esterase nach 20 Stunden Kultur in Suspension. Pfeil: SE-Aktivität. Vergrößerung: x 9000.

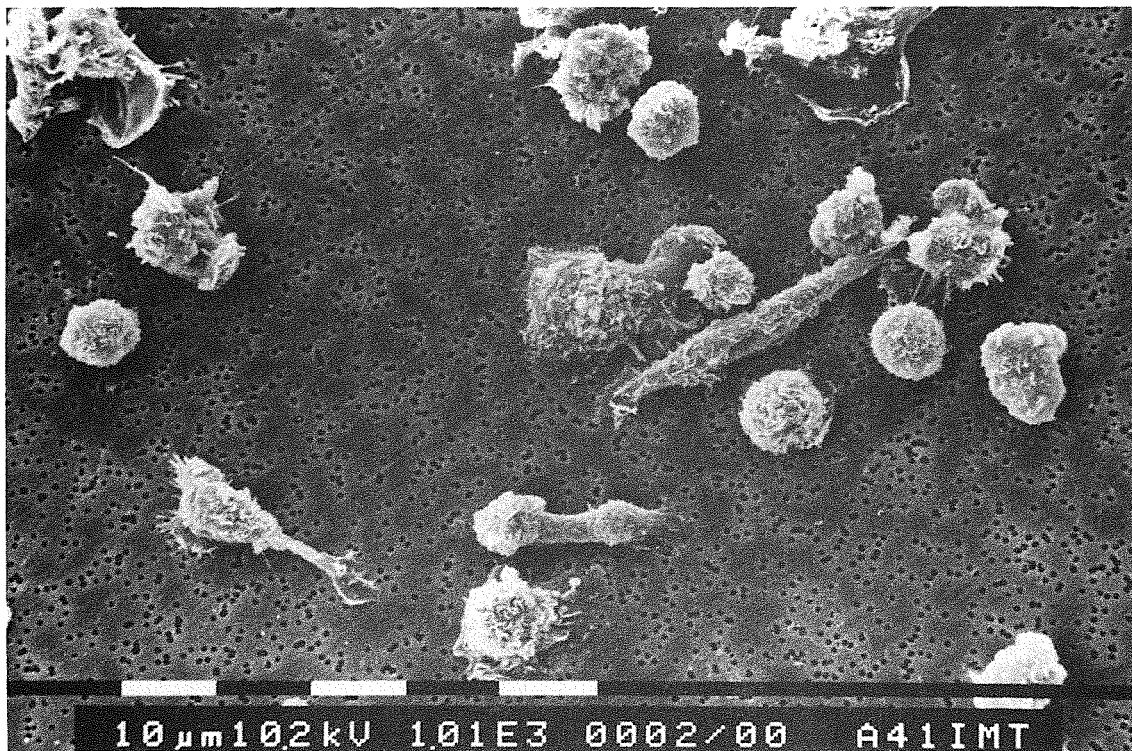


Abb. 31: Rinder-Alveolarmakrophagen, rasterelektronenmikroskopische Kontrolle auf Nuclepore-Membran nach 20 Stunden Kultur.

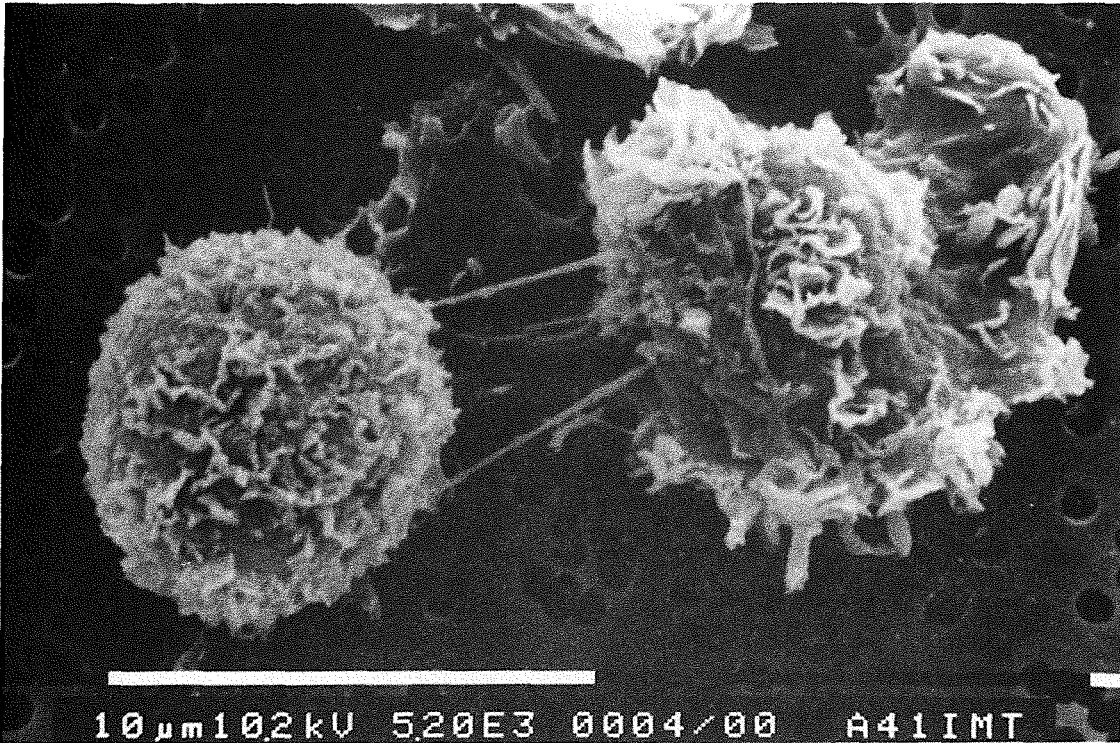


Abb. 32: Rinder-Alveolarmakrophagen, rasterelektronenmikroskopische Kontrolle auf Nuclepore-Membran nach 20 Stunden Kultur.

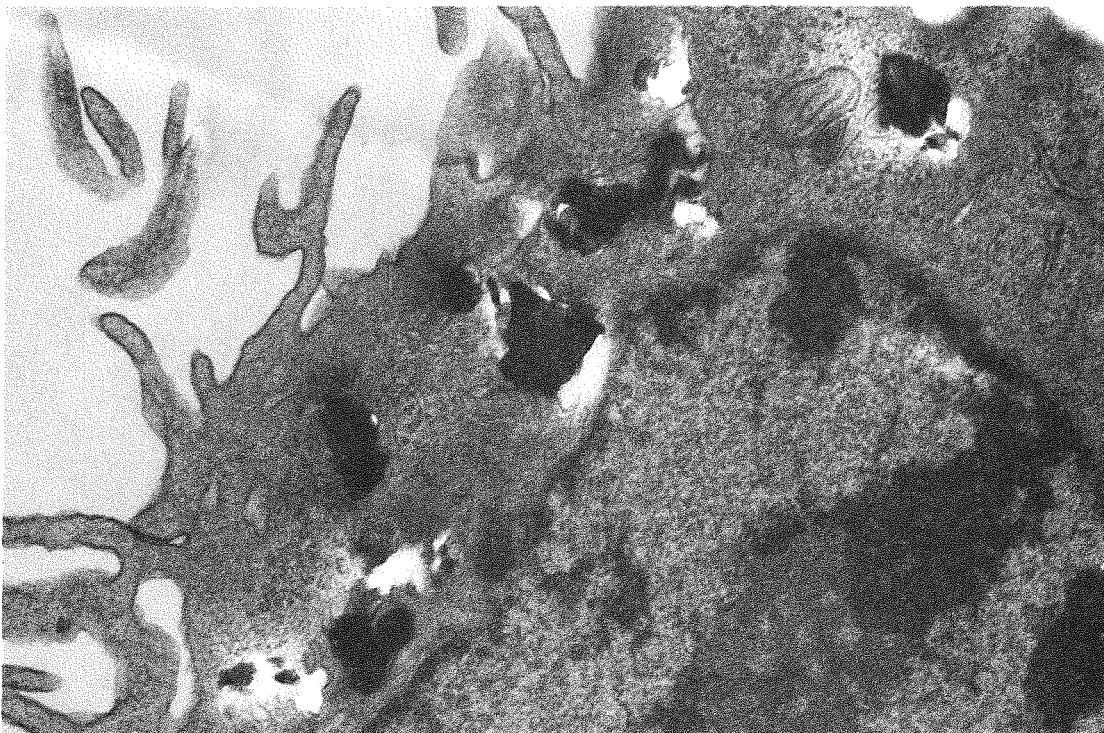


Abb. 33: Ausschnitt aus einer transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 10 Minuten Inkubation mit Quarz Qf ($250 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Vergrößerung: $\times 22800$.



Abb. 34: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit Quarz Qf ($250 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. M: multivesikuläres Körperchen. Pfeil: Quarzpartikel. Vergrößerung: $\times 21300$.

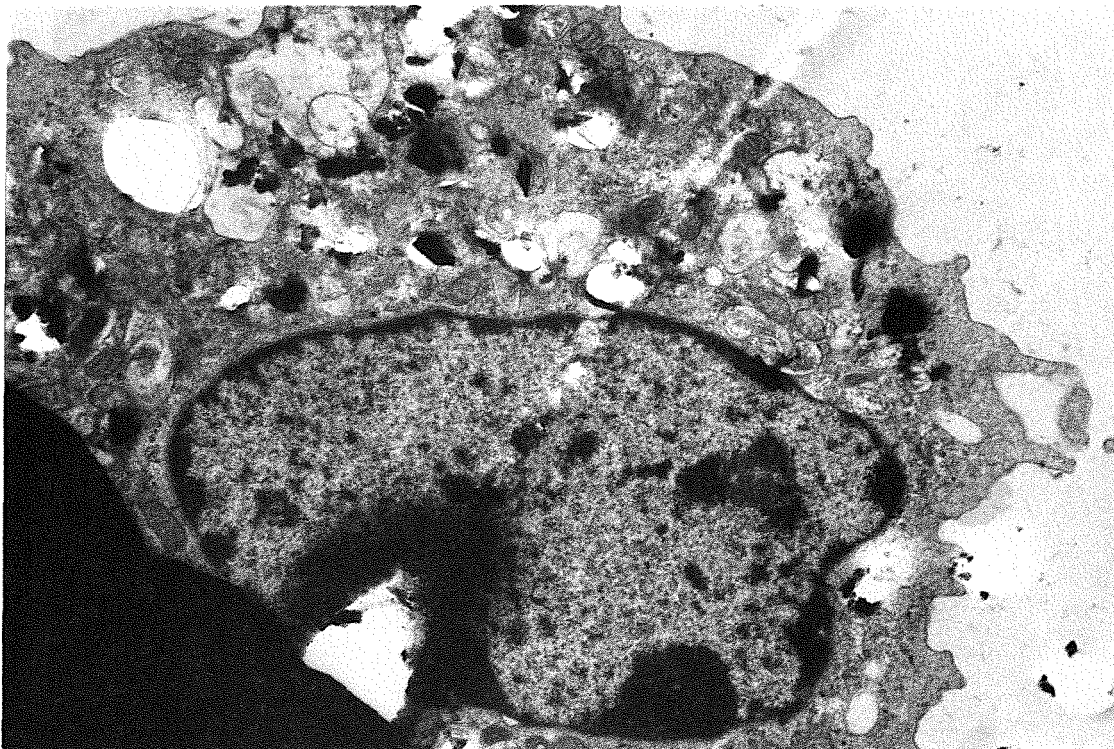


Abb. 35: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit Quarz Qf ($250 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Vergrößerung: $\times 9500$.

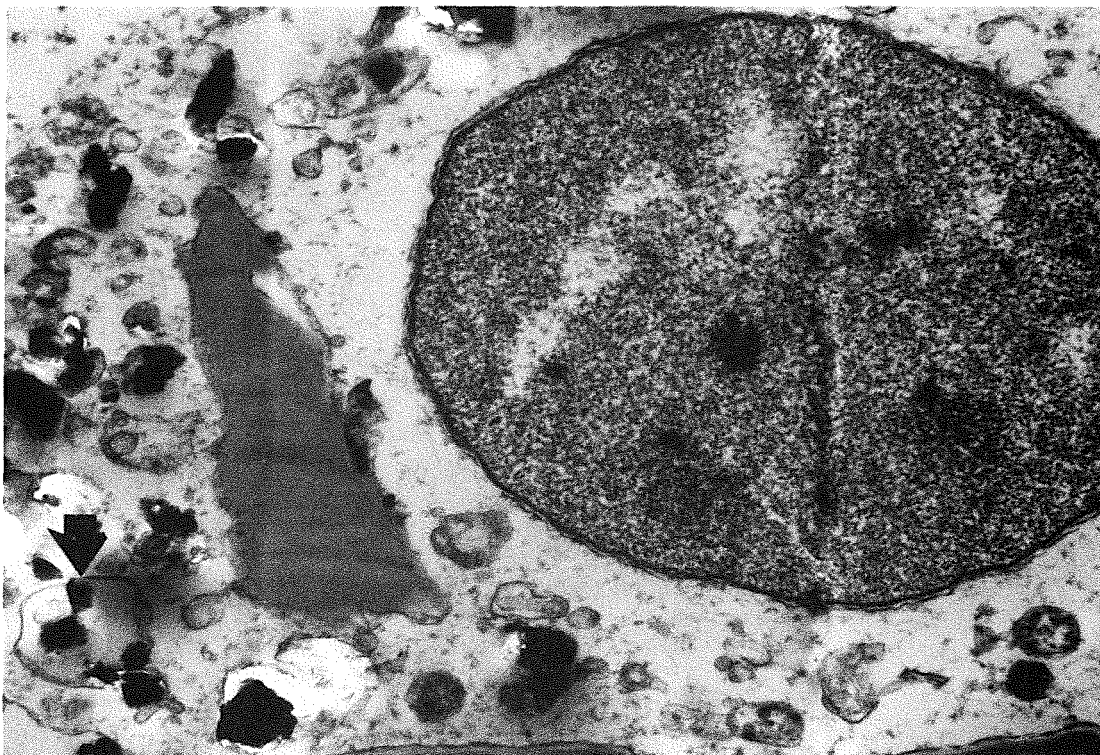


Abb. 36: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Qf ($250 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Pfeil: Membranschlossene Quarzpartikel. Vergrößerung: $\times 14900$.

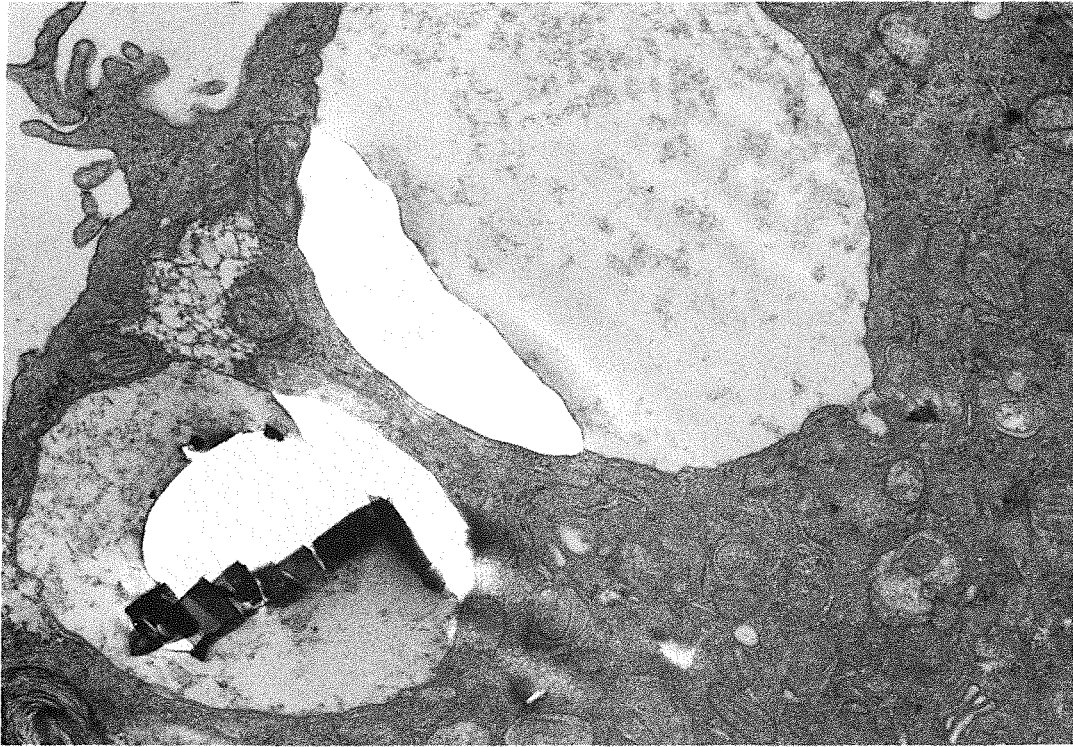


Abb. 37: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Vergrößerung: $\times 14300$.

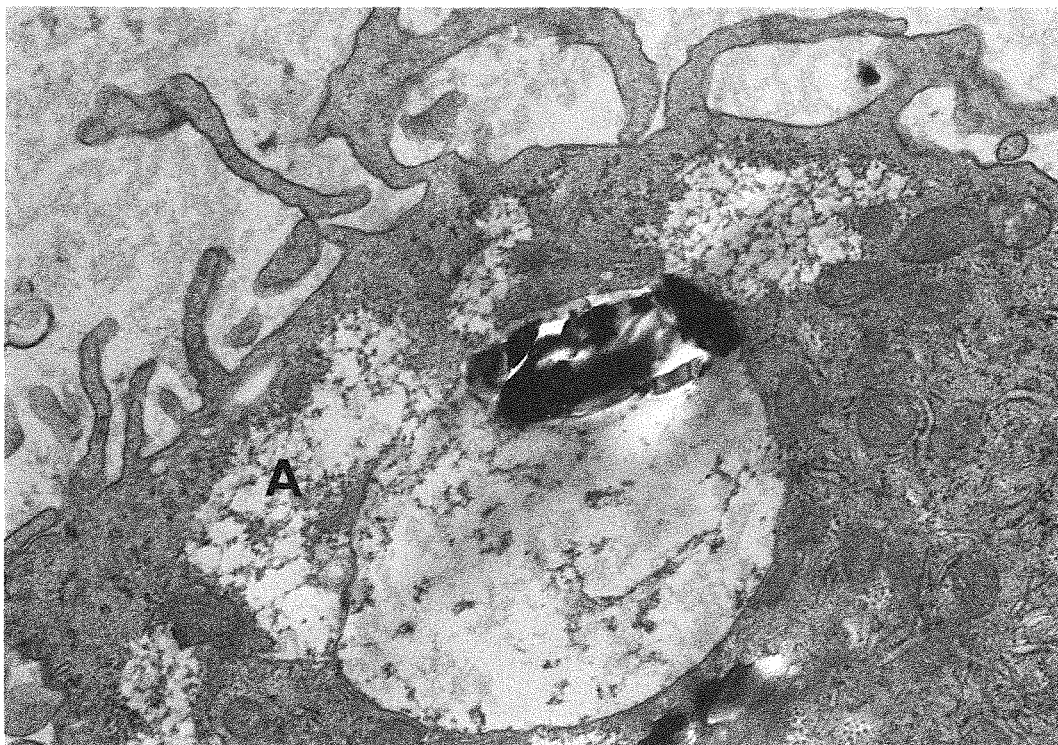


Abb. 38: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von einem Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. A: aufgelöste zytoplasmatische Bereiche. Vergrößerung: $\times 17500$.

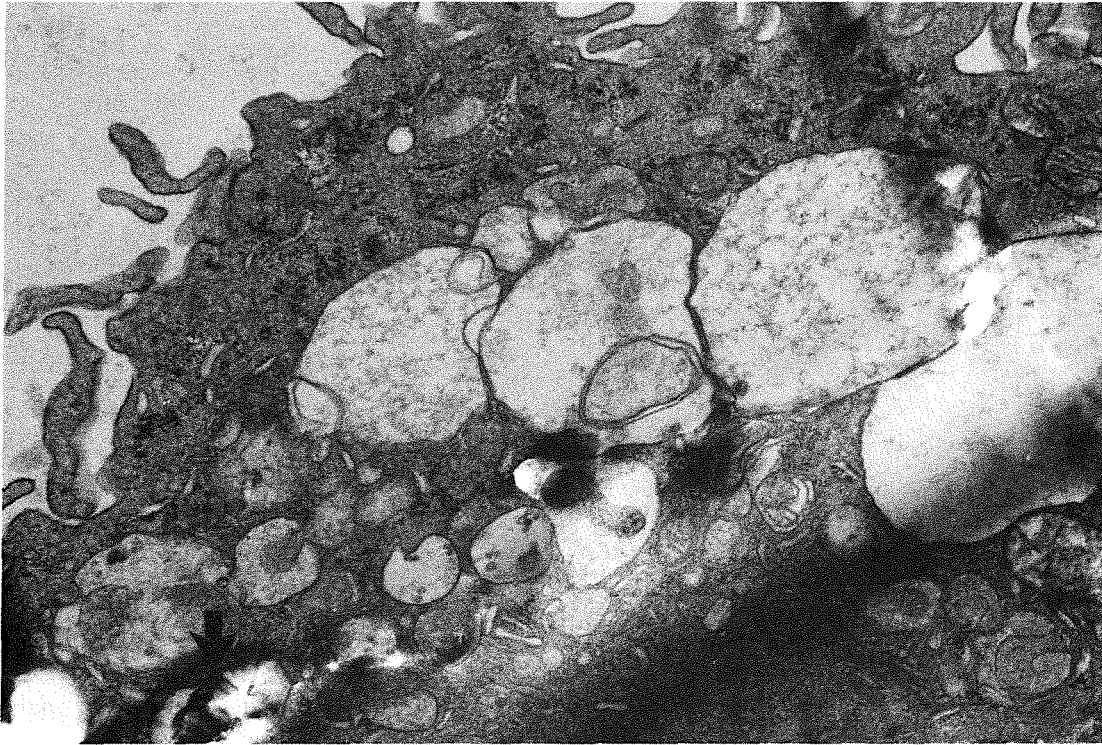


Abb. 39: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nucleopore-Membran. Pfeil: Quarzpartikel. Vergrößerung: $\times 19200$.

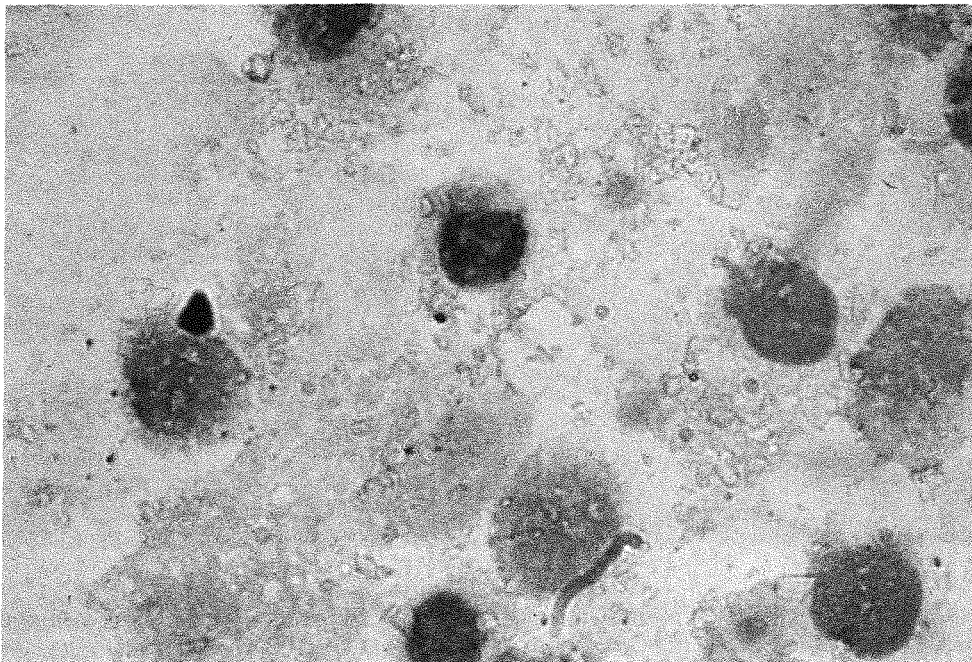


Abb. 40: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Qf ($100 \mu\text{g/ml}$). Vergrößerung: $\times 1400$.

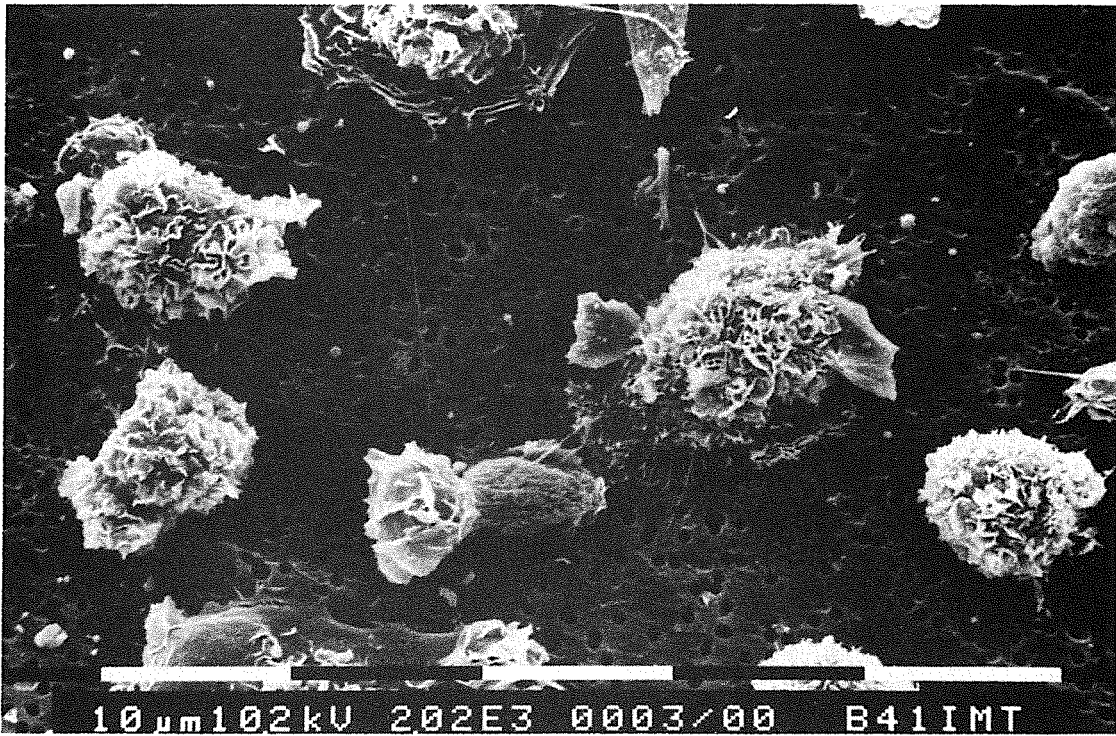


Abb. 41: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Kultur mit Quarz Q ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran.

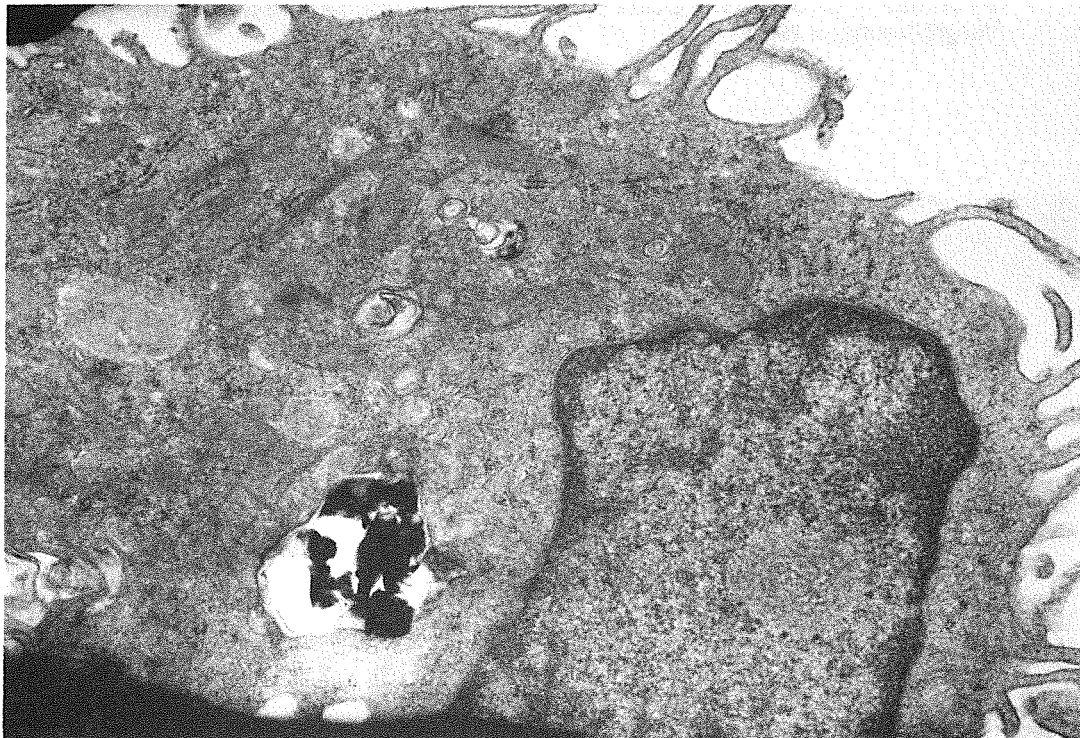


Abb. 42: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von einem Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Qf ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Vergrößerung: $\times 21500$.

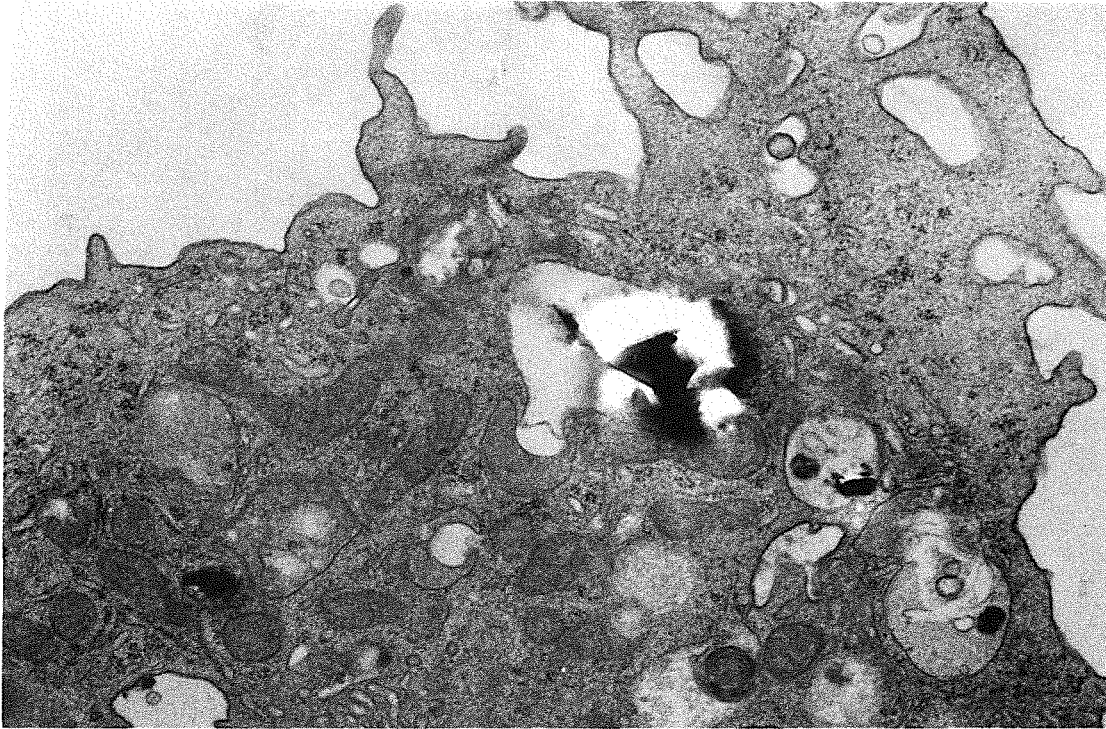


Abb. 43: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Qf ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Vergrößerung: x 18200.

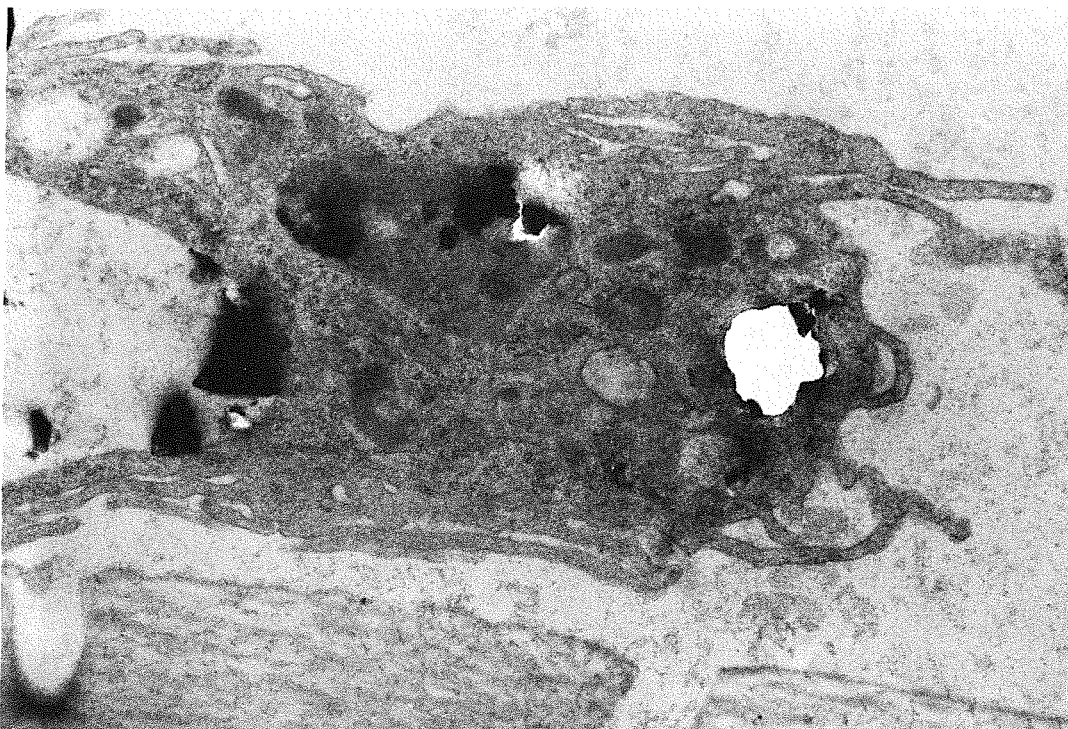


Abb. 44: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 60 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Qf ($250 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Vergrößerung: x 12700.

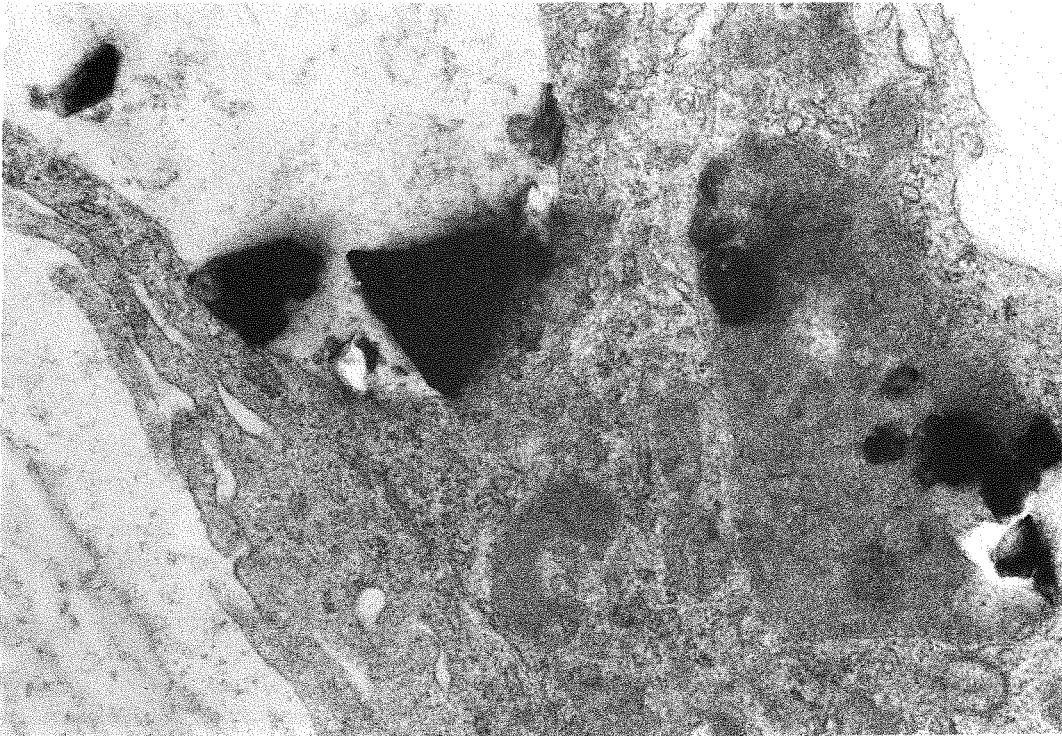


Abb. 45: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (Ausschnitt) eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 60 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Qf ($250 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Vergrößerung: $\times 27000$.

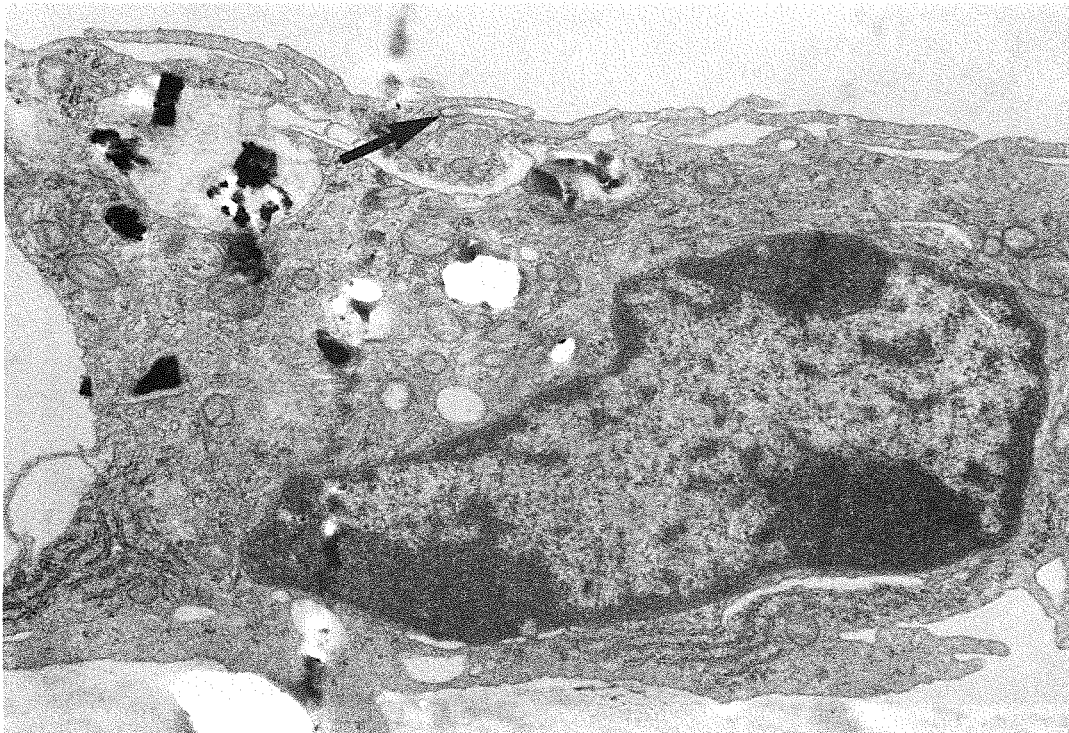


Abb. 46: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 60 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Qf ($250 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Pfeil: mikropinozytoseähnliche Vesikel. Vergrößerung: $\times 15300$.

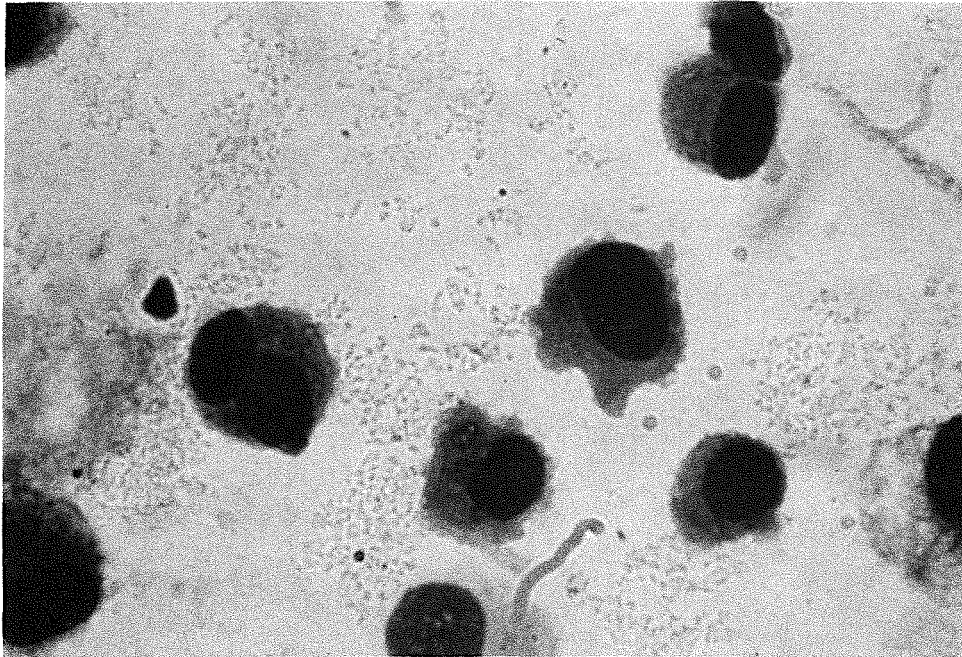


Abb. 47: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Qf ($100 \mu\text{g/ml}$) im Monolayer. Sehr deutlich ist die geringe Schädigung der Zellen zu erkennen. Vergrößerung: $\times 1400$.

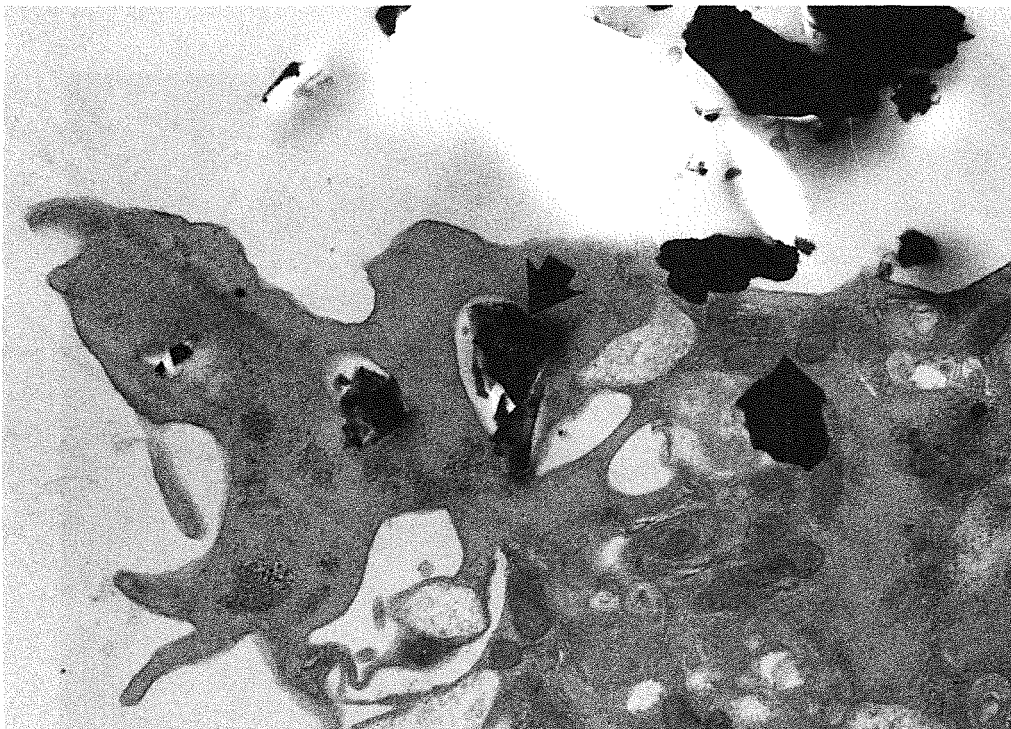


Abb. 48: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach wenigen Sekunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur. Pfeil: Quarzpartikel. Vergrößerung: $\times 18800$.

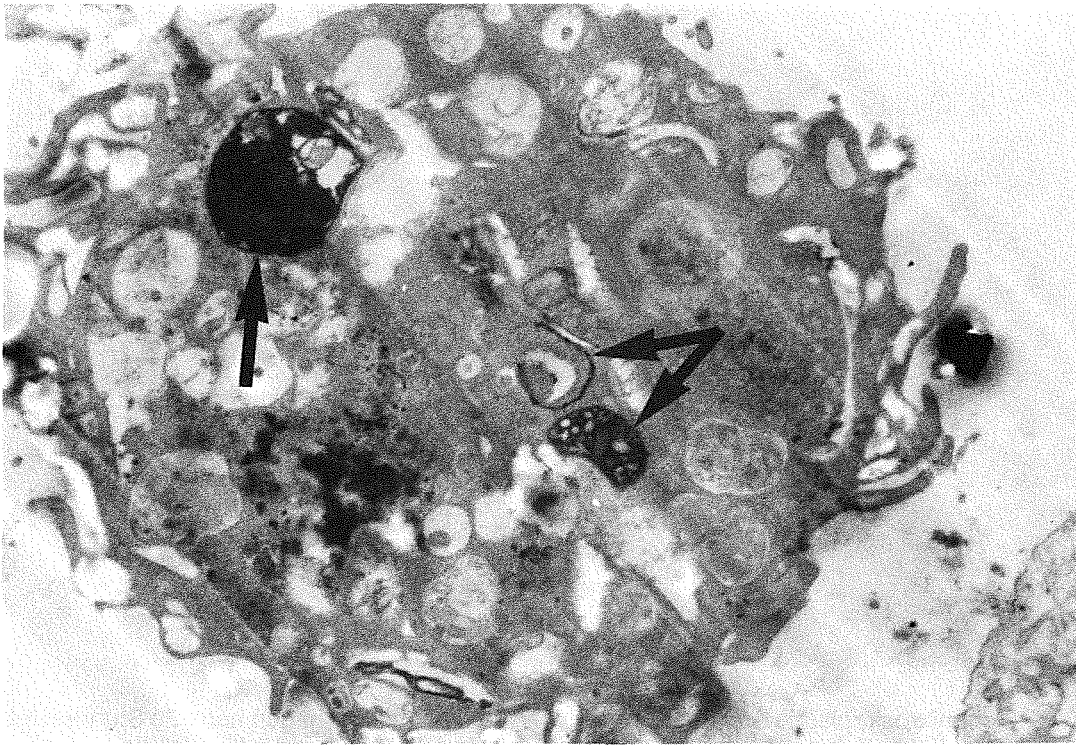


Abb. 49: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach wenigen Sekunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase. Pfeile: SP-Aktivität. Vergrößerung: $\times 12500$.

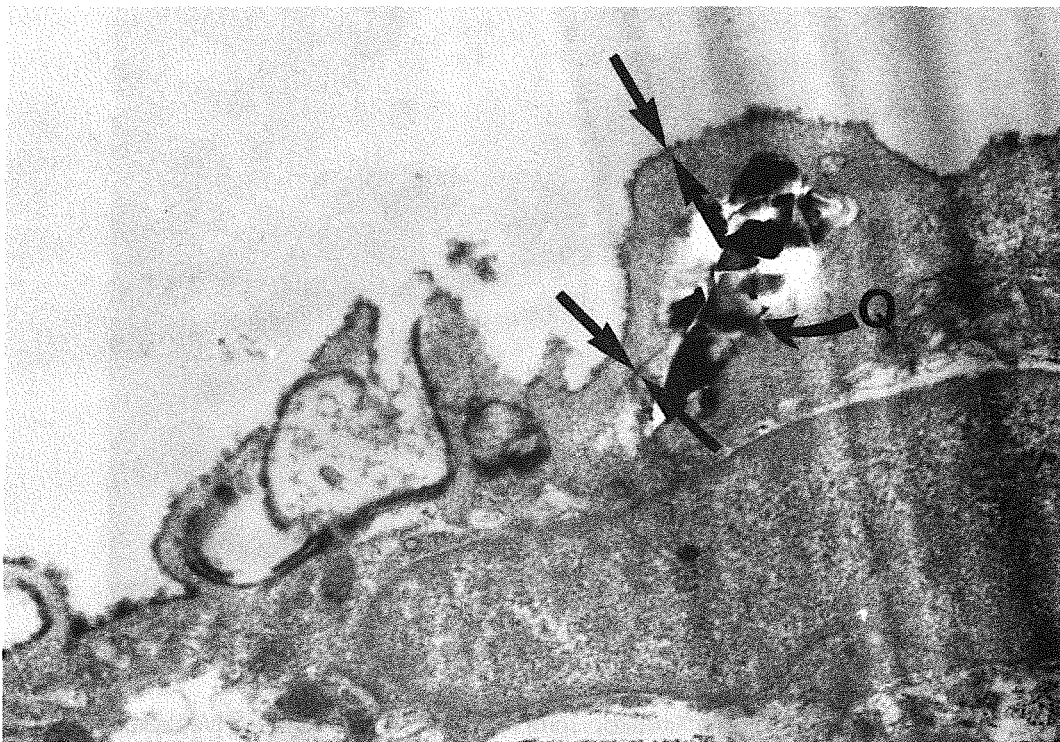


Abb. 50: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach wenigen Sekunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Esterase. Pfeil: SE-Aktivität. Q: Quarz. Vergrößerung: $\times 20000$.

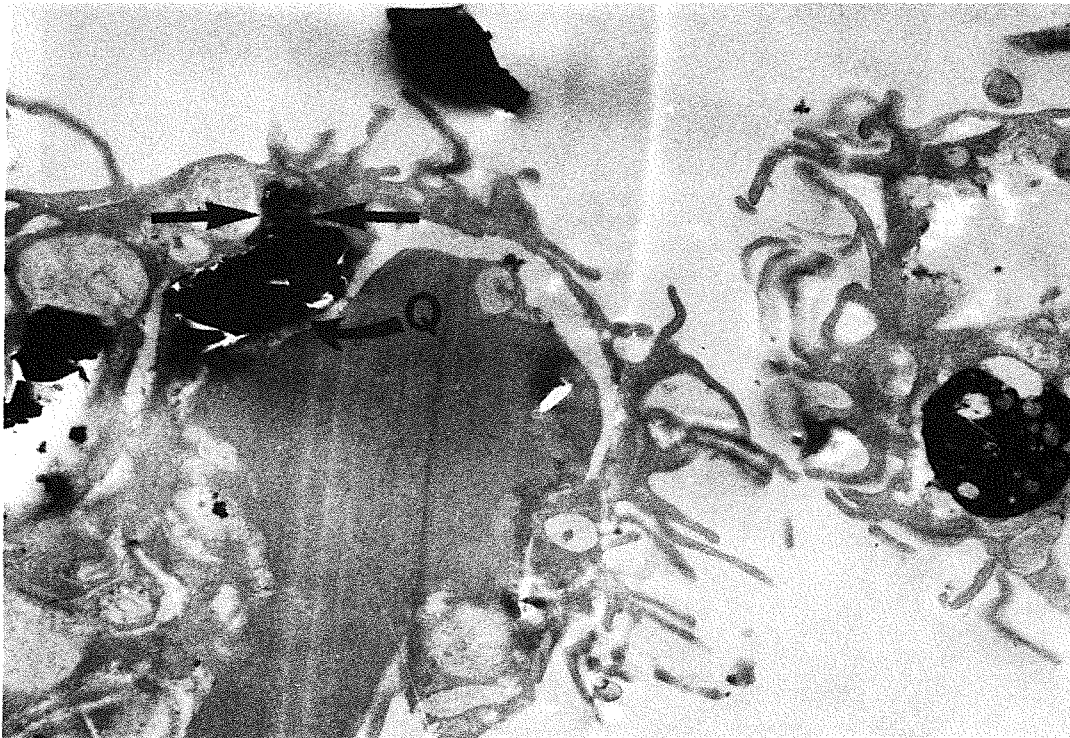


Abb. 51: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 10 Minuten Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase. Pfeile: SP-Aktivität. Q: Quarz. Vergrößerung: $\times 12900$.

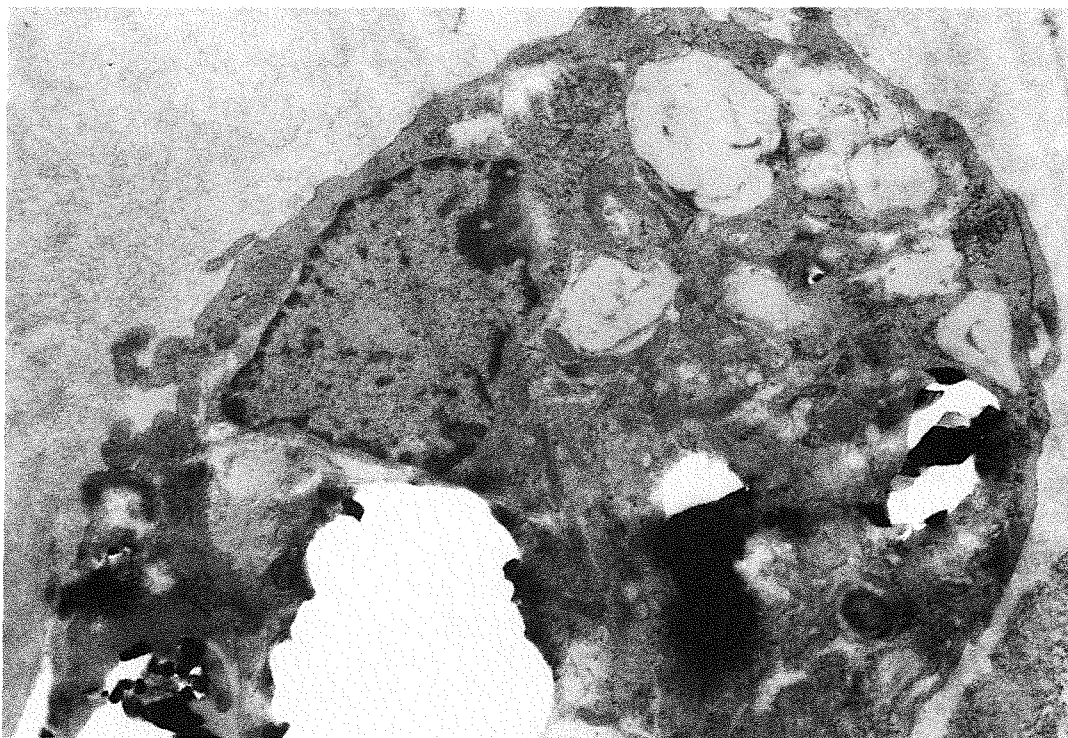


Abb. 52: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur. Vergrößerung: $\times 10200$.

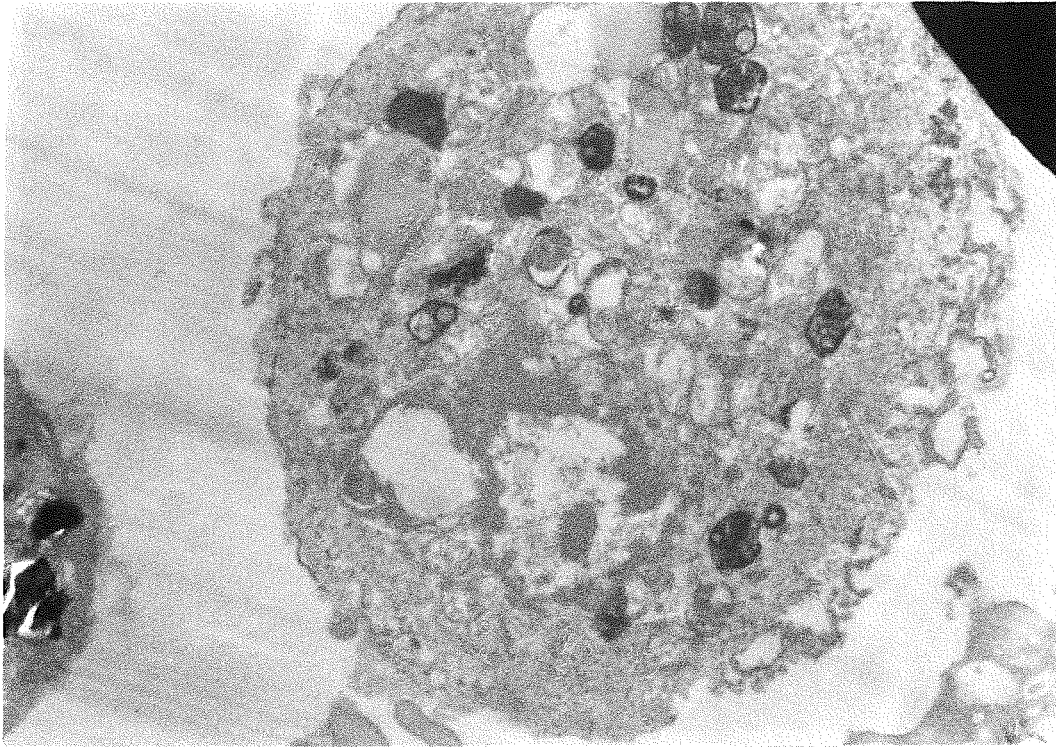


Abb. 53: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase. Vergrößerung: x 9100.



Abb. 54: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase. Pfeile: SP-Aktivität. Q: Quarz. Vergrößerung: x 14800.

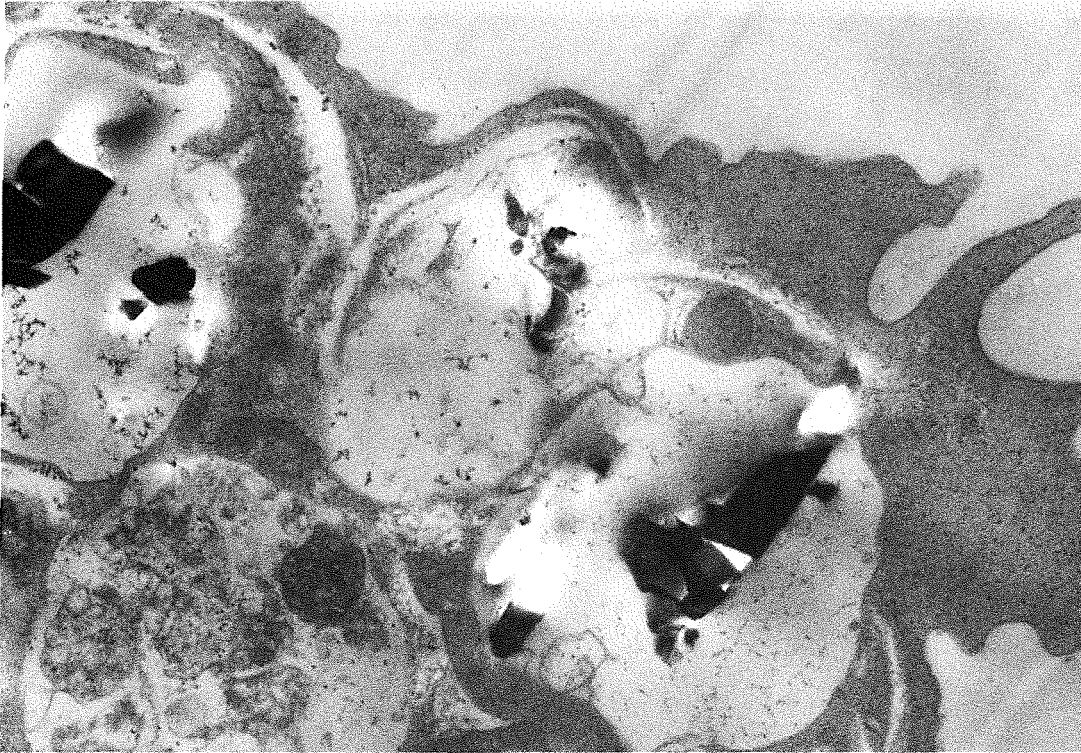


Abb. 55: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur. Vergrößerung: $\times 18200$.

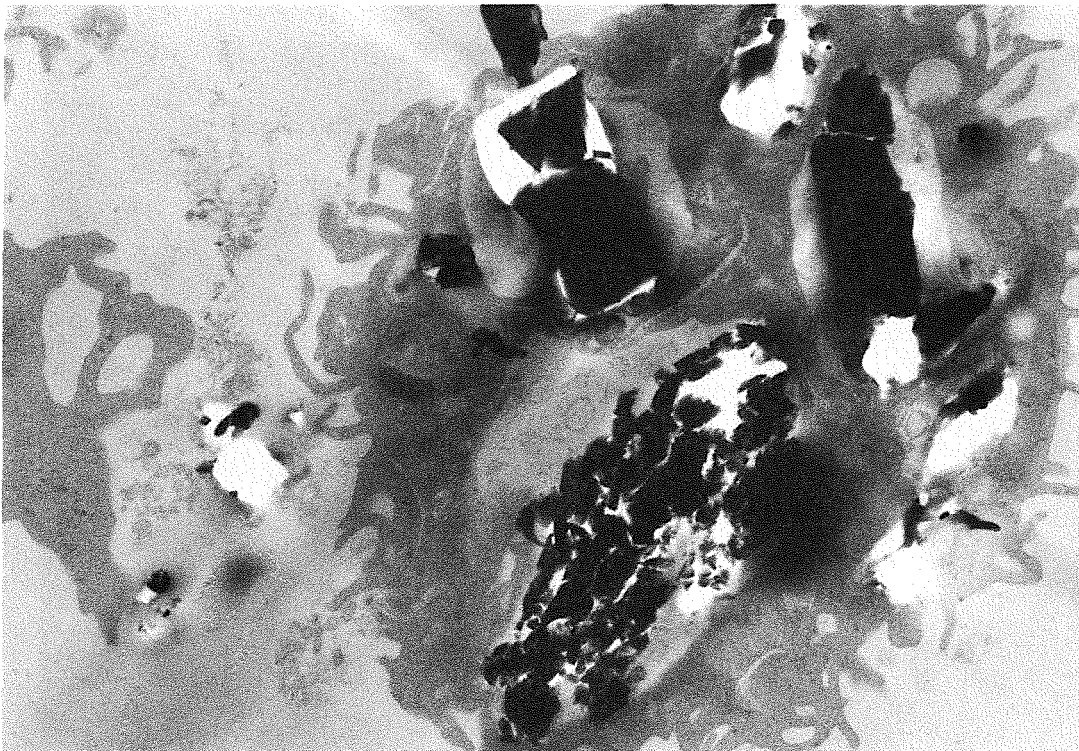


Abb. 56: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur. Vergrößerung: $\times 9000$.

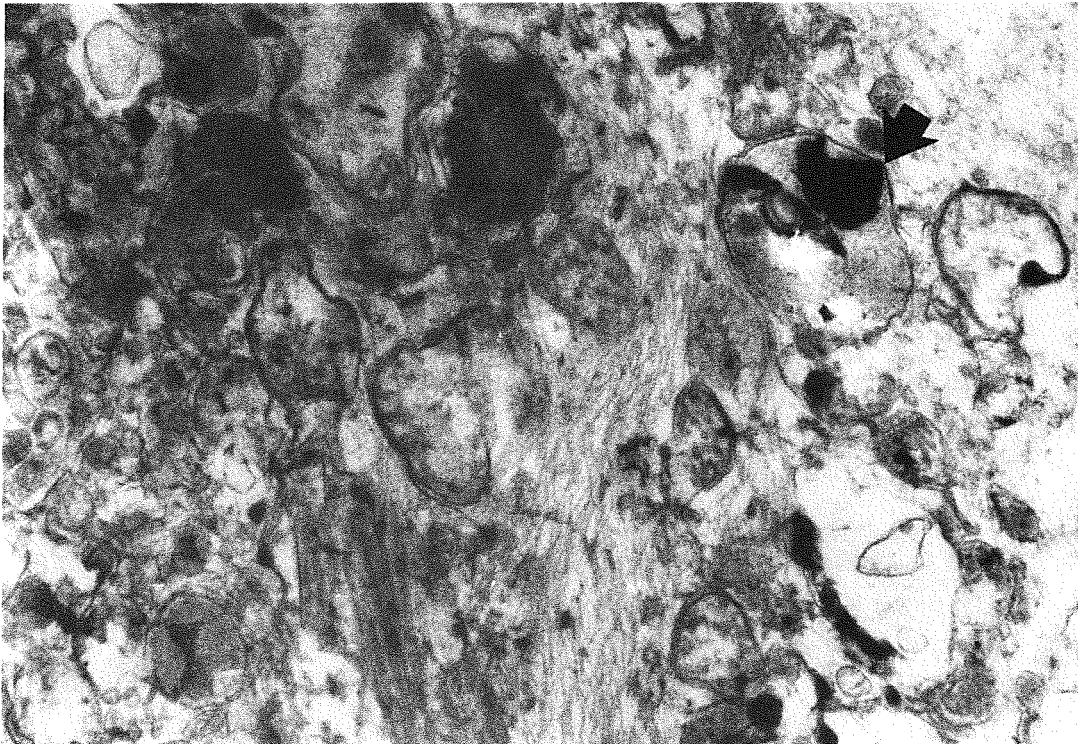


Abb. 57: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur. Pfeil: Quarzhaltiges membranumschlossenes Vesikel. Vergrößerung: $\times 34600$.

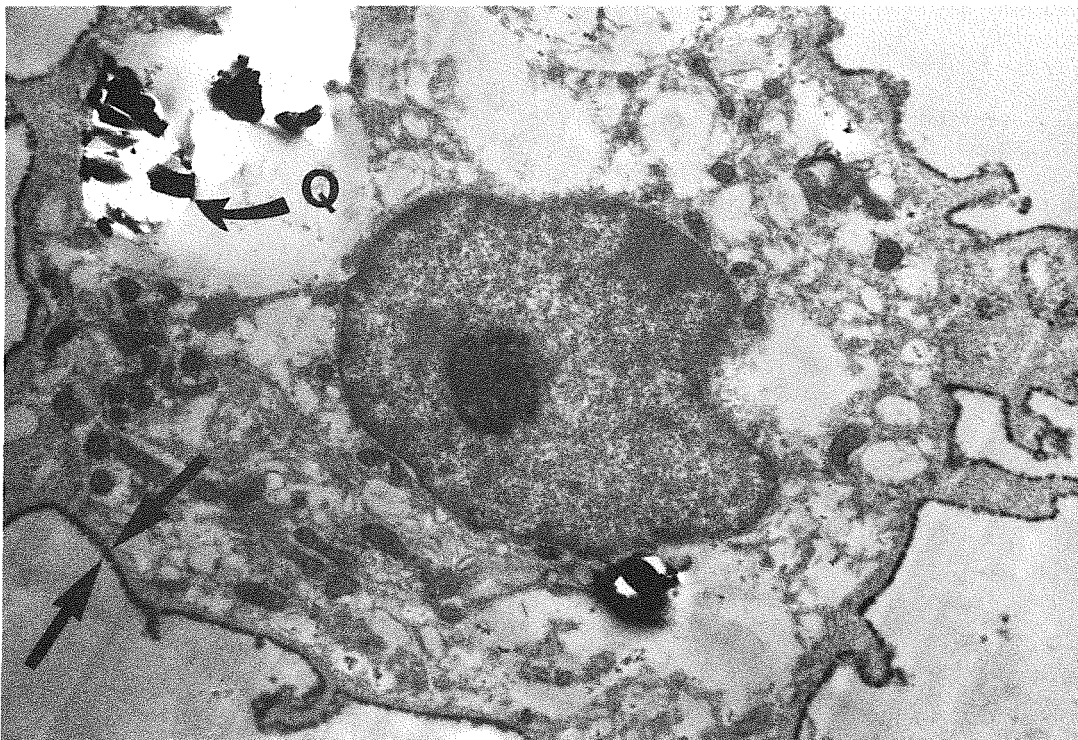


Abb. 58: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Esterase. Pfeil: SE-Aktivität. Q: Quarz. Vergrößerung: $\times 9000$.

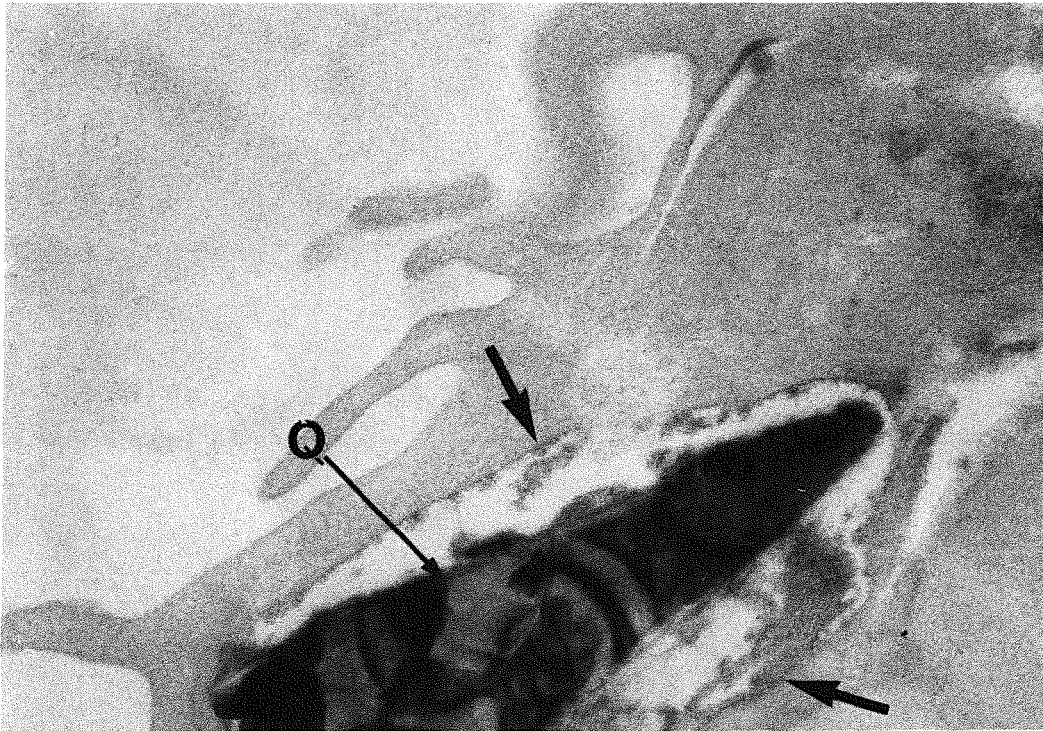


Abb. 59: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase. Pfeil: SP-Aktivität. Q: Quarz. Vergrößerung: $\times 40000$.

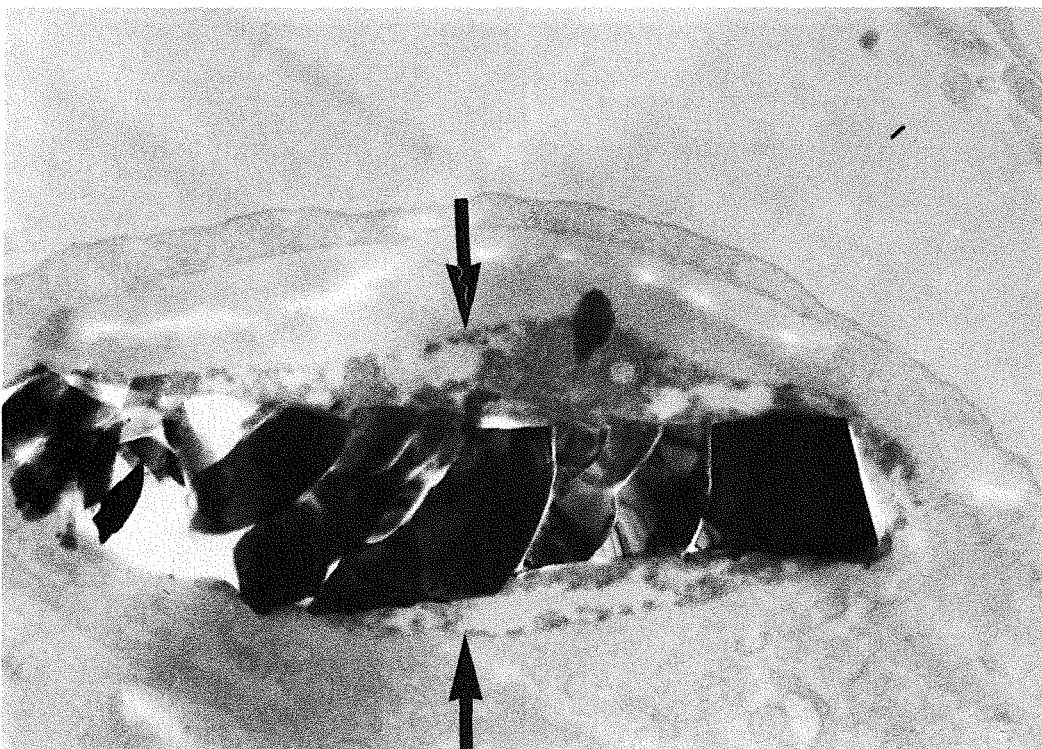


Abb. 60: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 90 Minuten Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Phosphatase. Pfeile: SP-Aktivität. Vergrößerung: $\times 32300$.

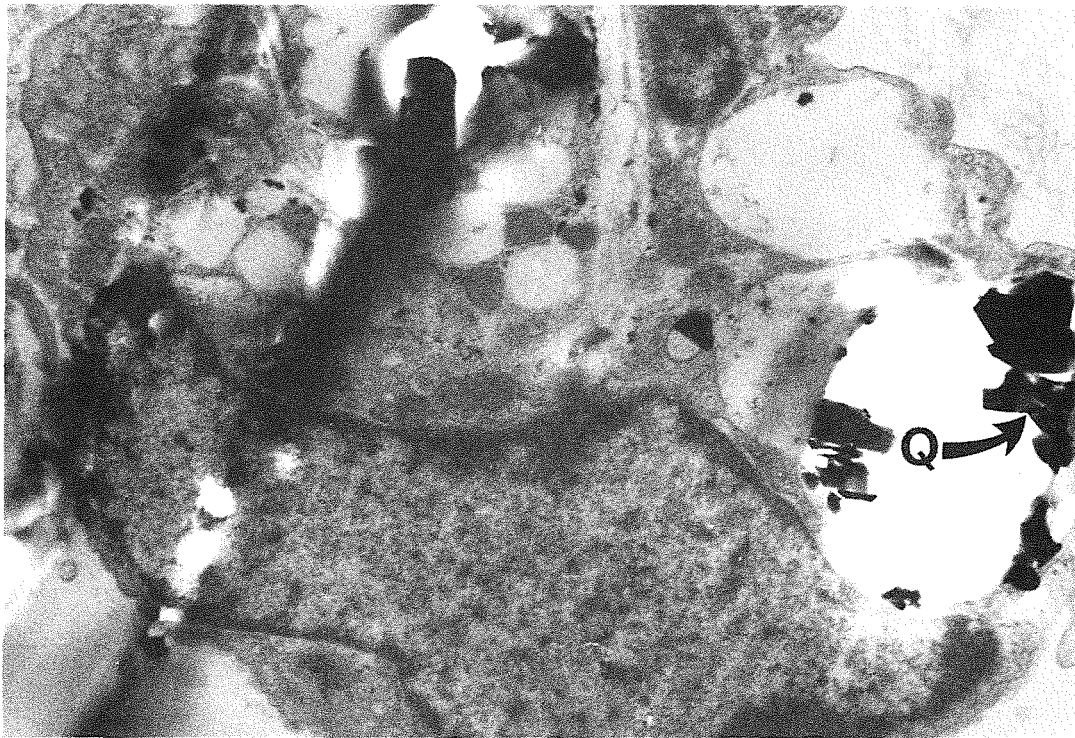


Abb. 61: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur. Q: Quarz. Vergrößerung: $\times 11900$.

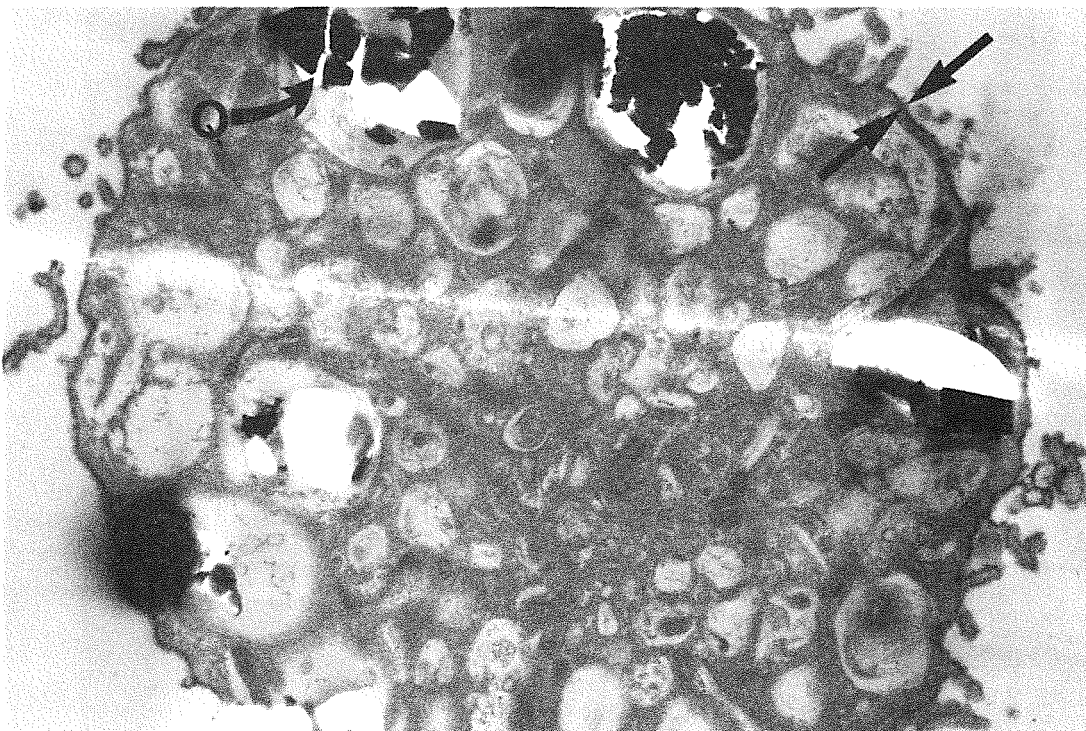


Abb. 62: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit Quarz Q ($250 \mu\text{g/ml}$) in Suspensionskultur mit zytochemischem Nachweis der Sauren Esterase. Vergrößerung: $\times 11900$. Pfeile. SE-Aktivität. Q: Quarz.

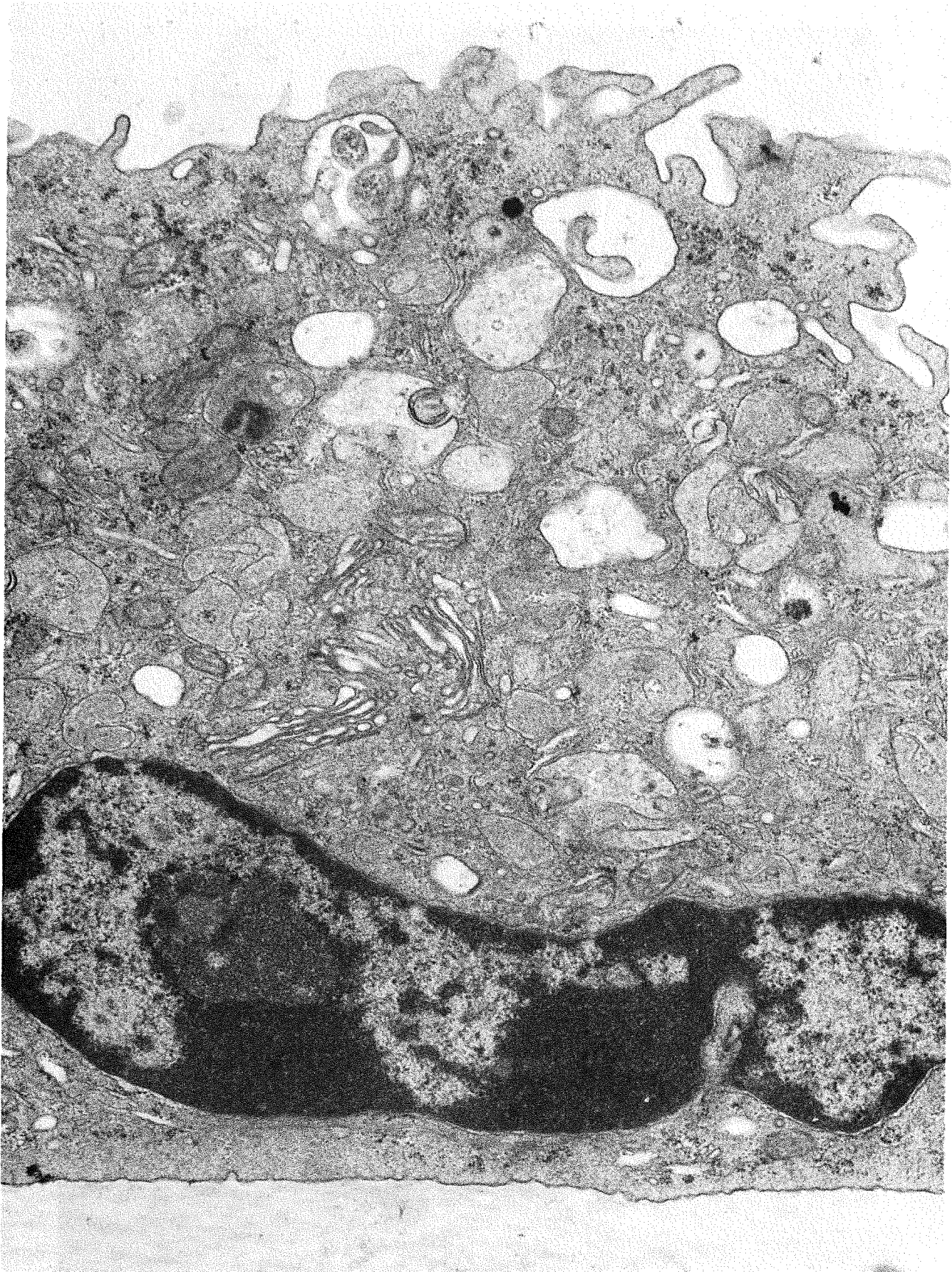


Abb. 63: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach wenigen Sekunden Inkubation mit $\{123\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Eine Anlagerung der Partikel ist nicht zu erkennen. Vergrößerung: $\times 22300$.

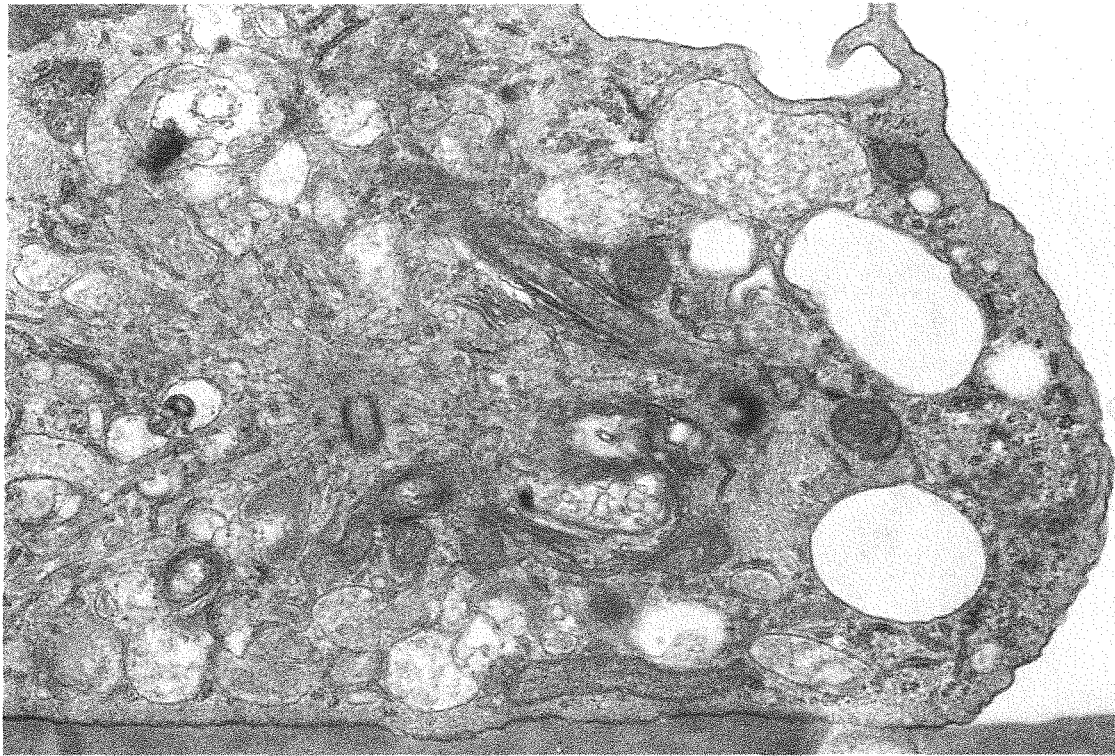


Abb. 64: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 5 Minuten Inkubation mit $\{^{123}\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Eine Anlagerung oder Aufnahme der Partikel ist nicht zu erkennen. Vergrößerung: $\times 24000$.

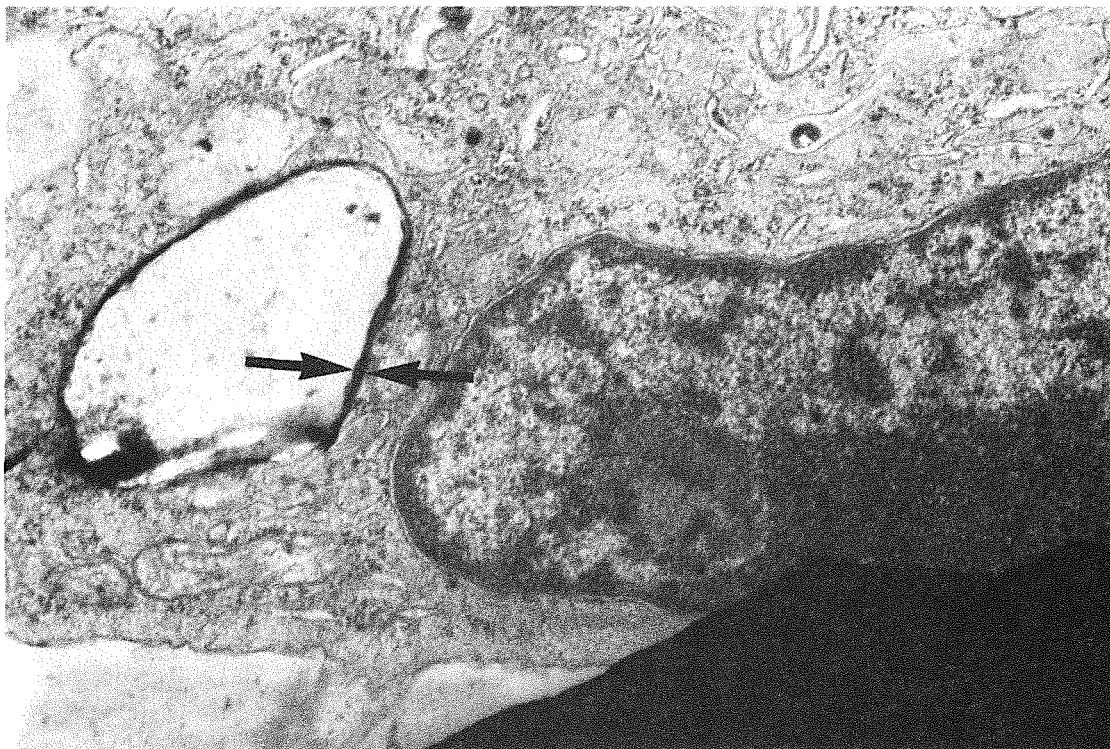


Abb. 65: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 10 Minuten Inkubation mit $\{^{123}\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore Membran. Pfeil: vermutete $\{^{123}\}$ -Partikel. Vergrößerung: $\times 28400$.

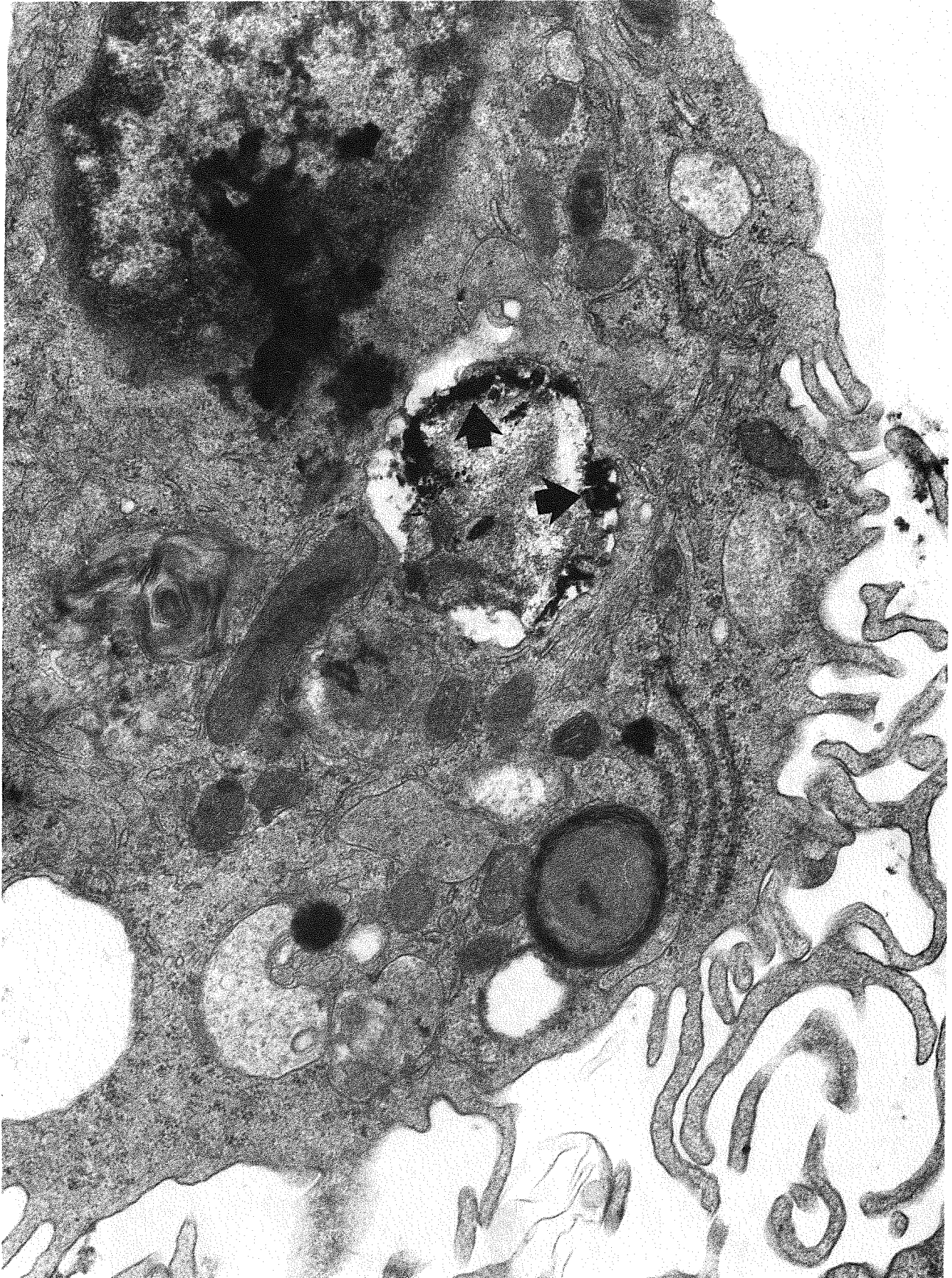


Abb. 66: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit $\{123\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Zu beachten sind die mit Pfeil gekennzeichneten Strukturen (vermutlich in Auflösung befindliche $\{123\}$ -Partikeln). Vergrößerung: x 28500.

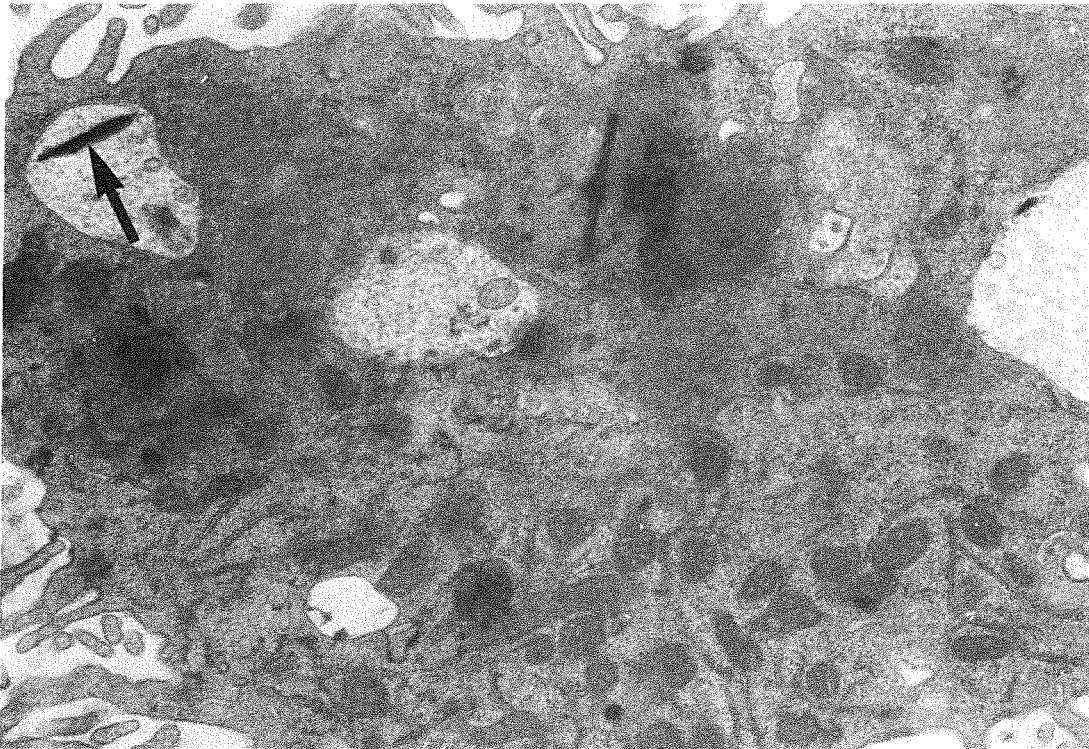


Abb. 67: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit $\{123\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nucleopore-Membran. Pfeil: vermutete $\{123\}$ -Partikel. Vergrößerung: x 22100.

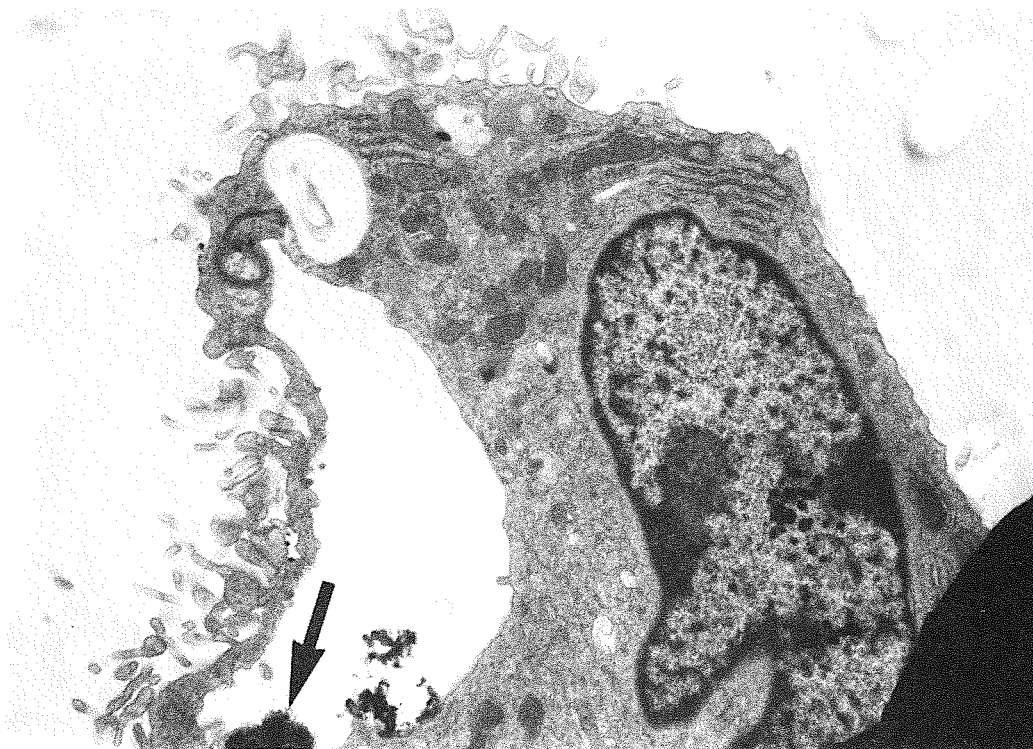


Abb. 68: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit $\{123\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nucleopore-Membran. Pfeil: $\{123\}$ -Partikel (in Auflösung?). Vergrößerung: x 7200.

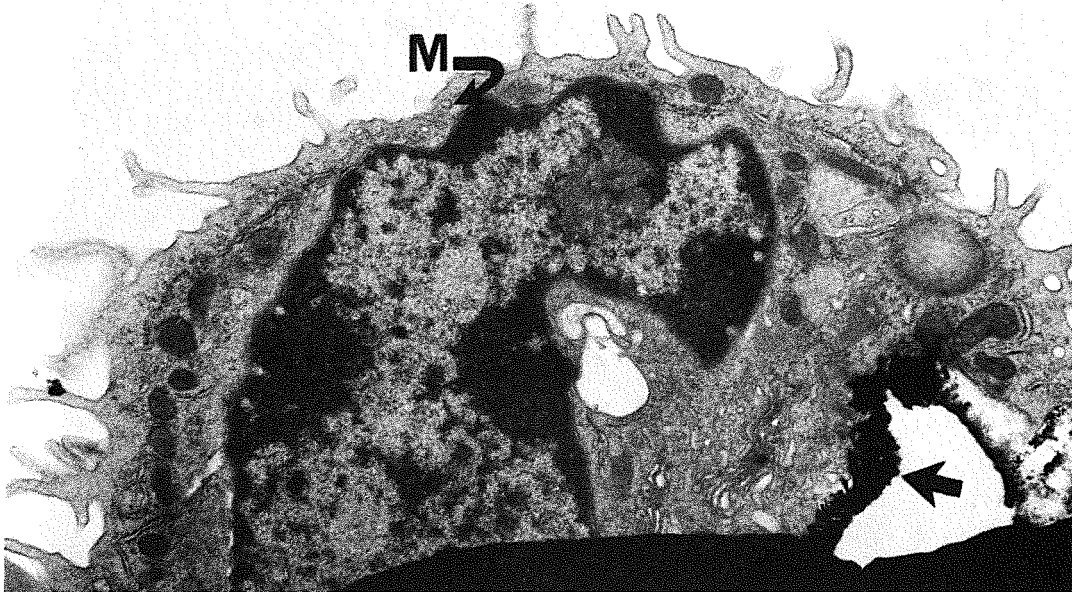


Abb. 69: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 30 Minuten Inkubation mit $\{123\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Pfeil: vermutete Rest eines $\{123\}$ -Partikels. M: mikropinozytoseähnlicher Vorgang. Vergrößerung: $\times 12900$.

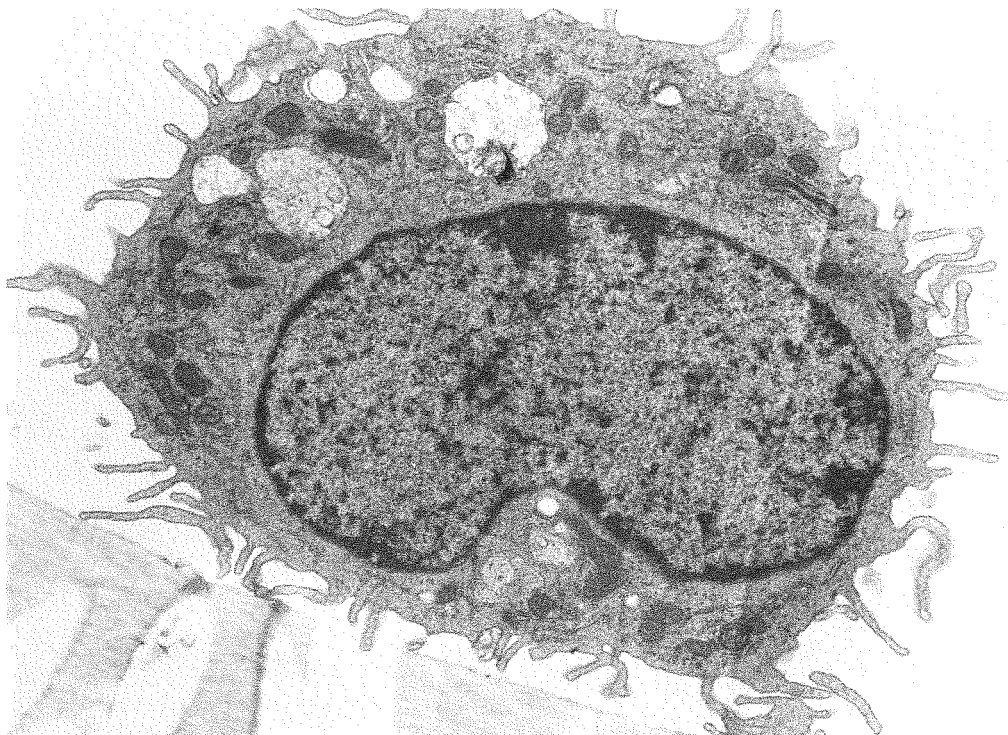


Abb. 70: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 60 Minuten Inkubation mit $\{123\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Vergrößerung: $\times 9000$.

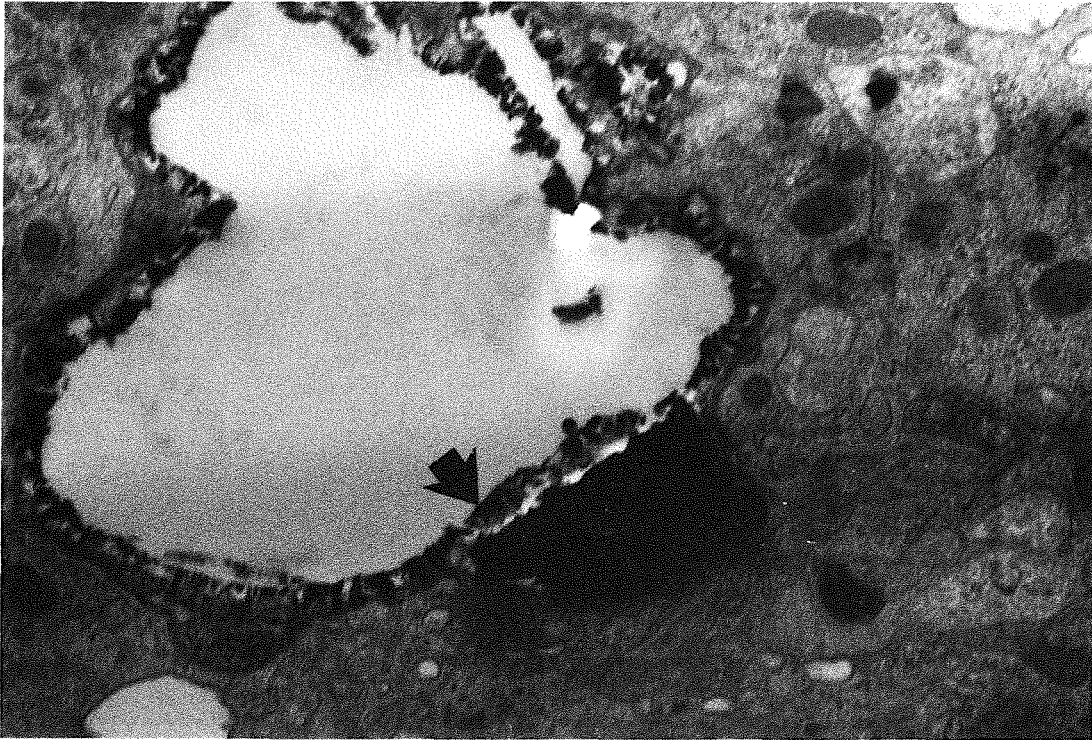


Abb. 71: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 60 Minuten Inkubation mit {123} ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nucleopore-Membran. Pfeil: vermuteter Rest einer {123}-Partikels. Vergrößerung: x 18000.

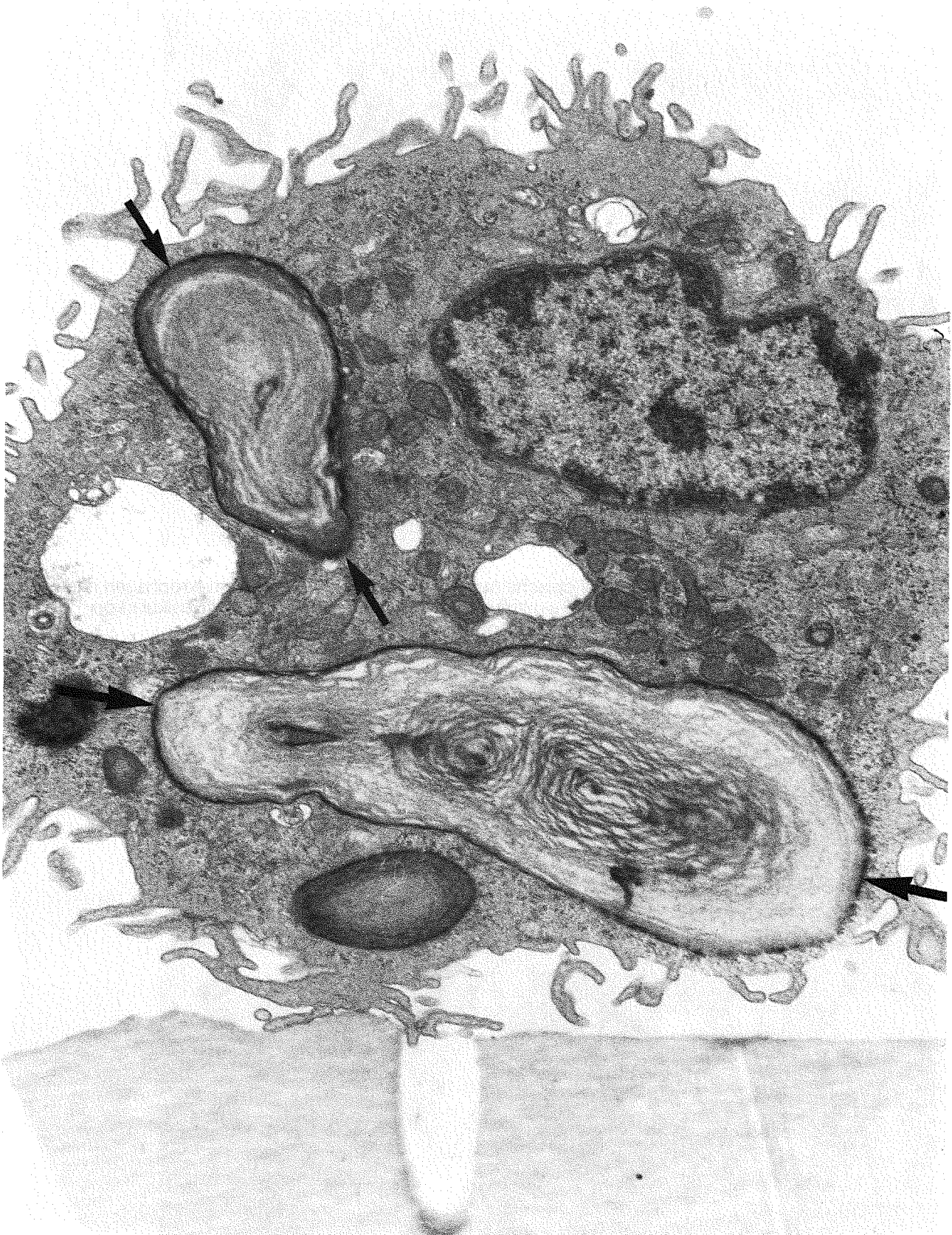


Abb. 72: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 60 Minuten Inkubation mit $\{^{123}\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Pfeile: Lamellarkörperchen. Vergrößerung: $\times 15700$.

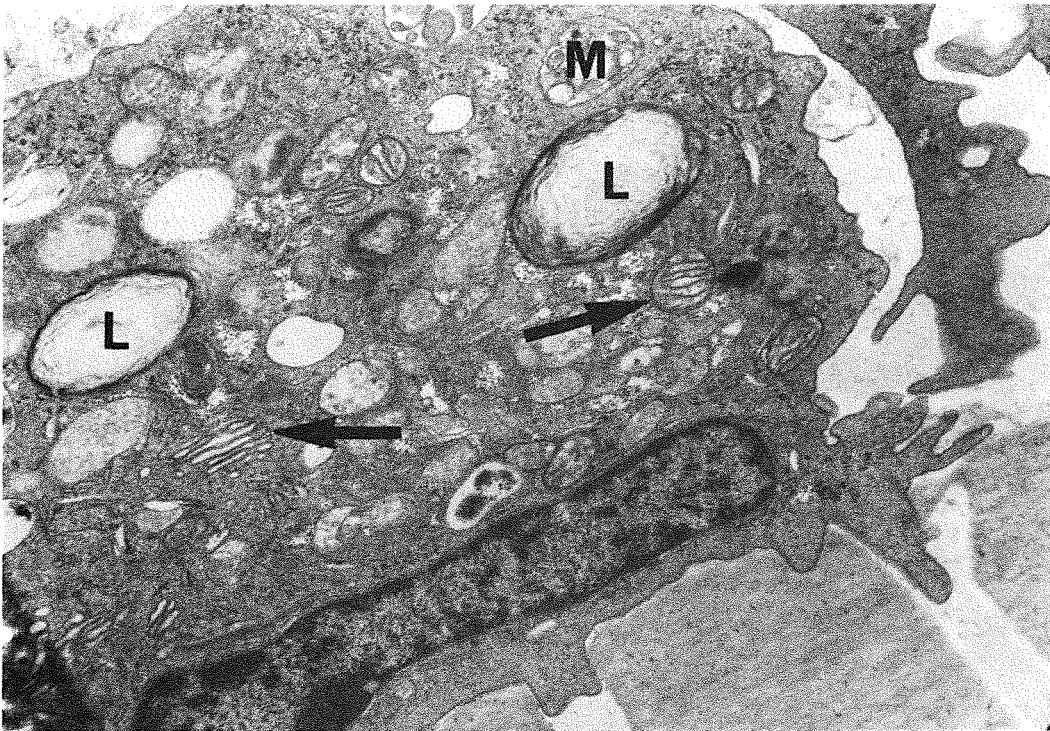


Abb. 73: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 2 Stunden Inkubation mit $\{^{123}\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. M: Multivesikularkörperchen. L: Lamellarkörperchen. Pfeil: veränderte Mitochondrien, bzw. ER. Vergrößerung: $\times 12600$.

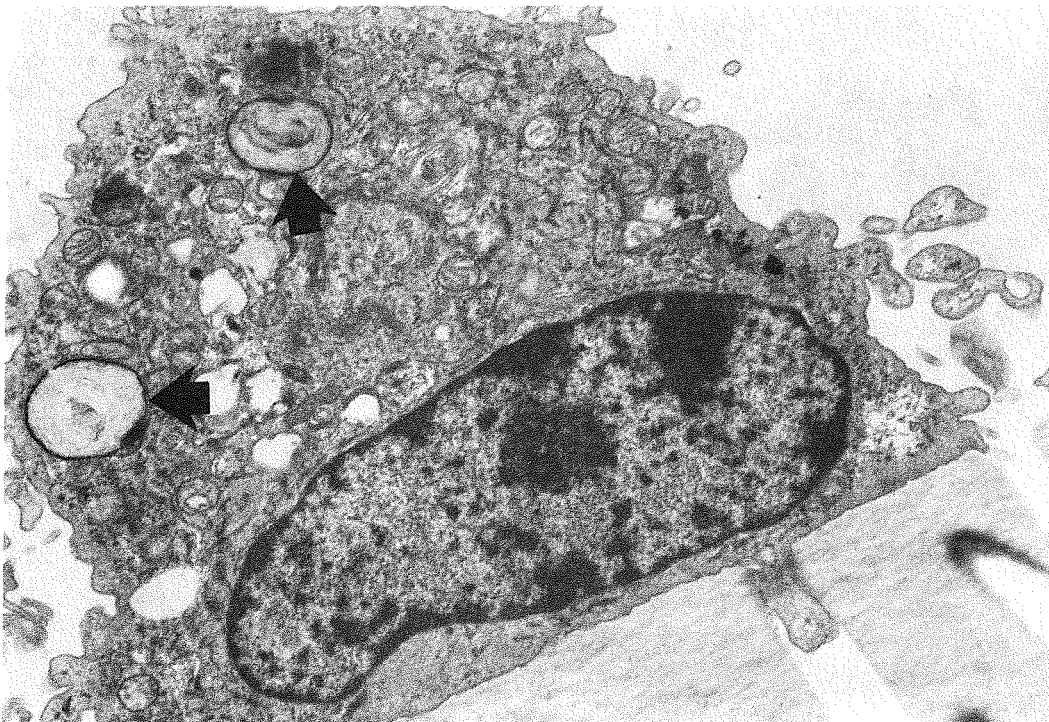


Abb. 74: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 2 Stunden Inkubation mit $\{^{123}\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. Pfeile: Lamellarkörperchen. Vergrößerung: $\times 9000$.

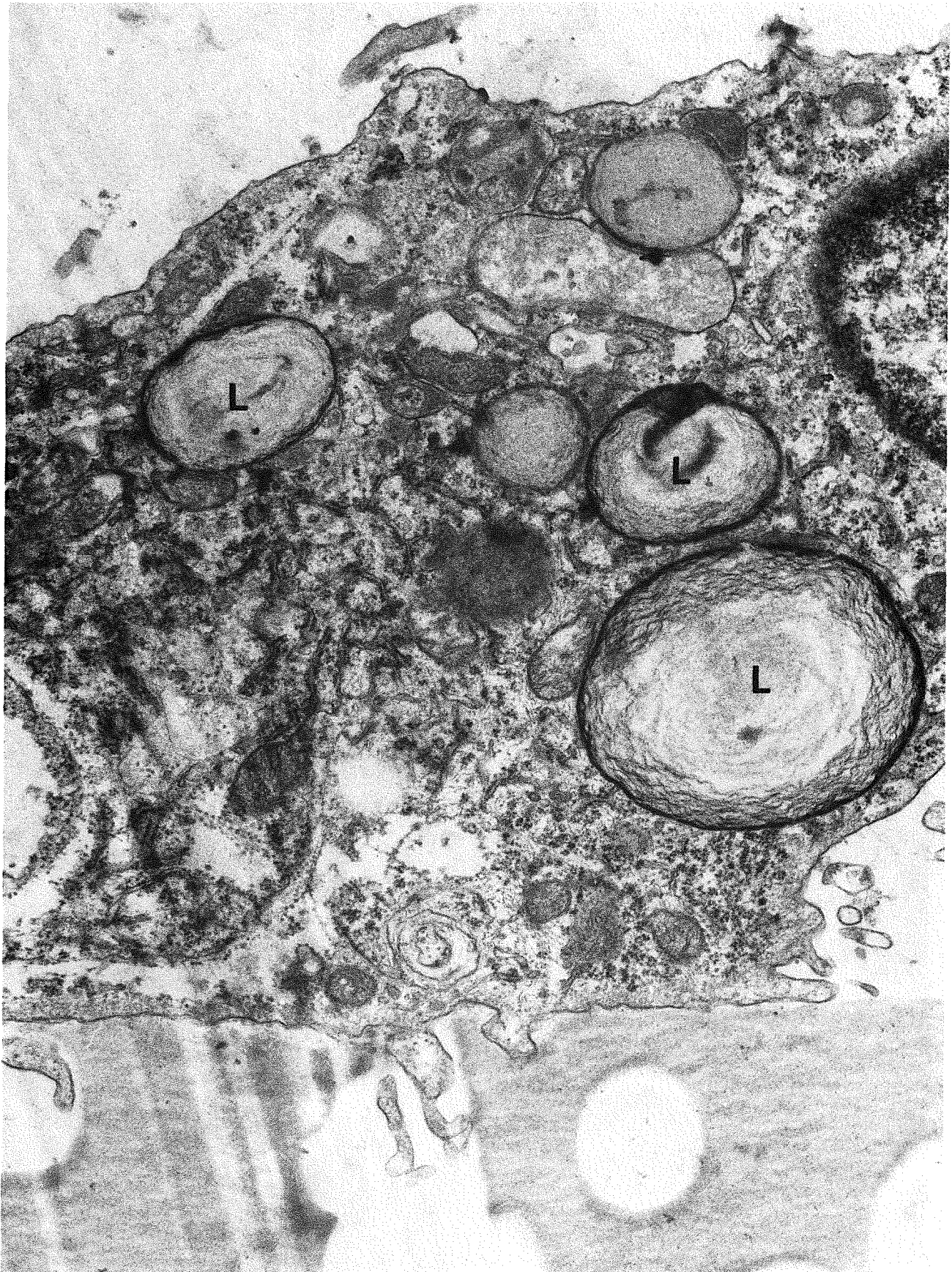


Abb. 75: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen mit mehreren Lamellarkörperchen nach 20 Stunden Inkubation mit $\{^{123}\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. L: Lamellarkörperchen. Vergrößerung: $\times 21400$.



Abb. 76: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit $\{^{123}\text{I}\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nucleopore-Membran. L: Lamellarkörperchen. Vergrößerung: x 28800.

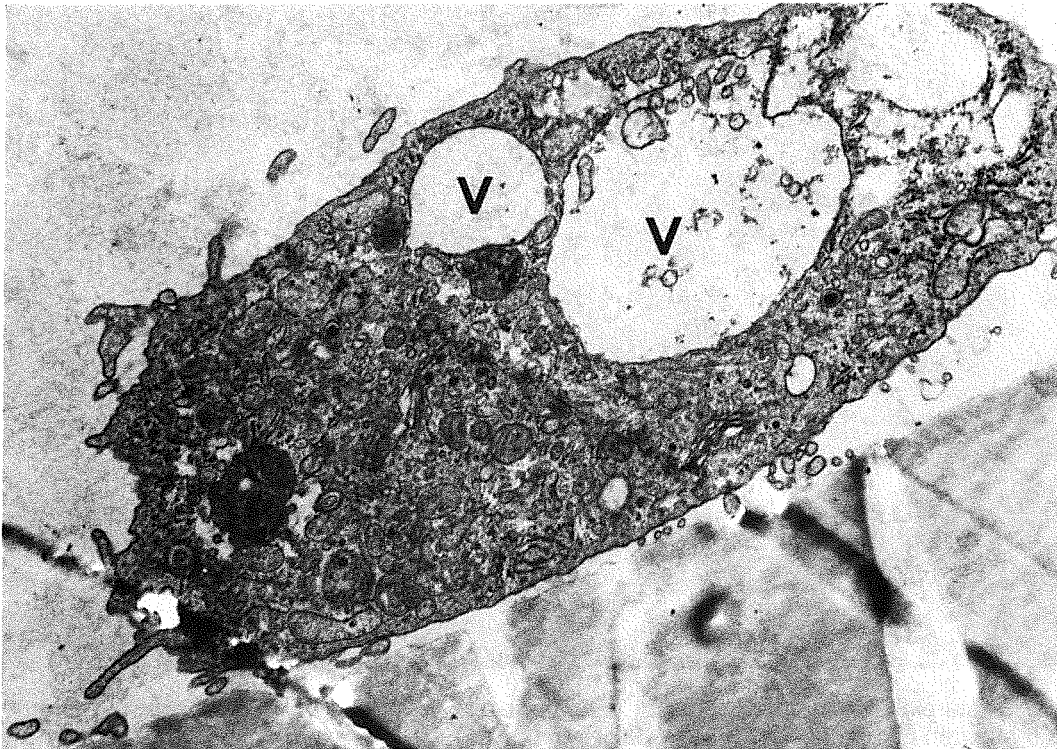


Abb. 77: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit {123} ($100\ \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran (nur Osmium-Fixation). V: Vakuolen (anstelle von Lamellarkörperchen). Vergrößerung: $\times 11900$.

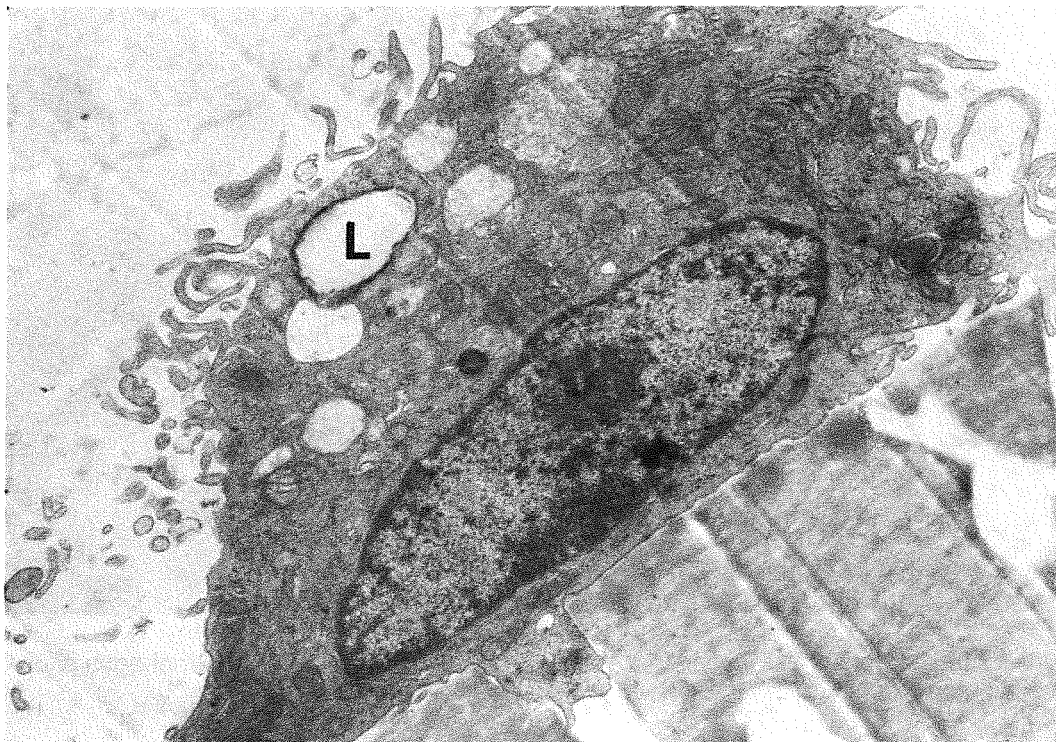


Abb. 78: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem {123} ($100\ \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran. L: kleines Lamellarkörperchen. Vergrößerung: $\times 9100$.

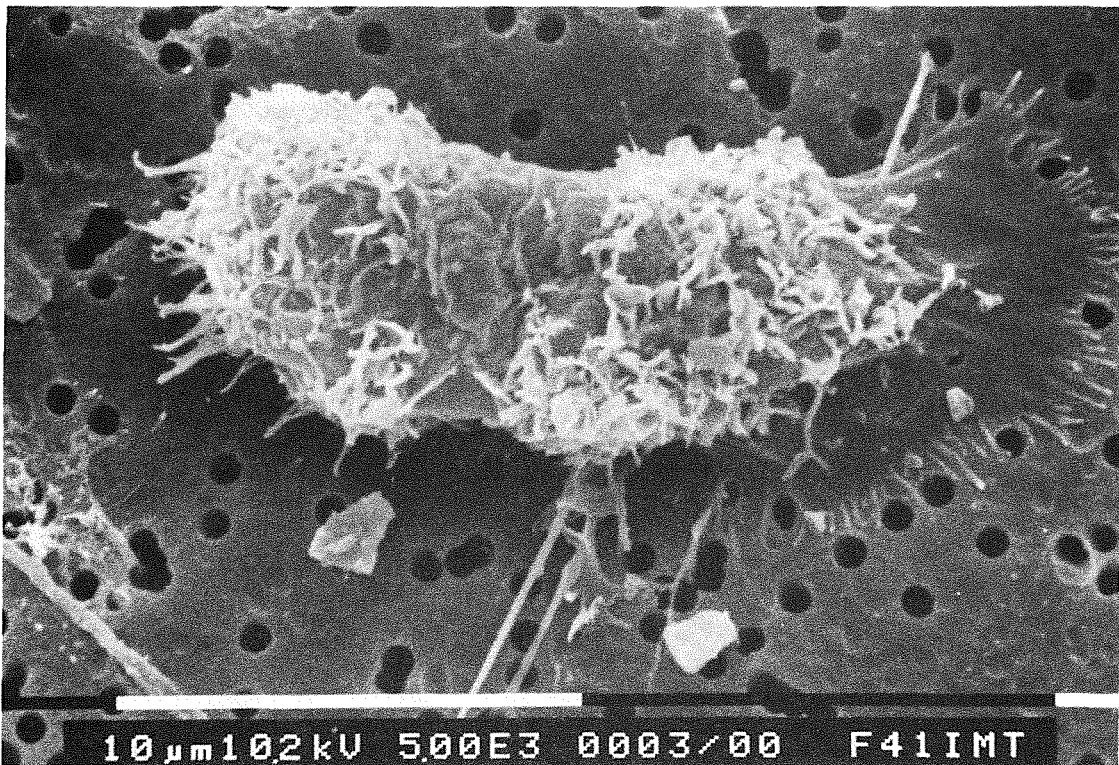


Abb. 79: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 5 Minuten Inkubation mit {123} (100 µg/ml) auf Nuclepore-Membran.

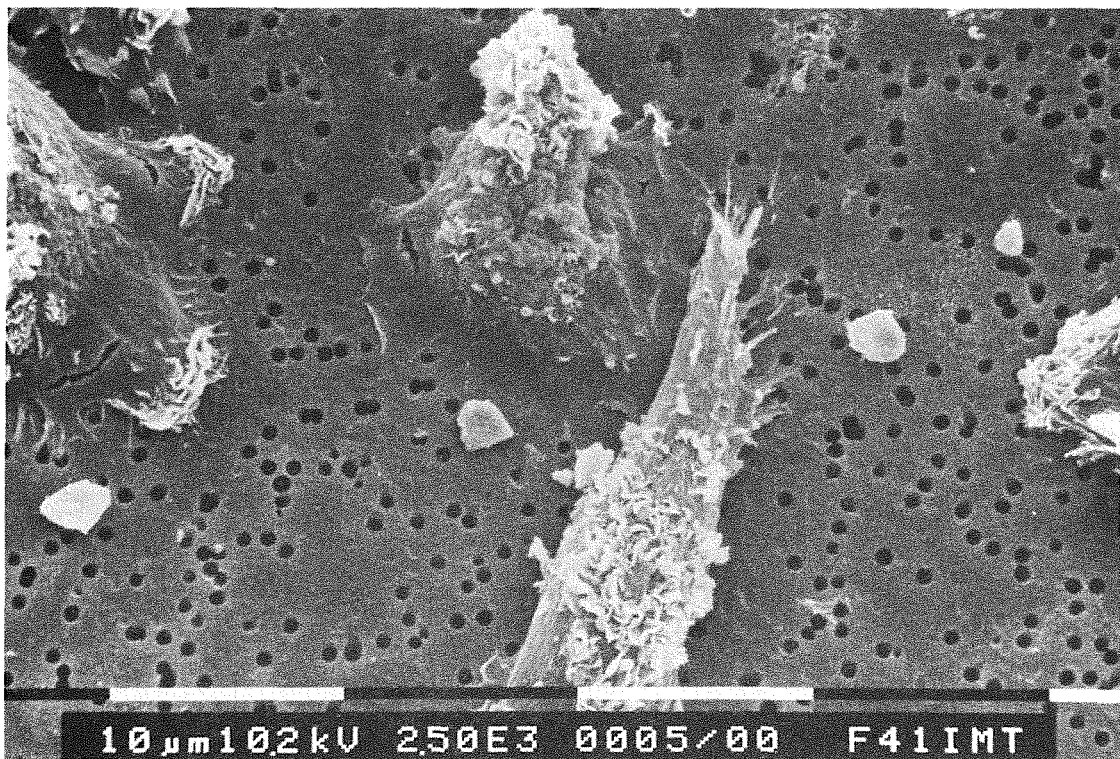


Abb. 80: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinder-Alveolarmakrophagen nach 5 Minuten Inkubation mit {123} (100 µg/ml) auf Nuclepore-Membran.

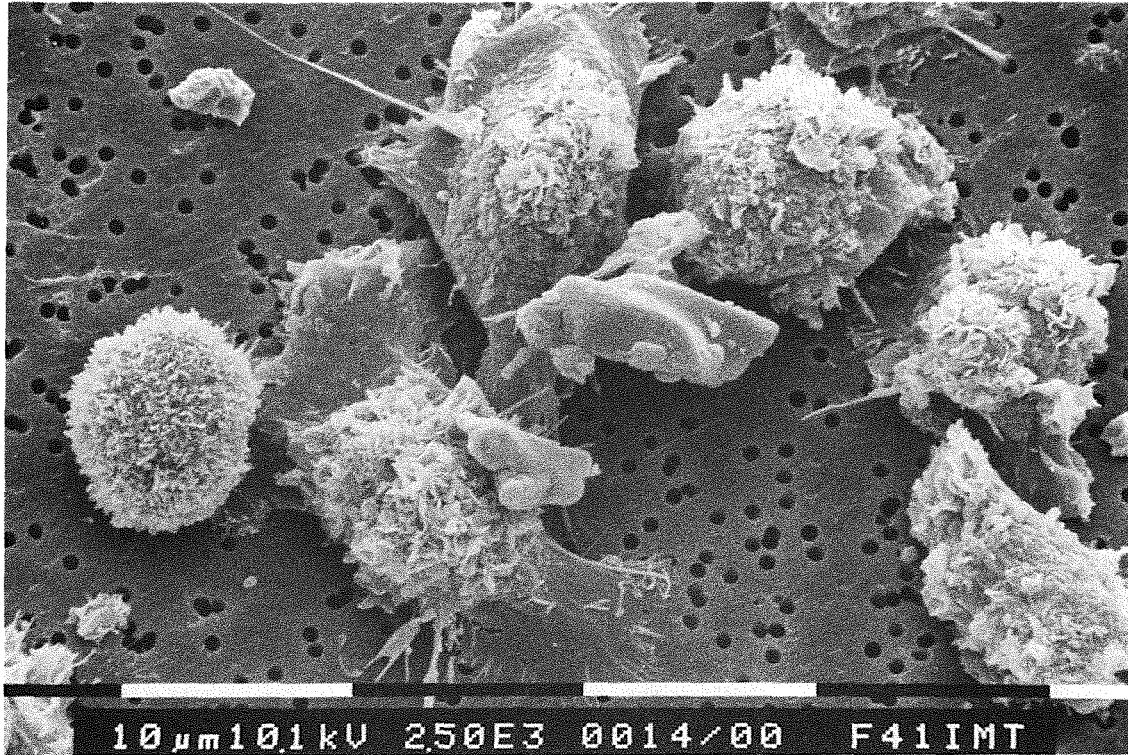


Abb. 81: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 5 Minuten Inkubation mit {123} (100 µg/ml) auf Nuclepore-Membran.

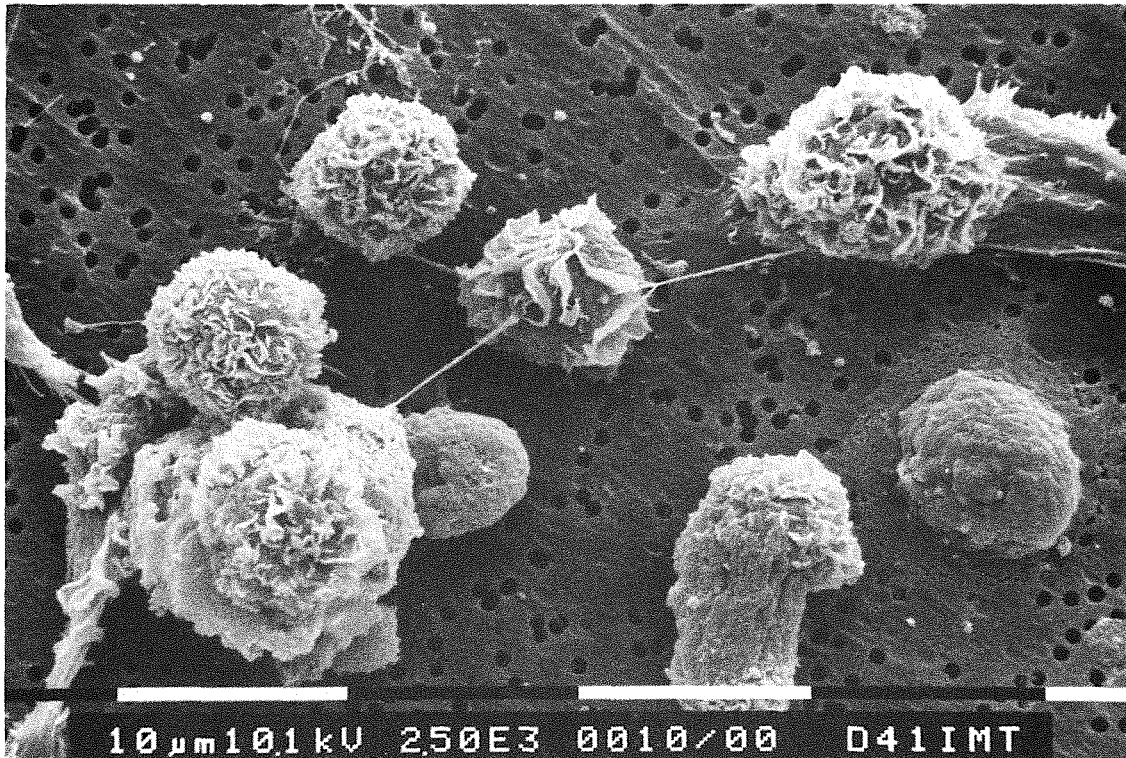


Abb. 82: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit {123} (100 µg/ml) auf Nuclepore-Membran.

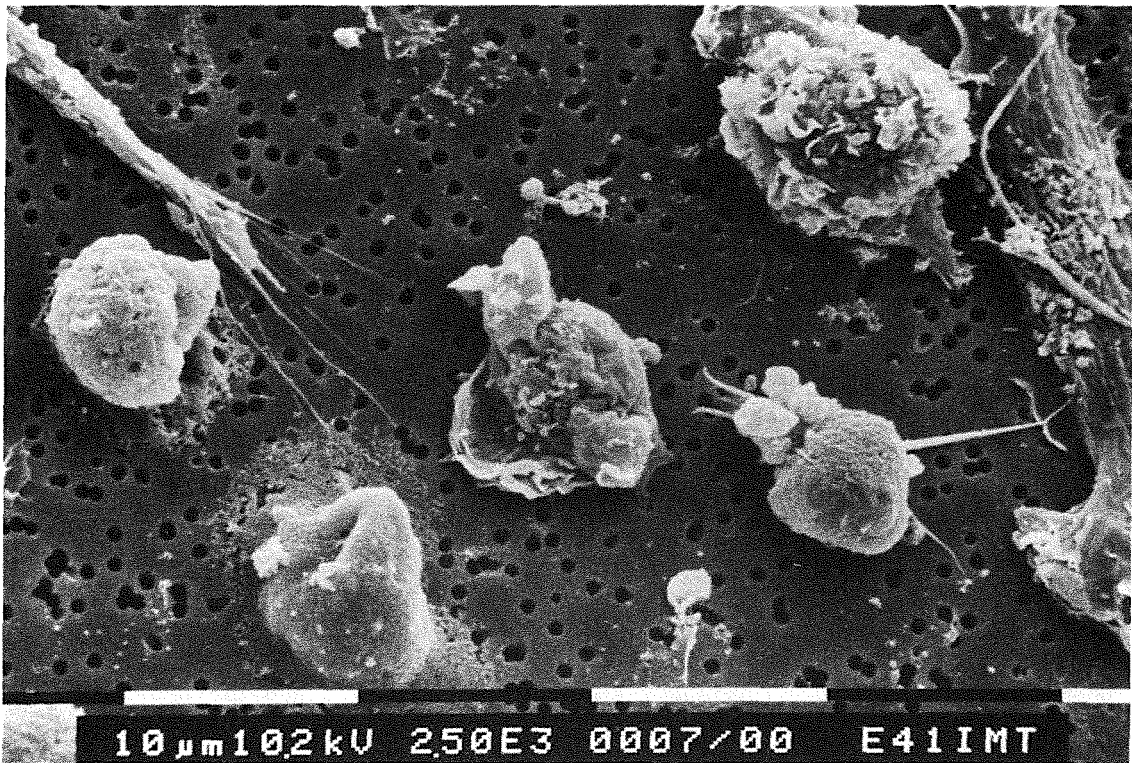


Abb. 83: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem {123} ($100 \mu\text{g/ml}$) auf Nuclepore-Membran.

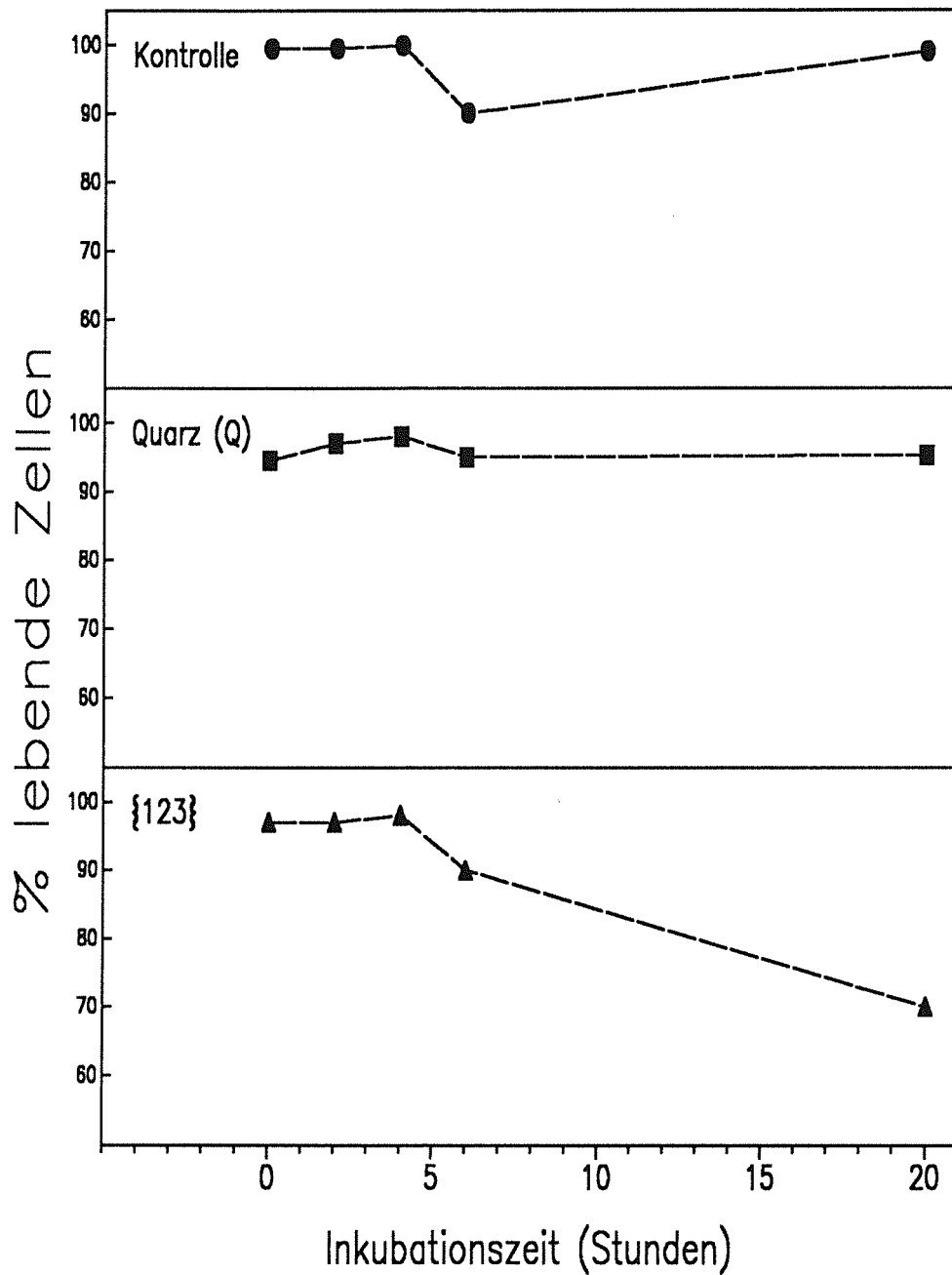


Abb. 84: Zeitliche Entwicklung der Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen unter dem Einfluß von {123} (100 µg/ml) oder Quarz Q (100 µg/ml).

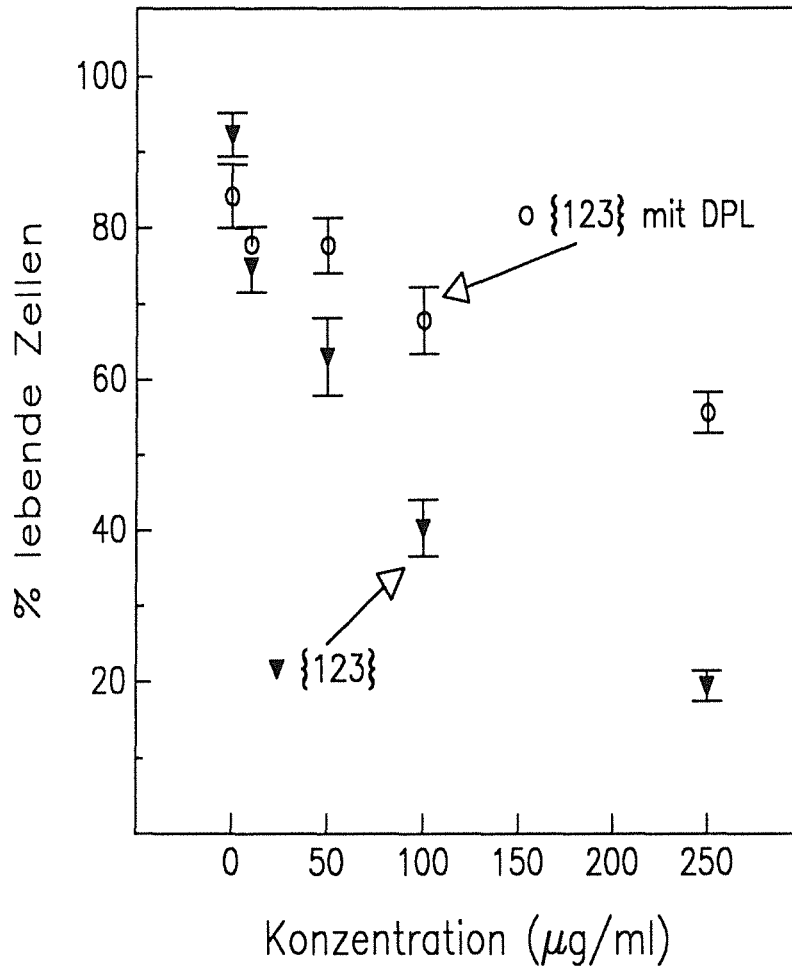


Abb. 85: Abhängigkeit der Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen von der Konzentration an {123} mit bzw. ohne DPL-Behandlung (20-stündige Inkubation). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 12).

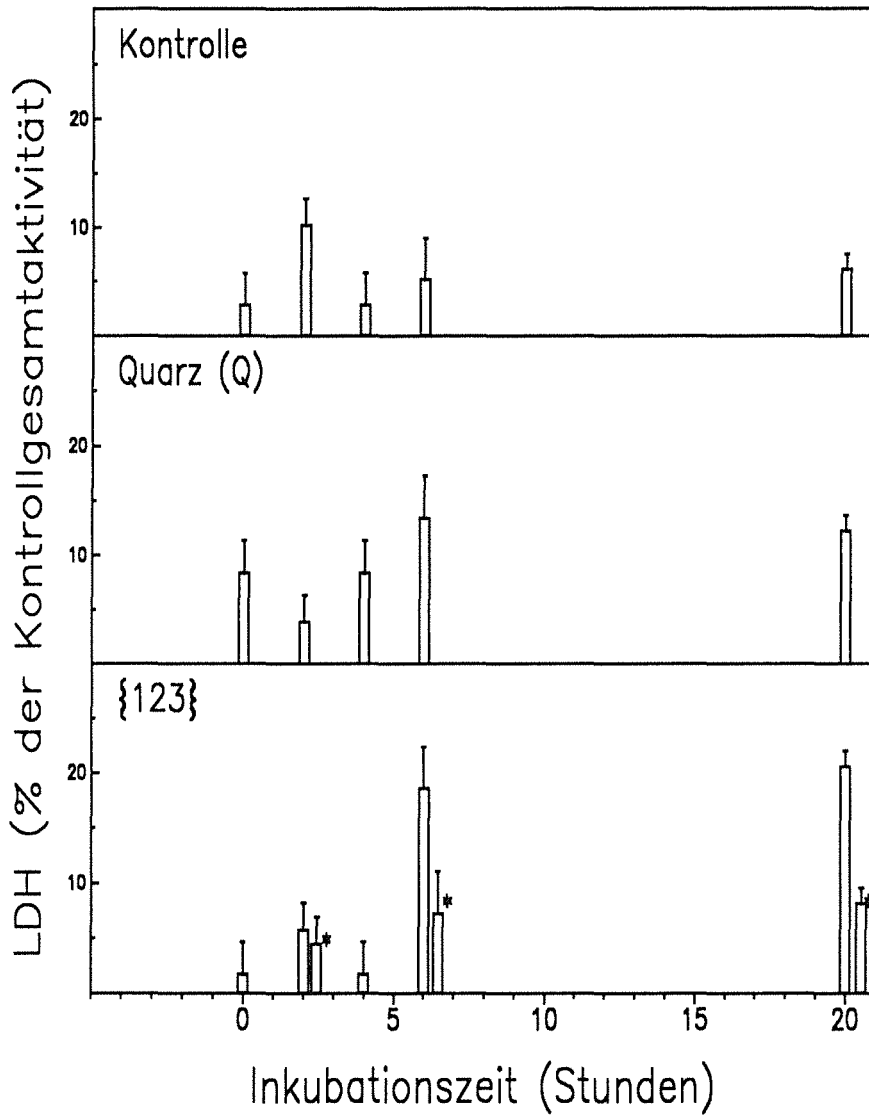


Abb. 86: Zeitliche Entwicklung der Freisetzung von LDH-Aktivität durch Rinder-Alveolarmakrophagen in den zellfreien Überstand unter dem Einfluß von {123} oder Quarz Q (je 100 μ g/ml) während einer 20-stündigen Inkubation. Werte mit DPL-Behandlung sind durch * gekennzeichnet. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3).

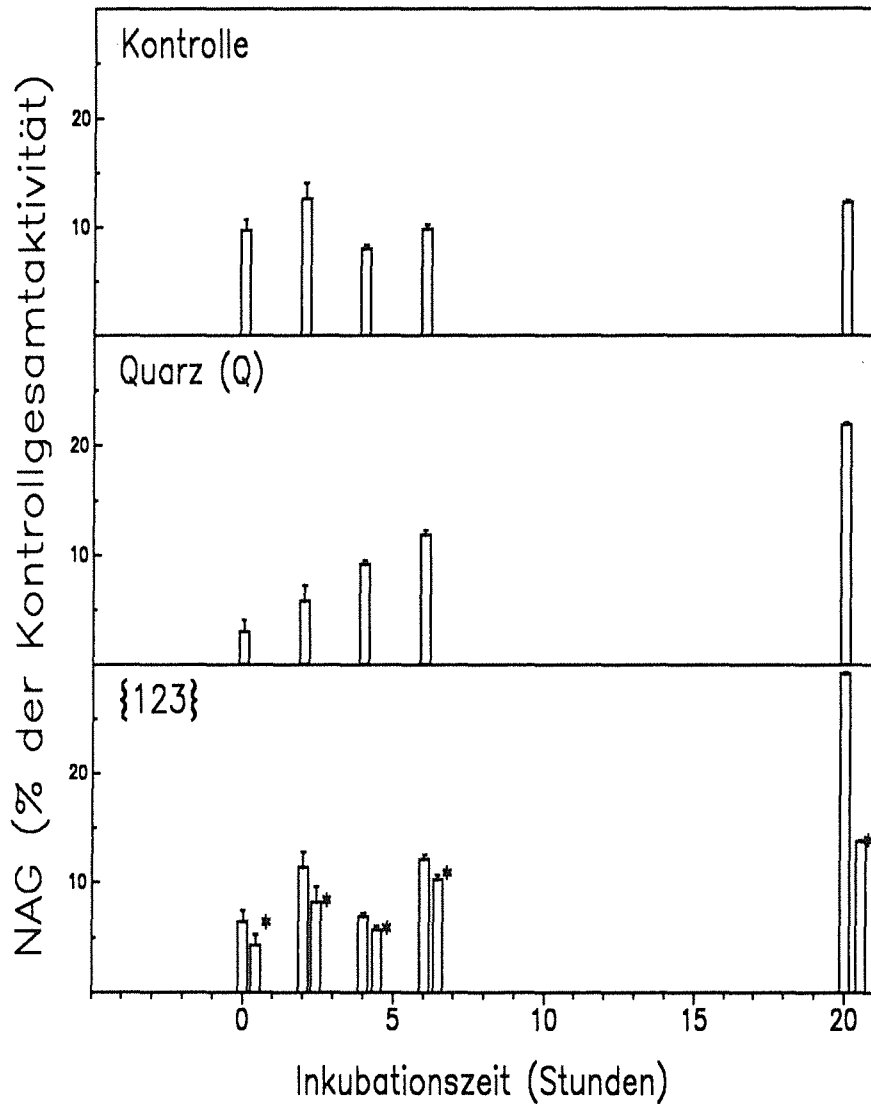


Abb. 87: Zeitliche Entwicklung der Freisetzung von NAG-Aktivität durch Rinder-Alveolarmakrophagen in den zellfreien Überstand unter dem Einfluß von {123} oder Quarz Q (je 100 μ g/ml) während einer 20-stündigen Inkubation. Werte mit DPL-Behandlung sind durch * gekennzeichnet. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3).

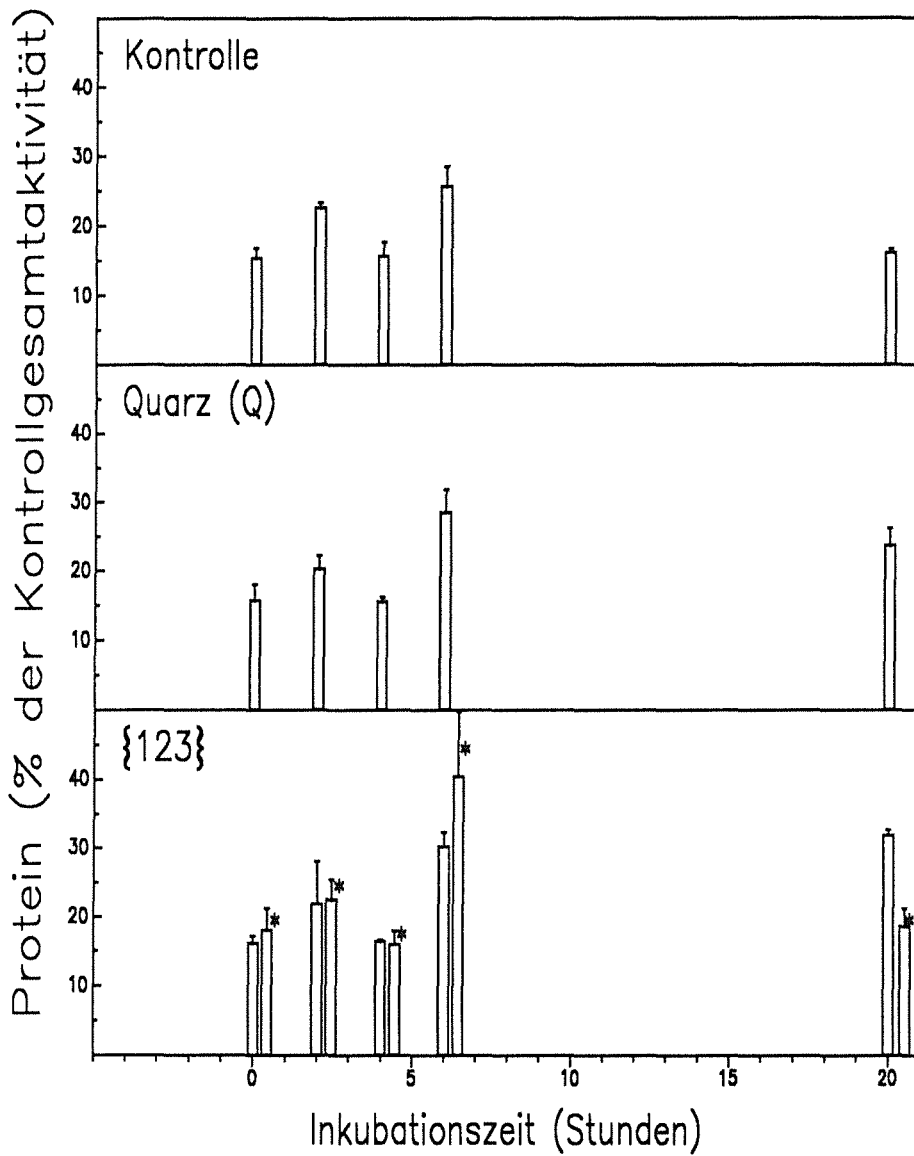


Abb. 88: Zeitliche Entwicklung der Freisetzung von zellulärem Protein durch Rinder-Alveolarmakrophagen in den zellfreien Überstand unter dem Einfluß von {123} oder Quarz Q (je $100 \mu\text{g/ml}$) während einer 20-stündigen Inkubation. Werte mit DPL-Behandlung sind durch * gekennzeichnet. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

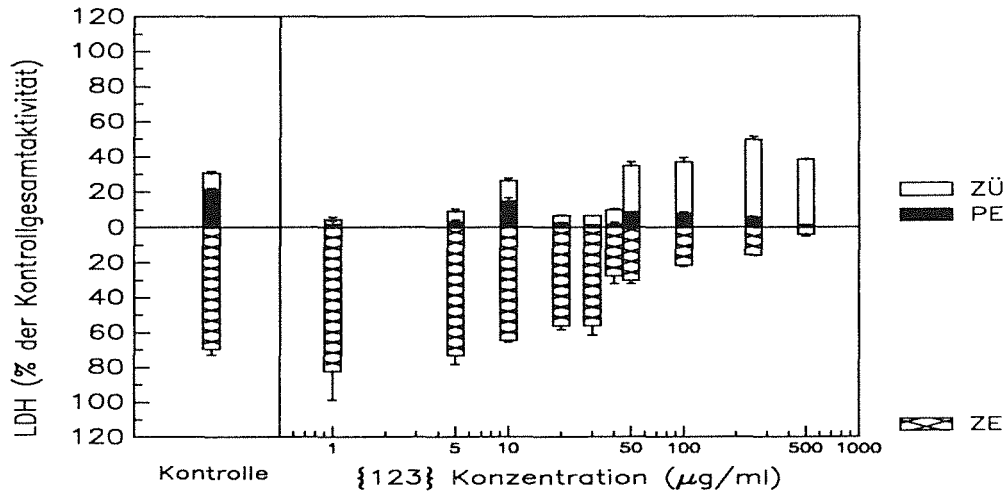


Abb. 89: Relativer Gehalt an LDH in ZE, ZÜ und PE nach 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Konzentrationen an {123}. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 12).

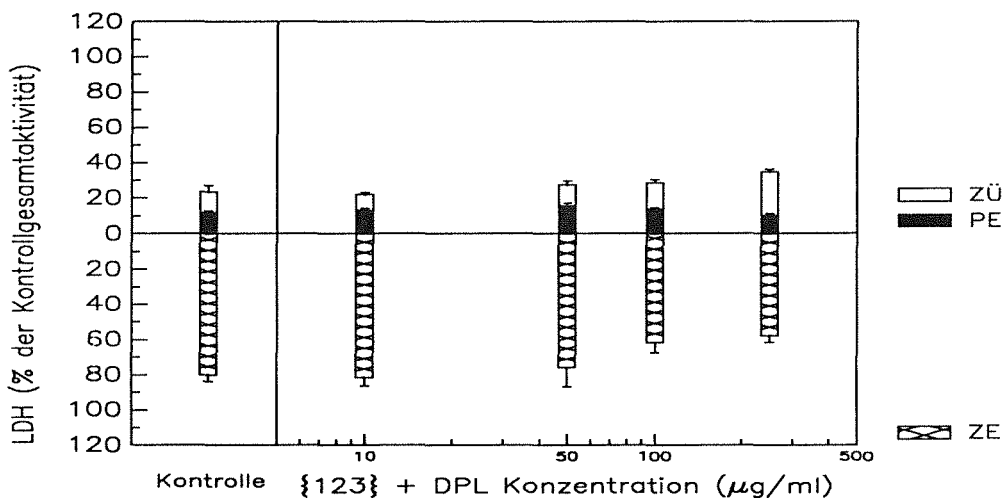


Abb. 90: Relativer Gehalt an LDH in ZE, ZÜ und PE nach 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Konzentrationen an DPL-behandeltem {123}. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 9).

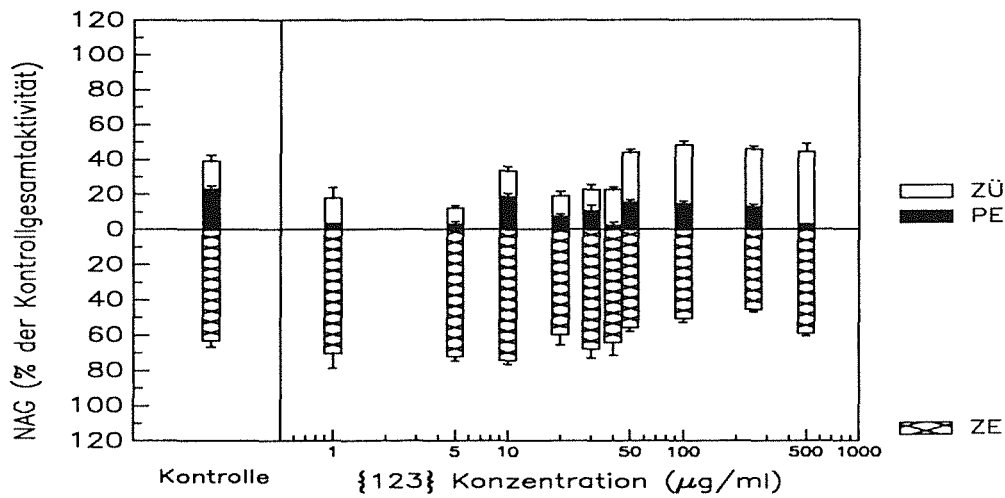


Abb. 91: Relativer Gehalt an NAG in ZE, ZÜ und PE nach 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Konzentrationen an {123}. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 9).

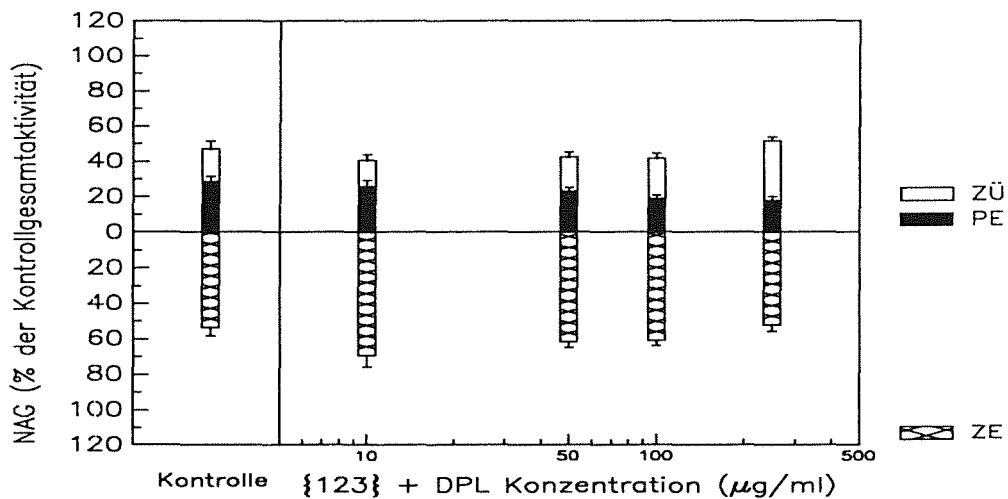


Abb. 92: Relativer Gehalt an NAG in ZE, ZÜ und PE nach 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Konzentrationen an DPL-behandeltem {123}. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 9).

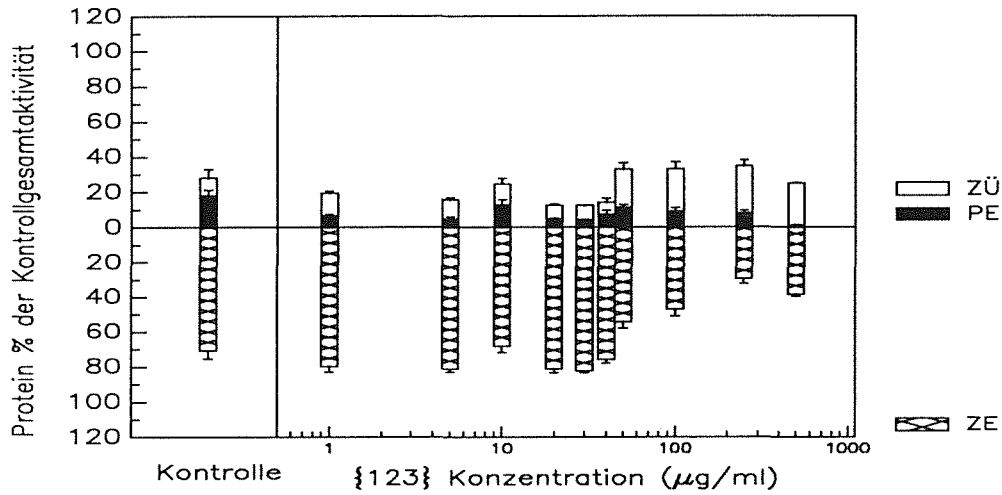


Abb. 93: Relativer Gehalt an Protein in ZE, ZÜ und PE nach 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Konzentrationen an {123}. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 6).

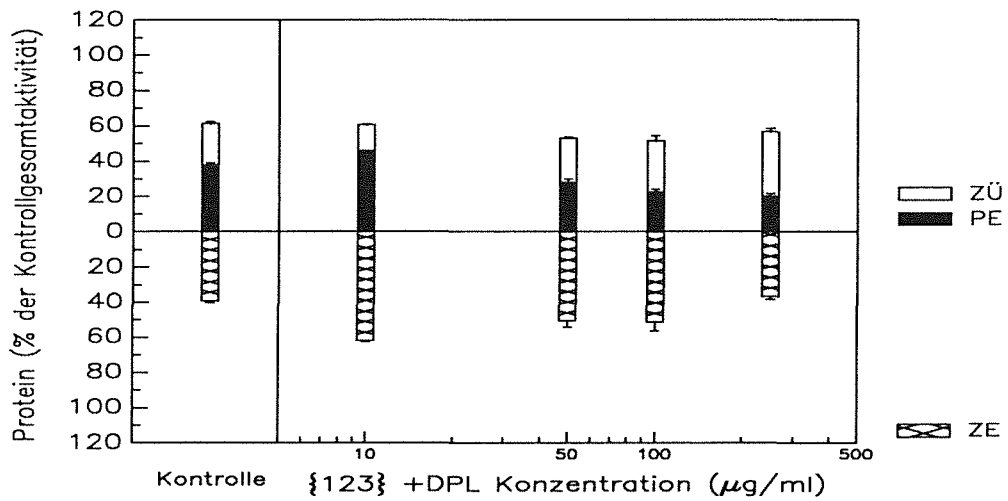


Abb. 94: Relativer Gehalt an Protein in ZE, ZÜ und PE nach 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Konzentrationen an DPL-behandeltem {123}. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 6).

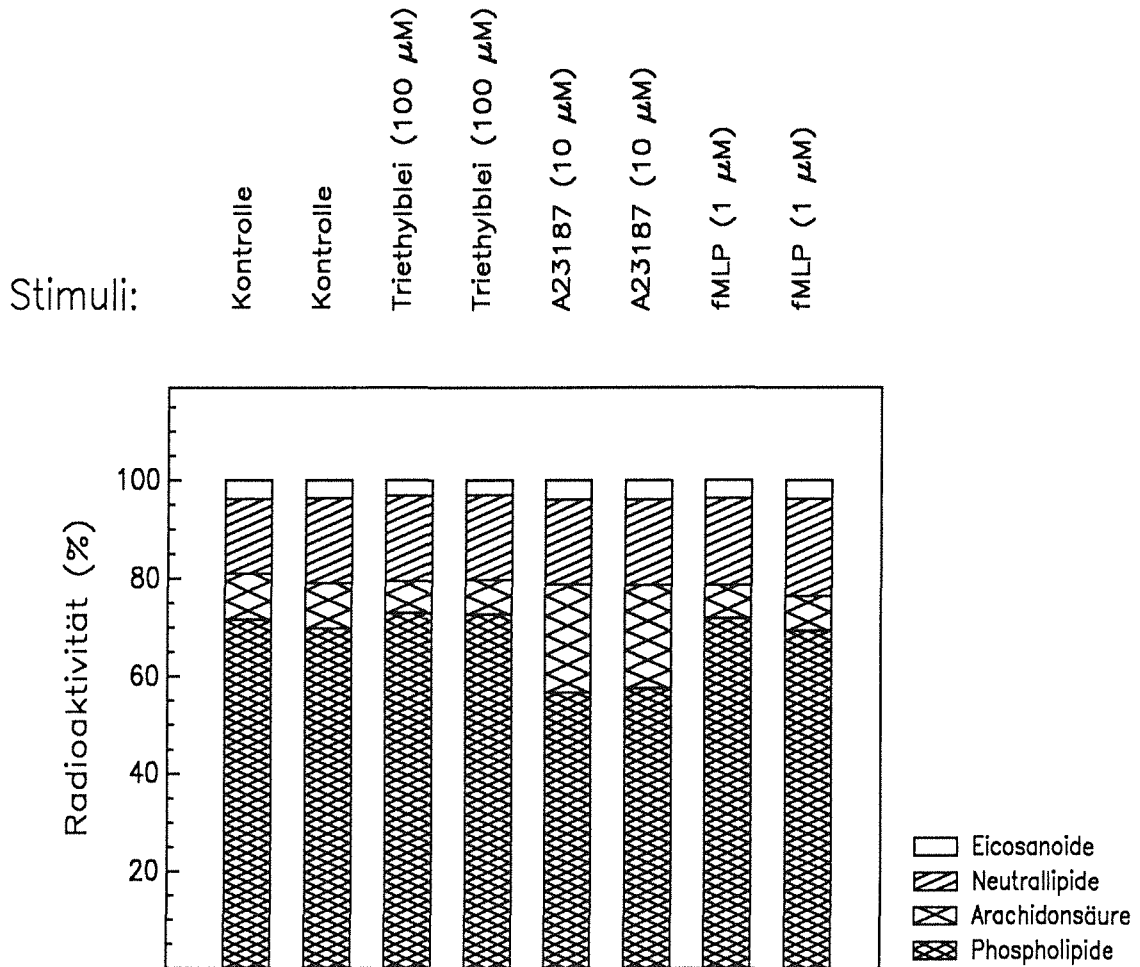


Abb. 95: Arachidonsäurefreisetzung aus Rinder-Alveolarmakrophagen durch verschiedene Stimuli. Rinder-Alveolarmakrophagen wurden 24 Stunden mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure vorbehandelt und anschließend 3 Stunden stimuliert. Trennung mittel Dünnschichtchromatographie. (Ein Versuch mit Doppelansätzen).

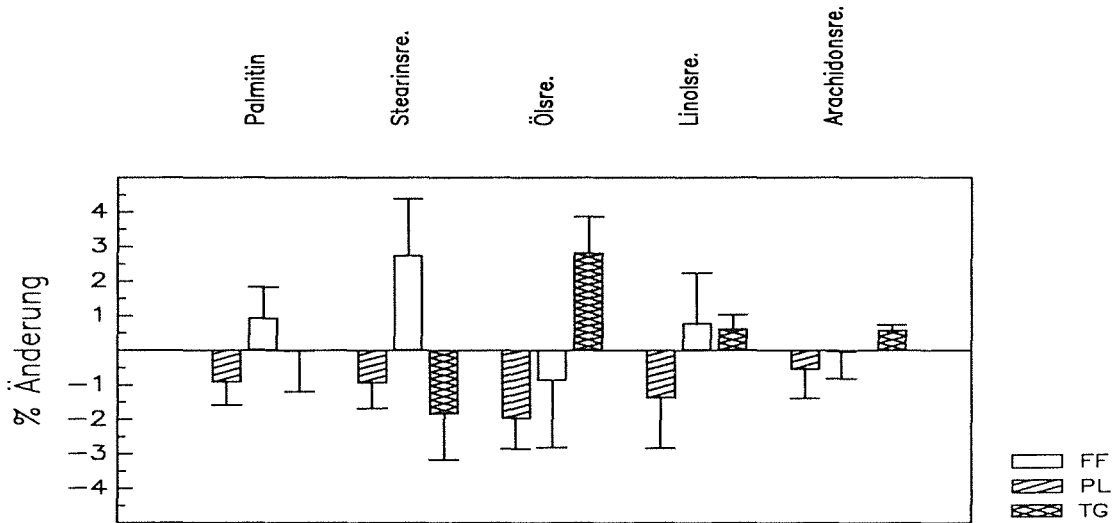


Abb. 96: Verteilung von ausgewählten Fettsäuren von Rinder-Alveolarmakrophagen, die 20 Stunden mit 10 µg/ml {123} inkubiert wurden, in die drei Fraktionen Freie Fettsäuren (FF), Phospholipide (PL) und Triglyceride (TG) (Ergebnisse von HPLC-Analysen nach Chloroform/Methanol Extraktion). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 4).

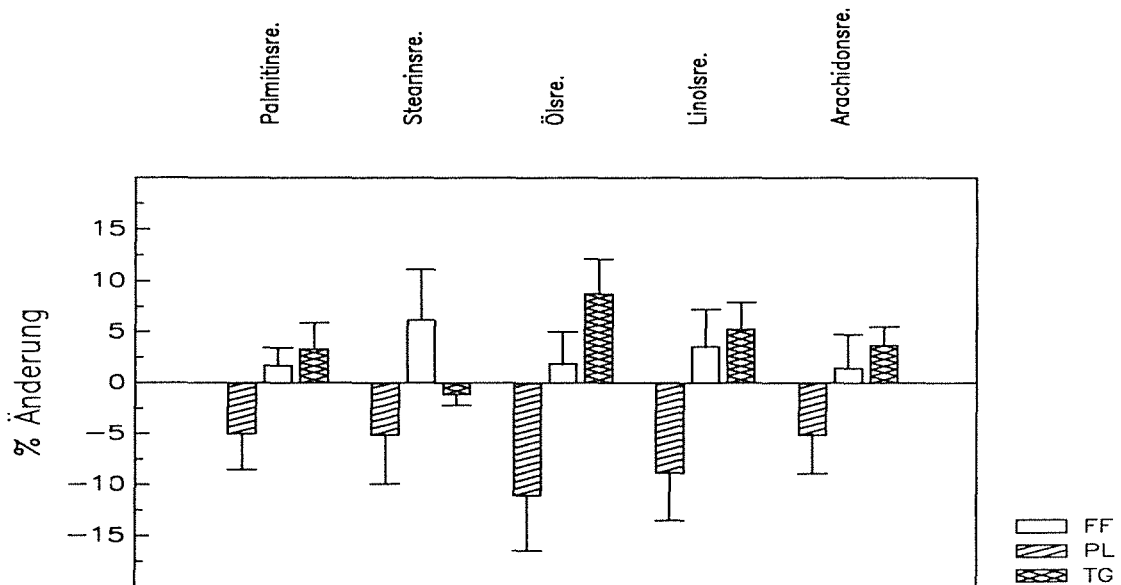


Abb. 97: Verteilung von ausgewählten Fettsäuren von Rinder-Alveolarmakrophagen, die 20 Stunden mit 100 µg/ml {123} inkubiert wurden, in die drei Fraktionen Freie Fettsäuren (FF), Phospholipide (PL) und Triglyceride (TG) (Ergebnisse von HPLC-Analysen nach Chloroform/Methanol Extraktion). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 4).

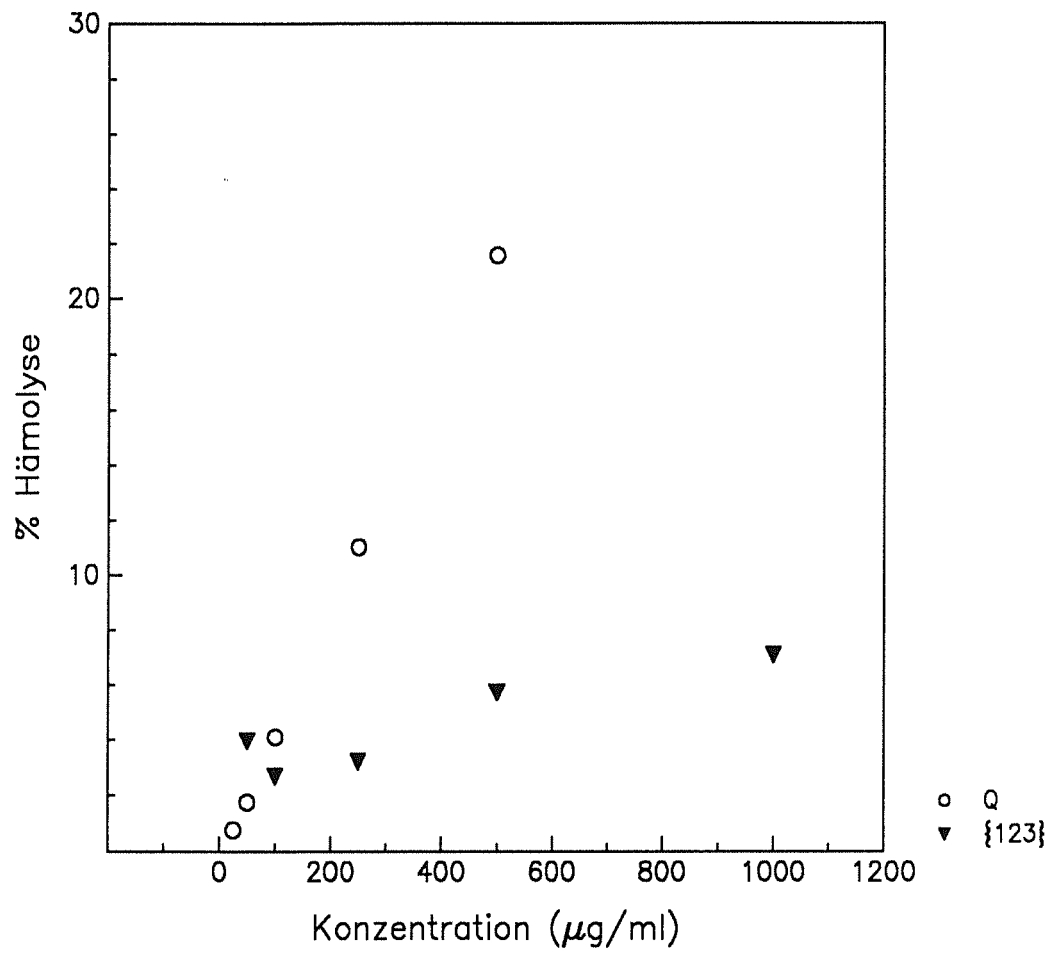


Abb. 98: Vergleich der durch Quarz (Q) und {123} verursachten Hämolyse von Erythrozyten (Repräsentativ für drei Experimente).

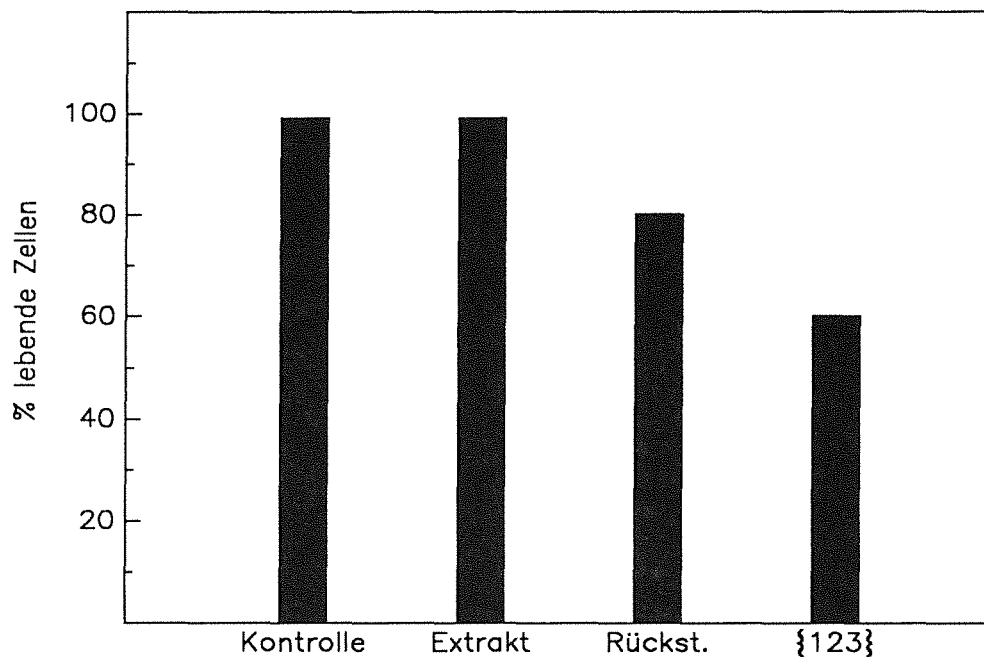


Abb. 99: Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation mit {123}, Extrakt von {123} mit RPMI-1640 für 1 Stunde bei Raumtemperatur und Rückstand aus der Extraktion. (Repräsentativ für 2 Experimente).

Probe	Zeit	Konz.	Ba ²⁺ (µg/ml)	Cu ²⁺ (µg/ml)	γ ³⁺ (µg/ml)
Aqua	1h	500 mg/ml	520	0,16	0,9
KM2	2h	100 µg/ml	0,19	0,33	0,2
KM2	20h	100 µg/ml	0,83	1,1	< 0,2
RAM	20h	100 µg/ml	1,1	0,80	< 0,2

Abb. 100: Gehalt an gelösten Einzelkomponenten in der Flüssigkeitsphase nach Inkubation von {123} in Aqua bidest., KM2 für 2 Stunden, KM2 für 20 Stunden und KM2 in Anwesenheit von Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) (Ein Experiment).

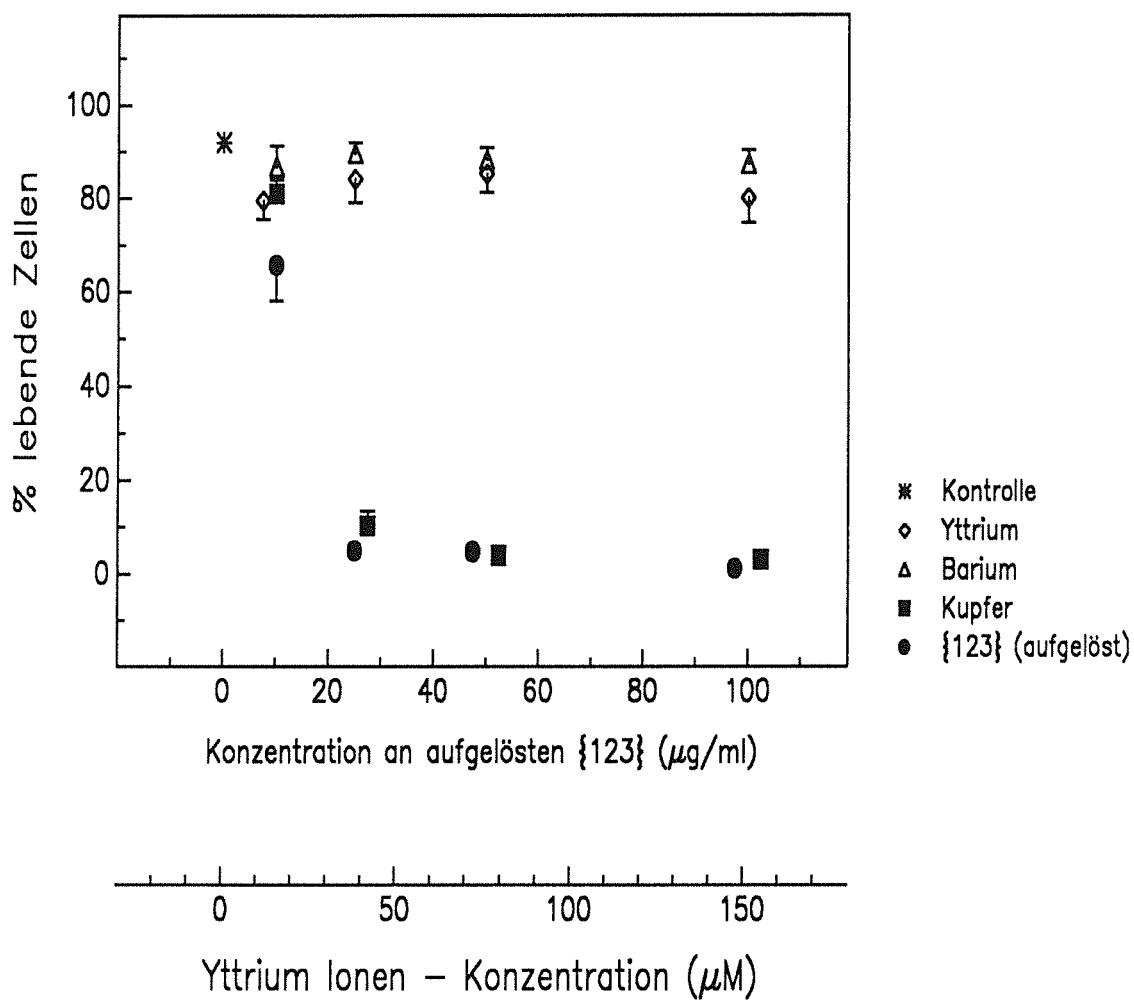


Abb. 101: Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation mit Einzelbestandteilen von {123} oder aufgelöstem {123}. Die Konzentration an Barium entspricht dem Doppelten, an Kupfer dem Dreifachen der unten angegebenen Yttrium-Konzentration. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 6). Fehlerbalken, die kleiner als der Meßpunkt waren, wurden nicht gezeichnet.

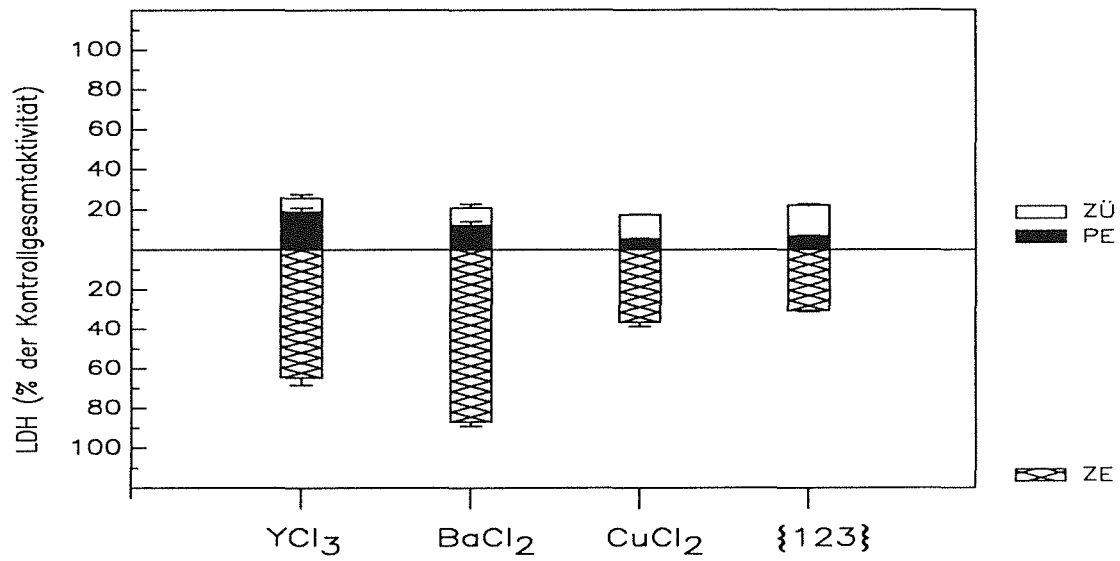


Abb. 102: Verteilung der LDH von Rinder-Alveolarmakrophagen in ZE, ZÜ und PE nach 20-stündiger Inkubation mit aufgelöstem {123} (10 µg/ml) bzw. der Chloride von dessen Einzelbestandteilen (YCl₃ 15 µM; BaCl₂ 30 µM; CuCl₂ 45 µM). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3).

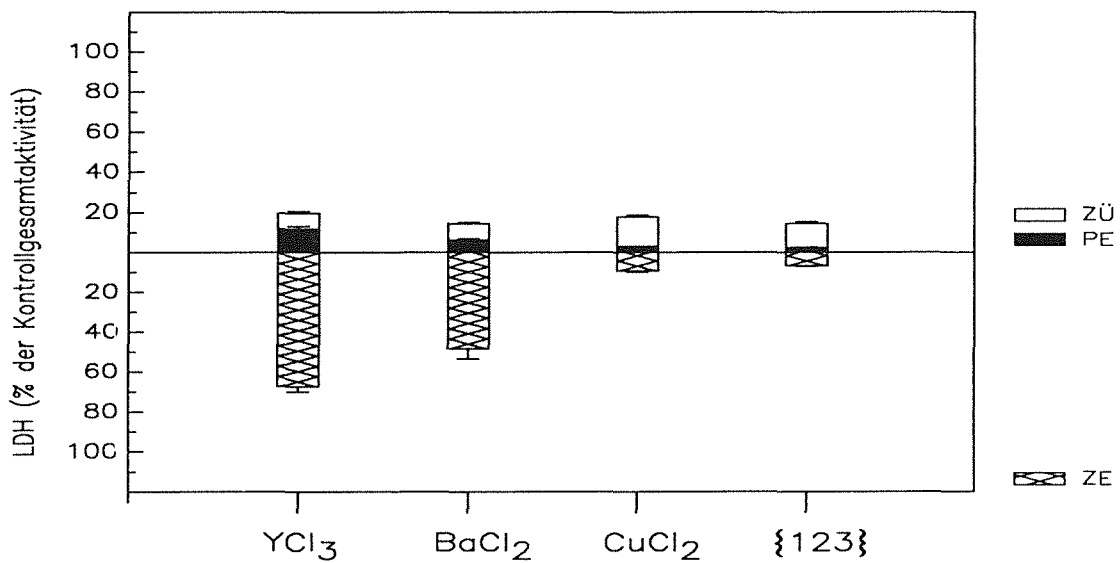


Abb. 103: Verteilung der LDH von Rinder-Alveolarmakrophagen in ZE, ZÜ und PE nach 20-stündiger Inkubation mit aufgelöstem {123} (100 µg/ml) bzw. der Chloride von dessen Einzelbestandteilen (YCl₃ 150 µM; BaCl₂ 300 µM; CuCl₂ 450 µM). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3).

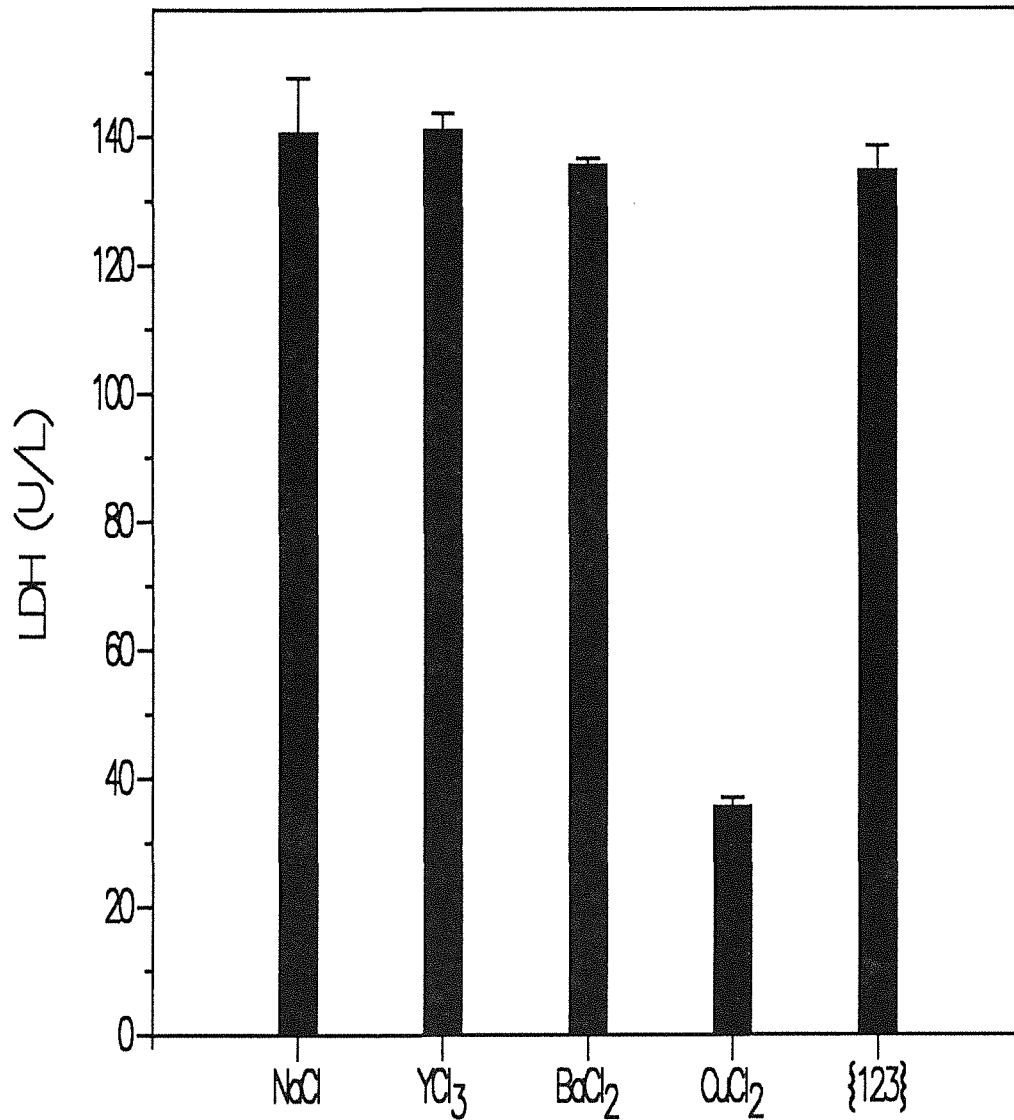


Abb. 104: Verminderung der meßbaren LDH-Aktivität durch verschiedene Ionen (je 50 μ M) oder {123} (100 μ g/ml) (Cytosol von Rinder-Alveolarmakrophagen wurde 20 Minuten bei 37° C mit den Komponenten inkubiert und anschließend die LDH-Aktivität bestimmt. Als Kontrolle diente 0,9%ige NaCl-Lösung). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3).

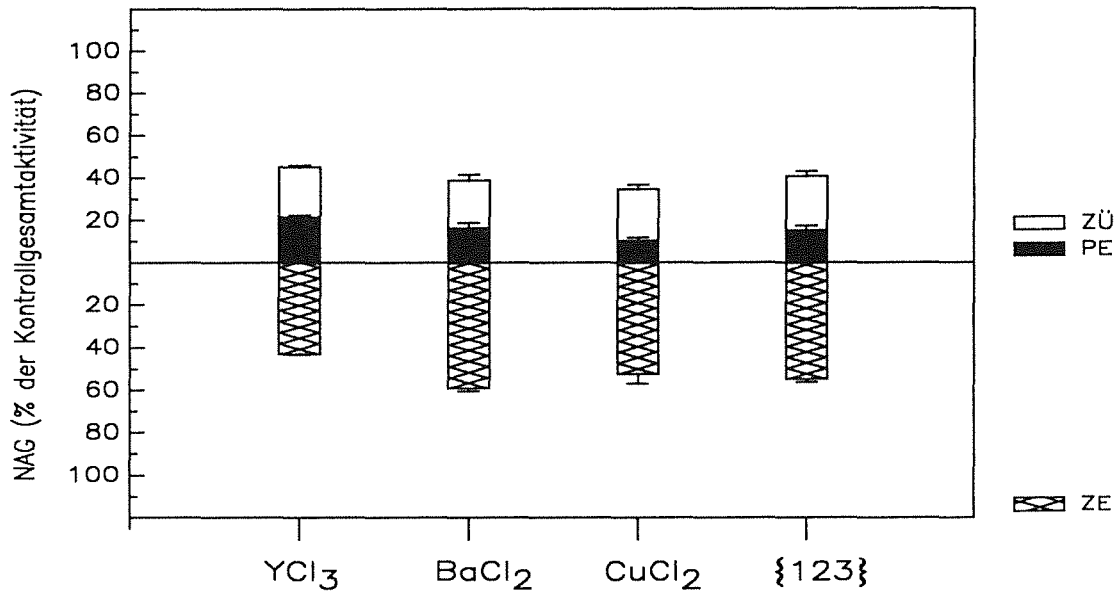


Abb. 105: Verteilung der NAG von Rinder-Alveolarmakrophagen in ZE, ZÜ und PE nach 20-stündiger Inkubation mit aufgelöstem {123} ($10 \mu\text{g/ml}$) bzw. der Chloride von dessen Einzelbestandteilen (YCl_3 $15 \mu\text{M}$; $BaCl_2$ $30 \mu\text{M}$; $CuCl_2$ $45 \mu\text{M}$). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

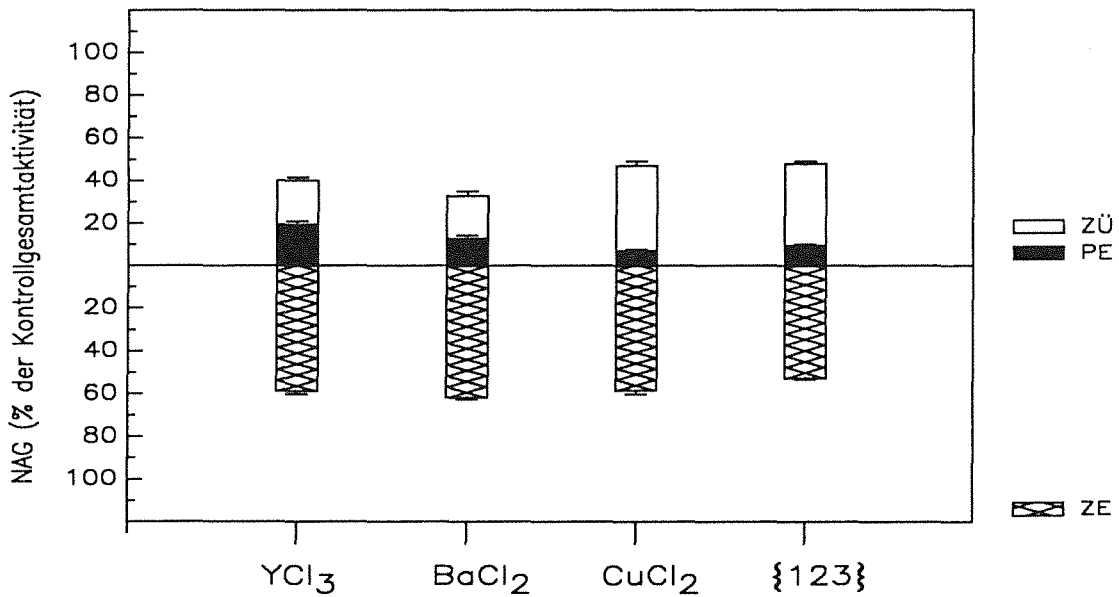


Abb. 106: Verteilung der NAG von Rinder-Alveolarmakrophagen in ZE, ZÜ und PE nach 20-stündiger Inkubation mit aufgelöstem {123} ($100 \mu\text{g/ml}$) bzw. der Chloride von dessen Einzelbestandteilen (YCl_3 $150 \mu\text{M}$; $BaCl_2$ $300 \mu\text{M}$; $CuCl_2$ $450 \mu\text{M}$). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

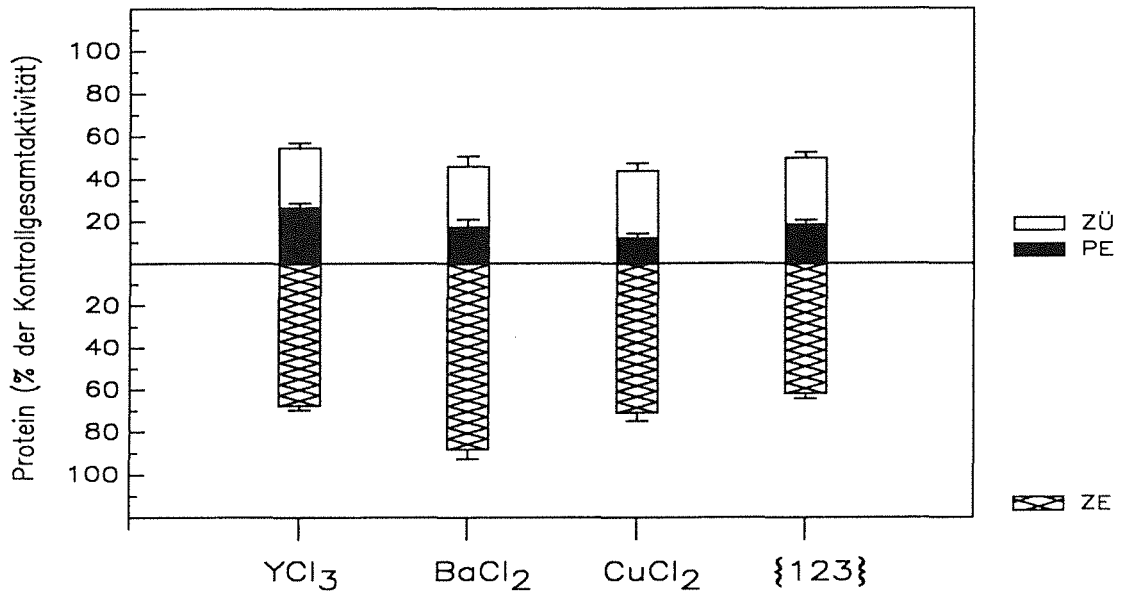


Abb. 107: Verteilung des Proteins von Rinder-Alveolarmakrophagen in ZE, ZÜ und PE nach 20 stündiger Inkubation mit aufgelöstem $\{123\}$ ($10 \mu\text{g/ml}$) bzw. der Chloride von dessen Einzelbestandteilen (YCl_3 $15 \mu\text{M}$; $BaCl_2$ $30 \mu\text{M}$; $CuCl_2$ $45 \mu\text{M}$). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

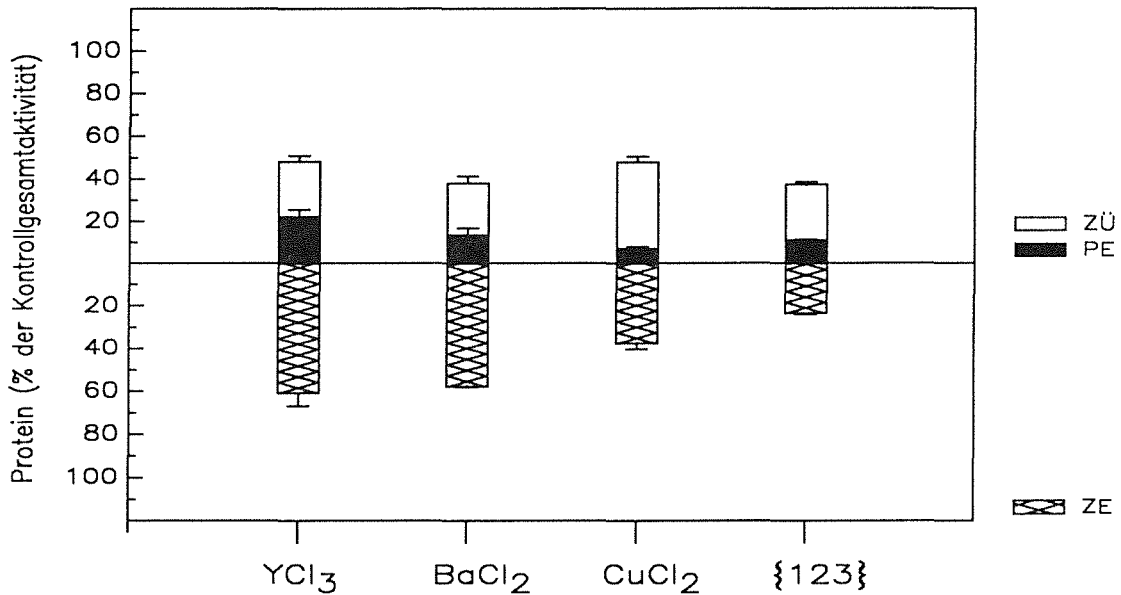


Abb. 108: Verteilung des Proteins von Rinder-Alveolarmakrophagen in ZE, ZÜ und PE nach 20 stündiger Inkubation mit aufgelöstem $\{123\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) bzw. der Chloride von dessen Einzelbestandteilen (YCl_3 $150 \mu\text{M}$; $BaCl_2$ $300 \mu\text{M}$; $CuCl_2$ $450 \mu\text{M}$). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

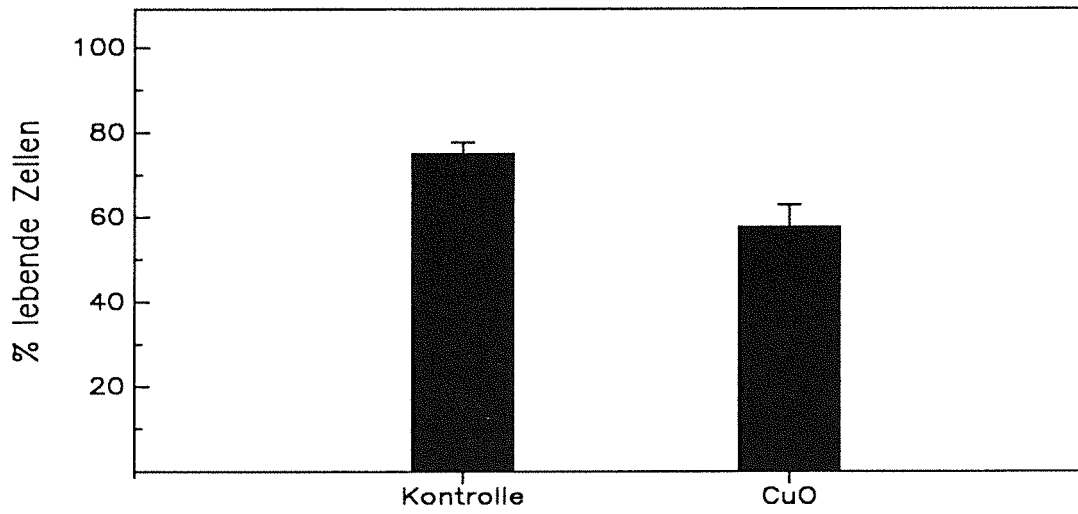


Abb. 109: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit $36 \mu\text{g/ml}$ CuO auf die Vitalität. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

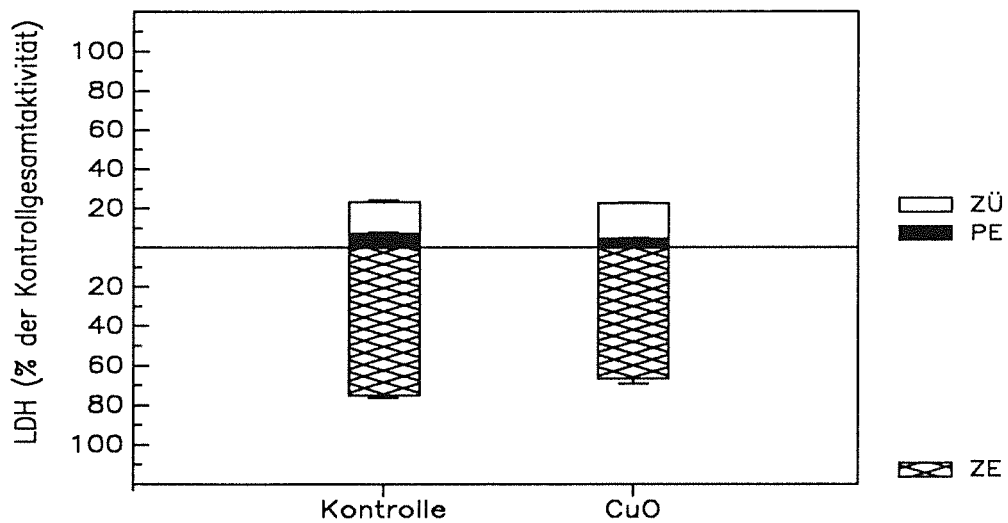


Abb. 110: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit $36 \mu\text{g/ml}$ CuO auf die Verteilung der LDH in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

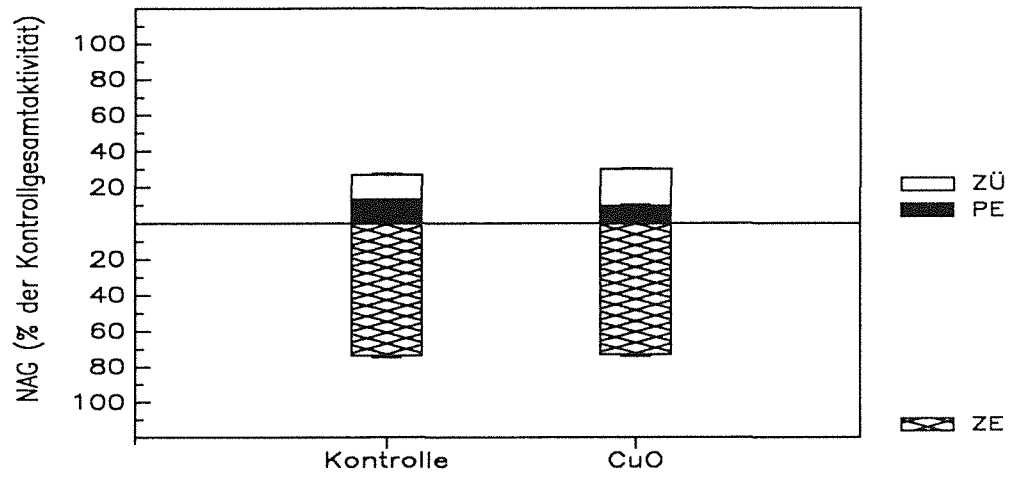


Abb. 111: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit $36 \mu\text{g/ml}$ CuO auf die Verteilung der NAG in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

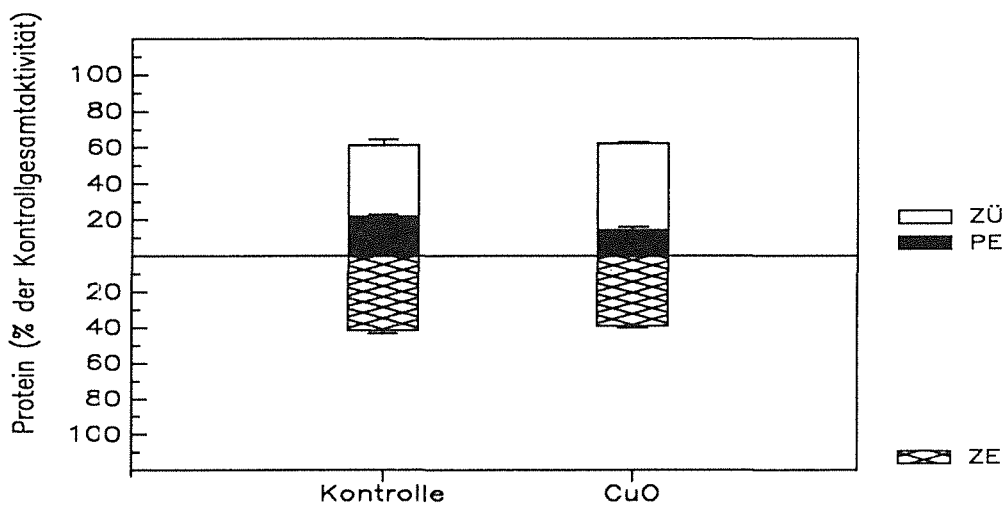


Abb. 112: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit $36 \mu\text{g/ml}$ CuO auf die Verteilung des zellulären Proteins in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

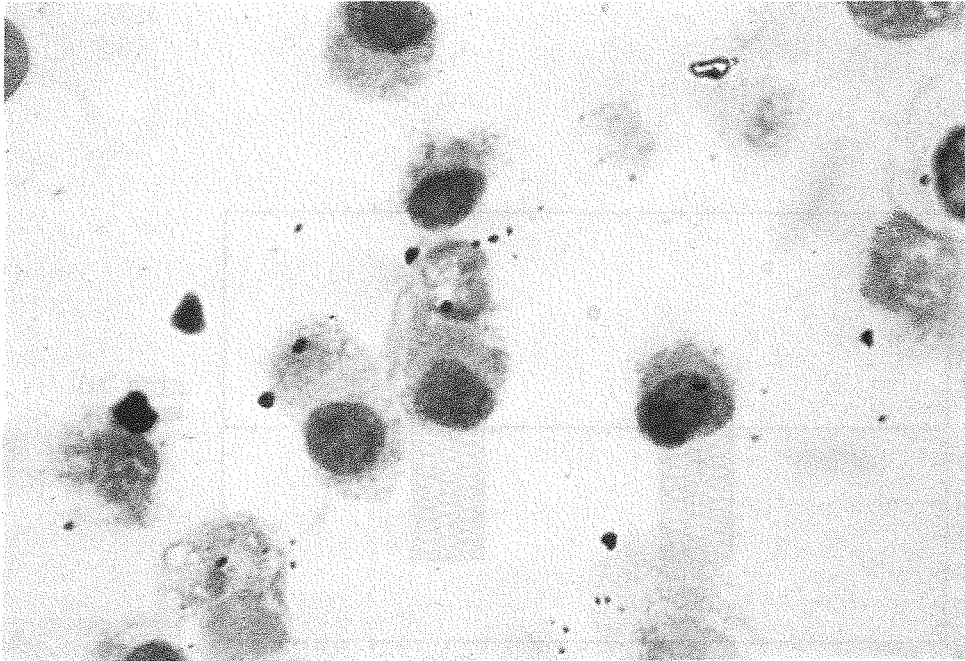


Abb. 113: Rinder-Alveolarmakrophagen, lichtmikroskopische Aufnahme nach 20 Stunden Inkubation mit {123} ($100\ \mu\text{g/ml}$) im Monolayer auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

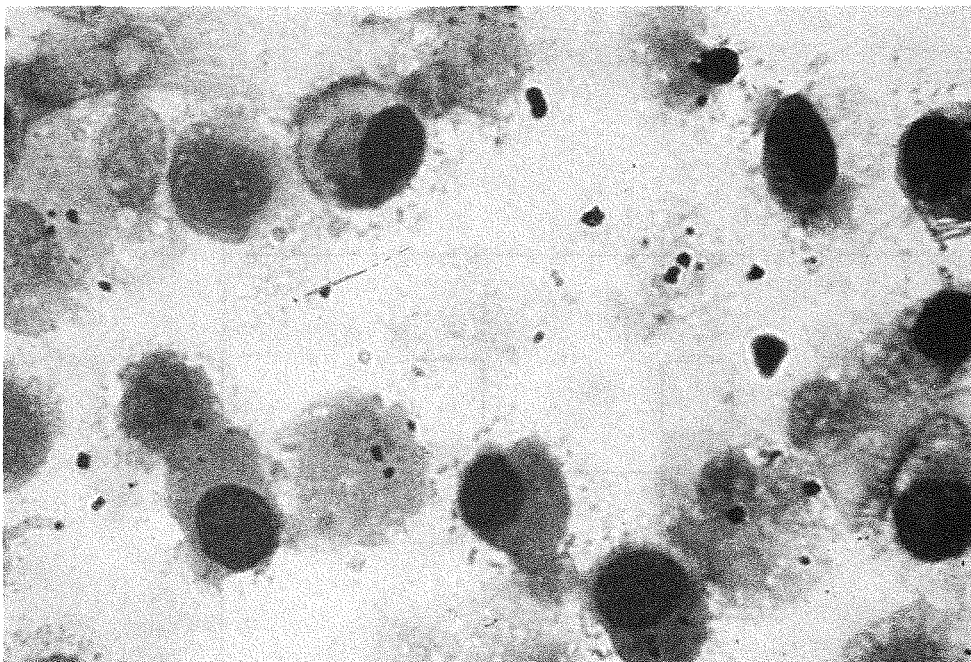


Abb. 114: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit LaBaCuO ($100\ \mu\text{g/ml}$) im Monolayer auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

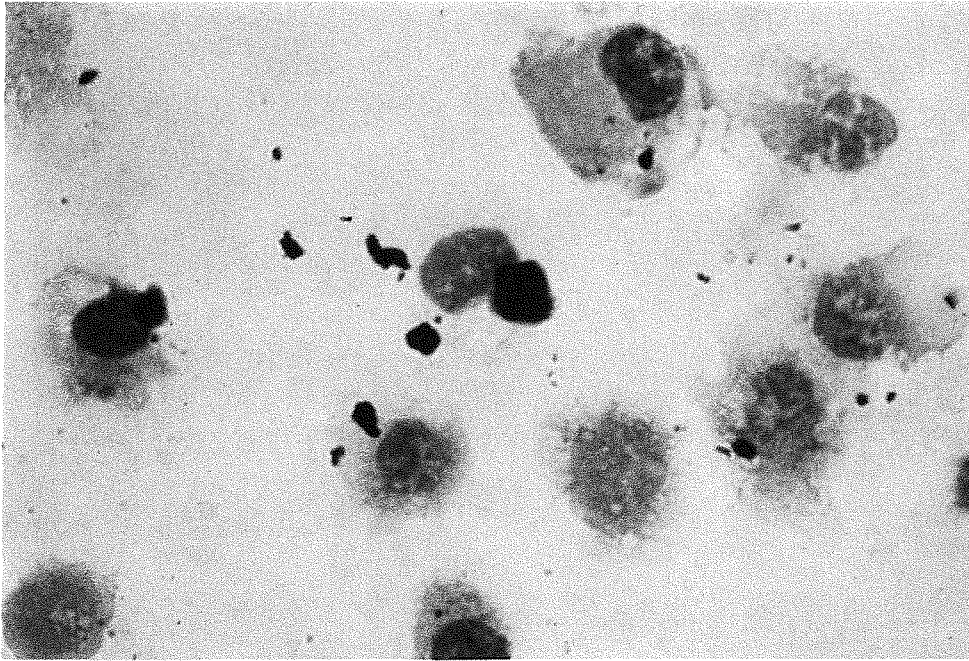


Abb. 115: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit $\{123\}^*$ ($100 \mu\text{g/ml}$) im Monolayer auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

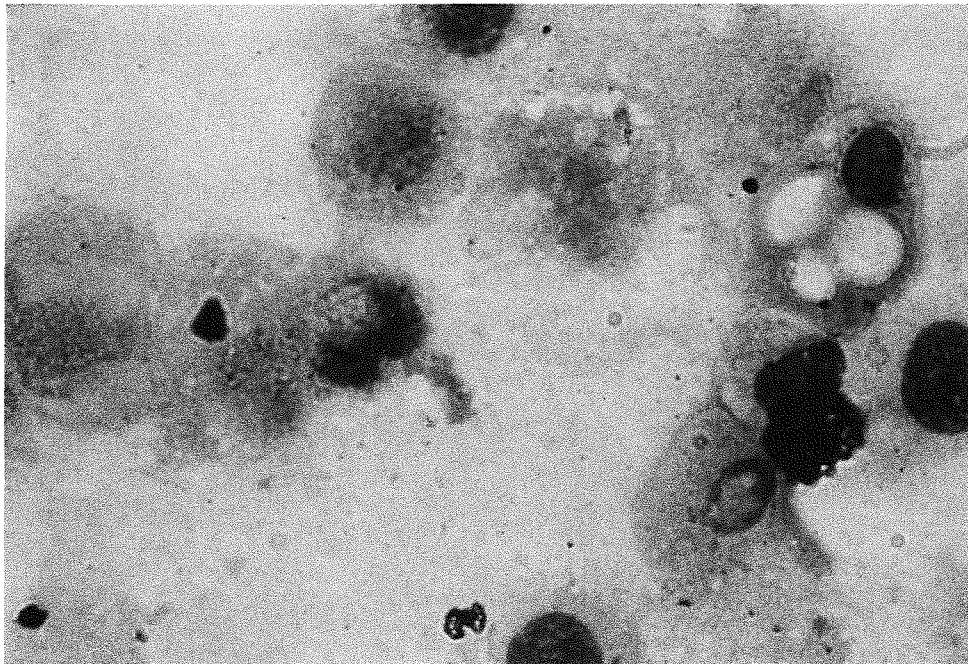


Abb. 116: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit $\{111\}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) im Monolayer auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

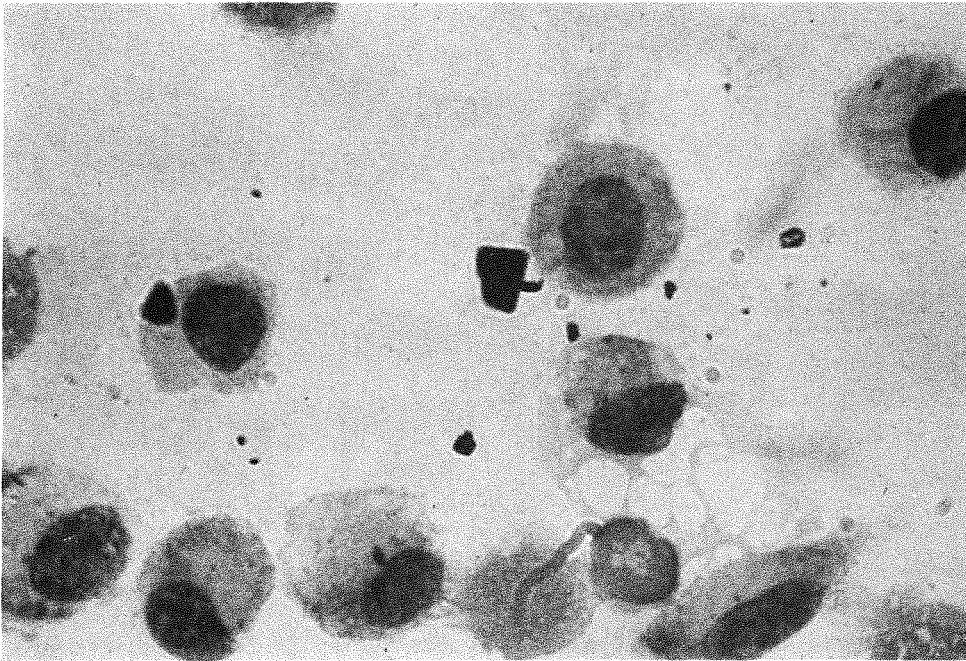


Abb. 117: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem {123} ($100 \mu\text{g/ml}$) im Monolayer auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

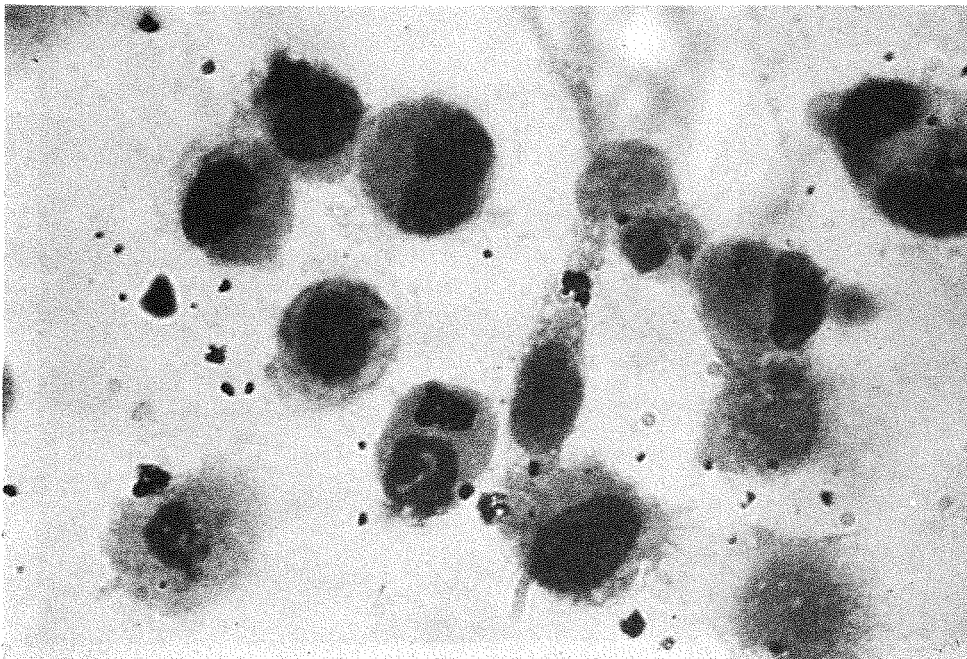


Abb. 118: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem LaBaCuO ($100 \mu\text{g/ml}$) im Monolayer auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

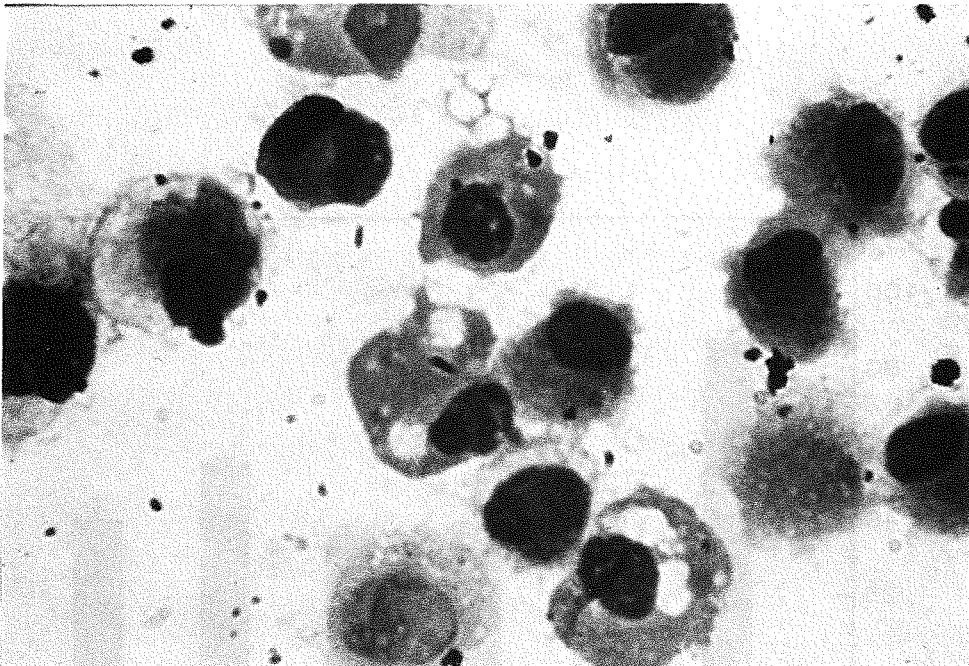


Abb. 119: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem {123}* (100 µg/ml) im Monolayer auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

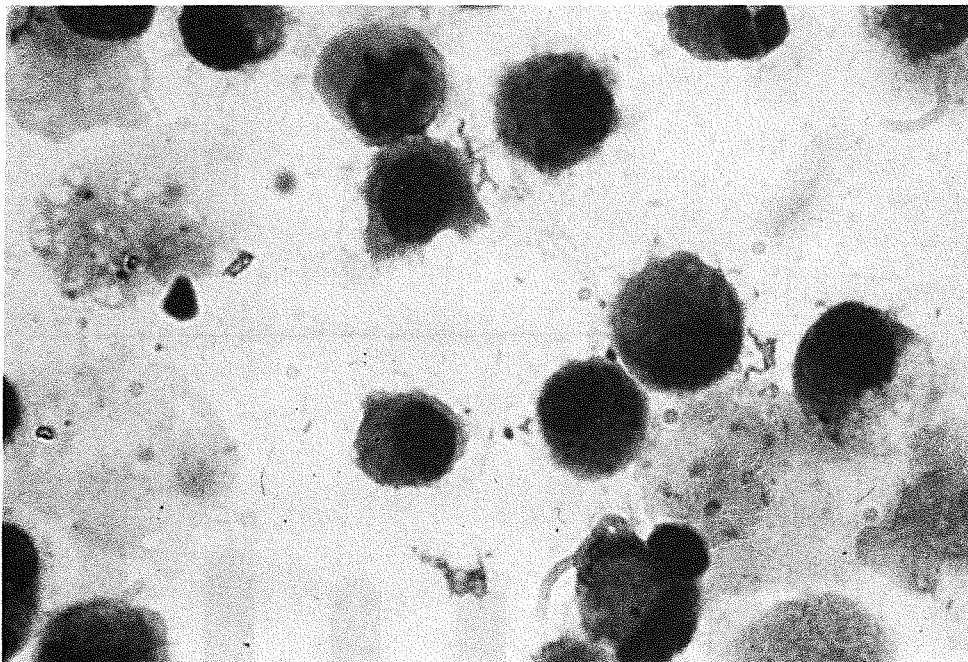


Abb. 120: Lichtmikroskopische Aufnahme von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem {111} (100 µg/ml) im Monolayer auf Deckglas. Vergrößerung: x 1400.

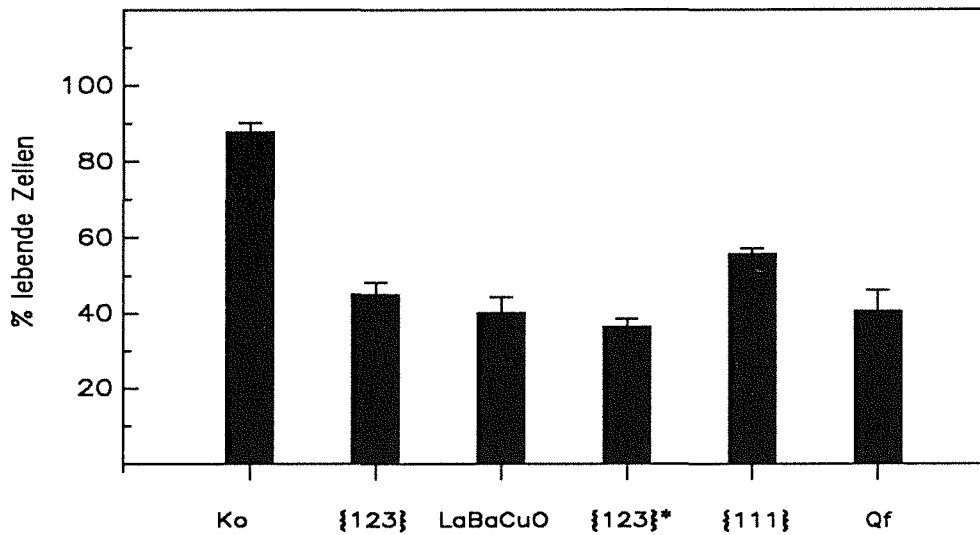


Abb. 121: Einfluß von 20 Stunden Inkubation mit den Stäuben {123}, LaBaCuO, {123}^{*}, {111} und Quarz Qf (je 100 µg/ml) auf die Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 9; für {123} und Kontrolle: n = 12).

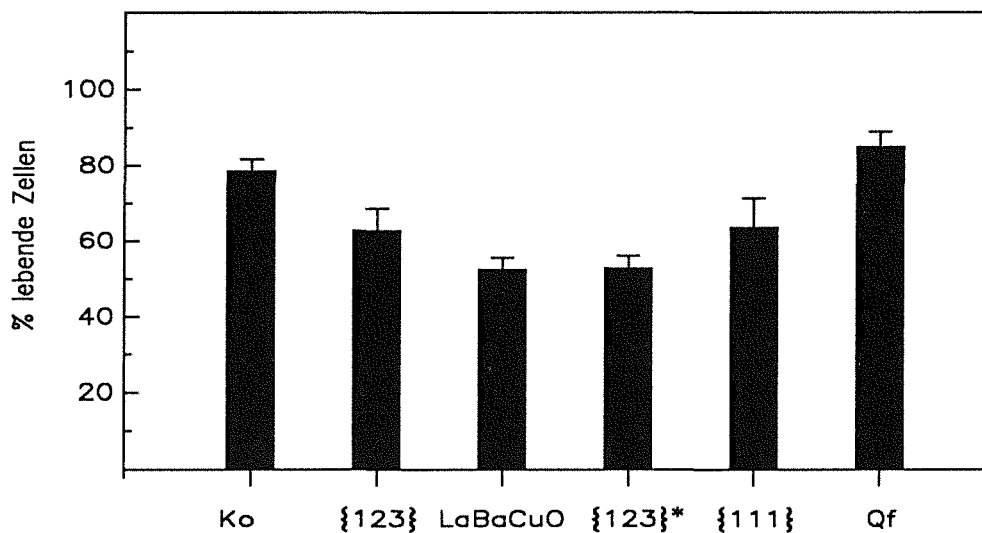


Abb. 122: Einfluß von 20 Stunden Inkubation mit den DPL-behandelten Stäuben {123}, LaBaCuO, {123}^{*}, {111} und Quarz Qf (je 100 µg/ml) auf die Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 9).

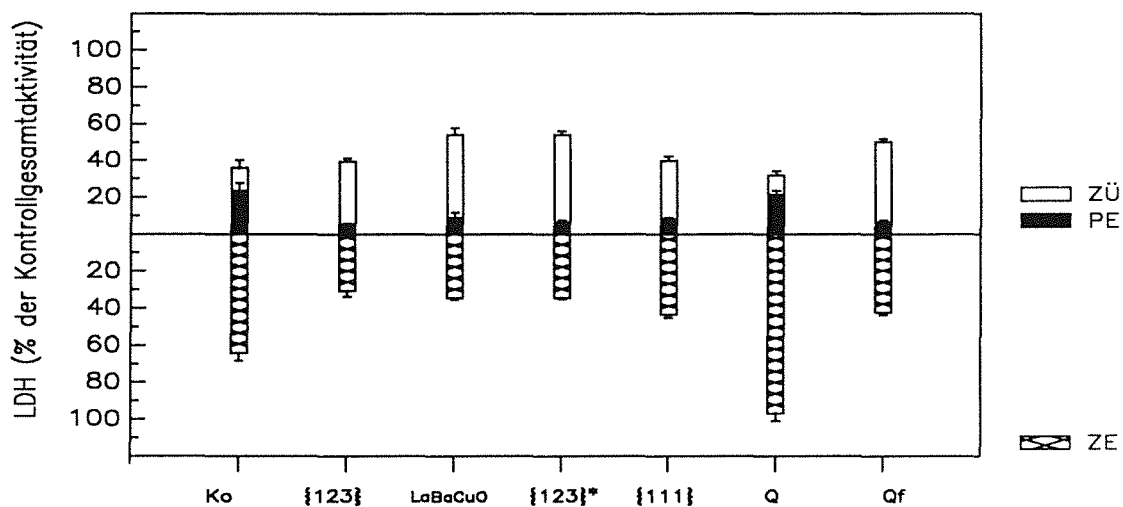


Abb. 123: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit den Stäuben {123}, LaBaCuO, {123}^{*}, {111}, Quarz (Q und Qf) (100 µg/ml) auf die Verteilung der LDH in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 6)

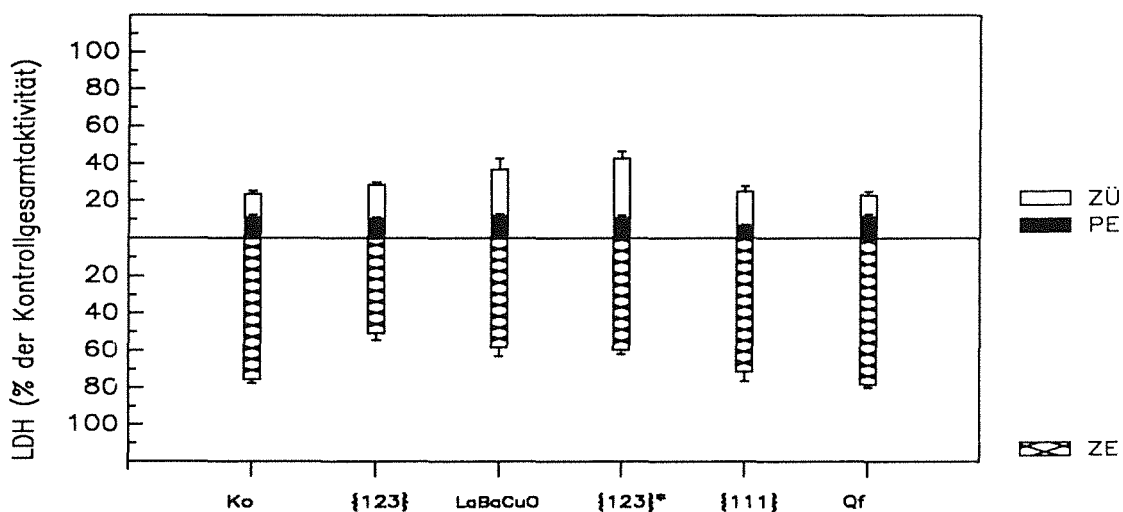


Abb. 124: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 100 µg/ml der mit DPL behandelten Stäube {123}, LaBaCuO, {123}^{*}, {111} und Quarz Qf auf die Verteilung der LDH in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 6).

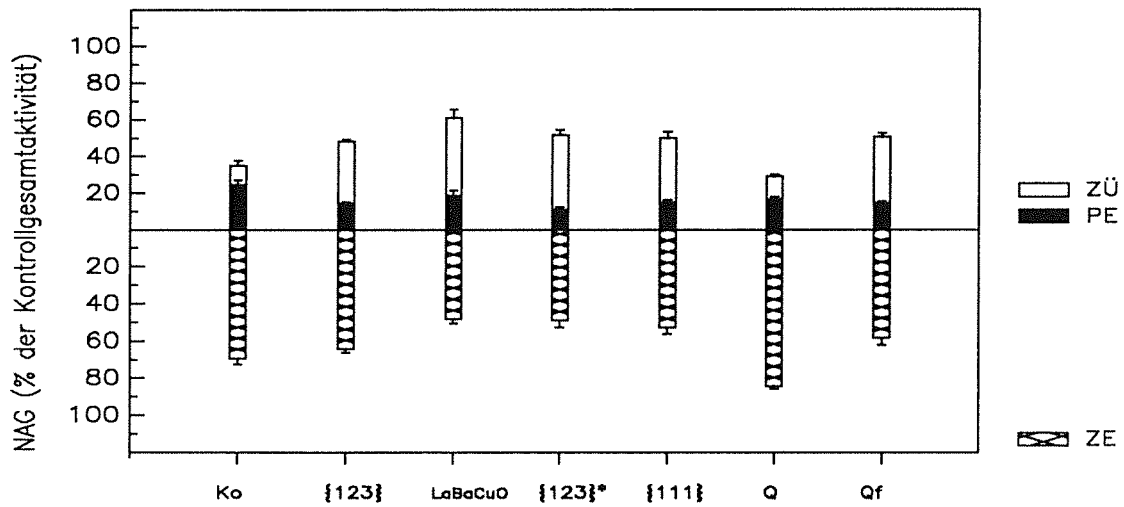


Abb. 125: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 100 µg/ml der Stäube {123}, LaBaCuO, {123}^{*}, {111} und Quarz (Q und Qf) auf die Verteilung der NAG in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3; für {123} und Kontrolle n = 12).

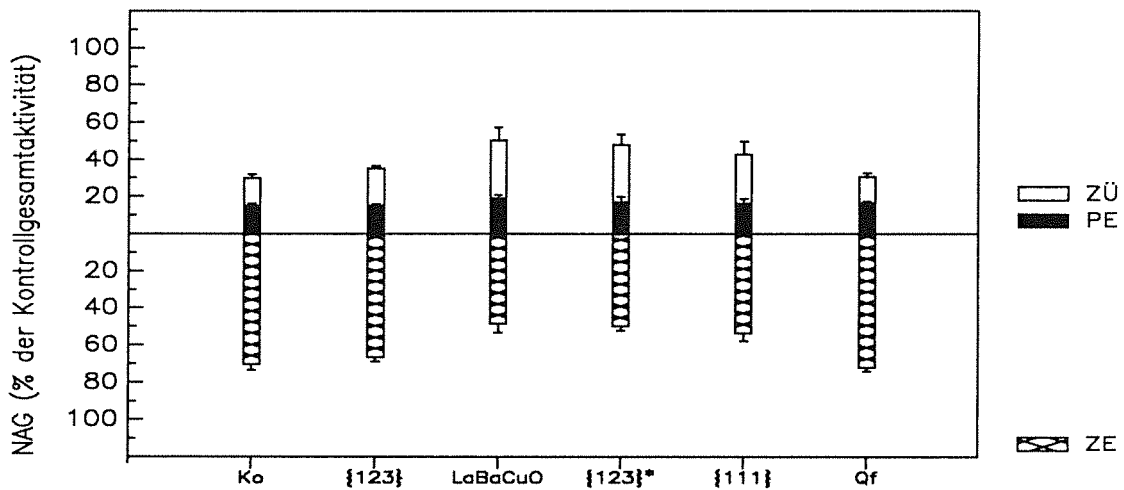


Abb. 126: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 100 µg/ml der DPL-behandelten Stäube {123}, LaBaCuO, {123}^{*}, {111} und Quarz (Qf) auf die Verteilung NAG in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 3).

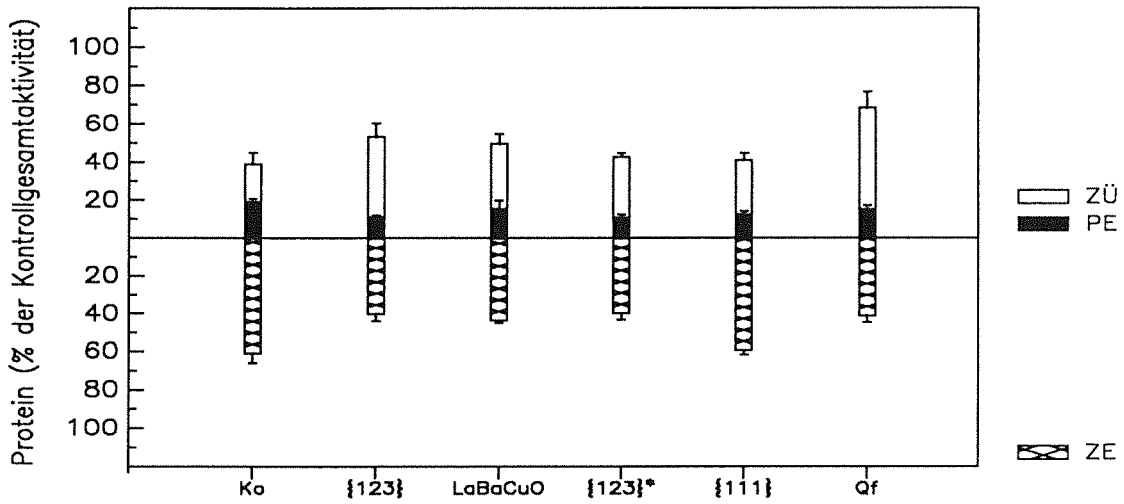


Abb. 127: Einfluß von 20 Stunden Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 100 µg/ml der Stäube {123}, LaBaCuO, {123}*, {111} und Quarz (Qf) auf die Verteilung des zellulären Proteins in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 6).

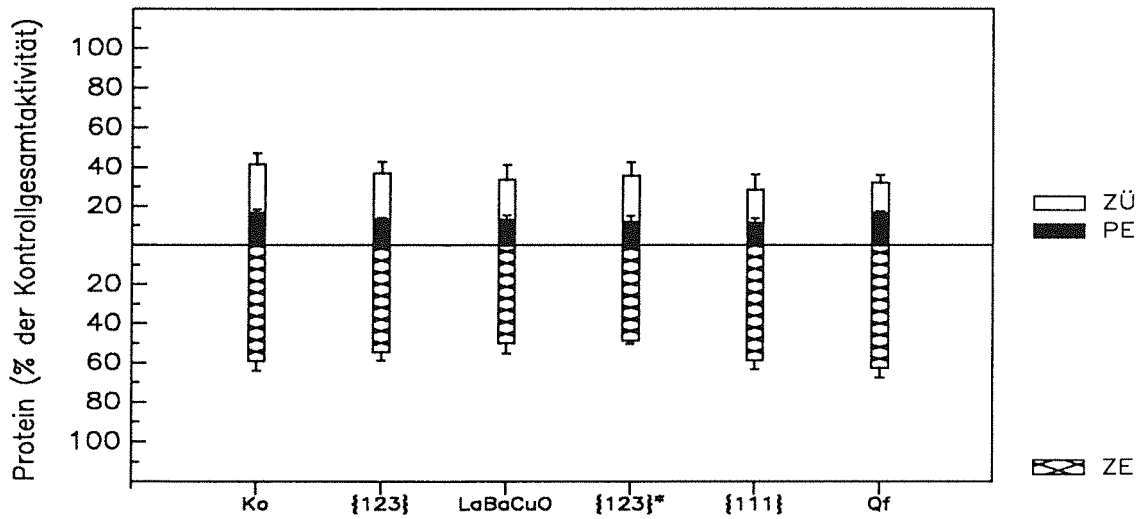


Abb. 128: Einfluß der Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 100 µg/ml der DPL-behandelten Stäube {123}, LaBaCuO, {123}*, {111}, Quarz (Q und Qf) auf die Verteilung des zellulären Proteins in ZE, ZÜ und PE. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 6).