

KfK 5097 B  
Oktober 1992

**Morphologische und  
biochemische Untersuchungen  
zur Wirkung von Seltenen  
Erdmetallverbindungen auf  
Rinderalveolarmakrophagen**

G. Polzer  
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5097 B

**MORPHOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN  
ZUR WIRKUNG VON  
SELTENEN ERDMETALLVERBINDUNGEN AUF  
RINDERALVEOLARMAKROPHAGEN**

Gerhard Polzer

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



## Morphologische und biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Seltenen Erdmetallverbindungen auf Rinderalveolarmakrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Seltenen Erdmetallverbindungen (SE) auf die Morphologie sowie einige immunologisch relevante Funktionen von Rinderalveolarmakrophagen (RAM) untersucht. Die Inkubation der Zellen in  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  führt zu einer deutlichen Vakuolisierung des Cytoplasmas. Die Vakuolen beinhalten typischerweise elektronendichte Strukturen, bei denen es sich um Verbindungen der Seltenen Erdmetalle handelt. Ein Vitalitätsverlust der Zellen konnte erst nach 20 Stunden beobachtet werden. Dieser spiegelt sich auch in einer Freisetzung von cytoplasmatischen und lysosomalen Enzymen wider.  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ , ein Hochtemperatursupraleiter und  $\text{La}_2\text{O}_3$  erwiesen sich ebenfalls als cytotoxisch.

Neben diesen toxischen Wirkungen konnte durch die Inkubation mit allen untersuchten SE eine Freisetzung von Faktoren induziert werden, die auf andere RAM chemoattraktiv wirkten. Es gibt Hinweise darauf, daß es sich bei ihnen u.a. um C5a, das chemoattraktive Fragment des Complementfaktors C5, handeln könnte.

Während RAM direkt nach ihrer Gewinnung keine Chemotaxis zeigten, konnte eine solche nach einer 20-stündigen in vitro Kultur gegenüber Zymosan-aktiviertem Serum festgestellt werden. Diese konnte durch die Inkubation der Zellen mit SE deutlich gehemmt werden.  $\text{LaCl}_3$  und  $\text{CeCl}_3$  waren selbst in geringen Konzentrationen (0.01 mM) und nach kurzen Inkubationszeiten (2 Stunden) sehr wirksam,  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  und  $\text{La}_2\text{O}_3$  bewirkten demgegenüber erst bei höheren Konzentrationen und längeren Inkubationszeiten eine Reduktion der Mobilität. Die immobilisierende Wirkung von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  kann nur z.T. auf ihre Eigenschaft als  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker zurückgeführt werden, denn auch nach der Kultur in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium können die Zellen noch chemotaktische Bewegungen ausführen. Sowohl die Desintegration des Mikrotubuli- als auch des Aktinfilamentsystems führen zur Immobilisierung der Zellen. Eine Beeinflussung dieser Komponenten durch die SE konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch ein Einfluß auf die C5a-Rezeptoren oder der Adhäsionsfähigkeit der Zellen konnte als Wirkmechanismus ausgeschlossen werden.

Aus den Ergebnissen kann darauf geschlossen werden, daß SE auf Alveolarmakrophagen cytotoxisch wirken und deren immunologische Funktionen beeinflussen können. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der pulmonalen Veränderungen nach deren Inhalation beitragen.

## **Morphological and biochemical investigations on the effect of rare earth compounds on bovine alveolar macrophages**

The influence of rare earth compounds (RE) upon the morphology and some immunologically relevant functions in bovine alveolar macrophages (BAM) have been investigated. The incubation of the cells with  $\text{LaCl}_3$  or  $\text{CeCl}_3$  caused the formation of large vacuoles within the cytoplasm. Electron dense structures containing these rare earth elements were typically found inside these vacuoles.

A loss of viability could only be observed 20 hours after incubation. This was also reflected by the release of cytoplasmatic and lysosomal enzymes.  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ , a high- $T_C$  superconducting material and  $\text{La}_2\text{O}_3$  were also found to be cytotoxic.

Beside these toxic effects, all of the RE studied were able to induce the release of some factors, which were chemoattractive for other BAM. One of these factors seems to be C5a, the chemoattractive fragment of the complement factor C5.

While BAM were unable to show any chemotactic movement directly after their isolation, this could be observed towards Zymosan activated serum subsequent to an *in vitro* culture for 20 hours. Incubation with the RE strongly inhibited this chemotactic mobility. Whereas  $\text{LaCl}_3$  and  $\text{CeCl}_3$  were effective even in low concentrations (0.01 mM) and after short incubation times (2 h),  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  and  $\text{La}_2\text{O}_3$  only reacted in higher concentrations and after longer times. Their mode of action could only be explained in part by the blockage of the  $\text{Ca}^{2+}$ -channels through the cell membrane by the rare earth elements, because even after incubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium, the chemotactic mobility of the cells was only reduced slightly. In contrast, a distinct decrease in the mobility could be achieved by the disintegration of the actin- or microtubulsystem. However there is no indication for the influence of the RE upon these cytoskeletal components. Furthermore, an interaction with the C5a-receptors or with the ability of the cells to adhere could also be excluded.

From these results it can be concluded, that RE might be cytotoxic for alveolar macrophages and can interfere with some of their immunological functions. This could help to explain some of the alterations of the lung which were observed after the inhalation of RE.

## ABKÜRZUNGSLISTE

AM	Alveolarmakrophage
AMAD	Activity median aerodynamic diameter
AO	Acridin Orange
ASS	Acetyl-Salicylsäure
CB	Cytochalasin B
CF	Chemotaktische Faktoren
CP	Chemotaktisches Potential
FCS	Fötale Kälberserum
FMLP	N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin
FMP	N-formyl-L-methionyl-L-phenylalanin
HTS	Hochtemperatursupraleiter
Ko	Kontrolle
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
NAG	N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase
PBS	Phosphate buffered saline
PMN	Polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten
RAM	Rinderalveolarmakrophagen
SP	Saure Phosphatase

# INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Puffer und Inkubationsmedien	7
2.1.1	Puffer	7
2.1.2	Inkubationsmedien	7
2.1.2.1	Inkubationsmedien mit löslichen Metallverbindungen	7
2.1.2.2	Inkubationsmedien mit partikulären Metallverbindungen und Quarz	8
2.1.2.3	Sonstige Inkubationsmedien	10
2.2	Zellkultur	10
2.2.1	Isolierung der Rinderalveolarmakrophagen	10
2.2.2	Zellkulturbedingungen	11
2.2.2.1	Generelle Kulturbedingungen	11
2.2.2.2	Kulturbedingungen für die licht-, raster- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen	11
2.2.2.3	Kulturbedingungen für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen	11
2.2.2.4	Kulturbedingungen für die Untersuchungen der Enzym- und Faktorenfreisetzung sowie des Polymerisationsgrades von Aktin	12
2.2.2.5	Kulturbedingungen für die Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität	12
2.2.2.6	Kulturbedingungen für die Untersuchungen des F-Aktingehaltes	12
2.2.2.7	Kulturbedingungen für die Untersuchungen der Adhäsionsfähigkeit	12
2.3	Untersuchungen der Morphologie	13
2.3.1	Lichtmikroskopie	13
2.3.1.1	Hämacolor-Schnellfärbung	13
2.3.1.2	Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau	13
2.3.2	Rasterelektronenmikroskopie	13
2.3.3	Transmissionselektronenmikroskopie	14
2.3.3.1	Einbettung, Kontrastierung und Mikroskopie	14
2.3.3.2	Saure Phosphatase -Zytochemie	16
2.3.3.3	Energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX-Verfahren)	16

		Seite
2.3.4	Fluoreszenzmikroskopie	17
2.3.4.1	Fluoreszenzmarkierung der Lysosomen mit Acridin Orange	17
2.3.4.2	Fluoreszenzmarkierung des F-Aktins mit Rhodamine-Phalloidin	17
2.3.4.3	Fluoreszenzmarkierung der Mikrotubuli mit FITC-gekoppelten Antikörpern	18
2.4	Untersuchungen der Enzymfreisetzung	19
2.4.1	Vorbereitung der Proben	19
2.4.2	Proteinbestimmung	19
2.4.3	Enzymbestimmungen	19
2.4.3.1	Laktatdehydrogenase (LDH)	19
2.4.3.2	N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG)	20
2.5	Untersuchungen zur Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren und zur Mobilität von Rinderalveolarmakrophagen	20
2.5.1	Versuchsordnung und Auswertung	20
2.5.2	Untersuchungen zur Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren	22
2.5.3	Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität	23
2.6	Untersuchungen der C5a-Rezeptoren	23
2.7	Untersuchungen des Polymerisationsgrades von Aktin	24
2.8	Untersuchungen des F -Aktingehaltes	26
2.9	Untersuchungen der Adhäsionsfähigkeit	26
2.10	Auswertung und Präsentation der Daten	27

	Seite	
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
3.1	Morphologische Untersuchungen	29
3.1.1	Lichtmikroskopie	29
3.1.2	Rasterelektronenmikroskopie	29
3.1.3	Transmissionselektronenmikroskopie	30
3.1.4	Fluoreszenzmarkierung mit Acridin Orange (AO)	31
3.2	Biochemische Untersuchungen	31
3.2.1	Inkubationen mit $\text{CeCl}_3$ bzw. $\text{LaCl}_3$	31
3.2.2	Inkubationen mit $\text{La}_2\text{O}_3$	32
3.2.3	Inkubationen mit $\text{LaBaCuO}_{3,5}$	33
3.3	Untersuchungen von chemotaktisch wirksamen Faktoren (CF)	34
3.3.1	Chemotaktische Wirkung verschiedener Substanzen	34
3.3.2	Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren	34
3.3.3	Charakterisierung der chemotaktisch wirksamen Faktoren	36
3.4	Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität	37
3.5	Untersuchungen der $\text{C5a}$ -Rezeptoren	38
3.6	Untersuchungen des Cytoskeletts von Rinderalveolarmakrophagen	39
3.6.1	Untersuchungen des Aktinsystems	39
3.6.1.1	Fluoreszenzmarkierung des F-Aktins mit Rhodamin-Phalloidin	39
3.6.1.2	Bestimmung des Polymerisationsgrades von Aktin	40
3.6.1.3	Untersuchung des F-Aktingehaltes	41
3.6.2	Untersuchungen des Mikrotubulsystems	41
3.6.2.1	Fluoreszenzmarkierung der Mikrotubuli mit FITC-gekoppelten Antikörpern	41
3.6.3	Untersuchungen der Adhäsionsfähigkeit	42
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>TABELLEN UND ABBILDUNGEN</b>	<b>73</b>

## 1. EINLEITUNG

Die Seltenen Erden sind eine Gruppe von metallischen Elementen, die neben den Lanthaniden (Elemente mit der Ordnungszahl 57 bis 71) auch die Elemente Yttrium und Scandium umfaßt. Anders als ihre Gruppenbezeichnung vermuten liesse, treten sie in vielen Mineralien keineswegs selten auf und kommen in der Erdkruste mit einer Ausnahme häufiger vor als z.B. Quecksilber oder Wolfram (Muecke und Möller, 1988). Ihre industrielle Anwendung nahm in den letzten Jahrzehnten stetig zu, so daß sie mittlerweile in vielen modernen Industrieprodukten eine wichtige Rolle spielen. Sie finden z.B. als Komponenten in Metallegierungen, in Laserkristallen, Halbleitern, beim Polieren von Spiegeln und optischen Linsen, als Katalysatoren bei der Erdöl-Raffinierung oder zur Veränderung des Brechungsindex von Glaslinsen und Glasfasern Verwendung. Besondere Aufmerksamkeit erlangten sie jedoch neuerdings als Bestandteile der neuen Hochtemperatur-Supraleitermaterialien.

Nicht zuletzt wegen dieser vielseitigen Verwendbarkeit der Seltenen Erdmetalle war das biologische Verhalten von Lanthan und Cer, zwei ihrer wichtigsten Vertreter, das Objekt zahlreicher Untersuchungen. Beide Elemente besitzen osteo- und hepatotrophe Eigenschaften, wobei allgemein die Leber als Hauptzielorgan ihrer Intoxikation gilt. Sowohl Lanthan (Das et al., 1988) als auch Cer (Wiener-Schmuck, 1988) können nach der intravenösen Applikation ihrer Chloride bei Ratten zur Ausbildung einer Fettleber und nachfolgend zu nekrotischen Veränderungen führen. Für ihre Aufnahme in den Körper scheint der Nahrungspfad in der Regel jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da, unabhängig von ihrer chemischen Form, die Resorption aus dem Magendarmtrakt ( $<0.1\%$  der verschluckten Menge) nur sehr gering ist (Seidel, 1988). Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, daß in Gebieten mit hohem natürlichem Cervorkommen (einige Regionen Indiens, Südamerikas und Afrikas) eine vermehrte Ceraufnahme mit der Nahrung erfolgt und diese in Verbindung mit Magnesiummangel zu der unter dem Namen "Tropischen Endomyokardfibrose" bekannten Herzerkrankung führen kann (Valiathan et al., 1989 und 1990).

Außer durch Ingestion können die Seltenen Erdmetallverbindungen auch durch Inhalation inkorporiert werden. Die dadurch induzierten pulmonalen Veränderungen waren der Aufmerksamkeit von Klinikern und Pathologen lange entgangen. Erst 1955 wurde von Schepers (Schepers, 1955) ein Zusammenhang zwischen röntgenologischen Veränderungen in den Lungen von Arbeitern der Cer-Industrie und der Staubexposition vermutet.

Der häufigste berufliche Kontakt zu diesen Elementen fand sich bis etwa 1960 im druckgraphischen Gewerbe, wo zur Ausleuchtung von Objekten Bogenlampen benutzt wurden, deren Dochtkohlen, zur Verbesserung der Lichtausbeute, mit Seltenen Erden versetzt waren. Beim Abbrennen der Kohle bildete sich eine weiße Flugasche, die sich im Arbeitsraum niederschlug und auch eingeatmet wurde (Hecht und Wesch, 1980). Heute werden die Expositionsmöglichkeiten vorwiegend bei Hartmetallen und den Hochtemperatursupraleitern gesehen (Blome et al., 1989).

Als charakteristische Befunde der durch die Seltenen Erdmetalle ausgelösten "Cer-Pneumonie" konnten morphologische Lungenveränderungen röntgenologisch (Heuck und

Hoschek, 1967) und histologisch (Egner, 1976) nachgewiesen werden. Röntgenologisch bestehen die Veränderungen in feinfleckigen, gleichmäßig über beide Lungenhälften verteilten, relativ scharf begrenzten sehr dichten Herden, die im Spätstadium der Krankheit von fibrotischen Lungenveränderungen begleitet sein können. Histologisch zeigten sich peribronchial, perivasal und in den interalveolären Septen staubhaltige Makrophagengranulome mit vielkernigen Riesenzellen. Elektronenmikroskopisch fanden sich in den Alveolarmakrophagen zahlreiche Phagosomen mit feinkristallinen Einschlüssen, bei denen es sich, wie energiedispersive Röntgenmikroanalysen ergaben, um cer- und lanthanhaltige Phosphate handelte (Vogt et al., 1986).

Cain et al. (1977) gelang es in den Lungen von Meerschweinchen durch die intratracheale Instillation einer Ceritoxyd-Suspension makrophagenreiche Granulomas und septale Fibrosen zu induzieren, deren Ausmaße von der Dauer und der Intensität der Exposition abhängig waren.

Obwohl der pathogenetische Verlauf dabei noch weitgehend unklar ist, ist es einsichtig, daß zunächst zelluläre Funktionen betroffen sein müssen, bevor Organfunktionen verändert erscheinen (Fischer, 1986).

Als die primären Zielzellen von eingeatmeten Seltenen Erdmetallverbindungen innerhalb des respiratorischen Traktes gelten die Alveolarmakrophagen. Untersuchungen bei Ratten zeigten, daß bereits kurze Zeit nach einer  $\text{CeCl}_3$ -Aerosolinhalation nahezu das gesamte Cer in den Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden kann (Berry et al., 1989). Auch nach längerer Expositionsdauer ist das Cer neben einem geringen Vorkommen in den Alveolarwänden, praktisch ausschließlich in den Makrophagen lokalisiert. In der gleichen Weise wird auch das Yttrium nach einer intratrachealen Instillation von Yttriumchlorid fast vollständig in den Lysosomen der Makrophagen gefunden (Hirano et al., 1990a).

Es ist deshalb von besonderem Interesse, die biologische Wirkung der Seltenen Erdmetallverbindungen speziell auf Alveolarmakrophagen zu untersuchen. Da derartige Untersuchungen in vivo jedoch kaum durchführbar sind, bietet sich ein in vitro -Testsystem mit isolierten Makrophagen an. Diese lassen sich mit der Technik der bronchoalveolären Lavage in über 90%-iger Reinheit gewinnen. Bei der Verwendung von Rinderlungen frisch geschlachteter Tiere können hierbei besonders große Zellausbeuten (bis zu  $2 \times 10^9$  Zellen pro Tier) erzielt werden. Diese Möglichkeit wurde erstmals von Fox (1973) beschrieben und wird seither in zahlreichen Laboratorien genutzt. Wegen ihrer genetischen Homogenität und ihrer identischen Vorgeschichte wurden die Rinderalveolarmakrophagen u.a. bereits für die Analyse von toxischen Stoffen in komplexen Umweltproben und von verschiedenen metallischen Verbindungen eingesetzt (Fisher et al., 1983; Finch et al., 1987; Müller, 1986; Wilczek, 1991).

Fisher (1989) weist zwar darauf hin, daß speziesspezifische Unterschiede in der Reaktion der Makrophagen gegenüber verschiedenen Substanzen auftreten können, kommt jedoch zu der Auffassung, daß es in Bezug auf die Übertragbarkeit der potentiellen Toxizität auf den Menschen keine Spezies gibt, die den anderen vorzuziehen wäre. Zu dem gleichen Ergebnis kommt Schimmelpfeng (1989), die vergleichende Untersuchungen mit Alveolarmakrophagen



von Rindern, Ratten, Affen, Hunden und Menschen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Quarzstaub und Asbestfasern durchführte.

In der vorliegenden Arbeit soll daher zunächst die zytotoxische Wirkung zweier löslicher ( $\text{LaCl}_3$  und  $\text{CeCl}_3$ ) und zweier partikulärer Seltenen Erdmetallverbindungen ( $\text{La}_2\text{O}_3$  und  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ ) auf Rinderalveolarmakrophagen untersucht werden. Als Parameter hierfür dienen neben der Morphologie der Zellen auch ihre Vitalität sowie die Freisetzung der zytosmatischen Laktatdehydrogenase bzw. der lysosomalen N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase. Die Eignung dieser Parameter als Maß für die Toxizität einer Substanz wurde bereits mehrfach beschrieben (Waters et al., 1975; Lock et al., 1987; Pätzold, 1989).

Wie in vitro-Untersuchungen zeigten, besitzen die Seltenen Erdmetallverbindungen  $\text{LaCl}_3$  und  $\text{CeCl}_3$  gegenüber den Alveolarmakrophagen von Ratten eine ähnlich hohe Zytotoxizität wie  $\text{CdCl}_2$  und führen selbst in geringen Konzentrationen zu morphologischen Veränderungen der Zellen (Palmer et al., 1987). Auch gegenüber den Alveolarmakrophagen von Rindern konnte bereits eine zytotoxische und morphologieverändernde Wirkung von  $\text{CeCl}_3$  dokumentiert werden (Wiener-Schmuck, 1988).

Da die Alveolarmakrophagen bei der Abwehr von Lungenschädigungen durch Umwelteinflüsse eine äußerst wichtige Rolle spielen, kann nicht nur die Verringerung ihrer Zahl durch das inhalierte Agens, sondern auch die Veränderung ihrer Funktionen weitreichende Folgen für den gesamten Organismus mit sich bringen.

Diese Funktionen umfassen so wichtige Aufgaben wie die Detoxifikation und Entfernung von inhalierten Partikeln, die Aufrechterhaltung der Sterilität, die Interaktion mit lymphatischen Zellen in immunologischen Reaktionen, die Beseitigung von beschädigten bzw. toten Zellen und die Rekrutierung und Aktivierung anderer inflammatorischer Zellen (Gardner, 1984). Diese breite funktionelle Kapazität der Alveolarmakrophagen wird hauptsächlich durch ihre Mobilität, ihre Fähigkeit zur Phagozytose und zur Erkennung externer Signale sowie ihrer äußerst vielfältigen Möglichkeiten zur Produktion und Sekretion von Substanzen vermittelt (Crystal, 1991). Zu diesen gehören neben zahlreichen Enzymen (Saure Hydrolasen, neutrale Proteinase, Proteinkinase u.a.) und bioaktiven Lipiden (Prostaglandine, Leukotriene u.a.) auch reaktive Sauerstoffmetaboliten (z.B. Superoxydion) sowie diverse weitere Faktoren, die regulativ oder attraktiv auf andere Zellen wirken können (Interleukine, Reifungs- und Wachstumsfaktoren, Tumor Nekrose Faktor, alle Komponenten des Complementsystems u.a.) (Nathan, 1987; Papadimitriou und Ashman, 1989).

Wie bereits bekannt ist, werden viele dieser Funktionen, die z.T. auch bei anderen Zelltypen, wie dem polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) oder den Monozyten nachgewiesen wurden, durch Seltene Erdmetallverbindungen beeinflusst.

So wird die Phagozytoserate von Lebermakrophagen (Kupferzellen) schon durch niedrige  $\text{GdCl}_3$ -Konzentrationen sehr deutlich verringert (Husztik et al., 1980), während sie bei Lungenmakrophagen durch die Inkubation mit  $\text{CeCl}_3$  nicht beeinflusst wird (Wiener-Schmuck, 1988).

LaCl<sub>3</sub> hat auf die Erzeugung von Superoxydanionen durch humane PMN aufgrund einer Stimulierung mit dem Tripeptid Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) eine ausgeprägt inhibitorische Wirkung (Simchowitz et al., 1990). Das gleiche gilt für Rinderalveolarmakrophagen bei deren Aktivierung mit Zymosan. CeCl<sub>3</sub> erwies sich hierbei sogar als noch effektiver. Demgegenüber besitzen Yttrium- und Gadoliniumchlorid nahezu keine Wirkung, während Ytterbium einen stimulierenden Effekt zu haben scheint (Wiener-Schmuck et al., 1990; Braune und Seidel, nicht veröffentlicht).

Eine ganze Reihe weiterer Untersuchungen zeigen, daß die Seltenen Erdmetallverbindungen zwar hauptsächlich inhibitorische, z.T. aber auch stimulierende Wirkungen auf die Sekretion von bioaktiven Substanzen besitzen. Diese Effekte können sich sowohl auf die basale als auch auf die stimulusgekoppelte Freisetzung auswirken. So reduziert LaCl<sub>3</sub> die thrombininduzierte Serotoninfreisetzung bei Thrombozyten nahezu vollständig, ohne jedoch deren basale Sekretion zu verändern (Zilberman et al., 1982). Bei den Mastzellen wird die induzierte Histaminfreisetzung durch hohe LaCl<sub>3</sub>-Konzentrationen (1mM) gehemmt, durch niedrigere Konzentrationen (0.01-0.1 mM) hingegen gefördert (Pearce und White, 1981).

Da sich im Laufe einer entzündlichen Lungenreaktion, wie sie z.B. nach der intratrachealen Instillation von YCl<sub>3</sub> auftritt (Hirano et al., 1990a), sowohl die Zahl der Granulozyten als auch die der Makrophagen in der Lunge drastisch erhöhen kann und dies sehr wahrscheinlich durch chemotaktische Faktoren induziert wird, stellen die Untersuchungen zur Freisetzung von chemoattraktiven Faktoren und deren grobe Charakterisierung einen wichtigen Aspekt der vorliegenden Arbeit dar. Dabei wird untersucht, ob die Behandlung der Rinderalveolarmakrophagen mit Seltenen Erdmetallverbindungen (partikuläre und nicht-partikuläre) zur Sekretion von chemoattraktiv wirksamen Faktoren führt und ob diese Sekretion spezifisch erfolgt oder durch die unspezifische Phagozytose bzw. durch die Zytotoxizität der Substanzen ausgelöst wird. Zu diesem Zwecke werden Inkubationen mit biologisch inertem TiO<sub>2</sub> und mit zytotoxischen Quarz durchgeführt. Desweiteren wird überprüft ob eine stimulusgekoppelte Sekretion (mit Lipopolysaccharid als Stimulus) stattfindet und ob diese durch die Seltenen Erdmetallverbindungen beeinflusst wird.

Zur Bestimmung von chemotaktischen Faktoren und der Mobilität von Zellen können verschiedene Systeme benutzt werden. Neben dem "under-agarose assay" (Nelson et al., 1975), der eine Aussage über die Mobilität von Einzelzellen zuläßt, wird die Migration von Zellpopulationen traditionsgemäß mit dem "boyden chamber assay" (Boyden, 1963) oder anderen damit eng verwandten Methoden bestimmt. Dabei wird entweder die Strecke, die die Zellen in einen Filter hinein (Nitrocellulosefilter) zurückgelegt haben, oder die Zahl der Zellen, die durch die Poren eines Filters (Polycarbonatfilter) gewandert sind, als Maß benutzt.

Da sich zum einen die Alveolarmakrophagen unterschiedlicher Spezies sowohl in ihrer Fähigkeit zur Migration als auch zur Erkennung chemotaktischer Agenzien unterscheiden (siehe Diskussion) und zum anderen keine Untersuchungen über die Chemotaxis von Rinderalveolarmakrophagen vorliegen, müssen zunächst die Versuchsparameter dafür empirisch optimiert werden.

Die Mobilität der Alveolarmakrophagen innerhalb der Lunge stellt einen äußerst wichtigen Mechanismus dar, der bei der Eliminierung von Mikroorganismen und inhalierten Partikeln sowie bei der Akkumulation der Makrophagen an Entzündungsherden eine entscheidende Rolle spielt (Laplante und Lemaire, 1990). Einige Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen deuten darauf hin, daß auch die Mobilität von Alveolarmakrophagen durch die Inkubation mit Seltenen Erdmetallverbindungen blockiert werden könnte. So stellten sowohl Boucek und Snyderman (1976) als auch Simchowitz und Cragoe (1990) bei humanen PMN nach der Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  eine Inhibierung der Chemotaxis gegenüber FMLP fest. Erstere wiesen zudem darauf hin, daß auch humane Blutmonozyten durch die Behandlung mit  $\text{LaCl}_3$  ihre Fähigkeit zur chemotaktischen Migration verlieren. Da zudem auch die Lokomotion von Epithelzellen (Strohmeier und Bereiter-Hahn, 1984) und die Phototaxis von *Chlamydomonas reinhardtii* (Nultsch, 1979) durch  $\text{La}^{3+}$  gehemmt wird, scheint ein genereller und kein zelltyp- oder speziesspezifischer Mechanismus betroffen zu sein.

In der vorliegenden Arbeit soll daher überprüft werden, ob Seltene Erdmetallverbindungen (partikulär und nicht partikulär) auch auf die Chemotaxis von Rinderalveolarmakrophagen inhibierend wirken was möglicherweise gravierende Folgen für die Ausübung ihrer Aufgaben mit sich brächte. Um allfällige spezifische Effekte von unspezifischen, die alleine auf der Phagozytose der Agenzien oder auf deren Zytotoxizität beruhen, unterscheiden zu können, werden, wie schon bei den Untersuchungen zur Freisetzung von chemotaktischen Faktoren, wieder Inkubationen mit  $\text{TiO}_2$  und Quarz durchgeführt.

Die Lanthanidionen ( $\text{Ln}^{3+}$ ) haben durch das, im Vergleich zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, höhere Ladungs/Volumenverhältnis bei ähnlichen Ionenradien oft eine stärkere Affinität zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen als die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen selbst und können diese dadurch reversibel oder irreversibel in ihrer normalen Funktion blockieren. Der kontrollierte Kalziumtransport in die Zelle hinein und aus der Zelle heraus ist für viele der basalen zellulären Prozesse und auch für zahlreiche stimulusgekoppelten Antworten sehr wichtig. Dieser Ein- und Ausstrom der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird durch spezielle Ionenkanäle und Austauschmechanismen reguliert, die jeweils spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen besitzen. Da die  $\text{Ln}^{3+}$ -Ionen die Plasmamembran einer intakten Zelle nicht durchqueren können (Evans, 1990), erklären die meisten Autoren deren physiologischen Wirkungen auf der Basis ihrer Anlagerung an die äußere Zellmembran und der dadurch bedingten Blockierung des zellulären Kalziumtransportes.

Mit dieser plausiblen Hypothese können jedoch nicht alle biologischen, biochemischen und pharmakologischen Effekte der Seltenen Erdmetallverbindungen erklärt werden (Yamaga und Evans, 1989). So gibt es Hinweise darauf, daß humane neutrophile Granulozyten, auch wenn sie in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium bzw. zusammen mit einem Kalziumkanalblocker kultiviert worden waren, zur chemotaktischen Migration fähig sind (Wilkinson, 1975; Simchowitz und Cragoe, 1990).

Aus diesem Grunde sind weitere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von  $\text{La}^{3+}$  auf die Chemotaxis von besonderem Interesse. Als Ansatzpunkte hierfür können neben den spezifischen Rezeptoren für die chemoattraktiven Stoffe, der Signaltransduktionsweg von den Rezeptoren in die Zelle hinein, die Adhäsionsfähigkeit der Zelle und vor allem das zyto-

skeletale Mikrofilament- und Mikrotubulsystem dienen. Wie bereits gezeigt werden konnte, führt die Desintegration eines dieser Filamentsysteme durch bestimmte Agenzien zur Inhibition der chemotaktischen Antwort von Neutrophilen (Ward, 1974). Auch Simchowicz und Cragoe (1990) schlagen für das  $\text{La}^{3+}$  einen Mechanismus vor, in dem eine direkte oder indirekte Wirkung des  $\text{La}^{3+}$  auf die Regulation des Aktingerüsts involviert ist.

Zusammenfassend können die Ziele der vorliegenden Arbeit folgendermaßen formuliert werden:

1. Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Seltenen Erdmetallen auf Rinderalveolarmakrophagen mit Hilfe von morphologischen Methoden und der Bestimmung des Vitalitätsverlustes sowie der Enzymfreisetzung.
2. Untersuchungen zur Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren aufgrund einer Inkubation mit Seltenen Erdmetallverbindungen und eine Charakterisierung derselben.
3. Bestimmung des Einflusses von Seltenen Erdmetallverbindungen auf die chemotaktische Mobilität der Rinderalveolarmakrophagen und die Einengung seiner Ursachen.
- 4.) Biochemische und morphologische Analyse der Wirkung von Seltenen Erdmetallverbindungen auf das Aktin- und Mikrotubulsystem.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Puffer und Inkubationsmedien

#### 2.1.1 Puffer

##### *PBS*

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

mit HCl (37%) auf pH 7.4 einstellen

##### *PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>*

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

mit HCl (37%) auf pH 7.2 einstellen

##### *50 mM Tris-Puffer*

30.29 g Tris  
 29.22 g NaCl  
 1.0 g Natriumazid

ad 5 l Aqua bidest.

mit 1 M HCl auf pH 7.55 einstellen

#### 2.1.2 Inkubationsmedien

Wenn nicht anders vermerkt, wurde für alle Versuche mit einer Kulturdauer unter 24 Stunden RPMI 1640 (GIBCO), dem vor Gebrauch 100 Einheiten Penicillin/ml und 100 µg Streptomycin/ml zugegeben wurde, als Kulturmedium verwendet. Kulturen mit längerer Gesamtdauer wurden in RPMI 1640 mit 2.5 µg/ml Ampicillin (SIGMA), 20 µg/ml Tetracyclin (SIGMA) und 200 µg/ml Amphotericin B (SIGMA) durchgeführt. Für einige Untersuchungen zur chemotaktischen Mobilität wurde RPMI 1640 ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (GIBCO) benutzt, dem zusätzlich EGTA (Ethyleneglycol-bis-(β-Aminoethyl Ether) N,N,N',N'-Tetraacetic acid, SIGMA) in einer Konzentration von 1mM zugegeben worden war.

##### 2.1.2.1 Inkubationsmedien mit löslichen Metallverbindungen

Als lösliche Verbindungen der zu untersuchenden Seltenen Erden Cer und Lanthan wurden ihre Chloride (CeCl<sub>3</sub>, SIGMA, LaCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O, Merck) verwendet. Diese wurden zur Herstellung von 10 mM Stammlösungen für 24 Stunden im Trockenschrank bei 100°C getrocknet, im Exsikkator abkühlen gelassen und anschließend in 0.9%-iger NaCl-Lösung (mit 1 M HCl auf pH 3 eingestellt) gelöst. Die für die Inkubationen mit löslichen Metallverbindungen benötigten Medien wurden jeweils kurz vor Versuchsbeginn frisch angesetzt.

### 2.1.2.2 Inkubationsmedien mit partikulären Metallverbindungen und Quarz

Sämtliche Partikel wurden unmittelbar vor dem Inkubationsbeginn in der gewünschten Konzentration in Medium aufgenommen und, um eine möglichst homogene Verteilung zu erzielen, für 5 Minuten unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier B15, Einstellung: 50%). Für die Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität und der Adhäsionsfähigkeit der Rinderalveolarmakrophagen nach der Inkubation mit löslichen oder partikulären Verbindungen wurden die jeweiligen Medien doppelkonzentriert hergestellt, ein Farbumschlag des Indikators wurde dabei nie beobachtet.

Folgende Partikel kamen zur Anwendung:

#### **Lanthanoxid**

Als partikuläre Lanthanverbindung wurde Lanthan (III) oxid (HITEC, Karlsruhe) verwendet. Die Korngrößenverteilung zeigt, daß der Durchmesser von etwa 85% aller Partikel kleiner als 5  $\mu\text{m}$  ist.

Reinheit <sup>1</sup>	99.9%
Dichte	5.84 g/cm <sup>3</sup>
Medianer geom.Durchmesser <sup>2</sup>	2.67 $\mu\text{m}$
AMAD	6.45 $\mu\text{m}$
Spez. Oberfläche	n.b.*

#### **LaBaCuO<sub>3,5</sub>**

Als lanthanhaltiger Hochtemperatursupraleiter wurde das metallische Mischoxid LaBaCuO<sub>3,5</sub> (HITEC, Karlsruhe) verwendet. Die Korngrößenverteilung zeigt, daß der Durchmesser von etwa 33% aller Partikel kleiner als 5  $\mu\text{m}$  ist.

Reinheit <sup>1</sup>	99.999%
Dichte	n.b.*
Medianer geom.Durchmesser <sup>2</sup>	11.49 $\mu\text{m}$
AMAD	n.b.*
Spez. Oberfläche	n.b.*

---

<sup>1</sup> Angabe des Herstellers.

<sup>2</sup> Ermittelt durch Hrn. Bürkin, KfK, IMT-I.

\* nicht bekannt

## Quarz

Als zytotoxischer Kontrollstaub wurde eine Subfraktion des Quarzes Sikron F 600 (Palas, Karlsruhe) verwendet. Diese wurde mit Hilfe eines five stage cyclone (Southern Research Inst., Alabama) bei der Fa.Palas hergestellt und zeigt eine gleichmäßige Partikelgrößenverteilung im Bereich von 0.92 - 1.6  $\mu\text{m}$ .

Reinheit <sup>1</sup>	99.0%
Dichte	2.66 g/cm <sup>3</sup>
Medianer geom.Durchmesser <sup>2</sup>	1.03 $\mu\text{m}$
AMAD	1.7 $\mu\text{m}$
Spez. Oberfläche	n.b.*

## Titandioxid

Als biologisch inerte Kontrollstaub wurde Titandioxid der Konfiguration Anatase (Aldrich) verwendet.

Reinheit <sup>1</sup>	99.9%
Dichte	3.9 g/cm <sup>3</sup>
Medianer geom.Durchmesser	n.b.*
AMAD	n.b.*
Spez. Oberfläche <sup>3</sup>	6.7 m <sup>2</sup> /g

## Kupferoxid (CuO)

Als partikuläre Kupferverbindung wurde Kupferoxid (Aldrich) verwendet. Die Korngrößenverteilung zeigt, daß der Durchmesser von 34% aller Partikel kleiner als 5  $\mu\text{m}$  ist.

Reinheit	n.b.*
Dichte	6.48 g/cm <sup>3</sup>
Medianer geom.Durchmesser <sup>2</sup>	7.43 $\mu\text{m}$
AMAD	18.9 $\mu\text{m}$
Spez. Oberfläche <sup>2</sup>	20.7 m <sup>2</sup> /g

---

<sup>1</sup> Angabe des Herstellers.

<sup>2</sup> Ermittelt durch Hrn. Bürkin, KfK, IMT-I.

<sup>3</sup> Ermittelt durch Fr.Dr.Drosselmeyer, KfK, IGT.

\* nicht bekannt.

### 2.1.2.3 Sonstige Inkubationsmedien

Für einige Untersuchungen wurden Inkubationsmedien mit den folgenden Zusätzen benötigt. Diese wurden entweder in Form von Stammlösungen oder direkt dem Medium zugesetzt.

Zusatz (Hersteller)	Lösungsmittel	Konzentration d. Stammlsg.
Colchizin (SIGMA)	DMSO	0.25 mg/ml
Cytochalasin B (SIGMA)	DMSO	1.00 mg/ml
Verapamil Hydrochlorid (SIGMA)	DMSO	1.00 mM
Lipopolysaccharide von Salmonella abortus equi (SIGMA)	0.9% NaCl	1.00 mg/ml
Actinomycin D (SIGMA)	0.9% NaCl	1.00 mg/ml
Acetylsalicylsäure (SIGMA)	RPMI 1640	
N-Propyl-Gallate (SIGMA)	RPMI 1640	

## **2.2 Zellkultur**

### 2.2.1 Isolierung der Rinderalveolarmakrophagen

Die Alveolarmakrophagen (AM) wurden post mortem durch bronchoalveoläre Lavage aus den Lungen gesunder Rinder beiderlei Geschlechts gewonnen. Die Isolierung der Zellen begann innerhalb einer Stunde nach dem Tod der Tiere (Schlachthof Karlsruhe). Hierzu wurde die Lunge 4 bis 6 mal mit je 3 bis 4 Litern NaCl-Lösung (0.9%, Raumtemperatur) gefüllt und vorsichtig massiert. Die auf diese Weise gewonnene Lavageflüssigkeit wurde durch Verbandmull und Nylongaze mit 100  $\mu$ m Maschenweite (Seidengazefabrik Eckert, Waldkirch) filtriert und anschließend zentrifugiert (250 g, 10 Min., 4°C, Hettich Rotixa/RP, Rotor Nr.5096). Aus den vereinigten und gewaschenen (0.9% NaCl, 0°C) Zellsedimenten wurden die lebenden AM mittels Ficoll-Paque (Pharmacia) angereichert. Hierfür wurden je 10 ml der Zellsuspension (in 0.9%-iger NaCl, 0°C) mit 15 ml Ficoll-Paque (4°C) unterschichtet und für 20 Minuten bei 250 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Entnahme aus der Trennschicht zwischen Ficoll und NaCl-Lösung wurden die Zellen wiederum gewaschen (0.9% NaCl, 4°C) und die Zellzahl bzw. die Vitalität in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro Lunge konnten bis zu  $2 \times 10^9$  Zellen isoliert werden, deren Vitalität in der Regel über 90% lag.



## 2.2.2 Zellkulturbedingungen

### 2.2.2.1 Generelle Kulturbedingungen

Das Zellsediment des letzten Isolierungsschrittes wurde in der gewünschten Konzentrationen in Kulturmedium resuspendiert und anschließend in die, je nach Versuchsansatz benötigten, Kulturgefäße ausgesät. Wenn nicht anders vermerkt, wurde nach 1-2 stündiger Anheftzeit im Brutschrank (Heraeus, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit) das Medium gewechselt.

Um den Einfluß einer Vorstimulation der Zellen durch die Prozedur der Isolierung auszuschließen, erfolgte bei Untersuchungen an adhärenenten Zellen der Start der Inkubationen erst am darauffolgenden Tag. Da Rinderalveolarmakrophagen in Suspension bei längerer Kulturdauer einen deutlichen Vitalitätsverlust zeigen, erfolgte der Inkubationsbeginn bei so kultivierten Zellen zum Zeitpunkt  $T = 20-t$  ( $t$  = Inkubationsdauer in Stunden). Hierdurch konnte die Gesamtkulturdauer für alle Zellen gleich auf 20 Stunden begrenzt werden.

### 2.2.2.2 Kulturbedingungen für die licht-, raster- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden 2 ml Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) in 6x35 mm Makroplatten (Greiner, Nr.657160) ausgesät, die zuvor mit je einem Glasdeckglas (24x24 mm) bestückt worden waren. Am Versuchsende wurden die auf den Deckgläsern adhärierenden Zellen für die verschiedenen mikroskopischen Methoden präpariert.

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen direkt nach der Lavage oder nach Suspensionskultur dienten Polypropylen-Urinbecher (Sarstedt) als Kulturgefäße, da hierin keine Adhäsion der Zellen stattfindet. Es wurden jeweils 5 ml Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) pro Becher eingesetzt, ein Mediumwechsel erfolgte bei dieser Versuchsanordnung nicht. Zur Präparation wurde ein Tropfen Zellsuspension auf einen Glasobjektträger getropft, dieser mit einem Glasdeckglas bedeckt und die Reagenzien anschließend mit Hilfe von Zellstoff durchgesaugt.

### 2.2.2.3 Kulturbedingungen für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden 2 ml Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) auf Polycarbonat-Filtermembranen (0.8  $\mu$  m Porendurchmesser, Nuclepore) ausgesät. Die Membranen waren zuvor in 60 mm Petrischalen (Greiner) plaziert und zur Vermeidung des Aufschwimmens mit einem Teflonring (Innendurchmesser: 38 mm) beschwert worden.

#### 2.2.2.4 Kulturbedingungen für die Untersuchungen der Enzym- und Faktorenfreisetzung sowie des Polymerisationsgrades von Aktin

Für die Untersuchungen der Enzym- und Faktorenfreisetzung sowie des Polymerisationsgrades von Aktin wurden 2 ml Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) in 6x35 mm Makroplatten (Greiner) ausgesät.

Zur Gewinnung größerer Überstandsmengen, die für die Bestimmung des Molekulargewichtes der freigesetzten, chemotaktisch wirksamen Faktoren mittels Gelfiltration nötig waren, wurden 25 ml Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) in große Kulturschalen (Greiner, Nr. 639160, Durchmesser 145 mm) ausgesät.

#### 2.2.2.5 Kulturbedingungen für die Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität

Für die Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität wurde 1 ml Zellsuspension ( $6 \times 10^6$  Zellen/ml) in 6x35 mm Makroschalen (Greiner, Nr.657102) ausgesät und bei Inkubationsbeginn mit 1 ml des gewünschten Inkubationsmediums (doppeltkonzentriert) versetzt. Die hier benutzten Kulturschalen sind nicht speziell beschichtet, so daß sich die AM nur sehr schwach anheften können und am Ende der Inkubation ohne Vitalitätsverlust abgespült bzw. abgekratzt werden können. Ein Mediumwechsel erfolgte bei dieser Versuchsanordnung nicht.

#### 2.2.2.6 Kulturbedingungen für die Untersuchungen des F-Aktingehaltes

Für die Untersuchungen des F-Aktingehaltes und seiner Veränderung nach Stimulation wurden 150  $\mu$ l Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) in Mikrotest III<sup>TM</sup> Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen (Falcon Primaria Nr.3872; Becton Dickinson) ausgesät. Um zeitliche Unterschiede beim Medien- und Reagenzienwechsel möglichst gering zu halten, wurden die einzelnen Vertiefungen einer Platte nicht nacheinander abgesaugt, sondern jeweils gleichzeitig ausgeschleudert.

#### 2.2.2.7 Kulturbedingungen für die Untersuchungen der Adhäsionsfähigkeit

Zur Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit der AM wurden 5 ml Zellsuspension ( $6 \times 10^6$  Zellen/ml) in Polypropylen-Urinbechern (Sarstedt) im Brutschrank kultiviert und bei Inkubationsbeginn mit 5 ml des gewünschten Inkubationsmediums (doppeltkonzentriert) versetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte bei dieser Versuchsanordnung nicht.

## 2.3 Untersuchungen der Morphologie

### 2.3.1 Lichtmikroskopie

#### 2.3.1.1 Hämacytometer-Schnellfärbung

Als Standardfärbung zur Beurteilung der Zellen wurde die Hämacytometer-Schnellfärbung für Blutausstriche (Merck) nach Vorschrift verwendet. Nach der Herstellung von Dauerpräparaten in Eukitt (Kindler, Freiburg) erfolgte die Mikroskopie an einem Leitz Diaplan Mikroskop mit einer Photoausrüstung der Fa. Wild (Photoautomat MPS 45, Kamera MPS 51).

#### 2.3.1.2 Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach der von Hanks et al. (1958) beschriebenen Trypanblau-Ausschluß-Methode. Dazu wurden die auf Deckgläsern feststehenden Zellen am Inkubationsende (s. 2.2.2.2) mit einer 0.25%-igen Trypanblau-Lösung (SIGMA) überschichtet, nach 2 Minuten mit NaCl-Lösung (0.9%) gespült und die Zahl der gefärbten (toten) und ungefärbten (lebenden) Zellen mit einem Inversmikroskop (Leitz Fluovert, Objektiv: 32x, Okular mit Gitter: 10x) bestimmt. Pro Versuchsansatz wurden 3 Gitternetze mit einer scheinbaren Kantenlänge von 150  $\mu$ m an verschiedenen Stellen des Deckgläschens ausgezählt.

### 2.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Präparation der Zellen erfolgte nach einer von Millipore (Eschborn) empfohlenen Methode.

#### *Chemikalien und Puffer*

##### Puffer A

10 ml	0.2 M Cacodylatpuffer
4 ml	25% Glutaraldehyd
6 ml	Aqua bidest.

##### Puffer B

10 ml	0.2 M Cacodylatpuffer
10 ml	Aqua bidest.
7.0%	Sucrose

##### Puffer C

10 ml	0.2 M Cacodylatpuffer
10 ml	4% wässrige OsO <sub>4</sub> -Lösung

#### *Durchführung:*

Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubation (s. 2.2.2.2) dreimal mit PBS gewaschen, nacheinander für jeweils 30 Minuten bei 0°C mit den Puffern A, B und C behandelt und anschließend mit Aqua bidest. (Raumtemperatur) gründlich gespült. Zur Entwässerung wurden sie durch die alkoholische Reihe (35%, 70%, 85%, 95% und 100% jeweils für 5 Minuten) ge-

führt und schließlich, als Ersatz für eine kritisch Punkttrocknung (Nation, 1983), 5 Minuten mit Hexamethyldisilazane (SIGMA) überschichtet. Nachfolgend wurden die Proben luftgetrocknet und bis zur Goldbedampfung im Exsikkator aufbewahrt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Hr. Schüler (KfK, IMT) an einem Philips 525 M Rasterelektronenmikroskop hergestellt.

### 2.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

#### 2.3.3.1 Einbettung, Kontrastierung, Mikroskopie

##### Einbettung

Die Einbettung der Zellen für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte nach einer von Wilczek (1991) abgewandelten Methode von Cornell (1969).

##### *Chemikalien und Puffer*

##### 0.2 M Cacodylatpuffer

- 0.2 M Na-Cacodylat x 3H<sub>2</sub>O (Serva)
- 0.2 M Sucrose
- mit 1 M HCl auf pH 7.0 einstellen

##### 0.1 M Cacodylatpuffer

- 50 ml 0.2 M Cacodylatpuffer
- 50 ml Aqua bidest.

##### Glutaraldehyd 1.0%

- 0.4 ml Glutaraldehyd 25% (Serva)
- 4.6 ml Aqua bidest.
- 5.0 ml 0.2 M Cacodylatpuffer

##### Veronalpuffer

- 2.94 g Natriumdiäthylbarbitursäure (Balzer Union)
- 1.94 g Natriumacetat x 3 H<sub>2</sub>O
- ad 100 ml Aqua bidest.

##### Osmiumtetroxid-Veronalpuffer nach Palade

- 1.0 ml Veronalpuffer
- 1.0 ml 0.1 M HCl
- 1.25 ml 4%-ige OsO<sub>4</sub>-Lösung
- 1.75 ml Aqua bidest.

##### Uranylacetat

- 2%-ige, wässrige Uranylacetat-Lösung (Fluka)

**Epon-Araldite**

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

Gut mischen und kurz vor dem Gebrauch 2% Araldite Beschleuniger DY 964 (Serva) zugeben.

**Durchführung:**

Nach Ablauf der Inkubation (s. 2.2.2.3) wurden die Membranen 2-3 mal mit PBS gespült und mit einem Skalpell in etwa 1 mm breite Streifen geschnitten. Diese wurden zur Fixierung für 1 Stunde in 1%-iges Glutaraldehyd (0°C) überführt, nach dreimaligem Waschen (0.1 M Cacodylatpuffer) mit Palade-Puffer (2 h, 0°C) nachfixiert und anschließend für 1 Stunde mit Uranylacetat (0°C) blockkontrastiert. Zur Entwässerung wurde eine alkoholische Reihe durchlaufen, die folgende Stufen umfaßt:

- 50% Ethanol; 10 Minuten
- 95% Ethanol; 10 Minuten
- 100% Ethanol; 2x je 20 Minuten
- Epon-Araldite/Ethanol 1 : 1; 20 Minuten

Die folgenden Inkubationen im Epon-Araldite wurden im evakuierten Exsikkator durchgeführt:

- Epon-Araldite, über Nacht, bei Raumtemperatur
- Epon-Araldite, 24 Stunden, bei Raumtemperatur
- Epon-Araldite, 60 Minuten, 60°C

Die Einbettung erfolgte in Flachformen, die Polymerisation in drei Tagen bei 60°C.

**Kontrastierung und Mikroskopie*****Chemikalien und Puffer***

Gesättigte, wässrige Uranylacetat-Lösung (Fluka)

**Bleicitratlösung**

- 1.33 g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Merck)
- 2.11 g Natriumcitrat x 5.5  $\text{H}_2\text{O}$
- 1.76 g Natriumcitrat x 2  $\text{H}_2\text{O}$

in 30 ml Aqua bidest. lösen, 5 Minuten schütteln und nach 30 Minuten 8 ml NaOH (1 M) zugeben. Am nächsten Tag mit  $\text{CO}_2$ -freiem Aqua bidest. auf 50 ml auffüllen.

***Durchführung:***

Die mit einem Diamantmesser an einem Sorvall MT2-B Ultramikrotom (Dupont) hergestellten Schnitte (Dicke: 100 nm) wurden auf unbeschichtete Kupfergrids aufgebracht und mit Uranylacetat (1 Min.) und Bleicitrat (5 Min.) kontrastiert. Anschließend wurden sie 2x mit  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Das Mikroskopieren der Proben erfolgte an einem Siemens Elmiskop IA bei 80 kV Beschleunigungsspannung.

### 2.3.3.2 Saure Phosphatase-Zytochemie

Der zytochemische Nachweis der lysosomalen Sauren Phosphatase erfolgte in Abwandlung der bei Ménard et al. (1990) beschriebenen Methode.

#### *Chemikalien und Puffer*

0.1 M Cacodylat-Puffer (pH 7.4) mit 4% Sucrose

0.1 M Acetat-Puffer (pH 5.0) mit 5% Sucrose

#### Inkubationsmedium

2 mM Beta-Glycerophosphat (SIGMA)

2 mM CeCl<sub>3</sub> (SIGMA)

0.00001% Triton X-100

in 0.1 M Acetat-Puffer

Das Inkubationsmedium wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und durch einen 0.45 µm Sterilfilter (Millipore) filtriert.

#### *Durchführung:*

Am Ende der Inkubationszeit (s. 2.2.2.3) wurden die Membranen dreimal mit PBS gewaschen und, nachdem sie in ca. 1 mm breite Streifen geschnitten worden waren, für 30 Minuten in Glutaraldehyd (1% in Cacodylat-Puffer, 4°C) vorfixiert. Anschließend wurde 3x mit Cacodylat-Puffer und 2x mit Acetat-Puffer gespült. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C mit Saure Phosphatase -Inkubationsmedium (nach 30 Minuten wurde das Medium durch frisches ersetzt) wurden die Membranen je 2x mit Acetat-Puffer und 3x mit Cacodylat-Puffer gewaschen und, wie unter 2.3.3.1 beschrieben, fixiert, eingebettet und mikroskopiert.

### 2.3.3.3 Energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX-Verfahren)<sup>1</sup>

Nach Ablauf der Inkubationszeit (s.2.2.2.3.) wurden die Membranen mit den adhärennten Zellen wie unter 2.2.3.1 beschrieben fixiert, eingebettet, geschnitten und kontrastiert.

Anschließend wurde mit einem Hitachi H700H-ST-Elektronenmikroskop in verschiedenen Zytoplasmabereichen der Zellen eine energiedispersive Röntgenmikroanalyse (System Tracor Northern TN 5500/ Serie II) durchgeführt. Der für Cer charakteristische Energiebereich, der durch den Beschuß der Schnitte mit Elektronen induzierten Röntgenstrahlung, diente zum Nachweis des Cers in der Probe.

---

<sup>1</sup> Die EDX-Analyse erfolgte durch Hrn. Thiele, KfK, TU.

### 2.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

#### 2.3.4.1 Fluoreszenzmarkierung der Lysosomen mit Acridin Orange

Die Markierung der Lysosomen bzw. der Phagolysosomen mit Acridin Orange erfolgte mit leichten Modifikationen nach der Methode von Kane et al. (1980).

##### *Chemikalien und Puffer*

##### Acridin Orange (AO)-Lösung

100  $\mu$ g Acridin Orange (SIGMA) in 10 ml 0.9% -iger NaCl lösen und lichtgeschützt aufbewahren.

##### *Durchführung:*

Am Versuchsende (s. 2.2.2.2) wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml AO-Lösung ersetzt. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die auf Deckgläsern festsitzenden Zellen gründlich mit PBS gewaschen und für weitere 15 Minuten in Medium (37°C) kultiviert. Anschließend wurden die Deckgläser umgedreht auf Objektträger mit Abstandshaltern gelegt, mit Medium unterschichtet und an einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Diaplan, Filterblock I2, Anregungswellenlänge: 450 - 490 nm, Emissionswellenlänge: > 515 nm) mit Photoausrüstung (Wild Photoautomat MPS 45, Kamera MPS 51) ausgewertet.

#### 2.3.4.2 Fluoreszenzmarkierung des F-Aktins mit Rhodamine-Phalloidin

Die Markierung des F-Aktins mit Rhodamine-Phalloidin wurde in Abänderungen der vom Hersteller (Molecular Probes) empfohlenen Methode durchgeführt.

##### *Chemikalien und Puffer*

##### PHEM-Puffer nach Schliwa und vanBlerkom (1981)

60 mM (Piperazine-N,N'-bis (2-ethane-sulfonic acid)) (PIPES)  
 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid (HEPES)  
 10 mM Ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -Aminoethyl Ether) N,N,N',N'-Tetraacetic acid (EGTA)  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 mit 1 M NaOH auf pH 6.9 einstellen.

##### Rhodamine-Phalloidin-Farblösung

Die methanolische Rhodamine-Phalloidin-Lösung (Molecular Probes, Eugene, OR; 100 Units/ml) wurde jeweils kurz vor dem Gebrauch mit PHEM-Puffer 1:100 verdünnt und auf 37°C vorgewärmt.

*Durchführung:*

Die Zellen wurden am Inkubationsende (s. 2.2.2.2) zweimal mit PHEM-Puffer (37°C) gewaschen und mit 2.5%-igem Glutaraldehyd (in PHEM-Puffer) für 10 Minuten bei 37°C fixiert. Nach erneutem Waschen mit PHEM-Puffer wurden die Zellen in Glaspetrischalen überführt und 5 Minuten mit -20°C kaltem Aceton extrahiert. Zur Färbung wurden die luftgetrockneten Deckgläser umgekehrt auf Objektträger mit Abstandshaltern gelegt, mit Rhodamine-Phalloidin-Farblösung unterschichtet und 1 Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Proben wurden über Nacht in PHEM-Puffer gewaschen, umgekehrt auf einen Objektträger mit Abstandshaltern gelegt und nach der Unterschichtung mit PHEM-Puffer an einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Diaplan, Wetzlar, Filterblock N2, Anregungswellenlänge: 530 - 560 nm, Emissionswellenlänge: > 580 nm) ausgewertet.

2.3.4.3 Fluoreszenzmarkierung der Mikrotubuli mit FITC-gekoppelten Antikörpern

Die Markierung der Mikrotubuli mit FITC-gekoppelten Antikörpern wurde mit geringfügigen Abweichungen nach der von Birrell et al. (1989) beschriebenen Methode durchgeführt.

*Chemikalien und Puffer*

## Stabilisierungspuffer

100 mM Piperazine-n,n'-bis(2-ethane-sulfonic acid)) (PIPES)  
 1.0 mM Ethyleneglycol-bis-(β-Aminoethyl Ether) N,N,N',N'-Tetraacetic acid (EGTA)  
 4% Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)  
 mit 1 M NaOH auf pH 6.9 einstellen

## 1. Antikörper

Monoclonal Anti-β-Tubulin (Ascites Fluid, SIGMA, Clon-No.TUB 2.1)  
 mit PBS kurz vor dem Gebrauch 1:200 verdünnen

## 2. Antikörper

Anti-Mouse IgG (whole molecule) FITC conjugate (developed in Sheep, SIGMA, Nr.F-6257)  
 mit PBS kurz vor dem Gebrauch 1:100 verdünnen

*Durchführung:*

Die Zellen wurden nach der Inkubation (s. 2.2.2.2) zweimal mit Stabilisierungspuffer (37°C) gewaschen und 2 Minuten mit Glutaraldehyd (0.02% in Stabilisierungspuffer, 37°C) vorfixiert. Nach einer 5 minütigen Permeabilisierung mit Triton X-100 (0.4% in Stabilisierungspuffer, 37°C) und zweimaligem Waschen mit Stabilisierungspuffer wurden die Zellen zur Fixierung für 5 Minuten in Glaspetrischalen mit -20°C kaltem Methanol überführt. Ohne anschließende Lufttrocknung wurden die Deckgläser gewaschen (1x Stabilisierungspuffer, 1x PBS), umgekehrt auf einen Objektträger mit Abstandshaltern gelegt und mit dem ersten Antikörper für 1 Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Behandlung mit dem zweiten Antikörper unter den gleichen Bedingungen. Die Deckgläser wur-



den anschließend 2 Stunden gewaschen (PBS), umgekehrt auf einen Objektträger mit Abstandshaltern gelegt und mit PBS unterschichtet. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Diaplan, Filterblock I2, Anregungswellenlänge: 450 - 490 nm, Emissionswellenlänge: >515 nm).

## 2.4 Untersuchungen der Enzymfreisetzung

### 2.4.1 Vorbereitung der Proben

Nach Ablauf der Inkubationszeit (s. 2.2.2.4) wurden die Kulturüberstände abgenommen und die Zelltrümmer und abgelösten Zellen sedimentiert (10 Min.; 4°C; 250 g). Die auf diese Weise erhaltenen Pellets und die mit einem Plastischaber von der Kulturschale abgelösten Zellen wurden jeweils in 2 ml Medium aufgenommen und ebenso wie die Überstände sofort bei -20°C eingefroren. Vor den Enzymbestimmungen wurden sämtliche Proben unter Eiskühlung mit 10 Pulsen Ultraschall behandelt (Branson Sonifier B15, Einstellung: 50%).

### 2.4.2 Proteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mit dem "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad-Laboratories) bestimmt. Der Test beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Comassie Brilliant Blue G250-Lösung von 465 nm nach 595 nm durch die Bildung eines Farbstoff-Protein-Komplexes (Bradford, 1976). Als Standard diente Rinderserumalbumin (SIGMA).

#### *Durchführung:*

400 µl Probe

100 µl Biorad Protein Assay

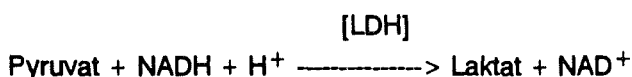
sofort sehr gut mischen. Die Messung der Absorption erfolgte nach 30 Minuten mit einem Beckman-DU65 Photometer bei 595 nm.

### 2.4.3 Enzymbestimmungen

#### 2.4.3.1 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die quantitative Bestimmung der zytoplasmatischen Laktatdehydrogenase erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Testkit (SIGMA). Zur Überprüfung der Methode wurde Precinorm E (Boehringer/Mannheim) als Standardkontrolle verwendet.

#### Reaktion:



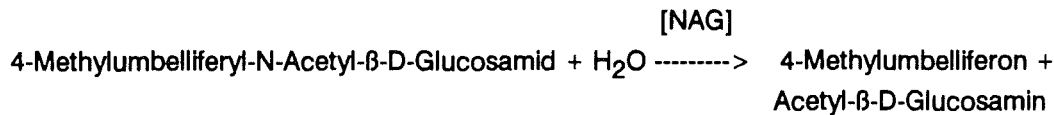
#### *Durchführung:*

Die Bestimmung wurde gemäß der dem Testkit beiliegenden Vorschrift durchgeführt. Die Messung erfolgte an einem Beckman-DU-65 Photometer bei 340 nm.

### 2.4.3.2 N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG)

Die quantitative Bestimmung des lysosomalen Enzyms NAG erfolgte nach der Methode von Andersen et al. (1982).

Reaktion:



#### *Chemikalien und Puffer*

##### Carbonat-Bicarbonat-Puffer

Lösung A: 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (MERCK)

Lösung B: 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> (MERCK)

Lösung A mit Lösung B auf den pH-Wert 10.5 titrieren.

##### Laktatpuffer

40 mM Natriumlaktat-lösung (4.48 g/l)

mit Milchsäure auf pH 3.7 einstellen.

##### Substrat

1 mM 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamid (SIGMA) in Laktatpuffer.

##### *Durchführung:*

10 μl Triton X-100 (10%)

100 μl Probe (s. 2.4.1)

100 μl Substrat

mischen und 30 Minuten bei 37°C inkubieren. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 1 ml Carbonat-Bicarbonatpuffer erfolgte die Messung an einem Lumineszenzphotometer (Perkin-Elmer, 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 Untersuchungen zur Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren und zur Mobilität von Rinderalveolarmakrophagen**

### 2.5.1 Versuchsanordnung und Auswertung

Beide Untersuchungen wurden nach der Methode von Falk et al. (1980) in einer "blind well" Chemotaxis-Kammer (Neuro Probe 48 Well Micro Chemotaxis Chamber, Nuclepore) durchgeführt.

### *Chemikalien und Puffer*

Zur Etablierung des Systems wurde bei den folgenden Substanzen die chemoattraktive Wirkung auf Rinderalveolarmakrophagen überprüft:

#### Zymosan aktiviertes Serum (ZAS)

Zur Herstellung von ZAS wurden 0.75 g Zymosan A von *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA) in 30 ml PBS gewaschen, sedimentiert (10 Min., 1000 g) und anschließend in 30 ml nicht hitzeinaktiviertem, mykoplasmenfreiem FCS (Blochrom, Ch. Nr. 6H01) resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad und einer erneuten Zentrifugation (10 Min., 3500 g) erfolgte eine einstündige Hitzeinaktivierung des Überstandes bei 56°C. Das auf diese Weise aktivierte Serum wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert und für die Versuche 1:10 mit Medium verdünnt.

#### (AS) Aktiviertes Serum

Die Aktivierung von Serum durch Quarz (QAS), Aktivkohle (AAS) und  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  ( $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ -AS) erfolgte mit der gleichen Methode (Oberdorster et al., 1989). Pro 10 ml Serum wurden dabei je 0.25 g Quarz oder  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  bzw. 0.1 g Aktivkohle eingesetzt. Für die Versuche wurden die Seren 1:10 mit Medium verdünnt.

#### FMLP (N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin, SIGMA)

Eine 10 mM FMLP -Stammlösung (in DMSO, Serva) wurde jeweils kurz vor Beginn des Versuches mit Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

#### LTB4 (Leukotrien B4, Serva)

Eine 12  $\mu\text{M}$  LTB4 -Stammlösung (in Ethanol, Roth) wurde jeweils kurz vor Beginn des Versuches mit Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Stammlösung wurde nach jeder Entnahme frisch mit  $\text{N}_2$  überschichtet.

#### *Durchführung:*

Die Handhabung der Kammer erfolgte gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Die Löcher des unteren Kammerteiles wurden mit je 25  $\mu\text{l}$  des putativ chemoattraktiven Stoffes bzw. der Kontrollösung gefüllt und gelegentlich auftretende Luftblasen sorgfältig entfernt. Anschließend wurde eine polyvenylpyrrolidonfreie Polycarbonatmembran (Nuclepore, Porendurchmesser 5  $\mu\text{m}$ , NMF-5, PVP free, 25x80 mm) aufgelegt und der obere Kammerteil aufgeschraubt. Die Löcher des oberen Kammerteils wurden nun mit 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml) gefüllt und anschließend die gesamte Kammer für 4 Stunden im Brutschrank (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , 100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach der Entnahme und dem Abstreifen der nichtgewanderten Zellen (obere Membranseite) wurde die Membran luftgetrocknet. Die gewanderten Zellen (untere Membranseite) wurden mittels Hämacolorfärbung (s. 2.3.1.1) angefärbt, wobei in jeder Farblösung jeweils eine Minute inkubiert wurde. Die Auswertung des Versuches erfolgte durch die Messung der Farbintensität an einem Laserdensitometer (UltraScan XL, LKB) im automatischen Peak-Integrationsmodus mit den Einstellungen für x-Width = 4 und y-Step = 5.

Zur Überprüfung der Methode wurde die Zahl der eingesetzten Zellen variiert und die jeweils vollständig durch die Poren gewanderten Zellen direkt mikroskopisch ausgezählt (400-fache Vergrößerung, je 4 Blickfelder pro Zellkonzentration). Die auf diese Weise bestimmten Zellzahlen wurden mit den an derselben Stelle densitometrisch gemessenen Werten verglichen. Der Korrelationskoeffizient lag dabei über 0.9.

### 2.5.2 Untersuchungen zur Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren (CF)

#### *Durchführung:*

Die Untersuchung der Freisetzung von CF wurde nach der in 2.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt und ausgewertet. Dazu wurden am Ende der Inkubation (s. 2.2.2.4) die Kulturüberstände entnommen und zum Abtrennen von Partikeln, Zelltrümmern und abgelösten Zellen für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Wenn nicht anders vermerkt wurden die Überstände ohne weitere Behandlung direkt in die Chemotaxiskammer pipettiert (25  $\mu$ l) und als Effektorzellen unbehandelte, 20 Stunden vorinkubierte Rinderalveolarmakrophagen (s. 2.2.2.5) benutzt. Diese wurden kurz vor Versuchsbeginn vorsichtig mit einem Plastikschaber abgelöst, sedimentiert (10 Min., 250 g) und in frischem Medium resuspendiert ( $2-3 \times 10^6$  leb. Zellen/ml). Um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchen zu gewährleisten, wurde die chemoattraktive Wirkung von ZAS (10%) und die spontane Mobilität der jeweiligen Effektorzellen (mit Medium als Chemoattraktant) mitbestimmt. Die chemotaktische Attraktivität der Proben wurde dann in Relation zu diesen gesetzt und als chemotaktisches Potential (CP) definiert (s. 2.10).

Zum Nachweis von intrazellulär vorhandenen CF wurden die Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit mit einem Plastikschaber abgekratzt, in 2 ml Medium aufgenommen und anschließend mit Ultraschall (Branson B15, Einstellung 50%, 10 Pulse) aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation (10 Min., 3500 g) wurde das chemotaktische Potential des Überstandes bestimmt. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden bei diesem Versuchsansatz die Kulturüberstände vor der Messung des CPs ebenfalls beschallt.

In einem Versuchsansatz wurde der zentrifugierte Kulturüberstand (10 Min., 3000 g) von LaBaCuO<sub>3,5</sub>-inkubierten Zellen (20 h, 50  $\mu$ g/ml) vor der Bestimmung des CPs für eine Stunde bei 0°C mit Antiserum gegen humanen Complementfaktor C5 (Goat Antiserum to Human C5, ICN, Endverdünnung 1:100) inkubiert. Als Kontrolle wurde gleichermaßen inkubiertes Medium und ZAS benutzt.

#### Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Die Kulturüberstände von LaBaCuO<sub>3,5</sub> inkubierten Zellen (20 h, 50  $\mu$ g/ml) wurden zur Abtrennung von Partikeln, Zellen und Zellfragmenten bei 3500 g zentrifugiert (10 Min.) und anschließend bei 4°C in einem Mikro-Ultrafiltrationssystem (Amicon, Modell 8MC) mit 5.5 bar N<sub>2</sub> 50-fach konzentriert (Trenngrenze 5 KDa., Diaflo-Membran YM5, Amicon). Nach dem Wechsel des Mediums gegen 50 mM Tris-Puffer (s. 2.1.1) wurden die CF auf einer Sephacryl-Säule (S200, Pharmacia) bei einer Durchflußrate von 1 ml/Min. aufgetrennt und fraktioniert (3 ml pro

Fraktion, Fraktionssammler Frac 300, Pharmacia). Die einzelnen Fraktionen wurden bis zur Bestimmung der jeweiligen CPs bei 4°C aufbewahrt.

Die Eichung der Säule erfolgte mit den Proteineichstandards (Pharmacia) Ribonuclease A (13.7 KDa.), Ovalbumin (43 KDa.), Rinderserumalbumin (67 KDa.), Aldolase (158 KDa.) und Ferritin (440 KDa.). Das Ausschlußvolumen wurde mit Dextran Blau (Pharmacia) bestimmt und betrug 168 ml.

### 2.5.3 Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität

#### *Durchführung:*

Die Durchführung und Auswertung der Untersuchungen erfolgte nach der in 2.5.1 beschriebenen Methode. Dazu wurden die Zellen am Ende der Inkubation (s. 2.2.2.5) vorsichtig mit einem Plastischaber abgelöst, sedimentiert (10 Min., 250 g) und anschließend mit Medium in einer Konzentration von  $2\text{-}3 \times 10^6$  lebender Zellen pro Milliliter resuspendiert. Für einige Versuche mit Cytochalasin B, Colchizin und  $\text{LaCl}_3$  wurde zum Resuspendieren nicht Medium, sondern der eigene Kulturüberstand verwendet, so daß sich die Zellen auch während des Aufenthaltes in der Chemotaxis-Kammer in dem jeweiligem Inkubationsmedium befanden. Als Chemoattraktant wurde bei allen Untersuchungen 10% -iges ZAS (s. 2.5.1) benutzt.

### **2.6 Untersuchungen der C5a-Rezeptoren**

Die Untersuchung der C5a-Rezeptoren wurde nach Modifikation der Methode von Robbins et al. (1987) durchgeführt.

#### *Chemikalien und Puffer*

ZAS -Lösung (s. 2.5.1)

#### **1. Antikörper**

Goat Antiserum to Human C5 (ICN)  
mit PBS kurz vor Gebrauch 1:100 verdünnt.

#### **2. Antikörper**

Anti-Goat IgG (whole molecule) FITC Conjugate developed in rabbit (SIGMA, F-6133)  
mit PBS kurz vor Gebrauch 1:200 verdünnt.

#### *Durchführung:*

Die Zellen wurden am Ende der Inkubationszeit (s. 2.2.2.2) mit warmem Medium gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit ZAS-Lösung bzw. zur Kontrolle mit Medium überschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem 1. Antikörper bei 4°C. Vor und nach der Inkubation mit dem 2. Antikörper (1h, 4°C) wurden die Zellen erneut gründlich mit PBS (4°C) gewaschen. Die Auswertung erfolgte an der unter 2.3.4.1 beschriebenen fluoreszenzmikroskopischen Einrichtung.

## 2.7 Untersuchung des Polymerisationsgrades von Aktin

Die Bestimmung des Polymerisationsgrades erfolgte in Anlehnung an die von Blikstad et al. (1978) beschriebenen Methode.

Diese basiert auf der spezifischen Eigenschaft des globulären (G-) Aktins, stöchiometrisch an das Enzym DNase I zu binden und es dadurch in seiner Aktivität zu hemmen. Die Aktivität der DNase I bzw. ihre Hemmung kann auf Grund der auftretenden Hyperchromizität bei 260 nm kinetisch am Photometer bestimmt werden. Dabei ist die Rate der Absorptionzunahme direkt proportional zur Menge des aktiven Enzyms. Der Polymerisationsgrad läßt sich aus dem Anteil des G-Aktins am Gesamtaktingehalt, der durch vorheriges Depolymerisieren des filamentösen (F-) Aktins bestimmt werden kann, berechnen.

### *Chemikalien und Puffer*

#### Extraktionspuffer

150.0 mM NaCl  
2.0 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.2 mM Adenosin 5'-Triphosphat (ATP, SIGMA)  
0.2 mM Dithioerythritol (DTE, SIGMA)  
0.5% Triton X-100  
0.01 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, SIGMA)  
in 5.0 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.6)

#### Depolymerisationspuffer

1.5 M Guanidine hydrochlorid (guHCl, SIGMA)  
1.0 M Natriumacetat (Merck)  
1.0 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck)  
1.0 mM Adenosin 5'-Triphosphat (ATP, SIGMA)  
in 20.0 mM Tris-HCl pH 7.5 (Merck)

#### Desoxyribonuclease I (DNase I) -Puffer

0.01 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, SIGMA)  
0.25 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck)  
in 50.0 mM Tris-HCl pH 7.5 (Merck)

### Desoxyribonuclease I (DNase I)- Lösung

Kurz vor dem Gebrauch wurde 0.1 mg DNase I (EC 3.1.21.1, from Bovine Pancreas, SIGMA) in 1 ml DNase I -Puffer gelöst und bei 0°C gelagert.

### Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Puffer

4.0 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck)  
1.8 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck)  
in 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 (Merck)

### Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Lösung (Substratlösung)

24 mg DNA-Fasern (Kalbsthymus DNA, Typ I, SIGMA) wurden mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten, über Nacht unter langsamen Rühren bei Raumtemperatur in 400 ml DNA -Puffer gelöst und anschließend filtriert. Nach der Portionierung (je 3 ml in 5 ml Reaktionsgefäße, Sarstedt) wurde die DNA -Lösung bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

### *Durchführung:*

Die Zellen wurden am Ende der Inkubationszeit (s. 2.2.2.4) je einmal mit Medium und Trypsin-Lösung (0.25%) gewaschen, anschließend mit 2 Tropfen Trypsin-Lösung (1-2 Min., 37°C) von der Schale abgelöst und in 2 ml eiskaltem PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (s. 2.1.1) aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (3 Min., 1000 g) wurde das Zellpellet mit 250 µl Extraktionspuffer (0°C) resuspendiert und je 100 µl davon zur Bestimmung des G-Aktin gehaltes mit 100 µl Extraktionspuffer bzw. zur Bestimmung des Gesamtaktin gehaltes mit 100 µl Depolymerisationspuffer versetzt. Sofern bei diesen Verdünnungen eine vollständige Hemmung der DNase I -Aktivität eintrat wurde mit Extraktionspuffer bzw. einem Extraktions-Depolymerisations-Puffergemisch (1:1) entsprechend stärker verdünnt. Jeweils 10 µl dieser Proben wurden mit 10 µl DNase I -Lösung gemischt und innerhalb von 5 Sekunden in 3 ml DNA-Lösung (25°C) pipettiert. Nach guter Durchmischung wurde die Messung der Enzymkinetik bei 25°C und 260 nm in Quarzküvetten an einem Beckman DU-65 Photometer über 3 Minuten (alle 15 Sekunden eine Messung) durchgeführt. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels Bio-Rad Protein Assay (s. 2.4.2) bestimmt.

Die Berechnung der G-Aktinmenge pro Probe erfolgte in inhibitorischen Einheiten mit Hilfe der in 2.10 erläuterten Formel.

Zur Überprüfung der Methode wurde gereinigtes (F-) Aktin (from Bovine Muscle, SIGMA) depolymerisiert (1 mg/ml Depolymerisationspuffer), in verschiedenen Konzentrationen verdünnt und jeweils die inhibitorischen Einheiten bestimmt.

## 2.8 Untersuchungen des F-Aktin gehaltes

Zur Bestimmung des F-Aktin gehaltes und seiner Veränderung nach Stimulation mit ZAS wurde die bei Simchowitz et al. (1990) beschriebene Methode etwas modifiziert.

### *Chemikalien und Puffer*

ZAS -Lösung (s. 2.5.1)

PHEM-Puffer (s. 2.3.4.2)

Rhodamine-Phalloidin-Farblösung (s. 2.3.4.2)

### *Durchführung:*

Am Ende der Inkubationszeit (s. 2.2.2.6) wurde das Medium entfernt und die Zellen für 0, 0.5, 1, 2, 5, 15, 30 oder 45 Minuten mit 150  $\mu$ l ZAS (10%) bei 37°C im Brutschrank stimuliert und anschließend gründlich mit PHEM-Puffer gewaschen. Nach der Fixierung mit 150  $\mu$ l Glutaraldehyd (10 Min., 2.5% in PHEM-Puffer) und der Extraktion mit 150  $\mu$ l Triton X-100 (10 Min., 0.15% in PHEM-Puffer) erfolgte die Anfärbung des filamentösen (F-)Aktins durch eine einstündige Inkubation mit 150  $\mu$ l Rhodamine-Phalloidin-Farblösung bei Raumtemperatur.

Um den nicht gebundenen Farbstoff vollständig zu entfernen wurde die Bestimmung des gebundenen Farbstoffes erst nach 72 stündigem Waschen mit PHEM-Puffer (4°C) durchgeführt. Dazu wurde die Intensität der Emission (mittlere Fluoreszenzwellenlänge: 625 nm) nach Anregung des Farbstoffes (mittlere Anregungswellenlänge: 540 nm) an einem Fluorescence Measurement System (CytoFluor<sup>TM</sup> 2300, Millipore) ermittelt. Die Durchlässigkeiten der benutzten Filtereinheiten lagen bei 555 - 625 nm (Fluoreszenz) bzw. bei 505 - 555 nm (Anregung), die Empfindlichkeit wurde auf Stufe 7 eingestellt.

## 2.9 Untersuchungen der Adhäsionsfähigkeit

Die zur Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit benötigte Zellzahlbestimmung erfolgte durch Bestimmung des DNA -Gehaltes nach der bei Xu et al. (1989) beschriebenen Methode.

### *Chemikalien und Puffer*

Natriumdodecylsulfat (SDS) -Lösung

0.1% Natriumdodecylsulfat-Lösung in Aqua bidest.

Ethidiumbromid-Lösung

6.0  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid (Boehringer, Mannheim) in Aqua bidest.



*Durchführung:*

Am Ende der Inkubationszeit (s. 2.2.2.7) wurde für jeden Versuchsansatz mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Vitalität bzw. die Zellzahl bestimmt und anschließend je 3x2 ml Zellsuspension in 6x35 mm Makroplatten (Greiner, Nr.657160) ausgesät. Nach einer einstündigen Anheftzeit im Brutschrank wurde der Kulturüberstand vorsichtig abgesaugt und die nichtadhärenten Zellen durch zweimaliges vor- und zurückschwenken der Platten mit 1 ml warmem Medium abgewaschen. Die Lyse der adhärennten Zellen erfolgte durch eine 5 minütige Behandlung mit 2 ml SDS-Lösung bei Raumtemperatur. Dieses Lysat wurde mit 2 ml Ethidiumbromid-Lösung gemischt und anschließend für 15 bis 30 Minuten unter Lichtabschluß stehen gelassen. Die Messung erfolgte an einem Lumineszenzphotometer (Perkin-Elmer LS 5B) bei einer Anregungswellenlänge von 525 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm. Als Eichstandard dienten Suspensionen von Rinderalveolarmakrophagen mit bekannter Zellzahl.

**2.10 Auswertung und Präsentation der Daten**

In der Darstellung der Enzymfreisetzung wurden die ermittelten Daten als Prozentwerte der Kontrollgesamtaktivität wiedergegeben. Die Kontrollgesamtaktivität ergibt sich aus der Addition der Aktivitäten des Kulturüberstandes, der abgelösten und der adhärennten Kontrollzellen zum Zeitpunkt 2 Stunden. Die Summe wurde als 100% genommen und bei der Berechnung der prozentualen Verteilungen in den Proben zugrunde gelegt.

Bei den Untersuchungen zur Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren wurde das chemotaktische Potential (CP) der Proben in Relation zu dem CP einer 10%-igen ZAS - Lösung gesetzt und mit Hilfe der folgenden Definition und Formel berechnet.

**Def.:** Das chemotaktische Potential einer Probe ist die Differenz zwischen seiner chemotaktischen Attraktivität und derjenigen vom Kontrollmedium (spontane Mobilität der Zellen).

$$CP = \frac{X - X_{RPMI}}{X_{ZAS} - X_{RPMI}} * 100 \text{ [Rel.Einheiten]}$$

X : Chemotaktische Attraktivität der Proben

X<sub>ZAS</sub> : Chemotaktische Attraktivität von ZAS

X<sub>RPMI</sub> : Chemotaktische Attraktivität von Medium (Spontane Mobilität)

Bei den Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität wurde die Zahl der gewanderten, unbehandelten Kontrollzellen als 100% gesetzt und der Berechnung der Mobilität von behandelten Zellen zugrunde gelegt.

Für die Untersuchungen des Polymerisationsgrades von Aktin wurden die inhibitorischen Einheiten [Units] der Proben mit Hilfe der folgenden Definition und Formel berechnet:

**Def:** Ein Unit ist die Menge an G-Aktin, die 1% der DNase I -Aktivität (0.1 mg DNase I/ml) hemmt.

$$\text{Aktinmenge [Units]} = \frac{(dE_0/dt) - (dE_1/dt)}{(dE_0/dt)} * 100 * \frac{V}{10 \mu l}$$

(dE<sub>0</sub>/dt) : Extinktionsänderung ohne Probe pro Minute

(dE<sub>1</sub>/dt) : Extinktionsänderung mit Probe pro Minute

V : Volumen, in dem die Probe aufgenommen wurde [in μl]

Der Gesamtaktin Gehalt wurde in inhibitorischen Einheiten pro μg Protein angegeben, der G - Aktin Gehalt als Prozentzahl des Gesamtaktins.

Sofern mehr als 3 Werte vorlagen, wurde der Mittelwert mit Standardfehler angegeben. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung (2p < 0.05) erfolgte durch die Ermittlung des David-Quotienten (Sachs, 1984). Statistische Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mit Hilfe des t-Testes nach Student geprüft. Ein statistischer Unterschied wurde dann angenommen, wenn 2p kleiner als 0.05 war.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Morphologische Untersuchungen

##### 3.1.1. Lichtmikroskopie

Die Abb. 1a-f zeigt hämacolorgefärbte Rinderalveolarmakrophagen (RAM) nach Inkubation mit und ohne  $\text{CeCl}_3$  bzw.  $\text{LaCl}_3$ . Während selbst nach 20 -stündiger Inkubation der Zellen in jeweils  $10 \mu\text{M}$  Lösungen (Abb. 1b, e), kein Unterschied zu den Kontrollzellen (Abb. 1a, d) feststellbar ist, kann bereits nach 4 Stunden in  $100 \mu\text{M}$  Lösungen eine Vakuolisierung des Zytoplasmas beobachtet werden (nicht gezeigt). Diese wird im weiteren Verlauf der Inkubation immer deutlicher und manifestiert sich nach 20 Stunden häufig in einer sehr großen Vakuole oder in dem fast völligen Verlust der Anfärbbarkeit des Zytoplasmas (Abb. 1c, f).  $\text{CeCl}_3$  und  $\text{LaCl}_3$ -inkubierte Zellen verhalten sich hinsichtlich der Ausprägung dieser Merkmale identisch.

Wie in Abb. 2a-c zu erkennen ist, führt die 20 -stündige Inkubation mit dem lanthanhaltigen Hochtemperatursupraleiter (HTS)  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  bei den untersuchten Konzentrationen zu keiner damit vergleichbaren morphologischen Veränderung der Zellen. Die meisten Partikel sind zu diesem Zeitpunkt von den Zellen aufgenommen oder mit ihren Oberflächen assoziiert, ihre Anzahl ist allerdings im Vergleich zur eingesetzten Partikelzahl stark reduziert. Im Gegensatz dazu kann nach der Inkubation mit  $\text{La}_2\text{O}_3$  eine, dem  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  vergleichbare, Vakuolisierung des Zytoplasmas beobachtet werden (Abb. 2d, e). Bei der Mehrzahl der Zellen tritt diese jedoch erst nach 20 Stunden und mit  $50 \mu\text{g/ml}$  deutlich hervor, wobei in der Regel im Innern der Vakuolen noch ein oder mehrere Partikel sichtbar sind. Die Inkubation mit  $100 \mu\text{g/ml}$  führt demgegenüber meist nicht zu einer Vakuolisierung, sondern zu einer Akkumulation der Partikel in oder an der Zelle (Abb. 2f).

##### 3.1.2. Rasterelektronenmikroskopie

Die Abb. 3a-c zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von RAM nach 20 -stündiger Kultur in Kontrollmedium. Es ist deutlich zu erkennen, daß es sich morphologisch um eine sehr heterogene Zellpopulation handelt. Neben den meist kugelförmigen Zellen (Abb. 3a, c) treten oft langgestreckte oder flache Formen (Abb. 3a, b) auf. Auffallend ist die sehr stark strukturierte Oberfläche mit den flächigen Lamellipodien und den feinen, z.T. sehr langen Filopodien, die häufig Zell-Zell Kontakte ausbilden (Abb. 3a). Durch eine 20 -stündige Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  kommt es, wie in Abb. 4a-c zu erkennen ist, zu deutlichen Veränderungen der Zelloberfläche. Die Zellen erscheinen wesentlich unstrukturierter (Abb. 4a) und die Anzahl der Filopodien ist sehr stark reduziert. Die auffälligste Veränderung ist jedoch das Auftreten von "Membraneinstülpungen", die eine beträchtliche Größe erreichen können (Abb. 4b). Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um die lichtmikroskopisch erkennbaren Vakuolen, die präparationsbedingt eingesunken sind.

Zellen, die für 20 Stunden mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$  inkubiert worden waren, sind in Abb. 5a-c dargestellt. Ebenso wie bei den  $\text{CeCl}_3$ -inkubierten Zellen sind Reduzierungen der Oberflächenstruktur (Abb. 5a) und zahlreiche "Membraneinstülpungen" (Abb. 5b) erkennbar. Diese zeigen

auch hier eine innere Oberflächenstrukturierung (Abb.5c).

Ein davon völlig abweichendes Erscheinungsbild ist bei Zellen, die für 20 Stunden mit Quarz inkubiert worden waren zu erkennen (Abb.6a-c). Zwar ist auch hier die Oberflächenstrukturierung stark vermindert und die Filopodienzahl reduziert, aber großflächige Einstülpungen treten nicht auf. Die Zellmembran ist so verändert, daß die Zellen z.T. ein schwammartiges Aussehen besitzen (Abb.6a). Zudem sind in ihnen sehr häufig Strukturen sichtbar, bei denen es sich möglicherweise um phagozytierte Quarzpartikel handeln könnte (Abb.6b, c).

### 3.1.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Abb.7a-c zeigen transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten durch RAM nach 2, 4 und 20 -stündiger Kultur in Kontrollmedium. Wie ein Vergleich der Zellen ergibt, treten im Laufe der Kulturdauer keine wesentlichen morphologischen Veränderungen auf. Sie besitzen zu allen Inkubationszeiten ein stark strukturiertes Zytoplasma, in dem meist ein gut entwickelter Golgi-Apparat, zahlreiche Mitochondrien, rauhes und glattes ER, Filamentbündel sowie diverse Einschlüsse bzw. Vakuolen sichtbar sind (Abb.7a). Wie in Abb.7b zu erkennen ist, kann die Vakuolisierung auch bei Kontrollzellen beträchtliche Ausmaße erreichen. Der Kern ist meist gebuchtet oder bohnenförmig und besitzt einen deutlichen Anteil an Heterochromatin. An der Zelloberfläche sind sehr viele Vorsprünge ausgebildet, die sich über die ganze Zelle erstrecken. In Abb.7c sind zudem einige pseudopodienartige Zellausstülpungen zu erkennen, mit denen sich die Zelle vermutlich auf der Polycarbonatmembran verankert.

Bereits nach 2 -stündiger Inkubation in  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  ist eine deutliche Vakuolisierung des ansonsten unverändert strukturierten Zytoplasmas feststellbar (Abb.8a). Die Vakuolen sind meist nicht rund oder oval, sondern besitzen gebuchtete, langgestreckte z.T. sogar tubuläre Formen. Sie sind elektronenhell, enthalten aber typischerweise elektronendichte, niederschlagsartige Strukturen. Diese Strukturen sind auch außerhalb der Zellen an der Zellmembran nachweisbar und gelangen sehr wahrscheinlich mittels Phagozytose in das Zellinnere (Abb.8a). Nach 4 -stündiger Inkubation in  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  sind noch immer zahlreiche kleine, voneinander getrennte, aber auch einige größere Vakuolen sichtbar. Ebenso können noch phagozytierende Zellen gefunden werden (Abb.8b). Abb.8c zeigt einen RAM, der 20 Stunden in  $100 \mu\text{M CeCl}_3$  inkubiert worden war. Das auffälligste Merkmal neben den häufig sehr großen Vakuolen mit ihren Einschlüssen ist die nahezu vollständig reduzierte Oberflächenstruktur. Die Zytoplasma- und die Kernstruktur erscheint auch nach 20 -stündiger Inkubation unverändert.

Wie energiedispersive röntgenspektrographische Untersuchungen zeigen, handelt es sich bei den elektronendichten Strukturen im Inneren der Vakuolen um cerhaltige Verbindungen (Abb.9). Das Cer kann nur in diesen typischen, membranumschlossenen Vakuolen, nicht aber in der Matrix oder in anderen elektronendichten Zytoplasmaeinschlüssen nachgewiesen werden. Auch in dem untersuchten lamellaren Körperchen ist Cer nicht nachweisbar.

Die für  $\text{CeCl}_3$ -inkubierte RAM erhobenen Befunde treffen in völlig analoger Weise auch auf  $\text{LaCl}_3$ -inkubierte Zellen zu (Abb.10a-d). Auch in diesen Zellen sind bereits nach 2 -stündiger Inkubation zahlreiche kleine Vakuolen mit elektronendichten Einschlüssen zu beobachten (Abb.10b). In Abb.10a scheint gerade die Phagozytose solcher Strukturen erkennbar zu sein. Im Laufe der weiteren Inkubation nimmt die Größe der Vakuolen zu, ihre Anzahl jedoch ab (Abb.10c, d). Genau wie bei den  $\text{CeCl}_3$ -inkubierten Zellen erscheint die Oberflächenstruktur sehr stark reduziert (Abb.10d), während sowohl die Kern- als auch die Zytoplasmastruktur unverändert bleibt. Die ultrastrukturelle Lokalisation der Sauren Phosphatase (SP) in RAM nach 20 -stündiger Inkubation mit und ohne  $\text{LaCl}_3$  ist in Abb.11a, b zu sehen. In den Kontrollzellen sind einige der im Zytoplasma erkennbaren Organellen und Vakuolen SP-positiv (Abb.11a). Diese SP -positiven Organellen sind jedoch morphologisch sehr heterogen. Neben einigen primären Lysosomen ( $< 0.1 \mu\text{m}$ ) sind vor allem multivesikuläre Körperchen und andere sekundäre Lysosomen angefärbt. Auch in  $\text{LaCl}_3$ -inkubierten Zellen sind SP-positive Organellen vorhanden. Sie sind sowohl in ihrer Heterogenität als auch in ihrer Häufigkeit mit denen der Kontrollzellen vergleichbar. Auffallend ist jedoch, daß die großen, bei  $\text{LaCl}_3$ -Inkubationen auftretenden Vakuolen mit ihren charakteristischen Einschlüssen keine SP-Aktivität zeigen.

#### 3.1.4. Fluoreszenzmarkierung mit Acridin Orange (AO)

Abb.12a-c zeigt Rinderalveolarmakrophagen nach 20 -stündiger Inkubation mit und ohne  $\text{CeCl}_3$  bzw.  $\text{LaCl}_3$ , die anschließend mit Acridin Orange markiert worden sind. Dieser Fluoreszenzfarbstoff reichert sich in sauren Zellkompartimenten, hauptsächlich jedoch in Lysosomen an und fluoresziert je nach pH-Wert gelb bis rot. In den Kontrollzellen (Abb.12a) sind sehr viele kleine bis mittelgroße, rot fluoreszierende Lysosomen zu erkennen. Die Zellkerne sind deutlich abgegrenzt, meist randständig und fluoreszieren grün. Sowohl in den  $\text{CeCl}_3$  (Abb.12b) als auch in den  $\text{LaCl}_3$  (Abb.12c) -inkubierten Zellen sind neben den zahlreichen kleinen bis mittelgroßen Lysosomen auch einige sehr große, rot fluoreszierende Kompartimente sichtbar. Ob es sich dabei ebenfalls um Lysosomen handelt ist aufgrund der Größe fraglich, vielmehr erscheint die Zuordnung zu den licht- und elektronenmikroskopisch identifizierten Vakuolen sinnvoll, die dann allerdings, wie die Fluoreszenzfarbe erkennen läßt, ein saures Milieu beinhalten. Zusätzlich zu diesen großen fluoreszierenden Kompartimenten sind in den  $\text{CeCl}_3$  bzw.  $\text{LaCl}_3$ -inkubierten Zellen vereinzelt auch völlig unmarkierte zu erkennen.

### **3.2. Biochemische Untersuchungen**

#### 3.2.1. Inkubationen mit $\text{CeCl}_3$ bzw. $\text{LaCl}_3$

##### *Vitalität*

Rinderalveolarmakrophagen wurden 2, 4 und 20 Stunden mit  $\text{CeCl}_3$  bzw.  $\text{LaCl}_3$  in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Der Einfluß dieser Inkubationen auf die Vitalität der Zellen ist in Abb.13 dargestellt. Bei keiner der untersuchten Zeiten und Konzentrationen können signifikante Vitalitätsunterschiede ( $2p < 0.05$ ) zwischen  $\text{CeCl}_3$ - und  $\text{LaCl}_3$ -inkubierten Zellen festgestellt werden. Auch im Vergleich zu den Kontrollzellen ist in den ersten 4 Stunden kein Unterschied zu beobachten. Ein solcher ergibt sich allerdings nach 20 -stündigen Inkubationen mit

50  $\mu$  M  $\text{LaCl}_3$  bzw. 100  $\mu$  M  $\text{CeCl}_3$ . Nach 20 Stunden in jeweils 100  $\mu$  M Lösungen ist die Vitalität der Zellen auf 57% ( $\text{CeCl}_3$ ) bzw. 54% ( $\text{LaCl}_3$ ) abgesunken.

#### *LDH-, NAG- und Proteinverteilung*

Neben der Vitalität wurden nach den jeweiligen Inkubationen in den drei Fraktionen: adhärenente Zellen, abgelöste Zellen und Kulturüberstand, die Enzymaktivitäten der zytoplasmatischen LDH und der lysosomalen NAG sowie der Proteingehalt gemessen. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Abb.14-16 dargestellt.

Die Verteilung der LDH ist in den ersten 4 Stunden der  $\text{CeCl}_3$ - bzw.  $\text{LaCl}_3$ -Inkubationen verglichen mit den Kontrollen nahezu unverändert (Abb.14). Die Hauptaktivität befindet sich in den adhärenenten Zellen und nur ein kleiner Prozentsatz ist im Kulturüberstand bzw. in den abgelösten Zellen nachweisbar. Nach 20 Stunden ist der Anteil im Kulturüberstand merklich angestiegen, wobei ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle jedoch erst bei Inkubationen mit 100  $\mu$  molaren Lösungen festzustellen ist. Dieses Freisetzungsmuster der LDH in den Überstand korreliert gut mit der Vitalitätsminderung. Die Gesamtaktivität ist durch die Inkubationen unbeeinflusst.

Ebenso wie bei der LDH erfolgt die Freisetzung der NAG in den Kulturüberstand erst nach 20 - stündiger Inkubation im nennenswerten Ausmaß (Abb.15). Im Gegensatz zur LDH kann die Freisetzung der NAG in den Überstand jedoch schon nach der Inkubation in 50  $\mu$  molaren Lösungen festgestellt werden. Die Inkubationen in 10  $\mu$  molaren Lösungen führen demgegenüber selbst nach 20 Stunden im Vergleich zur Kontrolle zu keiner erhöhten Enzymaktivität im Überstand. Die Gesamtaktivität bleibt während der Inkubationen nahezu konstant.

Das Verteilungsmuster des Proteins entspricht weitgehend dem der NAG. Signifikante Unterschiede im Proteingehalt des Überstandes im Vergleich zur Kontrolle zeigen sich erst nach 20 Stunden bei den jeweils 50  $\mu$  molaren Lösungen (Abb.16). Die Gesamtproteinmenge ist nach 20 -stündiger Kultur, unabhängig von den  $\text{CeCl}_3$  bzw.  $\text{LaCl}_3$  -Konzentrationen, meist etwas vermindert.

Die in den gezeigten Ergebnissen z.T. vorhandenen Unterschiede zwischen  $\text{CeCl}_3$ - und  $\text{LaCl}_3$ -Inkubationen konnten in Wiederholungsversuchen nicht bestätigt werden. Insgesamt scheinen sich die zytotoxischen Wirkungen dieser beiden Seltenen Erdmetalle nicht deutlich voneinander zu unterscheiden.

### 3.2.2. Inkubationen mit $\text{La}_2\text{O}_3$

#### *Vitalität*

$\text{La}_2\text{O}_3$  hat auf Rinderalveolarmakrophagen eine deutlich zytotoxische Wirkung (Abb.17), wobei der Vitalitätsverlust sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig erfolgt. Im Gegensatz zu den Inkubationen mit  $\text{CeCl}_3$  bzw.  $\text{LaCl}_3$  kann keine 4 -stündige Latenzzeit festgestellt werden. Eine signifikante Vitalitätsminderung ( $2p < 0.05$ ) tritt nach 2 Stunden mit 500  $\mu$  g/ml, nach 4 Stunden mit 50  $\mu$  g/ml und nach 20 Stunden bereits mit 10  $\mu$  g/ml  $\text{La}_2\text{O}_3$  ein. Es ist dabei allerdings zu berücksichtigen, daß die eingesetzte Menge an Lanthan im Vergleich zu den

LaCl<sub>3</sub>-Inkubationen deutlich größer ist. So sind z.B. 100 µg La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bezüglich des Lanthans 1 ml einer 613 µM LaCl<sub>3</sub>-Lösung äquimolar.

#### *LDH-, NAG- und Proteinverteilung*

Nach 2, 4 und 20 -stündigen Inkubationen der Rinderalveolarmakrophagen mit La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> wurden im Kulturüberstand, in den abgelösten und den adhärenen Zellen die Aktivitäten der Enzyme LDH und NAG sowie die Menge an Protein bestimmt. Ihre Verteilungen in den jeweiligen Versuchsansätzen sind in Abb.18-20 dargestellt.

Bereits nach 2 -stündiger Inkubation ist eine signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand festzustellen (Abb.18). Sehr deutlich wird dieser Anstieg allerdings erst nach 4 Stunden mit 100 µg/ml La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Im weiteren Verlauf der Inkubation kommt es zu einer drastischen Freisetzung der LDH aus den adhärenen Zellen in den Überstand, so daß sich z.B. nach der Inkubation mit 50 µg/ml La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 78% der in diesen Versuchsansatz gefundenen Gesamtenzymaktivität im Überstand befinden. Inkubationen mit höheren Konzentrationen führen zu keiner vermehrten Enzymfreisetzung mehr. Die Gesamtenzymaktivität in den jeweiligen Ansätzen entspricht in etwa den jeweiligen Kontrollen.

Die beobachteten Wirkungen der La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Inkubationen auf die Verteilung der LDH-Aktivität in den verschiedenen Fraktionen sind in nahezu gleicher Weise auch für die Verteilungen der NAG-Aktivität (Abb.19) und des Proteins (Abb.20) feststellbar.

### 3.2.3. Inkubationen mit LaBaCuO<sub>3,5</sub>

#### *Vitalität*

Rinderalveolarmakrophagen, die mit LaBaCuO<sub>3,5</sub> inkubiert worden waren, zeigen einen deutlich konzentrations- und zeitabhängigen Vitalitätsverlust (Abb.21), der allerdings in den ersten 4 Stunden nur relativ schwach ausgeprägt ist. Demgegenüber kann nach einer 20 -stündigen Inkubation mit 200 µg/ml eine drastische Reduzierung der Vitalität von 81% (Kontrolle) auf 21% festgestellt werden.

#### *LDH-, NAG- und Proteinverteilung*

Der Einfluß von LaBaCuO<sub>3,5</sub>-Inkubationen auf die Verteilung der Enzymaktivitäten und des Proteins in den Fraktionen Kulturüberstand, abgelöste und adhärenente Zellen ist in Abb.22-24 zu erkennen. Während sich selbst bei hohen LaBaCuO<sub>3,5</sub>-Konzentrationen die Verteilung der LDH im Vergleich zur Kontrolle weder nach 2 noch nach 4 -stündigen Inkubationen deutlich verändert, ergibt sich nach 20 Stunden ein völlig anderes Verteilungsmuster (Abb.22). Neben dem unsystematisch auftretenden Ablösen der Zellen ist dabei vor allem die Erhöhung der Enzymaktivität im Überstand auffällig. Diese kann bereits nach Inkubationen mit 10 µg/ml nachgewiesen werden ( $2p < 0.05$ ) und erreicht mit 100 µg/ml sowohl absolut, wie auch prozentual einen maximalen Wert, der auch durch die Verdoppelung der Konzentration nicht übertroffen wird. Die in diesem Versuch nach 4 Stunden auftretenden signifikant erhöhten Enzymaktivitäten konnten in Wiederholungsversuchen nicht bestätigt werden. In allen Versuchen war die LDH-Gesamtktivität nach 20 -stündigen Inkubationen mit 100 bzw. 200 µg/ml

LaBaCuO<sub>3,5</sub> mehr oder weniger deutlich reduziert.

Bei der Betrachtung der NAG- und Proteinverteilung (Abb.23 u. 24) ergibt sich ein der LDH-Verteilung entsprechendes Bild. Wie bei ihr findet die Freisetzung in den Überstand erst nach 20 Stunden im größerem Ausmaße statt, dies allerdings schon bei 50 µg/ml.

### **3.3. Untersuchungen zur Freisetzung von chemoattraktiv wirksamen Faktoren (CF)**

#### **3.3.1. Chemoattraktive Wirkung verschiedener Substanzen auf RAM**

Die Fähigkeit von Rinderalveolarmakrophagen, sich in den Konzentrationsgradienten verschiedener chemoattraktiver Agenzien gerichtet zu bewegen, wurde sowohl eine Stunde nach der Lavage als auch nach 20 -stündiger Übernachtkultur untersucht. Wie in Abb.25 zu erkennen ist, kann direkt nach der Lavage, bei dem als Negativkontrolle benutzten Medium (RPMI), eine geringe Wanderungsaktivität der Zellen beobachtet werden. Eine über diese spontane Migration hinausgehende Bewegung der Zellen ist jedoch weder mit Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) noch mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) induzierbar. Anschließend an eine 20 -stündige Übernachtkultur verändert sich weder die Anzahl der Zellen, die eine Spontanmigration zeigen, noch die Reaktivität der Zellen auf LTB<sub>4</sub> oder FMLP. Demgegenüber kann mit hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und mit Aktivkohle- (AAS) oder Quarz- (QAS) aktiviertem Serum sowohl bei frisch isolierten, als auch bei Übernacht kultivierten Rinderalveolarmakrophagen eine Verminderung der Spontanmigration beobachtet werden (Abb.26).

Wesentlich auffälliger ist jedoch die sehr starke chemotaktische Reaktion der RAM auf "Zymosan aktiviertes Serum" (ZAS), die jedoch nur von Zellen gezeigt wird, die zuvor für 20 Stunden in Kultur gehalten wurden. Diese Reaktion ist deutlich konzentrationsabhängig und erreicht bei einer Verdünnung des ZAS von 1:10 einen maximalen Wert (Abb.27).

#### **3.3.2. Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch RAM**

Im Kulturüberstand von Rinderalveolarmakrophagen, die mit CeCl<sub>3</sub> inkubiert worden waren, kann eine, auf andere, unbehandelte Rinderalveolarmakrophagen chemoattraktiv wirkende, Aktivität festgestellt werden (Abb.28). Die Freisetzung dieser CF ist jedoch erst nach einer 20 -stündigen Inkubation signifikant nachzuweisen. Sie erfolgt dann streng dosisabhängig, wobei die, nach einer Inkubation mit 50 µM bzw. 100 µM CeCl<sub>3</sub> freigesetzten CF, in ihrer Wirkung etwa 54% bzw. 97% derjenigen einer 10%-igen ZAS-Lösung entsprechen. Die hier zum ersten Mal beobachtete, aber auch in anderen Versuchsansätzen häufig auftretende Tendenz der Überstände von 2 Stunden inkubierten Kontrollzellen, die Mobilität der Effektorzellen zu inhibieren, ist zwar auffällig, aber nur in wenigen Fällen statistisch nachweisbar.

Die Inkubationen der Rinderalveolarmakrophagen mit LaCl<sub>3</sub> führen bzgl. der CF-Freisetzung prinzipiell zu den gleichen Ergebnissen (Abb.29). Während die 2 bzw. 4 -stündigen Inkubationen in 100 µM LaCl<sub>3</sub> keine Wirkung zeigen, tritt nach 20 Stunden schon mit 50 µM LaCl<sub>3</sub> eine deutliche Erhöhung des chemotaktischen Potentials des Überstandes auf.



Auch nach der Inkubation von Rinderalveolarmakrophagen mit den partikulären Lanthanverbindungen  $\text{La}_2\text{O}_3$  und  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  ist die Freisetzung von CF in den Kulturüberstand feststellbar. Sie führt bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$   $\text{La}_2\text{O}_3$  nach 20 Stunden zu einem drastischen Anstieg des chemotaktischen Potentials auf etwa das 2.5-fache einer 10%-igen ZAS-Lösung (Abb.30). Kurzzeitige Inkubationen zeigen keine Wirkung.

Analog dazu, zeigen auch die Inkubationen mit  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  (Abb.31) nach 2 Stunden keine Wirkung, während sie nach 20 Stunden sowohl mit  $50$  als auch mit  $100 \mu\text{g/ml}$  zu sehr deutlichen CF-Freisetzungen führen. Die, mit der hohen Konzentration induzierte Erhöhung des chemotaktischen Potentials im Überstand erreicht dabei das mit  $\text{La}_2\text{O}_3$  erhaltene Ausmaß.

Wie in Abb.32 zu sehen ist, bewirkt Kupfer, ein Bestandteil des  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  ( $10 \mu\text{g}$  CuO sind bzgl. des Kupfers mit ca.  $50 \mu\text{g}$   $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  äquimolar), wenn es als Kupferoxid verwendet wird, auch nach einer 20-stündigen Inkubation keine CF-Freisetzung aus Rinderalveolarmakrophagen.

Die Inkubationen mit Quarz und  $\text{TiO}_2$ , die jeweils als zytotoxische bzw. als inerte Kontrollpartikel benutzt wurden, führen nach 20 Stunden zu völlig konträren Ergebnissen. Während mit  $250 \mu\text{g/ml}$  Quarz (Abb.33) das chemotaktische Potential des Kulturüberstandes auf etwa das doppelte einer 10%-igen ZAS-Lösung erhöht wird, kann mit der gleichen Menge  $\text{TiO}_2$  nicht die geringste Wirkung erzielt werden (Abb.34). Kurzzeitinkubationen haben weder mit Quarz noch mit  $\text{TiO}_2$  einen Effekt.

Um zu überprüfen, ob die Inkubationen, neben den bereits beschriebenen Freisetzungen, auch zu Akkumulationen von CF innerhalb der Zellen führen, wurden die intrazellulären CF-Gehalte der Rinderalveolarmakrophagen parallel zu ihren Überständen bestimmt. In Abb.35 ist zu erkennen, daß sich 2 Stunden nach Inkubationsbeginn weder in den Kontrollzellen noch in den  $\text{LaCl}_3$ - bzw.  $\text{CeCl}_3$ -behandelten Zellen CF nachweisen lassen. Obwohl die  $\text{LaCl}_3$ - bzw.  $\text{CeCl}_3$ -inkubierten Zellen nach 20 Stunden große Mengen an CF in den Überstand freigesetzt haben, sind bei ihnen im Zellinneren ebenso, wie bei den Kontrollzellen, keine Faktoren mit chemoattraktiven Eigenschaften nachweisbar. Zu prinzipiell gleichen Ergebnissen führen die Inkubationen mit  $\text{La}_2\text{O}_3$  bzw.  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  (Abb.36) und mit Quarz bzw.  $\text{TiO}_2$  (Abb.37). Dabei konnte unabhängig von der jeweiligen Freisetzung in den Überstand bei keiner der benutzten Konzentrationen eine Anreicherung von CF in den Zellen nachgewiesen werden, die deutlich über die in Kontrollzellen bestimmte Menge hinausgeht.

Die Freisetzung von CF kann auch durch eine Behandlung der Rinderalveolarmakrophagen mit  $10 \mu\text{g/ml}$  Lipopolysaccharid (LPS) induziert werden (Abb.38). In Gegensatz zu den oben beschriebenen Freisetzungen durch die metallischen Verbindungen bzw. durch Quarz, erreicht das chemotaktische Potential des Kulturüberstandes bereits nach 2-3 Stunden seinen maximalen Wert und sinkt im Laufe der weiteren Kulturdauer deutlich ab. Weder eine gleichzeitige Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  (Abb.39) noch eine 16-stündige Vorinkubation der Zellen in diesen Lösungen (Abb.40) hemmen die LPS-induzierte Freisetzung der CF. Die Überstände der vorbehandelten Zellen besitzen, verglichen mit denen von nicht vorbehandelten Zellen, nach der LPS-Stimulation sogar ein höheres chemotaktisches Potential.

### 3.3.3. Charakterisierung der chemotaktisch wirksamen Faktoren

Wie in Abb.41a zu sehen ist, wird die LPS-induzierte Freisetzung der CF durch die Hemmung der Prostaglandin-Synthese mittels 30 -minütiger Vorinkubation mit 1mM Acetylsalicylsäure nicht beeinflusst. Auch nach der Hemmung der Leukotrien-Synthese (durch die Vorinkubation der Zellen mit 200  $\mu$  M n-Propyl-Gallate) können die Rinderalveolarmakrophagen bei der Stimulation mit LPS nahezu ebensoviel CF in den Überstand freisetzen wie Kontrollzellen (Abb.41b). Eine Hemmung der Proteinsynthese durch die Inkubation mit 10  $\mu$  g/ml Actinomycin D führt demgegenüber zu einer deutlichen Reduktion des chemotaktischen Potentials im Überstand von LPS-stimulierten Zellen (Abb.42). Ebenso wie bei der Inkubation mit LPS kann auch bei der Inkubation mit LaBaCuO<sub>3,5</sub> die Freisetzung der CF durch die Hemmung der Proteinsynthese reduziert werden.

Ein Vergleich zwischen den Überständen von Zellen, die mit LPS (10  $\mu$  g/ml, 4 h) bzw. mit LaBaCuO<sub>3,5</sub> (100  $\mu$  g/ml, 20 h) inkubiert worden waren, und ZAS zeigt bzgl. der Thermostabilität ihrer CF deutliche Parallelen auf (Abb.43). Das chemotaktische Potential beider Überstände wird durch eine einstündige Erwärmung auf 56°C nicht beeinflusst. Über das unbehandelte ZAS kann keine Aussage getroffen werden, da es schon während seiner Herstellung bei 56°C hitzeinaktiviert wird (s. 2.5.1.), die CF scheinen dadurch offensichtlich nicht beeinträchtigt zu werden. Die Erhitzung auf 100°C für eine Stunde führt sowohl bei den beiden Überständen als auch bei ZAS zum vollständigen Verlust des chemotaktischen Potentials.

Das chemotaktische Potential des Überstandes von LaBaCuO<sub>3,5</sub>-inkubierten RAM (50  $\mu$  g/ml, 20 h) und auch das von ZAS kann durch eine 2 -stündige Inkubation mit Antiserum gegen C5 deutlich vermindert werden (Abb.44). Dabei wird das chemotaktische Potential von ZAS um etwa 40%, das des Überstandes um etwa 70% reduziert. Interessanterweise besitzt das benutzte Antiserum gegen C5 selbst sehr starke chemoattraktive Eigenschaften.

Das Molekulargewicht der durch eine 20 -stündige Inkubation mit 50  $\mu$  g/ml LaBaCuO<sub>3,5</sub> von Rinderalveolarmakrophagen in den Kulturüberstand freigesetzten CF wurde durch Gelfiltration ermittelt. Abb.45 zeigt das Elutionsprofil der chemotaktischen Aktivität nach der Filtration über eine Sephacryl (S-200)-Säule. Die höchste Chemoattraktivität kann einem Molekulargewichtsbereich von 10500 -17000 Da. (Elutionsvolumen: 315-336 ml) zugeordnet werden. Das Maximum liegt bei 11700 Da. Neben diesem Hauptpeak können noch einige Nebenpeaks, die allerdings deutlich kleiner sind, im hochmolekularen Bereich (> 250 kDa.) festgestellt werden.

Untersuchungen der CF im Kulturüberstand von 20 Stunden mit 50  $\mu$  g/ml LaBaCuO<sub>3,5</sub> inkubierten Zellen in einem sog. "Checkerboard-Assay" (Tab.4) zeigen, daß diese wesentlich stärkere chemotaktische (bewirkt eine gerichtete Migration) als chemokinetische (bewirkt eine erhöhte Mobilität ohne die Bevorzugung einer bestimmten Richtung) Eigenschaften besitzen. Ein negativer Gradient des Überstandes (seine Konzentration ist in der oberen Kammer, wo sich die Zellen befinden, höher als in der unteren) führt zu keiner erhöhten Migration der Zellen. Demgegenüber kann durch einen positiven Gradienten (die Konzentration ist in der unteren Kammer höher als in der oberen) eine deutliche Chemotaxis bewirkt werden. Auch ohne

einen Gradienten (gleiche Konzentrationen in der oberen und unteren Kammer) kommt es in Anwesenheit der CF zu einer verstärkten Wanderung der Zellen, allerdings in weit geringerem Maße.

### 3.4. Untersuchungen der chemotaktischen Mobilität

Rinderalveolarmakrophagen, die mit  $\text{CeCl}_3$  inkubiert wurden, zeigen eine drastische Reduzierung ihrer chemotaktischen Reaktion auf ZAS (Abb.46). Die Wirkung des  $\text{CeCl}_3$  erfolgt dabei sehr schnell und ist deutlich dosisabhängig. Bereits nach einer 2 -stündigen Inkubation in  $100 \mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  beträgt die Mobilität der Zellen, verglichen mit Kontrollzellen, nur noch etwa 25%. Eine Zeitabhängigkeit des Effektes ist ebenfalls feststellbar, wobei allerdings schon nach 4 Stunden die maximale Wirkung der mittleren und hohen Konzentration erreicht zu sein scheint. Tendenziell ist auch bei der niedrigsten Konzentration eine Hemmung der Mobilität festzustellen, diese erreicht aber zu keinem Inkubationszeitpunkt statistische Signifikanz.

Die Inkubation der Rinderalveolarmakrophagen mit  $\text{LaCl}_3$  führt zu Mobilitätseinbußen, die sowohl in ihrer Höhe, als auch in ihrer zeitlichen Entwicklung mit den bei  $\text{CeCl}_3$  erhaltenen nahezu übereinstimmen (Abb.47). Unterschiede zu den Inkubationen mit  $\text{CeCl}_3$  sind nur nach 4 Stunden bei der mittleren und der hohen Konzentration festzustellen, die jeweils geringere Effekte zeigen. Nach 20 Stunden ist dieser Unterschied jedoch nicht mehr vorhanden und die  $\text{CeCl}_3$  bzw.  $\text{LaCl}_3$  inkubierten Zellen besitzen gleichermaßen verringerte Mobilitäten.

Ebenso wie die Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$ , so führen auch die Inkubationen mit den lanthanhaltigen  $\text{La}_2\text{O}_3$ - (Abb.48) und  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ -Partikeln (Abb.49) bei Rinderalveolarmakrophagen zu Mobilitätseinbußen. Diese treten beim  $\text{La}_2\text{O}_3$  aber erst nach längeren Inkubationszeiten und höheren Lanthankonzentrationen (die Lanthanmenge in  $50 \mu\text{g}$   $\text{La}_2\text{O}_3$  ist mit 1 ml einer  $307 \mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ -Lösung äquimolar) auf und erreichen selbst nach 20 -stündiger Inkubation mit  $50 \mu\text{g/ml}$  mit 37% bei weitem nicht das mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$  (9%) beobachtete Ausmaß. Interessanterweise kann nach der 20 -stündigen Inkubation mit der geringen Konzentration ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) eine merklich erhöhte Mobilität der Zellen festgestellt werden.

Auch bei den Inkubationen mit  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  kommt es erst nach längeren Inkubationszeiten und bei höheren Konzentrationen zu einer deutlichen Mobilitätseinbuße. Anders als beim  $\text{La}_2\text{O}_3$  werden jedoch nach 20 -stündigen Inkubationen Mobilitätsreduzierungen erreicht, die mit denen der  $\text{LaCl}_3$ -Inkubationen vergleichbar sind. Eine Steigerung der Mobilität durch geringe Partikelkonzentrationen konnte beim  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  nicht beobachtet werden.

Quarz, der als zytotoxischer Kontrollstaub benutzt wurde, führt bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  bereits nach 2 Stunden zu einem Mobilitätsverlust von etwa 40%, der sich im Laufe von 20 Stunden nur noch unwesentlich auf etwa 47% erhöht (Abb.50). Wie schon beim  $\text{La}_2\text{O}_3$  beobachtet, scheint die Mobilität der Zellen durch die Inkubationen mit niedrigen Konzentrationen deutlich erhöht zu werden.

Nach Inkubationen mit dem inerten  $\text{TiO}_2$  ist, im Gegensatz zu den anderen benutzten Parti-

keln, selbst nach 20 Stunden kein Mobilitätsverlust festzustellen (Abb.51). Während sich in den ersten 4 Stunden bei keiner Konzentration ein signifikanter Effekt auf die Mobilität zeigt, kommt es nach 20 Stunden, übereinstimmend mit  $\text{La}_2\text{O}_3$  und Quarz bei der geringeren und zusätzlich sogar bei der höheren Konzentration zu einer verstärkten Mobilität der Zellen.

Die Mobilität der Rinderalveolarmakrophagen wird in gleichem Maße, wie durch eine Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ , durch die Depolymerisierung sowohl der Aktinfilamente als auch der Mikrotubuli nahezu vollständig gehemmt (Abb.52). Während jedoch die für 4 Stunden mit Cytochalasin B bzw. Colchizin behandelten Zellen nach dem Auswaschen und einer 4 -stündigen Nachinkubation in Kontrollmedium wieder eine deutlich höhere Mobilität besitzen als davor, ist sie bei Zellen, die für 4 Stunden mit  $\text{LaCl}_3$  inkubiert worden waren, selbst nach 20 -stündiger Nachinkubation in Kontrollmedium unverändert gering.

Rinderalveolarmakrophagen, die für 16 Stunden in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem und anschließend für 4 Stunden in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Kontrollmedium kultiviert wurden, zeigen in ihrer chemotaktischen Reaktion auf ZAS keinen Unterschied zu den 20 Stunden in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium kultivierten Zellen (Abb.53a,b). Nach 20 Stunden in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium sinkt die Mobilität der Zellen jedoch auf etwa 60% ab. Eine 4 -stündige Inkubation mit dem Kalziumkanalblocker Verapamil führt bei den in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Medium kultivierten Zellen zu keiner veränderten Mobilität. Der Einfluß des  $\text{LaCl}_3$  auf die Mobilität der Zellen wird weder durch die Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Medium noch durch das Vorhandensein von Verapamil modifiziert. Eine Modifikation kann jedoch nach einer 30 -minütigen Vorbehandlung mit Acetylsalicylsäure (ASS) beobachtet werden (Abb.54). Dabei zeigen die mit 1 mM ASS vorbehandelten Zellen nach einer 4 -stündigen Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  eine, im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellen (15%), wesentlich höhere Mobilität (63%).

Abb.55a-d zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen, die nach einer 4 -stündigen Inkubation mit und ohne  $\text{LaCl}_3$  für weitere 4 Stunden in die Chemotaxis-Kammer überführt worden waren. Deutlich ist zu erkennen, daß sowohl die nicht-gewanderten Kontrollzellen (Abb.55a) als auch die nichtgewanderten  $\text{LaCl}_3$ -inkubierten Zellen (Abb.55b) sehr flach ausgebreitet auf der Membran festsitzen. Die mit  $\text{LaCl}_3$  inkubierten Zellen zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen keinerlei Besonderheiten wie z.B. Aggregationen, die ursächlich auf eine Mobilitätsminderung hinweisen würden. Die gewanderten Kontrollzellen (Abb.55c) sind noch flacher ausgebreitet und bedecken z.T. die gesamte Membranfläche einschließlich der Poren. Über die gewanderten  $\text{LaCl}_3$ -inkubierten Zellen (Abb.55d) kann aufgrund der geringen Anzahl keine Aussage gemacht werden.

### 3.5. Untersuchungen der C5a-Rezeptoren

Zur Untersuchung der C5a-Rezeptoren wurden RAM, nachdem sie für 4 Stunden mit bzw. ohne  $\text{LaCl}_3$  inkubiert worden waren, mit ZAS behandelt und anschließend, die an den Oberflächenrezeptoren gebundenen C5a-Moleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Abb.56a-d). Ein Vergleich zwischen den Kontrollzellen (Abb.56a) und den mit  $\text{LaCl}_3$  inkubierten Zellen (Abb.56b) zeigt bezüglich ihrer Oberflächenmarkierung keine Unterschiede. Sowohl die Anzahl der Zellen, die eine intensive Oberflächenmarkierung tragen als auch die

Intensität und die Verteilung der Fluoreszenz auf den jeweiligen Zellen scheint durch eine vorausgehende Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  nicht beeinflusst zu werden. Wie in Abb.56c zu erkennen ist, kann auch ohne ZAS-Behandlung auf der Oberfläche von Kontrollzellen, allerdings im wesentlich geringerem Maße, gebundene Fluoreszenz nachgewiesen werden. Eine unspezifische, über die Fc-Rezeptoren vermittelte Bindung der Fluoreszenz kann bei ZAS-behandelten Kontrollzellen nicht festgestellt werden (Abb.56d).

### **3.6. Untersuchungen des Zytoskeletts von Rinderalveolarmakrophagen**

#### 3.6.1. Untersuchungen des Aktinsystems

##### 3.6.1.1. Fluoreszenzmarkierung des F-Aktins mit Rhodamin-Phalloidin

Da es sich bei dem Mikrofilamentsystem um einen dynamisch veränderbaren Zellbestandteil handelt und die untersuchten Rinderalveolarmakrophagen zudem eine morphologisch sehr heterogene Zellpopulation darstellen, konnten trotz zahlreicher Untersuchungen keine einheitlichen Ergebnisse erhalten werden. Die folgenden Resultate zeigen deshalb meist nur Tendenzen auf, die mehrfach in unabhängigen Experimenten auftraten.

Die Organisation der Aktinfilamente in Rinderalveolarmakrophagen direkt nach der Lavage ist in Abb.57a zu sehen. Eine diffuse Anfärbung des gesamten Zytoplasmas läßt auf eine relativ gleichmäßige Verteilung der Filamente innerhalb der Zellen schließen. Demgegenüber ist nach 20 -stündiger Kultur in Suspension eine völlige Umorganisation des Filamentsystems festzustellen (Abb.57b). Die Zellen zeigen im cortikalen Zytoplasmabereich eine deutliche Anreicherung des F-Aktins, ohne jedoch eine Polarisierung erkennen zu lassen. In den inneren plasmatischen Bereichen der Zellen ist es dagegen zu einer Verarmung an Filamenten gekommen. Der Einfluß des depolymerisierend wirkenden Cytochalasin B ist in Abb.57c dargestellt. Schon nach einer 30 -minütigen Inkubation kommt es zu unregelmäßigen Akkumulationen der Fluoreszenz ohne erkennbare Ordnung.

Wie die Suspensionskultur, so führt auch die Monolayerkultur der Rinderalveolarmakrophagen zu einer Neuorganisation des Aktinfilamentsystems (Abb.58a,b). Bereits nach einer 1 -stündigen Anheftzeit ist das F-Aktin fast ausschließlich im cortikalen Zytoplasmabereich konzentriert. Im Unterschied zu den in Suspension kultivierten Zellen lassen sich jedoch Polaritäten und häufig punktförmige Strukturen im Inneren erkennen (Abb.58a). Diese, wie auch der cortikale Ring, befinden sich in direkter Nähe zu dem Substrat und scheinen bei der Adhäsion der Zellen eine Rolle zu spielen. Nach 3 -stündiger Anheftzeit zeigen die Zellen noch prinzipiell das gleiche Erscheinungsbild (Abb.58b), wobei sich im gesamten Zytoplasma wieder eine diffuse Verteilung der Filamente etabliert. Diese ist nach einer 20 -stündigen Ruhephase und anschließender 2, 4 oder 20 -stündiger Inkubation deutlich sichtbar (Abb.59a-c). Die Organisation der Aktinfilamente insgesamt ist jedoch bei den verschiedenen Zellen sehr heterogen, vor allem in der Ausbildung des cortikalen Ringes und der Polarität zeigen sich große Unterschiede. In Abb.59d ist die Organisation des Aktinfilamentsystems einer 20 Stunden inkubierten Kontrollzelle in stärkerer Vergrößerung zu sehen. Streßfasern, wie sie z.B. in Fibroblasten zu beobachten sind, konnten niemals festgestellt werden.

Weder die Inkubation in  $100\mu\text{M CeCl}_3$  (Abb.60a-d) noch in  $100\mu\text{M LaCl}_3$  (Abb.61a-d) führt zu einer signifikanten Umorganisation oder einer Zerstörung des Aktinzytoskes in den Zellen. Selbst nach 20 -stündiger Inkubation ist die hochorganisierte Vernetzung der Filamente noch klar zu erkennen (Abb.60d, 61d).

Demgegenüber ist während der Inkubation von Rinderalveolarmakrophagen mit Quarz die Umverteilung der Filamente direkt verfolgbare (Abb.62a-f). 15 Minuten nach der Zugabe des Quarzes sind vor allem im Randbereich des Zytoplasmas zahlreiche etwa  $1\mu\text{m}$  große punktbzw. ringförmige Filamentverdichtungen zu beobachten (Abb.62a, b). Diese sind auch noch nach 2 bzw. 4 Stunden, jedoch wesentlich seltener, festzustellen (Abb.62c-e). Häufig ist zu diesen Zeitpunkten eine Anreicherung des F-Aktins im inneren Zytoplasmabereich auffällig (Abb.62c). Nach 20 -stündiger Inkubation sind zum einen fast keine freien Quarzpartikel mehr vorhanden, zum anderen ist die Organisation der Aktinfilamente mit derjenigen von Kontrollzellen vergleichbar.

Auch durch die Inkubation mit Cytochalasin B kann ein völlig verändertes Erscheinungsbild der Zellen induziert werden (Abb.63a). Wie bei den in Suspension kultivierten Zellen (vgl. Abb.57c), allerdings nicht in diesem Umfang, treten unregelmäßige Akkumulationen der Fluoreszenz auf. Diese Veränderung ist reversibel, denn nach dem Auswaschen des Cytochalasin B und einer nachfolgenden 2 -stündigen Kultur in Kontrollmedium sind zahlreiche Filamente sichtbar, die sowohl in ihrer Länge als auch in ihrem Durchmesser diejenigen von Kontrollzellen übertreffen (Abb.63b). Bei transmissionselektronenmikroskopischen Betrachtungen ist nach der Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B eine Vergrößerung des Zytoplasmas festzustellen. Das vermehrte Auftreten von Vakuolen oder andere deutliche strukturellen Veränderungen sind jedoch nicht zu beobachten (Abb.64).

### 3.6.1.2. Bestimmung des Polymerisationsgrades von Aktin

Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, hat sowohl die Kulturdauer als auch die Kulturart einen Einfluß auf den Polymerisationsgrad des Aktins bei Rinderalveolarmakrophagen. Direkt nach der Isolierung liegen 57% des gesamten in der Zelle vorhandenen Aktins in globulärer, nicht polymerisierter Form vor. Während dieser Anteil durch die 20 -stündige Kultur in Suspension nicht verändert wird, kann kurz nach dem Anheften der Zellen an Plastik Kulturschalen eine Reduzierung des G-Aktinanteils und damit eine Erhöhung des im polymerisierten Zustand befindlichen Aktins beobachtet werden. Im Laufe der weiteren Monolayerkultur steigt der Anteil des G-Aktins wieder an und erreicht nach etwa 22 Stunden den kurz nach der Lavage festgestellten Wert. Bei länger inkubierten Zellen scheint der Prozentsatz an G-Aktin deutlich erhöht zu sein.

Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich ist, führen die 2 -stündigen Inkubationen der Rinderalveolarmakrophagen mit  $100\mu\text{M CeCl}_3$  bzw.  $\text{LaCl}_3$  zu keinen Veränderungen des Polymerisationsgrades von Aktin. Demgegenüber kann nach 4 Stunden eine depolymerisierende Wirkung beider Seltener Erden festgestellt werden, die allerdings nicht das durch Cytochalasin B be-

wirkte Ausmaß erreicht und nach 20 Stunden nur noch bei  $\text{LaCl}_3$  nachzuweisen ist. Bei den zum Vergleich durchgeführten Inkubationen mit Quarz kommt es ebenfalls, jedoch schon nach 2 Stunden, zu einer signifikanten Depolymerisation des Aktins während bei Inkubationen mit  $\text{TiO}_2$  relativ große Schwankungen auftreten. Ein Einfluß auf den Gesamtktingehalt konnte bei keiner Inkubation festgestellt werden.

### 3.6.1.3. Untersuchung des F-Aktin gehaltes

Rinderalveolarmakrophagen, die mit verschiedenen  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$ -Konzentrationen vorinkubiert waren, wurden für 15, 30 und 45 Minuten mit ZAS stimuliert und anschließend die Menge an filamentösem Aktin fluoressenzphotometrisch bestimmt. Wie in Abb.65a, b zu erkennen ist, reagieren sowohl die mit  $\text{LaCl}_3$  als auch die mit  $\text{CeCl}_3$  für 4 Stunden vorinkubierten Zellen auf die Stimulation mit ZAS im Prinzip gleich wie die Kontrollzellen. Nach einer anfänglichen Reduzierung der F-Aktinmenge erfolgt eine mehr oder weniger kontinuierliche Erhöhung. Die Konzentrationsabhängigkeit der F-Aktinmenge zu Beginn der Stimulation konnte tendenziell in allen Versuchen festgestellt werden, spielt aber für die Untersuchung des Umbaus von Aktin keine Rolle. Auch das gleichzeitige Vorhandensein von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  im Kulturmedium während der Stimulation mit ZAS verändert die Kinetik des Aktinumbaus der Zellen nicht (Abb.65c, d). Zwischen den mit 100

$\mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  vorinkubierten und den nicht vorinkubierten Zellen kann in diesem Versuchsansatz ebenfalls kein Unterschied in der Kinetik des Aktinumbaus festgestellt werden.

Diese Versuche wurden analog auch nach 20 -stündiger Vorinkubation mit den Verbindungen durchgeführt (Abb.66a-d). Zwischen Kontrollen und  $\text{LaCl}_3$ - bzw.  $\text{CeCl}_3$ -behandelten Zellen war wiederum kein systematischer Unterschied bezüglich der Antwort auf die ZAS-Stimulation zu beobachten.

### 3.6.2. Untersuchungen des Mikrotubulsystems

#### 3.6.2.1. Fluoreszenzmarkierung der Mikrotubuli mit FITC-gekoppelten Antikörpern

Während direkt nach der Lavage in Rinderalveolarmakrophagen keine Mikrotubuli nachweisbar sind (nicht gezeigt), sind diese nach einer Übernachtskultur in nahezu allen Zellen nachweisbar (Abb.67a-c). Die weitere Inkubationszeit hat auf die Verteilung keinen wesentlichen Einfluß mehr. Typischerweise dehnen sich die Mikrotubuli strahlenförmig, wie feine Fäden, durch das gesamte Zytoplasma bis zur Zellperipherie hin aus. Den Ausgangspunkt der Strahlen bildet dabei immer ein eng begrenzter Zytoplasmabereich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Zellkern (Mikrotubuli-Organisationszentrum). Sehr wahrscheinlich entspricht die in Abb.9 in der Mitte der Zelle erkennbare Struktur einem solchen Organisationszentrum. Die Verteilung der Mikrotubuli ist am deutlichsten in flach ausgebreiteten oder in spindelförmig langgestreckten Zellen zu erkennen. In kugelförmig abgerundeten Zellen ist demgegenüber häufig keine klare Organisation sichtbar.

Weder durch die Inkubation mit  $\text{CeCl}_3$  (Abb.68a-c) noch mit  $\text{LaCl}_3$  (Abb.69a-c) ergibt sich

eine Veränderung in der Organisation der Mikrotubuli. Selbst nach jeweils 20 -stündiger Inkubation sind bei zahlreichen Zellen die Mikrotubuli-Organisationszentren und die einzelnen, strahlenförmig verlaufenden Mikrotubuli deutlich zu erkennen (Abb.68c, Abb.69c). Auffällig sind jedoch die Mikrotubuli-freien Bereiche im Zytoplasma, die nach 4 -stündiger Inkubation auftreten und aufgrund ihrer Größe und Form an die bereits mit anderen Methoden dokumentierten Vakuolen erinnern.

Im Gegensatz zum Aktin werden die Mikrotubuli durch die Inkubation mit Quarz nicht umorganisiert (Abb.70a-c). Die Partikel sind deutlich im Zytoplasma sichtbar, führen aber an keiner Stelle zu einer erkennbaren Schädigung oder Veränderung dieser zytoskeletalen Komponente (Abb.70a, b). Nach 20 -stündiger Inkubation mit Quarz ist jedoch die Zahl der abgerundeten, kugelförmigen Zellen ohne erkennbare Mikrotubuli-Organisation merklich erhöht. Es sind jedoch noch zahlreiche Zellen vorhanden, bei denen sich die Anordnung der Mikrotubuli nicht wesentlich von der in Kontrollzellen unterscheidet (Abb.70c). Tendenziell tritt allerdings meist eine Reduzierung der Zahl der Mikrotubuli auf.

Wie Abb.71a und b zeigen, hat auch die 2 bzw. 4 -stündige Inkubation mit  $\text{La}_2\text{O}_3$  keine Auswirkungen auf das Mikrotubuli-Gerüst der Rinderalveolarmakrophagen. Zwar sind in den Zellen nach 4 -stündiger Behandlung sowohl Partikel als auch vakuolenartige, mikrotubulifreie Zytoplasmabereiche zu beobachten, aber an keiner Stelle ist eine direkte Schädigung oder Veränderung nachweisbar (Abb.71b).

Um die Wirkung einer depolymerisierenden Substanz auf die Organisation der Mikrotubuli zu untersuchen, wurden die Rinderalveolarmakrophagen mit  $0.1 \mu\text{g/ml}$  Colchizin inkubiert. Bereits nach 2 Stunden waren nahezu sämtliche Mikrotubuli depolymerisiert (Abb.72a) und somit nicht mehr anfärbbar. Sie erholen sich jedoch nach dem Auswaschen des Agens relativ rasch wieder und schon nach 2 Stunden in Kontrollmedium sind in vielen Zellen sternförmige Strukturen (Asteren) zu erkennen (Abb.72b), die sich stets in direkter Nähe zum Kern befinden.

### 3.6.3. Untersuchungen der Adhäsionsfähigkeit

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Adhäsionsfähigkeit von Rinderalveolarmakrophagen, wurden diese für 2, 4 und 20 Stunden in Suspension vorinkubiert und anschließend die Adhäsionsfähigkeit der vitalen Zellen auf Plastikoberflächen bestimmt.

Wie sich aus Tab.1a-c entnehmen läßt, konnte durch keine der Inkubationen eine deutliche Veränderung der Absetzrate bewirkt werden. Nach den Inkubationen mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$  oder  $\text{LaCl}_3$  zeigen die Zellen die Tendenz sich etwas schlechter festzusetzen (ausgenommen nach 20 Stunden in  $\text{LaCl}_3$ ). Während sich die Absetzrate bei Inkubationen mit Quarz im Laufe der Kulturdauer von "vermindert" zu "erhöht" verändert, ist sie nach den  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ -Inkubationen zu allen Kulturzeiten reduziert.  $\text{TiO}_2$  hat demgegenüber zu keiner Inkubationszeit einen Einfluß auf das Absetzverhalten der Zellen. Von den beiden Substanzen, die auf das Zytoskelett der Zellen einwirken, führt interessanterweise das Colchizin zu einer niedrigeren Absetzrate.



## 4. DISKUSSION

Die sog. Seltenen Erden sind nicht so selten, wie zunächst angenommen worden war und ihre Bedeutung am Arbeitsplatz dürfte in den nächsten Jahrzehnten durch die Produktion von Hochtemperatursupraleitern drastisch ansteigen. Da ihre Inhalation zu Lungenveränderungen führen kann und zudem sehr viele immunologische Reaktionen durch sie beeinflusst werden (s. Einleitung), ist es von großem Interesse, ihre toxikologische und immunologische Wirkung auf immunkompetente Lungenzellen zu klären. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zunächst die allgemeine Zytotoxizität von Seltenen Erdmetallen auf Alveolarmakrophagen zu erfassen und ein System zur Messung chemotaktischer Bewegungen zu etablieren. Im Anschluß daran sollte die Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren untersucht und diese weitgehend charakterisiert werden. Ein weiteres Anliegen war die Überprüfung einer Beeinflussung der Chemotaxis und die Aufklärung der Ursachen hierfür, mit besonderem Augenmerk auf zytoskeletale Veränderungen.

### Allgemeine Zytotoxizität

Die Morphologie unbehandelter Rinderalveolarmakrophagen (RAM) entspricht sowohl auf licht- als auch auf elektronenmikroskopischem Niveau der, von Alveolarmakrophagen (AM) anderer Spezies (vgl. Schimmelpfeng, 1989). Nach der Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  kann eine Verminderung der Oberflächenstrukturierung und eine starke Vakuolisierung des Zytoplasmas festgestellt werden. Die Veränderung der Oberflächenstruktur von Alveolarmakrophagen wurde bereits bei der Inkubation mit anderen Metallverbindungen beobachtet und jeweils als sehr sensibler Indikator für die Zytotoxizität des betreffenden Metalles gewertet. So konnten z.B. bei AM von Kaninchen nach der Behandlung mit  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CrCl}_3$  und  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  (Waters et al., 1975) ebenso wie mit Blei (DeVries et al., 1983) Oberflächenveränderungen festgestellt werden, die in ihrem Ausmaß und Erscheinungsbild den Grad der Zellschädigung widerspiegeln. Das Ausmaß der bei RAM beobachteten Veränderung durch  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  (Abb.4 u. Abb.5) läßt auf eine zytotoxische Wirkung dieser Metallverbindungen schließen, die jedoch im Vergleich zu anderen Schadstoffen, wie z.B. Quarz (Abb.6) oder  $\text{Ni}_3\text{S}_2$  (Finch et al., 1987) geringer ist. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen sowohl Palmer et al., (1987), die bei AM von Ratten nach der Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  das Auftreten von "Blebs" sowie eine Filopodienatropie mit nachfolgender Entdifferenzierung der Oberflächenstruktur und dem Erscheinen von Löchern und Gruben in der Zellmembran feststellten als auch Wiener-Schmuck (1988), die bei RAM nach der Inkubation mit  $\text{CeCl}_3$  ebenfalls eine verminderte Strukturierung der Zellmembran sowie Löcher bzw. Gruben beobachtete.

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  behandelten Zellen bestätigt die bereits lichtmikroskopisch festgestellte Vakuolisierung des Zytoplasmas. Zusätzlich ist jedoch zu erkennen, daß die Vakuolen granuläre Einschlüsse enthalten, bei denen es sich im Falle der Inkubation mit  $\text{CeCl}_3$ , wie die energiedisperse Röntgenspektroskopie ergab, um cerhaltige Verbindungen handelt. Diese befinden sich nur in membranumschlossenen Vesikeln und nicht frei im Zytoplasma.

Eine Beeinflussung der zytoplasmatischen Feinstruktur, wie dies bei der Inkubation mit Blei (DeVries et al., 1983) beschrieben wurde oder das vermehrte Auftreten von Lamellarkörperchen, wie nach der Inkubation mit Nickel und Chrom (Johansson et al., 1988) konnte weder mit  $\text{LaCl}_3$  noch mit  $\text{CeCl}_3$  festgestellt werden.

Die Untersuchungen mit Acridin Orange, bei denen nahezu alle Vesikel eine intensive Rotfärbung zeigten, deuten darauf hin, daß die beobachteten Vakuolen Fusionsprodukte von Phagosomen und Lysosomen sind und daher mit sekundären Lysosomen gleichgesetzt werden können (Goren et al., 1984). Die Beobachtung, daß in den niederschlaghaltigen Vakuolen bzw. Lysosomen keine Saure Phosphatase (SP) Aktivität nachzuweisen ist, steht dazu allerdings in einem gewissen Widerspruch, zumal in cerphosphathaltigen Lysosomen bereits hohe SP-Aktivitäten festgestellt wurden (Berry et al., 1988). Eine direkte Inaktivierung der SP durch  $\text{La}^{3+}$ , wie sie in gewissem Umfang für  $\text{Ce}^{3+}$  festgestellt wurde, kann als Ursache hierfür ausgeschlossen werden (Palmer et al., 1987). Möglicherweise wirken sich jedoch bei der zytochemischen Markierung der SP die intravakuolären Niederschläge störend auf die Reaktion aus.

Die in vitro bei RAM gefundenen Anreicherungen von Cer bzw. Lanthan in den Lysosomen stehen im guten Einklang mit in bzw. ex vivo Ergebnissen mit Rattenalveolarmakrophagen. Dabei konnte gezeigt werden, daß nach der Inhalation von  $\text{CeCl}_3$  das Cer ebenfalls ausschließlich in den Lysosomen und nicht frei im Zytoplasma nachzuweisen ist (Berry et al., 1989). Auch Yttrium, ein den Seltenen Erdmetallen chemisch nahe verwandtes Element, wird nach der Instillation von Yttriumchlorid in die Lunge intrazellulär ausschließlich in den Lysosomen von AM gefunden (Hirano et al., 1990a). Bei dieser intralysosomalen Speicherung als unlösliche Metallverbindungen könnte es sich um einen Eliminationsmechanismus der AM handeln, der dem Schutz der Lunge und anderer Organe dient (Berry et al., 1988).

Die morphologischen Befunde spiegeln sich in einem Verlust der Vitalität nach der Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  wider. Im Vergleich dazu, finden Palmer et al. (1987) bei  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  mit AM von Ratten wesentlich höhere Zytotoxizitäten, die in etwa derjenigen von  $\text{CdCl}_2$  entspricht. Diese Diskrepanz könnte jedoch auf speziesspezifischen Unterschieden in der Empfindlichkeit der AM gegenüber  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  beruhen. So findet Wilczek (1991) bei Untersuchungen mit AM von Rindern eine Zytotoxizität von  $\text{YCl}_3$ , die mit der von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  vergleichbar ist, wohingegen Hirano et al. (1990a) bei den AM von Ratten eine wesentlich höhere Wirkung feststellten.

Parallel zur Vitalitätsminderung erfolgte nach der Inkubation der RAM mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  ein Anstieg der Enzymaktivität im Kulturüberstand. Während die LDH-Aktivität jedoch, ebenso wie der Verlust der Vitalität, erst nach 20 Stunden und bei hohen Konzentrationen auftritt, ist die N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (NAG)-Aktivität im Überstand tendenziell bereits zu früheren Zeitpunkten und bei niedrigeren Konzentrationen verstärkt zu messen. Das Auftreten von lysosomalen Enzymen im Medium ohne eine adäquate Erhöhung der zytoplasmatischen Marker, weist aber auf sekretorische Prozesse hin (Lock et al., 1987). Aufgrund der geringen Ausprägung dieses Effektes kann eine solche Deutung allerdings nur mit Vorbehalt erfolgen. Demgegenüber konnten die morphologischen Befunde und die Ergebnisse der Vitalitätstests

durch die Bestimmung der Enzymfreisetzungen voll bestätigt werden. Danach besitzen  $\text{LaCl}_3$  und  $\text{CeCl}_3$  eine nahezu gleichgroße, im Vergleich zu  $\text{CuCl}_2$  (vgl. Wilczek, 1991) jedoch eher geringe zytotoxische Wirkung auf RAM.

Die Zytotoxizität von  $\text{La}_2\text{O}_3$  auf RAM ist im Vergleich zum  $\text{LaCl}_3$  deutlich geringer und entspricht in etwa dem von Palmer et al. (1987) bei AM von Ratten für Lanthanoxid bestimmten Wert. Während von den gleichen Autoren auch für das Ceroxid eine niedrige Zytotoxizität gefunden wurde, zeigte das Kadmiumoxid eine sehr hohe, die sogar diejenige von  $\text{CdCl}_2$  übertraf. Diese großen Unterschiede, die zwischen den jeweiligen Chloriden nicht auftraten, werden sicherlich durch die unterschiedliche intrazelluläre Löslichkeit der jeweiligen Partikel ausgelöst. Interessanterweise kann bei den Inkubationen mit  $\text{La}_2\text{O}_3$  sowohl bei der Freisetzung der LDH als auch der NAG ein Sättigungseffekt festgestellt werden, der möglicherweise auf eine resistente Subpopulation der RAM hindeutet. Ähnliche Beobachtungen, die bei der Inkubation von RAM mit Quarz gemacht wurden, führten zu der Hypothese, daß diesen überlebenden Zellen, aufgrund einer möglicherweise veränderten Mediatorenabgabe, bei pathogenen Gewebeveränderungen eine große Bedeutung zukommt (Pätzold, 1989).

Der lanthanhaltige Hochtemperatursupraleiter (HTS)  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  bewirkt bei RAM ebenfalls einen Vitalitätsverlust. Während jedoch beim  $\text{La}_2\text{O}_3$  offensichtlich nur das Lanthan als toxisches Agens in Frage kommt, kann die zytotoxische Wirkung des  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  durch mehrere Metalle vermittelt werden. Wilczek (1991) konnte in seinen Untersuchungen zur Toxizität verschiedener HTS zeigen, daß die Zytotoxizität von  $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{6-7}$  nahezu vollständig auf der Wirkung des Kupfers beruht, und daß diejenigen HTS-Stäube, die den höchsten Kupfergehalt haben, auch zu dem stärksten Vitalitätsverlust führen. Ebenso kann bei Nickel-Kupfer-Oxiden mit wechselnder Zusammensetzung eine Korrelation zwischen dem Kupfergehalt und der zytotoxischen Wirkung auf AM gefunden werden (Benson et al. 1988). Eine Verknüpfung der Toxizität mit dem Kupfer ist auch für  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  sehr wahrscheinlich.

### Meßsystem

Während es eine ganze Reihe von Untersuchungen zur Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten (PMN) und den Faktoren, die auf sie chemotaktisch wirksam sind, gibt, wurden gleichartige Versuche mit AM durch die relativ schwache Reaktion dieser Zellen auf die meisten chemotaktischen Stoffe erschwert. Zudem zeigte es sich, daß sowohl spezies- als auch differenzierungsspezifische Unterschiede in der Reaktion der AM auf verschiedene Chemotaxien existieren. So migrieren die AM von Mensch (Clemente et al., 1986, Martin et al., 1984) und Affe (Kazmierowski et al., 1977) nur sehr schlecht, während diejenigen von Meer-schweinchen, die praktisch nicht auf C5a zuwandern, sehr gut auf das synthetische Peptid FMP reagieren (Lugano et al., 1981). Demgegenüber kann bei Rattentalveolarmakrophagen sowohl durch FMLP (Laplante und Lemaire, 1990) als auch durch C5a eine deutliche chemotaktische Bewegung bewirkt werden, die allerdings erst am dritten Tag nach der Geburt festzustellen ist und bei Neugeborenen noch völlig fehlt (Kurland und Dauber, 1991). Über die Chemotaxis der AM von Rindern liegen bisher noch keine Angaben vor, in der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß diese direkt nach der Isolierung auf keinen, der üblicherweise benutzten chemotaktischen Stoffe reagieren. Nach einer 20-stündigen in vitro-

Kultur konnte allerdings Ihre Fähigkeit zur Chemotaxis gegenüber Zymosan aktiviertem Serum (ZAS), nicht aber gegenüber den anderen Agenzien, festgestellt werden (Abb.26).

Die fehlende chemotaktische Migration gegenüber FMLP beruht sehr wahrscheinlich auf dem Fehlen von FMLP-Rezeptoren bei RAM (Bielefeldt-Ohmann und Babiuk, 1984). Diese Eigenschaft fehlt neben den AM auch den PMN von Rindern, Pferden (Carroll et al., 1982), Schweinen und Katzen, während sie bei Mensch, Hund, Meerschweinchen und Hase nachzuweisen ist (Linnekin et al., 1990).

Fehlende Rezeptoren können jedoch bei den mit Quarz, Aktivkohle und  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  aktivierten Seren nicht als Erklärung dienen, denn die Inkubation des Serums mit den Partikeln induziert den alternativen Weg der Complement-Aktivierung und führt zur Bildung des Faktors C5a (Oberdorster et al., 1989). Dieser Faktor, der in der gleichen Weise durch die Aktivierung des Serums mit Zymosan erzeugt wird, ist jedoch in ZAS auf RAM chemotaktisch wirksam. Demnach besitzen die RAM, zumindest nach 20-stündiger *in vitro*-Kultur, funktionstüchtige C5a-Rezeptoren, so daß die mangelnde Chemotaxis gegenüber den mit Partikeln aktivierten Seren sehr wahrscheinlich nicht in den Effektorzellen, sondern eher in den Seren begründet liegt. Möglicherweise sind die hier benutzten Partikel nicht in der Lage den Complementfaktor C5a zu generieren. Von Leukotrien  $\text{B}_4$  wird angenommen, daß es in der Lunge weniger auf die Makrophagen als vielmehr auf die PMN chemotaktisch wirkt (Martin et al., 1984). Die chemotaktische Reaktion der RAM auf ZAS kann interessanterweise erst nach einer 20-stündigen *in vitro*-Kultur und nicht direkt nach der Lavage beobachtet werden. Da die AM *in vivo* jedoch gerichtete Migrationen ausführen können und dies für ihre Funktion auch unbedingt notwendig ist (Crystal, 1991), wäre es denkbar, daß der *in vitro*-Mangel direkt nach der Isolierung ein artifizieller Zustand der Zellen ist, der sich im Laufe der Kultivierung wieder normalisiert. Dieser könnte z.B. durch die Prozedur der Lavage und Reinigung der Zellen ausgelöst worden sein. Hinweise darauf liefern Befunde von Lind (1989), die bei RAM direkt nach der Lavage, nicht aber nach einer Übernachtskultur, eine spontane Superoxidationen-Freisetzung, einen Marker für die Aktivierung der Zellen, feststellte. Murata und Hirose (1991) konnten zudem bei Kälbern nachweisen, daß allein durch einen ein- bzw. vierstündigen Transport der Tiere die Aktivität der Lymphozyten und Alveolarmakrophagen verändert wird. Die Aktivierung der Makrophagen kann jedoch unter Umständen zur Migrationsinhibition führen (Gordon et al., 1987). Auch bei Monozyten kann nach der Aktivierung der Zellen eine Reduktion der Rezeptorenzahl auf der Zellmembran und damit verbunden, eine verminderte Chemotaxis beobachtet werden (Katona et al., 1991).

Die gerichtete Bewegung der AM von Rindern nach einer 20-stündigen Kultur ist etwa 3-4mal höher als ihre spontane Migration und liegt damit im Vergleich mit der von AM anderer Spezies zwischen Hund bzw. Ratte (2x) und Meerschweinchen (20x) (Mueller et al., 1990).

## Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren

Nach der Inkubation mit dem zytotoxischen und fibrogenen Quarz (Abb.33) oder dem in der Lunge entzündungsauslösendem bakteriellen Endotoxin (LPS) (Abb.38), setzen die RAM Faktoren in ihren Überstand frei, die auf unbehandelte AM chemotaktisch wirken. Das gleiche Ergebnis ist nach der Behandlung der RAM mit Seltenen Erdmetallverbindungen (Abb.28-31) zu beobachten. Diese Wirkung kann nicht durch phagozytotische Prozesse erklärt werden, da  $\text{TiO}_2$ , das, wie frühere Untersuchungen zeigen (Schimmelpfeng, 1989), ebenso wie  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  bzw.  $\text{La}_2\text{O}_3$  (Abb.2) von den RAM aufgenommen wird, keine Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren (CF) bewirkt. Dies steht im Einklang zu den von Dauber und Daniele (1980) mit Meerschweinchen erhaltenen Ergebnissen. Sie konnten im Überstand von AM nach 2 -stündiger Inkubation mit Latexpartikeln zwar ein erhöhtes chemotaktisches Potential feststellen, dieses war aber nur speziell auf neutrophile Granulozyten, jedoch nicht auf peritoneale oder alveoläre Makrophagen, wirksam. Nach 6 Stunden war es zudem völlig verschwunden, während bei der Inkubation mit Seltenen Erdmetallverbindungen eine Freisetzung von CF erst nach 20 Stunden festzustellen ist.

Im Gegensatz zu  $\text{LaCl}_3$  oder  $\text{La}_2\text{O}_3$  kann die durch  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  induzierte Freisetzung von CF, wie schon bei seiner Zytotoxizität diskutiert, durch mehrere Metalle induziert werden. Da die Inkubation mit  $\text{CuO}$  jedoch im Gegensatz zu  $\text{La}_2\text{O}_3$  keine Erhöhung des chemotaktischen Potentials im Kulturüberstand von RAM bewirkt (Abb.32), liegt zunächst die Vermutung nahe, daß die Wirkung des  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  durch das Lanthan und nicht, wie die Zytotoxizität, durch das Kupfer vermittelt wird. Die Ergebnisse von Wilzcek (1991) deuten jedoch darauf hin, daß das hier verwendete  $\text{CuO}$ , im Gegensatz zu dem Hochtemperatursupraleitermaterial intrazellulär nur sehr schlecht solubilisiert wird und biologisch nahezu inert ist. Die Zuordnung der Wirkung des  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  auf die Freisetzung von CF zu seinem Lanthananteil kann deshalb nur mit Vorbehalt erfolgen.

Während es zur Freisetzung von CF durch metallische Verbindungen nur sehr wenige Untersuchungen gibt, und dabei meist nur die Wirkung auf neutrophile Granulozyten bestimmt wurde (z.B. für  $\text{MnO}_2$ ; Snella, 1985), existieren zu mineralischen Stäuben und Fasern einige Vergleichsangaben. So setzen auch die AM von Ratten (Oghiso et al., 1984) und Meerschweinchen (Miller et al., 1979) nach der Inkubation mit Quarz Faktoren frei, die auf ruhende AM chemotaktisch wirken. In einem gewissen Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Lugano et al. (1982), die bei AM von Meerschweinchen nach der Behandlung mit Quarz zwar gleichermaßen die Freisetzung von CF aufzeigen, diese sind jedoch nur auf PMN und peritoneale, nicht jedoch auf alveolare Makrophagen wirksam. Da in diesen Untersuchungen jedoch keine entsprechende Positivkontrolle angegeben ist, könnte die fehlende Chemotaxis der AM, außer mit einer mangelnden Sekretion von CF, auch durch eine verminderte Reaktivität der Effektorzellen erklärt werden. So zeigen zum Beispiel, wie bereits diskutiert, die AM von Rindern direkt nach ihrer Isolierung eine defiziente Chemotaxis (Abb.25 u.26).

Interessanterweise kann durch die Inkubation der RAM mit LPS eine wesentlich schnellere Freisetzung der CF, als durch die metallischen Verbindungen oder Quarz, induziert werden. Auch Hunninghake et al. (1978) finden bereits nach 3 -stündiger Inkubation mit hitzegetöteten

Bakterien im Überstand der AM von Meerschweinchen Faktoren, die auf Monozyten, in stärkerem Maße jedoch auf PMN chemotaktisch wirksam sind. Die Inkubation der gleichen Zellen mit LPS führt sogar schon nach einer Stunde zur Freisetzung von CF (Snella und Rylander, 1985).

Die beobachtete zeitliche Differenz zwischen dem Auftreten von CF bei den Inkubationen mit den Seltenen Erdmetallverbindungen und denen mit LPS, könnte auf gänzlich unterschiedliche Mechanismen der Freisetzung oder auf verschiedene Faktoren mit der gleichen Wirkung hindeuten. Zum einen könnten die CF aufgrund einer aktiven Sekretion der AM direkt freigesetzt worden sein, wie dies z.B. bei den AM von Affen nach einer einstündigen Inkubation mit opsonisierten Bakterien (Kazmierowski et al., 1977) beobachtet wurde, zum anderen könnte aber auch die Zytolyse der AM eine Rolle spielen, wie es von Fox et al. (1983) bei der Freisetzung von CF durch Sauerstoff angenommen wird. Für beide Mechanismen können aus den Daten Hinweise erhalten werden. Da bei den Kurzzeitinkubationen mit LPS kein Vitalitätsverlust eintritt, erfolgt die Erhöhung des chemotaktischen Potentials hier sehr wahrscheinlich durch die direkte Sekretion. Auch bei den Inkubationen mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  lassen die biochemischen Ergebnisse z.T. auf sekretorische Prozesse schließen. Die CF müßten dann allerdings nach der Neusynthese oder der Aktivierung sofort sekretiert werden, da sich weder im Zytoplasma von Kontrollzellen noch in den mit den Seltenen Erdmetallverbindungen oder Quarz behandelten Zellen eine chemotaktische Aktivität feststellen läßt (Abb.35-37). Die Beobachtung, daß die Freisetzungen von CF durch die metallischen Verbindungen oder Quarz erst bei Konzentrationen und nach Inkubationszeiten auftreten, die auch zu Vitalitätsverlusten führen (Nach 20 -stündiger Inkubation mit  $250 \mu\text{g/ml}$  Quarz beträgt die Vitalität ca. 30%, Seidel et al., 1989) deutet auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität der Materialien und der Fähigkeit zur Generierung eines chemotaktischen Potentials hin. Der zytolytischen Wirkung von Quarz auf AM und der damit verbundenen Freisetzung von Faktoren, die u.a. chemotaktisch auf Fibroblasten wirken, wird seit geraumer Zeit eine wichtige Rolle in der Silikoseentstehung zugeschrieben (Miller et al., 1979; Brain, 1980). Eine Sekretion von inaktiven Faktoren und die anschließende Aktivierung infolge zytolytischer Enzymfreisetzung könnte die Ergebnisse, speziell das völlige Fehlen einer intrazellulären chemotaktischen Aktivität, erklären. Durch die Sekretion von Enzymen, die extrazellulär chemotaktische Faktoren generieren oder inaktivieren, können Entzündungsreaktionen von humanen PMN in ähnlicher Weise moduliert werden (Hara et al., 1989).

Neben dem Quarz, wurde die *in vitro* -Freisetzung von CF durch AM bereits für Asbest (Rola-Pleszczynski et al., 1984), Bleomycin (Denholm et al., 1989) und einige organische Substanzen wie z.B. Tannin (Rohrbach et al., 1989) beschrieben. All diese Substanzen können *in vivo* zu schweren Lungenveränderungen führen, in deren pathogenetischem Verlauf regelmäßig Akkumulationen von AM und/oder PMN auftreten. Die Anhäufung der AM durch die Einwanderung von Blutmonozyten in die Alveolen erfolgt sehr wahrscheinlich unter Einwirkung von CF, die auch bereits bei allen genannten Substanzen nach der Inhalation in der Lavageflüssigkeit nachgewiesen werden konnte. Das Auftreten von CF nach der Inkubation mit Seltenen Erdmetallverbindungen kann daher, unabhängig von dem tatsächlichen Freisetzungsmechanismus, als starkes Indiz für eine mögliche lungenpathogene bzw. zumindest inflammatorische Wirkung dieser Stoffe gewertet werden.

Dies ist auch deshalb sehr interessant, weil den Seltenen Erden bisher hauptsächlich anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen wurden (Evans, 1990). Auf das immunologische Verhalten der RAM bzgl. der LPS-induzierten Sekretion von CF haben Lanthan und Cer demgegenüber keinen Einfluß. Auch Schmidt et al. (1991) konnten bei der LPS-Stimulierung der RAM oder der, mit Calzitriol makrophagenartig ausdifferenzierten, HL-60 Zellen nicht die in vivo beobachteten anti-inflammatorischen Wirkungen von Lanthan und Cer feststellen. Eben- sowenig führt eine Vorinkubation der RAM mit den Seltenen Erden zu einer Verminderung, sondern eher zu einer Erhöhung der durch LPS freigesetzten CF.

#### Charakterisierung der CF

Die partielle Charakterisierung der CF liefert Hinweise darauf, daß zumindest ein Teil der freigesetzten chemotaktischen Aktivität durch C5a, einem Fragment des Complementfaktors C5, vermittelt wird. Da einerseits Acetyl-Salicylsäure spezifisch die Synthese der Prostaglandine hemmt (Vane, 1971) und andererseits N-Propyl-Gallate, als Inhibitor der Lipoxygenase (Smith et al., 1985) u.a. die Synthese der Leukotriene, beide aber keinen Einfluß auf die Freisetzung der CF haben, ist die Zugehörigkeit der CF zu diesen Lipidmediatoren sehr unwahrscheinlich. Vielmehr deutet die Hemmung der Freisetzung durch Actinomycin D, einem Transkriptionshemmer, darauf hin, daß es sich bei den CF um Peptide oder Proteine handelt. Zwischen ihnen und den CF von ZAS, dessen chemotaktische Wirkung zum größten Teil auf C5a beruht, sind in der Hitzelabilität und in der größeren chemotaktischen gegenüber der chemokinetischen Wirkung auffällige Gemeinsamkeiten zu beobachten. Auch ihr Molekulargewicht (10 -17 kDa.) liegt in einem Bereich in dem sich die C5a-Molekulargewichte vieler anderer Spezies befinden z.B. Meerschweinchen und Maus (10 - 15 kDa.), Mensch (11 kDa.), Schwein und Ratte (8-9 kDa.) (Hugli, 1981). Der stärkste Hinweis auf die Identität der CF mit C5a ist jedoch die Abschwächung des chemotaktischen Potentials durch Antiserum gegen C5. Obwohl es sich bei den benutzten Antikörper um solche gegen humanes C5 und nicht gegen bovines C5a handelte, sind die Ergebnisse dennoch aussagekräftig, da einerseits Hugli (1981) zeigen konnte, daß z.B. Antikörper gegen Schweine-C5a mit C5a von Ratte, Schwein, Maus, Meerschweinchen und Mensch kreuzreagieren, und daß auch Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen C5 mit C5a-Fragmenten üblich sind. Andererseits kann mit den gleichen Antikörpern auch das chemotaktische Potential von ZAS reduziert werden. Kazmierowski et al. (1977) kamen aufgrund ähnlicher Ergebnisse zu dem gleichen Schluß. Sie fanden bei Affen 4 Stunden nach einer initialen bronchoalveolären Lavage in der nachfolgenden Lavageflüssigkeit einen chemotaktischen Faktor, der ein Molekulargewicht von 15 kDa. hatte, bei 56°C stabil war und durch Antiserum gegen humanes C5 in seiner Wirkung deutlich vermindert werden konnte. Sie schlossen daraus, daß die chemotaktische Wirkung durch C5a vermittelt wird.

Die Fähigkeit der Makrophagen zur Sekretion von Complementfaktor C5 wurde schon mehrfach beschrieben (Nathan, 1987; Johanson und Hetland, 1988). Auch sämtliche Komponenten des klassischen und alternativen Weges der Complementaktivierung konnten im Überstand von in vitro kultivierten Lungenmakrophagen nachgewiesen werden (Martin und Loos, 1989). Zusätzlich konnte in Makrophagen ein C5-spaltendes Enzym nachgewiesen werden, welches in der Lage ist C5 direkt, ohne Aktivierung der Complementkaskade zu frag-

mentieren (Ward, 1974), so daß es sogar zwei Möglichkeiten zur völlig autonomen Generierung von C5a durch die AM bestehen.

Trotz der starken Hinweise auf C5a, könnten die durch die Seltenen Erdmetallverbindungen freigesetzten CF auch noch mit einer ganzen Reihe anderer chemotaktischer Faktoren identisch sein, deren Produktion durch Makrophagen zwar beschrieben, aber ihre Wirkung häufig nur auf PMN und nicht auf AM oder Monozyten getestet wurde.

Ihre vollständige Auflistung würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, einige besonders erwähnenswerte sollen dennoch aufgeführt werden. So fanden zum Beispiel Goodman et al. (1991) nach der Stimulation von Schweinealveolarmakrophagen mit LPS im Kulturüberstand zwei verschiedene chemotaktische Faktoren, die sie AMCF-1 und AMCF-2 nannten und bei denen es sich um Peptide mit einem Molekulargewicht von jeweils ca. 10 kDa. handelte. Auch bei den AM von Rindern wurde bereits die Sekretion von CF nach der Inkubation mit Zymosan beschrieben (McGuire und Babiuk, 1984), aber nur in ihrer Wirkung auf PMN charakterisiert. Ebenfalls mit Zymosan konnten Christman et al. (1985) bei AM von Ratten die Freisetzung von Faktoren induzieren die auf PMN, aber, wie die weitere Untersuchung zeigte, zugleich auf andere AM chemotaktisch wirkten. Die gleichen Zellen setzen bei einer Inkubation mit Asbest Faktoren in den Überstand frei, die auf ruhende AM chemotaktisch wirksam sind (Kagan et al., 1983). Diese sind thermolabil, in ihrer Freisetzung durch Actinomycin D hemmbar und besitzen Molekulargewichte von jeweils 13-15 kDa., 23-26 kDa. und 45-46 kDa. Desweiteren könnte es sich bei den CF um proteolytische Spaltprodukte von Fibronectin handeln, die auf Makrophagen und Fibroblasten, nicht aber auf PMN chemoattraktiv wirken (Norris et al., 1982) und deren Freisetzung durch AM bereits beobachtet wurde (Rennard et al., 1981). Ihr Molekulargewicht schwankt in sehr weiten Grenzen (20-220 kDa.) und ihre Wirkung auf Monozyten ist erheblich stärker chemotaktisch als chemokinetisch.

Eher unwahrscheinlich ist demgegenüber die Identität der CF mit NAP-1/IL-8 (10 kDa.), einem sehr wichtigen Chemoattraktant der Lunge, von dem allerdings bekannt ist, daß es sehr selektiv auf PMN und kaum auf AM wirkt (Kunkel et al., 1991). Auch das auf Monozyten wirkende "Monocyte chemotactic protein"(MCP-1) scheidet wohl aus, da es nicht von Makrophagen, sondern hauptsächlich von Endothelzellen und Fibroblasten gebildet wird (Kunkel et al., 1990). Natürlich kann auch die Möglichkeit nicht außer Acht gelassen werden, daß es sich um einen bisher noch nicht beschriebenen CF handelt.

### Chemotaxis

LaCl<sub>3</sub> bzw. CeCl<sub>3</sub> hemmen die Chemotaxis von RAM bereits nach kurzen Inkubationszeiten und bei Konzentrationen nahezu vollständig, bei denen weder ein Vitalitätsverlust noch eine Enzym- bzw. CF-Freisetzung zu beobachten ist (Abb.46, 47). Ebenso, wenn auch im abgeschwächtem Maße, kann nach der Inkubation mit partikulären Seltenen Erdmetallverbindungen oder Quarz eine deutlich reduzierte Mobilität der AM beobachtet werden. Da die Inkubation mit TiO<sub>2</sub> nicht zu einer Verminderung der Chemotaxis führt, scheidet die unspezifische Inhibition aufgrund der Beladung der Zellen mit Partikeln als Ursache hierfür sehr wahrscheinlich aus. Die unspezifische Hemmung der Mobilität von AM durch Partikelaufnahme konnte



schon mehrfach gezeigt werden, und stützt u.a. die Hypothese, daß für eine Staubüberlastung der Lunge, die bei längerer Exposition in hohen Staubkonzentrationen auftritt, der Mobilitätsverlust der AM verantwortlich ist (Yu et al., 1989). Dabei spielt vor allem die Höhe der Zellbelastung und weniger die Art der Partikel die entscheidende Rolle. So kann auch mit Latexpartikeln eine Mobilitätsminderung der AM induziert werden (Mueller et al., 1990). Diese tritt nach Untersuchungen von Morrow (1988) allerdings erst bei einem phagozytierten Partikelvolumen von  $60 \mu\text{m}^3/\text{AM}$  auf und erreicht ihr Maximum bei  $600 \mu\text{m}^3/\text{AM}$ . Diese Werte werden jedoch bei den benutzten  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ -,  $\text{La}_2\text{O}_3$ -, Quarz- und  $\text{TiO}_2$ -Konzentrationen nicht erreicht, bei denen z.B. die Inkubation mit  $100 \mu\text{g/ml TiO}_2$ , bei einer angenommenen gleichmäßigen Verteilung der Partikel auf die Zellen, nur zu einem phagozytierten Volumen von ca.  $10 \mu\text{m}^3/\text{AM}$  führt. Während demzufolge die Inhibition der Chemotaxis bei den hier benutzten hohen Konzentrationen auf spezifischen Ursachen beruht, scheint die bei niedrigen Konzentrationen beobachtete Erhöhung eher unspezifisch zu sein. Zum einen tritt sie bei allen untersuchten Materialien (mit Ausnahme von  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ ) auf, zum anderen fanden auch Mueller et al. (1990) nach einer Instillation von Latexpartikeln in Ratten- und Hundelungen eine erhöhte Mobilität der lavagierten AM, die sich mehr in einer verstärkten Chemokinetik als in einer erhöhten Chemotaxis äußerte.

Bei der Ursache der Mobilitätsminderung muß sicherlich zwischen den ionischen und den partikulären Verbindungen unterschieden werden. Ein möglicher Mechanismus der Inhibition durch die Inkubation mit den Partikeln wird von Miller et al. (1979) aufgezeigt. Sie fanden, daß die AM von Meerschweinchen, die Quarzpartikel inhaliert hatten, keine Chemotaxis mehr zeigten und schlossen u.a. daraus auf eine *in vivo* Inaktivierung der Zellen durch den Kontakt mit chemotaktischen Faktoren. Auch andere Autoren beobachteten nach Inkubation mit z.B. C5a oder FMLP eine Desensibilisierung von PMN und AM durch die Internalisierung besetzter Rezeptoren und damit den Verlust der Chemotaxis (Daughaday et al., 1985; Nelson et al., 1982; Chenoweth und Goodman, 1982). Der gleiche Mechanismus könnte auch bei der immobilisierenden Wirkung der partikulären Verbindungen eine Rolle spielen. Diese setzen mit Ausnahme von  $\text{TiO}_2$  chemotaktische Faktoren (wahrscheinlich C5a) frei, die an die Rezeptoren von Nachbarzellen binden und deren Chemotaxis dadurch inhibieren könnten. Die Korrelation zwischen der Freisetzung von CF und der Hemmung der Chemotaxis nach der Inkubation mit den verschiedenen Partikeln steht im guten Einklang mit dieser Hypothese.

Demgegenüber deutet einerseits die sehr schnelle Wirkung von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  auf die Chemotaxis der RAM und andererseits die Fähigkeit von  $\text{LaCl}_3$  auch völlig andersartige Zellen, wie z.B. Epidermiszellen von *Xenopus laevis* (Strohmeier und Bereiter-Hahn, 1984) zu immobilisieren, auf einen generellen Mechanismus hin. Da die Chemotaxis ein äußerst komplexer Vorgang ist, sind sehr viele Ansatzpunkte denkbar. Zum einen muß die Signalerkennung über spezielle Rezeptoren und die Signaltransduktion über einen rezeptorgekoppelten G-Protein-Komplex gewährleistet sein, zum anderen muß der Auf- und Abbau zytoskeletaler Elemente zur Generierung der erforderlichen Kräfte und die Ausbildung bzw. Auflösung von adhäsiven Interaktionen zwischen der Zelle und ihrem Substrat in einem koordinierten Zusammenspiel erfolgen (Senior und Daughaday, 1991).

Die Untersuchung der C5a-Rezeptoren ergab keinen Hinweis auf eine Beeinflussung ihrer Anzahl oder ihrer Affinität durch  $\text{LaCl}_3$ . Eine so spezifische Wirkung erscheint auch wenig wahrscheinlich, da  $\text{LaCl}_3$  bei humanen PMN die Chemotaxis sowohl gegenüber C5a (Boucek und Snyderman, 1976) als auch gegenüber FMLP (Simchowitz und Cragoe, 1990) hemmt und diese jeweils durch verschiedene Rezeptoren vermittelt wird. Zudem kann in Abwesenheit von chemotaktischen Faktoren durch hohe  $\text{LaCl}_3$ -Konzentrationen auch die spontane Migration der PMN gehemmt werden (Boucek und Snyderman, 1976).

Ebensowenig scheint eine Beeinflussung der Adhäsion bei der Immobilisierung der Zellen durch  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  eine Rolle zu spielen. Die beobachtete Reduzierung der Absetzrate ist zu gering um damit die nahezu vollständige Hemmung der Chemotaxis erklären zu können. Methodisch bedingt wurden die Untersuchungen jedoch nicht auf den in der Chemotaxiskammer benutzten Membranen, sondern in normalen Kulturschalen durchgeführt. Obwohl verschiedene Substrate zu einer unterschiedlich starken Intensität der Adhäsion führen (Gehr et al., 1989) gibt es keine Anhaltspunkte dafür, daß sich die mit  $\text{LaCl}_3$  vorinkubierten RAM auf den Membranen anders festsetzen würden als die Kontrollzellen. So lassen z.B. die rasterelektronenmikroskopischen Bilder von RAM, die auf diesen Membranen adhären (Abb.55) einen derartigen Schluß nicht zu. Auch auf Glasdeckgläschen wird die Adhäsionsfähigkeit durch  $\text{LaCl}_3$  nicht verändert (Simchowitz und Cragoe, 1990).

Demgegenüber gibt es zahlreiche Hinweise darauf, daß die meisten der inhibitorischen Wirkungen von  $\text{La}^{3+}$ -Ionen (eine gute Übersicht gibt Das et al., 1988) auf ihrer Fähigkeit beruhen,  $\text{Ca}^{2+}$  von der Zellmembran zu verdrängen und zu ersetzen, und dadurch eine Blockierung des transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxes bewirken.

Boucek und Snyderman (1976) nehmen diesen Wirkungsmechanismus auch bei der Hemmung der Chemotaxis an. Sie fanden bei der Inkubation von PMN mit  $\text{LaCl}_3$  neben der Immobilisierung der Zellen auch die Inhibition des Einstromes von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und schlossen daraus, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom für die Chemotaxis unbedingt notwendig ist.

Rinderalveolarmakrophagen zeigen jedoch auch in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium, in dem kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom stattfinden kann, eine normale chemotaktische Bewegung. Dies ist unerwartet, da normalerweise in Leukozyten unmittelbar nach Zugabe von chemotaktischen Stoffen ein Anstieg der freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu beobachten ist (Snyderman und Uhing, 1988). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spielen im Mechanismus der Zellbewegung eine wichtige Rolle, indem sie u.a. den Umbau des Aktins durch die Interaktion mit aktinregulierenden Proteinen, wie z.B. Alpha-Actinin, Gelsolin oder Caldesmon, steuern (Hartwig, 1991). Die Erhöhung der freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration geschieht jedoch biphasisch, wobei nach einem schnellen Anstieg, der durch die Mobilisierung aus internen Speichern erfolgt, zunächst ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux und erst dann ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx aus dem Medium zu beobachten ist (Romeo et al., 1982). Nur dieser zweite intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg wird durch Lanthan gehemmt (Randriamampita und Trautman, 1989).

Es wäre daher denkbar, daß in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium die Chemotaxis der RAM und die dafür notwendige Erhöhung der freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern aufrechterhalten werden kann. Die nach 20-stündiger Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium um ca. 40% reduzierte Chemotaxis könnte entsprechend auf eine Verarmung der internen Speicher im Laufe der Kultur zurückgeführt werden. In entsprechender Weise kann auch die fehlende Wirkung von Verapamil auf die Mobilität der RAM interpretiert werden, wobei jedoch zu beachten ist, daß Verapamil nicht alle, sondern hauptsächlich die spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle blockiert, so daß ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über andere Kanäle erfolgen könnte.

Gegenüber den RAM zeigen humane PMN eine größere Abhängigkeit von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Zum einen kann bereits unmittelbar nach ihrem Entzug eine um ca. 35% reduzierte chemotaktische Migration festgestellt werden (Simchowicz und Cragoe, 1990), zum anderen wurde nach der Inkubation mit Verapamil schon mehrfach eine Inhibition der Chemotaxis beobachtet. Diese könnte allerdings auch auf Mechanismen beruhen, die nicht durch Kalzium vermittelt werden, da sie häufig erst bei höheren Verapamil-Konzentrationen auftritt als für die Blockade der Kanäle notwendig ist (Harvath, 1989).

Der Unterschied zu den RAM hängt möglicherweise damit zusammen, daß die PMN nur wenige Mitochondrien (u.a. Speicherorte des  $\text{Ca}^{2+}$ ) besitzen (Romeo et al., 1982) und in Medien mit geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sehr schnell ihr intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  verlieren. Becker et al. (1982) wiesen deshalb darauf hin, daß die verminderte Reaktivität der PMN in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medien nicht nur durch einen fehlenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erklärt werden kann, sondern auch dadurch, daß die extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zur Aufrechterhaltung des labilen intrazellulären Kalzium-Pools nötig sind.

Aus den Ergebnissen mit RAM ergibt sich einerseits, daß ein Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wie er von vielen Autoren im Verlauf der chemotaktischen Antwort als notwendig erachtet wird, wahrscheinlich durch die Mobilisierung interner Kalziumspeicher gewährleistet ist und andererseits, daß zur Erklärung der immobilisierenden Wirkung des  $\text{LaCl}_3$  die Annahme einer einfachen Blockade des transmembranen Kalzium-Fluxes vermutlich nicht ausreicht, zumal  $\text{CeCl}_3$  denselben Effekt verursacht.

Der inhibitorische Effekt von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  auf die Chemotaxis könnte auch durch eine Beeinflussung des Zytoskeletts erfolgen. Die Wichtigkeit des Zytoskeletts für die gerichtete Bewegung konnte auch bei RAM gezeigt werden. Die Inkubation mit Cytochalasin B führt neben einer Zerstörung des F-Aktingerüsts (Abb.63) zu der vollständigen Hemmung der Chemotaxis. Analog dazu kann nach der Inkubation mit Colchizin die Zerstörung des Mikrotubulsystems (Abb.72) und ebenfalls die Inhibition der gerichteten Bewegung beobachtet werden. Während das Aktingerüst u.a. bei der Gel-Sol-Umwandlung in der hyalinen Cortex und der Generierung der erforderlichen Kräfte benötigt wird (Stossel, 1990), scheint das Mikrotubulsystem bei der Bestimmung der Migrationsrichtung eine Rolle zu spielen (Allison et al., 1971).

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von RAM zeigten, daß diese bzgl. der Verteilung und der Umorganisation des F-Aktins während des Festsetzens und in Monolayer-Kultur, mit Makrophagen anderer Spezies übereinstimmen (vgl. Amato et al., 1983). Nach den Inkubationen mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  konnten keine Anhaltspunkte für eine Veränderung dieser zytoskeletalen Komponente festgestellt werden. Demgegenüber kann bei Inkubationen mit Quarz eine Umstrukturierung des F-Aktinsystems beobachtet werden. Diese tritt aber sehr wahrscheinlich nur aufgrund der Phagozytose von Partikeln auf, da die gleichen Vorgänge bereits bei der Phagozytose von Hefezellen durch Makrophagen beschrieben wurden (Stendahl et al., 1980) und deshalb nicht als quarzspezifisch bewertet werden können.

Die Untersuchungen des Polymerisationsgrades von Aktin bei RAM zeigten, ebenso wie die Mikroskopie, kulturbedingte Veränderungen der Aktinorganisation auf. Direkt nach der Isolierung liegen ca. 57% des gesamten Aktins in Form von G-Aktin vor. Im Vergleich dazu wird der Prozentsatz an G-Aktin bei humanen Thrombozyten mit 59% und der von Lymphozyten mit 62% angegeben (Blikstad et al., 1978).

Im Gegensatz zu den morphologischen Ergebnissen konnte nach der Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  eine Erhöhung des G-Aktinanteils, d.h. eine Wirkung auf das Aktinsystem festgestellt werden. Diese resultiert wahrscheinlich aus einer Depolymerisation von F-Aktin und nicht aus einer Neusynthese von G-Aktin, da die Gesamtaktinmenge durch die Inkubationen nicht beeinflusst wird. Eine direkte Interaktion mit dem Aktinsystem ist allerdings wenig wahrscheinlich, denn wie Untersuchungen mit isolierten G-Aktin zeigen, führen die Lanthanide (mit Ausnahme von Lanthan) zu einer Erhöhung seiner Polymerisationsrate (Evans, 1983). Es ist denkbar, daß die festgestellte Depolymerisation mit den phagozytoseartigen Prozessen in Verbindung steht, die bei der Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  zu beobachten sind (Abb.10), da es auch nach der Inkubation mit Quarz und tendenziell ebenfalls mit  $\text{TiO}_2$  zu einer Erhöhung des G-Aktinanteils kommt. Die Depolymerisation des F-Aktins durch  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  ist jedoch sicherlich nicht die Ursache der Immobilisierung von RAM, da in der zeitlichen Entwicklung zwischen diesen beiden Merkmalen keinerlei Korrelation zu erkennen ist.

Die Organisation des Mikrotubulsystems von RAM ist, ebenso wie das Aktingerüst, mit dem von Makrophagen anderer Spezies vergleichbar (vgl. Cain et al., 1981). Auch bei dieser zytoskeletalen Komponente ist keine Beeinflussung durch die Behandlung mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  feststellbar. Eine Beteiligung des Zytoskeletts an der immobilisierenden Wirkung von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  scheint daher nicht gegeben zu sein. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß diese Untersuchungen an ruhenden Zellen gemacht wurden, währenddessen die Chemotaxis einen dynamischen Umbau der zytoskeletalen Elemente erfordert. Es ist daher durchaus denkbar, daß  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  ihre Wirkung nicht auf das "statische" Zytoskelett ausüben, sondern auf seine Regulation während der Migration.

Einen ähnlichen Wirkungsmechanismus schlagen auch Simchowitz und Cragoe (1990) vor. Sie stellten fest, daß  $\text{La}^{3+}$  die Chemotaxis von humanen PMN hemmt, und daß diese Hemmung durch die Blockade des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmechanismus mit Benzamil, welches interessanterweise selbst keinen Einfluß auf die Migration hat, unterdrückt werden kann. Zudem fanden sie eine Inhibition der FMLP-stimulierten F-Aktinpolymerisation durch  $\text{La}^{3+}$ , die

ebenfalls durch die Blockade des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmechanismus mit Benzamil verschwindet. Daraus schlossen sie, daß bei der Stimulation mit FMLP das  $\text{La}^{3+}$  anstelle des  $\text{Ca}^{2+}$  über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmechanismus in das Zytoplasma gelangt und dort entweder direkt oder indirekt die F-Aktinpolymerisation und dadurch die Chemotaxis verhindert.

Eine indirekte Wirkung ist dabei allerdings wahrscheinlicher, da die Latexphagozytose bei RAM, die ebenfalls einen komplexen Umbau des Aktingerüstes erfordert, durch die Inkubation mit  $\text{CeCl}_3$  nicht beeinflusst wird (Wiener-Schmuck, 1988).

Ähnlich durchgeführte Untersuchungen mit RAM kamen zu anderen Ergebnissen, die allerdings nur z.T. im Widerspruch zu diesen stehen. Verapamil führt zwar ebenso wie Benzamil nicht zu einer Hemmung der Chemotaxis, kann aber, im Gegensatz zu diesem, die Wirkung von  $\text{LaCl}_3$  nicht unterdrücken (Abb.53). Da die beiden  $\text{Ca}^{2+}$ -Blocker jeweils auf verschiedene Einstromwege des  $\text{Ca}^{2+}$  einwirken, könnte das Ergebnis auch als Hinweis auf den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmechanismus als Weg des  $\text{La}^{3+}$  in die Zelle gewertet werden.

Die Untersuchungen der F-Aktinpolymerisation nach der Stimulation wurden, da die RAM keine FMLP-Rezeptoren besitzen, mit ZAS durchgeführt. Überraschenderweise unterscheidet sich der zeitliche Verlauf der Reaktion bei RAM völlig von dem bei PMN. Deren Stimulation mit FMLP führt innerhalb von Sekunden zu einer drastischen Zunahme des F-Aktingehaltes, der sich nachfolgend langsam wieder normalisiert. Diese Kinetik wurde bei PMN bereits mehrfach beobachtet (Howard und Oresajo, 1985; Packman und Lichtman, 1990) und es gibt keine begründeten Zweifel an Ihrer Richtigkeit. Im Gegensatz dazu kann bei RAM innerhalb der ersten drei Minuten nach der Stimulation keinerlei Reaktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die F-Aktinpolymerisation tritt erst nach 15 Minuten, im Anschluß an eine meist deutliche Depolymerisation auf. Die Richtigkeit dieser Kinetik kann, da es an Vergleichsmöglichkeiten mangelt, nur sehr schwer beurteilt werden und eine Interpretation der Ergebnisse ist deshalb nur mit Vorbehalt möglich. Es ist jedoch offensichtlich, daß unbehandelte RAM eine F-Aktinpolymerisation durchführen können und diese in der gleichen Weise auch von vorbehandelten Zellen ausgeführt wird.

Auch die gleichzeitige Anwesenheit von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  im Stimulationsmedium führt im Vergleich zum Kontrollmedium zu keiner unterschiedlichen Reaktion, so daß der von Simchowitz und Cragoe (1990) bei PMN gefundene Wirkungsmechanismus von  $\text{La}^{3+}$  auf die Chemotaxis, bei den RAM zunächst nicht bestätigt werden konnte. Dies könnte zum einen an der Verschiedenartigkeit der benutzten Zellen, zum anderen aber auch an den unterschiedlichen Stimulantien liegen, die wahrscheinlich über verschiedene Reaktionsmechanismen wirken. So stellte Romeo et al. (1982) fest, daß die Stimulation von PMN mit Phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA), wie mit FMLP, zu einem Einstrom an extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  führt, die Stimulation mit C5a hingegen nicht. ZAS enthält zudem noch eine Vielzahl weiterer biologisch aktiver Substanzen, deren Wirkungen auf das Versuchsergebnis nicht abgeschätzt werden können. Möglicherweise handelt es sich daher bei der beobachteten F-Aktinpolymerisationskinetik nicht um eine spezifische Reaktion der RAM auf die chemotaktischen Faktoren von ZAS, sondern auf andere Faktoren oder um das Ergebnis mehrerer gleichzeitiger Reize. In diesem Falle könnte aber, wenn von einem

indirekten Einfluß des  $\text{La}^{3+}$  auf die F-Aktinpolymerisation ausgegangen wird, der für PMN vorgeschlagene Mechanismus der Immobilisierung durchaus auch für die RAM zutreffen. Hinweise dafür geben die Untersuchungen mit Acetyl-Salicylsäure (ASS), als deren Wirkungsmechanismus, neben der Hemmung der Prostaglandinsynthese, die Beeinflussung bestimmter Pertussis-Toxin sensitiver G-Proteine diskutiert wird (Weissmann, 1991). Diese können durch die vorherige Inkubation mit ASS gegenüber der inhibierenden Wirkung des Toxins geschützt werden. Es wäre denkbar, daß der beobachteten Reduktion der immobilisierenden Wirkung von  $\text{LaCl}_3$  durch ASS ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt. Daraus könnte dann auf eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen  $\text{La}^{3+}$  und speziellen G-Proteinen und eine dadurch veränderte Signaltransduktion, geschlossen werden. Dieser Schluß ist zwar reizvoll, da sowohl die bei RAM als auch bei PMN (Simchowitz und Cragoe, 1990) gefundenen Ergebnisse damit im Einklang stehen, jedoch ohne die genaue Wirkung von ASS zu kennen und die Frage der F-Aktinpolymerisationskinetik bei RAM geklärt zu haben, ist er etwas verfrüht.

Die bei RAM gefundene Hemmung der Chemotaxis durch  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$ , bestätigt die bei PMN erhobenen Befunde, könnte jedoch bei ihrer Übertragung auf das in vivo-System schwerwiegendere Auswirkungen haben. Diese könnten sich beispielsweise in einer verminderten Abtötungsrate von inhalierten Mikroorganismen und einer verzögerten Lungen-clearance manifestieren. Möglicherweise spielt die Immobilisierung der AM, neben dem von Berry et al. (1988) vorgeschlagenen Speichermechanismus, eine weitere Rolle bei der, im Vergleich zu Zink (14 Stunden; Hirano et al., 1989) oder Kupfer (7.5 Stunden; Hirano et al., 1990b), relativ langen Halbwertszeit von Cer und Yttrium (168 Tage; Hirano et al., 1990a) in der Lunge.

#### Zusammenfassung und Schlußfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund von morphologischen und biochemischen Untersuchungen gezeigt werden, daß die Seltenen Erdmetallverbindungen auf RAM eine zytotoxische Wirkung ausüben. Diese ist bei den Chloriden höher als bei dem Oxid, bei dem lanthanhaltigen Hochtemperatur-Supraleitermaterial jedoch wahrscheinlich auf den Kupferanteil zurückzuführen. Desweiteren konnten verschiedene immunrelevante Wirkungen der Seltenen Erdmetallverbindungen beschrieben werden. Einerseits führen sie zur Freisetzung eines oder mehrerer chemotaktisch wirksamer Faktoren, zu denen möglicherweise auch der Complementfaktor C5a gehört. Andererseits inhibieren sie die Chemotaxis der RAM über Mechanismen, die weder mit ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalkblockierenden Wirkung noch mit der Adhäsion, den Rezeptoren oder dem Zytoskelett selbst eindeutig in Zusammenhang gebracht werden konnten, sondern sehr wahrscheinlich dessen dynamische Regulation bzw. die Signaltransduktion betreffen. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Seltenen Erdmetallverbindungen wichtige immunologische Funktionen der Makrophagen beeinflussen können. Viele ihrer bekannten in vivo Effekte wie z.B. die Lungenfibrose oder die Hepatotoxizität sind möglicherweise dadurch erklärbar. Lanthanhaltige Hochtemperatursupraleiter sind potentiell toxisch und könnten zu schweren Lungenentzündungen oder Lungenveränderungen führen.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels morphologischer, biochemischer und zellbiologischer Methoden, die Wirkung von Seltenen Erdmetallverbindungen auf Rinderalveolarmakrophagen (RAM) untersucht.

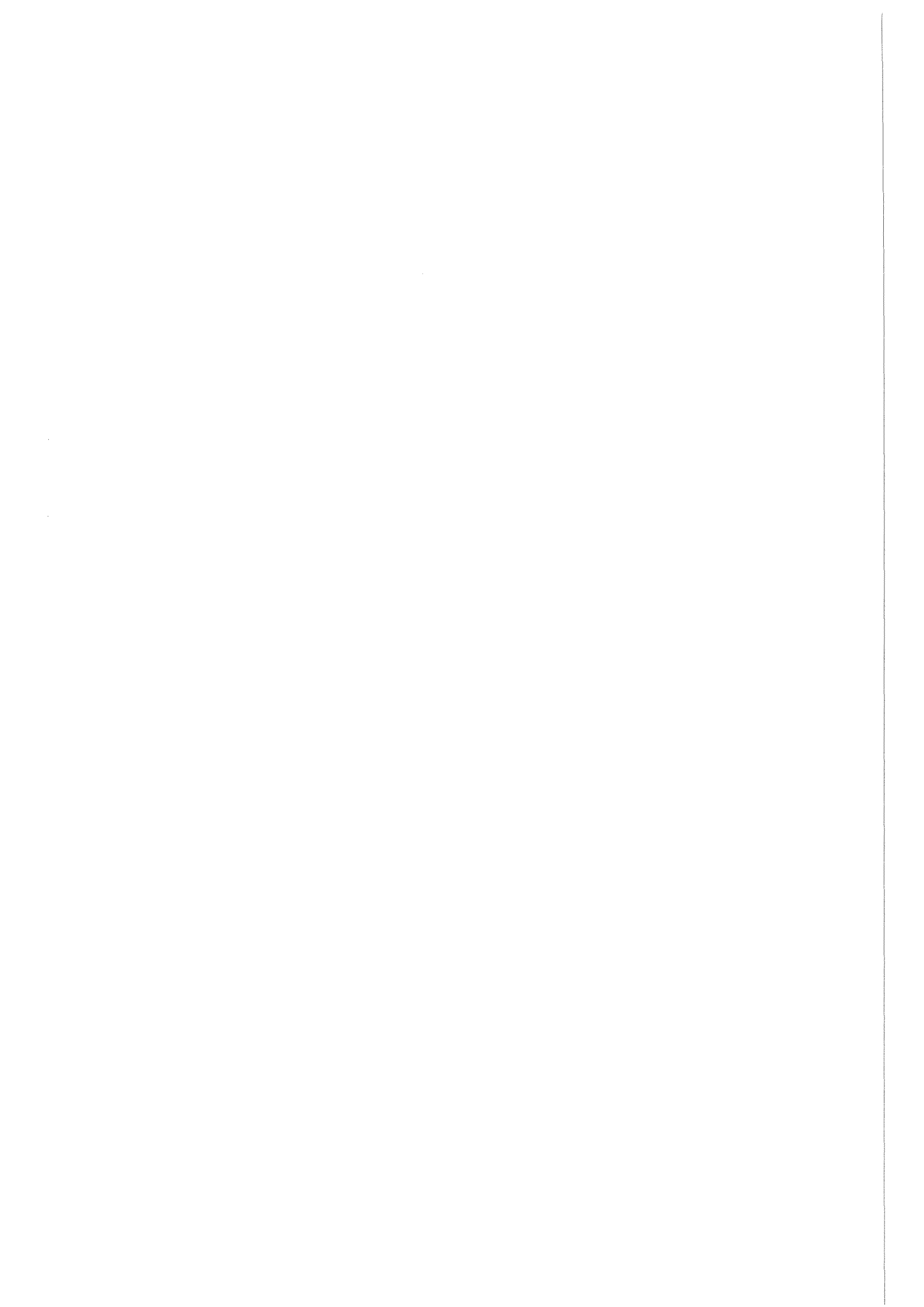
Die Inkubation der Zellen in  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  führt zu deutlichen morphologischen Veränderungen, die sich in der Vakuolisierung des Cytoplasmas und der Reduzierung der Zelloberflächenstrukturen äußern. Die Vakuolen beinhalten typischerweise elektronendichte Einschlüsse, bei denen es sich, wie EDX-Analysen an  $\text{CeCl}_3$ -inkubierten Zellen zeigen, um cerhaltige Verbindungen handelt. Der Inhalt der Vakuolen besitzt meist einen niedrigen pH-Wert, Saure Phosphatase-Aktivität kann in ihnen jedoch nicht nachgewiesen werden.

Ein Vitalitätsverlust der Zellen nach einer Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  kann erst nach 20 Stunden beobachtet werden. Dieser spiegelt sich auch in einer erhöhten Freisetzung von cytoplasmatischen und lysosomalen Enzymen in das Medium wider. Der Hochtemperatursupraleiter  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$  und  $\text{La}_2\text{O}_3$  erwiesen sich ebenfalls als cytotoxisch und führen in gleicher Weise zur Freisetzung der Markerenzyme.

Durch die Inkubation mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  wird die Freisetzung von chemoattraktiv wirkenden Faktoren (CF) induziert.  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$  und Quarz haben die gleiche Wirkung, während  $\text{TiO}_2$  keinen Einfluß hat. Eine zusätzliche Akkumulation von CF innerhalb der Zellen konnte in keinem Falle nachgewiesen werden. Auch die Stimulation der Zellen mit Lipopolysaccharid führt zur Freisetzung von CF, deren Ausmaß durch  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  nicht beeinflusst wird. Bei den CF handelt es sich um peptidische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von ca. 12 kDa. Ihre Wirkung ist chemotaktisch, nicht chemokinetisch, und kann durch eine thermische Behandlung zerstört werden. Es gibt Hinweise darauf, daß es sich bei ihnen u.a. um C5a, dem chemoattraktiven Fragment des Complementfaktors C5, handeln könnte.

RAM zeigen direkt nach ihrer Gewinnung keine chemotaktische Aktivität. Nach einer 20-stündigen in vitro Kultur kann jedoch gegenüber Zymosan-aktiviertem Serum eine gerichtete Bewegung festgestellt werden. Bereits eine kurzzeitige Inkubation der Zellen mit  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  führt zu einer Inhibierung ihrer Chemotaxis. Auch  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$  und Quarz, jedoch nicht  $\text{TiO}_2$ , bewirken eine Reduktion der Mobilität, die allerdings erst nach 20 Stunden sichtbar wird. Die immobilisierende Wirkung von  $\text{LaCl}_3$  bzw.  $\text{CeCl}_3$  kann nur z.T. auf ihre Eigenschaft als  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker zurückgeführt werden, denn auch nach der Kultur in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium können die Zellen chemotaktische Bewegungen ausführen. Sowohl die Desintegration des Mikrotubuli- als auch des Aktinfilamentsystems führen zur Immobilisierung der Zellen. Eine Beeinflussung dieser Komponenten durch die Seltenen Erdmetallverbindungen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch ein möglicher Einfluß auf die C5a-Rezeptoren der Zellmembran oder der Adhäsionsfähigkeit der Zellen konnte als Wirkmechanismus ausgeschlossen werden. Eine Beeinflussung des Signaltransduktionsweges ist jedoch denkbar.

Aus den Ergebnissen kann darauf geschlossen werden, daß Seltene Erdmetallverbindungen auf Alveolarmakrophagen cytotoxisch wirken und deren Immunologischen Funktionen beeinflussen können. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der pulmonalen Veränderungen nach deren Inhalation beitragen.





**LITERATURVERZEICHNIS**

**Allison, A.C., Davies, P., de Petris, S. (1971)**

Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis, *Nature New Biology*, 232, 153-155

**Amato, P.A., Unanue, E.R., Taylor, D.L. (1983)**

Distribution of actin in spreading macrophages: A comparative study on living and fixed cells, *J. Cell Biol.*, 96, 750-761

**Andersen, O.K., Stenvold, S.E., Volden, G. (1982)**

Optimal assay conditions of 3T3 cell lysosomal hydrolases, *Europ. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, IV, 265-272

**Becker, E.L., Naccache, P.H., Sha'afi, R.I. (1982)**

Some early ionic events in neutrophil activation by chemotactic factors, In: *Leukocyte locomotion and chemotaxis* (Keller, H., Till, G.O., Eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, 338-351

**Benson, J.M., Henderson, R.F., Pickrell, J.A. (1988)**

Comparative in vitro cytotoxicity of nickel oxides and nickel-copper oxides to rat, mouse, and dog pulmonary alveolar macrophages, *J. Toxicol. Environ. 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

**Berry, J.P., Masse, R., Escaig, F., Galle, P. (1989)**

Intracellular localization of Cerium. A microanalytical study using an electron microprobe and ionic microanalysis, *Human Toxicol.*, 8, 511-520

**Bielefeldt-Ohmann, H., Babiuk, L.A. (1984)**

In vitro generation of hydrogen peroxide and of superoxide anion by bovine polymorphonuclear neutrophilic granulocytes, blood monocytes, and alveolar macrophages, *Inflammation*, 8, 251-275

**Birrell, G.B., Hedberg, K.K., Habliston, D.L., Griffith, O.H. (1989)**

Protein Kinase C inhibitor H-7 alters the actin cytoskeleton of cultured cells, *J. Cell. Physiol.*, 141, 74-84

**Blikstad, I., Markey, F., Carlsson, L., Persson, T., Lindberg, U. (1978)**

Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of Deoxyribonuclease I, *Cell*, 15, 935-943

**Blome, H., Höltmann, B., Rödelsperger, K. (1989)**

VII. Internationale Pneumokoniose-Konferenz, Tagungs- und Messeberichte, Staub - Reinhaltung der Luft, 49, 137-141

**Boucek, M.M., Snyderman, R. (1976)**

Calcium Influx requirement for human neutrophil chemotaxis: Inhibition by lanthanum chloride, *Science*, 193, 905-907

**Boyden, S.V. (1962)**

The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes, *J. Exp. Med.*, 115, 453-466

**Bradford, M.M. (1976)**

A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254

**Brain, J.D. (1980)**

Macrophage damage in relation to the pathogenese of lung diseases, *Environm. Health Perspect.*, 35, 21-28

**Braune, A., Seidel, A. (1992)**

Noch nicht veröffentlichte Ergebnisse, Kernforschungszentrum Karlsruhe, Inst. Genetik und Toxikologie von Spaltstoffen.

**Cain, H., Egner, E., Ruska, J. (1977)**

Ablagerungen Seltener Erden in der menschlichen Lunge und im Tierexperiment, *Virchows Arch. A. Path. Anat. and Histol.*, 374, 249-261

**Cain, H., Kraus, B., Fringes, B., Osborn, M., Weber, K. (1981)**

Centrioles, microtubules und microfilaments in activated mononuclear and multinucleate macrophages from rat peritoneum: Electron-microscopic and immunofluorescence microscopic studies, *J. Path.*, 133, 301-323

**Carroll, E.J., Mueller, R., Panico, L. (1982)**

Chemotactic factors for bovine leukocytes, *Am. J. Vet. Res.*, 43, 1661-1664

**Cerra, R.F., Nathansson, S.D. (1989)**

Organ-specific chemotactic factors present in lung extracellular matrix, *J. Surg. Res.*, 46, 422-426

**Chenoweth, D.E., Goodman, M.G. (1982)**

The C5a receptor of neutrophils and macrophages, In: *Leukocyte locomotion and chemotaxis* (Keller, H., Till, G.O., Eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, 252-269

- Christman, J.W., Rinaldo, J.E., Henson, J.E., Moore, S.A., Dauber, J.H. (1985)**  
Modification by hyperoxia in vivo of endotoxin-induced neutrophil alveolitis in rats. Production of chemotactic factors by alveolar macrophages and ultrastructure, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132, 152-158
- Clemente, J., Clerici, N., Espinosa, M.A., Leyva-Cobian, F. (1986)**  
Defective chemotactic response of human alveolar and colostral macrophages, *Immunol. Lett.*, 12, 271-276
- Cornell, R. (1969)**  
The use of nuclepore filters in ultrastructural studies of cell cultures, *Exp. Cell Res.*, 56, 156-158
- Crystal, R.G. (1991)**  
Alveolar macrophages, In: *The Lung: Scientific Foundations* (Crystal, R.G., West J.B., Eds.), Raven Press, New York, 527-538
- Das, T., Sharma, A., Talukder, G. (1988)**  
Effects of lanthanum in cellular systems, *Biological Trace Element Research*, 18, 201- 228
- Dauber, J.H., Daniele, R.P. (1980)**  
Secretion of chemotaxins by guinea pig lung macrophages I. The spectrum of inflammatory cell responses, *Exp. Lung Res.*, 1, 23-32
- Daughaday, C.C., Mehta, J., Spilberg, I., Atkinson, J.P. (1985)**  
Deactivation of guinea pig pulmonary alveolar macrophage responses to N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine: Chemotaxis, superoxide generation, and binding, *J. Immunol.*, 134, 1823-1826
- Denholm, E.M., Wolber, F.M., Phan, S.H. (1989)**  
Secretion of monocyte chemotactic activity by alveolar macrophages, *Am. J. Path.*, 135, 571-580
- DeVries, C.R., Ingram, P., Walker, S.R., Linton, R.W., Gutknecht, W.F., Shelburne, J.D. (1983)**  
Acute toxicity of lead particulates on pulmonary alveolar macrophages. Ultrastructural and microanalytical studies, *Lab. Invest.*, 48, 35-44
- Egner, E. (1976)**  
Cer-Pneumokoniose, *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 60, 475
- Evans, C.H. (1983)**  
Interesting and useful biochemical properties of lanthanides, *Trends Biochem. Sci.*, 8, 445-449

**Evans, C.H. (1990)**

Biochemistry of the lanthanides (Biochemistry of the elements, Vol.8; Frieden, E., Series Ed.), Plenum Press, New York, 211-231

**Falk, W., Goodwin, R.H., Leonhard, E.J. (1980)**

A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration, *J. Immunol. Meth.*, 33, 239-247

**Finch, G.L., McNeill, K.L., Hayes, T.L., Fisher, G.L. (1987)**

In vitro interactions between pulmonary macrophages and respirable particles, *Environm. Res.*, 44, 241-253

**Fischer, A.B. (1986)**

Untersuchungen der akuten und chronischen Toxizität von Metallen an isolierten Säugerzellen, *Forum-Städte-Hygiene*, 37, 366-380

**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, E.D. et al., Eds.), Plenum Press, New York, 257-268

**Fisher, G.L. (1989)**

Use of pulmonary macrophages in metal toxicity: A brief overview, *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 8, 1247-1250

**Fox, M.L. (1973)**

The bovine alveolar macrophage. 1. Isolation, in vitro cultivation, ultrastructure, and phagocytosis, *Can. J. Microbiol.*, 19, 1207-1210

**Fox, R.B., Hoidal, J.R., Brown, D.M. (1983)**

Pulmonary inflammation due to oxygen toxicity: involvement of chemotactic factors and polymorphonuclear leukocytes, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 123, 521-523

**Gardner, D.E. (1984)**

Alterations in macrophage functions by environmental chemicals, *Environ. Health Perspect.*, 55, 343-358

**Gehr, P., Schuerch, S., Marugg, R., Geiser, M., Im Hof, V. (1989)**

Macrophage intracellular motility and its correlation with cell-substrate adhesion, In: Springer Series in Biophysics 3 (Bayley, P.M., ed.) Cytoskeletal and extracellular Proteins. Structure, Interactions and Assembly. The 2nd Int. EBSA Symp. 235-243

- Goodman, R.B., Forstrom, J.W., Osborn, S.G., Chi, E.Y., Martin, T.R. (1991)**  
Identification of two neutrophil chemotactic peptides produced by porcine alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.*, 266, 8455-8463
- Gordon, M.R., Chida, K., Takata, I., Myrvik, Q.N. (1987)**  
Macrophage migration inhibition induced by MDP, LPS, PMA, and MIF/MAF: Reversal by macrophage migration enhancement factor (MEF), L-Fucose, L-Fucosyl BSA, D-Mannose, and D-Mannosyl BSA, *J. Leukocyte Biol.*, 42, 197-203
- Goren, M.B., Swendsen, C.L., Fiscus, J., Miranti, C. (1984)**  
Fluorescent markers for studying phagosome-lysosome fusion, *J. Leukocyte Biol.*, 36, 273-292
- Hanks, J.H., Wallace, J.H. (1958)**  
Determination of cell viability, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98, 156-160
- Hara, Y., Tsukada, M., Komiyama, A., Akabane, T. (1989)**  
Temperature-dependent formation of vacuolar and canalicular systems in association with degranulation in stimulated neutrophils, *Eur. J. Haematol.*, 42, 474-480
- Hartwig, J. (1991)**  
Mechanisms of cell movement, In: *The Lung: Scientific Foundations* (Crystal, R.G., West J.B., Eds.), Raven Press, New York, 141-153
- Harvath, L., Falk, W., Leonard, E.J. (1980)**  
Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: Use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly, *J. Immunol. Meth.*, 37, 39-45
- Harvath, L. (1989)**  
Regulation of neutrophil chemotaxis, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24, 233-241
- Hecht, F.M., Wesch, H. (1980)**  
Beitrag zum röntgenologischen Bild der Cer-Pneumokoniose, *Prax. Pneumol.*, 34, 169-173
- Heuck, F., Hoschek, R. (1967)**  
Die morphologischen Lungenveränderungen der "Cer-Pneumokoniose" im Röntgenbild, *Fortschr. Röntgenstr.*, 106, 489-502
- Hirano, S., Higo, S., Tsukamoto, N., Kobayashi, E., Suzuki, K.T. (1989)**  
Pulmonary clearance and toxicity of zinc oxide instilled into the rat lung, *Arch. Toxicol.*, 63, 336-342
- Hirano, S., Kodama, N., Shibata, K., Suzuki, K.T. (1990a)**  
Distribution, localization, and pulmonary effects of yttrium chloride following intratracheal instillation into the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 104, 301-311

**Hirano, S., Sakai, S., Ebihara, H., Kodama, N., Suzuki, K.T. (1990b)**

Metabolism and pulmonary toxicity of intratracheally instilled cupric sulfate in rats, *Toxicology*, 64, 223-233

**Howard, T.H., Oresajo, C.O. (1985)**

The kinetics of chemotactic peptide-induced change in F-actin content, F-actin distribution, and the shape of neutrophils, *J. Cell Biol.*, 101, 1078-1083

**Hugli, T.E. (1981)**

The structural basis for anaphylatoxin and chemotactic functions of C3a, C4a, and C5a, *Critical Reviews in Immunology*, 1, 321-366

**Hunnighake, G.W., Gallin, J.I., Fauci, A.S. (1978)**

The in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 117, 15-23

**Husztik, E., Lazar, G., Parducz, A. (1980)**

Electron microscopic study of Kupffer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride, *Br. J. Exp. Path.*, 61, 624-630

**Johansson, A., Wiernik, A., Lundborg, M., Jarstrand, C., Camner, P. (1988)**

Alveolar macrophages in rabbits after combined exposure to nickel and trivalent chromium, *Environm. Res.*, 46, 120-132

**Johnson, E., Hetland, G. (1988)**

Mononuclear phagocytes have the potential to synthesize the complete functional complement system, *Scand. J. Immunol.*, 27, 489-493

**Kagan, E., Oghiso, Y., Hartmann, D-P. (1983)**

Enhanced release of a chemoattractant for alveolar macrophages after asbestos inhalation, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 128, 680-687

**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

**Katona, I.M., Ohura, K., Allen, J.B., Wahl, L.M., Chenoweth, D.E., Wahl, S.M. (1991)**

Modulation of monocyte chemotactic function in inflammatory lesions. Role of inflammatory Mediators, *J. Immunol.* 146, 708-714

**Kazmierowski, J.A., Gallin, J.I., Reynolds, H.Y. (1977)**

Mechanism for the inflammatory response in primate lungs. Demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage-derived chemotactic factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes, *J. Clin. Invest.*, 59, 273-281

**Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Chensue, S.W., Basha, M., Standiford, T., Ham, J., Remick, D.G. (1990)**

Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-8 and chemotactic cytokines, In: Progress in clinical and biological research, Vol.349. Cytokines and Lipocortins in inflammation and differentiation (Melli, M.,Parente, L., Eds.), Wiley-Liss., New York, 433-444

**Kunkel, S.L., Standiford, T., Kasahara, K., Strieter, R.M.(1991)**

Interleukin-8 (IL-8): The major neutrophil chemotactic factor in the lung, *Exp. Lung Res.*, 17,17-23

**Kurland, G., Dauber, J.H. (1991)**

The deficient migration in vitro of lung macrophages from newborn rats normalizes after three days of maturation in situ, *J. Leukocyte Biol.*, 49, 211-213

**Laplante, C., Lemaire, I. (1990)**

Interactions between alveolar macrophage subpopulations modulate their migratory function, *Am. J. Pathol.*, 136, 199-206

**Lind, I. (1989)**

Untersuchungen zur Superoxidanionenproduktion durch Makrophagen: Einfluß von Kulturbedingungen und Stäuben. Diplomarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

**Linnekin, D., Bowles, C.A., Murano, G., McVittie, T.J. (1990)**

Migration of dog polymorphonuclear neutrophilic leukocytes to formylated peptides, *Inflammation*, 14, 691-703

**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

**Lugano, E.M., Dauber, J.H., Daniele, R.P. (1981)**

Silica stimulation of chemotactic factor release by guinea pig alveolar macrophages, *J. Reticuloendothel. Soc.*, 30, 381-390

**Lugano, E.M., Dauber, J.H., Daniele, R.P. (1982)**

Acute experimental silicosis. lung morphology, histology, and macrophage chemotaxin secretion, *Am. J. Pathol.*, 109, 27-36

**Martin, T.R., Altman, L.C., Albert, R.K., Henderson, W.R. (1984)**

Leukotriene B<sub>4</sub> production by the human alveolar macrophage: A potential mechanism for amplifying inflammation in the lung, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129, 106-111

**Martin, H., Loos, M. (1989)**

Biosynthesis of complement components by macrophages, In: Macrophage-derived cell regulatory factors. Cytokines (Sorg, C., Ed.), Karger Verlag, Basel, 155-172

**McGuire, R.L., Babiuk, L.A. (1984)**

Evidence for defective neutrophil function in lungs of calves exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 5, 259-271

**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, *Trombosis Haemostasis*, 63, 127-132

**Miller, K., Calverley, A., Kagan, E. (1979)**

Evidence of a quartz-induced chemotactic factor for guinea pig alveolar macrophages, *Environ. Res.*, 22, 31-39

**Morrow, P.E. (1988)**

Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10, 369-384

**Muecke, G.K., Möller, P. (1988)**

Die nicht so seltenen Seltenerden, *Spektrum der Wissenschaft*, März, 96-101

**Müller, H-L. (1986)**

Zum biologischen Verhalten von Uran-Plutonium-Mischoxidaerosolen: Inhalationsversuche mit Ratten und in vitro-Studien mit Alveolarmakrophagen, Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.

**Mueller, H-L., Robinson, B., Muggenburg, B.A., Gillett, N.A., Guilmette, R.A. (1990)**

Particle distribution in lung and lymph node tissues of rats and dogs and the migration of particle-containing alveolar cells in vitro, *J. Toxicol. Environ. Health*, 30, 141-165

**Murata, H., Hirose, H. (1991)**

Effect of transportation stress on bovine lymphocyte and neutrophil functions, *Japan Agricult. Res. Quart.*, 25, 61-64

**Nathan, C.F. (1987)**

Secretory products of macrophages, *J. Clin. Invest.*, 79, 319-326

**Nation, J.L. (1983)**

A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy, *Stain Technol.*, 58, 347-351



**Nelson, R.D., Quie, P.G., Simmons, R.L. (1975)**

Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes, *J. Immunology*, 115, 1650-1656

**Nelson, R.D., Chenoweth, D.E., Solomkin, J.S., Solem, L.D. (1982)**

Cytotaxin receptors on human neutrophils: Modulation of C5a and peptide receptor number, In: *Leukocyte locomotion and chemotaxis* (Keller, H., Till, G.O., Eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, 274-287

**Norris, D.A., Clark, R.A., Swigart, L.M., Huff, J.C., Weston, W.L., Howell, S.E. (1982)**

Fibronectin fragment(s) are chemotactic for human peripheral blood monocytes, *J. Immunol.*, 129, 1612-1618

**Nultsch, W. (1979)**

Effect of external factors on phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*: III Cation, *Arch. Microbiol.*, 123, 93-99

**Oberdorster, G., Ferin, J., Corson, N., Gavett, S., Hemmenway, D. (1989)**

Particle induced in vitro chemotaxis of alveolar macrophages (AM) and neutrophils and in vivo effects, In: *Effects of mineral dusts on cells* (Mossman, B.T., Begin, R.O., Eds.), Springer Verlag, Berlin, 313-320

**Oghiso, Y., Kubota, Y., Tsuboi, A., Matsuoka, O., Hartmann, D.P., Kagan, E. (1984)**

The enhanced release of interleukins and chemotactic cytokines from rat alveolar macrophages and T Lymphocytes stimulated with dust particles, *J. Leukocyte Biol.*, 36, 233

**Packman, C.H., Lichtman, M.A. (1990)**

Activation of neutrophils: Measurement of actin conformational changes by flow cytometry, *Blood Cells*, 16, 193-207

**Pätzold, S. (1989)**

Morphologische und biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Quarz auf Rinderalveolarmakrophagen und deren Organellen, Kernforschungszentrum Karlsruhe Report, KfK 4649

**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, *Environ. Res.*, 43, 142-156

**Papadimitriou, J.M., Ashman, R.B. (1989)**

Macrophages: Current views on their differentiation, structure, and function, *Ultrastructural Path.*, 13, 343-372

**Pearce, F.L., White, J.R. (1981)**

Effect of lanthanide ions on histamine secretion from rat peritoneal mast cells, *Br. J. Pharmacol.*, 72, 341-347

**Randriamampita, C., Trautmann, A. (1989)**

Biphasic increase in intracellular calcium induced by platelet-activating factor in macrophages, *FEBS letters*, 249, 199-206

**Rennard, S.I., Hunninghake, G.W., Bitterman, P.B., Crystal, R.G. (1981)**

Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: Mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7147-7151

**Robbins, R.A., Russ, W.D., Thomas, K.R., Rasmussen, J.K., Kay, H.D. (1987)**

Complement component C5 is required for release of alveolar macrophage-derived neutrophil chemotactic activity, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 135, 659-664

**Rohrbach, M.S., Kreofsky, T., Rolstad, R.A., Russel, J.A. (1989)**

Tannin-mediated secretion of a neutrophil chemotactic factor from alveolar macrophages, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 139, 39-45

**Rola-Pleszczynski, M., Gouin, S., Begin, R. (1984)**

Asbestos-induced lung inflammation: Role of local macrophage-derived chemotactic factors in accumulation of neutrophils in the lungs, *Inflammation*, 8, 53-62

**Romeo, D., Mottola, C., Schneider, C., Zanetti, M., Gennaro, R. (1982)**

Calcium movements and protein phosphorylation in chemotactically stimulated neutrophils, In: *Leukocyte locomotion and chemotaxis* (Keller, H., Till, G.O., Eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, 353-358

**Sachs, L. (1984)**

*Angewandte Statistik*, 6.Auflage, Springer Verlag, Berlin

**Schepers, G.W.H. (1955)**

The biological action of rare earths I, II, *Arch. Industr. Health*, 12, 301-316

**Schimmelpfeng, J. (1989)**

Zytotoxische Wirkungen von Quarz und Asbest: Ein in vitro Interspeziesvergleich mit Alveolarmakrophagen, Kernforschungszentrum Karlsruhe Report, KfK 4624

**Schliwa, M., VanBlerkom, J. (1981)**

Structural interaction of cytoskeletal components, *J. Cell Biol.*, 90, 222-235

**Schmidt, A., Matejka, M., Polzer, G., Seidel, A. (1991)**

Effects of lanthanum and cerium on the release of tumor necrosis factor and of a chemoattractant factor by alveolar macrophages, Fifth annual conference of the Upper Rhine Universities on the macrophage (Abstract)

**Seidel, A. (1988)**

Verhalten, Wirkung und therapeutische Entfernung wichtiger Radionuklide, GIT Labor-Medizin, 10, 519-526

**Seidel, A., Drosselmeyer, E., Hofheinz, V., Kreyling, W.G., Krombach, F., Pätzold, S., Polzer, G., Schimmelpfeng, J., Württemberger, G. (1989)**

Interaction of quartz with bovine alveolar macrophages: Studies on cytotoxicity, electrophoretic mobility and subcellular components, In: Effects of mineral dusts on cells (Mossman, B.T., Begin, R.O., Eds.), Springer Verlag, Berlin, 281-288

**Senior, R.M., Daughaday, C.C. (1991)**

Chemotaxis, In: The Lung: Scientific Foundations (Crystal, R.G., West J.B., Eds.), Raven Press, New York, 131-139

**Simchowitz, L., Foy, M.A., Cragoe, E.J. (1990)**

A role for  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in the generation of superoxide radicals by human neutrophils, J. Biol. Chem., 265, 13449-13456

**Simchowitz, L., Cragoe, E.J. (1990)**

Polyvalent cations inhibit human neutrophil chemotaxis by interfering with the polymerization of actin, J. Biol. Chem., 265, 13457-13463

**Smith, J.B., Dangelmaier, C., Mauco, G. (1985)**

Measurement of arachidonic acid liberation in thrombin-stimulated human platelets. Use of agents that inhibit both the cyclooxygenase and lipooxygenase enzymes, Biochim. Biophys. Acta, 835, 344-351

**Snella, M-C. (1985)**

Manganese dioxide induces alveolar macrophage chemotaxis for neutrophils in vitro, Toxicology, 34, 153-159

**Snella, M-C., Rylander, R. (1985)**

Endotoxin inhalation induces neutrophil chemotaxis by alveolar macrophages, Agents and Actions, 16, 521-526

**Snyderman, R., Uhing, R.J., (1988)**

Phagocytic cells: Stimulus-response coupling mechanisms, In: Inflammation; Basic Principles and Clinical Correlates (Gallin, J.I., Goldstein, I.M., Snyderman, R., Eds) Raven Press, New York, 309-323

**Stendahl, O.I., Hartwig, J.H., Brotschi, E.A., Stossel, T.P. (1980)**

Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis, *J. Cell Biol.*, 84, 215-224

**Stossel, T.P. (1990)**

How cells crawl, *American Scientist*, 78, 408-423

**Strohmeier, R., Bereiter-Hahn, J. (1984)**

Control of cell shape and locomotion by external calcium, *Exp. Cell Res.*, 154, 412-420

**Valiathan, M.S., Kartha, C.C., Eapen, J.T., Dang, H.S., Sunta, C.M. (1989)**

A geochemical basis for endomyocardial fibrosis, *Cardiovasc. Res.*, 23, 647-648

**Valiathan, S.M., Kartha, C.C. (1990)**

Endomyocardial fibrosis - the possible connexion with myocardial levels of magnesium and cerium, *Int. J. Cardiology*, 28, 1-5

**Vane, J.R. (1971)**

Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, *Nature-New Biology*, 231, 232-235

**Vogt, P., Spycher, M.A., Rüttner, J.R. (1986)**

Pneumokoniose durch "Seltene Erden" (Cer-Pneumokoniose), *Schweiz. Med. Wschr.*, 116, 1303-1308

**Ward, P.A. (1974)**

Leukotaxis and leukotactic disorders, *Amer. J. Pathol.*, 77, 520-538

**Waters, M.D., Gardner, D.E., Aranyi, C., Coffin, D.L. (1975)**

Metal toxicity for rabbit alveolar macrophages in vitro, *Environ. Res.*, 9, 32-47

**Weissmann, G. (1991)**

Aspirin: alte und neue Erkenntnisse, *Spektrum der Wissenschaft*, März, 118-126

**Wiener-Schmuck, M. (1988)**

Untersuchungen zur Hepatoxizität von Cer: In vivo-Versuche an Ratten und in vitro-Studien mit Hepatozyten und Makrophagen, *Kernforschungszentrum Karlsruhe Report*, KfK 4443.

**Wiener-Schmuck, M., Lind, I., Polzer, G., Seidel, A. (1990)**

In vivo and in vitro effects of rare earth compounds, *J. Aerosol Sci.*, 21, S505-S508

**Wilczek, W. (1991)**

Reaktionen von Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz und Hochtemperatursupraleiterstäube, *Kernforschungszentrum Karlsruhe Report*, KfK 4924

**Wilkinson, P.C. (1975)**

Leukocyte locomotion and chemotaxis: The influence of divalent cations and cation ionophores, *Exp. Cell Res.*, 93, 420-426

**Xu, Q., Mori, H., Sakamoto, O., Uesugi, Y., Koda, A. (1989)**

Immunological mechanisms of antitumor activity of some kinds of crude drugs on tumor necrosis factor production, *Int. J. Immunopharmac.*, 11, 607-613

**Yamaga, M., Evans, C.H. (1989)**

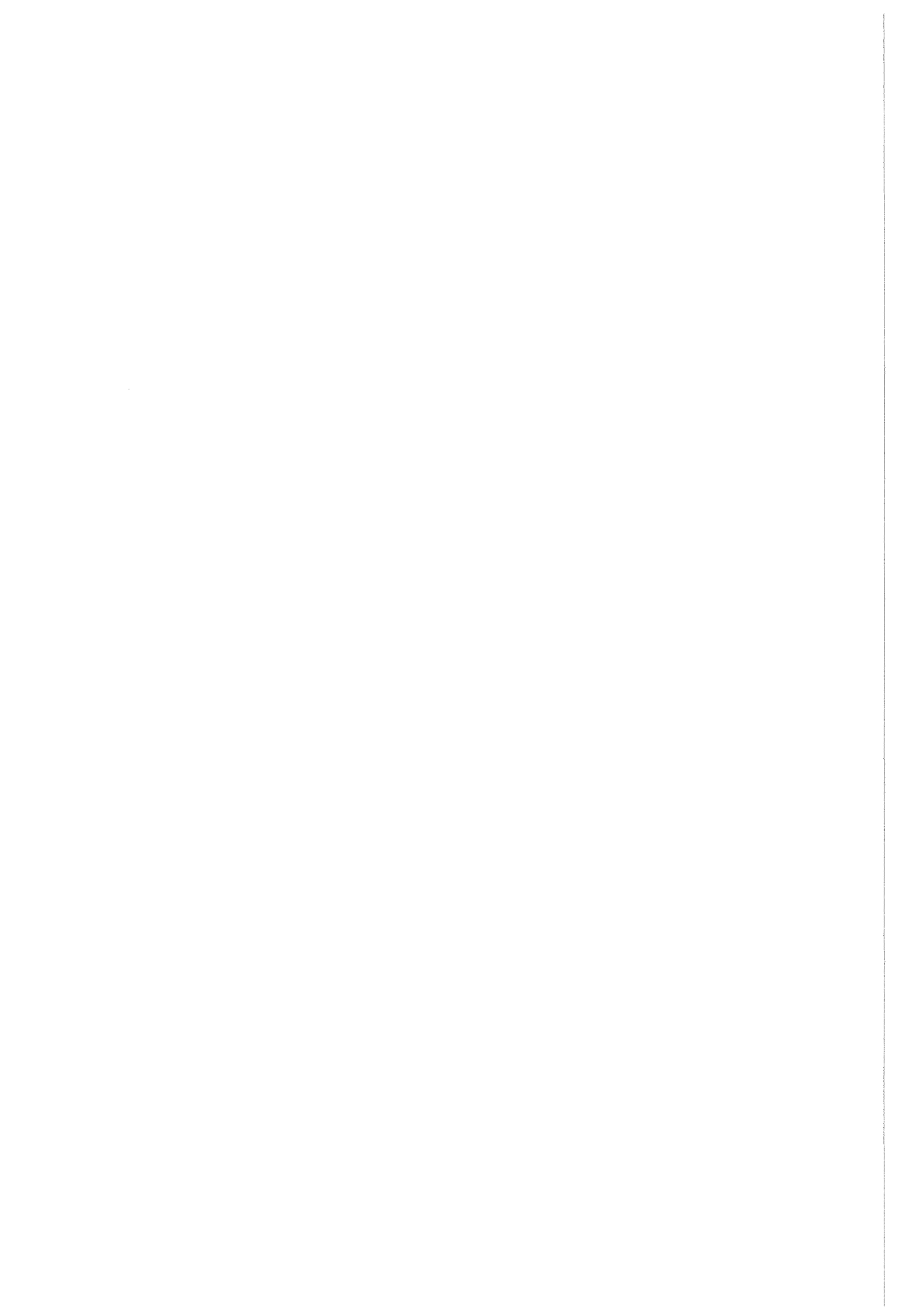
Suppression of mitogen- and antigen induced lymphocyte proliferation by lanthanides, *Experimentia*, 45, 1129-

**Yu, C.P., Chen, Y.K., Morrow, P.E. (1989)**

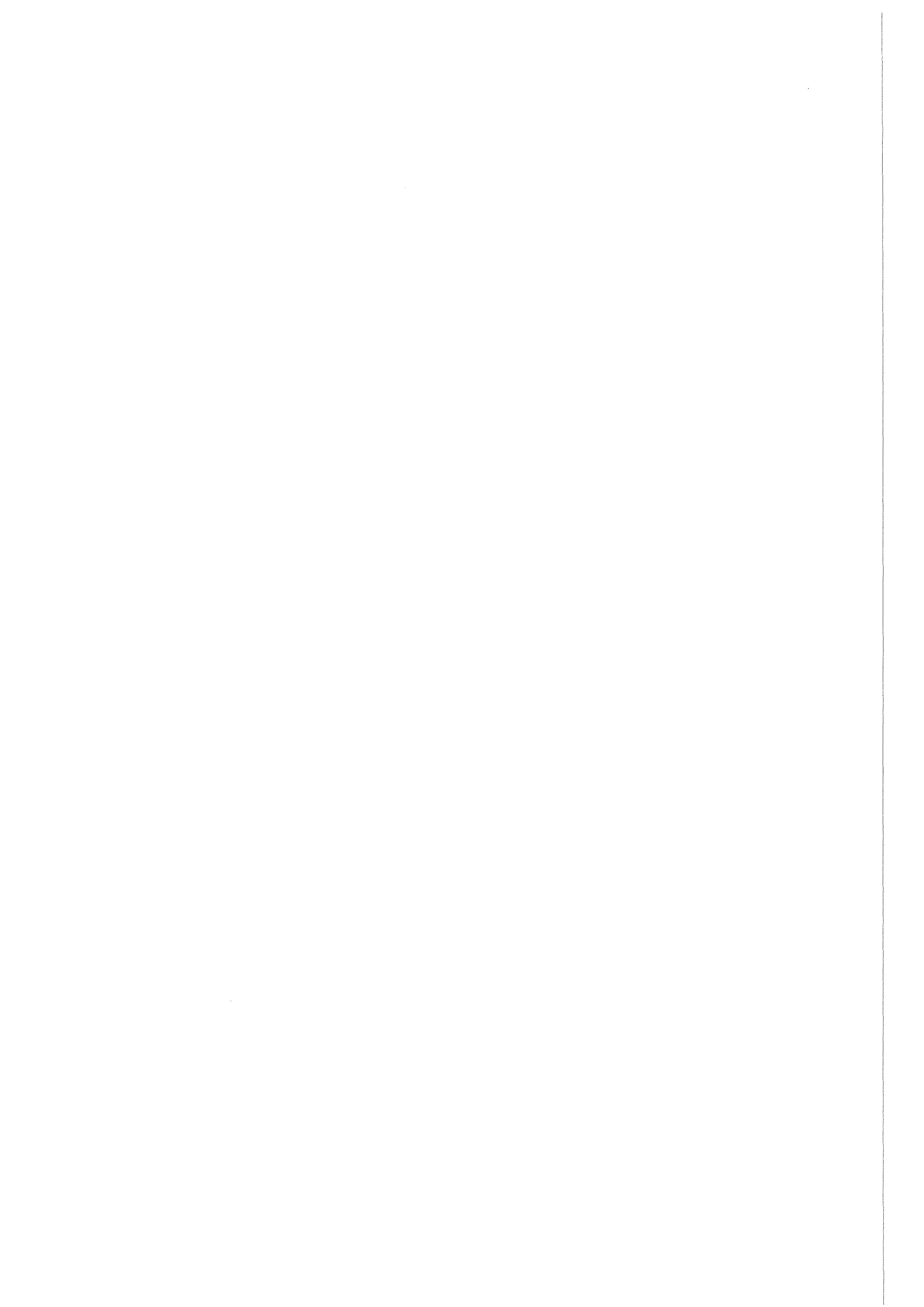
An analysis of alveolar macrophage mobility kinetics at dust overloading of the lungs, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13, 452-459

**Zilberman, Y., Gutman, Y., Koren, R. (1982)**

The effect of verapamil, lanthanum and local anesthetics on serotonin release from rabbit platelets, *Biochim. Biophys. Acta*, 691, 106-114



## **TABELLEN UND ABBILDUNGEN**





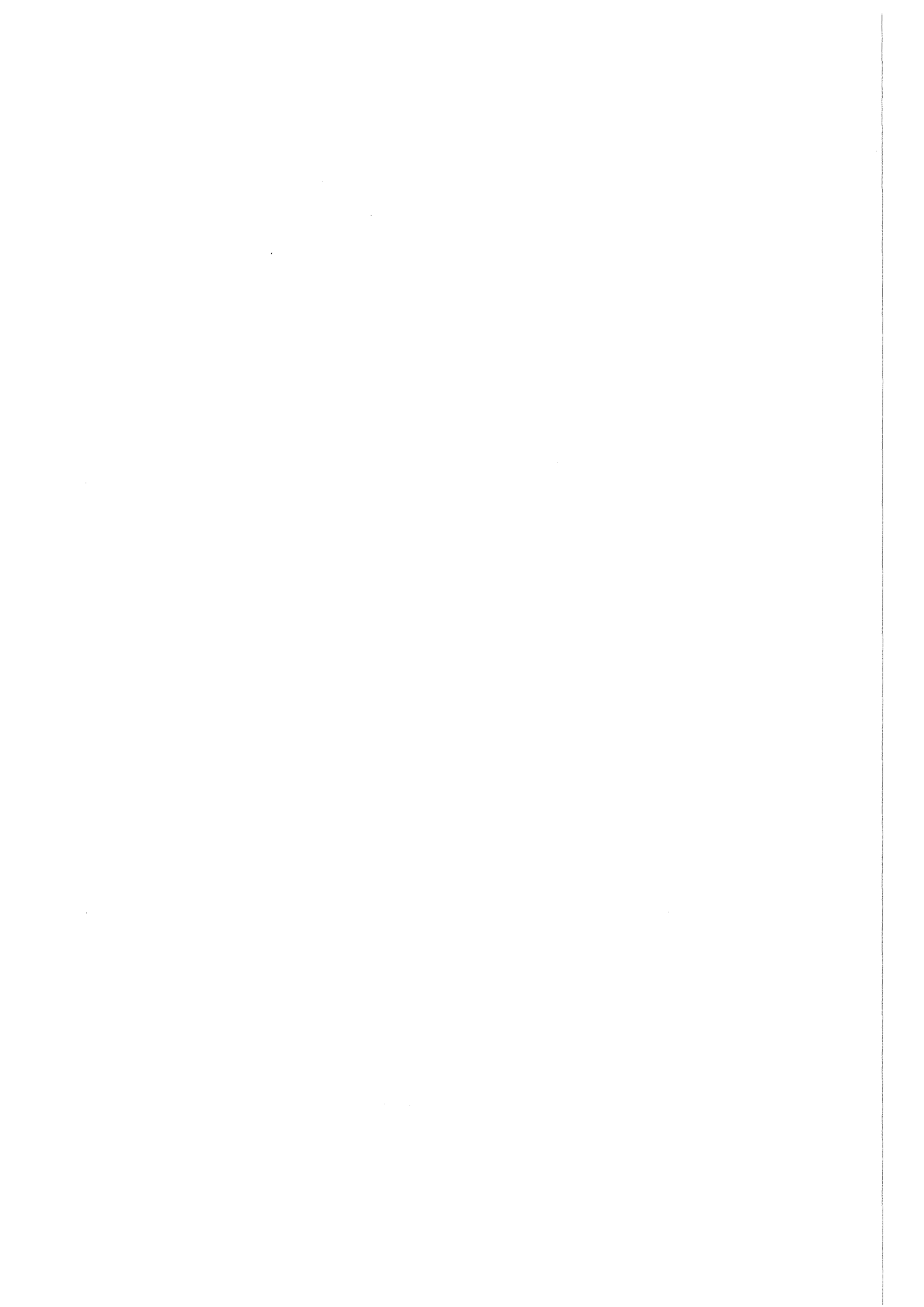
		Konzentration des Überstandes a) von LaBaCuO <sub>3,5</sub> -inkubierten Zellen (20h; 50 g/ml) in der <b>oberen</b> Kammer <sup>b)</sup>		
		0 %	50 %	100 %
Konzentra- tion des Überstandes a) von LaBaCuO <sub>3,5</sub> - inkubierten Zellen (20h;50 g/ml) in der <b>unteren</b> Kammer	0 %	6 ± 0	8 ± 2	7 ± 1
	50 %	125 ± 5	49 ± 5	17 ± 1
	100 %	130 ± 6	93 ± 4	48 ± 2

Tab. 1: Anzahl der gewanderten Rinderalveolarmakrophagen pro Blickfeld mit und ohne positiven bzw. negativen Konzentrationsgradienten.

Mittelwert mit Standardfehler von 3 Bestimmungen.

a) Der Überstand wurde mit Medium verdünnt

b) Rinderalveolarmakrophagen + jeweilige Verdünnung.



Kulturbedingungen	n	Kulturdauer	Anteil des G-Aktins am Gesamt-Aktingehalt [%]
Suspensionskultur	4	1.5 h	57 ± 3
	3	20.0 h	56 ± 3
Monolayerkultur	6	1.5 h	43 ± 3
	6	22.0 h	59 ± 7
	6	24.0 h	53 ± 4
	6	44.0 h	66 ± 6
	3	5 d	84 ± 2

Tab. 2: Einfluß der Kulturbedingungen und der Kulturzeit auf den Polymerisationsgrad von Aktin bei Rinderalveolarmakrophagen.  
Mittelwerte mit Standardfehler.  
n: Zahl der ausgewerteten Proben.



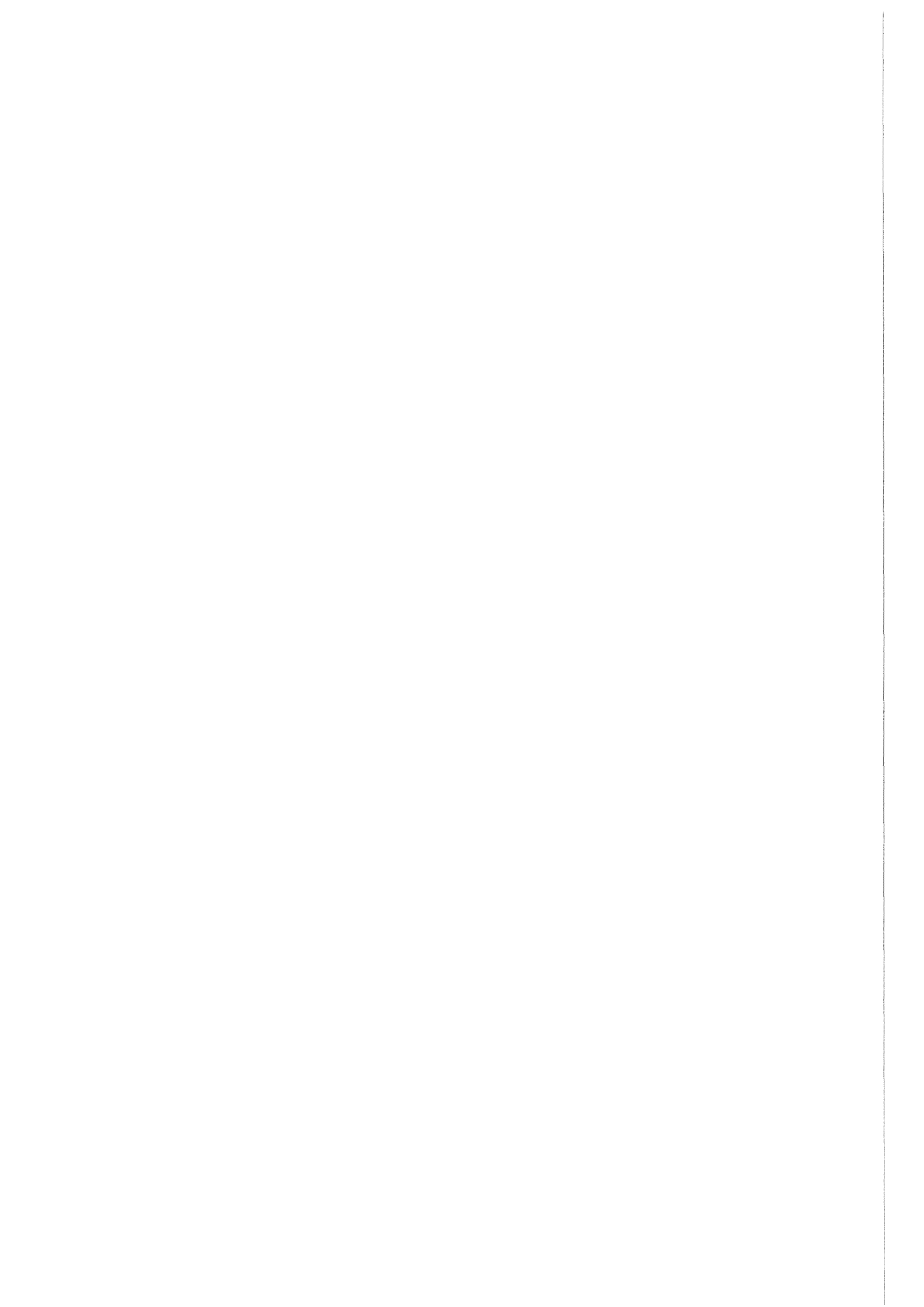
Inkubationszeit	Inkubationsmedium	n	Aktiningehalt [Inhibitorische Einheiten pro $\mu\text{g}$ Protein]	G-Aktiningehalt [% des Gesamtaktins]
2h	Kontrolle (RPMI 1640)	9	$25 \pm 2$	$47 \pm 7$
	$\text{CeCl}_3$ (100 $\mu\text{M}$ )	5	$27 \pm 3$	$47 \pm 8$
	$\text{LaCl}_3$ (100 $\mu\text{M}$ )	9	$27 \pm 3$	$50 \pm 6$
	Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$ )	9	$22 \pm 1$	$59 \pm 5^*$
	$\text{TiO}_2$ (250 $\mu\text{g/ml}$ )	8	$23 \pm 1$	$53 \pm 6$
	Cytochalasin B (10 $\mu\text{g/ml}$ )	3	$32 \pm 1$	$77 \pm 7^*$
4h	Kontrolle (RPMI 1640)	8	$25 \pm 3$	$53 \pm 3$
	$\text{CeCl}_3$ (100 $\mu\text{M}$ )	9	$24 \pm 3$	$67 \pm 7^*$
	$\text{LaCl}_3$ (100 $\mu\text{M}$ )	7	$23 \pm 1$	$62 \pm 5^*$
	Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$ )	8	$23 \pm 1$	$63 \pm 7$
	$\text{TiO}_2$ (250 $\mu\text{g/ml}$ )	5	$24 \pm 3$	$58 \pm 10$
	Cytochalasin B (10 $\mu\text{g/ml}$ )	6	$26 \pm 1$	$89 \pm 6^*$
20h	Kontrolle (RPMI 1640)	6	$23 \pm 2$	$64 \pm 4$
	$\text{CeCl}_3$ (100 $\mu\text{M}$ )	3	$25 \pm 3$	$67 \pm 6$
	$\text{LaCl}_3$ (100 $\mu\text{M}$ )	3	$24 \pm 1$	$76 \pm 1^*$
	Quarz (250 $\mu\text{g/ml}$ )	4	$26 \pm 1$	$69 \pm 2$
	$\text{TiO}_2$ (250 $\mu\text{g/ml}$ )	3	$20 \pm 1$	$60 \pm 15$

Tab. 3: Einfluß verschiedener Inkubationsmedien und -zeiten auf den Polymerisationsgrad von Aktin bei Rinderalveolarmakrophagen.

Mittelwerte mit Standardfehler.

n: Zahl der Versuche.

\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ( $2p < 0.05$ )



2h	n	Zahl der ausplat. Zellen ( $\times 10^4$ )	Vitalität der ausplat. Zellen (%)	Zahl der adhärenten Zellen ( $\times 10^4$ )	Absetzrate (Adh.Zellen/ Leb.ausplat. Zellen)*100
Kontrolle	6	243 $\pm$ 15	81 $\pm$ 6	106 $\pm$ 3	56 $\pm$ 3
CeCl <sub>3</sub> 100 $\mu$ M	6	267 $\pm$ 27	77 $\pm$ 3	102 $\pm$ 3	50 $\pm$ 1 *
LaCl <sub>3</sub> 100 $\mu$ M	6	262 $\pm$ 29	78 $\pm$ 6	108 $\pm$ 2	54 $\pm$ 3
Quarz 100 $\mu$ g/ml	6	271 $\pm$ 14	81 $\pm$ 6	107 $\pm$ 2	49 $\pm$ 1 *
TiO <sub>2</sub> 100 $\mu$ g/ml	4	249 $\pm$ 13	85 $\pm$ 7	108 $\pm$ 4	51 $\pm$ 1
LaBaCuO <sub>3,5</sub> 100 $\mu$ g/ml	6	299 $\pm$ 9	77 $\pm$ 1	104 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1 *
Colchizin 1 $\mu$ g/ml	6	282 $\pm$ 12	80 $\pm$ 3	102 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1 *
Cyto- chalasin B 10 $\mu$ g/ml	6	300 $\pm$ 6	78 $\pm$ 1	116 $\pm$ 1	51 $\pm$ 1 *

Tab.4a: Einfluß einer 2 -ständigen Vorinkubation mit verschiedenen Inkubationsmedien auf die Adhäsionsfähigkeit von Rinderalveolarmakrophagen auf Kunststoffoberflächen.

Mittelwerte mit Standardfehler.

n: Zahl der ausgewerteten Proben.

\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle. ( $2p < 0.05$ )





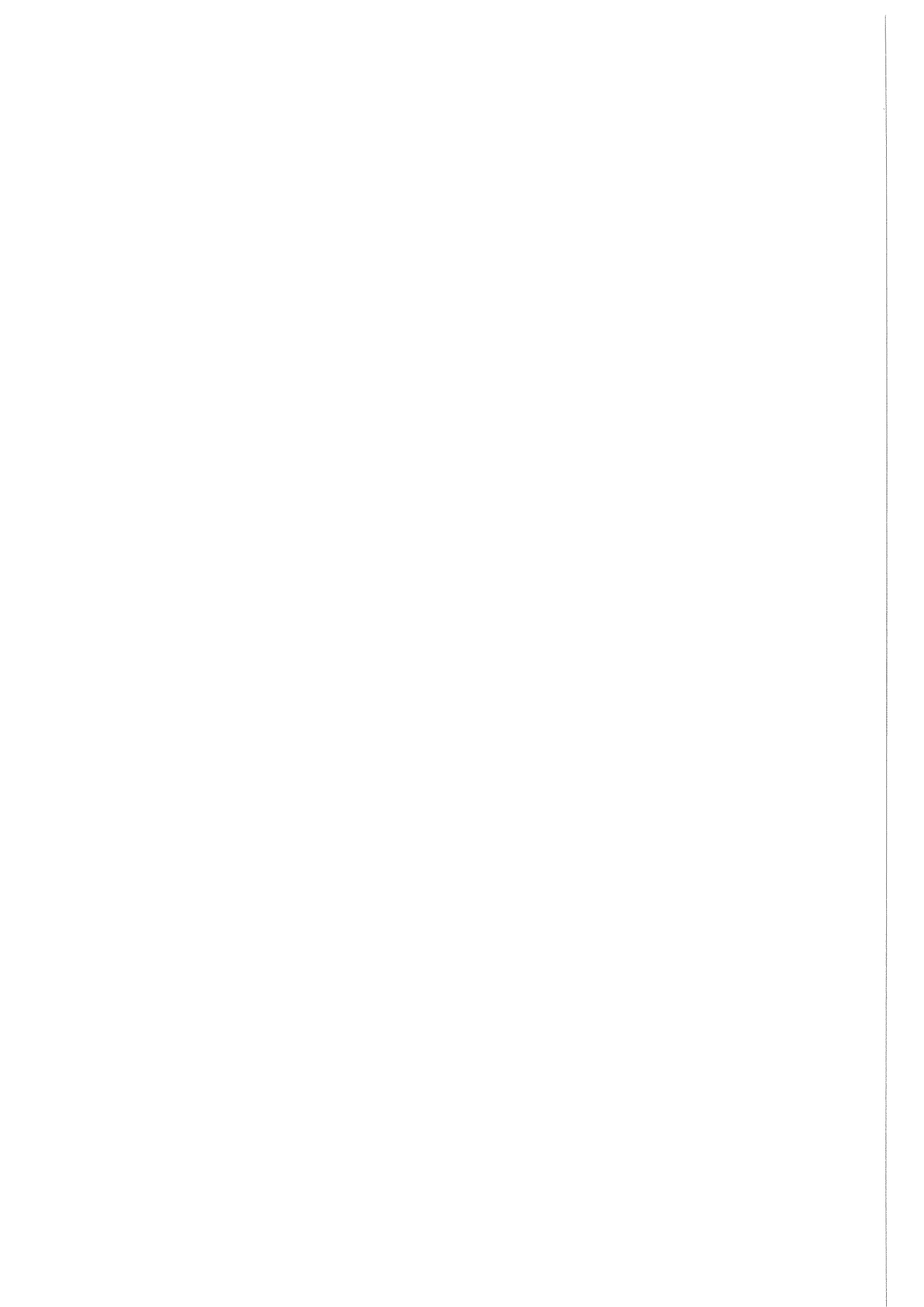
4h	n	Zahl der ausplat. Zellen (x10 <sup>4</sup> )	Vitalität der ausplat. Zellen (%)	Zahl der adhärenten Zellen (x10 <sup>4</sup> )	Absetzrate (Adh.Zellen/ Leb.ausplat. Zellen)*100
Kontrolle	6	271 ± 34	77 ± 2	94 ± 3	46 ± 1
CeCl <sub>3</sub> 100 µM	6	275 ± 62	81 ± 1	88 ± 3	41 ± 3 *
LaCl <sub>3</sub> 100 µM	6	281 ± 46	76 ± 2	87 ± 4	41 ± 2 *
Quarz 100 µg/ml	6	259 ± 57	77 ± 4	90 ± 4	46 ± 2
TiO <sub>2</sub> 100 µg/ml	4	242 ± 31	80 ± 8	92 ± 1	48 ± 1
LaBaCuO <sub>3,5</sub> 100 µg/ml	4	346 ± 39	78 ± 4	93 ± 2	35 ± 1 *
Colchizin 1 µg/ml	6	301 ± 43	75 ± 3	87 ± 1	39 ± 1 *
Cyto- chalasin B 10 µg/ml	6	329 ± 36	75 ± 5	113 ± 1	46 ± 1

Tab.4b: Einfluß einer 4 -stündigen Vorinkubation mit verschiedenen Inkubationsmedien auf die Adhäsionsfähigkeit von Rinderalveolarmakrophagen auf Kunststoffoberflächen.

Mittelwerte mit Standardfehler.

n: Zahl der ausgewerteten Proben.

\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle. (2p < 0.05)



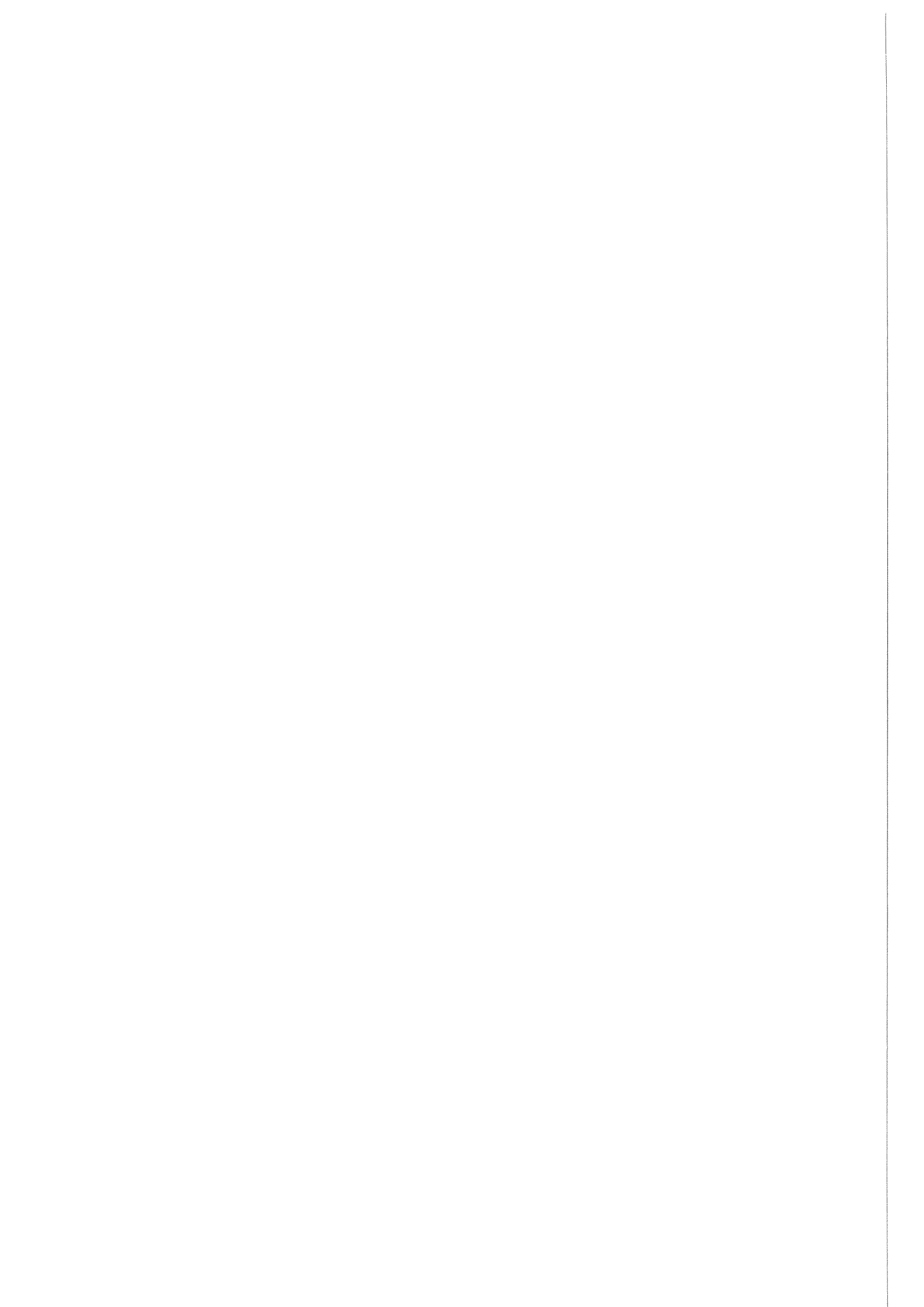
20h	n	Zahl der ausplat. Zellen ( $\times 10^4$ )	Vitalität der ausplat. Zellen (%)	Zahl der adhärenten Zellen ( $\times 10^4$ )	Absetzrate (Adh.Zellen/ Leb.ausplat. Zellen)*100
Kontrolle	6	290 $\pm$ 15	86 $\pm$ 2	111 $\pm$ 8	44 $\pm$ 3
CeCl <sub>3</sub> 100 $\mu$ M	6	274 $\pm$ 17	83 $\pm$ 3	95 $\pm$ 2	42 $\pm$ 1
LaCl <sub>3</sub> 100 $\mu$ M	6	216 $\pm$ 25	77 $\pm$ 9	98 $\pm$ 1	59 $\pm$ 1 *
Quarz 100 $\mu$ g/ml	4	232 $\pm$ 24	82 $\pm$ 8	122 $\pm$ 1	64 $\pm$ 1 *
TiO <sub>2</sub> 100 $\mu$ g/ml	6	328 $\pm$ 26	58 $\pm$ 5	94 $\pm$ 4	48 $\pm$ 2
LaBaCuO <sub>3,5</sub> 100 $\mu$ g/ml	3	212 $\pm$ 11	36 $\pm$ 5	25 $\pm$ 1	33 $\pm$ 2 *

Tab.4c: Einfluß einer 20 -stündigen Vorinkubation mit verschiedenen Inkubationsmedien auf die Adhäsionsfähigkeit von Rinderalveolarmakrophagen auf Kunststoffoberflächen.

Mittelwerte mit Standardfehler.

n: Zahl der ausgewerteten Proben.

\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle. ( $2p < 0.05$ )



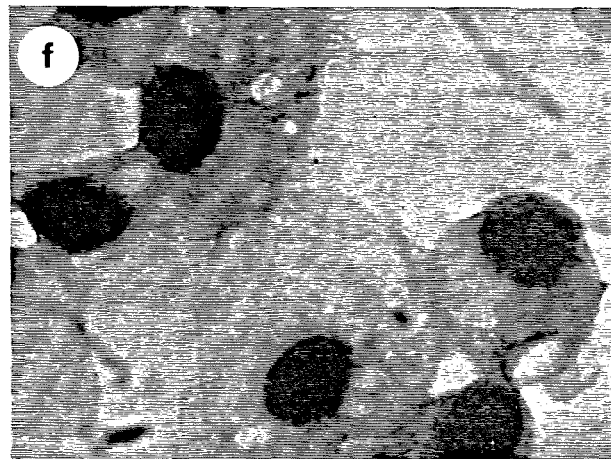
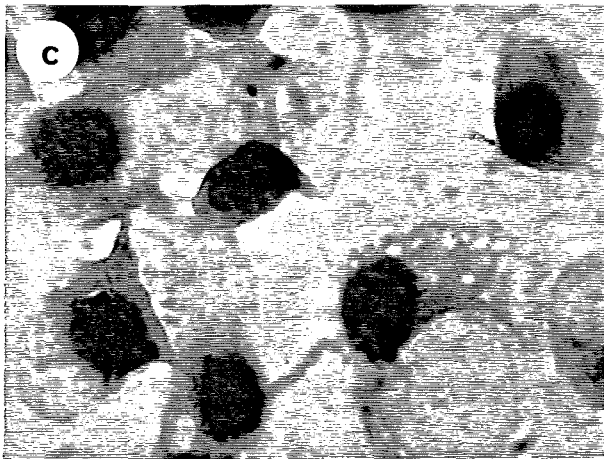
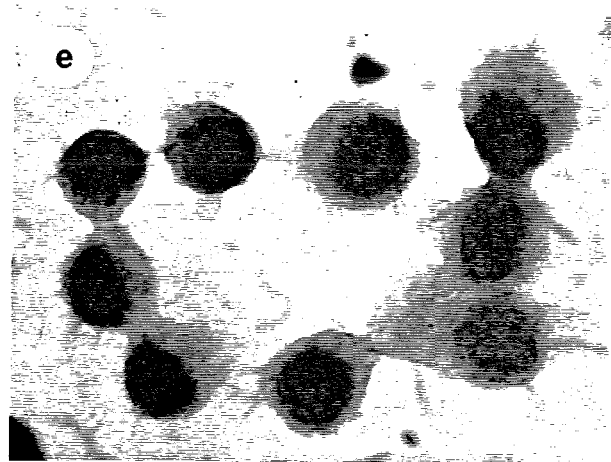
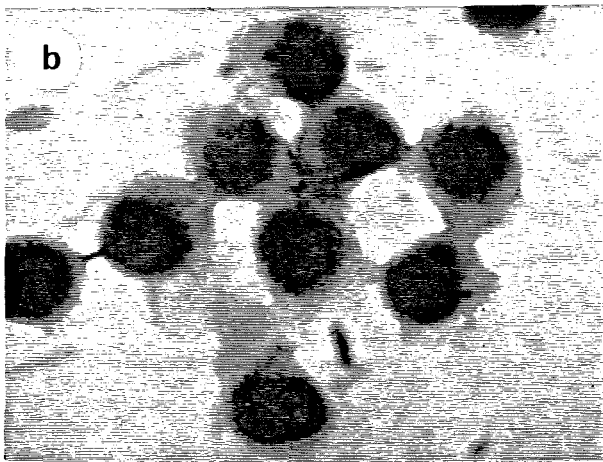
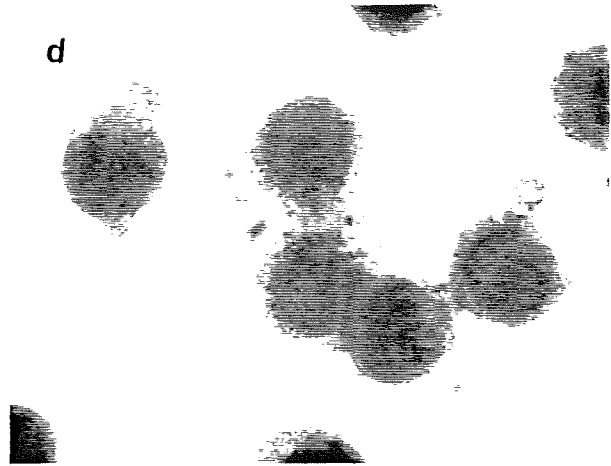
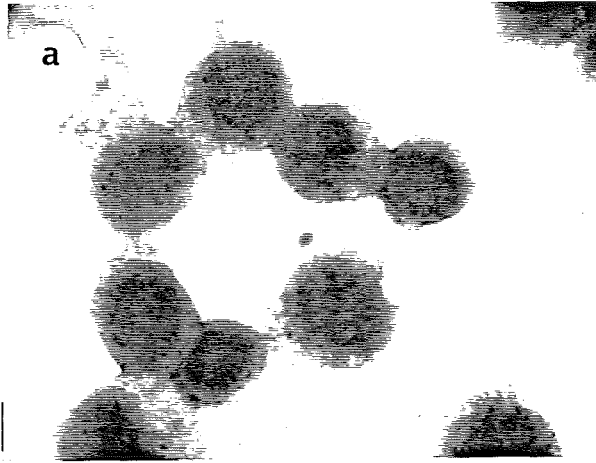


Abb. 1: Rinderalveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation in:

a) Medium (Kontrollzellen)

b) 10 µM CeCl<sub>3</sub>

c) 100 µM CeCl<sub>3</sub>

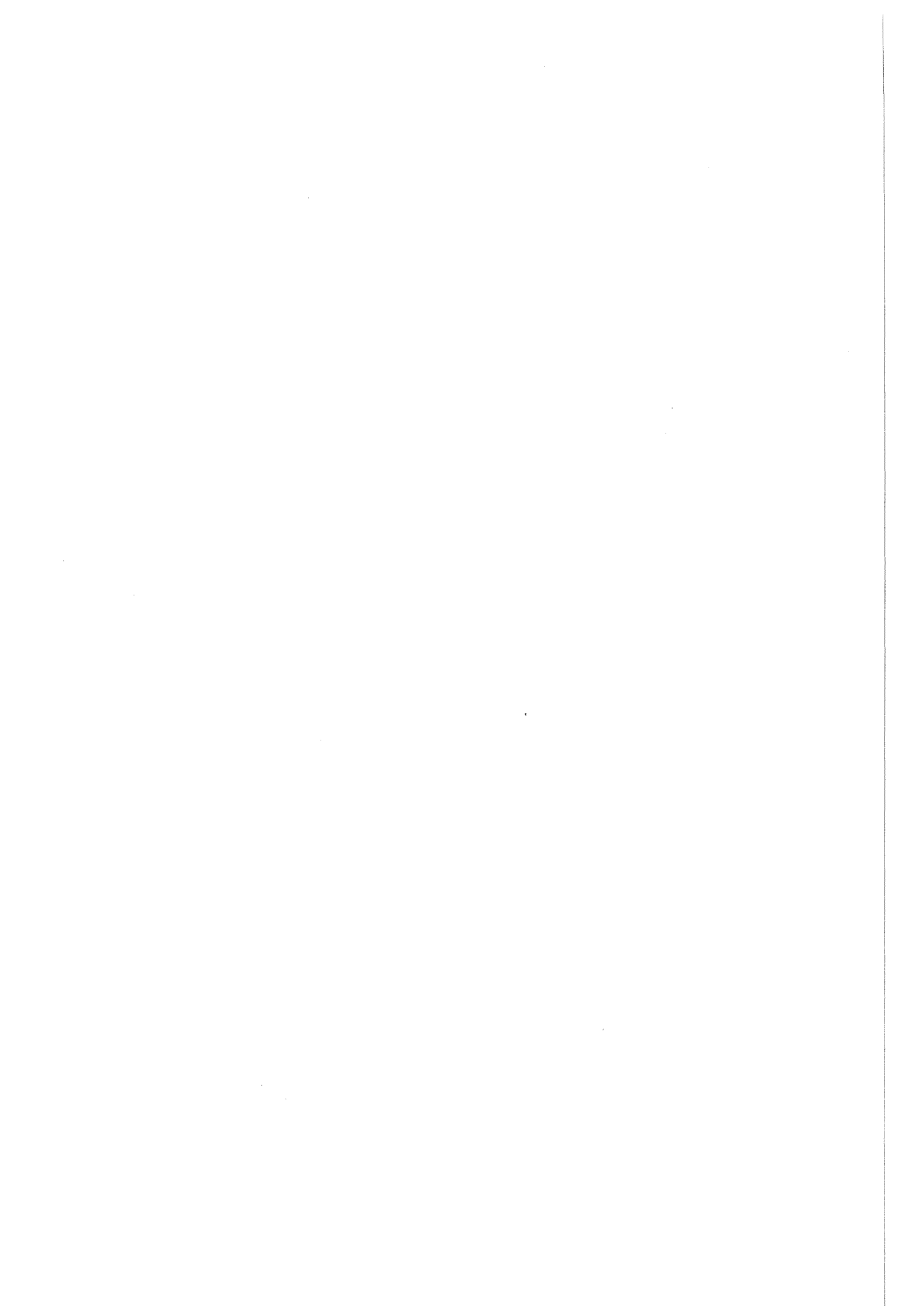
d) Medium (Kontrollzellen)

e) 10 µM LaCl<sub>3</sub>

f) 100 µM LaCl<sub>3</sub>

Hämacyto-Schnellfärbung

Vergrößerung: 1600x



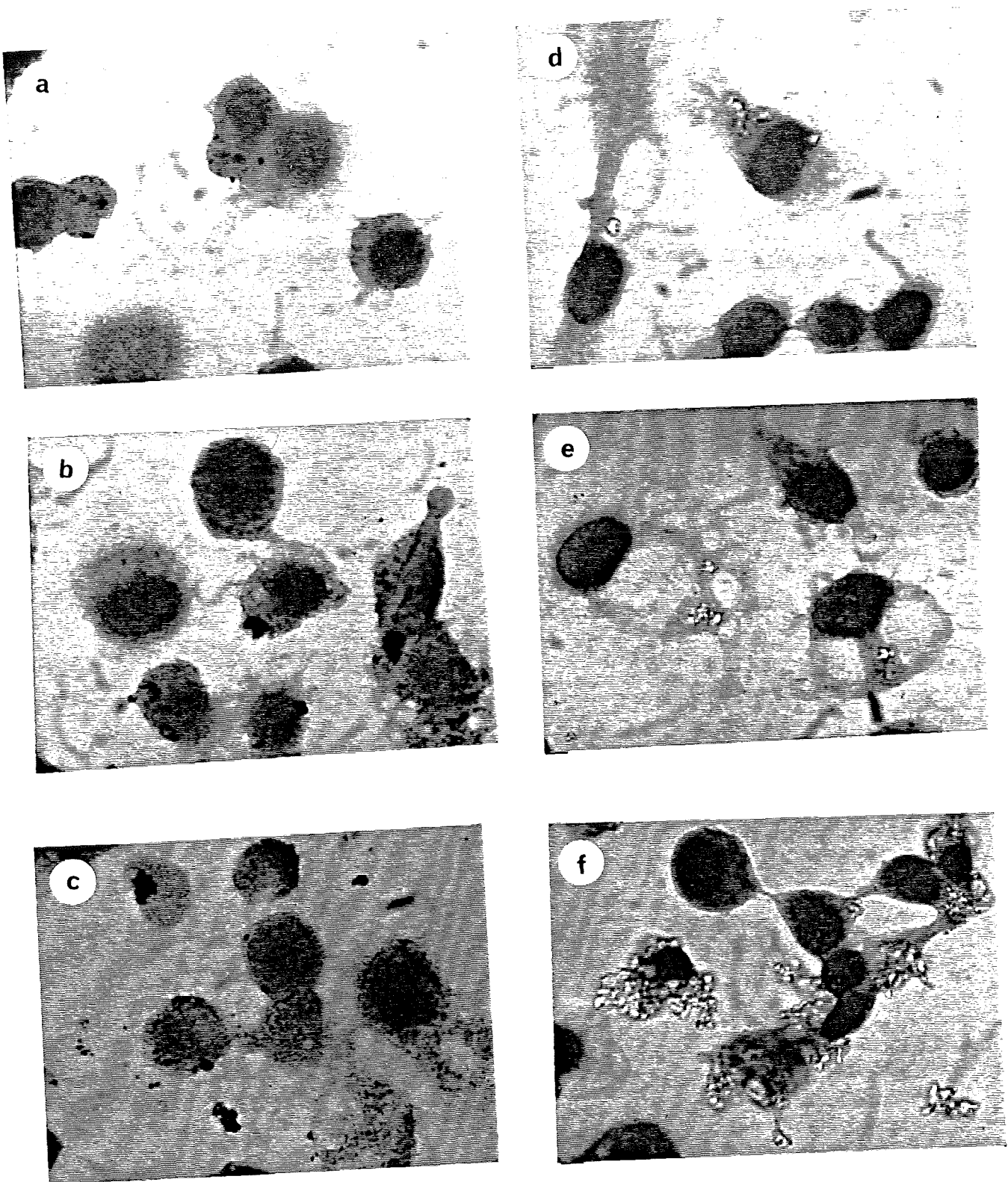


Abb. 2: Rinderalveolarmakrophagen nach 20 -stündiger Inkubation mit:

- a)  $10 \mu\text{g/ml LaBaCuO}_{3,5}$
- b)  $50 \mu\text{g/ml LaBaCuO}_{3,5}$
- c)  $100 \mu\text{g/ml LaBaCuO}_{3,5}$

- d)  $10 \mu\text{g/ml La}_2\text{O}_3$
- e)  $25 \mu\text{g/ml La}_2\text{O}_3$
- f)  $100 \mu\text{g/ml La}_2\text{O}_3$

Hämacolor-Schnellfärbung  
Vergrößerung: 1600x

**Abb. 3:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen nach 20 -ständiger Inkubation in Medium (Kontrollzellen).

- a) Vergrößerung: 2020x
- b) Vergrößerung: 5000x
- c) Vergrößerung: 5000x



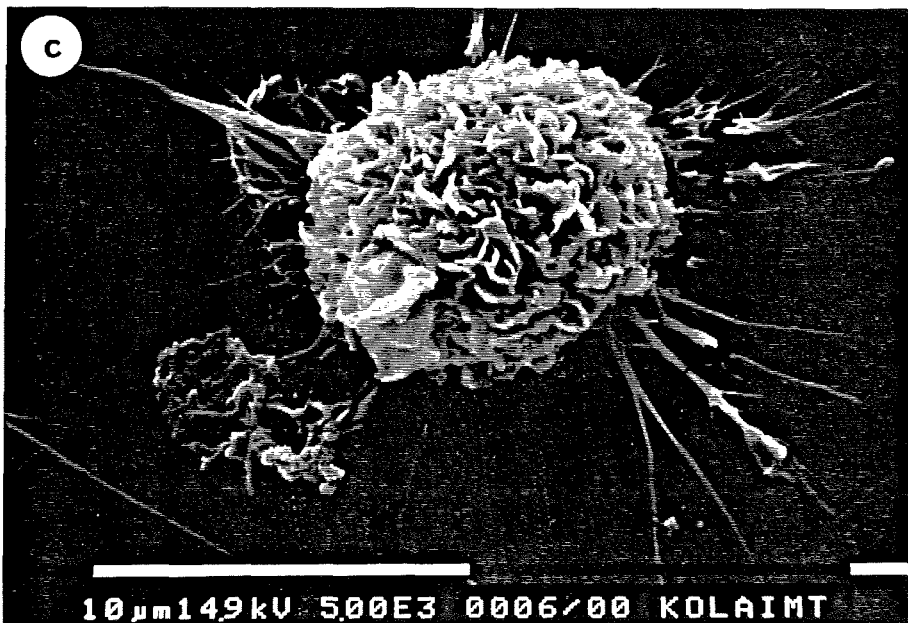
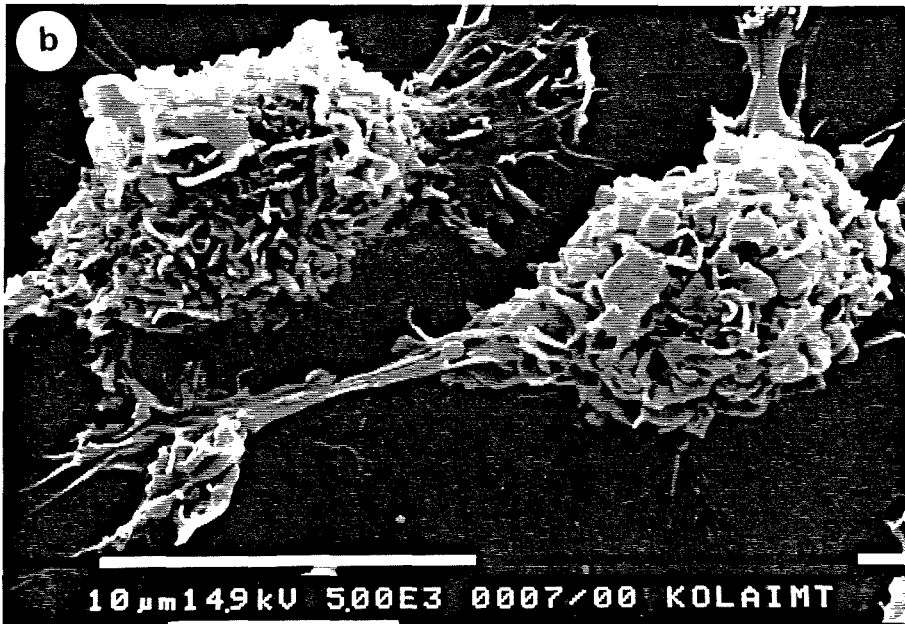
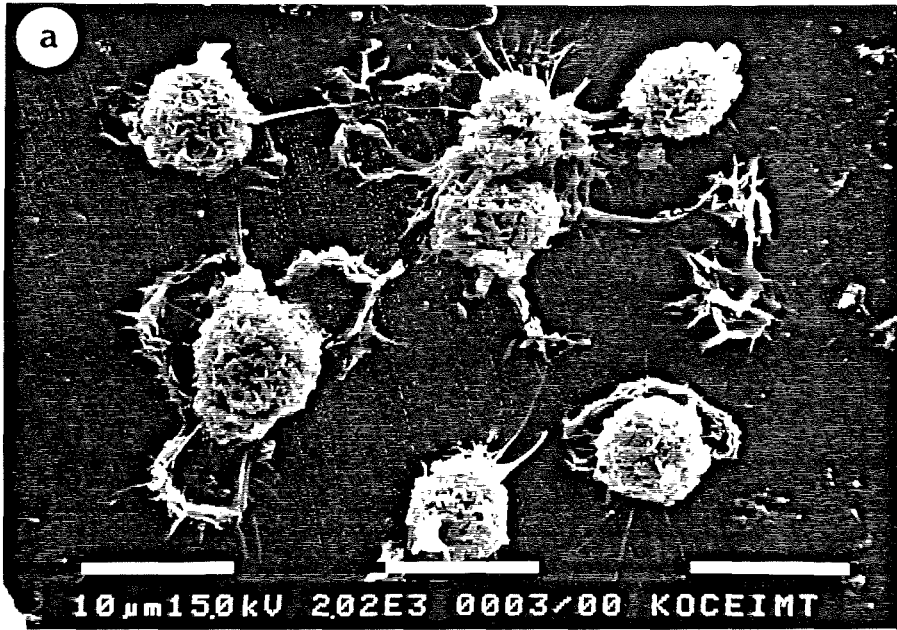


Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen nach 20 -stündiger Inkubation in  $100 \mu\text{M}$   $\text{CeCl}_3$ .

- a) Vergrößerung: 2020x
- b) Vergrößerung: 5000x
- c) Vergrößerung: 5000x

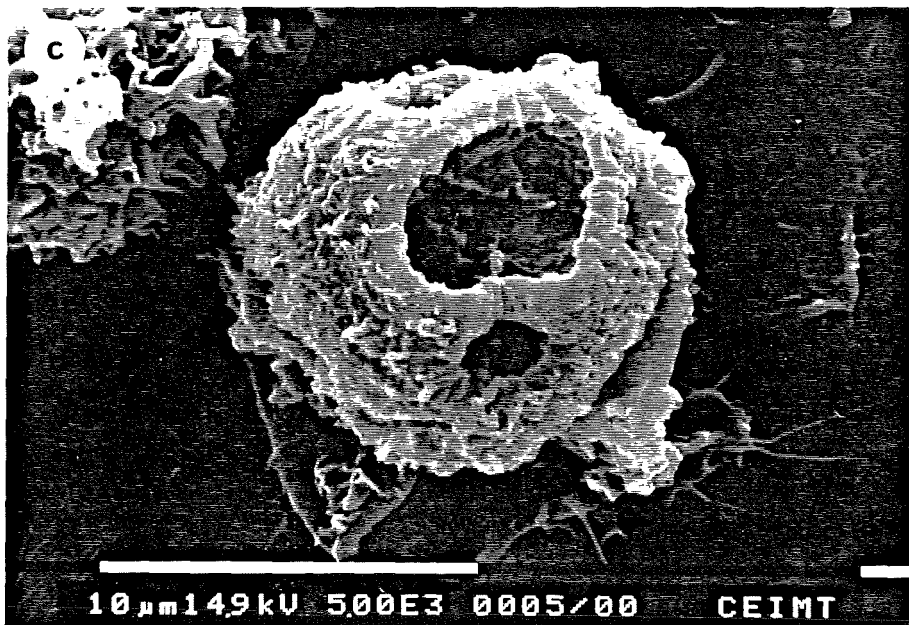
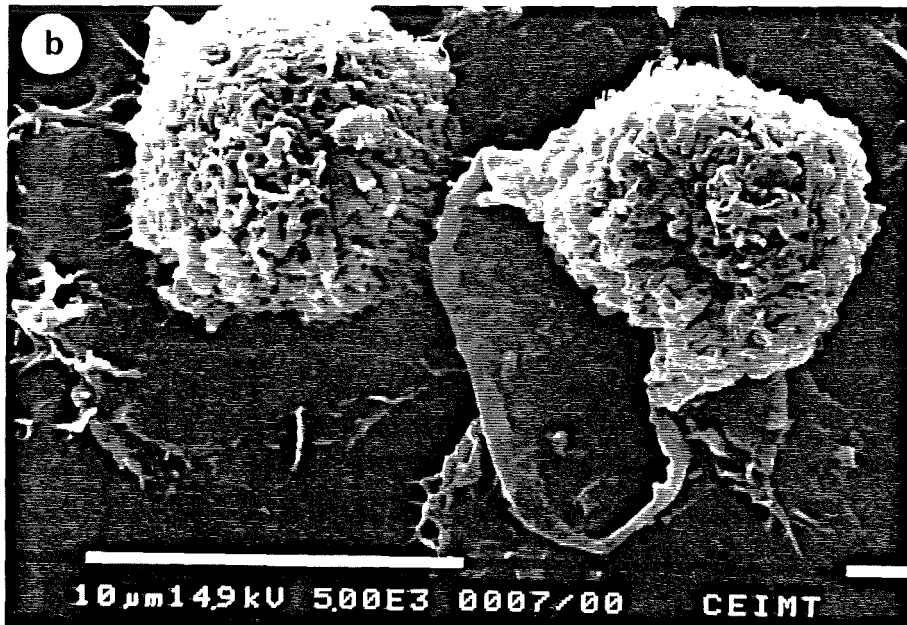
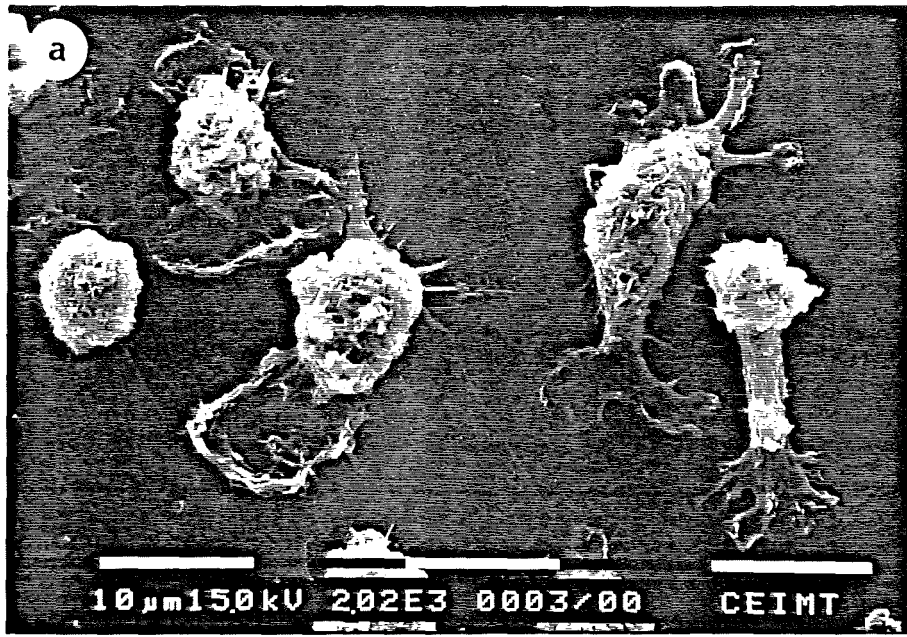


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen nach 20 -ständiger Inkubation in  $100 \mu\text{M LaCl}_3$

- a) Vergrößerung: 2020x
- b) Vergrößerung: 5000x
- c) Vergrößerung: 5000x

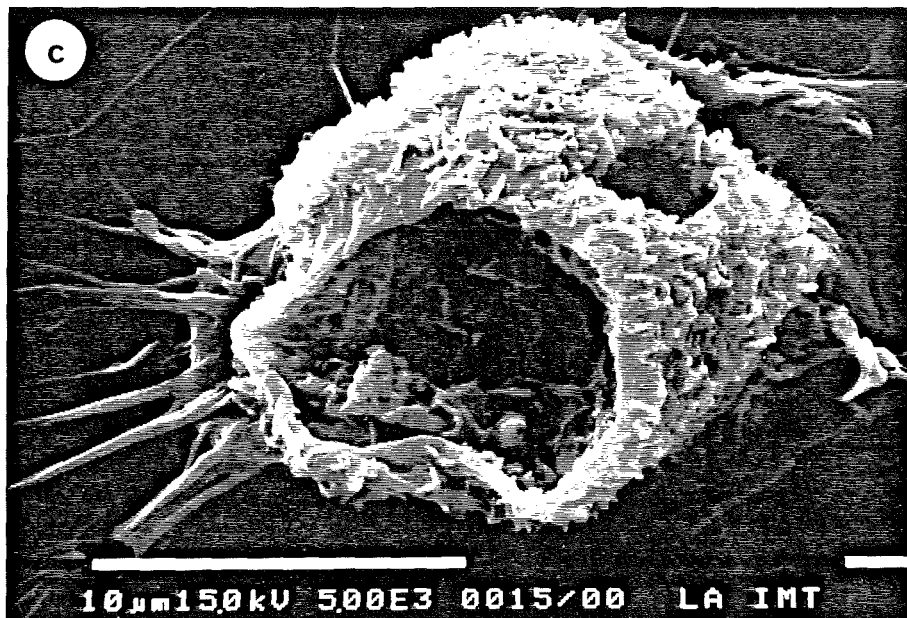
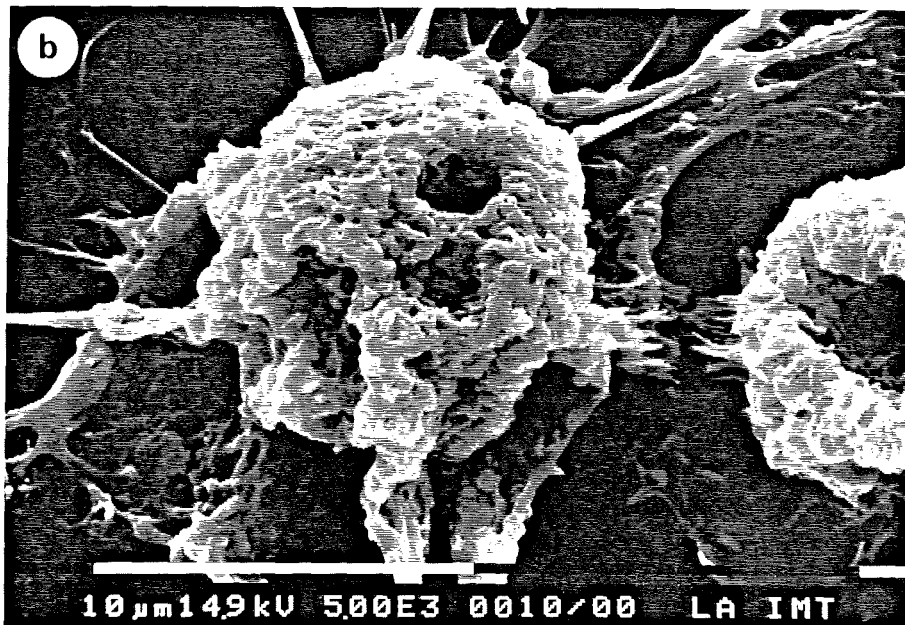
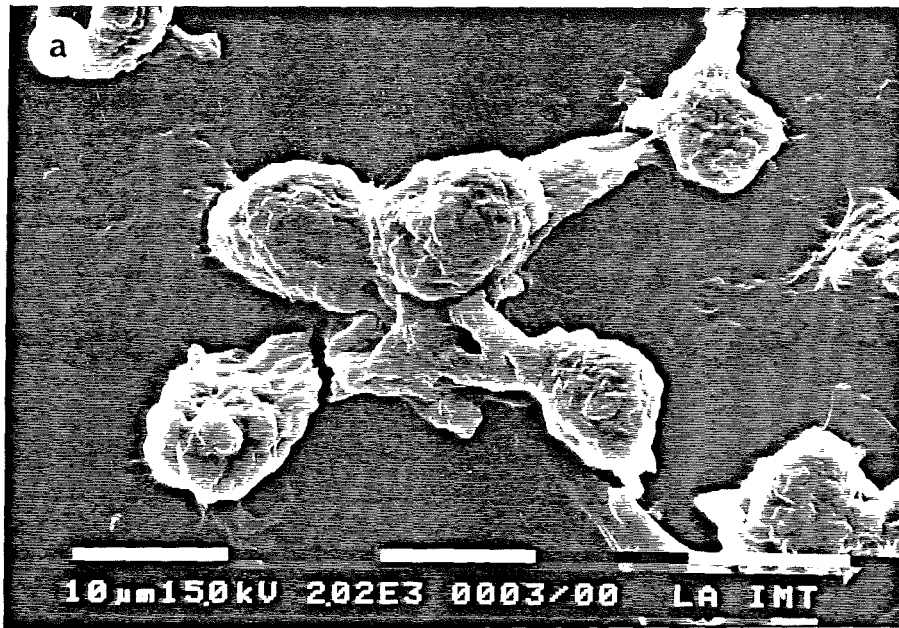


Abb. 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen nach 20 -stündiger Inkubation mit 250  $\mu$ g/ml Quarz

- a) Vergrößerung: 2100x
- b) Vergrößerung: 5000x
- c) Vergrößerung: 5000x

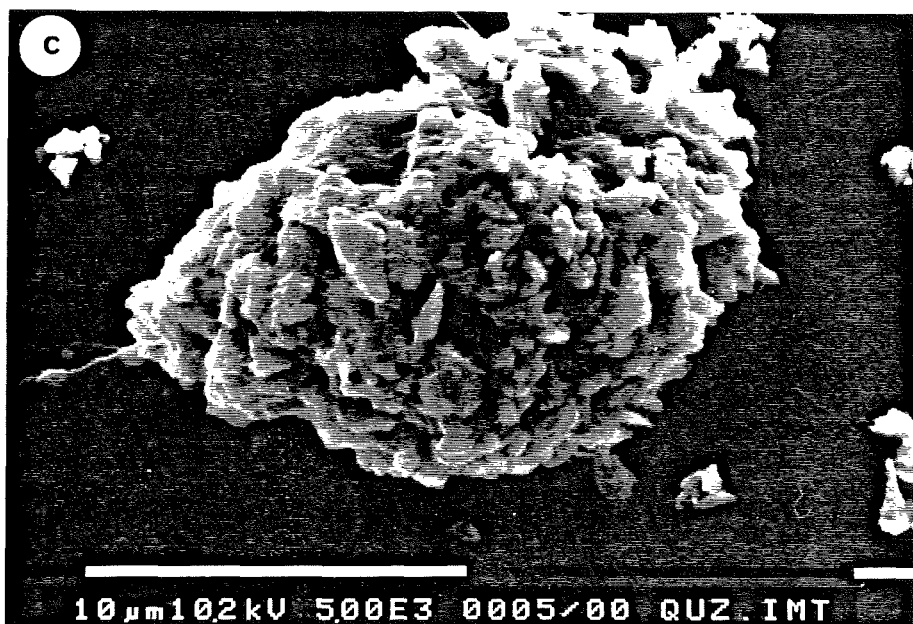
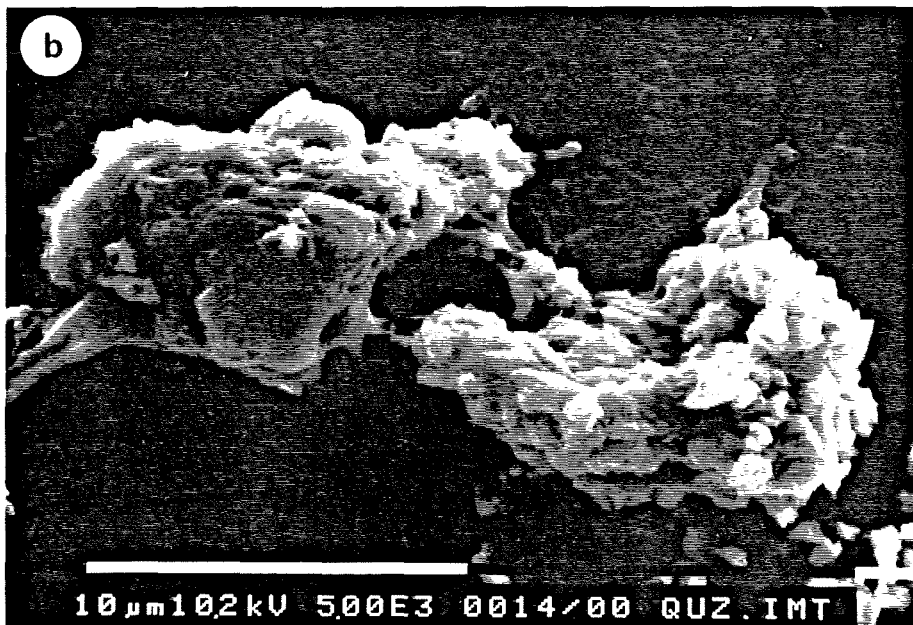
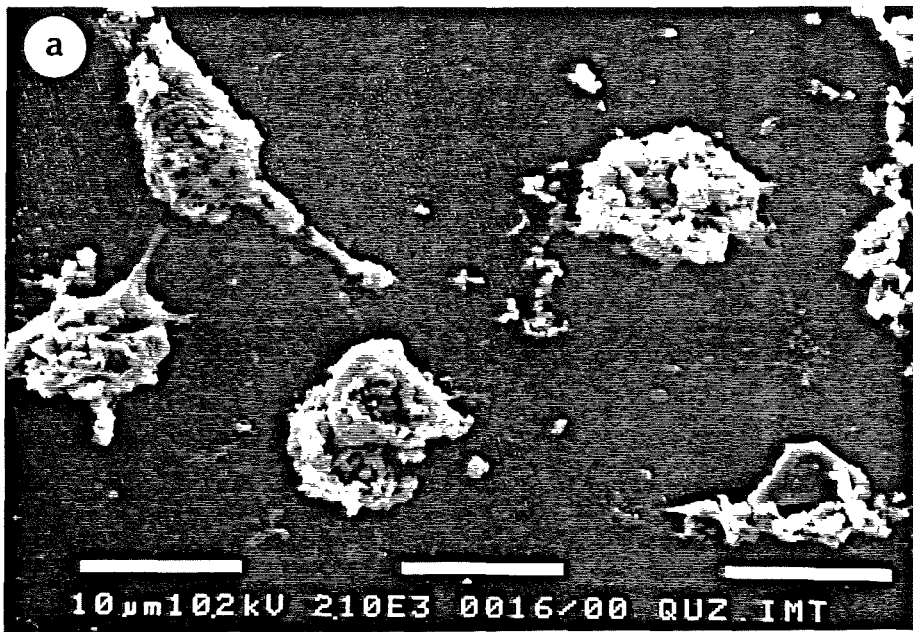
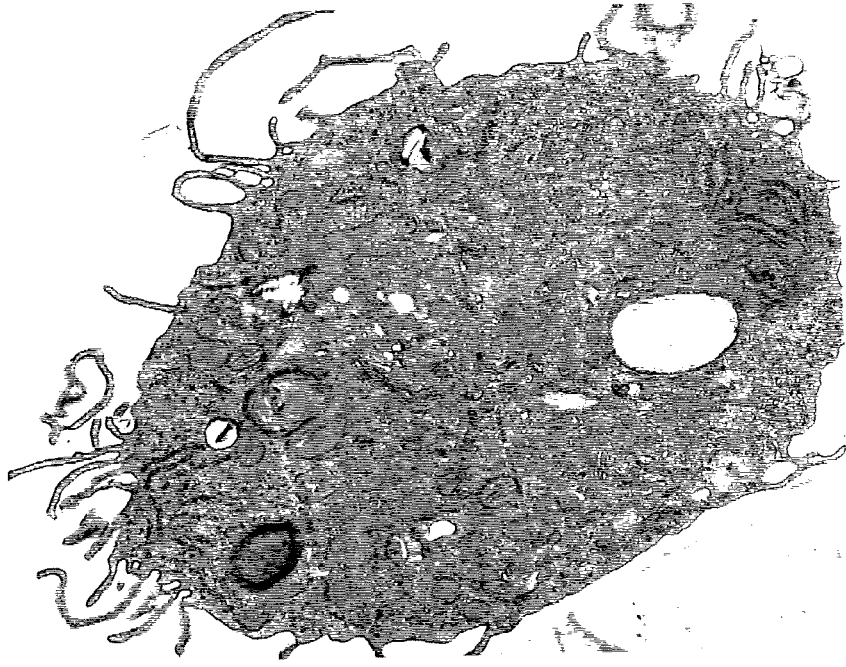


Abb. 7: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in Medium (Kontrollzellen).

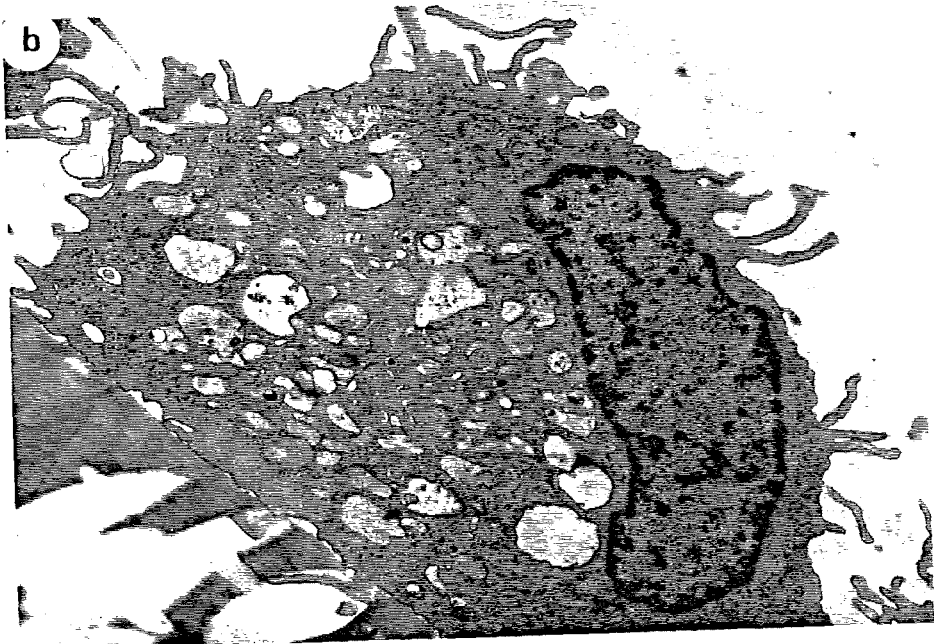
- a) 2 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 9700x
- b) 4 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 7000x
- c) 20 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 7800x



a



b



c

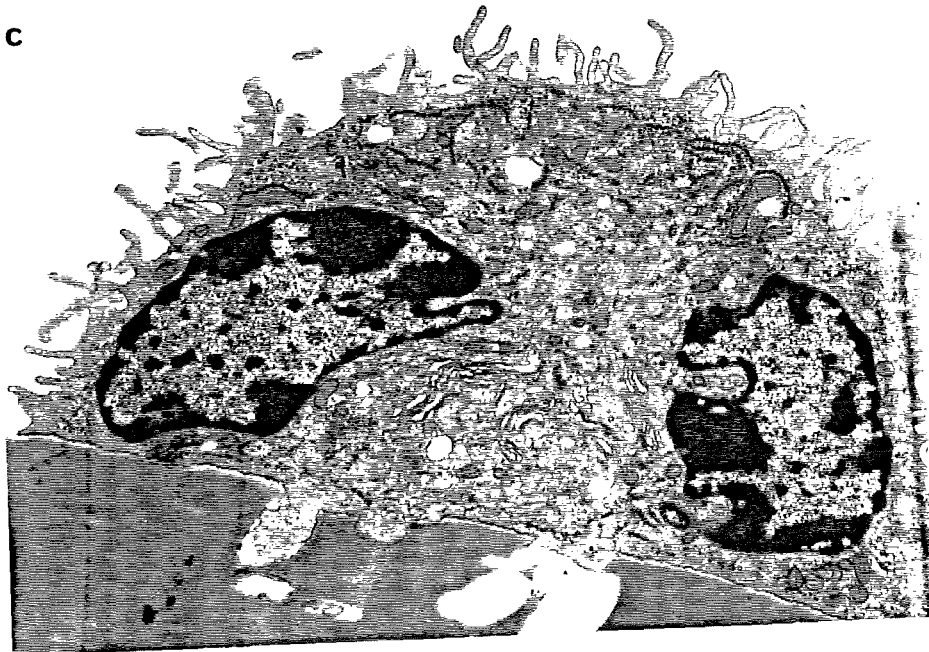
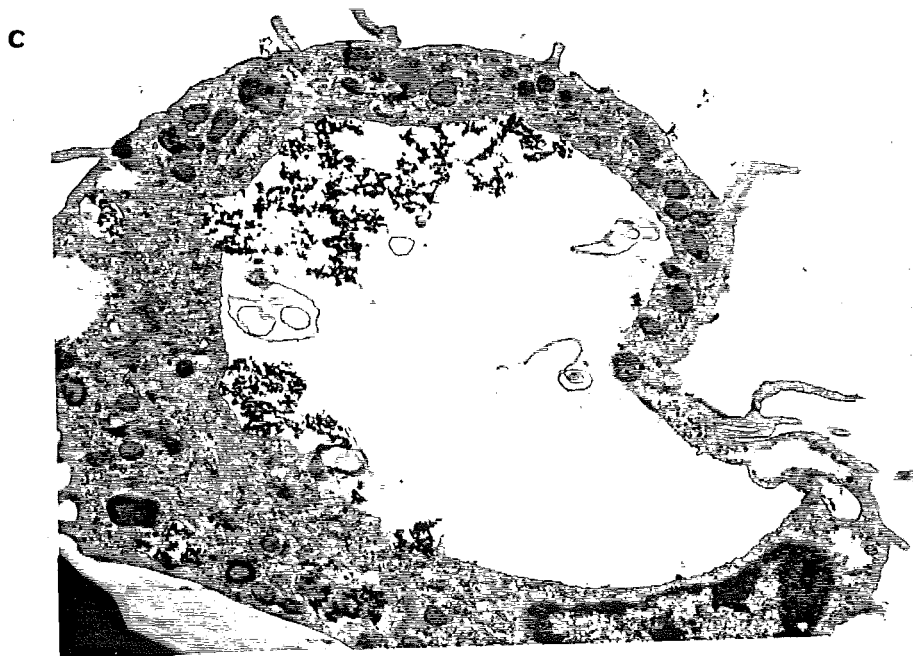
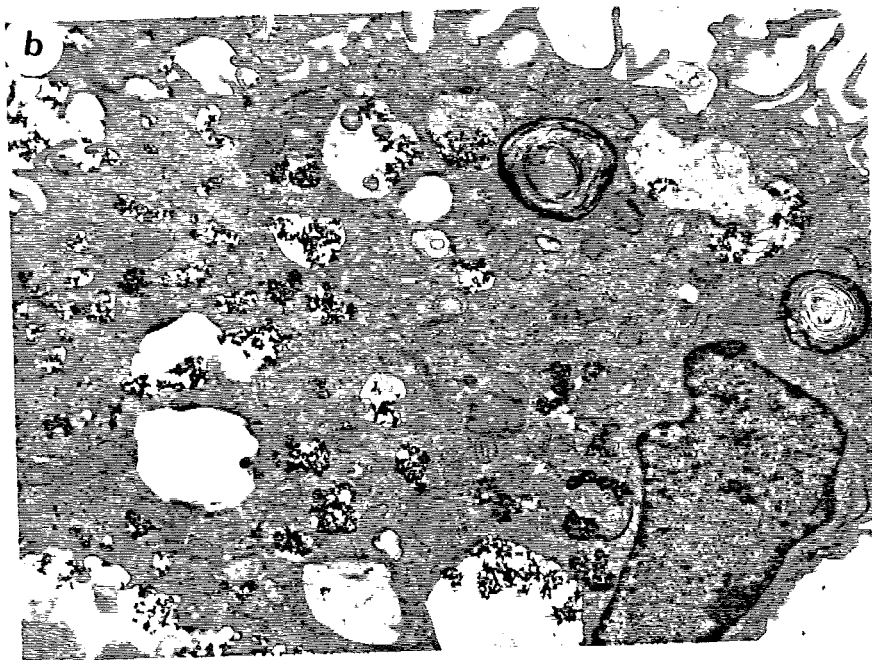
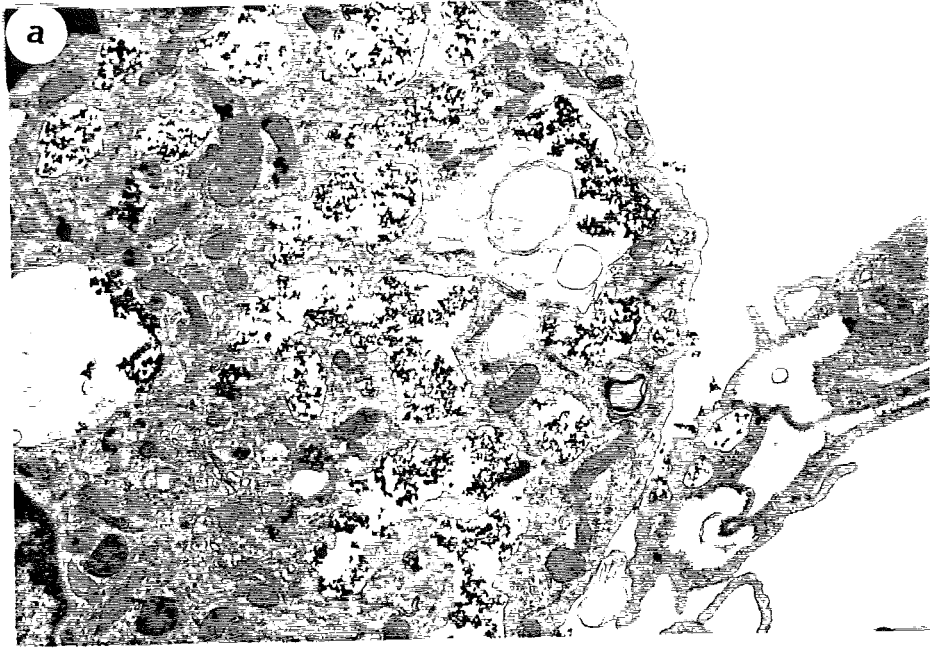


Abb. 8: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in  $100 \mu\text{M CeCl}_3$ .

- a) 2 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 9000x
- b) 4 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 6500x
- c) 20 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 8900x





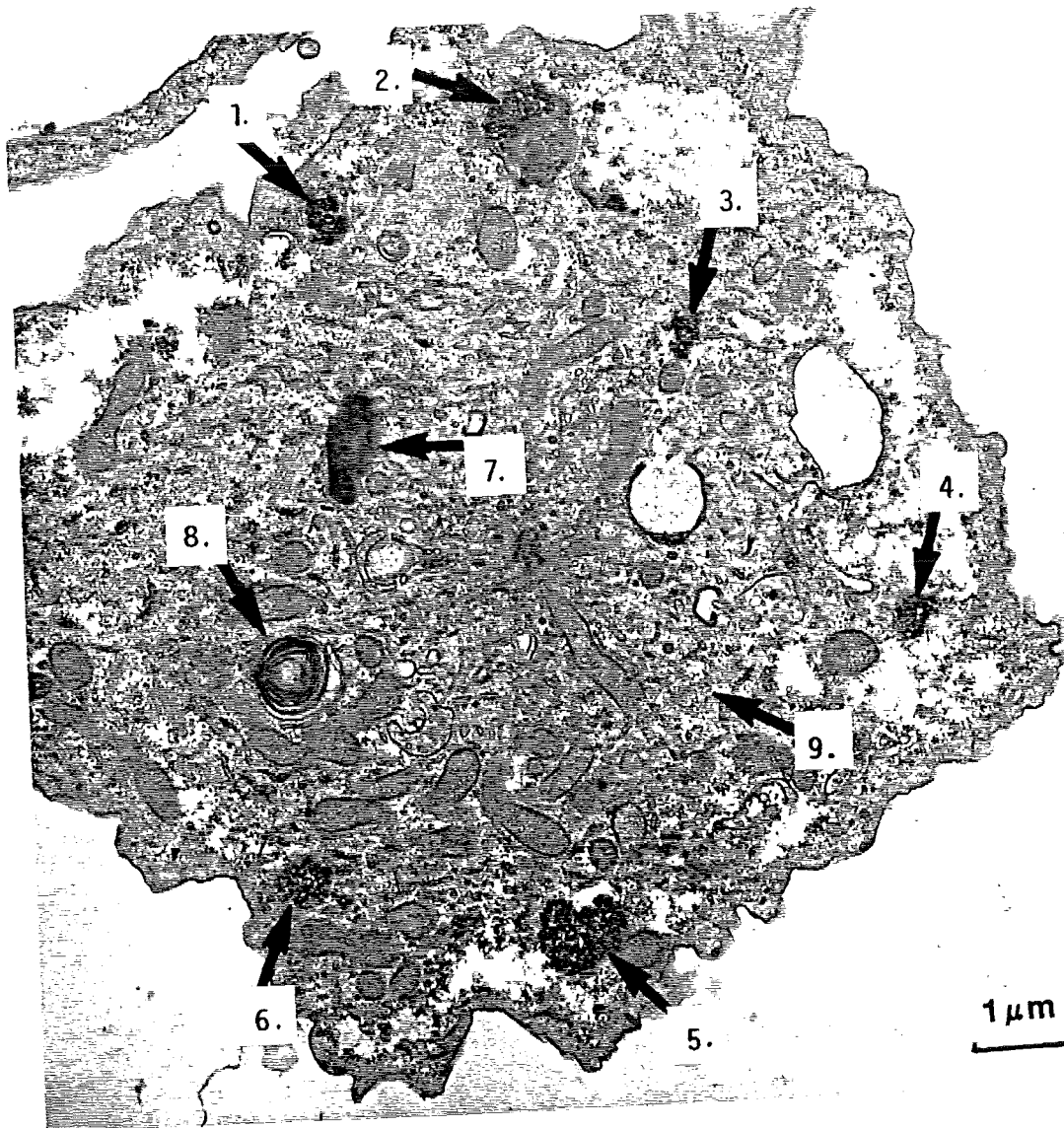


Abb.9a: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Rinderalveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation in  $100 \mu\text{M CeCl}_3$ . Die nummerierten Pfeile (1 - 9) entsprechen den Meßpunkten der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse. Siehe Spektren Abb.9b.



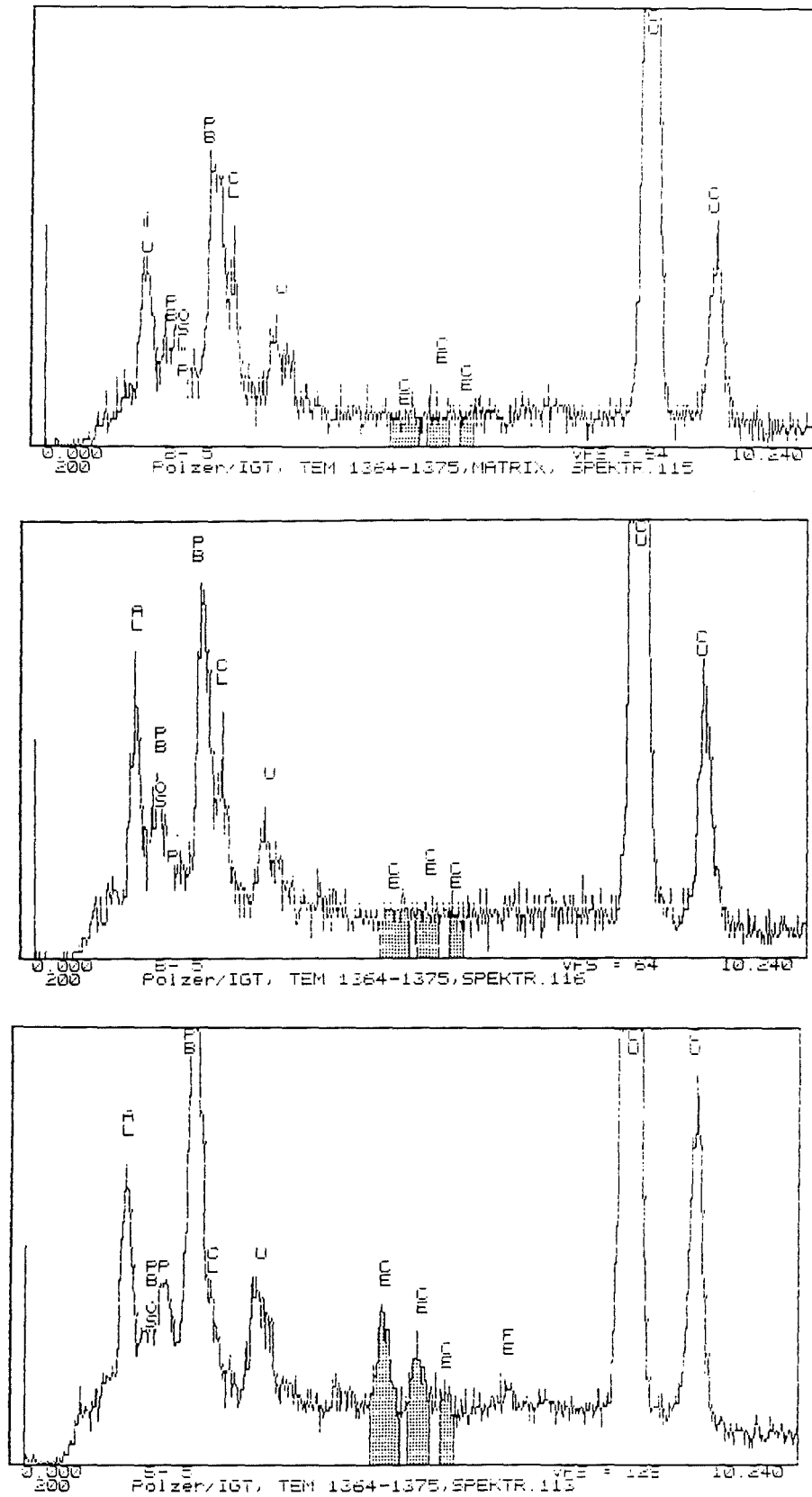


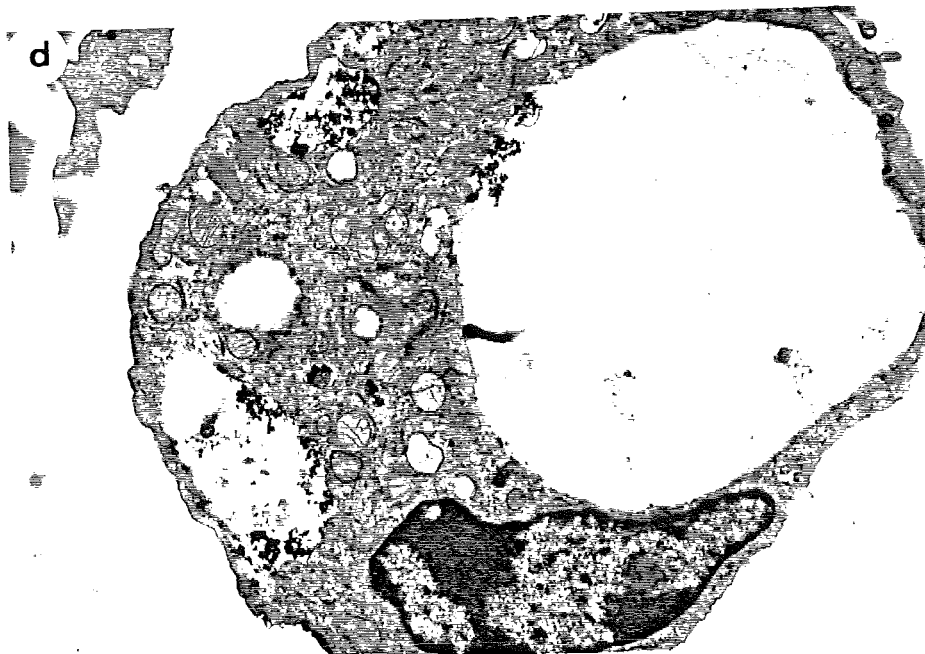
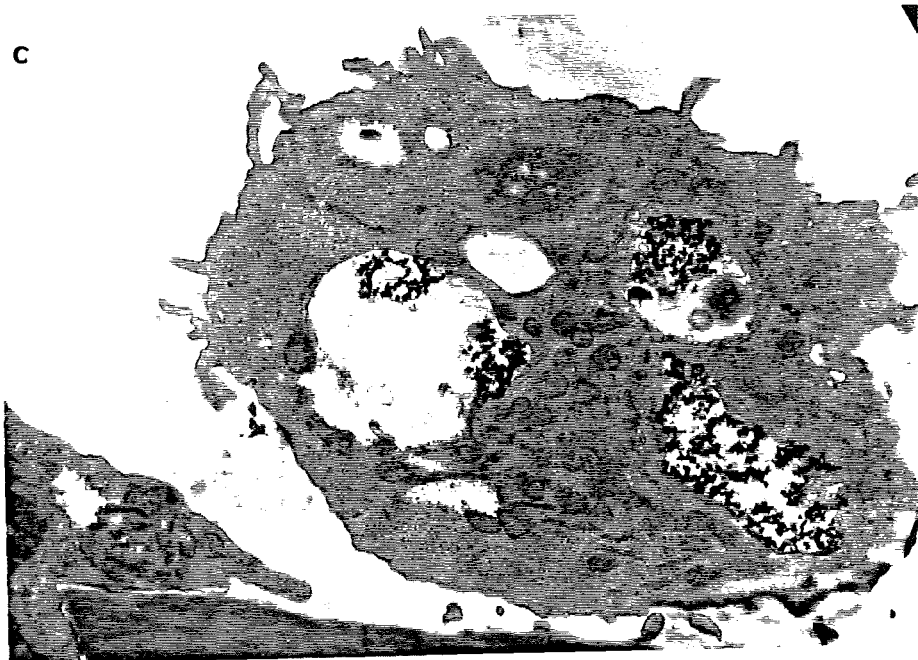
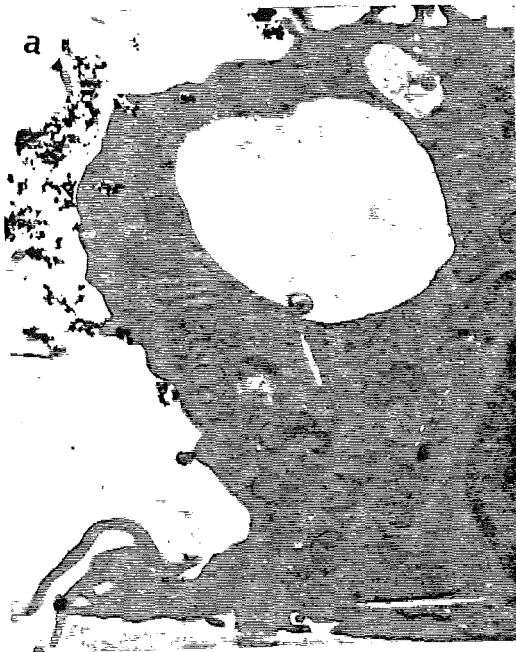
Abb.9b: Energiedispersive Röntgenspektren aus dem Präparat in Abb.9a.

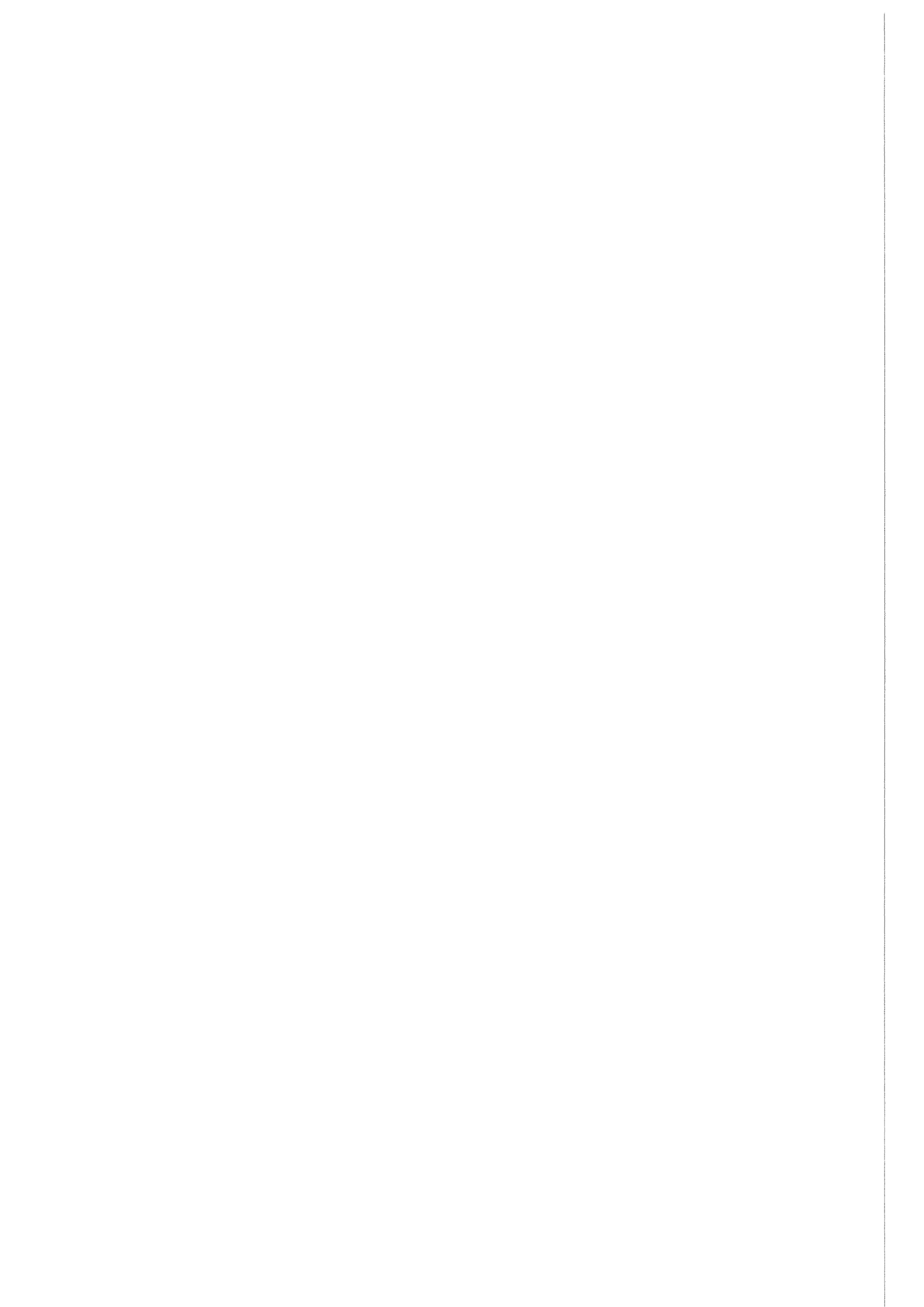
- a) Cerhaltige Einschlüsse ; Meßpunkt Nr.: 1 - 6
- b) Lamelläre und elektronendichte Struktur ; Meßpunkt Nr.: 7 + 8
- c) Cytoplasma der Zelle (Matrix) ; Meßpunkt Nr.: 9

Abb.10: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in  $100 \mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ .

- a) 2 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 8800x
- b) 2 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 9700x
- c) 4 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 10100x
- d) 20 -stündige Inkubation. Vergrößerung: 6600x







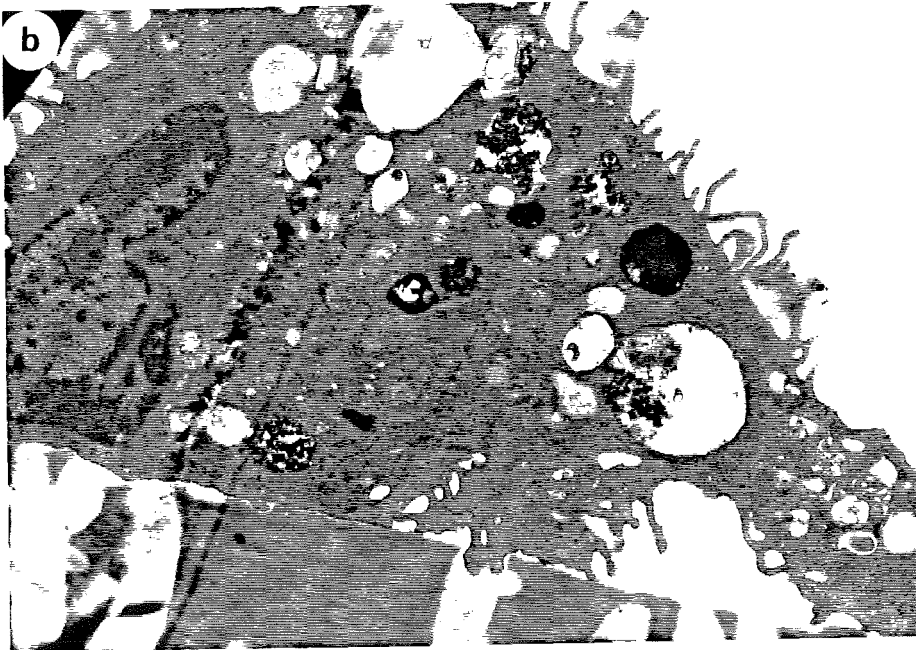
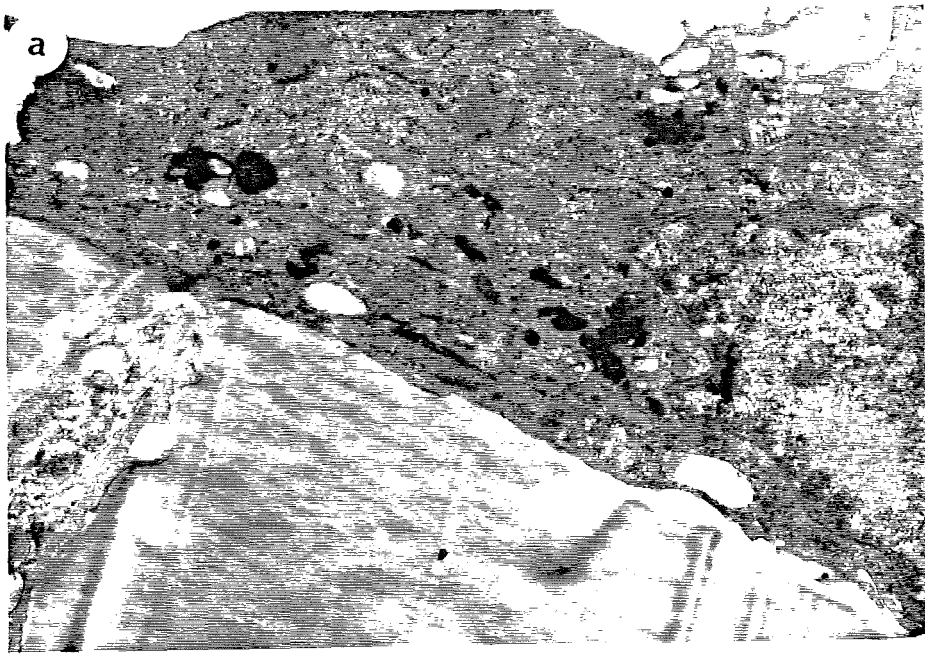


Abb.11: Ultrastrukturelle Lokalisation der Sauren Phosphatase in Rinderalveolarmakrophagen nach 20 - stündiger Inkubation in:

- a) Medium (Kontrollzellen). Vergrößerung: 10000x
- b) 100  $\mu$  M  $\text{LaCl}_3$ . Vergrößerung: 6500x

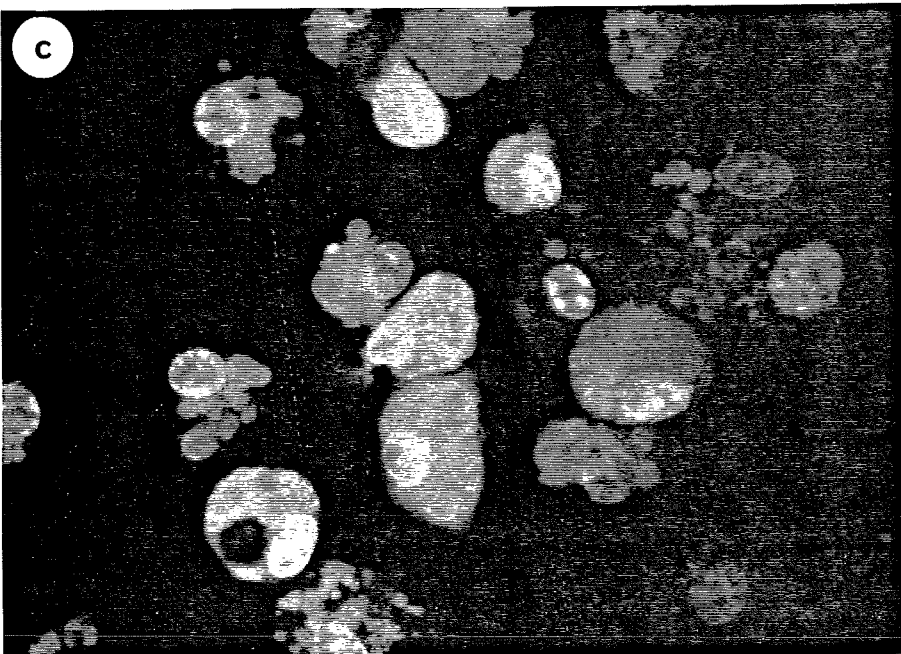
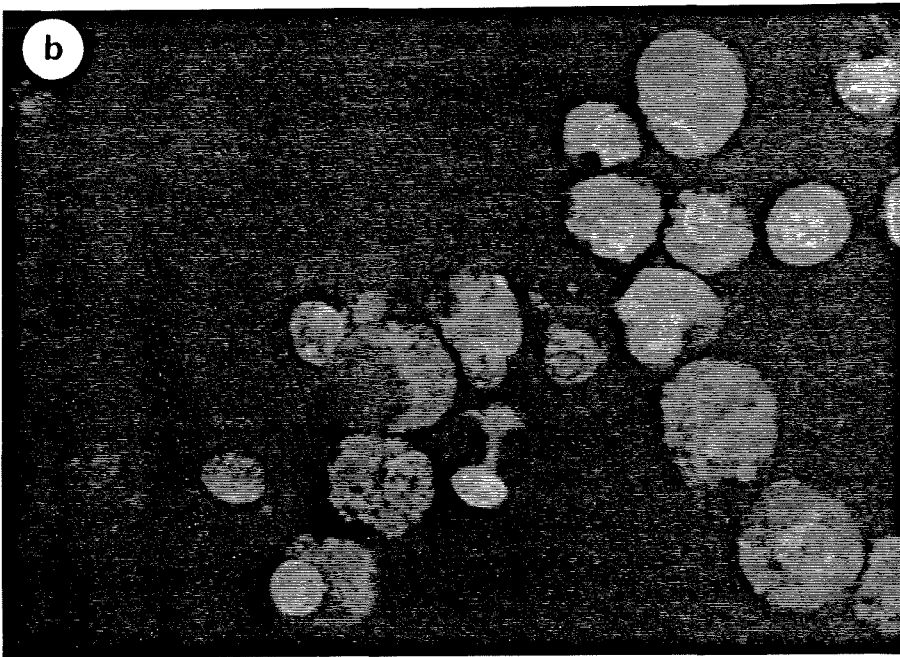
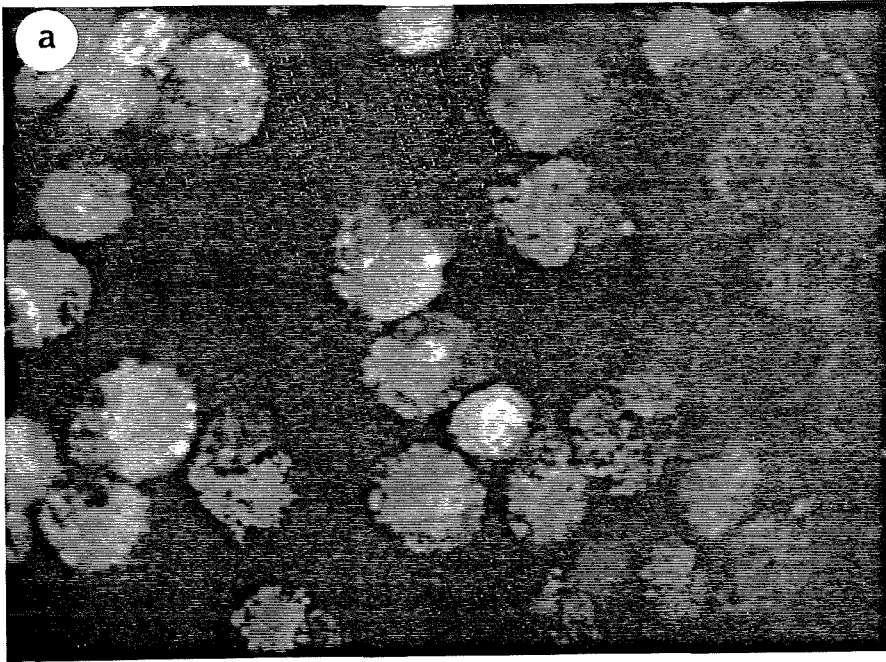
Abb.12: Acridin Orange Färbung von Rinderalveolarmakrophagen nach 20 -ständiger Inkubation in:

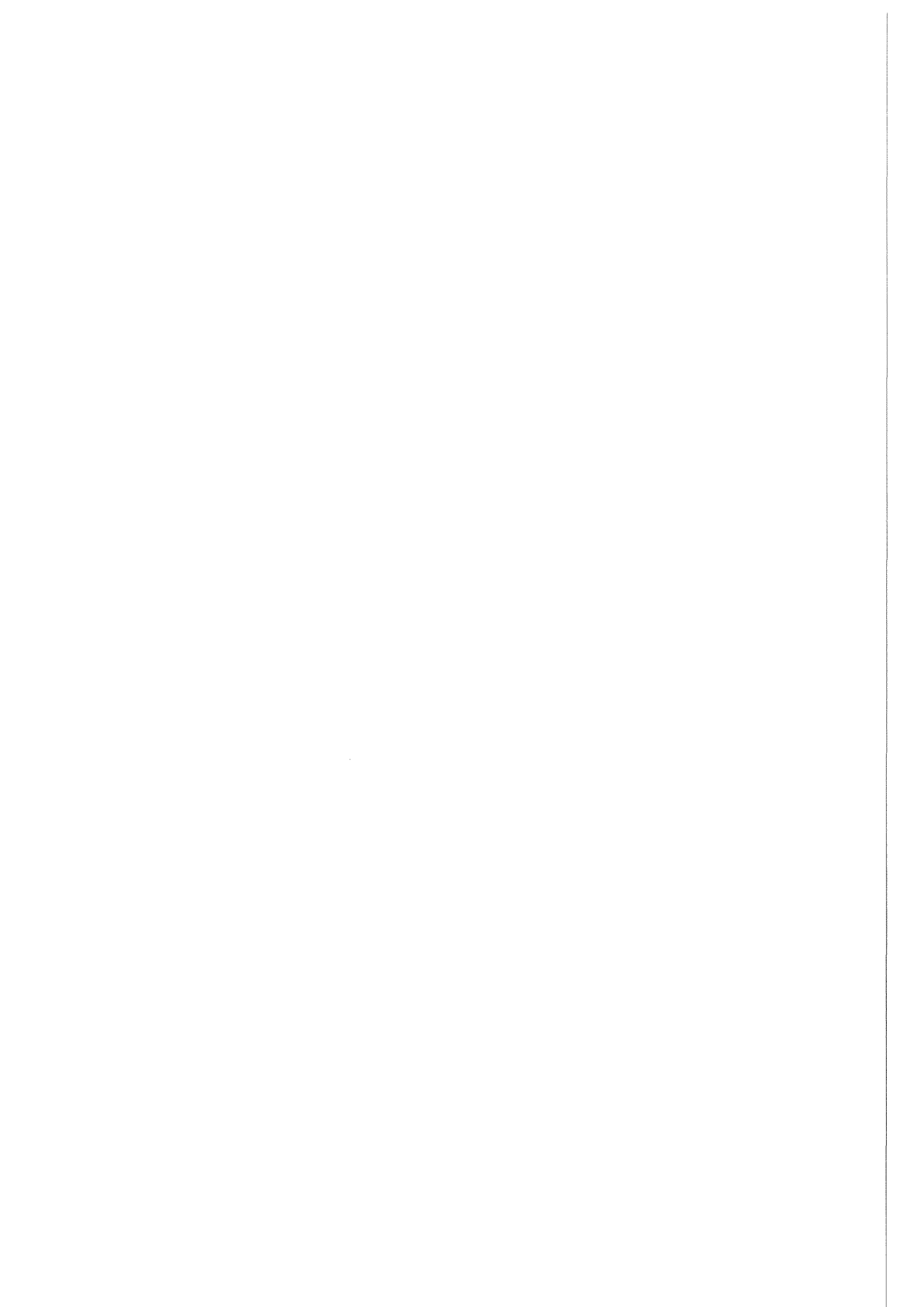
a) Medium (Kontrollzellen)

b) 100  $\mu$  M CeCl<sub>3</sub>

c) 100  $\mu$  M LaCl<sub>3</sub>

Vergrößerung: 1000x





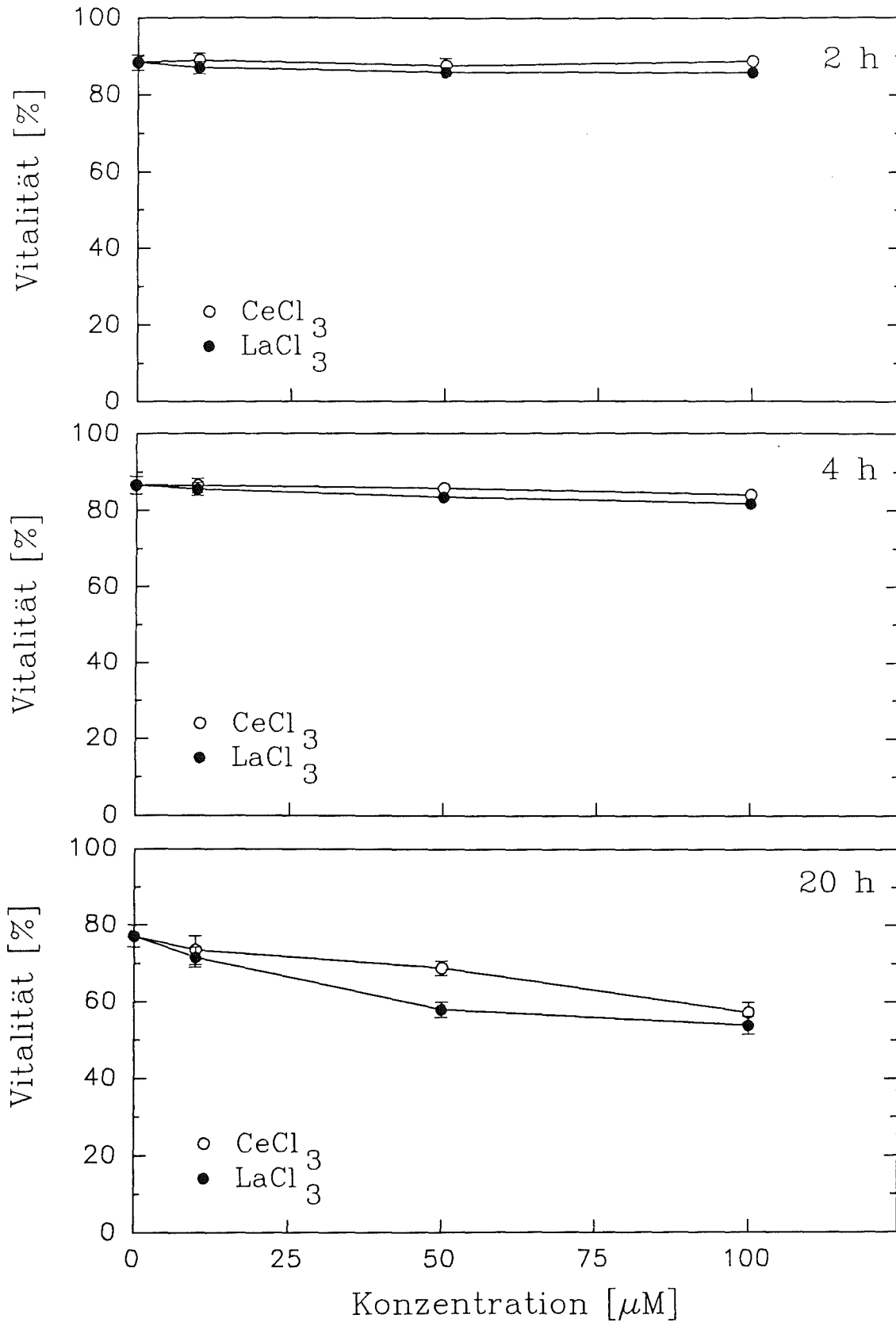
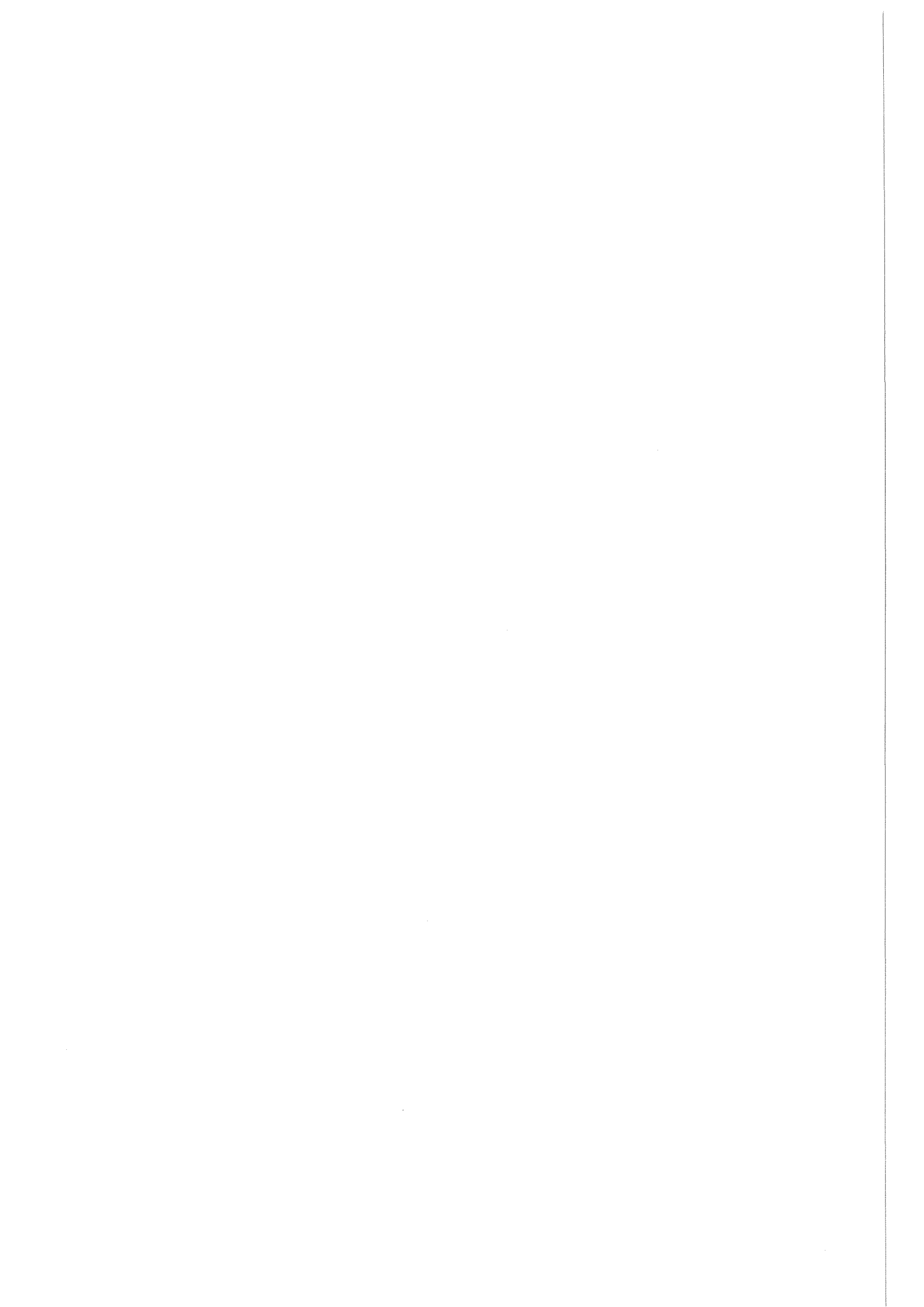


Abb.13: Einfluß verschiedener  $\text{CeCl}_3$  und  $\text{LaCl}_3$  -Konzentrationen auf die Vitalität von Rinderalveolarmakrophagen nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler.  $n = 6$





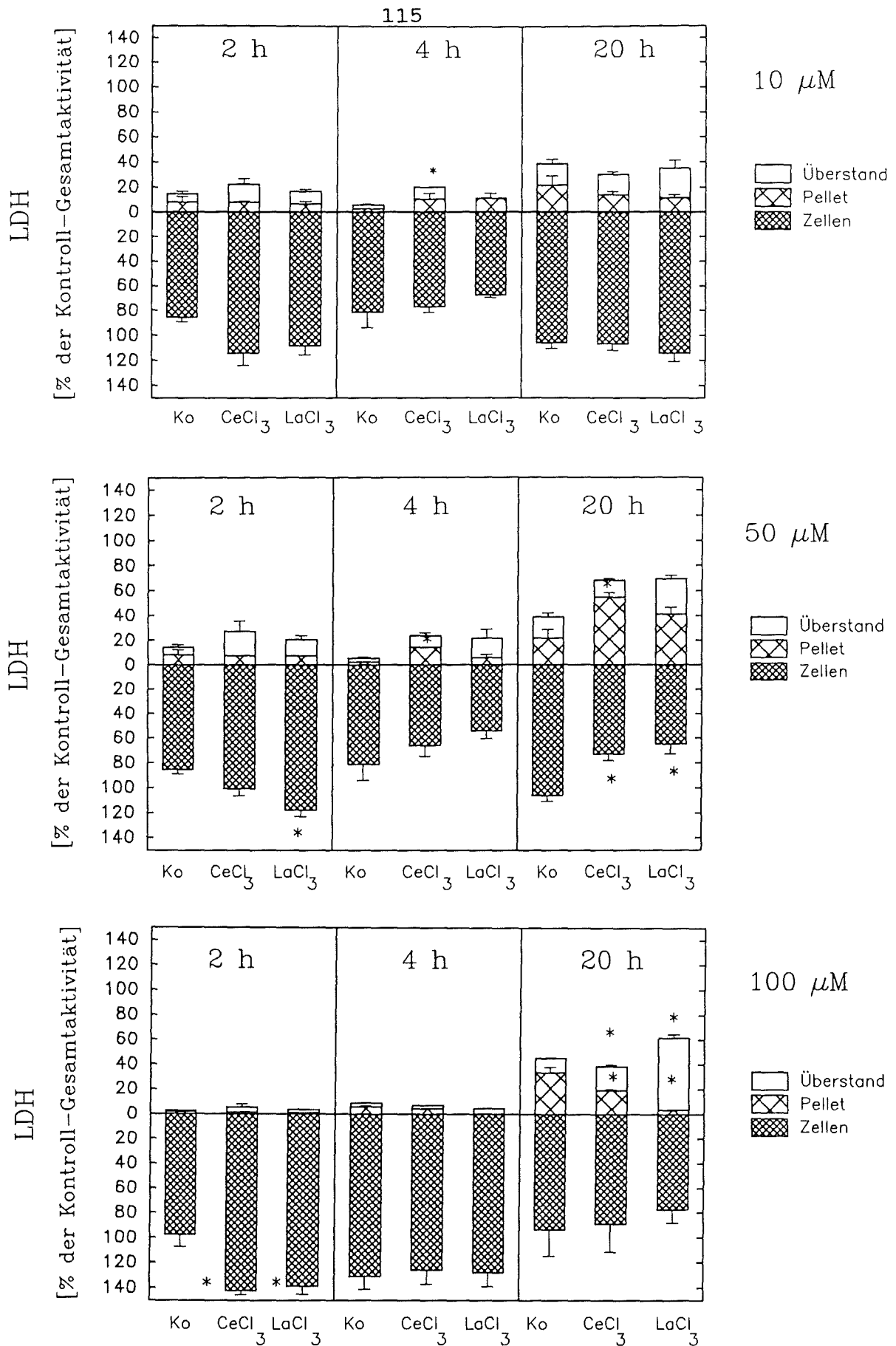
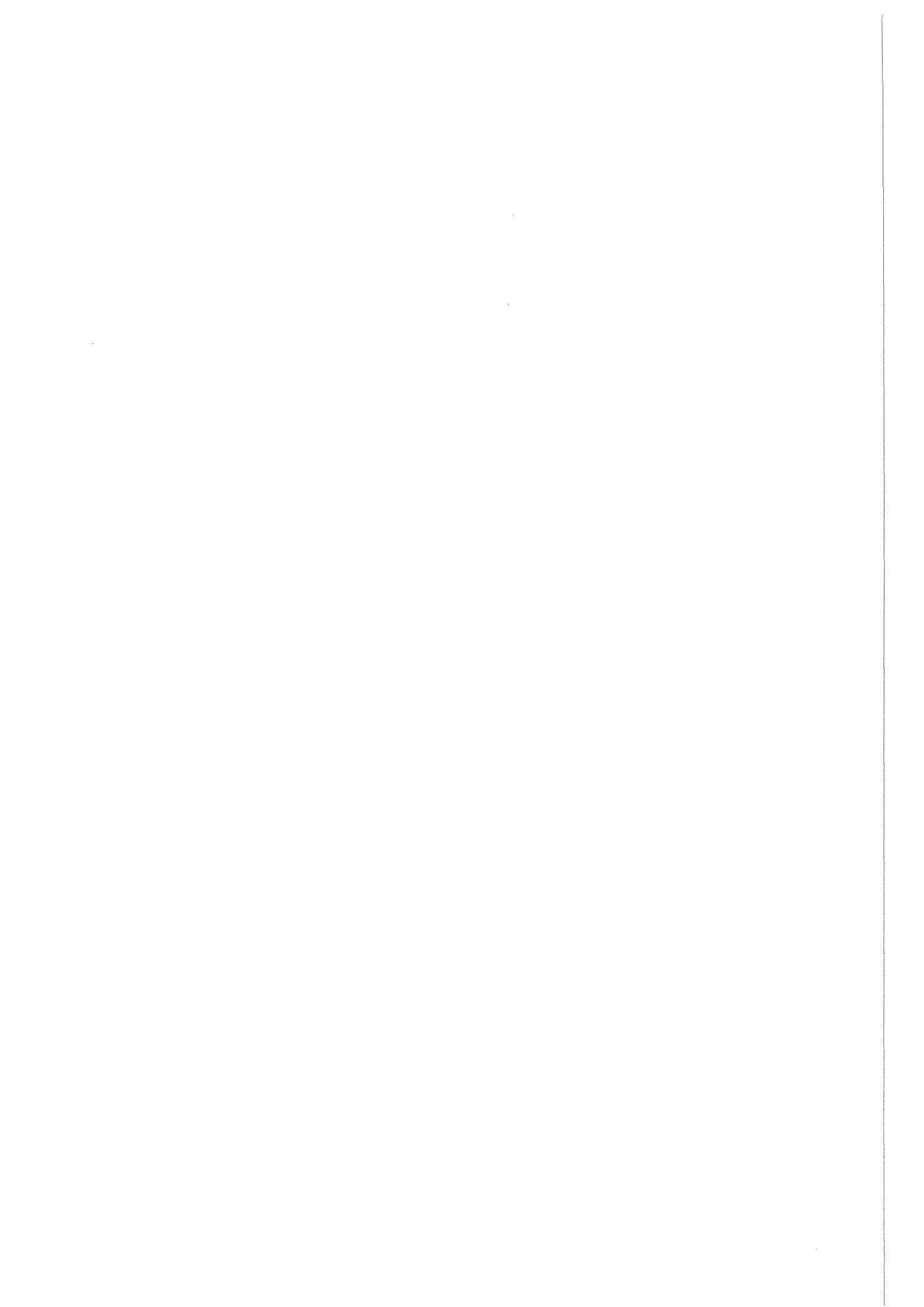


Abb.14: Einfluß verschiedener  $\text{CeCl}_3$  und  $\text{LaCl}_3$  -Konzentrationen auf die Verteilung der LDH von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation. (in % der Kontrollgesamtaktivität zum Zeitpunkt 2 Stunden) Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler. n = 3. Repräsentativ für 3 Versuche.  
\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle. ( $2p < 0.05$ )



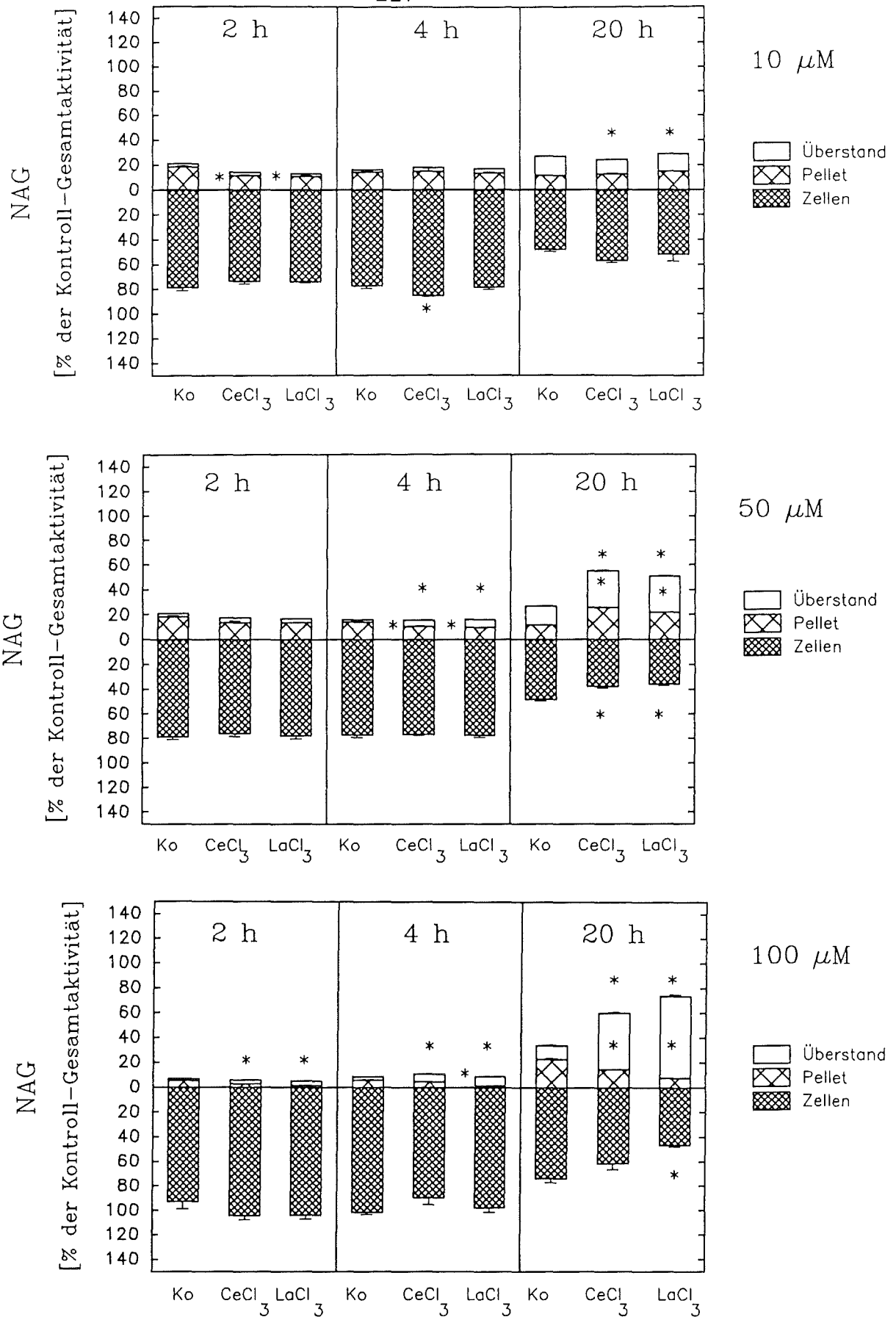
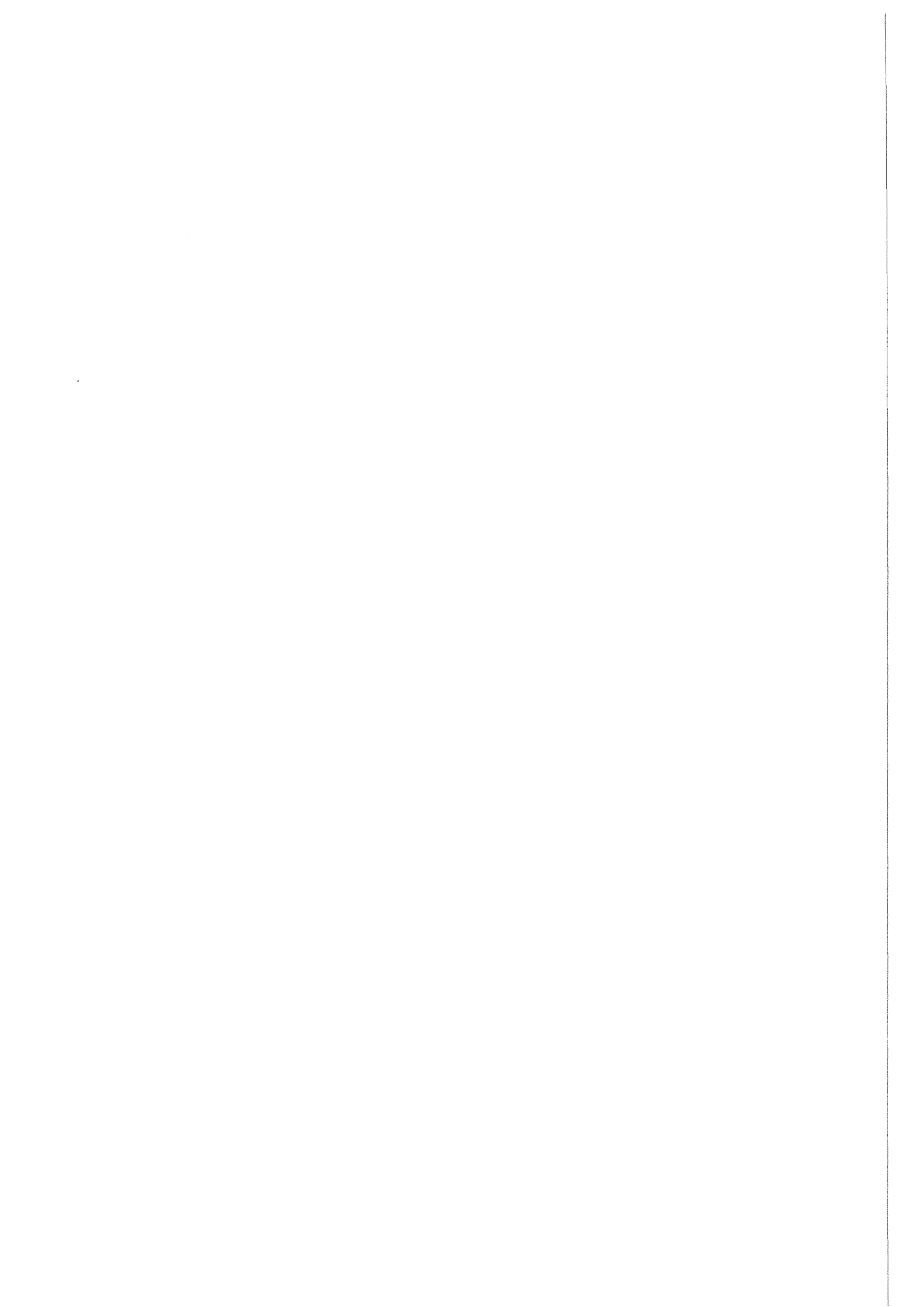


Abb.15: Einfluß verschiedener  $\text{CeCl}_3$  und  $\text{LaCl}_3$  -Konzentrationen auf die Verteilung der NAG von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation. (in % der Kontrollgesamtaktivität zum Zeitpunkt 2 Stunden) Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler.  $n = 3$ . Repräsentativ für 3 Versuche.



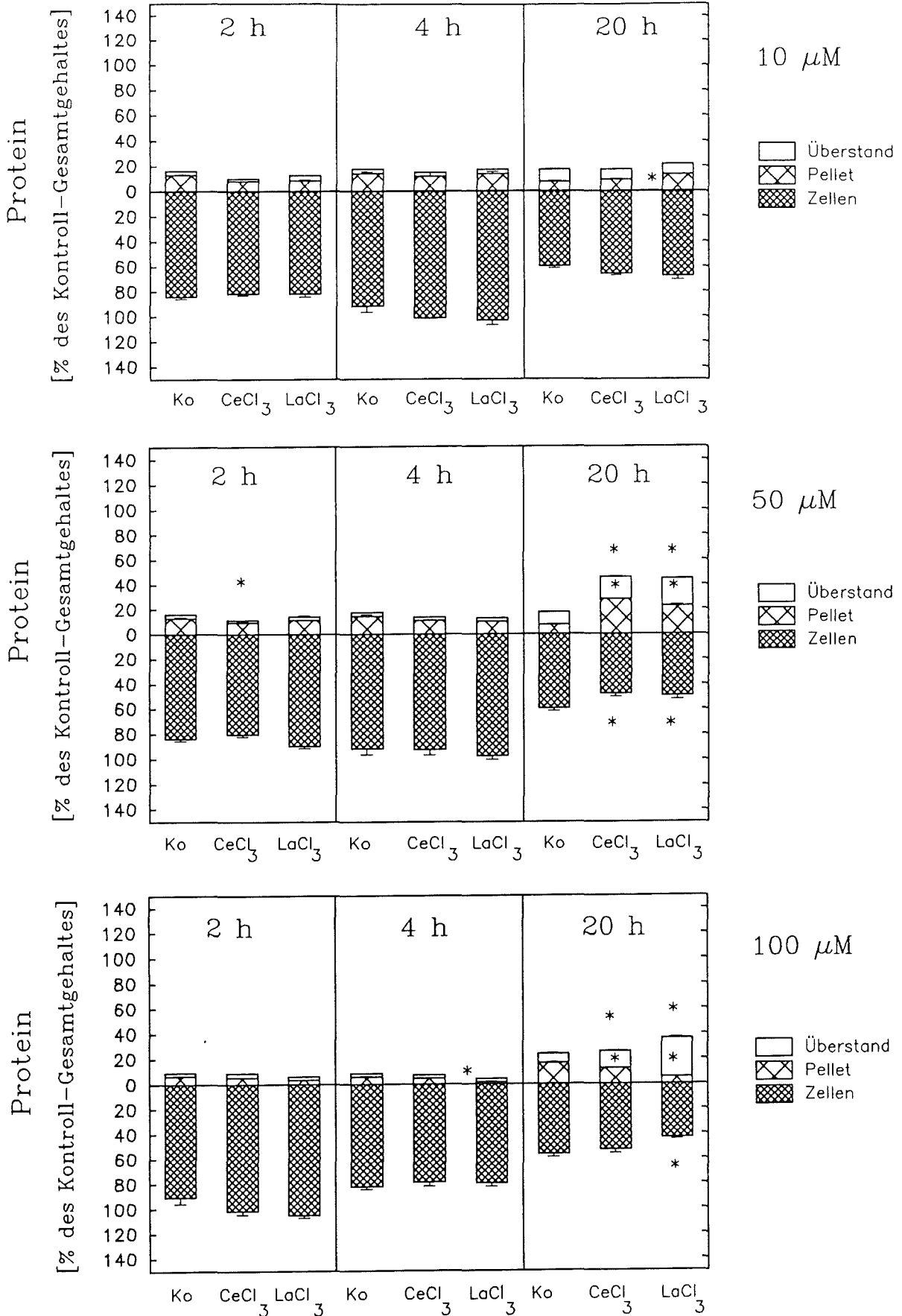
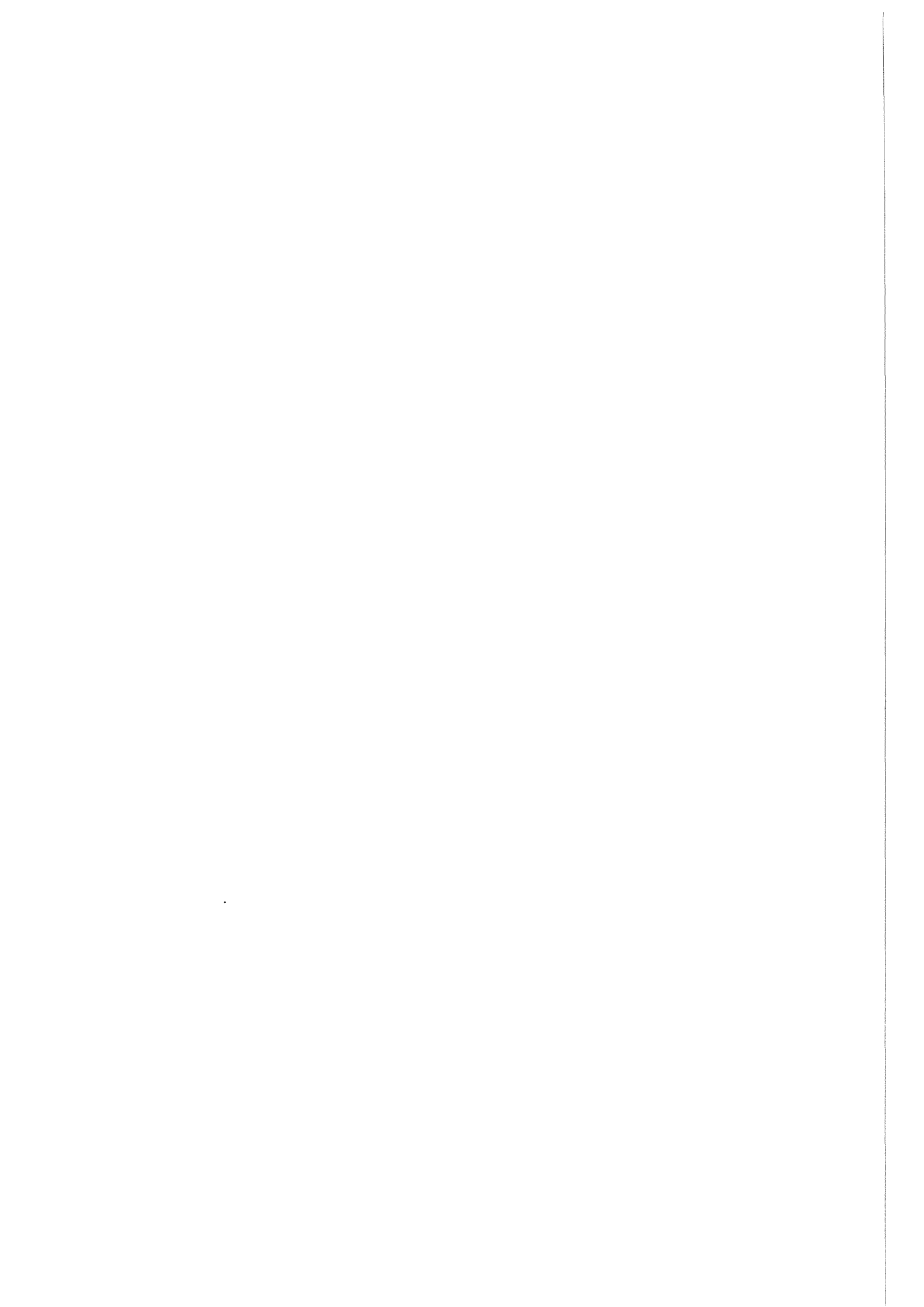


Abb.16: Einfluß verschiedener  $\text{CeCl}_3$  und  $\text{LaCl}_3$ -Konzentrationen auf die Verteilung des Proteins von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärenente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation. (In % des Kontrollgesamtgehaltes zum Zeitpunkt 2 Stunden)  
Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler.  $n = 3$ . Repräsentativ für 3 Versuche.  
\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle. ( $2p < 0.05$ )



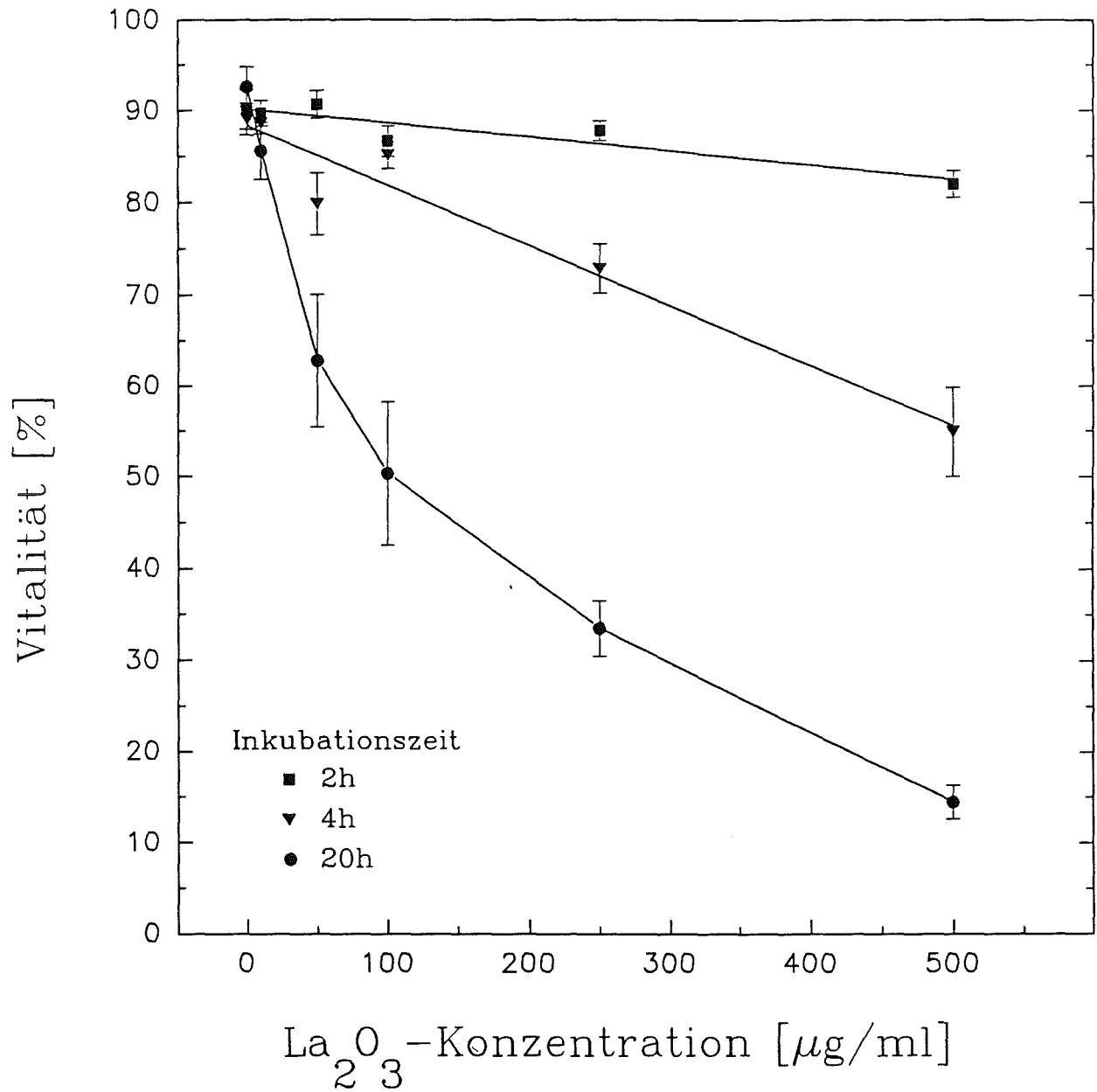
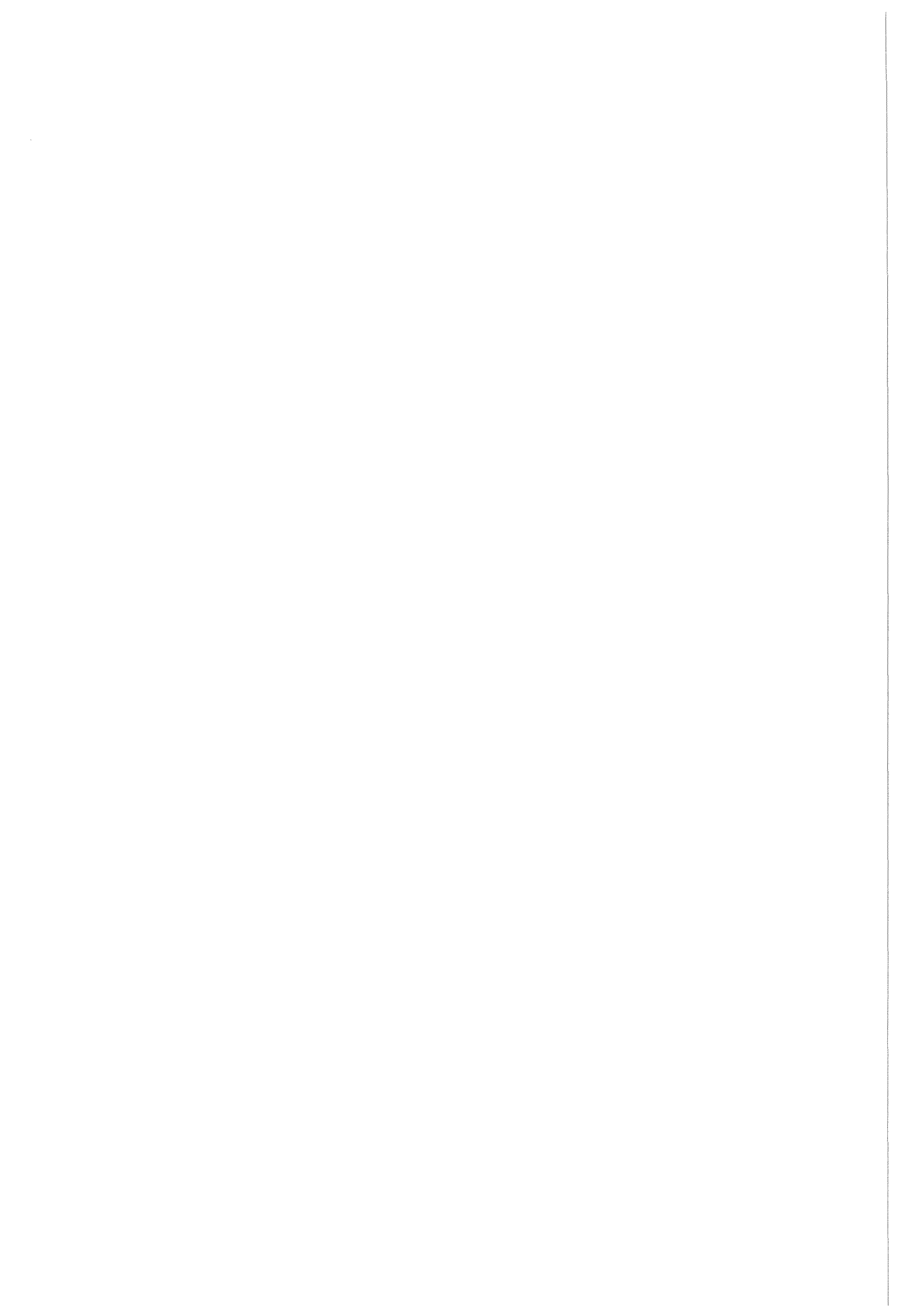


Abb.17: Einfluß verschiedener  $\text{La}_2\text{O}_3$ -Konzentrationen auf die Vitalität von Rinderalveolarmakrophagen nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler.  $n = 9$





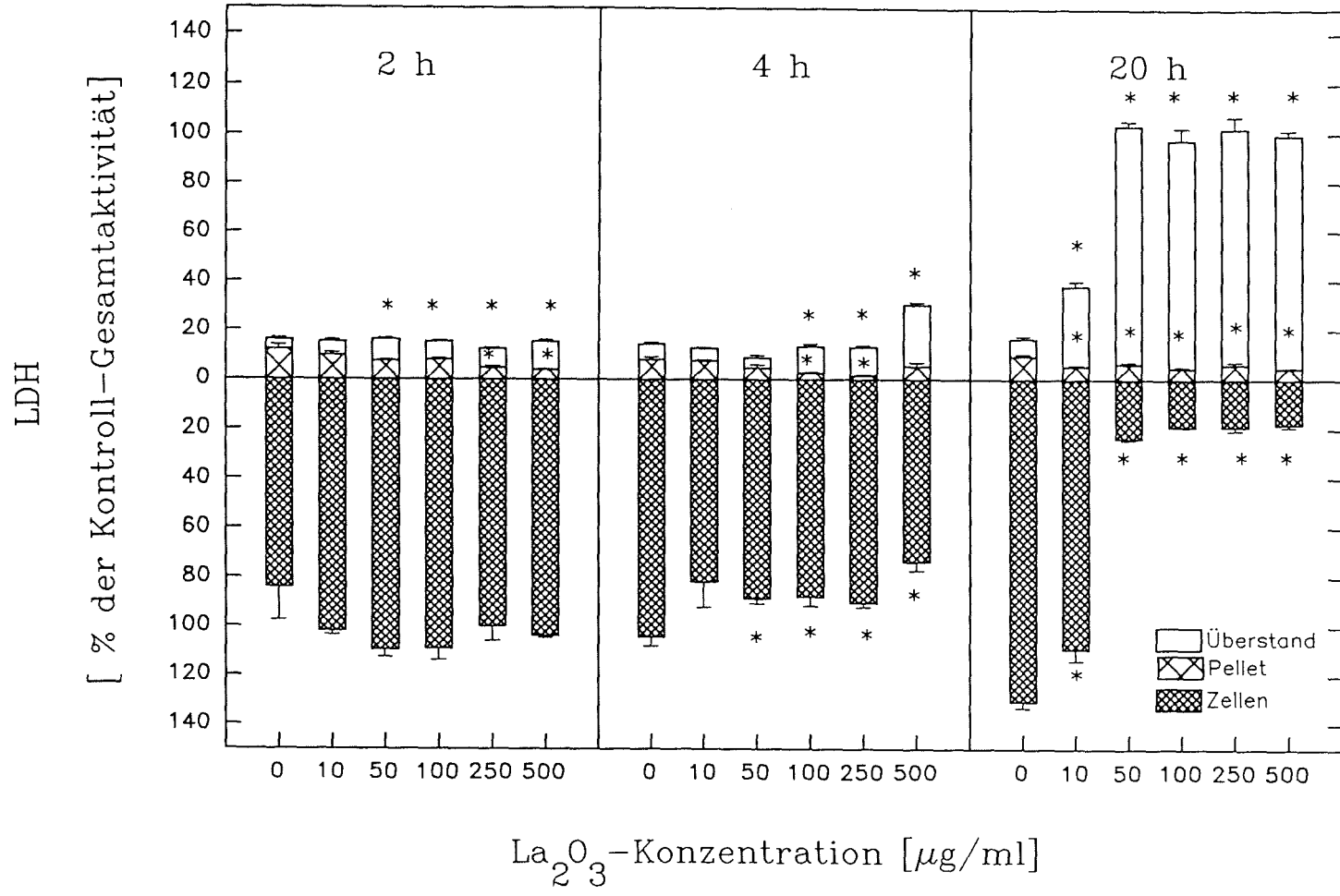
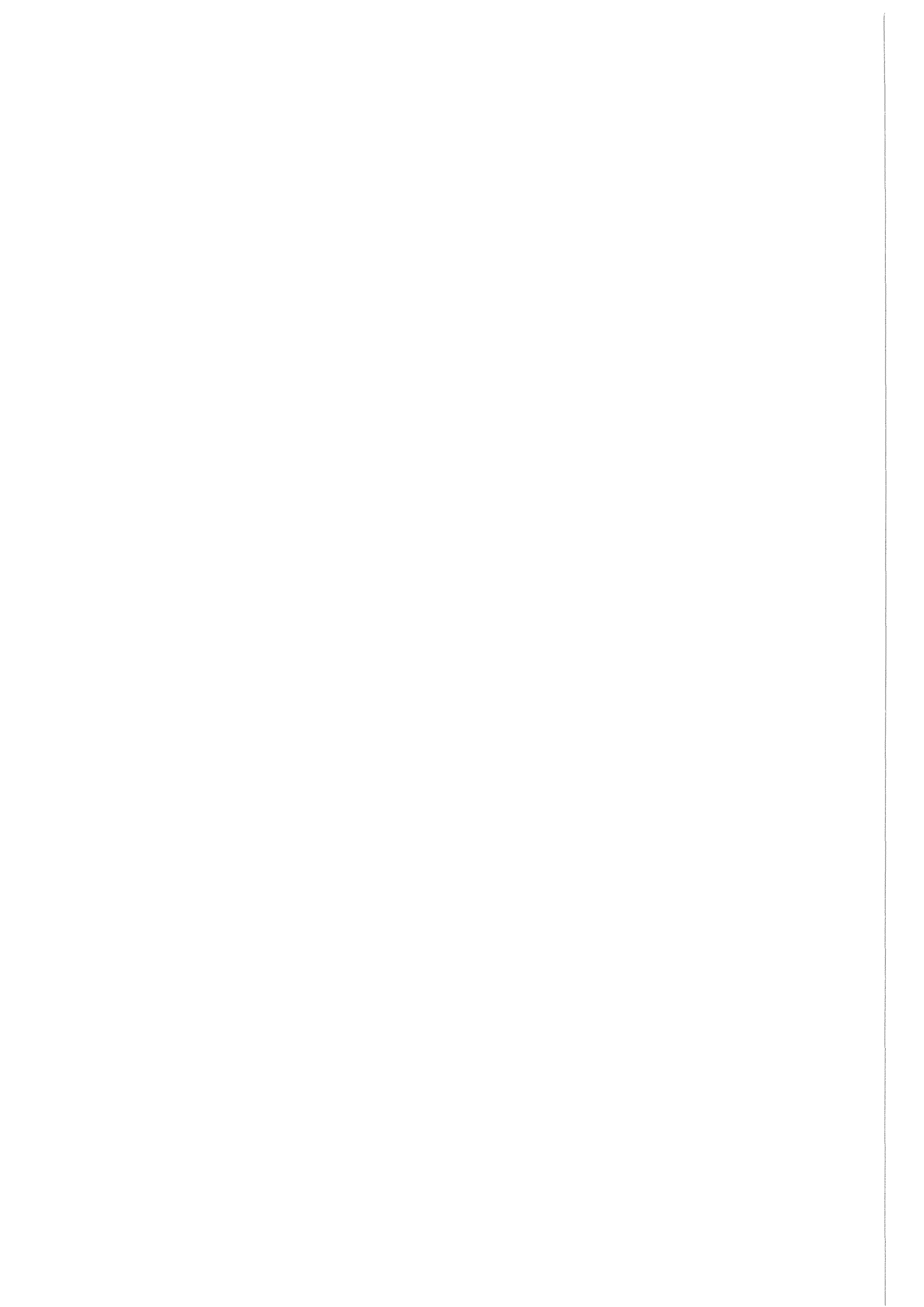


Abb.18: Einfluß verschiedener La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> -Konzentrationen auf die Verteilung der LDH von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation. (in % der Kontrollgesamtaktivität zum Zeitpunkt 2 Stunden)  
 Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler. n=3  
 Einzelversuch.  
 \* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle



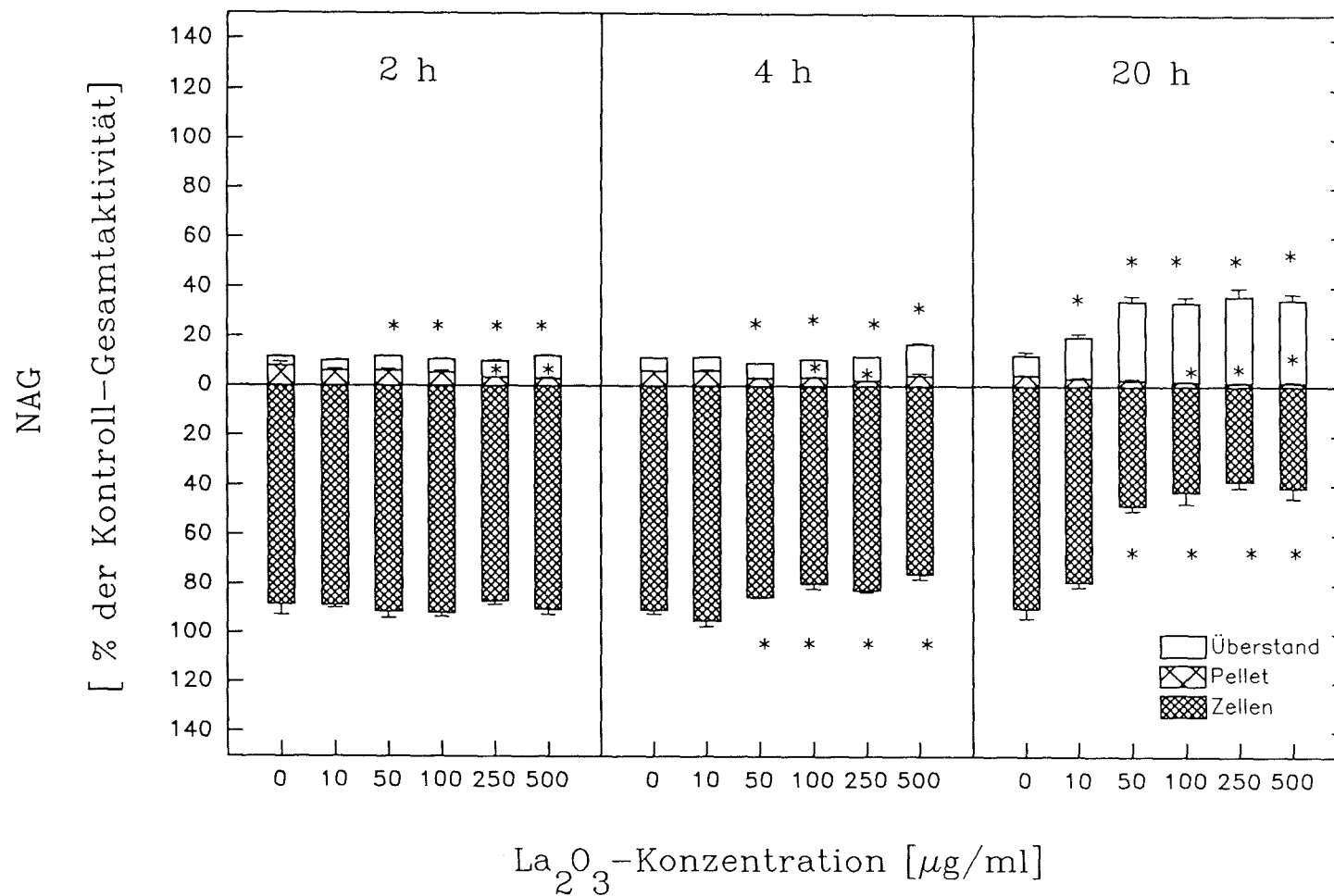


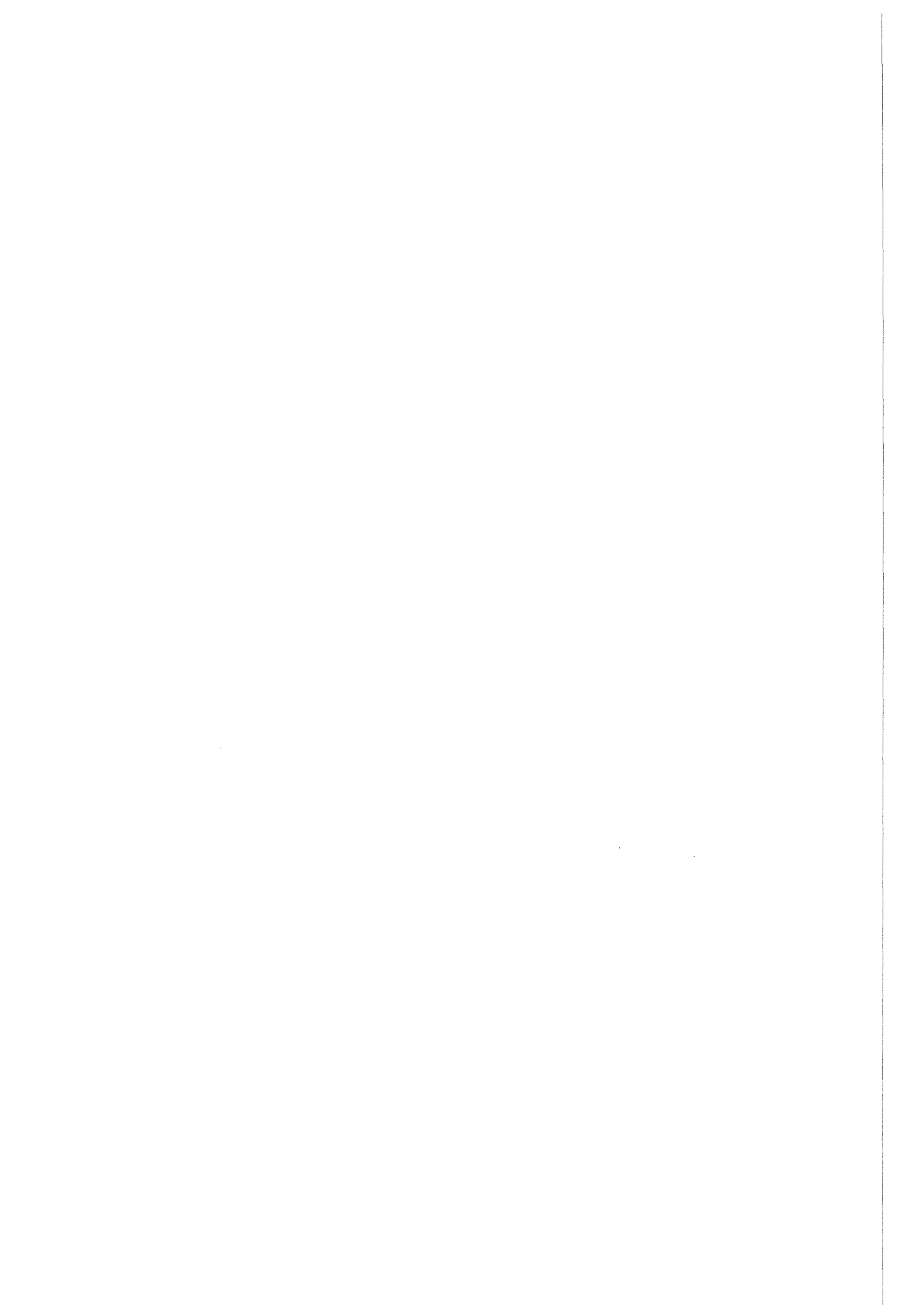
Abb.19: Einfluß verschiedener La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> -Konzentrationen auf die Verteilung der NAG von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation.

(in % der Kontrollgesamtaktivität zum Zeitpunkt 2 Stunden)

Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler. n=3

Einzelversuch.

\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle



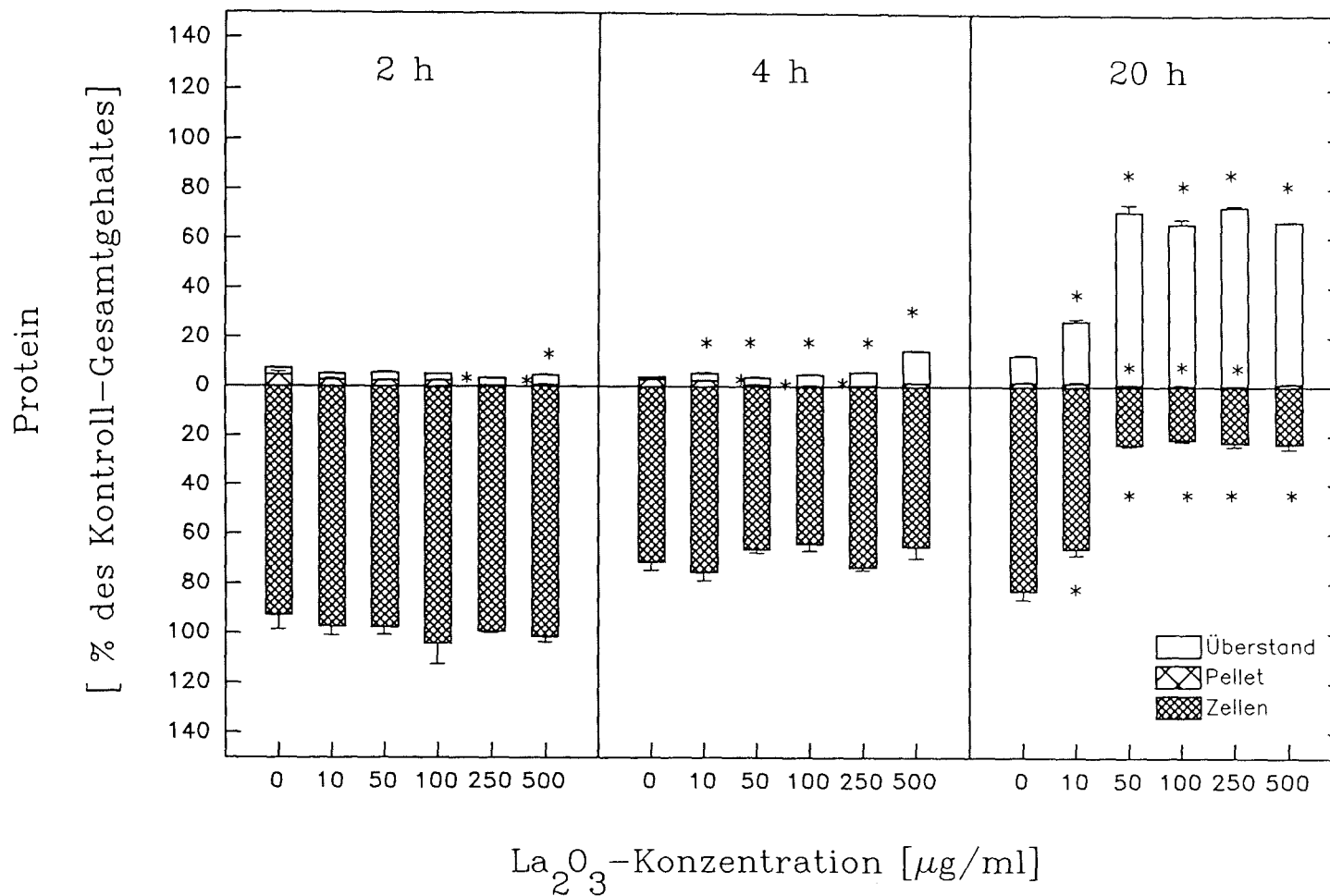
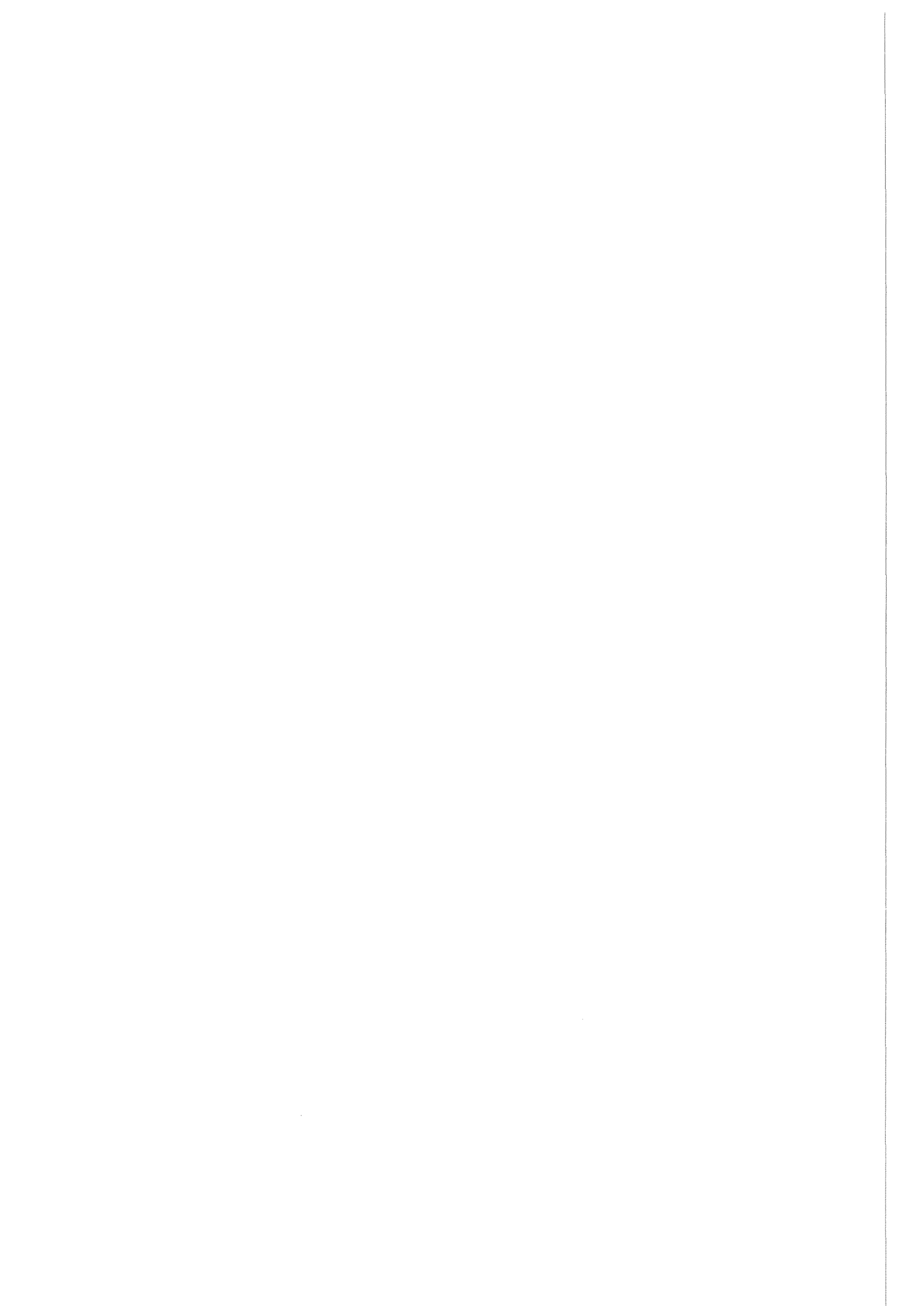


Abb.20: Einfluß verschiedener La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> -Konzentrationen auf die Verteilung des Proteins von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärenente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation. (in % des Kontrollgesamtgehaltes zum Zeitpunkt 2 Stunden)  
 Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler.  
 Einzelversuch.  
 \* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle



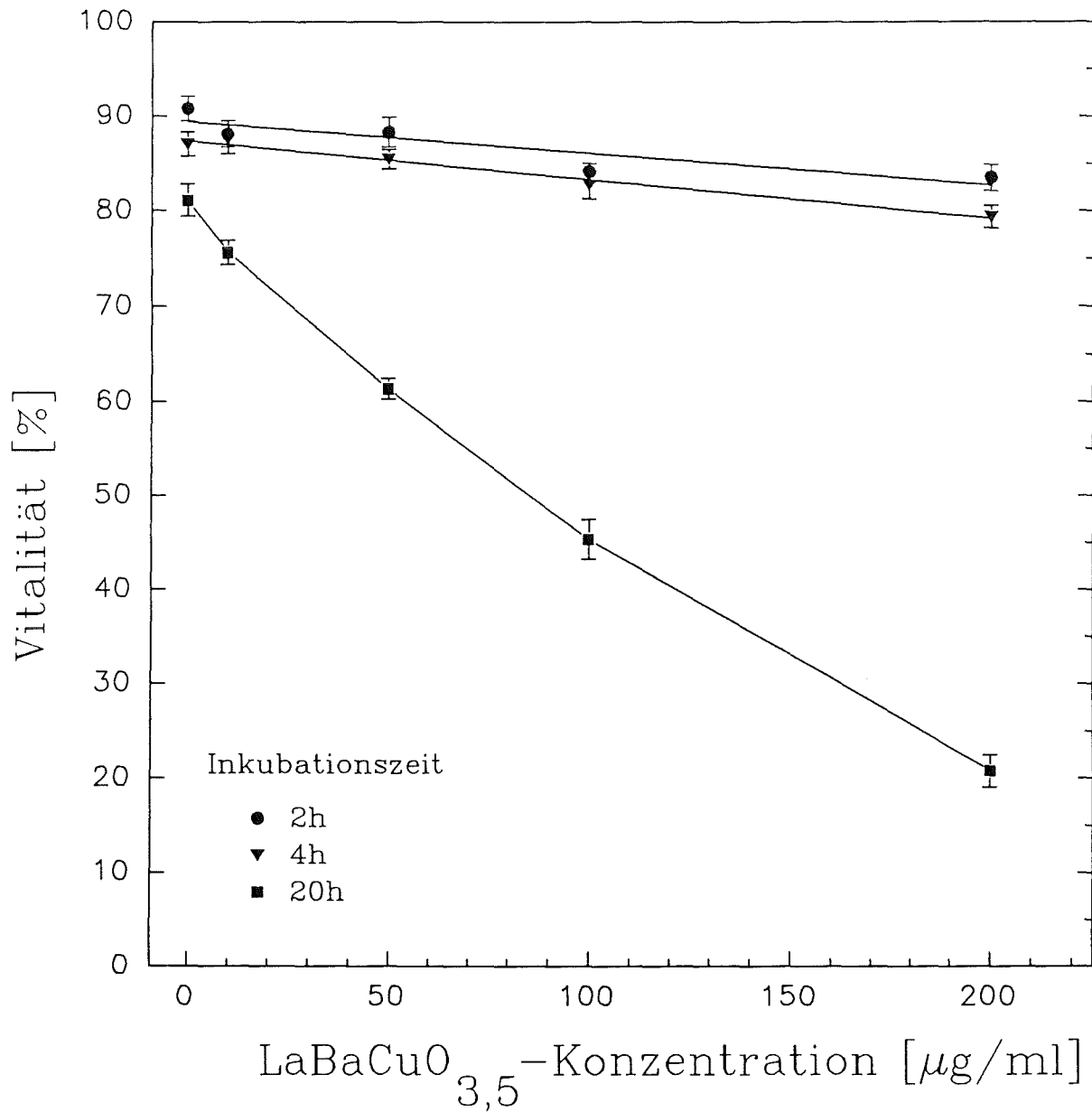
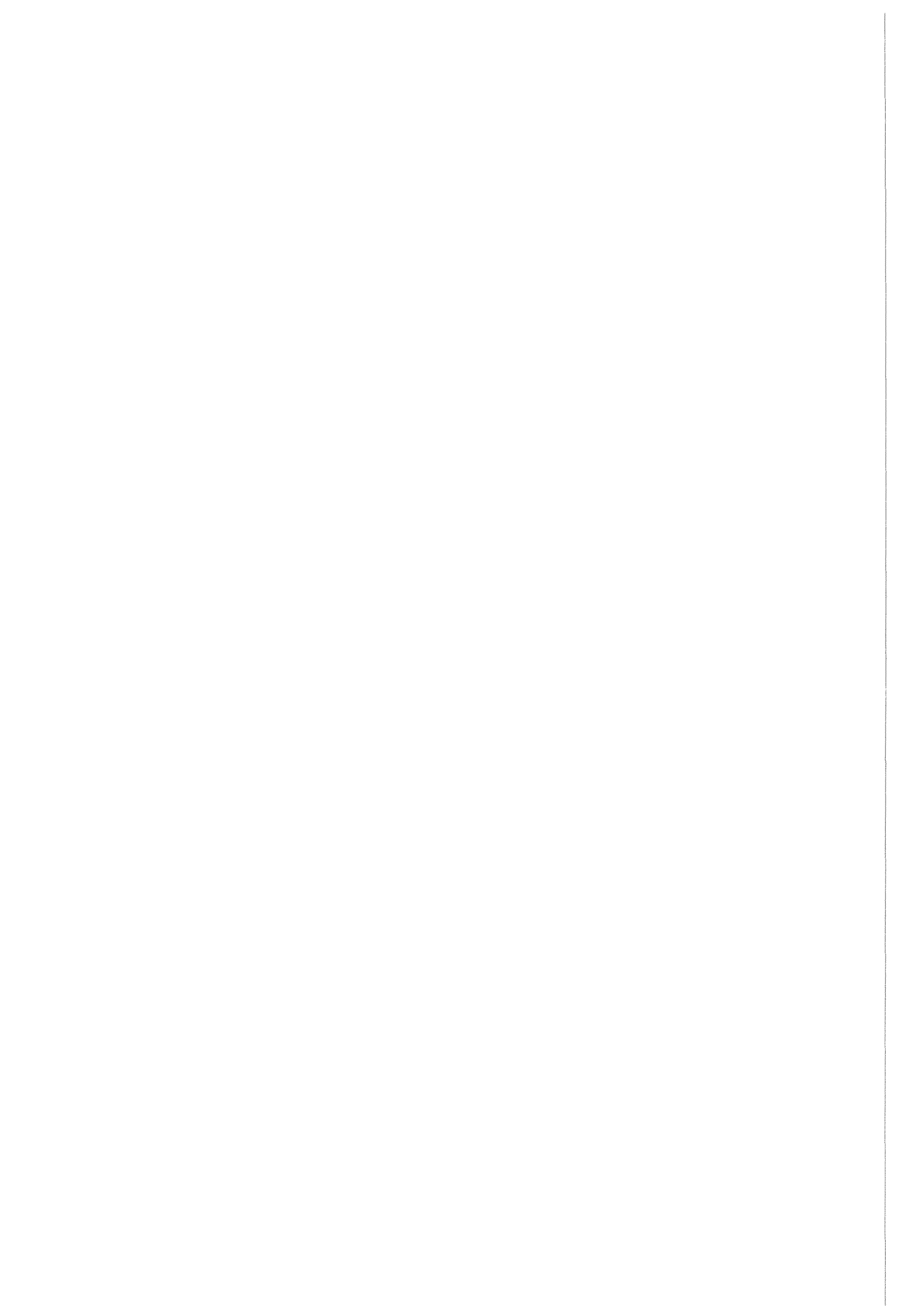


Abb.21: Einfluß verschiedener LaBaCuO<sub>3,5</sub>-Konzentrationen auf die Vitalität von Rinderalveolarmakrophagen nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler. n = 9





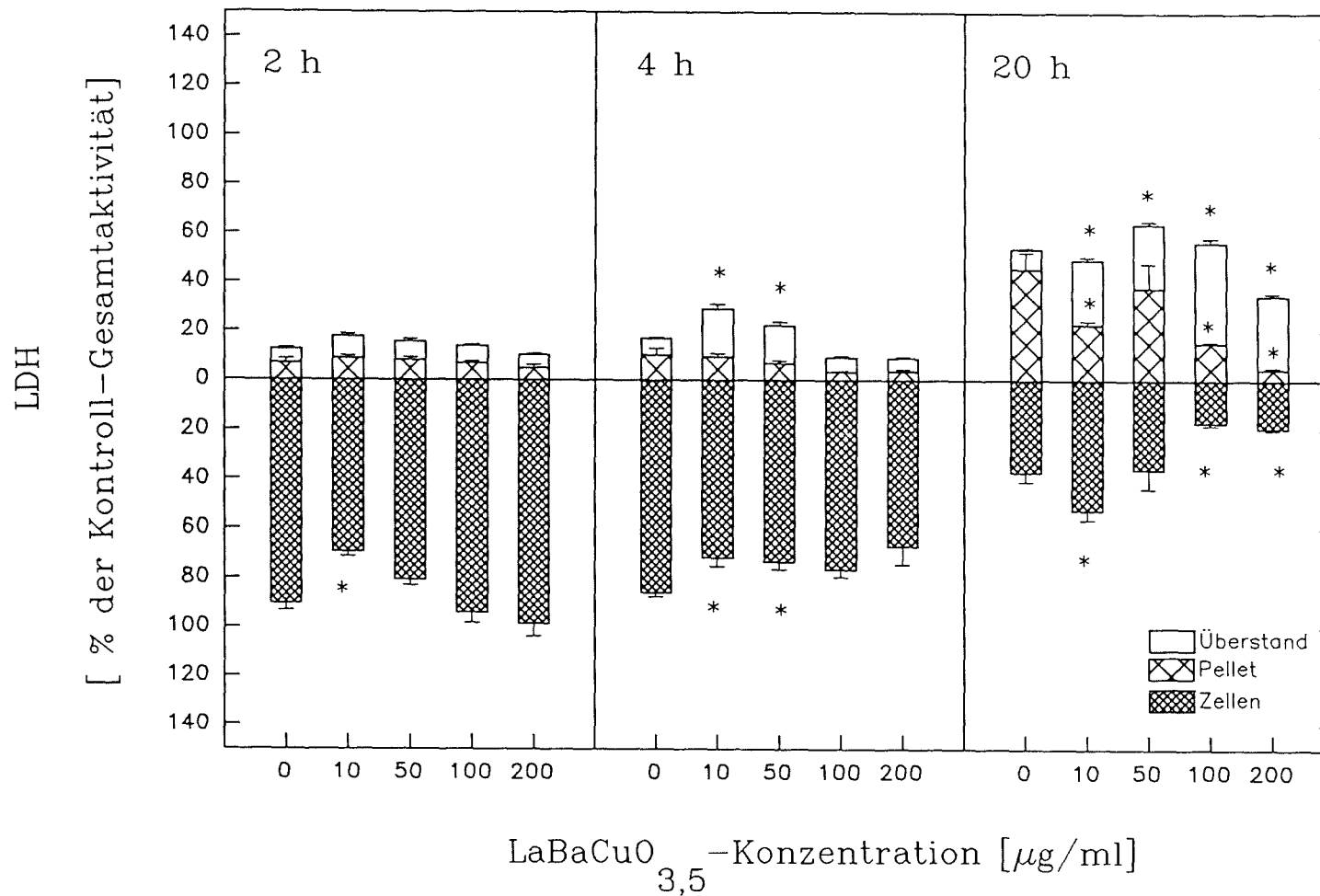


Abb.22: Einfluß verschiedener LaBaCuO<sub>3,5</sub> -Konzentrationen auf die Verteilung der LDH von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärenente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation.

(in % der Kontrollgesamtaktivität zum Zeitpunkt 2 Stunden)

Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler. n=3

Repräsentativ für 3 Versuche.

\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle



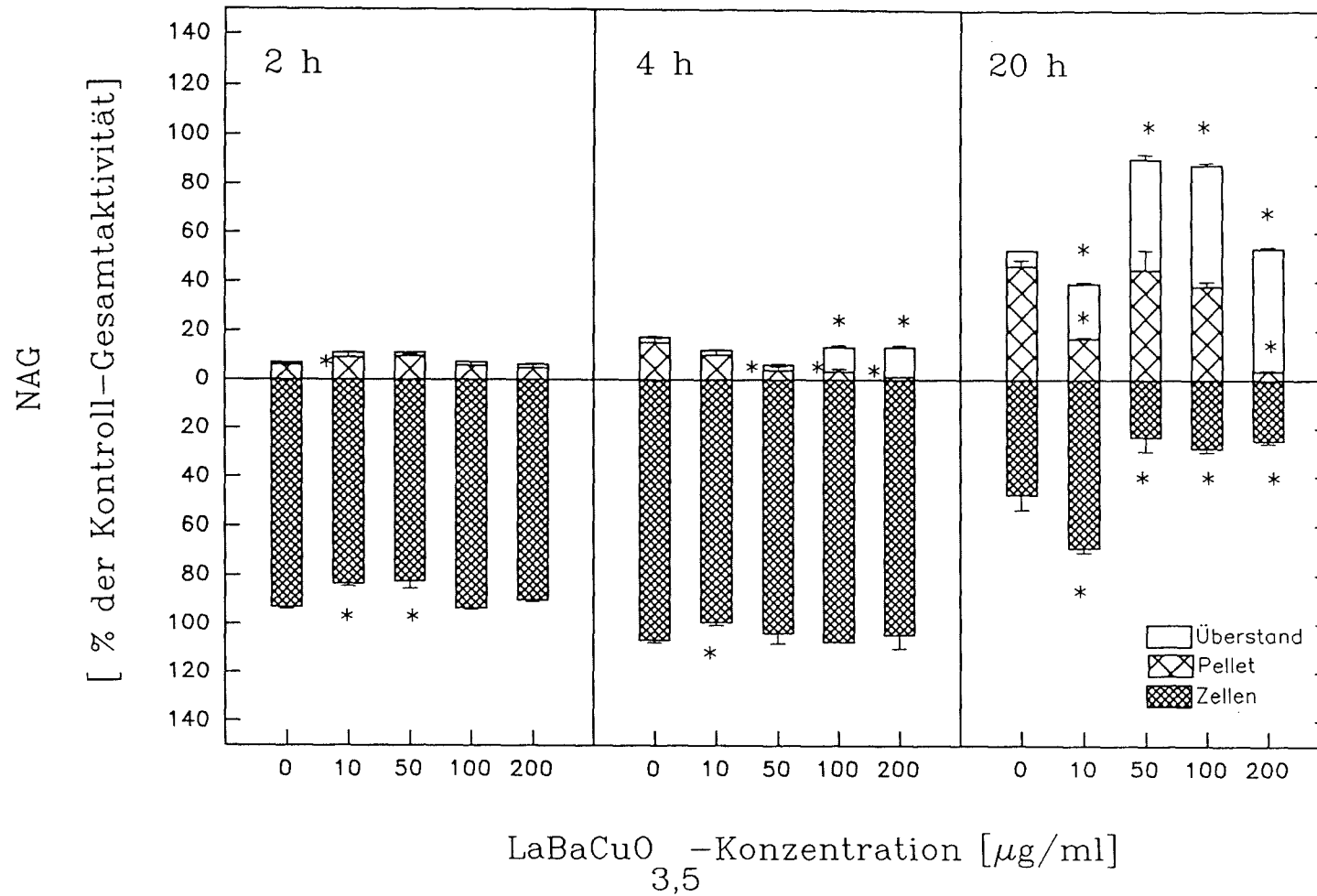
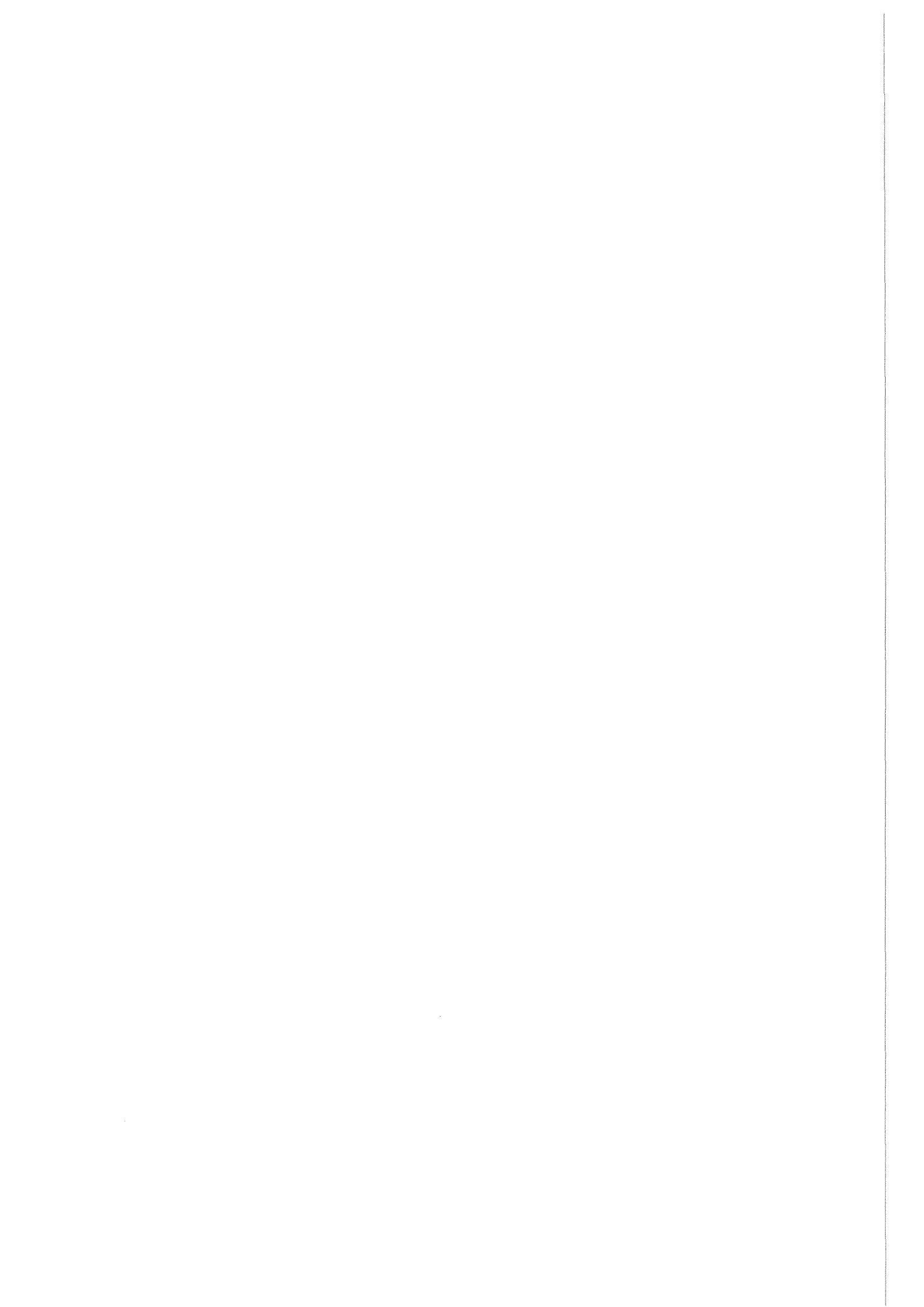


Abb.23: Einfluß verschiedener LaBaCuO<sub>3,5</sub> -Konzentrationen auf die Verteilung der NAG von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation. (in % der Kontrollgesamtaktivität zum Zeitpunkt 2 Stunden)  
 Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler. n=3  
 Repräsentativ für 3 Versuche.  
 \* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle



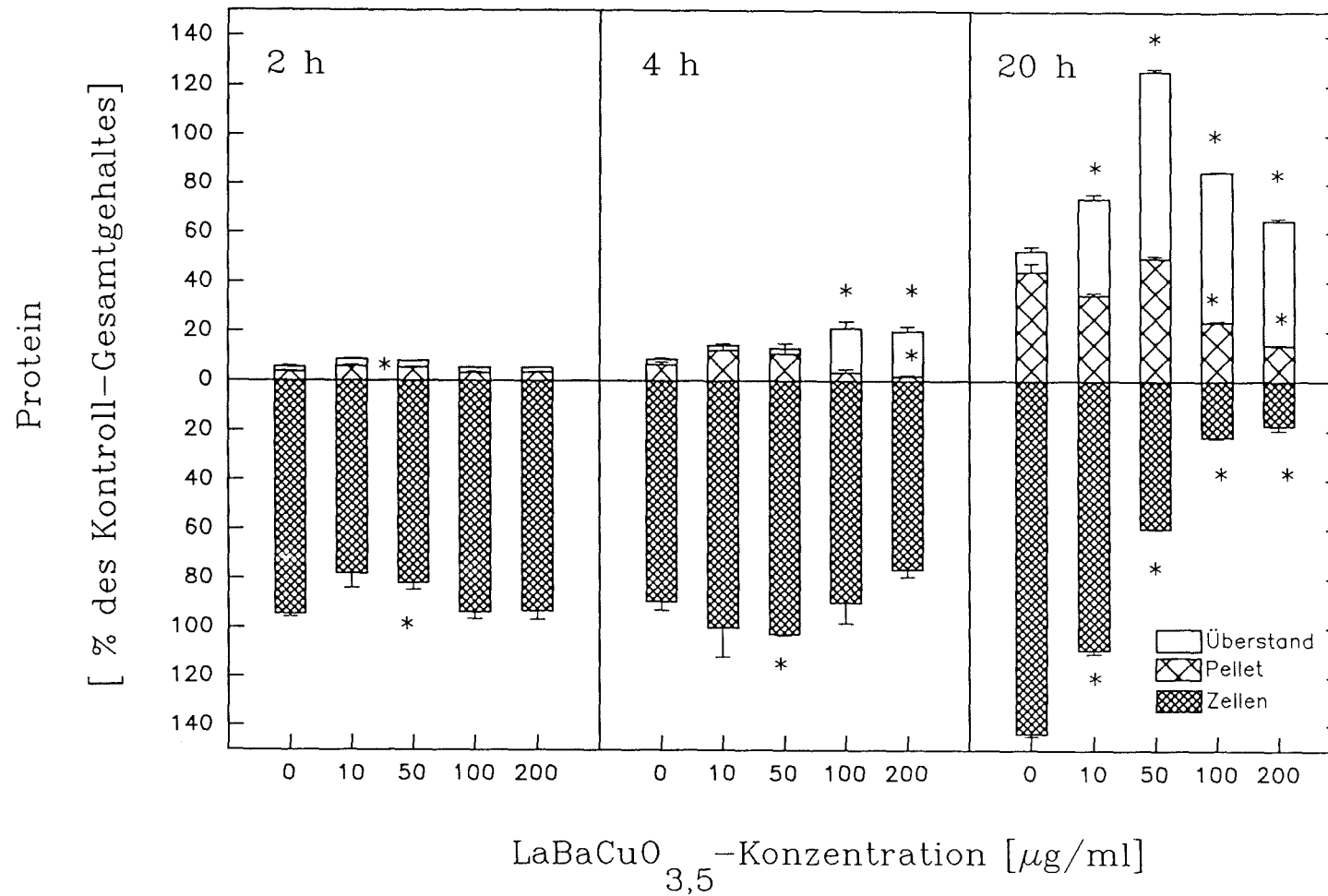
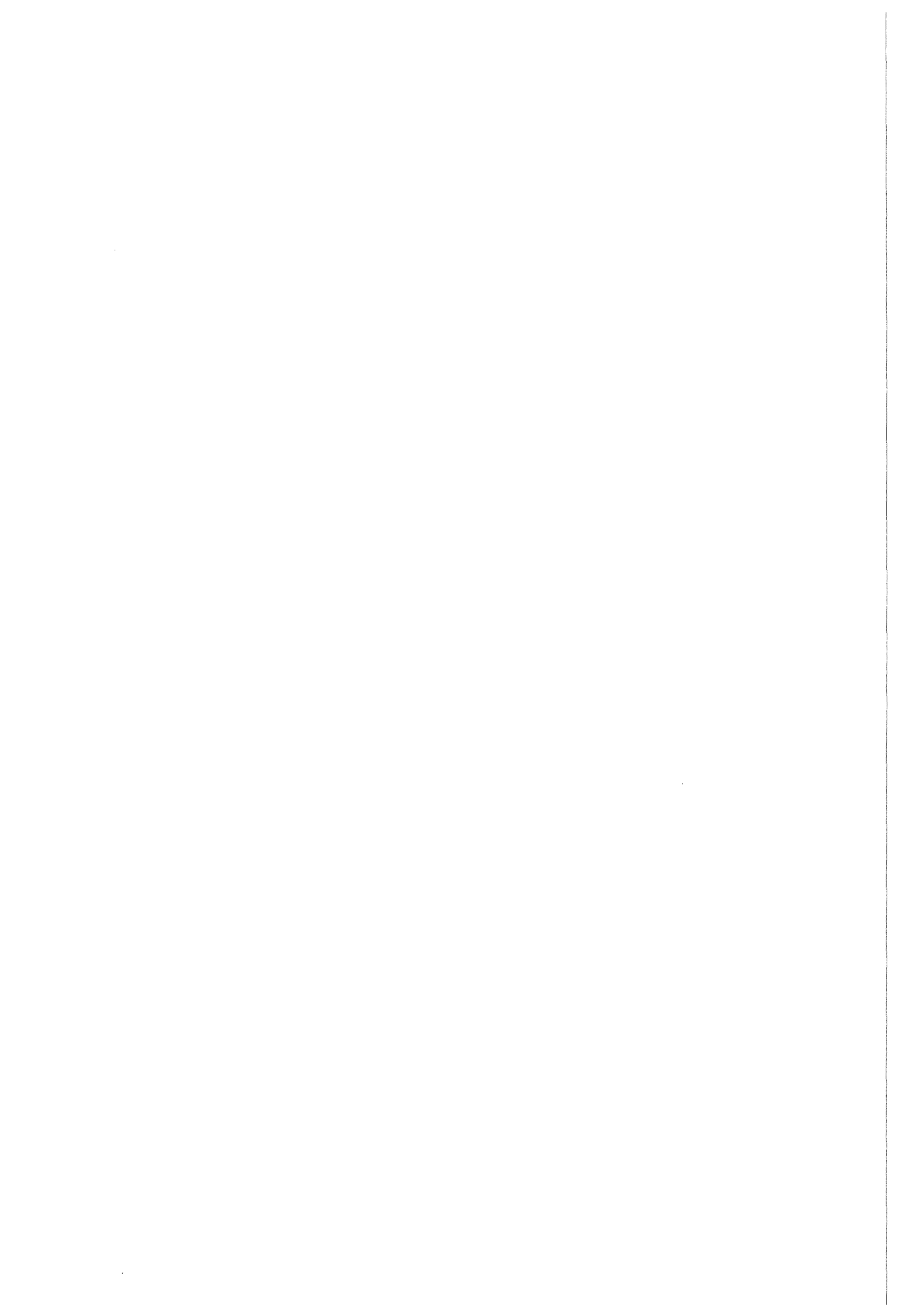


Abb.24: Einfluß verschiedener LaBaCuO<sub>3,5</sub>-Konzentrationen auf die Verteilung des Proteins von RAM in Kulturüberstand (Überstand), abgelöste (Pellet) und adhärente Zellen (Zellen) nach 2, 4 und 20 Stunden Inkubation.

(in % des Kontrollgesamtgehaltes zum Zeitpunkt 2 Stunden)

Arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler. Repräsentativ für 3 Versuche. n=3

\* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle



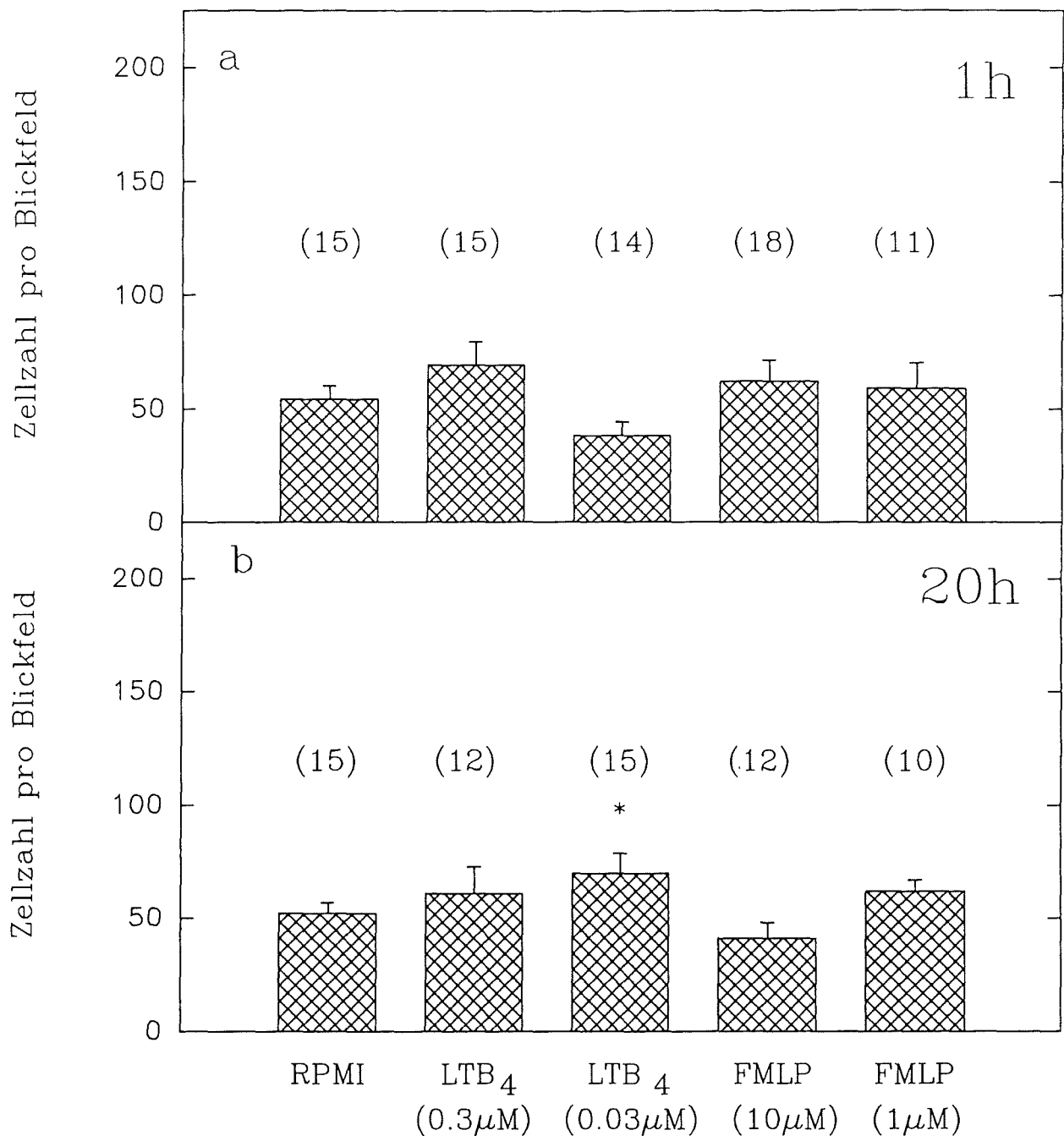


Abb.25: Einfluß verschiedener chemoattraktiver Stoffe auf die Zahl der gewanderten Rinderalveolarmakrophagen pro Blickfeld zu verschiedenen Zeitpunkten.

a) 1 Stunde nach der Lavage.

b) 20 Stunden nach der Lavage.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste.





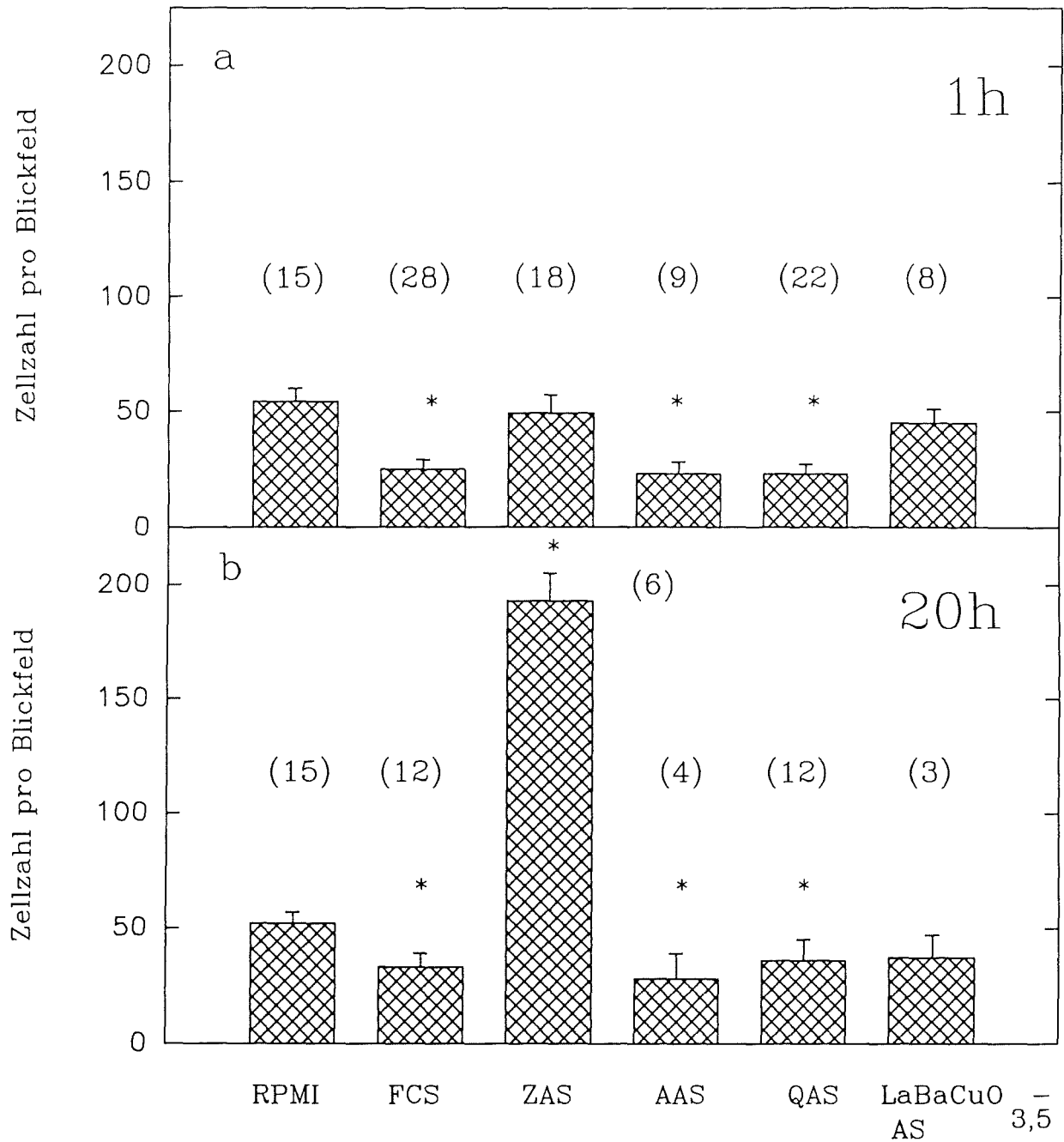


Abb.26: Einfluß verschiedener chemoattraktiver Stoffe auf die Zahl der gewanderten Rinderalveolarmakrophagen pro Blickfeld zu verschiedenen Zeitpunkten.

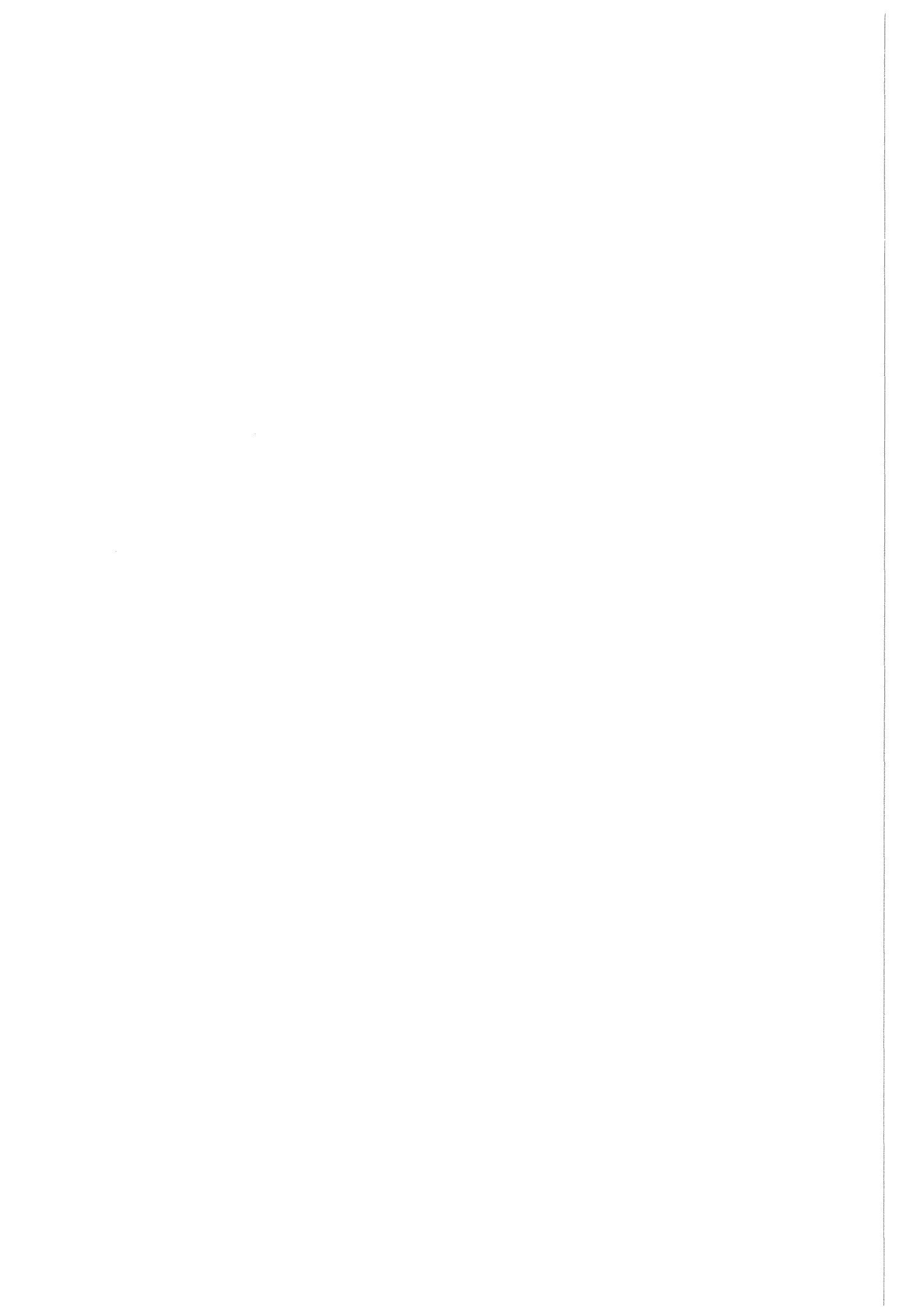
a) 1 Stunde nach der Lavage.

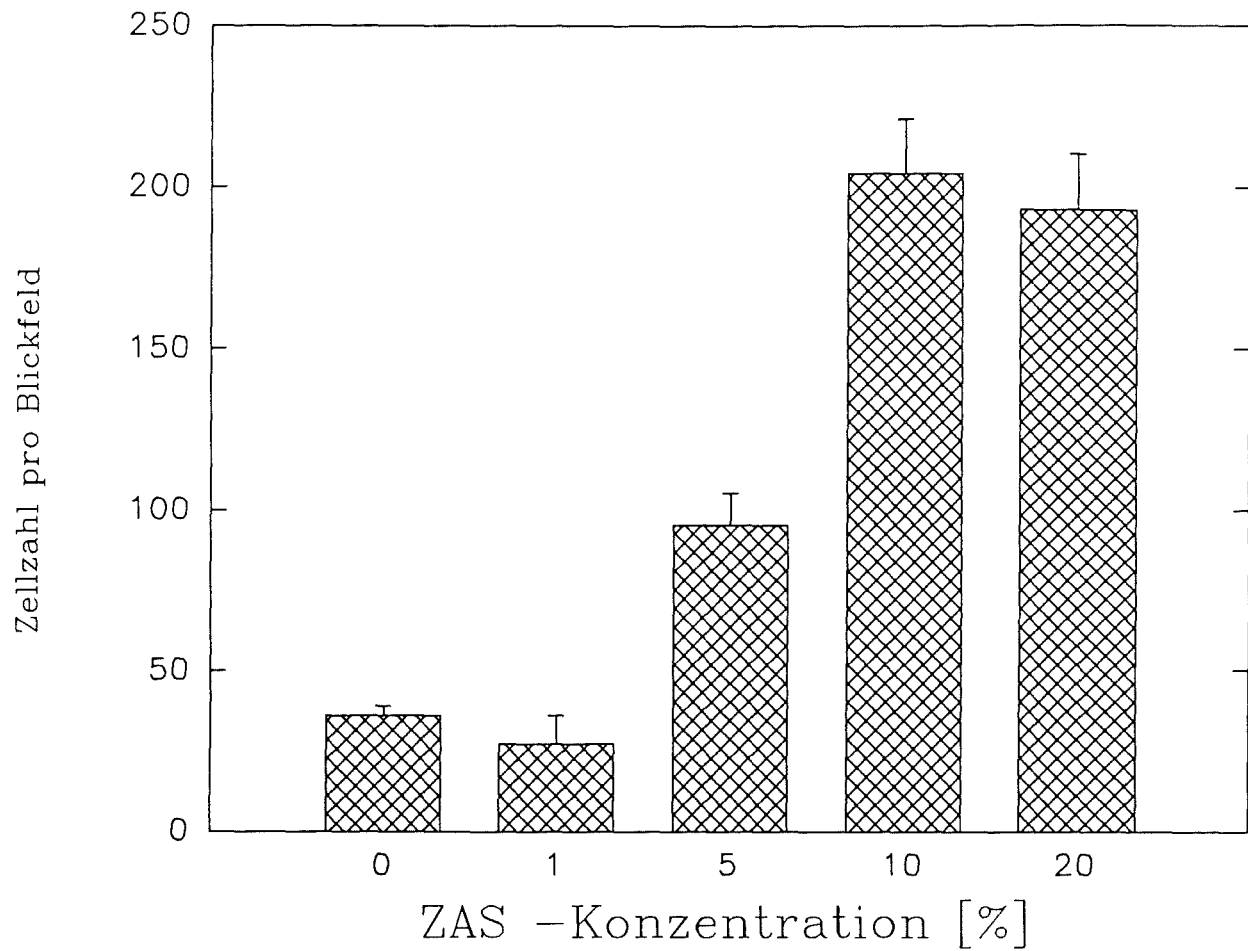
b) 20 Stunden nach der Lavage

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

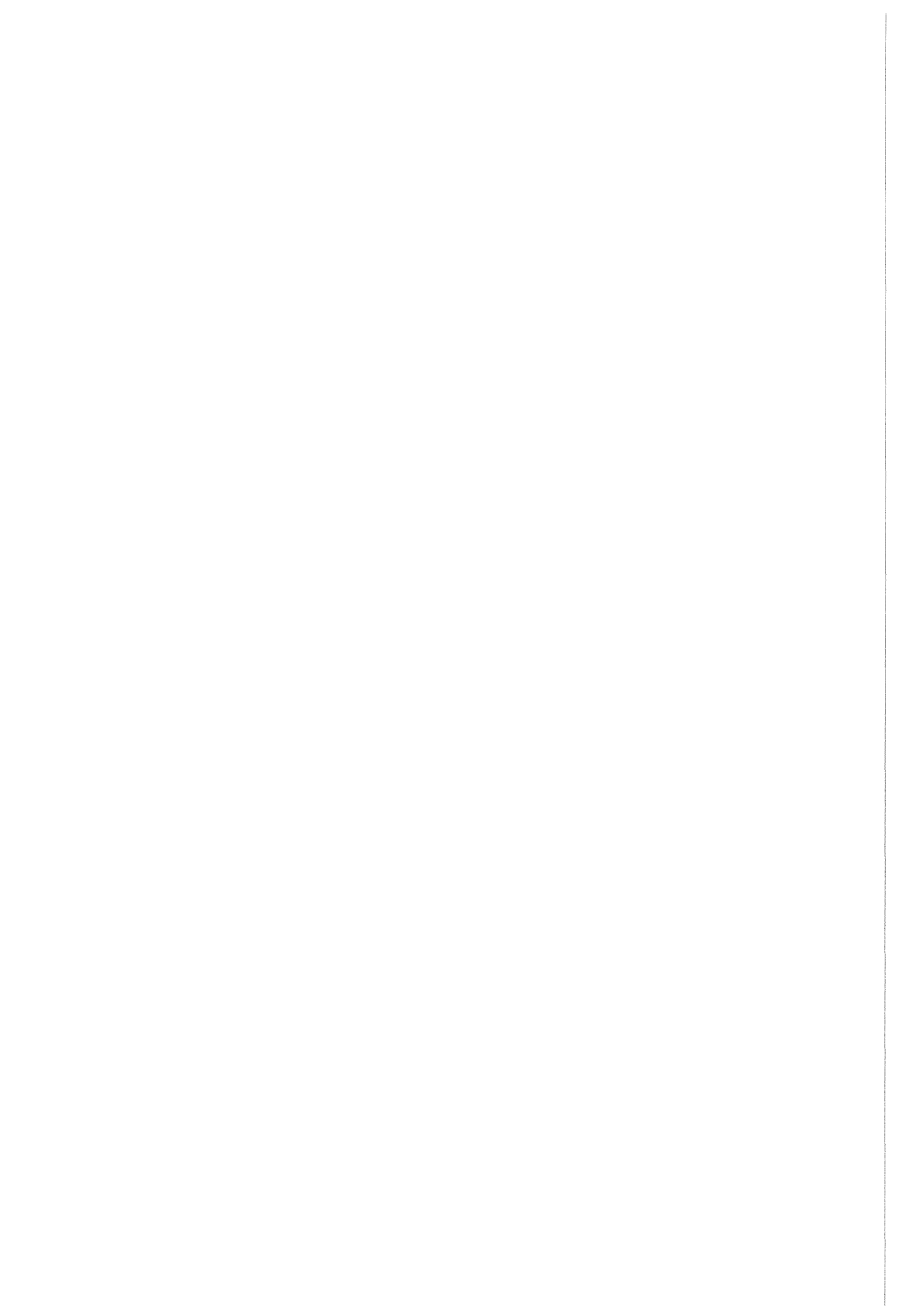
\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste.





**Abb.27:** Einfluß verschiedener Konzentrationen von Zymosan aktiviertem Serum (ZAS) auf die Zahl der gewanderten Rinderalveolarmakrophagen pro Blickfeld.  
Mittelwerte mit Standardfehler. n = 6



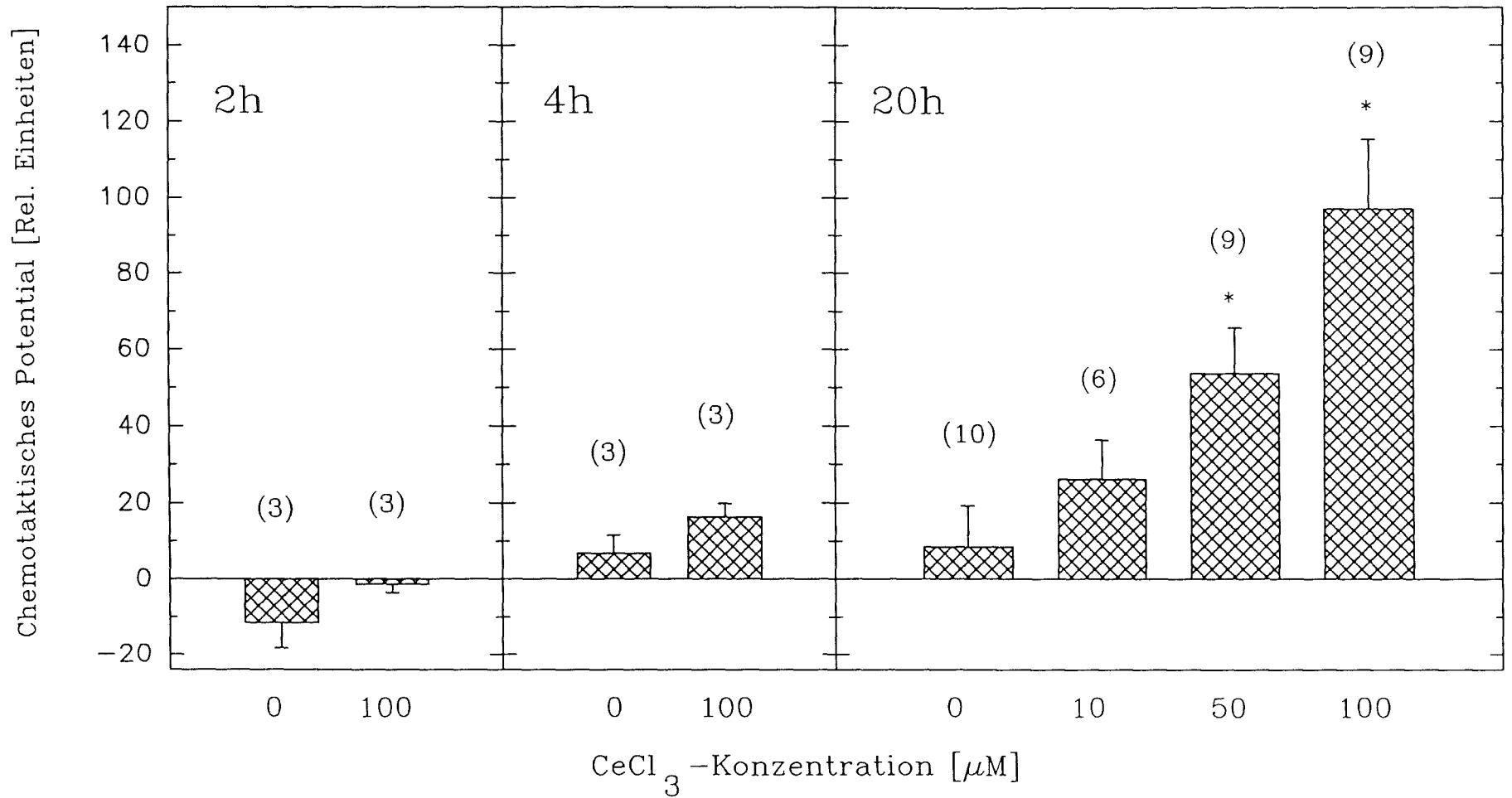
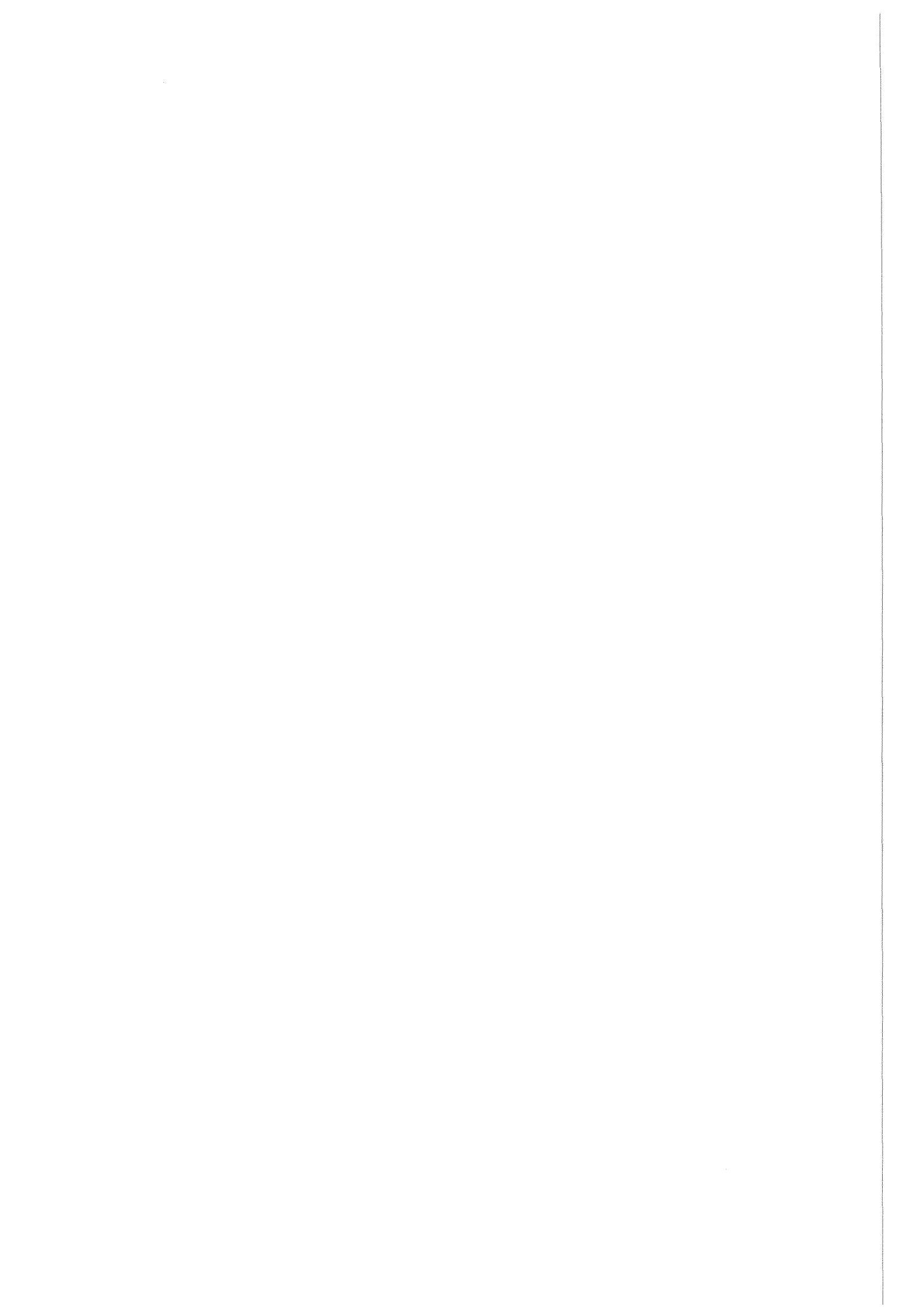


Abb.28: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinder-alveolarmakrophagen bei Inkubationen mit CeCl<sub>3</sub>.  
 Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)  
 \* Statistisch signifikanter Unterschied.



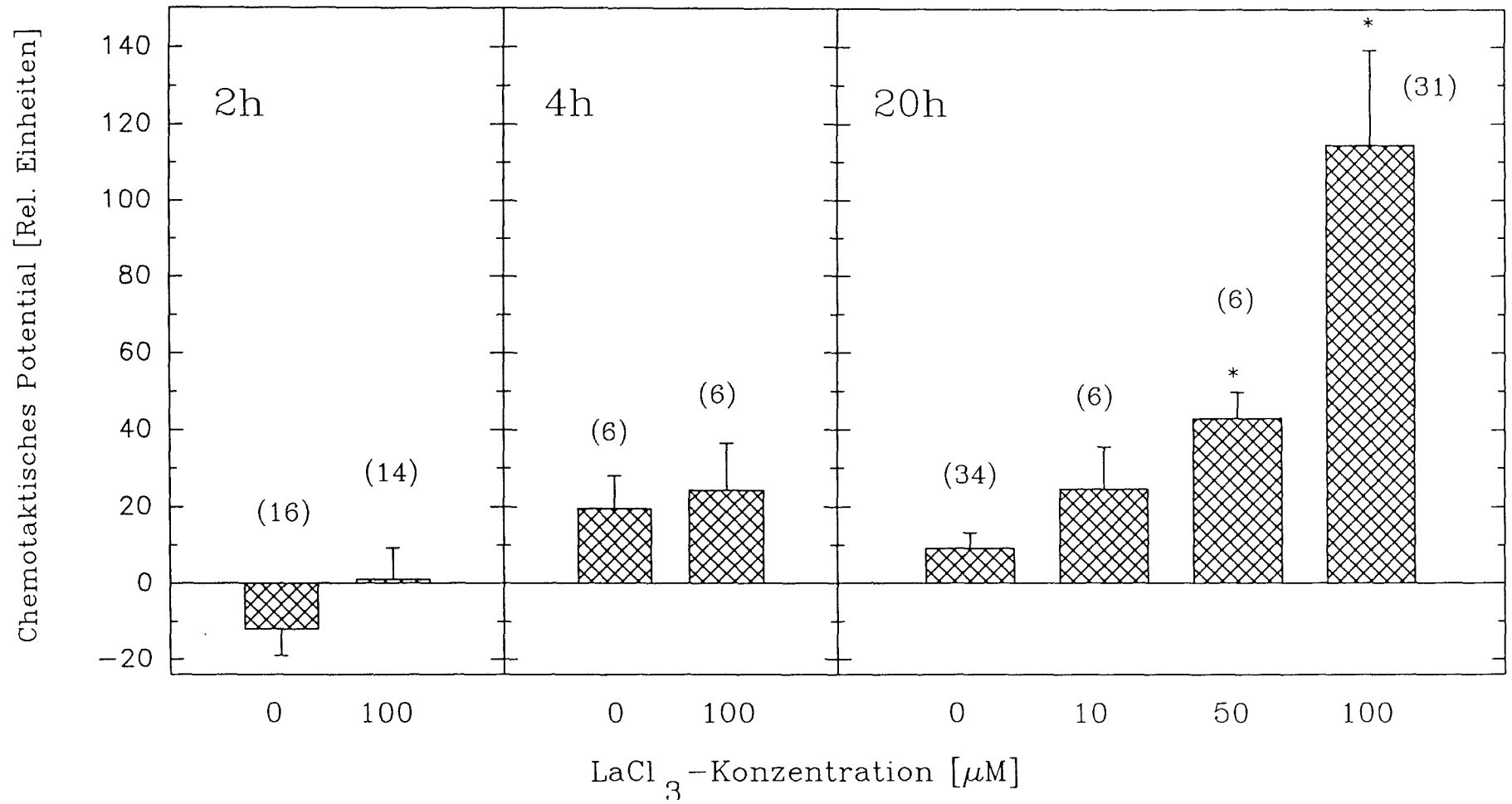
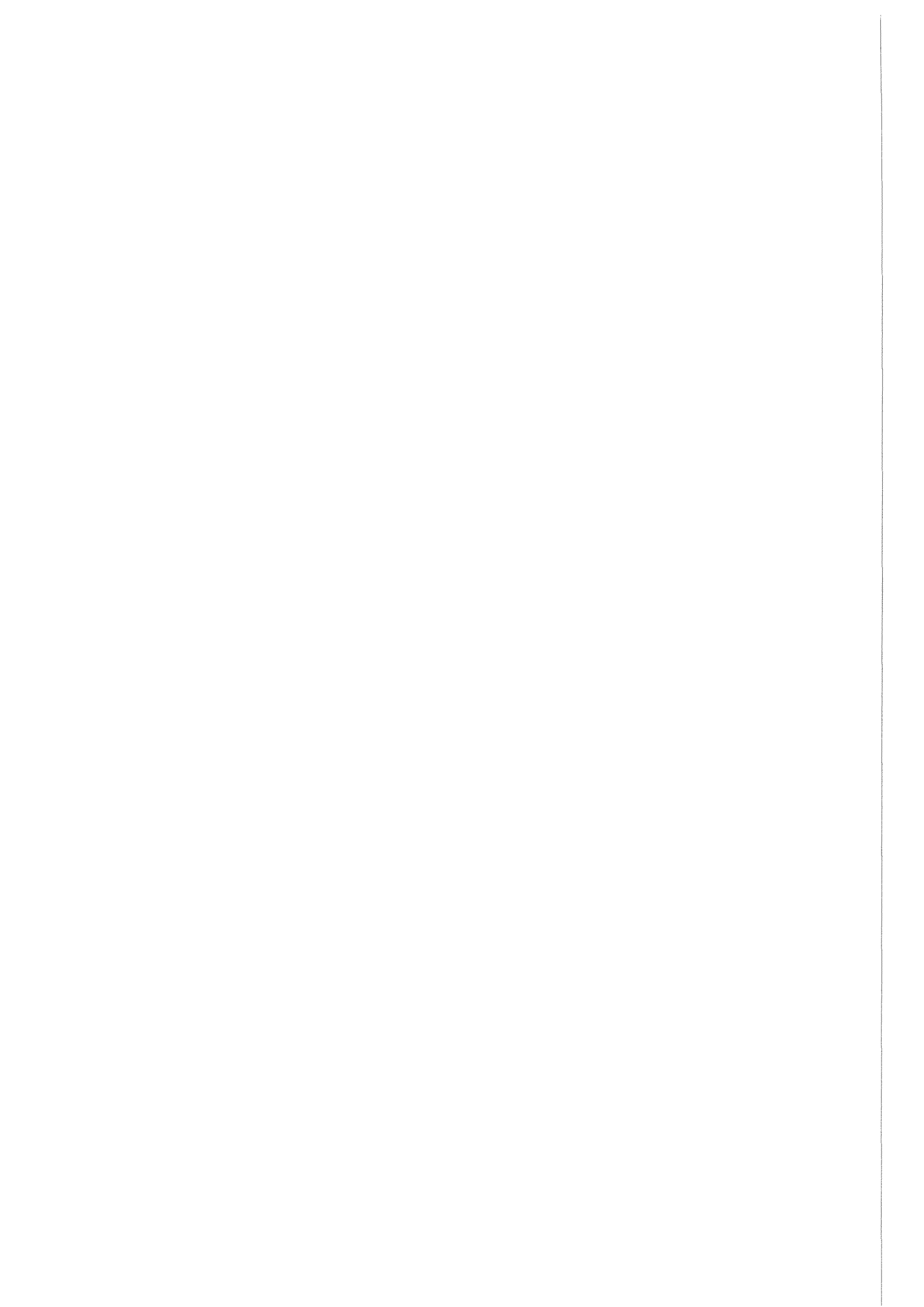


Abb.29: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinder-alveolarmakrophagen bei Inkubationen mit LaCl<sub>3</sub>.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)





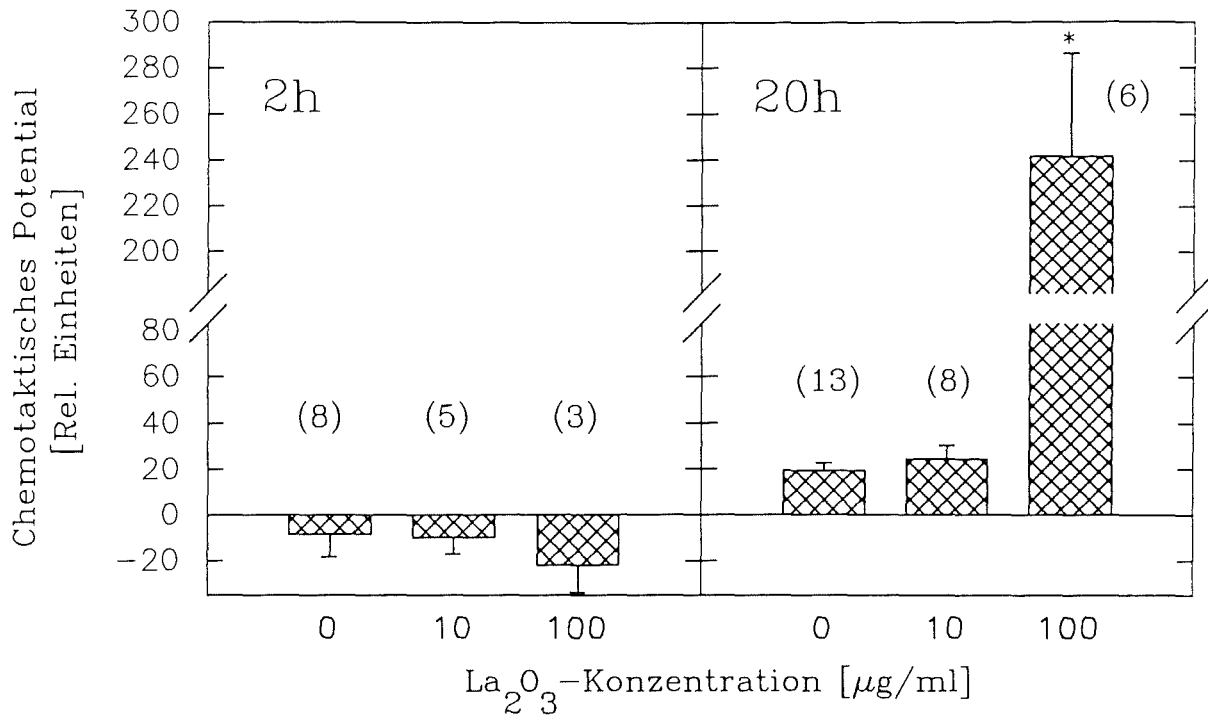


Abb.30: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen bei Inkubationen mit  $\text{La}_2\text{O}_3$ .

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer).

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )

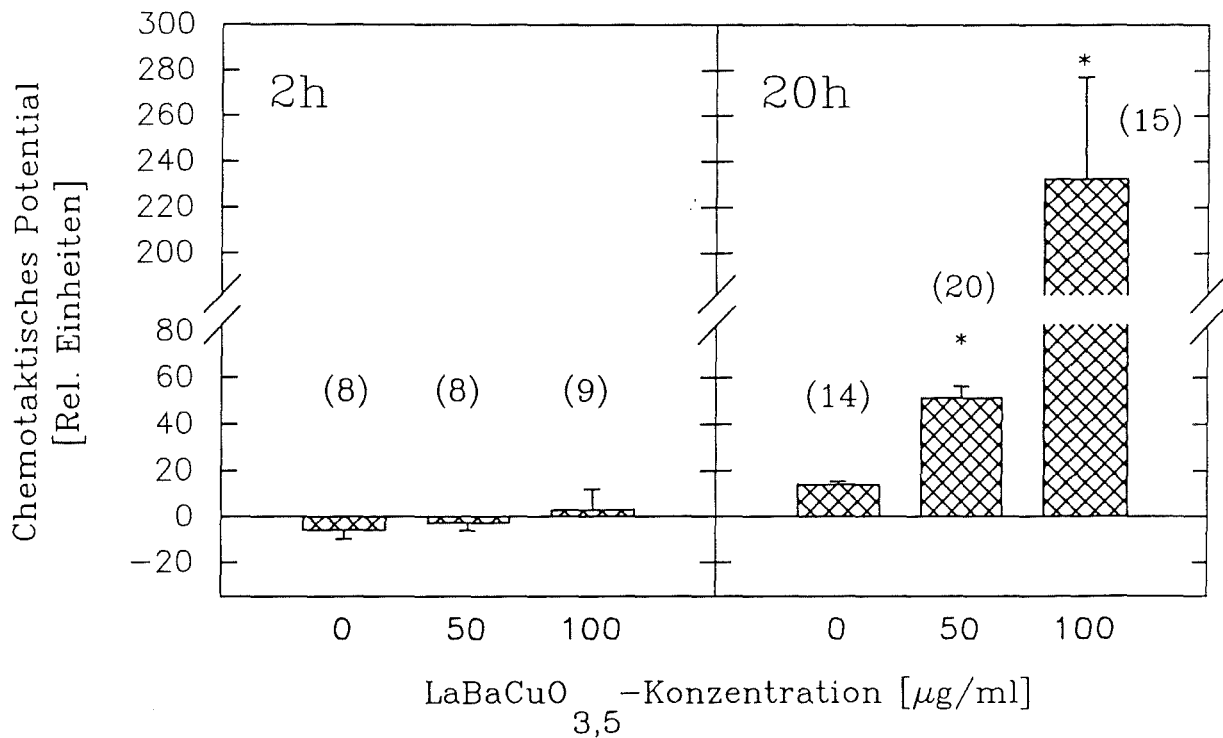
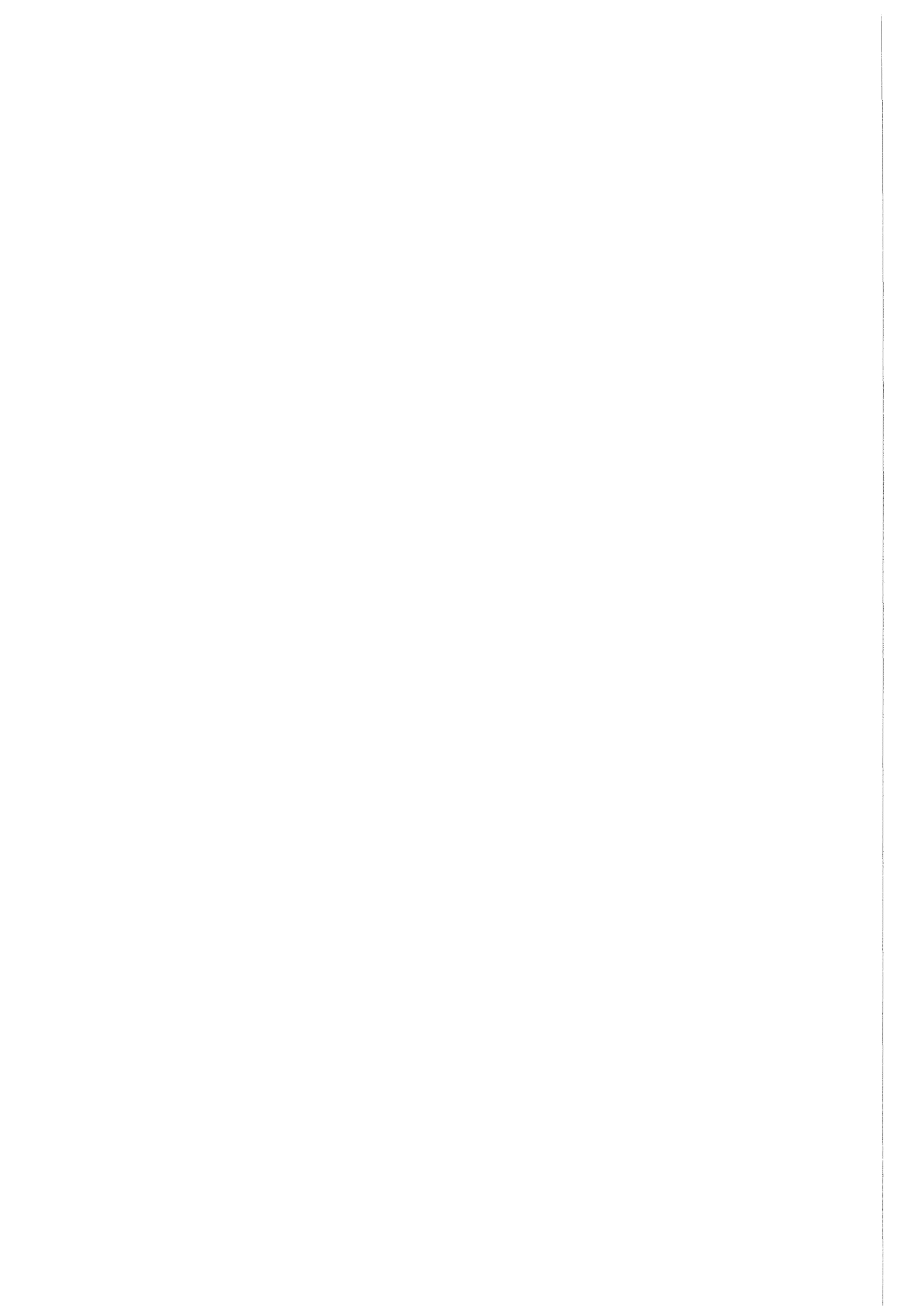


Abb.31: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen bei Inkubationen mit  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ .

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )



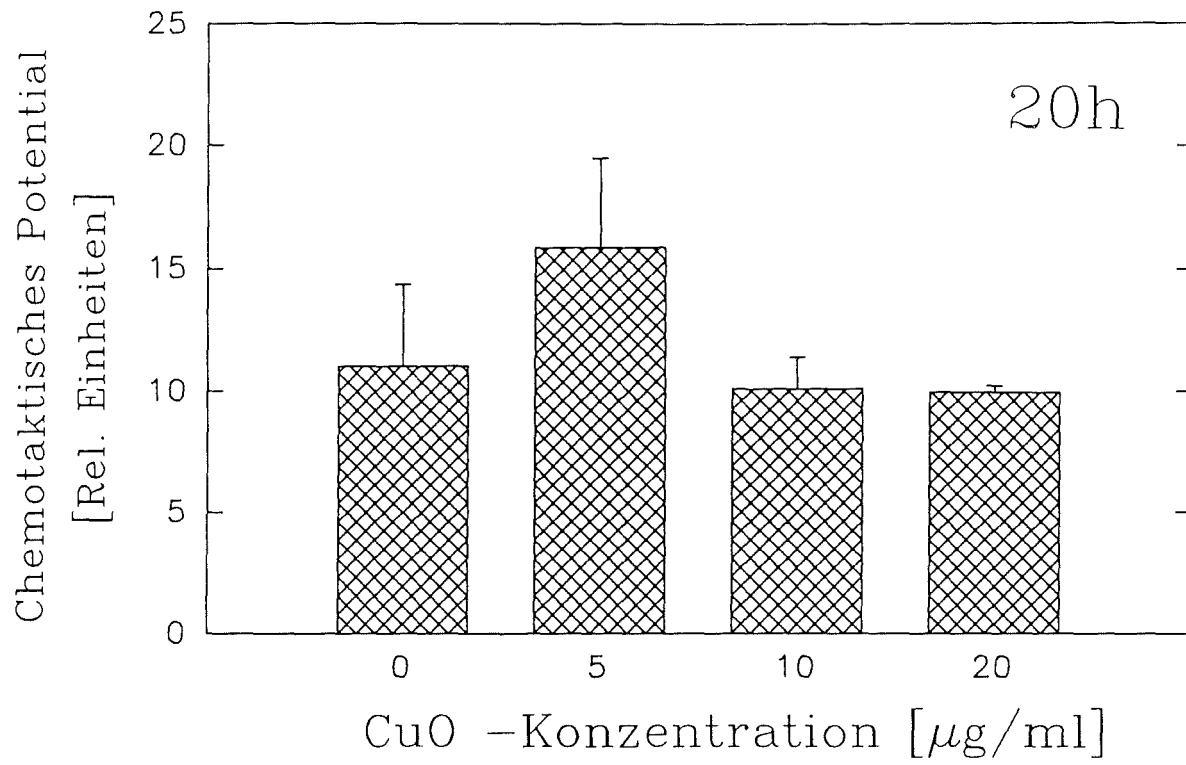
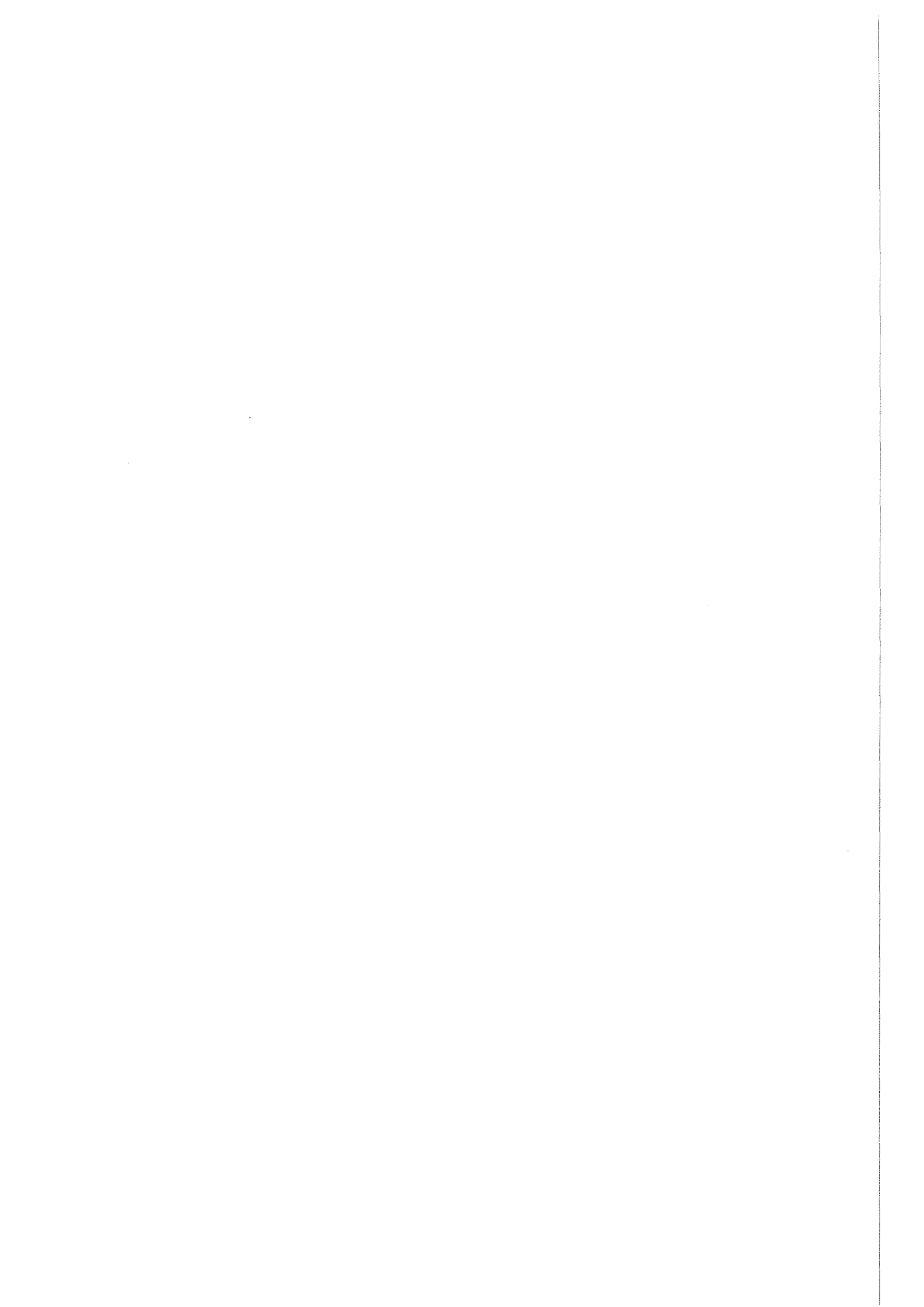


Abb.32: Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen nach 20 -stündiger Inkubation mit verschiedenen CuO -Konzentrationen.  
Mittelwerte mit Standardfehler. n = 3



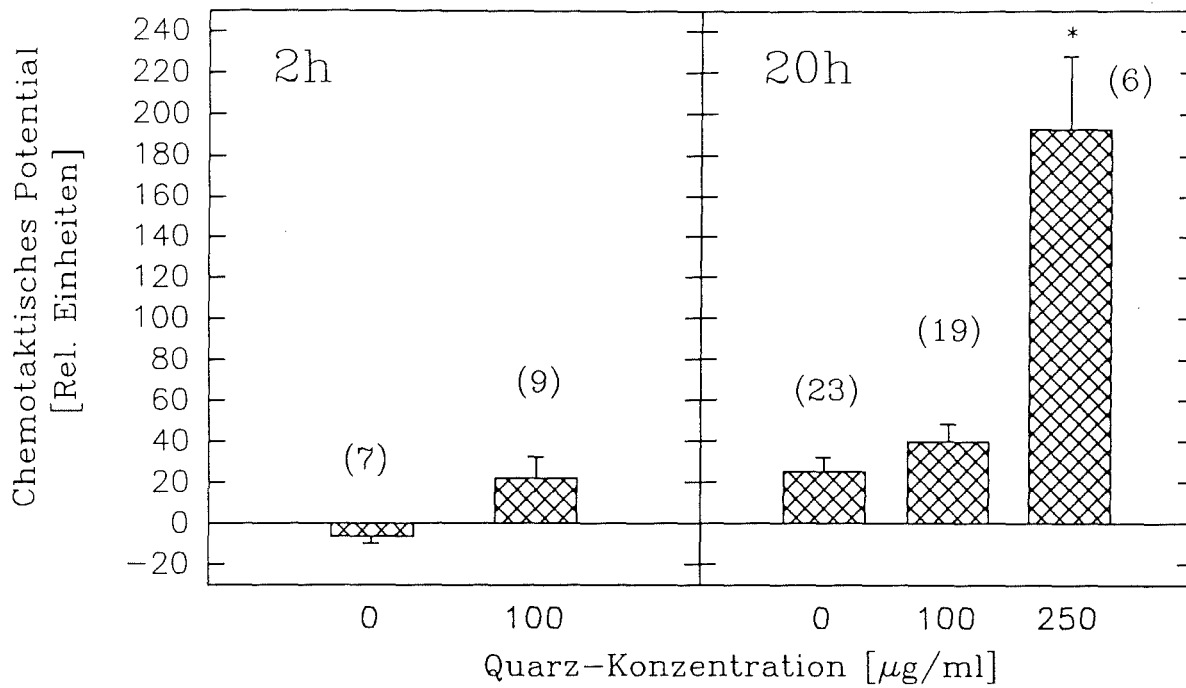


Abb.33: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen bei Inkubationen mit Quarz.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )

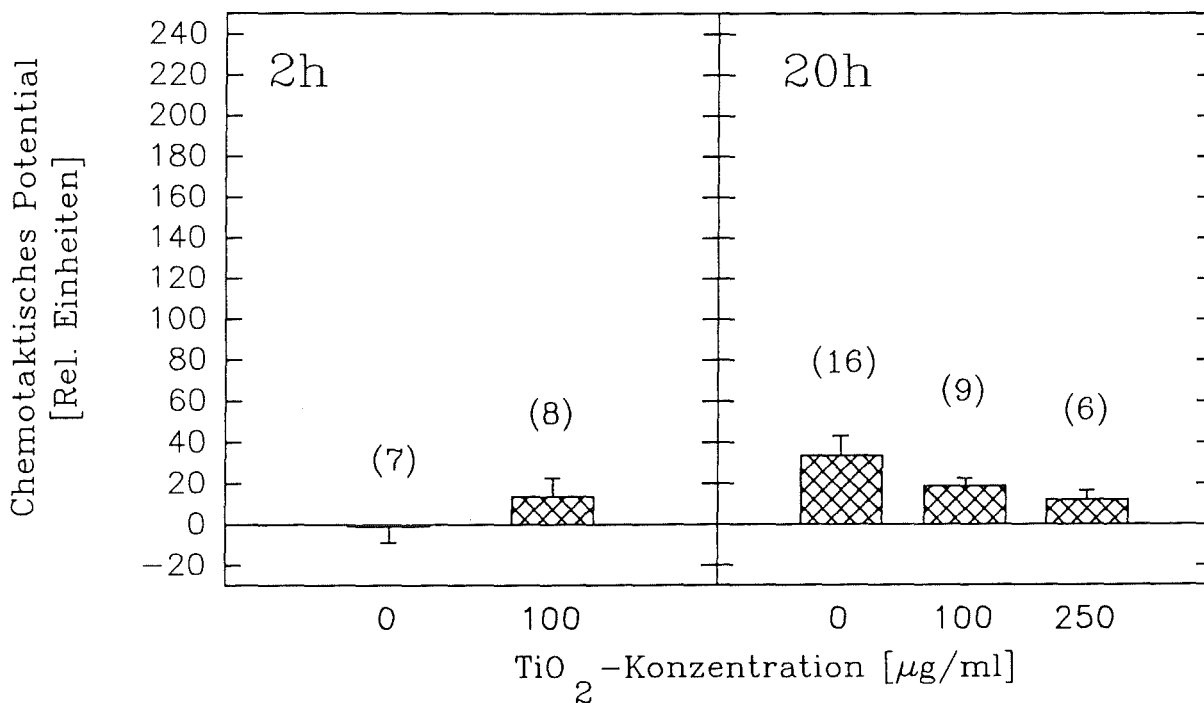
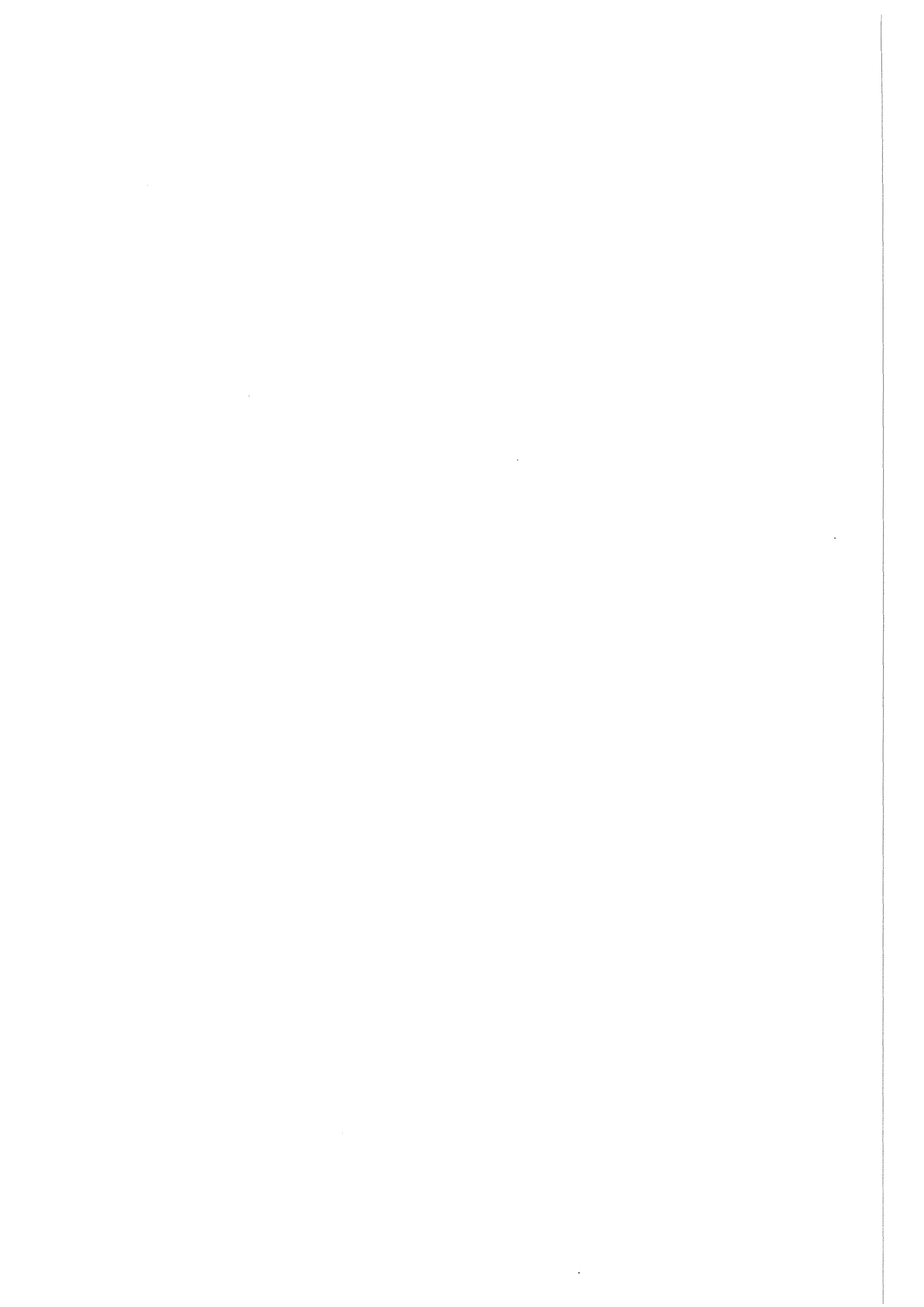


Abb.34: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen bei Inkubationen mit TiO<sub>2</sub>.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )



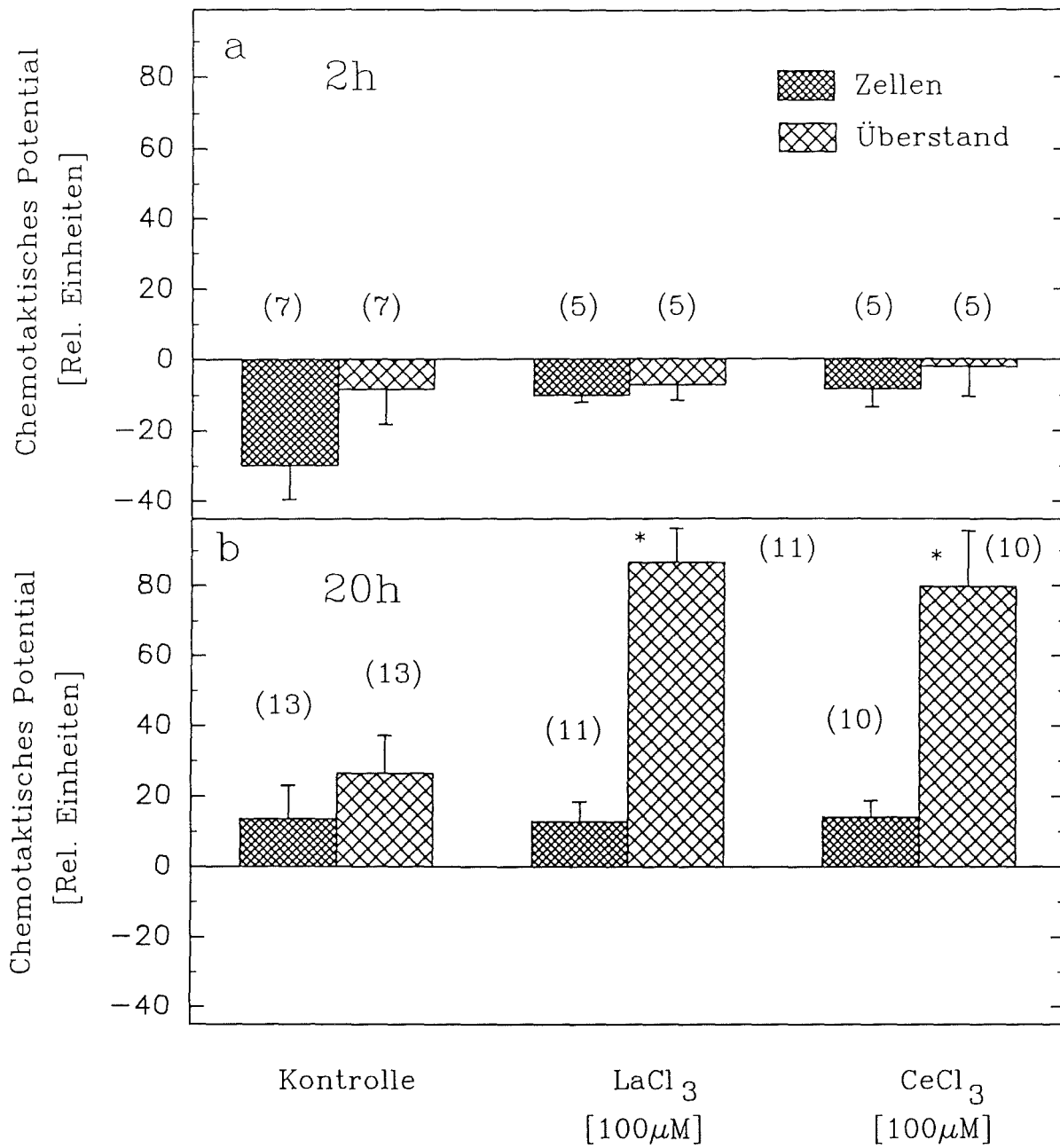


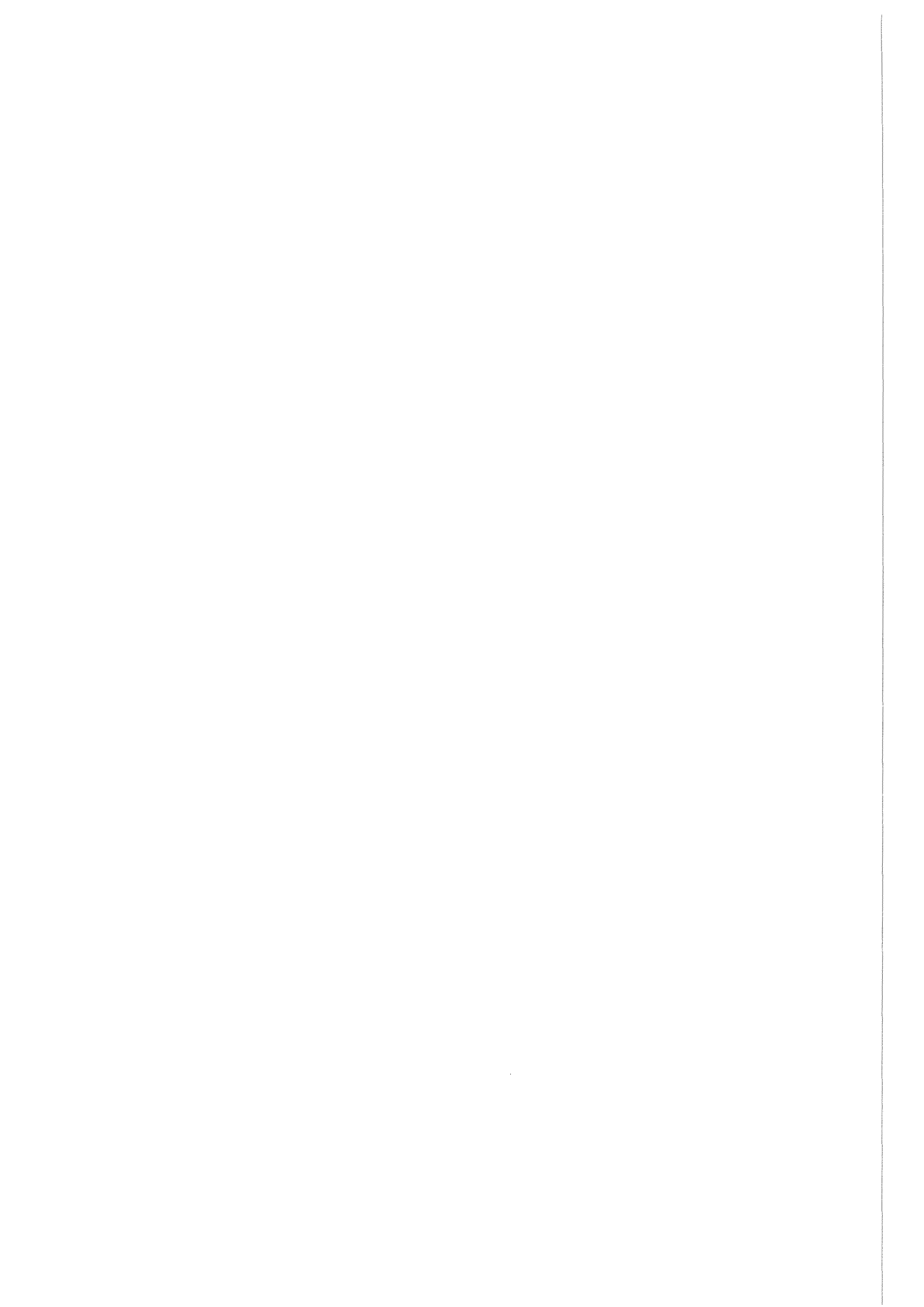
Abb.35: Zeitliche Veränderung des zellulären und extrazellulären Gehaltes an chemotaktisch wirksamen Faktoren bei Inkubationen von Rinderalveolarmakrophagen mit LaCl<sub>3</sub> bzw. CeCl<sub>3</sub>.

a) Nach 2 -stündiger Inkubation.

b) Nach 20 -stündiger Inkubation.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)





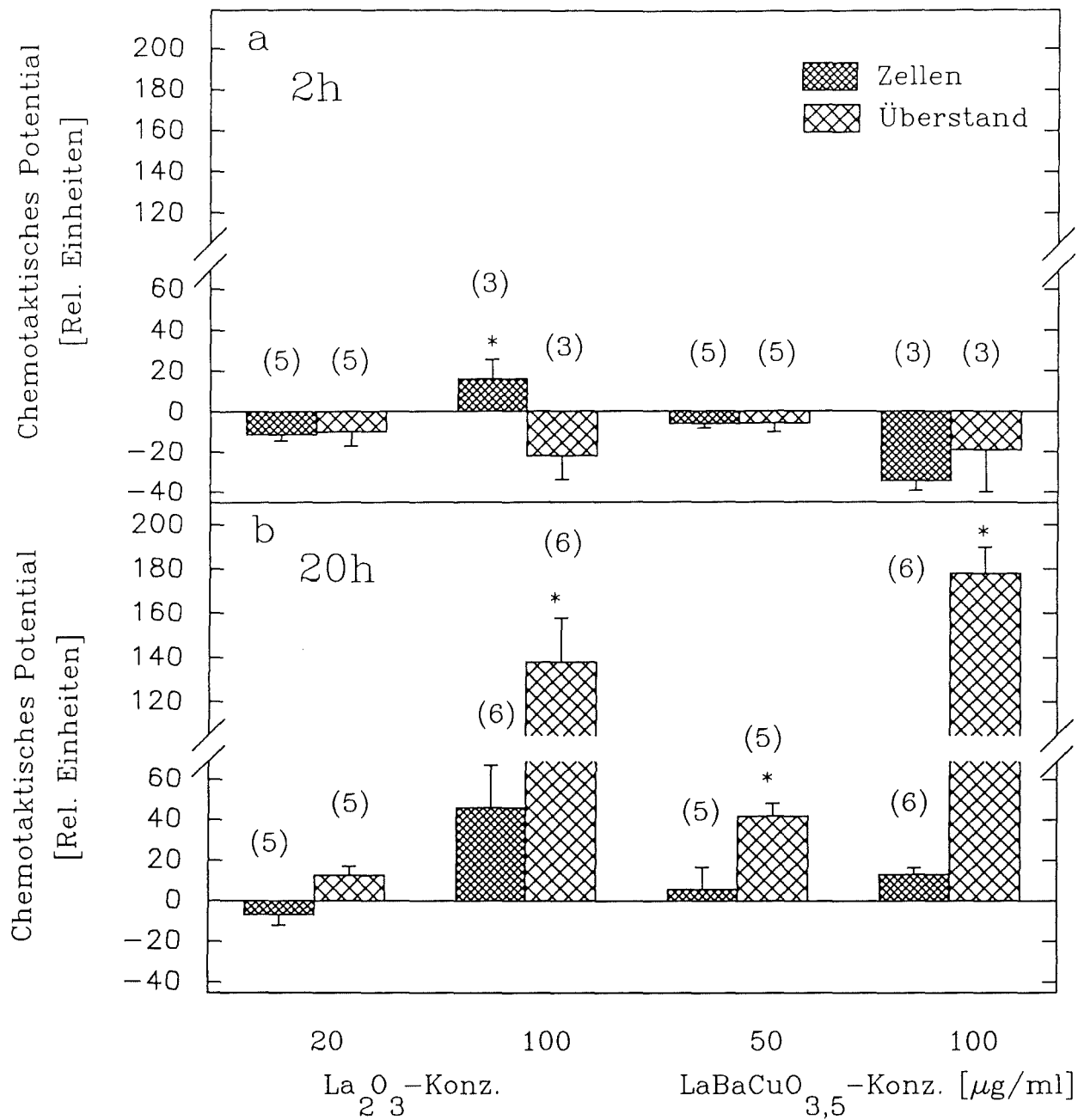


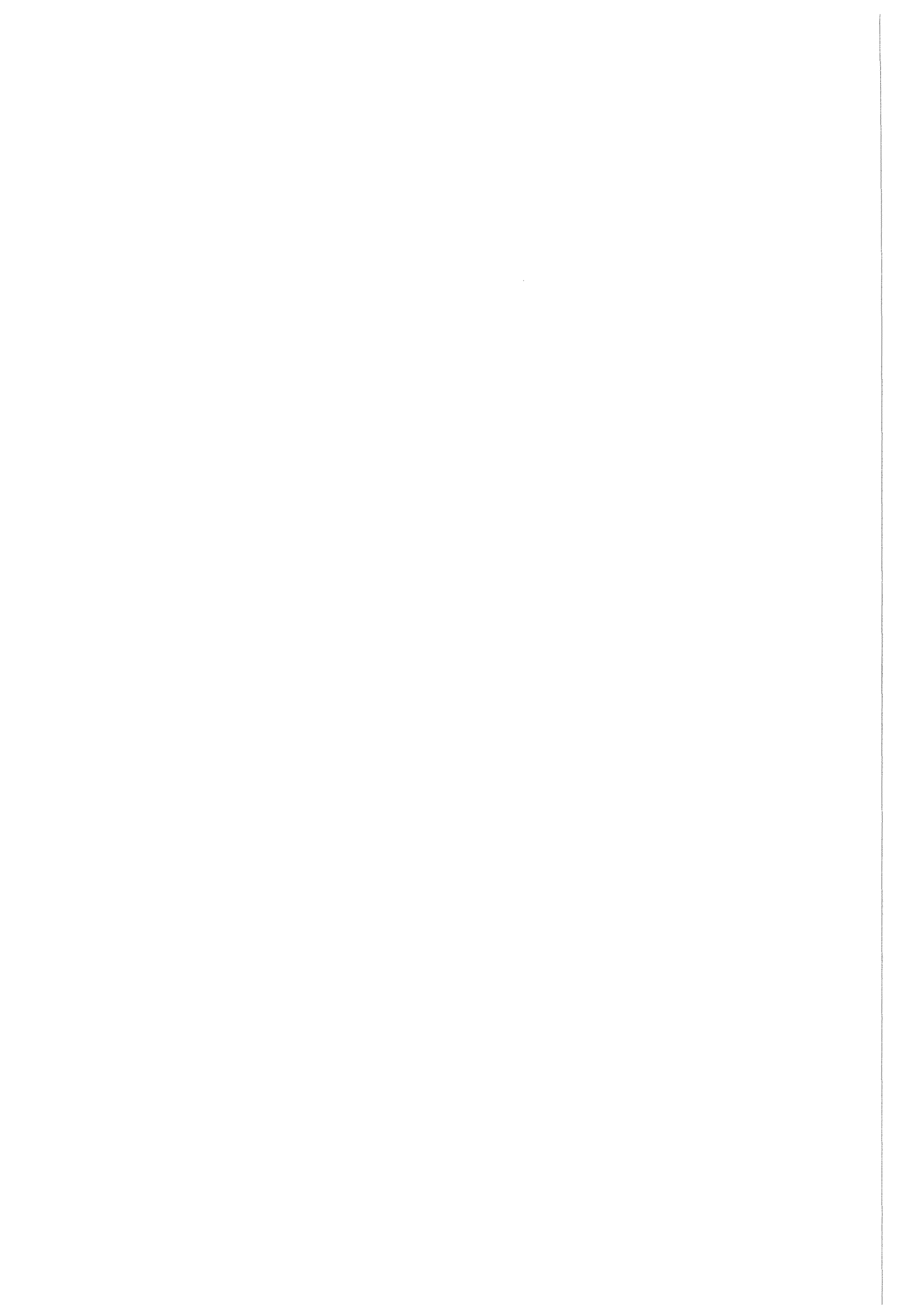
Abb.36: Zeitliche Veränderung des zellulären und extrazellulären Gehaltes an chemotaktisch wirksamen Faktoren bei Inkubationen von Rinderalveolarmakrophagen mit  $\text{La}_2\text{O}_3$  bzw.  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ .

a) Nach 2 -stündiger Inkubation.

b) Nach 20 -stündiger Inkubation.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )



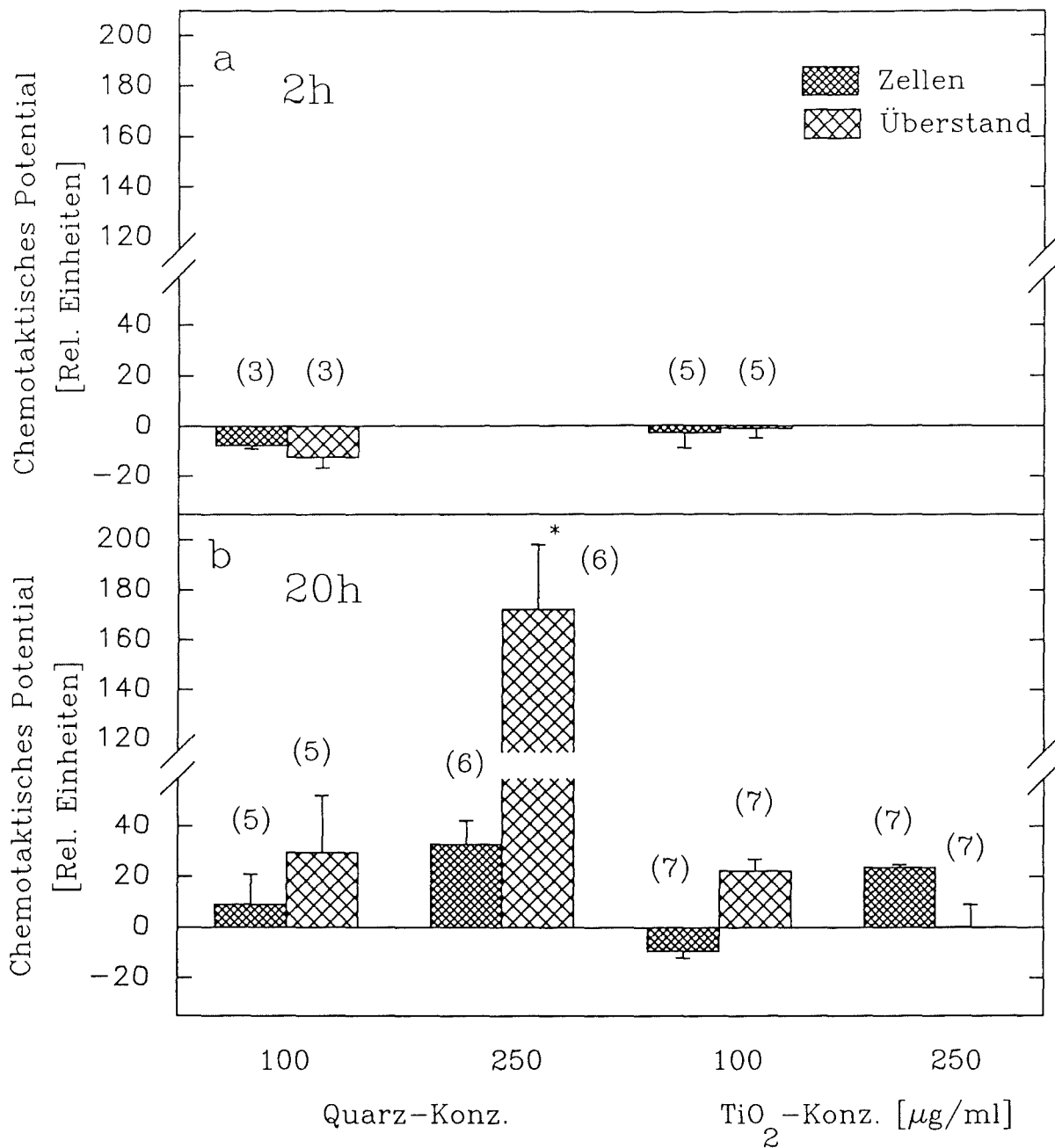


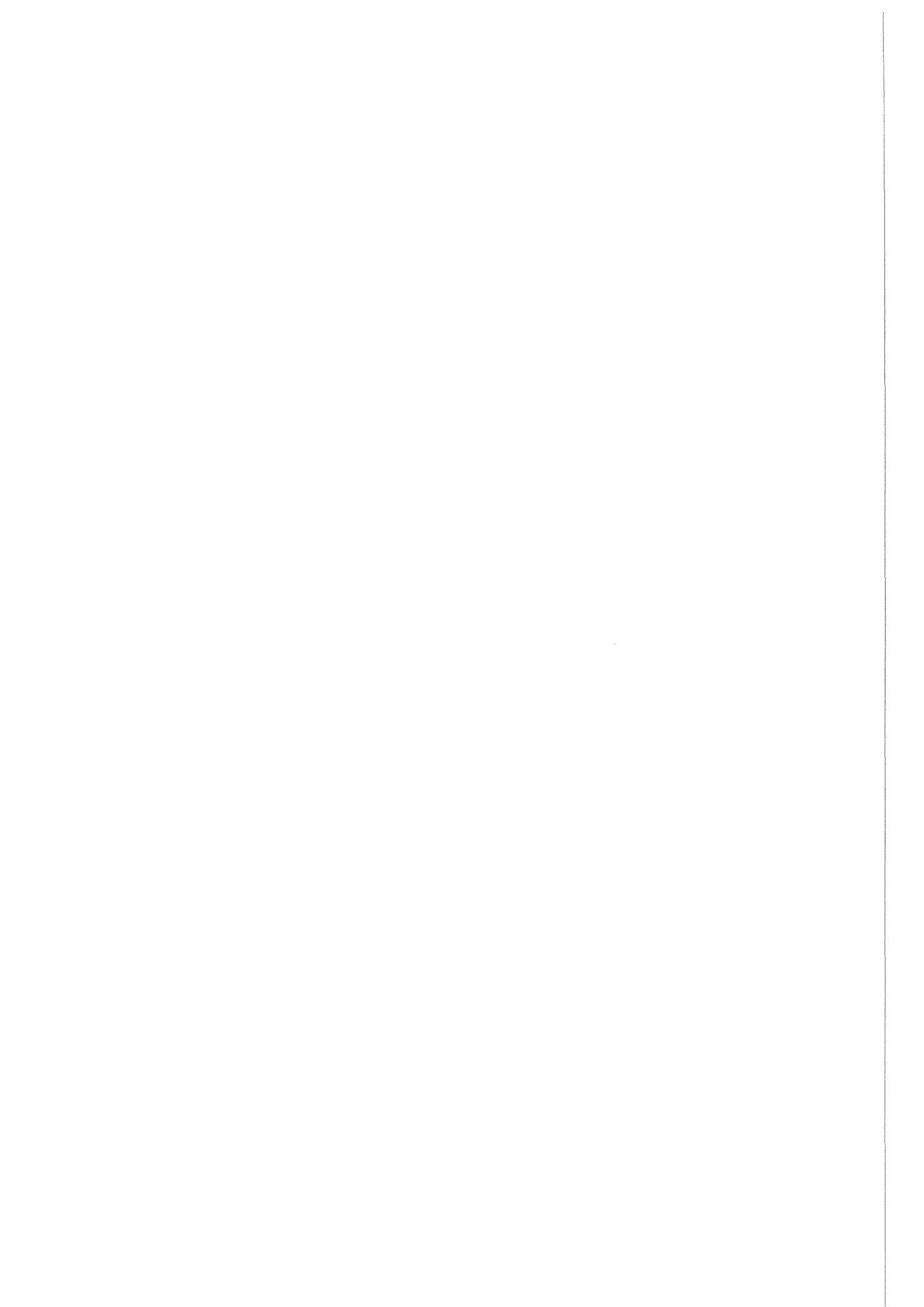
Abb.37: Zeitliche Veränderung des zellulären und extrazellulären Gehaltes an chemotaktisch wirksamen Faktoren bei Inkubationen von Rinderalveolarmakrophagen mit Quarz bzw. TiO<sub>2</sub>

a) Nach 2 -stündiger Inkubation.

b) Nach 20 -stündiger Inkubation.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)



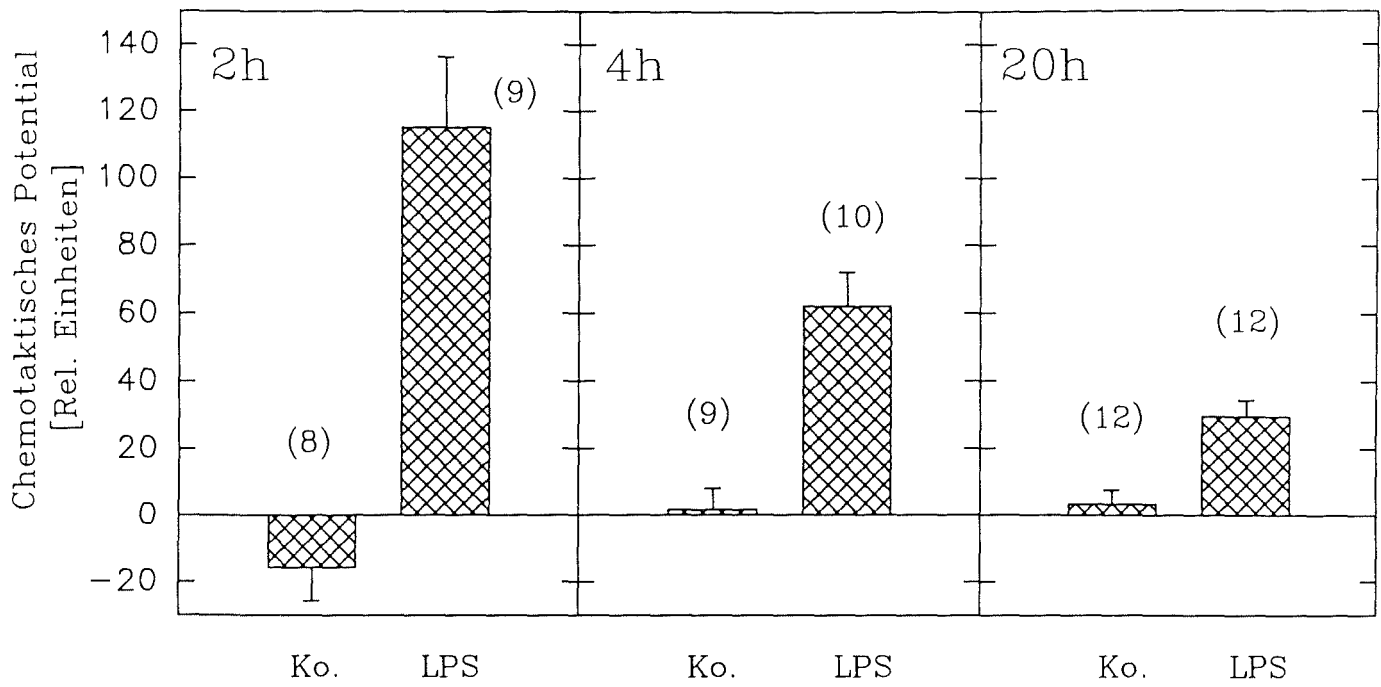
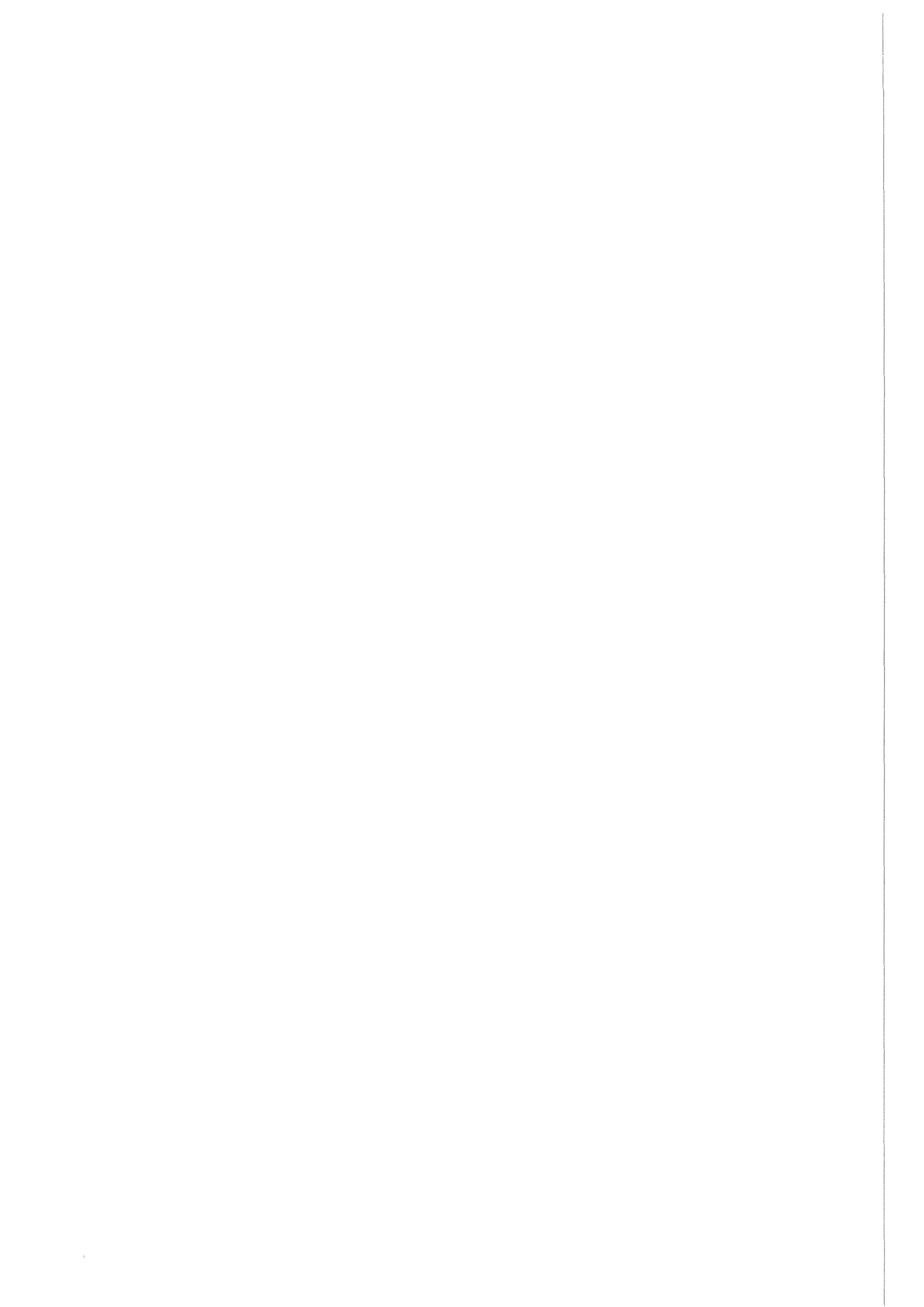


Abb.38: Zeitabhängigkeit der Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolar-makrophagen bei Inkubationen mit Lipopolysaccharid von *Salmonella abortus equi* (LPS, 10  $\mu$ g/ml). Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)



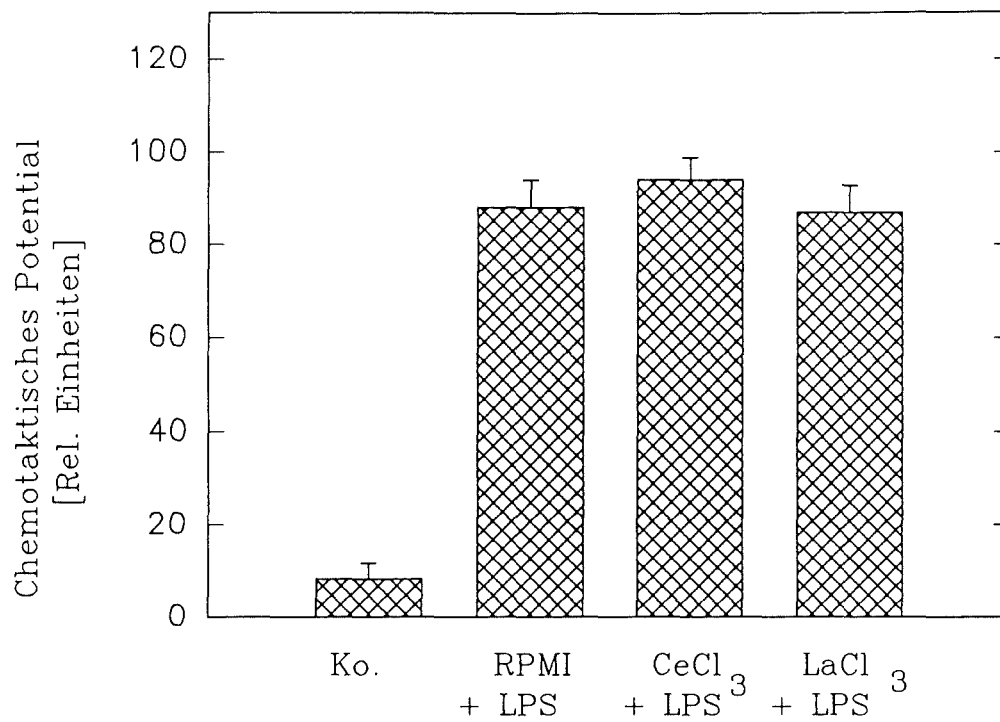


Abb.39: Einfluß einer gleichzeitigen Inkubation mit LaCl<sub>3</sub> (100 µM) oder CeCl<sub>3</sub> (100 µM) auf die LPS-induzierte (10 µg/ml) Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen. Mittelwerte mit Standardfehler. n = 3.

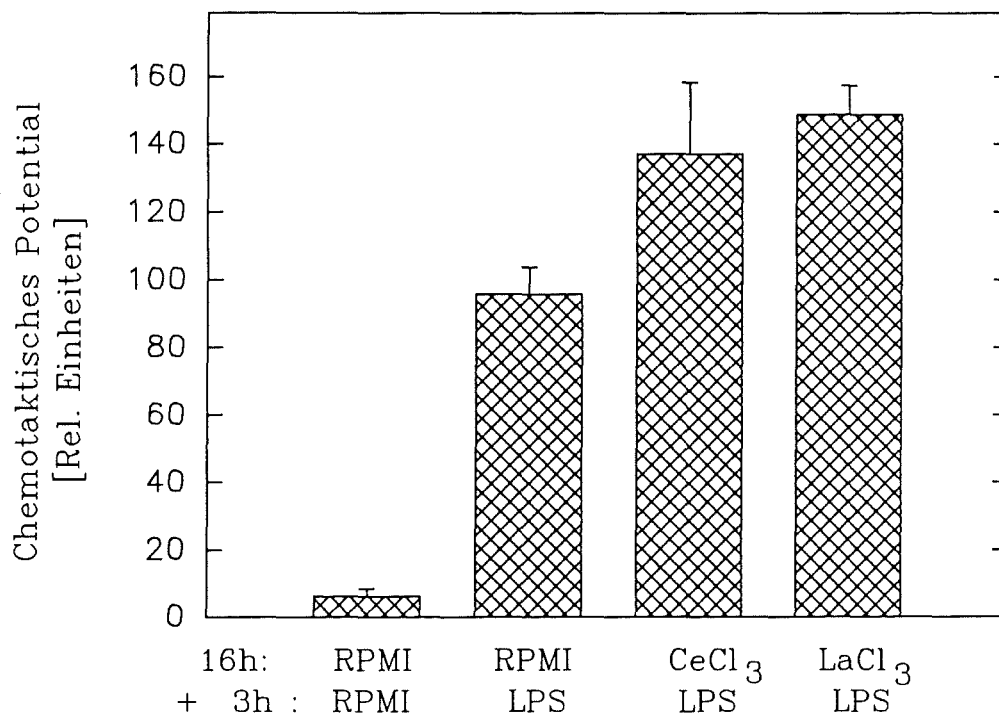
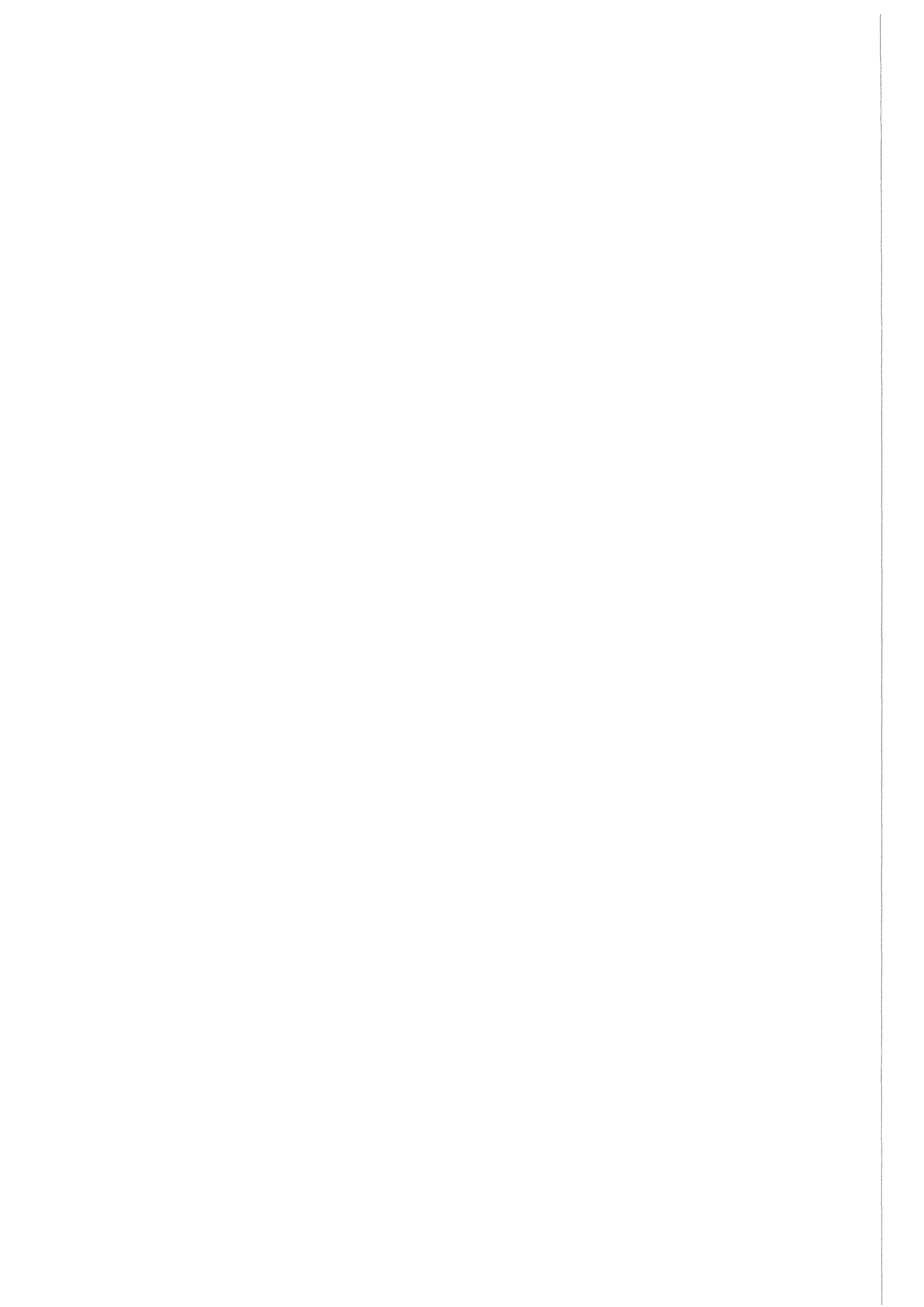


Abb.40: Einfluß einer 16-stündigen Vorinkubation mit Medium (RPMI), LaCl<sub>3</sub> (100 µM) oder CeCl<sub>3</sub> (100 µM) auf die LPS-induzierte Freisetzung (10 µg/ml) von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen. Mittelwerte mit Standardfehler. n = 3





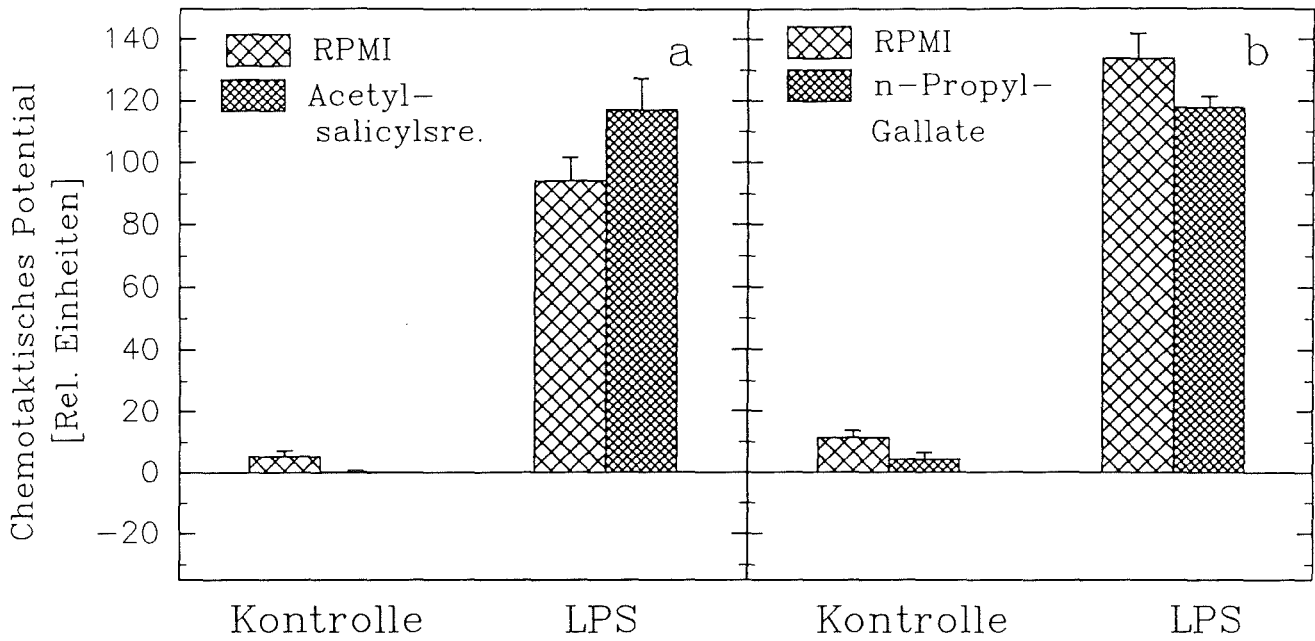
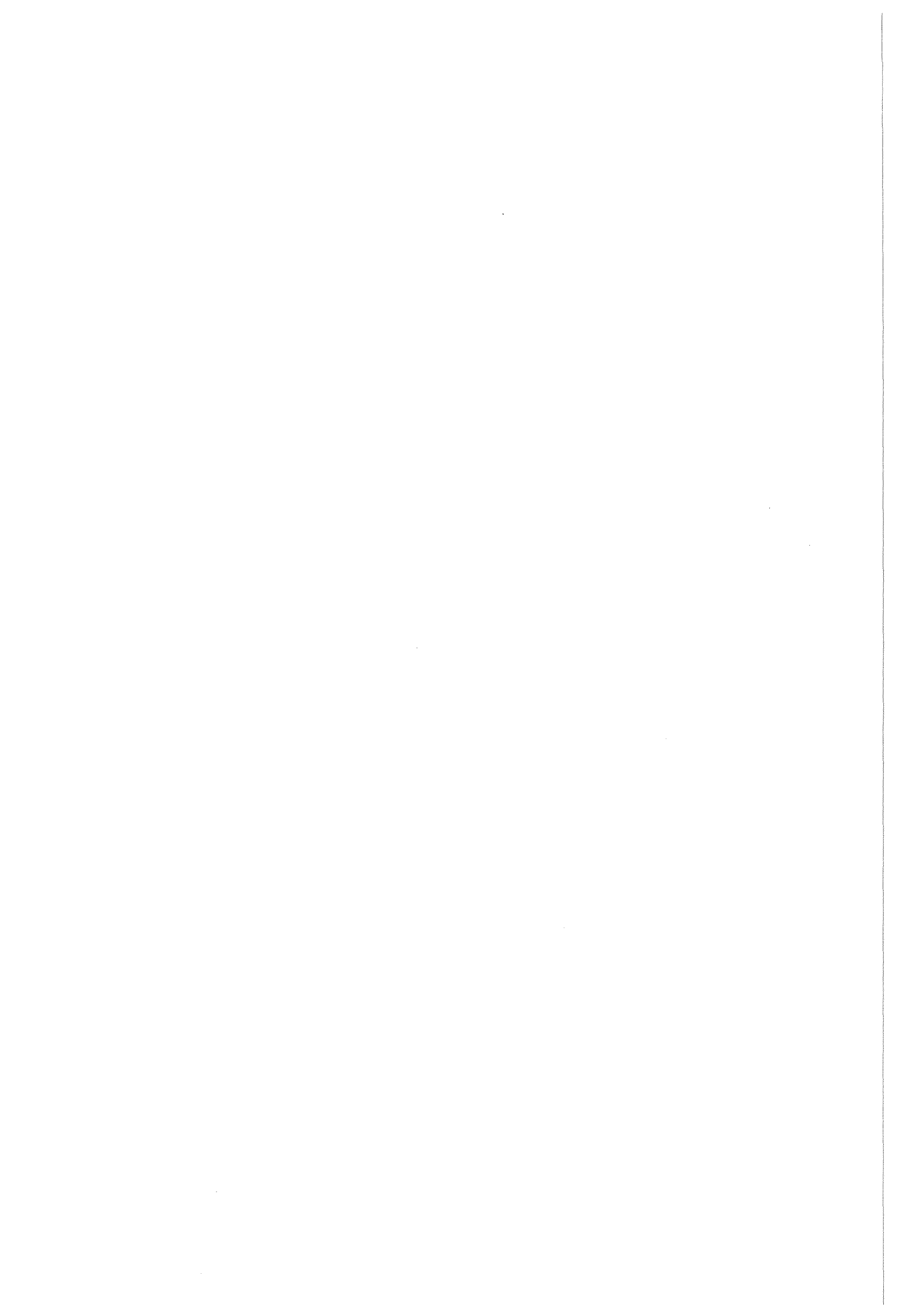


Abb.41: Einfluß der Vorinkubation mit Acetylsalicylsäure bzw. N-Propyl-Gallate auf die LPS-induzierte Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen.  
 a) 30 -minütige Vorinkubation mit Medium (RPMI) oder 1 mM Acetylsalicylsäure und nachfolgende Stimulation mit LPS (3h, 10  $\mu$ g/ml).  
 b) 30 -minütige Vorinkubation mit Medium (RPMI) oder 200  $\mu$ M N-Propyl-Gallate und nachfolgend gleichzeitige Inkubation mit LPS (3h, 10  $\mu$ g/ml).  
 Mittelwerte mit Standardfehler. n = 3



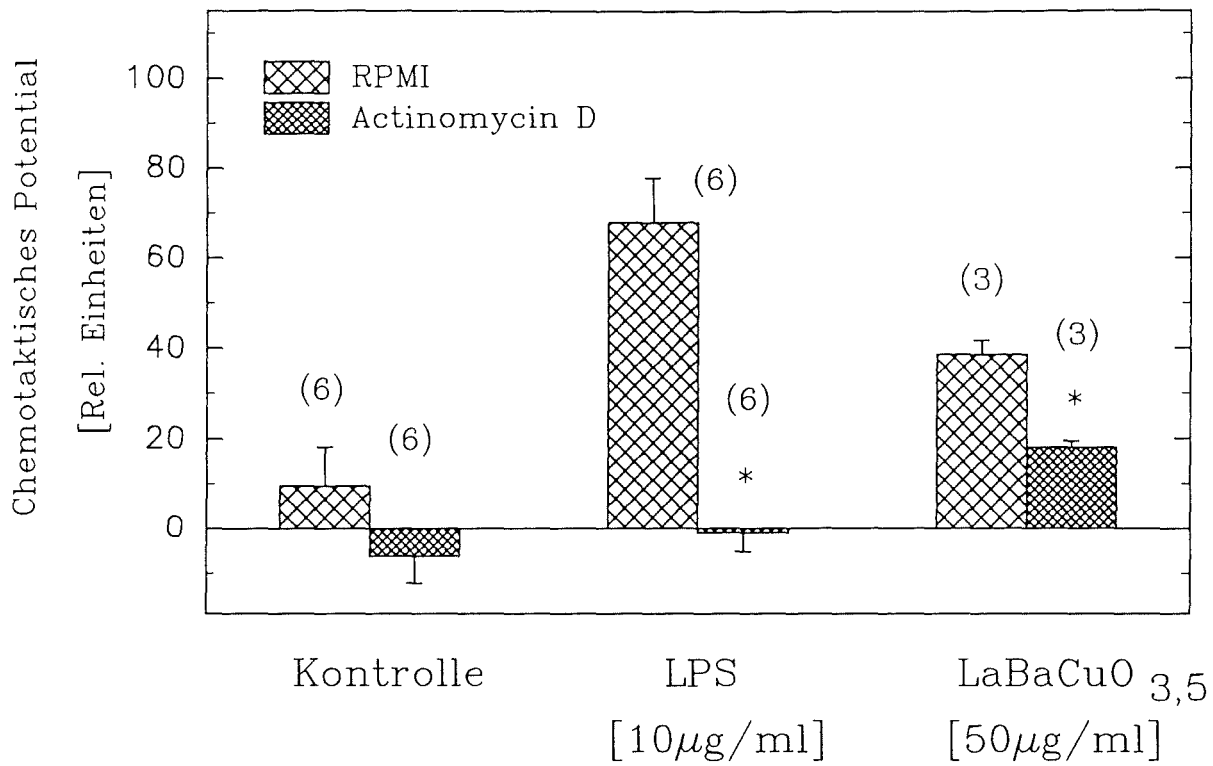
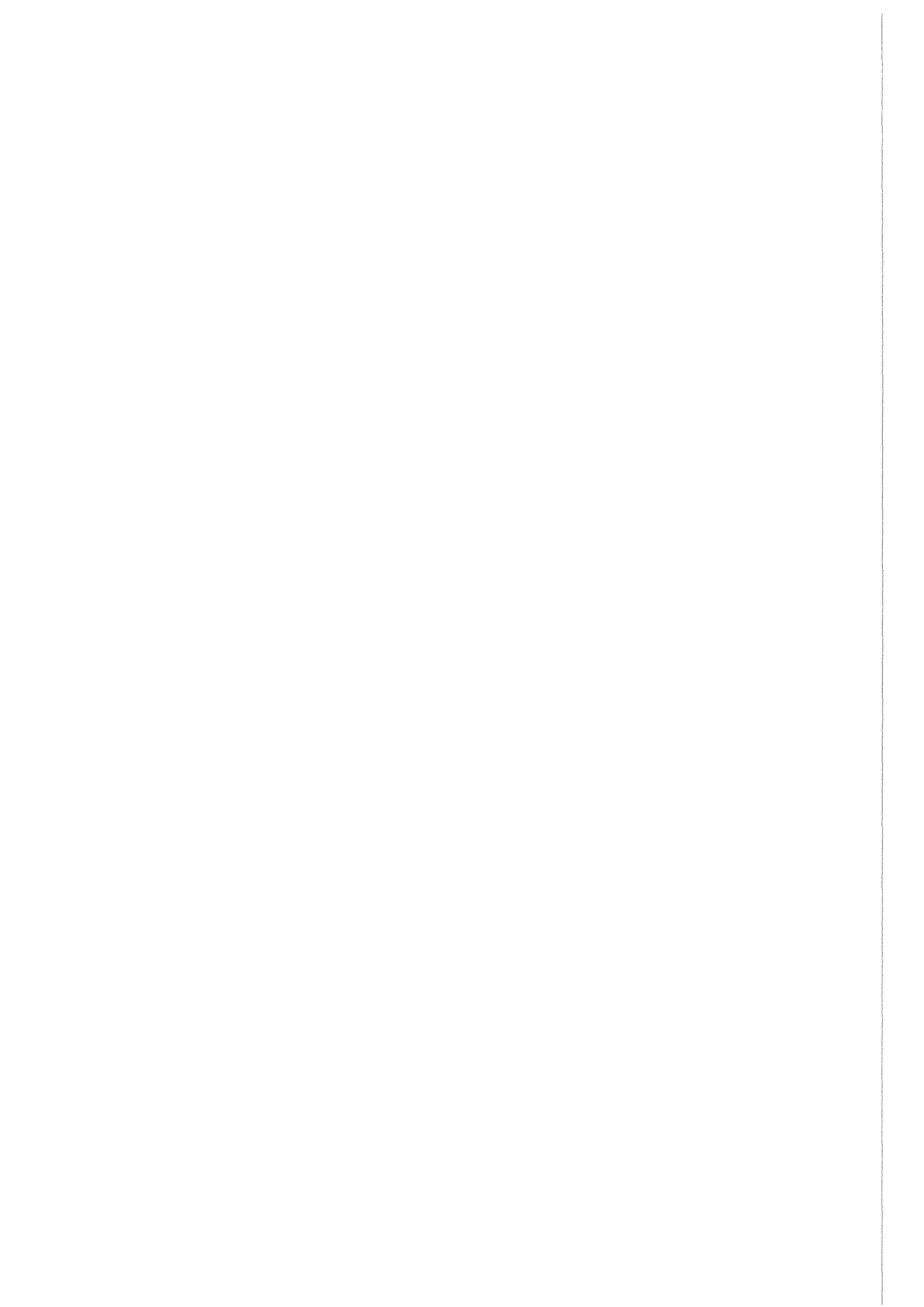


Abb.42: Einfluß von Actinomycin D (10 µg/ml) auf die LPS- (3h, 10 µg/ml) bzw. LaBaCuO<sub>3,5</sub> (20h, 50 µg/ml) induzierte Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren durch Rinderalveolarmakrophagen.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)



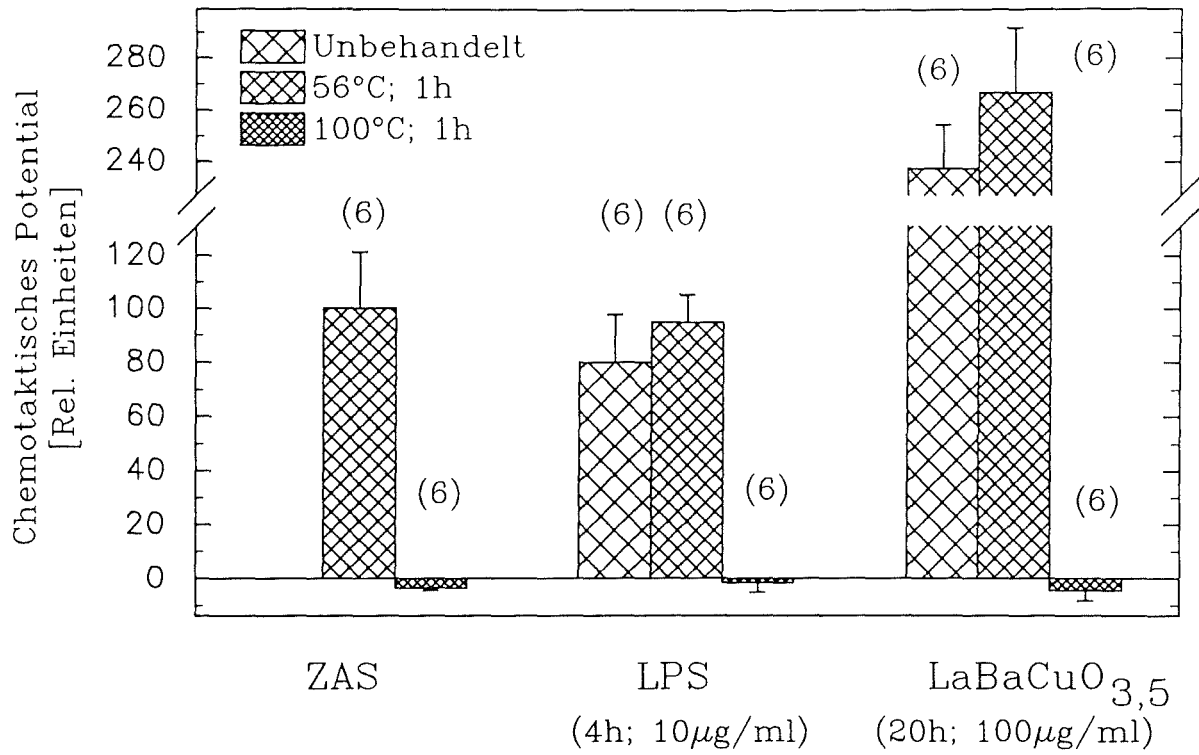


Abb.43: Thermische Beeinflussung des chemotaktischen Potentials der Überstände von LPS- bzw. LaBaCuO<sub>3,5</sub>-inkubierten Rinderalveolarmakrophagen und von ZAS. Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)



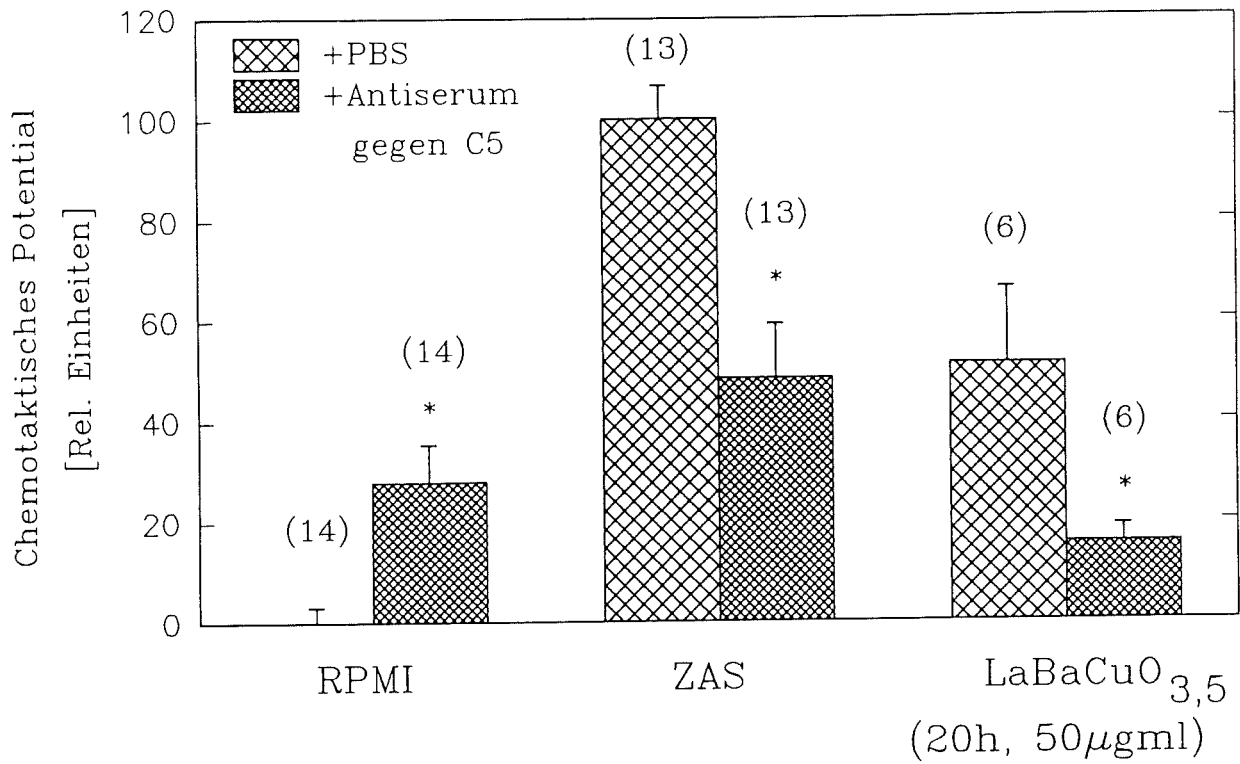
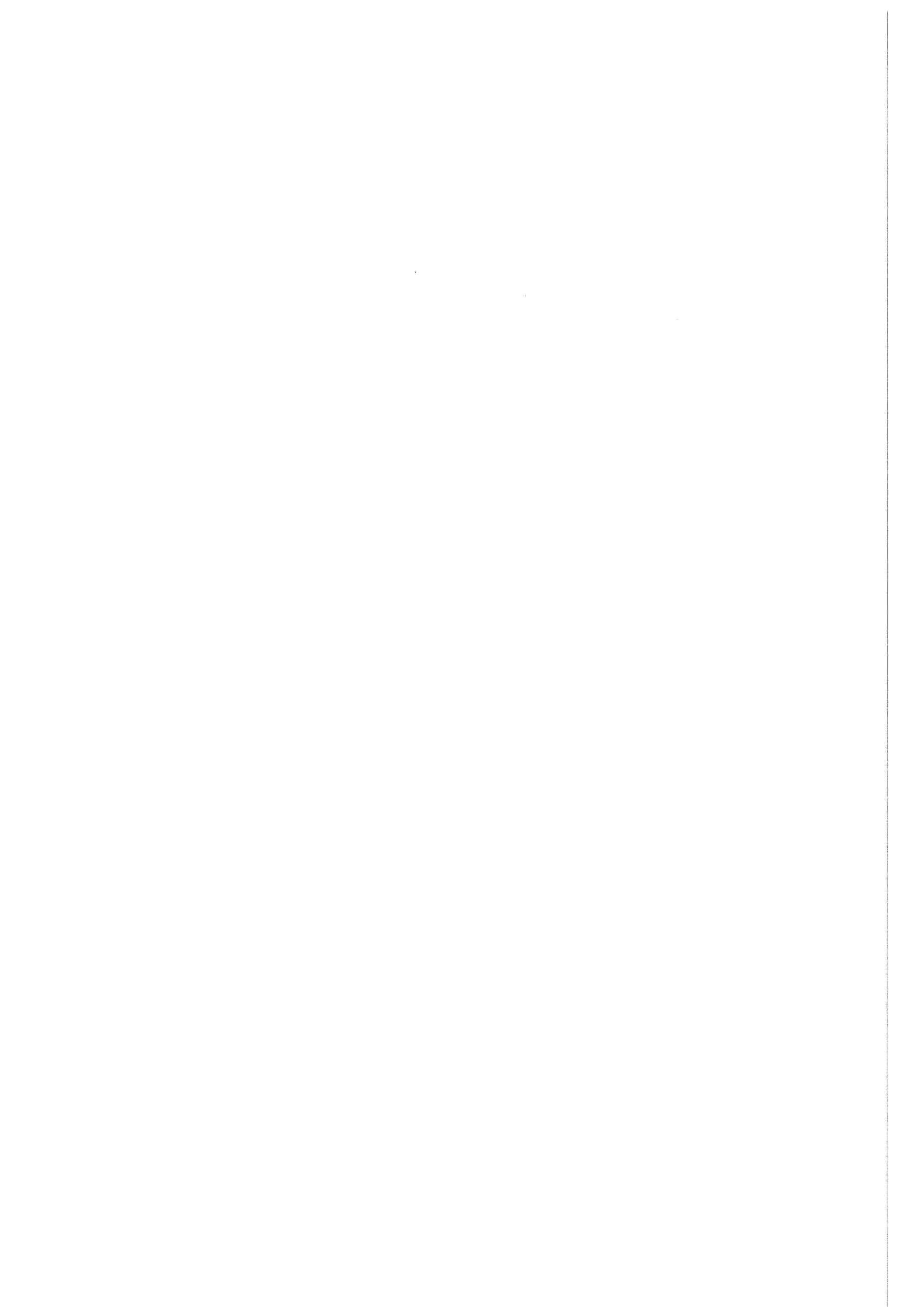


Abb.44: Einfluß einer 2 -ständigen Inkubation mit Antikörpern gegen Komplementfaktor C5 auf das chemotaktische Potential des Überstandes von LaBaCuO<sub>3,5</sub> -inkubierten Rinderalveolarmakrophagen bzw. von ZAS.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )





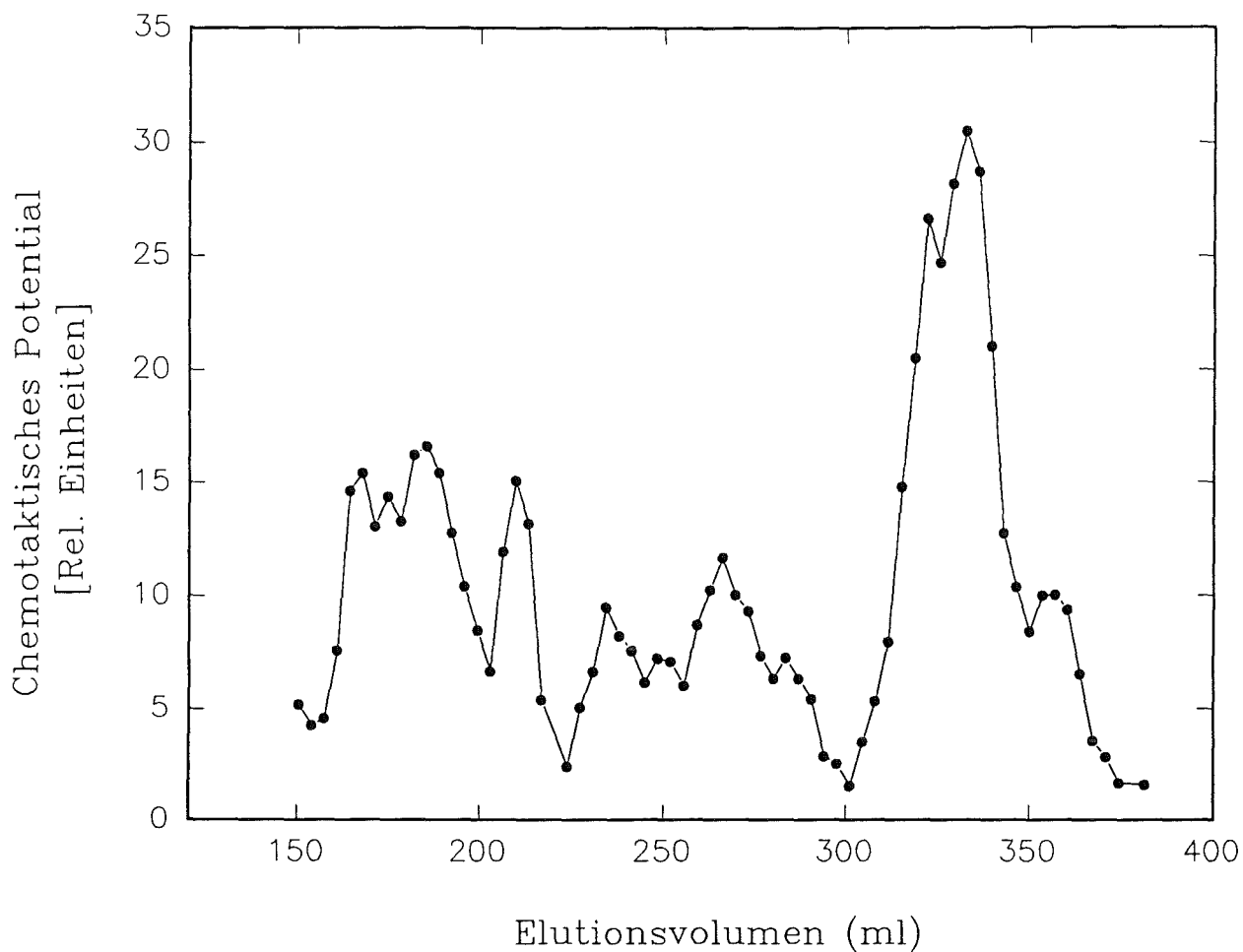
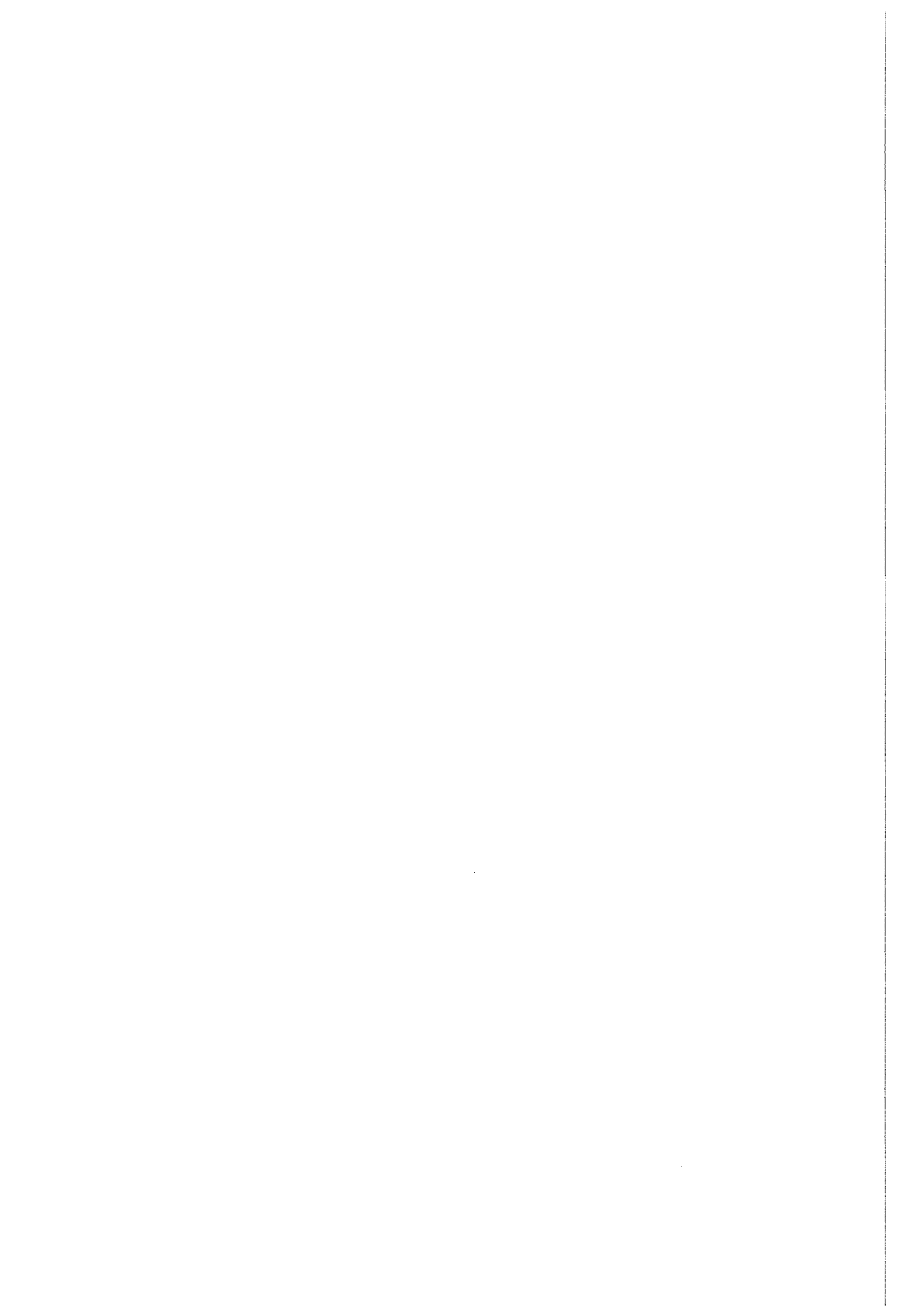


Abb.45: Chemotaktische Potentiale der durch Gelfiltration (Sephacryl S 200) erhaltenen Einzelfractionen des Überstandes von  $\text{LaBaCuO}_{3,5}$ -inkubierten Rinderalveolarmakrophagen (20h,  $50 \mu\text{g/ml}$ ).



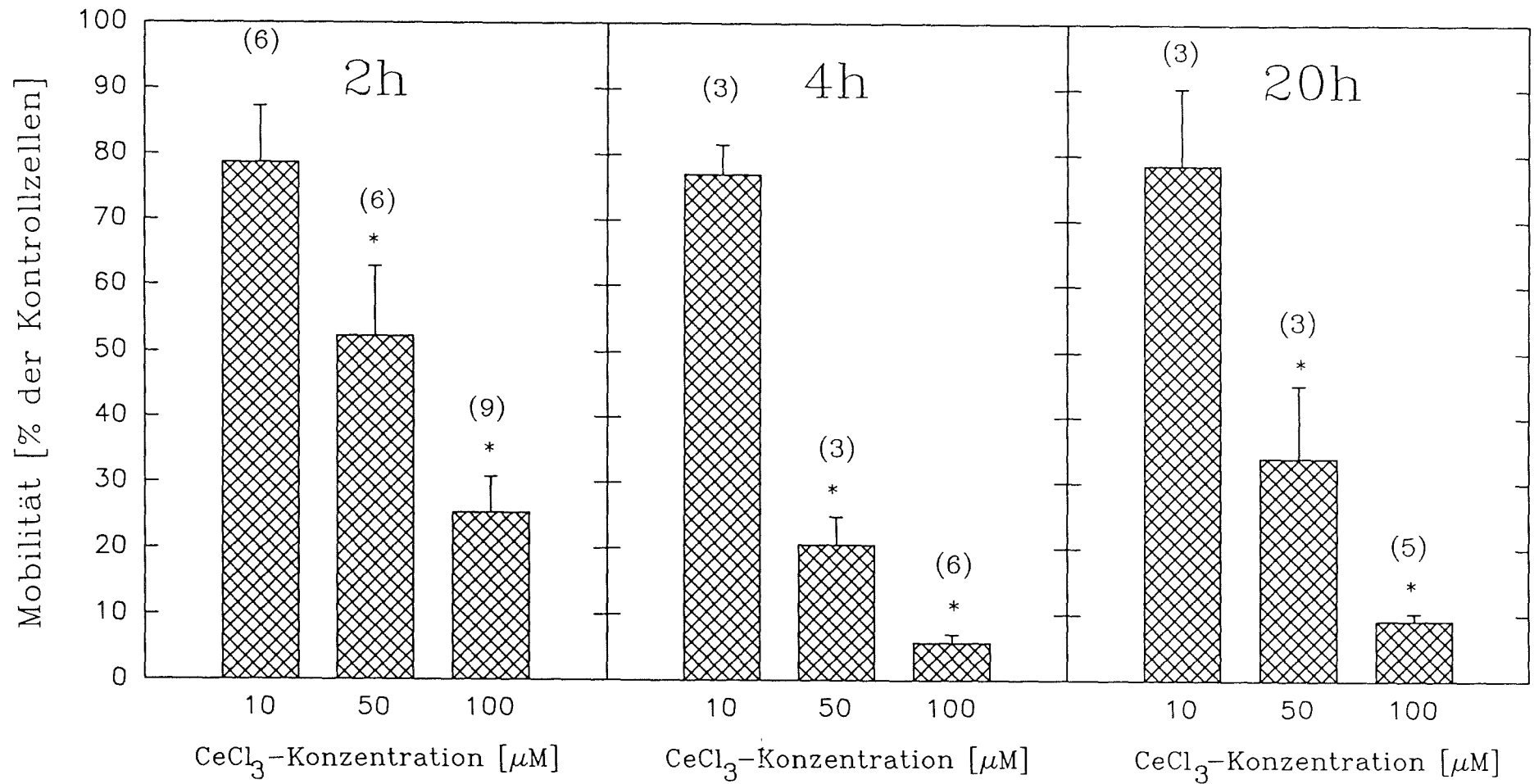
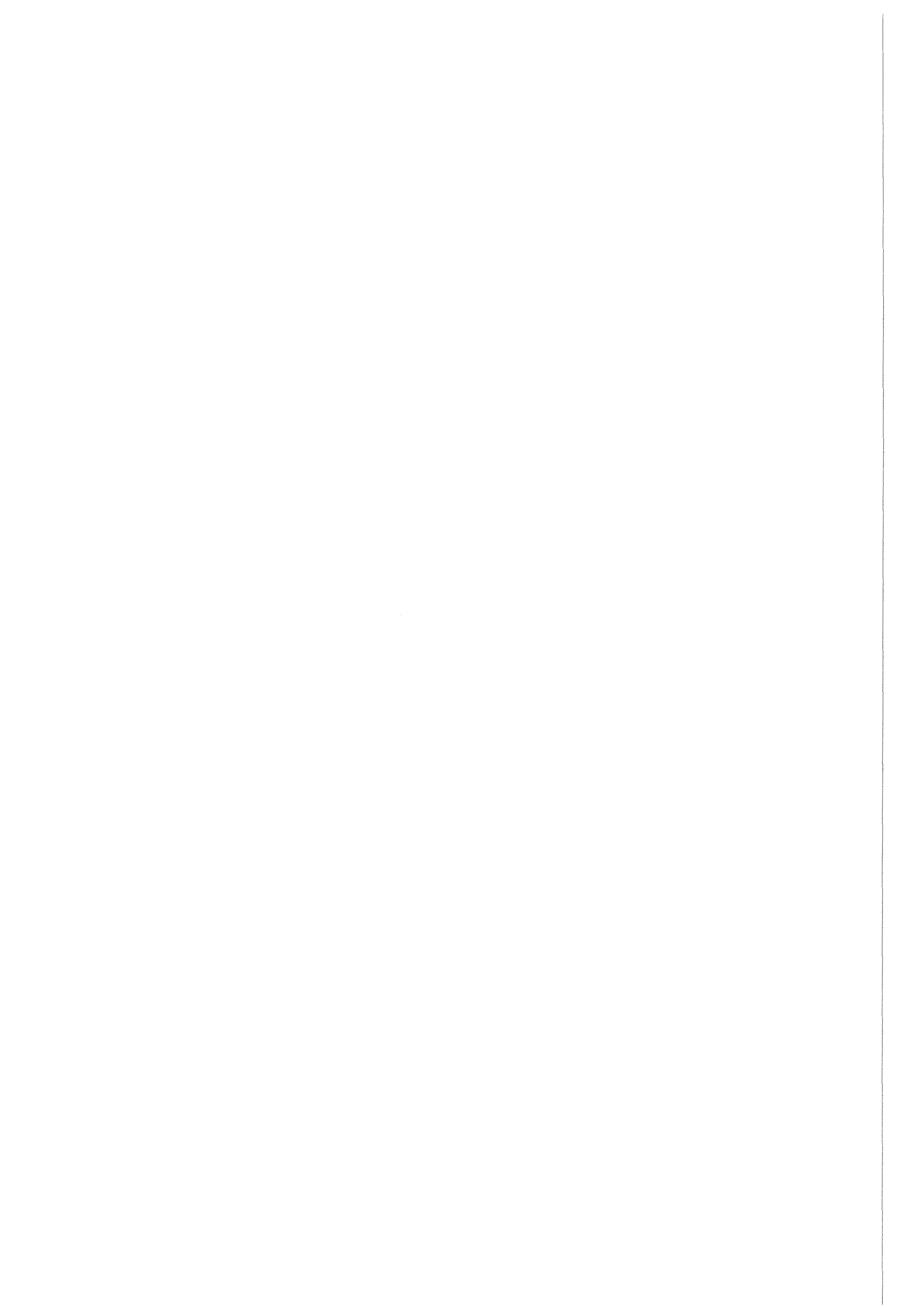


Abb.46: Einfluß verschiedener CeCl<sub>3</sub> -Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Mobilität von Rinderalveolarmakrophagen.

(in % der Kontrollzellen)

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)



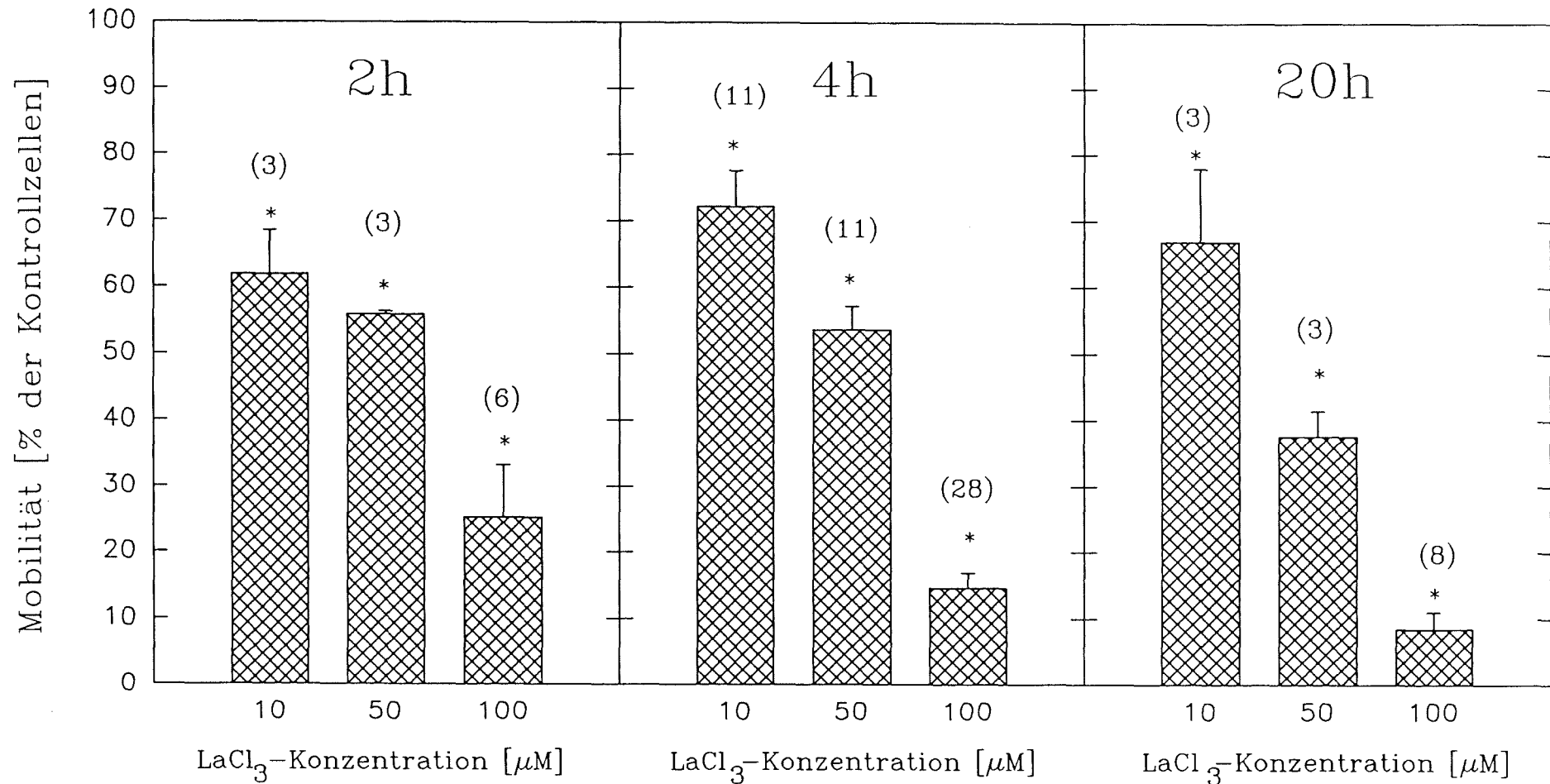
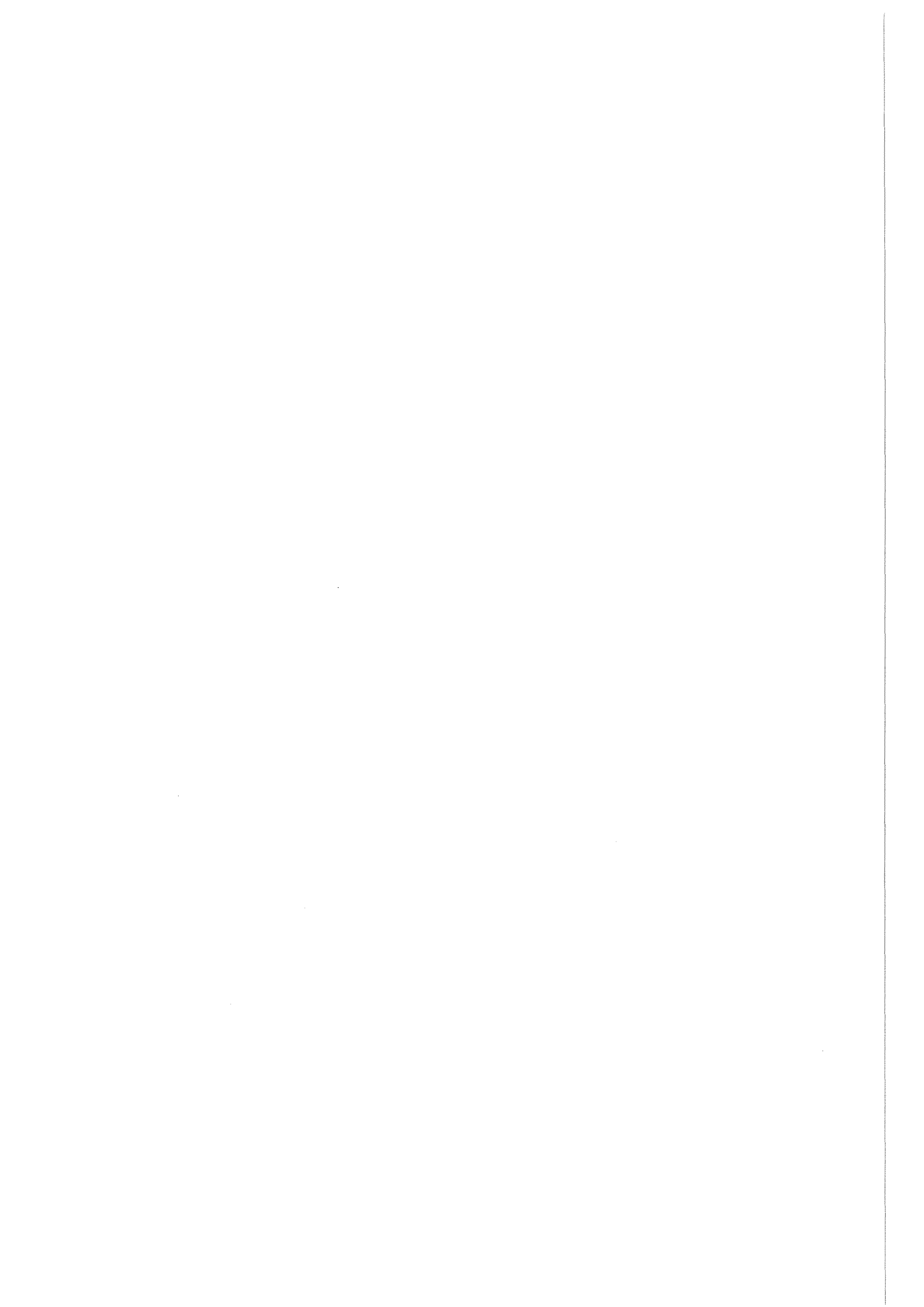


Abb.47: Einfluß verschiedener LaCl<sub>3</sub> -Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Mobilität von Rinderalveolarmakrophagen.

(in % der Kontrollzellen)

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)



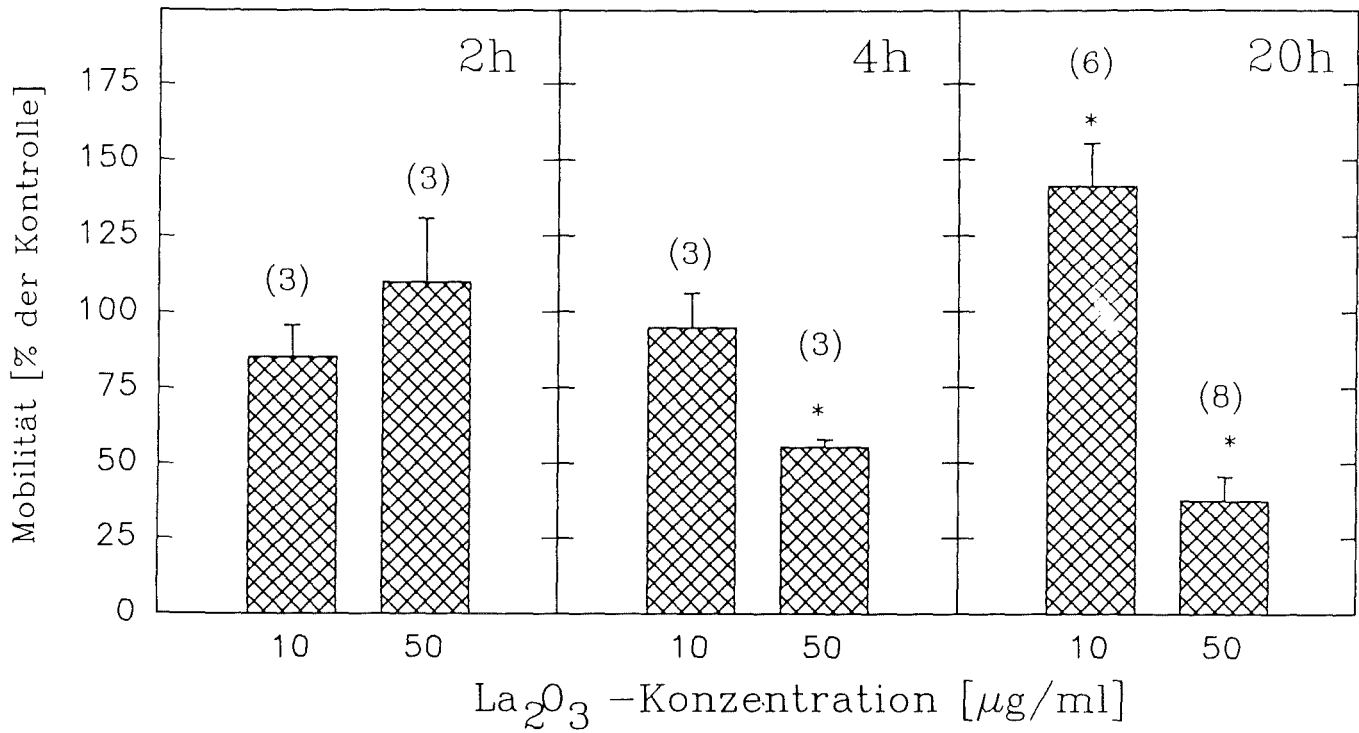


Abb.48: Einfluß verschiedener La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Mobilität von Rinder-alveolarmakrophagen. (in % der Kontrollzellen)

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)

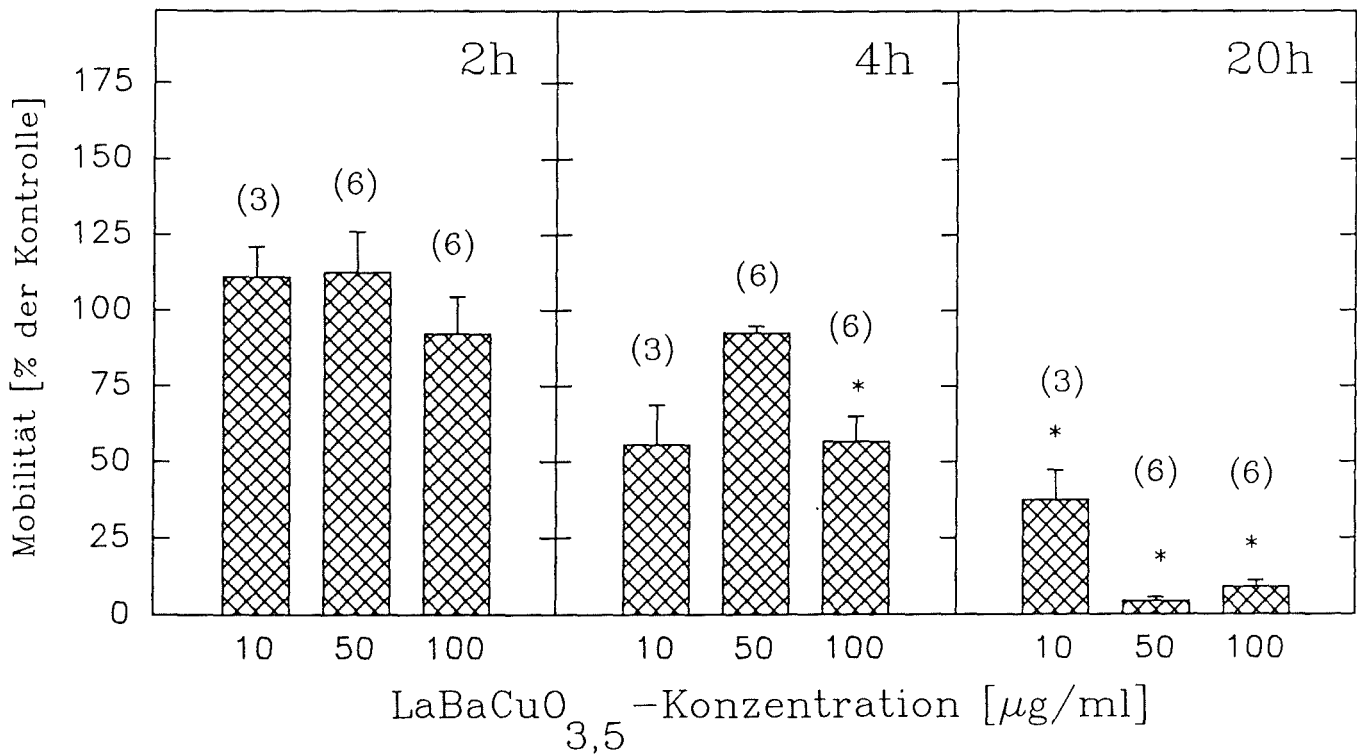
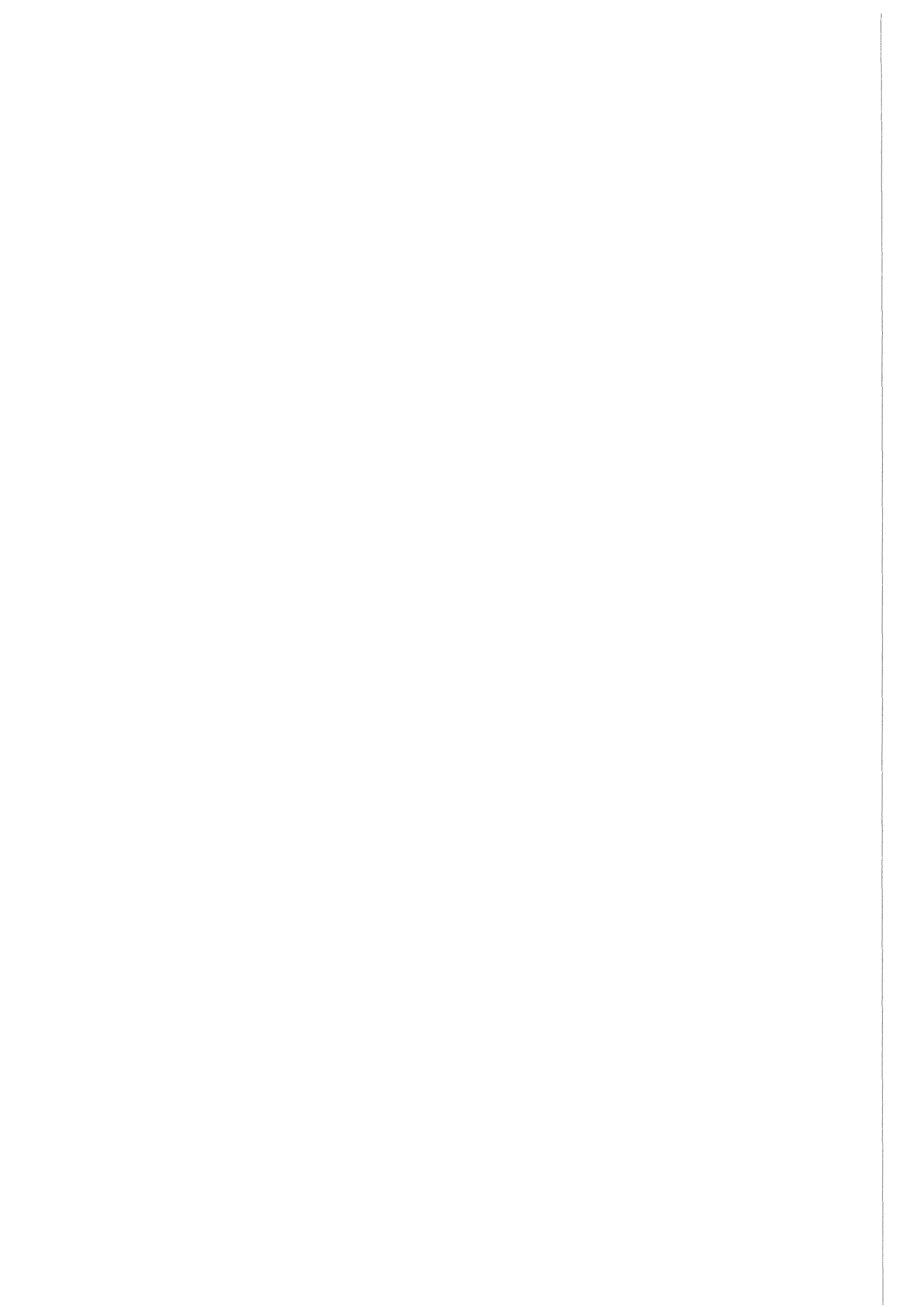


Abb.49: Einfluß verschiedener LaBaCuO<sub>3,5</sub>-Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Mobilität von Rinder-alveolarmakrophagen. (in % der Kontrollzellen)

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)





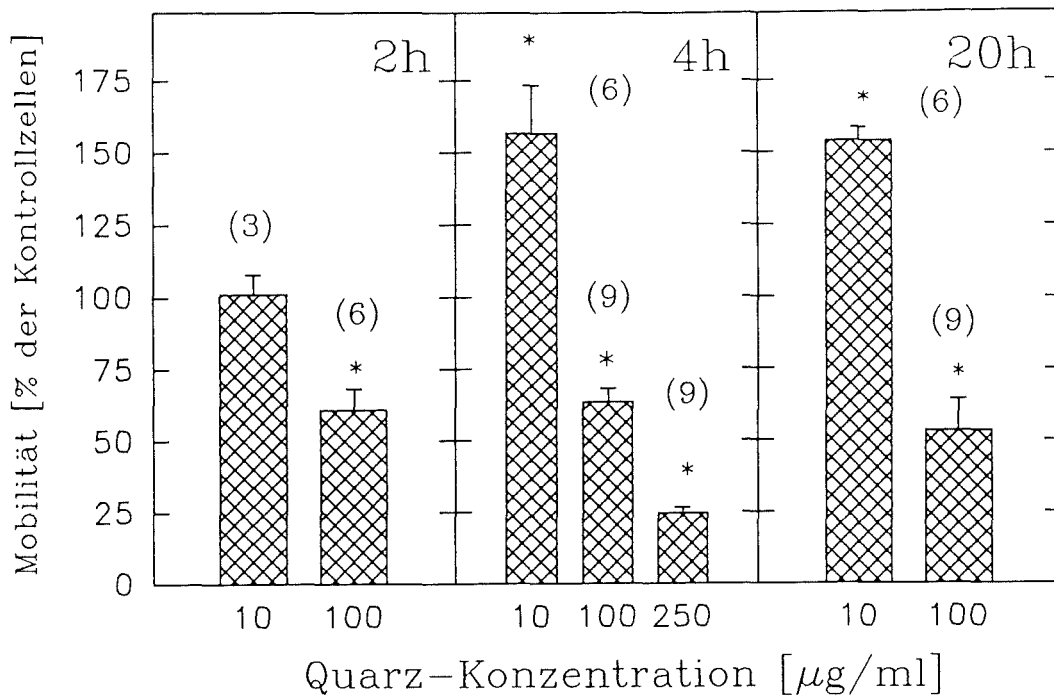


Abb.50: Einfluß verschiedener Quarz -Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Mobilität von Rinder-alveolarmakrophagen. (in % der Kontrollzellen)

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )

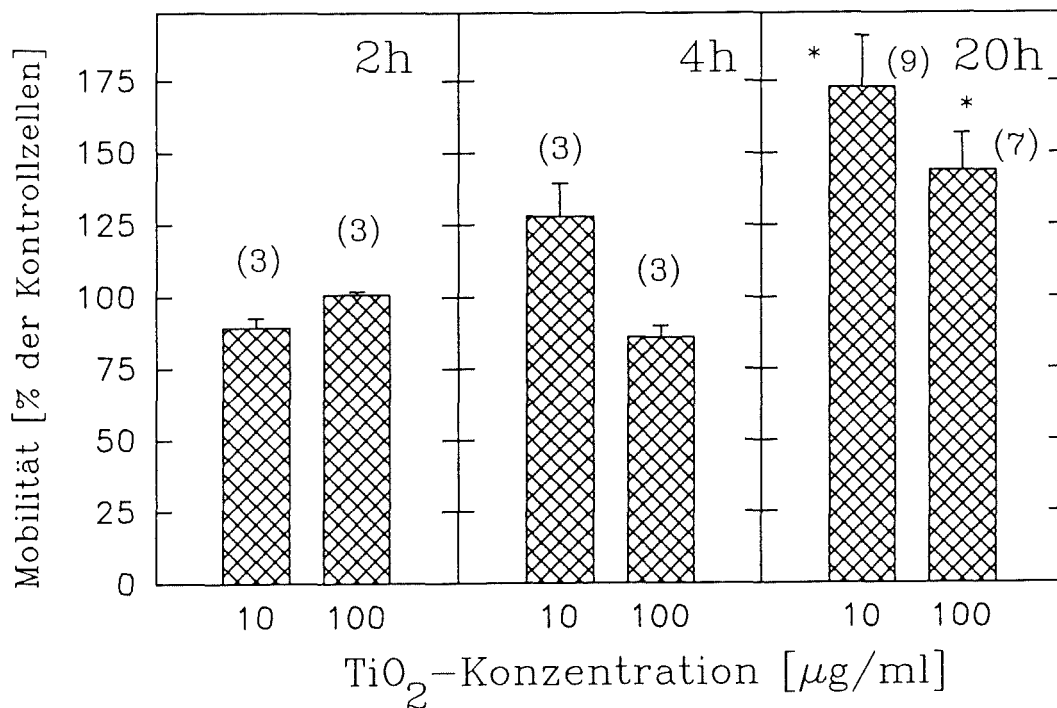


Abb.51: Einfluß verschiedener  $\text{TiO}_2$  -Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Mobilität von Rinder-alveolarmakrophagen. (in % der Kontrollzellen)

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. ( $2p < 0.05$ )



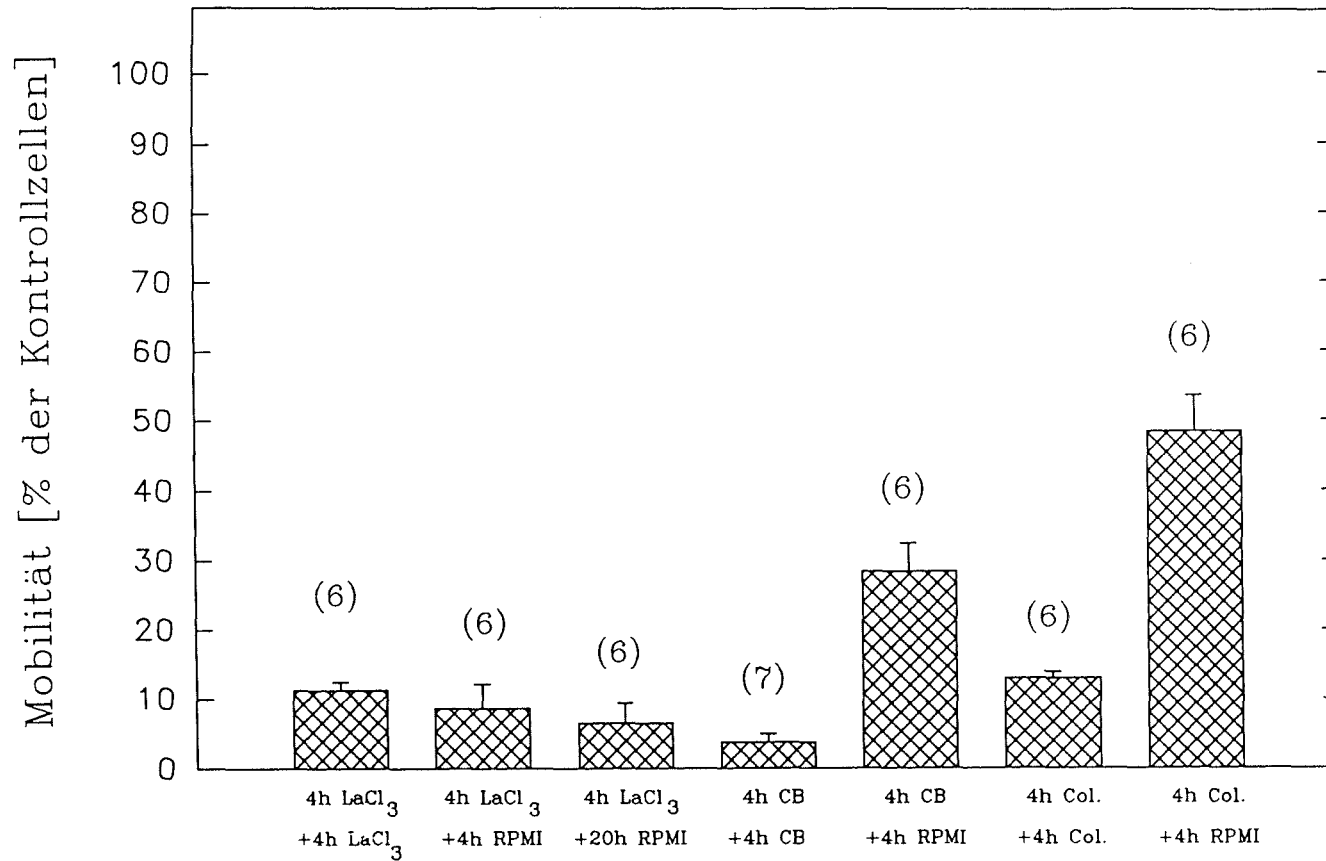
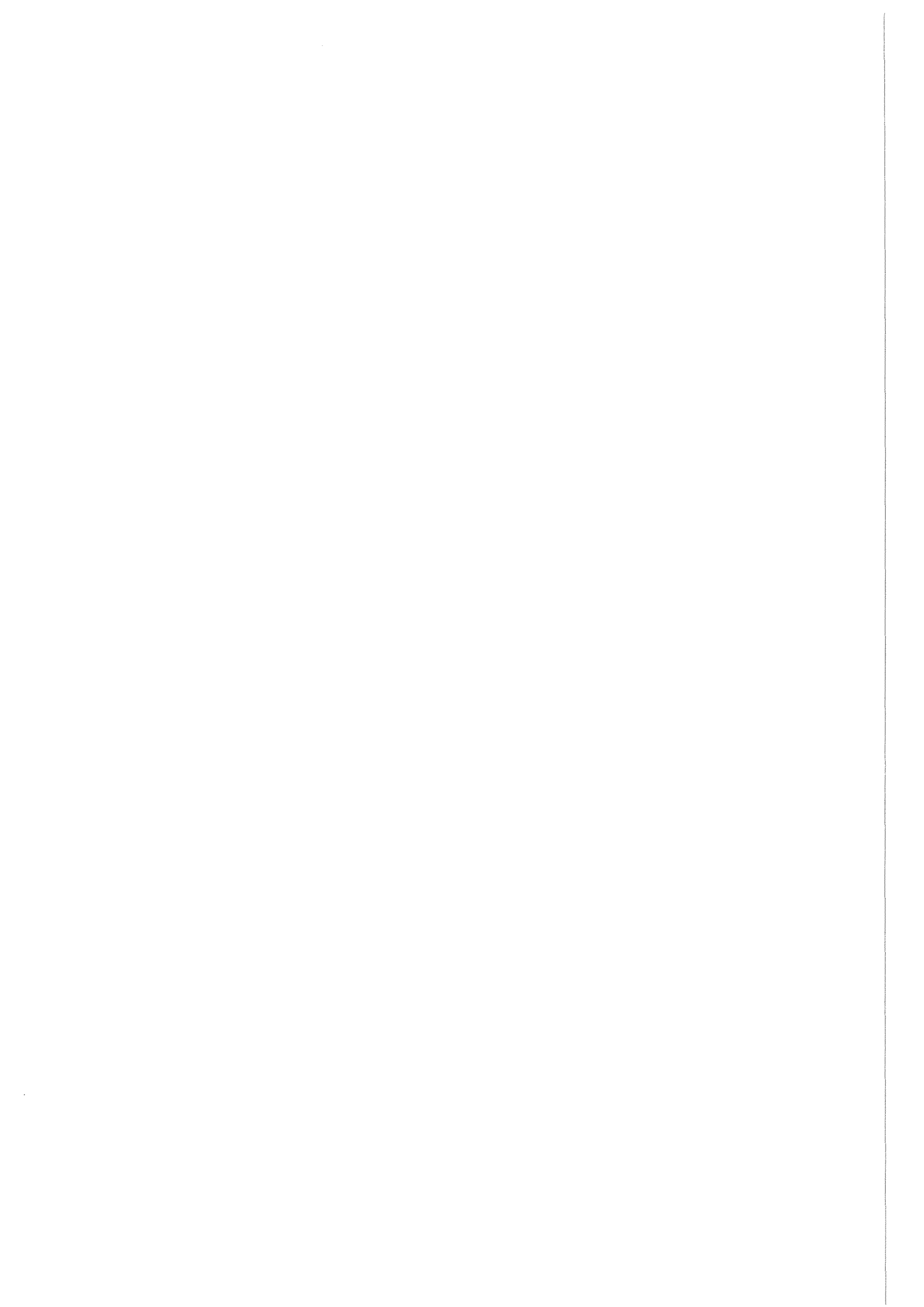


Abb.52: Einfluß einer 4 -ständigen Inkubation mit LaCl<sub>3</sub> (100 µM), Cytochalasin B (10 µg/ml) und Colchizin (0.25 µg/ml) sowie einer 4 bzw. 20 -ständigen Nachinkubation in Medium (RPMI) auf die Mobilität von Rinderalveolarmakrophagen.  
 (in % der Kontrollzellen)  
 Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)



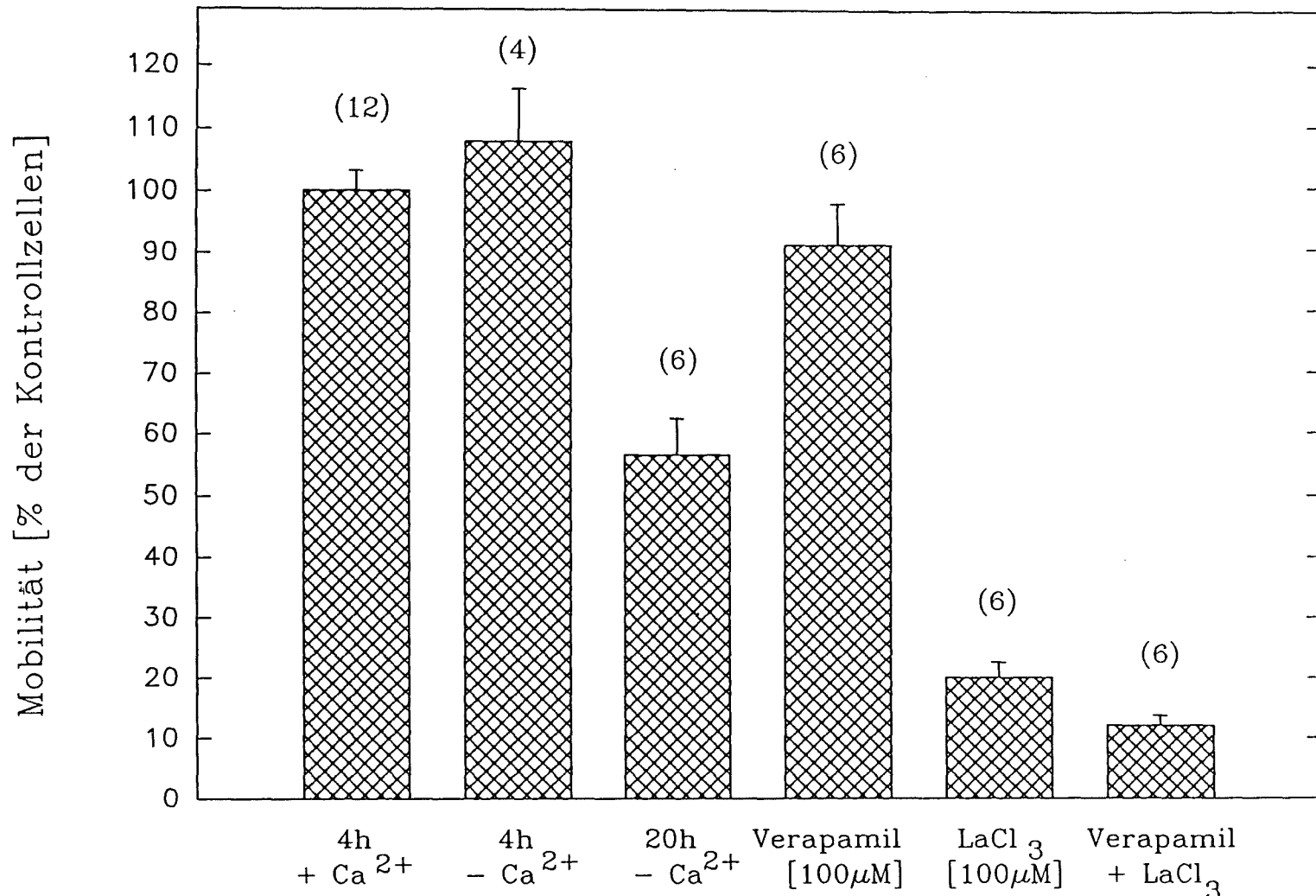
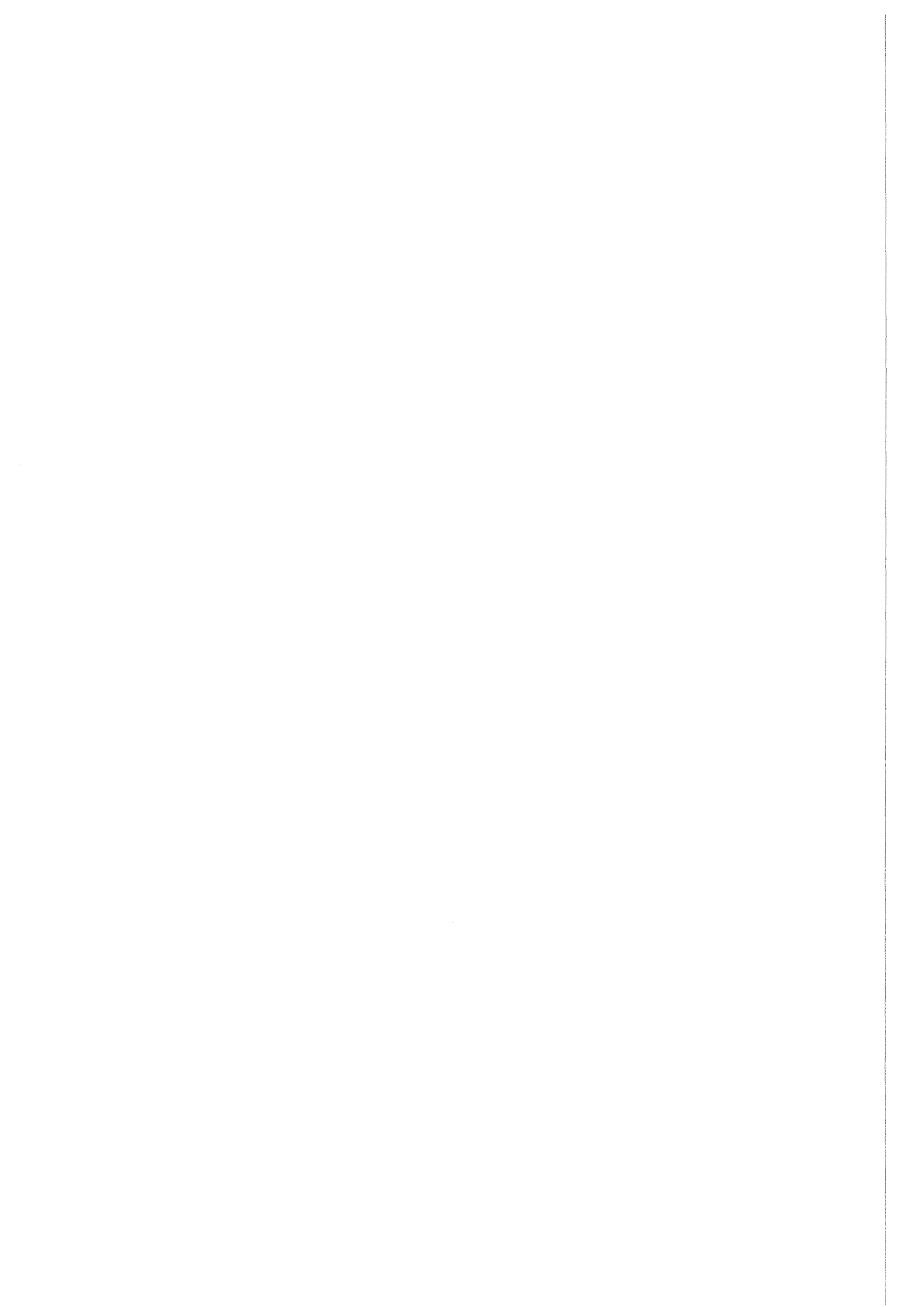


Abb.53: Einfluß von Ca<sup>2+</sup>-Ionen auf die Mobilität von Rinderalveolarmakrophagen. Die Zellen wurden 16 Stunden in Medium mit normalen Ca<sup>2+</sup>-Gehalt kultiviert und anschließend für 4 Stunden mit Ca<sup>2+</sup>-haltigen Medium, Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium, Verapamil (100 µM) LaCl<sub>3</sub> (100 µM) oder Verapamil und LaCl<sub>3</sub> gleichzeitig inkubiert (jeweils 100 µM). Zusätzlich wurden Kontrollzellen 20 Stunden in Ca<sup>2+</sup>-freien Medium kultiviert. Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)



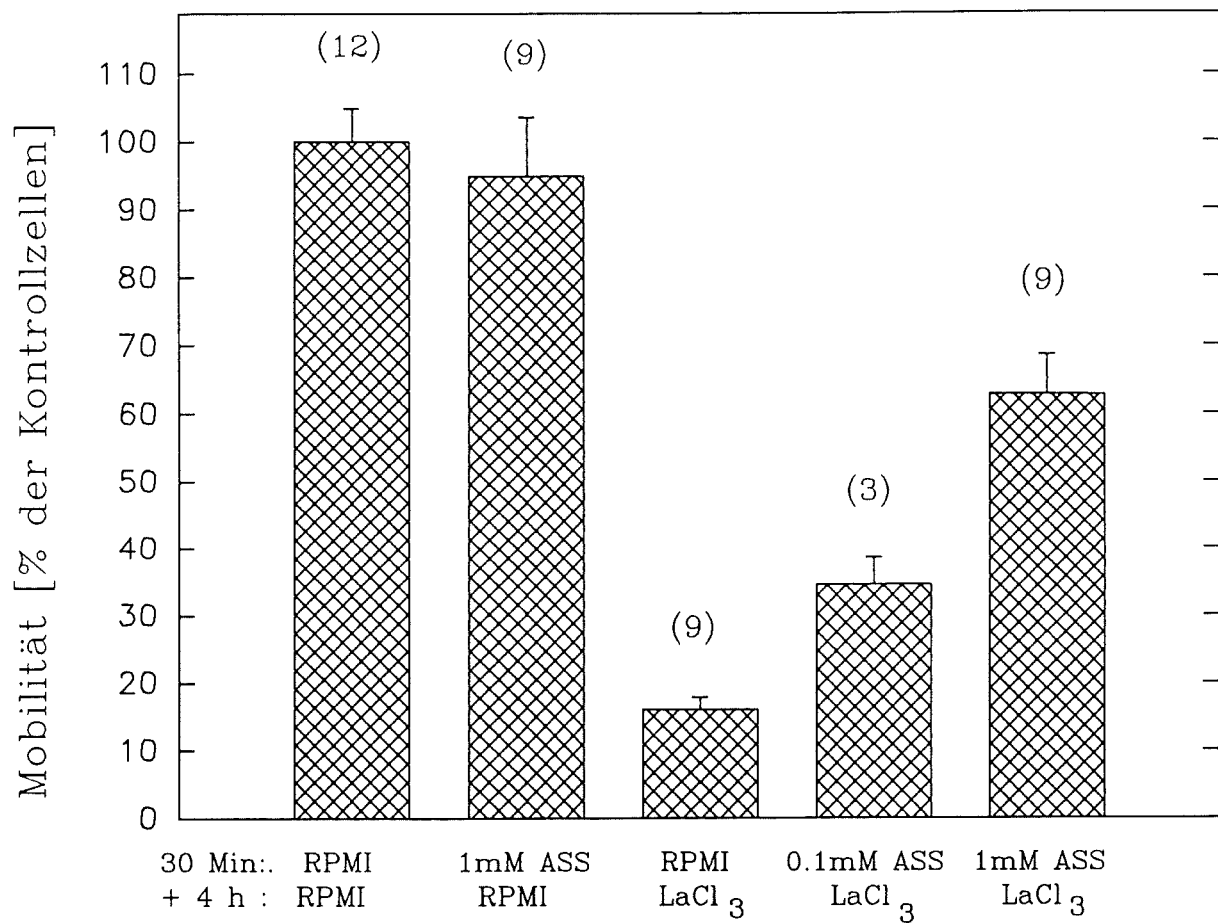


Abb.54: Beeinflussung der Wirkung einer 4 -stündigen LaCl<sub>3</sub> -Inkubation auf die Mobilität von Rinder-alveolarmakrophagen durch eine 30 -minütige Vorinkubation mit verschiedenen Acetylsalicylsäure-Konzentrationen.

Mittelwerte mit Standardfehler. (Zahl der Proben in Klammer)

\* Statistisch signifikanter Unterschied. (2p < 0.05)

Abb.55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinderalveolarmakrophagen nach 4 -stündigem Aufenthalt in der Chemotaxis-Kammer.

a) Nichtgewanderte Kontrollzellen (Membranoberseite).

Vergrößerung: 1010x

b) Nichtgewanderte  $\text{LaCl}_3$  -inkubierte Zellen (4h, 100  $\mu\text{M}$ )

Vergrößerung: 965x

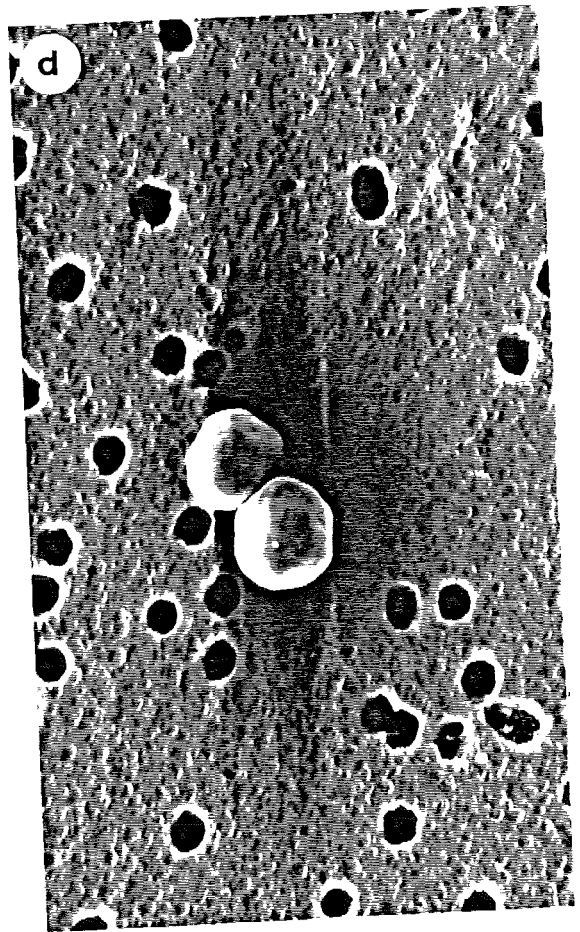
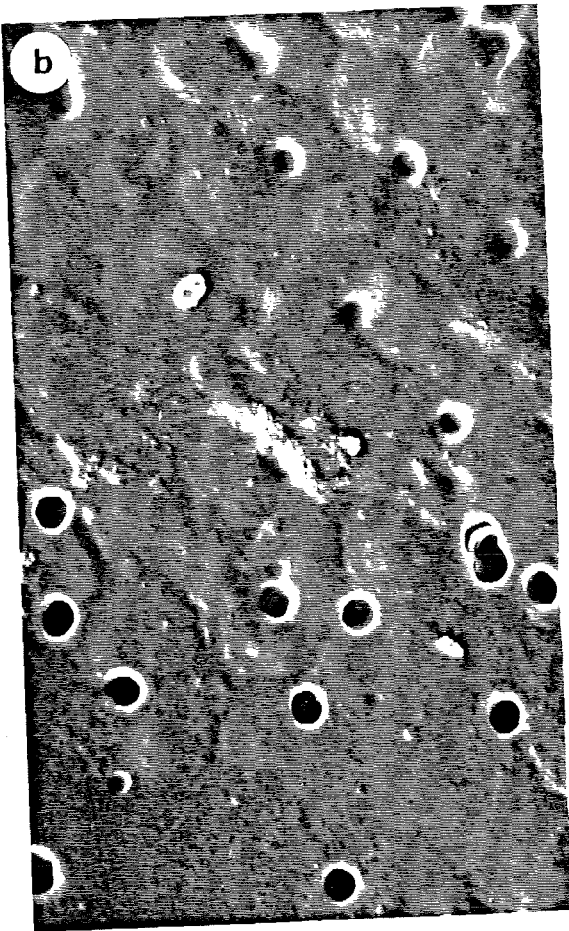
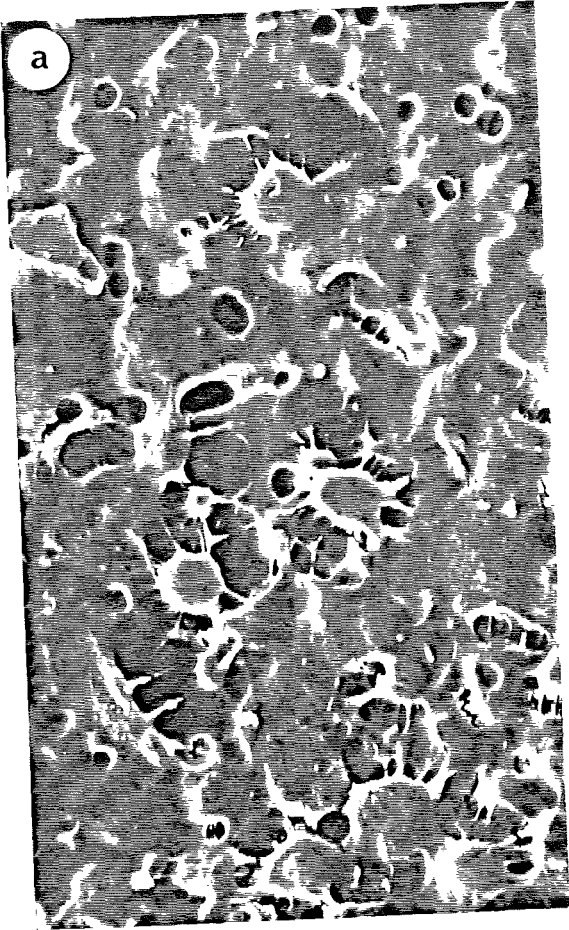
c) Gewanderte Kontrollzellen (Membranunterseite)

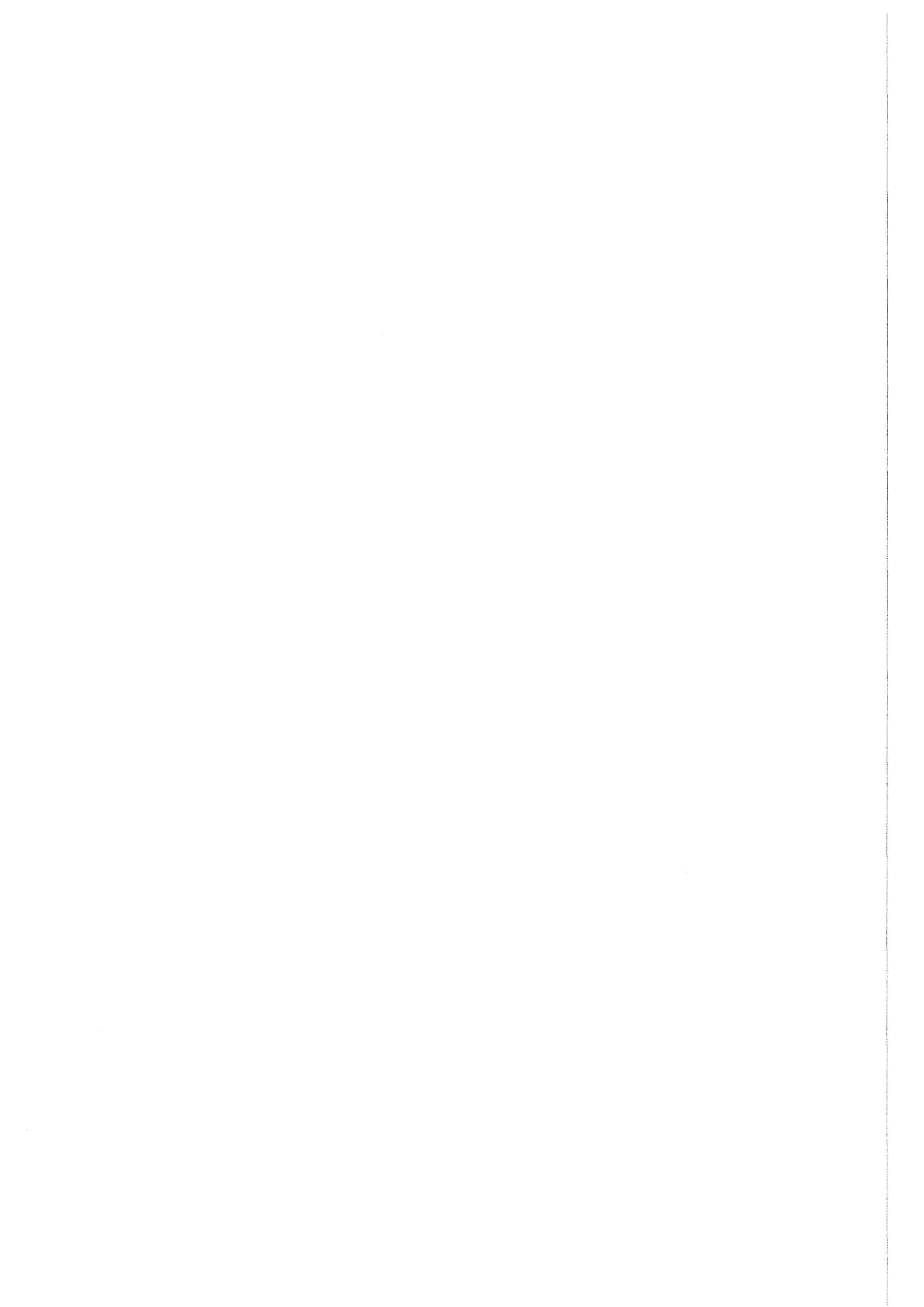
Vergrößerung: 1150x

d) Gewanderte  $\text{LaCl}_3$  -inkubierte Zellen (4h, 100  $\mu\text{M}$ )

Vergrößerung: 1010x







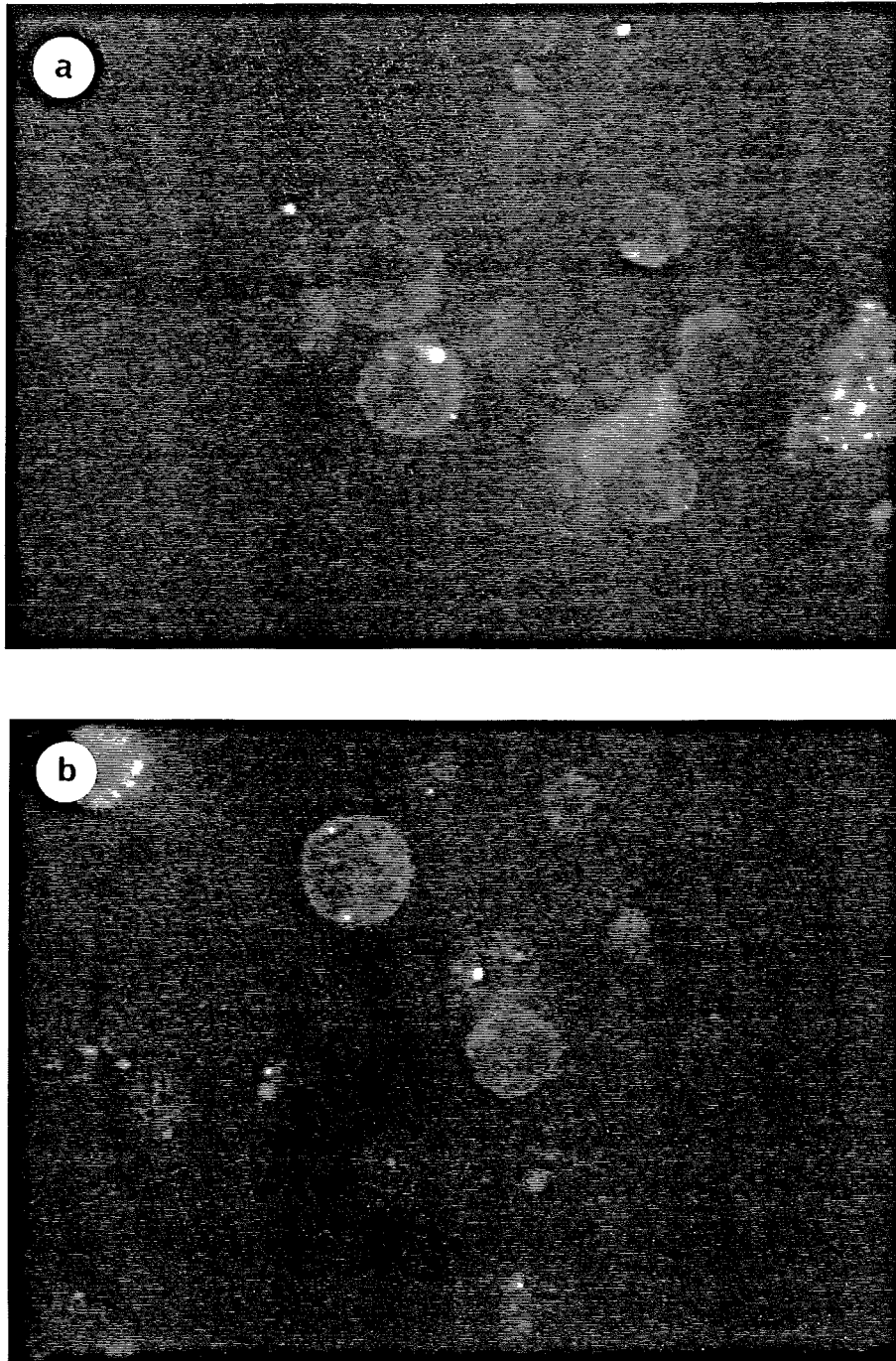
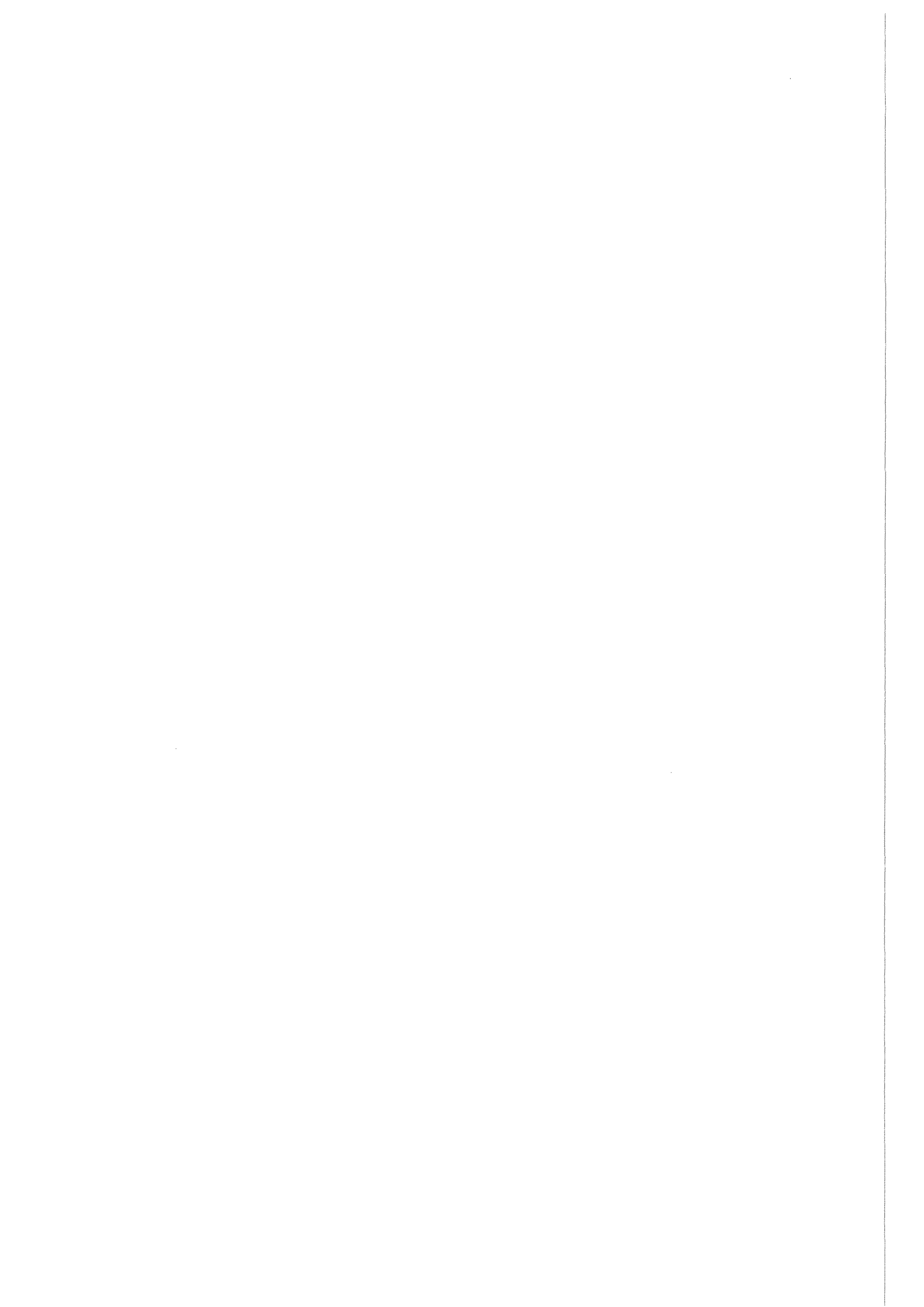


Abb.56: Darstellung der C5-Rezeptoren auf Rinderalveolarmakrophagen durch indirekte Immunfluoreszenz  
a) Kontrollzellen nach 30 -minütiger ZAS-Behandlung.  
b)  $\text{LaCl}_3$  -inkubierte Zellen (4h,  $100 \mu\text{M}$ ) nach 30 -minütiger ZAS-Behandlung.  
Vergrößerung jeweils 1000x.



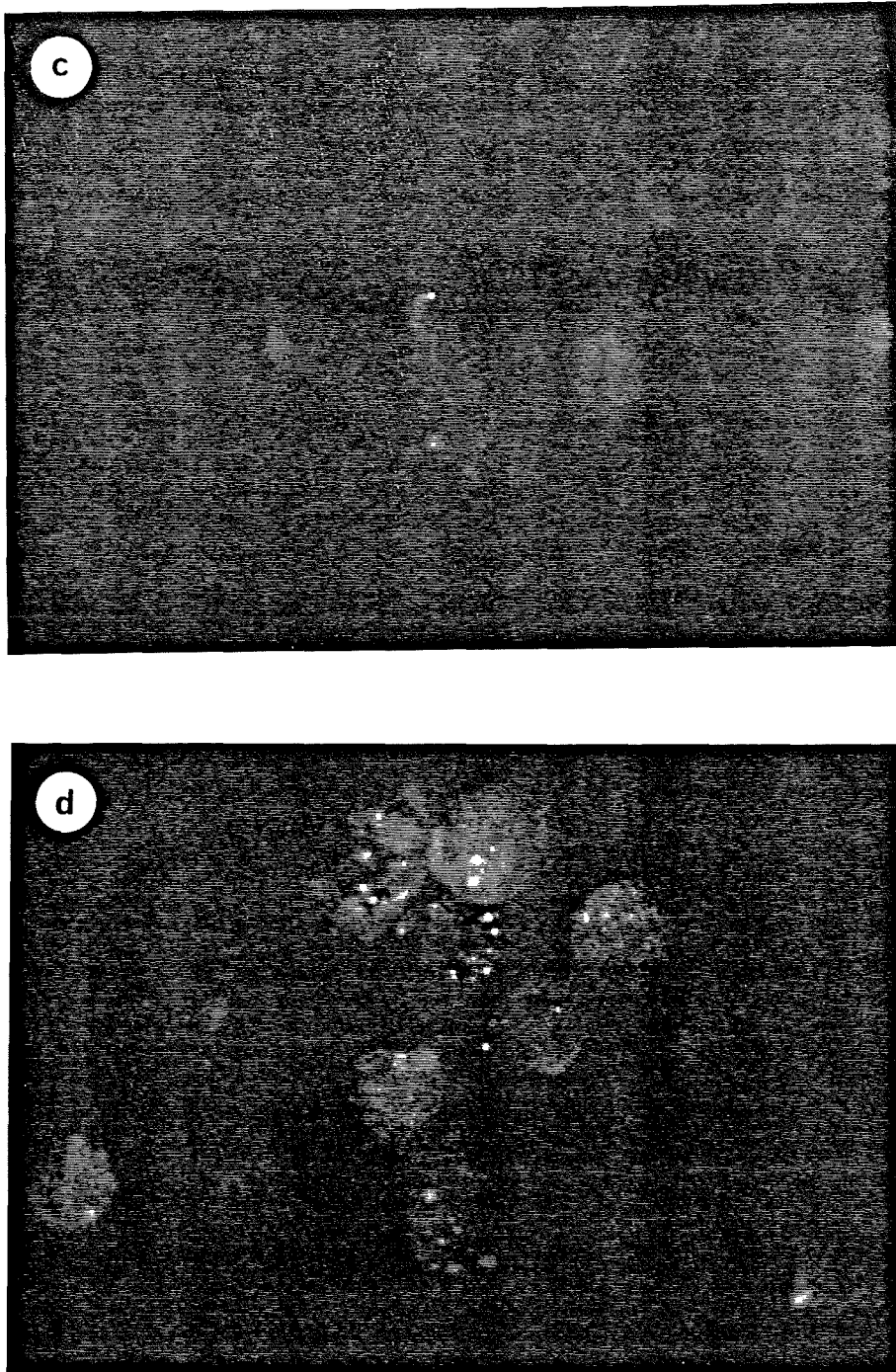
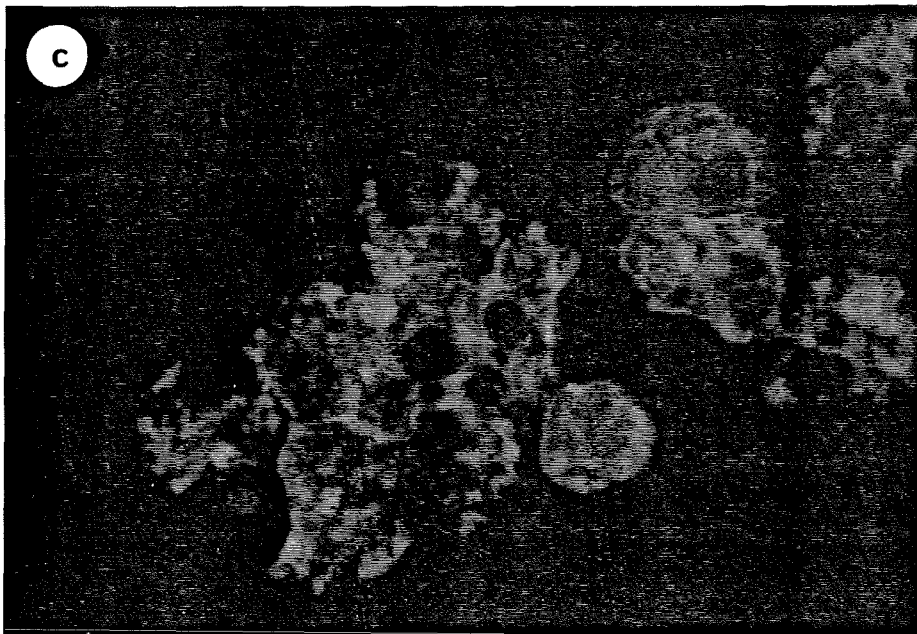
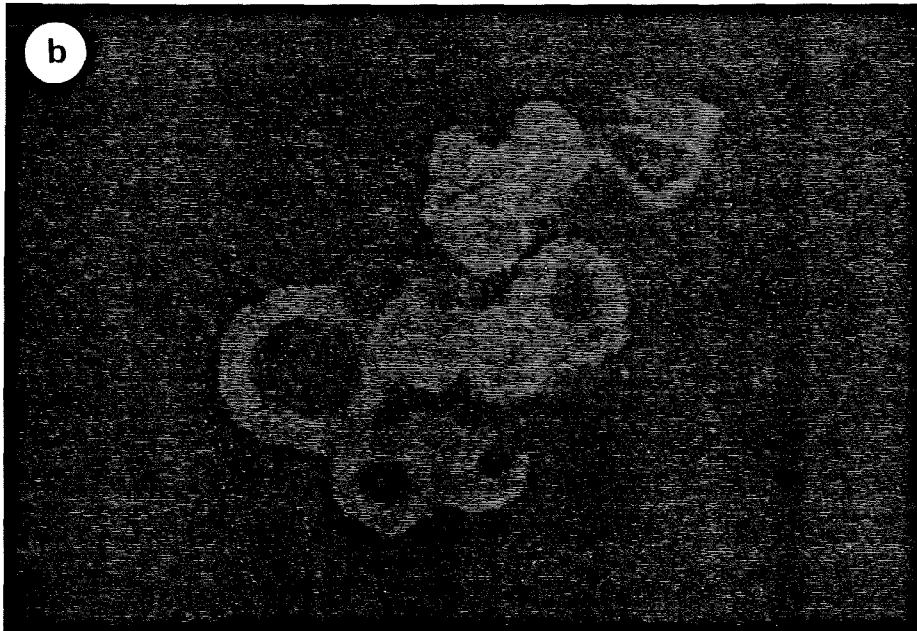
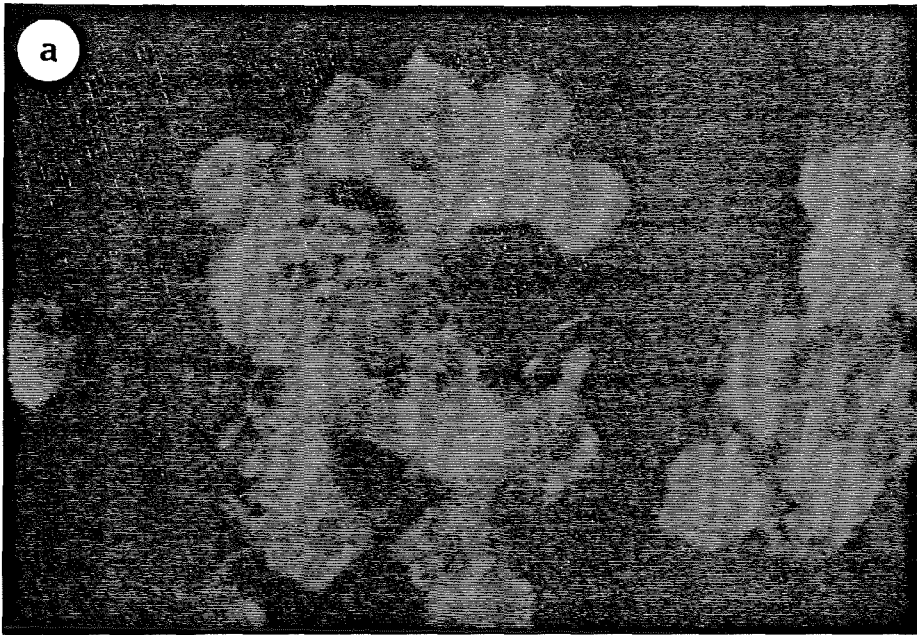
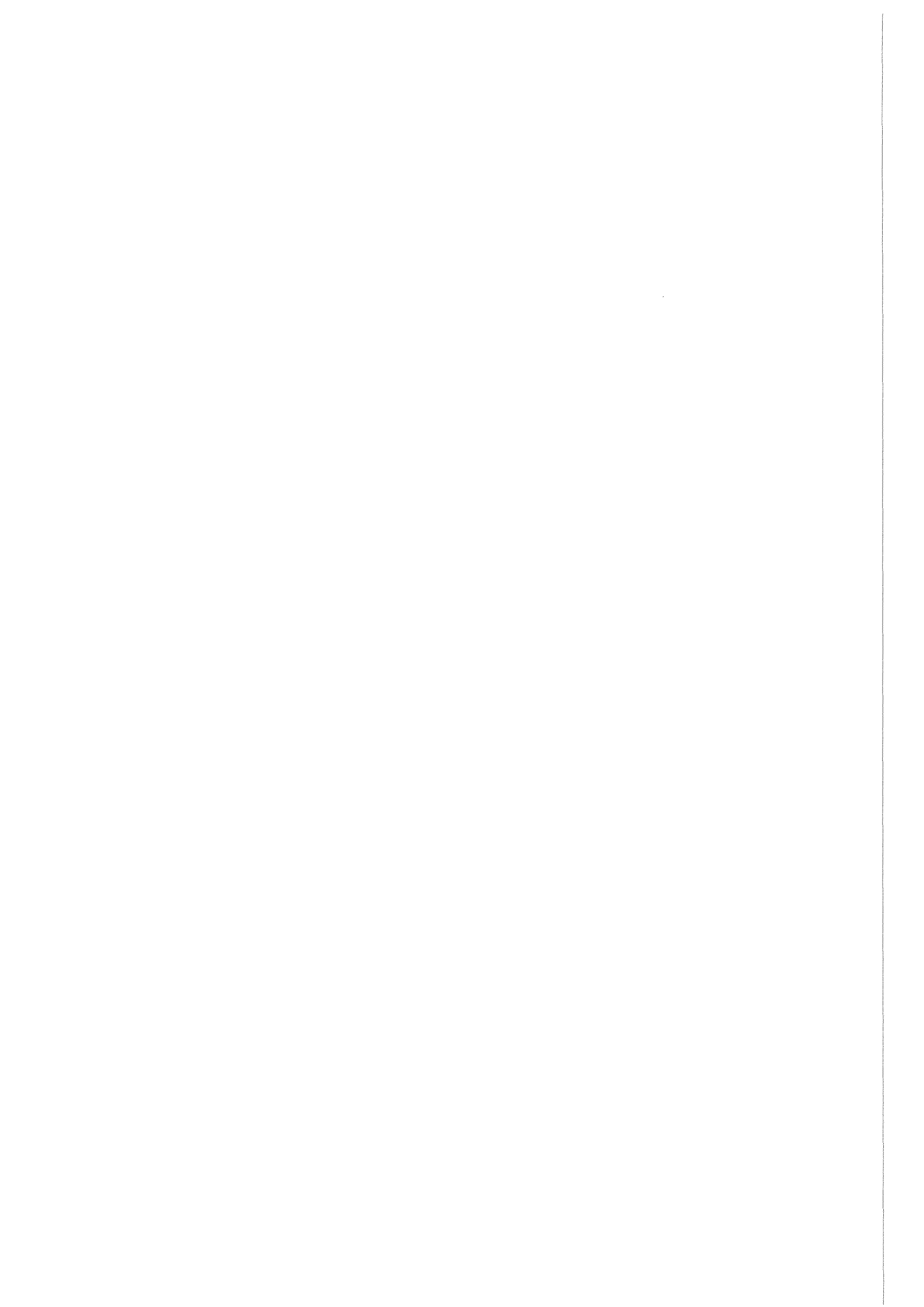


Abb.56: Darstellung der C5-Rezeptoren auf Rinderalveolarmakrophagen durch indirekte Immunfluoreszenz  
c) Kontrollzellen nach 30 -minütiger ZAS-Behandlung ohne Inkubation mit Antikörper gegen C5.  
d) Kontrollzellen ohne 30 -minütige ZAS-Behandlung.  
Vergrößerung jeweils 1000x.

- Abb.57: Organisation der F-Actinfilamente von nicht adhärenen Rinderalveolarmakrophagen.
- a) Direkt nach der Lavage. Vergrößerung: 1000x
  - b) Nach 20 -ständiger Suspensionskultur. Vergrößerung: 1000x
  - c) Nach 20 -ständiger Suspensionskultur und anschließender 30 minütiger Inkubation mit 10  $\mu$ g/ml Cytochalasin B. Vergrößerung: 1000x
- Rhodamin Phalloidin-Färbung







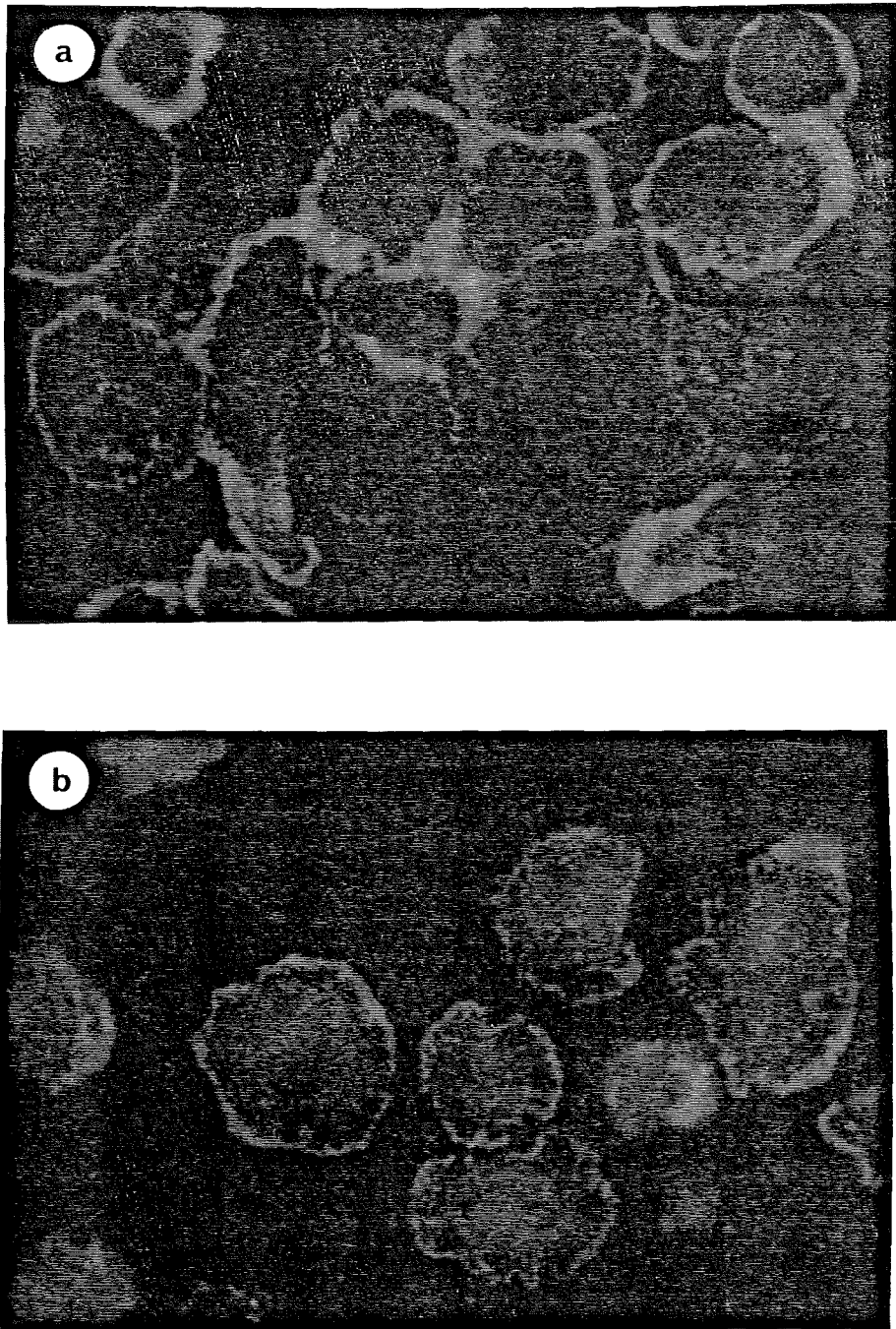


Abb.58: Organisation der F-Aktinfilamente von adhärennten Rinderalveolarmakrophagen.  
a) Nach 1 -ständiger Anheftungszeit. Vergrößerung: 1000x  
b) Nach 3 -ständiger Anheftungszeit. Vergrößerung: 1000x  
Rhodamin Phalloidin-Färbung

**Abb.59: Organisation der F-Aktinfilamente von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in Medium (Kontrollzellen).**

- a) Nach 2 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - b) Nach 4 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - c) Nach 20 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - d) wie c) Vergrößerung: 1600x
- Rhodamin Phalloidin-Färbung

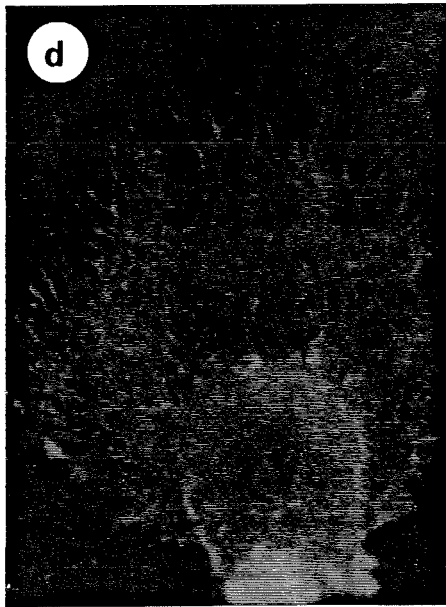
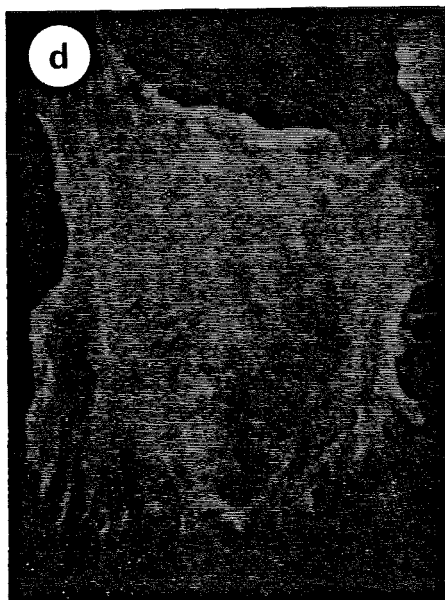
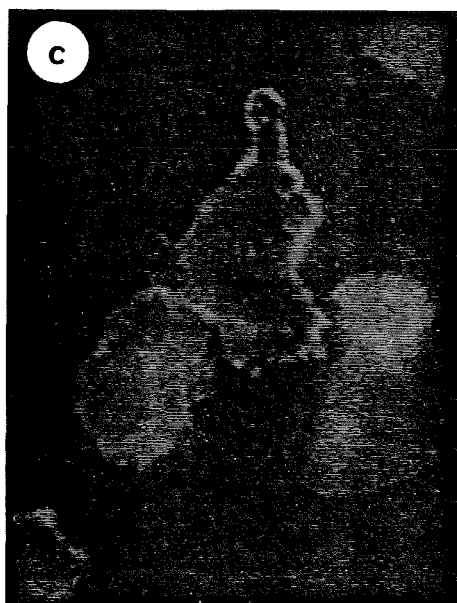
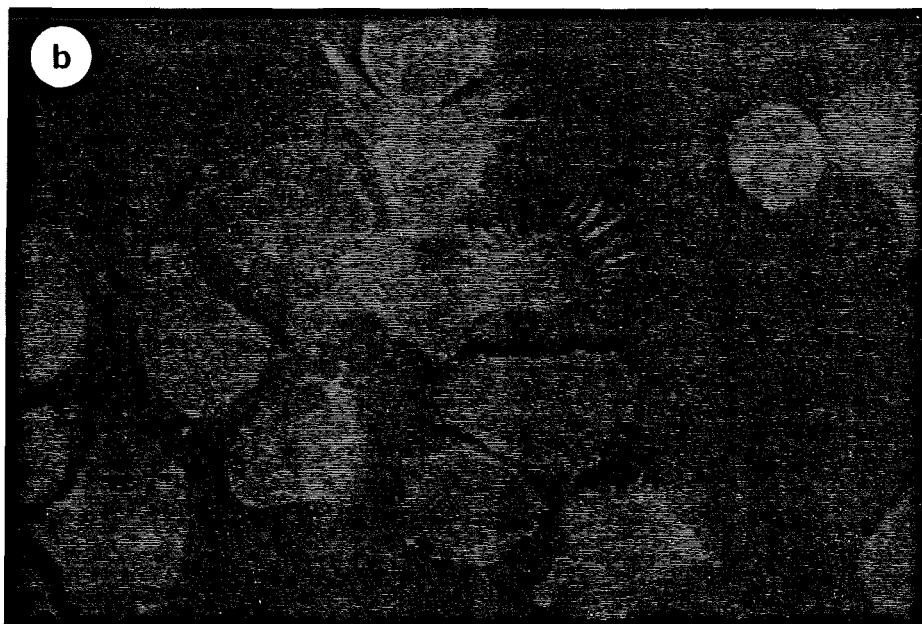
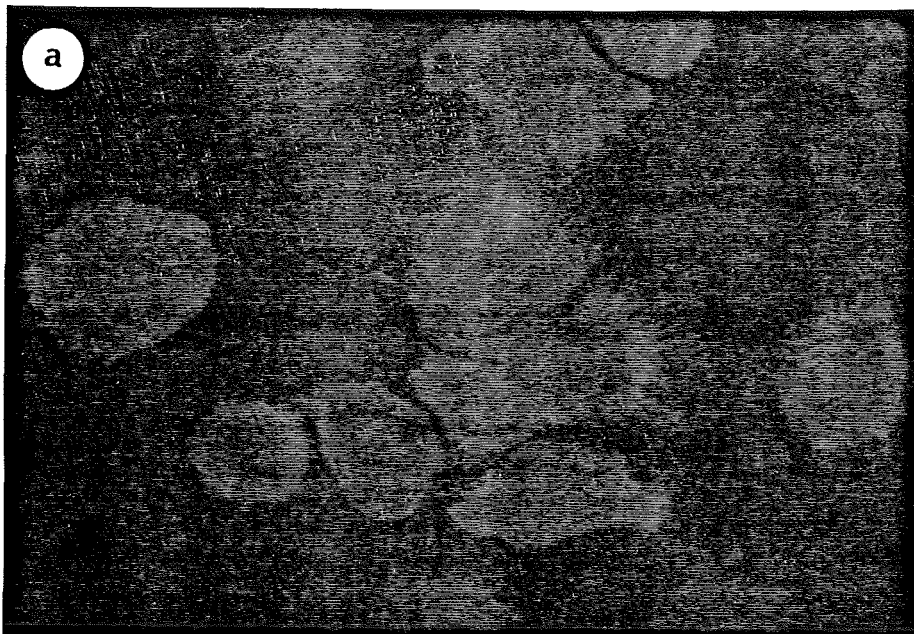


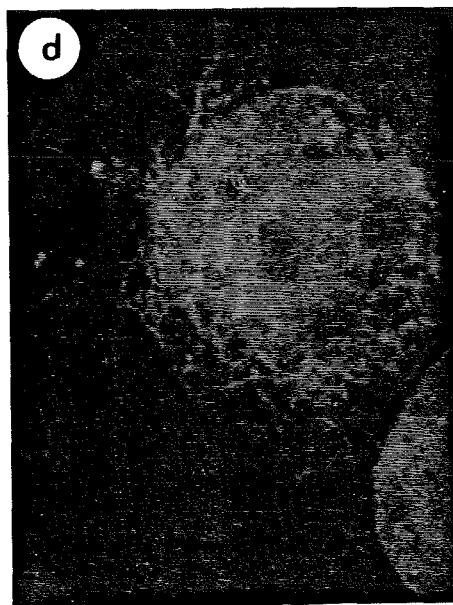
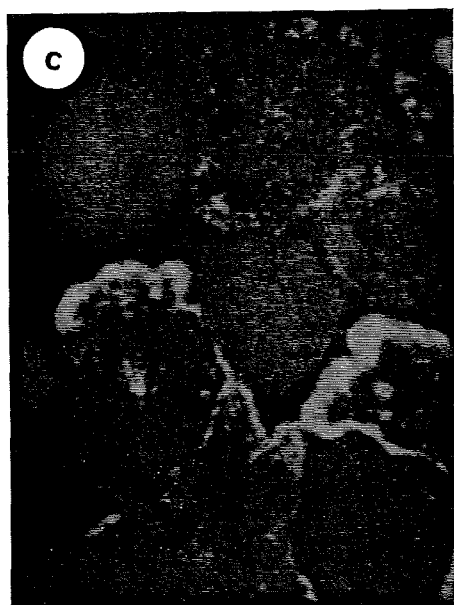
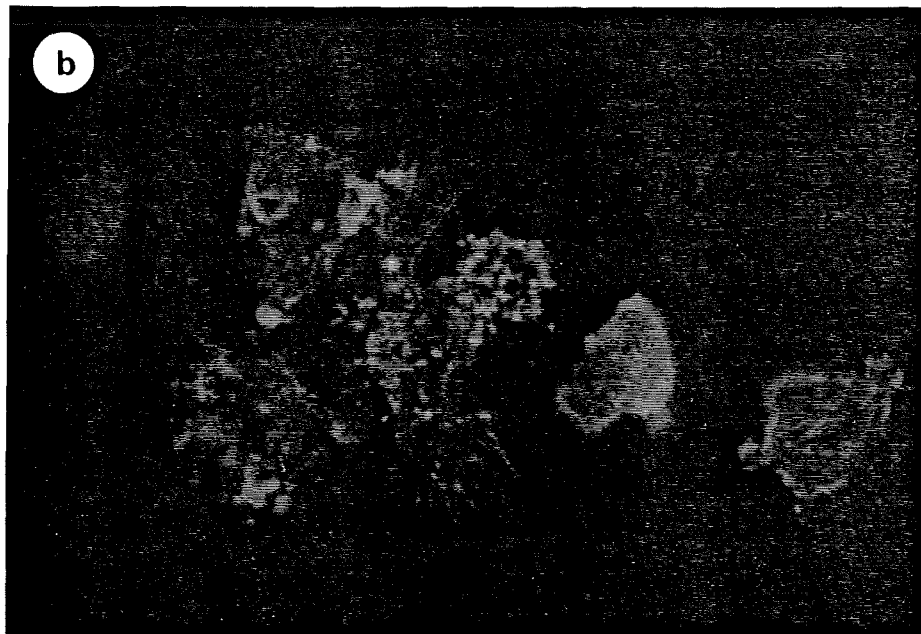
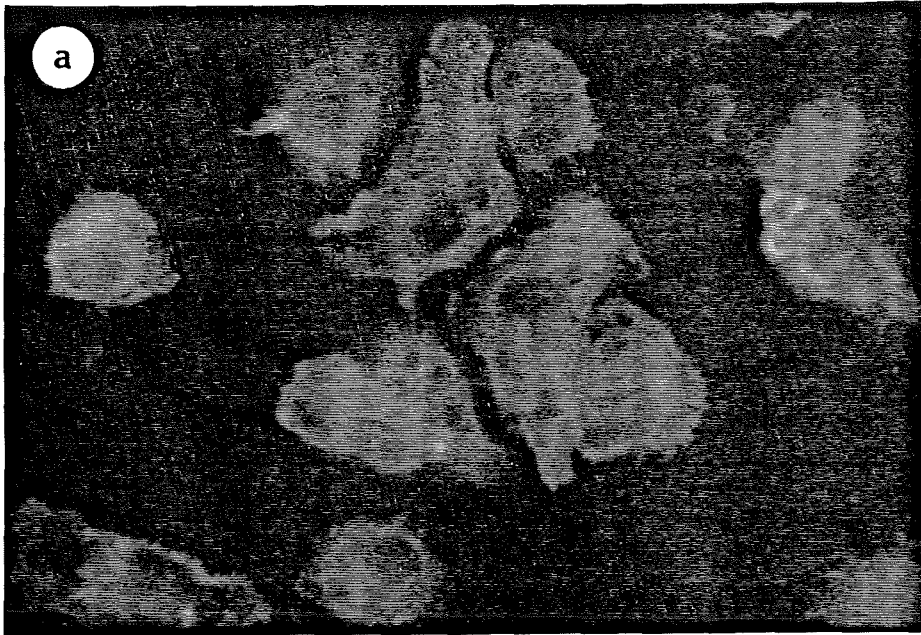
Abb.60: Organisation der F-Aktinfilamente von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in  $100 \mu\text{M CeCl}_3$ .

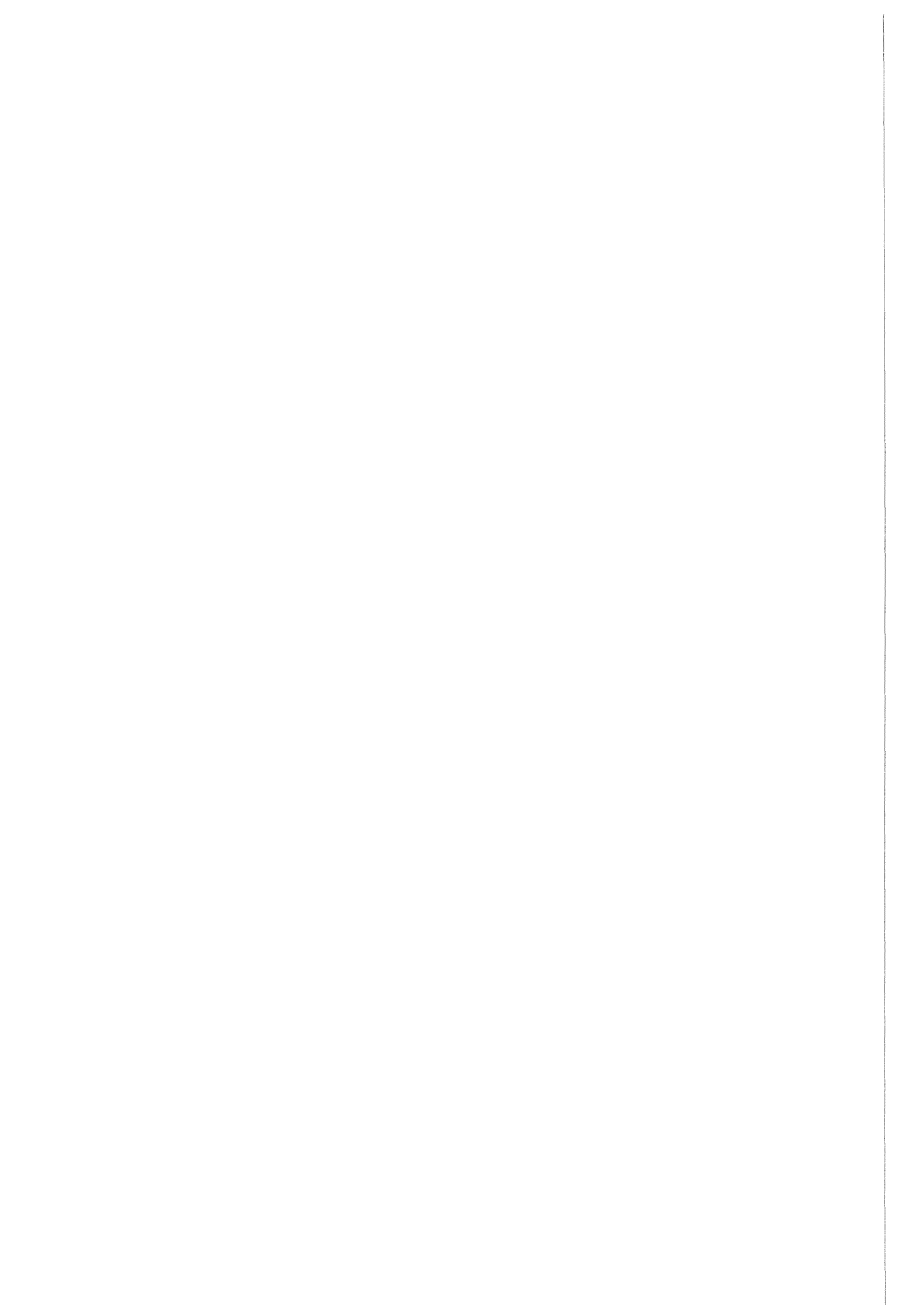
- a) Nach 2 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- b) Nach 4 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- c) Nach 20 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- d) wie c) Vergrößerung: 1600x

Rhodamin Phalloidin-Färbung



- Abb.61: Organisation der F-Actinfilamente von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in  $100 \mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ .
- a) Nach 2 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - b) Nach 4 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - c) Nach 20 -ständiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - d) wie c) Vergrößerung: 1600x
- Rhodamin Phalloidin-Färbung







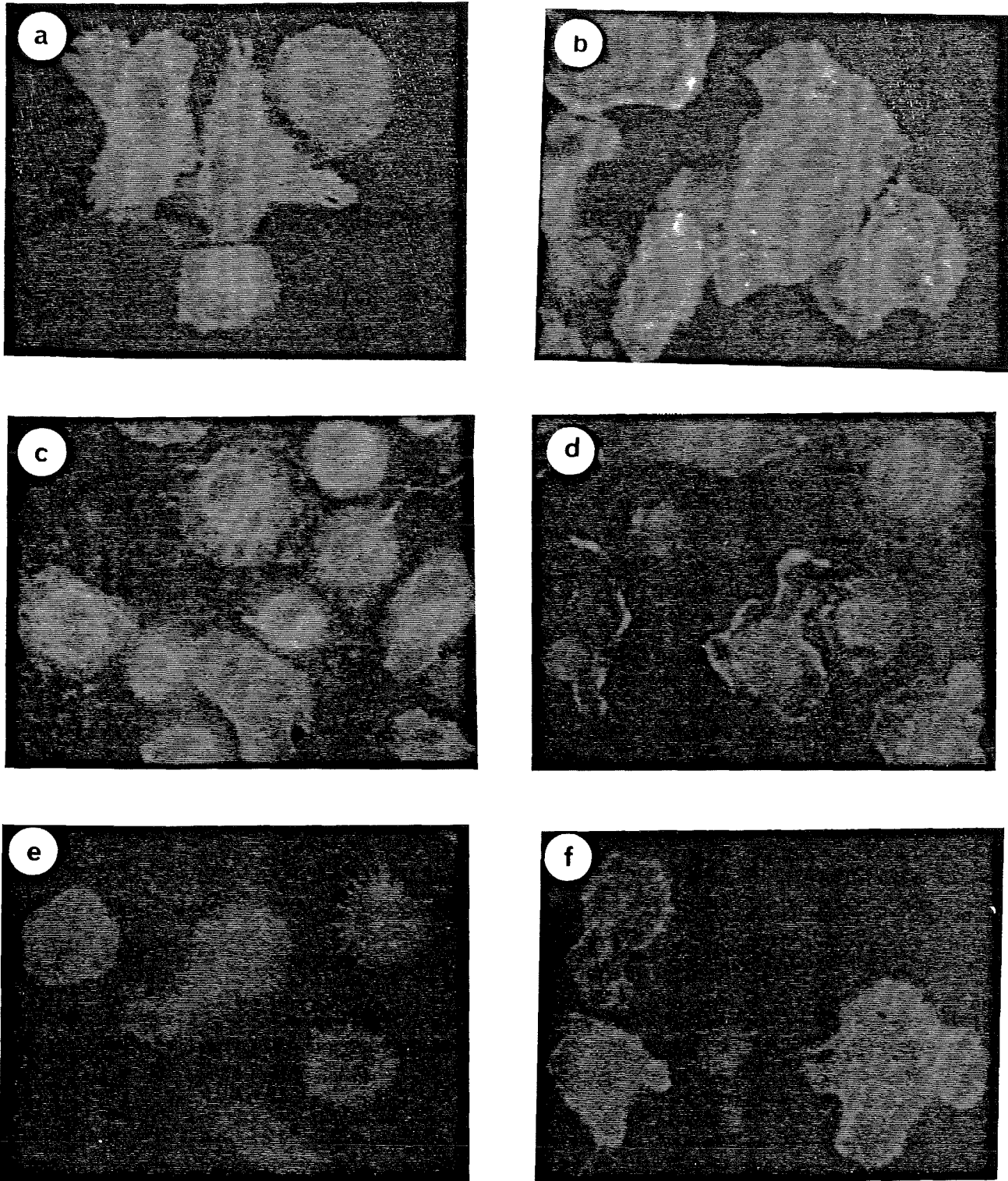
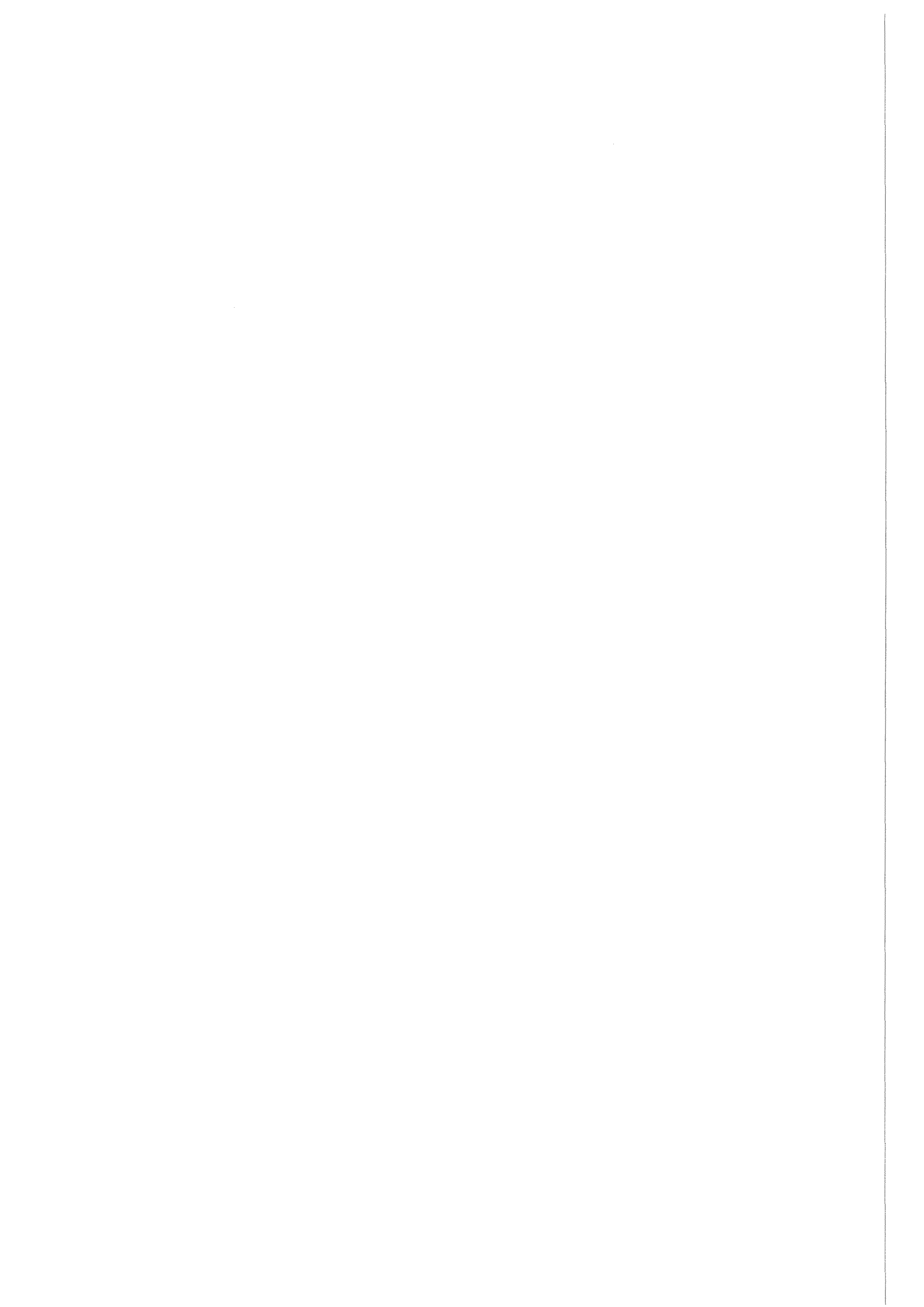


Abb.62: Organisation der F-Aktinfilamente von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarz.  
 a) und b) Nach 15 -minütiger Inkubation mit 250  $\mu$ g/ml Quarz. Vergrößerung: 1000x  
 c) und d) Nach 2 -stündiger Inkubation mit 250  $\mu$ g/ml Quarz. Vergrößerung: 1000x  
 e) Nach 4 -stündiger Inkubation mit 250  $\mu$ g/ml Quarz. Vergrößerung: 1000x  
 f) Nach 20 -stündiger Inkubation mit 100  $\mu$ g/ml Quarz. Vergrößerung: 1000x  
 Rhodamin Phalloidin-Färbung



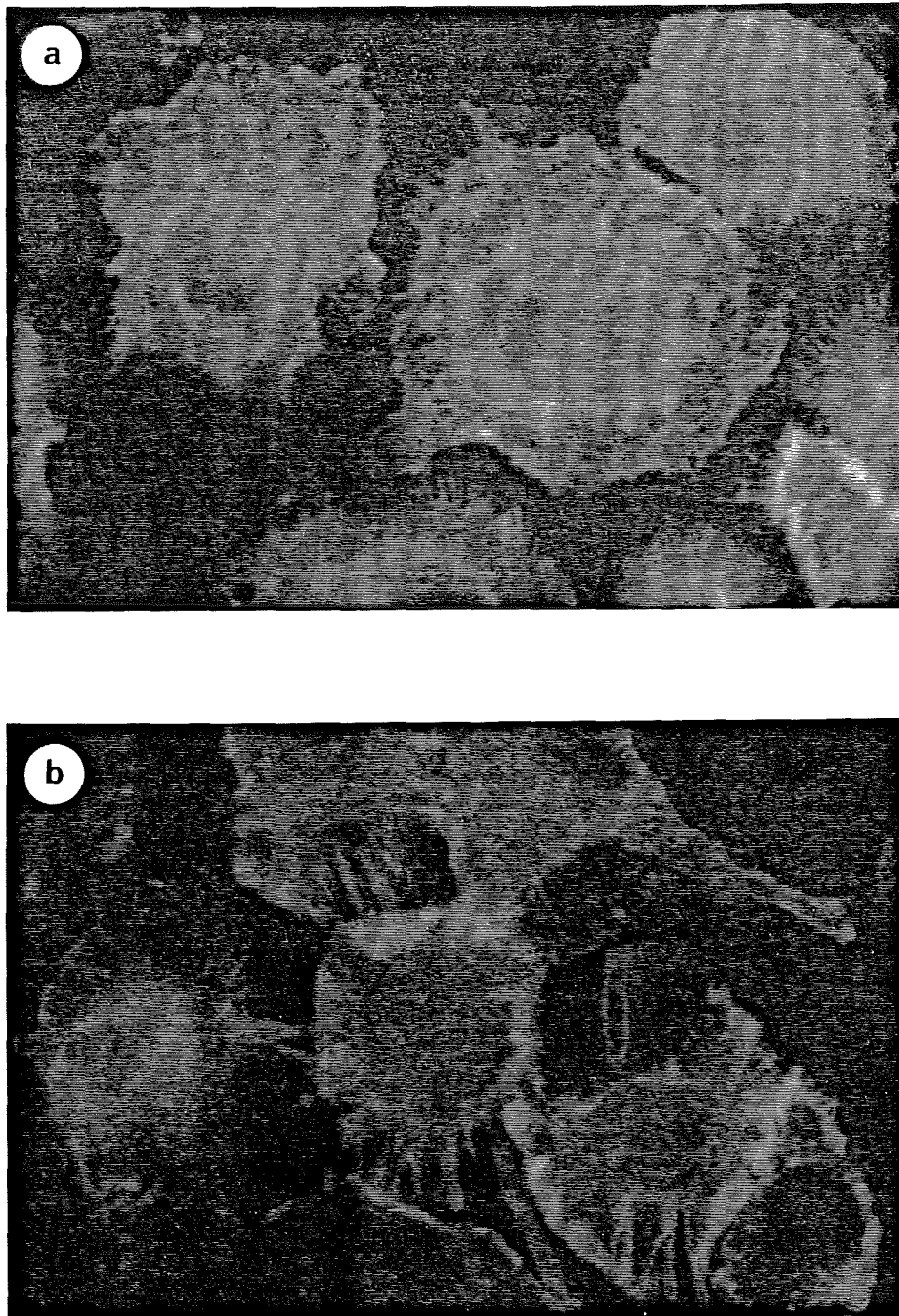
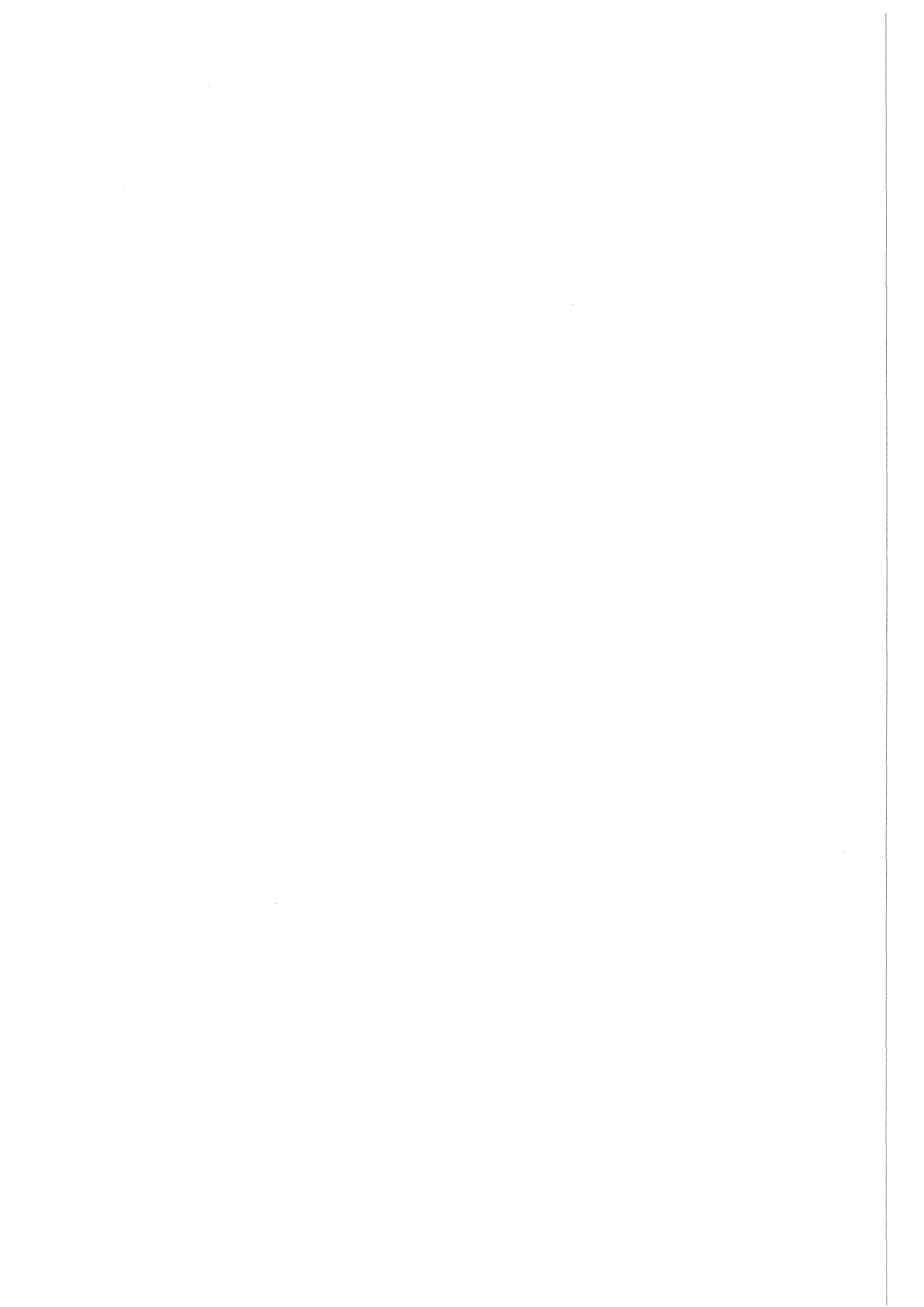


Abb.63: Einfluß einer 30 -minütigen Inkubation mit  $10 \mu\text{g/ml}$  Cytochalasin B auf die Organisation der F-Aktin-filamente von Rinderalveolarmakrophagen nach 20 Stunden in Monolayer-Kultur.  
a) Direkt nach der Inkubation mit Cytochalasin B. Vergrößerung: 1000x  
b) Nach weiteren 2 Stunden Kultur in Medium. Vergrößerung: 1000x  
Rhodamin Phalloidin-Färbung



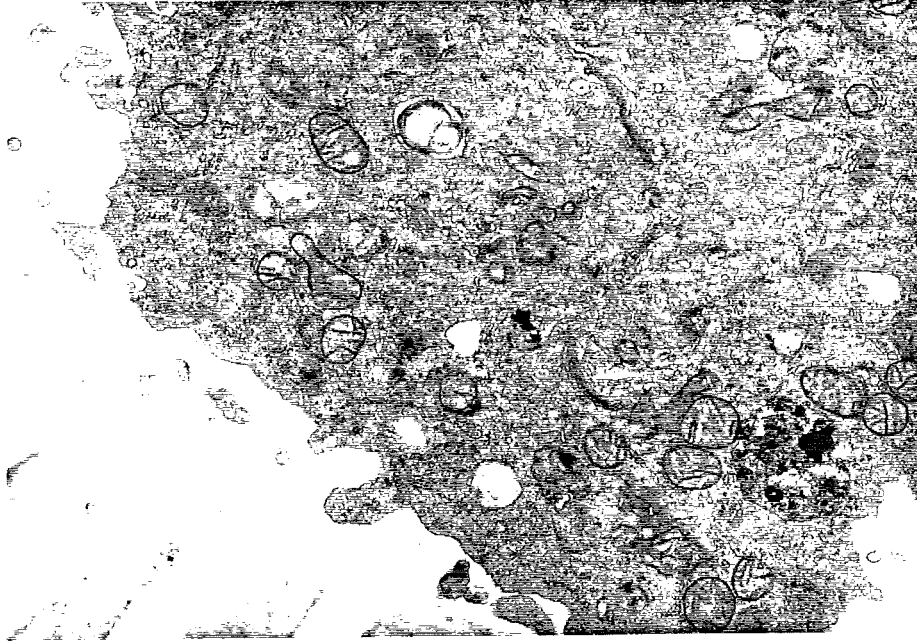
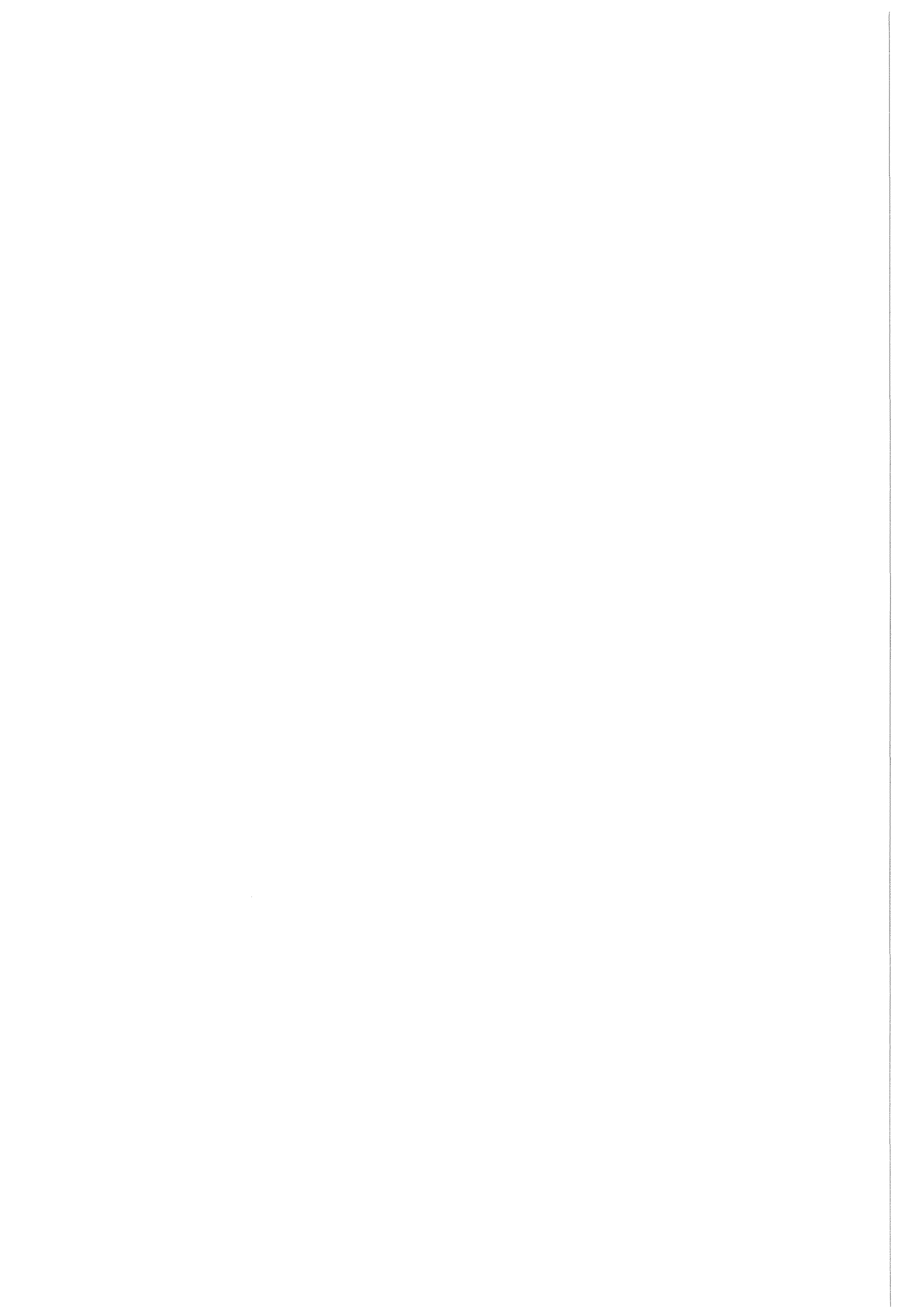


Abb.64: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von einem Rinderalveolarmakrophagen nach 20 Stunden in Monolayer-Kultur und anschließender 30 -minütigen Inkubation mit  $10 \mu\text{g/ml}$  Cytochalasin B. Vergrößerung: 9400x



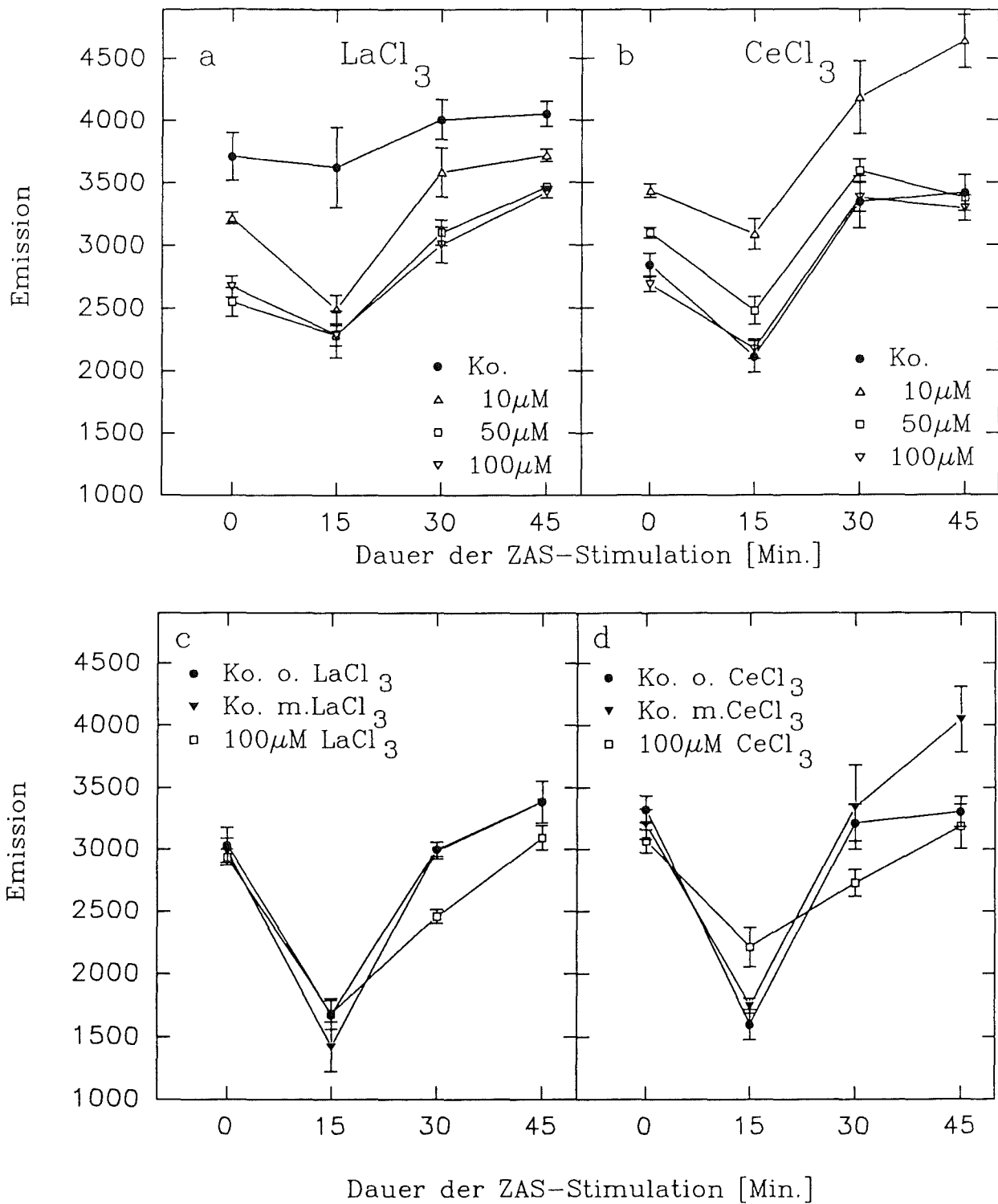


Abb.65: Emission des gebundenen Rhodamin-Phalloidin, als Maß für die vorhandene F-Aktinmenge in Rinderalveolarmakrophagen, nach 15, 30 und 45-minütiger Stimulation mit ZAS.

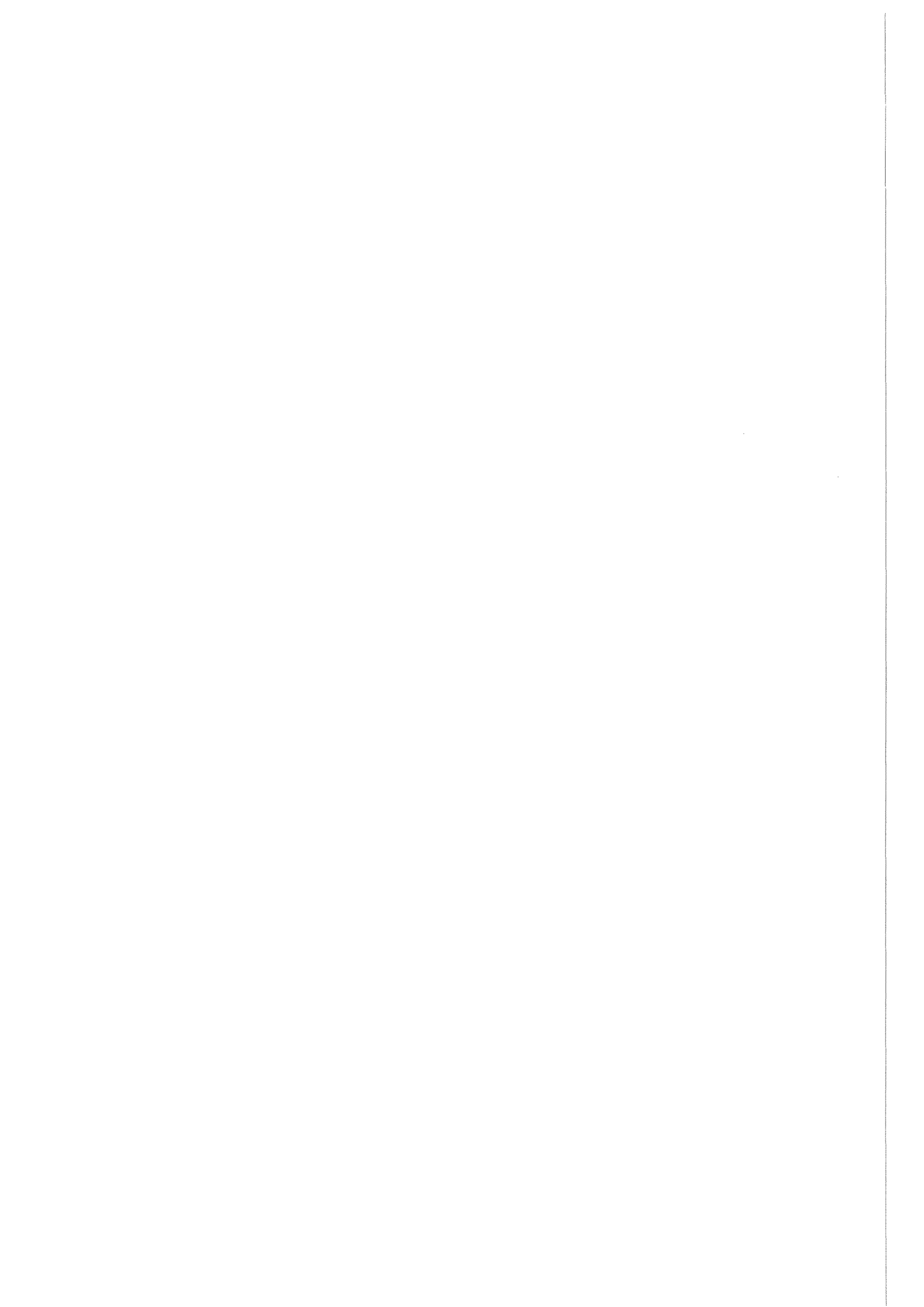
a) Die Zellen waren mit verschiedenen LaCl<sub>3</sub>-Konzentrationen für 4 Stunden vorinkubiert worden.

b) Die Zellen waren mit verschiedenen CeCl<sub>3</sub>-Konzentrationen für 4 Stunden vorinkubiert worden.

c) Die Stimulation erfolgte mit ZAS in 100 μM LaCl<sub>3</sub> nach 4-stündiger Vorinkubation mit 100 μM LaCl<sub>3</sub>.

d) Die Stimulation erfolgte mit ZAS in 100 μM CeCl<sub>3</sub> nach 4-stündiger Vorinkubation mit 100 μM CeCl<sub>3</sub>.

Mittelwerte mit Standardfehler. n = 5. Repräsentativ für 3 Versuche.





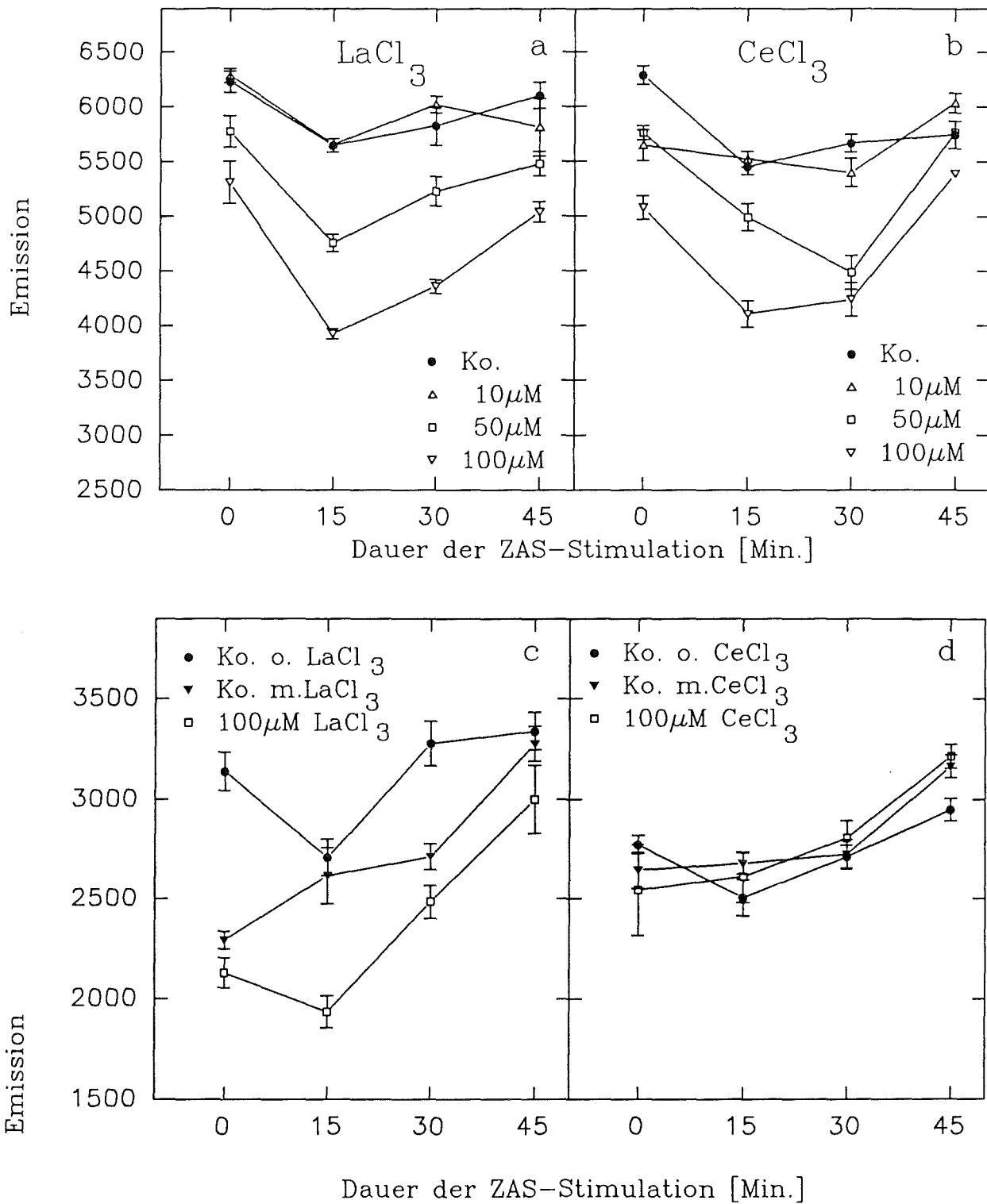


Abb.66: Emission des gebundenen Rhodamin-Phalloidin, als Maß für die vorhandene F-Aktinmenge in Rinderalveolarmakrophagen, nach 15, 30 und 45-minütiger Stimulation mit ZAS.

a) Die Zellen waren mit verschiedenen LaCl<sub>3</sub>-Konzentrationen für 20 Stunden vorinkubiert worden.

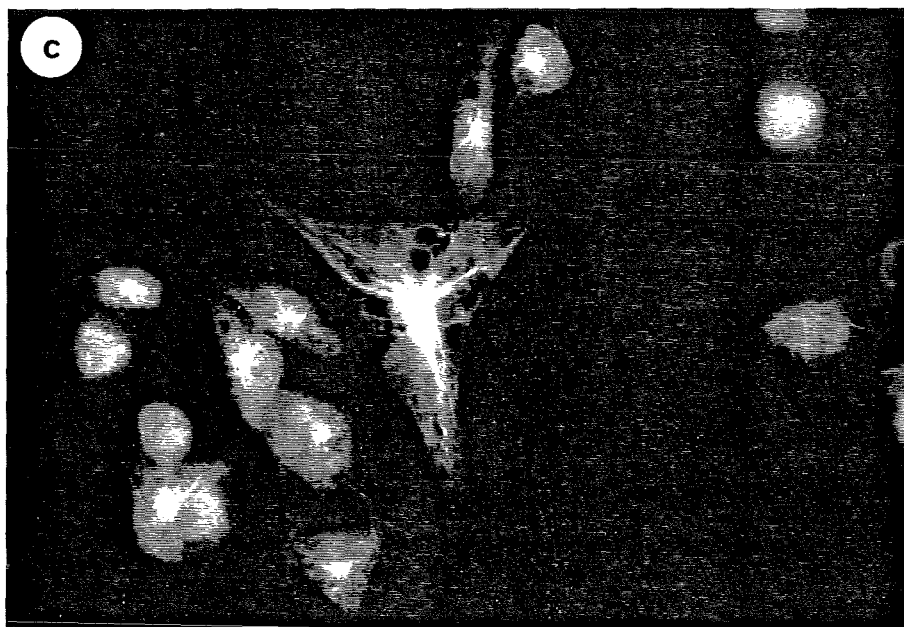
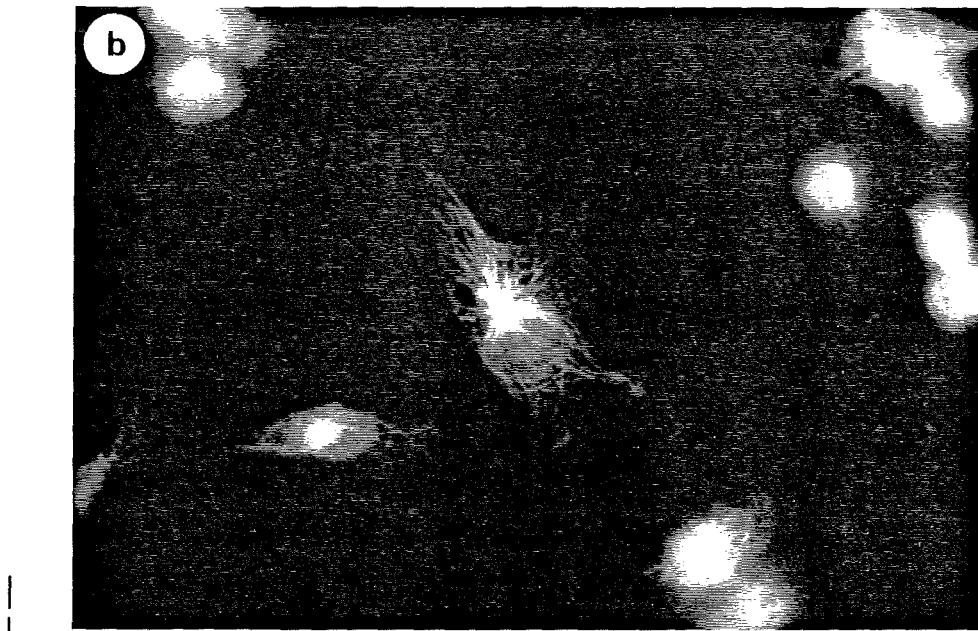
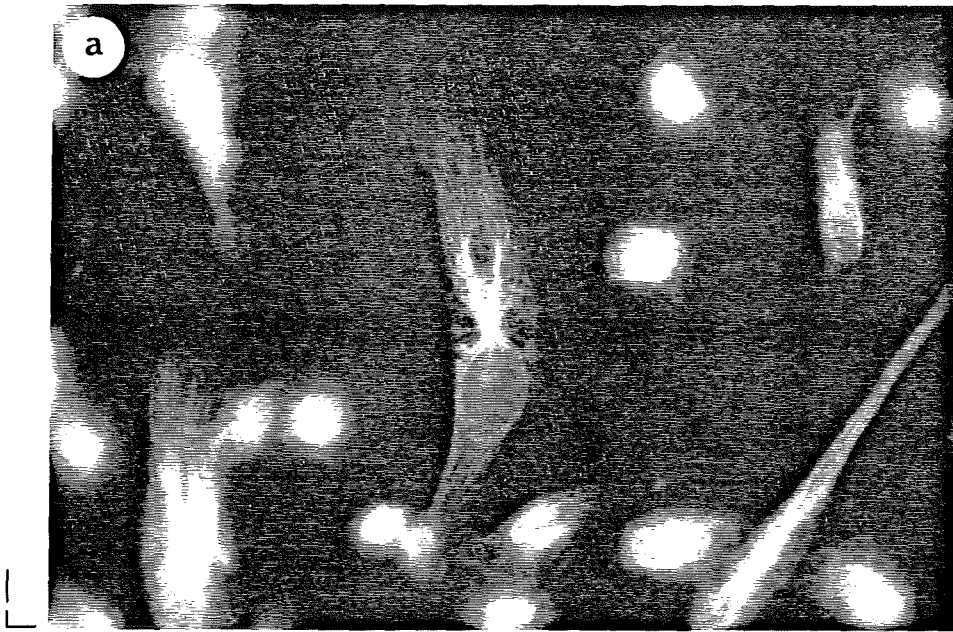
b) Die Zellen waren mit verschiedenen CeCl<sub>3</sub>-Konzentrationen für 20 Stunden vorinkubiert worden.

c) Die Stimulation erfolgte mit ZAS in 100 μM LaCl<sub>3</sub> nach 20-stündiger Vorinkubation mit 100 μM LaCl<sub>3</sub>.

d) Die Stimulation erfolgte mit ZAS in 100 μM CeCl<sub>3</sub> nach 20-stündiger Vorinkubation mit 100 μM CeCl<sub>3</sub>.

Mittelwerte mit Standardfehler. n = 5. Repräsentativ für 3 Versuche.

- Abb.67: Organisation der Mikrotubuli von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in Medium (Kontrollzellen).
- a) Nach 2 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - b) Nach 4 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - c) Nach 20 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung.



- Abb.68: Organisation der Mikrotubuli von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in  $100 \mu\text{M CeCl}_3$ .
- a) Nach 2 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - b) Nach 4 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
  - c) Nach 20 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung.

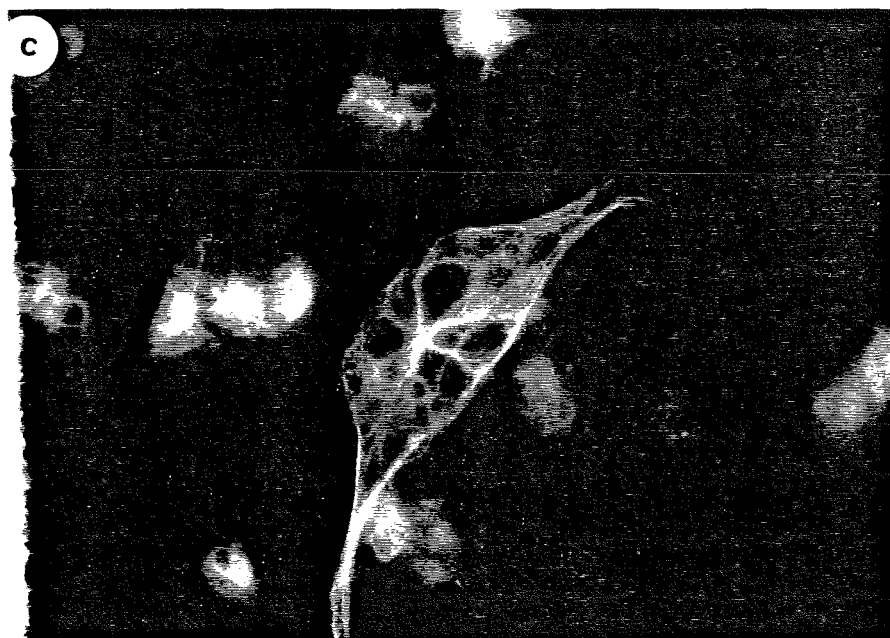
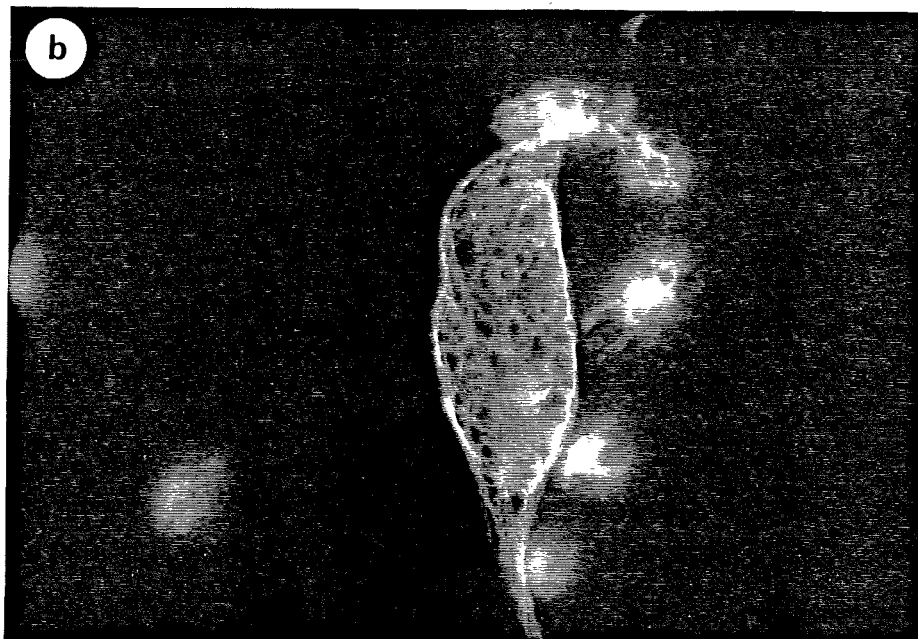
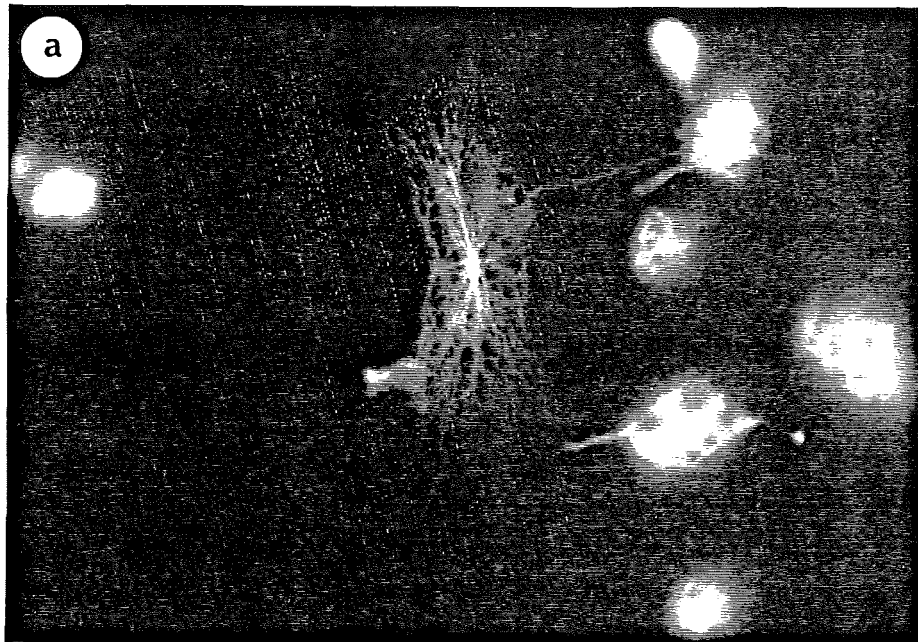


Abb.69: Organisation der Mikrotubuli von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation in  $100 \mu\text{M LaCl}_3$ .

- a) Nach 2 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- b) Nach 4 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- c) Nach 20 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x

Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung.

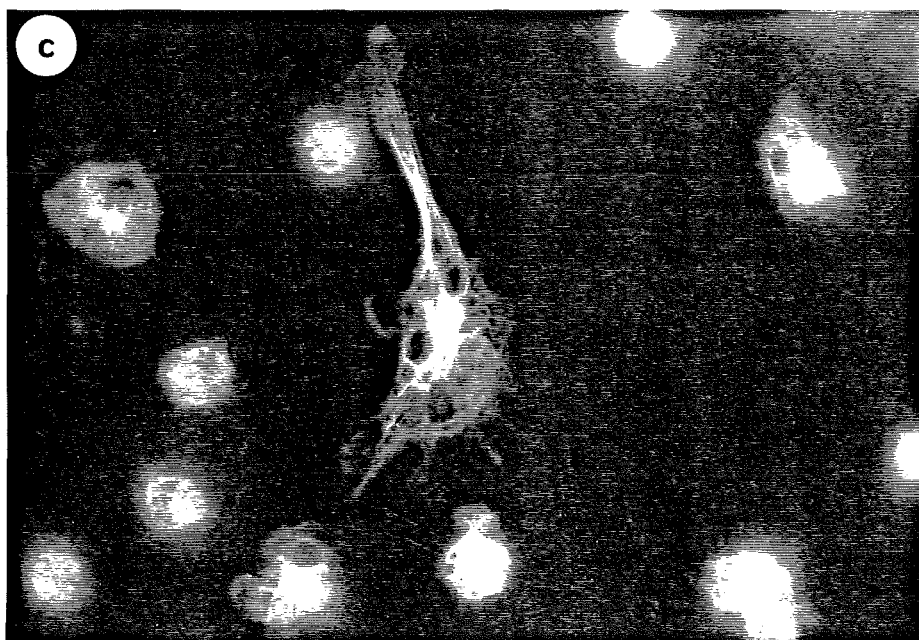
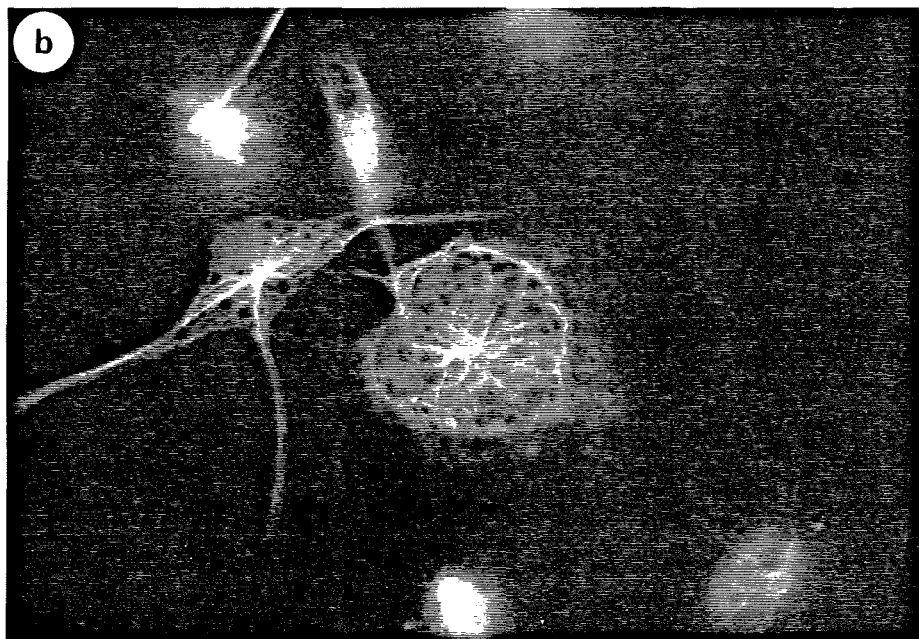
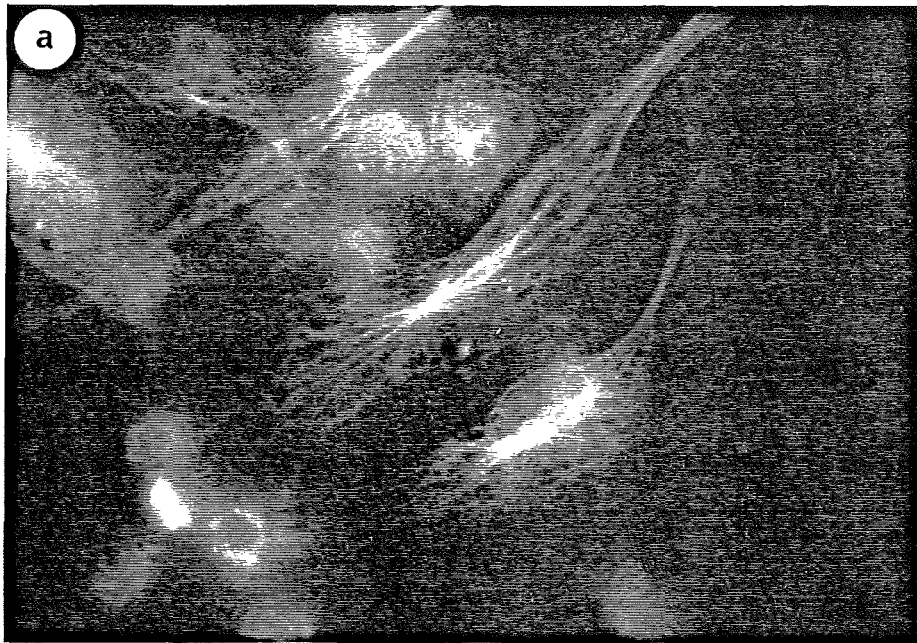
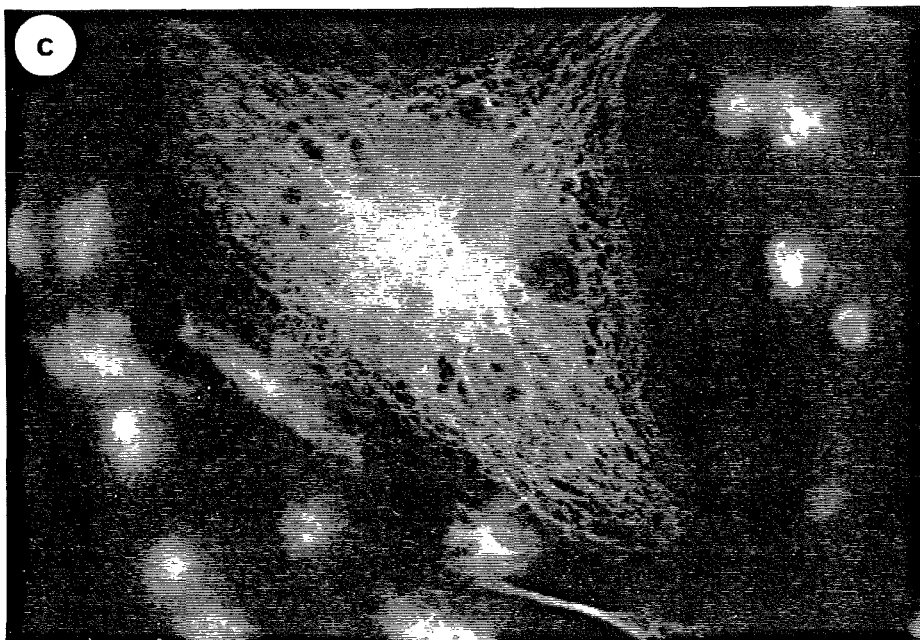
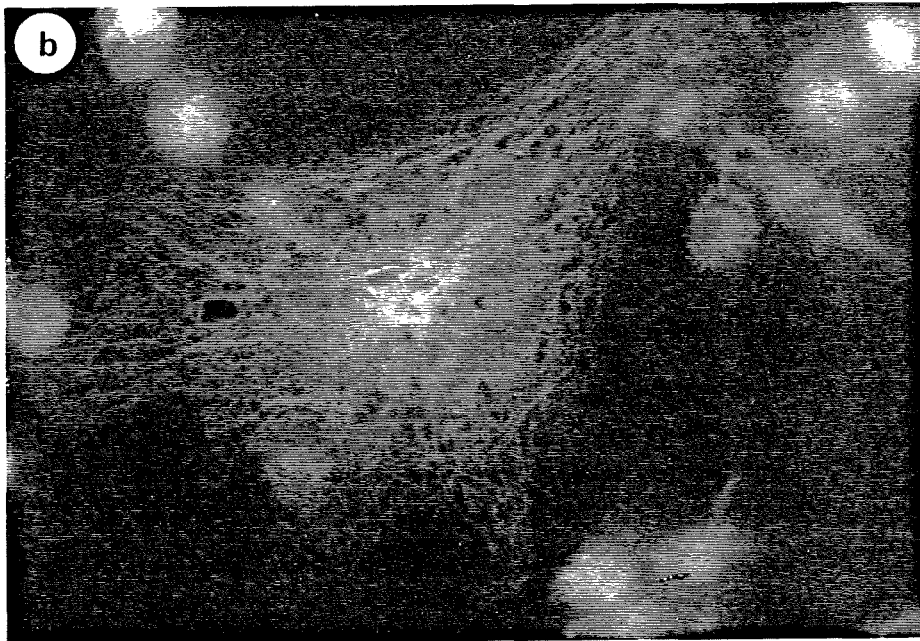
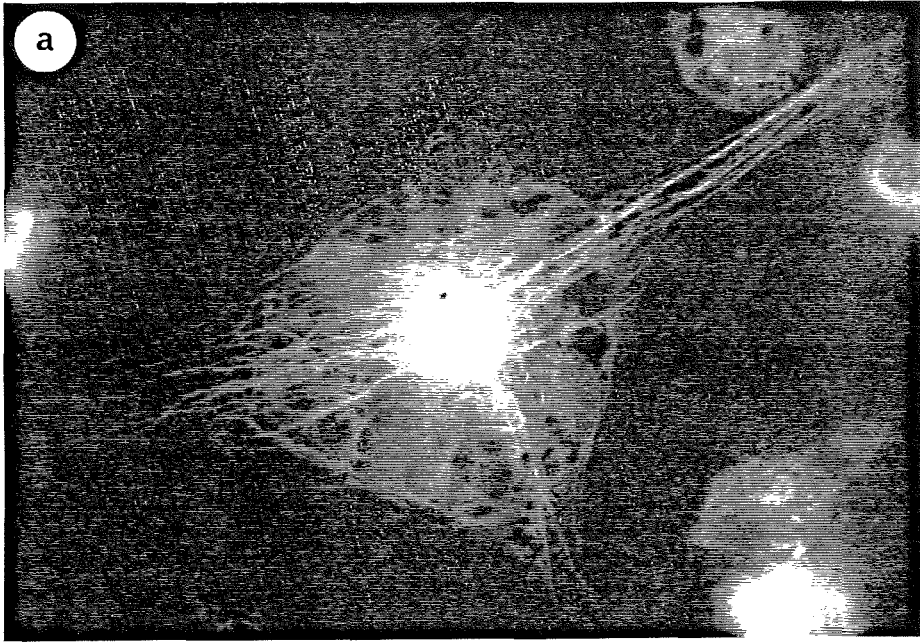


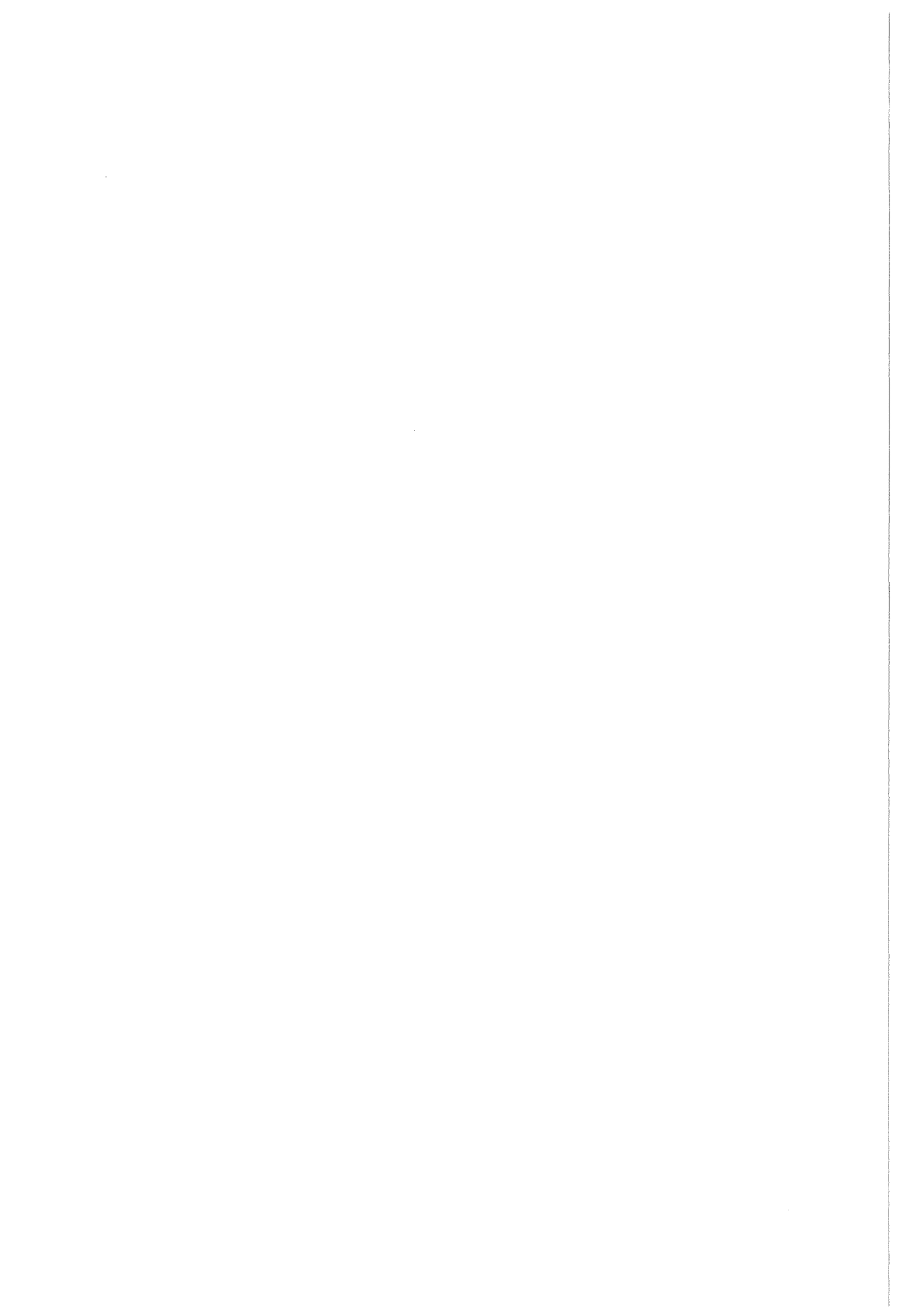
Abb.70: Organisation der Mikrotubuli von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation mit 100  $\mu$ g/ml Quarz.

- a) Nach 2 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- b) Nach 4 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x
- c) Nach 20 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x

Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung.







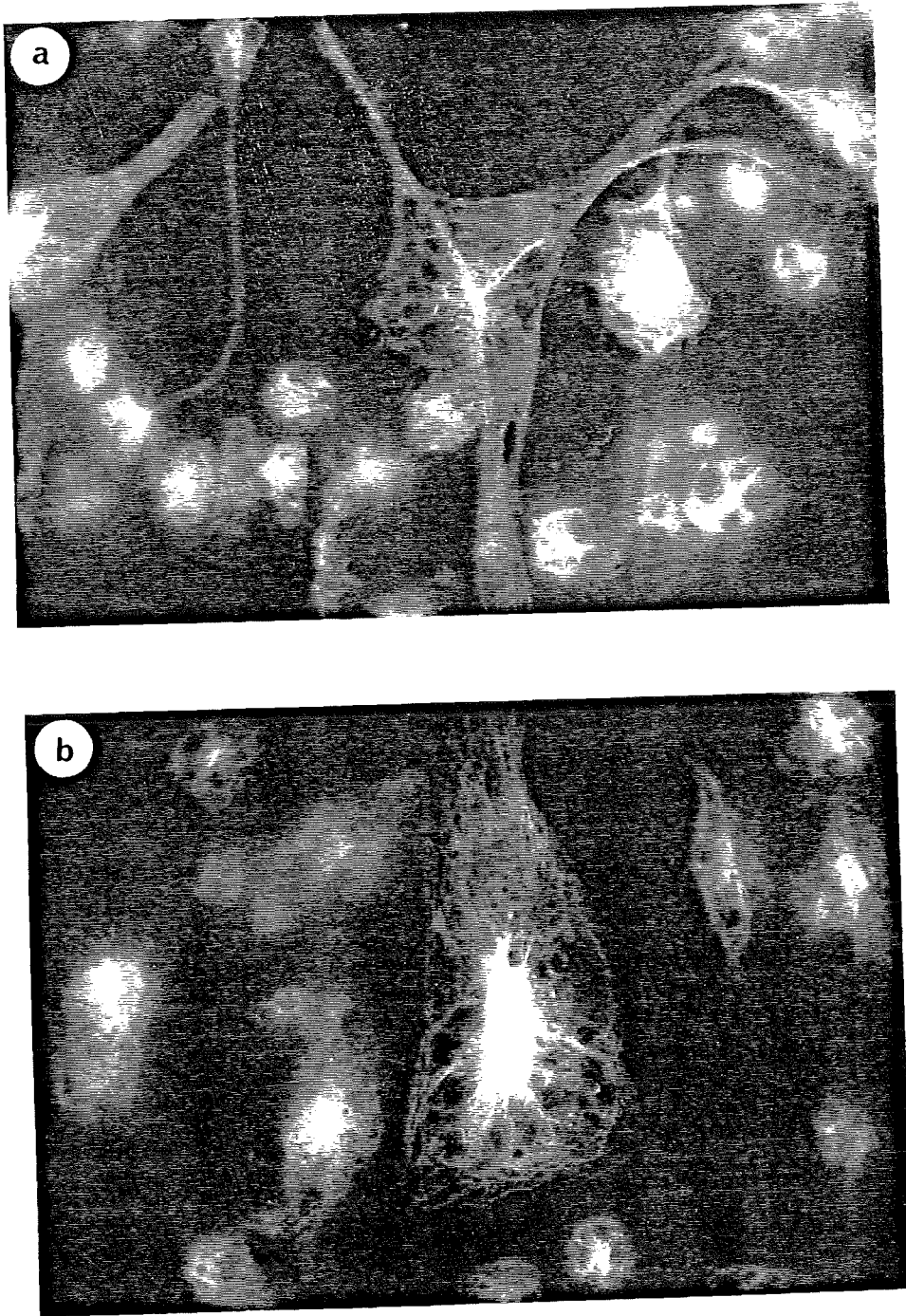
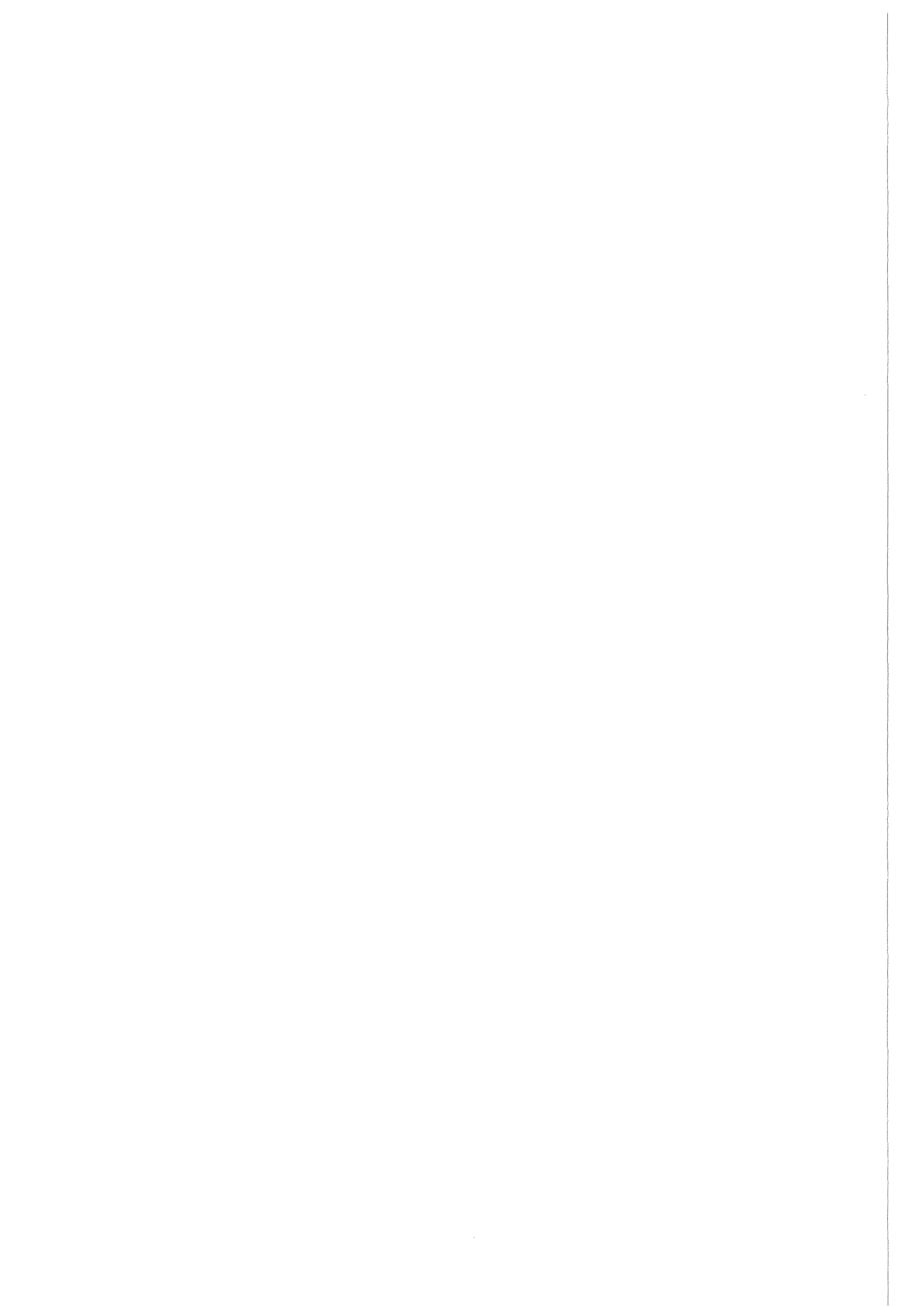


Abb.71: Organisation der Mikrotubuli von Rinderalveolarmakrophagen nach Inkubation mit  $100 \mu\text{g/ml La}_2\text{O}_3$ .  
a) Nach 2 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x  
b) Nach 4 -stündiger Inkubation. Vergrößerung: 1000x  
Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung.



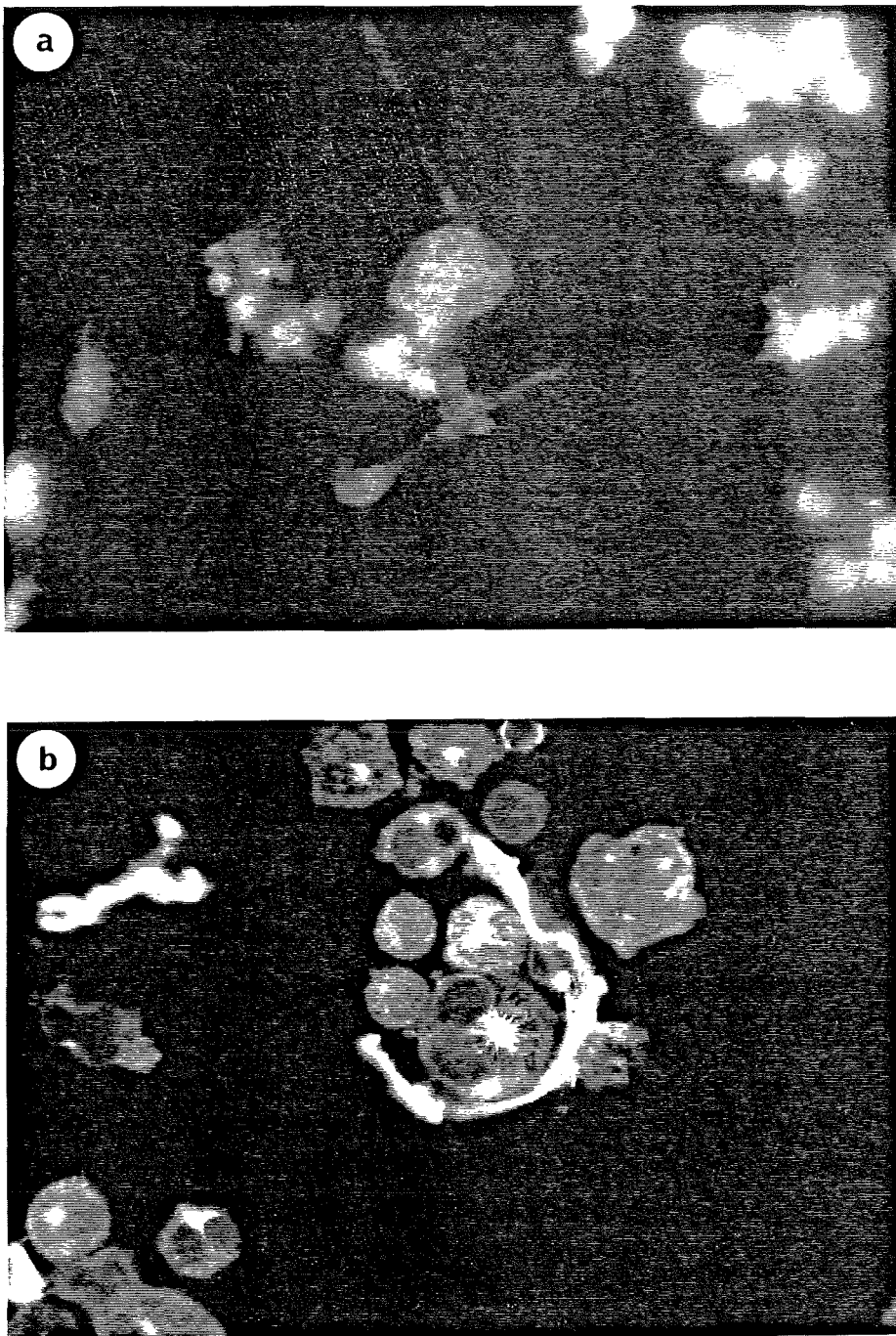


Abb.72: Einfluß einer 2 -ständigen Inkubation mit Colchizin ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) auf die Organisation der Mikrotubuli von Rinderalveolarmakrophagen nach 20 Stunden Monolayer-Kultur.  
 a) Direkt nach der Inkubation Colchizin. Vergrößerung:1000x  
 b) Nach weiteren 4 Stunden Kultur in Medium. Vergrößerung: 1000x  
 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung.