

KfK 5248 B  
Februar 1994

**Untersuchungen der Wirkungen  
von NO<sub>2</sub> auf Immunfunktionen  
von Rinderalveolarmakrophagen  
in einem realitätsnahen  
in vitro-System**

I. Lind  
Institut für Toxikologie

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Toxikologie

KfK 5248 B

**Untersuchungen der Wirkungen von NO<sub>2</sub> auf Immunfunktionen  
von Rinderalveolarmakrophagen in einem realitätsnahen  
in vitro-System**

Ines Lind

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, 76021 Karlsruhe**

**ISSN 0303-4003**

## **Untersuchungen der Wirkungen von NO<sub>2</sub> auf Immunfunktionen von Rinderalveolarmakrophagen in einem realitätsnahen in vitro-System**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Kultur von Zellen direkt in der Gasphase etabliert. Benutzt wurden post-mortal gewonnene Rinderalveolarmakrophagen wie auch differenzierte HL-60 Zellen als Modell für menschliche Zellen.

Mittels dieses Systems wurde die Wirkung der Inhalationsnoxe NO<sub>2</sub> auf Rinderalveolarmakrophagen untersucht.

NO<sub>2</sub> führte dosisabhängig zu einem Vitalitätsverlust der Rinderalveolarmakrophagen, der nach Applikation von 1,5 ppm NO<sub>2</sub> maximal 10% betrug und nach 3 ppm sich zwischen 10 und 20% bewegte. Damit verbunden war eine Sekretion lysosomaler und cytoplasmatischer Enzyme. Bei beiden Konzentrationen kam es zu morphologischen Veränderungen an der Zellmembran (Bildung sogenannter "Blebs").

Das Gas führte per se zu keiner Stimulation der Sekretion an Superoxidanionen oder TNF, zeigte jedoch bezüglich der Sekretion von Superoxidanionen eine dosisabhängige Hemmung sowohl bei Zymosan-stimulierten als auch bei spontan voraktivierten Zellen. In fast allen Fällen führte NO<sub>2</sub> zu einer vollständigen Hemmung der LPS-stimulierten TNF-Sekretion, die also sehr empfindlich auf das Gas reagierte.

Die Kombinationsapplikation von Staub (Quarz und Latex) und Schadgas hatte ebenfalls suppressive Wirkung.

Die gleichzeitige Anwesenheit des Hauptbestandteils des Surfactants, Dipalmitoyllecithin, konnte bei der Messung der Superoxidanionenbildung bei beiden NO<sub>2</sub>-Konzentrationen die hemmende Wirkung von NO<sub>2</sub> kompensieren. Die vollständige Hemmung der TNF-Bildung blieb trotz eines solchen Zusatz bestehen.

In der Arbeit wurde geprüft, inwiefern bestimmte Mediatoren, die im Alveolarraum als Reaktion auf eine Noxe auftreten, RAM beeinflussen könnten.

Bei nicht voraktivierten Zellen führte die Anwesenheit von micro- und picomolaren Konzentrationen von PAF zu keiner Stimulation der Superoxidanionenfreisetzung, auch nicht in Kombination mit TNF oder Zymosan. TNF und LTB<sub>4</sub> für sich allein waren ebenfalls ohne Einfluß. Spontan voraktivierte Zellen können durch diese Mediatoren stimuliert werden.

Was die TNF-Sekretion durch RAM betrifft, so waren PAF, LTB<sub>4</sub> und IFN- $\gamma$ , jeweils alleine appliziert, ohne Effekte. Die gleichzeitige Verabreichung von PAF bzw. LTB<sub>4</sub> zusammen mit LPS bewirkte keine über den bloßen LPS-Effekt hinausgehende TNF-Freisetzung. Wichtige Mediatoren des Entzündungsgeschehens haben also für sich allein oder in Kombination keinen Einfluß auf die Superoxidanionen- bzw. TNF-Freisetzung durch Alveolarmakrophagen. Dexamethason hatte eine Hemmung der LPS-stimulierten TNF-Bildung zur Folge.

Es wurde festgestellt, daß auch zu Makrophagen oder zu Granulocyten differenzierte HL60-Zellen sich für die Gasphasenkultur eignen. Sie setzen nach Stimulation TNF, IL 6 und IL 8 in

den Kulturunterstand frei, wie mittels ELISA nachgewiesen werden konnte. Damit steht auch ein Modell mit menschlichen Zellen für bestimmte Fragestellungen zur Verfügung.

Es wurde somit gezeigt, daß unsere Gasphasenkultur ein valides System zur Untersuchung der Wirkungen von Schadgasen darstellt. Für NO<sub>2</sub> wurden mit dieser Methode deutlich immunsuppressive Wirkungen für Konzentrationen nachgewiesen, die zwar erheblich über den umweltüblichen, aber unterhalb des MAK-Wertes liegen.

## **Investigations to the influence of nitrogen dioxide on immunomodulatory properties of bovine alveolar macrophages in a realistic in vitro-system**

A method for culture of cells in gasphase was established. The cells used were post-mortem lavaged bovine alveolar macrophages as well as differentiated HL-60 cells as a model for human cells.

The influence of nitrogen dioxide on bovine alveolar macrophages was investigated by means of this system.

NO<sub>2</sub> induced a dose-related loss of viability that was maximal 10% after the application of 1,5 ppm NO<sub>2</sub> and varied inbetween 10 and 20% after the application of 3 ppm NO<sub>2</sub>. Linked to that was the secretion of lysosomal and cytoplasmatic enzymes. Both concentrations induced morphological changes on the outer cell membrane (the formation of so called "blebs").

The gas per se didn't cause any stimulation of the secretion of superoxide anions or TNF, whereas Zymosan-stimulated as well as spontaneously activated cells showed a dose-related inhibition of the secretion of superoxide anions. In nearly all cases NO<sub>2</sub> induced a total inhibition of the LPS-stimulated TNF-secretion, which therefore showed to be very sensitive to the gas.

A combination of dust (quartz and latex) and gas induced as well a suppression of both parameters.

The simultaneous presence of the chief component of the surfactant, the Dipalmitoyllecithin, lead to a compensation of the suppressive influence of NO<sub>2</sub> concerning the secretion of superoxide anions. The total inhibition of the TNF-formation still remained when Dipalmitoyllecithin was added.

It was examined to what extent certain mediators, that appear in the alveolar tract as a reaction to toxic gases, can influence the reaction of the bovine cells.

The presence of micro- and picomolar concentrations of platelet-activating factor didn't lead to any stimulation of the secretion of superoxide anions with cells not spontaneously activated. The same was valid for the combination with TNF or Zymosan. TNF and LTB<sub>4</sub> itselfes were without any influence. Spontaneously activated cells can be stimulated through these mediators.

Concerning the TNF secretion by bovine alveolar macrophages, the sole application of PAF, LTB<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$  were without any influence. The simultaneously application of PAF and LTB<sub>4</sub> respectively together with LPS induced a TNF secretion that was similar to the sole LPS effect. Important mediators of the inflammation are therefore without any influence. Dexamethasone lead to an inhibition of the LPS-stimulated TNF-secretion.

It was found out that HL60- cells differentiated to macrophages or granulocytes can be cultured in gas phase. When stimulated the cells release TNF, IL-6 and IL-8 as could be detected by an ELISA. That means there is also a model system available that can be used together with human cells.

It could be demonstrated that our gasphase culture is a valid system for the investigation of the effects of adversary gases. The effects found for NO<sub>2</sub> quantified with that culture method were immunosuppressive namely for concentrations that are considerably above the ones in the environment but are below the MAK-value.

## Abkürzungsliste

AA	Arachidonsäure
AM	Alveolarmakrophagen
AMAD	Activity median aerodynamic diameter
BSA	bovine serum albumin
Dex	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPL	L- $\alpha$ Dipalmitoyl Lecithin
EtBr	Ethidiumbromid
FDA	Fluoresceindiacetat
IFN	Interferon
IL	Interleukin
FCS	Fötale Kälberserum
HBSS	Hank's balanced salt solution
Ko	Kontrolle
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
MTT	3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid
NAG	N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphonukleäre neutrophile Granulocyten
RAM	Rinderalveolarmakrophagen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
rhu-TNF	human rekombinantes TNF
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Stickstoffdioxid als gasförmige Noxe.....	1
1.2.	Reaktionszellen in der Lunge auf gasförmige Noxen.....	2
1.3.	Ziele der Arbeit.....	9
2.	Material und Methoden.....	10
2.1.	Gewinnung und Kultur der Zellen.....	10
2.1.1.	Gewinnung von RAM.....	10
2.1.2.	Kultur von HL60-Zellen.....	11
2.2.	Kultur und Exposition der Zellen in Gasphase bzw. in Submerskultur.....	12
2.2.1.	Allgemeines.....	12
2.2.2.	Kultur der Zellen in Gasphase.....	14
2.2.2.1.	Gasphasenkultur von RAM.....	15
2.2.2.2.	Gasphasenkultur von HL60-Zellen.....	16
2.2.3.	Kultur von RAM in der konventionellen Submerskultur.....	16
2.3.	Morphologische und biochemische Betrachtungen.....	17
2.3.1.	Fluoreszenzmikroskopie - Vitalitätstest mit Ethidiumbromid und Fluoresceindiaceat.....	17
2.3.2.	Lichtmikroskopie - Vitalitätstest mit Trypanblau.....	18
2.3.3.	Untersuchungen zur Enzymfreisetzung.....	18
2.3.3.1.	Laktatdehydrogenase (LDH).....	18
2.3.3.2.	N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG).....	18
2.4.	Assays und Reagenzien.....	19
2.4.1.	Messungen von Superoxidanionen.....	19
2.4.1.1.	Allgemeines.....	19
2.4.1.2.	Reagenzien.....	20
2.4.1.3.	Messungen von Superoxidanionen in Gasphase.....	22
2.4.1.4.	Messungen von Superoxidanionen in Submerskultur.....	22
2.4.2.	TNF-Quantifizierung.....	23
2.4.2.1.	TNF-Bestimmung bei RAM durch den WEHI-Bioassay.....	23
2.4.2.1.1.	Allgemeines.....	23
2.4.2.1.2.	Reagenzien.....	23
2.4.2.1.3.	Gewinnung von Kulturüberständen für den TNF-Bioassay.....	25
2.4.2.1.4.	Der TNF-Bioassay.....	25
2.4.2.2.	TNF-Bestimmung bei HL60-Zellen mittels ELISA.....	27
2.4.2.2.1.	Allgemeines.....	27
2.4.2.2.2.	Reagenzien.....	28
2.4.2.2.3.	Gewinnung TNF-haltiger Kulturunterstände.....	28
2.4.2.2.4.	Durchführung der ELISAs zur TNF-Bestimmung.....	29
2.4.3.	Quantifizierung weiterer Cytokine bei HL60-Zellen durch ELISAs: IL-6 und IL-8.....	29
2.4.3.1.	Allgemeines.....	29
2.4.3.2.	Gewinnung IL-6- und IL-8-haltiger Kulturunterstände.....	29
2.4.3.3.	Durchführung der ELISAs zur IL-6- und IL-8-Bestimmung.....	29
2.4.4.	Bestimmung von LTB <sub>4</sub> bei RAM durch HPLC.....	30
2.4.4.1.	Allgemeines.....	30
2.4.4.2.	Gewinnung von Zelllipiden.....	31
2.4.4.3.	Reversed-Phase Chromatographie von LTB <sub>4</sub> - angewandte Methode.....	32

2.4.4.4.	Quantifizierung von LTB <sub>4</sub> .....	33
2.5.	Auswertung der Daten .....	33
3.	Ergebnisse.....	35
3.1.	Morphologische und biochemische Untersuchungen .....	35
3.1.1.	Fluoreszenzmikroskopie von Rinderalveolarmakrophagen (RAM).....	35
3.1.2.	Lichtmikroskopie von RAM .....	35
3.1.3.	Fluoreszenzmikroskopie von HL60-Zellen.....	35
3.1.4.	Lichtmikroskopie von HL60-Zellen .....	36
3.1.5.	Quantifizierung der Lactatdehydrogenase (LDH) und der N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG) bei RAM .....	36
3.2.	Superoxidanionenmessungen.....	36
3.2.1.	Messung der Sekretion von Superoxidanionen durch RAM .....	36
3.2.1.1.	Einfluß von Cytokinen auf O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Messungen .....	36
3.2.1.2.	Einfluß von NO <sub>2</sub> und DPL auf die Superoxidanionenfreisetzung durch RAM ...	39
3.2.2.	Messung der Sekretion von Superoxidanionen durch HL60-Zellen .....	41
3.2.2.1.	Einfluß von Cytokinen auf O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Messungen .....	41
3.3.	TNF-Messungen .....	42
3.3.1.	Messung der Sekretion von Tumor Nekrose Faktor durch RAM .....	42
3.3.1.1.	Einfluß von Mediatoren auf TNF-Messungen .....	42
3.3.1.2.	Einfluß von NO <sub>2</sub> und DPL auf die spontane und LPS-induzierte TNF-Freisetzung durch RAM.....	43
3.4.	TNF-, IL-6- und IL-8-Messungen bei HL60-Zellen .....	46
3.5.	LTB <sub>4</sub> -Bestimmung bei RAM per HPLC.....	48
4.	Diskussion .....	49
4.1.	Eignung der Kulturmethode zum Nachweis von Effekten gasförmiger Noxen ...	49
4.2.	Eignung von HL60 Makrophagen und HL60 Granulocyten für die Gasphasenkultur.....	50
4.3.	Bildung von Superoxidanionen und Tumor Nekrose Faktor durch verschiedene Mediatoren.....	51
4.3.1.	Einflüsse von Cytokinen und Lipidmediatoren .....	51
4.3.2.	Einflüsse von TPA, Ca <sup>2+</sup> -Ionophor, LPS und Dexamethason.....	54
4.4.	Wirkung von NO <sub>2</sub> auf die Vitalität, Enzymfreisetzung und Morphologie von Rinderalveolarmakrophagen .....	57
4.5.	Bildung von Superoxidanionen und Tumor Nekrose Faktor bei Rinderalveolarmakrophagen unter dem Einfluß von NO <sub>2</sub> .....	58
4.6.	Einfluß von Dipalmitoyllecithin auf die Wirkung von NO <sub>2</sub> bei Rinderalveolarmakrophagen .....	60
4.7.	Zusammenfassende Diskussion .....	62
5.	Zusammenfassung .....	63
6.	Literaturverzeichnis.....	65
7.	Abbildungen.....	

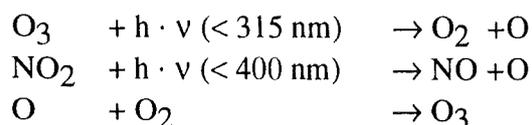
## 1. Einleitung

### 1.1. Stickstoffdioxid als gasförmige Noxe

Die Auswirkungen von Luftschadstoffen auf die Gesundheit sind immer höher zu bewerten. Daß Luftschadstoffe einen gesundheitsschädigenden Einfluß haben können, weiß man seit den großen Umweltkatastrophen dieses Jahrhunderts, 1930 in Maastal/Belgien, 1948 in Donnora/Pennsylvania und 1952 in London. Bei vielen an der Luftverschmutzung beteiligten Stoffen ist davon auszugehen, daß es sich um anthropogen verursachte Substanzen handelt. Industrie und Verkehr tragen in vielfacher Weise dazu bei, die unterschiedlichsten Stoffe in die Atmosphäre zu emittieren. Eine der Hauptkomponenten der Luftverschmutzung stellt das Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) dar.  $\text{NO}_2$  wird hauptsächlich bei Verbrennungsprozessen produziert und erreicht in Städten und Industriegebieten die höchsten Konzentrationen.

Im Gegensatz zum Schwefeldioxid ist ein abnehmender Trend der Emission in den letzten 10 Jahren bei den Stickoxiden nicht zu beobachten, obwohl inzwischen durch die Immissionsschutzgesetzgebung wie der Großfeuerungsanlagen-Verordnung der Anteil der industriebedingten Emissionen deutlich gesunken ist. Stickstoffdioxid-Konzentrationen erreichen in den Ballungsgebieten -insbesondere durch das hohe Verkehrsaufkommen bedingt- Werte zwischen  $60$  und  $70 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $0,03$  und  $0,035$  ppm) pro Jahr mit Spitzenwerten bis zu  $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $0,2$  ppm). Die in der TA-Luft festgelegten Jahresmittelgrenzwerte liegen mit  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $0,04$  ppm) nur wenig über dem tatsächlich vorkommenden Jahresmittelwert. Der MAK (maximale Arbeitsplatzkonzentration) -Wert beträgt  $5$  ppm.

Neben einer direkten Wirkung des  $\text{NO}_2$  auf biologische Systeme, auf die später genauer eingegangen werden soll, kann diese Verbindung als Reaktionskomponente am photochemischen Oxidationsprozeß teilnehmen. Der hohe Sauerstoffanteil in der Atmosphäre stellt ein großes Oxidationspotential dar, das unter dem Einfluß von Sonnenlicht in Verbindung mit den in der Luftschicht angesammelten Schadstoffen reagiert. In der Troposphäre stehen als Radikalvorläufer nur  $\text{O}_3$  und  $\text{NO}_2$  zur Verfügung. In verschmutzter, durch Verbrennung fossiler Brennstoffe belasteter Atmosphäre gilt das  $\text{NO}_2$  als Vorläufer für Ozon. Beide Spurengase absorbieren das Sonnenlicht im Spektralbereich unterhalb  $400$  nm und unterliegen der photochemischen Zersetzung:



Wenn Stickoxide, Kohlenmonoxid und Kohlenwasserstoffe intensiver Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind, entsteht photochemischer Smog. So können mehrere Tonnen Ozon bis etwa am frühen Nachmittag gebildet werden, z.B. besonders über Ballungsgebieten.

Durch die hohe Stickstoffanreicherung in der Atmosphäre kommt es auch zu einer Deposition im Boden. Die Speicherkapazität des Bodens stößt aber zunehmend auf Grenzen (Houdijk et

al., 1993). Der Stickstoff wird einerseits als Nitrat über das Sickerwasser ausgewaschen, andererseits findet durch mikrobielle Umbauprozesse die Bildung von Lachgas ( $N_2O$ ) statt, das an die Atmosphäre abgegeben wird. Da  $N_2O$  eine geringe chemischen Reaktivität besitzt, kann es als Spurengas in die Stratosphäre diffundieren und wird dort einer kurzweiligen UV-Strahlung ausgesetzt. Es kommt zur Photolyse und Bildung von NO aus  $N_2O$ . Das entstehende Stickstoffmonoxid katalysiert seinerseits dann den Abbau des stratosphärischen Ozons.  $NO_2$  führt durch photolytische Prozesse zur bodennahen Ozonbildung, andererseits kann es über den Umweg des Bodens zum NO-katalysierten Ozonabbau in der Stratosphäre beitragen. Stickstoffdioxidemissionen sind damit auf mehrfache Weise an schädigenden Einflüssen auf biologische Systeme beteiligt.

Weiterhin hat das oxidative Gas  $NO_2$  eine direkte Wirkung auf den Respirationstrakt von Lebewesen. Die Oxide des Stickstoffs sind hochreaktive Komponenten und spielen ebenso eine Rolle als Luftschadstoffe in Innenräumen und am Arbeitsplatz. Inhalationsunfälle am Arbeitsplatz mit hohen  $NO_2$ -Konzentrationen waren die ersten Hinweise auf die gesundheitsschädigende Wirkung von  $NO_2$  auf den Atemtrakt. Darüberhinaus tritt  $NO_2$  auch im Zigarettenrauch bis zu einer Konzentration von 250 ppm auf (Norman und Keith, 1965). Epidemiologische Untersuchungen ergaben Hinweise auf eine Assoziation zwischen einer Innenraum- und einer Außenluftexposition und der Häufigkeit oder der Dauer der Atemwegserkrankung und Verschlechterung der Lungenfunktion. Eine Interpretation epidemiologischer Untersuchungen bezüglich kausaler Ursachen wirft viele Fragestellungen auf, so z.B. die Frage nach den verwendeten Variablen oder die Komplexität des Luftschadstoffgemisches.

Im Mittelpunkt der Arbeit steht deshalb die Frage nach der toxischen Wirkung von  $NO_2$  auf seine Zielzellen in der Lunge. Mit Hilfe eines in vitro-Modells soll dieser Zusammenhang untersucht werden.

## 1.2. Reaktionszellen in der Lunge auf gasförmige Noxen

Stickstoffdioxid besitzt eine nur sehr geringe Löslichkeit in wässrigen Medien. Dies bedingt eine große Eindringtiefe in den unteren Bereich des Respirationstraktes, während vergleichsweise leichter wasserlösliche Gase wie Schwefeldioxid oder Chlorwasserstoff bereits im oberen Teil des Respirationstraktes weitgehend absorbiert werden. In Untersuchungen von Postlethwait et. al. (1991) mit isolierten Lungen konnte gezeigt werden, daß das Stickstoffdioxid sehr schnell aufgenommen wird und dabei zu Nitrit reagiert. Es zeigte sich, daß die Rate der  $NO_2$ -Aufnahme durch chemische Reaktionen mit der biologischen Materie und nicht durch die physikalische Löslichkeit begrenzt war. Nicht reagiertes  $NO_2$  trat erst nach reaktiver Absorption in das Epithel ein. Aus diesen in vitro-Untersuchungen kann gefolgert werden, daß die Cytotoxizität des  $NO_2$  nicht auf das eigentliche  $NO_2$  als vielmehr auf seine Reaktionsprodukte, die in die Zellen aufgenommen werden, zurückzuführen ist.

Im Experiment wird der Lungenschaden durch toxische Gase allgemein so eingeschätzt, daß histopathologische Abnormitäten, Veränderungen bei dem Zellproliferationsmuster und

biochemische Veränderungen im Lungengewebe auftreten (Bils und Christie, 1980; Mustafa und Tierney, 1978, Wagner et al., 1992).

Im Tierversuch kann  $\text{NO}_2$  eine Vielzahl zellulärer Reaktionen modifizieren. Aus der Literatur ist zu ersehen, daß  $\text{NO}_2$  zu folgenden physiologischen Lungenfunktionsveränderungen führen kann: es übt vermutlich seine biologische Wirkung zum Teil durch Initiation einer Lipidperoxidation der Zellmembran (Menzel, 1976) und/oder durch Oxidation von reduzierenden Verbindungen und Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht aus, was nachfolgend zum Zellschaden oder Zelltod führt (Sagai und Ichinose, 1987). Die dabei auftretende Bildung reaktiver Intermediate (Rietjens et al., 1986) führt nach längerer  $\text{NO}_2$ -Exposition zu einem verminderten antioxidativen Schutz - damit steigt die Bildung cytotoxischer Lipidperoxide, die die Membranfluidität beeinflussen können (Sagai et al., 1984; Rietjens et al., 1987). Die Inhalation von  $\text{NO}_2$  verursacht einen Zellschaden bei Alveolar-Typ-I-Zellen, führt zur Proliferation von Typ-II-Zellen, zur Ablösung des Endothels und zu einer interstitiellen fibrotischen Reaktion (Crapo et al., 1984; Evans et al. 1976), ebenso wie zu einem centrilobulären Emphysem (Glasgow et al., 1987). Weiterhin kann ein Anstieg der Atemwegsreaktivität verzeichnet werden (Kobayashi und Shinozaki, 1992). Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL)  $\text{NO}_2$ -exponierter Tiere resultiert in einer veränderten Zusammensetzung der Zellpopulation im Vergleich zu Luft-exponierten Tieren (Richters und Damji, 1988), und die Zahl der lavagierten Zellen erhöht sich nach Schadgasexposition (Mochitate et al., 1986). Eine Hemmung der Phagozytoserate (Gardner et al., 1969) kann genauso wie eine Immunsuppression durch  $\text{NO}_2$  induziert werden: es kommt zu einer verminderten Infektabwehr (Goldstein et al., 1973, Kosmider et al., 1973; Acton und Myrvik, 1972).

Untersuchungen, bei denen menschliche Probanden mit  $\text{NO}_2$  exponiert wurden, scheinen im Hinblick auf ihre Auswirkungen des Stickstoffdioxids teilweise widersprüchlich: Pinkston et. al. (1988) konnten in ihrer Untersuchung keine direkt toxische Wirkung von  $\text{NO}_2$  feststellen. Dies gilt auch für die Ergebnisse von Kim et. al. (1991), die  $\text{NO}_2$ -induzierte Veränderungen im niedrigen Konzentrationsbereich quantifizierten. Andererseits gibt es Autoren, die bei 0,6 ppm  $\text{NO}_2$  (Frampton et. al., 1991) und bei 0,2 ppm (Bart et. al., 1988) induktive Effekte von  $\text{NO}_2$  verzeichnen konnten. Die Problematik solcher Untersuchungen wird durch die folgende Publikation deutlich: Mohsenin (1988) exponierte Nichtraucher bei 2 ppm  $\text{NO}_2$ . Die Probanden entwickelten im Laufe der Exposition eine erhöhte Reaktivität der Atemwege, die allerdings nicht mit Veränderungen der Lungenvolumina, Atemflußraten oder Atemsymptomen assoziiert war.

Die Vielfältigkeit der variablen Parameter erschwert eine allgemeine Bewertung solcher Untersuchungen. Weiterhin zeigen die obengenannten Ergebnisse, daß  $\text{NO}_2$  nur bestimmte Funktionen in der Lunge zu beeinträchtigen scheint.

Ein weiterer, nicht unbedeutender Aspekt, der bei Expositionsstudien zur Quantifizierung schadgas-induzierter Noxen eine Rolle spielt, ist die Tatsache, daß  $\text{NO}_2$  immer in Zusammenhang mit anderen Luftschadstoffen in der Außenluft auftritt, und daher eine genaue Zuordnung der aufgetretenen Effekte schwierig erscheint. Ein schwerwiegender Nachteil, den

alle epidemiologischen Untersuchungen mit sich bringen. Laboruntersuchungen mit Menschen sind aus ethischen und praktischen Gründen mit Nachteilen behaftet, denn es können nur relativ geringe physiologische Veränderungen gemessen werden, und Fragen über chronische Krankheiten oder Infektoresistenz bleiben unzulänglich beantwortet.

Wie oben schon erwähnt, beeinflusst  $\text{NO}_2$  vor allem die unteren Atemwege (Stephens et. al., 1972, Parkinson und Stephens, 1973). Geringe Konzentrationen scheinen bei einer Dauerexposition zu Lungenfibrosen und zu Beeinträchtigung der Abwehrmechanismen der Lunge zu führen (Frampton et. al., 1991; Acton und Myrvik, 1972). Als Kompartiment sind die Alveoli und die Alveolargänge besonders betroffen (Stephens et al., 1972). Toxische Effekte der verschiedensten Art sind an Alveolarmakrophagen (Mochitate et. al., 1986; Kleiner mann et. al., 1982) und Epithelzellen (Alink und Rietjens, 1988) beobachtet worden.

Vor diesem Hintergrund erscheint für diese Arbeit die Verwendung der beiden folgenden Zelltypen sinnvoll:

- Rinderalveolarmakrophagen und
- zu Makrophagen differenzierte HL60-Zellen.

Alveolarmakrophagen, in diesem Fall aus der Rinderlunge isoliert, repräsentieren eine der Zielzellen für die anthropogene Inhalationsnoxe  $\text{NO}_2$  und stellen eine sehr stark an den natürlichen Zustand angelehnte Situation dar. Andererseits ermöglicht die Verwendung von zu Makrophagen differenzierten HL60-Zellen gegebenenfalls eine konstantere Reproduktion von Daten als auch die Verwendung spezifischer ELISA-Verfahren für diverse Cytokine. Daraus resultiert auch eine der Zielsetzungen dieser Arbeit, nämlich die Klärung der Frage, ob eine Gasphasenkultur von HL60-Zellen überhaupt möglich ist.

Biochemische Analysen, die mit in vivo befindlichen Zellen durchgeführt werden, zeigen Veränderungen, die durch den Einfluß der verschiedenen Zelltypen hervorgerufen werden. Kombinierte biochemische und morphologische Untersuchungen waren teilweise hilfreich bei der Bemessung von Lungenschäden, jedoch können solche Untersuchungen kompliziert und teuer sein. Diese Probleme können dadurch überwunden werden, indem definierte Populationen an Lungenzellen in Zellkulturen verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein in vitro-Modell für Alveolarmakrophagen entwickelt, um die Toxizität eines Schadgases auf Zellen des Atemtraktes zu untersuchen. Diese Gasphasenkultur von Zellen beinhaltet wichtige Aspekte der Alveoli, besonders den Einfluß von Mediatoren anderer Zellen des Alveolartraktes, die Exposition von Zellen in einer gasförmigen und einer flüssigen Phase, und die Versorgung der Zellen durch basal befindliches Medium. Im Zusammenhang mit biochemischen Messungen werden in dieser Arbeit vollständig neue Fragestellungen über die Wirkung von  $\text{NO}_2$  aufgegriffen, die sich von den bis dato gemachten Untersuchungsmethoden und -parametern unterscheiden: wie moduliert  $\text{NO}_2$  die Cytokinsekretion (in diesem Fall die des Tumor Nekrose Faktors) nach einer Gasphasenexposition von Alveolarmakrophagen? Und welche Rolle kommt dem Stickstoffdioxid bei einer Kombinationsexposition zusammen mit Staub zu? Außerdem wird untersucht, welche Auswirkungen  $\text{NO}_2$  auf die lokalen Abwehrvorgänge (Bildung von

Superoxidanionenradikalen) in der Lunge hat. Entsprechend der üblichen Nomenklatur wird im folgenden das Superoxidanionenradikal kurz als Superoxidanion bezeichnet.

Die Phagocytose spielt bei Alveolarmakrophagen eine entscheidende Rolle bei der Reinigung des Atemtraktes. Werden diese Zellen *in vitro* untersucht, scheint ihre Reaktion auf der Natur des Partikels zu beruhen. Asbest, Quarz ( $\text{SiO}_2$ ), und z.B. Zigarettenrauch zeigen ihre cytotoxische Wirkung durch eine gehemmte Mobilität der Makrophagen. Quarz darüberhinaus führt zur Hemmung ihrer Vitalität.

Gasförmige Umweltnoxen, denen Menschen exponiert sind, können Kombinationen aus aerosolisierten Partikeln ( $\text{SiO}_2$ ) und oxidativen Gasen ( $\text{NO}_2$ ) darstellen. Ursachen für die kombinierte Exposition können vom photochemischen Smog herrühren, ihren Ursprung in der individuellen Lebensweise haben (Rauchen) oder beruflich bedingt sein (Bergbau).

$\text{NO}_2$  und  $\text{SiO}_2$  scheinen bei der Induktion einer veränderten Lungenfunktion sowohl gleiche als auch unterschiedliche Mechanismen zu besitzen. Nach einer  $\text{SiO}_2$ -Exposition findet eine Partikeldeposition in den Verzweigungen des Alveolartraktes und eine Phagocytose statt (Brody et al., 1982), und es kommt zu einem raschen Einstrom von neutrophilen Granulocyten und Monocyten in die Alveoli (Adamson und Bowden, 1984). Während des Zelltodes oder der Phagocytose setzen Entzündungszellen lysosomale Enzyme frei und synthetisieren freie Radikale, die einen punktförmigen Schaden bei Epithelzellen hervorrufen (Snider, 1983). Darüberhinaus kann Quarz seine Toxizität für die Lunge direkt über die Bildung freier Sauerstoffradikale ausüben (Shi et al., 1988; Vallyathan et al., 1988). Trotz fehlender Hinweise auf eine anders geartete Lungenschädigung nach einer Kombinationsexposition von  $\text{SiO}_2$  und  $\text{NO}_2$ , wurden Untersuchungen mit Tieren in Hinblick auf gemeinsame Exposition mit  $\text{O}_3$  und  $\text{SiO}_2$  bzw. Asbest durchgeführt. Shiotsuka et al. (1986) konnten keine Veränderungen nach einer Quarz-induzierten Fibrose bei Ratten feststellen, die nach der  $\text{SiO}_2$ -Applikation mit 0,8 ppm  $\text{O}_3$  exponiert wurden. Pinkerton et al. (1990) exponierten Ratten mit 0,06-0,25 ppm  $\text{O}_3$  und dann mit aerosolisierten Asbestfasern. Beide Autorengruppen konnten keine potenzierende Wirkung nach dieser Kombinationsexposition feststellen. Andererseits führte die Untersuchung von Vetrano et al. (1992) zu der Erkenntnis, daß eine  $\text{NO}_2$ -Exposition die Quarz-induzierte Entzündung und Fibrose beeinflussen kann, und zwar durch die Abnahme des Quarz-induzierten Influx von neutrophilen Granulocyten in den Alveolen und des Collagengehaltes in der Lunge. Weiterhin konnten die Autoren feststellen, daß der Zeitpunkt der Schadgasapplikation nach der Partikelgabe eine Rolle spielt. Naturgemäß spielt eine kombinierte Einwirkung von speziell Quarz und  $\text{NO}_2$  auf den Menschen kaum eine Rolle. Im Rahmen dieser Untersuchung werden bewußt Quarzpartikel als Modell für ein toxisches Teilchen benutzt. Latex dient dagegen als sogenannter Inertstaub.

Aufgrund der Heterogenität in der Form der Exposition mit vielfach nicht exakt definierten Versuchsbedingungen konnten bis dato zwar Aussagen darüber getroffen werden, daß  $\text{NO}_2$  eine cytotoxische Wirkung ausübt, eine genaue Bestimmung der Veränderungen immunologischer Funktionen konnte aber nicht getroffen werden. Das Hauptanliegen der Arbeit ist die genaue Zuordnung immunologischer Abläufe von  $\text{NO}_2$ -Wirkungen im niedrigen Konzentrationsbereich und ihre Quantifizierung.

Dabei wird mit einem Zellsystem gearbeitet, das eine annähernd ähnliche Reaktivität wie menschliche Alveolarmakrophagen zeigt, nicht aber die Nachteile mit sich führt, die das

Arbeiten mit humanem Zellmaterial besitzt. Diese Nachteile bestehen unter anderem darin, daß mit einer bronchoalveolären Lavage nur geringe Zellausbeuten erzielt werden, und die Zellen eine unterschiedliche Voraktivierung aufweisen können, da sie meistens von Klinikpatienten gewonnen werden.

Bei der Arbeit wird in Betracht gezogen, daß bei diesem in vitro-Modell folgende Nachteile gegenüber der in vivo-Situation auftreten können:

Das System berücksichtigt möglicherweise immunmodulierende Einflüsse nicht, die andere Zellarten auf die Alveolarmakrophagen ausüben können. Weiterhin ist in vivo die Oberfläche einer jeden Alveole mit Surfactant ausgekleidet. Surfactant ist ein den Alveolarraum stabilisierender Lipoproteinfilz mit oberflächenaktiven Eigenschaften. Sein Fehlen sollte in diesem in vitro-System durch das "Coaten" der Zellen mit dem Hauptbestandteil des Surfactant, dem Phospholipid Dipalmitoyllecithin (DPL), kompensiert werden.

Isolierte Surfactant-Aufbereitungen haben einen Proteinanteil, der unter 20% liegt, und beim Lipidanteil ist DPL mit 70-80% der Hauptbestandteil des Gesamtlipidgehaltes (Harwood, 1987). Insofern repräsentiert das bei den Gasphasenkulturen durchgeführte "Coaten" der Zellen damit eine relativ naturgetreue Wiedergabe des natürlichen Surfactant.

Ein weiterer Grund für die Verwendung von DPL besteht auch darin, daß sein Verhalten im in vitro-Modell dem von Alveofact entspricht (Mosbach 1993, unveröffentlicht). Alveofact ist ein Surfactant-Präparat aus Rinderlungen, das seine klinische Anwendung bei Kindern findet, die mit einem akuten Atemnotsyndrom geboren werden.

In dem bei dieser Arbeit verwendeten in vitro-Modell werden oben genannte nicht quantifizierbare Einflüsse auf das Meßsystem weitgehend ausgeschlossen. Diese Eingrenzungen von Untersuchungsparametern ermöglichen definierte und damit kontrollierte Expositionsstudien.

Alveolarmakrophagen werden durch exogene Mediatoren in ihrem Sekretionsverhalten beeinflusst, eine Tatsache, die in diesem in vitro-Modell Berücksichtigung findet.

Einer der untersuchten Parameter, der durch exogene Mediatoren modifiziert werden kann, ist das Superoxidanion  $O_2^-$ .  $O_2^-$  ist ein Nebenprodukt des zellulären Metabolismus (Chance et. al., 1979), der intrazelluläre Ursprung sind die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Elektronentransportprozesse an der Kernmembran und lösliche Proteine wie Hämoglobin, Aldehydoxidase und die Xanthinoxidase (Freeman und Crapo, 1982). Die Produktion an Superoxid kann durch pathologische Prozesse wie Entzündungen (Weiss und LoBuglio, 1982) gesteigert werden. Wird es im Überschuß produziert, können Zellschäden auftreten (Fridovich, 1983).

$O_2^-$  ist als toxische Spezies an der durch freie Radikale induzierten Cytotoxizität beteiligt, wobei die Superoxiddismutase (SOD) den Zellschaden begrenzt. Beispielsweise limitiert eine Erhöhung der intrazellulären SOD den Sauerstoff-induzierten Schaden bei Endothelzellen (Freeman et. al., 1983)

Stimuliert man Makrophagen durch Partikel wie Zymosan, einem Zellwandbestandteil von *Saccaromyces cerevisiae*, weisen sie eine erhöhte Atmungsaktivität auf (Goodlick und Kane,

1986). Die Phagocytose von Zymosan oder Bakterien führt zu einer verstärkten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies wie dem Superoxidanion  $O_2^-$  (Lohmann-Matthes, 1981).

Der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) wurde zuerst als Wirkstoff beschrieben, der durch einen IgE-abhängigen immunologischen Prozeß aus basophilen Leukocyten freigesetzt wird. Der Name der Substanz leitet sich ursprünglich von seiner plättchenaktivierenden Wirkung ab. PAF ist ein biologisch aktives Phospholipid, das von einer Vielzahl von Zellen freigesetzt wird, die an der Pathogenese von allergischen und entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Es führt im Atemtrakt zu biologischen Effekten wie Bronchokonstriktion, Chemotaxis und Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Folglich liegt die Vermutung nahe, daß es als Mediator bei Erkrankungen des Respirationstraktes eine Rolle spielt. Auf zellulärer Ebene besteht die Wirkung von Phospholipiden darin, daß sie wichtige Zwischenprodukte bei der Signalvermittlung durch die Membran sind. PAF kann zur Bildung von Interleukinen, zum Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gehaltes und zur Phosphorylierung durch die Proteinkinase C führen. PAF könnte zu einer Entzündung der Atemwege beitragen, indem es auf direktem Weg die Sekretion von Superoxidanionen induziert. Daß PAF *in vivo* eine solche Wirkung besitzt, zeigten Kato et al. (1993) für Alveolarmakrophagen des Meerschweinchens.

Zymosan ist bei Alveolarmakrophagen von Meerschweinchen ein guter Stimulus der Produktion des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) (Tapia et al., 1989).

Steward und Phillips (1989) fanden, daß adhärenzte Makrophagen beim Meerschweinchen zellassoziertes PAF enthalten, das nach Stimulation freigesetzt wird. In der Arbeit wird bei beiden Kultursystemen Zymosan als Standardstimulans für Rinderalveolarmakrophagen (RAM) verwendet. Damit steht die Frage offen, ob von den Zellen sezerniertes PAF auch durch einen indirekten Mechanismus zu einer verstärkten Sekretion an reaktiven Sauerstoffspezies führt. Diese PAF-Produktion kann *in vivo* auch durch die Anwesenheit anderer Zellarten erfolgen, so z.B. durch Epithelzellen vom Typ I oder II oder durch neutrophile Granulocyten, die bei entzündlichen Reaktionen die Lunge infiltrieren. Eine veränderte Sekretion von Superoxidanionen nach Applikation von PAF konnten Zoratti et al. (1991) bei menschlichen eosinophilen und neutrophilen Granulocyten feststellen.

Werden neutrophile Granulocyten stimuliert, so kommt es zur PAF-Sekretion (Lynch und Henson, 1986; Satouchi et al., 1983), die über eine Mobilisierung der Arachidonsäure (AA) die Bildung freier Radikale induzieren kann (Steward und Philipps, 1989; Henerson, 1987). Die Beeinflussung von Makrophagen wird durch die exogene Applikation dreier verschiedener PAF-Konzentrationen überprüft. Dabei wird eine biphasische Wirkungsweise von PAF in Betracht gezogen: Rola-Pleszczynski und Stankova (1992) fanden, daß PAF im pico- und im mikromolaren Konzentrationsbereich das eine Mal stimulierend, das andere Mal inhibierend wirken kann.

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) wird durch aktivierte Makrophagen produziert und wurde anfänglich als tumorizides Protein beschrieben (Carswell et al., 1975). TNF spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Entzündungs- und Immunreaktionen. Seine Sekretion wurde zuerst bei aktivierten Makrophagen beobachtet und kann nach Exposition mit Endotoxin induziert werden (Tabor et al., 1988). Die Injektion von TNF führt zum Septischen Schock, verursacht Lungenödeme und eine erhöhte Permeabilität, die mit einer Anreicherung von

neutrophilen Granulocyten in der Lunge verknüpft ist (Tracey et al., 1986). Bei dem durch Endotoxine ausgelösten Septischen Schock kann es zu einem Organversagen kommen und als erstes ist davon die Lunge betroffen. Bei diesem Lungenschaden sind Entzündungszellen beteiligt, u.a. neutrophile Granulocyten und Makrophagen, die Mediatoren wie Sauerstoffradikale und Cytokine freisetzen.

Während der letzten Jahre konnte gezeigt werden, daß TNF viele Wirkungen über die der Cytotoxizität auf Tumorzellen hinaus besitzt. Zu den Wirkungen, die TNF bei Zielzellen verursacht, gehören u.a. Veränderungen beim Arachidonsäure-Metabolismus (Bachwich et al., 1986) und oxidative Schäden wie Lipidperoxidation (Zimmerman et al., 1989). Die Cytotoxizität von TNF kann durch Inhibitoren der Cyclooxygenase (Reid et al., 1989), Glucocorticoide (Tsujimoto et al., 1988; Reid et al., 1989) und Antioxidanzien (Yamauchi et al., 1989) reduziert oder verhindert werden. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, daß die Bildung von Superoxidradikalen und anderer reaktiver Sauerstoffspezies zur Schädigung zellulärer Bestandteile führt (Freeman und Crapo, 1982), und die Freisetzung bestimmter Enzyme induziert, die an der durch TNF initiierten Cytotoxizität beteiligt sein könnten (Smolen, 1984). Eine in vivo-Applikation von TNF hat bei Ratten sogar einen direkten Einfluß auf die Produktion des Superoxidradikals: die TPA-stimulierte  $O_2^-$ -Sekretion der Alveolarmakrophagen wird durch TNF erhöht (Mayer et al., 1993). Dem entgegen stehen Untersuchungen, bei denen TNF zur vermehrten Bildung antioxidativer Enzyme in der Lunge führt, wie z.B. der SOD, Katalase oder Glutathionperoxidase, die dann einen Schutz vor einer Sauerstofftoxizität vermitteln (Tsan et al., 1990; Visner et al., 1992)

Eine Modifikation der Radikalbildung durch Cytokine fanden Das und Mitarbeiter (1990) auch bei menschlichen Leukocyten, die nach Stimulation mit TNF eine verstärkte Arachidonsäure-Freisetzung zeigten. Arachidonsäure wiederum induziert die Bildung freier Radikale wie  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ .

Leukotrien  $B_4$  gehört zu den Eicosanoiden und ist ein Metabolit der Arachidonsäure. Es wird bei entzündlichen Prozessen vermehrt gebildet und führt zur Aktivierung von Leukocyten.

Es verstärken sich die Hinweise darauf, daß die Endotoxinwirkung durch Lipidmediatoren wie PAF und Metaboliten der Arachidonsäure modifiziert werden könnte. In vitro-Untersuchungen zeigten, daß PAF und Leukotrien  $B_4$  ( $LTB_4$ ) potente Stimuli für die Produktion des TNF darstellen (Dinarello et al., 1984; Dubois et al., 1989). Weiterhin können Cytokine wie Interferon- $\gamma$  ein wichtiges Signal zur TNF-Freisetzung darstellen (Ruggiero et al., 1986).

Ein aussagekräftiges in vitro-Modell muß mögliche Einflüsse dieser bzw. anderer Faktoren auf die Reaktion von Alveolarmakrophagen auf exogene Mediatoren mit berücksichtigen. Untersuchungen hierzu wurden sowohl in der konventionellen Submerskultur als auch in dem in vitro-Modell der Gasphasenkultur durchgeführt.

---

### 1.3. Ziele der Arbeit

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen ergeben sich für die Arbeit folgende Ziele:

- Vergleichende Untersuchungen des Einflusses von Mediatoren und anderen Stimuli auf die Superoxidanionen- und TNF-Freisetzung von Rinderalveolarmakrophagen in Gasphasen- und Submerskultur.
- Analyse der Effekte von NO<sub>2</sub> auf Rinderalveolarmakrophagen im Hinblick auf die Vitalität, die Freisetzung von Enzymen, die Bildung von Superoxidanionen sowie der Sekretion von Tumor Nekrose Faktor mittels eines Kultursystems zur direkten Exposition von Zellen an Schadgasen.
- Prüfung der modifizierenden Wirkung von Partikeln und Surfactantbestandteilen auf die Effekte von NO<sub>2</sub>.
- Versuche zur Eignung von differenzierten HL60-Zellen als Modellzellen für Begasungsexperimente, Einflüsse verschiedener Stimulanzen auf die Bildung von Interleukinen und Tumor Nekrose Faktor.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Gewinnung und Kultur der Zellen

Für die Versuche und die Kultur wurden zwei verschiedene Zelltypen verwendet: dies waren einerseits Rinderalveolarmakrophagen (RAM), die aus frisch geschlachteten Rindern gewonnen wurden und andererseits HL60-Zellen, eine akute promyelotische Leukämiezelllinie.

#### 2.1.1. Gewinnung von RAM

Die Alveolarmakrophagen (AM) wurden aus den Lungen frisch geschlachteter Rinder oder Färsen gewonnen. Dafür wurden 3 mal je 3 l 0,9% NaCl durch die Trachea in die Lunge eingefüllt und diese Lavageflüssigkeit nach leichtem Massieren der Lunge wieder abgezogen. Bei diesem Vorgang lösen sich die AM von der Lungenoberfläche ab und können durch nachfolgende Aufarbeitungsschritte der Lavageflüssigkeit angereichert werden. Dafür wurde die Lösung durch Mull und Gaze filtriert (Maschenweite 100 µm, Seidengazefabrik Eckert, Waldkirch), um eventuell in der Lunge befindliche Großpartikel zurückzuhalten. Anschließend wurde die Suspension bei 4° C und 250 g 10 Minuten lang zentrifugiert (Zentrifuge der Fa. Hettich, Rotixa, RP). Die erhaltenen Zellpellets wurden vereinigt und mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert. Eine eventuell vorhandene Kontamination des Pellets mit Erythrocyten konnte durch Abspülen dieser Zellen beseitigt werden. Für die weitere Reinigung der AM wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt: jeweils 20 ml eiskalte Zellsuspension wurde mit 15 ml Ficoll-Paque (Fa. Pharmacia) unterschichtet und für 20 Minuten bei 250 g und 4° C zentrifugiert. Die Alveolarmakrophagen reichert sich dabei in der Trennschicht zwischen Ficoll-Paque und Kochsalzlösung an. Sie wurden mit einer Pipette abgezogen und wiederholt in 0,9% NaCl gewaschen und dann für die Kultur in RPMI 1640 ( Fa. Sigma) resuspendiert. Die Zellzahl und Vitalität wurde in einem Neubauer-Hämocytometer mit der Trypanblauausschlußmethode bestimmt. Es konnten bis zu  $10^9$  Zellen erhalten werden, deren Vitalität jeweils über 90% lag.

Kultur der RAM:

Die Zellzahl der AM wurde mit RPMI 1640 auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, wobei je nach Versuchstyp jeweils 1 oder 2 ml ausplattiert wurden. Bei den Versuchen in Gasphase wurde jeweils 1 ml Zellsuspension in Membrankulturschälchen (Fa. Costar, Transwell; Durchmesser 2,5 cm, s. 2.2.2) ausplattiert. Für die Messung von Superoxidanionen in Submerskultur wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in 2 ml ausplattiert, bei allen anderen Versuchsansätze in Submerskultur wurden jeweils 2 ml Zellsuspension/Kulturschale ausgesät. Die hier verwendeten Plastik-Kulturschalen hatten einen Durchmesser von 3,5 cm (Fa. Greiner).

Medienzusammensetzung für die Messung von Superoxidanionen:

450	ml RPMI-1640	(Fa. Sigma) ohne Phenolrot
5	ml P/S	(Penicillin/Streptomycin der Fa. Gibco; Life Technology)
	entsprechend	100 U Penicillin (Endkonzentration)
		100 µg/ml Streptomycin (Endkonzentration)

bzw.

- 2,5 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration, Fa. Böhringer)
- 10 µg/ml Tetracyclhydrochlorid (Endkonzentration)

Medienzusammensetzung für die übrigen Messungen:

- 450 ml RPMI-1640 (Fa. Sigma)
- 5 ml P/S (Fa. Gibco)

Die Kulturschalen wurden zum Adhären der Zellen 2 Stunden lang bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhären Zellen abgesaugt und Medium für die Über-Nacht-Kultur entsprechend dem jeweiligen Versuchsansatz auf bzw. unter die Zellen gegeben.

### 2.1.2 Kultur von HL60-Zellen

HL60-Zellen stammen ursprünglich von einer Patientin mit einer akuten promyelotischen Leukämie (Collins et al., 1977) und wurden 1977 von Collins in Kultur gebracht. Die Zellen sind primär undifferenziert und werden in Suspension kultiviert. Diese primär undifferenzierten HL60-Zellen können durch Zugabe bestimmter Substanzen in Richtung Granulocyten (durch Applikation von 1,3% DMSO für 4 oder 5 Tage, Collins et al. 1977; Collins et al. 1978; Newburger et al., 1979) oder Makrophagen (durch Applikation von Calcitriol 10<sup>-6</sup> M für 4 Tage, Rossi et al., 1987) differenziert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten HL60-Zellen stammen von der Fa. ATCC (American Type Culture Collection, USA).

Diese kontinuierliche Kultur erfordert ein regelmäßiges Passagieren der Zellen, denn undifferenzierte HL60-Zellen teilen sich permanent mit einer Verdopplungszeit von 24 Stunden (differenzierte Zellen stellen ihre Teilungsaktivität ein, Collins et al., 1978). Die laufende Kultur wurde jeweils alle drei bis vier Tage passagiert: 5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden der vorhergehenden Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, Fa. Greiner) entnommen, in eine neue gegeben und mit neuem Kulturmedium auf 20 ml ergänzt.

Zusammensetzung des Kulturmediums:

- 450 ml RPMI 1640 (Fa. Sigma), je nach Kulturansatz mit oder ohne Phenolrot
- 75 ml FCS (fötales Kälberserum) für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert (Fa. Gibco)
- 7,5 ml L-Glutamin (Fa. Sigma), 200 mM
- 5 ml Natriumpyruvat (Fa. Sigma), 100 mM
- 5 ml MEM 100 x (non essential amino acids, Fa. Gibco)
- 5 ml P/S (Fa. Gibco)

Für die Differenzierung der HL60-Zellen in Richtung Makrophagen wurden die Zellen mit 10<sup>-6</sup> M Calcitriol (1 α, 25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>, Fa. Hoffman La Roche, Basel) im Kulturmedium auf die Membranen der Gasphasenkulturschälchen ausgesät (Transwell, Fa. Costar, s.2.2.2). 1 ml der Zellsuspension wurden für eine Differenzierungszeit von 3 Tagen (Versuchsdurchführung am 3. Tag) je Membran ausgesät. Diese Zelldichte gewährleistet, daß sich am Versuchstag die Zellen auf eine Zellzahl von ca. 3 x 10<sup>6</sup> Zellen vermehrt hatten.

Um die HL60-Zellen zu neutrophilen Granulocyten zu differenzieren, wurden die Kulturflaschen mit den undifferenzierten Zellen mit 1,3% DMSO (Fa. Serva) versetzt und am 5. oder 6. Differenzierungstag für den Versuch verwendet. Dafür wurden pro Gasphasenkulturschale  $3 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium ausplattiert. Durch das Absaugen des Mediums unterhalb der Membran, lief die auf der Membran befindliche Flüssigkeit durch die Membran hindurch, so daß sich ca. 1 ml davon unterhalb der Zellen befand, und diese in Gasphase saßen.

## 2.2. Kultur und Exposition der Zellen in Gasphase bzw. in Submerskultur

### 2.2.1. Allgemeines

Zur besseren Annäherung an physiologische Bedingungen wurden die Zellen in Gasphase in speziellen Luftkulturschälchen (s. Schemazeichnung) kultiviert. Diese Kultivierungsmethode ermöglicht einen direkten Kontakt der Zellen mit dem Expositionsgas ohne Vitalitätsverlust.

Die Exposition der Zellen im jeweiligen Gas wurde in Anlehnung an eine Methode von Voisin et al. (1977) in 2 speziell angefertigten Expositionskammern (Fa. Maton, Lille, Frankreich) durchgeführt.

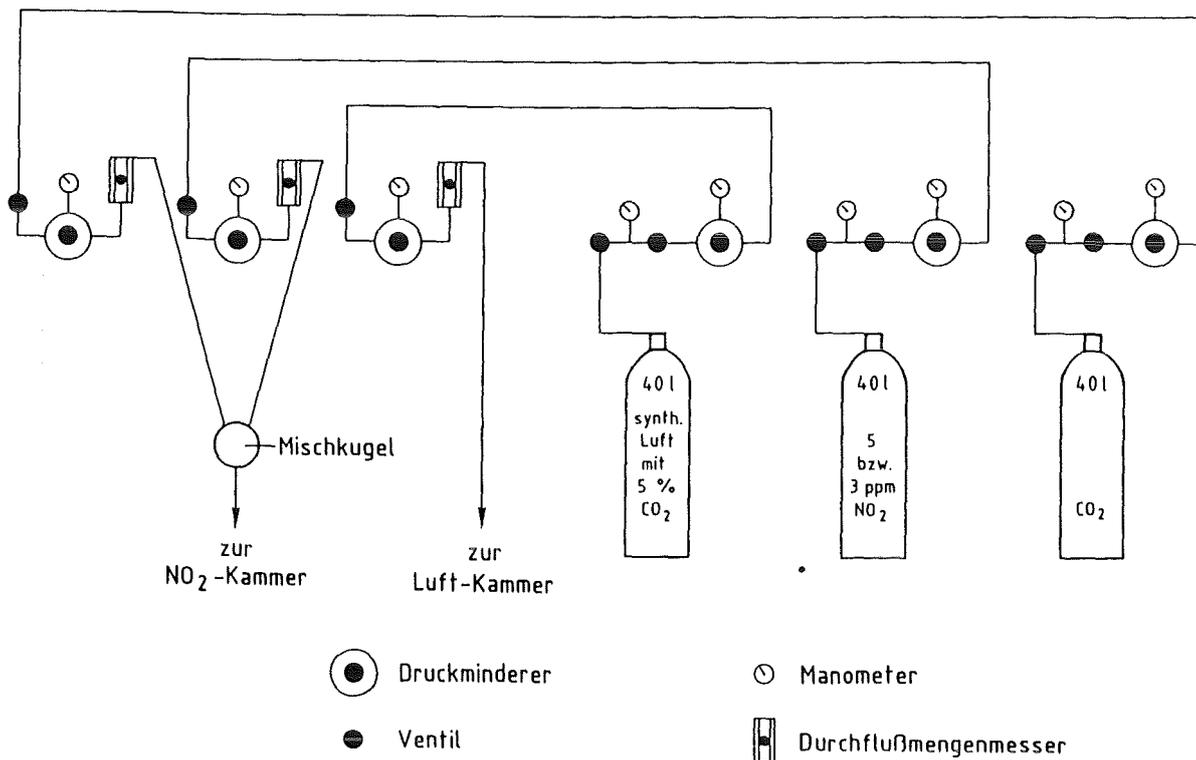
Diese Expositionskammern ermöglichten das Aussetzen von Zellen gegenüber Gasen: eine Luftkammer, in der die Zellen mit synthetischer Luft mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden und eine NO<sub>2</sub>-Kammer, in der die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an NO<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> ausgesetzt werden konnten. Zur Beschickung dieser Kammern mit den entsprechenden Gasgemischen wurde durch die Fa. Messer Griesheim, Karlsruhe, eine Gasanlage installiert, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

Ein Sicherheitsschrank, in dem drei 40 Liter Gasflaschen für die Entnahme bereitstanden, ein Leitungssystem, das den Sicherheitsschrank mit den Entnahmestellen im Labor verband und 3 Entnahmestellen, an die folgende Druckluftflaschen angeschlossen waren:

1. synthetische Luft mit 5% CO<sub>2</sub>
2. 5 bzw. 3 ppm NO<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub> wurde als Gasgemisch bezogen: 5 bzw. 3 VPM Stickstoffdioxid, Rest: synthetische Luft, 150 bar Fülldruck)
3. CO<sub>2</sub>

Das Gas nach Punkt 1 diente der Beschickung der Expositionskammer 1, die Gase nach Punkt 2 und 3 mußten vor Beschickung der Expositionskammer 2 im richtigen Verhältnis (NO<sub>2</sub> zu CO<sub>2</sub>) mit Hilfe einer Gasmischglaskugel (Fa. Maton, Lille, Frankreich) vollständig durchmischt werden. Dies war aus technischen Gründen notwendig, da eine Gasflasche, die eine bestimmte Konzentration an NO<sub>2</sub> enthielt, nicht noch gleichzeitig mit 5% CO<sub>2</sub> beschickt werden konnte. Die Entnahmestellen selbst bestanden pro Einheit aus einem Druckminderer, der den schwankenden Vordruck des Leitungssystems auf 1 bar konstant hielt und einem Durchflußmengenmesser, der einen Gasfluß von 0,5 l/min. gewährleistete, denn bei höheren Gasdurchflußraten bestand die Gefahr einer Austrocknung der Zellen. Ein Silikon- bzw.

Teflonschlauch (für aggressive Gase wie  $\text{NO}_2$ ) verband die Entnahmestelle mit der Expositions-kammer 1 oder 2 (siehe nachfolgende schematische Darstellung).

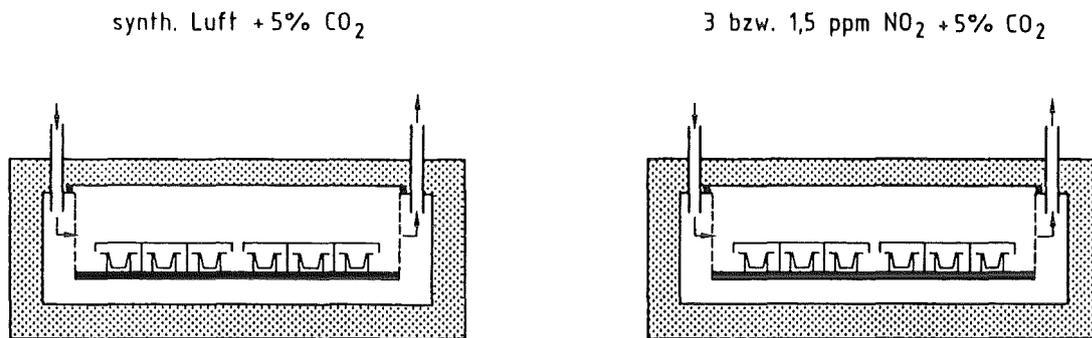


Die Expositions-kammer bestand aus einer Außenkammer, die mit Wasser gefüllt war, das auf  $37^\circ\text{C}$  geheizt werden konnte. In diese Außenkammer war eine zweite Kammer eingesenkt, in der die eigentliche Exposition der Zellen in Gasphase erfolgte, und in die das jeweilige Expositionsgas ein- und ausströmte. Diese Innenkammer besaß einen fest anschraubbaren Deckel, der zur Beschickung der Kammern mit Zellkulturschalen vor Versuchsbeginn geöffnet und nach Beschickung wieder fest verschlossen werden konnte. Dies war für die anschließende Inkubation von Bedeutung, für die die gesamte Innenkammer in das Wasser der Außenkammer abgesenkt und fixiert wurde, so daß die Innenkammer mit Wasser umspült wurde. Auf der Oberseite der Innenkammer befanden sich auch noch die Ein- und Austrittsstutzen für das Gas, das durch das Seitenteil eines Lochblecheinsatzes in den eigentlichen Expositionsraum ein- und auf der gegenüberliegenden Seite wieder austrat. Der Boden des Einsatzes diente als Standfläche für die Gasphasenkulturschalen. Der Zwischenraum zwischen Boden der

Innenkammer und Boden des Einsatzes wurde mit Wasser beschickt, um eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit für die Zellkultur zu gewährleisten.

Die Abführung des Gases erfolgte durch einen Silikon- oder Teflonschlauch in die Außenluft. Die folgende Abbildung zeigt einen schematischen Querschnitt durch die beiden Inkubationskammern:

### Begasungskammer nach Voisin



Da ein solches Gasleitungssystem Leckagen besitzt, die nicht vollständig zu eliminieren sind, wurde die Messung der NO<sub>2</sub>-Konzentration, die in der Kammer herrschte, nach dem Austreten des Gases aus der Expositionskammer vorgenommen. Die Messungen erfolgten mit einem portablen NO<sub>2</sub>- und SO<sub>2</sub>-Meßgerät ECS 102-1 der Fa. MPS Sensor Systems. Der NO<sub>2</sub>-Meßbereich dieses Gerätes liegt zwischen 0 und 200 ppm, und die Meßgenauigkeit beträgt 1% vom Endwert, wobei die Detektion des Meßgases mit Hilfe elektrochemischer Zellen durchgeführt wird. NO<sub>2</sub>-Messungen ergaben beim Anschluß einer Flasche mit 5 ppm NO<sub>2</sub> bei Austritt des Gases aus der Kammer eine Konzentration von 3 ppm NO<sub>2</sub>, und bei einer Flasche mit 3 ppm NO<sub>2</sub> eine Konzentration von 1,5 ppm NO<sub>2</sub>.

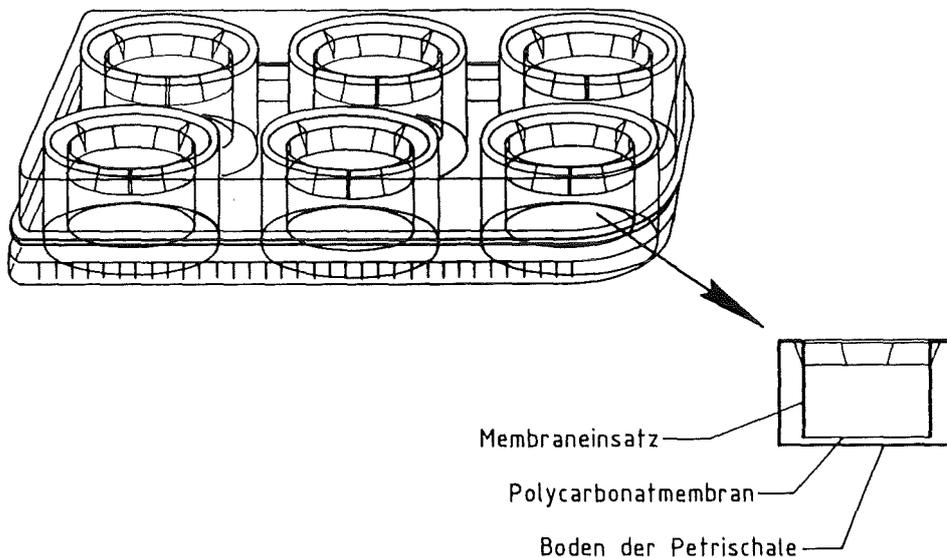
Ferner sollte angemerkt werden, daß NO<sub>2</sub> eine relativ schlechte Löslichkeit in Wasser besitzt, somit also keine Wechselwirkung mit einem angesäuerten Wasserdampf in der Kammer und den Zellen zu befürchten war.

#### 2.2.2. Kultur der Zellen in Gasphase

Zur Kultivierung der Zellen in Gasphase wurden die Membrankulturschälchen "Transwell" der Fa. Costar verwendet. Eine Einheit bestand aus 6 Vertiefungen, wobei über jede Vertiefung ein Einsatz aufgesetzt wurde. Dieser Einsatz trug an seiner Basis eine Polycarbonatmembran, die mit 0,4 µm großen Poren regelmäßig durchsetzt war. Der Boden des Einsatzes, also die Membran, hat ca. 3 mm Abstand zur eigentlichen Vertiefung. Sollten Zellen in Gasphase kultiviert werden, so wurden sie mit Medium auf die Membran ausplattiert und absitzen

gelassen. Während dieses Adhärungsvorganges streckten die Zellen zahlreiche Pseudopodien durch die Poren der Membran hindurch. Zum Mediumwechsel wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und je Einsatz 1 ml neues Medium in den Zwischenraum zwischen Vertiefung und Membranboden gegeben (eine dort befindliche Flüssigkeit wird nachfolgend als "Zellunterstand" oder "Unterstand unter der Membran" bezeichnet). Die Zellen waren nun direkt dem sie umgebenden Gas exponiert und konnten sich gleichzeitig mit Hilfe ihrer Pseudopodien ernähren und vollständig vital bleiben (siehe nachfolgende Abbildung).

## Petrischale zur Gasphasenkultur



### 2.2.2.1. Gasphasenkultur von RAM

Für die Versuche mit RAM wurden die Zellen direkt nach ihrer Isolierung, also am Tag vor Versuchsbeginn, in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen pro ml pro Gasphasenkulturschälchen ausplattiert.

Da sich aus Vorversuchen ergab, daß ein Mediumwechsel direkt vor Versuchsbeginn voraktivierend auf die Zellen wirken kann, wurden RAM bereits über Nacht in Gasphase kultiviert und dann unverändert zur Inkubation in die Kammern gestellt. Die Inkubationsdauer betrug sowohl in der Luft- als auch in der  $\text{NO}_2$ -Kammer 2 Stunden.

Bei den Untersuchungen über die Schadgaswirkung von  $\text{NO}_2$  wurde ein Ansatz in der  $\text{NO}_2$ -Kammer ( 3,0 oder 1,5 ppm  $\text{NO}_2$  mit jeweils 5%  $\text{CO}_2$ ) durchgeführt und mit dem Luftkammeransatz (synthetische Luft mit 5%  $\text{CO}_2$ ) verglichen. Bei den Versuchen, denen lediglich eine Gasphasenkultur in Luft zugrunde lag, entfiel der  $\text{NO}_2$ -Ansatz.

### 2.2.2.2. Gasphasenkultur von HL60-Zellen

Undifferenzierte HL60-Zellen wurden für die Gasphasenkultur entweder in Kulturflaschen oder direkt in den Luftkulturschälchen differenziert.

Die Messung der Superoxidanionenfreisetzung durch differenzierte HL60-Zellen in Gasphase wurde sowohl mit HL60 Granulocyten als auch mit HL60 Makrophagen durchgeführt.

HL60 Granulocyten:

Um HL60 Granulocyten zu erhalten, wurden  $4,3 \times 10^7$  undifferenzierte HL60-Zellen in 43 ml RPMI 1640 mit 1,3% DMSO in Kulturflaschen (Gesamtvolumen 250 ml, Fa. Greiner) für 5 oder 6 Tage differenziert. Am Versuchstag wurden die Zellen abzentrifugiert (250 g für 10 Minuten) und mit HL60-Medium ohne Phenolrot und ohne FCS auf eine Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Phenolrot stört die spektralphotometrischen Messungen bei 550 nm und das Weglassen von FCS war deshalb notwendig, weil es als Radikalfänger wirken kann und dadurch Superoxidanionen hätte wegfangen können. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde dann auf ein Luftkulturschälchen gegeben und die Zellen in Gasphase überführt. Hierzu wurde 1 ml Medium unter die Membran gegeben, um durch Benetzung der Membran zu ermöglichen, daß das Medium oberhalb der Membran nach unten durchläuft, und die Zellen an der Luft exponiert sitzen. Es wurde dann gerade soviel Medium unterhalb der Membran abgezogen, daß sie an ihrer Basis vollständig befeuchtet war.

HL60 Makrophagen:

Die HL60 Makrophagen wurden mit einer Zelldichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen pro ml zur Differenzierung in HL60-Medium mit  $10^{-6}$  M Calcitriol (ohne Phenolrot) angesetzt und 1,5 ml dieser Zellsuspension pro Luftkulturschale ausgesät. Diese Zellzahl gewährleistete, daß sich am 3. Tag der Differenzierung, also am Versuchstag, ungefähr  $3 \times 10^6$  Zellen auf der Membran befanden. Unter die Membran wurden 2,5 ml HL60-Medium mit Calcitriol gegeben, um einen allseitigen Kontakt der Zellen mit Calcitriol zu gewährleisten, denn die Differenzierung selbst wurde nicht in Gasphase, sondern in Submerskultur durchgeführt. Am 3. Differenzierungstag wurden die Zellen zuerst in Gasphase gebracht. Dazu wurde das Medium unterhalb der Membran entfernt, was das Durchlaufen des Mediums oberhalb der Membran nach unten zur Folge hatte, und die Zellen noch mehrmals mit FCS-freiem HL60-Medium ohne Phenolrot gewaschen.

Waren die Zellen in Gasphase gebracht worden, so wurden die Kulturschälchen für 2 Stunden in die Luftkammer gestellt und nachfolgend für Messungen verwendet.

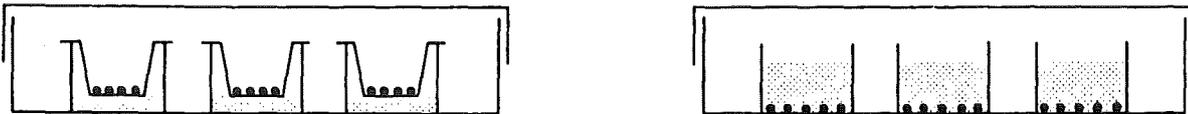
### 2.2.3. Kultur von RAM in der konventionellen Submerskultur

Die AM wurden für die Messung von Superoxidanionen in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ 2 ml Kulturmedium in Plastik Kulturschalen (Makroplatte mit 6 Vertiefungen, Fa. Greiner) ausgesät. Das hierfür verwendete Zellkulturmedium war RPMI 1640 ohne Phenolrot. Zur Quantifizierung der TNF-Sekretion von AM in Submerskultur wurden pro Plastik Kulturschale  $6 \times 10^6$  Zellen in 2 ml RPMI 1640 ausplattiert. Die nachfolgende

Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen der Kultur in Gasphase und der konventionellen Submerskultur:

## Kultur in Gasphase

## Submerskultur



### 2.3. Morphologische und biochemische Betrachtungen

#### 2.3.1. Fluoreszenzmikroskopie - Vitalitätstest mit Ethidiumbromid und Fluoresceindiacetat

Die Vitalitätsbestimmung bei den Gasphasenkulturen erfolgte mit einer Farblösung, die aus Ethidiumbromid (EtBr) und Fluoresceindiacetat (FDA) besteht. Eine Bestimmung mit Trypanblau war nicht möglich, da der Farbstoff zwar die toten Zellen blau färbt, die lebenden aber auf der Membran nicht sichtbar sind.

Der hier verwendete Vitalitätstest wurde nach einer Methode von Dankberg und Persidsky (1976) durchgeführt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran fluoreszieren grün, da Fluoresceindiacetat als unpolare, fluoreszierender Ester in die Zelle eindringt und im Zellinneren durch Esterasen gespalten wird. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Fluorescein. Fluorescein wiederum ist ein polares Molekül und kann die intakte Zelle nicht verlassen. Es reichert sich rasch in der Zelle an und führt zu einer grünen Fluoreszenz unter UV-Anregung. Bei Zellen mit geschädigten Membranen dagegen tritt das Fluorescein so schnell aus wie das Fluoresceindiacetat in die Zelle eindringt, und es kommt zu keiner Fluoreszenz. Tote Zellen mit zerstörten Membranen haben demgegenüber einen rot fluoreszierenden Zellkern, da Ethidiumbromid ungehindert in die Zelle eindringen und mit der Kern-DNA einen rot fluoreszierenden Komplex bilden kann.

Der Vitalitätstest wurde folgendermaßen durchgeführt:

Zu Beginn wurden Stammlösungen von Ethidiumbromid (Fa. Serva, 200 µg/ml in HBSS) und Fluoresceindiacetat (Fa. Sigma, 5 mg/ml in Aceton) hergestellt und bei -20° C aufbewahrt.

Im Versuch selbst wurde jeweils eine frische Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromidlösung hergestellt. Dazu wurden 100 µl der Ethidiumbromidstammlösung und 2 µl der Fluoresceindiacetatstammlösung mit 4,9 ml HBSS vermischt. Die Membran wurde mit einem Skalpell aus ihrer Halterung herausgeschnitten, in eine Petrischale gelegt und für 10 Minuten mit 2 ml der frisch hergestellten Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran auf einen mit 0,9% NaCl-Lösung befeuchteten Objektträger überführt, mit einem Deckglas bedeckt und im Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leitz Diaplan, Filter I2,

Anregungswellenlänge 450-490 nm) betrachtet und die grünen, lebenden Zellen von den roten Kernen der toten bzw. beschädigten Zellen unterschieden.

Die Vitalität lag vor Versuchsbeginn in jedem Fall über 90%.

### 2.3.2. Lichtmikroskopie - Vitalitätstest mit Trypanblau

Bei den Versuchen in Submerskultur wurde mit den am Boden der Petrischale befindlichen Zellen ein Vitalitätstest durchgeführt.

Dafür wurde 1 ml einer Trypanblaulösung (Fa. Sigma, 0,5% in NaCl) mit 1 ml NaCl (0,9%) gemischt und für 2 Minuten auf die Zellen gegeben. Die Farblösung wurde anschließend abgenommen und die Zellen zweimal vorsichtig mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. An vier verschiedenen, zufällig gewählten Stellen wurden mit dem Okularmikrometer (Fa. Leitz Periplan GF 10 x 18 M) die toten, durch Trypanblau angefärbten Zellen und die lebenden, nicht angefärbten Zellen ausgezählt und die Vitalität berechnet.

Zellen, die nicht adhärent auf dem Boden der Petrischale waren (HL60 Makrophagen und HL60 Granulocyten), wurden mit einer Transferpipette abgezogen und in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert (250 g, 10 min.). Anschließend wurden die Zellen in der mit NaCl gemischten Trypanblaulösung aufgenommen und auf ihre Vitalität hin überprüft.

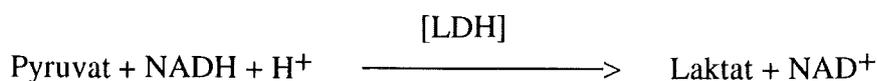
Die Vitalität lag bei RAM vor Versuchsbeginn in jedem Fall über 90 % und bei HL60-Zellen über 80%.

### 2.3.3. Untersuchungen zur Enzymfreisetzung

#### 2.3.3.1. Laktatdehydrogenase (LDH)

Messungen zur Freisetzung der cytoplasmatischen Laktatdehydrogenase in den Zellunterstand bei Gasphasenkulturen von RAM wurden mit kommerziell erhältlichen Tests durchgeführt (Fa. Sigma).

Dem Test liegt folgendes Reaktionsprinzip zugrunde:

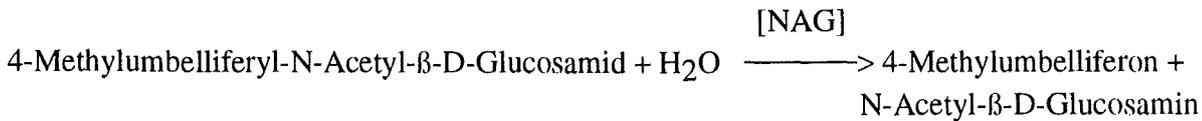


Die Extinktion wurde bei 340 nm im Beckmann DU-65 Spektrophotometer gemessen. Die LDH-Aktivität (gemessen in Units/l) errechnete sich aus der Extinktionsabnahme pro Minute, die gesamte Meßdauer erstreckte sich über 3 Minuten, mit je einer Messung pro 30 Sekunden. Als interner Standard und auch bei der Überprüfung einer eventuellen Zerstörung der LDH durch Begasung von Zellunterständen mit NO<sub>2</sub> diente das Kontrollserum Precinorm E (Fa. Boehringer, Mannheim).

#### 2.3.3.2. N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG)

Messungen zur Freisetzung der lysosomalen NAG in den Zellunterstand bei Gasphasenkulturen von RAM erfolgten nach der Methode von Andersen et al. (1982). Bei dieser fluoreszenzphotometrischen Meßmethode wird die Aktivität des Enzyms anhand der Menge des gebildeten 4-Methylumbelliferon (Fa. Sigma) bestimmt.

Bei diesem Ansatz läuft folgende Reaktion ab:



Dafür wurden folgende Reagenzien benötigt:

Substrat (Fa. Sigma):

4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamid, 1 mM in Laktatpuffer

Laktatpuffer:

40 mM Na-Laktat, mit Milchsäure auf pH 3,7 eingestellt

Carbonat-Bicarbonat-Puffer (Fa. Merck):

Lösung A: 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Lösung B: 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>

Lösung A wurde mit Lösung B auf pH 10,5 eingestellt.

Durchführung:

10  $\mu$ l Triton X-100 (10%, Fa. Serva) wurden mit 100  $\mu$ l Probe und 100  $\mu$ l Substrat gemischt und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte mit 1 ml des Carbonat-Bicarbonat-Puffers, und die Proben wurden im Anschluß daran an einem Lumineszenzphotometer (Fa. Perkin Elmer, LS 5B) bei einer Anregungswellenlänge von 371 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm mit einem 1% Filter gemessen (Messung der Zunahme an 4-Methylumbelliferon).

## 2.4. Assays und Reagenzien

### 2.4.1. Messung von Superoxidanionen

#### 2.4.1.1. Allgemeines

Die Messung von Superoxidanionen erfolgte nach der Methode von Johnston (1981). Es wird nochmals darauf hingewiesen, daß in Übereinstimmung mit der allgemein üblichen Nomenklatur das Superoxidanionenradikal kurz als Superoxidanion bezeichnet wird. Das Prinzip der Messung beruht auf der reversiblen Reduktion von Cytochrom c. Cytochrom c besitzt ein zentrales Fe-Atom, das sowohl im reduzierten wie auch im oxidierten Zustand vorliegen kann. Das reduzierte Cytochrom c besitzt eine alpha- und eine beta-Bande. Das Absorptionsmaximum der alpha-Bande liegt bei einer Wellenlänge von 550 nm und ist spektralphotometrisch genau quantifizierbar. Diese Bande verschwindet, wenn Cytochrom c in oxidiertem Zustand vorliegt. In der Reaktionslösung liegt das Cytochrom c im oxidierten Zustand vor. Werden in die Reaktionslösung Radikale durch Zellen abgegeben, die das Cytochrom c reduzieren können, so kann die Menge der sezernierten Radikale bei 550 nm quantitativ erfaßt werden. Um eine unspezifische Reduktion von Cytochrom c auszuschließen,

wird parallel zu den eigentlichen Messung jeweils ein Ansatz gemacht, der mindestens zusätzlich zum Cytochrom c noch Superoxiddismutase (SOD) enthält. Die SOD ist ein zelluläres Enzym, das durch seinen chemischen Aufbau in der Lage ist, spezifisch Superoxidanionen abzufangen. In der Zelle hat es die Aufgabe, die sezernierten Superoxidanionen abzufangen und so die Zelle vor einer Reduktion ihrer Komponenten zu schützen. In diesem hier verwandten in vitro-System erfüllt sie die gleiche Aufgabe, nämlich  $O_2^-$  Ionen zu  $O_2$  und  $H_2O_2$  umzuwandeln. Subtrahiert man die Meßwerte der Ansätze mit SOD von denen ohne SOD, so erhält man als Differenz genau den Betrag, der an  $O_2^-$  Ionen durch das System produziert wurde. Dieses Meßprinzip ändert sich nicht, wenn den Reaktionslösungen Stimuli hinzugefügt werden, deren Einflüsse getestet werden sollen. Dabei ist zu beachten, daß die Stimuli auch jeweils bei den Ansätzen mit SOD hinzugegeben werden müssen, denn es kann nicht ohne weiteres eine Interaktion zwischen Stimulus und Cyt. c ausgeschlossen werden. Die Inkubationszeit mit der Reaktionslösung betrug 90 Minuten, dies war in Vorversuchen zur Zeitabhängigkeit der Reaktion als optimal ermittelt worden (Lind, 1989).

#### 2.4.1.2. Reagenzien

Hank's balanced salt solution (HBSS) ohne Phenolrot und ohne Natriumbicarbonat (Fa. Sigma) wurde als Grundlage für die Herstellung der Reaktionslösungen verwendet. Pro Liter HBSS wurden 0,35 g Natriumbicarbonat zugesetzt. Um nach der anschließenden Sterilfiltration (Millipore Schlauchpumpe, Millipore Sterivex GV-Filtereinheit mit Füllglocke) einen pH von 7,4 zu erhalten, wurde der pH vor der Sterilfiltration mit 1 M NaOH oder 1 M HCl 0,2 bis 0,3 Einheiten unter dem gewünschten pH eingestellt.

Cytochrom c (aus Pferdeherzen, Typ VI, mindestens 90% liegen in der oxidierten Form vor, Fa. Sigma)

##### Konzentration in der Stammlösung

Vor Versuchsbeginn wurde eine 1,2 mM Stammlösung hergestellt. Dafür wurde die für den jeweiligen Versuch benötigte Menge Cytochrom c (MG 12.384) in HBSS gelöst und anschließend sterilfiltriert (Sterilfilter der Fa. Schleicher und Schüll, Porendurchmesser 0,45  $\mu$ m).

##### Konzentration in der Reaktionslösung

Die Cytochrom c Konzentration betrug 80  $\mu$ M in 1,5 ml Reaktionslösung

Superoxiddismutase (SOD, aus Rindererythrocyten, Fa. Sigma).

##### Konzentration in der Stammlösung

Zur Herstellung einer Stammlösung mit der Konzentration von 30.000 U wurde die SOD in destilliertem Wasser aufgelöst und dann sterilfiltriert (Sterilfilter der Fa. Schleicher und Schüll, Porendurchmesser 0,45  $\mu$ m). Die Stammlösung wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  tiefgefroren und nach Bedarf aufgetaut.

##### Konzentration in der Reaktionslösung

Die Konzentration an SOD in der Reaktionslösung betrug 120 U/ml.

### Zymosan (von *Saccaromyces cerevisiae*, Fa. Sigma)

Da Makrophagen u.U. opsoniertes Zymosan schneller phagozytieren, wurde das Zymosan vor Versuchsbeginn in allen Fällen opsoniert.

Die Opsonierung wurde nach folgenden Schritten durchgeführt:

Ausgangsmenge: 1g

1 g Zymosan wurde in ca. 100 ml 0,9% NaCl suspendiert. Die Suspension wurde im Wasserbad für 1 Stunde unter ständigem Rühren gekocht. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 2000 g. Anschließend wurde das Sediment einmal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend in 20 ml 0,9% NaCl resuspendiert, so daß eine Konzentration von 50 mg/ml eingestellt wurde. Die Opsonierung erfolgte, indem ein Teil Zymosan mit drei Teilen FCS (20 ml Zymosan und 60 ml fötales Kälberserum) für 20 Minuten bei 37°C unter mehrmaligem Rühren inkubiert wurde. Dann wurde bei 2000 g für 15 Minuten zentrifugiert, einmal mit 0,9%iger NaCl gewaschen, erneut zentrifugiert und in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert, so daß eine Konzentration von 10 mg Zymosan/ml eingestellt wurde. Opsoniertes Zymosan kann bei -20°C für längere Zeit gelagert werden. Da sich das Zymosan in der Suspension sehr leicht absetzte, mußte vor dem Einfrieren darauf geachtet werden, daß das Zymosan unter ständigem Rühren entnommen wurde, um die gleiche Zymosankonzentration in allen eingefrorenen Aliquots zu gewährleisten.

### Konzentration in der Reaktionslösung

Die Zymosankonzentration in der Reaktionslösung war 1 mg/ml.

### TNF (Tumor Nekrose Faktor, Fa. Boehringer, Mannheim)

Der humane, rekombinante Tumor Necrose Factor- $\alpha$  wird aus *E.coli* gewonnen. Die Primärstruktur ist mit der des natürlichen, humanen TNF- $\alpha$  identisch. TNF- $\alpha$  lag mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml in PBS gelöst vor und war mit 1 mg/ml BSA stabilisiert.

Die Verdünnung erfolgte mit Kulturmedium (RPMI 1640), das 1 mg/ml BSA enthielt.

### PAF (Plättchen aktivierender Faktor, Fa. Serva)

Das pulverförmige C<sub>16</sub>-PAF wurde in Methanol gelöst, Stammlösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt und diese in gasdichte Röhrchen zur Aufbewahrung abgefüllt. Die zur Superoxidationmessung verwendeten Konzentrationen waren: 10<sup>-14</sup> M, 10<sup>-12</sup> M und 10<sup>-6</sup> M. Die PAF-Stammlösungen wurden nach jeder Entnahme mit N<sub>2</sub> überschichtet, um eine Oxidation von Doppelbindungen im Molekül durch Luftsauerstoff zu verhindern.

### LTB<sub>4</sub> (Leukotrien B<sub>4</sub>, Fa. Paesel)

Stammlösungen von LTB<sub>4</sub> wurden in verschiedenen Konzentrationen mit Methanol hergestellt. Im Versuch wurde LTB<sub>4</sub> 10 nM, 20 nM und mit einer Konzentration von 800 nM verwandt. Die LTB<sub>4</sub>-Stammlösungen wurden ebenfalls nach jeder Entnahme mit N<sub>2</sub> überschichtet.

TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat, Fa. Sigma)

Der Phorbol-ester wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Serva) gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Versuch wurde TPA in einer Konzentration von 10 und 20 ng/ml verwandt.

A 23187 (Fa. Sigma)

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor wurde in einer 2  $\mu\text{M}$ - und 200  $\mu\text{M}$ -Stammlösung in DMSO aufbewahrt und kam im Versuch in einer Konzentration von 10 nM, 100 nM und 1  $\mu\text{M}$  zur Anwendung.

LPS (Lipopolysaccharid, Fa. Sigma)

In den Versuchen wurde Lipopolysaccharid von *Salmonella abortus equi* verwandt. Die Konzentration der Stammlösung war 1 mg/ml in PBS und die der Reaktionslösung 10  $\mu\text{g/ml}$ . Aliquots der Stammlösung wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

DPL (L- $\alpha$  Phosphatidylcholin Dipalmitoyl, Fa. Sigma)

DPL wurde in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}$  pro ml RPMI 1640 (ohne Phenolrot) für 3 Minuten mit Ultraschall emulgiert (Branson Sonifier B 15, Einstellung 50%).

Vor Inkubation der Gasphasenkulturen in den Kammern wurde je Membran 1 ml DPL-Lösung auf die in Gasphase befindlichen Zellen ausplattiert. Das Medium unterhalb der Membran wurde solange entfernt, bis es vollständig nach unten durchgelaufen war und sich die Zellen wieder in Gasphase befanden. Somit waren die Zellen zu Versuchsbeginn mit DPL "bedeckt".

#### 2.4.1.3. Messungen von Superoxidanionen in Gasphase

Die Vorgehensweise war hier für die HL60 - und RAM-Ansätze dieselbe.

Die Zellen wurden nach Inkubation in den Expositionskammern für zwei Stunden für die nachfolgende  $\text{O}_2^-$ -Messung folgendermaßen weiterbehandelt: Die Membran eines jeden Ansatzes mit den anhaftenden Zellen wurde mit dem Skalpell vollständig aus der Plastik-Halterung herausgeschnitten und mit den Zellen obenauf in eine neue Kulturschale hineingelegt. Daraufhin wurden sofort 1,5 ml der jeweiligen Reaktionslösung in die Vertiefung pipettiert. Bei den Ansätzen, die Zymosan enthielten, wurde die gesamte Reaktionslösung gründlich geschüttelt, um ein Absetzen des Zymosans zu verhindern. Die Kulturschälchen wurden dann für die 90minütige Inkubationszeit in den Brutschrank gestellt. Danach wurden die Zellüberstände abgenommen, in 2 ml Eppendorfgefäße pipettiert und für zehn Minuten bei 250 g ( $4^{\circ}\text{C}$ ) abzentrifugiert, um Partikel aus der zu quantifizierenden Lösung zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände in 1 ml Plastikkuvetten pipettiert und bei 550 nm gemessen.

#### 2.4.1.4. Messungen von Superoxidanionen in Submerskultur

Die Überstände in den Kulturschälchen wurden nach der Übernacht-Inkubation im Brutschrank abgezogen und pro Vertiefung 1,5 ml Reaktionslösung auf die Zellen gegeben. Diese Ansätze

wurden ebenfalls für neunzig Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Überstände wie unter 2.4.1.3. beschrieben weiterbehandelt. Pro Reaktionslösung wurden jeweils drei Parallelansätze hergestellt.

## 2.4.2. TNF-Quantifizierung

### 2.4.2.1. TNF-Bestimmung bei RAM durch den WEHI-Bioassay

#### 2.4.2.1.1. Allgemeines

Dieser Bioassay basiert auf der cytotoxischen Wirkung von TNF auf WEHI-Zellen. WEHI-Zellen sind eine TNF-sensitive Fibroblastenzelllinie der Maus, die auf ihre Sensitivität gegenüber TNF selektiert wurde. Dieser Assay unter Verwendung des WEHI-Subklons 164/13 wurde in unserem Labor durch Matejka (1992) nach der Methode von Espevik und Nissen-Meyer (1986) eingeführt. Die Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Wendel, Institut für Biochemie und Pharmakologie der Universität Konstanz, zur Verfügung gestellt.

Eine Inkubation TNF-haltiger Lösungen mit WEHI-Zellen führte konzentrationsabhängig zum Vitalitätsverlust der Zellen. Nach einer bestimmten Inkubationsdauer mit der zu untersuchenden Probe wurde MTT (3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) auf Zellen und Probe appliziert. MTT wird von noch lebenden Zellen in ihren Mitochondrien durch eine succinatabhängige Dehydrogenase zu einem Farbstoff, dem blauen Formazan, umgewandelt. Dies ist ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Vorgang - die Menge des gebildeten Farbstoffs ist ein Maß für die Zahl der lebenden Zellen und damit umgekehrt proportional zur TNF-Konzentration der Proben. Nach Lyse der Zellen durch ein Detergens wird der Farbstoff freigesetzt und kann spektralphotometrisch bei 550 nm gemessen werden.

#### 2.4.2.1.2. Reagenzien

Folgende Substanzen wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, bei RAM eine TNF-Freisetzung zu stimulieren:

LPS (Lipopolysaccharid, Fa. Sigma)

Als Standardstimulans zur Induktion einer TNF-Sekretion bei RAM diente LPS.

s. unter 2.4.1.2.

PAF (Plättchen-aktivierender Faktor, Fa. Serva)

s. unter 2.4.1.2.

Im Versuch wurde PAF mit der Konzentration 1 ng/ml verwandt.

Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>, Fa. Paesel)

s. unter 2.4.1.2.

Im Versuch wurde LTB<sub>4</sub> in den Konzentrationen 20 nM und 160 nM verwandt.

Dexamethason (Fa. Sigma)

Dexamethason befand sich in einer Stammlösung mit der Konzentration von 10<sup>-4</sup> M in Ethanol, es wurde mit einer Konzentration von 2 x 10<sup>-7</sup> M in der Reaktionslösung verwandt.

Dexamethason ist lichtempfindlich und wurde daher dunkel und bei -20° C gelagert.

IFN-γ (Interferon-γ, Fa. Boehringer, Mannheim)

IFN-γ wurde in einer Stammlösung mit der Konzentration 50.000 U in 1 ml PBS, stabilisiert mit BSA (1 mg/ml) bezogen und Aliquots mit folgenden Konzentrationen hergestellt (denn wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden): 100 µl mit je 5.000 Units in PBS mit BSA (1 mg/ml), die bei -20° C gelagert wurden.

Die Endkonzentrationen bei den Versuchen waren 750 und 1.000 U/ml.

DPL (L-α-Phosphatidylcholin-Dipalmitoyl, Fa. Sigma)

DPL wurde für das "Coaten" der Zellen mit einer Konzentration von 100 µg/ml verwandt. Die Vorbehandlung und die Applikation kann dem Punkt 2.4.1.2. entnommen werden.

SiO<sub>2</sub> (Quarz, Fa. Palas)

Für die Versuche mit Quarz wurde Sikron F 600, Fraktion II (Fa. Palas, Karlsruhe) verwandt. Diese Subfraktion wurde bei der Fa. Palas mit Hilfe eines five stage cyclone (Southern Research Institute, Alabama) hergestellt. Die Partikelgrößenverteilung liegt im Bereich zwischen 0,92 und 1,6 µm. Der Median des geometrischen Durchmessers beträgt 1,03 µm, der AMAD (activity median aerodynamic diameter) 1,7 µm.

Quarz wurde in den Versuchen mit 50 µg/ml appliziert. Dafür wurde die entsprechende Menge Quarz abgewogen, in RPMI 1640 aufgenommen und anschließend für 5 Minuten auf Eis beschallt (Branson Sonifier B 15, pulsed, Einstellung 50%). Zur Ermöglichung der Phagozytose bei Gasphasenkulturen wurden die in Gasphase sitzenden Zellen mit 1 ml der Quarzsuspension bedeckt und für 1 Stunde in den Brutschrank gestellt. Danach wurde der Unterstand unter der Membran abgesaugt, und der Zellüberstand lief durch die 0,4 µm großen Poren durch die Membran hindurch.

Nachdem die Zellen wieder in Gasphase saßen, erfolgte die Inkubation in den Kammern.

Latex (Fa. Sigma)

Polystyrenlatex (Dow-Latex) sollte im Vergleich zu Quarz als biologisch inerte Staub untersucht werden. Der Durchmesser der Latexpartikel betrug 1,0 µm, die Konzentration im Versuch betrug 250 µg/ml.

Das Latex wurde zur homogenen Durchmischung vor Entnahme eine halbe Stunde auf den Schüttler gestellt. Die entsprechende Menge Latex wurde in RPMI 1640 aufgenommen und zur Phagozytose durch die Zellen gleich dem Quarz behandelt.

#### 2.4.2.1.3. Gewinnung von Kulturüberständen für den TNF-Bioassay

TNF-Messungen bei RAM wurden einerseits nach Cytokinapplikation in Gasphase und Submerskultur, andererseits nach Exposition der Zellen mit Luft bzw. NO<sub>2</sub> in Gasphase durchgeführt.

Bei Cytokinapplikationen in Gasphase wurde am Tag nach Lavage der Unterstand unter den Zellen verworfen (s. 2.2.2.) und je Ansatz 1 ml Reaktionslösung auf die Zellen pipettiert. Diese lief durch die Membran hindurch und befand sich während der Inkubation als Unterstand unter den Zellen. Die Inkubation der Zellen erfolgte 2 Stunden lang in der Begasungskammer bei 37°C und synthetischer Luft, die mit 5 % CO<sub>2</sub> versetzt war. Nach 2 Stunden wurde der Unterstand steril entnommen und in autoklavierte Eppendorfgefäße überführt. Um eventuell mitgeführte Zellen zu entfernen, wurden die Unterstände für 10 Minuten bei 1000 g in der Digifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in sterile Eppendorfgefäße aliquotiert und bis zur Durchführung des TNF-Bioassays bei -20°C zwischengelagert.

Bei Cytokinapplikation in Submerskultur wurde das Medium nach der Übernacht-Kultur abgesaugt, 2 ml Reaktionslösung auf die Zellen appliziert, und die Kulturschalen 2 Stunden lang in den Brutschrank gestellt. Die nach der Inkubation gewonnenen Kulturüberstände wurden wie die der Gasphasenversuche weiterbehandelt und für die spätere Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

Gasphasenversuche zur Quantifizierung der Wirkung von Luft bzw. NO<sub>2</sub> auf die TNF-Sekretion bei RAM wurden wie folgt durchgeführt: Die Gasphasenkulturschalen blieben nach der Übernacht-Inkubation im Brutschrank unverändert mit 1 ml RPMI 1640 mit Penicillin und Streptomycin unter der Membran und wurden so in die Luft- bzw. NO<sub>2</sub>-Kammer gestellt. Nach einer 2stündigen Begasung wurden die Unterstände verworfen. Sofort nachfolgend wurden pro Ansatz 3 ml Reaktionslösung auf und unter der Membran bzw. den Zellen verteilt und die Kulturschalen für weitere 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. Bei den Ansätzen ohne vorherige Inkubation mit Staub wurden die Über- und Unterstände direkt in sterile Eppendorfgefäße überführt. Bei den Ansätzen mit Staubinkubation wurden die Über- und Unterstände zunächst zur Abtrennung der Partikel in Zentrifugenröhrchen (14 ml, Fa. Falcon) abzentrifugiert (2000 g, 10 Minuten), erst dann in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.4.2.1.4. Der TNF-Bioassay

##### Kultivierung der WEHI-Zellen

WEHI-Zellen wachsen in Kultur als adhärenter Monolayer. Bei ihrer Kultivierung sollte beachtet werden, daß die Zelldichte nicht zu hoch wird, da sie sich sonst ablösen und damit für die Durchführung eines Assays nicht mehr tauglich sind.

### Zusammensetzung des Kulturmediums

- 450 ml RPMI (Fa. Gibco)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Fa. Gibco)
- 50 ml FCS (bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert, Fa. Gibco)
- 5 ml L-Glutamin (200 mM, Fa. Sigma)

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Fa. Greiner (250 ml Gesamtvolumen) kultiviert und regelmäßig auf ihre Zelldichte hin überprüft. Nach Erhalt eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen zum Passagieren mit Trypsin von ihrer Unterlage abgelöst. Dafür wurde das Medium abgezogen und pro Flasche zuerst mit 4 ml 0,25%igem Trypsin gespült. Nach Dekantieren des Trypsins wurde 1 ml der gleichen Lösung auf die Zellen gegeben und so lange darauf belassen, bis sie sich vom Flaschenboden abgelöst hatten. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurden 10 ml WEHI-Medium auf die Zellen gegeben, gut resuspendiert und Zellen samt Medium zur Zentrifugation in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde für 10 Minuten bei 4°C und 250 g zentrifugiert und danach der Trypsin-haltige Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in WEHI-Medium resuspendiert. Nach Auszählen der Zellen und Überprüfung der Vitalität mit der Trypanblaumethode wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 20 ml WEHI-Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Zellen mußten auf diese Art jeden 3. bis 4. Tag passagiert werden und wurden maximal bis zur Passagenzahl 17 verwendet.

### Durchführung des WEHI-Assays

Für eine TNF-Quantifizierung mit Hilfe des WEHI-Assays wurden die konfluenten Zellen durch Trypsinbehandlung aus den Kulturflaschen gewonnen (s. vorhergehender Abschnitt) und auf eine Zellzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 96er Mikrotiterplatten (Fa. Falcon, Primaria), und zwar mit einer Dichte von  $6 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung (entsprechend 200 µl Zellsuspension).

Zur Adhärenz der Zellen wurden die Mikrotiterplatten für mindestens 4 Stunden in den Brutschrank gestellt und nachfolgend für den Bioassay verwandt.

Am Versuchstag wurden die zu messenden Proben aufgetaut und seriell verdünnt (1:2, 1:5, und 1:10). Die Verdünnung der Proben erfolgte mit WEHI-Medium und wurde vorgenommen, um eventuell auftretende hohe Konzentrationen an TNF, die nicht im linearen Bereich der Eichkurve lagen, durch eine Verdünnung zu erfassen und um eine ebenso mögliche Maskierung unverdünnter oder gering verdünnter Proben zu kompensieren.

Der Ablauf des Bioassays war folgender:

Die erste Reihe der Mikrotiterplatte wurde als Kontrollreihe mitgeführt - sie war das Maß für die Kapazität der Farbstoffbildung durch die verwendete Zellpopulation. Sie erhielt demzufolge pro Vertiefung 100 µl WEHI-Medium. Die letzte Reihe blieb zellfrei und erhielt alle Reagenzien in gleicher Weise wie alle anderen Vertiefungen. Sie wurde als Reagenzienleerwert von allen anderen Meßwerten abgezogen. Die Proben selbst wurden pro Ansatz bzw. Verdünnung jeweils 4 x unabhängig voneinander untersucht. Um ein Maß für den TNF-Gehalt der Proben zu bekommen, wurde eine TNF-Eichkurve mit humanem rekombinantem TNF (rhu-TNF) erstellt. Hier galt für die erste und letzte Reihe das gleiche Prinzip wie für die Probenplatten. Reihe 2 bis 10 der Mikrotiterplatte erhielten absteigende Konzentrationen an rhu-TNF, wobei ein Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 pg TNF/ml abgedeckt wurde.

Die Platten wurden anschließend mit 100 µl Actinomycin D-Lösung (20 µg/ml in PBS, Fa. Sigma) mit einer Multikanalpipette (Fa. Flow Laboratories) beschickt, entsprechend 2 µg/Well. Actinomycin D, ein Transkriptionshemmer, verhinderte die weitere Teilung der Zellen und objektivierte die Quantifizierung insofern, als daß während des gesamten Assays die Zellzahl identisch blieb.

Die Zellen wurden zur Inkubation mit den Überständen für 18 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Anderentags wurde jede Vertiefung mit 20 µl MTT versetzt (5 mg/ml in PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, Fa. Sigma) und die Platten für weitere 4 Stunden in den Brutschrank gestellt. Dieser Schritt ermöglichte die Absorption von MTT durch noch lebende Zellen und seine Überführung in blauviolette Formazankristalle. Danach erfolgte die Lyse der Zellen durch Applikation von 60 µl SDS pro Vertiefung (20% Natriumdodecylsulfat in 0,02 M HCl, Fa. Merck p.A.). Zur vollständigen Solubilisierung der Formazankristalle wurde für weitere 18 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Formazanbildung wurde im ELISA-Reader (Fa. Titertek Multiskan Plus MK II, Labsystem) bei 550 nm quantifiziert. Je größer die gemessenen Werte bei dieser Wellenlänge, desto höher die Zahl der lebenden Zellen bzw. desto geringer war der TNF-Gehalt der Proben. Die Cytotoxizität der Probe errechnete sich folgendermaßen:

$$\% \text{ Cytotoxizität} = \frac{\text{Extinktion Kontrolle} - \text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Kontrolle}} \times 100$$

Die Berechnung des TNF-Gehaltes der Probe (pg/ml) erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die mit humanem rekombinanten TNF erstellt wurde.

#### 2.4.2.2. TNF-Bestimmung bei HL60-Zellen mittels ELISA

##### 2.4.2.2.1. Allgemeines

Da HL60-Zellen humanen Ursprungs sind, können von ihnen gewonnene Über- bzw. Unterstände mit käuflich erwerbbaaren ELISAs (Enzyme linked immunosorbent assays) sehr genau quantifiziert werden.

Diesem Assay liegt folgendes Prinzip zugrunde:

Bei der Durchführung der Messung wird eine Lösung mit unbekanntem Antigengehalt auf den Antikörper-beschichteten Boden einer Mikrotiterplatte ausgebracht. Nach einer bestimmten Reaktionszeit hat das Antigen an den Antikörper am Boden einer jeden Vertiefung gebunden und die Überstände werden abgespült. In einem weiteren Schritt wird ein Antikörper zugegeben, der einerseits gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, andererseits aber auch an ein Enzym gekoppelt ist. In der dann folgenden Reaktion bindet der zugegebene Antikörper an die Antigene, die zuvor mit den Platten-gebundenen Antikörpern reagiert hatten. Alle nicht gebundenen Antikörper, die mit Enzym beladen sind, werden bei dem nachfolgenden Waschvorgang aus dem System entfernt. Eine dann zupipettierte Substratlösung wird durch das Antikörper-gebundene Enzym umgesetzt, so daß eine photometrisch meßbare Farblösung

entsteht. Die Intensität der Farblösung ist demnach proportional zur Zahl der an Antikörper gebundenen Antigene. Nach einem bestimmten Zeitraum wird der Reaktionsablauf gestoppt und die Farbtintensität der Überstände spektralphotometrisch bei 450 nm gemessen.

Um die gemessenen Werte mit einer Absolutmenge an TNF gleichsetzen zu können, wird eine Eichkurve mit rhu-TNF erstellt. Die Berechnung der Eichgeraden erfolgte durch lineare Regression, wobei die Korrelation in einem Bereich von 0 bis 1000 pg/ml immer sehr gut war ( $r^2 > 0,99$ ). Liegt der TNF-Gehalt der unbekannt Probe im linearen Bereich der Eichkurve, so kann eine genaue Bestimmung der Konzentration erfolgen.

#### 2.4.2.2.2. Reagenzien

##### LPS

s. unter 2.4.2.1.2.

##### PAF

s. unter 2.4.2.1.2.

##### Lyso-Phosphatidylcholin (L-PAF, Fa. Sigma)

Das Lysophospholipid wurde als C<sub>16</sub>-Lyso-PAF im Versuch eingesetzt, die Stammlösung wurde mit Methanol hergestellt.

##### LTB<sub>4</sub>

s. unter 2.4.2.1.2.

Leukotrien B<sub>4</sub> kam mit einer Konzentration von 10 und 20 nM im Versuch zur Anwendung.

#### 2.4.2.2.3. Gewinnung TNF-haltiger Kulturunterstände

Die TNF-Konzentration wurde bei HL60-Zellen bestimmt, die entweder mit Hilfe von 1,3 % DMSO zu Granulocyten oder durch Calcitriol zu Makrophagen differenziert worden waren (s. 2.2.2.2.).

Die Überprüfung des Differenzierungszustandes der Zellen erfolgte vor Versuchsbeginn durch optische Kontrolle zusammen mit einem Vitalitätstest (EtBr/FDA-Methode) (s. 2.3.1.).

Für den eigentlichen Versuchsansatz wurde das Medium unterhalb der Membran vollständig entfernt und 1 ml Reaktionslösung pro Gasphasenschälchen ausplattiert. Die Reaktionslösung lief unter die Membran - die HL60 Makrophagen befanden sich während der 2stündigen Reaktionszeit im Brutschrank in Gasphase. Nachfolgend wurden die Zellunterstände steril in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, bei 2000 g für 10 Minuten zentrifugiert (Abzentrifugation eventuell mitgeführter Zellen), die Überstände in Eppendorfgefäße aliquotiert und bis zur Durchführung des ELISAs bei -20°C gelagert. Die Zellen aller Ansätze wurden nach Abnahme des Mediums einer fluoreszenzmikroskopischen Vitalitätsbestimmung unterzogen.

#### 2.4.2.2.4. Durchführung der ELISAs zur TNF-Bestimmung

Die ELISAs wurden als Gesamtset von der Fa. Biermann bezogen (Hersteller der "Quantikine": R&D-Systems, USA). Dieses Set hatte folgenden Inhalt: Kulturplatten, Waschpuffer, TNF-Konjugat (polyklonaler Antikörper gegen TNF, konjugiert an eine Meretichperoxidase), Substratlösung (bestehend aus Farbreagens A (stabilisiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Farbreagens B (Tetramethylbenzidin) und eine Stopplösung (2 N Schwefelsäure)).

Zu Beginn des Assays wurden 200 µl Probe oder rhu-TNF-Standardlösung in jede Vertiefung pipettiert. Der mitgelieferte TNF-Standard wurde gelöst und seriell verdünnt, so daß folgende Konzentrationen als TNF-Eichkurve ausgebracht wurden: 500, 250, 125, 62,5, 31,3 und 15,7 pg TNF/ml. Als Reagenzienleerwert wurden 2 Werte, bei denen nur HL60-Medium ausplattiert wurde, mitgeführt. Anschließend wurden die Platten für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Absaugen der Überstände und das 3malige Spülen mit 400 µl des zuvor verdünnten Waschpuffers erfolgte mit einem ELISA-Plattenwäscher (Vertrieb durch Fa. SLT Labinstruments). Nachfolgend wurden 200 µl TNF-Konjugat appliziert und die Mikrotiterplatten zur weiteren Reaktion für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. Das anschließende Waschen verlief nach dem gleichen Schema wie zuvor. Pro Ansatz wurden nun 200 µl Substratlösung ausgebracht - der Überstand färbte sich blau. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung pro Ansatz unterbrochen. Die 2 N Schwefelsäure bewirkte einen Farbumschlag nach gelb. Die Messung der Platten erfolgte innerhalb der nächsten 30 Minuten mit einem ELISA-Reader (Fa. Titertek Multiskan) bei 450 nm.

#### 2.4.3. Quantifizierung weiterer Cytokine bei HL60-Zellen durch ELISAs: IL-6 und IL-8

##### 2.4.3.1. Allgemeines

Das Reaktionsprinzip dieser beiden Assaytypen ist das gleiche wie das für TNF- $\alpha$  beschriebene (s. 2.4.2.2.1.)

##### 2.4.3.2. Gewinnung IL-6 und IL-8 haltiger Kulturunterstände

Wie bereits unter 2.4.2.2.3. beschrieben, wurden hierfür HL60-Zellen verwendet, die entweder zu Granulocysten oder zu Makrophagen differenziert worden waren. Die Überführung ausdifferenzierter Zellen in Gasphase sowie alle weiteren Schritte erfolgten analog zu der unter 2.4.2.2.3. beschriebenen Methode.

##### 2.4.3.3. Durchführung der ELISAs zur IL-6 und IL-8 Bestimmung

Die Durchführung der ELISAs erfolgte genau nach der Vorschrift der Hersteller (Quantikine, Fa. Biermann), wobei vor der IL-8-Bestimmung die Proben 1:100 mit Medium verdünnt werden mußten.

#### 2.4.4. Bestimmung von LTB<sub>4</sub> bei RAM durch HPLC

##### 2.4.4.1. Allgemeines

Lipide sind eine große Gruppe natürlich vorkommender Substanzen. Sie sind charakterisiert durch ihre hydrophoben Eigenschaften und können nach ihren Hydrolyseeigenschaften unterteilt werden. Zu den einfachen Lipiden gehören Fettsäuren, Prostaglandine, Steroide usw. Sie besitzen keine hydrolysierbare Bindung. Die komplexen Lipide enthalten i.d.R. Fettsäuren, die mit polyfunktionellen Alkoholen verestert sind, wie Triglyceride, Phospholipide und Sphingolipide. Phospholipide und Sphingolipide sind nochmals mit hochpolaren Gruppen verestert und verleihen dadurch dem Molekül Oberflächenaktivität.

Die verschiedenartige Struktur und Funktion der Lipide verlangen unterschiedliche analytische Prozeduren, um den chemischen Eigenschaften jeder einzelnen Gruppe gerecht zu werden, und um das umgebende Milieu zu berücksichtigen.

Zur Auftrennung komplexer Lipidgemische erzielt eine Reversed-Phase (RP) Säule in Kombination mit einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit variabler Wellenlänge des UV-Detektors gute Ergebnisse. Die verschiedenen Chromatographieverfahren unterscheiden sich voneinander durch die Art der Bindungskräfte und durch das Trennprinzip.

Bei der Verteilungschromatographie, zu der die RP-Chromatographie gehört, verteilen sich die Substanzen zwischen zwei nicht mischbaren oder nur begrenzt mischbaren Phasen aufgrund der verschiedenen Löslichkeit der Komponenten. Die Reversed-Phase-Chromatographie wird daher so benannt, weil das Prinzip des Verfahrens genau gegenteilig zur Adsorptionschromatographie ist. Die stationäre Phase ist nicht polar und besitzt eine hydrophobe Oberfläche: Silicium ist chemisch an Alkylsilylgruppen gebunden. Die Retention der Moleküle erfolgt aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und der Kohlenwasserstoff-Oberfläche der stationären Phase. Die mobile Phase ist polar, i.d.R. H<sub>2</sub>O vermischt mit Methanol, Acetonitril und/oder anderen, mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln. Die Moleküle werden in der Reihenfolge abnehmender Polarität, also ansteigender Hydrophobie, eluiert. Ein Ansteigen der polaren (wasserhaltigen) Eigenschaften der mobilen Phase erhöht die Retention der zu trennenden Verbindungen. Die mobile Phase kann je nach Wunsch isokratisch (ohne Gradient) oder mit Gradient durchgeführt werden. Allgemein läßt sich feststellen, daß die polaren (weniger hydrophoben) Moleküle am besten in der mobilen Phase getrennt werden, die einen geringen Gehalt an organischen Verbindungen hat. Denn Substanzen mit kurzkettigen Kohlenwasserstoffen treten am besten mit mobilen Phasen mit geringem Gehalt an organischen Verbindungen in Wechselwirkung. In der Praxis ist die Säule als stationäre Phase meist mit C<sub>18</sub>-Molekülen beladen: Octadecylsilylgruppen sind an Si-Oberflächen gebunden. Bei identischen Bedingungen steigt die Retentionszeit der Moleküle proportional mit der Länge der C-Kette der an das Si-gebundenen Gruppen.

#### 2.4.4.2. Gewinnung von Zelllipiden

RAM wurden nach ihrer Isolierung entweder in Gasphase ( $3 \times 10^6$  Zellen/Well) oder in Submerskultur ( $6 \times 10^6$  Zellen/Well) in RPMI 1640 ohne Phenolrot über Nacht kultiviert (s. 2.2.2. bzw. 2.2.3). Anderentags wurden bei den Zellen des Gasphasenansatzes das Medium über und unter den Zellen abgesaugt, 1 ml RPMI 1640 ohne Phenolrot unter die Membran gegeben und die Kulturschälchen für 2 Stunden in die Luftkammer gestellt. Bei den Submerskulturen erfolgte ein Mediumwechsel und anschließend eine 2stündige Inkubation im Brutschrank. Zur Stimulation der Zellen wurde dann bei allen Ansätzen das Medium abgesaugt. Bei der Gasphasenkultur wurde die Membran ausgeschnitten, in eine kleine Petrischale überführt und 1 ml der jeweiligen Inkubationslösung auf die Zellen gegeben. Die Zellen in Submerskultur wurden mit 2 ml der entsprechenden Lösung inkubiert. Stimuliert wurden die RAM mit  $10 \mu\text{M}$  A 23187 für 5 Minuten, die Kontrollansätze erhielten ein Äquivalent des Lösemittels des Ionophors (s. 2.4.1.2.). Zur Methodenüberprüfung wurden 2 separate Ansätze mit einem internen Standard parallel dazu durchgeführt. Der erste Standardansatz beinhaltete Zellen plus 100 ng  $\text{LTB}_4$ , das gleichzeitig mit dem Stimulus für 5 Minuten mitinkubiert wurde. Der zweite Standardansatz beinhaltete ebenfalls Zellen plus 100 ng  $\text{LTB}_4$ , das jedoch erst bei der nachfolgenden Lipidextraktion mit Ethanol hinzugefügt wurde. Diese Methodenüberprüfung erfolgte sowohl in Gasphase als auch in Submerskultur. Die Extraktion der Zelllipide erfolgte bei Zimmertemperatur. Für jeden Ansatz (Kontrolle, stimulierte Zellen, erster und zweiter Standardansatz) wurde Ethanol in einem Glaszentrifugenröhrchen vorgelegt, wobei für die Gasphase 1 ml pro Ansatz und für die Submerskultur 2 ml benötigt wurden. Der zweite Standardansatz wurde zu diesem Zeitpunkt mit 100 ng  $\text{LTB}_4$  versehen. Für die Extraktion wurden die Überstände nach der 5minütigen Brutschrankinkubation in die Zentrifugenröhrchen mit dem vorgelegten Ethanol hinzugegeben. Zwecks Durchmischung der wässrigen und der organischen Phase wurden alle Röhrchen gevortext. Um auch zellassoziertes  $\text{LTB}_4$  zu erfassen, wurden die Zellen mit einem Gummischaber von der Membran der Gaskulturschalen bzw. vom Plastikboden der Petrischale abgekratzt. Die Membran wurde 3 x mit 1 ml Ethanol, der Boden der Petrischale 3 x mit 2 ml Ethanol gespült. Das Gesamtvolumen der ethanolextrahierten Gasphasenansätze betrug 5 ml, das der Submerskulturansätze 10 ml. Die Durchmischung ergab eine einzige Phase.

Hier nochmals den Ablauf der Lipidextraktion mit Ethanol im Überblick

(S1 bedeutet Standard 1 und S2 Standard 2, Ko steht für den Kontrollansatz und bei A 23187 wurden die Zellen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor stimuliert, G bedeutet Kultur der Zellen in Gasphase und S in Submerskultur):

Kultivierungsmethode	Ko		A 23187		S1		S2	
	G	S	G	S	G	S	G	S
100 ng LTB <sub>4</sub> vorlegen	-	-	-	-	X	X	-	-
EtOH in Zentrifugenröhrchen vorlegen	1 ml	2 ml						
Volumen des zugegebenen Überstandes	1 ml	2 ml						
V o r t e x e n								
Z e l l e n a b k r a t z e n								
Waschen der Kulturschale mit EtOH	3 x 1 ml	3 x 2 ml						

Nachfolgend wurden die Lösungen für 1 Stunde bei 37°C mit einem kleinen Rührfisch gerührt, für 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert und über Nacht bei 40°C im Vakuum zur Trockene eingedampft. Zum Einspritzen in die HPLC wurde jede Probe in 200 µl MeOH aufgenommen und ein Aliquot davon injiziert. Für eine Konservierung der Proben wurden sie zur Trockene eingedampft, in 1 ml  $\text{CHCl}_3$  aufgenommen und bei -20°C tiefgefroren.

#### 2.4.4.3. Reversed-Phase-Chromatographie von LTB<sub>4</sub> - angewandte Methode

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion wurde dazu verwandt, die LTB<sub>4</sub>-Sekretion von RAM in Gasphase und in Submerskultur zu quantifizieren. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von O'Sullivan et al. (1988).

Dafür gab es bei jeder Kultivierungsmethode einen unstimulierten Kontrollansatz und eine 5minütige Stimulation mit 10 µM A 23187. Die Zellipide der Überstände wurden mittels einer Ethanolextraktion gewonnen (s. 2.7.2.) und über Nacht im Vakuum zur Trockene eingedampft.

Zur Injektion in die HPLC wurden die Lipide in MeOH aufgenommen und jeweils 10 µl davon injiziert.

Das HPLC-System bestand aus 2 Hochdruckflüssigkeitspumpen (Waters 510 HPLC Pump), die auf eine mit Laufmittel gefüllte Probenschleife einen Druck von ca. 200 PSI brachten. Die Pumpen förderten ein Lösungsmittelgemisch aus MeOH : H<sub>2</sub>O : Essigsäure (konz.) im

Verhältnis 75: 25: 0,05, das von Pumpe A, und MeOH : Essigsäure, das im Verhältnis 100 : 0,5 von Pumpe B mit einem 2 Stufen-Gradient durch das System geleitet wurde. Vor Verwendung der Laufmittel erfolgte deren Filtration (Millipore Filter) und deren Entgasung mit Helium während des Pumpenbetriebs. Die Injektion der Proben erfolgte automatisch mit dem Injektor 712 WISP (Fa. Waters). Die Probenschleife führte als erstes zu einer Vorsäule, die zum Abtrennen grober Verunreinigungen angebracht war. Nach der Vorsäule erfolgte die eigentliche Probenauftrennung mit einer NOVA-Pak-Säule, die mit 4 µm großen C<sub>18</sub>-Partikeln gefüllt war. Die Probenschleife mündete danach in einen UV-Detektor (Waters 490 programmable multiwavelength), der die Proben bei 269 nm analysierte. Der Detektor selbst war an einen Personalcomputer angeschlossen, von dem aus sowohl die gesamte Systemsteuerung erfolgte, als auch die Signale des Detektors auf dem Bildschirm visualisiert wurden. Die Systemsteuerung und Berechnung der Daten wurde mit Hilfe der Chromatography Workstation, Maxima 820, Version 3.3 durchgeführt.

#### 2.4.4.4. Quantifizierung von LTB<sub>4</sub>

Die nach 2.4.5.2. erhaltenen Zellipide wurden für die Injektion in die HPLC zur Trockene eingedampft und in MeOH aufgenommen.

Zusätzlich wurden zu den Proben zur Verifizierung des LTB<sub>4</sub>-Peaks 50 ng LTB<sub>4</sub> injiziert.

Als Berechnungsgrundlage für die durch RAM sezernierte LTB<sub>4</sub>-Menge diente der nach Injektion der 50 ng LTB<sub>4</sub> detektierte Restbetrag.

## 2.5. Auswertung der Daten

Jeder Versuch wurde mehrere Male durchgeführt, die Probenanzahl kann der jeweiligen Abbildungslegende entnommen werden. Einzelversuche sind als solche besonders ausgewiesen. Bei den im folgenden Ergebnisteil dargestellten Daten handelt es sich demzufolge um Mittelwerte und den dazugehörigen Standardfehlern.

Die Überprüfung der Werte auf ihre Normalverteilung erfolgte durch den Kolmogoroff-Smirnov-Anpassungstest (KSA). Dieser testet, ob die zu überprüfende unbekannte Verteilungsfunktion  $F(x)$  mit einer definierten Verteilungsfunktion  $F_0(x)$  übereinstimmt. Dazu werden die zwei folgenden Hypothesen  $H_0$  (Nullhypothese) und  $H_1$  aufgestellt:

$$H_0: F(x)=F_0(x) \forall x$$

$$H_1: F(x)\neq F_0(x) \text{ für wenigstens ein } x$$

Die Nullhypothese wird zum Niveau  $\alpha=0,05$  verworfen, wenn die Testgröße  $D_n$  des KSA-Tests größer gleich dem entsprechenden Schrankenwert  $d_{n,0,95}$  ist.

Die vorgegebene Verteilungsfunktion war hierbei die Normalverteilung  $N(\mu,\sigma)$ . Bei allen untersuchten Daten konnte die Übereinstimmung mit einer Normalverteilung bestätigt werden.

Die Unabhängigkeit der einzelnen Datengruppen ergab sich aufgrund des Versuchsansatzes.

Zur Überprüfung der Gleichheit der Mittelwerte wurde die Varianzanalyse (LSD-Test, LSD= least significant difference) angewendet.

Beim Vergleich mehrerer Datengruppen miteinander kann der t-Test nach Student nicht mehr angewendet werden kann, da das Signifikanzniveau nicht konstant bleibt, sondern sich mit zunehmender Anzahl der Datengruppen exponentiell verschlechtert. Eine Auswertemethode beim Vergleich mehrerer Datengruppen ist die Varianzanalyse von R.A. Fisher. Je nach den zugrundeliegenden Verteilungsfunktionen der Meßreihen können verschiedene Testverfahren angewendet werden. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein LSD-Test verwendet, wobei das Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$  betrug.

Bei diesem Testverfahren werden die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Datengruppen miteinander verglichen. Zwei aufeinanderfolgende Mittelwerte gelten als signifikant voneinander verschieden, wenn ihre Differenz größer ist als die durch das Testverfahren ermittelte kleinste signifikante Differenz (LSD). Die kleinste signifikante Differenz berechnet sich wie folgt:

$$\Delta = t_{n-k;\alpha} * \sqrt{s_{in} * \left(\frac{n_a+n_b}{n_a*n_b}\right)} \quad \text{mit} \quad s_{in} = \frac{1}{n-k} * \sum_{i,j} (x_{i,j} - \mu_i)^2$$

Alle zur Ermittlung der Signifikanzen notwendigen Rechnungen wurden mit einem Personalcomputer und einer speziellen Statistik-Software (NCSS 5. Graphics, J.L. Hintze, Utah 84037, USA) durchgeführt.

Signifikante Unterschiede werden in den Abbildungen über den einzelnen Säulen durch unterschiedliche Buchstaben kenntlich gemacht. Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwerte und mit den dazugehörigen Standardfehlern.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Morphologische und biochemische Untersuchungen

##### 3.1.1. Fluoreszenzmikroskopie von Rinderalveolarmakrophagen (RAM)

RAM zeigten nach einer 2stündigen Inkubation in Gasphase in der Luftkammer eine Vitalität, die zwischen 90 und 95% lag (Abbildung 1). Die lebenden Zellen sind in dieser Abbildung als grün-gelblich zu erkennen. Die Vitalität der Zellen betrug vor Versuchsbeginn immer 90 % und mehr und wurde durch optische Kontrolle ermittelt.

Ein deutlicher Vitalitätsverlust war nach einer 2-Stunden-Begasung mit 3 ppm NO<sub>2</sub> zu sehen (Abbildung 2): die Zahl toter Zellen stieg um 10 - 20% an, so daß die Vitalität zwischen 70 und 80% variierte. Einen nicht ganz so drastischen Effekt induzierte die Applikation von 1,5 ppm NO<sub>2</sub>, es kam zu einer Vitalitätsminderung, die sich zwischen 0 und 10% bewegte (Abbildung 3).

Beiden NO<sub>2</sub>-Dosen war gemeinsam, daß es durch das Schadgas zur Bildung von "Blebs" an der Zellmembran vieler Zellen kam. Diese morphologische Veränderung war in allen Fällen eindeutig von der des Luftansatzes abzugrenzen (Abbildung 2 und 3). Dieses Schadstoff-induzierte Phänomen war nach einer anschließenden Inkubation im Brutschrank für 2 Stunden immer noch sichtbar (Abbildung 4).

Abbildung 5 zeigt RAM nach einer 90minütigen Inkubation mit Reaktionslösung für die Superoxidationenmessung. Die Zellen konnten für die Gesamtdauer der Inkubation Zymosan phagozytieren - dieses ist als dunkler Einschluß in den Zellen erkennbar.

##### 3.1.2. Lichtmikroskopie von RAM

Zellen von Versuchen in Submerskultur wurden vor Versuchsbeginn und danach durch Trypanblauausschluß auf ihre Vitalität hin untersucht. Diese lag bei allen Ansätzen zwischen 90 und 95% (keine Abbildung).

Die Applikation von TPA (12-O-tetradecanolyphorbol-13-acetat) in den Dosen von 10 und 20 ng/ml führte bereits nach einer 1,5 stündigen Inkubation zu einer Aggregation von Zellen, analog zu der, die bei der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden konnte.

##### 3.1.3 Fluoreszenzmikroskopie von HL60-Zellen

Hier wurde ebenfalls bei allen Gasphasenversuchen die Vitalität vor und nach Versuchsbeginn durch optische Kontrolle geprüft.

Sie lag bei HL60 Granulocyten jedesmal zwischen 80 und 90% und bei HL60 Makrophagen zwischen 85 und 95%.

Die Applikation von TPA induzierte wie bei RAM eine Aggregation der Zellen innerhalb von 90 Minuten (Abbildung 6).

### 3.1.4. Lichtmikroskopie von HL60-Zellen

HL60 Granulocyten und Makrophagen, mit denen Messungen in Submerskultur durchgeführt wurden, zeigten vor und nach dem Versuch eine Vitalität, die zwischen 85 und 95% lag (gemessen durch Trypanblauausschluß, keine Abbildung).

### 3.1.5. Quantifizierung der Lactatdehydrogenase (LDH) und der N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) bei RAM

Die Messung der cytoplasmatischen LDH und der lysosomalen NAG erfolgten für die Gasphase vergleichend nach einer Luft- und einer NO<sub>2</sub>-Applikation. Es wurde jeweils der Unterstand unter der Membran nach einer 2stündigen Gasexposition gemessen.

Abbildung 7 zeigt die LDH-Freisetzung in den Unterstand der Kontrolle und nach Applikation von DPL. Das Phospholipid wurde hierbei vor der Kammerinkubation mit einer Konzentration von 100  $\mu$ g in 1 ml Medium auf die RAM gegeben, so daß diese während der Begasung von DPL bedeckt waren. Beide NO<sub>2</sub>-Unterstände wiesen im Vergleich zu den Luftansätzen einen erhöhten LDH-Gehalt auf. Das "Coaten" der Zellen mit DPL führte zu einer vermehrten LDH-Sekretion - dies konnte jedoch statistisch nicht abgesichert werden. Eine mögliche Zerstörung der LDH durch NO<sub>2</sub> konnte aufgrund eines mitgeführten Precinorm-Standards ausgeschlossen werden.

Die Sekretion der NAG (Abbildung 8) war genauso wie die der LDH beim NO<sub>2</sub>-Ansatz erhöht. Die DPL-Applikation führte sowohl beim Luftansatz als auch beim NO<sub>2</sub>-Ansatz zur signifikanten Erhöhung der NAG-Freisetzung in den Unterstand.

Die Applikation einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml Quarz (pro  $3 \times 10^6$  ausplattierten Zellen), der vor Versuchsbeginn für 1 Stunde zur Phagocytose angeboten wurde, führte sowohl nach Luft- als auch nach NO<sub>2</sub>-Begasung zu einer erhöhten LDH-Sekretion (Abbildung 9), die beim Luftansatz signifikant erhöht war, nicht jedoch beim NO<sub>2</sub>-Ansatz. Deutlich war dagegen auch hier wieder, daß 3 ppm NO<sub>2</sub> zum Ansteigen der LDH-Sekretion in den Unterstand führten.

Die Quarzwirkung war bei der NAG-Messung eindeutig sichtbar (Abbildung 10), bei beiden Gasen war der Quarz-Meßwert signifikant gegenüber der dazugehörigen Kontrolle erhöht, und alle NO<sub>2</sub>-Ansätze hatten höhere NAG-Werte als die Luftinkubationen.

Die für beide Enzyme gemessene Erhöhung nach NO<sub>2</sub>-Applikation korrelierte gut mit der Vitalitätsminderung.

## 3.2. Superoxidanionenmessungen

### 3.2.1. Messung der Sekretion von Superoxidanionen durch RAM

#### 3.2.1.1. Einfluß von Cytokinen auf O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Messungen

In diesem Abschnitt wird die Applikation verschiedener Konzentrationen an TNF und PAF, und deren Einfluß auf die Cytokinsekretion von RAM besprochen. Dabei werden für jede

Konzentration vergleichende Betrachtungen zwischen der neuartigen Gasphasenkultur und der konventionellen Submerskultur angestellt. Zu erwähnen ist dabei, daß die Zellen bei beiden Kultivierungsmethoden mit der gleichen Zelldichte ausplattiert wurden.

Abbildung 11 zeigt im oberen Teil einen Gasphasenversuch, bei dem der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF)  $10^{-14}$  M und der Tumor Nekrose Faktor (TNF) mit einer Konzentration von 200 ng/ml appliziert wurden. Es erfolgte die Messung von Superoxidanionen bei voraktivierten Zellen, die über diese Spontansekretion hinaus durch Zymosan noch deutlicher aktivierbar waren. Als "voraktiviert" werden RAM bezeichnet, die  $O_2^-$  spontan bilden. Auf mögliche Ursachen dieser Voraktivierung wird in der Diskussion eingegangen. PAF in der Reaktionslösung ergab keine  $O_2^-$ -Sekretion, die sich statistisch signifikant von der Kontrolle unterschied, und 200 ng TNF/ml führten zu einer leicht erhöhten Sekretion gegenüber der Kontrolle. Für PAF und TNF kombiniert appliziert, wie bei getrennter Verabreichung, war die durch TNF induzierte Erhöhung nicht mehr zu sichern. Im mittleren Teil der Abbildung, bei der ebenfalls Penicillin und Streptomycin als Antibiotikum für die Übernacht-Kultur verwendet wurden, die Zellen aber nicht voraktiviert waren, ließ sich der Effekt von 200 ng TNF pro ml mit einer niedrigen Dosis von 5 ng TNF pro ml nicht reproduzieren. Keine Veränderung gegenüber der Kontrolle ergab sich auch durch PAF  $10^{-14}$  M alleine und in Kombination mit 5 ng TNF/ml. Eine starke Voraktivierung von Zellen durch Amphothericin/Tetracyclin als Zusätze für die Übernacht-Kultur ist aus dem unteren Teil der Abbildung 11 zu ersehen. Eine weitere Aktivierung konnte auch hier durch Zymosan induziert werden. PAF ( $10^{-14}$  M) führte zu einer geringen, statistisch nicht absicherbaren Erhöhung gegenüber der Kontrolle. Die Werte der Kombinationsapplikation von TNF und PAF waren gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht.

Betrachtet man nun die dazugehörigen Versuche in Submerskultur, so war bei Abbildung 12 keine Voraktivierung zu verzeichnen. Was die Applikation oben genannter Cytokine anbelangt, so konnte bei Submerskultur in keinem Fall ein Cytokineffekt gemessen werden, der sich signifikant von den übrigen Ansätzen unterschied.

Wie Abbildung 13 zeigt, wurde die Reaktion von RAM nach Gasphasenkultur und Submerskultur auf PAF um Faktor 100 konzentrierter im Vergleich zu oben und auf TNF mit 100 ng pro Milliliter Reaktionslösung gemessen. 100 ng TNF/ml jeweils alleine und mit PAF kombiniert appliziert ergab das gleiche Ergebnis wie für nicht voraktivierte Zellen in Submerskultur. Kein Mediator führte zu einer  $O_2^-$ -Sekretion, die sich signifikant von den übrigen Ansätzen unterschied. Dies galt auch für die Applikation aller Stimulanzen in Submerskultur (Abbildung 14 unten).

Da die Literatur bezüglich der Konzentration Hinweise auf eine biphasische Wirkungsweise von PAF bei Makrophagenzelllinien gibt (Rola-Pleszczynski und Stankova, 1992) - jeweils im physiologischen und im hohen Dosisbereich - wurde nach den niedrigen PAF Dosen auch eine hochkonzentrierte Applikation von  $10^{-6}$  M PAF untersucht (Abbildung 15). Doch auch hier war PAF sowohl in der Gasphase als auch in der Submerskultur unwirksam.

$LTB_4$ , ein Metabolit der Arachidonsäure, kann als mutmaßliches endogenes  $Ca^{2+}$ -Ionophor Synthese und Sekretion von Superoxidanionen beeinflussen (Heidel et al. 1991). Um eventuelle Kreuzreaktionen zu untersuchen, wurde  $LTB_4$  in verschiedenen hohen Konzentrationen der Reaktionslösung beigelegt. Bei Zellen in Submerskultur (Abbildung 16) war nach 10 und 20 nM  $LTB_4$  keine signifikant veränderte  $O_2^-$ -Abgabe im Vergleich zur Kontrolle zu messen,

ebenso nicht, wenn  $\text{LTB}_4$  mit einer Konzentration von 800 nM appliziert wurde. Nach Verwendung von Amphotericin/Tetracyclin als Zusatz für die Übernacht-Kultur der Gasphase waren die Makrophagen sehr stark voraktiviert und durch Zymosan nicht signifikant mehr stimulierbar (Abbildung 17 oben). Die beiden niedrigeren Konzentrationen an  $\text{LTB}_4$  führten allerdings im Vergleich zur Kontrolle zu einer Reduktion an detektierbaren Superoxidanionen. In Abbildung 17 ist im unteren Teil der  $\text{LTB}_4$ -Einfluß bei gering voraktivierten Zellen dargestellt. Hier ist dagegen keine Reduktion gegenüber dem Kontrollansatz zu sehen.

Eine weitere Fragestellung ergab sich aus der Verwendung von TPA, einem Phorbolster und stärkstem natürlichen Tumorpromotor und A 23187, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor - bedienten sich diese Substanzen eines anderen zellulären Mechanismus bei der  $\text{O}_2^-$ -Sekretion als dies bei bioaktiven Mediatoren der Fall war? A 23187, eine im normalen zellulären Geschehen nicht involvierte Substanz, sollte genauso wie TPA als Stellvertreter eines möglicherweise vorkommenden alternativen Signaltransduktionsweges untersucht werden.

TPA zeigte in der Gasphase einen Konzentrationseffekt: 20 ng TPA pro ml führten zu einer höheren  $\text{O}_2^-$ -Sekretion gegenüber dem Zymosanansatz als dies bei 10 ng/ml der Fall war. Diese höhere Dosis konnte die  $\text{O}_2^-$ -Abgabe um fast das Doppelte mehr triggern als Zymosan (Abbildung 18). Dieser "Mehreffekt" gegenüber dem natürlichen Stimulans Zymosan verschwand bei 10 ng TPA pro Milliliter. In Submerskultur gab es weder einen Dosisseffekt durch die beiden TPA-Dosen noch einen "Mehreffekt" gegenüber Zymosan: 10 und 20 ng TPA pro ml stimulierten die Zellen genauso stark, wie dies Zymosan zu tun vermochte (Abbildung 19).

A 23187 hat als artifizielle Substanz den vermutlich ähnlichen Wirkungsmechanismus wie  $\text{LTB}_4$ . Wie Abbildung 18 zeigt, konnte die Konzentration von 10, 100 nM und 1  $\mu\text{M}$  A 23187 in Gasphase keine signifikant erhöhte  $\text{O}_2^-$ -Sekretion gegenüber der Kontrolle induzieren. In Submerskultur gab es bei allen drei Applikationsdosen eine geringe, aber signifikante Reduktion gegenüber der Kontrolle (Abbildung 19).

Eine Applikation von LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) vermochte weder in Gasphase noch in Submerskultur die  $\text{O}_2^-$ -Produktion zu triggern, die signifikant verändert gegenüber der Kontrolle war, und eine kombinierte Applikation von LPS und Zymosan führte in Gasphase zu einer reduzierten  $\text{O}_2^-$ -Abgabe gegenüber der durch Zymosan alleine induzierten. In Submerskultur erzielte die kombinierte Applikation von LPS und Zymosan einen Effekt wie Zymosan alleine (Abbildung 20 und 21).

Wenn PAF  $10^{-6}$  M oder  $10^{-14}$  M (Abbildung 20, 21, 22 und 23) gleichzeitig mit Zymosan auf die Zellen gegeben wurde, kam es zu keinem zusätzlichen Triggereffekt, der über den von Zymosan hinausging. Bei Abbildung 22 führte die Kombinationsapplikation sogar zu einer verminderten  $\text{O}_2^-$ -Sekretion gegenüber dem Zymosanansatz. Wiederholt galt dies für beide Kulturmethoden, und somit kann festgehalten werden, daß es zwischen Zymosan einerseits und LPS und PAF andererseits keine wesentliche Interaktion gibt. Daß selbst ein 20stündiges Triggern mit LPS und dann durchgeführter Stimulation mit Zymosan zu keiner Erhöhung der  $\text{O}_2^-$ -Sekretion gegenüber Zymosan alleine führt, kann Abbildung 22 und 23 entnommen werden.

### 3.2.1.2. Einfluß von NO<sub>2</sub> und DPL auf die Superoxidationenfreisetzung durch RAM

Was die Ansätze der Begasung von Zellen mit NO<sub>2</sub> anbelangt, so sei daran erinnert, daß die Applikation von 3 ppm NO<sub>2</sub> zu einem Vitalitätsverlust der Zellen bis zu 20% führte. Dieser betrug bei den 1,5 ppm NO<sub>2</sub>-Inkubationen zwischen 0 und 10%. Bei allen nachfolgenden Betrachtungen wird demzufolge unterstellt, daß eine Reduktion der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion kleiner oder gleich 20% bei einer Applikation von 3 ppm NO<sub>2</sub> auf einen Vitalitätsverlust zurückzuführen war. Alle darüber hinausgehenden Effekte werden von uns als "echt" betrachtet. Das Gleiche gilt für 1,5 ppm NO<sub>2</sub> und einen 10%igen Vitalitätsverlust.

Den nachfolgend besprochenen Abbildungen werden folgende Bewertungskriterien zugrunde gelegt: zuerst erfolgt eine vergleichende Beurteilung des Einflusses von NO<sub>2</sub> auf die spontane und stimulierte Absolutmenge an freigesetztem O<sub>2</sub><sup>-</sup> bei der Inkubation an Luft. Darauf folgend werden Ergebnisse über RAM, die mit DPL gecoatet worden waren, betrachtet: hatte DPL einen Einfluß auf die Luft- und/oder NO<sub>2</sub>-Inkubation?

Die in Abbildung 24 gezeigten Messungen wurden nach Applikation synthetischer Luft bzw. 3 ppm NO<sub>2</sub> durchgeführt. Das Antibiotikum der Übernachtskultur war Penicillin und Streptomycin. Bei diesem Versuch war keine nennenswerte Spontansekretion an O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu verzeichnen. Die Zellen des Luftansatzes waren durch Zymosan sehr deutlich stimulierbar. Dies kann für die NO<sub>2</sub>-Inkubation ebenfalls ganz klar erkannt werden. Genauso deutlich ist jedoch die verminderte Sekretion an Superoxidationen nach Zymosanapplikation im Vergleich zum Luftansatz zu erkennen, wobei die Reduktion deutlich über die 20% des Vitalitätsverlustes hinausgeht.

Der Einfluß von DPL auf Luft-inkubierte RAM wird in Abbildung 25 dargestellt. Die Bedeckung der Zellen mit dem Phospholipid hatte weder bei dem unstimulierten Kontrollansatz noch bei den stimulierten Zellen irgendeinen Einfluß auf die gemessene O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion. Analog dazu fällt das Ergebnis nach einer 2stündigen Inkubation DPL gecoateter RAM mit 3 ppm NO<sub>2</sub> aus (Abbildung 26). DPL führte auch hier zu keinem meßbaren Effekt.

Für eine halb so hohe Dosis von 1,5 ppm NO<sub>2</sub> ergibt sich folgendes Bild (bei gleichen Antibiotika und bei schwach voraktivierten Zellen), dargestellt in Abbildung 27: die Makrophagen des Luft- und des NO<sub>2</sub>-Ansatzes sind durch Zymosan sehr deutlich stimulierbar, hier war jedoch gegenüber der Applikation von 3 ppm kein NO<sub>2</sub>-Effekt zu verzeichnen, NO<sub>2</sub> führte zu keiner Hemmung der stimulierten Freisetzung von Superoxidationen bei gar keinem oder nicht die Messung beeinflussenden Vitalitätsverlust. Die gering voraktivierte Kontrolle zeigte dagegen nach NO<sub>2</sub>-Applikation eine leichte Hemmung der Superoxidationsekretion, die wie bei 3 ppm statistisch nicht signifikant unterschiedlich zu der des Luftansatzes war. Die bessere Anlehnung des Systems an die in vivo-Situation durch Applikation von DPL vor der Kammerinkubation führte bei dem Luftansatz (Abbildung 28) wie bei der höheren NO<sub>2</sub>-Dosis (Abbildung 29) zu keiner signifikant veränderten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion (Abb. 28 und 29).

Bei spontan voraktivierten Zellen (die Antibiotika waren wie zuvor Penicillin und Streptomycin) wurde bereits bei 1,5 ppm NO<sub>2</sub> anhand des Kontrollansatzes deutlich (Abbildung 30), daß NO<sub>2</sub> zu Veränderungen zellulärer Mechanismen führt: die unspezifisch stimulierte O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion war bei 1,5 ppm NO<sub>2</sub> im Vergleich zum Luftansatz über den

Vitalitätsverlust hinaus vermindert. Weniger, aber ebenfalls statistisch signifikant reduziert war ebenfalls die  $O_2^-$ -Sekretion Zymosan-stimulierter RAM aus der  $NO_2$ -Kammer. Auch bei voraktivierten Zellen blieb die DPL-Applikation bei allen Luftansätzen im Vergleich zu den nicht Phospholipid-geschützten RAM ohne Wirkung, und zwar sowohl bei Kontroll- als auch bei Zymosanansätzen (Abbildung 31). Dem Kontrollansatz aus Abbildung 32 ist zu entnehmen, daß es gleichgültig war, ob DPL anwesend war oder nicht.

Anders verhielten sich bereits vorstimulierte Zellen, die nach einer zweistündigen  $NO_2$ -Inkubation mit Zymosan stimuliert wurden: DPL entfaltete hier sozusagen einen "Schutzeffekt" und ermöglichte es den Zellen, eine größere Menge an  $O_2^-$  zu sezernieren als dies bei "nicht geschützten" Zellen der Fall war.

Bei Versuchen, in denen die Zellen über Nacht nicht mit Penicillin und Streptomycin, sondern mit Amphotericin B und Tetracyclin kultiviert worden waren, kam es regelmäßig zu einer "unspezifischen" Voraktivierung der Zellen, die ursächlich wohl auf die Verwendung von Amphotericin B als Antimykotikum zurückzuführen war (Wolf und Massof, 1990).

Aus Abbildung 33 kann ersehen werden, daß die Zellen des Luftansatzes mit einer Spontansekretion von fast 20 nmol  $O_2^-$  innerhalb von 90 Minuten so stark voraktiviert waren, wie dies bei manchen Individuen durch Zymosan herbeigeführt werden konnte. Über diese Voraktivierung hinaus waren die Zellen des Luftansatzes durch Zymosan um ein weiteres Drittel zusätzlich zu aktivieren. 3 ppm  $NO_2$  konnten die Voraktivierung fast vollständig unterdrücken, ein drastischer Effekt, der ein Vielfaches über den Verlust an Vitalität hinausging. Auch die Zymosan-stimulierte Radikalsekretion wurde durch  $NO_2$  gehemmt (mehr als durch einen Vitalitätsverlust zu erklären wäre), jedoch war hier keinesfalls eine so deutliche Abnahme wie bei der voraktivierten Kontrolle zu messen. Bei der Luftinkubation voraktivierter Zellen blieb DPL ohne Einfluß (Abbildung 34). Ganz klar ist die Wirkung von DPL bei zuvor mit  $NO_2$ -inkubierten, danach Zymosan-stimulierten RAM (Abbildung 35). Die  $O_2^-$ -Abgabe übertraf beim Zymosanansatz den Vergleichsansatz nach Luftinkubation.

Abbildung 36 zeigt zusammenfassend die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der applizierten  $NO_2$ -Konzentration und der  $O_2^-$ -Sekretion. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Luft- und  $NO_2$ -begasteten Kontrollansätzen, und die Konzentration von 1,5 ppm  $NO_2$  führt ebenfalls zu keiner signifikanten Modifikation der Zymosan-stimulierten  $O_2^-$ -Sekretion. 3 ppm  $NO_2$  führen dagegen eindeutig zu einer Hemmung der stimulierten Freisetzung. Die Abbildungen 37 und 38 zeigen in einer Übersicht eine Zusammenfassung der zuvor präsentierten Daten, was den Effekt von DPL auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von Luft- und mit 1,5 und 3 ppm  $NO_2$ -inkubierten Zellen anbetrifft. Nach Applikation von synthetischer Luft (Abbildung 37 und 38) zeigten die Ansätze mit DPL keine statistisch signifikant veränderte  $O_2^-$ -Sekretion im Vergleich mit den Ansätzen ohne DPL. Nach Applikation von 1,5 ppm  $NO_2$  (Abbildung 37) hatte DPL keinen Einfluß auf die Sekretion unstimulierter Kontrollansätze, dagegen führte es bei den Zymosan-stimulierten Ansätzen zu einer signifikanten Erhöhung der  $O_2^-$ -Abgabe. Für die Messungen nach Applikation von 3 ppm  $NO_2$  (Abbildung 38) trifft das Gleiche zu wie für eine Applikation von 1,5 ppm  $NO_2$ : DPL hatte keinen Einfluß auf die Sekretion unstimulierter Kontrollansätze, führte aber bei Zymosan-stimulierten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung gegenüber der Sekretion von Zellen, bei denen kein DPL appliziert worden war.

### 3.2.2. Messung der Sekretion von Superoxidanionen durch HL60-Zellen

#### 3.2.2.1. Einfluß von Cytokinen auf $O_2^-$ -Messungen

Superoxidanionen werden nach spezifischer Stimulation auch von HL60-Zellen sezerniert, und zwar sowohl von Zellen, die in vitro mit 1,3% Dimethylsulfoxid (DMSO) zu Granulocyten differenziert worden waren, als auch von denjenigen, die nach  $10^{-6}$  M Applikation von Calcitriol Makrophagen-ähnlichen Charakter aufwiesen. Bei den Versuchen stellte sich heraus, daß Zymosan bei beiden Zelltypen nicht immer zur Induktion einer Radikalsekretion führte. Das Stimulans, das ein dem Zymosan bei Rinderzellen äquivalentes Potential besaß, war der Phorbolester TPA, der ebenso wie bei RAM wirkte.

Die Versuche zur  $O_2^-$ -Sekretion wurden lediglich nach vorheriger Gasphasenkultur durchgeführt. Versuche mit Zellen in Submerskultur ergaben keinen Sinn, denn beide Zellarten sind im ausdifferenzierten Zustand nicht vollständig adhärent.

Abbildung 39 zeigt eine  $O_2^-$ -Messung mit HL60 Makrophagen. Die Zellen wurden direkt auf der Membran differenziert und am Versuchstag in Gasphase gebracht. Die Ansätze nach Stimulation mit Zymosan und bei gleichzeitiger Applikation von Zymosan und PAF ( $10^{-6}$  M) zeigen eine Sekretion, die signifikant höher als die des Kontrollansatzes war. Beide Stimuli waren in ihrer Induktionsfähigkeit gleich effizient. Die Sekretion nach PAF ( $10^{-6}$  M) alleine hatte keinen signifikanten Effekt gegenüber der des Kontrollansatzes. Dies galt auch für die Applikation von  $10^{-14}$  M PAF (nicht gezeigt). Eine Stimulation von HL60 Makrophagen mit A 23187 (100 nM) konnte eine  $O_2^-$ -Abgabe induzieren, die sich auf die Hälfte der durch Zymosan induzierten Menge belief (keine Abbildung). Hier zeigte sich, daß TPA (20 ng/ml) das geeignete Agens zur Überprüfung der Stimulierbarkeit der verwendeten Zellen darstellt.

HL60 Granulocyten wurden nach Differenzierung in Zellkulturflaschen (s. 2.2.2.2.) am Versuchstag mit der gleichen Zelldichte wie RAM in Gasphasenkulturschälchen ausplattiert. Zymosan induzierte bei HL60 Granulocyten eine geringe  $O_2^-$ -Menge mit 2 nmol (Abbildung 40). Die gemeinsame Applikation von Zymosan und PAF ( $10^{-6}$  M) führte zu keiner signifikant veränderten Sekretion gegenüber Zymosan alleine. Die  $O_2^-$ -Abgabe der Zellen nach Applikation von PAF allein ( $10^{-6}$  M) führte zu keiner statistisch signifikant unterschiedlichen Messung gegenüber der Kontrolle und den Ansätzen mit Zymosan. Wie bei den Messungen mit HL60 Makrophagen erwies sich TPA als das Stimulans, das zu einer deutlichen  $O_2^-$ -Abgabe durch die Zellen führte und damit die Überprüfung der Stimulierbarkeit der Zellen im jeweiligen Versuch ermöglichte.

### 3.3. TNF-Messungen

#### 3.3.1. Messung der Sekretion von Tumor Nekrose Faktor durch RAM

##### 3.3.1.1. Einfluß von Mediatoren auf TNF-Messungen

Um die Funktionstüchtigkeit der Gasphasenkultur für TNF-Messungen unter Beweis zu stellen, wurden die nachfolgend gezeigten Messungen nach Applikation von Stimuli bzw. Cytokinen jeweils vergleichend für die Kultur von Zellen in Gasphase und in Submerskultur dargestellt. Dabei ist besonders anzumerken, daß die Reaktionslösung bei allen Gasphasenversuchen unter die Membran, auf der die Zellen saßen, gegeben wurde. Wenn die Zellen also zur TNF-Sekretion angeregt wurden, dann nicht dadurch, daß die gesamte Zelloberfläche mit dem stimulierenden Agens in Kontakt kam, sondern lediglich durch die "Pseudopodien", die jede Zelle durch die Membranporen in die darunterliegende Reaktionslösung streckte.

Abbildung 41 demonstriert, daß RAM in Gasphase tatsächlich nach basalem Kontakt mit der Reaktionslösung, die 10 µg LPS pro ml enthielt, stimuliert werden konnten. Das von ihnen sezernierte TNF wurde auch wieder auf demselben Weg in den Unterstand abgegeben. Aus dieser Abbildung kann weiter entnommen werden, daß die TNF-Sekretion einen zeitabhängigen Verlauf aufwies, der "TNF-Effekt" war jedoch bereits nach einer zweistündigen Inkubation vorhanden. Dieser Vorversuch diente als Richtwert für die eigentlichen Untersuchungen, die alle mit einer Inkubationsdauer von 2 Stunden durchgeführt wurden.

Das erste Stimulans, das in Bezug auf Beeinflussung der TNF-Sekretion wichtig erschien, war PAF. Abbildung 42 zeigt eine nicht voraktivierte Kontrolle und Zellen, die durch 10 µg LPS deutlich zur TNF-Sekretion zu stimulieren waren. PAF (1 ng/ml) konnte keine meßbare TNF-Sekretion in den Unterstand induzieren, und die Meßwerte waren nach einer gemeinsamen Applikation von PAF und LPS im Vergleich zur alleinigen LPS-Applikation leicht erhöht, jedoch bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

Prinzipiell ergab sich für die Submerskultur (Abbildung 43) die gleiche Gesamtaussage wie für die Gasphase, die gemeinsame Applikation von PAF und LPS erbrachte ebenfalls keinen Synergismus.

Um eine mögliche Wechselwirkung zwischen TNF und dem Eicosanoid LTB<sub>4</sub> zu erkennen, wurde der Metabolit der Arachidonsäure in zwei verschiedenen Konzentrationen auf seine Induzierbarkeit von TNF untersucht: 20 nM und 160 nM.

Die geringere Dosis von 20 nM LTB<sub>4</sub> zeigte das gleiche Bild, das sich nach PAF-Applikation ergab: LTB<sub>4</sub> allein appliziert führte weder in Gasphase (Abbildung 44) noch in Submerskultur (Abbildung 45) zu einer meßbaren TNF-Freisetzung. Bei beiden Kultivierungsmethoden waren die Zellen durch LPS im gleichen Ausmaß zu stimulieren. Die kombinierte Gabe von LTB<sub>4</sub> und LPS entsprach in Gasphase dem stimulatorischen Effekt von LPS allein. In Submerskultur dagegen kam es zu einer signifikant verminderten Freisetzung.

Die Applikation der höher dosierten Reaktionslösung (160 nM) (Abbildung 46, dieser Versuch wurde nur in Gasphase durchgeführt) führte dagegen zu einem abweichenden Ergebnis, u.a. möglicherweise dadurch bedingt, daß die Zellen bereits unspezifisch voraktiviert waren. Der

Kontrollansatz wies eine durchschnittliche TNF-Konzentration von 73 pg in 1 ml Unterstand auf, und die Makrophagen waren durch LPS zu keiner statistisch signifikant höheren TNF-Sekretion zu stimulieren. Nach 160 nM LTB<sub>4</sub> betrug die gemessene TNF-Menge nur noch ca. 15 pg in 1 ml Unterstand - eine deutliche Reduktion gegenüber dem Kontrollansatz. Deutlich erniedrigt gegenüber dem LPS-Ansatz war auch die Kombinationswirkung von LPS und LTB<sub>4</sub>, andererseits war sie jedoch höher als nach einer Inkubation mit LTB<sub>4</sub> allein.

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) war hier in Gasphase bezüglich der TNF-Sekretion weder mit der Konzentration von 750 U noch von 1000 U/ ml von Bedeutung (Abbildung 47). In Submerskultur, die eine voraktivierte Kontrolle aufwies, hatten die gleichen Konzentrationen an Interferon- $\gamma$  sogar einen hemmenden Einfluß auf die spontane TNF-Sekretion: es waren nur noch geringe TNF-Mengen im Zellüberstand zu messen (Abbildung 48).

Schaut man nun die Reaktion von Zellen in Gasphase nach Applikation von Dexamethason, einem synthetischen Glucocorticoid, an (Abbildung 49), so war nach einer  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethasongabe, die 2 Stunden vor der LPS-Applikation durchgeführt wurde, eine eindeutige Hemmung gegenüber der alleinigen LPS-Applikation zu verzeichnen. Es kam zur Sekretion eines bestimmten Restbetrages an TNF. Wurde Dexamethason gleichzeitig mit LPS auf die Zellen gegeben, so führte dies sogar fast vollständig zur Hemmung der TNF-Freisetzung und führte zu keinem signifikanten Unterschied zur Kontrolle, bei der überhaupt kein TNF gemessen werden konnte. Etwas anders stellte sich der Sachverhalt für die Submerskultur dar: die Zellen waren durch LPS ähnlich stimulierbar wie in Gasphase (Abbildung 50). Wurde Dexamethason 2 Stunden vor LPS appliziert, so war die TNF-Sekretion der RAM vollständig unterbunden. Eine geringfügige, nicht signifikant unterschiedliche Freisetzung von TNF gegenüber der Kontrolle und der Dexamethasongabe vor der LPS-Applikation konnte gemessen werden, wenn Dexamethason und LPS gleichzeitig verabreicht wurden.

### 3.3.1.2. Einfluß von NO<sub>2</sub> und DPL auf die spontane und LPS-induzierte TNF-Freisetzung durch RAM

Nachdem durch Vorversuche klargelegt war, daß eine mögliche Cytokinsekretion während der Applikation von Gasen benachbarte Zellen nicht maßgeblich beeinflusste, wurden bei den im folgenden besprochenen Abbildungen RAM nach ersten Kinetikmessungen für 2 Stunden in Gasphase in der Luft- bzw. NO<sub>2</sub>-Kammer inkubiert. Ein "Coaten" der Zellen mit DPL fand vor der Inkubation der Kulturschalen in den Kammern statt: pro Ansatz wurden 100  $\mu$ g DPL auf die Zellen gegeben, und die Zellen durch Absaugen von Medium sofort wieder in Gasphase gebracht. Die Zellen der Ansätze einer Kombinationsapplikation von Staub und NO<sub>2</sub> bekamen vor Inkubation in den Kammern den jeweiligen Staub für 1 Stunde zur Phagozytose angeboten und wurden nachfolgend in Gasphase gebracht. Alle Ansätze wurden auf die gleiche Weise weiterbehandelt wie die ohne DPL- oder Staubapplikation. Nach Inkubation in den Kammern wurde der Unterstand auf seinen Enzymgehalt untersucht oder verworfen, und dann 3 ml Reaktionslösung auf bzw. unter die Zellen gegeben. Nach einer 2stündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe des WEHI-Bioassays

auf seinen TNF-Gehalt hin untersucht. Die Inkubation mit Stimuli konnte nicht gleichzeitig mit der Begasung der Zellen durchgeführt werden. Dies lag darin begründet, daß wir in Vorversuchen gefunden hatten, daß mit NO<sub>2</sub>-begastes human rekombinantes TNF- $\alpha$  im Verlauf der Zeit durch NO<sub>2</sub> zerstört wurde. Da dies natürlich auch für das von den Zellen sezernierte Rinder-TNF zu befürchten war, fand die Stimulation der Zellen nach der Kammerinkubation statt.

Die erste NO<sub>2</sub>-Applikationsdosis betrug 3 ppm NO<sub>2</sub>, und eine nachfolgende Inkubation im Brutschrank von 2, 3 und 4 Stunden ergab, daß die TNF-Sekretion nach LPS-Applikation bereits nach 2 Stunden ausreichend stimuliert worden war (keine Abbildung). Somit wurden wie zuvor schon erwähnt, die Kulturschalen mit der Stimulationslösung für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Abbildung 51 zeigt im oberen Teil der Abbildung die Sekretion von TNF in den Kulturüberstand in Abhängigkeit von verschiedenen Substanzen bzw. Stimuli nach einer 2 stündigen Inkubation der AM in der Luftkammer. Aus dem Kontrollansatz ist zu ersehen, daß die Zellen sehr stark vorstimuliert waren (als "gering stimuliert" bezeichnen wir eine spontane Freisetzung von ca. 10 pg/ml). Eine weitere Stimulation durch 10  $\mu$ g LPS/ ml Reaktionslösung war möglich, jedoch war der Unterschied zum Kontrollansatz statistisch nicht signifikant. Das Coaten der Zellen mit 100  $\mu$ g DPL/ml Medium vor der Inkubation in der Luftkammer konnte den vorstimulierten Zustand der Zellen fast vollständig aufheben. Bei dem Ansatz DPL+LPS zeigten die Zellen "trotz" Coaten mit DPL eine physiologische Reaktion: sie ließen sich durch LPS in dem Maße stimulieren, wie dies durch LPS allein möglich war.

Der untere Teil der Abbildung zeigt eine TNF-Messung nach Inkubation der Zellkulturen für 2 Stunden mit 3 ppm NO<sub>2</sub>. Der Kontroll- und der LPS-Ansatz zeigen, daß sowohl die spontane als auch die durch LPS induzierbare TNF-Sekretion durch 3 ppm NO<sub>2</sub> vollständig gehemmt wurde. Dies ist eine deutliche NO<sub>2</sub>-Wirkung, die über den sich auf maximal 20% belaufenden Vitalitätsverlust, der durch NO<sub>2</sub> verursacht wurde, hinausgeht. Die Bedeckung der Zellen mit DPL führte nach der NO<sub>2</sub>-Begasung per se zu keiner meßbaren TNF-Sekretion in den Kulturüberstand. DPL allein hatte also keine stimulierende Wirkung. Kongruent damit waren die Messungen nach dem Coaten der Zellen mit DPL und anschließender LPS-Stimulation: NO<sub>2</sub> führte bei beiden Zusätzen zur Hemmung der TNF-Sekretion.

Von gering vorstimulierten Zellen kann bei der Messung in Abbildung 52 gesprochen werden. Die TNF Sekretion war durch LPS deutlich zu stimulieren. Bei dem hier repräsentativen Versuch für die Inkubation mit Quarz bekamen die Zellen 50  $\mu$ g Quarz in 1 ml RPMI 1640 für 1 Stunde zur Phagocytose angeboten. Die Staublösung befand sich, um überhaupt eine Phagocytose des Quarzes zu ermöglichen, als Überstand über den Zellen. Der Ansatz "Kontrolle Quarz" wurde gleich dem Quarzansatz behandelt, jedoch erhielten die Zellen 1 ml Medium ohne Staub. Dieser Kontrollansatz ermöglichte es, eventuell auftretende Einflüsse, die nicht durch den Quarz bedingt waren, auszuschließen (z. B. Aktivierung der Zellen durch Mediumwechsel). Nach der einstündigen Phagocytose wurden die Zellen in Gasphase gebracht und zur Begasung für 2 Stunden in die entsprechenden Kammern gestellt. Die TNF-Sekretion in den Überstand wurde in dem nach der Kammerinkubation neu hinzugegebenen Medium gemessen.

Das Bedecken der Zellen mit Medium beim Ansatz "Kontrolle Quarz" vor der Inkubation in der Luftkammer reduzierte die schwache Voraktivierung der Kontrollzellen, die ständig in Gasphase saßen, weiter. Die Phagocytose von 50  $\mu$ g Quarz führte zu einer geringen, aber

meßbaren TNF-Sekretion. Es bestand jedoch keine statistische Signifikanz zum Ansatz "Kontrolle Quarz".

Im unteren Teil dieser Abbildung war beim Kontrollansatz nach einer 3 ppm NO<sub>2</sub>-Begasung keine Hemmung der Voraktivierung zu verzeichnen, jedoch waren die hier gemessenen Werte so gering, daß es fraglich erscheint, hier von einer (nicht) eingetretenen Hemmung zu sprechen. Eindeutig war dagegen der Effekt von NO<sub>2</sub> auf LPS-stimulierte Zellen, es verursachte im Vergleich zum Luftansatz eine deutliche Reduzierung, die ebenfalls über den 20%igen Verlust an lebenden Zellen hinausging. Für die Ansätze "Kontrolle Quarz" und "Quarz" gilt das Gleiche wie für den Kontrollansatz: die sowohl beim Luft- als auch beim NO<sub>2</sub>-Ansatz gemessene Sekretion war so gering, daß keine eindeutige Wirkung (sowohl von Quarz als auch von NO<sub>2</sub>) feststellbar war.

Die Messungen der zum Quarz analogen Versuche mit Latex sind aus Abbildung 53 zu ersehen. Hier wurden 250 µg Latex in 1 ml Medium für 1 Stunde zur Phagocytose angeboten. Die Zellen wiesen im oberen Teil der Abbildung eine starke Vorstimulation auf. Sie war durch LPS noch steigerbar, jedoch statistisch nicht eindeutig. Der Kontrollansatz für Latex vermochte die Vorstimulation herabzusetzen, und Latex selbst führte zu einer kaum meßbaren TNF-Sekretion, die im Vergleich zum Ansatz "Kontrolle Latex" nicht durch den Staub verursacht worden sein konnte.

3 ppm NO<sub>2</sub> führten auch hier wieder in allen Fällen zur vollständigen Unterdrückung der Voraktivierung und der Induktion der TNF-Sekretion durch LPS, auch bei "Kontrolle Latex" und "Latex".

Für die Applikation der halb so hohen Dosis an Stickstoffdioxid bei gleichbleibenden Versuchsablauf ergab sich folgendes Bild (Abbildung 54): Eine "Bedeckung" der Zellen mit 100 µg DPL übte stimulierenden Einfluß auf die Zellen aus, es kam im Gegensatz zur LPS-Applikation, die sich von der voraktivierten Kontrolle nicht unterschied, zu einer statistisch signifikant höheren TNF-Sekretion. Die kombinierte Applikation von DPL und LPS führte sogar zu einem Synergismus bezüglich der TNF-Sekretion.

1,5 ppm NO<sub>2</sub> waren genauso wie 3 ppm in der Lage, die gesamte TNF-Freisetzung, die beim Luftansatz auftrat, zur (fast) vollständigen Hemmung zu bringen. Genauso reproduzierbar war das Ergebnis, daß NO<sub>2</sub> in Wechselwirkung mit DPL und DPL + LPS zu keiner Steigerung der TNF-Sekretion durch RAM führte, und zwar auch bei der Dosis von 1,5 ppm. Berücksichtigt man, daß bei dieser NO<sub>2</sub>-Konzentration der Vitalitätsverlust zwischen 0 und 10% lag, so war dies ein bei bereits 1,5 ppm NO<sub>2</sub> auftretender eindeutiger Effekt.

Die Phagocytose von 50 µg/ml Quarz führte bei RAM zu einer deutlichen TNF-Sekretion (Abbildung 55). Diese Quarz-induzierte Stimulation der TNF-Sekretion konnte durch NO<sub>2</sub>-Begasung supprimiert werden, sie ging um ein Vielfaches über den Vitalitätsverlust hinaus. Durch TNF-Messung nach der Luftbegasung konnte hier auch noch gezeigt werden, daß ein Mediumwechsel nicht notwendigerweise zur Voraktivierung der Zellen führen muß (Ansatz "Kontrolle Quarz"). Allen NO<sub>2</sub>-Ansätzen war gemeinsam, daß das Gas nicht einen stimulierenden, sondern einen hemmenden Einfluß auf zelluläre Mechanismen der TNF-Sekretion hatte. Die durch LPS induzierte TNF-Sekretion war im Vergleich zum Luftansatz um den Faktor 15 vermindert.

Was eine Applikation von 1,5 ppm Stickstoffdioxid nach Phagozytose des sogenannten Inertstaubes Latex induzierte, kann Abbildung 56 entnommen werden. Bei dem Luftansatz war die Kontrolle wiederholt stark voraktiviert und die Zellen durch LPS nicht weiter zu stimulieren. Bei dem Staubkontrollansatz ist bemerkenswert, daß der Mediumwechsel zu einer stärkeren Stimulation der Zellen als LPS führte. Der Ansatz mit 250 µg Latex wies ebenfalls eine stimulierte TNF-Sekretion auf, dies war aber nicht auf die Latexwirkung zurückzuführen, sondern resultierte, wie dem "Kontrolle-Latex" -Ansatz entnommen werden kann, aus einer unspezifischen Voraktivierung der Zellen.

1,5 ppm NO<sub>2</sub> beeinflussten die spezifische Aktivierung der Zellen (LPS) und die unspezifische (Kontrolle, Kontrolle Latex) in supprimierender Weise. Alle Ansätze waren im Vergleich zur Luftinkubation jeweils signifikant gehemmt.

Desweiteren scheint es erwähnenswert, daß die Zellen bei diversen Versuchen weder durch LPS noch unspezifisch zu einer TNF-Sekretion in den Überstand zu stimulieren waren. Die Gesamtzahl dieser Versuche bei 3 ppm betrug 6 von insgesamt 15 durchgeführten Versuchen. Bei 1,5 ppm wurde mit einer geänderten Zusammensetzung der Reaktionslösung gearbeitet: anstatt wie bei den Versuchen mit 3 ppm NO<sub>2</sub> die Reaktionslösung zur Stabilisierung des TNF mit Rinderserumalbumin zu supplementieren, wurde bei diesen Versuchen ein 10%iger FCS-Zusatz gewählt. Hier waren bei einer Gesamtzahl von 8 Versuchen die Zellen in allen Fällen zu stimulieren.

Bei den nicht zu stimulierenden Versuchen konnte zwar die Hemmwirkung des NO<sub>2</sub> nicht demonstriert werden, jedoch kann auch ihnen entnommen werden, daß NO<sub>2</sub> per se zu keiner TNF-Sekretion durch RAM führte.

#### 3.4. TNF-, IL-6- und IL-8-Messungen bei HL60-Zellen

Im folgenden Kapitel stellte sich die Frage, inwieweit sich eine menschliche Zelllinie nach Cytokinapplikation von den Rinderalveolarmakrophagen unterschied, und zwar auch in Bezug auf die Verwendung des jeweiligen Kultursystems.

Die mit Hilfe eines ELISAs durchgeführte Quantifizierung von TNF, IL-6 und IL-8 wurde bei HL60 Granulocyten und HL60 Makrophagen sowohl in Gasphase als auch in Submerskultur durchgeführt.

Die in den Abbildungen 57 (a-c) gezeigten Daten von HL60 Granulocyten, sind Ergebnisse von Zellen, die in Gasphasenkultur durch den Unterstand unter der Membran stimuliert worden waren (oberer Teil der Abbildung). In diesen Unterstand wurden die gemessenen Cytokine auch wieder sezerniert. Eine andere methodische Vorgehensweise ergab sich zwangsläufig für die Granulocyten in Submerskultur. Da diese Zelllinie eine Suspensionskultur darstellt, mußten die Zellen nach vorheriger Zentrifugation bereits in der entsprechenden Reaktionslösung aufgenommen werden und die Cytokinsekretion der Zellen erfolgte in den Zellüberstand (unterer Teil der Abbildung). Diese unterschiedliche Behandlungsweise der Zellen in Gasphase und in Submerskultur trifft auch für alle weiteren in diesem Kapitel besprochenen Versuche zu. Die gezeigte Gegenüberstellung der beiden Kulturmethoden nach Applikation von PAF allein und kombiniert mit Endotoxin läßt folgende Aussage zu: bei beiden Kulturmethoden kann

davon ausgegangen werden, daß es sich hier um voraktivierte Zellen handelte. In Gasphase erzielte die Applikation von 1 ng PAF pro Milliliter Reaktionslösung im Vergleich zur Kontrolle keinen Effekt, und die Kombinationsapplikation PAF plus LPS resultierte in einer tendenziell höheren Freisetzung an TNF (Abbildung 57 a), IL-6 (Abbildung 57 b) und IL-8 (Abbildung 57 c), die nur in manchen Fällen statistisch abzusichern war. Die Granulocyten in Submerskultur zeigten die gleiche Verhaltensweise wie die in Gasphase.

Eine vergleichende Untersuchung zur Gasphasenkultur von HL60 Makrophagen ist in den Abbildungen 58 (a-c) dargestellt. Im oberen Teil des Schaubildes wurden Messungen bei nicht voraktivierten Zellen durchgeführt, im unteren Teil waren die HL60-Zellen deutlich spontan aktiviert.

Bei nicht voraktivierten Zellen in Gasphase konnten weder PAF (1 ng/ml Reaktionslösung) noch Lyso-PAF bei gleicher Konzentration die Sekretion von einem der drei untersuchten Cytokine so beeinflussen, daß ein von der Kontrolle deutlich abweichender Wert aufgetreten wäre (Abbildung 58 a, b und c, jeweils die obere Abbildung). Aus dem unteren Teil der Abbildungen kann ersehen werden, daß eine derart hohe Spontanaktivierung dazu führte, daß die Zellen durch Endotoxin gar nicht deutlich mehr aktiviert werden konnten, so wie dies für die IL-6 und IL-8 Quantifizierung zutrifft (Abbildung 58 b und c). Trotzdem ergibt sich auch hier dasselbe Bild wie bei den obigen Ergebnissen: PAF verursachte auch bei voraktivierten Zellen keine wesentliche Veränderung gegenüber der Kontrolle. Eine zu PAF äquivalente Aussage ergab sich auch für die Applikation der physiologischen Dosen von 10 und 20 nM LTB<sub>4</sub> in der Reaktionslösung.

Die analoge Betrachtungsweise zu den Abbildungen 58 liefern die Abbildung 59 (a-c) für die Submerskultur: im oberen Teil der Abbildungen nicht spontan aktivierte Zellen, im unteren Teil voraktivierte Zellen.

Nicht voraktivierte HL60 Makrophagen in Submerskultur verhielten sich wie Zellen in Gasphase, PAF zeigte keine Wirkung bzw. es führte sogar bei der IL-8 Sekretion zu einer verminderten Freisetzung. Die voraktivierten Zellen der Submerskultur waren ebenso wie voraktivierte Zellen in Gasphase durch Endotoxin so gut wie gar nicht zusätzlich zu stimulieren, eine deutliche Stimulation erzielte jedoch PAF bei allen drei gemessenen Cytokinen. Die stimulierende Wirkung von PAF wurde durch LPS im Fall von TNF und IL-6 aufgehoben (Abbildung 59 a und b, Ansatz "PAF+LPS"). Für IL-8 galt dieser "Reversionseffekt" von LPS nicht. Während also bei der Gasphase kein wesentlicher Unterschied in der Reaktion nicht spontan vorstimulierter und spontan vorstimulierter Zellen festgestellt werden konnte, war dies für die PAF-Wirkung in Submerskultur durchaus der Fall.

### 3.5. LTB<sub>4</sub>-Bestimmung bei RAM per HPLC

Wie bei allen zuvor untersuchten Cytokinen wurden auch bei der Quantifizierung von LTB<sub>4</sub> vergleichende Betrachtungen der beiden Kulturmethoden Gasphase und Submerskultur angestellt.

Die Stimulation der Zellen erfolgte durch eine 5minütige Inkubation mit 10 µM A 23187. Zur Überprüfung der Methode wurden 2 Standards mitgeführt: ein interner Standard (St. 1), der während der 5minütigen Inkubation zu den Zellen gegeben wurde (unstimulierter Kontrollansatz), und ein zweiter Standard (St. 2), der für die nachfolgende Lipidextraktion mit Ethanol in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt wurde. Der interne Standard war für die quantitative Auswertung von durch die Zellen sezerniertem LTB<sub>4</sub> vorgesehen, der 2. Standard sollte eine quantitative Überprüfung der Lipidextraktion (durch Ethanol) gewährleisten.

Das Chromatogramm (Abbildung 60) zeigt die Daten zur Wiederfindungsrate von LTB<sub>4</sub> nach Gasphasenkultur der RAM. Es wurde das Chromatogramm von Standard 1 und Standard 2 übereinandergelegt. Die Wiederfindungsrate für den internen Standard (St. 1) betrug ca. 40 % (bei 100 ng eingesetztem LTB<sub>4</sub>) und 70% für den Standard 2. Die Vergrößerung der mit dem Pfeil markierten Stelle zeigt die Peaks für LTB<sub>4</sub>. Abbildung 61 zeigt 3 übereinandergelegte Chromatogramme: Messungen einer unstimulierten Kontrolle und von Zellen, die mit 10 µM A 23187 für 5 Minuten stimuliert worden waren. Die Kontrolle wies eine geringe LTB<sub>4</sub>-Sekretion auf (4-5 ng pro 3 x 10<sup>6</sup> ausplattierten Zellen), die durch Ionophor nicht weiter stimuliert werden konnte. Ersichtlich ist dies anhand des Standards 2, der über die beiden anderen Chromatogramme gelegt wurde. Die mit einem Pfeil markierte Stelle der Chromatogramme wurde im oberen rechten Teil der Abbildung herausvergrößert. Sie zeigt den LTB<sub>4</sub>-Peak, und die beiden darunterliegenden Chromatogramme (Kontrolle und A 23187-stimulierte Zellen) lassen keine deutlich sichtbare LTB<sub>4</sub>-Sekretion erkennen.

Die Chromatogramme der Abbildung 62 und 63 zeigen die Daten der Zellen nach Submerskultur. In Abbildung 62 wurden die Chromatogramme von Standard 1 und Standard 2, die zur Submerskultur hinzugegeben worden waren, übereinandergelegt. Die mit dem Pfeil gekennzeichnete Stelle zeigt in Vergrößerung den Peak für LTB<sub>4</sub>. Die Wiederfindungsrate für den internen Standard belief sich hier auf ca. 50 % (bei 100 ng eingesetztem LTB<sub>4</sub>) und auf 65% für den Standard 2. Bei der Submerskultur wurden 6 x 10<sup>6</sup> Zellen ausplattiert. Abbildung 63 zeigt 3 übereinandergelegte Chromatogramme: Messungen einer unstimulierten Kontrolle und von Zellen, die mit 10 µM A 23187 für 5 Minuten stimuliert worden waren. Die LTB<sub>4</sub>-Sekretion des Kontrollansatzes blieb mit durchschnittlich 3 ng bei doppelter Zahl an ausplattierten Zellen unterhalb der des Gasphasenansatzes, und die Zellen waren durch A 23187 zu einer geringfügig höheren LTB<sub>4</sub>-Abgabe von ca. 8 ng zu stimulieren. Die Vergrößerung der mit dem Pfeil markierten Stelle zeigt den LTB<sub>4</sub>-Peak, und den Chromatogrammen kann entnommen werden, daß es auch bei der konventionellen Submerskultur zu einer vernachlässigbaren Sekretion an LTB<sub>4</sub> kommt.

## 4. Diskussion

Die Erforschung schadgasinduzierter Zellschädigungen gehört nach wie vor zu den aktuellen umweltmedizinischen Problemstellungen unserer Zeit. Kontrollierte in vitro-Expositionsstudien können zumindest teilweise das Manko epidemiologischer Untersuchungen an Menschen oder das von Tierversuchen kompensieren, da die Zahl der in die Versuchsergebnisse einfließenden Parameter genau definiert und limitiert werden kann.

Wie eingangs erwähnt, ist es daher Ziel der vorliegenden Arbeit, anhand eines solchen in vitro-Systems, das eine möglichst naturgetreue Reproduktion der wirklichen Situation darstellen sollte, kontrollierte Untersuchungen der Wirkung von Stickstoffdioxid in Kombination mit Stäuben auf Alveolarmakrophagen durchzuführen.

Aus der neuartigen Gasphasenkultur von Zellen ergibt sich eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit: es soll überprüft werden, ob mit HL60 Makrophagen als Modell eine Gasphasenkultur möglich sei (diese Zellen leben unter konventionellen Kulturbedingungen nicht an Luft).

Naturgetreu bedeutet in diesem Zusammenhang eine Kulturmethode zu finden, die einem direkten Kontakt zwischen Zelle und gasförmiger Expositionsnoxe gerecht wird, in diesem Fall die Kultur von Zellen in Gasphase. Dieses, wie auch jedes andere artifizielle Kultursystem, ist in seiner Übertragbarkeit auf die in vivo-Situation durch Vernachlässigung von Einflüssen, die in vivo vorhanden sind, potentiell gefährdet. Einer der Fehler, mit dem dieses System behaftet ist, ergibt sich aus der Verwendung von nur einem einzigen lungenspezifischen Zelltyp, den Alveolarmakrophagen. Dies sollte dadurch kompensiert werden, daß mögliche Cytokineinflüsse, sei es durch die Sekretion derselben Zellen oder durch andere relevante Zelltypen, erfaßt bzw. ausgeschlossen würden. Daher wurde eine exogene Mediatorapplikation über einen weiten Konzentrationsbereich untersucht. Ein weiterer Schritt in Richtung der in vivo-Situation stellte das "Coaten" von Zellen mit DPL, dem Hauptbestandteil des Surfactantmaterials der Lunge, dar.

Parameter der Schädigung waren die Sekretion cytoplasmatischer und lysosomaler Enzyme in den Zellunterstand, die Freisetzung von Superoxidanionen unter Berücksichtigung verschiedener Variationen beim Versuchsablauf und der Einfluß von  $\text{NO}_2$  und Stäuben auf die Sekretion des Tumor Nekrose Faktor bei Alveolarmakrophagen.

### 4.1. Eignung der Kulturmethode zum Nachweis von Effekten gasförmiger Noxen

Da in dieser Arbeit die Messung des Einflusses gasförmiger Luftschadstoffe auf zelluläre Mechanismen durchgeführt werden sollte, galt es zu allererst, ein geeignetes Kultursystem zu finden. Dieses sollte den direkten Kontakt zwischen Gas und Zelle ermöglichen, ein Grund, warum die konventionelle Submerskultur dafür ungeeignet war. Mit dem von Voisin übernommenen System ist es möglich, Alveolarmakrophagen diverser Spezies mit Gasen wie  $\text{NO}_2$  oder  $\text{O}_3$  über längere Zeiträume hinweg ohne Vitalitätsverlust zu exponieren. Das klassische Kultursystem hätte darüberhinaus die Quantifizierung, welche Schadgaskonzentration überhaupt zur Zelle vordringt, nicht erlaubt. Weiterhin wäre unbekannt geblieben, inwieweit sich  $\text{NO}_2$  in Medium löst und damit z.B. durch eine Ansäuerung zu Artefakten bezüglich der durchgeführten Messungen führen könnte. So führten

epidemiologische Untersuchungen am Menschen zu der Erkenntnis, daß eine Ansäuerung der Luft signifikant mit verschiedenen Indikatoren des Status Asthmaticus assoziiert war, u.a. Husten und Kurzatmigkeit (Ostro et al. 1991). Die Alveolarmakrophagen könnten durch diese Kultursystem-bedingte Ansäuerung bereits in einen ähnlich unphysiologischen Zustand versetzt werden wie beim Status Asthmaticus.

Daß dieses Kultursystem in Bezug auf seine "Funktionstüchtigkeit" mit der konventionellen Submerskultur vergleichbar ist, konnte durch die Staubapplikation verifiziert werden: Quarz (50 µg/ml) führt nach Inkubation von RAM in der Luftkammer zur signifikant höheren Enzymfreisetzung in den Zellunterstand im Vergleich zu den Ansätzen ohne Staub. Es induziert damit auch eine cytotoxische Wirkung, die mit der der Submerskultur von RAM vergleichbar ist (Schmidt, 1992), und Latex bleibt als Inertstaub ohne Einfluß (Abbildung 53 und 55) auf die TNF-Sekretion.

#### 4.2. Eignung von HL60 Makrophagen und HL60 Granulocyten für die Gasphasenkultur

Die Überprüfung der Fragestellung, ob eine Gasphasenkultur von HL60-Zellen überhaupt möglich ist, um mit dieser Zelllinie auch andere zelluläre Mechanismen zu untersuchen, erfolgte unter anderem durch eine Quantifizierung der Radikalsekretion.

Es stellte sich heraus, daß Zymosan, das Standardstimulans von RAM, weder bei HL60 Makrophagen noch bei HL60 Granulocyten geeignet war, reproduzierbar eine deutliche Menge an  $O_2^-$  zu induzieren. Als adäquater Stimulus bei HL60-Zellen stellte sich TPA heraus.

PAF ergab bei beiden HL60-Zelltypen keine von der Kontrolle abweichende Sekretion und auch die gemeinsame Applikation von PAF und Zymosan erbrachte keine andersartige Erkenntnis als bei RAM.

HL60-Zellen könnten hierbei als Substitut für RAM Verwendung finden. Jedoch ist dies noch insofern in Frage zu stellen, als daß Zymosan nur eine schwach induktive Wirkung besitzt und bei HL60-Zellen möglicherweise andere Mechanismen der Signaltransduktion in Betracht kommen. So bliebe denn bei einem neu auszutestenden Agens die Frage offen, ob es nicht über den gleichen Mechanismus wie Zymosan eine  $O_2^-$ -Sekretion hätte auslösen können und deshalb nur wenig wirksam war.

Weiterhin sollte die Tauglichkeit der Gasphasenkultur von HL60-Zellen durch Messung einer Cytokinsekretion überprüft werden. HL60 Granulocyten und HL60 Makrophagen wurden mit LPS und/oder PAF, Lyso-PAF und  $LTB_4$  im Zellunterstand während einer Gasphasenkultur und im Überstand bei der Submerskultur inkubiert. Quantifiziert wurden dann  $TNF-\alpha$ , IL-6 und IL-8.

LPS vermochte in allen untersuchten Fällen eine Sekretion der drei Cytokine zu induzieren, es sei denn, die Zellen waren sehr stark hypersensibilisiert.

Bei nicht voraktivierten HL60 Makrophagen hatten weder PAF noch Lyso-PAF bei beiden Kulturmethoden irgendeine Wirkung. Voraktivierte Zellen verhielten sich dagegen anders. PAF konnte in manchen Fällen zu einer Cytokinsekretion führen, deutlich ausgeprägt war. Dies traf aber nur für die Submerskultur zu. Die Ansätze nach Kombinationsapplikation von PAF und LPS verhielten sich bezüglich voraktivierten Zellen ähnlich wie die von PAF allein: die zelluläre Reaktion war nicht einheitlich, und ein vorhandener Effekt kam bei der Submerskultur

deutlicher zur Ausprägung. In ihrer Sekretionsrate untereinander verglichen, kam der Effekt bei TNF am deutlichsten zum Tragen.

Da bei HL60 Granulocyten nur Daten über voraktivierte Zellen vorliegen, können keine Betrachtungen zum "Normalverhalten" der Zellen angestellt werden. Hier gilt wie für die Makrophagen, daß ein Effekt nach Applikation von PAF oder PAF und LPS zusammen vorwiegend bei der Submerskultur der Zellen auftrat und bei den drei gemessenen Cytokinen TNF am stärksten induziert wurde. Eine vergleichbare Wirkung von Cytokinen auf voraktivierte Zellen fanden Gosset et al. (1991) bei Alveolarmakrophagen von Asthmatikern. Carre et al. (1991) arbeiteten mit Alveolarmakrophagen von Patienten mit einer idiopathischen Lungenfibrose. Die Zellen wiesen eine gesteigerte Expressionsrate des IL-8 Gens auf. Durch die pathologische Vorgeschichte der Patienten kann in beiden Fällen davon ausgegangen werden, daß es sich um voraktivierte Zellen handelt. Daß eine gesteigerte Cytokinsekretion tatsächlich auf eine Vorstimulation zurückgehen kann, konnten Boutten et al. (1992) zeigen. Die Autoren fanden nach Applikation des  $\alpha_1$ -sauren Glykoproteins (AGP) keine Cytokinsekretion. Wurden die Monocyten bzw. Makrophagen mit einer suboptimalen LPS-Konzentration vorstimuliert, so erhöhte AGP signifikant die IL-1, IL-6 und die TNF-Produktion.

Zusammenfassend kann festgestellt werden daß HL60-Zellen für die Gasphasenkultur geeignet sind. Standardstimuli wie LPS können die Zellen zur Cytokinsekretion stimulieren, und auch die Exposition von HL60-Zellen in Gasphase mit NO<sub>2</sub> führen zu Ergebnissen, die mit denen von RAM vergleichbar sind (Polzer in press).

#### 4.3. Bildung von Superoxidationen und Tumor Nekrose Faktor durch verschiedenen Mediatoren

##### 4.3.1. Einflüsse von Cytokinen und Lipidmediatoren

Bezüglich der Induktion der Superoxidationenfreisetzung stellte sich heraus, daß die Voraktivierung der Rinderalveolarmakrophagen unter Umständen spontanen Charakter hatte, möglicherweise bedingt durch die individuelle Vorgeschichte eines jeden Tieres. Die Verwendung bestimmter Zusätze für die Übernacht-Kultur konnte das System ebenfalls beeinflussen: das Versetzen des Mediums mit Amphothericin/Tetracyclin führte regelmäßig zu einer Voraktivierung der Kontrollansätze. Daß diese Erhöhung der Atmungsaktivität möglicherweise auf Amphothericin zurückzuführen ist, zeigen Untersuchungen von Wolf und Massof (1990), die ebenfalls eine erhöhte O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion nach Amphothericin B-Zusatz statistisch absichern konnten. Nach der Erkenntnis, daß bereits die Art der Zellkultur solch drastischen Einfluß auf die durchgeführten Messungen haben kann, erschien es um so wichtiger, derartige Beeinflussungen des Systems von vornherein auszuschließen.

Zur Realisierung eines naturnahen in vitro-Modells war es notwendig, den Einfluß exogener oder endogener Mediatoren zu bestimmen, denn Alveolarmakrophagen haben im Atemraum Kontakt zu anderen Zellarten wie Epithelzellen und Endothelzellen, die nach Aktivierung sekretorisch aktiv werden können.

Zur Überprüfung der "Funktionstüchtigkeit" der Gasphasenkultur wurde bei Messungen von Sauerstoffradikalen und TNF eine Applikation der jeweiligen Substanzen für beide Kultursysteme (Gasphase und Submerskultur) vorgenommen, um dann eventuell auftretende Unterschiede genau qualifizieren und quantifizieren zu können.

Wie schon eingangs dargelegt, hat TNF mit seiner Wirkung auf reaktive Sauerstoffspezies zwei antagonistische Wirkungsweisen: er führt vermutlich durch Stimulation der Bildung von Sauerstoffradikalen zur Schädigung zellulärer Bestandteile (Freeman und Crapo, 1982). TNF kann aber auch eine vermehrte Bildung antioxidativer Enzyme bewirken und führt somit zu einem Schutz vor einer Sauerstofftoxizität (Tsan et al., 1990; Visner et al. 1992).

In den hier durchgeführten Untersuchungen kam es nach Applikation von TNF bei beiden Kultursystemen zu keiner signifikant höheren  $O_2^-$ -Sekretion im Vergleich zur Kontrolle. Eine Ausnahme bildeten die folgenden Fälle: die Applikation von 100 ng/ml TNF nach Gasphasenkultur von RAM führte zu einer signifikant höheren  $O_2^-$ -Freisetzung als die Kontrolle. Die nach der Applikation von 100 ng/ml TNF sezernierte  $O_2^-$ -Menge unterschied sich nicht von der nach einer Kombinationsapplikation von TNF und PAF, die ihrerseits wiederum nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war (Abb. 13). Ähnlich zeigte sich das Verhalten dreier Messungen mit RAM nach Submerskultur: die Menge an gemessenem  $O_2^-$  nach TNF-Gabe unterschied sich zwar signifikant von der Kontrolle, nicht aber von der gemeinschaftlichen Applikation von TNF und PAF, die wie auch für den oben beschriebenen Fall der Gasphasenkultur nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war (Abb. 12, 13 und 14).

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, daß TNF bei RAM kein primärer Stimulus der  $O_2^-$ -Produktion ist. Bestätigt wird dies durch Untersuchungen von Tanner et al. (1992), die bei Makrophagen, die vom Knochenmark abstammten, ebenfalls keine primär stimulierende Wirkung des TNF bei der Superoxidsekretion feststellen konnten. Das Gleiche gilt für Untersuchungen von Peters et al. (1990), die Sauerstoffradikale bei Kupfferzellen der Ratte quantifizierten.

Vermutlich ist jedoch die primär stimulierende Wirkung von TNF Zelltyp-spezifisch, denn TNF kann bei Nierenzellen eine  $O_2^-$ -Abgabe induzieren (Radeke et al., 1990), ebenso wie dies für neutrophile Granulozyten der Ratte (Peters et al., 1990) oder für die L-929-Zelllinie (Hennet et al., 1993) zutrifft.

In diesem Falle scheint es relativ unwahrscheinlich, daß TNF wie oben erwähnt innerhalb des hier angewandten Meßzeitraumes von 90 Minuten zur Bildung und Sekretion antioxidativer Schutzenzyme führt und ihm dadurch eine bimodale bzw. antagonistische Wirkungsweise zukommt: es induziert einerseits die Expression und Sekretion antioxidativ wirkender Schutzenzyme, andererseits ist es ein Primärstimulus der  $O_2^-$ -Sekretion.

Weiterhin enthält die Literatur Hinweise darauf, daß sich die Wirksamkeit von TNF bei Makrophagen auf den Mechanismus der Vor- oder Zweitstimulation von Zellen zu beschränken scheint (Humbert und Winsor, 1990; Tanner et al., 1992). Dies stellt auch eine mögliche Erklärung des Effektes dar, warum bei dieser Untersuchung in einigen Fällen die Applikation von TNF mit PAF zu einer geringen, aber signifikant höheren  $O_2^-$ -Produktion als bei der Kontrolle führt. Um die Rolle des TNF bezüglich seiner Triggerwirkung eindeutig klären zu können, sollten RAM für einen längeren Zeitraum mit TNF vorinkubiert werden, um dann mit einem Zweitstimulus induziert zu werden oder umgekehrt.

Wie eingangs dargelegt, führt PAF nach einer in vivo-Applikation direkt zur Superoxidanionenbildung bei Alveolarmakrophagen des Meerschweinchens (Kato et al., 1993).  $10^{-14}$ ,  $10^{-12}$  und  $10^{-6}$  M appliziert führte PAF bei den Alveolarmakrophagen des Rindes in Gasphase zu keiner signifikant unterschiedlichen Menge an Radikalen im Vergleich zur Kontrolle. Die signifikant geringere Freisetzung nach einer  $10^{-6}$  M Applikation von PAF in Submerskultur muß aufgrund der geringen Ausprägung dieses Effektes mit Vorbehalt bewertet werden.

Es gibt immer noch Widersprüchliches, was die Rolle von PAF als Aktivator für die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate anbetrifft. Tatsächlich gibt es weitere Untersuchungen, bei denen PAF die Atmungsaktivität bei Meerschweinchenmakrophagen stimuliert: und zwar die von Peritonealmakrophagen als auch die von Alveolarmakrophagen (Maridonneau-Parini et al., 1985; Parnham und Bittner, 1986). Im Gegensatz dazu fanden einige Autoren, daß PAF keinen Einfluß auf Rattenalveolarmakrophagen hat (Hwang et al., 1983). Offensichtlich ändert sich die Wirkung von PAF als eine Funktion des Gewebetyps und der Spezies, von denen die Zellen abstammen, genauso wie sie vom Phänotyp der Zelle ("voraktiviert" oder "ruhend") und von den Kulturbedingungen abhängig zu sein scheint.

Kombinationsapplikationen von PAF und TNF führten zu keiner abweichenden Erkenntnis gegenüber der Einzelapplikation des jeweiligen Agens. Zwar kam es zu signifikanten Abweichungen von der Kontrolle sowohl für die Gasphase (Abb. 11 und 14) als auch für die Submerskultur (Abb. 12 und 14), diese Erniedrigungen oder Erhöhungen der  $O_2^-$ -Sekretion waren jedoch äußerst gering, und für die Gasphase eher von widersprüchlicher Natur. Bei den betreffenden Versuchen waren die Zellen jeweils voraktiviert und es wurden ähnliche Konzentrationen angewandt, die Messungen verhielten sich aber entgegengesetzt. Es ist naheliegend, daß der Grund dafür nicht in zellulären Abläufen liegt, sondern dies auf die methodische Behandlung zurückzuführen ist. Für die Submerskultur zeigte sich, daß die gemessenen Kombinationseffekte durch TNF verursacht werden. In den Versuchen, bei denen TNF zur signifikanten Erhöhung oder Erniedrigung gegenüber der Kontrolle führte, ergab die Applikation beider Agenzien dasselbe Resultat. Dies scheint ein weiterer Hinweis für Richtigkeit der Annahme zu sein, daß RAM auf PAF nicht reagieren. Kommt es zu einer veränderten  $O_2^-$ -Sekretion, so scheint sie TNF-induziert zu sein.

Diese Hypothese wird durch folgende Messungen ergänzt: PAF konnte bei gleichzeitiger Applikation mit Zymosan zu keinem Triggern der  $O_2^-$ -Produktion führen (Abb. 20-23).

Diese Verhaltensweise der Alveolarmakrophagen steht im deutlichen Gegensatz zu den Daten, die Paubert-Braquet und Mitarbeiter (1990) erzielen konnten: eine TNF-Applikation erhöht bei menschlichen neutrophilen Granulocyten die PAF-induzierte  $O_2^-$ -Produktion.

$LTB_4$  ist ein von der Membran abstammender Lipidmediator, der aus Arachidonsäure über den 5-Lipoxygenaseweg produziert wird. Arachidonsäure kann die Bildung freier Radikale wie  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  induzieren, und ihre Freisetzung ist durch TNF stimulierbar (Das et al., 1990). Der Mechanismus, daß eine Stimulation der Zellen zu einer  $LTB_4$ -Sekretion führt, die ihrerseits die Bildung von Sauerstoffradikalen induziert, könnte auch für  $LTB_4$  wirksam sein. Hinweise darauf ergeben sich aus folgenden Publikationen: die Stimulation menschlicher Alveolarmakrophagen führt zur Produktion großer Mengen an  $LTB_4$  (Bigby und Holtzman,

1987), und eine LTB<sub>4</sub>-Vorbehandlung führt bei neutrophilen Granulocyten aus der Rinderlunge zur Sekretion an Superoxidanionen (Heidel et al., 1991).

In den hier durchgeführten Versuchen induzierte LTB<sub>4</sub> in der Submerskultur von RAM keine signifikant veränderte Menge an O<sub>2</sub><sup>-</sup> im Vergleich zur Kontrolle. Dasselbe ergab sich für Zellen in Gasphasenkultur, die immunologisch nicht voraktiviert waren. Wiesen die Zellen der Gasphasenkultur dagegen eine starke Vorstimulation auf, so führte LTB<sub>4</sub> zu der genau gegenteiligen Wirkung wie der von Heidel et al. (1991) gezeigten: LTB<sub>4</sub> hemmte die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion signifikant. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis stellen die folgenden Sachverhalte dar: LTB<sub>4</sub> gehört zu den Substanzen, die Entzündungen auslösen (Pauwels, 1990). Da entzündliche Prozesse unter anderem zur Rekrutierung neutrophiler Granulocyten in die Lunge führen (Neijens, 1990; O'Byrne et al., 1985), die ihrerseits zellschädigende Wirkung ausüben können, wirkt die reduzierte Radikalsekretion voraktivierter Makrophagen diesem Prozeß entgegen. Eine derartige Hemmung auf zelluläre Ebene erscheint insofern sinnvoll, als daß die Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies während entzündlicher Prozesse zu einem zusätzlichen Gewebeschaden und damit zu einer weiteren Verschlechterung des Krankheitszustandes beitragen würde.

Eine LTB<sub>4</sub>-Sekretion durch RAM selbst konnte nicht gemessen werden (Abb. 60-63), da jedoch bei inflammatorischen Reaktionen eine Vielzahl von Zellen und Cytokinen miteinander interagierten, sollte in dieser Untersuchung nicht ausgeschlossen werden, daß exogen gebildetes LTB<sub>4</sub> RAM in ihrer zellulären Antwort beeinflussen könnte.

Mediatoren wie PAF, LTB<sub>4</sub> und IFN- $\gamma$  vermochten bei Gasphasen-inkubierten RAM keine TNF-Sekretion zu induzieren. Eine Kombinationsapplikation mit LPS führte zu Ergebnissen, die der jeweiligen Messung mit LPS allein entsprachen. LTB<sub>4</sub> zeigte dagegen bei voraktivierten Zellen eine abweichende Wirkungsweise: 160 nM LTB<sub>4</sub> führten in Gasphase zu einer Hemmung gegenüber der voraktivierten Kontrolle, genauso wie LPS und LTB<sub>4</sub> zusammen. Es wäre denkbar, daß Cytokine unter entsprechenden Bedingungen einen Status der Hyporeagibilität induzieren, so wie dies für LPS der Fall sein kann (Chu et al., 1993).

Cytokine in Submerskultur erbrachten keine von der Gasphase abweichenden Erkenntnisse.

#### 4.3.2. Einflüsse von TPA, Ca<sup>2+</sup>-Ionophor, LPS und Dexamethason

Die Produktion reaktiver Sauerstoffintermediate kann in verschiedenen Zelltypen, darunter auch bei Alveolarmakrophagen, durch lösliche Aktivatoren wie TPA stimuliert werden (Goya et al., 1992, Robison et al., 1990).

Dies bestätigte sich auch für RAM in Gasphase und Submerskultur. 20 ng/ml TPA führten nach Gasphasenkultur zur signifikant höheren O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion gegenüber dem Zymosan-stimulierten Ansatz. Die TPA-induzierte Radikalsekretion war dosisabhängig: die niedrigere TPA-Menge induzierte eine signifikant geringere O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion als die doppelt so hohe. In Submerskultur zeigten RAM ein abweichendes Sekretionsverhalten: eine Steigerung der Wirkung von TPA war durch die höhere Dosis nicht mehr zu erzielen, ein Effekt der durch die Kulturmethode bedingt zu sein scheint. Möglicherweise kann eine Gasphasenkultur die Sensibilität der Zellen gegenüber einer nachfolgenden Stimulation mit TPA im Vergleich zur Submerskultur erhöhen.

Mayer et al. (1993) konnten in diesem Zusammenhang ermitteln, daß TNF- $\alpha$  bei Ratten-AM lediglich die TPA-stimulierte, nicht aber die A 23187- oder die Zymosan-stimulierte O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion erhöhen konnte. Diese Tatsache, und die in dieser Untersuchung gewonnene Erkenntnis, daß TPA zu einer deutlich höheren O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion als Zymosan führen kann, scheint die Vermutung zu bestätigen, daß es verschiedene zelluläre Mechanismen bezüglich der Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies gibt. So kann TPA z.B. neutrophile Granulozyten aktivieren. Es kommt nachfolgend zur Superoxidanionensekretion, wobei sowohl Ca<sup>2+</sup> als auch die Phospholipid-abhängige Proteinkinase (PKC) an dieser Stimulus-abhängigen Produktion beteiligt zu sein scheinen (Nishizuka, 1984). Jedoch ist die Rolle der PKC bei dem Mechanismus der NADPH-Oxidase-Aktivierung ungeklärt (Rotrosen und Leto, 1990; Nauseef et al., 1991; Sharma et al., 1991). Es gibt eine neuere Untersuchung von Watson et al. (1991), die bei menschlichen neutrophilen Granulozyten PKC-abhängige und PKC-unabhängige Mechanismen der NADPH-Oxidase-Aktivierung finden konnten. Bhaskaran und Mitarbeiter (1992) bestimmten die Superoxidanionensekretion bei menschlichen AM und kamen ebenfalls zu der Schlußfolgerung, daß je nach Stimulus verschiedene Signaltransduktionswege beschritten werden.

A 23187 ist eine artifizielle Verbindung, die als Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Verwendung findet. Sie führt durch Induktion eines Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in die Zelle zur Mobilisierung der Arachidonsäure (Steward und Phillips, 1989; Henerson, 1987). Es besitzt also einen Wirkungsmechanismus, der dem des LTB<sub>4</sub> vergleichbar ist.

A 23187 zeigt bei der Gasphasenkultur keinen signifikanten Effekt auf die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Submerskultur kommt es bei allen drei applizierten Konzentrationen zu einer geringen Hemmung gegenüber dem Kontrollansatz. Ein Ergebnis, das dem mit voraktivierten Zellen in Gasphase nach LTB<sub>4</sub>-Applikation entspricht. A 23187 zeigt durch seine fehlende oder hemmende Wirkungsweise keine Parallele zu dem Signaltransduktionsweg, dessen sich das TPA bedient und kann, zumindest was die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion anbelangt, nicht als Substanz für die Erforschung alternativer Stoffwechselwege Verwendung finden.

LPS stellt einen wichtigen Makrophagen-aktivierenden Stimulus dar - die Mechanismen, über die das Endotoxin seine Wirkung ausübt, sind jedoch noch unbekannt. Es mehren sich die Beweise, daß die Pathophysiologie z.T. auf oxidative Reaktionen zurückgeführt werden kann, die dann zum Gewebeschaden und Organversagen führen. So konnten Jackson et al. (1989) zeigen, daß die Makrophagen von Mäusen in vitro freie Radikale nach Endotoxinstimulation produzieren, und Arthur und Mitarbeiter (1988) konnten durch Applikation von Antioxidanzien wie SOD die Wirkung des Endotoxins auf Makrophagen herabsetzen.

In den hier durchgeführten Untersuchungen sollte herausgefunden werden, ob dieser Mechanismus der Endotoxinwirkung für RAM und damit möglicherweise für die Lunge ebenfalls zutrifft, und ob LPS die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion zu triggern vermag, wenn es vor und gleichzeitig mit Zymosan appliziert wird.

LPS führte bei RAM weder in Gasphase noch in Submerskultur zu einer signifikant veränderten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion, wenn es allein und in Konzentrationen appliziert wurde, die zur Erhöhung der TNF-Freisetzung durch diese Zellen ausreichte.

Eine Vorinkubation der Zellen mit LPS für 20 Stunden ergab eine  $O_2^-$ -Abgabe, die dem Zymosanansatz entsprach, und war damit keinen Hinweis auf ein mögliches Triggern. Die gleichzeitige Applikation von Zymosan und LPS erbrachte für die Submerskultur keine neue Erkenntnis. Beim entsprechenden Gasphasenansatz kam es zu einer signifikanten Reduktion gegenüber der Stimulation mit Zymosan. Da LPS bei allen anderen Versuchen aber keine Hemmwirkung ausüben vermochte, und diese Messung mit einem relativ hohen Standardfehler behaftet ist, scheint es naheliegend, diesen Effekt einem Artefakt zuzuordnen.

Werden Makrophagen *in vitro* mit LPS stimuliert, so produzieren sie eine bestimmte Anzahl an Cytokinen, u.a. TNF- $\alpha$ , das direkt zu der Fähigkeit der Makrophagen beiträgt, eindringende Bakterien zu töten, dann aber andererseits an der Entstehung des Septischen Schocks beteiligt ist (Old, 1988; Tracey et al., 1986).

Daß RAM nach Applikation von LPS zur Sekretion von TNF stimuliert werden, konnte bereits Schmidt (1992) in unserem Labor zeigen. Ganz neu ist jedoch die Erkenntnis, daß die Zellen auch dazu in der Lage sind, wenn sie in Gasphase lediglich mit ihren Pseudopodien Kontakt zu der LPS-Lösung hatten (Abb. 41). Dies bedeutet, daß schon der Kontakt einer kleinen Anzahl von Rezeptoren mit LPS die Zellen aktiviert. Ähnliche Schlußfolgerungen hatte bereits Geiger (1993) aus seinen Untersuchungen mit HL60-Zellen gezogen.

Im Laufe der TNF-Quantifizierung stellte sich heraus, daß sich RAM in einigen Versuchen mit LPS zu keiner TNF-Sekretion stimulieren ließen. Diese mangelhafte Stimulierbarkeit der Zellen ließ sich revertieren, wenn während der Inkubation mit dem Stimulus dem Medium fötales Kälberserum beigefügt wurde. Khemlani et al. (1992) fanden Hinweise darauf, daß die Reaktion der Vertebraten auf bakterielles Lipopolysaccharid zum Teil durch Serumfaktoren reguliert werden könnte, die die Bioverfügbarkeit und die Bindungsaffinität für LPS auf zellulärer Ebene beeinflussen. Sie konnten im Serum von adulten und fötalen Rindern einen Faktor finden, der an LPS bindet. Daß es sich bei diesem Faktor um das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) handeln könnte, ergab sich aus Untersuchungen von Corradin et al. (1992), Martin et al. (1992) und Gally et al. (1993). Die Autorengruppen fanden eine Hyporeagibilität der Zellen nach Fehlen von Serumfaktoren. Da in dieser Untersuchung die Stimulierbarkeit der Zellen durch Serum in allen Fällen erreicht werden konnte, ist es naheliegend, den Grund dafür in einem solchen Serumfaktor wie LBP zu suchen.

Dexamethason ist ein synthetisches Glucocorticosteroid. Es kann die TNF-Biosynthese beeinflussen: es verhindert als anti-inflammatorisches Agens die Biosynthese von TNF und Monokinen und erlangt damit Bedeutung auf dem klinischen Sektor. Aus der Literatur war bekannt, daß eine Vorbehandlung von Makrophagen mit Dexamethason dazu führen kann, daß die Zellen auf eine LPS-Stimulation kein TNF mehr produzieren können (Beutler, 1990). Ist das LPS bereits mit den Zellen assoziiert, so können die Glucocorticoide eine TNF-Biosynthese nicht mehr verhindern.

Die Versuche ergaben, daß RAM vermutlich Corticosteroidrezeptoren besitzen, denn die gemeinsame Applikation von Dexamethason und LPS führte bei beiden Kulturmethoden zu einer deutlichen Hemmung der TNF-Sekretion. Diese Ergebnisse stehen nur teilweise in Einklang mit den Untersuchungen von Floch und Mitarbeitern (1989), die *in vitro* bei Mausmakrophagen zeigen konnten, daß Dexamethason nur wirksam ist, wenn es 15 Minuten vor der Stimulation mit LPS appliziert wird. In dieser Arbeit führte die gleichzeitige

Applikation von Dexamethason und LPS noch zusätzlich zu einer Hemmung der TNF-Sekretion, wobei die Zellen in Submerskultur stärker gehemmt wurden als die in Gasphase. Eine Erklärung hierfür könnte u.a. in den unterschiedlichen Kulturbedingungen liegen, denn in Submerskultur wird dem Agens leichter ein Zutritt an die Zelle ermöglicht als dies bei der Gasphasenkultur der Fall ist.

Insgesamt kann man doch wohl aus den relativ geringen Effekten von PAF, LTB<sub>4</sub> und TNF schließen, daß die Aussagen zur Wirkung von NO<sub>2</sub> (und anderen Gasen), die mittels des Gasphasenkultursystems erhalten werden, nicht dadurch verfälscht sein können, daß nur Alveolarmakrophagen ohne Zusammenhang mit PAF-, LTB<sub>4</sub>- oder TNF-produzierenden Zellen im Gewebsverband benutzt wurden. Also ein weiteres Argument für die Validität unseres Systems.

#### 4.4. Wirkung von NO<sub>2</sub> auf die Vitalität, Enzymfreisetzung und Morphologie von Rinderalveolarmakrophagen

Die Exposition mit 3 ppm NO<sub>2</sub> für 2 Stunden führt bei RAM zu einem Vitalitätsverlust, der sich zwischen 10 und 20% bewegt. Nach einer Begasung der Zellen mit 1,5 ppm variiert der Prozentsatz an toten Zellen zwischen 0 und 10%. Trotz der subjektiven Auswertungsmethode und der Individuen-bedingten Schwankung der Vitalitätsraten ist zwischen beiden Konzentrationen deutlich eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu ersehen. Polzer et al. (in press) können für HL60 Makrophagen bei den gleichen NO<sub>2</sub>-Konzentrationen sehr ähnliche Vitalitätsverluste verzeichnen: ein ca. 10%iger Vitalitätsverlust tritt bei HL60-Zellen bereits nach 1 ppm NO<sub>2</sub> für 3 Stunden auf. Daß eine Exposition mit NO<sub>2</sub> dosisabhängig zu einem Anstieg der Letalitätsrate führen kann, wird durch Untersuchungen von Zamora et al. (1986), Davis et al. (1992) und Smeglin et al. (1986) bestätigt. Smeglin und Mitarbeiter fanden nach Exposition von Nichtraucherern mit 0,6 ppm NO<sub>2</sub> keine signifikante Vitalitätsveränderung der Alveolarmakrophagen. Davis und Mitarbeiter konnten bei Mäusen eine Dosis-Wirkungsbeziehung feststellen: im höheren Konzentrationsbereich von 5 und 10 ppm fand eine signifikante Reduktion der Vitalität statt, nicht aber nach 2 ppm NO<sub>2</sub>. Zamora und Coautoren konnten nach einer in vitro-Exposition von Epithelzellen eine Vitalitätsabnahme nach einer einstündigen Exposition mit 6 ppm NO<sub>2</sub> verzeichnen. Der durch ein oxidatives Schadgas bedingte schädliche Einfluß auf Alveolarmakrophagen kann sich u.a. auch durch eine erhöhte Zellzahl nach Lavage der Lunge bemerkbar machen, denn die Zellen lösen sich dann leichter von der Lungenoberfläche ab. Dies konnten Mochitate et al. (1986) nach einer 10tägigen Applikation von 4 ppm NO<sub>2</sub> bei Ratten messen.

Eine Bestätigung bzw. Ergänzung dieser optischen Quantifizierung von NO<sub>2</sub>-bedingten Vitalitätsänderungen ergaben sich durch die biochemische Messungen der Enzymfreisetzung in den Unterstand der Zellen in Gasphase. Eine Exposition von RAM mit 3 ppm NO<sub>2</sub> führt in allen Fällen zu einer signifikant höheren Freisetzung an LDH und NAG in das Medium unterhalb der Membran (Abbildung 7 bis 10). Die Freisetzung der cytoplasmatischen LDH und der lysosomalen NAG von RAM in den Extrazellularraum sind ein Parameter für Zellyse (Pätzold, 1989). Wie nachfolgend noch genauer besprochen, kann die allgemein festgestellte suppressive Wirkung, die NO<sub>2</sub> ausübt, für enzymatische Messungen nicht festgestellt werden.

Dies ist natürlich auf die Freisetzung von Enzymen nach dem Zelltod zurückzuführen, die durch NO<sub>2</sub> nicht verhindert werden kann.

Siegel und George (1990) konnten ebenfalls eine erhöhte LDH-Menge nach Exposition von Mäusen für 1 Stunde mit 50 und 91 ppm NO<sub>2</sub> feststellen. Vetrano et al. (1992) kamen zu dem gleichen Ergebnis, jedoch bereits bei der geringeren Dosis von 20 ppm.

Oxidative Schadgase wie NO<sub>2</sub> führen nicht nur zu Vitalitätsverlusten, sondern auch zu morphologischen Veränderungen. Zamora et al. (1986) fanden nach Exposition einer Lungenepithelzelllinie mit NO<sub>2</sub> morphologische Veränderungen, die nach Applikation von 6 ppm NO<sub>2</sub> besonders deutlich zur Ausprägung kamen: die Zellen waren mit großen cytoplasmatischen Vesikeln angefüllt, und die Zelloberfläche war von Trümmern bedeckt. Eine ähnlich Veränderung des Zelläußeren konnte in dieser Untersuchung nach Begasung von RAM bei 1,5 und 3 ppm NO<sub>2</sub> festgestellt werden. Es kam zur Bildung von "Blebs" an der Außenwand der Zellmembran, die in Abbildung 2 und 3 als fluoreszierende Vesikel an vielen Zellen erkennbar sind.

#### 4.5. Bildung von Superoxidanionen und Tumor Nekrose Faktor bei Rinderalveolar-makrophagen unter dem Einfluß von NO<sub>2</sub>

Aus der Literatur ist bereits seit längerem bekannt, daß Stickstoffdioxid zu einer verminderten Infektabwehr aufgrund seiner suppressiven Wirkung auf verschiedene immunologische Parameter führt (Acton und Myrvik, 1972; Frampton et al., 1989).

Diese durch NO<sub>2</sub>-induzierte Hemmung läßt sich bei den Versuchen zur Superoxidanionenmessung bei RAM ebenfalls feststellen: nicht bzw. gering voraktivierte Zellen zeigen nach 3 ppm NO<sub>2</sub> eine Hemmung der Zymosan-stimulierten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion, die für die geringere Dosis von 1,5 ppm jedoch nicht gezeigt werden kann. Die Kontrollansätze beider NO<sub>2</sub>-Konzentrationen weisen keine statistisch absicherbare Hemmung auf.

Anders zeigt sich der immunmodulierende Einfluß von NO<sub>2</sub> bei voraktivierten Zellen: sowohl die unstimulierte Kontrolle als auch die Zymosan-stimulierten Ansätze unterliegen einer signifikanten Hemmung bei beiden NO<sub>2</sub>-Konzentrationen. Hinweise auf dieses Phänomen liefern Untersuchungen von Suzuki et al. (1986) und Voter et al. (1991). Beide Autorengruppen arbeiteten mit Alveolarmakrophagen, die in vivo mit NO<sub>2</sub> exponiert worden waren: Voter et al. konnten nach einer 6stündigen NO<sub>2</sub>-Exposition mit 2 ppm eine Absenkung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion bei den unstimulierten Zellen nachweisen und Suzuki et al. maßen bei 8 ppm eine Hemmung der voraktivierten Kontrolle. Eine dosisabhängige Hemmung nach den NO<sub>2</sub>-Konzentrationen von 1, 5 und 20 ppm konnten Robison et al. (1990) bei stimulierten Alveolarmakrophagen dokumentieren. Im gewissen Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Frampton et al. (1992), die Raucher bei 2 ppm NO<sub>2</sub> exponierten und bei den anschließend isolierten Alveolarmakrophagen keinen Einfluß von NO<sub>2</sub> auf die Superoxidanionenproduktion feststellen konnten.

Was die Untersuchungen zur gesundheitsschädlichen Wirkung des NO<sub>2</sub> auf die Lunge anbetrifft, so stehen folgende Untersuchungsgebiete im Vordergrund:

Veränderungen der Infektanfälligkeit, enzymatische Quantifizierungen, Beeinflussung der Membranlipidzusammensetzung bzw. von deren Derivaten, Radikalmessungen, Erfassung der Verhältnisse von Zellpopulationen zueinander und Lungenfunktionsmessungen bzw. Atemwegsreaktivitäten. Dabei gibt es sowohl zahlreiche in vivo-Untersuchungen am lebenden Tier, vornehmlich an Ratten und Mäusen, als auch an menschlichen Probanden. Biochemische Untersuchungen wurden vorwiegend mit Zellen gemacht, die zuvor im lebenden Organismus mit dem Schadgas exponiert worden und danach isoliert worden waren.

Ganz allgemein läßt sich feststellen, daß  $\text{NO}_2$  in allen untersuchten Fällen zu einer signifikanten Hemmung der TNF-Sekretion führte. Die Hemmwirkung des  $\text{NO}_2$  auf die TNF-Sekretion scheint über einen allgemeinen Mechanismus abzulaufen, denn eine voraktivierte Kontrolle wird genauso wie ein LPS-stimulierter Ansatz gehemmt.

$\text{NO}_2$  führt auch hier wie bei der Messung von Superoxidanionen zu keiner Stimulation irgendeines Ansatzes, und im Gegensatz zur Radikalsekretion kann aus den beiden applizierten Konzentrationen kein Dosiseffekt bzw. ein möglicherweise vorhandener Synergismus von  $\text{NO}_2$  und LPS auf die TNF-Sekretion ersehen werden. Um dies aber eindeutig behaupten zu können, wären diesbezüglich noch weitere Untersuchungen vonnöten, die eine größere Konzentrationsbreite an  $\text{NO}_2$  vorsähen und eine größere Zahl an untersuchten Individuen mit ihrer jeweiligen Vorgeschichte einbezögen. Bestätigung finden die hier gemachten Feststellungen bei Versuchen mit HL60 Makrophagen: eine Applikation identischer  $\text{NO}_2$ -Konzentrationen führte zu ganz ähnlichen Ergebnissen (Polzer in press).

Die Kombinationswirkung von Staub und  $\text{NO}_2$  führt zu keiner neuen Erkenntnis, insofern, als daß die mit der Staubphagozytose verknüpfte TNF-Sekretion durch  $\text{NO}_2$  supprimiert wird- und zwar sowohl bei dem sogenannten Inertstaub Latex als auch nach Phagozytose von Quarz. Hinweise auf die supprimierende Wirkung von  $\text{NO}_2$  in Kombination mit einer Staubphagozytose liefern die folgenden Publikationen:

Vetrano et al. (1992) fanden, daß die Exposition mit  $\text{NO}_2$  nach intratrachealer Instillation von Siliciumdioxid bei Mäusen zur signifikanten Abnahme an Enzymen und Eiweißen führt. Eine suppressive Wirkung nach Phagozytose und  $\text{NO}_2$ -Applikation konnten auch Kouzan et al. (1989) verzeichnen.  $\text{NO}_2$  wirkte cytotoxisch: es kam zur Abnahme der  $\text{LTB}_4$ -Produktion nach einer durch Eisen induzierten Phagozytose. Stickstoffdioxid hatte auch hier keinen stimulierenden Einfluß auf den Arachidonsäuremetabolismus nach Induktion der Phagozytose. Die Daten beinhalten, daß eine Exposition mit dem Schadgas nicht zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt.

Lefkowitz et al. (1986) und Katz und Laskin (1975) untersuchten die Phagozytoserate von Latex bei  $\text{NO}_2$ -begasteten AM. Bei beiden Autorengruppen führte eine Dosis zwischen 5 und 10 ppm zu keiner veränderten Phagozytose, Katz und Laskin (1975) konnten jedoch bei 25 ppm eine signifikante Hemmung verzeichnen. Auch hier führte Stickstoffdioxid wieder zu einer Supprimierung der Phagozytose von Latex, allerdings stellen 25 ppm  $\text{NO}_2$  eine relativ hohe Konzentrationen dar. Die erst bei höheren Konzentrationen auftretende suppressive Wirkung des Schadgases mag unter anderem darin begründet liegen, daß diese Art der Messung für einen niedrigen Konzentrationsbereich nicht empfindlich genug ist.

Vetrano und Mitarbeiter (1992) fanden, daß eine vorgeschaltete  $\text{SiO}_2$ -Applikation zur Verstärkung der  $\text{NO}_2$ -gehemmten Enzymsekretion führt. Dies könnte Veränderungen in der Konzentration Si-induzierter Antioxidanzien widerspiegeln. Freie Radikale, die durch Si-Partikel gebildet werden, könnten durch Antioxidanzien (z.B. SOD, Glutathion) abgefangen

werden, was andererseits ihre Verfügbarkeit gegenüber oxidativen Gasen herabsetzt (Henderson et al., 1991).

Die Suppression der Sekretion von Superoxidanionen und TNF nach einer NO<sub>2</sub>-Exposition könnte folgendermaßen bedingt sein:

NO<sub>2</sub> führt aufgrund seines oxidativen Potentials zu Veränderungen der Lipidkomponenten der Zellmembran (Rietjens et al., 1987, Alink et al., 1988, Mohsenin, Sagai und Ichinose, 1991, De und Ghosh, 1991). Durch die Schadgas-induzierte Radikalbildung könnten sekretorische Mechanismen, bei denen die Zellwand beteiligt ist, gestört sein. Als Folge davon kommt es zu einer verringerten Abgabe an Mediatoren in das extrazelluläre Medium.

#### 4.6. Einfluß von Dipalmitoyllecithin auf die Wirkung von NO<sub>2</sub> bei Rinderalveolar-makrophagen

DPL wurde bei den Versuchen zur Wirkung von NO<sub>2</sub> sowohl bei der Messung der Enzymfreisetzung in den Zellunterstand, der Superoxidanionenbildung als auch bei der Quantifizierung der TNF-Sekretion eingesetzt.

Bei den Untersuchungen zur Wirkung von DPL kann bei den NO<sub>2</sub>-behandelten Zellen bezüglich der LDH-Freisetzung kein Unterschied zu den ohne DPL exponierten Zellen festgestellt werden. Bezüglich der Freisetzung der lysosomalen NAG kommt es zur signifikant höheren Freisetzung in das Medium unterhalb der Zellen (wie eingangs bereits erwähnt führte Stickstoffdioxid nicht zur Hemmung der Enzymfreisetzung). Eine Parallele dazu ergab sich auch nach einer Kombinationsexposition von Quarz und NO<sub>2</sub>: es kann lediglich bei der NAG-Quantifizierung eine vermehrte Freisetzung im Vergleich zu der dazugehörigen Kontrolle beobachtet werden. Eine höhere NAG-Aktivität zu einem früheren Zeitpunkt als eine LDH-Erhöhung konnte auch Polzer (1992) bei cytotoxischen Prozessen feststellen.

Sowohl bei voraktivierten als auch bei nicht voraktivierten Zellen des Luftansatzes zeigt die nicht stimulierte Kontrolle eine von DPL unbeeinflusste Sekretion an Superoxidanionen. Demgegenüber zeigen nicht voraktivierte "gecoatete" Zellen, die mit Zymosan stimuliert worden waren, nur in einem Fall eine signifikante Erhöhung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion gegenüber nicht mit DPL behandelten Zellen. In allen anderen Fällen bleibt das Meßergebnis unabhängig vom Aktivierungszustand der Zellen dasselbe (Abbildungen 24-35). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß dem Surfactant unter physiologischen Bedingungen kein immunmodulierender Effekt zukommt.

Anders stellt sich die Situation für voraktivierte, mit NO<sub>2</sub> begaste Zellen dar (dies entspräche in vivo der Situation, in der bereits eine Belastung der Lunge vorliegt und zusätzlich eine NO<sub>2</sub>-Exposition hinzukäme). Werden diese Zellen mit Zymosan stimuliert, so übt DPL eine protektive Wirkung aus. Es kommt bei 1,5 und 3 ppm NO<sub>2</sub> zu einer verstärkten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion, die der DPL-Applikation zuzuordnen ist (Abb. 37 und 38). Bei 1,5 ppm wird der suppressive Effekt von NO<sub>2</sub> durch DPL gegenüber den Ansätzen ohne DPL vollständig kompensiert, die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Sekretion entspricht der des dazugehörigen Ansatzes nach der Luftinkubation. Nach einer Exposition mit 3 ppm NO<sub>2</sub> zeigen voraktiviert RAM eine Radikalsekretion, die sogar signifikant höher als die des Luftansatzes liegt. NO<sub>2</sub> scheint in Kombination mit DPL bei beiden NO<sub>2</sub>-Konzentrationen eine stimulatorische Wirkung zu

besitzen. Diese erhöhte Sekretion im Vergleich zum Luftansatz kann bei 1,5 ppm ebenfalls bereits festgestellt werden, sie ist jedoch statistisch nicht abzusichern. Die Literatur enthält Hinweise darauf, daß  $\text{NO}_2$  im niedrigen Dosisbereich zu einer Erhöhung der Radikalsekretion führt: Bart et al. (1988) konnten nach einer Kurzzeitexposition von AM von Rauchern mit 0,2 ppm eine Stimulation der  $\text{O}_2^-$ -Sekretion messen. Da bei AM von Rauchern davon ausgegangen werden kann, daß es sich um bereits voraktivierte Zellen handelt (Mosbach 1993, unveröffentlicht), steht dies in Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten, daß DPL nur bei vorstimulierten,  $\text{NO}_2$ -behandelten Zellen eine Wirkung besitzt. Dies könnte u.a. dadurch erklärt werden, daß immunologisch "vorgeschädigte" Zellen in Gegenwart von intaktem Surfactant eine Überreaktion bezüglich der  $\text{O}_2^-$ -Produktion zeigen, wenn kompensatorische Mechanismen nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen, z.B. bei einer Unterversorgung mit dem das  $\text{O}_2^-$  detoxifizierende Enzym Superoxiddismutase.

In dieser Untersuchung hat DPL bei Luft-begasteten RAM keinen Einfluß, und bei einer Exposition mit  $\text{NO}_2$  zeigt es eine Schutzwirkung gegenüber den Ansätzen ohne DPL, die sogar zu einer Erhöhung der  $\text{O}_2^-$ -Sekretion führt. Es wäre denkbar, daß das Coaten der Zellen mit DPL zu einer Verminderung der Schadgasmenge führt, die an die Zellen herantritt.

In diese Hypothese würde sich die Untersuchung von Frampton et al. (1992) einfügen, bei der kein suppressiver Effekt von  $\text{NO}_2$  bei Rauchern festgestellt werden kann.

Bei der TNF-Quantifizierung nach vorheriger DPL- und  $\text{NO}_2$ -Applikation war im Gegensatz zu den Messungen von Superoxidanionen keine Modifikation der Daten durch DPL zu verzeichnen. Es gibt damit auch keine protektive Wirkung von DPL im niedrigen  $\text{NO}_2$ -Konzentrationsbereich. Über eine mögliche Verstärkungswirkung des  $\text{NO}_2$ -Effektes durch DPL kann lediglich spekuliert werden, da in allen Fällen die Hemmung auch ohne DPL-Applikation bereits zu 100% erfolgte.

Die in den hier untersuchten Fällen beschriebene protektive Wirkung des DPL bezüglich der  $\text{O}_2^-$ -Freisetzung bei Kurzzeitbegasungen mit  $\text{NO}_2$  im niedrigen Konzentrationsbereich wurde auch bei Ozon bezüglich der TNF-Freisetzung beobachtet (Mosbach 1993, unveröffentlicht). Sie stellte fest, daß DPL nach einer zweistündigen Begasung von RAM mit 0,5 bzw. 1 ppm  $\text{O}_3$  eine Schutzwirkung entfaltete. Es wäre aber auch durchaus denkbar, daß nach längerer Applikation oxidativer Gase oder nach Steigerung der Schadgaskonzentration die gegenteilige Wirkung eintritt. Langzeitexpositionen mit Stickstoffdioxid können nach Untersuchungen von Tepper et al. (1993) zu Veränderungen bei Lungenfunktionsmessungen führen. Ähnliche Effekte könnten nach wiederholten Expositionen eintreten: eine mögliche Lipidperoxidation käme unter Umständen erst nach längerer Inkubationsdauer auf zellulärer Ebene zur Ausprägung. Hinweise auf ein anderes Verhalten von Zellen nach wiederholter  $\text{NO}_2$ -Exposition ergeben sich aus den Untersuchungen von Sandström et al. (1992). Eine mögliche Modifikation der gezeigten Daten müßte in weiteren Versuchen überprüft werden.

Um herauszufinden, ob DPL bei TNF-Messungen auch eine Schutzwirkung aufweist, wäre es notwendig, die Schwellenkonzentration für  $\text{NO}_2$  herauszufinden, bei der keine 100%ige Hemmung mehr auftritt.

Für die DPL-Applikation beim Luftansatz zeigen sich die Daten der TNF-Messung eher widersprüchlich. In einem Fall reduziert DPL eine bereits bestehende Voraktivierung, in dem

zweiten wirkt es als stimulierendes Agens, das wirksamer als LPS ist. Nach gemeinsamer Applikation von DPL und LPS kristallisiert sich eine additive bzw. synergistische Wirkung beider Agenzien heraus. Eine stimulierende Wirkung von DPL bei voraktivierten Zellen konnte in unserem Labor wiederholt festgestellt werden (Mosbach 1993, unveröffentlicht).

Robison et al. (1990) konnten bei Alveolarmakrophagen der Ratte nach einer Begasung mit 5 ppm NO<sub>2</sub> für 1 Stunde eine erhöhte Sekretionsrate an LTB<sub>4</sub> verzeichnen. Dies führten die Autoren auf Lipidperoxidationsprozesse, bedingt durch das Stickstoffdioxid, zurück. Die aus diesen Oxidationsprozessen resultierende Bildung von Hydroperoxiden induzierte ihrerseits eine erhöhte LTB<sub>4</sub>-Bildung. Bei 20 ppm NO<sub>2</sub> führte die höhere Konzentration an Hydroperoxiden zu einer Verringerung der LTB<sub>4</sub>-Produktion.

Es scheint so, als gälte für die hier durchgeführten Messungen folgendes Prinzip: steht der gemessene Parameter oder eine zellspezifische Komponente in struktureller Beziehung zu den Membranlipiden, wie z.B. LTB<sub>4</sub>, so gibt es zwei Konzentrationsbereiche, innerhalb derer NO<sub>2</sub> eine gegenteilige Wirkung entfaltet: die niedrige Dosis an NO<sub>2</sub> führt zu einer stimulierten Sekretion, die höhere resultiert in einer Suppression. Besteht andererseits zwischen Meßparameter und Zellmembran keine direkte strukturelle Relation, so scheint NO<sub>2</sub> lediglich eine hemmende Wirkung zu entfalten.

#### 4.7. Zusammenfassende Diskussion

Zusammenfassend können wir feststellen, daß die Reaktion von Alveolarmakrophagen auf physiologische und pathologische Stimuli in der Gasphasenkultur jener in der Submerskultur zumindest qualitativ recht ähnlich ist. Damit ist gezeigt, daß sich die Gasphasenkultur prinzipiell eignet. Die alleinige Verwendung von Alveolarmakrophagen ohne Kokultur könnte mit anderen Zelltypen des Atemtraktes die Reaktivität der Makrophagen so verändern, daß artifizielle Effekte auftreten. Aus unseren Ergebnissen wird jedoch deutlich, daß so potente Mediatoren wie PAF und TNF keine so erhebliche Änderung der Reaktionslage von Alveolarmakrophagen bedingen, daß durch Nichtberücksichtigen ihrer Anwesenheit eine Verfälschung der Aussagen zur Wirkung von Noxen wie NO<sub>2</sub> zu erwarten wäre. Unsere Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, daß es für eine Gesamtbeurteilung der Wirkung von inhalativen Noxen auf Alveolarmakrophagen notwendig ist, in Anwesenheit von Surfactant oder seinen Bestandteilen zu arbeiten.

Aus unseren Befunden schließen wir, daß NO<sub>2</sub> in Konzentrationen, die höher sind als in der allgemeinen Umwelt, aber niedriger als der MAK-Wert, eine supprimierende Wirkung auf die Stimulus-induzierte Bildung von Superoxidanion und TNF haben kann. Im deutlichen Gegensatz zum Ozon hat NO<sub>2</sub> für sich allein bei diesen Konzentrationen keine stimulierende Wirkung für Alveolarmakrophagen.

Für bestimmte Fragestellungen eignen sich auch differenzierte HL60-Zellen in der Gasphasenkultur als Modellzellen. Diese bieten den Vorteil, daß für einen Teil der Mediatoren spezifische ELISA-Verfahren anstelle von biologischen Tests benutzt werden können.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Kultur von Zellen direkt in der Gasphase etabliert. Benutzt wurden post-mortal gewonnene Rinderalveolarmakrophagen wie auch differenzierte HL-60 Zellen als Modell für menschliche Zellen.

Mittels dieses Systems wurde die Wirkung der Inhalationsnoxe  $\text{NO}_2$  auf Rinderalveolarmakrophagen untersucht.

$\text{NO}_2$  führte dosisabhängig zu einem Vitalitätsverlust der Rinderalveolarmakrophagen, der nach Applikation von 1,5 ppm  $\text{NO}_2$  maximal 10% betrug und nach 3 ppm sich zwischen 10 und 20% bewegte. Damit verbunden war eine Sekretion lysosomaler und cytoplasmatischer Enzyme. Bei beiden Konzentrationen kam es zu morphologischen Veränderungen an der Zellmembran (Bildung sogenannter "Blebs").

Das Gas führte per se zu keiner Stimulation der Sekretion an Superoxidanionen oder TNF, zeigte jedoch bezüglich der Sekretion von Superoxidanionen eine dosisabhängige Hemmung sowohl bei Zymosan-stimulierten als auch bei spontan voraktivierten Zellen. In fast allen Fällen führte  $\text{NO}_2$  zu einer vollständigen Hemmung der LPS-stimulierten TNF-Sekretion, die also sehr empfindlich auf das Gas reagierte.

Die Kombinationsapplikation von Staub (Quarz und Latex) und Schadgas hatte ebenfalls suppressive Wirkung.

Die gleichzeitige Anwesenheit des Hauptbestandteils des Surfactants, Dipalmitoyllecithin, konnte bei der Messung der Superoxidanionenbildung bei beiden  $\text{NO}_2$ -Konzentrationen die hemmende Wirkung von  $\text{NO}_2$  kompensieren. Die vollständige Hemmung der TNF-Bildung blieb trotz eines solchen Zusatz bestehen.

In der Arbeit wurde geprüft, inwiefern bestimmte Mediatoren, die im Alveolarraum als Reaktion auf eine Noxe auftreten, RAM beeinflussen könnten.

Bei nicht voraktivierten Zellen führte die Anwesenheit von micro- und picomolaren Konzentrationen von PAF zu keiner Stimulation der Superoxidanionenfreisetzung, auch nicht in Kombination mit TNF oder Zymosan. TNF und  $\text{LTB}_4$  für sich allein waren ebenfalls ohne Einfluß. Spontan voraktivierte Zellen können durch diese Mediatoren stimuliert werden.

Was die TNF-Sekretion durch RAM betrifft, so waren PAF,  $\text{LTB}_4$  und  $\text{IFN-}\gamma$ , jeweils alleine appliziert, ohne Effekte. Die gleichzeitige Verabreichung von PAF bzw.  $\text{LTB}_4$  zusammen mit LPS bewirkte keine über den bloßen LPS-Effekt hinausgehende TNF-Freisetzung. Wichtige Mediatoren des Entzündungsgeschehens haben also für sich allein oder in Kombination keinen Einfluß auf die Superoxidanionen- bzw. TNF-Freisetzung durch Alveolarmakrophagen.

Dexamethason hatte eine Hemmung der LPS-stimulierten TNF-Bildung zur Folge.

Es wurde festgestellt, daß auch zu Makrophagen oder zu Granulocysten differenzierte HL60-Zellen sich für die Gasphasenkultur eignen. Sie setzen nach Stimulation TNF, IL 6 und IL 8 in den Kulturunterstand frei, wie mittels ELISA nachgewiesen werden konnte. Damit steht auch ein Modell mit menschlichen Zellen für bestimmte Fragestellungen zur Verfügung.

Es wurde somit gezeigt, daß unsere Gasphasenkultur ein valides System zur Untersuchung der Wirkungen von Schadgasen darstellt. Für NO<sub>2</sub> wurden mit dieser Methode deutlich immunsuppressive Wirkungen für Konzentrationen nachgewiesen, die zwar erheblich über den umweltüblichen, aber unterhalb des MAK-Wertes liegen.

---

## 6. Literaturverzeichnis

- Acton, J.D., Myrvik, Q.N. (1972)  
Nitrogen dioxide effects in alveolar macrophages.  
Arch. Env. Hlth., 24, 48-52
- Adamson, I.Y.R., Bowden, D.H. (1984)  
Role of polymorphonuclear leukocytes in silica-induced pulmonary fibrosis.  
Am. J. Pathol., 117, 37-43
- Alink, G.M., Rietjens, I.M.C.M. (1988)  
Mechanisms of O<sub>3</sub> and NO<sub>2</sub>-toxicity in lung cells in vitro.  
Zbl. Bakt. Hyg. B 185, 469-497
- Andersen, O.K., Stenvold, S.E., Volden, G. (1982)  
Optimized assay conditions of 3T3 cell lysosomal hydrolases.  
Europ. Rev. Med. Pharmacol. Sci., IV, 265-272
- Arthur, M.J.P., Kowalsky-Saunders, P., Wright, R. (1988)  
Effect of endotoxin on release of reactive oxygen intermediates by rat hepatic macrophages.  
Gastroenterology, 95, 1588-1594
- Bachwich, P.R., Chensue, S.W., Larrick, J.W., Kunkel, S.L. (1986)  
Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E<sub>2</sub> production in resting macrophages.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 136, 94-101
- Bart, F., Aerts, C., Deroubaix, C., Wallaert, B., Voisin, C. (1988)  
In vitro short exposure of human alveolar macrophages to 0,2 ppm nitrogen dioxide. Evidence for an increased generation of superoxide anion and neutrophil chemotactic activity.  
Am. Rev. Respir. Dis., 138, 168
- Beutler, B. (1990)  
TNF in pathophysiology - biosynthetic regulation.  
Journal of Investigative Dermatology, 95, 81-84
- Bhaskaran, G., Nii, A., Sone, S., Ogura, T. (1992)  
Differential effects of interleukin-4 on superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with LPS and interferon- $\gamma$ .  
Journal of Leukocyte Biology, 52, 218-223
- Bigby, T.A., Holtzman, M.J. (1987)  
Enhanced 5-lipoxygenase activity in lung macrophages compared to monocytes from normal subjects.  
J. Immunol., 138, 1546-1550
- Bils, R.F., Christie, B. (1980)  
The experimental pathology of oxidant and air pollutant inhalation.  
Inter. Rev. Exp. Pathol., 21, 195-293

- Boutten,A., Dehoux,M., Deschenes,M., Rouzeau,J-D., Bories,P.N., Durand,G. (1992)  
Alpha-1-acid glycoprotein potentiates lipopolysaccharide-induced secretion of interleukin-1  $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and alveolar and peritoneal macrophages.  
*European Journal Immunology*, 22, 2687-2695
- Brody,A.R., Roe,M.W., Evans,J.N., Davis,G.S. (1982)  
Deposition and translocation of inhaled silica in rats.  
*Laboratory Investigation*, 47, 533-542
- Carre,P.C., Mortenson,R.L., King,T.E., Noble,P.W., Sable,C.L., Riches,D.W.H. (1991)  
Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis.  
*Journal of Clinical Investigation*, 88, 1802-1810
- Carswell,E.A., Old,L.J., Kassel,R.L., Green,S., Fiore,N., Williamson,B. (1975)  
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.  
*P.N.A.S.*, 72, 3666-3670
- Chance,B., Sies,H., Boveris,A. (1979)  
Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.  
*Physiol. Rev.*, 59, 527-605
- Chu,E., Casey,L.C., Harris,J.E., Braun,D.P. (1993)  
Suppression of the development of tumoricidal function in gamma interferon-treated human peripheral blood monocytes by lipopolysaccharide: the role of cyclooxygenase metabolites.  
*J. of Clinical Immunol.*, 13, 49-57
- Collins,S.J., Gallo,R.C., Gallagher,R.E., (1977)  
Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.  
*Nature*, 270, 347-349
- Collins,S.J., Ruscetti,F.W., Gallagher,R.E., Gallo,R.C. (1978)  
Terminal differentiation of human promyelotic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds.  
*P.N.A.S.*, 75, 2458-2462
- Corradin,S.B., Mauel,J., Gallay,P., Heumann,D., Ulevitch,R.J., Tobias,P.S. (1992)  
Enhancement of murine macrophage binding of and response to bacterial lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein.  
*Journal of Leukocyte Biology*, 52, 363-368
- Crapo,J.D., Barry,B.E., Chang,L., Mercer,R.R. (1984)  
Alterations in lung structure caused by inhalation of oxidants.  
*Journal of Environmental Health*, 13, 301-321
- Dankberg,F., Persidsky,M.D. (1976)  
A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function.  
*Cyrobiology*, 13, 430-432

- Das,U.N., Padma,M., Sagar,P.S., Ramesh,G., Koratkar,R. (1990)  
Stimulation of free radical generation in human leukocytes by various agents including tumor necrosis factor is a calmodulin dependent process.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 167, 1030-1036
- Davis,J.K., Davidson,M.K., Schoeb,T.R., Lindsey,J.R. (1992)  
Decreased intrapulmonary killing of mycoplasma pulmonis after short-term exposure to NO<sub>2</sub> is associated with damaged alveolar macrophages.  
Am. Rev. Respir. Dis., 145, 406-411
- De,A.K., Ghosh,J.J. (1991)  
Effects of short-term capsaicin treatment on formalin and nitrogen dioxide induced changes in lipid peroxidation and antioxidant enzyme system in rat lung.  
Phytotherapy Research, 5, 88-90
- Dinareello,C.A., Bishai,I., Rosenwasser,L.J., Coceani,F. (1984)  
The influence of lipoxygenase inhibitors of the in vitro production of human leukocyte pyrogen and lymphocyte activating factor (interleukin-1).  
Int. J. Immunopharmacol., 6, 43-50
- Dubois,C., Bissonnette,E., Rola-Pleszczynski,R. (1989)  
Platelet-activating factor (PAF) enhances tumor necrosis factor production by alveolar macrophages.  
J. Immunol., 143, 964-970
- Espevik,T., Nissen-Meyer,J. (1986)  
A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13 for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes.  
Journal of Immunological Methods, 95, 99-105
- Evans,M.J., Johnson,L.V., Stephens,R.J., Freeman,G. (1976)  
Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in the rat.  
Lab. Invest., 35, 246-257
- Floch,A., Bousseau,A., Hetier,E., Floch,F., Bost,P.E., Cavero,I. (1989)  
RP-55778, a PAF receptor antagonist, prevents and reverses LPS-induced hemoconcentration and TNF release.  
Journal of Lipid Mediators, 1, 349-360
- Frampton,M.W., Morrow,P.E., Cox,C., Gibb,F.R., Speers,D.M., Urtell,M.J. (1991)  
Effects of nitrogen dioxide exposure on pulmonary function and airway reactivity in normal humans.  
Am. Rev. Res. Dis., 143, 522-527
- Frampton,M.W., Smeglin,A.M., Roberts,N.J., Finkelstein,J.N., Morrow,P.E., Utell,M.J. (1989)  
Nitrogen dioxide exposure in vivo and human alveolar macrophage inactivation of influenza virus in vitro.  
Environ. Res., 48, 179-192

- 
- Frampton,M.W., Voter,K.Z., Morrow,P.E., Roberts Jr.,N.J., Gavras,J.B., Utell,M.J. (1992)  
Effects of NO<sub>2</sub> exposure on human host defense.  
Am. Rev. Respir. Dis., International Conference of the American Lung Association and the  
American Thoracic Society, 145, A455
- Freeman,B.A., Crapo,J.D. (1982)  
Free radicals and tissue injury.  
Lab. Invest., 47, 412-419
- Freeman,B.A., Young,S.L., Crapo,J.D. (1983)  
Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen  
injury.  
Journal of Biological Chemistry, 258, 12534-12542
- Fridovich,I. (1983)  
Superoxide radical: an endogenous toxicant.  
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23, 239-257
- Gallay,P., Carrel,S., Glauser,M.P., Barras,C., Ulevitch,R.J., Tobias,P.S., Baumgartner,J.-D.,  
Heumann,D. (1993)  
Purification and characterization of murine lipopolysaccharide-binding protein.  
Infection and Immunity, 61, 378-383
- Gardner,D.E., Holzman,R.S., Coff,D.L. (1969)  
Effects of nitrogen dioxide on pulmonary population.  
Journal of Bacteriology, 98, 1041-1043
- Geiger,M. (1993)  
Expression und Freisetzung des Tumor Nekrose Faktors- $\alpha$  bei HL-60 Zellen und  
Alveolarmakrophagen.  
Diplomarbeit, Universität Karlsruhe
- Glasgow,J.E., Piertra,G.G., Abrams,W.R., Bank,J., Oppenheim,D.M., Weinbaum,G. (1987)  
Neutrophil recruitment and degranulation during induction of emphysema in the rat by nitrogen  
dioxide.  
Am. Rev. Respir. Dis., 135, 1129-1136
- Goldstein,E., Eagle,M.C., Hoerich,P.D. (1973)  
Effect of nitrogen dioxide on pulmonary bacterial defense mechanisms.  
Arch. Environ. Health, 26, 202-204
- Gosset,P., Tscopoulos,A., Wallaert,B., Vannimenes,C., Joseph,M., Tonnel,A.B., Capron,A.  
(1991)  
Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by alveolar macrophages  
consecutive to the development of the late asthmatic reaction.  
J.Allergy Clin. Immunol., 88, 561-571
- Goodglick,L.A., Kane,A.B. (1986)  
Role of reactive oxygen metabolites in crocidolite asbestos toxicity to mouse macrophages.  
Cancer Research, 46, 5558-5566

- 
- Goya,T., Abe,M., Shimura,H., Torisu,M. (1992)  
Characteristics of alveolar macrophages in experimental septic lung.  
*Journal of Leucocyte Biology*, 52, 236-243
- Harwood,J.L. (1987)  
Lung surfactant.  
*Prog. Lipid Res.*, 26, 211-256
- Heidel,J.R., Taylor,S.M., Silflow,R.M., Laegreid,W.W., Leid,R.W. (1991)  
Characterization of arachidonic acid metabolism, superoxide production and bacterial killing by bovine alveolar neutrophils elicited with leukotriene B<sub>4</sub> and zymosan-activated plasma.  
*Inflammation*, 15, 31-42
- Henderson,R.F., Harkema,J.R., Hotchkiss,J.A., Boehme,D.S. (1991)  
Effect of blood leukocyte depletion on the inflammatory response of the lung to quartz.  
*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 109, 127-136
- Henerson,W.R. (1987)  
Eicosanoids and lung inflammation.  
*Am. Rev. Respir. Dis.*, 135, 1176-1185
- Hennet,T., Richter,C., Peterhans,E. (1993)  
Tumor necrosis factor alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L 929 cells.  
*Biochem. J.*, 298, 587-592
- Houdijk,A.L.F., Smolders,A.J.P., Roelofs,J.G.M. (1993)  
The effects of atmospheric nitrogen deposition on the soil chemistry of coniferous forests in the Netherlands.  
*Environmental Pollution*, 80, 73-78
- Humbert,J.R., Winsor,E.L. (1990)  
Tumor necrosis factor primes neutrophils by shortening the lag period of the respiratory burst.  
*Am. J. Med. Sci.*, 300, 209-213
- Hwang,S-B., Lee,C-S.C., Cheah,M.J., Shen,T.Y. (1983)  
Specific receptor sites for 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF) on rabbit platelets and guinea smooth muscle membranes.  
*Biochem.*, 22, 4756-4763
- Jackson,S.K., Stark,J.M., Rowlands,C.C., Evans,J.C. (1989)  
Electron spin resonance detection of oxygen-centred radicals in murine macrophages stimulated with bacterial endotoxin.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 7, 165-170
- Johnston,R.B. Jr. (1981)  
Secretion of superoxide anion.  
In: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, (Ed.: Adams,P.O., Edelson,P.J., Karen,H.), Academic Press, N.Y., 1981, 489-497

- Kato,M., Tokuyama,K., Morikawa,A., Kuroume,T., Barnes,P.J. (1993)  
Platelet-activating factor-induced enhancement of superoxide anion generation in guinea-pigs.  
Eur. J. Pharmacol., 323, 7-12
- Katz,G.V., Laskin,S. (1975)  
Pulmonary macrophages respond to irritant gases.  
Air pollution and the Lung, Proceedings of the Twentieth Annual "OHOLO" Biological  
Conference Ma'alot, Israel, March 16-19  
(Ed.: Aharonson,E.F., Ben-David,A., Klingberg,M.A.), Israel Universities Press, Jerusalem
- Khemlani,L.S., Bochsler,P.N., Maddux,J.M. (1992)  
Lipopolysaccharide-binding factors are present in bovine serum.  
BioFactors, 4, 33-36
- Kim,S.U., Koenig,J.Q., Pierson,W.E., Hanley,Q.S., (1991)  
Acute pulmonary effects of nitrogen dioxide exposure during exercise in competitive athletes.  
Chest, 99, 815-819
- Kleinerman,J., Ip,M.C.P., Sorensen,J. (1982)  
Nitrogen dioxide exposure and alveolar macrophage elastase in hamsters.  
Am. Rev. Respir. Dis., 15, 203-207
- Kobayashi,T., Shinozaki,Y. (1992)  
Induction of transient airway hyperresponsiveness by exposure to 4 ppm nitrogen dioxide in  
guinea pigs.  
Journal Toxicology and Environmental Health, 37, 451-461
- Kosmider,St., Misiewicz,A., Felus,E., Drozd,M., Ludyga,K. (1973)  
Experimentelle und klinische Untersuchungen über den Einfluß der Stickstoffoxide auf die  
Immunität.  
Int. Arch. Arbeitsmed., 31, 9-23
- Kouzan,S., Fournier,T., Voisin,C., Jaurand,M.C., Bignon,J. (1989)  
Arachidonic acid metabolite production by alveolar macrophages cultured in gaseous phase.  
Effects of NO<sub>2</sub> and diesel exhaust.  
In: Effects of mineral dusts on cells, (Ed.: Mossman,B.T., Begin,R.O.), Springer Verlag Berlin  
Heidelberg, 1989, 215-222
- Lefkowitz,S.S., McGrath,J.J., Lefkowitz,D.L. (1986)  
Effects of NO<sub>2</sub> on immune responses.  
Journal of Toxicology and Environmental Health, 17, 241-248
- Lind,I. (1989)  
Untersuchungen zur Superoxidanionenproduktion durch Makrophagen: Einfluß von  
Kulturbedingungen und Stäuben.  
Diplomarbeit, Universität Karlsruhe
- Lohmann-Matthes,M-L. (1981)  
Der Makrophage.  
BIUZ, 11, 135-143

- Lynch, J.M., Henson, P.M. (1986)  
The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor.  
Journal of Immunology, 137, 2653-2661
- Maridonneau-Parini, I., Lagente, V., Lefort, J., Randon, I., Russo-Marie, F., Vargaftig, B.B. (1985)  
Desensitization to PAF-induced bronchoconstriction and to activation of the alveolar macrophages by repeated inhalations of PAF in the guinea pig.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 131, 42-49
- Martin, T.R., Mathison, F.C., Tobias, P.S., Leturcq, D.J., Moriarty, A.M., Maunder, R.J., Ulevitch, R.J. (1992)  
Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide.  
Journal of Clinical Investigation, 90, 2209-2219
- Matejka, M. (1992)  
Einfluß von Lanthan und Cer auf die Freisetzung des Tumornekrosefaktors durch Makrophagen.  
Diplomarbeit, Universität Karlsruhe
- Mayer, A.M.S., Pittner, R.A., Lipscomb, G.E., Spitzer, J.A. (1993)  
Effect of in vivo TNF administration on superoxide production and PKC activity of rat alveolar macrophages.  
Am. J. Physiol., 264, L 43 - L 52
- McPhail, L.C., Clayton, C.C., Snyderman, R. (1984)  
A potential second messenger role for unsaturated fatty acid: activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase.  
Science, 224, 622-625
- Menzel, D.B. (1976)  
The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (nitrogen dioxide and ozone).  
Free Radicals in Biology, 181-202
- Mochitate, K., Takahashi, Y., Ohsumi, T. (1986)  
Activation and increment of alveolar macrophages induced by nitrogen dioxide.  
Journal of Toxicology and Environmental Health, 17, 229-239
- Mohsenin, V. (1988)  
Airway responses to 2.0 ppm nitrogen dioxide in normal subjects.  
Archives of Environmental Health, 43, 242-246
- Mohsenin, V. (1991)  
Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidant stress - role of antioxidant defenses.  
Journal of Applied Physiology, 70, 1456-1462
- Mustafa, M.G., Tierney, D.F. (1978)  
Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity.  
Am. Rev. Respir. Dis., 118, 1061-1090

- Nauseef, W.M., Volpp, B.D., McCormick, S., Leidal, K.G., Clark, R.A. (1991)  
Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase.  
Journal of Biological Chemistry, 266, 5911-5917
- Neijens, H.J. (1990)  
Determinants and regulating process in bronchial hyperreactivity.  
Lung, Suppl., 268-277
- Newburger, P.E., Chovaniec, M.E., Greenberger, J.S., Cohen, H.J. (1979)  
Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation.  
J. Cell Biol., 82, 315-322
- Nishizuka, Y. (1984)  
The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion.  
Nature, 308, 693-698
- Norman, V., Keith, C.H. (1965)  
Nitrogen oxides in tobacco smoke.  
Nature, 205, 915-916
- Old, L.J. (1988)  
Der Tumor-Nekrose-Faktor.  
Spektrum der Wissenschaft, 7, 42-51
- Ostro, B.D., Lipsett, M.J., Wiener, M.B., Selner, J.C. (1991)  
Asthmatic responses to airborne acid aerosols.  
American Journal of Public Health, 81, 694-702
- O'Byrne, O.M., Leikauf, G.D., Aizawa, H. (1985)  
Leukotrien B<sub>4</sub>-induced airway hyperresponsiveness in dogs.  
J. Appl. Physiol., 59, 1941-1946
- O'Sullivan, M.G., Dobrowsky, R.T., Fleisher, L.N., Olson, N.C., Brown Jr., T.T. (1988)  
Arachidonic acid metabolites produced by bovine alveolar macrophages.  
Am. J. Vet. Res., 49, 1214-1217
- Pätzold, S. (1989)  
Morphologische und biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Quarz auf  
Rinderalveolarmakrophagen und deren Organellen.  
Dissertation, Universität Karlsruhe
- Parnham, M.J., Bittner, C. (1986)  
Pharmacological analysis of guinea-pig macrophage chemiluminescence responsive to platelet  
activating factor and opsonized zymosan.  
Int. J. Immunopharmac., 8, 951-959,
- Paubert-Braquet, M., Hosford, D., Klotz, P., Guilbaud, J., Braquet, P. (1990)  
Tumor necrosis factor alpha primes the platelet-activating factor-induced superoxide  
production by human neutrophils - possible involvement of G proteins.  
Journal of Lipid Mediators, 2, 1-14

- Pauwels,R. (1990)  
The pharmacology of airway hyperresponsiveness and inflammation.  
Lung, Suppl., 221-229
- Peters,T., Gaillard,T., Decker,K. (1990)  
Tumor necrosis factor alpha stimulates prostaglandin but not superoxide synthesis in rat Kupffer cells.  
Eicosanoids, 3, 115-120
- Pinkerton,K.E., Mercer,R.R., Chechowitz,M.A., Crapo,J.D. (1990)  
Biological sequelae of exposure to low levels of ozone and chrysotil asbestos.  
Ann. Rev. Respir. Dis., 141, A 418
- Pinkston,P., Smeglin,A., Roberts,N.J., Gibb,F.R., Morrow,P.E., Utell,M.J. (1988)  
Effects of in vitro exposure to nitrogen dioxide on human alveolar macrophage release of neutrophil chemotactic factor and interleukin-1.  
Environmental Research, 47, 48-58
- Polzer,G. (1992)  
Morphologische und biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Seltenen Erdmetallverbindungen auf Rinderalveolarmakrophagen.  
Dissertation, Universität Karlsruhe
- Polzer,G., Lind,I., Krüger,E., Seidel,A.  
In vitro effects NO<sub>2</sub> on the superoxide anion, TNF- $\alpha$ , and IL-8 release by HL60-macrophages and bovine alveolar macrophages.  
(in press)
- Postlethwait,E.M., Langford,S.D., Bidani,A. (1991)  
Transfer of NO<sub>2</sub> through pulmonary epithelial lining fluid.  
Toxicology and Applied Pharmacology, 109, 464-471
- Radeke,H.H., Meier,B., Topley,N., Flöge,J., Habermehl,G.G., Resch,K. (1990)  
Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells.  
Kidney International, 37, 767-775
- Reid,T.R., Torti,F.M., Ringold,G.M. (1989)  
Evidence for two mechanisms by which tumor necrosis factor kills cells.  
Journal of Biological Chemistry, 264, 4583-4589
- Richters,A., Damji,K. (1988)  
Changes in T-lymphocyte subpopulations and natural killer cells following exposure to ambient levels of nitrogen dioxide.  
Journal of Toxicology and Environmental Health, 25, 247-256

- Rietjens, I.M.C.M., Poelen, M.C.M., Hempenius, R.A., Gijbels, M.I.J., Alink, G.M. (1986)  
Toxicity of ozone and nitrogen dioxide to alveolar macrophages: comparative study revealing differences in their mechanisms of toxic action.  
*Journal of Toxicology and Environmental Health*, 19, 555-568
- Rietjens, I.M.C.M., Van Tilburg, C.A.M., Coenen, T.M.M., Alink, G.M., Konings, A.W.T. (1987)  
Influence of polyunsaturated fatty acid supplementation and membrane fluidity on ozone and nitrogen dioxide sensitivity of rat alveolar macrophages.  
*Journal of Toxicology and Environmental Health*, 21, 45-56
- Robison, T.W., Duncan, D.P., Forman, H.J. (1990)  
Chemoattractant and leukotriene B<sub>4</sub> production from rat alveolar macrophages exposed to nitrogen dioxide.  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 3, 21-26
- Rola-Pleszczynski, M., Stankova, J. (1992)  
Differentiation-dependent modulation of TNF production by PAF in human HL60 myeloid leukemia cells.  
*Journal of Leukocyte Biology*, 51, 609-616
- Rossi, P., Chini, L., Fattorossi, A., Gidlund, M., Galli, E., Laan, K., Jondal, M., Wigzell, H. (1987)  
1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phorbol esters (TPA) may induce select in vivo differentiation pathways in the HL-60 promyelotic cell line.  
*Clinical Immunology and Immunopathology*, 44, 308-316
- Rotrosen, D., Leto, T.L. (1990)  
Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor.  
*Journal of Biological Chemistry*, 265, 19910-19915
- Ruggiero, V., Tavernier, J., Fiers, W., Baglino, C. (1986)  
Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon- $\gamma$ .  
*J. Immunol.*, 136, 2445-2450
- Sagai, M., Ichinose, T. (1987)  
Lipid peroxidation and antioxidative protection mechanisms in rat lungs upon acute and chronic exposure to nitrogen dioxide.  
*Environ. Health Perspect.*, 73, 179-189
- Sagai, M., Ichinose, T. (1991)  
Biochemical effects of combined gases of nitrogen dioxide and ozone. IV. Changes of lipid peroxidation and antioxidative protective systems in rat lungs upon life span exposure.  
*Toxicology*, 66, 121-132
- Sagai, M., Ichinose, T., Kubota, K. (1984)  
Studies on the biochemical effects of nitrogen dioxide.  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, 73, 444-456

- Sandström,T., Wilnerzon-Thörn,R., Bjermer,L., Stjernberg,N. (1992)  
Repeated exposure to nitrogen dioxide causes a different cell response in the lung in comparison with single exposure.  
Am. Rev. Respir. Dis., International Conference of the American Lung Association and the American Thoracic Society, 145, A 455
- Satouchi,K., Oda,M., Yasunaga,K., Saito,K. (1983)  
Application of selected ion monitoring to determination of platelet activating factor.  
Journal of Biochemistry, 94, 2067-2070
- Schmidt,A.M. (1992)  
Die Wirkung von Quarz auf Lysosomen und die TNF-Produktion von Alveolarmakrophagen.  
Dissertation, Universität Karlsruhe
- Sharma,P., Evans,A.T., Parker,P.J., Evans,F.J. (1991)  
NADPH-Oxidase activation by protein kinase C-isotypes.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 1033-1040
- Shi,X., Dalad,N.S., Vallayathan,V. (1988)  
ESR evidence for the hydroxyl radical formation in aqueous suspension of quartz particles and its possible significance to lipid peroxidation in silicosis.  
Journal of Toxicology and Environmental Health, 25, 237-245
- Shiotsuka,R.N., Yermakoff,J.K., Osheroff,M.R., Dew,R.T. (1986)  
The combination of ozone and silica on the development of pulmonary fibrosis.  
Journal of Toxicology and Environmental Health, 17, 297-310
- Siegel,P.D., George,W.J. (1990)  
Pharmacologic manipulation of the murine pulmonary biochemical response to NO<sub>2</sub>.  
JEPTO, 10, 231-236
- Smeglin,A.M., Roberts Jr,N.J., Morrow,P.E., Utell,M.J. (1986)  
Effects of 0,6 ppm nitrogen dioxide on human alveolar macrophage inactivation of influenza virus.  
Am. Rev. Respir. Dis., Joint Annual Meeting of the American Lung Association and the American Thoracic Society, Kansas City, 133, A 216
- Smolen,J.E. (1984)  
Lag period for superoxide anion generation and lysosomal enzyme release from human neutrophils: effects of calcium antagonists and anion channel blockers.  
The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 104, 1-10
- Snider,G.L. (1983)  
Interstitial pulmonary fibrosis - which cell is the culprit?  
Am. Rev. Respir. Dis., 127, 535-539
- Stephens,R.J., Freeman,G., Evans,M.J. (1972)  
Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide.  
Arch. Environ. Health, 24, 160-179

- Steward,A.G., Phillips,W.A. (1989)  
Intracellular platelet-activating factor regulates eicosanoid generation in guinea-pig resident peritoneal macrophages.  
Br. J. Pharmacol., 98, 141-148
- Suzuki,T., Ikeda,S., Kanoh,T., Mizoguchi,I. (1986)  
Decreased phagocytosis and superoxide anion production in alveolar macrophages of rats exposed to nitrogen dioxide.  
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15, 733-739
- Tabor,D.R., Burchett,S.K., Jacobs,R.F. (1988)  
Enhanced production of monokines by canine alveolar macrophages in response to endotoxin-induced shock.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 187, 408-415
- Tanner,W.G., Welborn,M.B., Sheperd,V.L. (1992)  
Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1-alpha synergistically enhance phorbol myristate acetate-induced superoxide production by rat bone marrow-derived macrophages.  
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7, 379-384
- Tapia,D.P., Hursh,D.M., Kartha,R.K. (1989)  
Inhibition of platelet-activating factor release by magnesium sulfate in guinea pig alveolar macrophages.  
Anesthesiology, 73, A 740
- Tepper,J.S., Costa,D.L., Winsett,D.W., Stevens,M.A., Doerfler,D.L., Watkinson,W.P. (1993)  
Near-lifetime exposure of the rat to a simulated urban profile of nitrogen dioxide: pulmonary function evaluation.  
Fundamental and Applied Toxicology, 20, 88-96
- Tracey,K.L., Beutler,B., Lowry,S.F. (1986)  
Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin.  
Science, 234, 470-474
- Tsan,M.F., White,J.E., Teanor,C., Shaffer,J.B. (1990)  
Molecular basis for tumor necrosis factor-induced increase in pulmonary superoxide dismutase activities.  
American Journal of Physiology, 259, L 506- L 512
- Tsujimoto,M., Okamura,N., Adachi,H.(1988)  
Dexamethasone inhibits the cytotoxic activity of tumor necrosis factor.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 153, 109-115
- Vallayathan,V., Xianglin,S., Dalad,N.S., Irr,W., Castranova,V. (1988)  
Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury.  
Am. Rev. Respir. Dis., 138, 1213-1219
- Vetrano,K.M., Morris,J.B., Hubbard,A.K. (1992)  
Silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice is altered by acute exposure to nitrogen dioxide.

- Journal of Toxicology and Environmental Health, 37, 425-442  
Visner,G.A., Chesrown,S.E., Monnier,J., Ryan,U.S., Nick,H.S. (1992)  
Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 188, 453-462
- Voisin,C., Aerts,C., Jakubczak,E., Tonnel,A.B. (1977)  
La culture cellulaire en phase gazeuse.  
Bull. Europ. Physiopath. Resp., 13, 69-82
- Voter,K.Z., Frampton,M.W., Whitin,J.C., Morrow,P.E., Utell,M.J. (1991)  
The effects of NO<sub>2</sub> on superoxide anion generation by human alveolar macrophages.  
Am. Rev. Respir. Dis., International Conference of the American Lung Association and the American Thoracic Society, 143, A705
- Wagner,U., Barth,P.J., Amon,D., Kimpel,C., Saalman,R., von Wichert,P. (1992)  
Untersuchungen zur Korrelation pathophysiologischer und pathomorphologischer Prozesse des Epithels der Trachea, der submukösen Trachealdrüsen und des Epithels der peripheren Atemwege nach inhalativer Exposition gegenüber den Noxen NO<sub>2</sub> und SO<sub>2</sub>.  
In: Berichtsband zum 1. Statuskolloquium des Projektes Umwelt und Gesundheit, Karlsruhe, KFK-PUG 4, 61-62
- Weiss,S.J., LoBuglio,A.F. (1982)  
Biology of disease - phagocyte generated oxygen metabolites and cellular injury.  
Lab. Invest., 47, 5-18
- Wolf,J.E., Massof,S.E. (1990)  
In vivo activation of macrophage oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B.  
Infection and Immunity, 58, 1296-1300
- Yamauchi,N., Kuriyama,H., Watanabe,N., Neda,H., Maeda,M., Niitsu,Y. (1989)  
Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro.  
Cancer Research, 49, 1671-1675
- Zamora,P.O., Gregory,R.E., Li,A.P., Brooks,A.L. (1986)  
An in vitro model for the exposure of lung alveolar epithelial cells to toxic gases.  
JEPTO, 7, 159-168
- Zimmermann,R.J., Chan,A., Leadon,S.A. (1989)  
Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human tumor necrosis factor.  
Cancer Research, 49, 1644-1648
- Zoratti,E.M., Sedgwick,J.B., Vrtis,R.R., Busse,W.W. (1991)  
The effect of platelet-activating factor on the generation of superoxide anion in human eosinophils and neutrophils.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology, 88, 749-758

## 7. Abbildungen

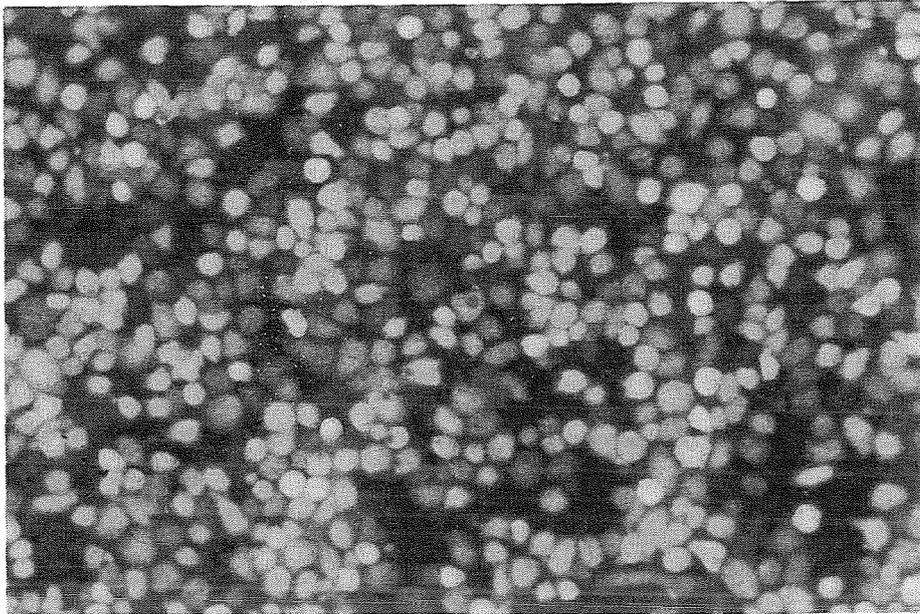


Abbildung 1:  
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von RAM nach einer 2stündigen Inkubation in Gasphase in der Luftkammer. Die lebenden Zellen fluoreszieren grün, die toten rotgelblich (Vergrößerung: 150x)

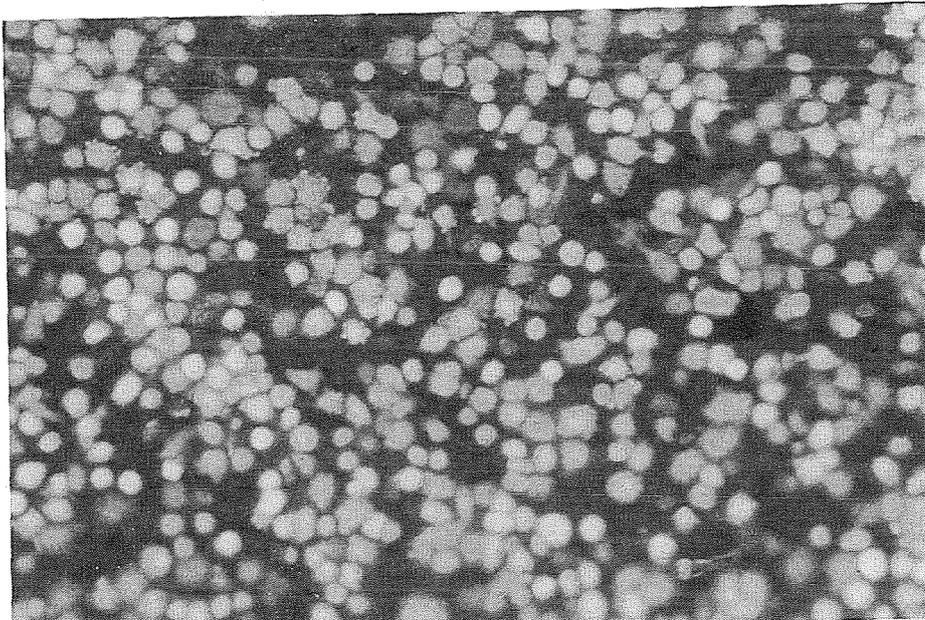


Abbildung 2:  
Darstellung des Vitalitätsverlustes nach einer 2stündigen Begasung von RAM mit 3 ppm NO<sub>2</sub>. Die "Blebs", die nach NO<sub>2</sub>-Applikation auftreten, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.  
(Vergrößerung 150x)

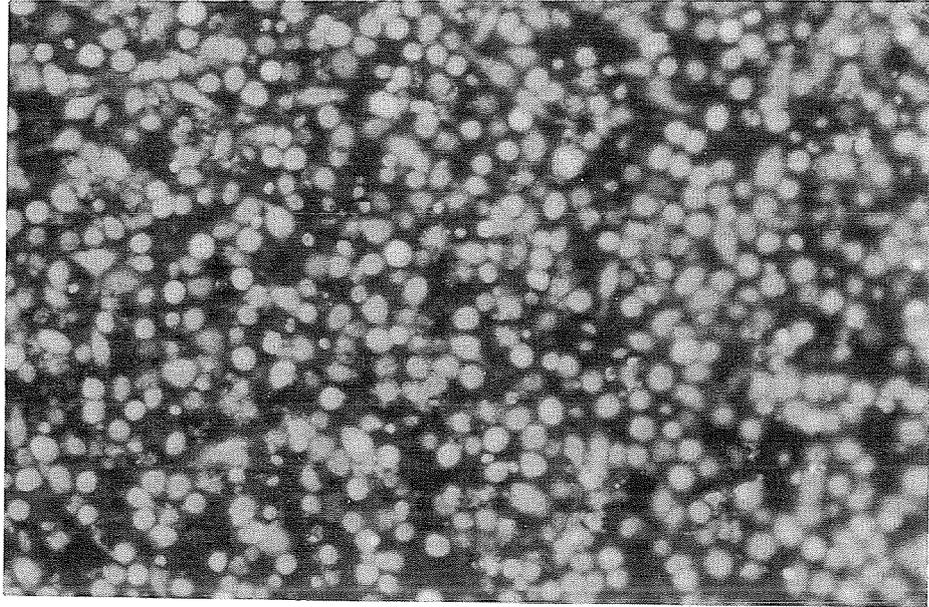


Abbildung 3:  
Darstellung des Vitalitätsverlustes nach einer 2stündigen Begasung von RAM mit 1,5 ppm NO<sub>2</sub>. Die "Blebs", die nach NO<sub>2</sub>-Applikation auftreten, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.  
(Vergrößerung 150x)

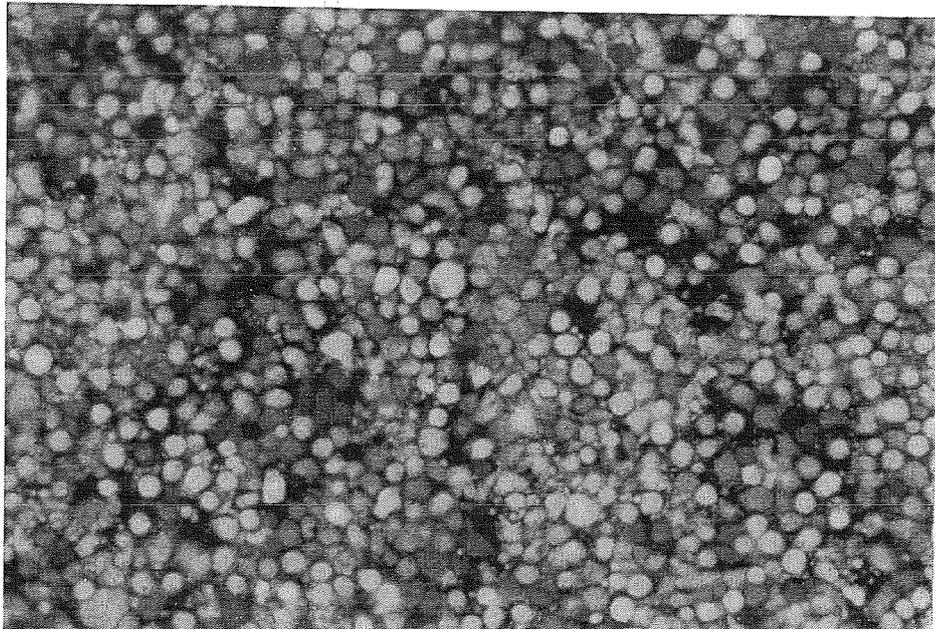


Abbildung 4:  
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von RAM, die zuerst einer 2stündigen Begasung mit 3 ppm NO<sub>2</sub> ausgesetzt waren, und anschließend die gleiche Zeitdauer im Brutschrank inkubiert wurden.  
(Vergrößerung 150x)

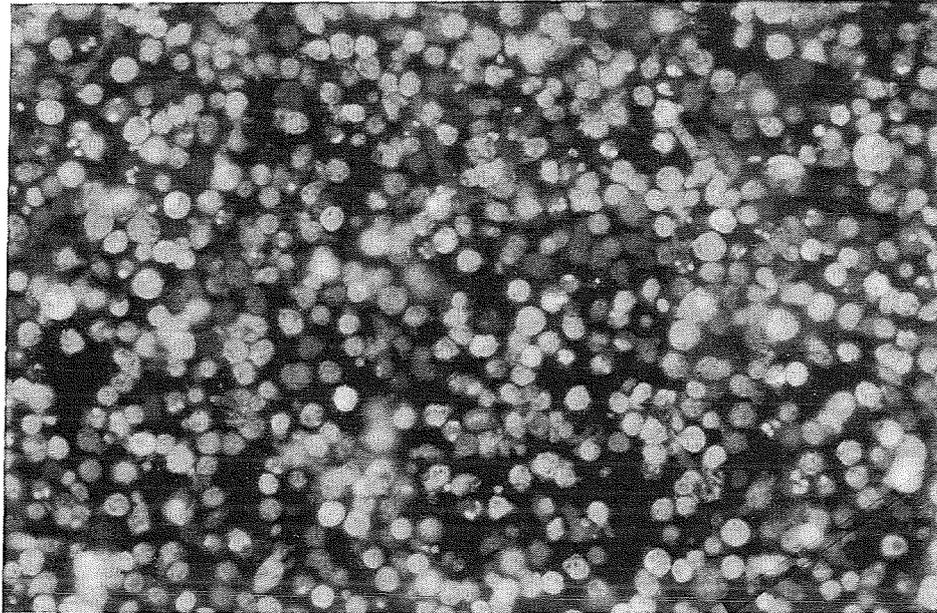


Abbildung 5:

RAM nach 2stündiger Exposition in der Luftkammer und anschließend durchgeführter 90minütiger Inkubation mit Reaktionslösung zur Superoxidanionenmessung. Die Zellen konnten für die Gesamtdauer der Inkubation Zymosan phagozytieren - dieses ist als dunkler Einschluß in den Zellen sichtbar.

(Vergrößerung 150x)

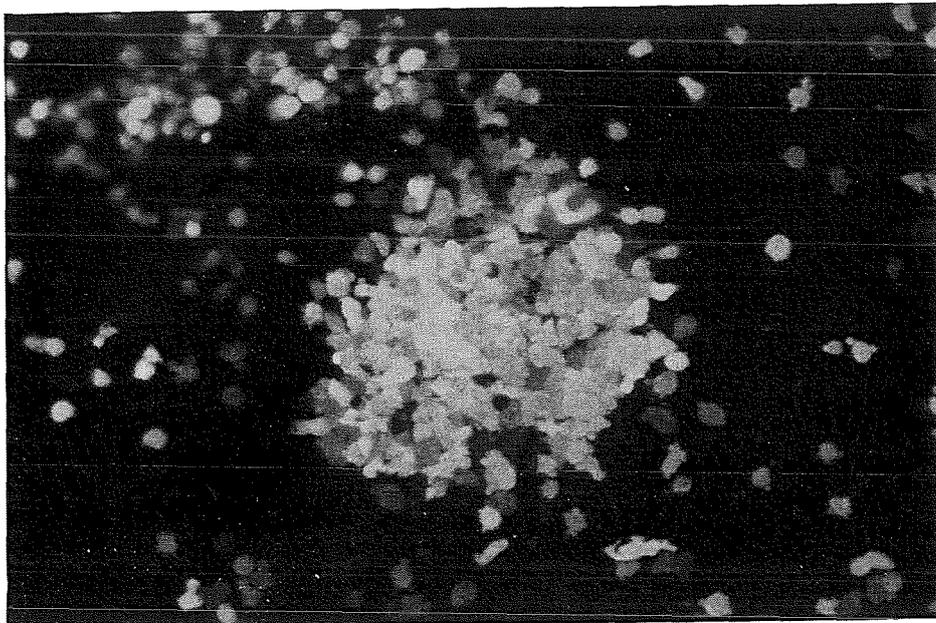


Abbildung 6:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HL60-Zellen nach TPA-Applikation. Bereits nach 90 Minuten war eine Aggregation der Zellen feststellbar.

(Vergrößerung 300x).

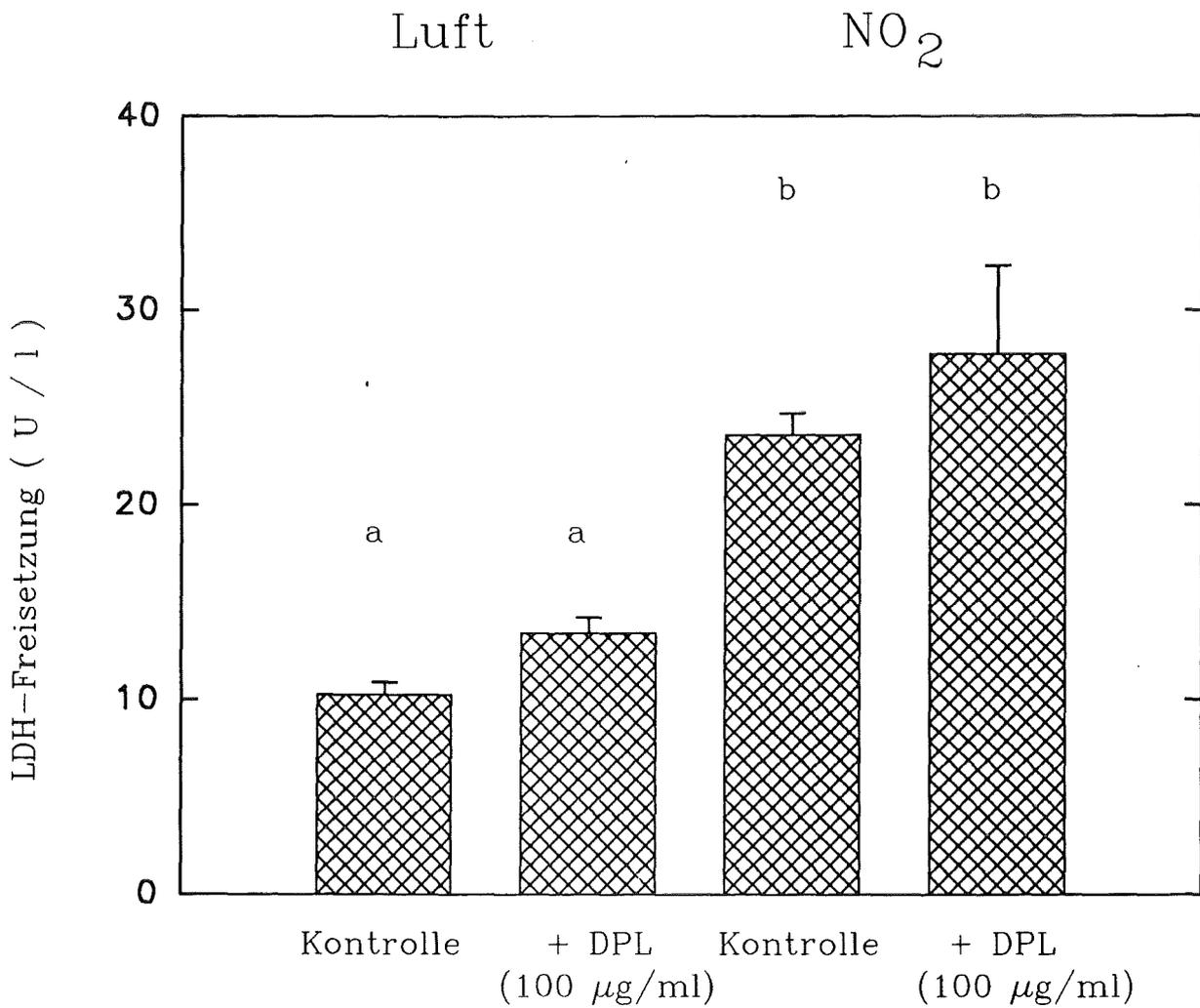


Abbildung 7:

Einfluß von 3 ppm NO<sub>2</sub> und DPL (100 µg/ml) auf die LDH-Freisetzung von RAM in Gasphase in den Zellunterstand (2stündige Inkubation mit Gas, n = 15).

Signifikante Unterschiede werden in allen folgenden Abbildungen durch unterschiedliche Buchstaben kenntlich gemacht. Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwerte und mit den dazugehörigen Standardfehlern.

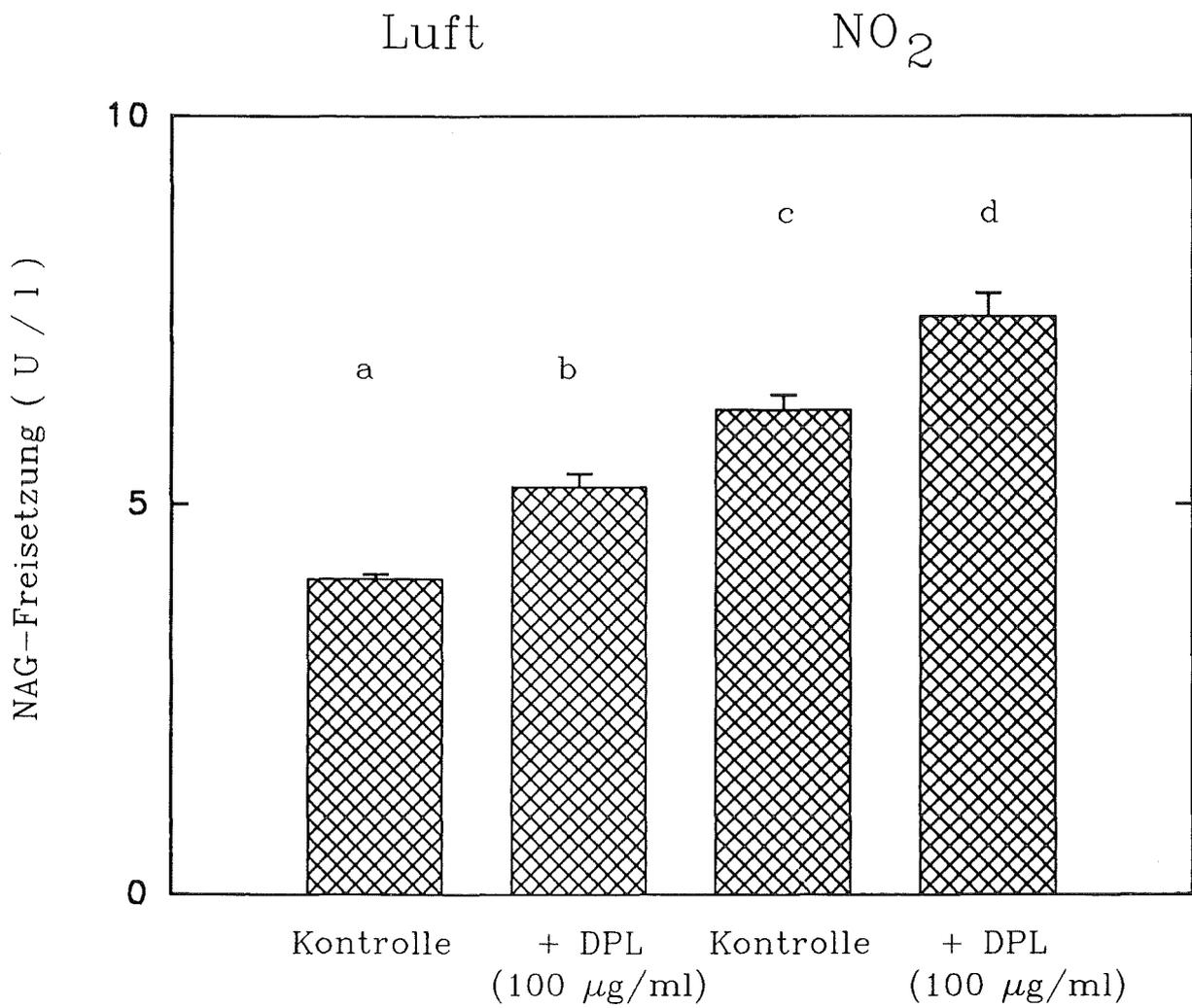


Abbildung 8:

Einfluß von 3 ppm NO<sub>2</sub> und DPL (100 µg/ml) auf die NAG-Freisetzung von RAM in Gasphase in den Zellunterstand (2stündige Inkubation mit Gas, n = 15).

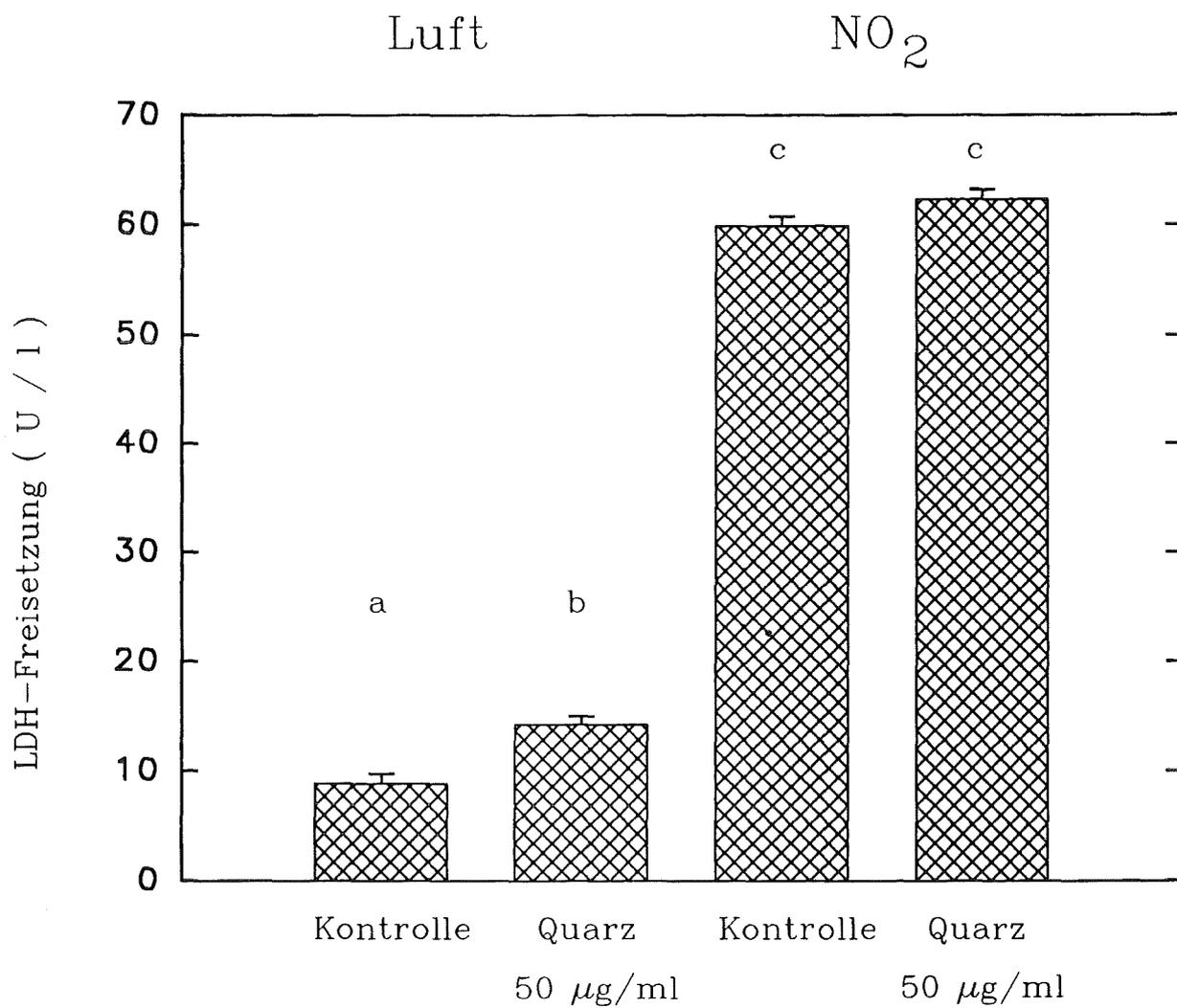


Abbildung 9:  
 Einfluß einer Exposition mit NO<sub>2</sub> (3 ppm, 2 Stunden) auf die LDH-Freisetzung von RAM, die zuvor 50 µg Quarz 1 Stunde lang phagozytierten.  
 (n = 21).

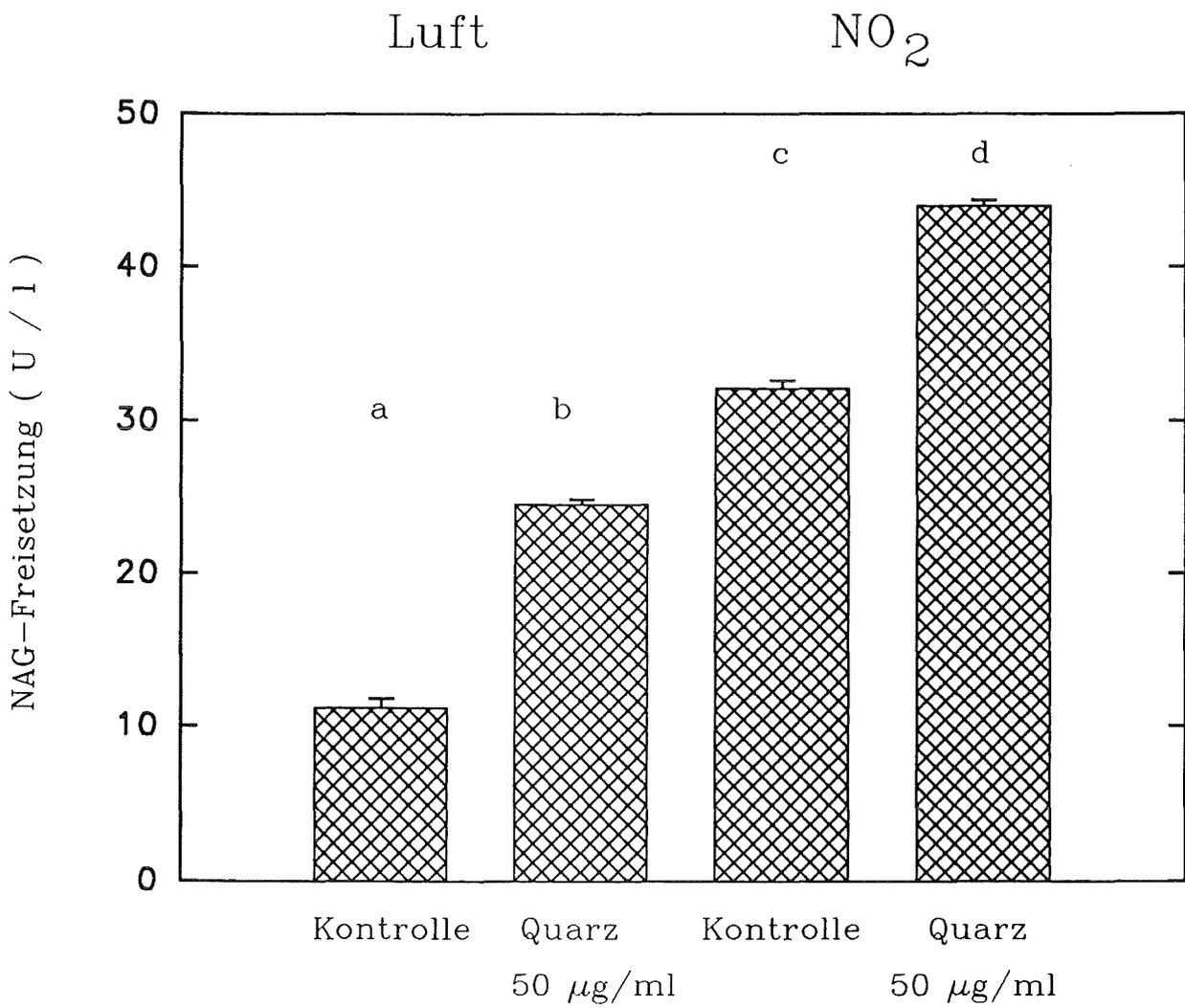


Abbildung 10:  
 Einfluß einer Exposition mit NO<sub>2</sub> (3 ppm, 2 Stunden) auf die NAG-Freisetzung von RAM, die zuvor 50 µg Quarz 1 Stunde lang phagocytierten.  
 (n = 21).

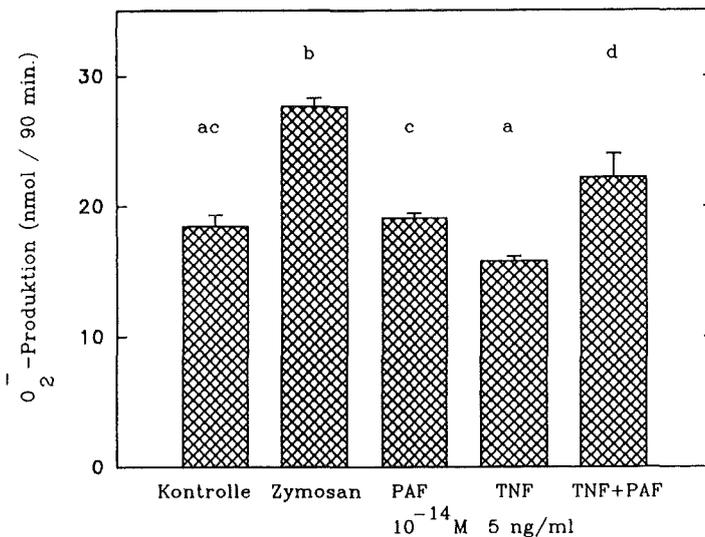
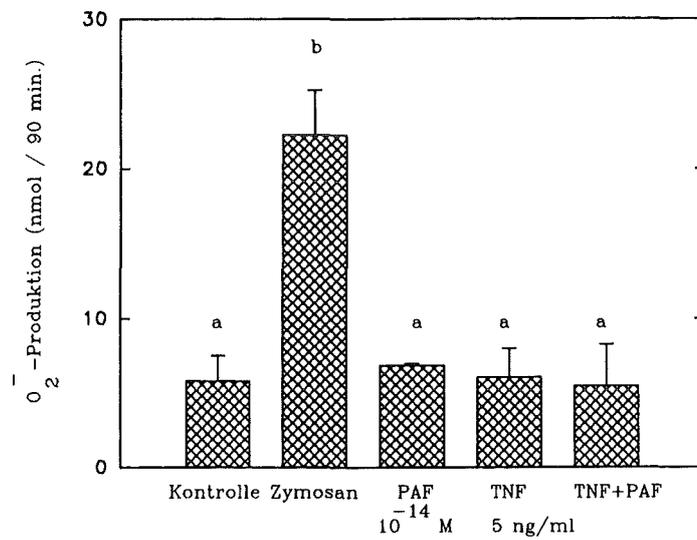
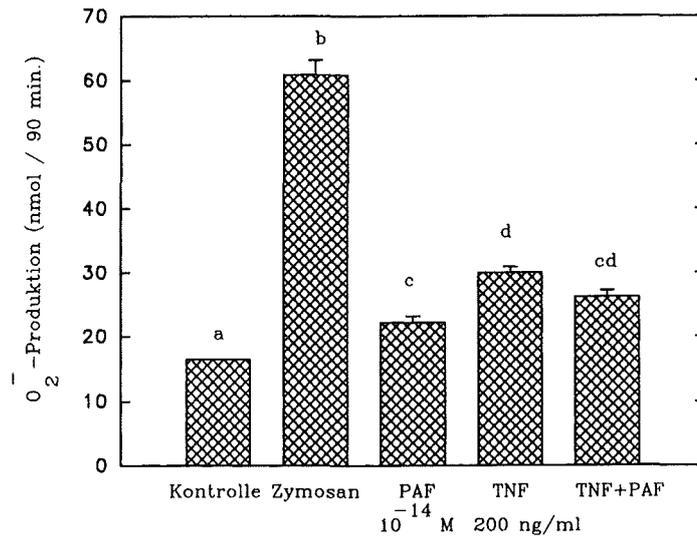


Abbildung 11:

Einfluß von PAF ( $10^{-14}$ M) und verschiedener Konzentrationen an TNF auf die Sekretion von Superoxidanionen bei RAM nach Kultur in Gasphase und in Abhängigkeit vom Voraktivierungszustand der Zellen.

Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).

Obere Abbildung: Einzerversuch mit voraktivierten Zellen (n = 3)

Mittlere Abbildung: Versuch mit nicht voraktivierten Zellen (n = 9)

Untere Abbildung: Versuch mit voraktivierten Zellen (n = 12)

Die statistische Analyse wurde für alle drei Abbildungen getrennt durchgeführt.

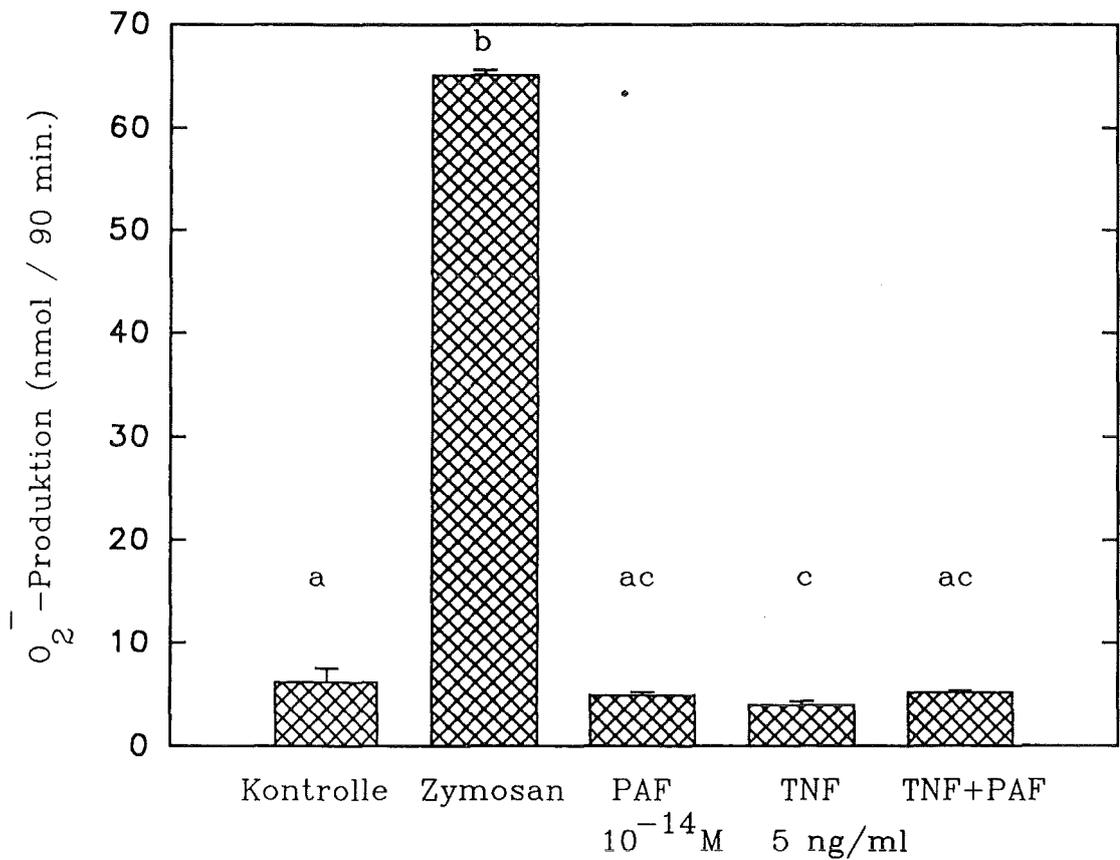
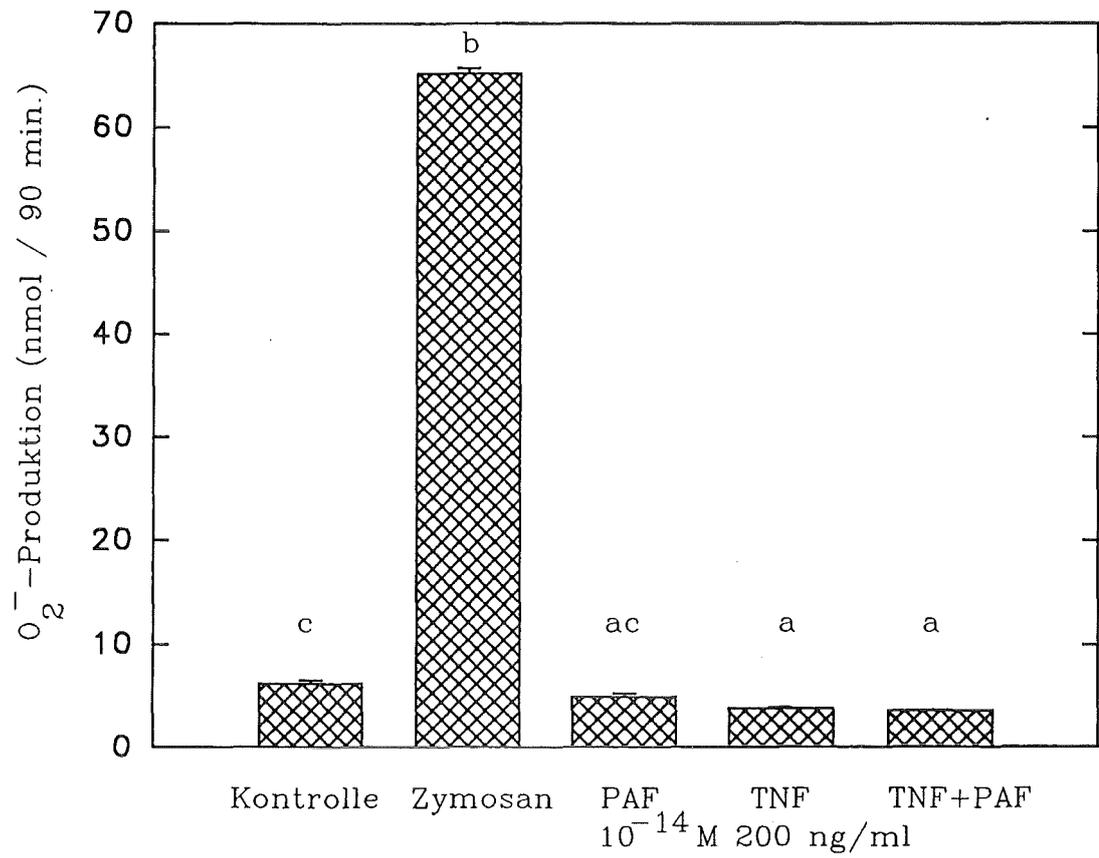


Abbildung 12:

Einfluß der Applikation von PAF ( $10^{-14}$ M) und/oder verschiedener Konzentrationen an TNF auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM in Submerskultur.

Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).

Oben: Einzelversuch (n = 3)

Unten: (n = 9)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt.

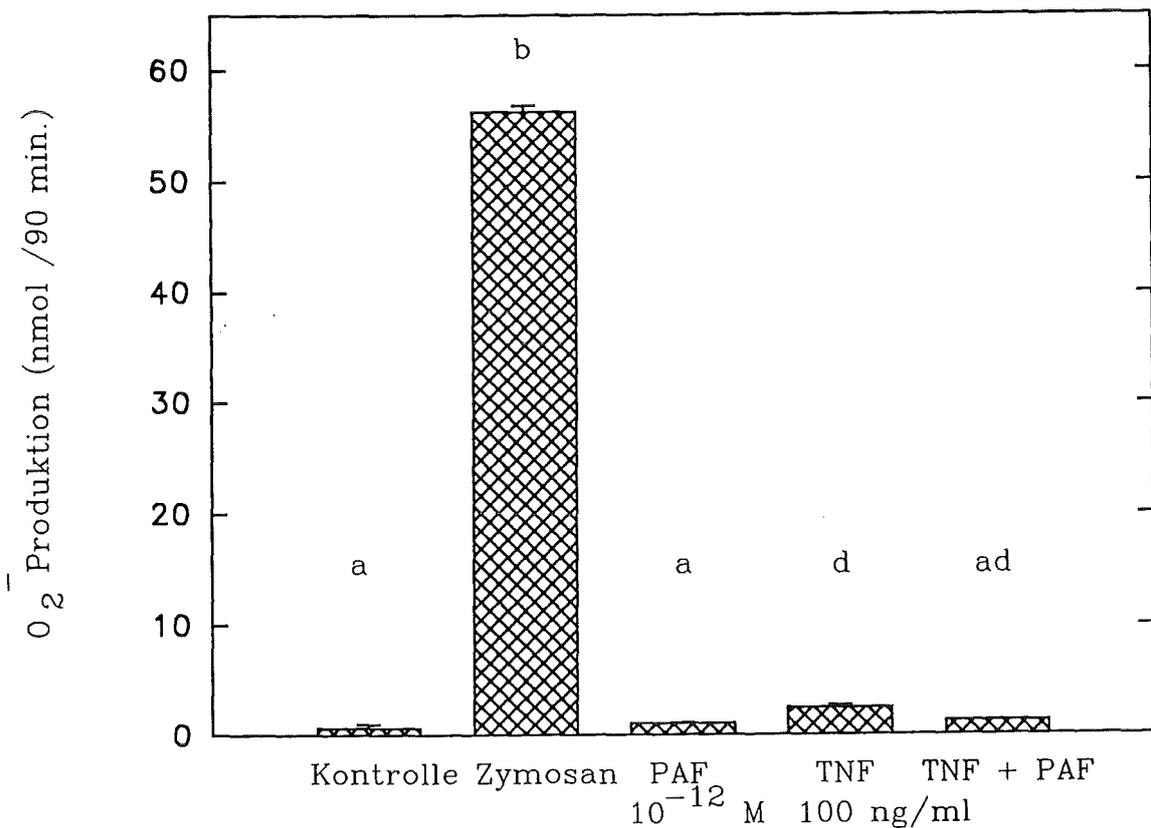
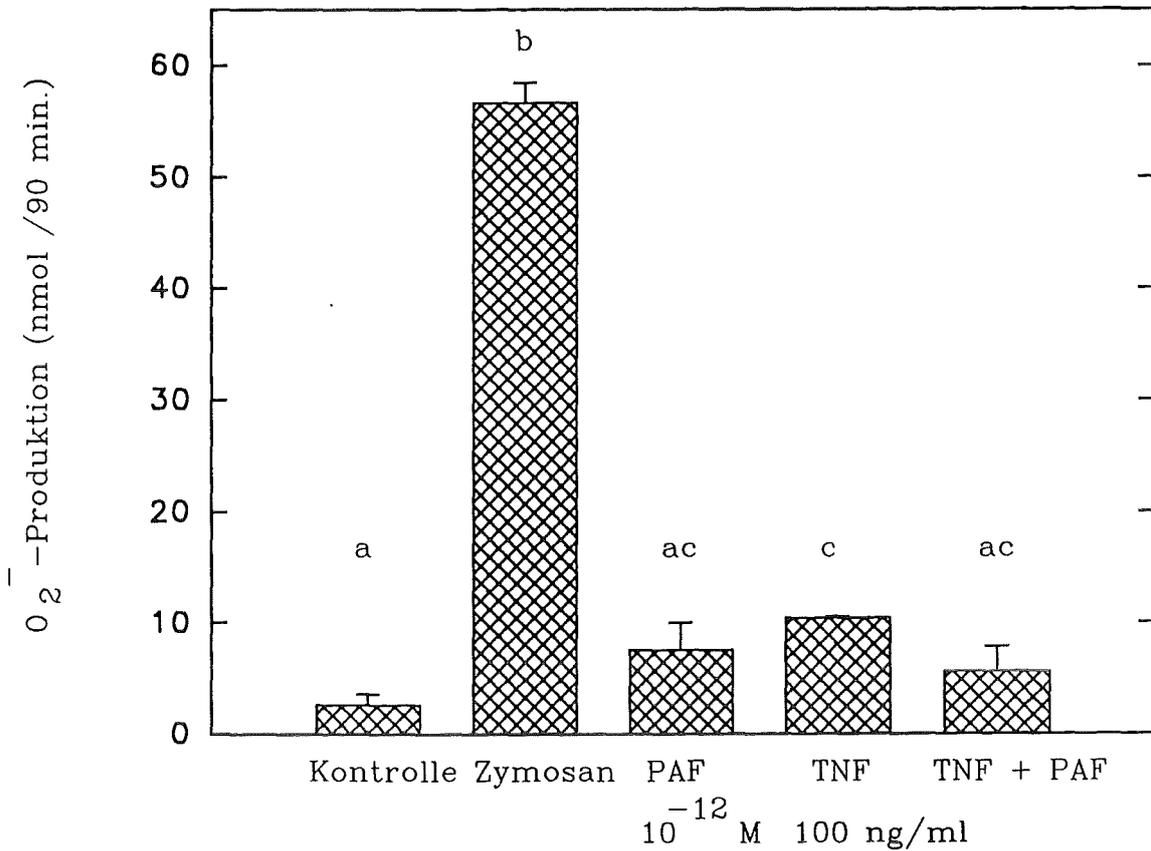


Abbildung 13:

Vergleich der beiden angewandten Kultivierungsmethoden bei RAM hinsichtlich ihres Einflusses auf die  $O_2^-$ -Freisetzung nach Applikation von PAF ( $10^{-12}$  M) und/oder TNF (100 ng/ml).

Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).

obere Abbildung: Gasphasenkultur, Einzelversuch (n = 3)

untere Abbildung: Submerskultur, Einzelversuch (n = 3)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt.

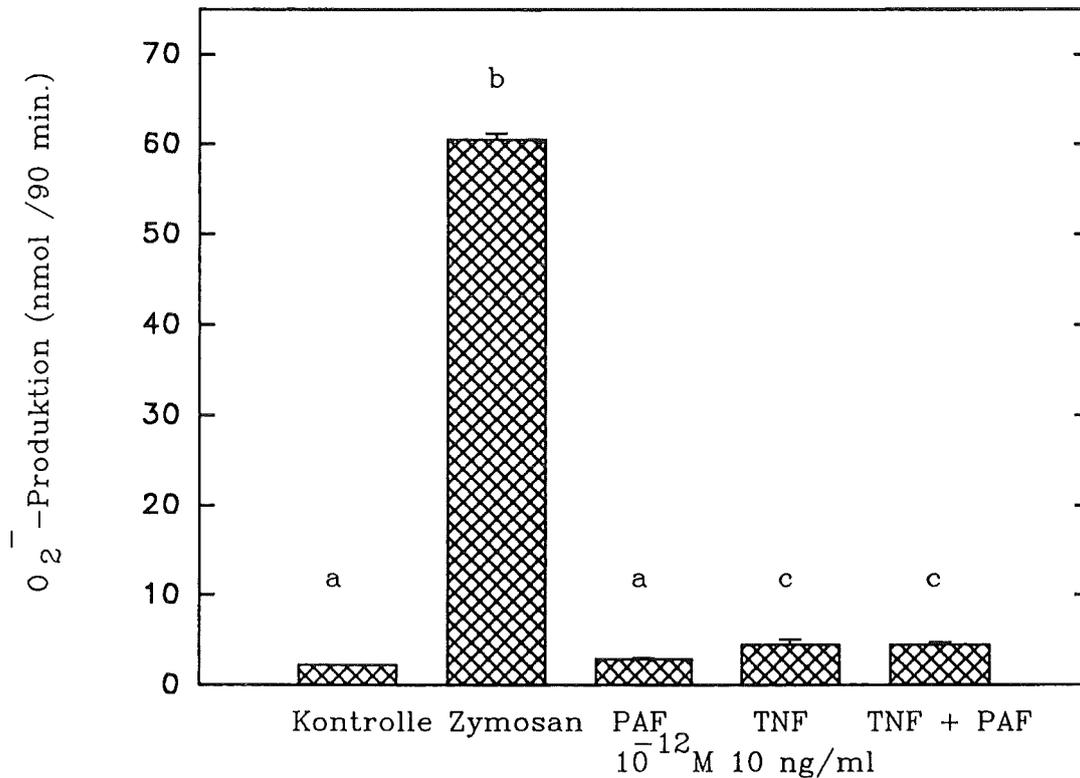
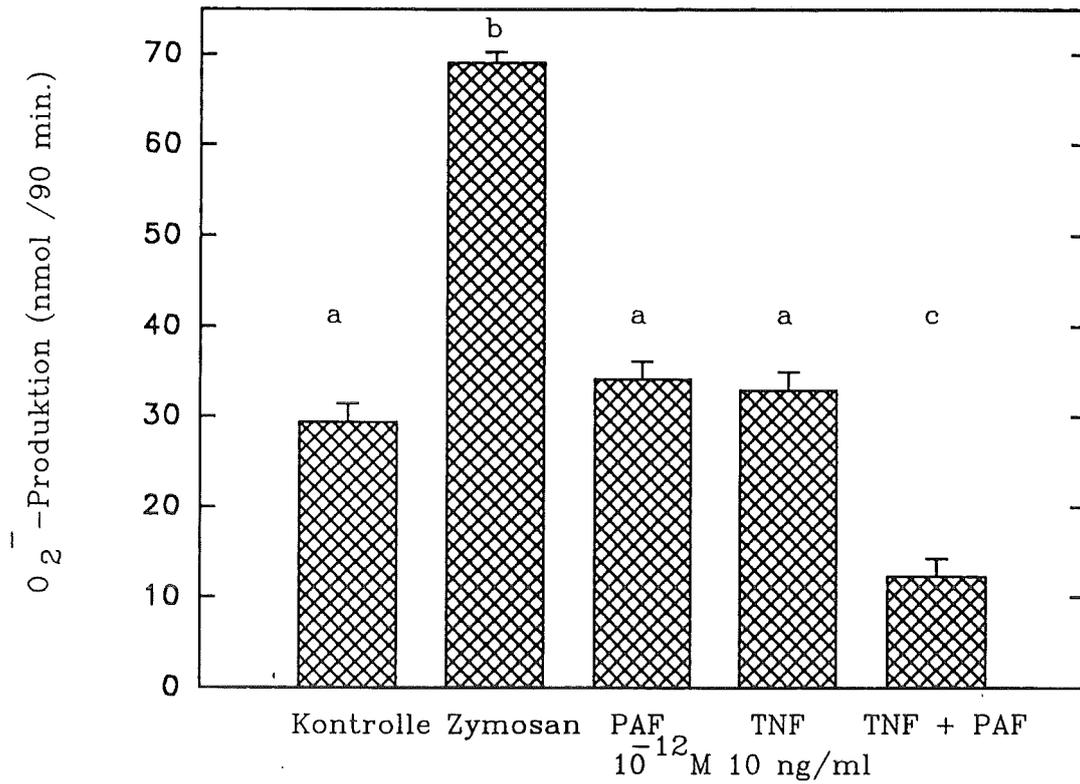


Abbildung 14:

Vergleich der beiden angewandten Kultivierungsmethoden bei RAM hinsichtlich ihres Einflusses auf die  $O_2^-$ -Freisetzung nach Applikation von PAF ( $10^{-12}$  M) und/oder TNF (10 ng/ml).

Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).

obere Abbildung: Gasphasenkultur, Einzelversuch (n = 3)

untere Abbildung: Submerskultur, Einzelversuch (n = 3)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt.

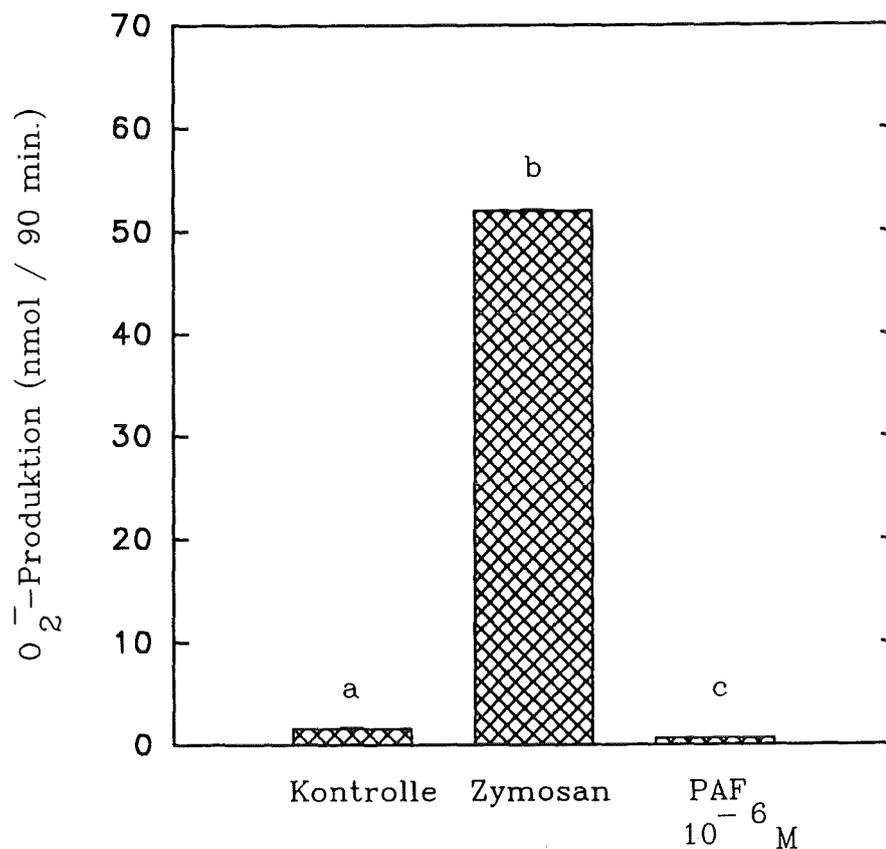
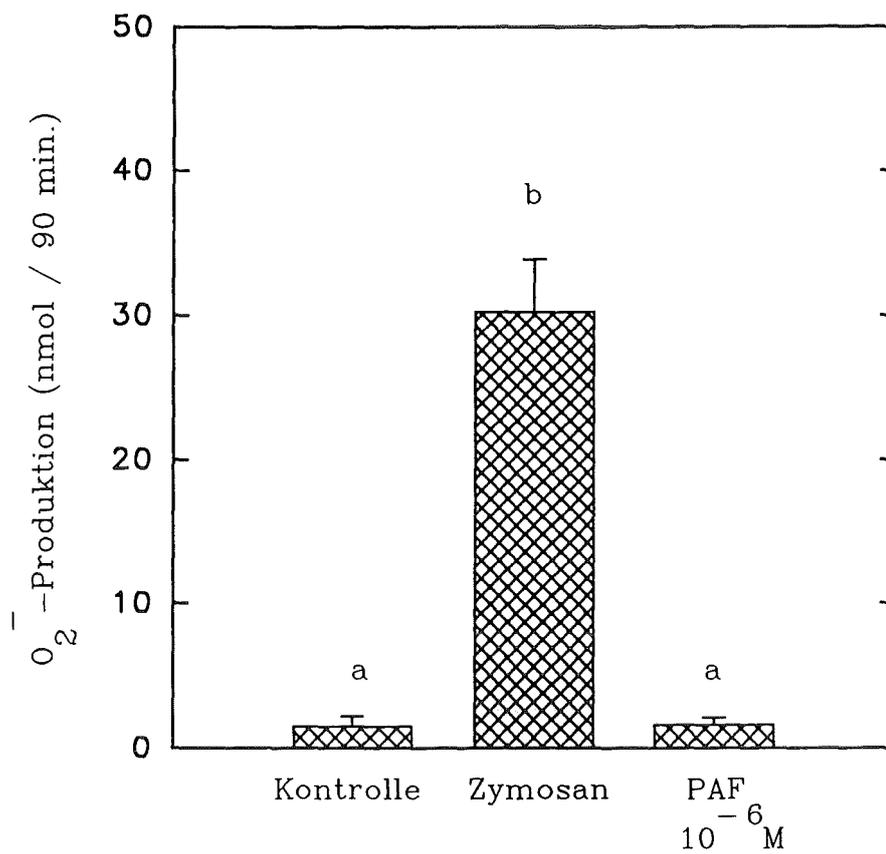


Abbildung 15:  
 Vergleich der beiden angewandten Kultivierungsmethoden bei RAM hinsichtlich ihres Einflusses auf die  $O_2^-$ -Freisetzung nach Applikation von PAF ( $10^{-6}$ M).  
 Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).  
 obere Abbildung: Gasphasenkultur (n = 6)  
 untere Abbildung: Submerskultur (n = 6)  
 Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

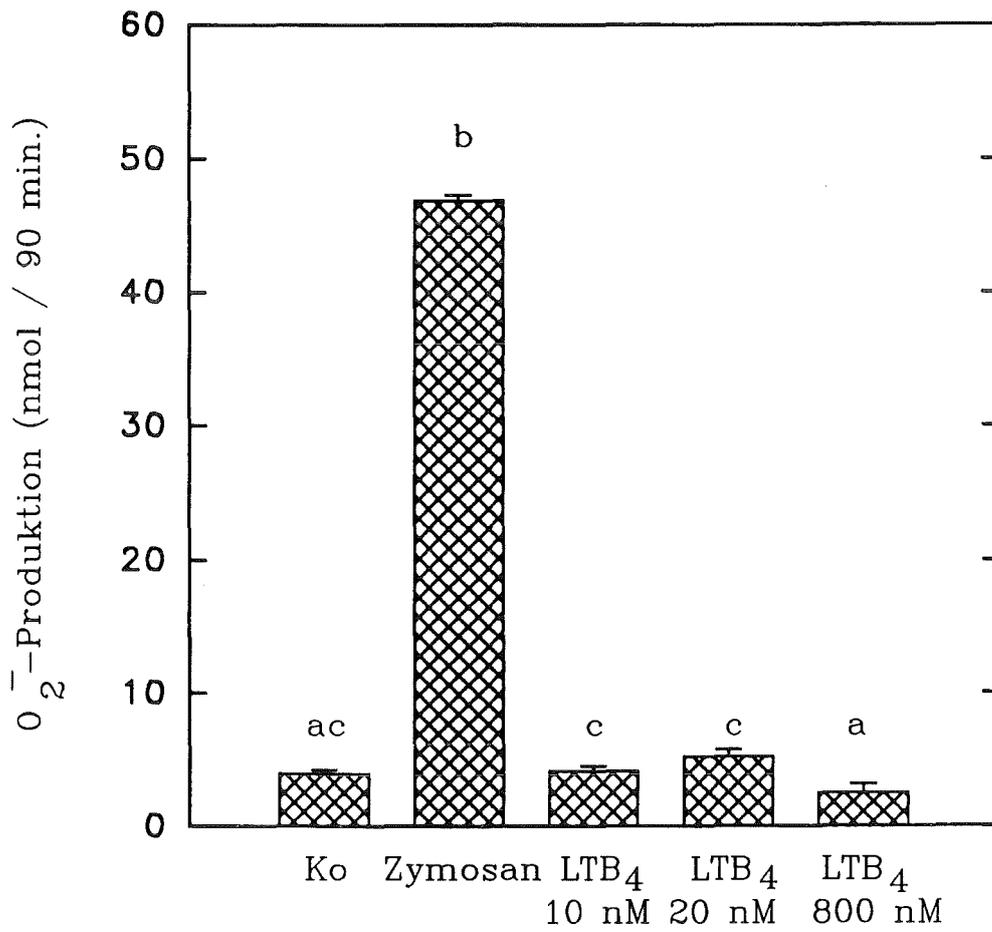


Abbildung 16:  
 Einfluß von LTB<sub>4</sub> auf die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung von RAM in Submerskultur.  
 Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).  
 (n = 6)

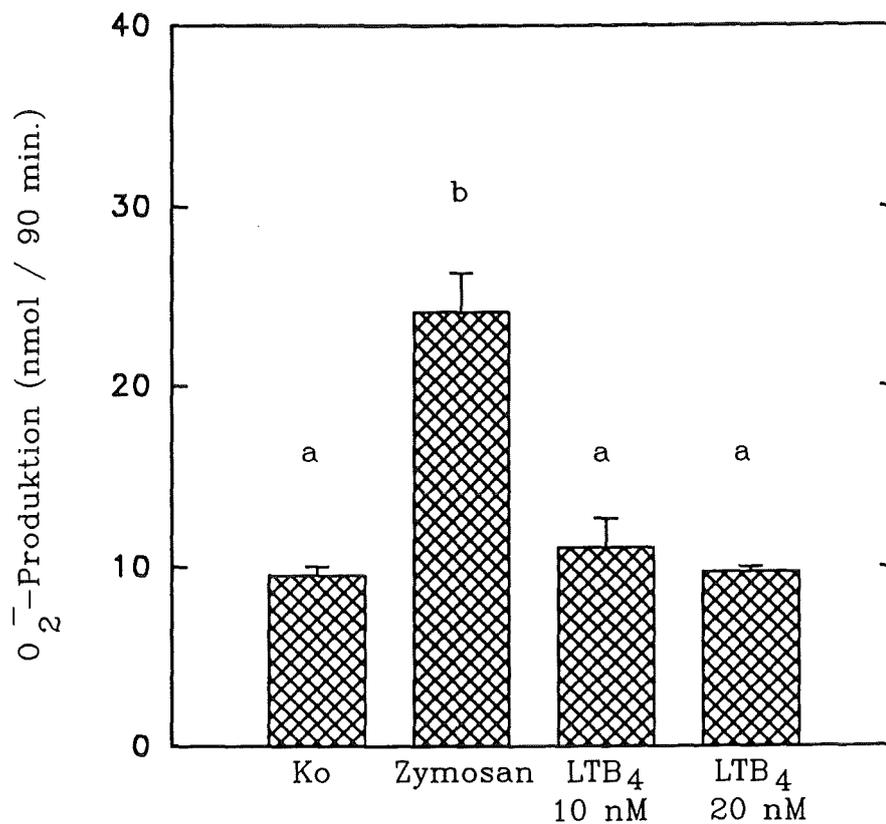
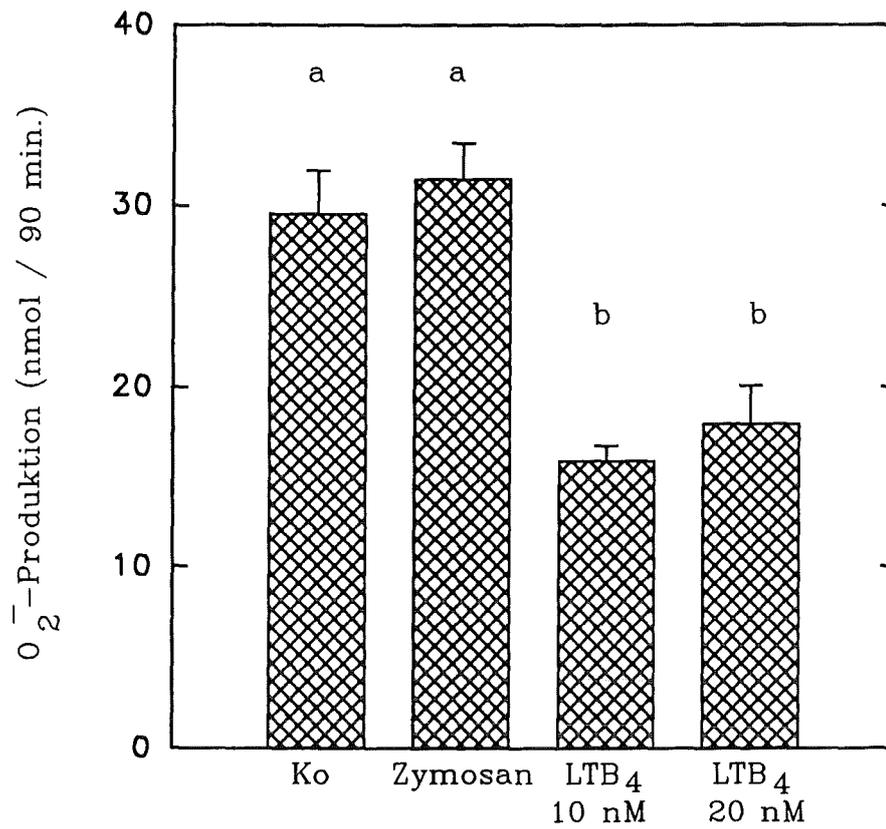


Abbildung 17:

Quantifizierung der Sekretion an Superoxidanionen bei RAM nach Gasphasenkultur. Einfluß zweier verschiedener Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> in Abhängigkeit vom Voraktivierungszustand der Zellen.

Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).

Obere Abbildung: Versuch mit voraktivierten Zellen (n = 12)

Untere Abbildung: Versuch mit nicht voraktivierten Zellen (n = 6)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt.

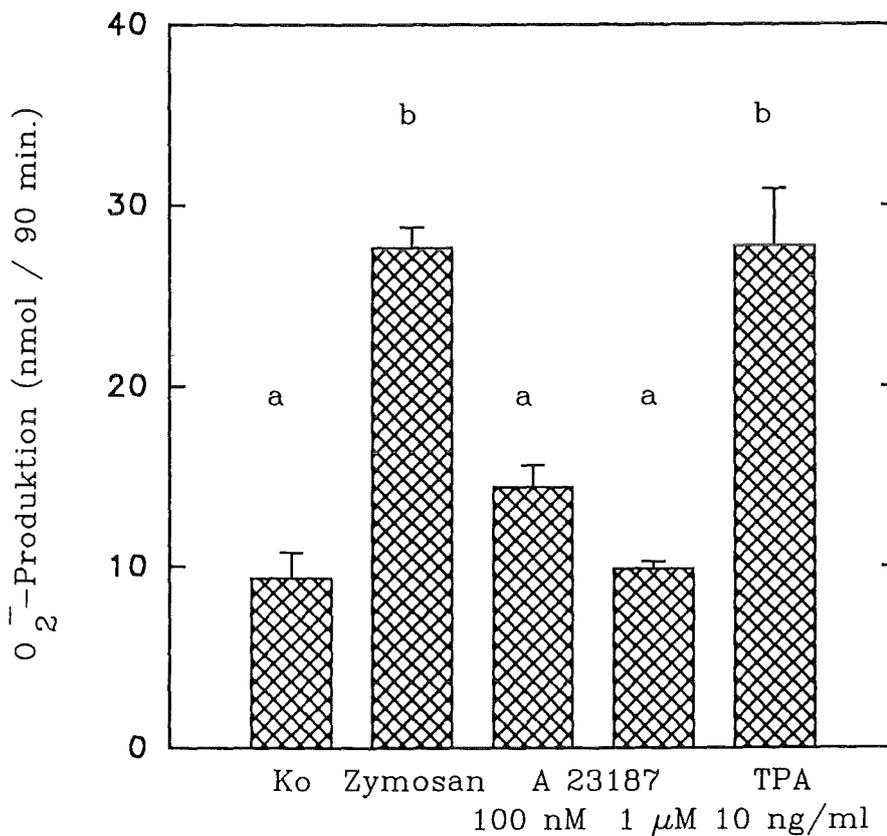
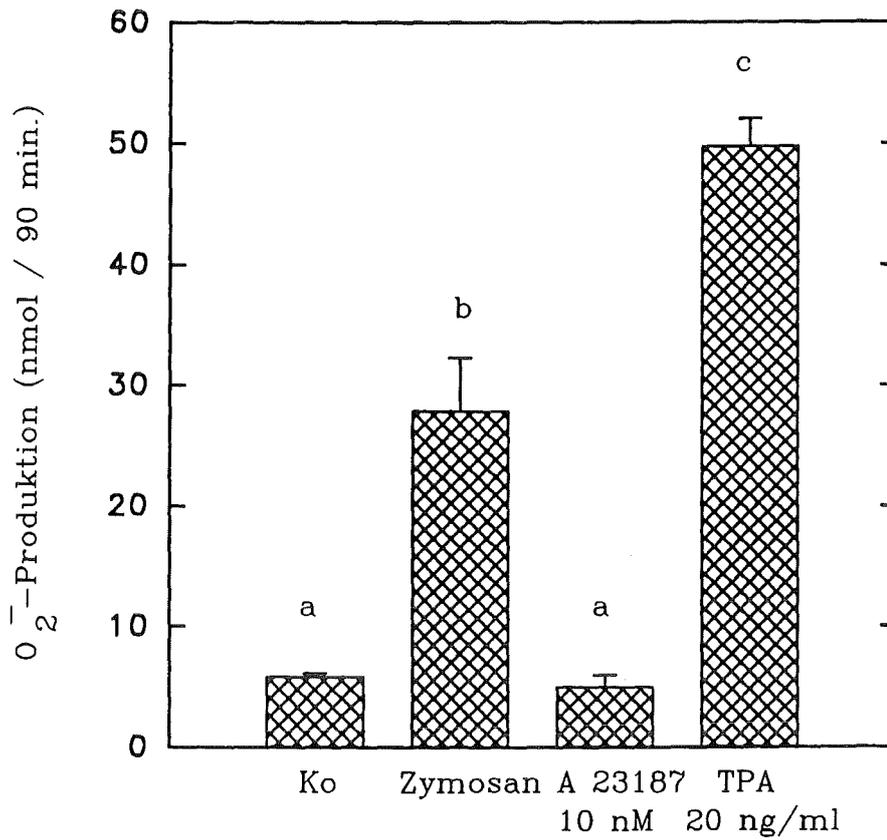


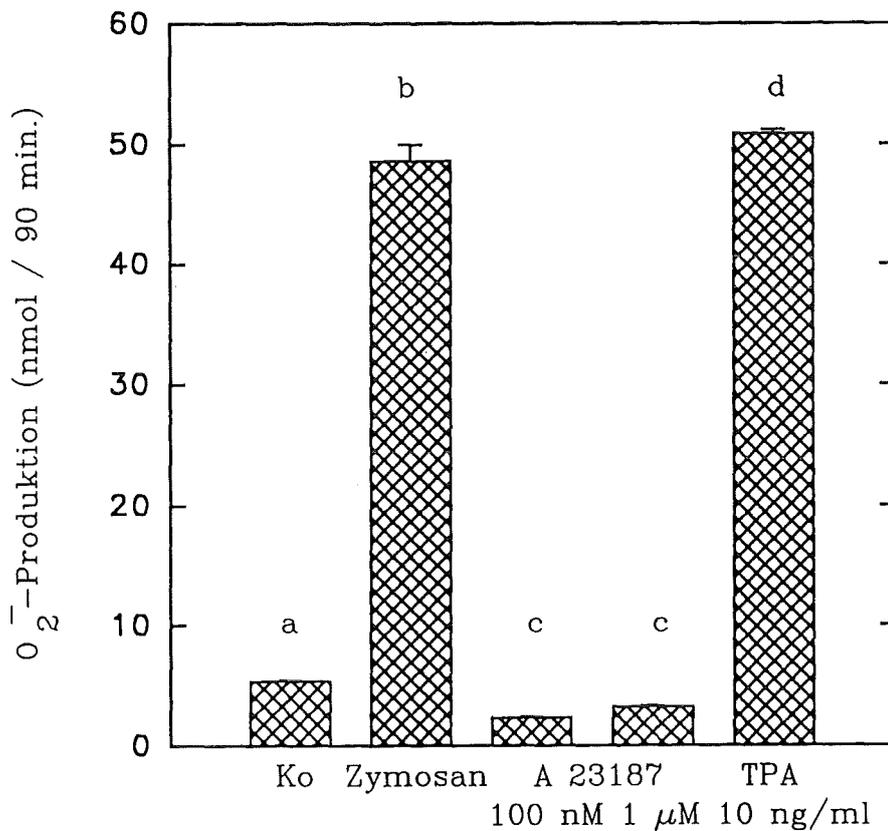
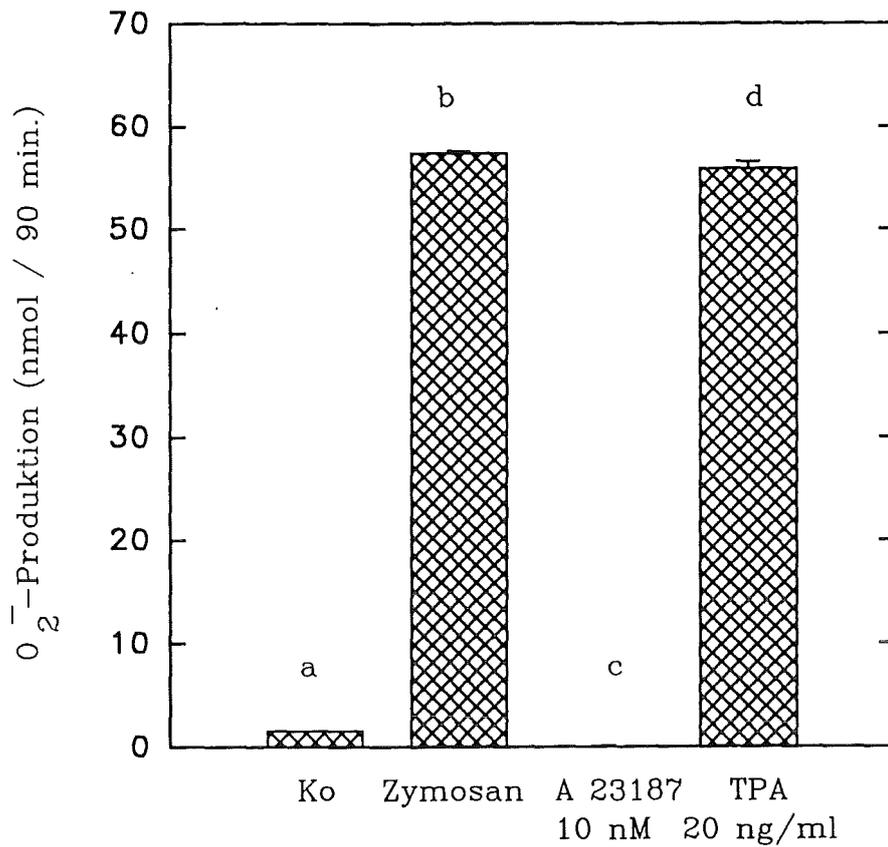
Abbildung 18:  
Einfluß von A 23187 und TPA auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM nach Gasphasenkultur.

Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).

Obere Abbildung: Versuch mit nicht voraktivierten Zellen (n = 6)

Untere Abbildung: Versuch mit schwach voraktivierten Zellen (n = 6)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt.



**Abbildung 19:**  
Einfluß von A 23187 und TPA auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM nach Submerskultur.

Positivkontrollansatz mit Zymosan (1 mg/ml).

Obere Abbildung: Versuch mit nicht voraktivierten Zellen (n = 6)

Untere Abbildung: Versuch mit schwach voraktivierten Zellen (n = 6)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt.

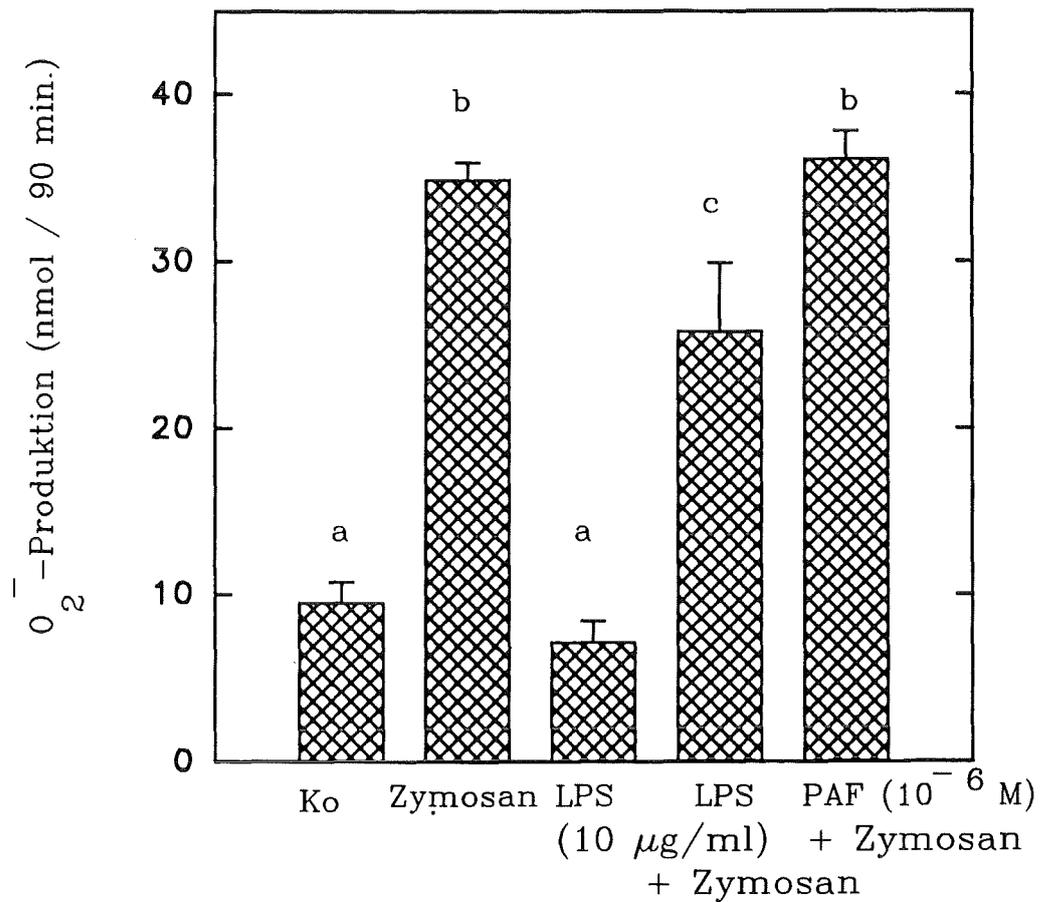


Abbildung 20:

Einfluß einer Applikation von Zymosan und LPS, sowie einer Kombination von LPS und PAF mit Zymosan auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM in Gasphase.  
(n = 6)

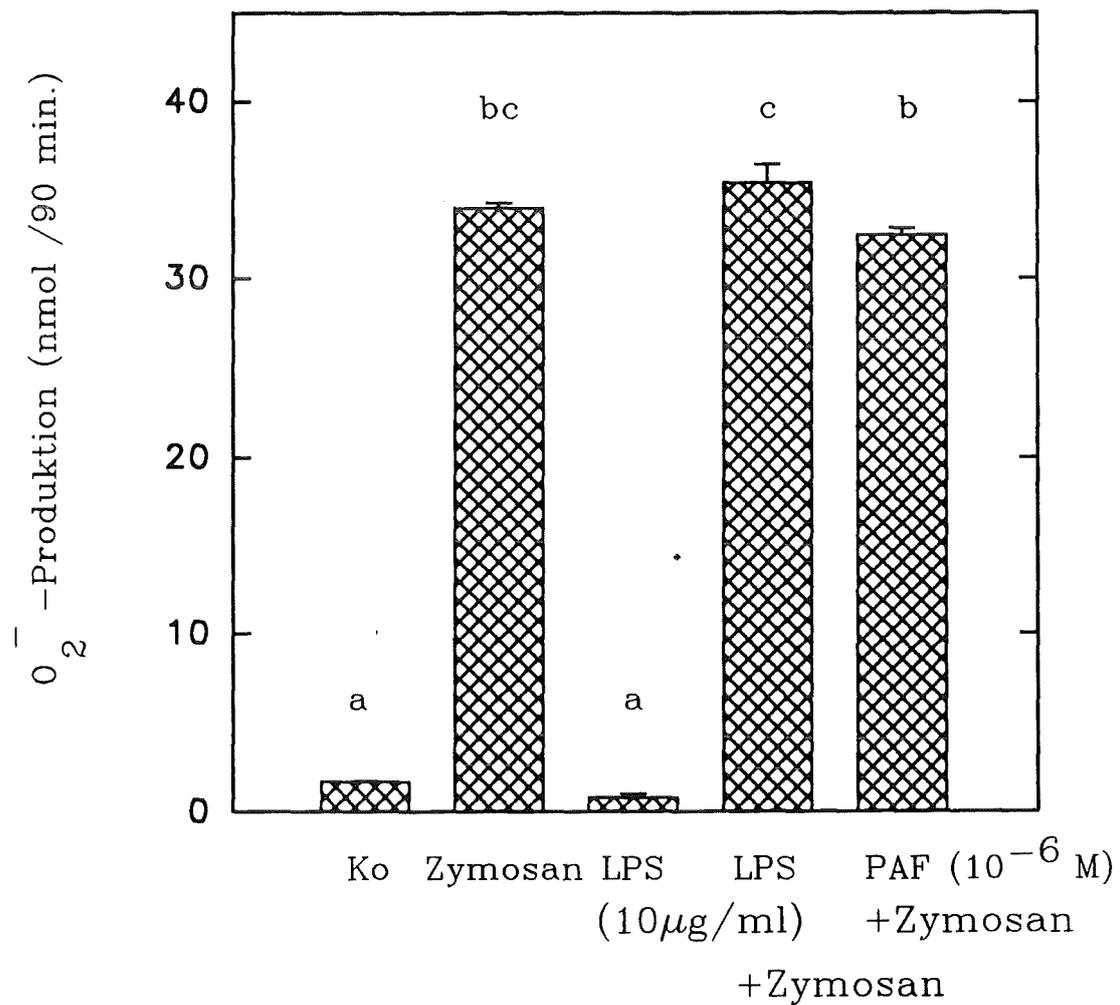


Abbildung 21:  
 Einfluß einer Applikation von Zymosan und LPS, sowie einer Kombination von LPS und PAF mit Zymosan auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM in Submerskultur.  
 (n = 6)

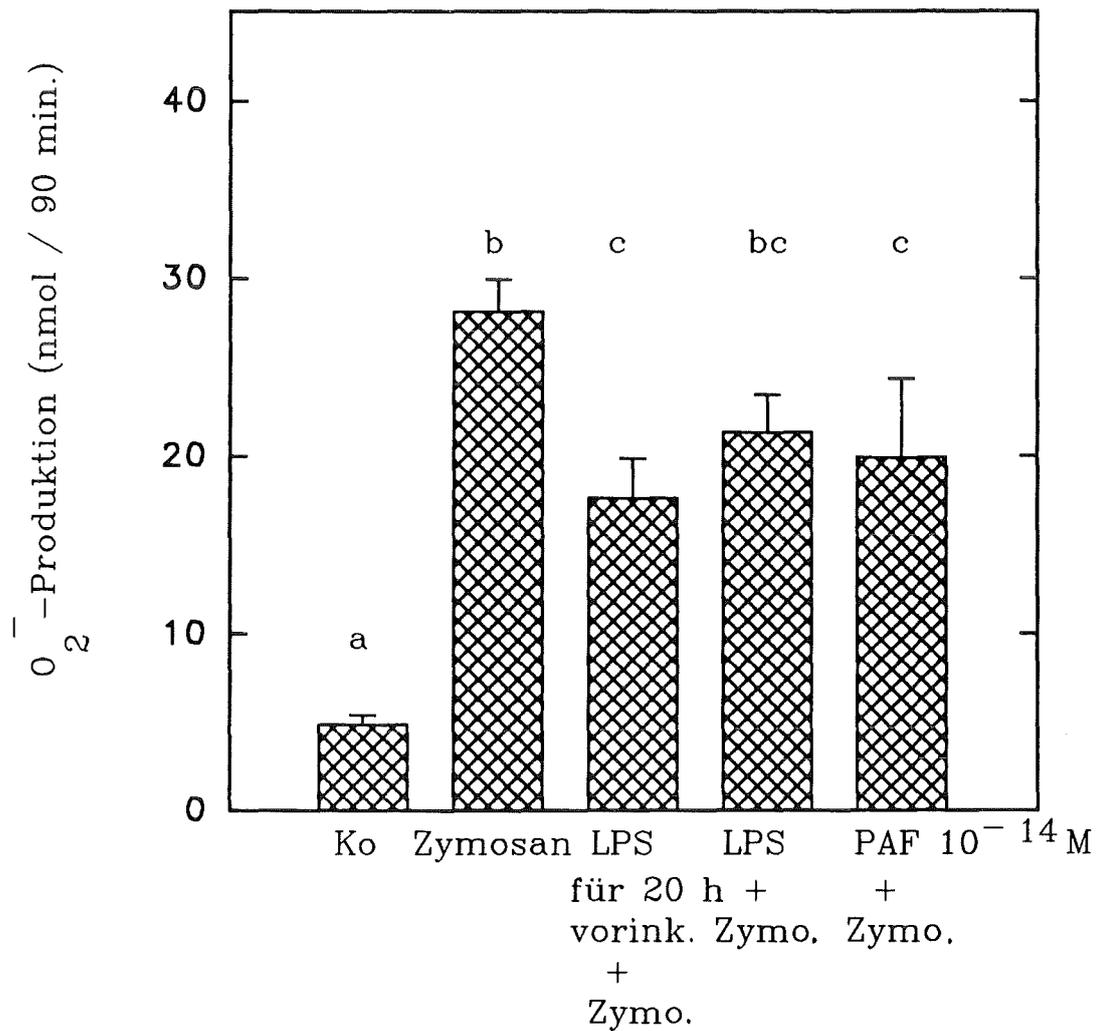


Abbildung 22:

Kultur von RAM in Gasphase und anschließende Messung von  $O_2^-$ . Bei Säule drei wurden die Alveolarmakrophagen 20 Stunden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  LPS vorinkubiert und dann mit Zymosan zur  $O_2^-$ -Sekretion stimuliert. Bei den übrigen Ansätzen wurden Zymosan und zusätzlicher Stimulus gleichzeitig appliziert.

Positivkontrollansatz mit Zymosan ( $1 \text{ mg/ml}$ ).

Einzelversuch ( $n = 3$ )

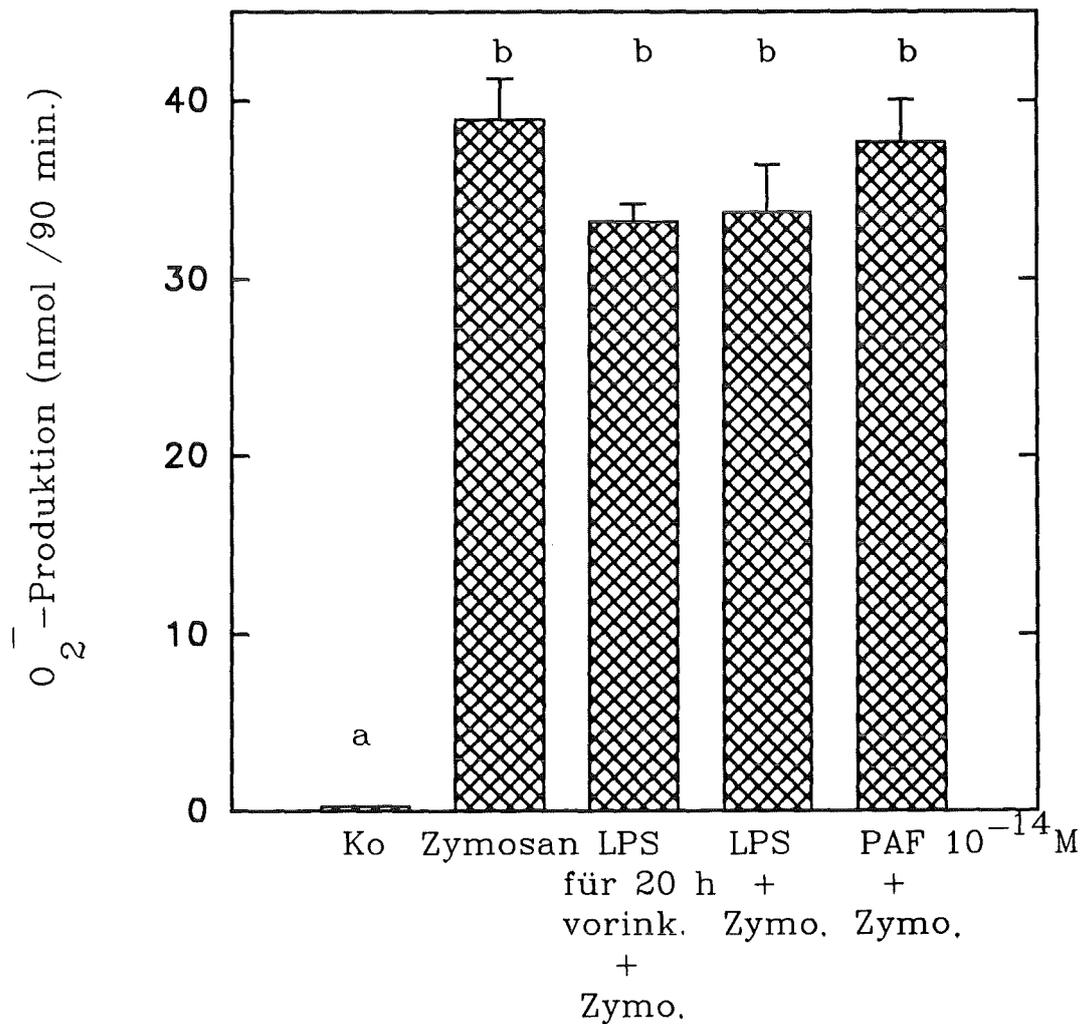


Abbildung 23:

Kultur von RAM in Submerskultur und anschließende Messung von  $O_2^-$ . Bei Säule drei wurden die Alveolarmakrophagen 20 Stunden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  LPS vorinkubiert und dann mit Zymosan zur  $O_2^-$ -Sekretion stimuliert. Bei den übrigen Ansätzen wurden Zymosan und zusätzlicher Stimulus gleichzeitig appliziert.

Positivkontrollansatz mit Zymosan ( $1 \text{ mg/ml}$ ).

Einzelversuch ( $n = 3$ )

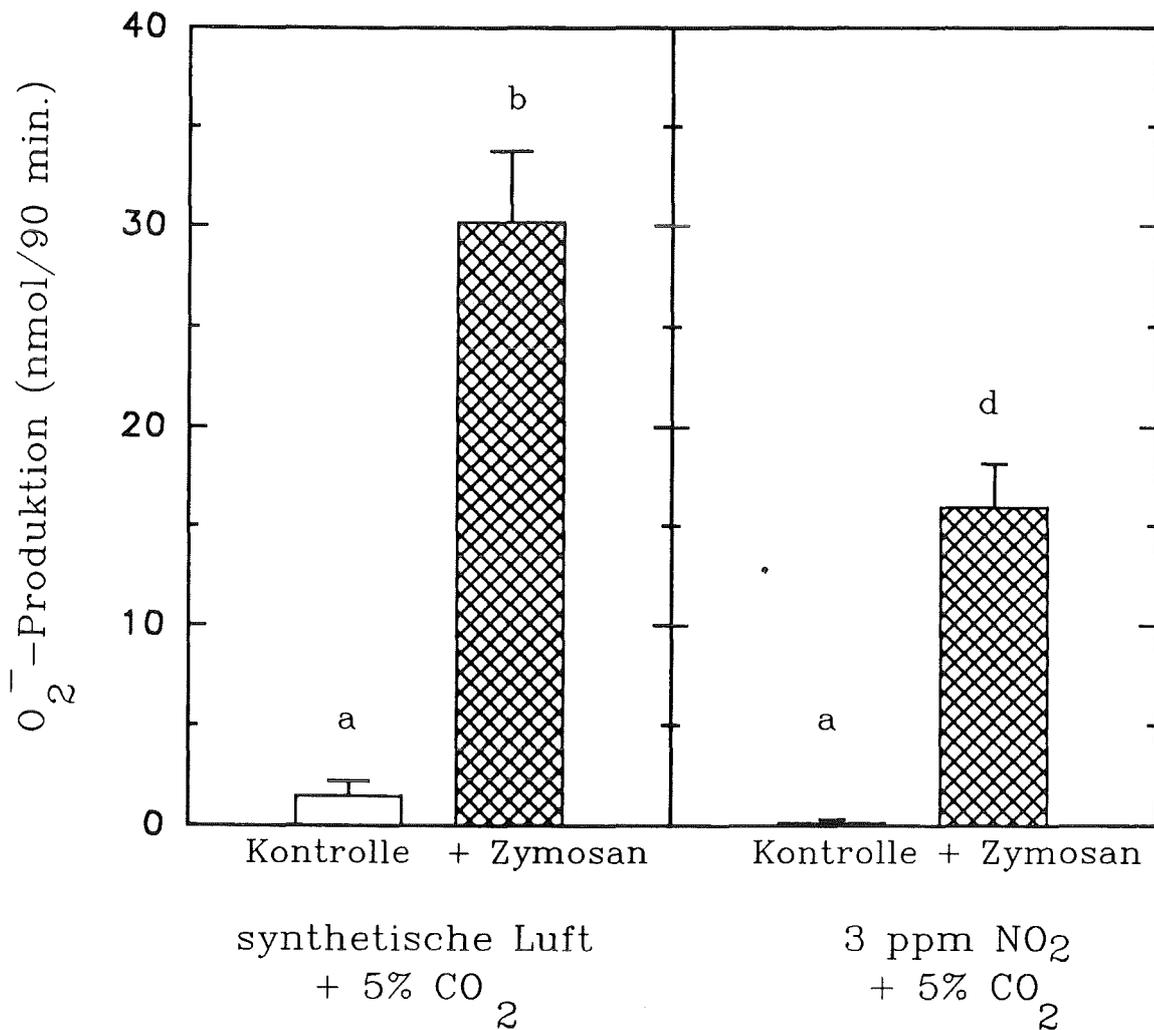


Abbildung 24:

Einfluß einer  $NO_2$ -Exposition auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM.

Im linken Teil der Abbildung wird die unstimulierte und die Zymosan-stimulierte Sekretion nach Inkubation in der Luftkammer gezeigt, im rechten Teil der Abbildung nach 3 ppm  $NO_2$  (2stündige Inkubation mit Gas).

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 12).

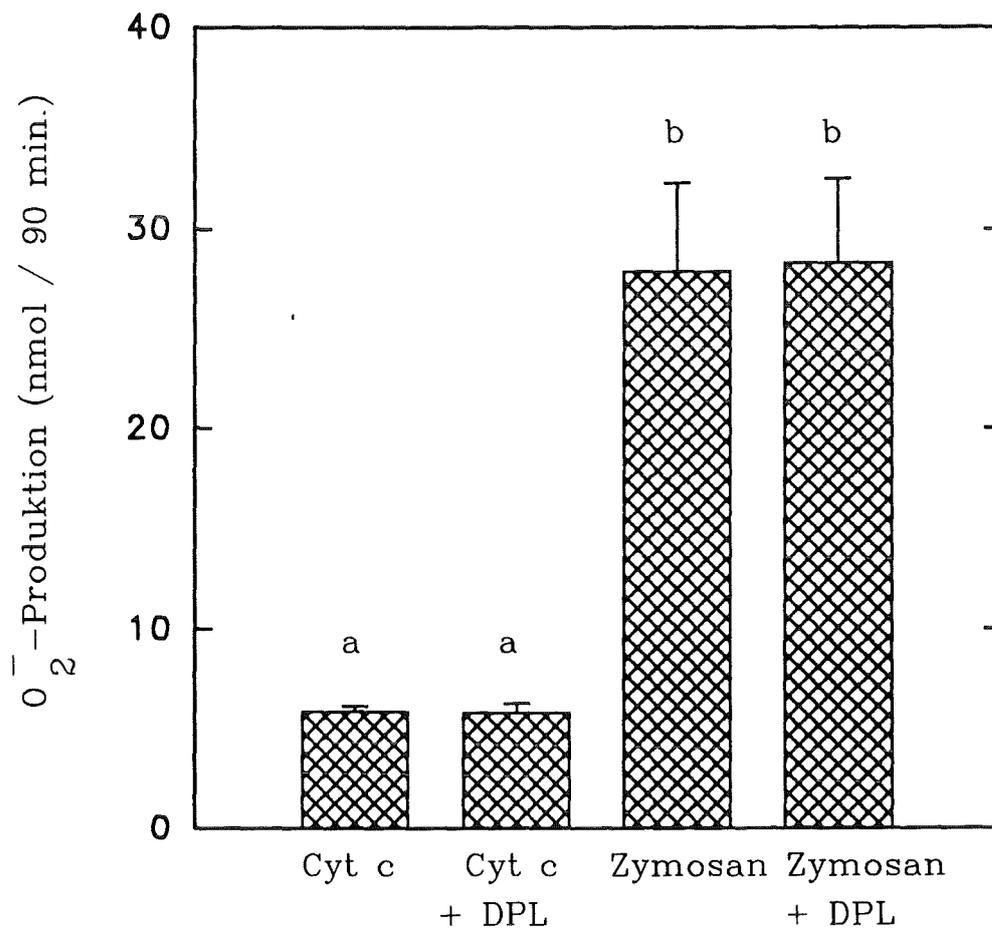


Abbildung 25:

Einfluß von DPL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die spontane und Zymosan-stimulierte  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM (2stündige Inkubation mit Luft, n = 12).

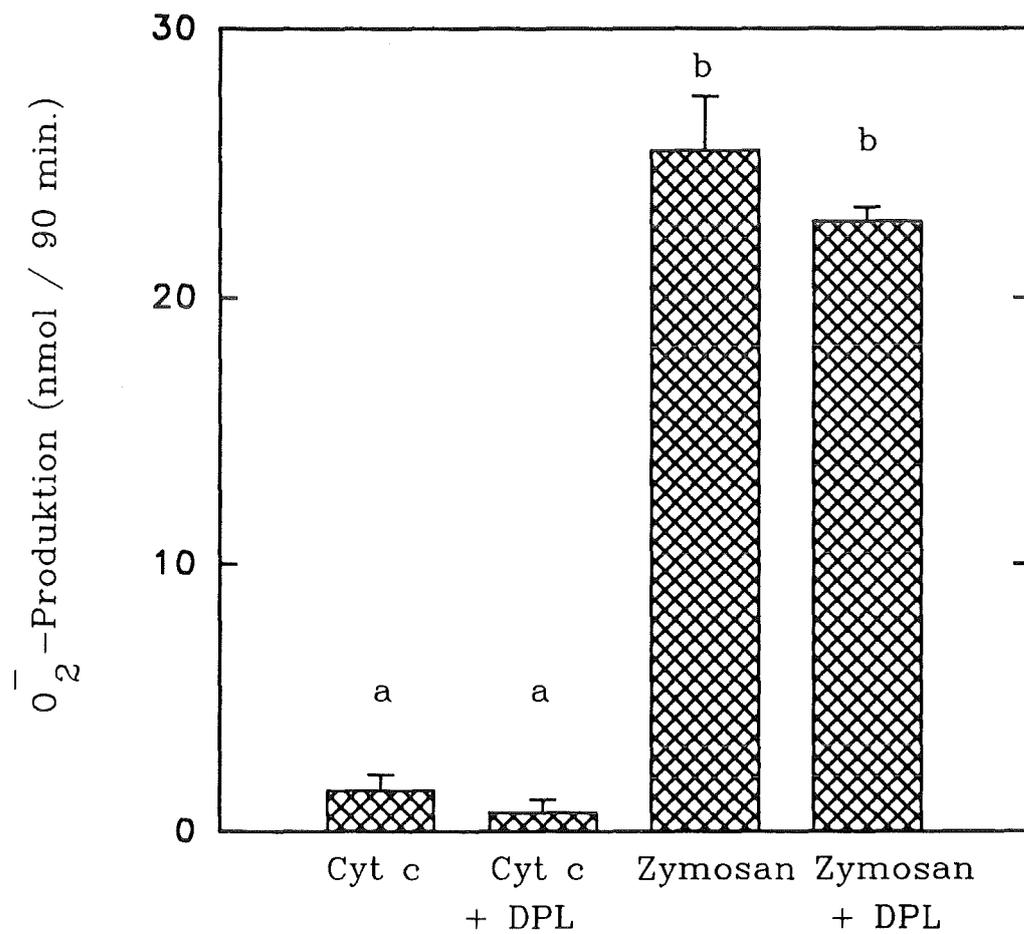


Abbildung 26:

Einfluß von DPL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die spontane und Zymosan-stimulierte  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM (2stündige Inkubation mit 3 ppm  $NO_2$ , n = 12)

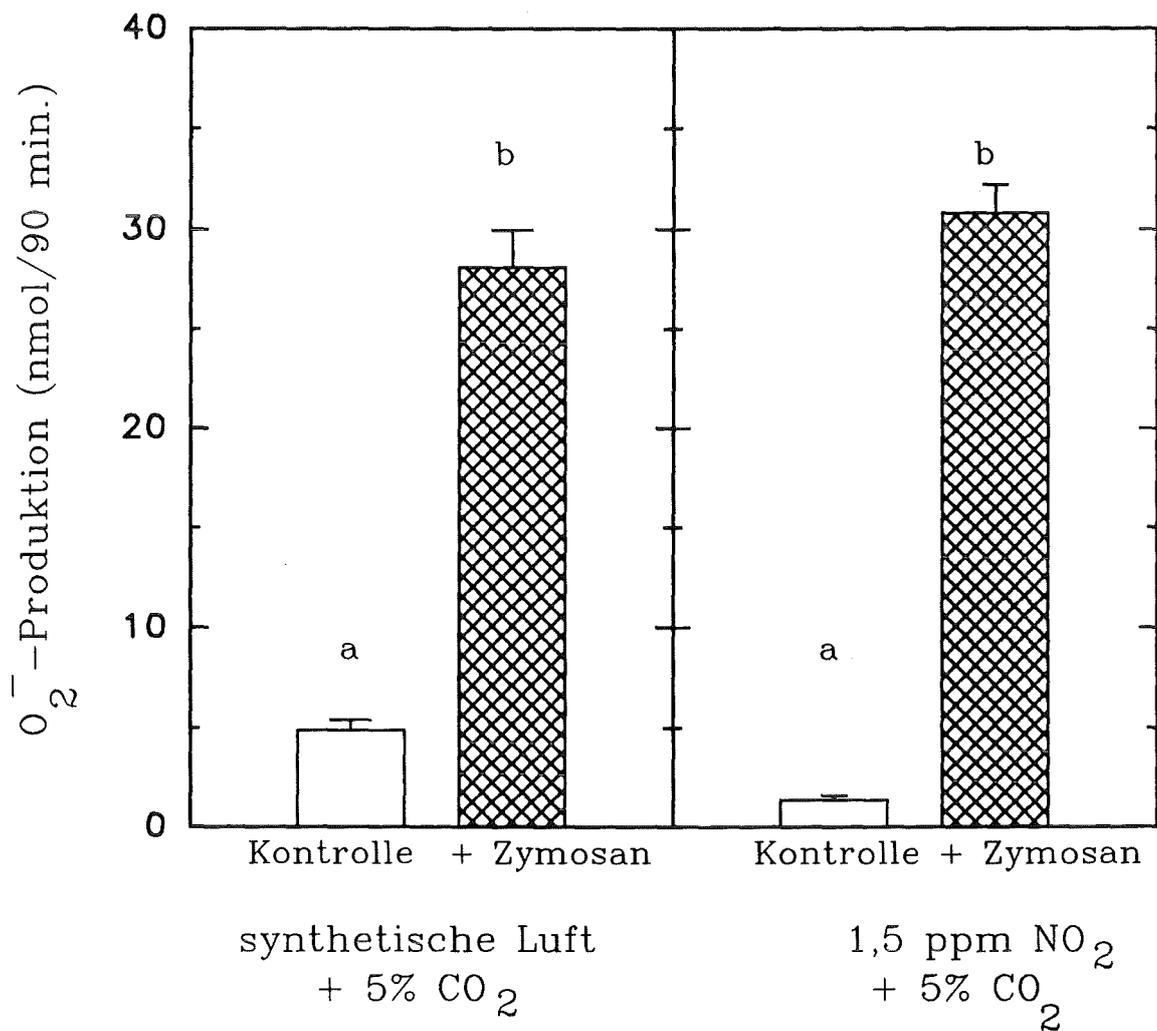


Abbildung 27:

Einfluß einer NO<sub>2</sub>-Exposition auf die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung von RAM.

Im linken Teil der Abbildung wird die unstimulierte und die Zymosan-stimulierte Sekretion nach Inkubation in der Luftkammer gezeigt, im rechten Teil der Abbildung nach 3 ppm NO<sub>2</sub> (2stündige Inkubation mit Gas).

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 9).

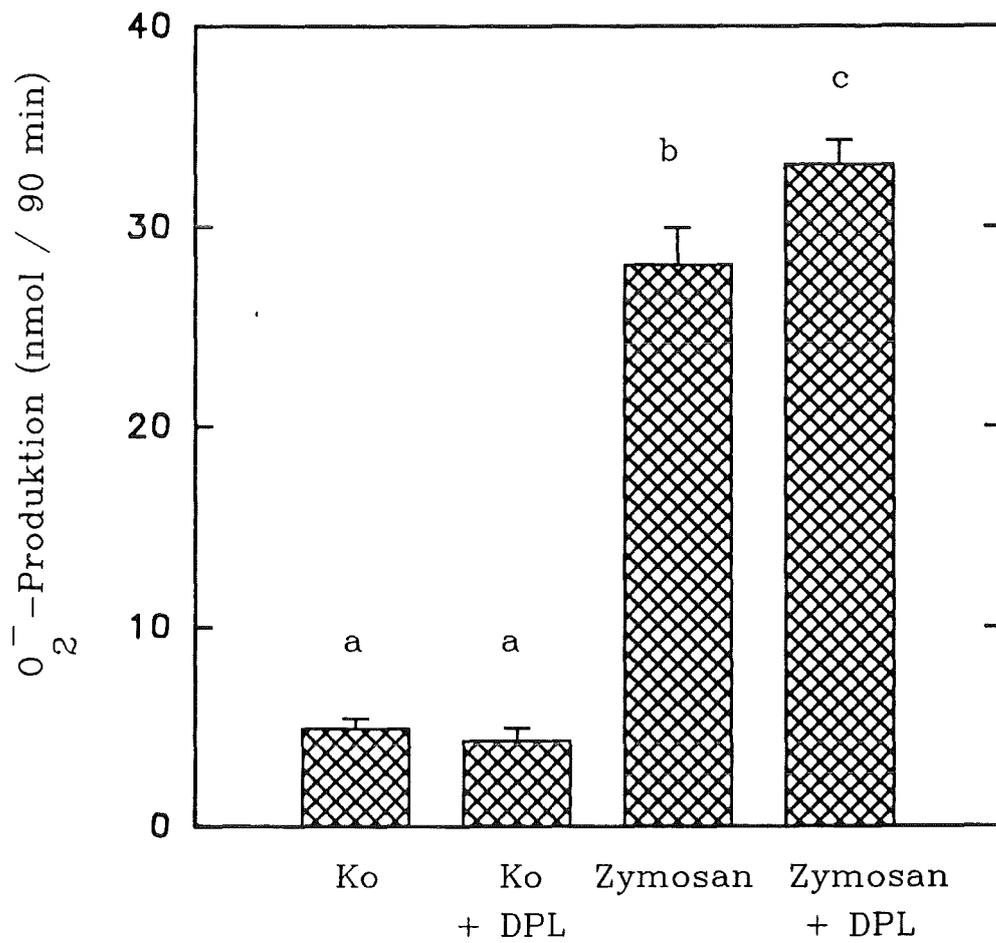


Abbildung 28:  
Einfluß von DPL (100  $\mu$ g/ml) auf die spontane und Zymosan-stimulierte  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM (2stündige Inkubation mit Luft, n = 9)

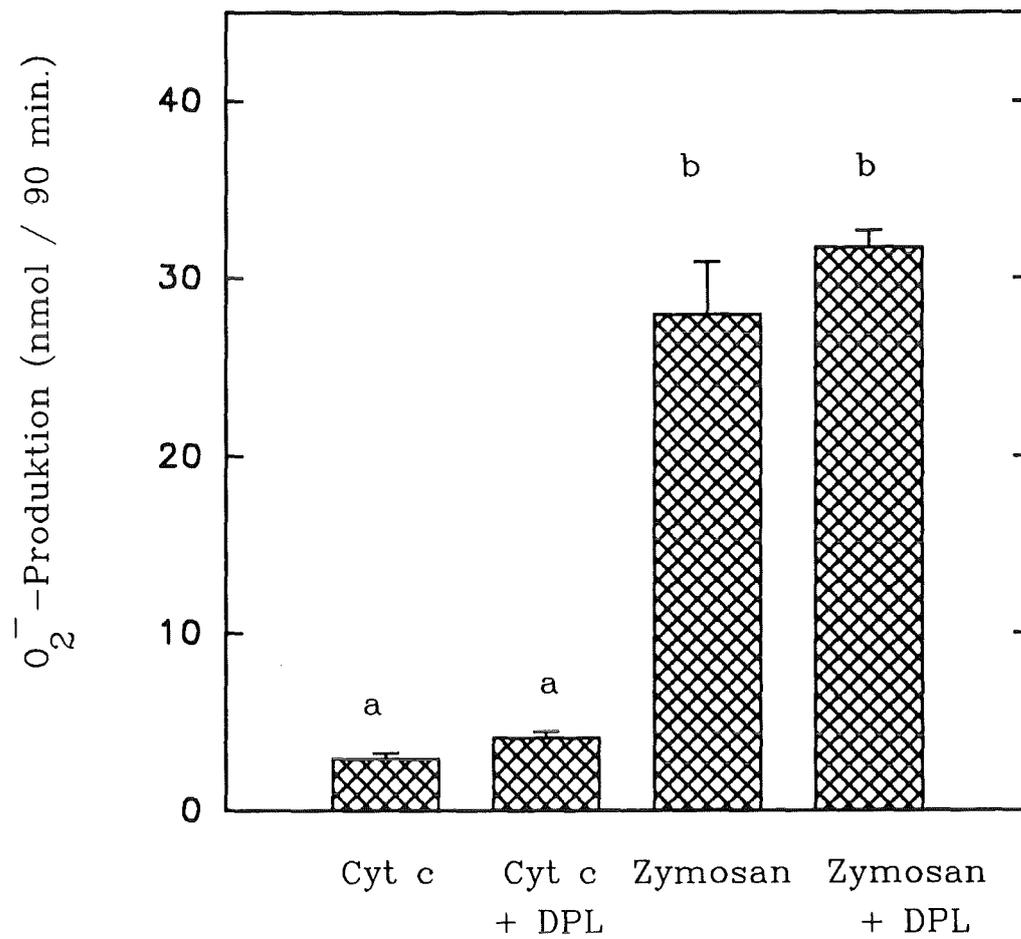


Abbildung 29:  
 Einfluß von DPL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die spontane und Zymosan-stimulierte  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM (2stündige Inkubation mit 1.5 ppm  $NO_2$ , n = 9)

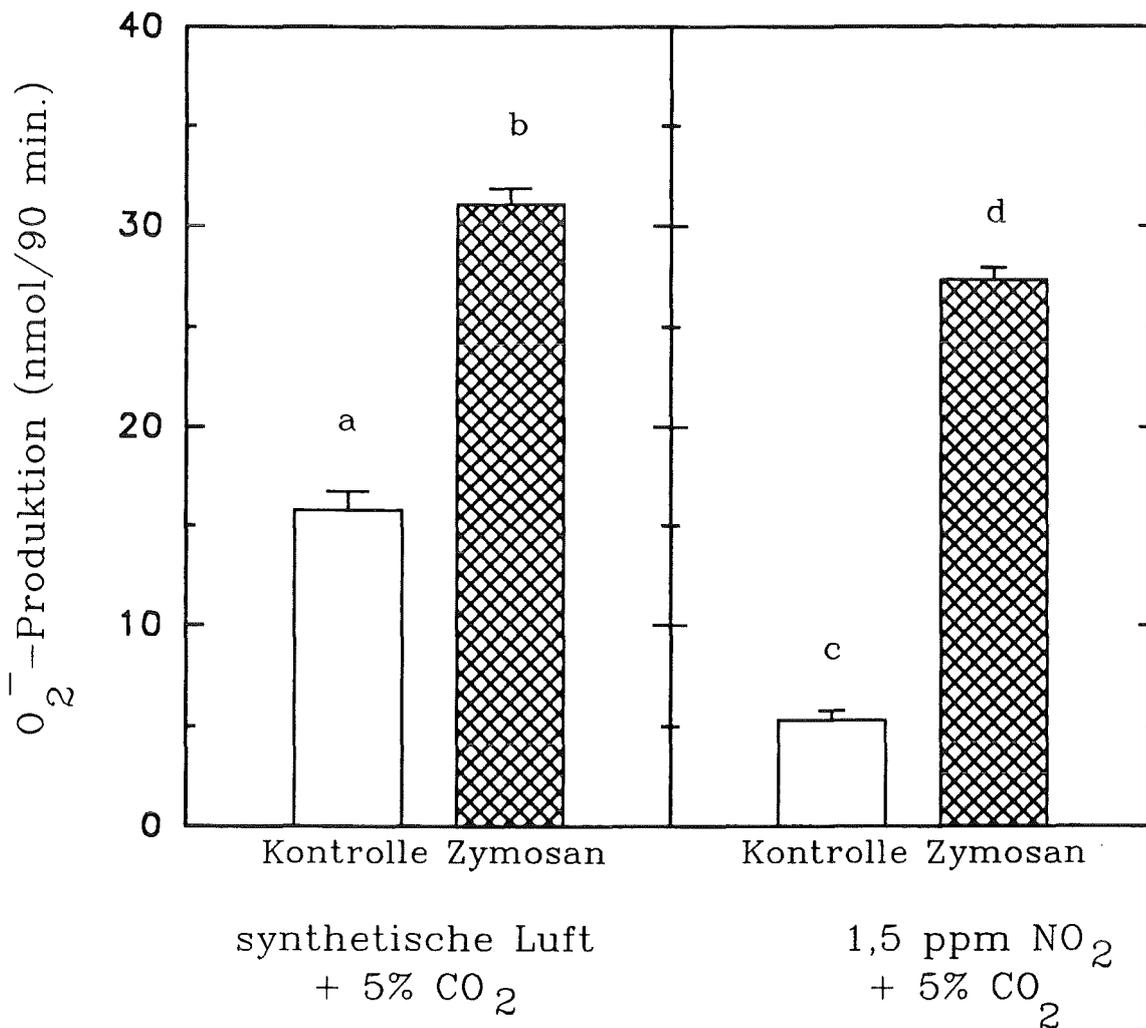


Abbildung 30:

Einfluß einer  $NO_2$ -Exposition auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM.

Im linken Teil der Abbildung wird die vorstimulierte und die Zymosan-stimulierte Sekretion nach Inkubation in der Luftkammer gezeigt, im rechten Teil der Abbildung nach 1,5 ppm  $NO_2$  (2stündige Inkubation mit Gas).

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 6).

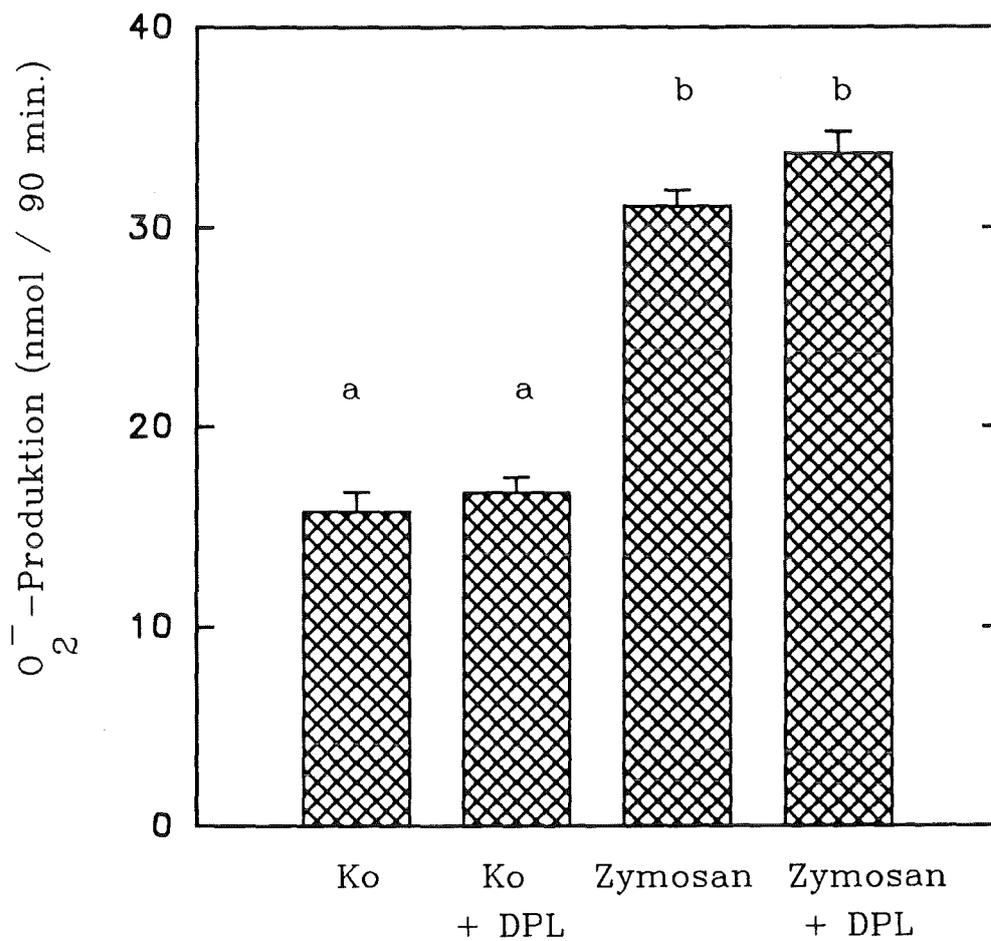


Abbildung 31:  
 Einfluß von DPL (100 µg/ml) auf die vorstimulierte und Zymosan-stimulierte  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM (2stündige Inkubation mit Luft, n = 6).

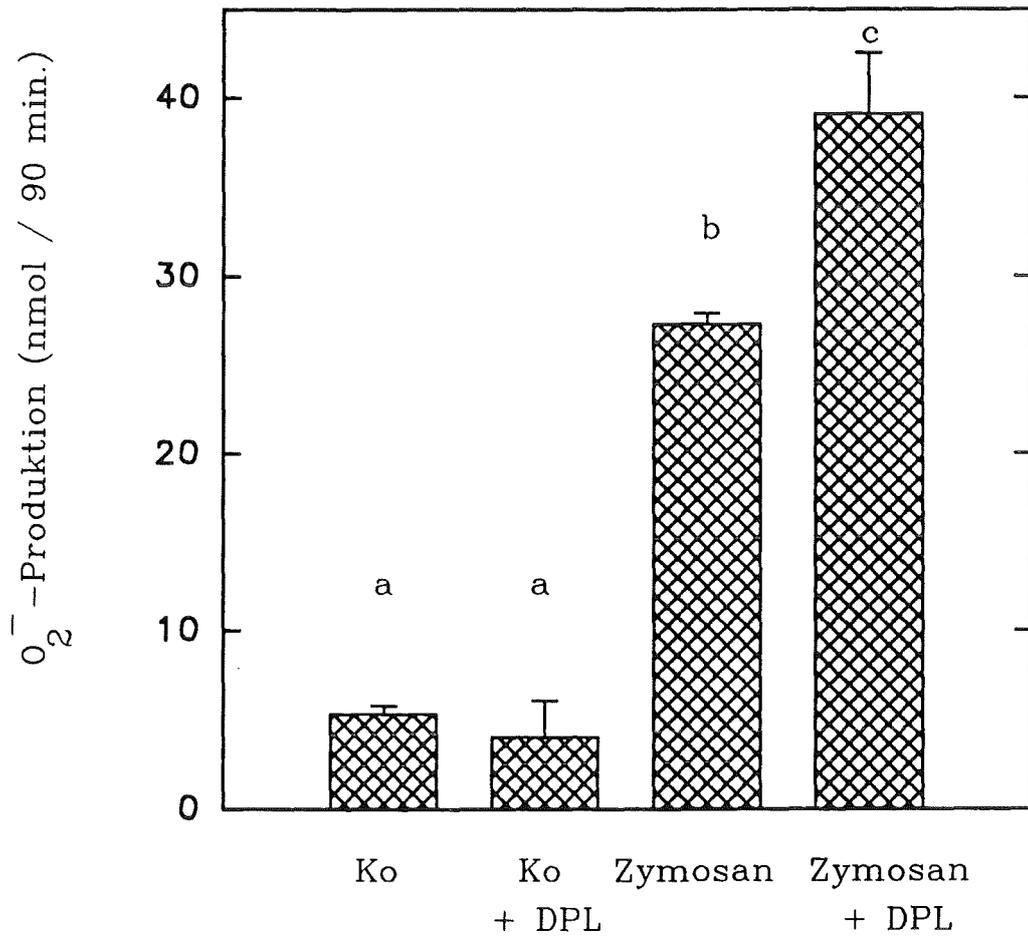


Abbildung 32:

Einfluß von DPL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die vorstimulierte und Zymosan-stimulierte  $O_2^-$ -Freisetzung bei voraktivierten RAM nach 1,5 ppm  $NO_2$  (2stündige Inkubation mit  $NO_2$ ).

(n = 6).

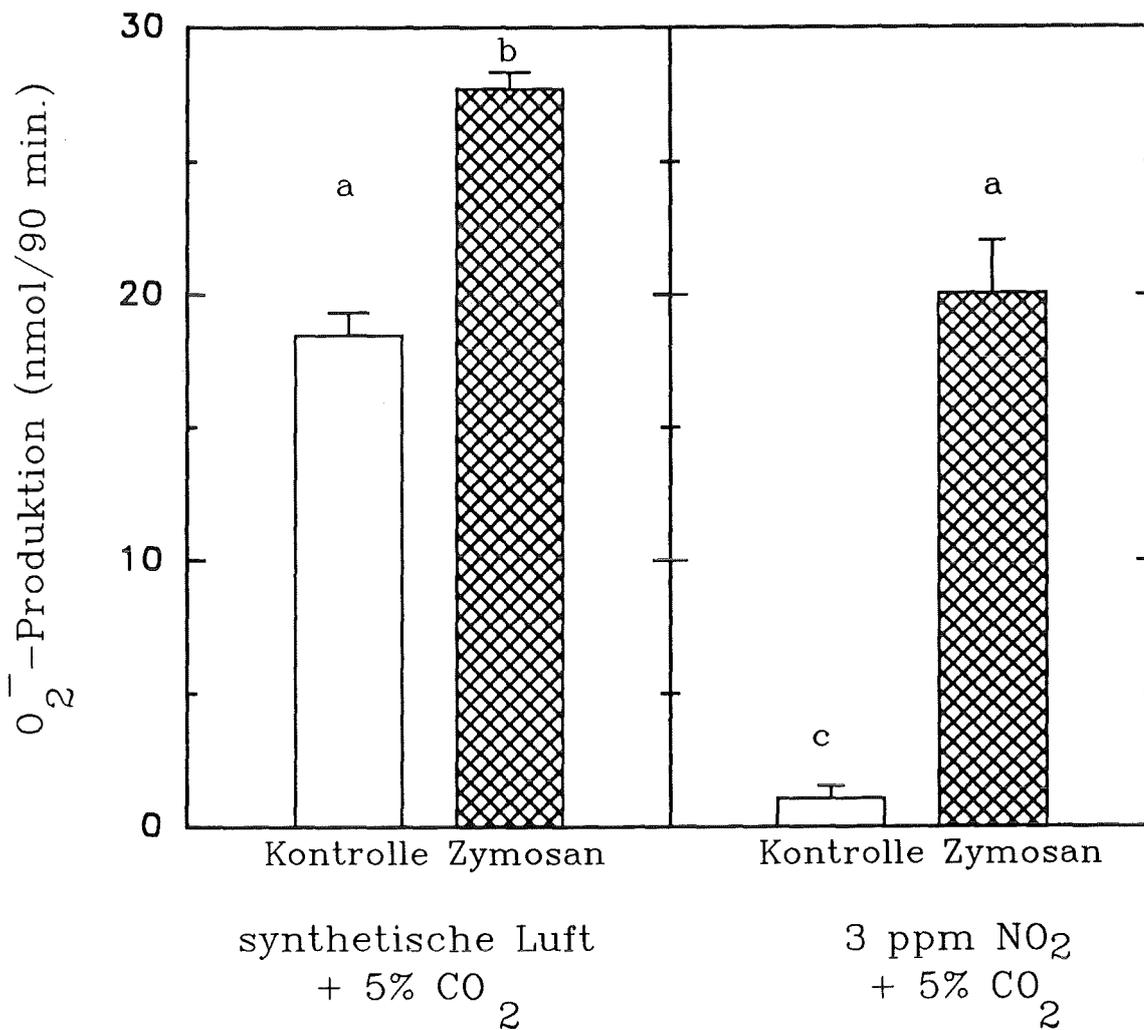


Abbildung 33:

Einfluß einer NO<sub>2</sub>-Exposition auf die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung von RAM.

Im linken Teil der Abbildung wird die vorstimulierte und die Zymosan-stimulierte Sekretion nach Inkubation in der Luftkammer gezeigt, im rechten Teil der Abbildung nach 3 ppm NO<sub>2</sub> (2stündige Inkubation mit Gas).

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 12).

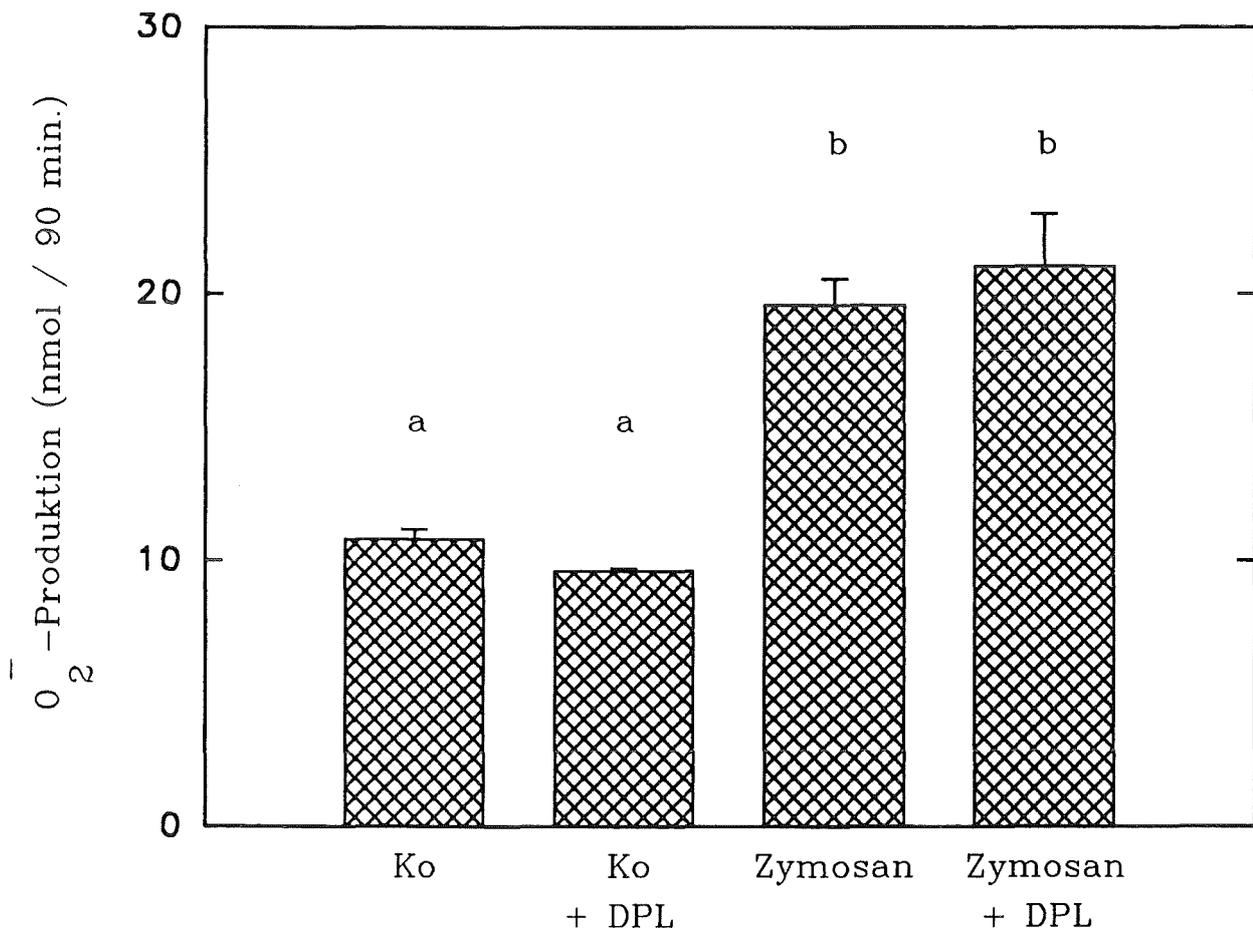


Abbildung 34:

Einfluß von DPL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die vorstimulierte und Zymosan-stimulierte  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM (2stündige Inkubation mit Luft, n = 6).

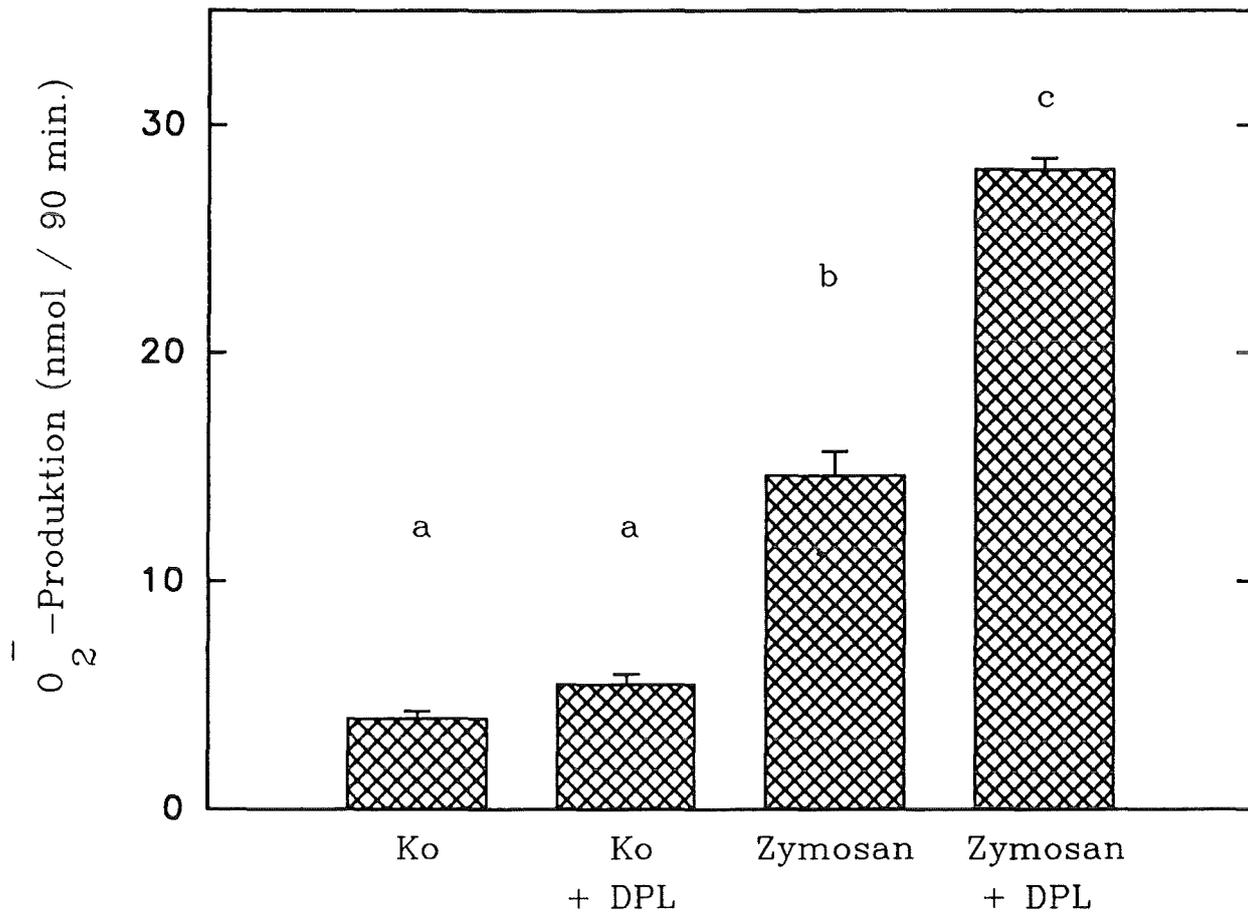


Abbildung 35:

Einfluß von DPL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die vorstimulierte und Zymosan-stimulierte  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM (2stündige Inkubation mit 3 ppm  $NO_2$ , n = 6).

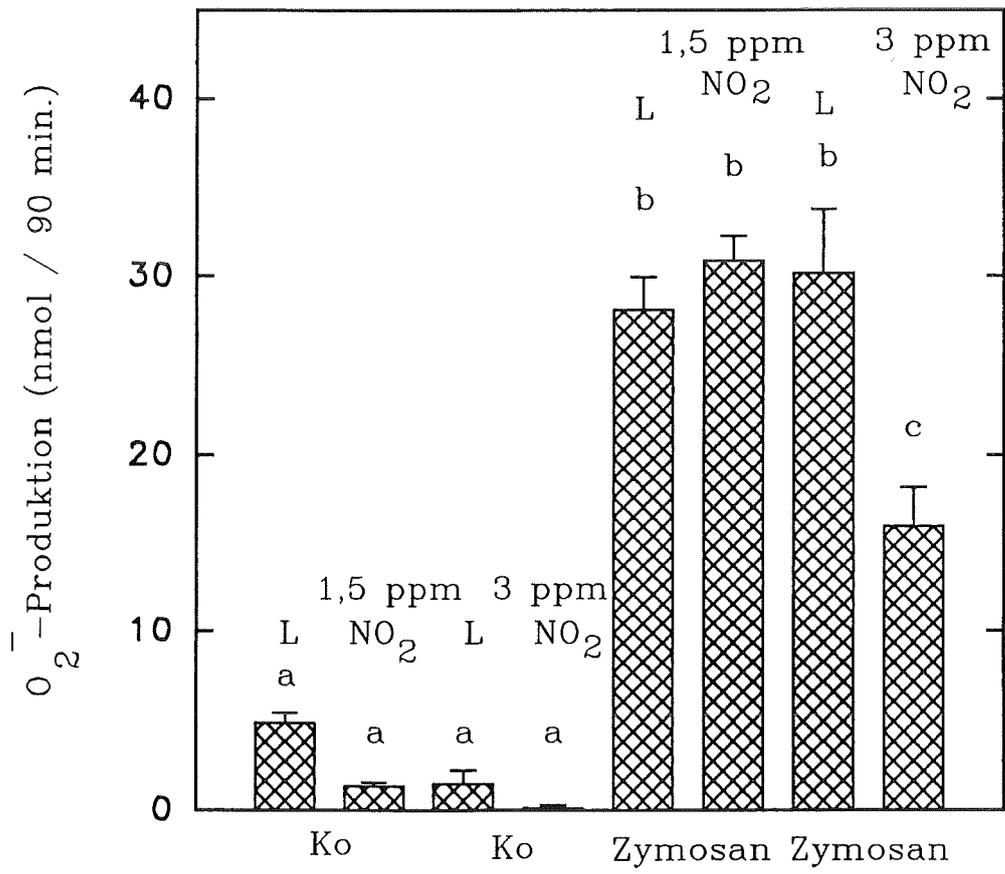


Abbildung 36:  
 Vergleichende Übersicht der spontanen und Zymosan-stimulierten  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM mit Luft (L) bzw. mit 1,5 und 3 ppm  $NO_2$  ( $NO_2$ ).  
 (2stündige Inkubation mit Gas, n = 6).

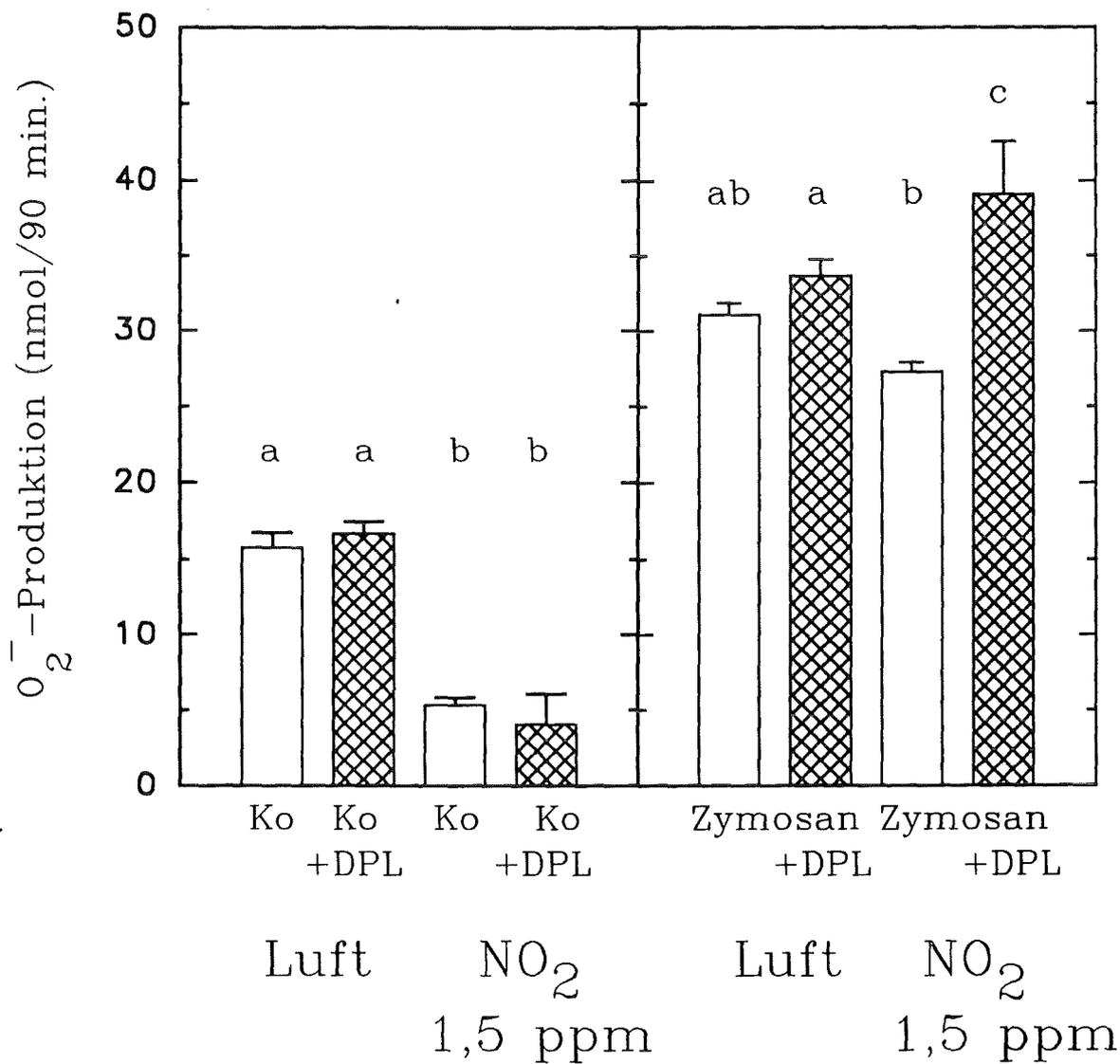


Abbildung 37:

Vergleichende Übersicht der spontanen und Zymosan-stimulierten  $O_2^-$ -Freisetzung von RAM mit Luft bzw. mit 1,5 ppm  $NO_2$ . Quantifizierung des Einflusses von DPL und der Vorstimulierung der Zellen (2stündige Inkubation mit Gas, n = 6).

Die statistische Analyse wurde für die linke und die rechte Hälfte der Abbildung getrennt durchgeführt.

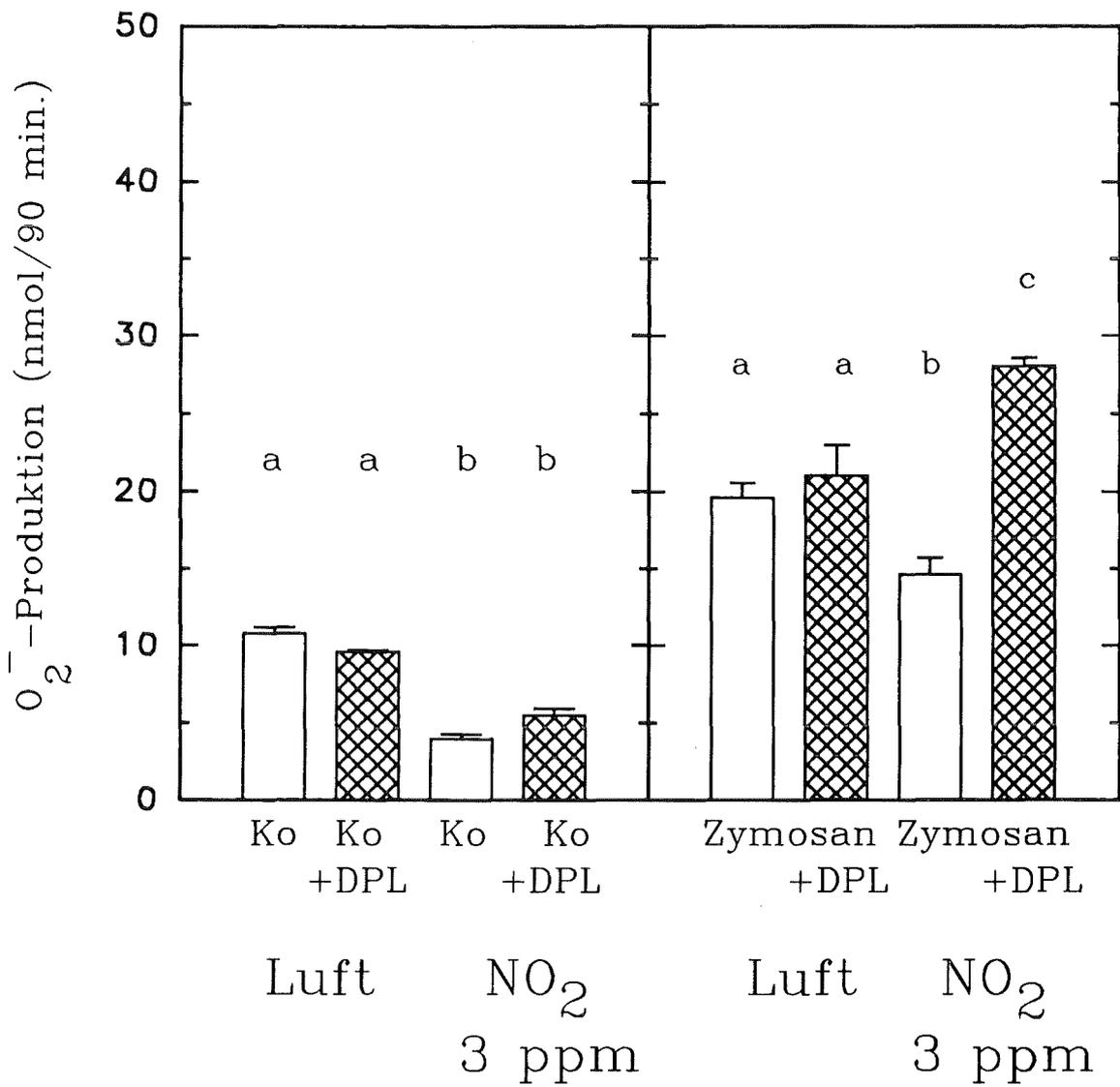


Abbildung 38:

Vergleichende Übersicht der spontanen und Zymosan-stimulierten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung von RAM mit Luft bzw. mit 3 ppm NO<sub>2</sub>. Quantifizierung des Einflusses von DPL und der Vorstimulierung der Zellen (2stündige Inkubation mit Gas, n = 6).

Die statistische Analyse wurde für die linke und die rechte Hälfte der Abbildung getrennt durchgeführt.

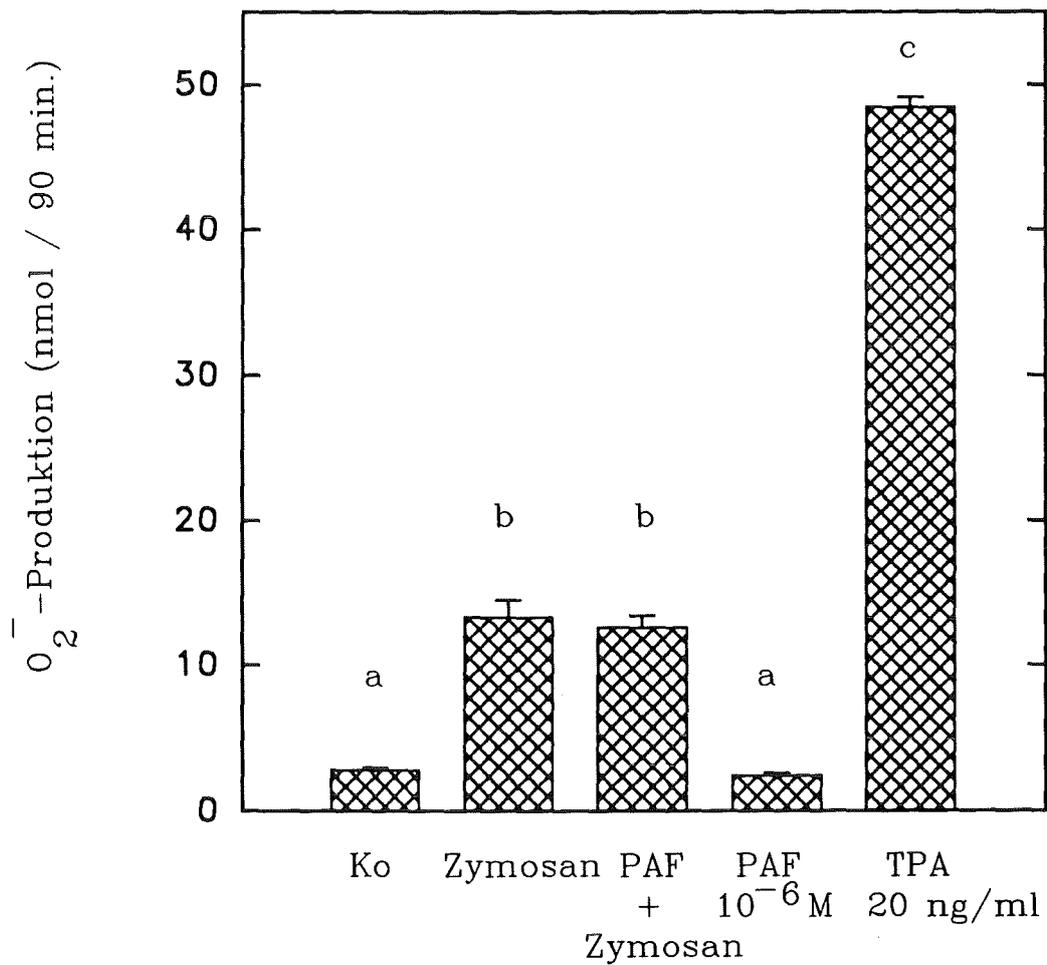


Abbildung 39:

Einfluß verschiedener Stimulanzen auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von HL60-Makrophagen nach Gasphasenkultur. Die Stimulation erfolgte mit Zymosan (1 mg/ml) und/oder PAF ( $10^{-6}$ M) und TPA (20 ng/ml).

(n = 6)

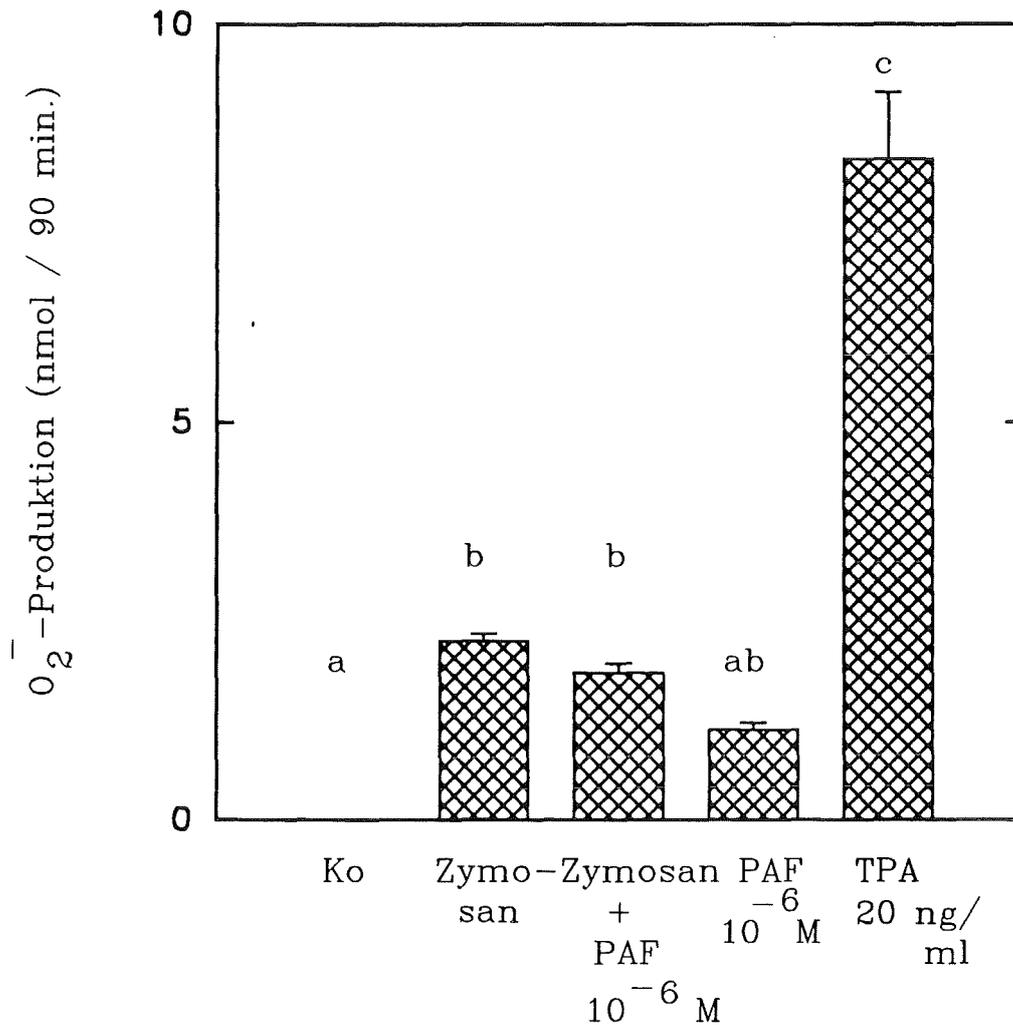


Abbildung 40:

Einfluß verschiedener Stimulanzen auf die  $O_2^-$ -Freisetzung von HL60-Granulocyten nach Gasphasenkultur. Die Stimulation erfolgte mit Zymosan (1 mg/ml) und/oder PAF ( $10^{-6}M$ ) und TPA (20 ng/ml).

Einzelversuch (n = 3)

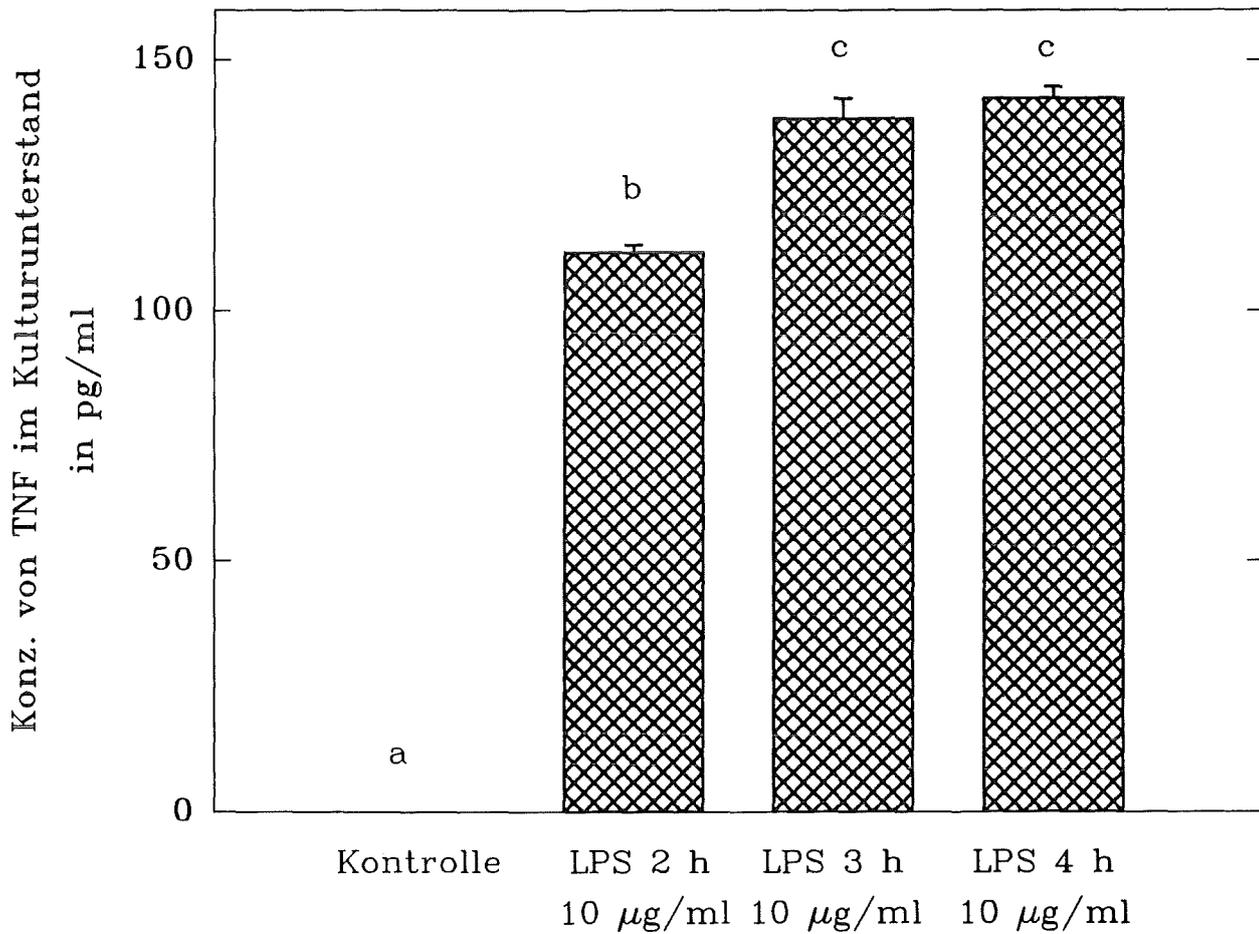


Abbildung 41:  
Zeitabhängigkeit der stimulierten TNF-Freisetzung durch RAM nach Gasphasenkultur.  
Die Stimulation der Zellen erfolgte mit LPS für 2, 3 und 4 Stunden.  
(n = 9).

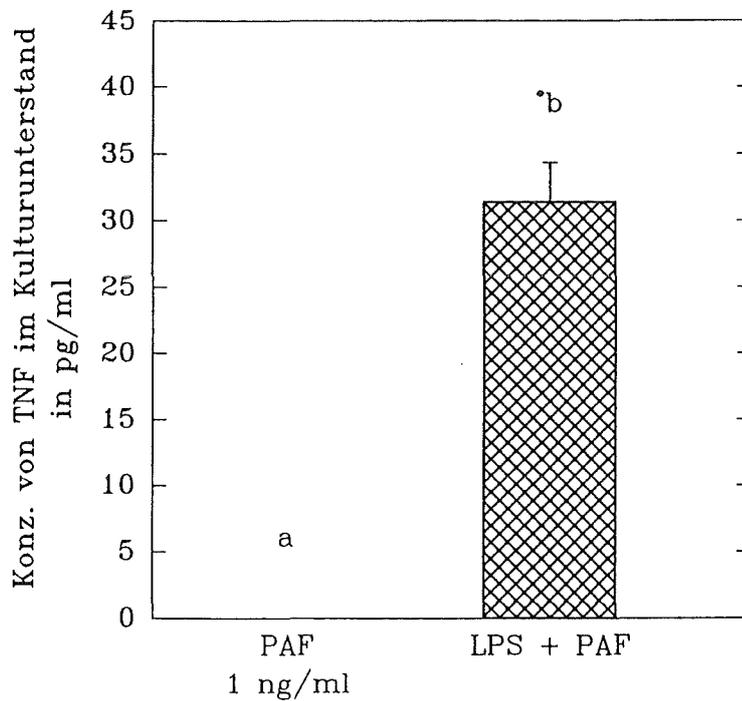
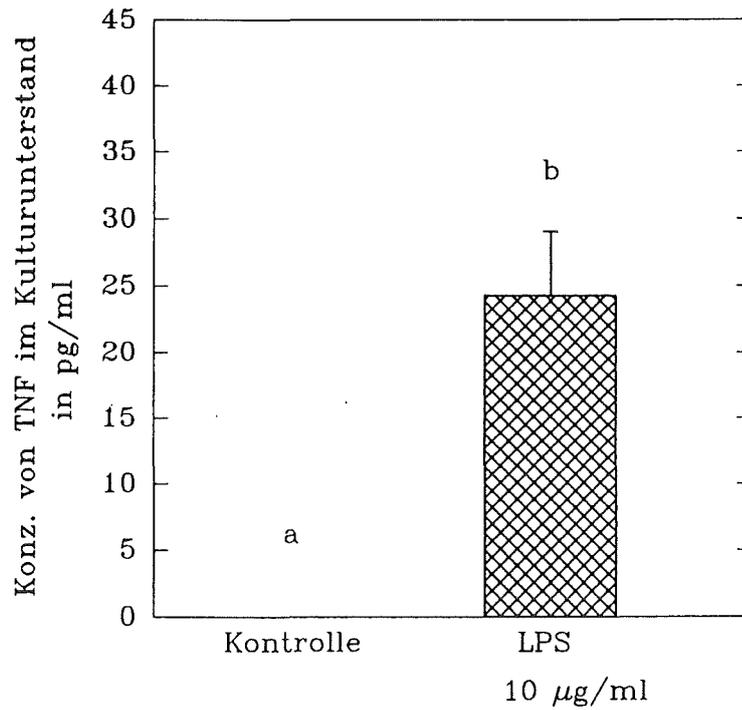


Abbildung 42:  
 Einfluß verschiedener Stimulanzen auf die TNF-Sekretion von RAM nach Gasphasenkultur. Die Stimulation erfolgte mit LPS, PAF und einer Kombinationsapplikation (2stündige Inkubation mit den Agenzien).  
 Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 9).

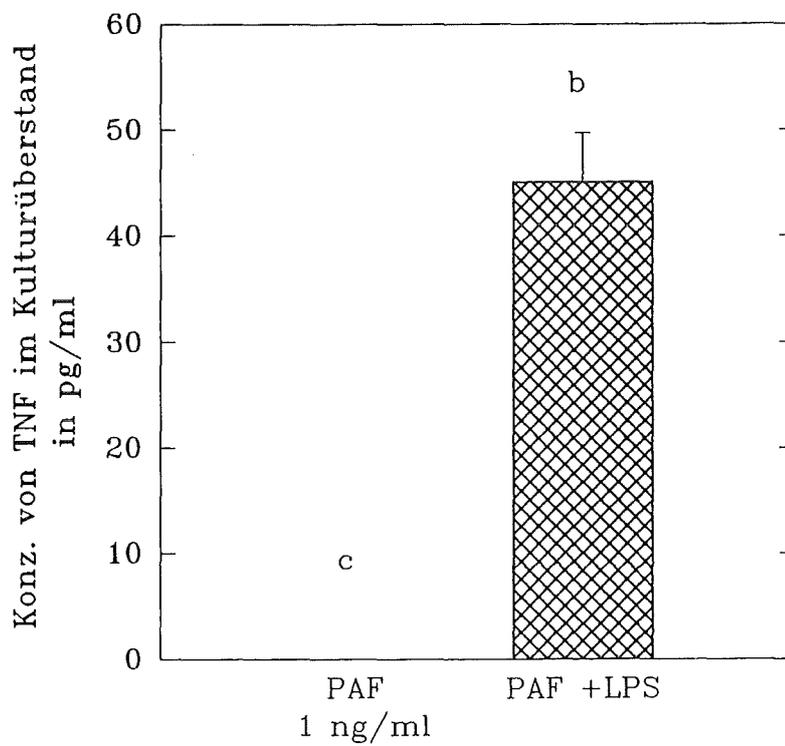
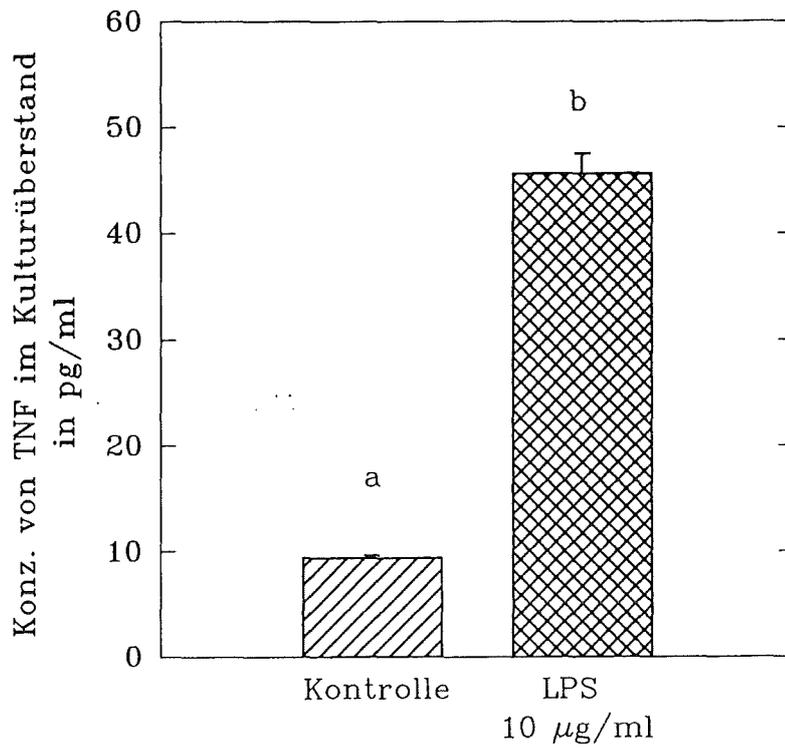


Abbildung 43:  
 Einfluß verschiedener Stimulanzen auf die TNF-Sekretion von RAM nach Submerskultur. Die Stimulation erfolgte mit LPS, PAF und einer Kombinationsapplikation (2stündige Inkubation mit den Agenzien). Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 9).

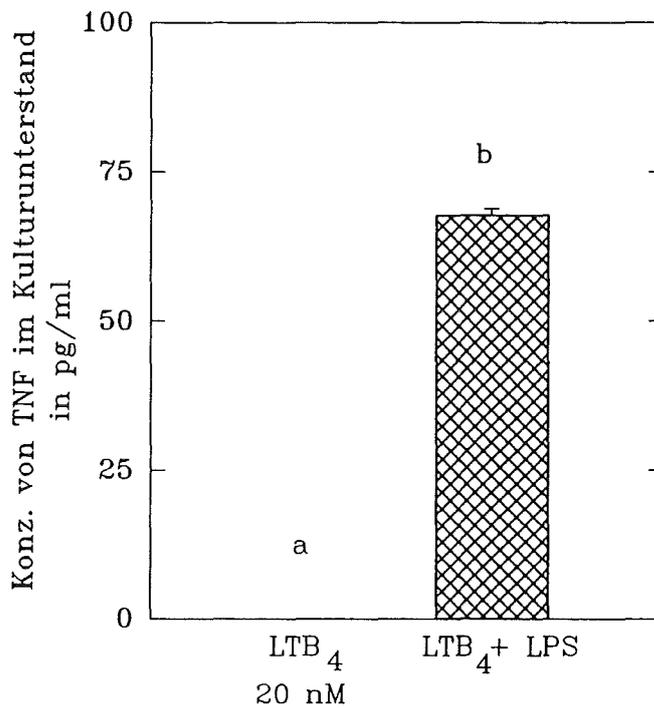
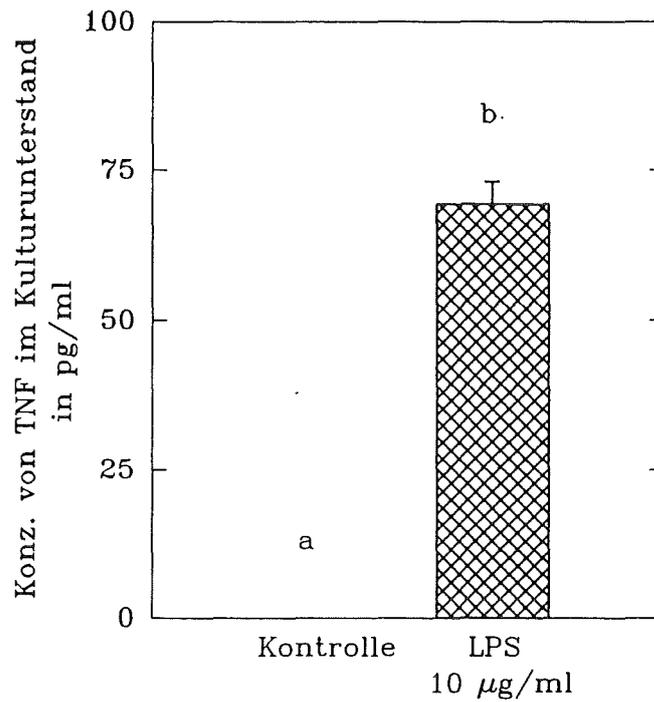


Abbildung 44:

Einfluß verschiedener Stimulanzen auf die TNF-Sekretion von RAM nach Gasphasenkultur. Die Stimulation erfolgte mit LPS (10 µg/ml), LTB<sub>4</sub> (20 nM) und einer Kombinationsapplikation (2stündige Inkubation mit den Agenzien).

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 6).

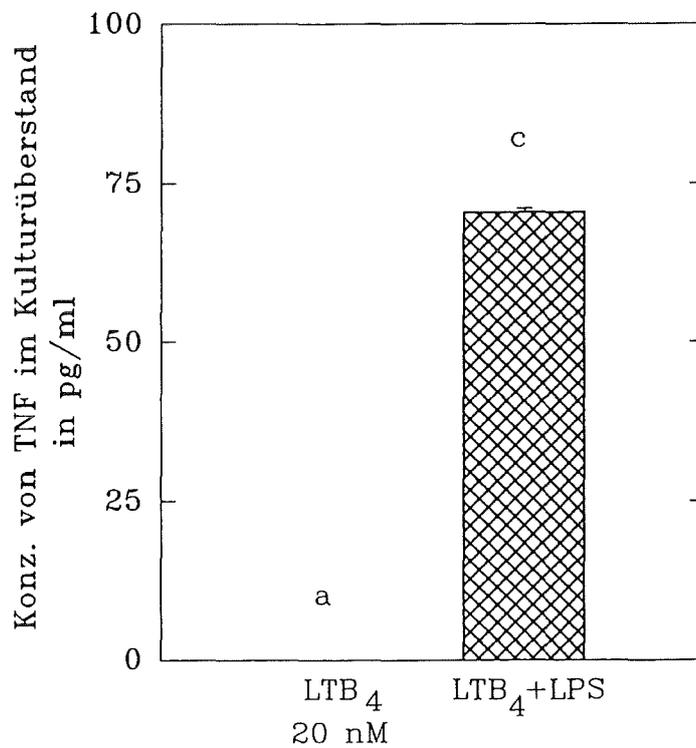
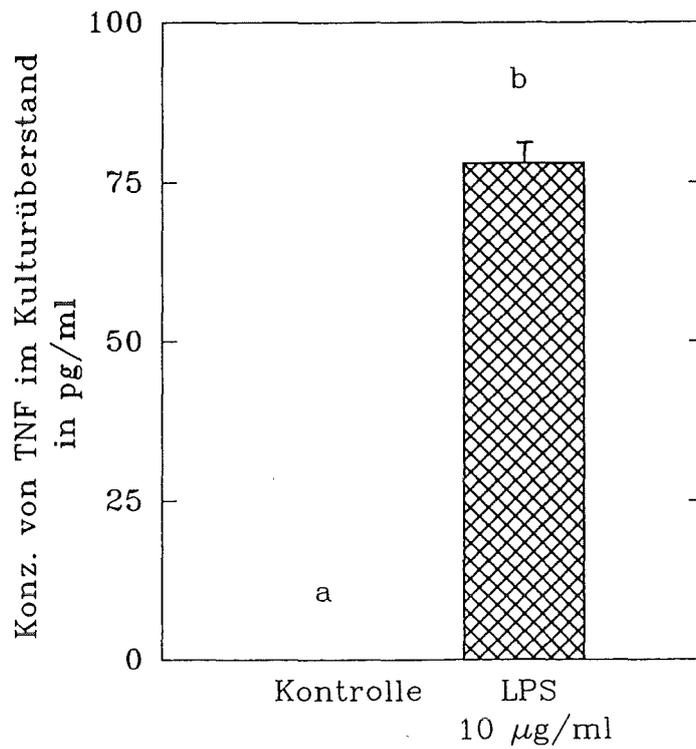


Abbildung 45:

Einfluß verschiedener Stimulanzen auf die TNF-Sekretion von RAM nach Submerskultur. Die Stimulation erfolgte mit LPS (10 µg/ml), LTB<sub>4</sub> (20 nM) und einer Kombinationsapplikation (2stündige Inkubation mit den Agenzien).

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 6).

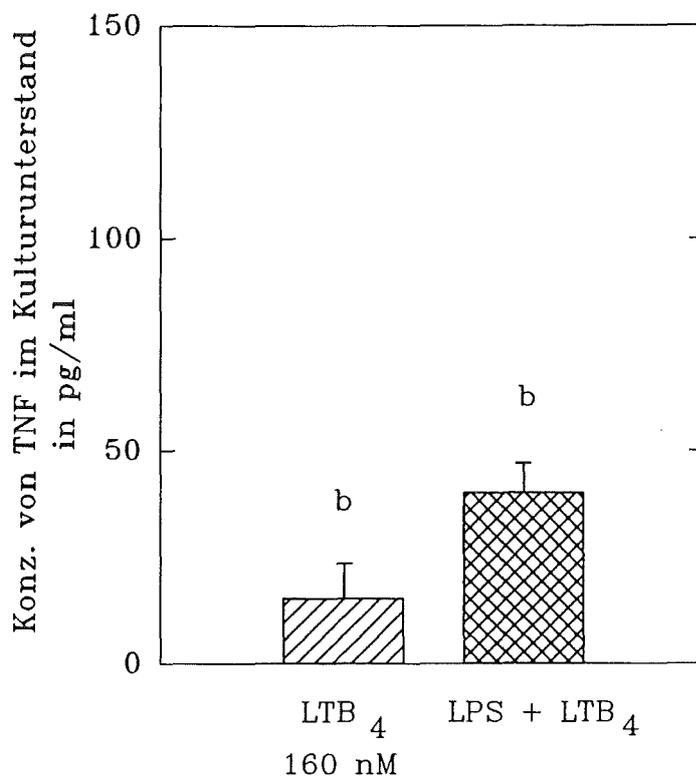
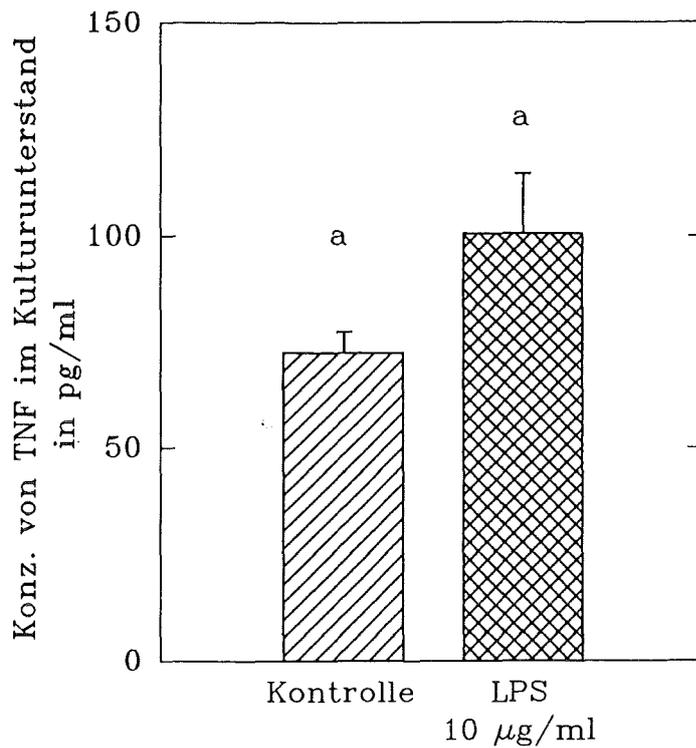


Abbildung 46:  
 Exposition von voraktivierten RAM in Gasphase. Messung der TNF-Sekretion in dem Kulturunterstand nach Inkubation mit LPS (10 µg/ml), LTB<sub>4</sub> (160 nM) und einer Kombination beider Substanzen (2stündige Inkubation mit den Agenzien).  
 Einzelversuch (n = 3)  
 Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt.

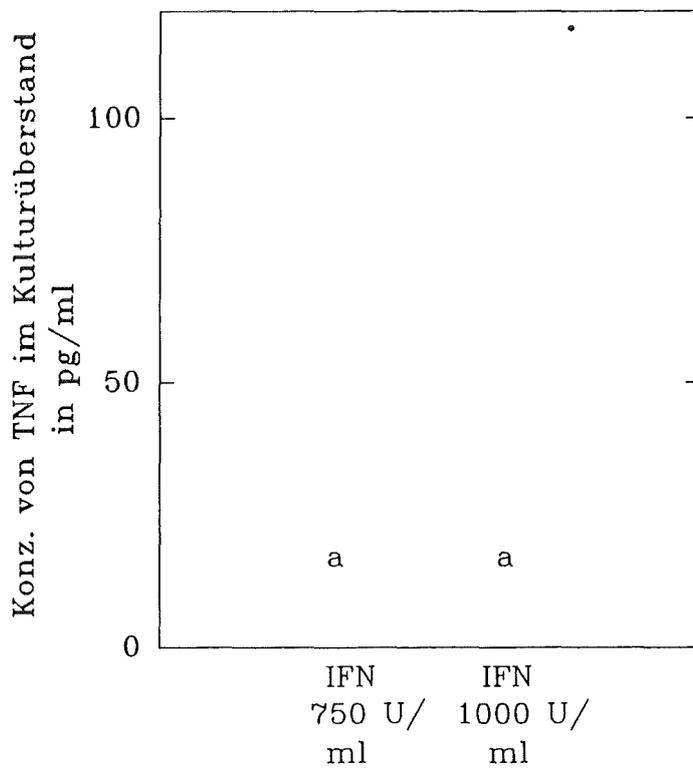
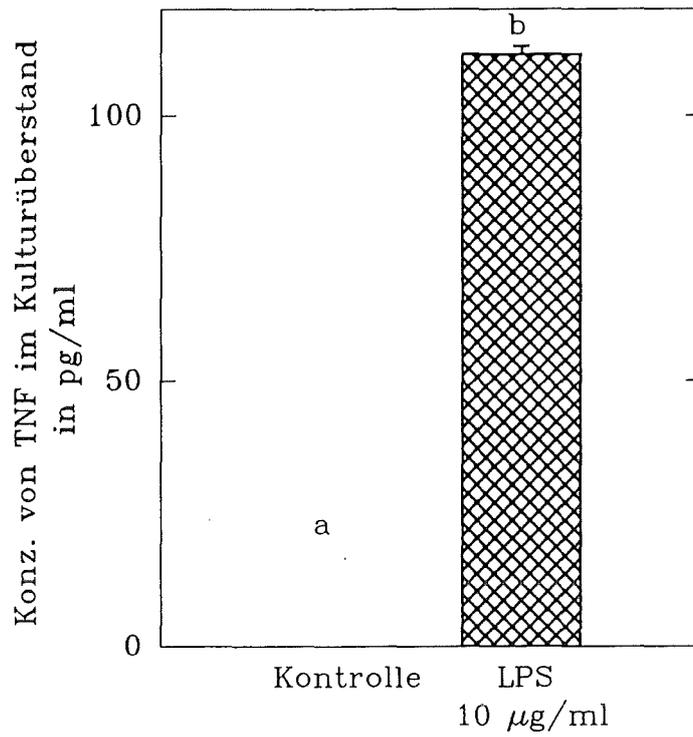


Abbildung 47:  
 Einfluß der Stimulation mit LPS oder IFN- $\gamma$  auf die TNF-Sekretion von RAM nach Gasphasenkultur (2stündige Inkubation mit den Agenzien).  
 Einzelversuch (n = 3)  
 Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt.

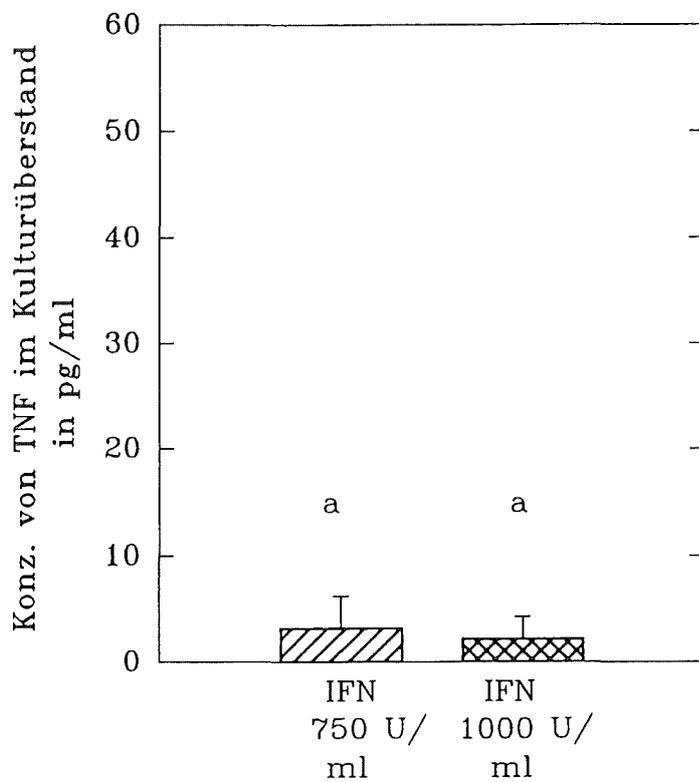
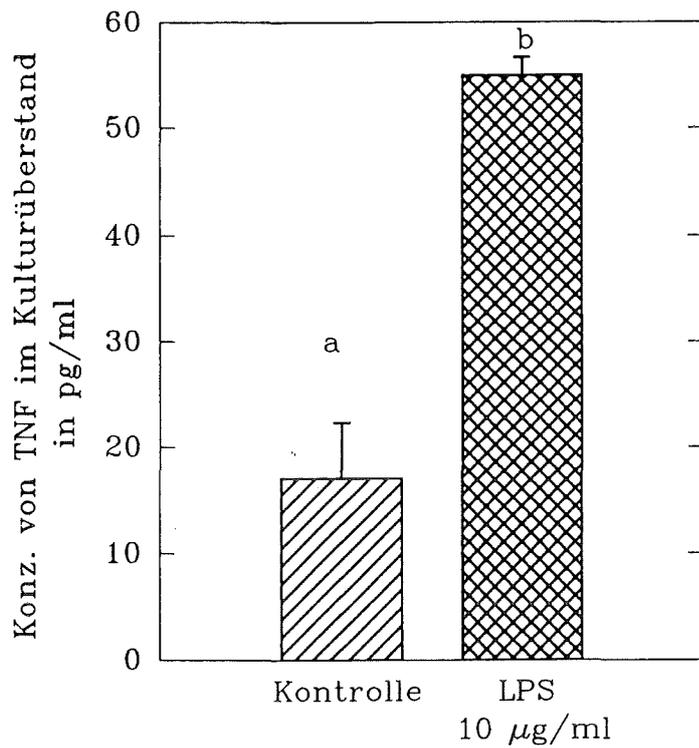


Abbildung 48:

Einfluß der Stimulation mit LPS oder IFN- $\gamma$  auf die TNF-Sekretion von RAM nach Submerskultur (2stündige Inkubation mit den Agenzien).

Einzelversuch (n = 3)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt.

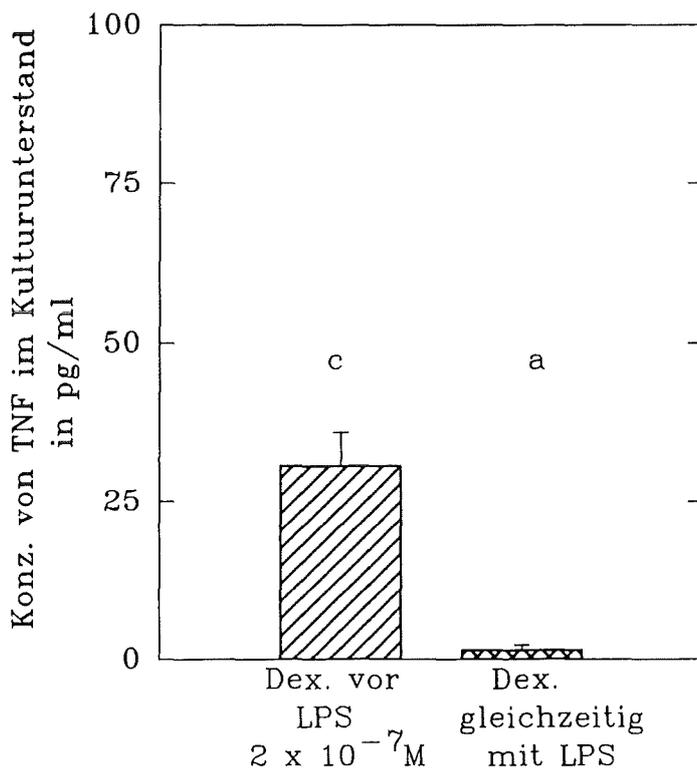
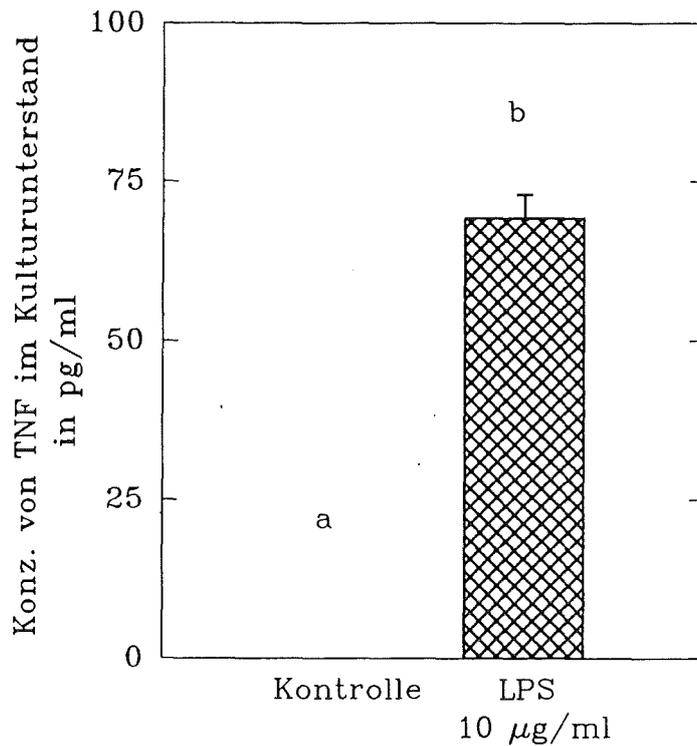


Abbildung 49:

Einfluß von LPS (10 µg/ml) und Dexamethason (2 x 10<sup>-7</sup> M) auf die TNF-Sekretion von RAM nach Gasphasenkultur.

Bei dem Ansatz "Dex. vor LPS" wurde Dexamethason eine Stunde vor der Applikation von LPS in den Zellunterstand gegeben, bei "Dex. gleichzeitig mit LPS" wurden beide Substanzen gleichzeitig verabreicht (2stündige Inkubation mit den Agenzien).

Einzelversuch (n = 3)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt.

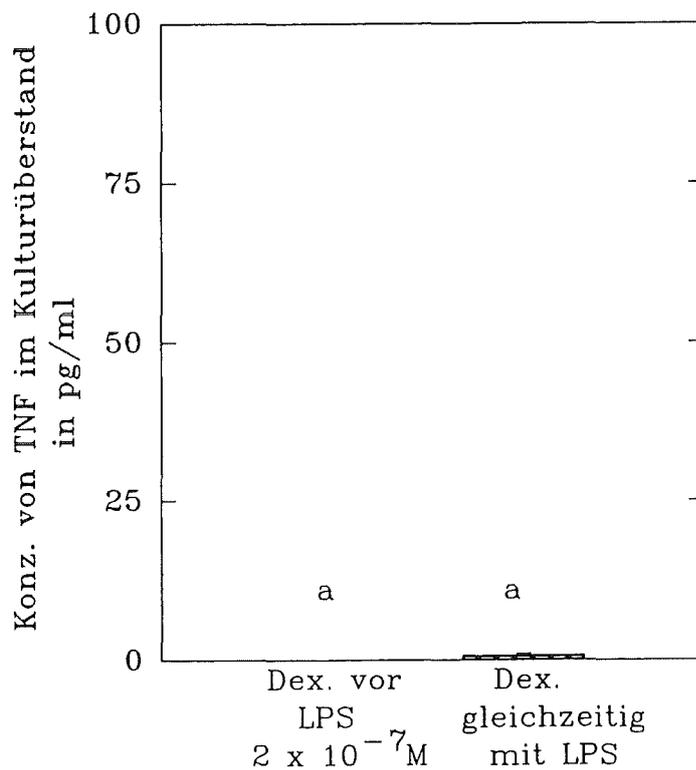
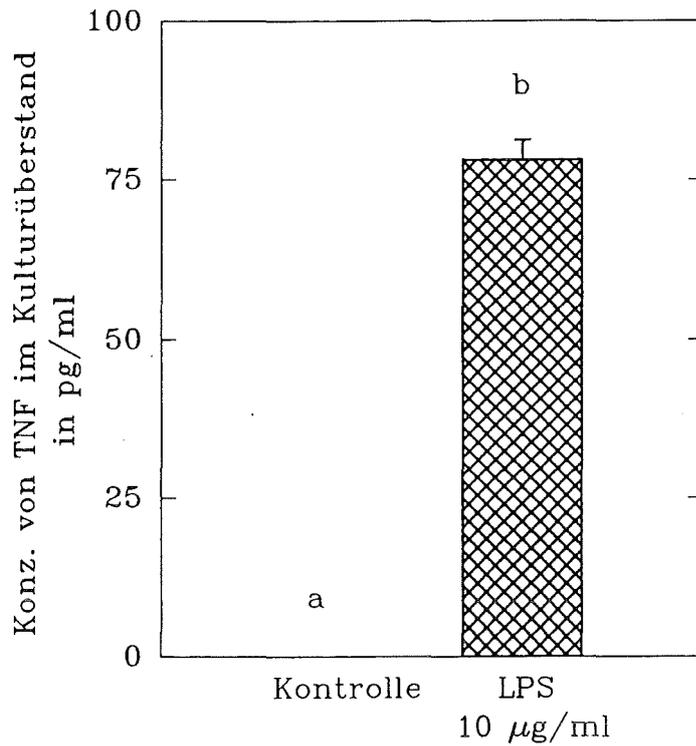


Abbildung 50:

Einfluß von LPS (10 µg/ml) und Dexamethason ( $2 \times 10^{-7}$  M) auf die TNF-Sekretion von RAM nach Submerskultur.

Bei dem Ansatz "Dex. vor LPS" wurde Dexamethason eine Stunde vor der Applikation von LPS in den Zellunterstand gegeben, bei "Dex. gleichzeitig mit LPS" wurden beide Substanzen gleichzeitig verabreicht (2stündige Inkubation mit den Agenzien).

Einzelversuch (n = 3)

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt.

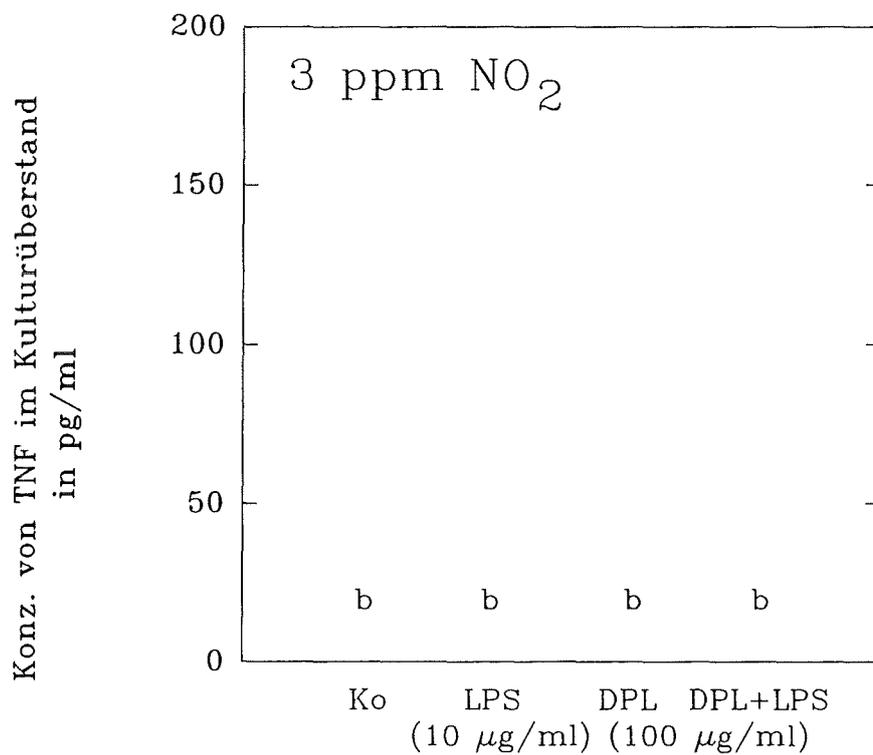
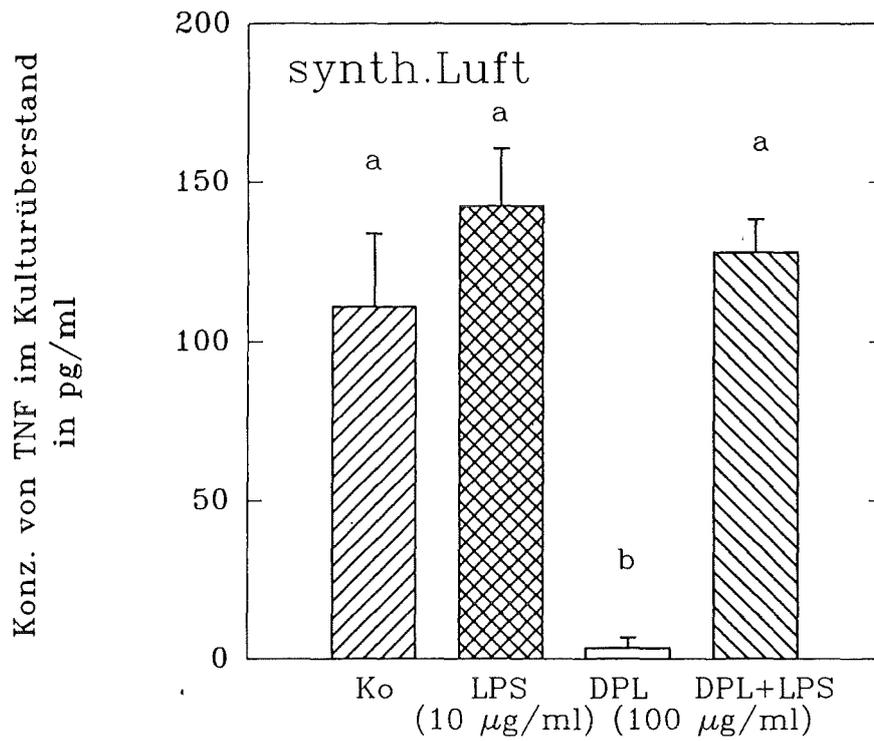


Abbildung 51:

Einfluß einer DPL-Behandlung auf die LPS-stimulierte und unstimulierte TNF-Sekretion von RAM nach Gasphasenkultur.

obere Abbildung: 2 Stunden, Luft

untere Abbildung: 2 Stunden, NO<sub>2</sub>, 3 ppm

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 15).

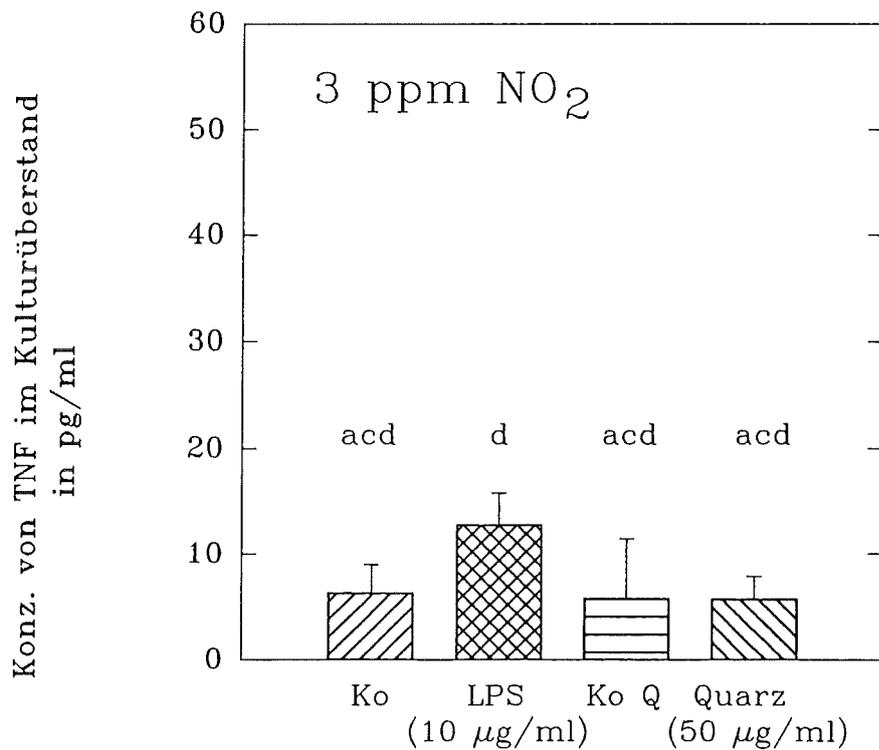
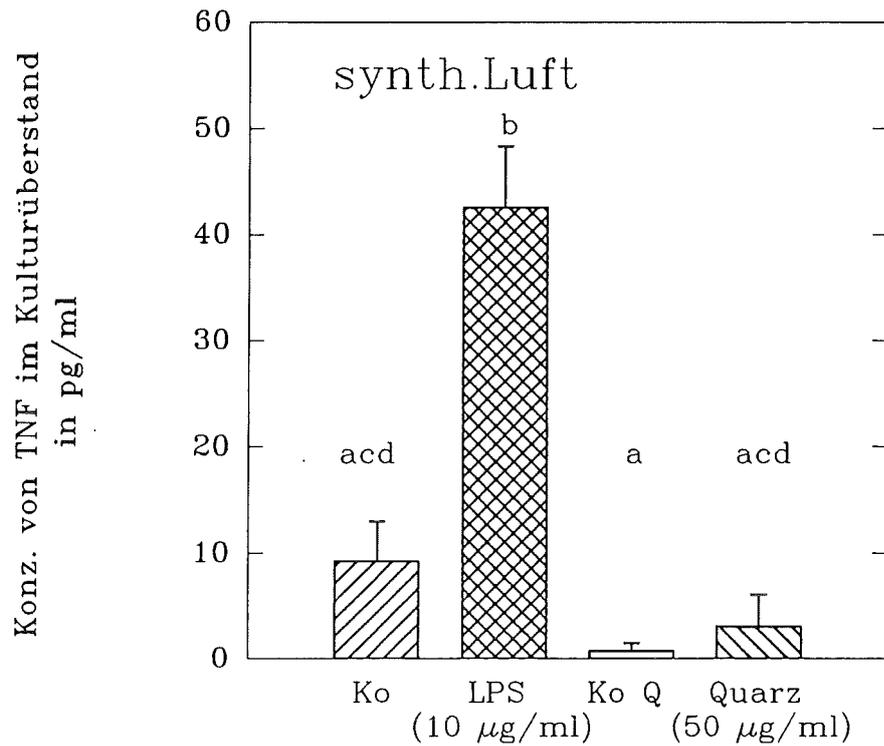


Abbildung 52:

Einfluß einer Quarzphagocytose auf die LPS-stimulierte und unstimulierte TNF-Sekretion von RAM nach Gasphase. Die Staubphagocytose fand vor der Inkubation mit Gasen statt.

obere Abbildung: 2 Stunden, Luft

untere Abbildung: 2 Stunden, NO<sub>2</sub>, 3 ppm

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 6).

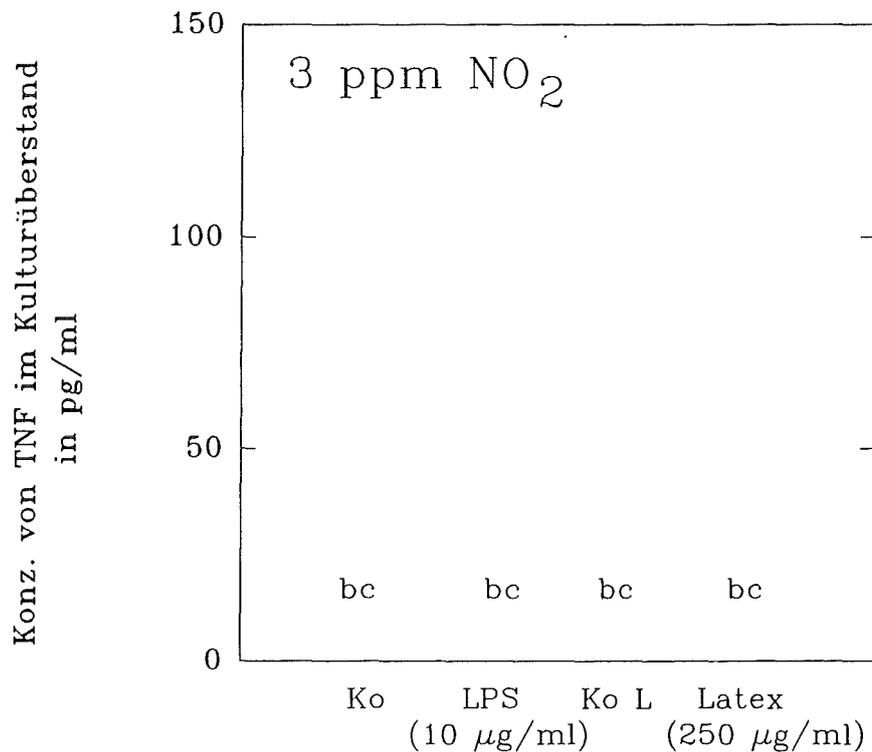
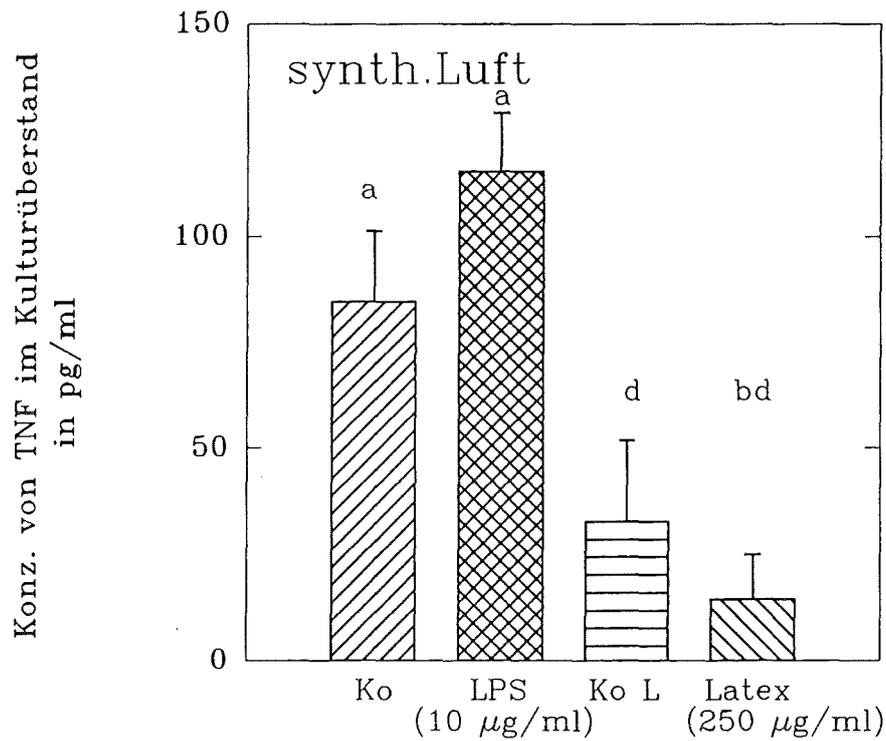


Abbildung 53:

Einfluß einer Latexphagozytose auf die LPS-stimulierte und unstimulierte TNF-Sekretion von RAM nach Gasphase. Die Staubphagozytose fand vor der Inkubation mit Gasen statt.

obere Abbildung: 2 Stunden, Luft

untere Abbildung: 2 Stunden, NO<sub>2</sub>, 3 ppm

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 6).

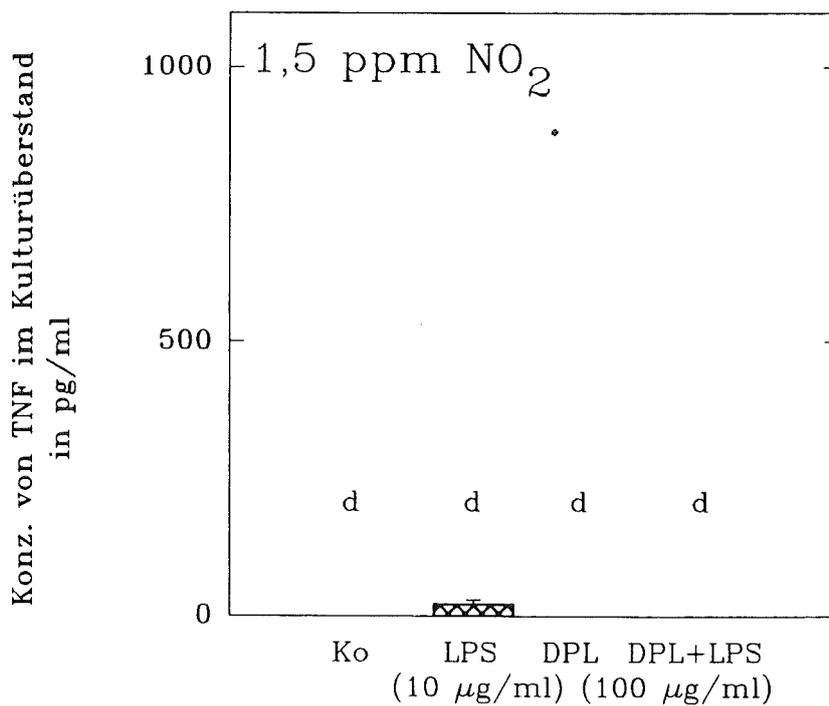
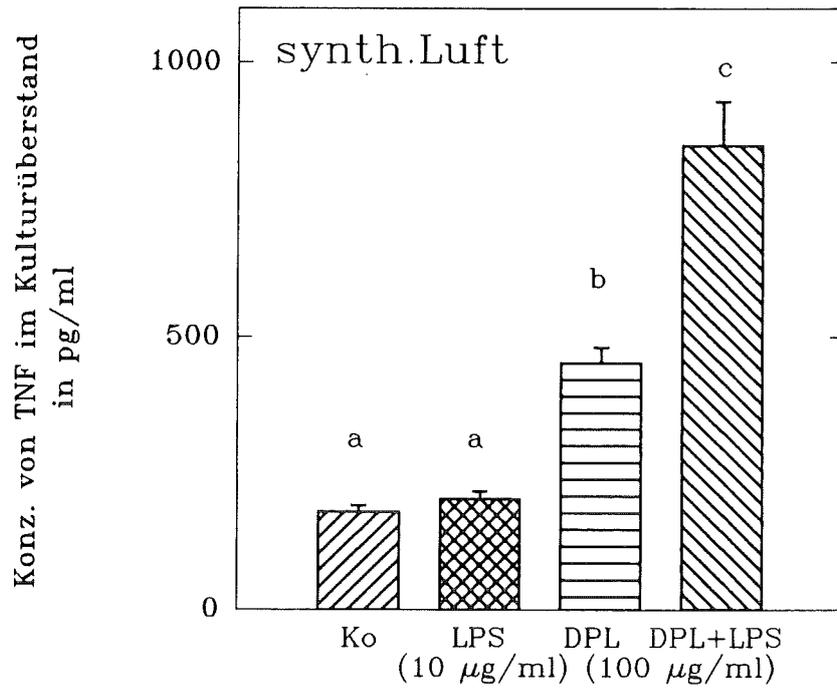


Abbildung 54:  
 Einfluß einer DPL-Behandlung auf die LPS-stimulierte und unstimulierte TNF-Sekretion von RAM nach Gasphasenkultur.  
 obere Abbildung: 2 Stunden, Luft  
 untere Abbildung: 2 Stunden, NO<sub>2</sub>, 1,5 ppm  
 Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 6).

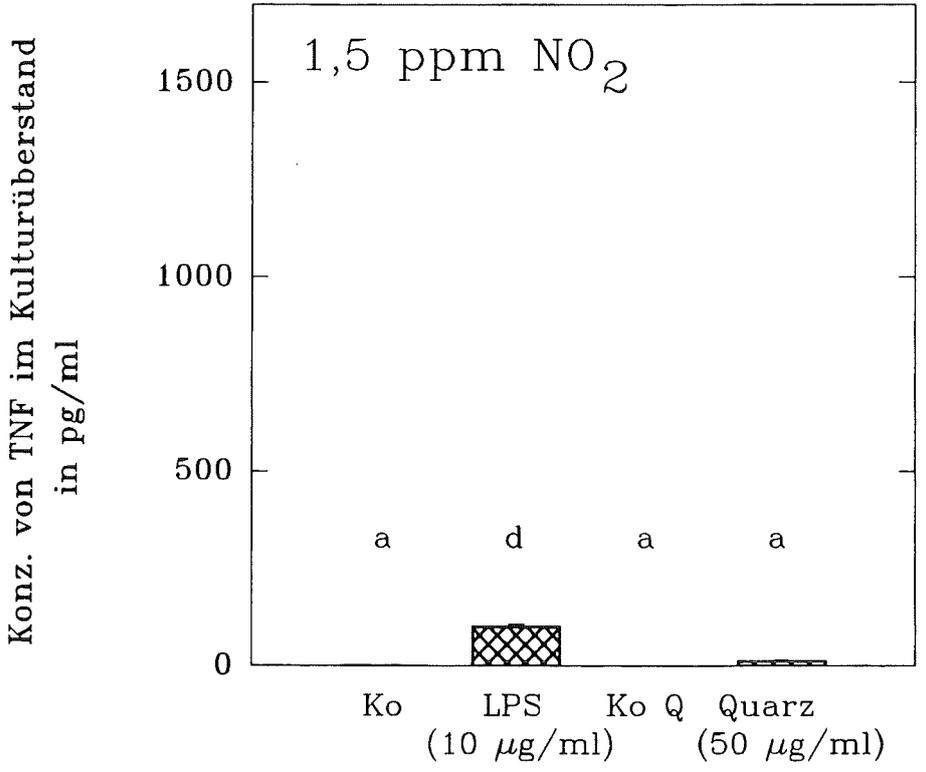
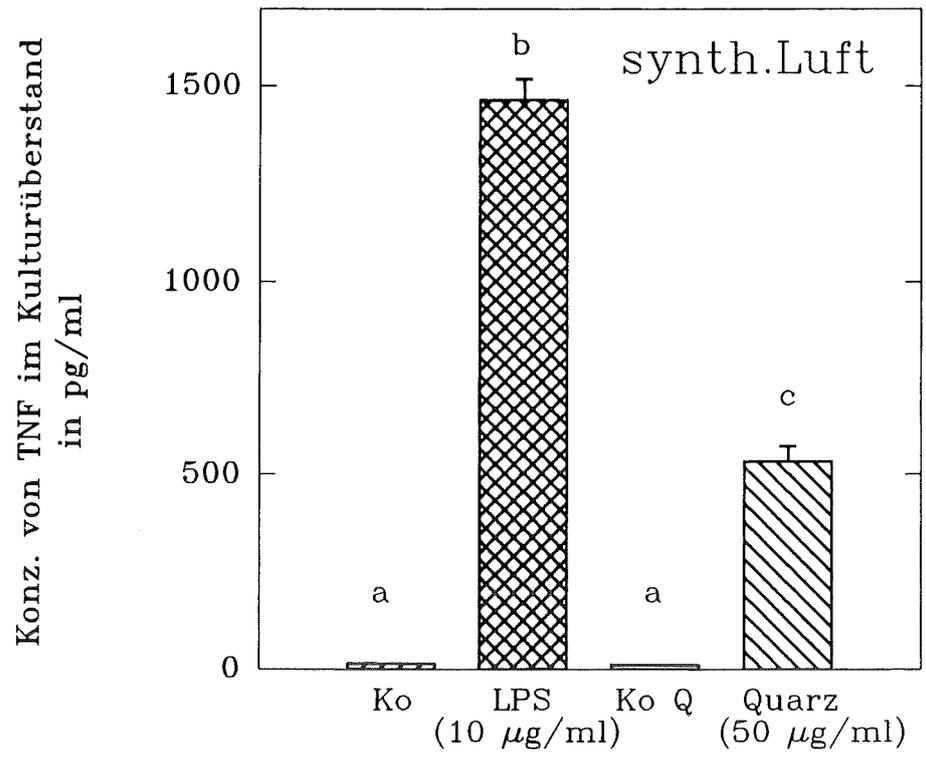


Abbildung 55:  
 Einfluß einer Quarzphagozytose auf die LPS-stimulierte und unstimulierte TNF-Sekretion von RAM nach Gasphase. Die Staubphagozytose fand vor der Inkubation mit Gasen statt.  
 obere Abbildung: 2 Stunden, Luft  
 untere Abbildung: 2 Stunden, NO<sub>2</sub>, 1,5 ppm  
 Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 12).

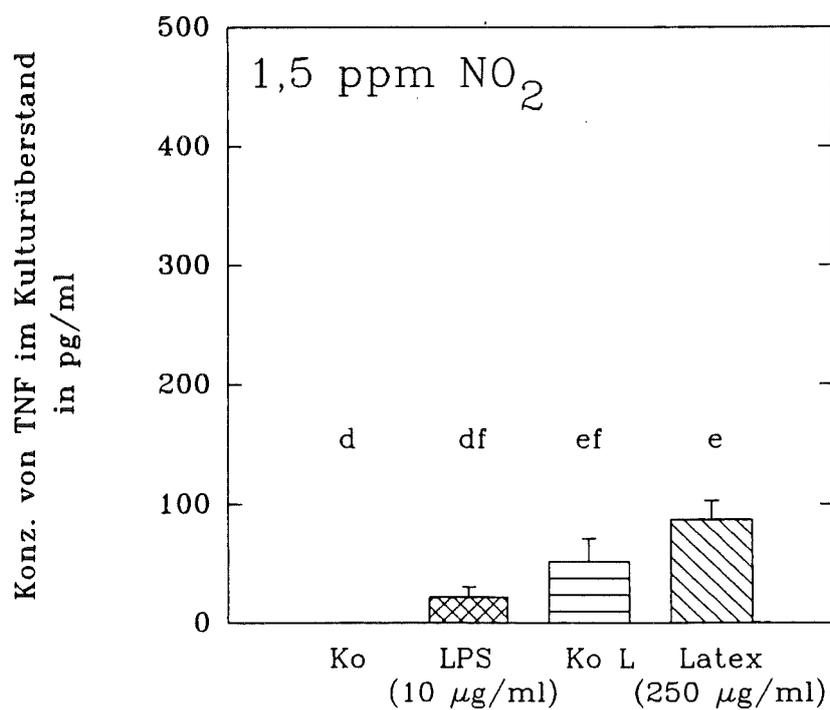
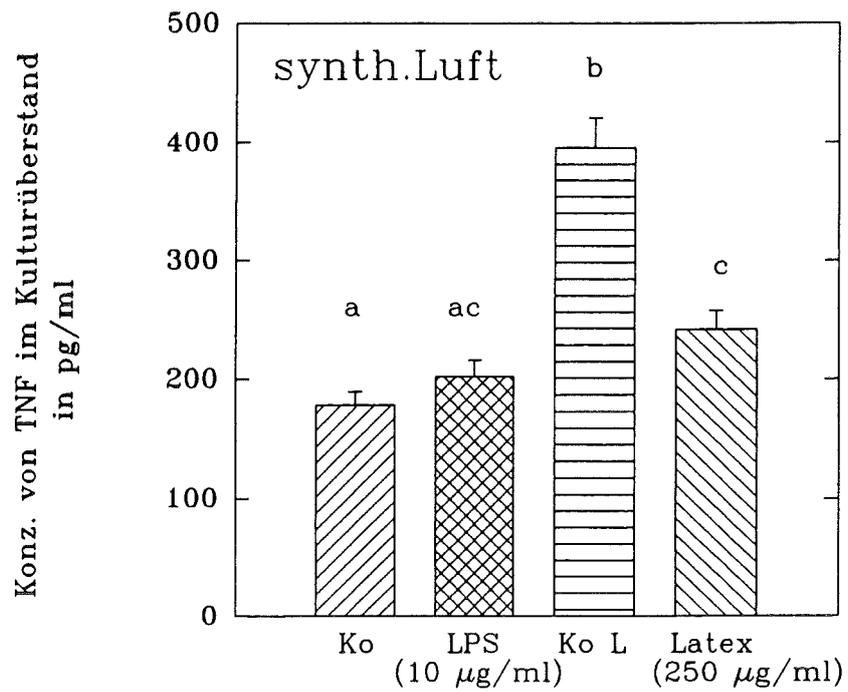


Abbildung 56:

Einfluß einer Latexphagozytose auf die LPS-stimulierte und unstimulierte TNF-Sekretion von RAM nach Gasphase. Die Staubphagozytose fand vor der Inkubation mit Gasen statt.

obere Abbildung: 2 Stunden, Luft

untere Abbildung: 2 Stunden, NO<sub>2</sub>, 1,5 ppm

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen zusammen durchgeführt (n = 9).

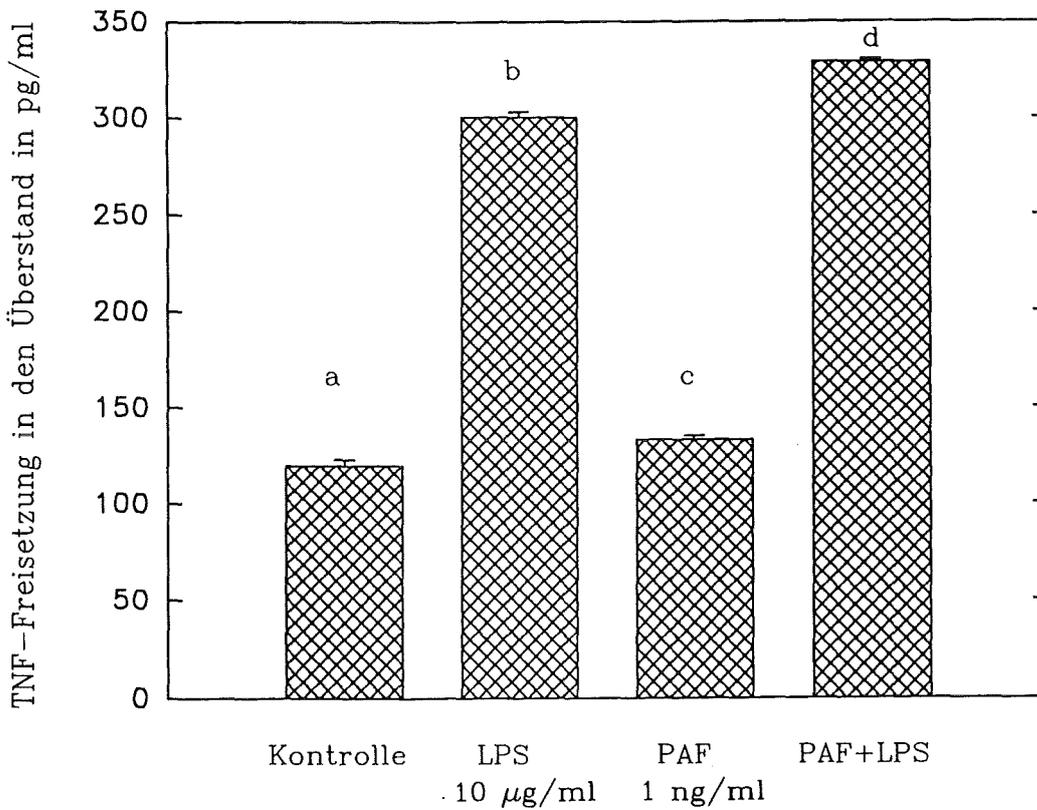
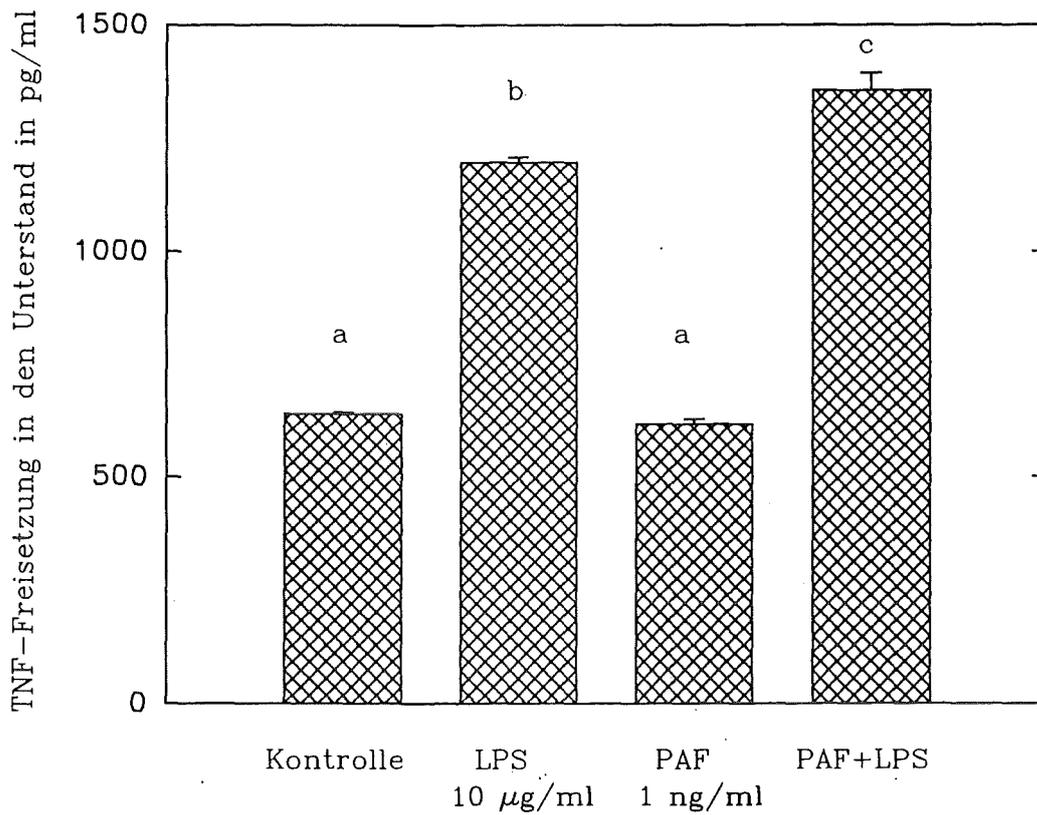


Abbildung 57 a:

TNF-Sekretion von HL60-Granulocytin in den Zellunterstand bzw. -überstand nach zweistündiger Stimulation mit LPS, PAF und LPS + PAF.

oben: Gasphasenkultur

unten: Submerskultur

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

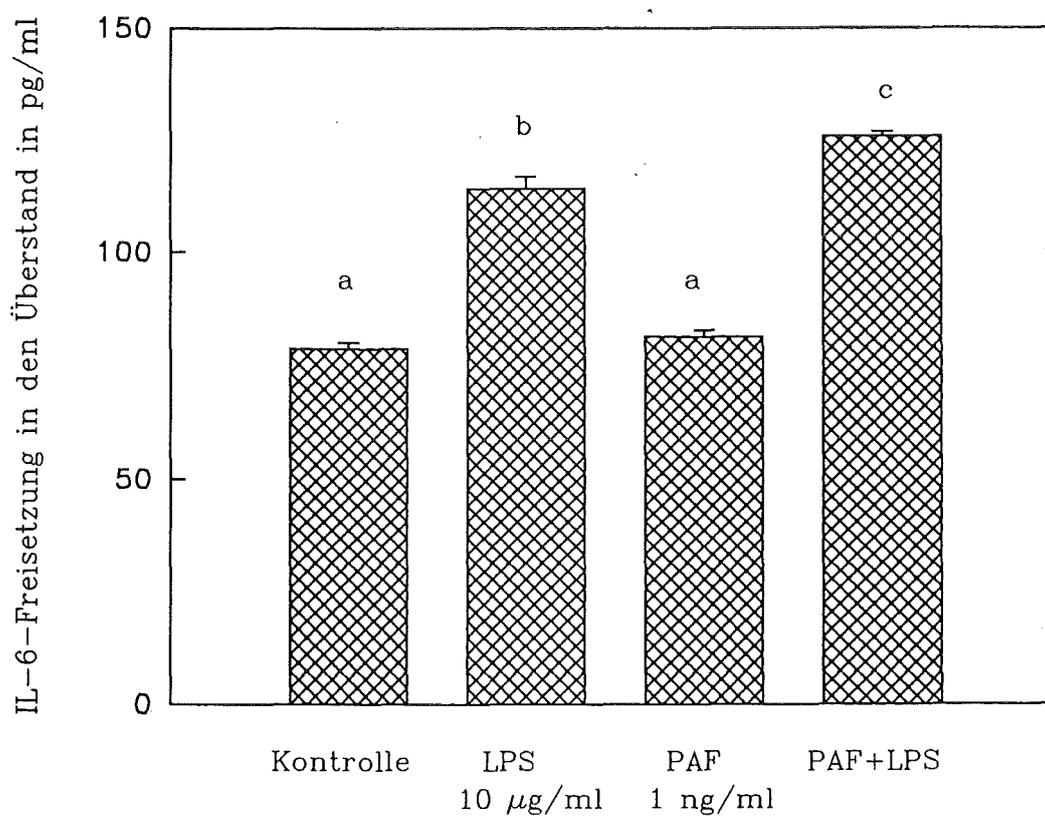
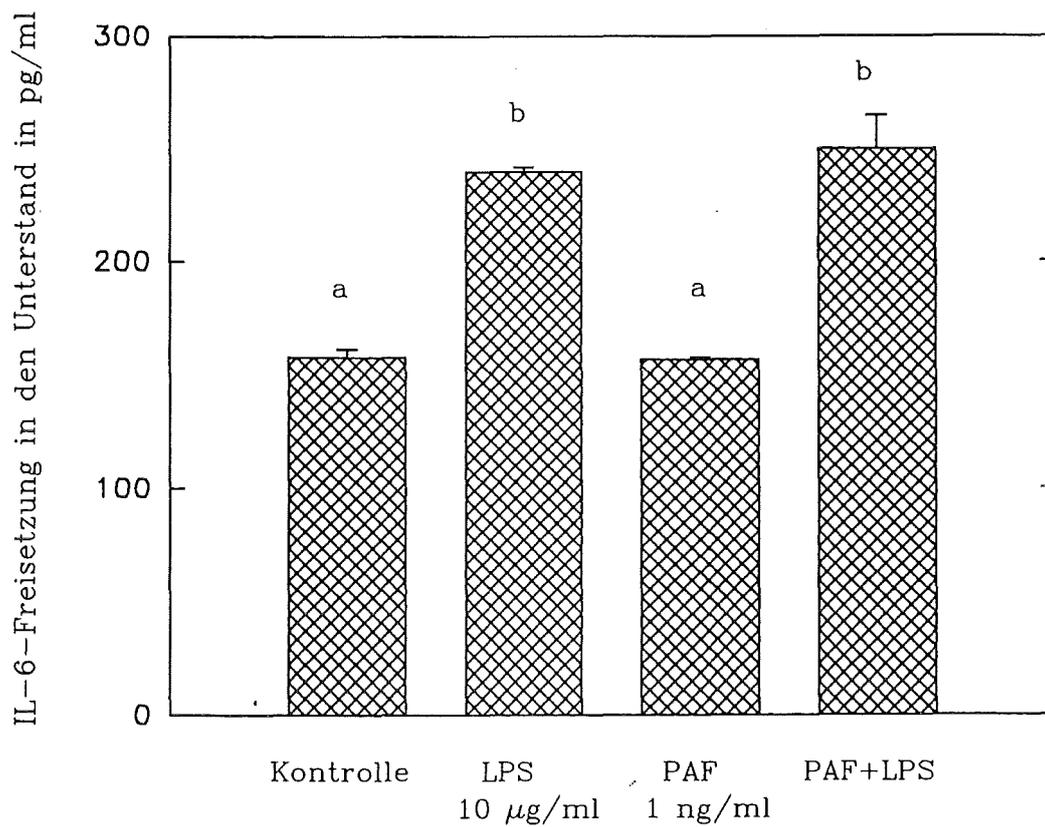


Abbildung 57 b:

IL-6 Sekretion von HL60-Granulocyten in den Zellunterstand bzw. -überstand nach zweistündiger Stimulation mit LPS, PAF und LPS + PAF.

oben: Gasphasenkultur

unten: Submerskultur

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

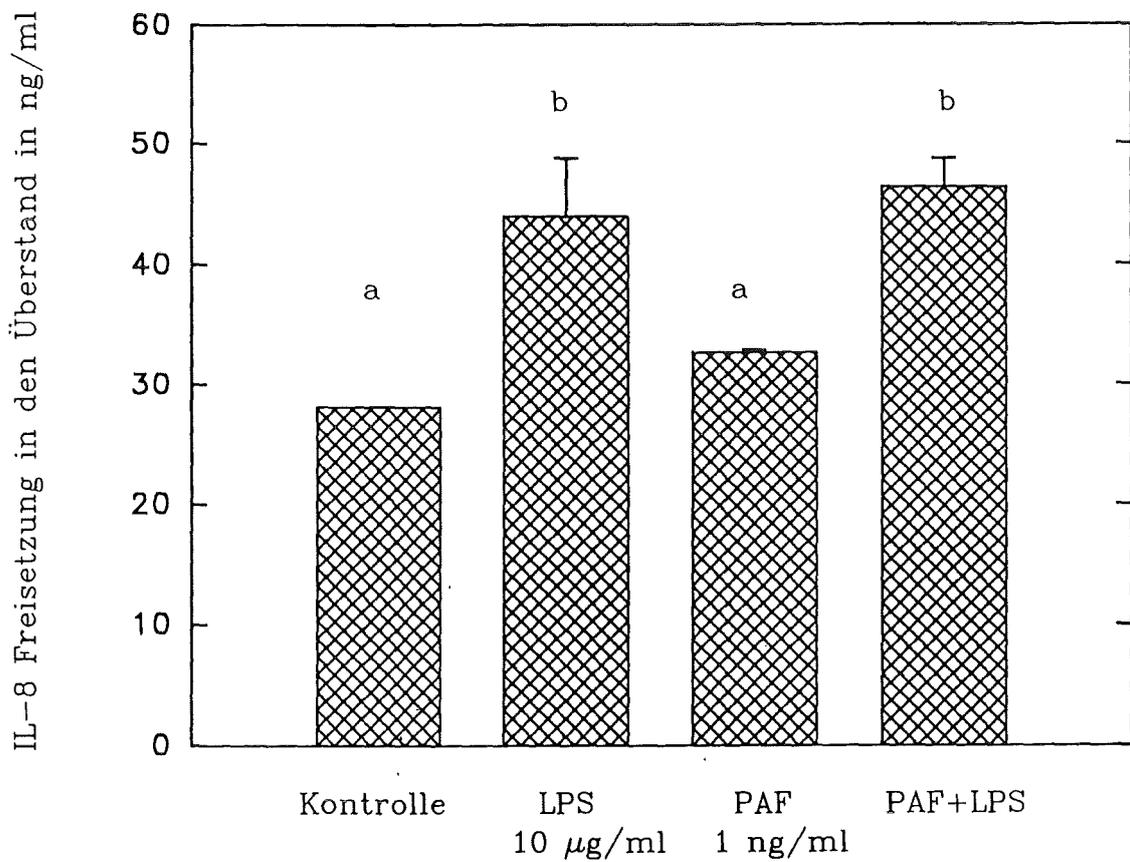
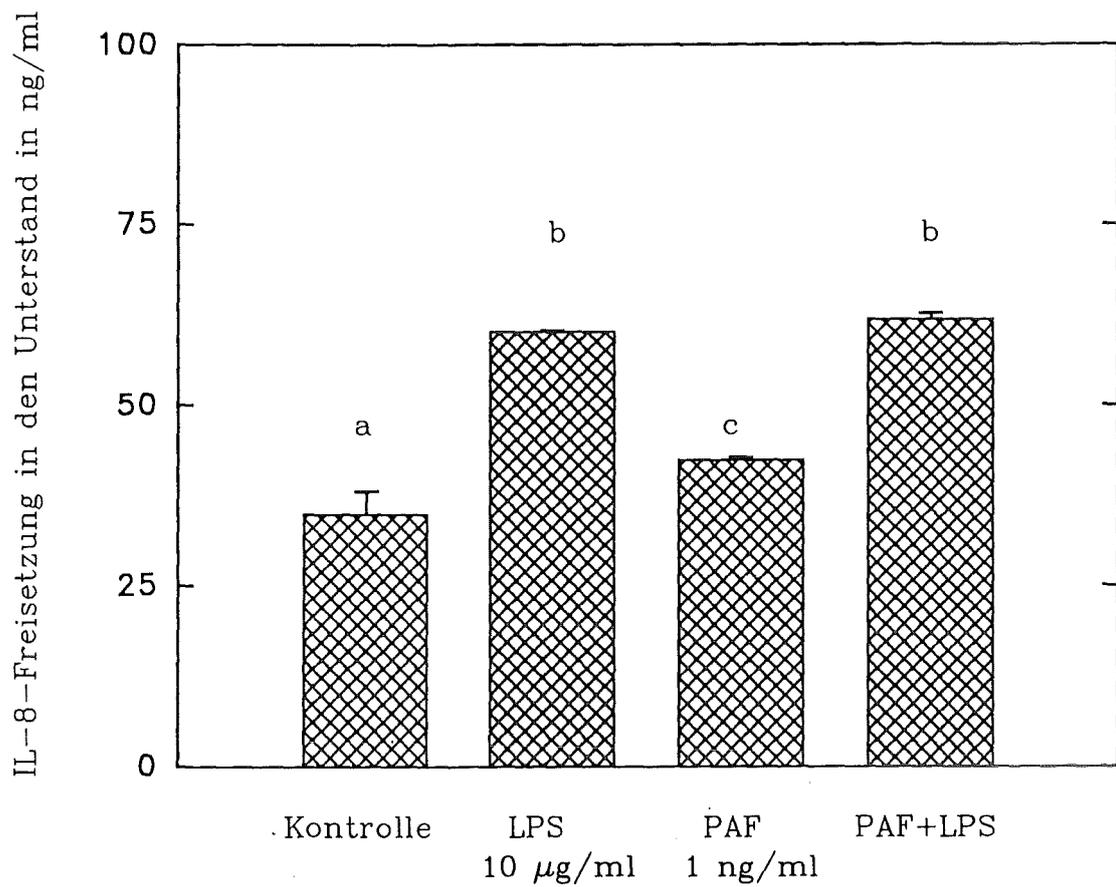


Abbildung 57 c:

IL-8 Sekretion von HL60-Granulocyten in den Zellunterstand bzw. -überstand nach zweistündiger Stimulation mit LPS, PAF und LPS + PAF.

oben: Gasphasenkultur

unten: Submerskultur

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

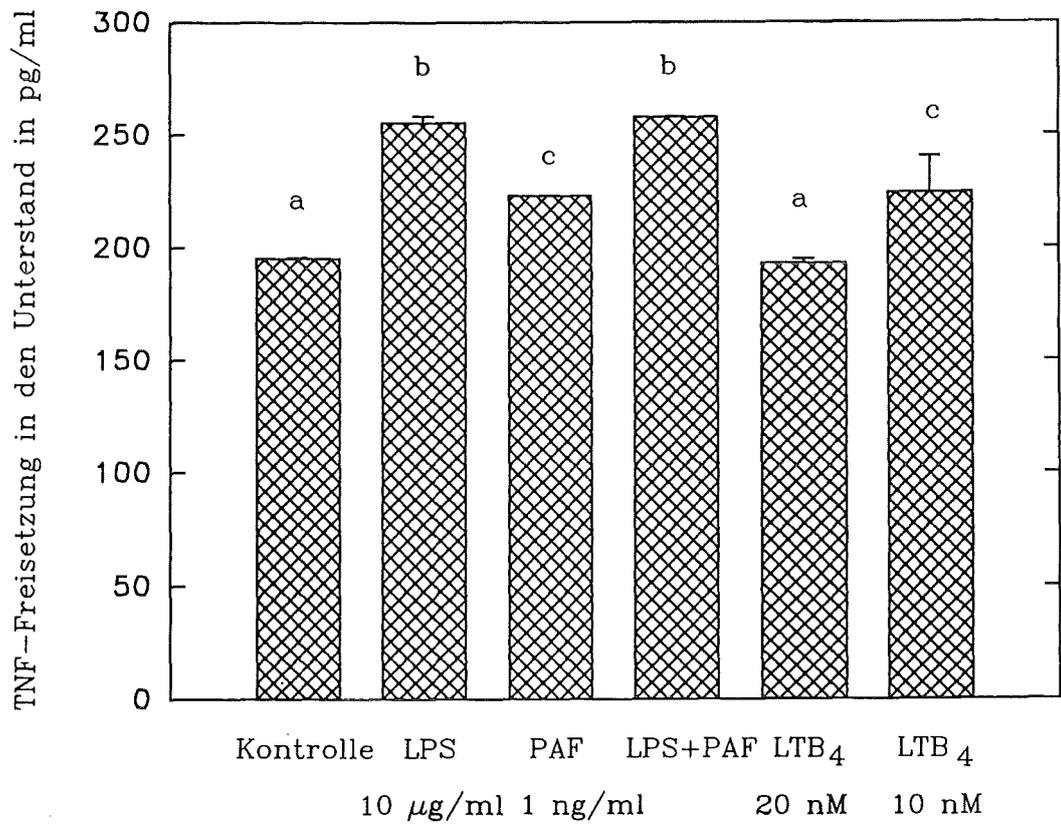
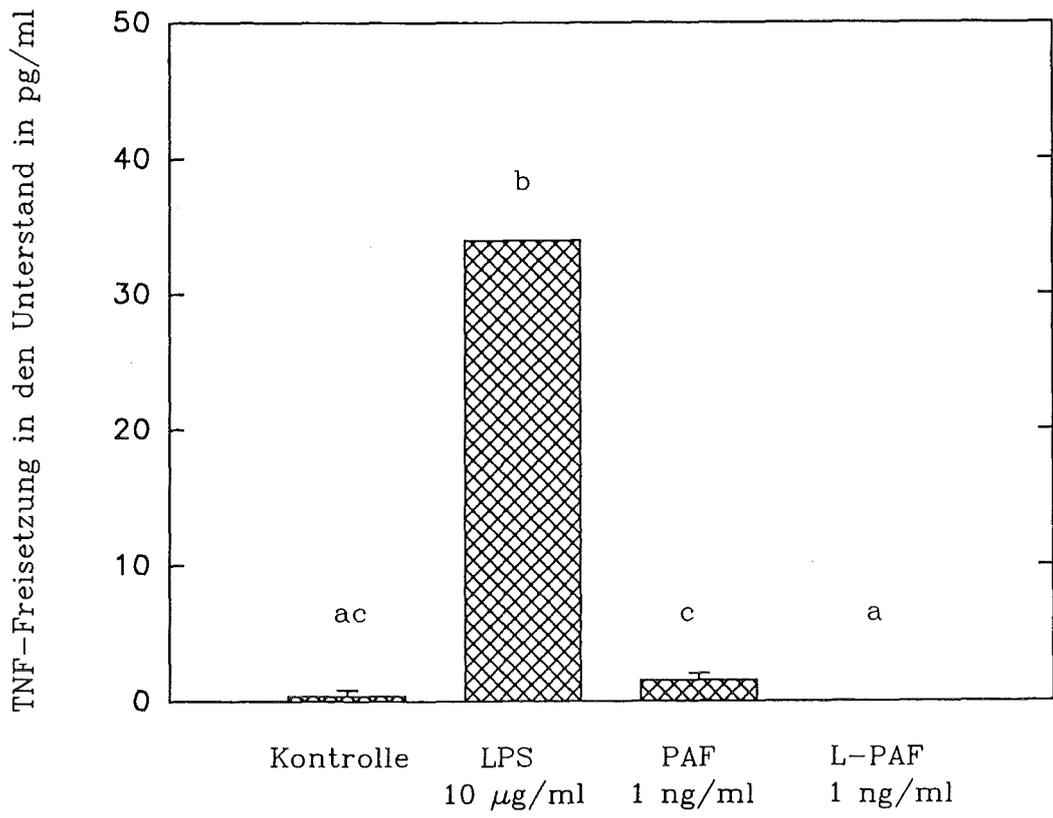


Abbildung 58 a:  
 Einfluß des Aktivierungszustandes auf die Stimulierbarkeit der TNF-Sekretion von HL60-Makrophagen nach Gasphasenkultur. Im oberen Teil der Abbildung wurden nicht voraktivierte Zellen mit LPS, PAF und Lyso-PAF inkubiert. In der unteren Abbildung handelt es sich um voraktivierte Zellen, die mit LPS, PAF, LPS + PAF und zwei verschiedenen Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> stimuliert worden waren. Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

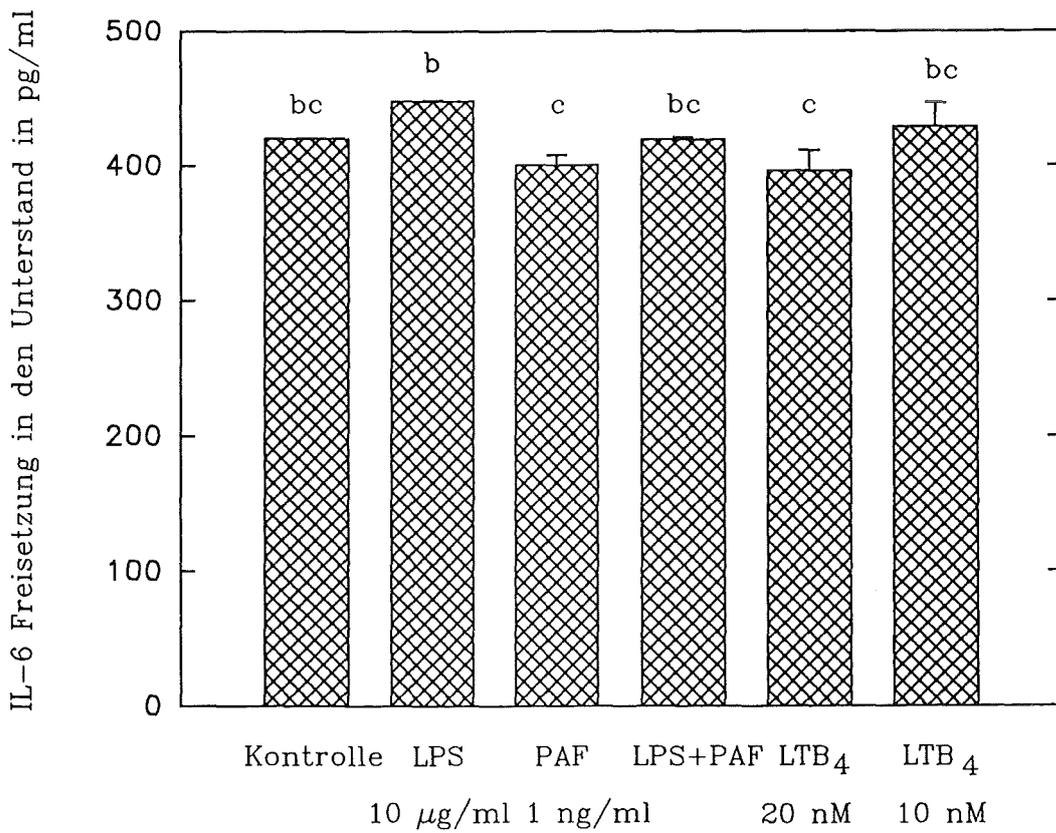
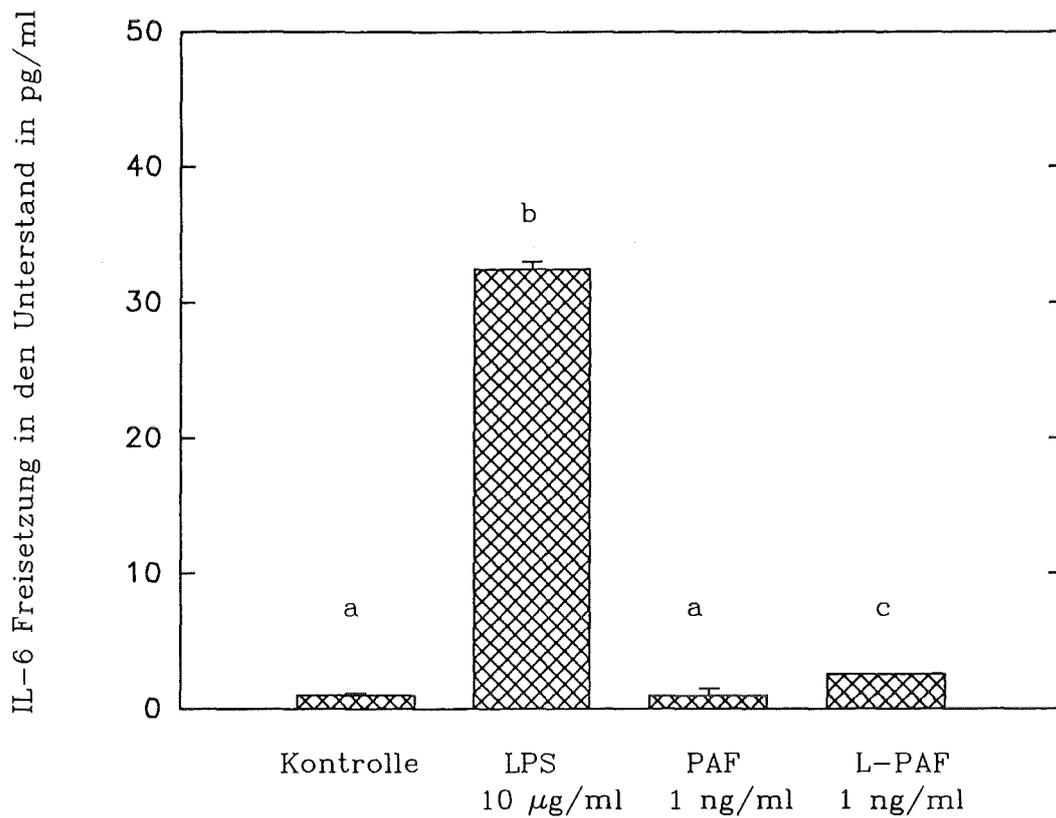


Abbildung 58 b:  
 Einfluß des Aktivierungszustandes auf die Stimulierbarkeit der IL-6-Sekretion von HL60-Makrophagen nach Gasphasenkultur. Im oberen Teil der Abbildung wurden nicht voraktivierte Zellen mit LPS, PAF und Lyso-PAF inkubiert. In der unteren Abbildung handelt es sich um voraktivierte Zellen, die mit LPS, PAF, LPS + PAF und zwei verschiedenen Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> stimuliert worden waren.  
 Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

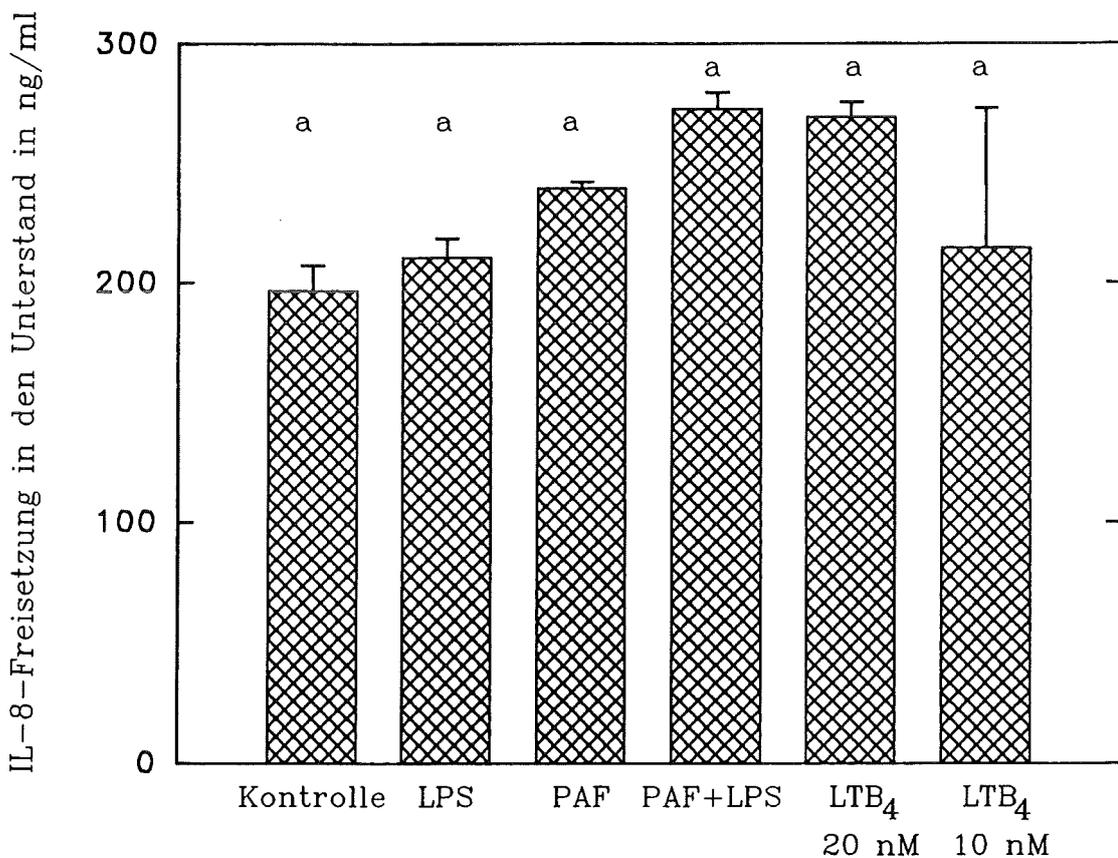
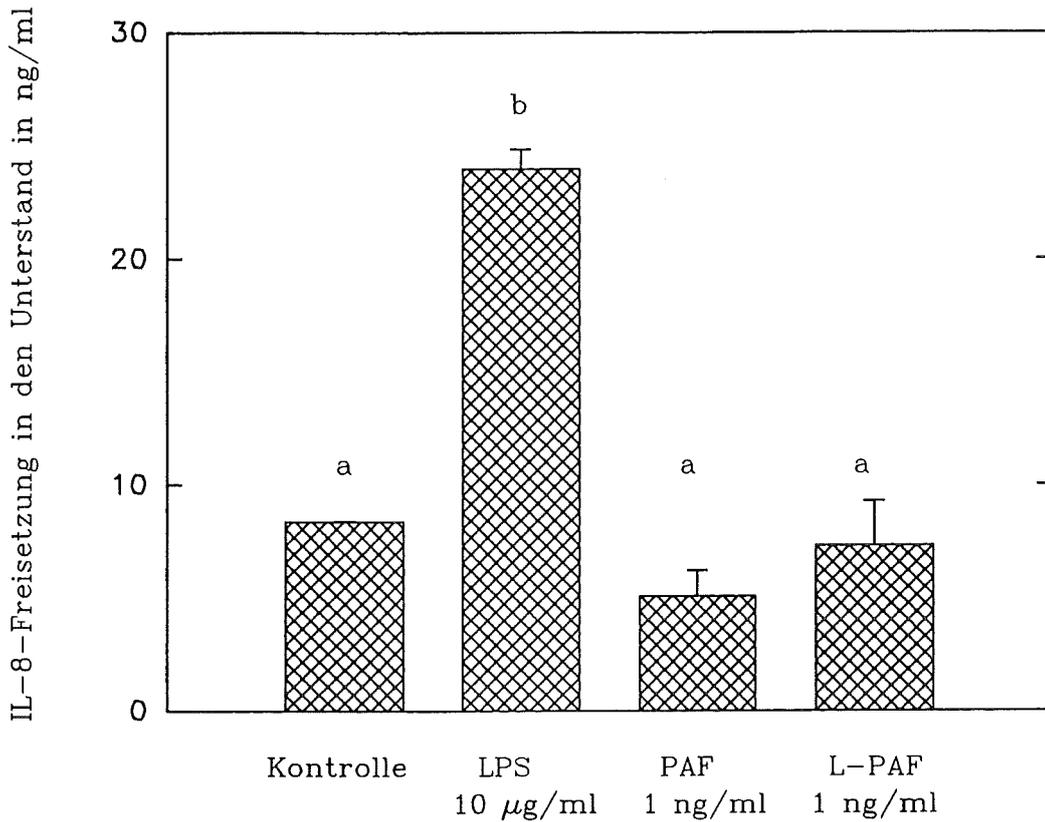


Abbildung 58 c:  
 Einfluß des Aktivierungszustandes auf die Stimulierbarkeit der IL-8-Sekretion von HL60-Makrophagen nach Gasphasenkultur. Im oberen Teil der Abbildung wurden nicht voraktivierte Zellen mit LPS, PAF und Lyso-PAF inkubiert. In der unteren Abbildung handelt es sich um voraktivierte Zellen, die mit LPS, PAF, LPS + PAF und zwei verschiedenen Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> stimuliert worden waren. Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

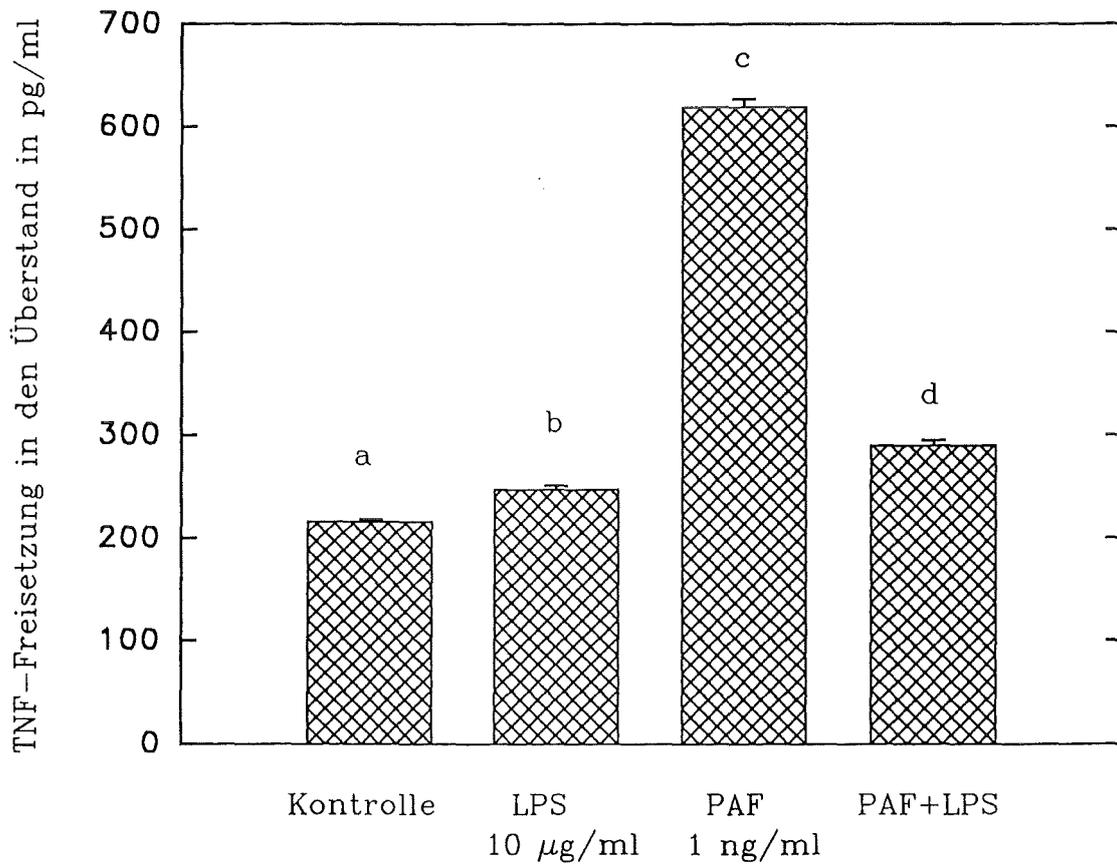
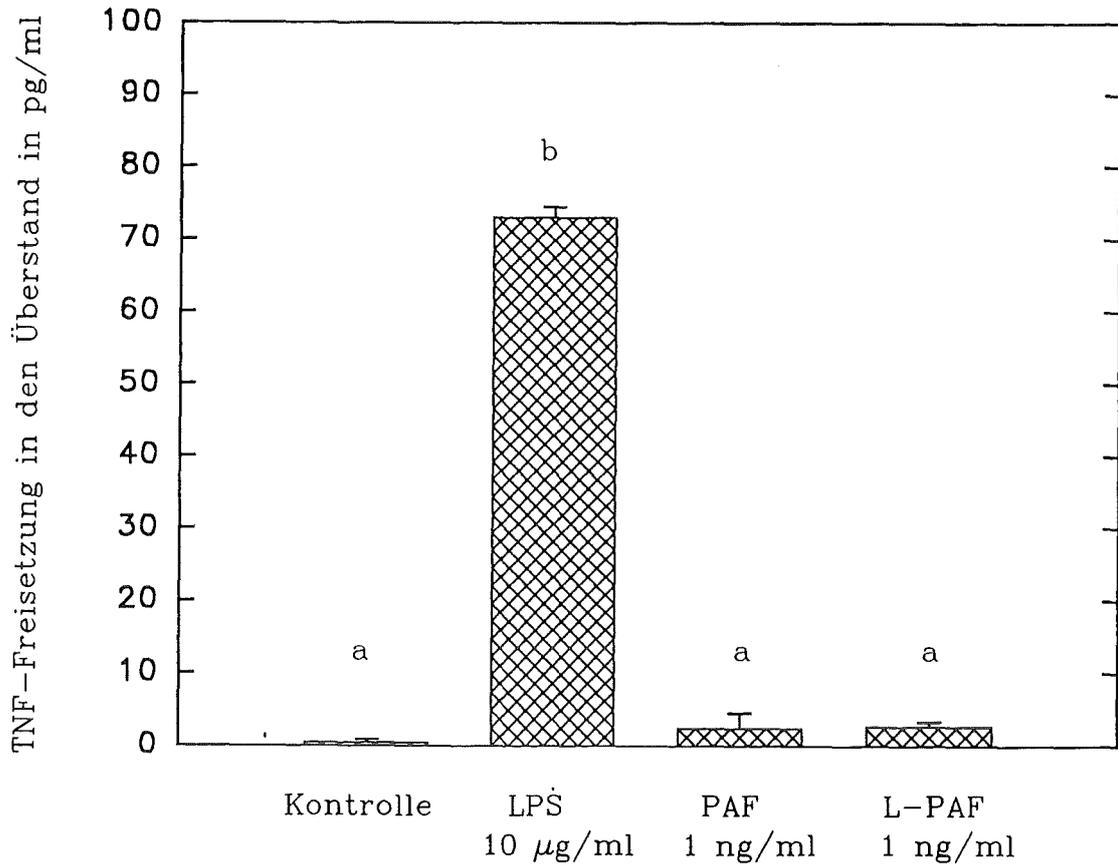


Abbildung 59 a:

Einfluß des Aktivierungszustandes auf die Stimulierbarkeit der TNF-Sekretion von HL60-Makrophagen nach Submerskultur. Im oberen Teil der Abbildung wurden nicht voraktivierte Zellen mit LPS, PAF und Lyso-PAF inkubiert. In der unteren Abbildung handelt es sich um voraktivierte Zellen, die mit LPS, PAF, LPS + PAF und zwei verschiedenen Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> stimuliert worden waren.

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

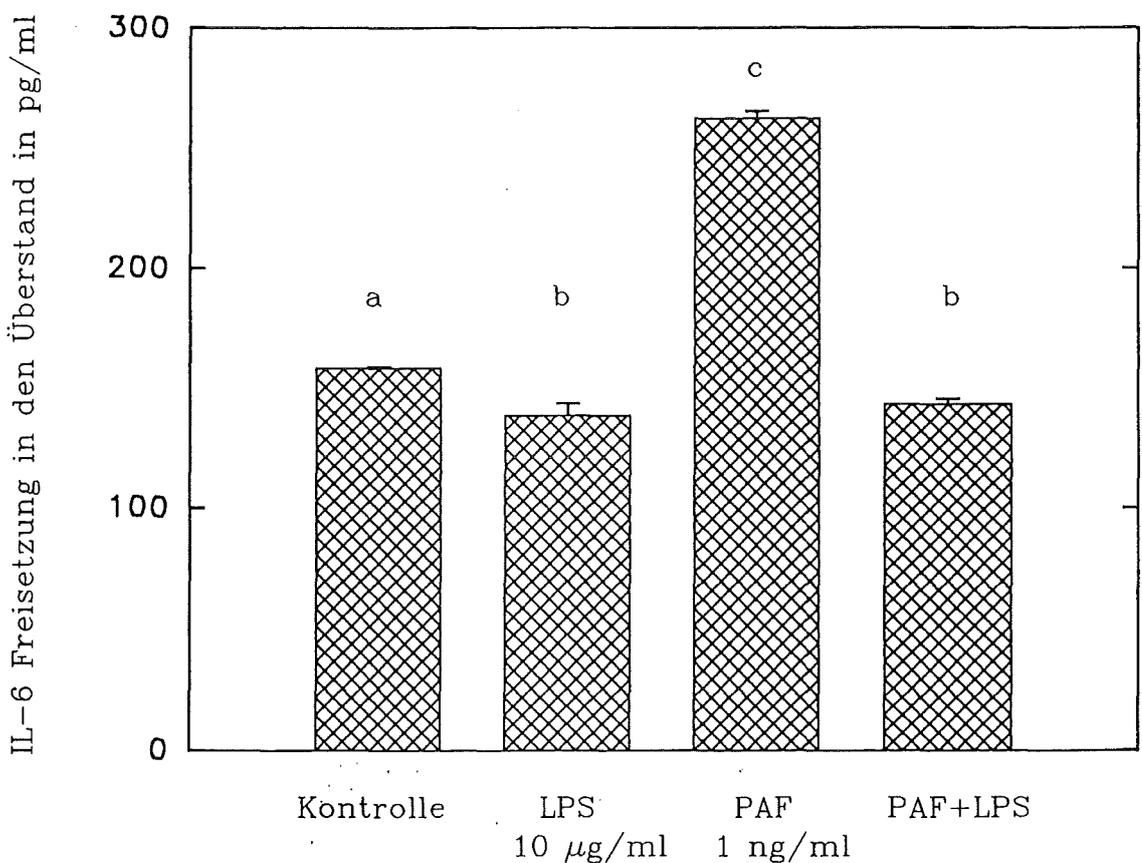
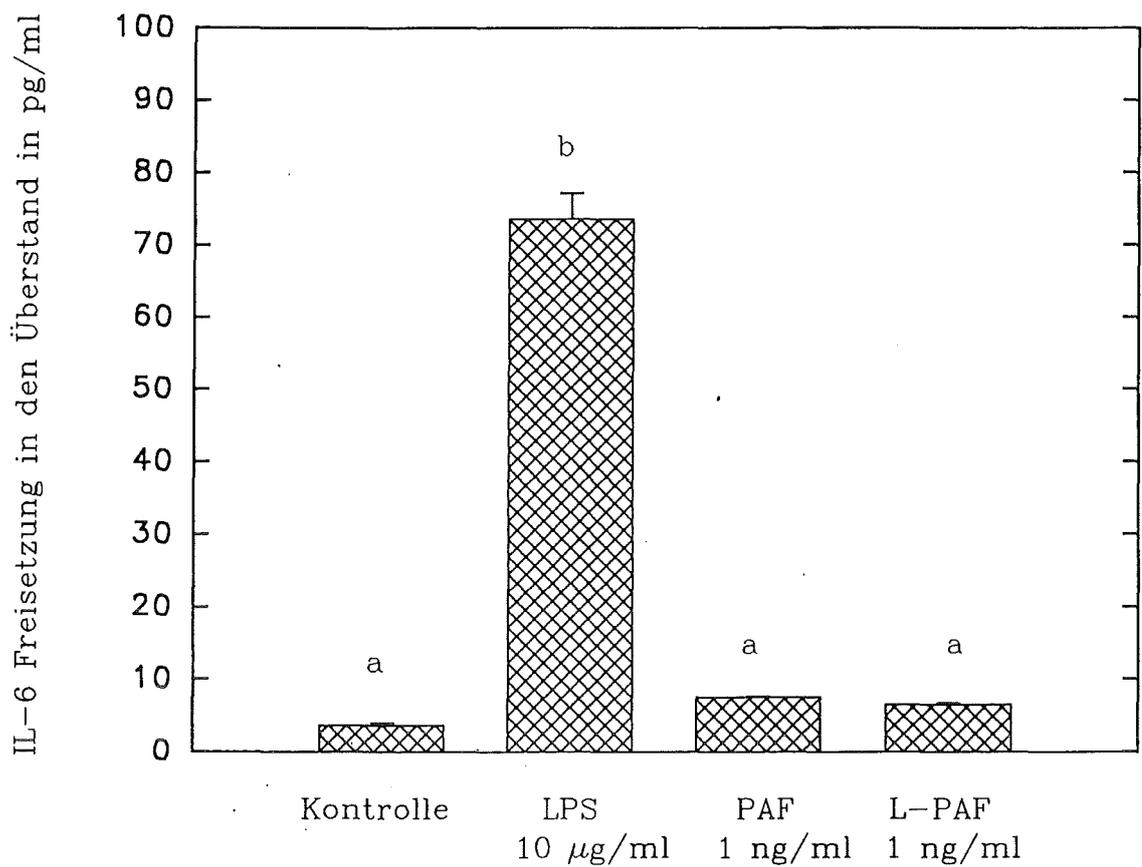


Abbildung 59 b:

Einfluß des Aktivierungszustandes auf die Stimulierbarkeit der IL-6-Sekretion von HL60-Makrophagen nach Submerskultur. Im oberen Teil der Abbildung wurden nicht voraktivierte Zellen mit LPS, PAF und Lyso-PAF inkubiert. In der unteren Abbildung handelt es sich um voraktivierte Zellen, die mit LPS, PAF, LPS + PAF und zwei verschiedenen Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> stimuliert worden waren.

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

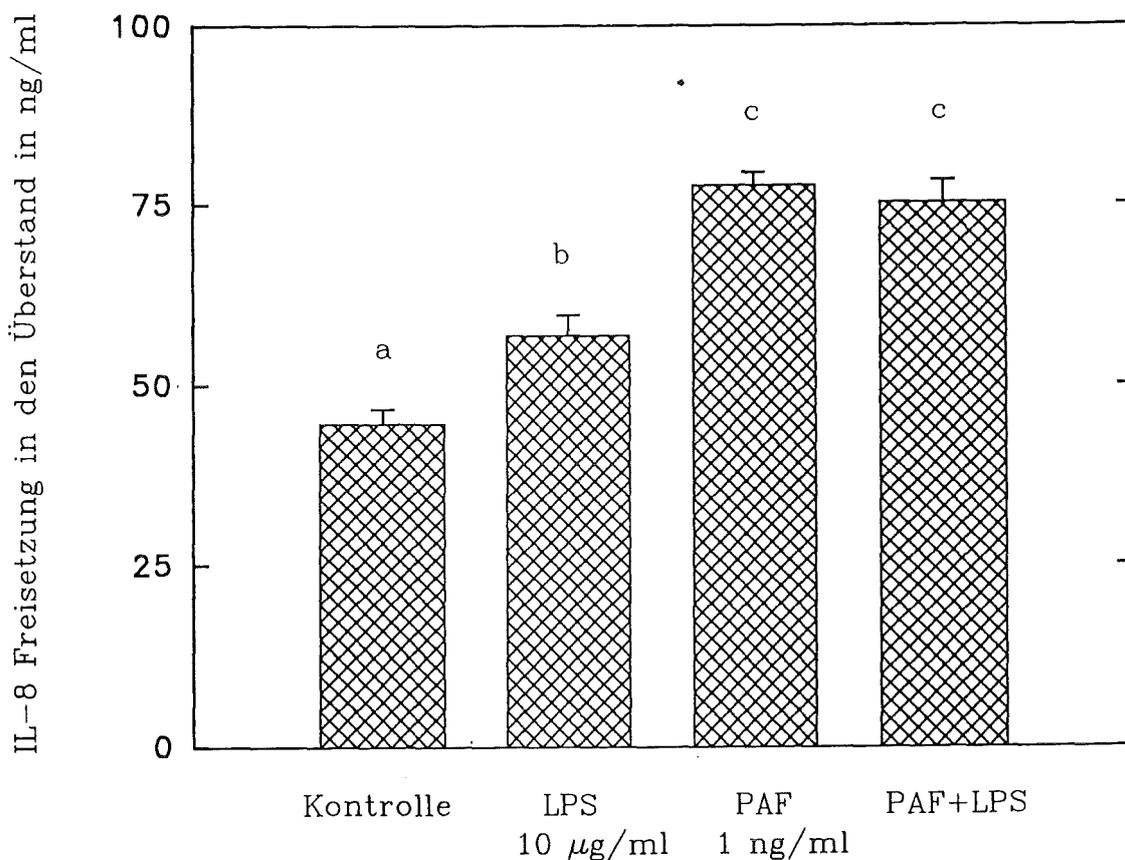
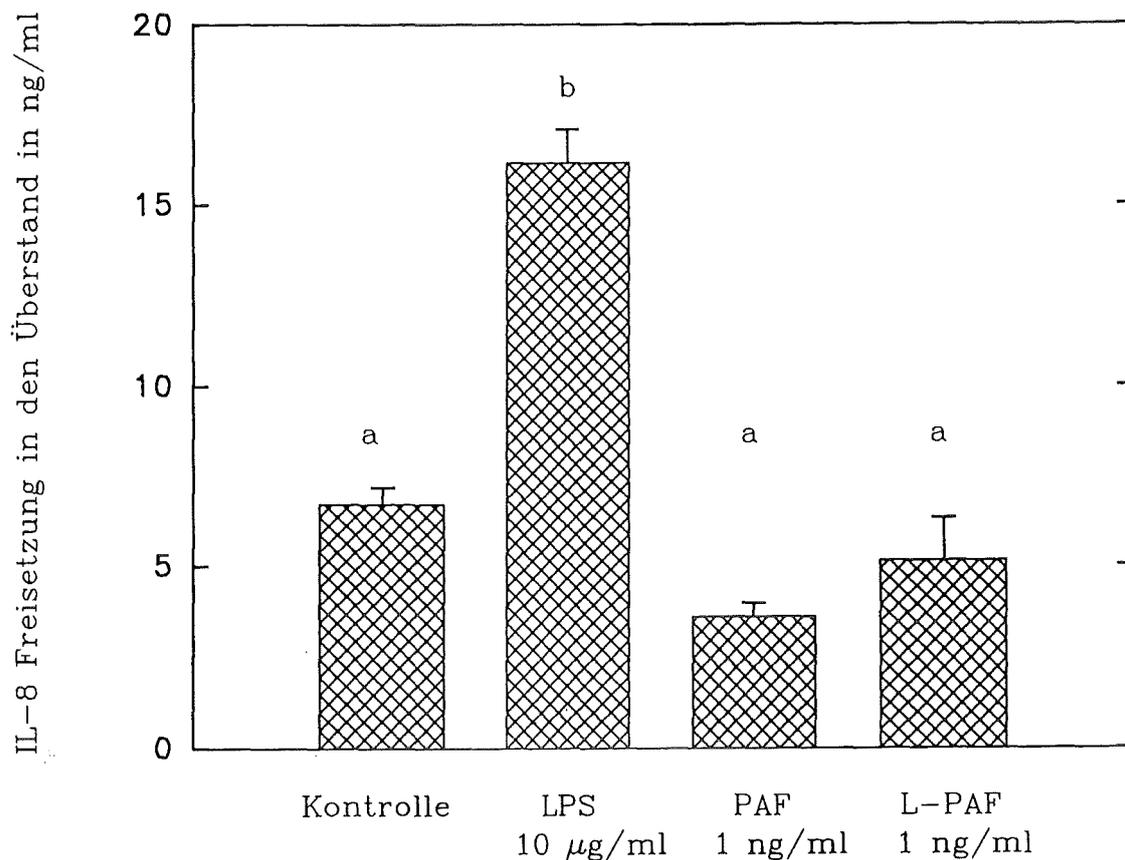


Abbildung 59 c:

Einfluß des Aktivierungszustandes auf die Stimulierbarkeit der IL-8-Sekretion von HL60-Makrophagen nach Submerskultur. Im oberen Teil der Abbildung wurden nicht voraktivierte Zellen mit LPS, PAF und Lyso-PAF inkubiert. In der unteren Abbildung handelt es sich um voraktivierte Zellen, die mit LPS, PAF, LPS + PAF und zwei verschiedenen Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> stimuliert worden waren.

Die statistische Analyse wurde für beide Abbildungen getrennt durchgeführt (n = 6).

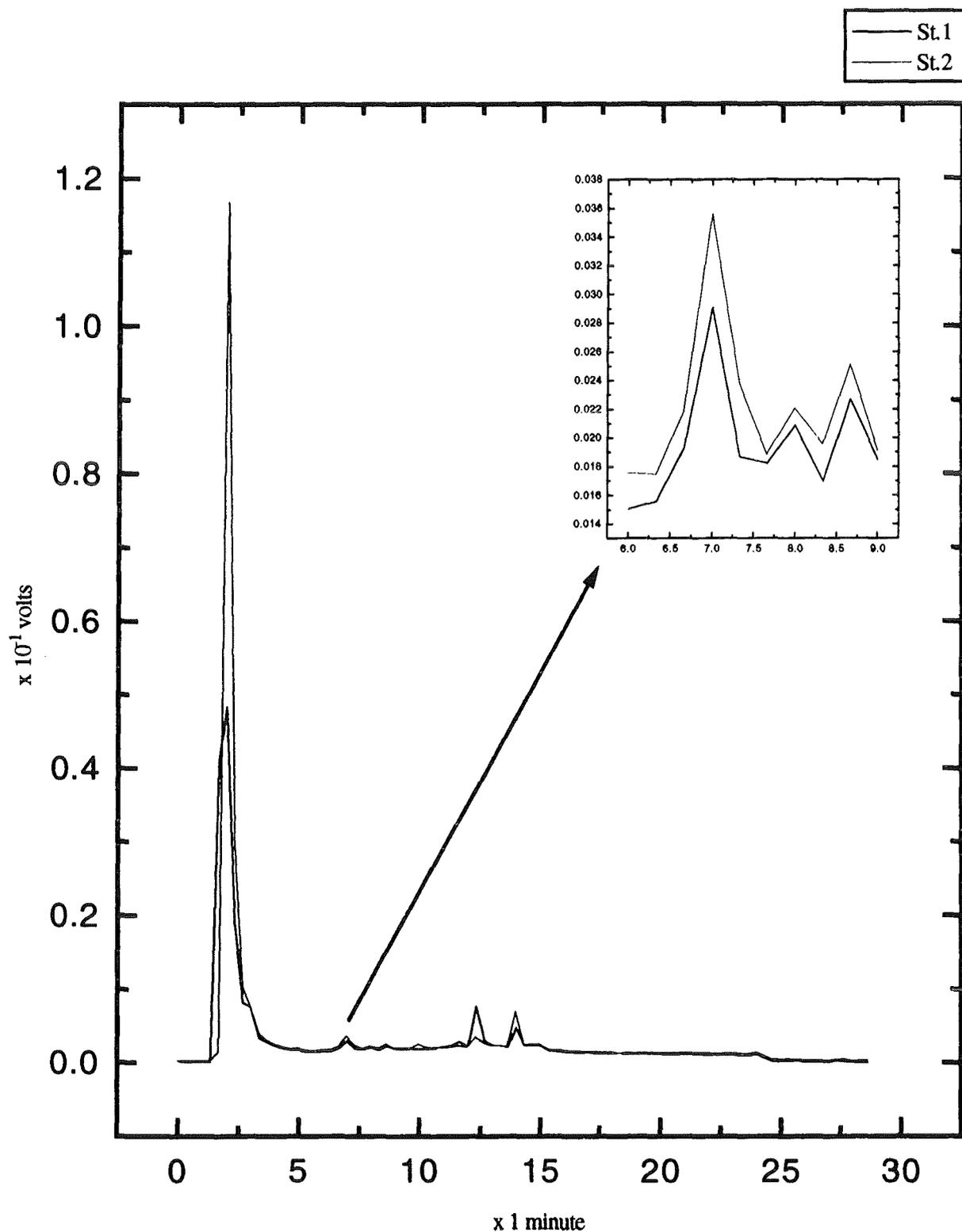


Abbildung 60:

Das Chromatogramm zeigt die Wiederfindungsrate des  $LTB_4$ -Standards nach Auftrennung in der HPLC. Der Standard (100 ng  $LTB_4$ ) wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zu RAM in Gasphase gegeben. Der erste  $LTB_4$ -Standard (St.1) wurde während der 5minütigen Inkubationszeit zu den Zellen gegeben, der Standard 2 (St.2) wurde bei der nachfolgenden Lipidextraktion zugefügt. Die Abszisse zeigt die Retentionszeitpunkte der jeweiligen Substanzen in Minuten, die Ordinate die Spannung in Volt ( $n=6$ ).

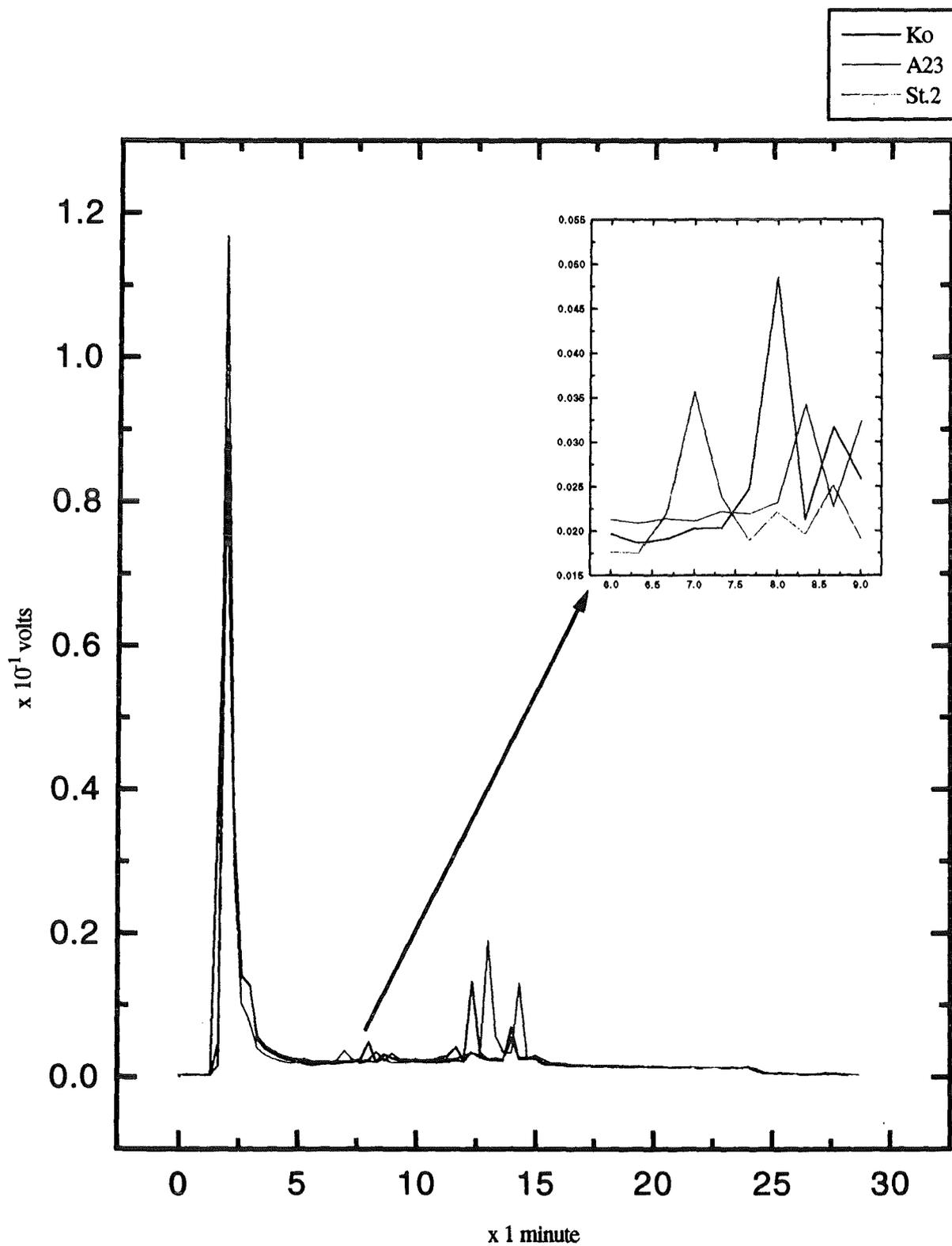


Abbildung 61:

Diese Abbildung zeigt drei separate Chromatogramme von Zellextrakten nach der Auftrennung in der HPLC, die im nacheinander übereinandergelegt wurden. Die Zellextrakte wurden von unstimulierten Zellen (Ko) und von Zellen, die fünf Minuten lang mit A 23187 (A23) stimuliert worden waren, gewonnen. Als methodische Kontrolle wurde den unstimulierten Zellen bei der Extraktion 100 ng LTB<sub>4</sub> (St.2) zugegeben. Dieser Standard entspricht dem Standard 2 aus der vorherigen Abbildung. Der Ausschnitt zeigt die Vergrößerung der Daten von Ko, A 23187 und St. 2. Alle Ansätze wurden mit RAM in Gasphasenkultur durchgeführt, (n=6).

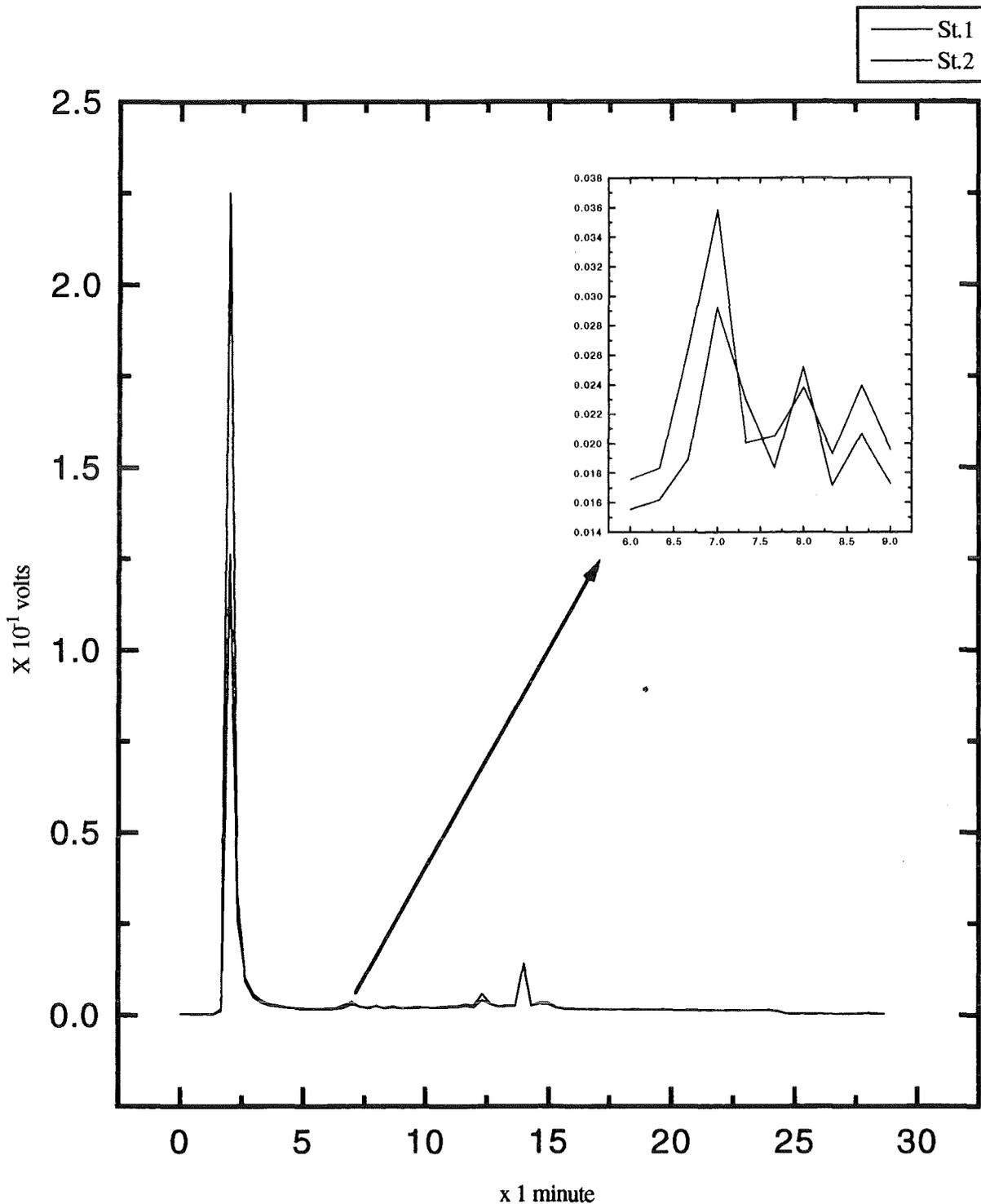


Abbildung 62:

Das Chromatogramm zeigt die Wiederfindungsrate des  $LTB_4$ -Standards nach Auftrennung in der HPLC. Der Standard (100 ng  $LTB_4$ ) wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zu RAM in Submerskultur gegeben. Der erste  $LTB_4$ -Standard (St. 1) wurde während der 5minütigen Inkubationszeit zu den Zellen gegeben, der Standard 2 (St. 2) wurde bei der nachfolgenden Lipidextraktion zugefügt. Die Abszisse zeigt die Retentionszeitpunkte der jeweiligen Substanzen in Minuten, die Ordinate die Spannung in Volt ( $n=6$ ).

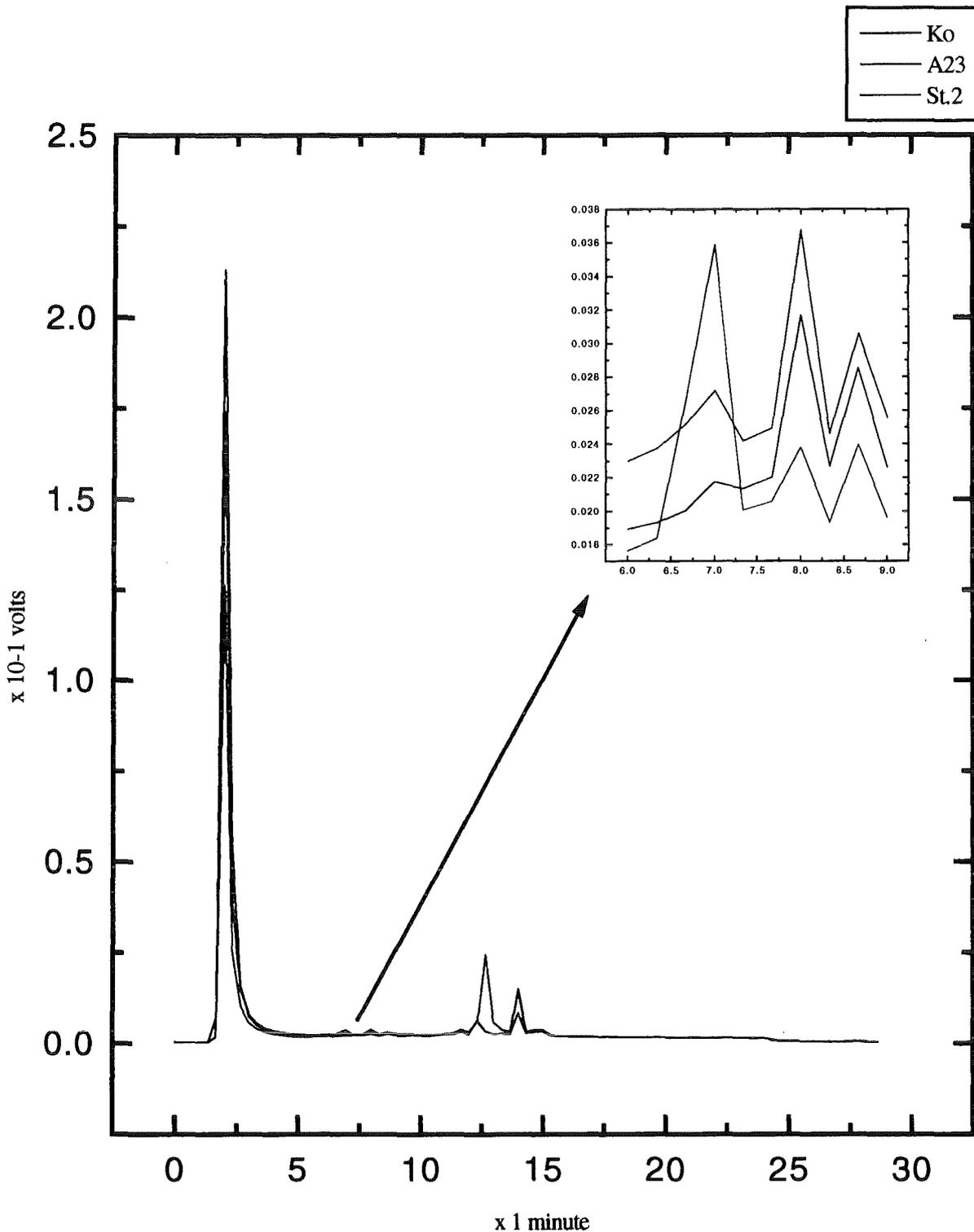


Abbildung 63:

Diese Abbildung zeigt drei separate Chromatogramme von Zellextrakten nach der Auftrennung in der HPLC, die im nachhinein übereinandergelagert wurden. Die Zellextrakte wurden von unstimulierten Zellen (Ko) und von Zellen, die fünf Minuten lang mit A 23187 (A23) stimuliert worden waren, gewonnen. Als methodische Kontrolle wurde den unstimulierten Zellen bei der Extraktion 100 ng LTB<sub>4</sub> (St. 2) zugegeben. Dieser Standard entspricht dem Standard 2 aus der vorherigen Abbildung. Der Ausschnitt zeigt die Vergrößerung der Daten von Ko, A23187 und St. 2. Alle Ansätze wurden mit RAM in Submerskultur durchgeführt, (n=6).