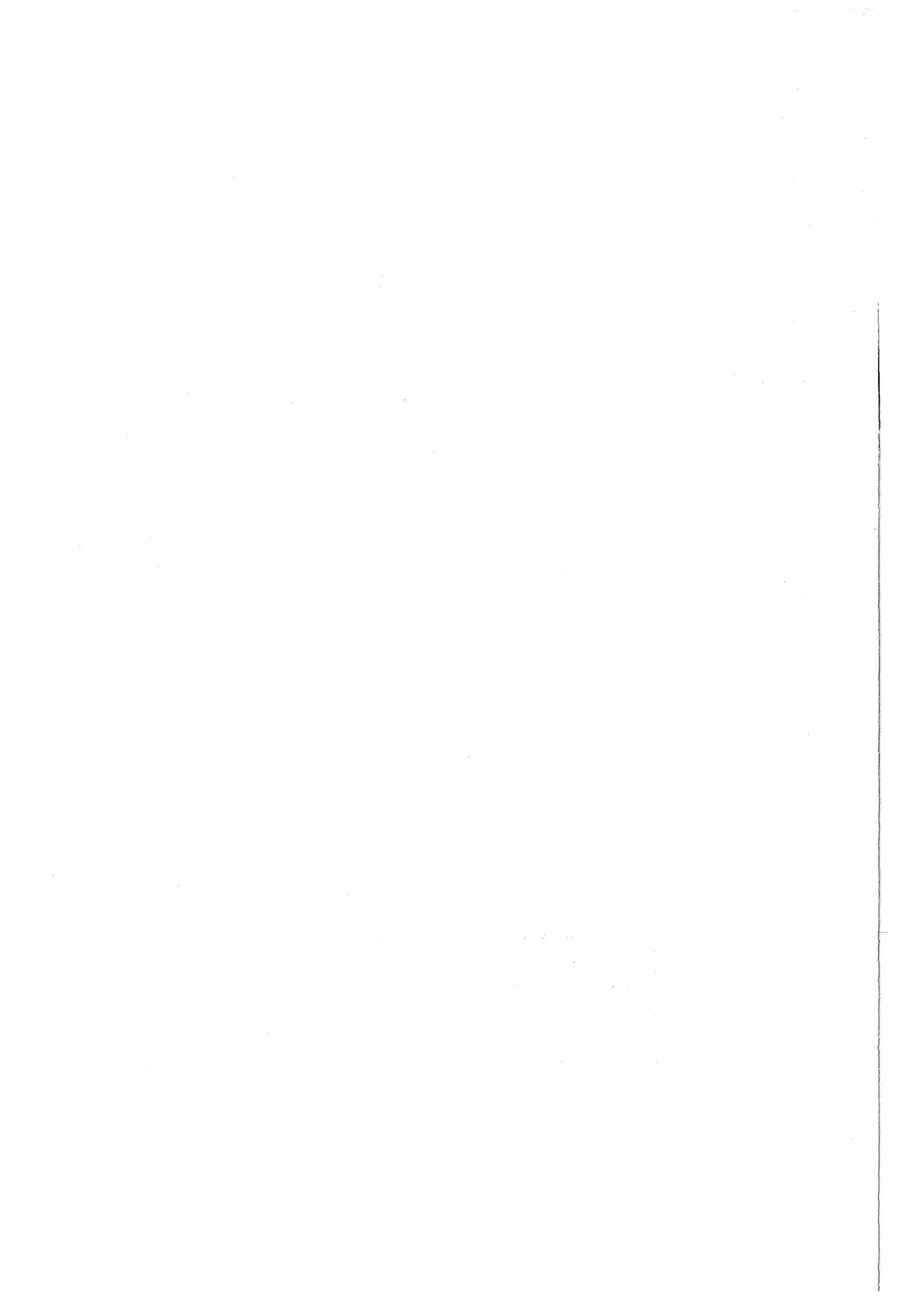


KfK 4649  
Oktober 1989

**Morphologische und  
biochemische Untersuchungen  
zur Wirkung von Quarz auf  
Rinderalveolarmakrophagen  
und deren Organellen**

S. Pätzold  
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

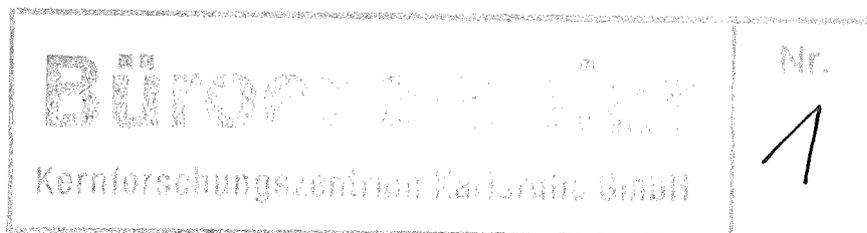
Institut für Genetik und für Toxikologie  
von Spaltstoffen

KfK 4649

MORPHOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN  
ZUR WIRKUNG VON QUARZ AUF  
RINDERALVEOLARMAKROPHAGEN  
UND DEREN ORGANELLEN

Susanne Pätzold

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



Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

1

## Zusammenfassung

Der Einfluß der Phagozytose von Quarzpartikel wurde an in vitro kultivierten Rinderalveolarmakrophagen (RAM) sowie an isolierten Lysosomen untersucht. Eine membranolytische Aktivität von Quarz konnte an isolierten Lysosomen aus Kontrollzellen nicht nachgewiesen werden. Auch partikelhaltige Phagolysosomen, die aus Zellen nach der Phagozytose von Quarz isoliert worden waren, wurden durch innen abgelagerte Partikel nicht lysiert. Eine primäre Schädigung der Lysosomenmorphologie scheint somit nicht die Ursache für die zytotoxische Quarzwirkung zu sein. Vielmehr deuten Hinweise darauf hin, daß die Funktion dieser Organellen durch die intralysosomale Ablagerung von Quarz gestört wird. So ist die Aktivität des elastinolytischen Enzyms Cathepsin B möglicherweise aufgrund eines veränderten pH-Wertes in den quarzhaltigen Phagolysosomen um mehr als 50% reduziert. Die zytotoxische Quarzwirkung auf kultivierte RAM ist bereits nach kurzen Inkubationszeiten sowohl morphologisch als auch anhand eines starken Vitalitätsverlustes erkennbar. Nach längerer Inkubation ( $\geq 47$  Stunden) treten jedoch unempfindliche Subpopulationen auf, die morphologisch völlig intakt erscheinen. Quarz, der vor der Phagozytose mit Dipalmitoyl Lecithin beschichtet wird, hat trotz unverminderter Phagozytoserate über einen Zeitraum von bis zu 90 Stunden keinerlei zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Hier treten vermehrt vielkernige Riesenzellen auf.

Morphological and biochemical investigations of the effect of quartz  
on bovine alveolar macrophages

Abstract

The influence of quartz phagocytosis on cultured bovine alveolar macrophages (BAM) and their lysosomal system was investigated. No membranolytic activity of quartz was observed when either isolated lysosomes from control cells were incubated with the particles or when quartz containing phagolysosomes were kept in vitro for up to two hours. Hence it seems that morphological damage of lysosomes is not the primary reason for the cytotoxic quartz effects. More likely the deposition of quartz in phagolysosomes seems to impair lysosomal function. This is revealed by a more than 50% reduction of the activity of the elastinolytic lysosomal enzyme cathepsin B in BAM after quartz phagocytosis, possibly because of an increase of pH in quartz containing secondary lysosomes. Quartz phagocytosis leads to morphological changes in BAM as well as to a rapid loss of cell vitality. After longer periods of incubation ( $\geq 47$  hours), however, quartz resistant subpopulations were observed, which showed no signs of morphological alterations. Quartz that has been coated with dipalmitoyl lecithin prior to phagocytosis had no cytotoxic effects for up to 90 hours. The development of multinucleated giant cells was observed in these cultures.

## Abkürzungen

AM	Alveolarmakrophagen
RAM	Rinderalveolarmakrophagen
Ko	Kontrolle
ÜÜ	zellfreier Kulturüberstand
ZÜ	Zellen im Kulturüberstand
Z	adhaerente Zellen

## PUFFER und MEDIEN

FCS	foetales Kälberserum
GP	Gradientenpuffer
KM	Kulturmedium
KP	Kammerpuffer

## CHEMIKALIEN

AO	Acridin Orange
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPL	L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin-Dipalmitoyl (Dipalmitoyl Lecithin)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Metrizamid	2-[3-acetamido-5-N-methyl-acetamido-2,4,6-trijodo-benzamido]-2-deoxy-D-glukose
TPA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
TX-100	Triton X-100

## PARTIKEL

A	Titan(IV)Oxid, Anatas
L	Latex
Q1	Sicron F600 Quarz (Fa. Palas, Karlsruhe)
Q2	DQ12-Quarz (Dr.K.H.Friedrichs, Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Düsseldorf)
Q3	DQ12-Quarz (Dr.K.Robock, Forschungsinstitut Bergbauverein, Essen-Kray)
Q4	DQ12-Quarz (Dr.L.Armbruster, Forschungsinstitut Bergbauverein, Essen-Kray)
Q5	Subfraktion von Q2
Q6	Subfraktion von Q3
Q7	Subfraktion von Q1
Q8	DQ12-Quarz (Dr.N.Seemayer, Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Düsseldorf)
Q9	Subfraktion von Q5
CMAD	"count median aerodynamic diameter"

## SUBZELLULÄRE FRAKTIONEN

"N"	870g-Sediment, vorwiegend bestehend aus Zellkernen, Zelltrümmern und intakten Zellen
"E"	Überstand über "N"
"ML"	16,000g-Sediment, vorwiegend bestehend aus Mitochondrien und Lysosomen
"X"	Überstand über "ML"
"P"	102,000g-Sediment, bestehend aus Plasmamembranen und Endoplasmatischem Retikulum
"S"	Zytosol, Überstand über "P"

## ENZYME

NAG	N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
LDH	Laktatdehydrogenase
SP	Saure Phosphatase

## Elektronenmikroskopie

REM	Rasterelektronenmikroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Kulturmedien und Puffer</b>	<b>8</b>
2.1.1. Kulturmedien für Alveolarmakrophagen	8
2.1.2. Puffer für die Trägerfreie Elektrophorese	8
2.1.3. Gradientenpuffer (GP)	8
2.1.4. Phosphatgepufferte Salzlösungen	9
2.1.5. Puffer für die Enzymbestimmungen	9
2.1.6. Puffer für die Elektronenmikroskopie	10
2.1.6.1. Rasterelektronenmikroskopie	10
2.1.6.2. Transmissionselektronenmikroskopie	10
<b>2.2. Staubsuspensionen</b>	<b>11</b>
2.2.1. Latex	11
2.2.2. Titan(IV)Oxid (TiO <sub>2</sub> )	12
2.2.3. Quarz (SiO <sub>2</sub> )	12
2.2.4. Phospholipid-behandelter Quarz	13
<b>2.3. Zellkultur</b>	<b>14</b>
2.3.1. Isolierung der Rinderalveolarmakrophagen	14
2.3.2. Primärkultur der Alveolarmakrophagen	15
2.3.3. Präparation für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen	15
2.3.3.1. Lichtmikroskopie	16
2.3.3.1.1. Vitalitätsbestimmung der kultivierten Zellen	16
2.3.3.1.2. Hemacolor-Schnellfärbung	16
2.3.3.1.3. Fluoreszenzmarkierung mit Acridin Orange	16
2.3.3.2. Rasterelektronenmikroskopie	17
2.3.3.3. Transmissionselektronenmikroskopie	17
<b>2.4. Biochemische Untersuchungen</b>	<b>18</b>
2.4.1. Proteinbestimmung	18
2.4.2. Enzymbestimmungen	18
2.4.2.1. N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAG)	19
2.4.2.2. Saure Phosphatase (SP)	19

	Seite	
2.4.2.3.	Cathepsin B	20
2.4.2.4.	Glutamatdehydrogenase (GLDH)	21
2.4.2.5.	Laktatdehydrogenase (LDH)	21
<b>2.5.</b>	<b>Subzelluläre Fraktionierung der Alveolarmakrophagen durch differentielle Zentrifugation</b>	<b>21</b>
2.5.1.	Fraktionierung der Alveolarmakrophagen	22
2.5.2.	Präparation der "ML"-Fraktion aus Kontrollzellen für die Trägerfreie Elektrophorese	23
2.5.2.1.	Trägerfreie Elektrophorese der "ML"-Fraktion	23
2.5.2.2.	Transmissionselektronenmikroskopie hochreiner Lysosomen	24
2.5.3.	<u>In vitro</u> -Inkubation der "N"- und "ML"-Fraktionen aus quarzkubierten Alveolarmakrophagen	24
2.5.3.1.	Dichtegradientenzentrifugation der "N"-und "ML"-Fraktionen	24
2.5.4.	Inkubation isolierter Lysosomen mit verschiedenen Stäuben	25
2.5.4.1.	"ML" aus Kontroll-Alveolarmakrophagen	25
2.5.4.2.	"ML" aus Rattenleber	26
2.5.5.	Inkubation der Fraktionen "P" und "S" mit DQ12-Quarz (Q8)	27
<b>2.6.</b>	<b>Auswertung und Präsentation der Daten</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
<b>3.1.</b>	<b>Morphologische Untersuchungen</b>	<b>28</b>
3.1.1.	Lichtmikroskopie	28
3.1.2.	Fluoreszenzmikroskopie	29
3.1.3.	Rasterelektronenmikroskopie	29
3.1.4.	Transmissionselektronenmikroskopie	31
<b>3.2.</b>	<b>Biochemische Untersuchungen</b>	<b>49</b>
3.2.1.	Einfluß der <u>in vitro</u> -Kultivierung	49
3.2.2.	Inkubationen mit verschiedenen Stäuben	50
3.2.3.	Wirkung von Quarz auf Alveolarmakrophagen	52
3.2.3.1.	Vergleich verschiedener Quarzfraktionen	52
3.2.3.1.1.	Vitalität	52
3.2.3.1.2.	Enzym- und Proteinverteilung	53
3.2.3.2.	Vergleich von nativem und Phospholipid-behandeltem Quarz (Q5)	58

	Seite
<b>3.3. Untersuchungen an fraktionierten Zellen</b>	64
3.3.1. Trägerfreie Elektrophorese der "ML"-Fraktion	64
3.3.1.1. Verhalten gelöster Enzyme in der Trägerfreien Elektrophorese	64
3.3.2. Morphologische Untersuchungen an isolierten Organellen	67
3.3.2.1. Isolierte Organellen aus quarzinkubierten Zellen	70
3.3.3. Quarzeinfluß auf Freisetzung und subzelluläre Verteilung von Enzymen und Protein	74
3.3.3.1. Einfluß von nativem Quarz	75
3.3.3.2. Einfluß von Phospholipid-behandeltem Quarz	80
3.3.4. Stabilität der Lysosomen aus quarzinkubierten Zellen	82
3.3.5. Dichtegradientenzentrifugation der "N"- und "ML"-Fraktion	86
3.3.5.1. Verteilungsprofile im linearen Saccharosedichtegradienten	86
3.3.5.2. Verteilungsprofil der NAG im linearen Metrizamiddichte- gradienten	91
3.3.6. Inkubationsversuche mit der "ML"-Fraktion aus Kontrollzellen	93
3.3.6.1. "ML" aus Alveolarmakrophagen	93
3.3.6.2. "ML" aus Rattenleber	96
3.3.6.3. Einfluß der Quarzdosis auf "ML" aus Alveolarmakrophagen	97
3.3.6.4. Quarzeinfluß auf "P" und "S" aus Alveolarmakrophagen	102
<b>4. DISKUSSION</b>	104
4.1. Lysosomen und ihre Reaktion auf Partikel	104
4.2. Rinderalveolarmakrophagen und ihre Reaktion auf Partikel	111
4.3. Phospholipid-Schutzeffekt	117
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	120
<b>6. LITERATUR</b>	123

## 1. EINLEITUNG

Die Lunge ist das primäre Zielorgan für gasförmige und partikuläre Schadstoffe, die sich in der Atemluft befinden. Die Inhalation und Ablagerung von partikulären Substanzen in der Lunge kann zu pathologischen Veränderungen führen, die unter dem Begriff der "Pneumokoniose" zusammengefaßt werden. Diese Staublungerkrankungen werden in der Medizin in zwei Gruppen, die "benignen" und "malignen" Pneumokoniosen, eingeteilt (PSCHYREMBEL 1985). Erstere ist dadurch charakterisiert, daß die in der Lunge abgelagerten Stäube nicht zu fibrotischen Veränderungen führen. Hierzu zählen Stäube wie Eisenstaub (Siderose), reiner Kohlenstaub (Anthrakose) und Schwerspatstaub (Barytose) aber auch Latexpartikel, Titan(IV)Oxid- und Korundstäube, die vielfach experimentell als Kontrollstäube genutzt werden (zur detaillierten Übersicht siehe PARKES 1982).

Bei den malignen Pneumokoniosen, oder Fibrosen, kommt es dagegen zu meist irreversiblen Veränderungen der alveolären Strukturen durch verstärkte Ablagerung von Kollagen und durch Narbenbildung in der Lunge. Sie werden durch mineralische Stäube wie z.B. Quarz (Silikose), Asbest (Asbestose), Kaolin (Kaolinose) aber auch durch pflanzliche Stäube z.B. von Getreide (Farmerlunge) verursacht (MATTHYS 1982). Besonders gefährdet sind Menschen, die am Arbeitsplatz einer hohen Staubbelastung ausgesetzt sind, wie Arbeiter im Bergbau, in asbestverarbeitenden Betrieben (HOLT 1987, SCHLIPKÖTER 1982), aber z.B. auch in der Keramik- und Porzellanindustrie (WAGNER et al. 1986). Durch die weitreichende Nutzung z.B. von Asbest in Bremsbelägen oder Dachziegeln, kommen jedoch die meisten Menschen auch im täglichen Leben unabhängig von ihrem Arbeitsplatz in Kontakt mit derartigen Stäuben.

Ein typischer Vertreter stark fibrogener und zytotoxischer Stäube ist Quarzstaub. Bereits ein Quarzanteil von 3% in einem Staubgemisch genügt, um experimentell die Ausbildung einer fibroblastischen Gewebsreaktion zu induzieren (SCHLIPKÖTER 1982). Quarz gehört zu den Silikaten, die als wichtigste gesteinsbildende Minerale zu 95% am Aufbau der Erdkruste beteiligt sind. In reiner kristalliner Form treten die Silikate in verschiedenen Modifikationen des Siliciumdioxides auf, neben dem Quarz auch als Tridymit und Cristobalit. Ihre Kristallkonfiguration setzt sich aus Tetraedern zusammen, in denen je zwei Silicium-Atome gemeinsam von vier Sauerstoffatomen umgeben sind (HOHL 1981).

Aufgrund seiner weiten Verbreitung ist Quarzstaub von großer klinischer und sozialmedizinischer Bedeutung. Das pathologische Erscheinungsbild der Silikose, einer nodulären Form der Pneumokoniose, ist durch das Auftreten knötchenförmiger, bindegewebiger Agglomerationen an den Staubablagerungsorten charakterisiert. Dort kommt es u.a. zur Ansammlung von Makrophagen und zur vermehrten Proliferation und Anheftung von Fibroblasten, die verstärkt Kollagen synthetisieren. In schweren Krankheitsfällen verschmelzen die Knötchen zu ausgedehnten Herden, die zu Schrumpfungen und Verziehungen von Lungenteilen führen, so daß es zu schweren Lungenfunktionsstörungen u.a. zu Reizhusten, Atemnot, Brustschmerzen und Funktionsminderung von Kreislauf und Atmung kommt (HILSCHER et al. 1987, NETTER 1982).

Zu den Besonderheiten der Silikose zählt, daß sie auch noch Jahre nach der Staubexposition fortschreitet und sich oft erst nach mehr als 10 Jahren manifestiert (REISER & LAST 1979). Als "lungengängig" gelten Partikel, die einen Durchmesser von weniger als 3 µm Durchmesser haben (KLOSTERKÖTTER & ROBOCK 1975, NETTER 1982).

Die Genese der quarzinduzierten Lungenfibrose wird seit über 40 Jahren intensiv untersucht. Einen Literaturüberblick hierzu geben REISER & LAST (1979). Der erste Hinweis auf die Risiken, die von Quarzstaub ausgehen, stammt bereits aus dem Jahr 1556 von Agricola, der die Gefahr der Silikose im Bergbau beschreibt (HOLT 1957). Die experimentelle Induktion fibroblastischer Reaktionen durch Quarz anhand von in vivo-Experimenten gelang KING et al. (1950) an Ratten und POWELL & GOUGH (1959) an Kaninchen. Seither wurden in vivo-Untersuchungen an verschiedenen Tierarten durchgeführt, in jüngster Zeit u.a. von ESKELSON et al. (1988), RENDALL et al. (1988), SJÖSTRAND & RYLANDER (1987).

Wesentliche Fortschritte in der Silikoseforschung erbrachte die Entwicklung der Lungenlavage-Technik, die erstmals von MYRVIK et al. (1961) am Kaninchen und von FINLEY et al. (1967) am Menschen beschrieben wurde. Mit dieser Methode wurde es einerseits möglich, im in vivo-Experiment durch Quarz induzierte Lungenveränderungen besser zu erfassen bzw. isolierte Zellen und Alveolarflüssigkeit aus den Lungen kranker Personen zu untersuchen. Andererseits eröffnete sich die Möglichkeit, Alveolarmakrophagen zu isolieren, in vitro zu kultivieren und als Testsystem für verschiedene Fragestellungen zu verwenden.

Als erste Frühreaktion nach Quarzinhalation wird eine verstärkte Proliferation und sekretorische Aktivität der Typ II-Pneumozyten beobachtet, die verstärkt

Surfactant sezernieren. Hierdurch kommt es zu einer starken Zunahme von Phospholipiden in der Lunge (ESKELSON et al. 1988, HEATH et al. 1976, SCHLIPKÖTER 1982). Außerdem wird in der zellfreien Lavageflüssigkeit eine Zunahme zytoplasmatischer und lysosomaler Enzyme beobachtet (DETHLOFF et al. 1987, SJÖSTRAND & RYLANDER 1987). Als zelluläre Frühreaktion treten verstärkt Neutrophile und Granulozyten auf bei gleichzeitig verminderter Zahl von Alveolarmakrophagen (BEHRENDT et al. 1987). Aus diesen und anderen Untersuchungen (u.a. ZISKIND et al. 1976) geht hervor, daß die Alveolarmakrophagen als Zielzellen für lungengängige Staubpartikel anzusehen sind und eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielen (PARKES 1982).

Der Zelltyp der Makrophagen wurde von METCHNIKOFF (1887) entdeckt. Sie kommen in verschiedenen Geweben wie Lymphknoten, Haut, Leber und Lunge und in der peritonealen Leibeshöhle vor. Der Ursprung der differenzierten Gewebsmakrophagen liegt im Knochenmark, wo aus pluripotenten Stammzellen Monozyten hervorgehen, die im Blut zirkulieren und von dort aus in die Gewebe einwandern (VAN FURTH 1970). Somit gehören diese Zellen gemeinsam mit den Granulozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und Erythrozyten zum Hämatopoetischen Zellsystem. Bei der Maus differenzieren sich 56% der Monozyten in der Leber zu Kupfferzellen, 15% in der Lunge zu Alveolarmakrophagen und 8% in der Leibeshöhle zu Peritonealmakrophagen (VAN FURTH 1981). Die Verweildauer der Monozyten im Blut beträgt 24 Stunden und in den Alveolen 4 Tage (BOWDEN & ADAMSON 1980).

Eine wichtige Funktion der Makrophagen ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose (u.a. DAVIES & ALLISON 1984, FELS & COHN 1986), die bei Alveolarmakrophagen durch ihre ständige Konfrontation mit inhalierten Stoffen besondere Bedeutung hat. Fremdstoffe wie Stäube und Mikroorganismen werden aufgenommen und entweder verdaut oder mit Hilfe des mucoziliären Transports über die Bronchien oder durch das Interstitium in die Lymphgefäße und Lymphknoten aus der Lunge abtransportiert (BOWDEN 1984). Somit kommt den Alveolarmakrophagen eine wichtige Rolle in der Reinhaltung der Lungenoberfläche zu.

Vielfältige Bedeutung erlangen Makrophagen auch durch ihre Funktion als sekretorische und zytotoxische Effektorzellen (FELS & COHN 1986, CARDELLA et al. 1974), als akzessorische Zellen in der Immunabwehr (RICHES et al. 1988, SHARMA 1986) und durch ihre Rolle bei der Regulation des Lipidstoffwechsels (KOTTKE 1987).

Heute ist allgemein akzeptiert, daß die Phagozytose der Quarzpartikel durch Alveolarmakrophagen als erstes Ereignis in der Entwicklung der

pathogenetischen Veränderungen anzusehen ist (u.a. ALLISON 1971). Der Prozeß, der von der Phagozytose der Partikel über das Absterben der Makrophagen bis hin zu den fibrotischen Prozessen in der Lunge führt, ist bisher jedoch wenig verstanden. Die Toxizität von Quarz auf in vitro-kultivierte Peritoneal- und Alveolarmakrophagen konnte von MARKS (1957) nachgewiesen werden. An in vitro-kultivierten Zellen können die durch die Quarzphagozytose induzierten Zellreaktionen gut untersucht werden, obwohl die Extrapolation der Daten auf die in vivo-Situation nicht unumstritten ist. Zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen, die mit der Phagozytose und intrazellulären Ablagerung der Partikel einhergehen, ist ein streng standardisiertes in vitro-Modell mit kontrollierbaren Bedingungen jedoch vorzuziehen. Derartige Untersuchungen stellen eine wichtige Ergänzung zu den im Tiermodell ermittelten Ergebnissen dar. Gute Übereinstimmung zwischen der relativen Toxizität von Quarz in vitro und der Pathogenität und fibrogenen Aktivität in vivo geht auch aus verschiedenen Untersuchungen hervor (MARKS & NAGELSCHMIDT 1959, MILLER 1979, VIGLIANI et al. 1961).

Von Alveolarmakrophagen phagozytierte Partikel werden in Phagosomen aufgenommen, die daraufhin mit primären Lysosomen fusionieren. Diese wurden erstmals von DE DUVE et al. (1955) aus Leberhomogenat isoliert und beschrieben. Die sauren Hydrolasen der Lysosomen ergießen sich nach der Fusion in das Phagosom und bauen dessen Inhalt ab (CAPO et al. 1983, D'ARCY HART et al. 1983, MOR & GOREN 1987). Dieser Vorgang findet auch statt, wenn unverdauliche inerte Partikel, wie z.B. Latexpartikel phagozytiert werden. Da diese nicht abgebaut werden können, verbleiben sie in der Zelle, ohne jedoch Schäden zu verursachen. Wird dagegen nativer Quarz phagozytiert, sterben die Makrophagen innerhalb weniger Stunden ab (SEEMAYER 1985). Auch diese Partikel werden in membranumgrenzten Phagosomen abgelagert (ALLISON et al. 1966, SEIDEL et al. 1989). Nach einigen Stunden kann jedoch eine zunehmende Desintegration des Zytoplasmas und der Zellmembran beobachtet werden. Einige Arbeitsgruppen berichten von zunehmender Aktivität der sauren Hydrolasen im Zytoplasma der Zellen, die auf eine intrazelluläre Zerstörung der Lysosomen- bzw. der Phagolysosomenmembran zurückgeführt wird (ALLISON & MORGAN 1979, KANE et al. 1985).

Die wichtige Frage nach dem primären Schaden, der durch Quarz verursacht wird und der zu den pathogenetischen Ereignissen in der Lunge führt, ist bislang nicht geklärt. In der Vergangenheit wurde von der Hypothese einer durch Quarz induzierten intrazellulären Ruptur der Lysosomen ausgegangen (ALLISON & MORGAN 1979). So konnten DEHNEN & FETZER (1967) sowie

WEISSMANN & RITA (1972) in einem Modellsystem, in dem isolierte Leberlysosomen in vitro mit Quarz inkubiert wurden, eine verminderte Latenz der Organellen feststellen. In jüngerer Zeit sind jedoch Zweifel an dieser Hypothese aufgekommen (KANE et al. 1980, 1985). So konnte gezeigt werden, daß die intrazelluläre Ruptur der Lysosomen nicht zum Absterben der Zellen führt.

Da  $\alpha$ -kristalliner Quarz in seinen biologischen und physikalischen Eigenschaften gut charakterisiert ist, erscheint es uns sinnvoll, anhand dieses Materials der Frage nach den initialen pathogenetischen Ereignissen nachzugehen, die nach seiner Inhalation in der Lunge auftreten. Besondere Aufmerksamkeit soll der Frage einer möglichen primären Lysosomenschädigung gelten.

Die meisten Literaturdaten liegen zu dem Quarztyp DQ12 vor, der aus tertiärem Quarzsand der Lagerstätte Dörentrup hergestellt wurde (BECK et al. 1973). Aber auch andere Quarztypen, wie z.B. Min-U-Sil (LOCK et al. 1987, NOLAN et al. 1987a) werden verwendet. Als modifizierende Parameter der Quarztoxizität werden u.a. Herstellungsverfahren, Korngröße und spezifische Oberfläche der Partikel, Fremdelementbeimischung in das Kristallgitter sowie das Verhältnis von Partikel- zu Zellzahl diskutiert (BECK et al. 1973, FUBINI et al. 1987, KRIEGSEIS et al. 1987, NOLAN et al. 1987a, VILIM et al. 1987). Welche dieser Parameter allein oder in Kombination mit anderen ausschlaggebend sind ist bislang nicht geklärt.

In der geplanten Arbeit sollen an in vitro kultivierten Zellen die Quarztypen DQ12 und Sicron F600 verschiedener Herkunft und Korngrößen vergleichend untersucht werden. Ferner ist vorgesehen, die Quarzwirkung mit der Reaktion der Zellen auf Kontrollstäube wie Latexpartikel und Titan(IV)Oxid ( $\text{TiO}_2$ ) zu vergleichen. Latex wird in der Literatur als vollständig inert beschrieben (u.a. DAVIES & ALLISON 1984). Dagegen mehrten sich Hinweise, wonach das ebenfalls als inert geltende  $\text{TiO}_2$  zumindest in vitro eine gewisse Aktivität besitzt (FINCH et al. 1987, NOLAN et al. 1987b). Als Testparameter sind Vitalitätsverlust, Freisetzung verschiedener Markerenzyme in das Kulturmedium sowie morphologische Methoden geplant.

Als Modellsystem für diese Untersuchungen sollen Rinderalveolarmakrophagen (RAM) eingesetzt werden, die als in vitro-Versuchsmodell gut charakterisiert sind (BIELEFELDT OHMANN & BABIUK 1986, FINCH et al. 1987, FOX 1973, McGUIRE & BABIUK 1982, SEIDEL et al. 1988, WIENER 1988). Vergleichende Untersuchungen von SCHIMMELPFENG (1989) an Alveolarmakrophagen

verschiedener Spezies inklusive humaner Zellen belegen die qualitativ vergleichbaren Eigenschaften dieser Zellen in vitro. Sie können in großer Zahl und Reinheit isoliert werden, so daß verschiedene Versuchsansätze parallel an genetisch identischem Zellmaterial durchgeführt werden können. Außerdem stellen sie eine geeignete Quelle für die Isolierung ausreichender Mengen Lysosomen dar.

Zunächst sollen Lysosomen aus Kontroll-RAM isoliert und charakterisiert werden. Hierzu bietet sich die Methode der differentiellen Zentrifugation an, die in unserem Labor für die Isolierung von Leberlysosomen etabliert ist. Die Eigenschaften der Lysosomen sollen anhand morphologischer Verfahren und ihres Verhaltens in Dichtegradienten, in der Trägerfreien Elektrophorese sowie anhand biochemischer Messungen der Latenz einiger typischer Enzyme ermittelt werden.

Zur Untersuchung quarzinduzierter Veränderungen der Organellen, die von ALLISON & MORGAN (1979) als Ursache für die Quarztoxizität genannt werden, sind zwei Versuchsansätze geplant. Zum einen sollen in vitro kultivierten RAM Quarzpartikel zur Phagozytose angeboten werden. Aus diesen Zellen sollen partikelhaltige Phagolysosomen isoliert und mögliche quarzbedingte Effekte, wie verminderte in vitro-Latenz oder veränderte Dichteigenschaften der Organellen untersucht werden.

Als zweiter Versuchsansatz ist vorgesehen, aus Kontrollzellen isolierte Lysosomen mit Quarz zu inkubieren. Mit Hilfe dieser Anordnung konnten DEHNEN & FETZER (1967) und WEISSMANN & RITA (1972) aus isolierten Leberlysosomen eine quarzinduzierte Enzymfreisetzung nachweisen. Anhand isolierter Organellen aus Alveolarmakrophagen soll dieser Befund geprüft werden.

Die intrazelluläre Quarzwirkung soll ferner anhand der subzellulären Verteilung einiger lysosomaler Markerenzyme quantifiziert und mit der Verteilung aus unbehandelten Kontrollzellen verglichen werden.

Neben nativem Quarz sollen auch Partikel eingesetzt werden, die mit Dipalmitoyl Lecitin (DPL), dem Hauptbestandteil des Lungensurfactants, vorbehandelt sind. Hierdurch wird die Quarztoxizität auf in vitro kultivierte Zellen reduziert (WALLACE et al. 1985, 1986). Es soll geprüft werden, über welchen Zeitraum dieser Schutzeffekt anhält und wie er sich auf die subzelluläre Verteilung lysosomaler Enzyme sowie die Latenz der isolierten Phagolysosomen auswirkt.

Die vorliegenden Arbeit hatte somit folgende Ziele:

1. Vergleichende Untersuchung verschiedener  $\alpha$ -kristalliner Quarzstäube an in vitro kultivierten Rinderalveolarmakrophagen (RAM) zur Prüfung der Zellreaktionen sowie der Validität des Modellsystems anhand morphologischer und biochemischer Parameter.
2. Charakterisierung isolierter nativer Lysosomen aus RAM in Bezug auf Morphologie, Stabilität und Verhalten in der Trägerfreien Elektrophorese sowie in ionischen und nicht-ionischen Dichtegradienten.
3. Isolierung von Phagolysosomen aus quarzinkubierten Zellen, Charakterisierung der Quarzwirkung auf die lysosomalen Kompartimente mittels subzellulärer Verteilung lysosomaler Enzyme und in vitro-Stabilität sowie Verhalten der Organellen in ionischen und nicht-ionischen Dichtegradienten.
4. Prüfung der membranolytischen Aktivität von Quarz auf isolierte native Lysosomen durch Bestimmung der Latenz.
5. Untersuchung der DPL-Schutzwirkung und Vergleich der Reaktionen der Zellen und ihrer Organellen mit der Wirkung von nativem Quarz.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Kulturmedien und Puffer

#### 2.1.1. Kulturmedien für Alveolarmakrophagen

##### KM 1

(in vitro-Kultur < 16 Stunden)

RPMI-1640 (Sigma)

50 Einheiten Penicillin/ml

50 µg Streptomycin/ml

##### KM 2

(in vitro-Kultur > 16 Stunden)

RPMI-1640 (Sigma)

200 µg Ampicillin/ml

20 µg Tetracyclin/ml

10 µl Amphotericin B/ml

10% foetales Kälberserum

(FCS, hitzeinaktiviert, Gibco)

#### 2.1.2. Puffer für die Trägerfreie Elektrophorese

##### *Elektrodenpuffer*

##### *Kammerpuffer (KP)*

Triethanolamin	10 mM	1 mM
Essigsäure	10 mM	1 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	10 mM	1 mM
Saccharose	-	306 mM

den pH mit konzentrierter NaOH auf 7.4 einstellen; mit H<sub>2</sub>O<sub>bldest</sub> auf je 5l auffüllen (nach HENNING & HEIDRICH 1974).

#### 2.1.3. Gradientenpuffer (GP)

250 mM Saccharose

10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan

den pH mit HCl auf 8.6 einstellen.

#### 2.1.4. Phosphatgepufferte Salzlösungen

##### *PBS*

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

pH auf 7.4 einstellen

##### *DPBS*

137.0 mM NaCl  
3.0 mM KCl  
1.0 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
0.6 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O  
8.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
1.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH auf 7.4 einstellen  
(nach WEISSMAN & RITA 1972)

#### 2.1.5. Puffer für die Enzymbestimmungen

##### *Carbonat-Bicarbonat-Puffer*

Lösung A: 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21.2 g/l)

Lösung B: 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> (16.8 g/l)

Lösung A mit Lösung B auf pH 10.5 einstellen.

##### *Laktat-Puffer*

40 mM Na-Laktat (4.48 g/l)

mit Milchsäure auf pH 3.7 einstellen

##### *Glycin-HCl-Puffer*

50 mM Glycin (3.75 g/l)

mit 1 M HCl auf pH 3.3 einstellen

##### *Phosphatpuffer*

Lösung A: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (13.8 g/l)

Lösung B: 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (17.8 g/l)

Lösung A mit Lösung B auf pH 5.2 einstellen

zu 1000 ml Phosphatpuffer:            1.2 mM EDTA (446.7 mg/ml)  
   4.0 mM Cysteamin (308.4 mg/ml)  
   zugeben

den pH mit Phosphorsäure auf pH 5.2 einstellen.

## **2.1.6. Puffer für die Elektronenmikroskopie**

### **2.1.6.1. Rasterelektronenmikroskopie**

#### ***Puffer A***

50 ml Cacodylat-Puffer (200 mM) (s. 2.1.6.2.)  
20 ml 25% Glutaraldehyd  
30 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
pH ca. 7.2

#### ***Puffer B***

50 ml Cacodylat-Puffer (200 mM) (s. 2.1.6.2.)  
7 g Saccharose  
50 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### ***Puffer C***

50 ml Cacodylat-Puffer (200 mM) (s. 2.1.6.2.)  
50 ml 4% Osmiumtetroxid

### **2.1.6.2. Transmissionselektronenmikroskopie**

#### ***Cacodylatpuffer***

200 mM Na-Cacodylat (42.8 g/l)  
mit 1 M HCL auf pH 7.0 einstellen

### ***Bleicitratlösung***

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

in 30 ml  $\text{CO}_2$ -freiem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  lösen, nach 30 Min. 8 ml  
NaOH (1M) dazugeben, mit  $\text{CO}_2$ -freiem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 50 ml  
auffüllen

### ***Uranylacetat***

gesättigte, wässrige Lösung

### ***Osmiumtetroxid-Lösung***

1 ml Veronal-Puffer            2.94 g Na-diethylbarbitursäure  
   1.94 g Na-acetat x  $3\text{H}_2\text{O}$   
   in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

1 ml HCl (0.1 M)  
1.25 ml 4% Osmiumtetroxid  
1.75 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

## **2.2. Staubsuspensionen**

### **2.2.1. Latex**

Als biologisch inerte Testpartikel wurden Latexpartikel (Dow-Latex, Serva) in Konzentrationen von 100 bzw. 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KM1 verwendet ( $\phi$  1.1  $\mu\text{m}$  bzw. 2.02  $\mu\text{m}$ ). Die Inkubationszeiten mit Latex betragen 2 und 4 Stunden für die biochemischen Untersuchungen, 47 Stunden für die Rasterelektronenmikroskopie und 60 Stunden für die Fluoreszenzmikroskopie.

Für die Hemacolor-Schnellfärbung (s. 2.3.3.1.2.) wurden die mit Latex inkubierten Zellen nach der Fixierung für etwa 3 Stunden mit Xylol behandelt, um die außen an den Zellen anhaftenden nicht phagozytierten Latexpartikel aufzulösen (PAROD & BRAIN 1983, VAN FURTH & DIESELHOFF-DEN DULK 1980).

### 2.2.2. Titan(IV)Oxid (TiO<sub>2</sub>)

Als weiterer Kontrollstaub wurde Titandioxid der Konfiguration Anatas (Aldrich) in Konzentrationen von 150 bzw. 250 µg/ml KM1 verwendet.

Reinheit (lt. Hersteller)	99.9%
Dichte	3.9 g/cm <sup>3</sup>
spezifische Oberfläche (s. 2.2.3.)	6.7 m <sup>2</sup> /g
CMAD-Wert (s. 2.2.3.)	1.48 µm

Die Inkubationszeiten der Zellen mit TiO<sub>2</sub> betragen 2 und 4 Stunden für die biochemischen Untersuchungen, 47 Stunden für die Rasterelektronenmikroskopie und 60 Stunden für die Fluoreszenzmikroskopie

### 2.2.3. Quarz (SiO<sub>2</sub>)

In den Versuchen wurden folgende verschiedene Quarz-Typen unterschiedlicher Herkunft sowie hieraus hergestellte Fraktionen verwendet:

Bezeichnung	Quarz-Typ	Quelle
Q1	Sicron F600-Quarz	Fa. Palas GmbH, Karlsruhe
Q7	Subfraktion von Q1	
Q2	DQ12-Quarz	Dr. K.H.Friedrichs, Düsseldorf
Q5	Subfraktion von Q2	
Q9	Subfraktion von Q5	
Q3	DQ12-Quarz	Dr. K.Robock, Essen-Kray
Q6	Subfraktion von Q3	
Q4	DQ12-Quarz	Dr. L.Armbruster, Essen-Kray
Q8	DQ12-Quarz	Dr. N.Seemayer, Düsseldorf

Bei allen Quarzen handelt es sich um α-kristallines Siliziumdioxid (Dichte 2.66 g/cm<sup>3</sup>).

Zur Herstellung der Quarzfraktionen verschiedener Korngrößen wurden je 1 g der Quarze Q1, Q2 und Q3 in je 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgeschlämmt und durch Filtration durch Nylongaze (Seidengazefabrik E.Eckert, Waldkirch) fraktioniert (Q5, Q6 und Q7: sukzessive Filtration durch Gaze mit 20 µm, 10 µm und 5 µm Maschenweite, Q9: zusätzliche Filtration durch Gaze mit 1 µm Maschenweite). Insgesamt standen somit für die Versuche 9 verschiedene Quarzfraktionen zur Verfügung, die in drei Größenklassen eingeteilt wurden:

Quarzfraktion	CMAD <sup>1</sup>
Q1 - Q3	1.75 - 1.4 µm
Q4 - Q8	1.1 - 0.7 µm
Q9	< 0.7 µm

Von einigen Quarzfraktionen konnte mit dem BET-Stickstoffadsorptionsverfahren nach BRUNAUER et al. (1938) die spezifische Oberfläche der Partikel bestimmt werden:

Quarzfraktion	spezifische Oberfläche <sup>1</sup>
Q1	2.72 m <sup>2</sup> /g
Q2	3.25 m <sup>2</sup> /g
Q3	3.39 m <sup>2</sup> /g

Die Quarze wurden in Konzentrationen von 150, 250 und 500 µg/ml KMI verwendet. Die Inkubationszeiten der Zellen mit nativem Quarz betragen 2, 4 und 16 Stunden für die biochemischen Untersuchungen, 47 Stunden für die Raster-elektronenmikroskopie und 60 Stunden für die Fluoreszenzmikroskopie.

#### 2.2.4. Phospholipid-behandelter Quarz

Neben dem nativen Quarz wurde auch Quarz verwendet, der nach der Methode von WALLACE et al (1985) mit L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin-Dipalmitoyl (DPL, Sigma) vorbehandelt worden war. Für diese Versuche wurde die Quarzfraktion Q5 benutzt.

<sup>1</sup>Von Frau Dr.E.Drosselmeyer (KfK, IGT) wurden die CMAD-Werte an einem TSI Aerodynamic Particle Sizer (APS) und die spezifischen Oberflächen mit Hilfe des Brunauer-Emmett-Teller (BET)-Stickstoffadsorptionsverfahrens ermittelt.

DPL wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml KM1 mit Ultraschall emulgiert (2 x je 5 Min. im Eisbad) und anschließend bei 300g 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem in 2 ml KM1 resuspendierten Quarz in der Konzentration 1.33 mg DPL/mg Quarz gemischt und 1 Stunde bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde bei 1000g 10 Min. zentrifugiert und das DPL-behandelte Quarzsediment in der Konzentration 250 µg/ml KM1 mit einer Pipette resuspendiert.

Die Inkubationszeit der Zellen mit DPL-behandeltem Quarz betrug 16, 47, 69 und 90 Stunden und für die Fluoreszenzmikroskopie 60 Stunden.

Vor dem Einsatz in den Zellkulturen wurden alle Stäube (außer DPL-behandeltem Quarz) in 5 ml KM1 aufgenommen und auf Eis 2 Min. mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier B 15, Einstellung 50%), um eine möglichst homogene Verteilung der Partikel zu erzielen (MÜNCH et al. 1971). Danach wurden die Suspensionen auf das gewünschte Volumen mit KM1 aufgefüllt und auf die Zellen pipettiert.

## 2.3. Zellkultur

### 2.3.1. Isolierung der Rinderalveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen (AM) wurden *post mortem* durch bronchoalveoläre Lavage aus den Lungen gesunder Rinder beiderlei Geschlechts isoliert<sup>2</sup>. Hierfür wurden die Lungen innerhalb einer Stunde nach dem Tod der Tiere 5 mal mit bis zu 20 l 0.9%iger NaCl gespült. Die Lavageflüssigkeit wurde durch Mull und Nylongaze der Maschenweite 100 µm (Seidengazefabrik E.Eckert, Waldkirch) filtriert und anschließend bei 250g/4°C für 10 Min. zentrifugiert (Zentrifugen: Beckman J2-21, Rotor JA-10 bzw. Hettich Rotixa/RP, Rotor Nr.5096). Die Zellsedimente wurden vereinigt und nochmals mit eiskalter 0.9%iger NaCl gewaschen. Leichte Kontaminationen mit Erythrozyten wurden durch Abspülen des Sediments mit 0.9%iger NaCl entfernt, deutlich verunreinigte Sedimente jedoch verworfen.

Die Anreicherung der lebenden AM erfolgte durch eine Gradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque (Pharmacia), indem 10 ml Zellsuspension (in 0.9%iger NaCl) mit 15 ml Ficoll unterschichtet und für 20 Min. bei 200g/4°C zentrifugiert wurden.

---

<sup>2</sup>Herrn Dr. Botzenhardt und den Mitarbeitern der Großviehschlachthalle des städtischen Schlachthofes Karlsruhe danke ich an dieser Stelle für Ihre verständnisvolle Mitarbeit.

Aus der Trennschicht zwischen NaCl und Ficoll wurden die gereinigten AM mit einer Pipette entnommen und wiederum in 0.9%iger NaCl gewaschen. Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität wurden je 100 µl Zellsuspension und Trypanblaulösung (0.5%ig in 0.9%iger NaCl) gemischt und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt (MÜNCH et al., 1971). Die Vitalität lag in der Regel bei über 90%. Pro Lunge konnten  $1 - 2.5 \times 10^9$  lebende Zellen isoliert werden.

### **2.3.2. Primärkultur der Alveolarmakrophagen**

Das Zellsediment wurde in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml in 37°C warmem KM1 resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Versuchsansatz in Plastik Kulturschalen mit 3.5 cm oder 13.4 cm Durchmesser (Falcon 3046 bzw. Greiner No. 639160) oder in Kulturflaschen (Falcon 3028, 175 cm<sup>2</sup>) in einer Dichte von  $6 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach 1 - 2 Stunden Kulturdauer (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luft) wurde das Medium mit den nicht-adhaerenten Zellen entfernt und durch frisches KM1 ersetzt. Nach Kultivierung über Nacht wurden die Zellen für die Experimente mit staubsupplementiertem KM1 inkubiert. Kontrollkulturen ohne Staubexposition wurden jeweils parallel angelegt.

Bei den Versuchen, die länger als 16 Stunden mit Staub inkubiert wurden, erfolgte die Staubexposition zunächst für 4 Stunden in KM1. Dann wurde das Medium entfernt und die adhaerenten Zellen gründlich gespült. Die weitere Inkubation erfolgte dann in KM2 (s. 2.1.1.).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände abgenommen und bei 250g/4°C für 10 Min. zentrifugiert. Die resultierenden Sedimente (ZÜ) wurden in 0.9%iger NaCl aufgenommen. Die adhaerenten Zellen (Z) in den Kulturschalen wurden in 0.9%iger NaCl mit einem Zellschaber abgeschabt. Die zellfreien Überstände (ÜÜ) sowie die Zellen ZÜ und Z wurden sofort bei -20°C eingefroren.

### **2.3.3. Präparation für Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Für die morphologische Untersuchung wurden parallel zu jedem Versuch Zellen in Kulturschalen mit 3.5 cm Durchmesser ausgesät, die zuvor mit je einem Glasdeckglas (24 x 24 mm) bestückt worden waren. Mit diesen Kulturen wurde ebenso verfahren wie unter 2.3.2. beschrieben. Nach Beendigung der Versuche wurden die Zellen auf den Deckgläsern für die verschiedenen mikroskopischen Methoden präpariert.

### 2.3.3.1. Lichtmikroskopie

#### 2.3.3.1.1. Vitalitätsbestimmung der kultivierten Zellen

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Überstand von den Kulturen entfernt. Die adhaerenten Zellen wurden dann für 2 Min. mit 2 ml einer 0.5%igen Trypanblaulösung (in 0.9%iger NaCl) angefärbt. Danach wurden die Zellen gründlich mit 0.9%iger NaCl gewaschen und mit dem Inversmikroskop (Fluovert, Leitz) die Zahl der gefärbten und ungefärbten Zellen an mehreren Stellen der Kulturen bestimmt.

#### 2.3.3.1.2. Hemacolor-Schnellfärbung

Zur kontinuierlichen Beurteilung der Kulturen wurden Zellen mit der Hemacolor-Schnellfärbung für Blutausstriche (Merck) nach Vorschrift fixiert und angefärbt.

Diese Färbung entspricht einer May-Grünwald-Färbung. Dauerpräparate wurden durch Einbettung der Deckgläser in Eukitt (Kindler, Freiburg) hergestellt. Photographiert wurde mit einer Photoausrüstung der Fa. Wild (Photoautomat MPS 45, Kamera MPS 51, Kunstlichtfilm Kodak Ektachrome 50).

#### 2.3.3.1.3. Fluoreszenzmarkierung mit Acridin Orange

Die Markierung der Zellen mit Acridin Orange (AO) erfolgte mit geringen Abweichungen nach der Methode von KANE et al. (1980).

15 Min. vor Versuchsende wurde das Kulturmedium entfernt und durch eine AO-Lösung (10 µg AO/ml 0.9%ige NaCl) ersetzt. Nach 15 Min. wurden die Deckgläser mit den Zellen sehr gründlich mit PBS (s. 2.1.4.) gespült, umgedreht auf einen Objektträger gelegt und mit PBS unterschichtet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Leitz Diaplan, Filterblock I2, Anregungswellenlänge 450 - 490 nm, Emissionswellenlänge 530 nm, Film Kodak Ektachrome 400 ASA )<sup>3</sup>.

<sup>3</sup>Frau A.Schmidt (KfK, IGT) danke ich für die methodische Einarbeitung.

### 2.3.3.2. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Zellen nach der Methode von NATION (1983) fixiert. Hierzu wurden die auf Deckgläsern sitzenden Zellen mit eiskalter 0.9%iger NaCl gespült und nacheinander für je 30 Min. auf Eis mit den Puffern A, B und C (s. 2.1.6.1.) fixiert. Bei Raumtemperatur wurden die Zellen dann 2 x 5 Min. in  $H_2O_{\text{bidest}}$  gewaschen und anschließend für je 5 Min. durch die alkoholische Reihe geführt (35%, 70%, 85%, 95% und 100% Ethanol). An Stelle der kritischen Punkttrocknung wurden die Proben für 5 Min. mit Hexamethyldisilazan (HMDS, Sigma) behandelt, um Trocknungsschäden zu vermeiden. Bis zur Goldbedampfung verblieben die Proben im Exsikkator mit Silicagel<sup>4</sup>.

Die Präparation der isolierten Fraktionen "N" und "ML" (s. 2.5.1.) erfolgte wie für die Zellen beschrieben. In den Zentrifugenröhrchen wurden die Sedimente, ohne sie aufzuwirbeln, fixiert und entwässert. Teile der trockenen Sedimente wurden nach Beendigung der Präparation auf Trägern fixiert und mit Gold bedampft.

### 2.3.3.3. Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Zellen nach Versuchs-ende auf Eis mit einem Zellschaber vorsichtig in Glutaraldehyd (2.5%ig in 0.1 M Cacodylatpuffer (s. 2.1.6.2.)) von den Kulturschalen abgeschabt und bei 250g/4°C für 10 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde noch 3x mit 0.1 M Cacodylatpuffer gewaschen und für 2 Stunden auf Eis mit  $OsO_4$ -Lösung (1%ig in Veronal/HCl-Puffer, s. 2.1.6.2.) fixiert. Die in 3%igen Agar eingebetteten Proben wurden dann in der alkoholischen Reihe entwässert, 2 x 60 Min. mit Propylenoxid behandelt und in Epon-812-Araldit eingebettet. Nach 3 tägiger Trocknung bei 60°C wurden mit einem Sorvall MT2-B Ultramikrotom Ultra-dünnschnitte hergestellt und diese für 1 Min. mit Uranylacetat und für 5 Min. mit Bleicitrat (s. 2.1.6.2.) doppelkontrastiert. Die Schnitte wurden an einem Elmiskop IA (Fa. Siemens)<sup>5</sup> ausgewertet.

Die Präparation der subzellulären Fraktionen "N" und "ML" (s. 2.5.1.) für die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte analog zu diesem Präparations-schema.

<sup>4</sup>Herrn G.Schüler (KfK, IKVT), der die REM-Aufnahmen an einem Philips 525M Rasterelektronenmikroskop aufgenommen hat, möchte ich an dieser Stelle sehr für sein Engagement und seine Mitarbeit danken.

<sup>5</sup>Für die Unterstützung bei der Transmissionselektronenmikroskopie danke ich besonders herzlich Frau R.Mauser (KfK, IGT).

## 2.4. Biochemische Untersuchungen

### 2.4.1. Proteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mit dem "Bio-Rad Protein Assay" (BIO-RAD, München) bestimmt. Die Messung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Comassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Protein (BRADFORD 1976).

Aufgrund des geringen Proteingehalts in einigen Proben wurde mit dem "Mikro-Assay" gemessen, das für einen Konzentrationsbereich von  $\leq 25 \mu\text{g/ml}$  geeignet ist. Höher konzentrierte Proben wurden entsprechend mit 0.9%iger NaCl verdünnt.

Als Eichstandard wurden definierte Konzentrationen von Rinderserumalbumin (Sigma) verwendet.

### 2.4.2. Enzymbestimmungen

Zum biochemischen Nachweis von Enzymen wurde das Untersuchungsgut zunächst auf Eis 10 Sek. lang mit Ultraschall behandelt, um ein homogenes Probenmaterial zu erzielen.

Die lysosomalen Enzyme wurden nach den von ANDERSEN et al. (1982) beschriebenen Methoden gemessen und die Aktivitäten anhand von Endprodukteichkurven bestimmt (NAG und SP mit 4-Methylumbelliferon, Cathepsin B mit  $\beta$ -Naphthylamin, beides Sigma). Die Enzyme GLDH und LDH wurden mit Testkits der Fa. Boehringer (Mannheim) gemessen. Die Enzymaktivitäten konnten anhand von angegebenen Faktoren direkt in U/l errechnet werden (1 Unit (U) katalysiert die Umsetzung von 1  $\mu\text{Mol}$  Substrat pro Min. bei 25°C). Das Testsystem wurde mit Kontrollserum (Precinorm E, Boehringer, Mannheim) überprüft.

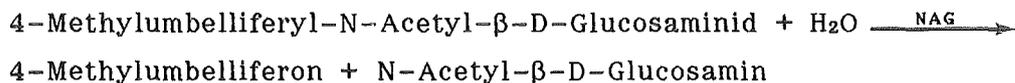
Zur fluoreszenzphotometrischen Bestimmung der Aktivitäten der lysosomalen Enzyme wurde das LS-5B Luminescence Spectrometer von Perkin-Elmer, zur Extinktionsmessung im sichtbaren Bereich das Beckman DU-65-Spectrophotometer benutzt.

Folgende Enzyme wurden gemessen:

<u>Enzym</u>	<u>Kompartiment</u>
N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase	Lysosomen
Saure Phosphatase	"
Cathepsin B	"
Glutamatdehydrogenase	Mitochondrien
Laktatdehydrogenase	Zytoplasma

#### 2.4.2.1. N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG)

Reaktionsprinzip:



Substrat: 3.79 mg 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid  
in 10 ml Laktat-Puffer (s. 2.1.5.) lösen (= 1 mM)

Reaktionsansatz:

10  $\mu$ l TX-100 (10%)  
100  $\mu$ l Probe (1:10 verdünnt mit 0.9%iger NaCl)  
100  $\mu$ l Substrat

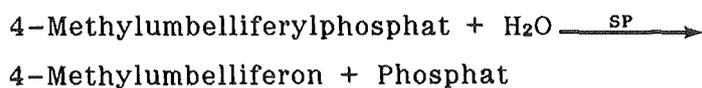
gut mischen und 30 Min. bei 37°C inkubieren

Reaktionsstopp: 1 ml Carbonat-Bicarbonat-Puffer (s. 2.1.5.) zugeben

gemessen wird bei 371 nm (Anregungswellenlänge)  
und 450 nm (Emissionswellenlänge)

#### 2.4.2.2. Saure Phosphatase (SP)

Reaktionsprinzip:



Substrat: 12.81 mg 4-Methylumbelliferylphosphat in 1 ml DMSO lösen  
mit Glycin-HCl-Puffer (s. 2.1.5.) 1:50 verdünnen (= 1 mM)

Reaktionsansatz:

10 µl TX-100 (10%)  
100 µl Probe (1:10 verdünnt mit 0.9%iger NaCl)  
100 µl Substrat

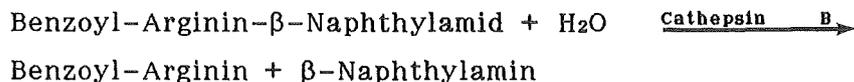
gut mischen und 30 Min. bei 37°C inkubieren

Reaktionsstop: 1 ml Carbonat-Bicarbonat-Puffer (s. 2.1.5) zugeben

gemessen wird bei 371 nm (Anregungswellenlänge)  
und 450 nm (Emissionswellenlänge)

#### 2.4.2.3. *Cathepsin B*

Reaktionsprinzip:



Substrat: 22 mg Benzoyl-Arginin- $\beta$ -Naphthylamid in 1 ml DMSO lösen  
mit Phosphat-Puffer (s. 2.5.1.) 1:12.5 verdünnen (= 1 mM)

Reaktionsansatz:

10 µl TX-100 (1%)  
100 µl Probe  
100 µl Substrat

gut mischen und 60 Min. bei 37°C inkubieren

Reaktionsstop: 1 ml Carbonat-Bicarbonat-Puffer (s. 2.1.5.) zugeben

gemessen wird bei 340 nm (Anregungswellenlänge)  
und 406 nm (Emissionswellenlänge)

Als Leerwerte für die lysosomalen Enzyme wurden 100 µl Probe mit 10 µl TX-100 inkubiert. Erst nach dem Abstoppen mit 1 ml Carbonat-Bicarbonat-Puffer wurden 100 µl Substrat zugegeben.

#### **2.4.2.4. Glutamatdehydrogenase (GLDH)**

Reaktionsprinzip:



Für die Bestimmung der GLDH wurde der Monotest GLDH *aktiviert* (Boehringer, EC 1.4.1.3) benutzt. Die Reaktion wurde mit 20 µl α-Ketoglutarat gestartet und die Extinktionsabnahme über 5 Min. bei 340 nm gemessen.

#### **2.4.2.5. Laktatdehydrogenase (LDH)**

Reaktionsprinzip:



Für die Bestimmung der LDH wurde der Monotest LDH *opt.* (Boehringer, EC 1.1.1.27) benutzt. Die Extinktionsabnahme wurde über 3 Min. bei 340 nm gemessen.

### **2.5. Subzelluläre Fraktionierung der Alveolarmakrophagen durch differentielle Zentrifugation**

Die subzelluläre Fraktionierung der Alveolarmakrophagen erfolgte mit einigen Abweichungen nach der Methode von STAHN et al. (1970). Die Zellen wurden in die folgenden Fraktionen aufgetrennt:

<u>Fraktion</u>	<u>wichtigste Bestandteile</u>
"N"	Nuclei, Zelltrümmer und intakte Zellen
"E"	Überstand über "N"
"ML"	Mitochondrien und Lysosomen
"X"	Überstand über "ML"
"P"	Plasmamembranen und Endoplasmatisches Reticulum
"S"	Zytosol mit gelösten Proteinen

Für die Zentrifugationen standen eine Kontron Ultrazentrifuge Centrikon T-2060 und eine Beckman Zentrifuge, Spinco L 250 B jeweils mit dem Rotor Ti60 zur Verfügung. Alle Schritte wurden auf Eis ausgeführt, Zentrifugen und Rotoren waren auf 4°C vorgekühlt.

### 2.5.1. Fraktionierung der Alveolarmakrophagen

Für die Homogenisation wurden sowohl Kontrollzellen als auch AM verwendet, die zuvor mit Quarz (Q5 und Q5+DPL, 250 µg/ml) inkubiert worden waren. Nach Ablauf der Inkubationszeit (2, 16 und 47 Stunden ) wurden die Zellen mit einem Zellschaber in KP (s. 2.1.2.) von den Kulturschalen abgeschabt und separat weiterverarbeitet. Das folgende Homogenisationsschema gilt sowohl für Kontroll- als auch für quarzinkubierte Zellen.

Die abgeschabten Zellen wurden in einem 60 ml Dounce-Homogenisator (B. Braun, Melsungen) mit eng sitzendem Glaspistill (Spaltweite "S") 5x vorsichtig homogenisiert und bei 870g/4°C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand "E1" wurde auf Eis gestellt. Mit dem Sediment "N" wurde dieser Schritt insgesamt 3x durchgeführt. Das dritte Sediment "N" wurde auf Eis gestellt.

Die drei 870g-Überstände ("E1", "E2" und "E3") wurden vereinigt ("E") und bei 16,000g/4°C 20 Min. lang zentrifugiert.

Aus dem 16,000g-Überstand "X" wurde durch 40 Min. Zentrifugation mit 102,000g das Sediment "P" vom Überstand "S" abgetrennt.

Das 16,000g-Sediment "ML" und das 870g-Sediment "N" wurden vorsichtig mit einem 20 ml Dounce-Homogenisator (Spaltweite "L") in KP oder DPBS (s. 2.1.2. bzw. 2.1.4.) resuspendiert. Diese "ML"- und "N"-Suspensionen gelangten in den entsprechenden Verdünnungen in die weiteren Versuche.

Von allen Fraktionen ("N", "E", "ML", "X", "P" und "S") wurden vor deren weiterer Verarbeitung je 2 ml-Aliquots entnommen und zur späteren Bestimmung der Enzymverteilung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.5.2. Präparation der "ML"-Fraktion aus Kontrollzellen für die Trägerfreie Elektrophorese

Zur Isolierung reiner Lysosomen aus Kontrollzellen wurde die "ML"-Fraktion mittels Trägerfreier Elektrophorese weiter aufgetrennt. Hierzu wurde das "ML" in KP aufgenommen, vorsichtig 10x in einem 20 ml Dounce-Homogenisator (Spaltweite "L") resuspendiert und mit  $16,000\text{g}/4^{\circ}\text{C}$  20 Min. zentrifugiert. Insgesamt wurde dieser Vorgang 4x wiederholt. Das gewaschene "ML"-Sediment wurde in einer Konzentration, die  $5 \times 10^7$  Zellen pro ml entsprach, in KP resuspendiert und der Trägerfreien Elektrophorese zugeführt.

#### 2.5.2.1. Trägerfreie Elektrophorese der "ML"-Fraktion

Die Trägerfreie Elektrophorese erfolgte im wesentlichen wie bei NEU-MÜLLER (1988) beschrieben. Es wurden die unter 2.1.2. beschriebenen Puffer verwendet.

Das 4x gewaschene und in KP resuspendierte "ML"-Sediment wurde über einen PP 50-Perfusor (Hoechst) kontinuierlich in die mit KP durchströmte Trennkammer der Apparatur (Elektrophorese-Apparatur VaP 11, Bender & Hobein, München) in die rechte der insgesamt drei Öffnungen eingeschleust.

#### Trennungsbedingungen:

Kammertemperatur	5.5°C
Stromstärke	220-240 mA
Spannung	1400 V
Durchflußgeschwindigkeit des KP	350 ml/h
Probeneinführung	2-3 ml/h

Nach der Elektrophorese wurden die Fraktionen 1 - 50 der insgesamt 90 Fraktionen bis zur Bestimmung der lysosomalen und mitochondrialen Leitenzyme (s. 2.4.2.1. bzw. 2.4.2.4.) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.5.2.2. Transmissionselektronenmikroskopie hochreiner Lysosomen

Für die transmissionselektronenmikroskopische Präparation der gereinigten Lysosomen wurden noch während der Trägerfreien Elektrophorese in den Fraktionen 1 - 50 die Leitenzyme für Lysosomen (NAG) und Mitochondrien (GLDH) gemessen. Anhand der ermittelten Enzymprofile wurden die Fraktionen, in denen die Lysosomen mit weniger als 10% der Mitochondrien verunreinigt waren (Fraktion 1 - 20), vereinigt und bei 16,000g/4°C für 20 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde, wie unter 2.3.3.3. für die Zellen beschrieben, fixiert und für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert.

### 2.5.2. in vitro Inkubation der "N"- und "ML"-Fraktionen aus quarzinkubierten Alveolarmakrophagen

Aus Kontroll- und quarzinkubierten Zellen (Q5 und Q5+DPL, 250 µg/ml) wurden, wie unter 2.5.1. beschrieben, "N"- und "ML"-Fraktionen hergestellt und in einer Konzentration, die 10<sup>7</sup> Zellen pro ml entsprach, in KP bzw. DPBS resuspendiert. Sofort (= Zeitpunkt 0 Min.) und nach 120 Min. Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurden jeweils 3 Aliquots (3 - 4 ml) entnommen und bei 16,000g/4°C 20 Min. lang zentrifugiert (Zentrifuge s. 2.5., Rotor T150). Die Überstände wurden abpipettiert und die Sedimente in den entsprechenden Volumina KP bzw. DPBS resuspendiert. Bis zur biochemischen Auswertung wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

### 2.5.3.1. Dichtegradientenzentrifugation der "N"- und "ML"- Fraktionen

Von den in KP resuspendierten "N"- und "ML"-Fraktionen aus Kontroll- und quarzinkubierten Zellen wurden zu den Zeitpunkten 0 Min. (= sofort nach der Isolierung) und 120 Min. (= nach Inkubation bei 37°C) jeweils 1.7 ml-Aliquots entnommen und in linearen Saccharose- und Metrizamiddichtegradienten zentrifugiert. In zwei Versuchen wurden zusätzlich ein Kontroll-"ML" und ein "ML" aus quarzinkubierten Zellen mit TX-100 versetzt (Endkonzentration 1%) und anschließend im Saccharosedichtegradienten zentrifugiert, um einen Vergleich der Enzymfreisetzung aus zerstörten und intakten Lysosomen zu erhalten.

Sowohl die Saccharose- als auch die Metrizamiddichtegradienten wurden nach SÜTTERLIN (1982) mit Hilfe eines Zweikammer-Gradientenformers in Beckman-Quickseal<sup>R</sup>-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen gelegt.

Saccharosedichtegradient: 14.7 ml Saccharose (62%ig in H<sub>2</sub>O)  
+ 18.3 ml GP (s. 2.1.3.)  
pH 7.4

Metrizamiddichtegradient: 14.7 ml Metrizamid (50.6%ig in H<sub>2</sub>O)  
+ 18.3 ml Metrizamid (9.2%ig in H<sub>2</sub>O)  
pH 7.6  
Osmolalität: 120 - 140 mOs/kg H<sub>2</sub>O  
(RICKWOOD & BIRNIE 1975)

Mit einem Abbé-Refraktometer (Fa. Zeiß) wurde die Saccharosekonzentration bestimmt, aus der mit Hilfe der Int. Critical Tables of Numerical Data, Physical Chemistry and Technology (Vol. II, London 1927) die Dichte  $\rho$  ermittelt werden konnte.

Ebenfalls im Abbé Refraktometer wurde der Brechungsindex  $c$  der Metrizamidfraktionen ermittelt, der nach der Formel  $\rho = 3.35 \times c - 3.462$  (BIRNIE et al. 1973) die Dichte  $\rho$  bestimmt.

Da die Osmolalität der Metrizamidlösungen sehr gering ist (Metrizamid bildet in H<sub>2</sub>O nichtionische Lösungen) wurden die Metrizamidgradienten im Gegensatz zu den Saccharosegradienten unter- und nicht überschichtet. Dieses Verfahren erwies sich als schonender für die Lysosomen.

Nachdem die Proben über bzw. unter die Gradienten geschichtet worden waren, wurden die Röhrchen verschweißt und in der Kontron Zentrifuge (s. 2.5.) im Vertikalrotor VTi 50 2 Stunden bei 60,000g/4°C zentrifugiert. Danach wurden die Gradienten in 22 Fraktionen ausgetropft, die bis zur Enzymbestimmung bei -20°C eingefroren wurden.

#### 2.5.4. Inkubation isolierter Lysosomen mit verschiedenen Stäuben

##### 2.5.4.1. "ML" aus Kontroll-Alveolarmakrophagen

Kontroll-"ML" wurde in DPBS in der doppelten Konzentration (d.h.  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml entsprechend), in einem 20 ml Dounce-Homogenisator (Spaltweite "L") resuspendiert. Aliquots hiervon wurden mit den gleichen Volumina der verschiedenen Staubsuspensionen (Latex, TiO<sub>2</sub> (Anatas), DQ12-Quarz (Q8), in

DPBS) vermischt. Die Endkonzentrationen der Stäube in den Inkubationsansätzen betragen für Latex 100 µg/ml, für TiO<sub>2</sub> 150 µg/ml und für Quarz 150, 250 und 500 µg/ml.

Die "ML"-Staub-Gemische wurden für 2 Stunden in 50 ml-Plastikzentrifugenröhrchen (2.7 cm x 11 cm, Fa. Falcon) bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wurden die Gemische mit Hilfe eines "Wheaton Roll-Apparates" (Fa. Wheaton Instruments) mit 2 Umdrehungen pro Min. gerollt, um eine konstante Durchmischung der Proben zu gewährleisten.

Sofort nach dem Mischen des "ML" mit den Staubsuspensionen (= 0 Min.) sowie nach 120 Min. Inkubation bei 37°C wurden je Ansatz 3 Aliquots (3 - 4 ml) entnommen, die zunächst für 5 Min. bei 500g/4°C zentrifugiert wurden (Hettich Rotixa/K), um die Stäube zu sedimentieren. Die 500g-Überstände wurden anschließend bei 16,000g/4°C 20 Min. zentrifugiert (s. 2.5.1.).

Die 16,000g-Überstände (Ü) wurden abpipettiert und die 16,000g-Sedimente (S1) ebenso wie die 500g-Sedimente (S2) in den entsprechenden Volumina DPBS resuspendiert.

Die resuspendierten 500g-Sedimente wurden mit TX-100 (Endkonzentration 1%) versetzt, gut gemischt und nochmals bei 500g zentrifugiert. Die resultierenden 500g-Überstände wurden ebenso wie die Proben S1 und Ü bis zur Messung der Enzyme bei -20°C eingefroren.

In den letzten 500g-Sedimenten (Stäube) waren weder Enzymaktivitäten noch Proteine meßbar, so daß sie verworfen wurden.

#### **2.5.4.2. "ML" aus Rattenleber**

Parallel zu den Freisetzungsversuchen mit "ML" aus Alveolarmakrophagen unter Quarzeinfluß (s. 2.5.4.1.) wurde auch "ML" aus Rattenleber untersucht. Aus dem Homogenat von 5 g Rattenleber (Rasse Sprague Dawley) wurde nach dem bei WIENER (1988) beschriebenen Homogenisationsschema das "ML" isoliert. Das "ML" wurde in KP und DPBS resuspendiert und wie Makrophagen-"ML" mit verschiedenen Staubsuspensionen inkubiert. In KP wurde die Wirkung von Latex ( $\phi$  1.1 µm, 100 µg/ml), TiO<sub>2</sub> (Anatas) und Quarz (Q1, beide 150 µg/ml) untersucht. In DPBS wurde "ML" mit Q1 (150 µg/ml) inkubiert. Mit den "ML"-Staubgemischen wurde wie unter 2.5.4.1. beschrieben verfahren.

### 2.5.5. Inkubation der Fraktionen "P" und "S" mit DQ12-Quarz (Q8)

Das 102,000g-Sediment "P" (s. 2.5.1.) aus dem Homogenat von  $7 \times 10^8$  Zellen wurde mit dem 20 ml Dounce Homogenisator (Spaltweite "L") in 35 ml DPBS-Puffer resuspendiert. Diese Suspension und das Zytosol "S" aus der 102,000g-Zentrifugation wurden mit Quarzsuspensionen vermischt. Die Quarz-Endkonzentrationen betragen 250 und 500  $\mu\text{g/ml}$  für "P" und 500  $\mu\text{g/ml}$  für "S".

Diese Mischungen wurden, wie unter 2.5.4.1. beschrieben, inkubiert. Mit den Aliquots, die nach 0 Min. und 120 Min. entnommen wurden, wurde analog zu den "ML"-Proben (s. 2.5.4.1.) verfahren.

### 2.6. Auswertung und Präsentation der Daten

In den Zellinkubationsversuchen wurden die ermittelten Daten als Prozentwerte aufgetragen. Als 'Gesamtaktivität der Kontrolle' wurde die Summe der Werte aus zellfreiem Überstand, Zellen im Überstand und adhaerenten Zellen gebildet ( $\text{ÜÜ} + \text{ZÜ} + \text{Z}$ ). Diese Werte wurden zu 100% gesetzt und der Berechnung der prozentualen Verteilungen in den Proben zugrundegelegt.

Für die Verteilung von Enzymen und Protein in den subzellulären Fraktionen wurde die Summe der Werte ("N"+"E") zu 100% gesetzt und die prozentualen Anteile in den einzelnen Fraktionen unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung errechnet.

Die in vitro-Freisetzung der Enzyme aus den isolierten Fraktionen "N" und "ML" wurde als Prozent der in ("N"+"ML") gemessenen Gesamtaktivität eines jeden Versuchsansatzes errechnet.

Die Enzym- und Proteinprofile der Saccharose- und Metrizamiddichtegradienten wurden nach BEAUFAY & AMAR-COSTESEEC (1976) in der Form  $\Delta Q / \Delta \rho$  (Ordinate) als Funktion der Dichte  $\rho$  (Abszisse) aufgetragen.  $\Delta \rho$  entspricht der Dichtezunahme innerhalb der einzelnen Fraktionen,  $\Delta Q$  ist der prozentuale Anteil, den jede Fraktion gemessen an der Gesamtaktivität im Gradienten ausmacht. Die Verteilungsprofile wurden mit Hilfe eines computergesteuerten Plotters (Benson Plotter) aufgezeichnet. Die Programme hierfür wurden von Dr.Thies und Dr.Haffner (IGT, KfK) geschrieben.

Für die "ML"-Auftrennung über Trägerfreie Elektrophorese wurde die Gesamtaktivität der dargestellten Fraktionen zu 100% gesetzt und hiervon die prozentualen Anteile in den einzelnen Fraktionen errechnet.

Anhand des T-Test nach Student wurden die Mittelwerte der Versuche miteinander verglichen und auf statistisch abzusichernde Unterschiede hin geprüft. Die Signifikanzschranke wurde auf  $2p < 0.05$  festgesetzt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Morphologische Untersuchungen

Die Morphologie der Rinderalveolarmakrophagen, die mit den verschiedenen Stäuben inkubiert worden waren, wurde mikroskopisch untersucht. Die Präparation der Zellen und der isolierten Organellen für die Licht-, Fluoreszenz-, Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie erfolgte wie unter 2.3.3. beschrieben.

##### 3.1.1. Lichtmikroskopie

Für die Lichtmikroskopie wurden die Kulturen wie unter 2.3.3.1. beschrieben präpariert.

Abb. 1a - c zeigt in einer Bildsequenz die Veränderungen der Zellen, die nach 2 Stunden und 16 Stunden Inkubation mit  $\text{TiO}_2$  auftreten. Schon nach 2 Stunden Inkubation weisen die Zellen eine deutliche Vakuolisierung auf. Dieser Prozeß setzt sich mit zunehmender Inkubationsdauer fort, und nach 60 Stunden sind die meisten Zellen sehr stark aufgebläht (s. auch Abb. 4c). Werden die Zellen nach der Hemacolor-Färbung fixiert und angefärbt (s. 2.3.3.1.2.), so sind diese Vakuolen nur sehr schwach sichtbar. Die Kontrollen zeigen während der gesamten Inkubationsdauer keine derartige auffällige Vakuolisierung (s. Abb. 4a).

Zellen, die 16 Stunden mit nativem Quarz (Q5) inkubiert worden waren, sind in Abb. 2b gezeigt. Nach Inkubation mit Quarz lassen sich die Zellen in der Kultur nicht mehr im selben Maße homogen anfärben wie die Kontrolle, einige Zellen zeigen eine rötliche Färbung und unscharfe Konturen. Die meisten Quarzpartikel sind in die Zellen aufgenommen oder zumindest mit ihnen assoziiert. Einzeln vorhandene Quarzpartikel ohne erkennbaren Zellkontakt liegen in Gruppen vor. Hier handelt es sich wahrscheinlich um Quarz, der zunächst von Zellen phagozytiert und nach deren Untergang wieder freigesetzt worden ist.

Im Gegensatz zu den mit nativem Quarz inkubierten Zellen zeigen die mit DPL-behandeltem Quarz inkubierten Zellen auch nach längerer Inkubationszeit keine erkennbaren Schäden (Abb. 3b-d). Nach 47-stündiger Phagozytose sind die Zellen bereits prall mit Quarzpartikeln angefüllt (Abb. 3b) und die Zellform hat sich stark abgerundet. In den Kulturen fallen einige sehr große, mehrkernige Zellen auf. Dieses Erscheinungsbild ändert sich im weiteren Verlauf der Inkubation nicht. Auch nach 90 Stunden ist darüber hinaus kein morphologischer Unterschied zur Kontrolle zu erkennen (Abb. 3d).

### 3.1.2. Fluoreszenzmikroskopie

Nach 60-stündiger Inkubation mit verschiedenen Stäuben wurden die Zellen mit Acridin Orange, einem Farbstoff, der sich in den Lysosomen anreichert, markiert (Abb. 4a-e). Die Kontrollzellen (Abb. 4a) zeigen deutlich rot fluoreszierende Lysosomen, die gut einzeln identifizierbar sind. Die Zellkerne erscheinen schwach grün gefärbt.

Abb. 4b zeigt Zellen nach Latexpheagozytose. Die meisten Latexpartikel sind rot gefärbt oder weisen zumindest einen roten Saum auf.

Deutlich anders ist das Erscheinungsbild der mit  $\text{TiO}_2$  inkubierten Zellen (Abb. 4c). Im Zellinneren sind kaum klar umgrenzte Kompartimente zu erkennen. Das phagozytierte  $\text{TiO}_2$  erscheint als diffus körnige Struktur. Die Zelle rechts der Bildmitte weist eine sehr große grünlich leuchtende Vakuole auf (Pfeil), die den eigentlichen Zellkörper mit den aufgenommenen  $\text{TiO}_2$ -Partikeln stark einengt. Alle Zellen erscheinen gelblich-grün mit nur sehr wenigen orange fluoreszierenden Stellen.

Einen interessanten Befund ergibt die 60-stündige Inkubation der Zellen mit Quarz (Abb. 4d, e). Zwischen den mit nativem und DPL-behandeltem Quarz inkubierten Zellen sind keine Unterschiede mehr zu erkennen. Die aufgenommenen Quarzpartikel sind unabhängig von ihrer Größe deutlich rot gefärbt im Zellinneren zu sehen (Pfeile). Nach kürzeren Inkubationszeiten (bis 16 Stunden) waren in den mit nativem Quarz behandelten Kulturen viele Zellen tot (erkennbar an einer nur noch sehr schwachen grünen Fluoreszenz). Die lebenden Zellen enthielten vermehrt gelb-grünlich leuchtende Vesikel (Ergebnis nicht dargestellt).

### 3.1.3. Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Kulturen nach 2, 16 und 47 Stunden Staubinkubation präpariert.

Die Kontrollzellen zeigen die typische, stark strukturierte Zellmembran und sind mit gut ausgebildeten Pseudopodien auf dem Substrat festgeheftet (Abb. 5b, 6a, 7a). Innerhalb von 47 Stunden Inkubation ändert sich weder die Form noch die Größe der Zellen. Zwischen einzelnen Zellen sind zu allen Zeiten Zellbrücken erkennbar, die zum Teil als sehr lange, dünne Filopodien ausgebildet sind.

Auch Zellen, die mit Latex ( $\varnothing$  2.02  $\mu\text{m}$ ) inkubiert worden sind, zeigen keine auffälligen Veränderungen (Abb. 7b). Nach 47 Stunden Inkubation sind sie prall mit Partikeln angefüllt. Die Plasmamembran ist stark gedehnt und umspannt deutlich sichtbar die aufgenommenen Partikel.

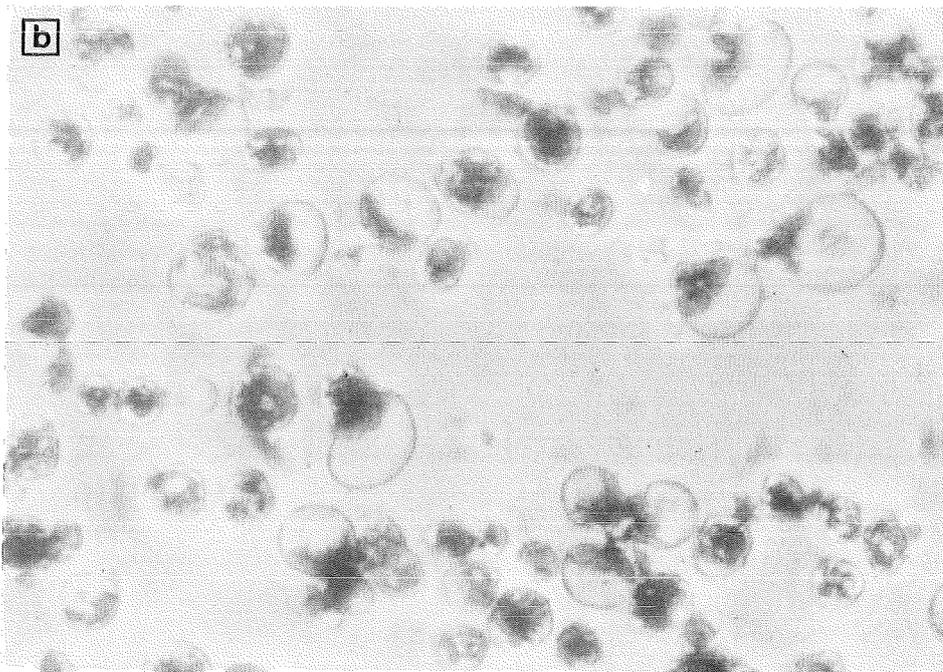
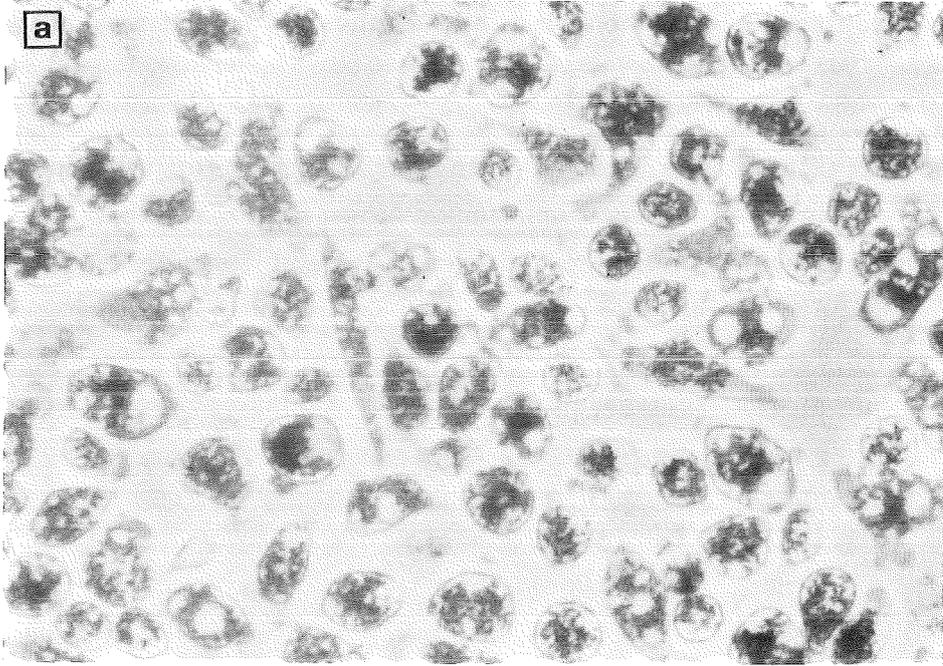
Abb. 7c zeigt Zellen, die für 47 Stunden mit  $\text{TiO}_2$  inkubiert worden sind. Einige Zellen weisen tiefe Einsenkungen auf, bei denen es sich wahrscheinlich um die im Lichtmikroskop (Abb. 1, 4c) beobachteten großen Vakuolen handelt, die durch die Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie nicht erhalten werden konnten. In den Einsenkungen sind die kleinen körnigen Anataspartikel zu erkennen (Pfeile).

Zellen, die für 2, 16 und 47 Stunden mit nativem Quarz inkubiert worden sind, sind in Abb. 5c, d, 6b - d und 7d dargestellt. Auch hier treten, ähnlich wie bei den Kontrollen, Zellbrücken in Form von langen dünnen Filopodien auf. Nach 2 und 16 Stunden Inkubation weisen die Zellen an mehreren Stellen Löcher auf (Pfeilspitzen) (Abb. 5c, d, 6d). Ob es sich dabei um "echte" Löcher in der Zellwand handelt oder aber um Einstülpungen derselben, die z.B. durch die Aufnahme von Partikeln in die Zelle entstehen, kann anhand der Bilder nicht eindeutig beurteilt werden. Abb. 6c zeigt Quarzpartikel, die zum Teil schon von einer Zelle aufgenommen worden sind (Pfeile). In den Zellen der Abb. 5c sind dagegen einige Strukturen zu sehen, bei denen es sich um vollständig aufgenommene, noch peripher liegende Quarzpartikel handeln könnte (Pfeile). Im Gegensatz zu den Kulturen nach 2-stündiger Inkubation (Abb. 5c, d) sind nach 16 Stunden Inkubation nur noch wenige frei liegende Quarzpartikel zu sehen (Abb. 6b - d). Nach 47 Stunden Inkubation mit nativem Quarz weisen die Zellen, die noch adhaerent sind, keine auffälligen morphologischen Veränderungen auf (Abb. 7d). Ihre Zellmembran ist deutlich strukturiert mit auf dem Substrat ausgebreiteten Pseudopodien. Verglichen mit der Kontrolle ist die dargestellte Zelle jedoch stark vergrößert. Auch hier ist unterhalb der Zellmembran ein eckiger Umriß, möglicherweise eines aufgenommenen Quarzpartikels, zu erkennen (Pfeil). Insgesamt unterscheiden sich die mit nativem Quarz inkubierten Zellen nach 47 Stunden nicht wesentlich von den Zellen, die mit DPL-behandeltem Quarz inkubiert worden sind (Abb. 7e, f). Diese sind ebenfalls weit ausgestreckt, mit Pseudopodien auf dem Substrat festgeheftet und weisen eine unregelmäßige Zelloberfläche auf.

### 3.1.4. Transmissionselektronenmikroskopie

Im Transmissionselektronenmikroskop wurden Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit nativem Quarz untersucht. Abb. 8 zeigt eine Kontrollzelle mit gut strukturiertem Zytoplasma. Unter anderem sind der bohnenförmige Zellkern, Lysosomen, zahlreiche Mitochondrien und rauhes Endoplasmatisches Retikulum zu erkennen.

Ein Ausschnitt einer Zelle nach 2-stündiger Quarzphagozytose ist in Abb. 9 gezeigt. Zu erkennen sind die Bruchstücke eines Quarzpartikels, die von einer Membran umschlossen sind. Am unteren Bildrand ist der Zellkern angeschnitten. Bedingt durch die Härte der Quarzpartikel kommt es in den Präparaten bei der Herstellung der Ultradünnschnitte häufig zu großen Löchern unmittelbar um die Partikel herum.



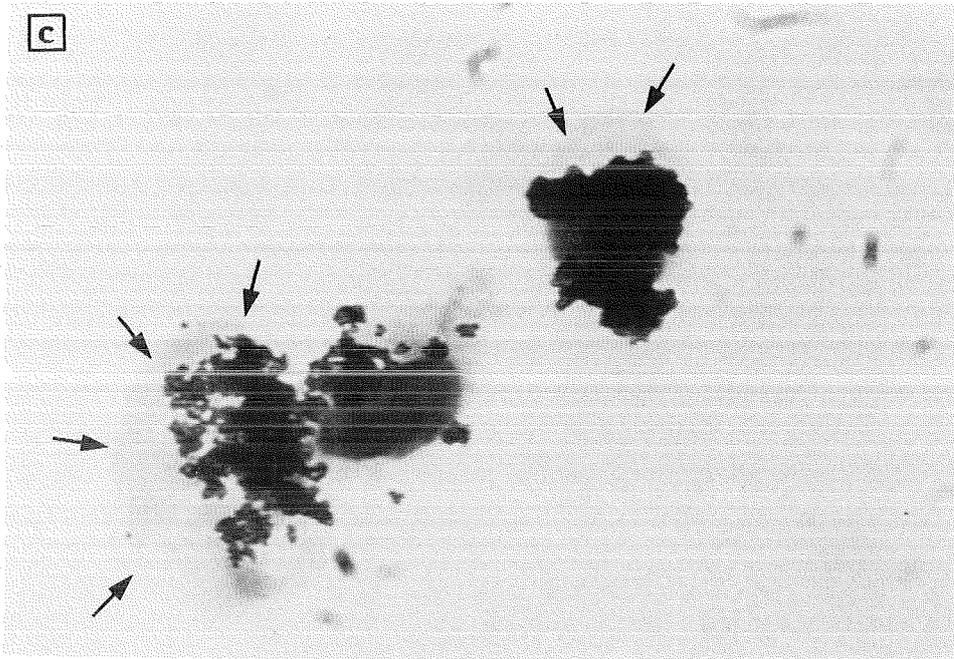


Abb. 1: Alveolarmakrophagen in Kultur nach Inkubation mit  $\text{TiO}_2$  (Anatas ).  
(a) lebende Kultur (Phasenkontrast) nach 2 Stunden ( $150\mu\text{g/ml}$ ),  
Vergrößerung: x 512  
(b) lebende Kultur (Phasenkontrast) nach 16 Stunden ( $250\mu\text{g/ml}$ ),  
Vergrößerung: x 512  
(c) fixierte Zellen (Hemacolor-Schnellfärbung) nach 16h ( $250\mu\text{g/ml}$ );  
die Pfeile weisen auf Vakuolen hin, Vergrößerung: x 1600



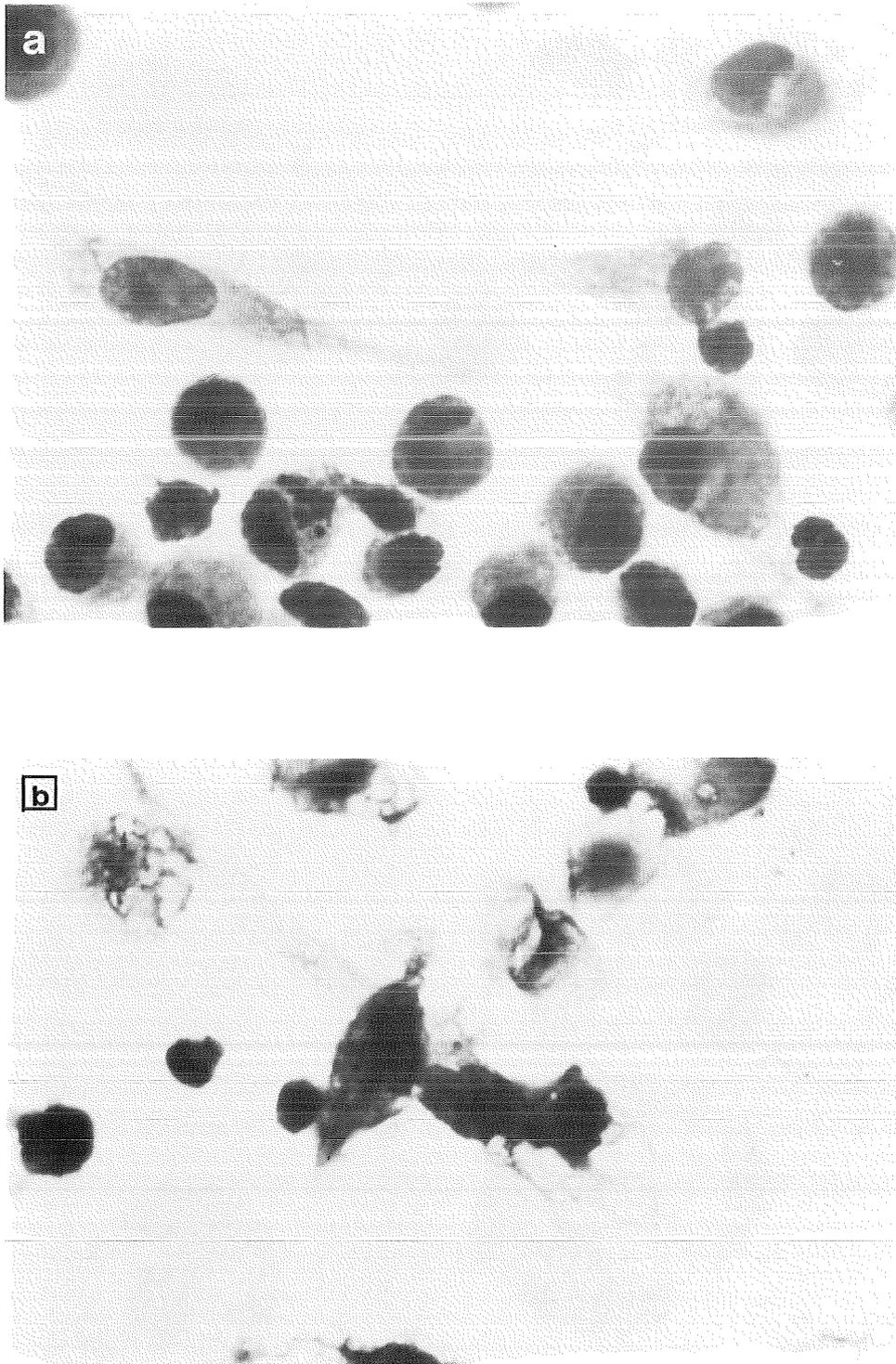
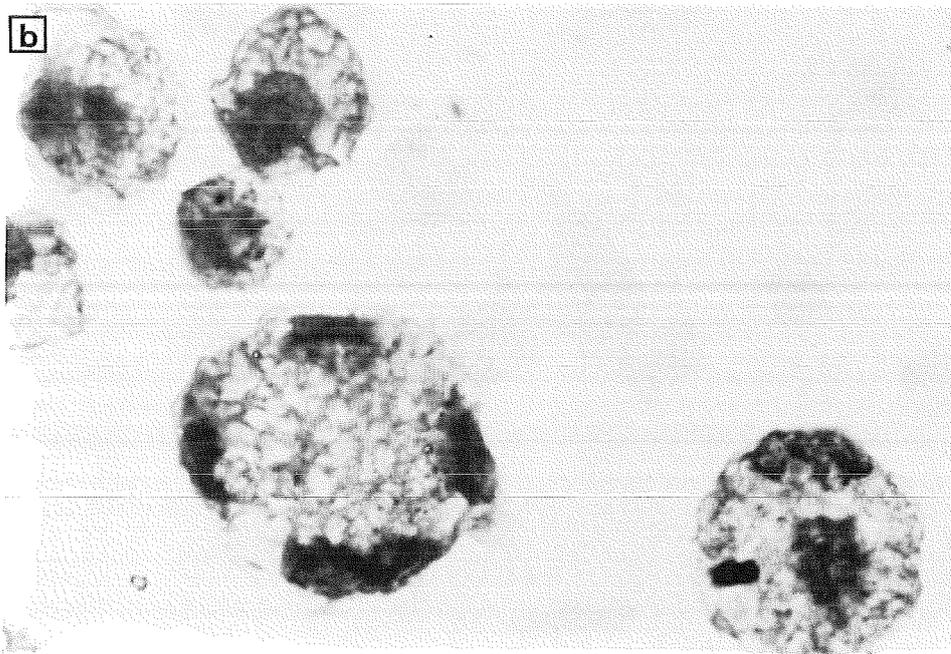
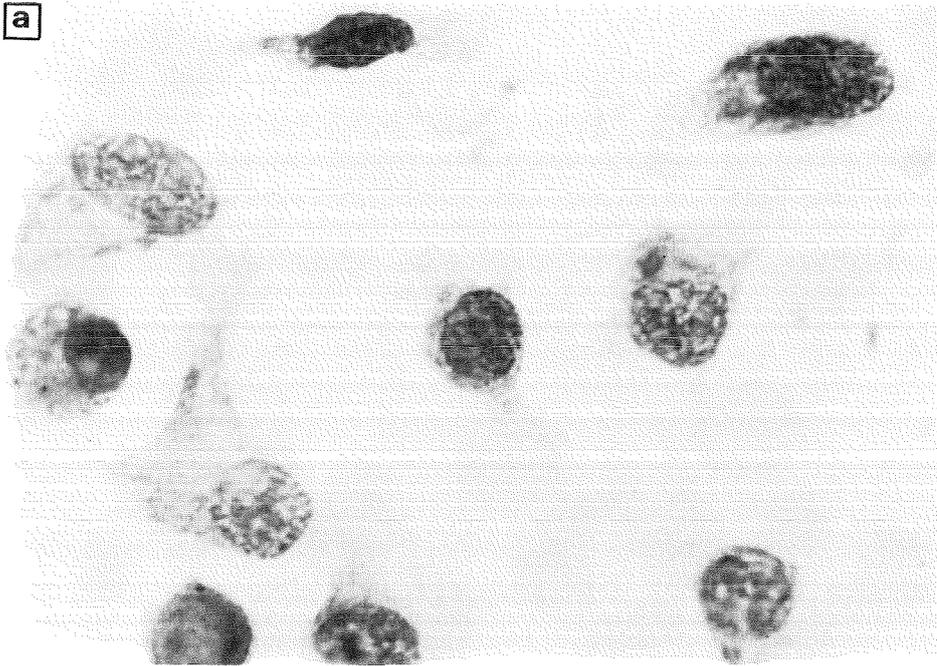


Abb. 2: Alveolarmakrophagen nach 16 Stunden Inkubation mit nativem Quarz.

(Hemacolor-Schnellfärbung), Vergrößerung: x 1600

(a) Kontrollzellen

(b) quarzinkubierte Zellen (Q5, 250 µg/ml)



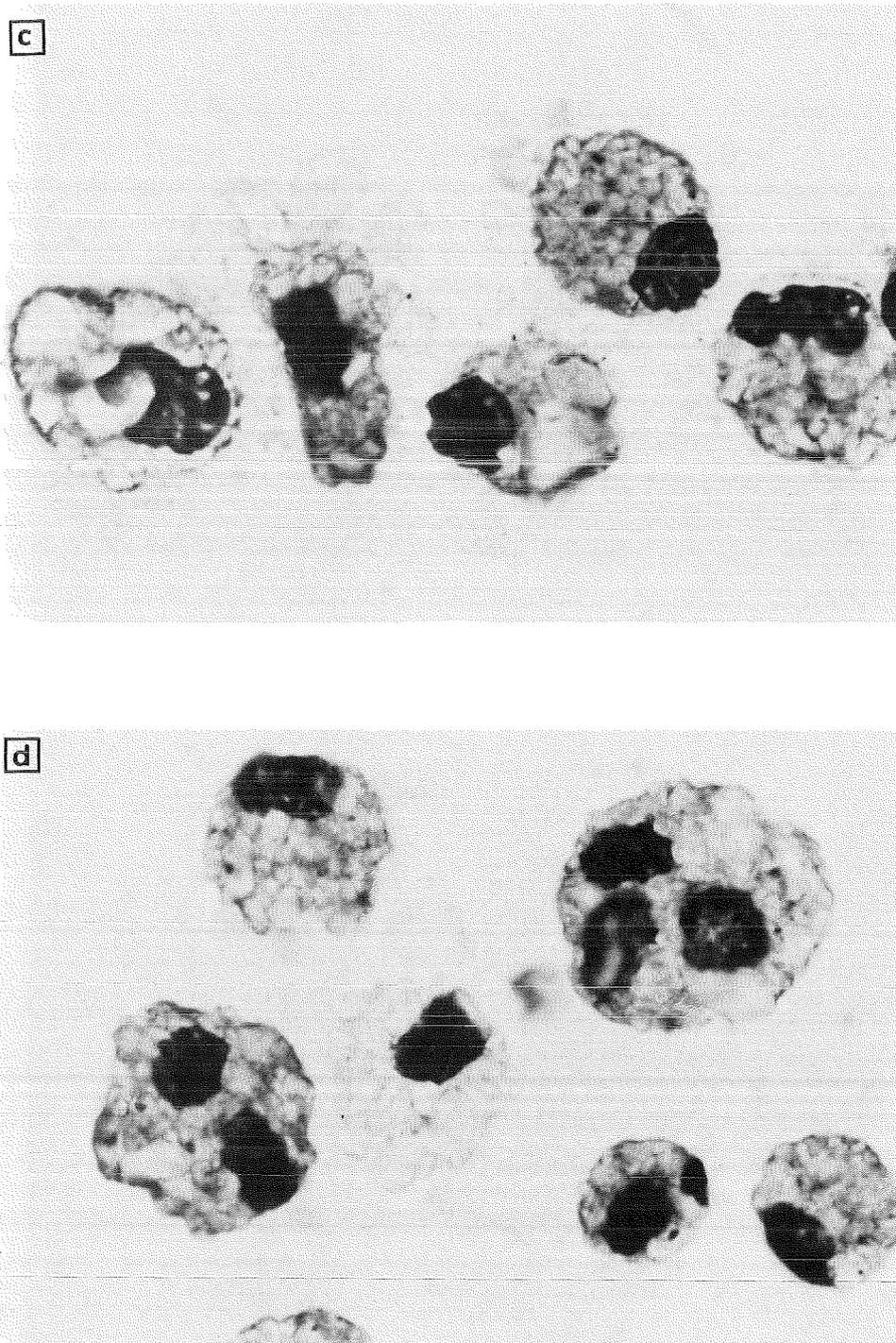
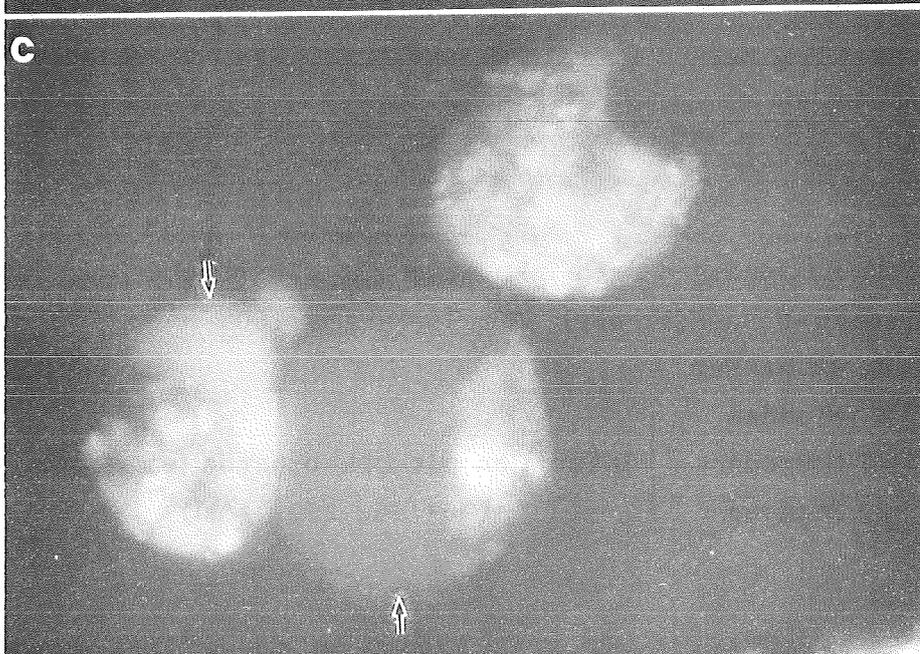
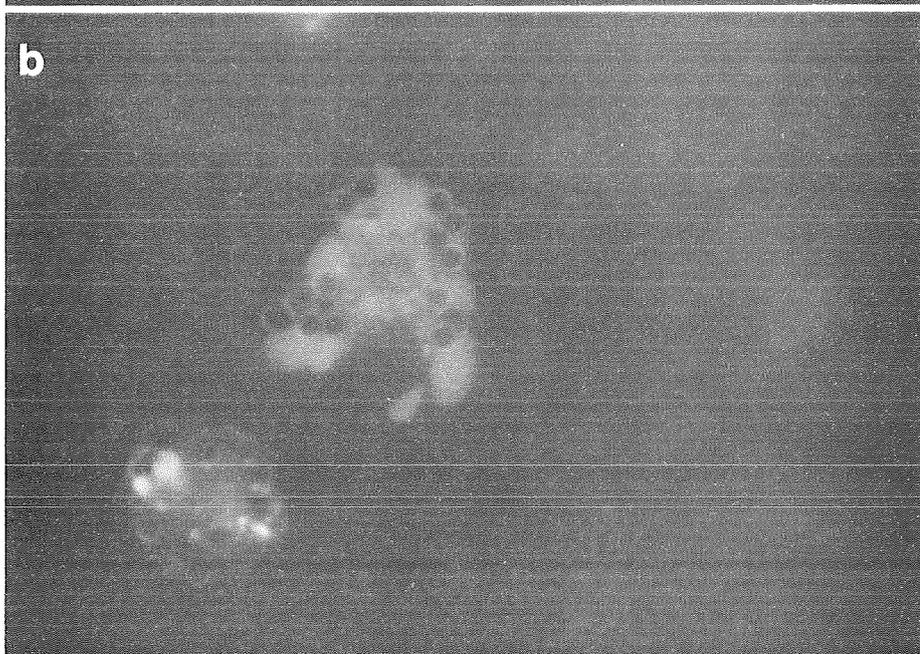


Abb. 3: Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz.  
(Hemacolor-Schnellfärbung), Vergrößerung: x 1600

- (a) Kontrollzellen
  - (b) 47 Stunden
  - (c) 67 Stunden
  - (d) 90 Stunden
- } Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz  
(Q5+DPL, 250 µg/ml)



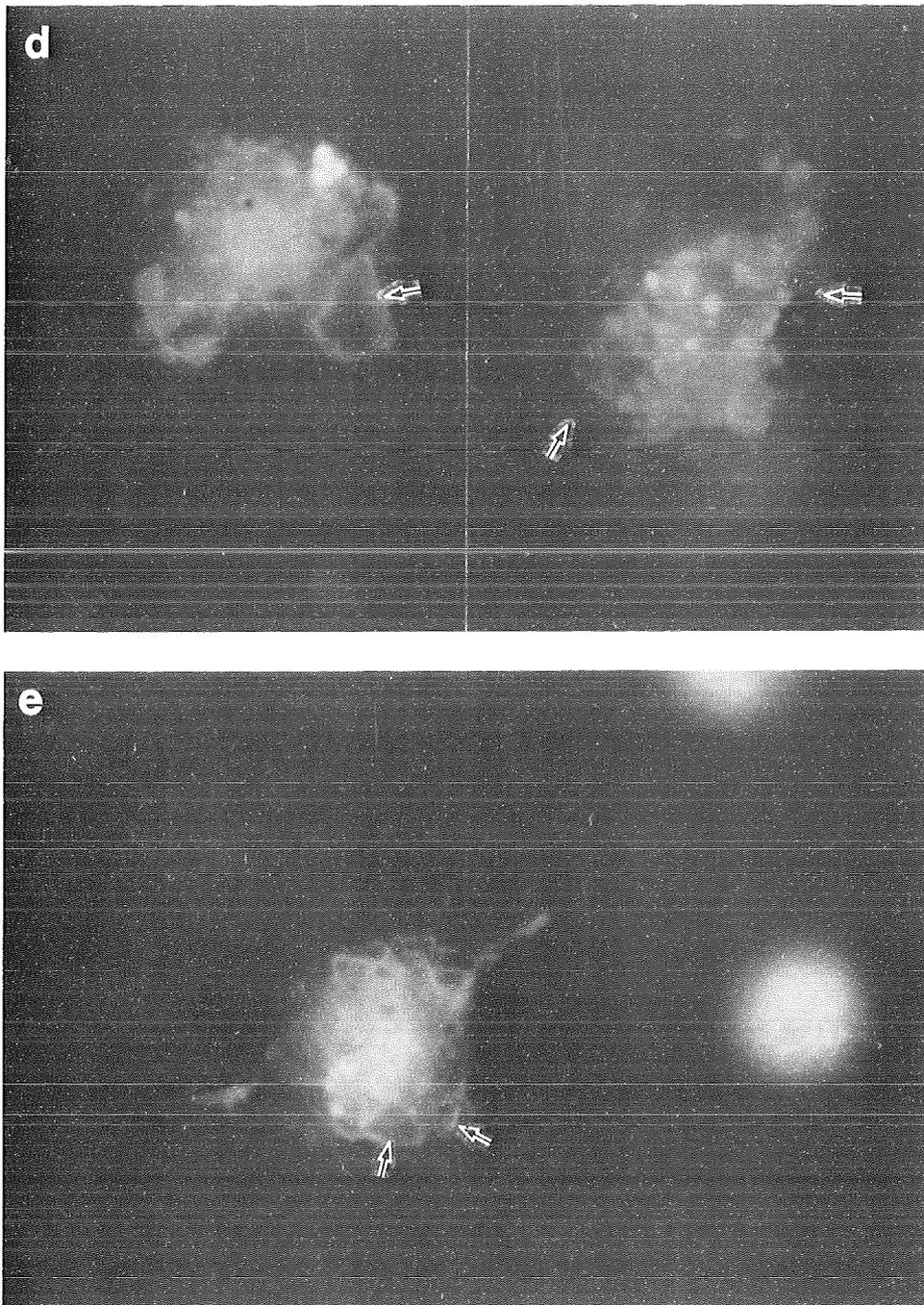
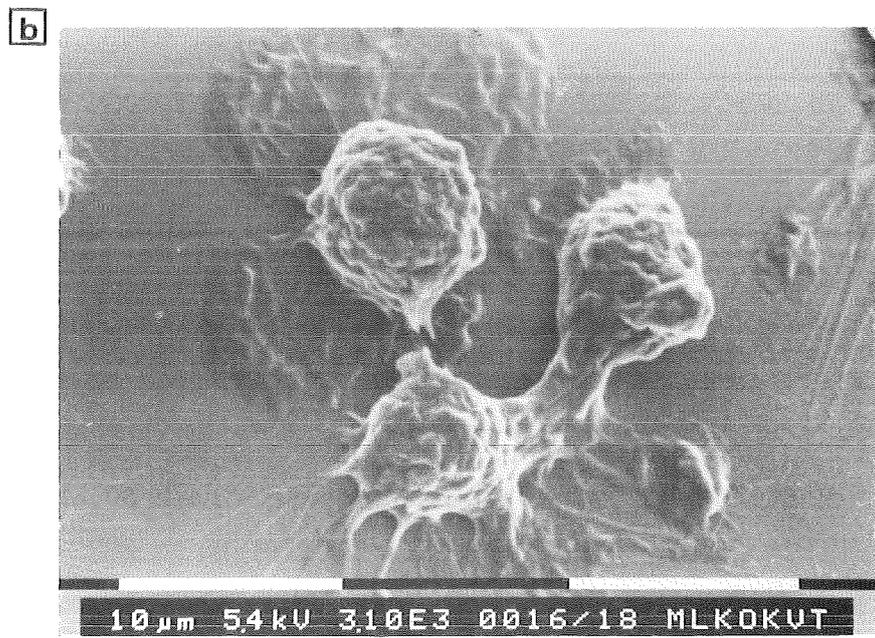
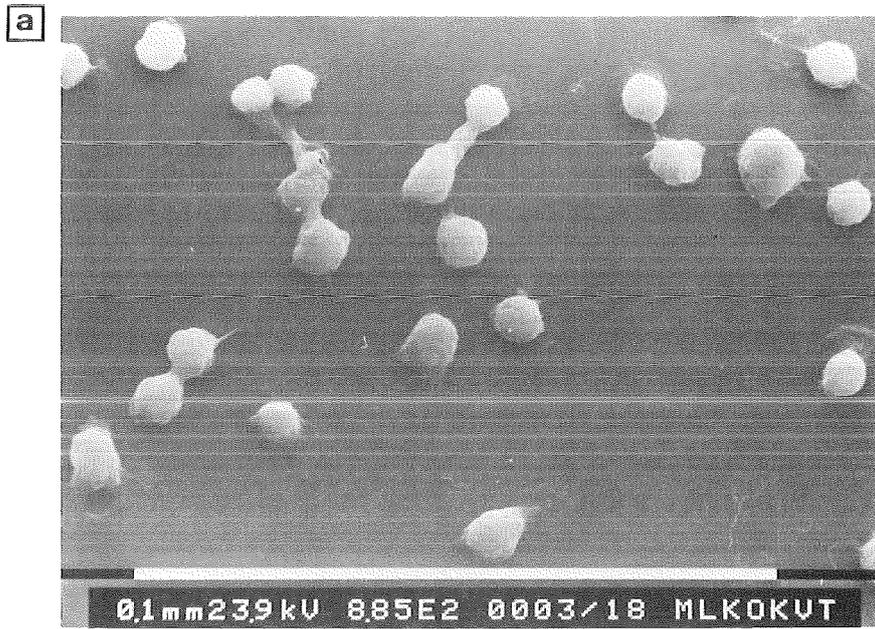


Abb. 4: Acridin Orange Färbung von Alveolarmakrophagen nach 60 Stunden Inkubation mit verschiedenen Stäuben, Vergrößerung: x 1600.

- (a) Kontrollzellen
- (b) Latex ( $\phi$  2.02 $\mu$ m, 200  $\mu$ g/ml)
- (c) TiO<sub>2</sub> (Anatase, 250  $\mu$ g/ml), starke Vakuolisierung der Zellen (Pfeile)
- (d) nativer Quarz (Q5, 250  $\mu$ g/ml), aufgenommener Quarz fluoresziert rot (Pfeile)
- (e) DPL-behandelter Quarz (Q5+DPL, 250  $\mu$ g/ml), aufgenommener Quarz fluoresziert rot (Pfeile)



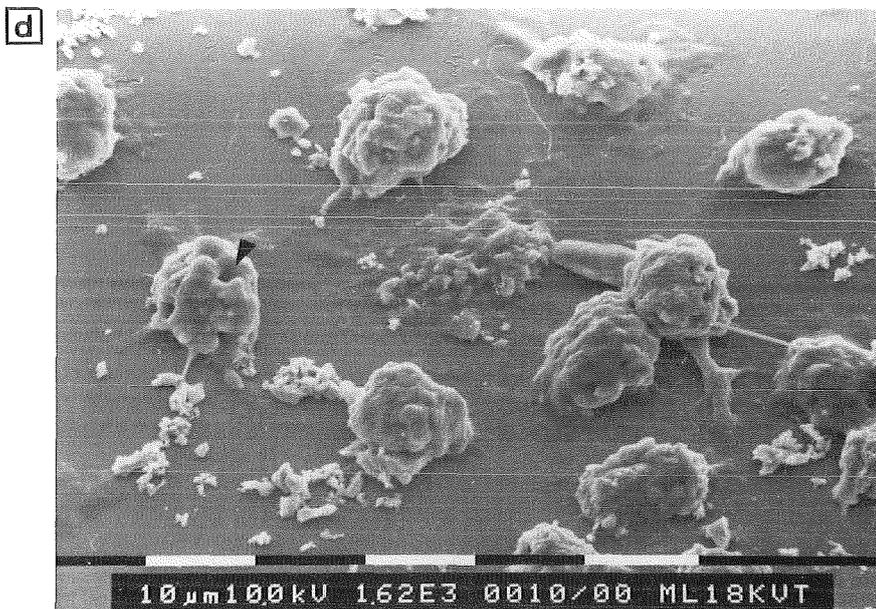
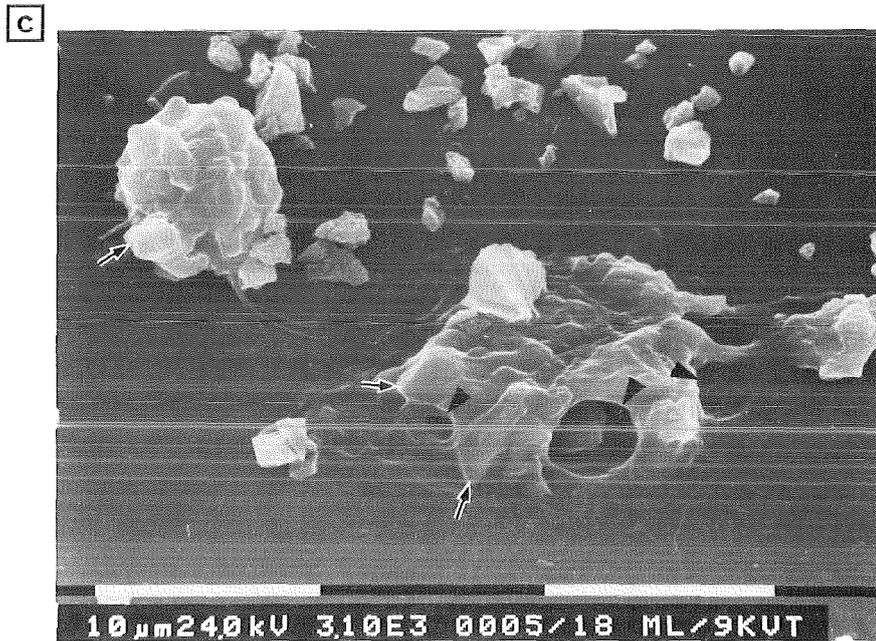
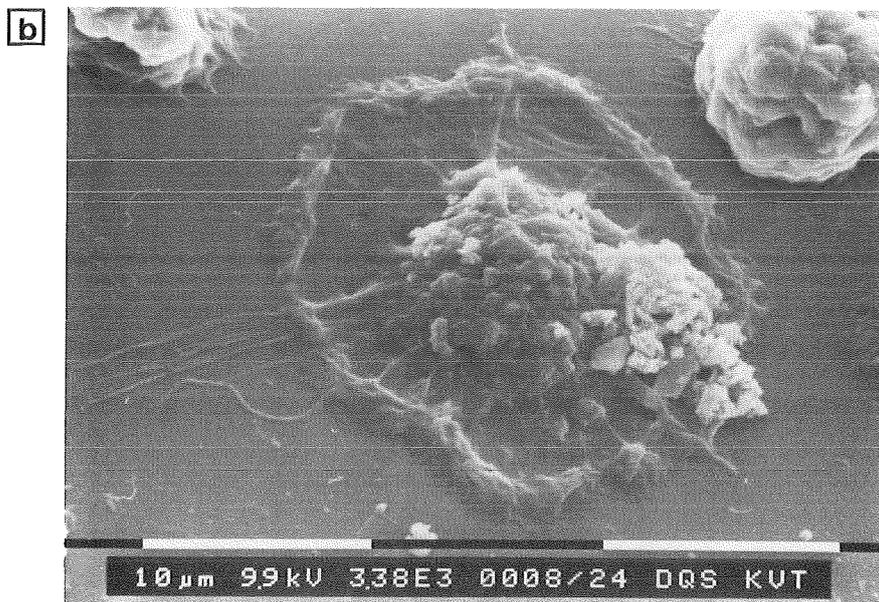
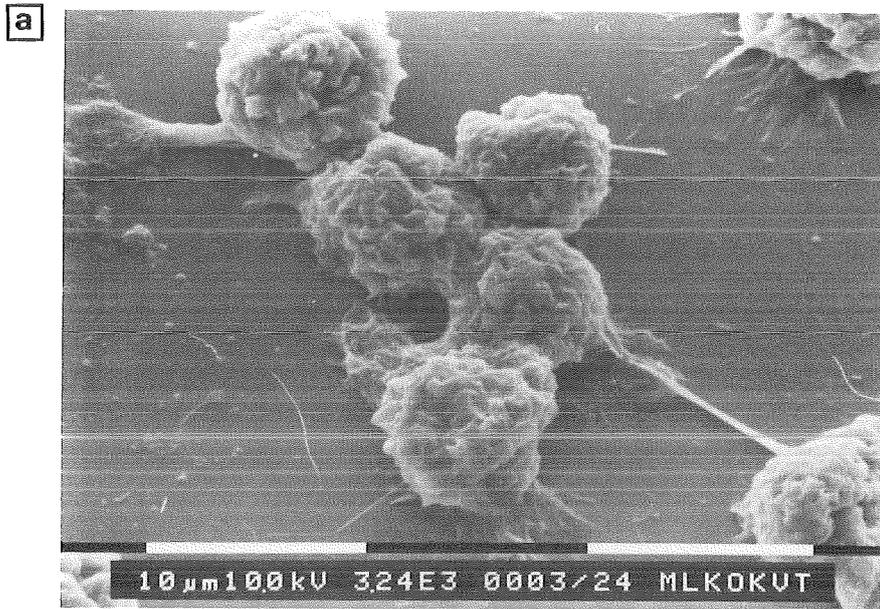


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Alveolarmakrophagen nach 2 Stunden Inkubation mit nativem Quarz.

(a,b) Kontrollzellen

(c,d) quarzinkubierte Zellen, (c) Q5, (d) Q6, (je 500 μg/ml)  
Pfeilspitzen weisen auf "Löcher" in der Zellmembran hin  
Pfeile weisen auf phagozytierte Quarzpartikel hin



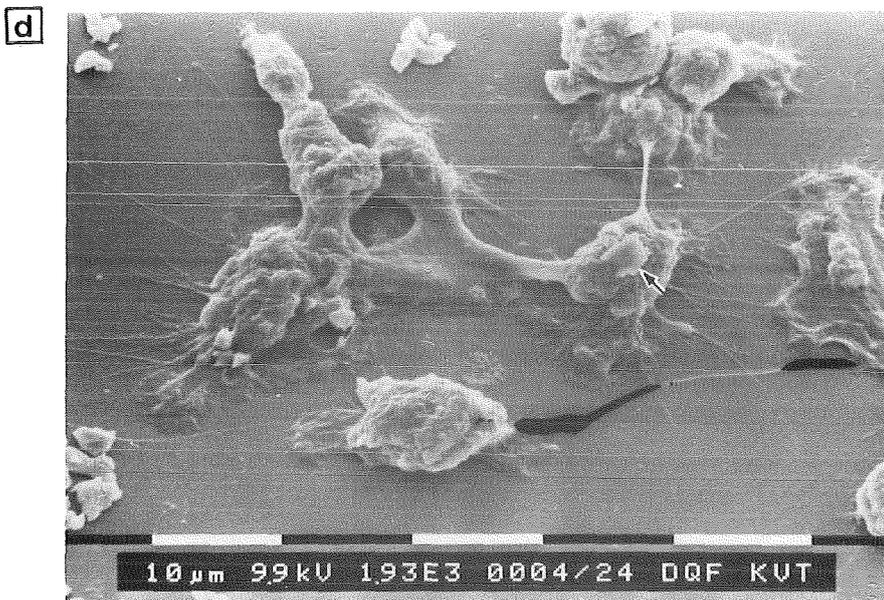
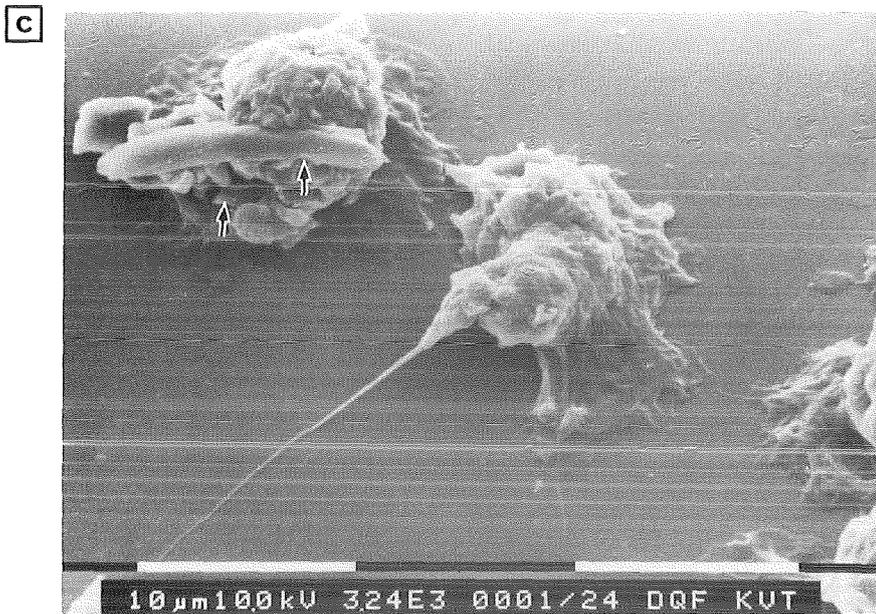
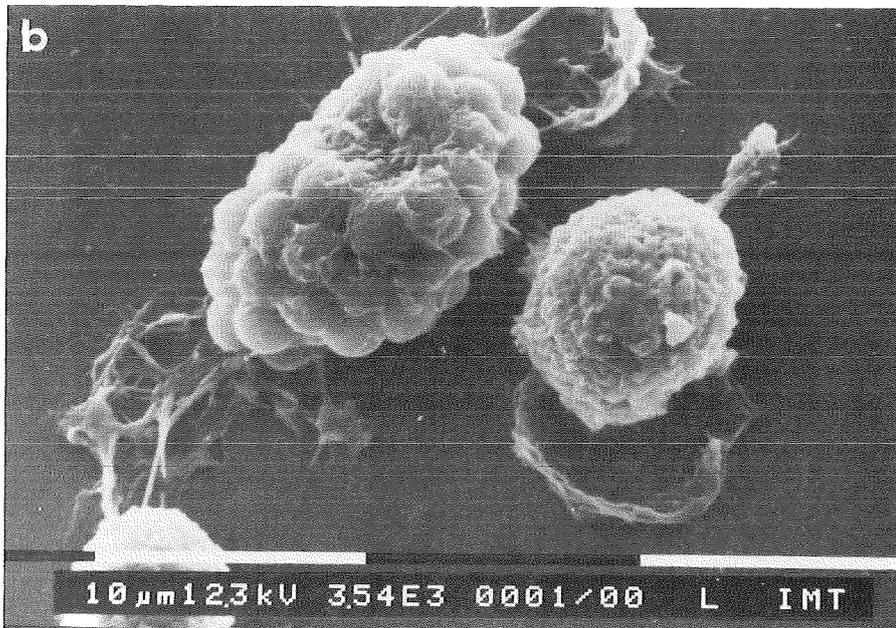
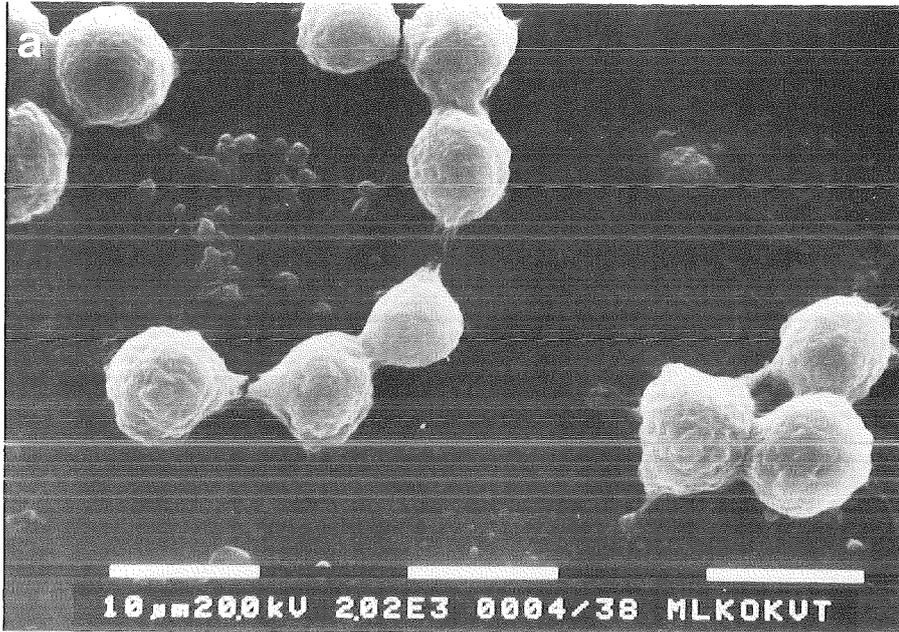


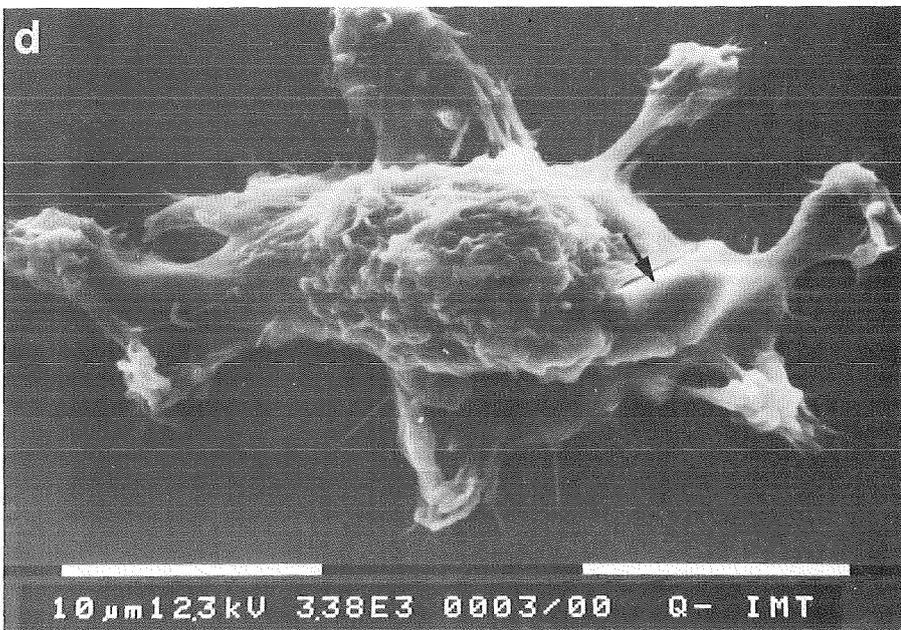
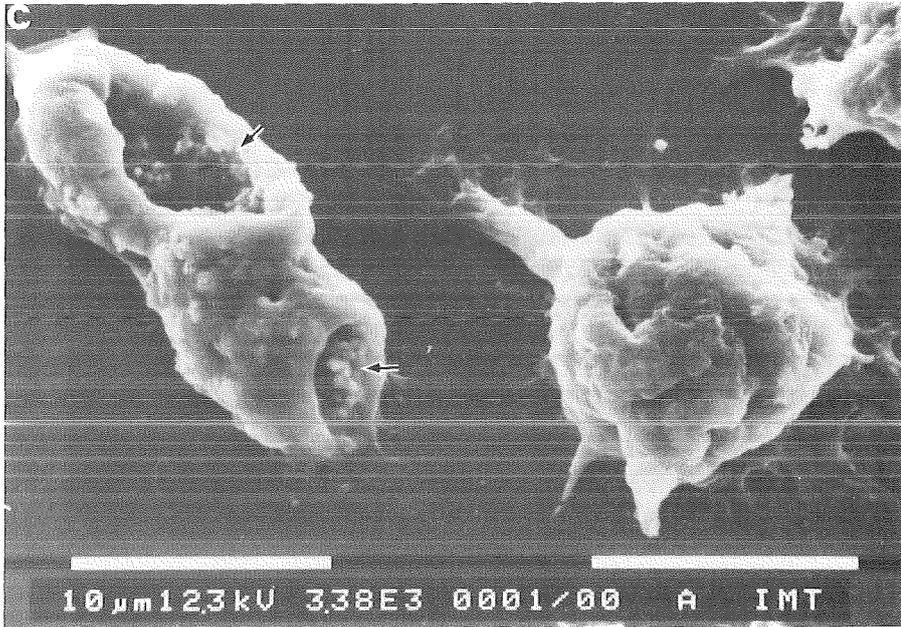
Abb. 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Alveolarmakrophagen nach 16 Stunden Inkubation mit nativem Quarz.

(a) Kontrollzellen

(b,c,d) quarzinkubierte Zellen, (b) Q8, (c,d) Q5 (je 250  $\mu\text{g/ml}$ )

Pfeile weisen auf unvollständig phagozytierten Quarz hin





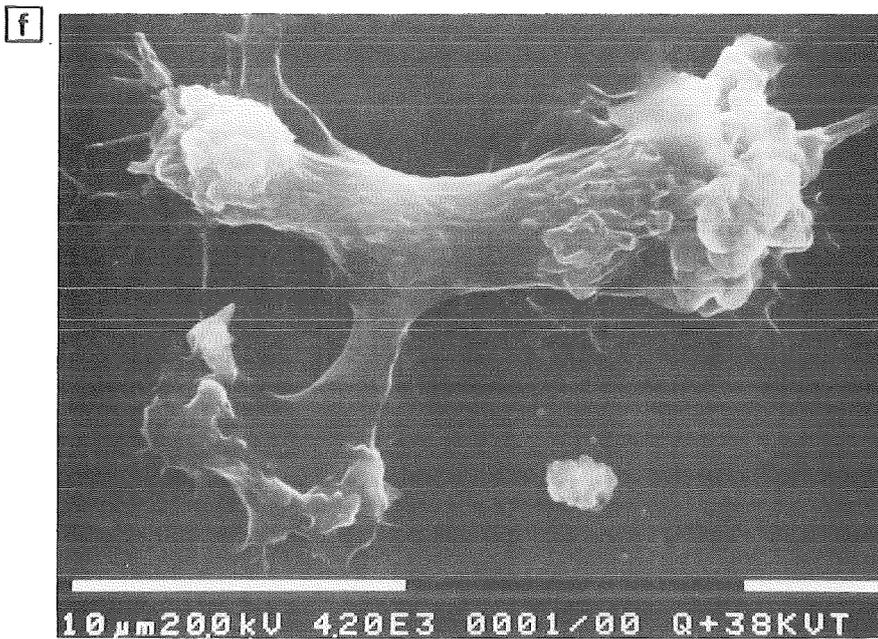
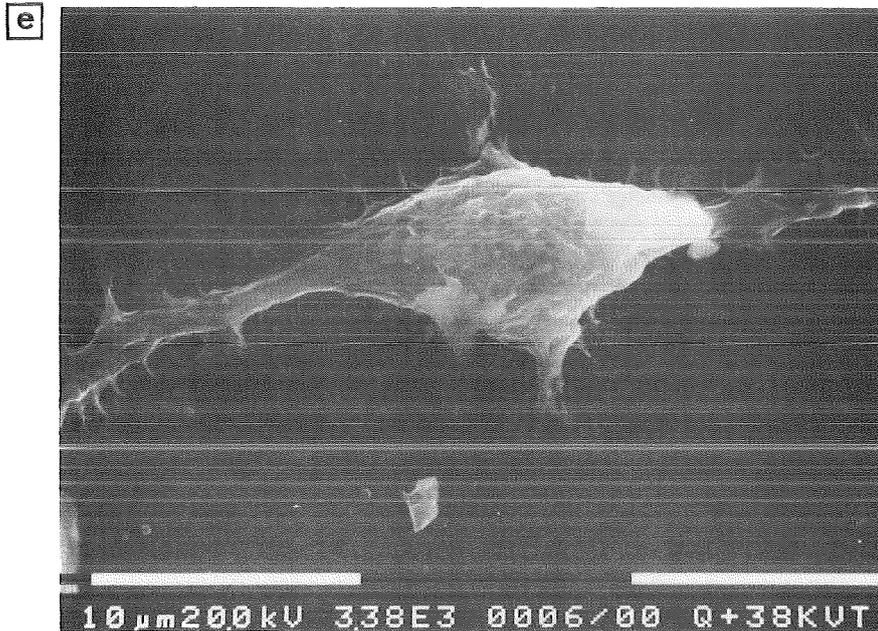


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Alveolarmakrophagen nach 47 Stunden Inkubation mit verschiedenen Stäuben.

- (a) Kontrollzellen
- (b) Latex ( $\phi$  2.02  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- (c)  $\text{TiO}_2$  (Anatas, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Pfeile markieren kollabierte Vakuolen
- (d) nativer Quarz (Q5, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Pfeil markiert phagozytierte Quarzpartikel
- (e,f) DPL-behandelter Quarz (Q5+DPL, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

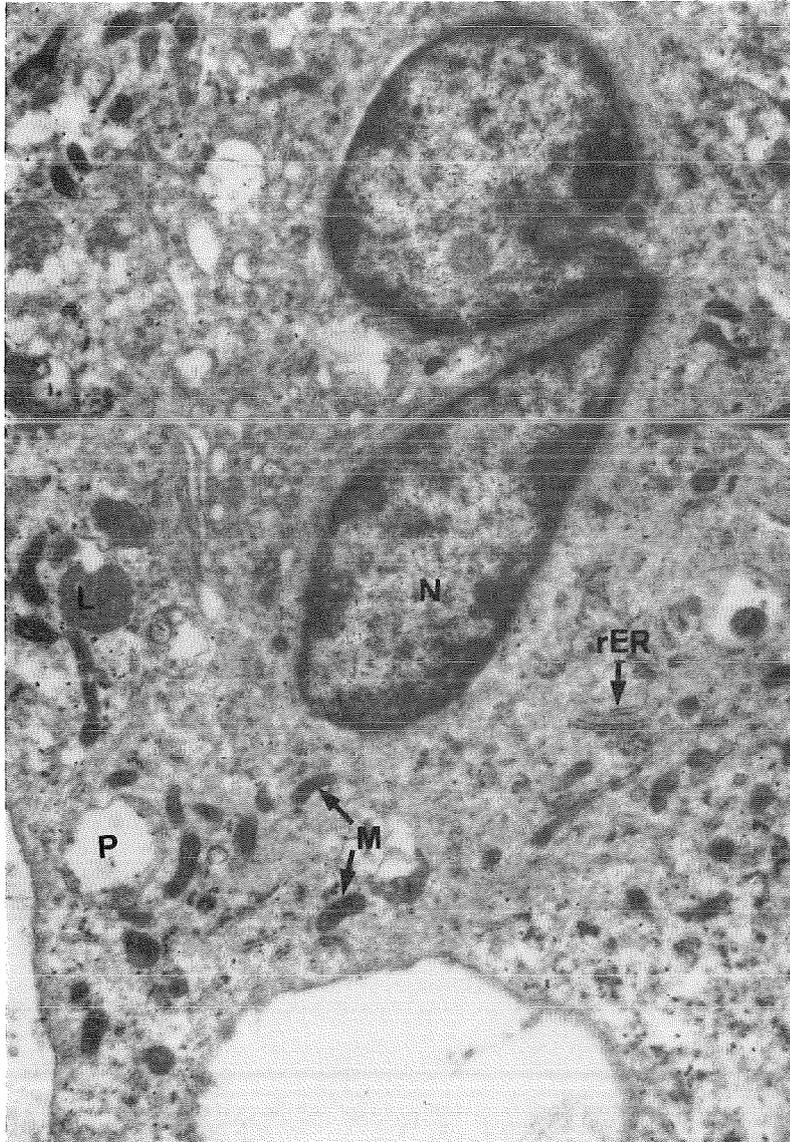


Abb. 8: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Kontroll-Alveolarmakrophagen, Vergrößerung: x 12,000.

M: Mitochondrien, rER: rauhes Endoplasmatisches Retikulum

N: Nucleus, L: primäres Lysosom, P: Phagosom

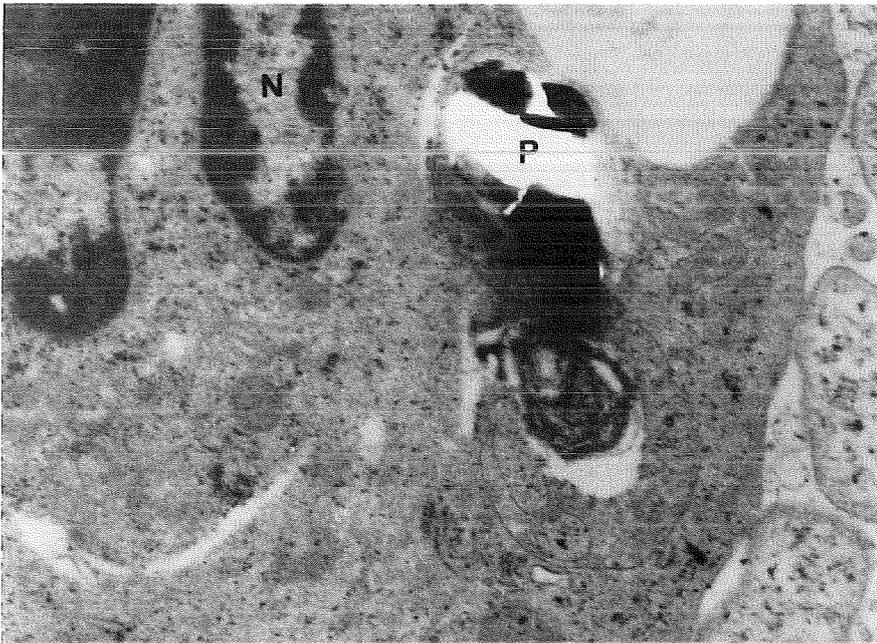


Abb. 9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Alveolar-  
makrophagen nach 2 Stunden Inkubation mit nativem Quarz  
(Q5, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Vergrößerung: x 21,000.  
P: quarzhaltiges Phagosom, N: Nucleus

### 3.2. Biochemische Untersuchungen

#### 3.2.1. Einfluß der in vitro-Kultivierung

Für die in vitro-Inkubationsversuche mit Alveolarmakrophagen (AM) wurden die Zellen in Monolayerkulturen gehalten. Tab. 1 zeigt den Einfluß der in vitro-Kultivierung auf Enzym- und Proteingehalt von Kontrollzellen. Aufgeführt ist die Summe der Enzymaktivitäten bzw. des Proteins aus Kulturüberstand und adhaerenten Zellen. Während des gesamten Inkubationszeitraumes kommt es in den unbehandelten Kontrollen zu keinen signifikanten Veränderungen von Gesamtzym- bzw. Proteingehalt. Diese Werte bilden die Berechnungsgrundlage für die Ergebnisse der Versuche mit staubinkubierten Zellen (s. 2.6.).

Tab. 1: Absolute Enzymaktivitäten und Gesamtproteingehalt von Kontroll-Alveolarmakrophagen nach verschiedenen Inkubationszeiten

Inkubationszeit (Std.)	NAG <sup>a</sup>	SP <sup>a</sup>	Cath.B <sup>a</sup>	GLDH <sup>b</sup>	LDH <sup>b</sup>	Protein <sup>c</sup>
2	16.8±3.9 [8]	4.6±3.1 [2]	1.6±0.7 [2]	18.6±2. [3]	144±40 [8]	113.0±20 [8]
4	29.3±7.0 [3]	n.b.	2.4±0.5 [2]	16.3. [1]	.94±52 [3]	161.2±11 [2]
16	17.6±2.7 [6]	n.b.	1.9±0.4 [4]	30.9±14 [3]	216±49 [5]	176.5±20 [6]

Mittelwerte ± Standardfehler

Zahl der Versuche in Klammern

<sup>a</sup>mU/ml Medium; 1Unit (U) katalysiert die Umsetzung von 1 µMol Substrat pro Minute bei 37°C

<sup>b</sup>mU/ml Medium; 1Unit (U) katalysiert die Umsetzung von 1 µMol Substrat pro Minute bei 25°C

<sup>c</sup>µg/ml Medium

n.b.: nicht bestimmt

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

### 3.2.2. Inkubationen mit verschiedenen Stäuben

AM wurden für 2 Stunden und 4 Stunden mit den Kontrollstäuben Latex und TiO<sub>2</sub> (Anatas) und mit DQ12-Quarz (Q8) inkubiert. Die Verteilung des lysosomalen Enzyms NAG sowie des zytoplasmatischen Enzyms LDH in Überstand und adhaerenten Zellen wurde bestimmt.

Nach 2 Stunden Inkubation erfolgt, verglichen mit den unbehandelten Kontrollen, in keinem der Versuchsansätze eine erhöhte Enzymfreisetzung in die Kulturüberstände (Abb. 10). Die Aktivitäten in den adhaerenten Zellen sind leicht erhöht.

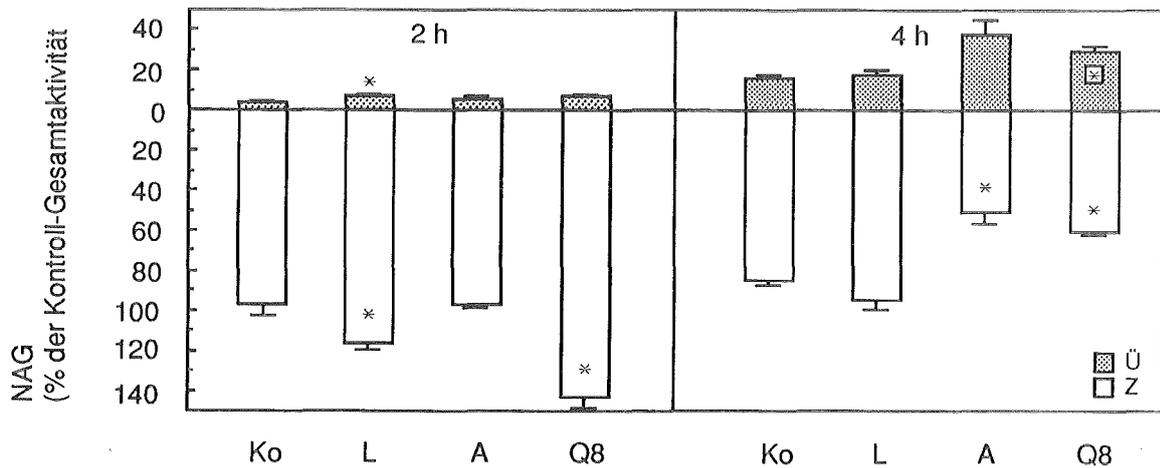


Abb. 10: Verteilung der NAG in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z) nach 2 und 4 Stunden Inkubation mit Latex (100 µg/ml), TiO<sub>2</sub> (A) und Quarz (Q8, je 150 µg/ml) bei 37°C.

(in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)

Repräsentativ für 2 Versuche

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3

\*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Nach 4 Stunden sind die Enzymverteilungen bei den mit  $\text{TiO}_2$  und Q8 inkubierten Zellen verschoben (Abb. 11). Während im Überstand die Aktivitäten deutlich erhöht sind, haben sie in den adhaerenten Zellen abgenommen. Besonders deutlich ist dieser Effekt bei den mit Q8 inkubierten Kulturen. Die Enzymverteilungen der mit Latex inkubierten Zellen sind unverändert verglichen mit den Kontrollen.

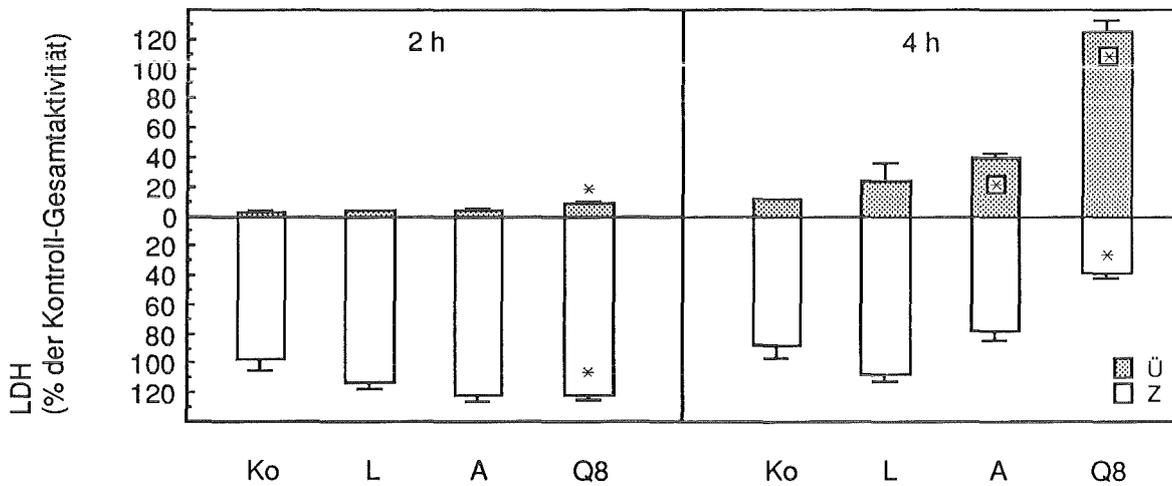


Abb. 11: Verteilung der LDH in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z) nach 2 und 4 Stunden Inkubation mit Latex (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $\text{TiO}_2$  (A) und Quarz (Q8, je 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bei 37°C.

(in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)

Repräsentativ für 2 Versuche

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$

\*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

### 3.2.3. Wirkung von Quarz auf Alveolarmakrophagen

#### 3.2.3.1. Vergleich verschiedener Quarzfraktionen

##### 3.2.3.1.1. Vitalität

Zellkulturen wurden mit je 500 µg/ml nativem Quarz verschiedener Größenklassen (2.2.3.) inkubiert. Der Einfluß auf die Vitalität in Abhängigkeit der Zeit ist in Abb. 12 dargestellt. Bei der eingesetzten Dosis können keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Quarzfraktionen festgestellt werden. Mit zunehmender Kulturdauer kommt es zu einer drastischen Abnahme der Vitalität bis auf etwa 20% nach 16 Stunden Inkubation.

Im Gegensatz dazu beträgt die Vitalität von Zellen, die mit DPL-behandeltem Quarz (Q5+DPL) inkubiert worden waren, über einen Zeitraum von 90 Stunden noch über 95% und ist somit unverändert gegenüber den Kontrollen (Daten nicht aufgeführt).

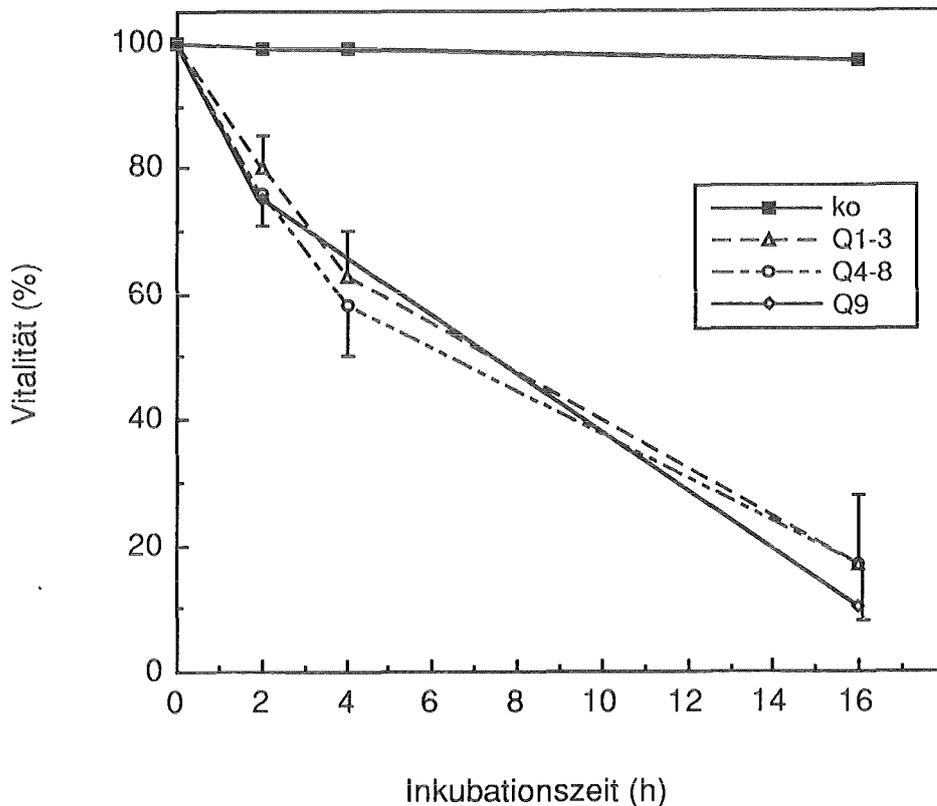


Abb. 12: Einfluß verschiedener Quarzfraktionen (Q1 - Q9, jeweils 500 µg/ml) auf die Vitalität von Alveolarmakrophagen (bestimmt durch Anfärben der Kulturen mit Trypanblau).

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=4

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste und 2.2.3.

### **3.2.3.1.2. Enzym- und Proteinverteilung**

Nach 2, 4 und 16 Stunden Inkubation der AM mit je 500 µg/ml der verschiedenen Quarzfraktionen wurden in Kulturüberständen und adhaerenten Zellen (s. 2.3.2.) die Aktivitäten von lysosomalen und zytoplasmatischen Markerenzymen sowie der Proteingehalt bestimmt. Die Verteilungen sind in Abb. 13 - 16 dargestellt.

Mit zunehmender Inkubationszeit kommt es unabhängig von der eingesetzten Quarzfraktion zu einer ansteigenden Freisetzung von NAG, LDH und Protein in den Überstand. Parallel dazu nimmt die Aktivität in den Zellen mit der Inkubationsdauer ab. Dieser Effekt ist bei der LDH am deutlichsten ausgeprägt (Abb. 15) und korreliert gut mit der Abnahme der Vitalität (s. Abb. 12). Während nach 16 Stunden Inkubation mit Quarz nur noch 10 - 15% LDH in den adhaerenten Zellen gemessen werden, verringern sich NAG und Protein in den Zellen auf etwa 40%.

Die Summe der NAG aus Überständen und Zellen bleibt über die gesamte Versuchszeit hinweg nahezu konstant (Abb. 13). Dagegen ist der Gehalt der LDH und des Proteins bei den quarzinkubierten Zellen nach 16 Stunden leicht vermindert gegenüber der Kontrolle (Abb. 15, 16).

Ein anderes Bild ergibt sich aus der Betrachtung des Cathepsin B (Abb. 14). Nach 2 Stunden Inkubation mit Quarz ist bereits eine Abnahme der Aktivität in den Zellen zu beobachten, die zunächst nicht von einer Zunahme in den Überständen begleitet wird. Erst nach 4 Stunden sind die Werte in den Überständen signifikant höher als die Kontrolle. Nach 16 Stunden Inkubation schließlich ist sowohl die Aktivität in den Überständen als auch in den adhaerenten Zellen deutlich geringer als in der Kontrolle. Insgesamt konnten in den quarzinkubierten Kulturen weniger als 40% der Kontroll-Gesamtaktivität gemessen werden (s. auch Abb. 18).

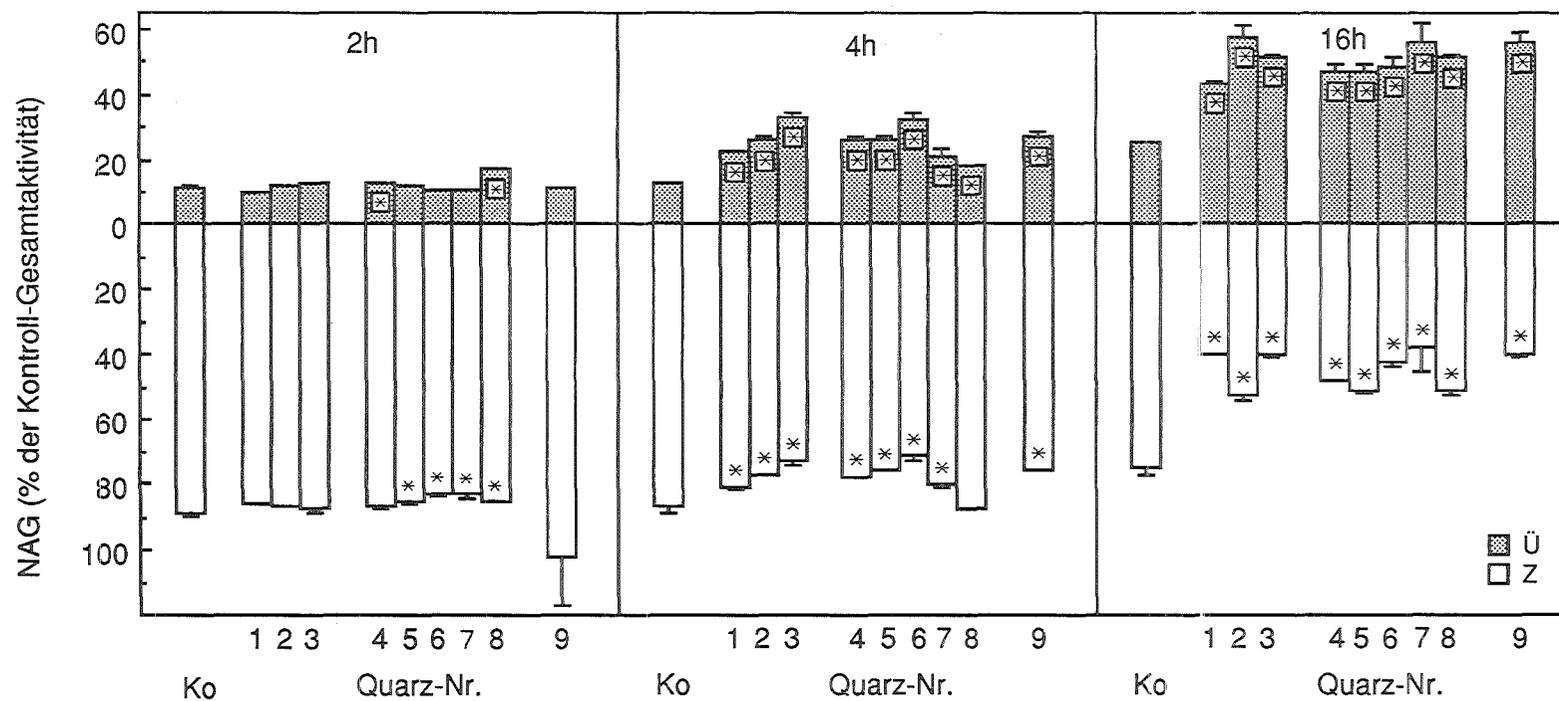


Abb. 13: Einfluß verschiedener Quarzfraktionen (Q1 - Q9, je 500 µg/ml) auf die Verteilung der NAG von Alveolarmakrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z) nach 2, 4 und 16 Stunden Inkubation bei 37°C.  
 (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)  
 Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3  
 Einzelversuch  
 \*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle  
 Abkürzungen siehe Abkürzungsliste und 2.2.3.

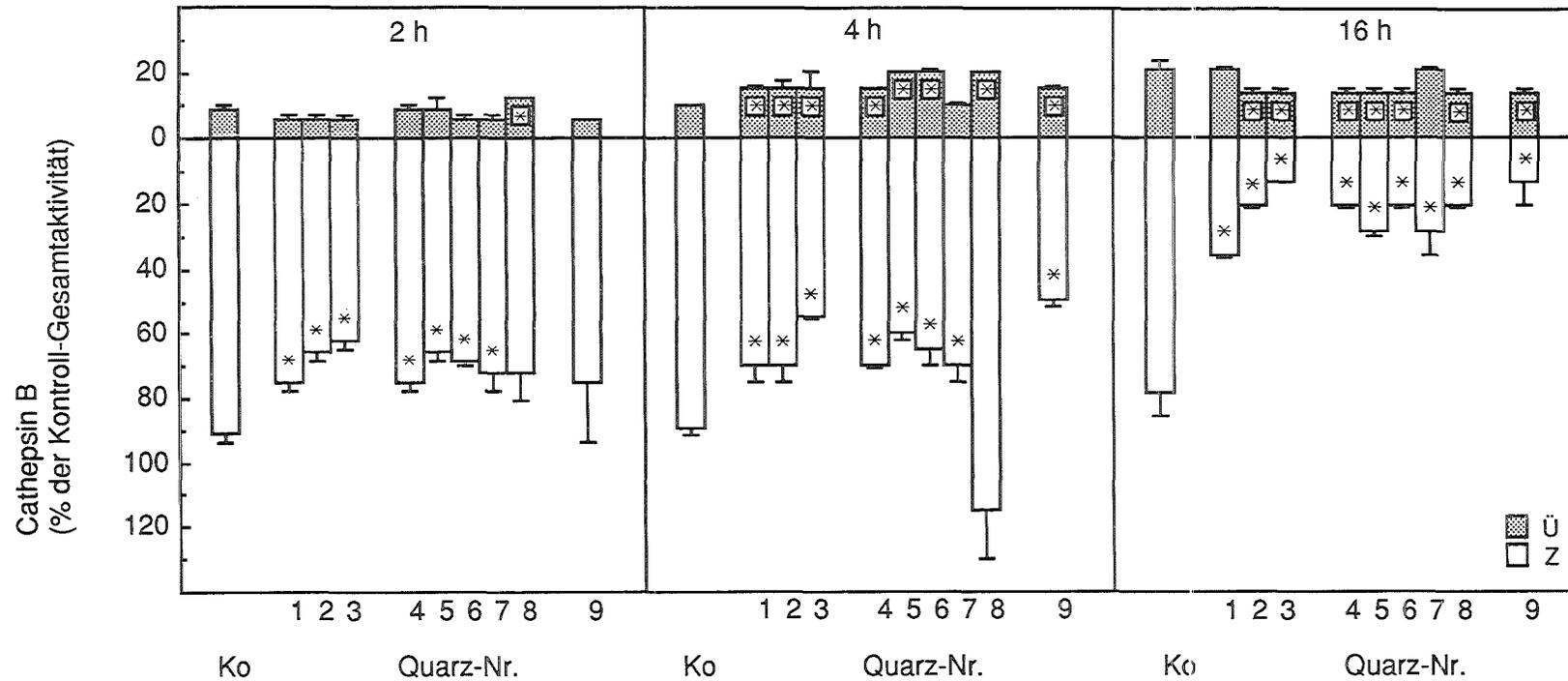


Abb. 14: Einfluß verschiedener Quarzfraktionen (Q1 - Q9, je 500 µg/ml) auf die Verteilung von Cathepsin B von Alveolarmakrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adherenten Zellen (Z) nach 2, 4 und 16 Stunden Inkubation bei 37°C.  
 (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)  
 Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3  
 Einzelversuch  
 \*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle  
 Abkürzungen siehe Abkürzungsliste und 2.2.3.

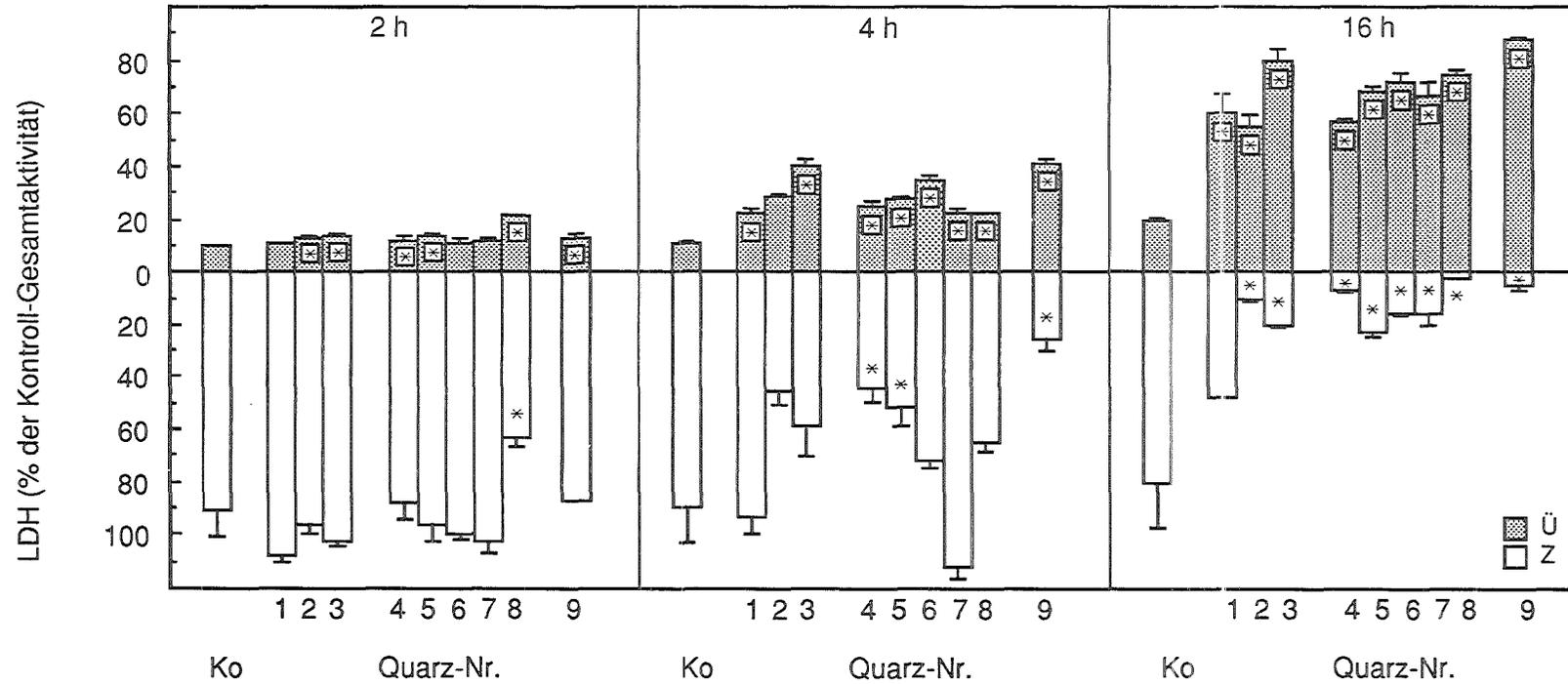


Abb. 15: Einfluß verschiedener Quarzfraktionen (Q1 - Q9, je 500 µg/ml) auf die Verteilung der LDH von Alveolarmakrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z) nach 2, 4 und 16 Stunden Inkubation bei 37°C.  
 (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)  
 Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3  
 Einzelversuch  
 \*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle  
 Abkürzungen siehe Abkürzungsliste und 2.2.3.

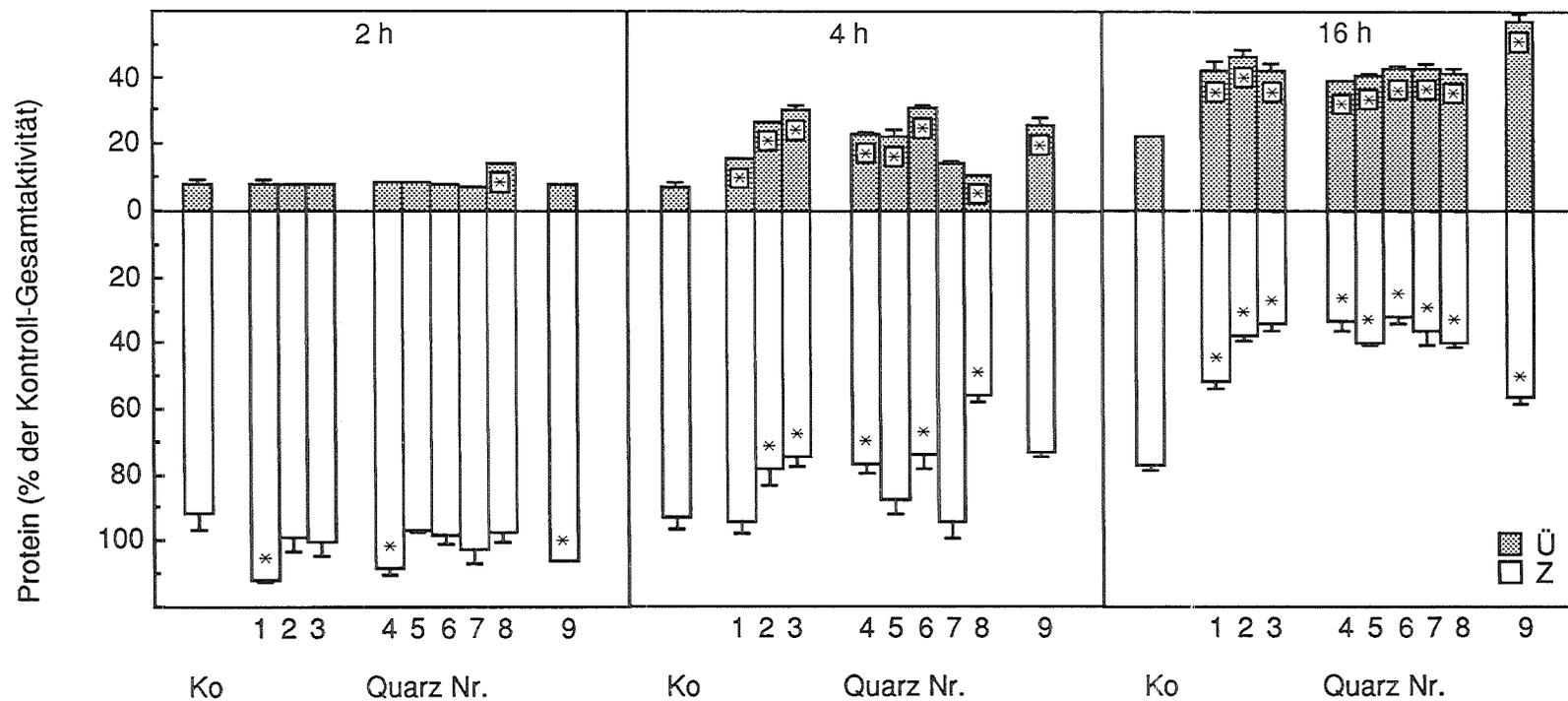


Abb. 16: Einfluß verschiedener Quarzfraktionen (Q1 - Q9, je 500 µg/ml) auf die Verteilung des Gesamtproteins von Alveolarmakrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adherenten Zellen (Z) nach 2, 4 und 16 Stunden Inkubation bei 37°C (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)  
 Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3  
 Einzelversuch  
 \*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle  
 Abkürzungen siehe Abkürzungsliste und 2.2.3.

### 3.2.3.2. Vergleich von nativem und Phospholipid-behandeltem Quarz (Q5)

Kultivierte AM wurden mit 250 µg nativem Q5/ml für 2, 4 und 16 Stunden inkubiert. In den Kulturüberständen und adhaerenten Zellen wurden die Aktivitäten von NAG, Cathepsin B, LDH und der Proteingehalt gemessen. Aus Abb. 17 und Abb. 20 ist ersichtlich, daß weder NAG noch Protein nach 2 und 4 Stunden Unterschiede zur Kontrolle zeigen. Erst nach 16 Stunden kommt es zu erhöhter Freisetzung in den Überstand bei gleichzeitiger Abnahme in den Zellen (Protein:  $2p < 0.02$ ).

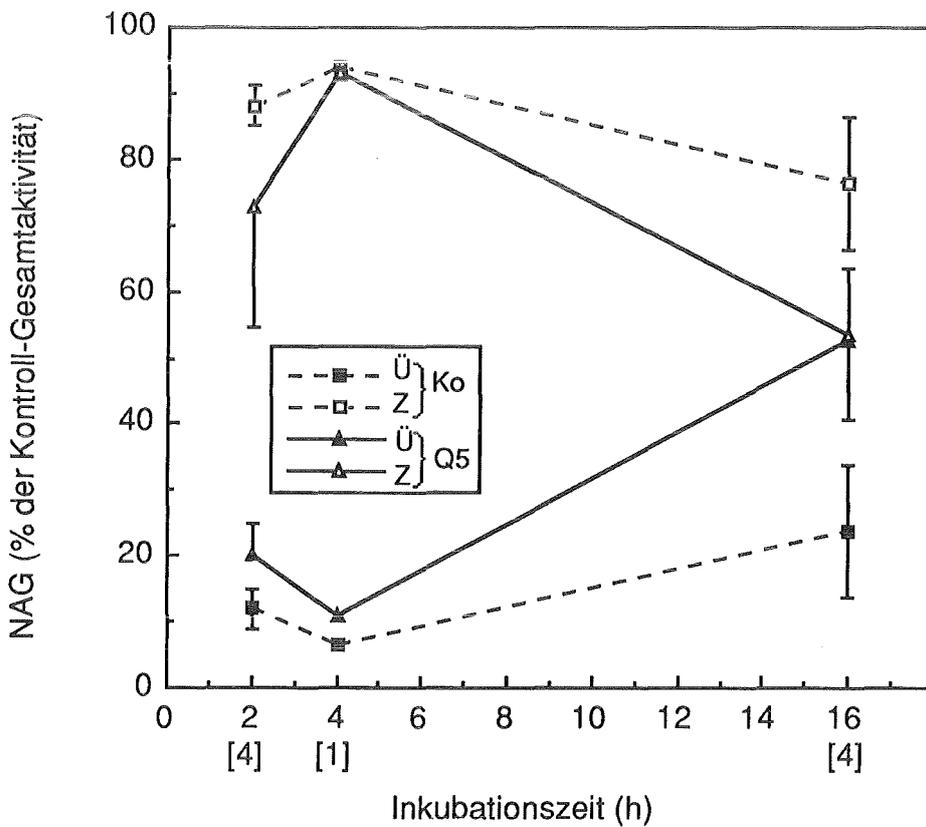


Abb. 17: Einfluß der Inkubationsdauer mit nativem Quarz (Q5, 250 µg/ml, 37°C) auf die Verteilung der NAG von Alveolarmakrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z).  
(in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)  
Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler  
Zahl der Versuche in Klammern  
Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

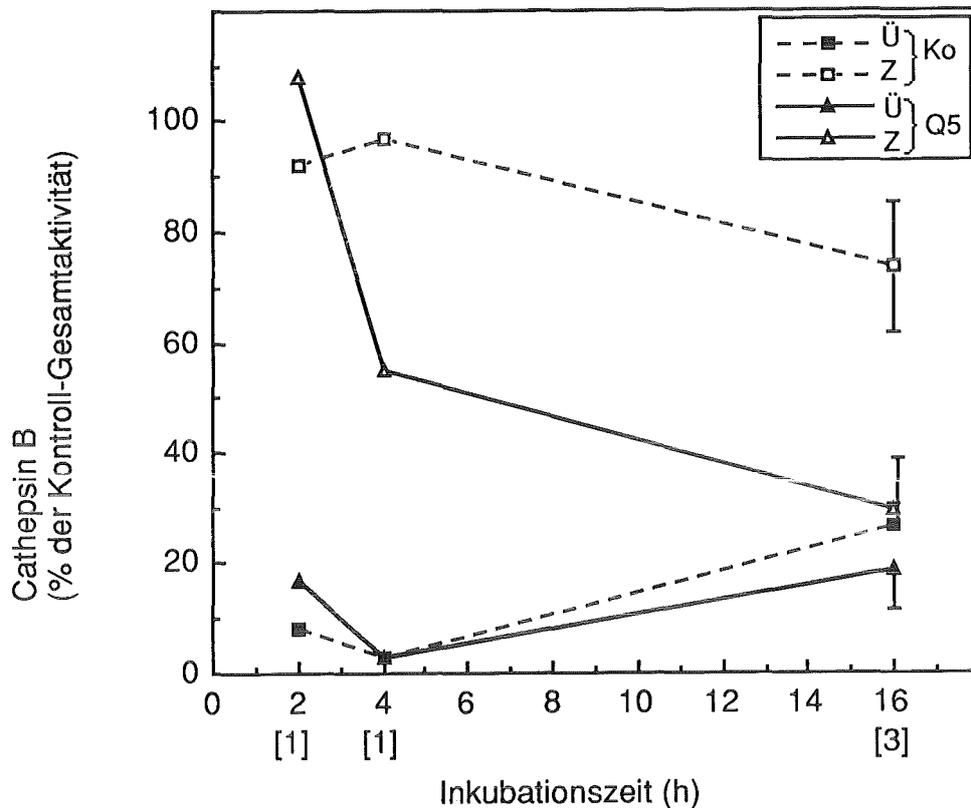


Abb. 18: Einfluß der Inkubationsdauer mit nativem Quarz (Q5, 250 µg/ml, 37°C) auf die Verteilung von Cathepsin B von Alveolarmakrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z).  
 (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)  
 Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler  
 Zahl der Versuche in Klammern  
 Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Das zweite lysosomale Enzym Cathepsin B zeigt dagegen eine andere Verteilung (Abb. 18). In der Kontrolle bleibt der Enzymgehalt in Überstand und Zellen bis zu 4 Stunden nahezu konstant. Erst nach 16 Stunden Inkubation werden 25% in den Überstand freigesetzt. Bei den mit Q5 inkubierten Kulturen ist die Aktivität in den Überständen im gesamten Beobachtungszeitraum vergleichbar mit der Kontrolle. In den Zellen kommt es dagegen zu einer drastischen Abnahme des Enzymgehaltes auf 55% nach 4 Stunden und auf 30% nach 16 Stunden Inkubation ( $2p < 0.02$ ).

Auch der LDH-Gehalt der quarzinkubierten Zellen beträgt nach 16 Stunden nur noch etwa 55% der Kontroll-Gesamtaktivität (Abb. 19). In den Überständen ist der LDH-Gehalt zu den drei Zeitpunkten jeweils doppelt so hoch wie in der Kontrolle. In den Zellen nimmt die LDH-Aktivität mit zunehmender Inkubationsdauer bis auf 20% ab ( $2p < 0.01$ ).

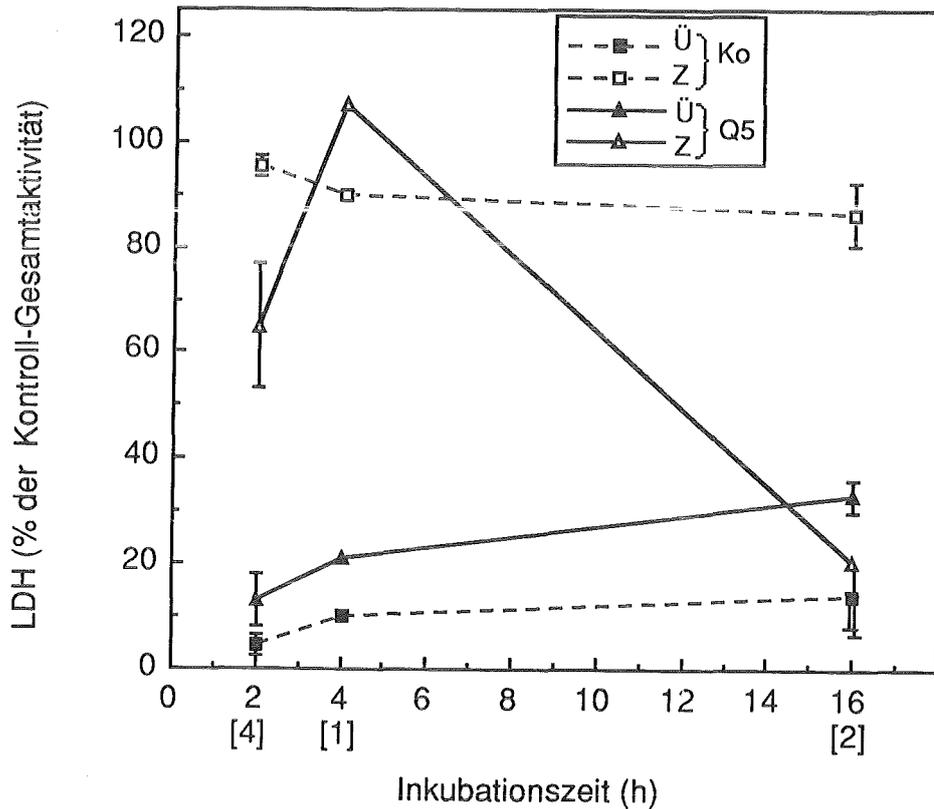


Abb. 19: Einfluß der Inkubationsdauer mit nativem Quarz (Q5, 250 µg/ml, 37°C) auf die Verteilung der LDH von Alveolarmakrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z).  
(in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)  
Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler  
Zahl der Versuche in Klammern  
Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

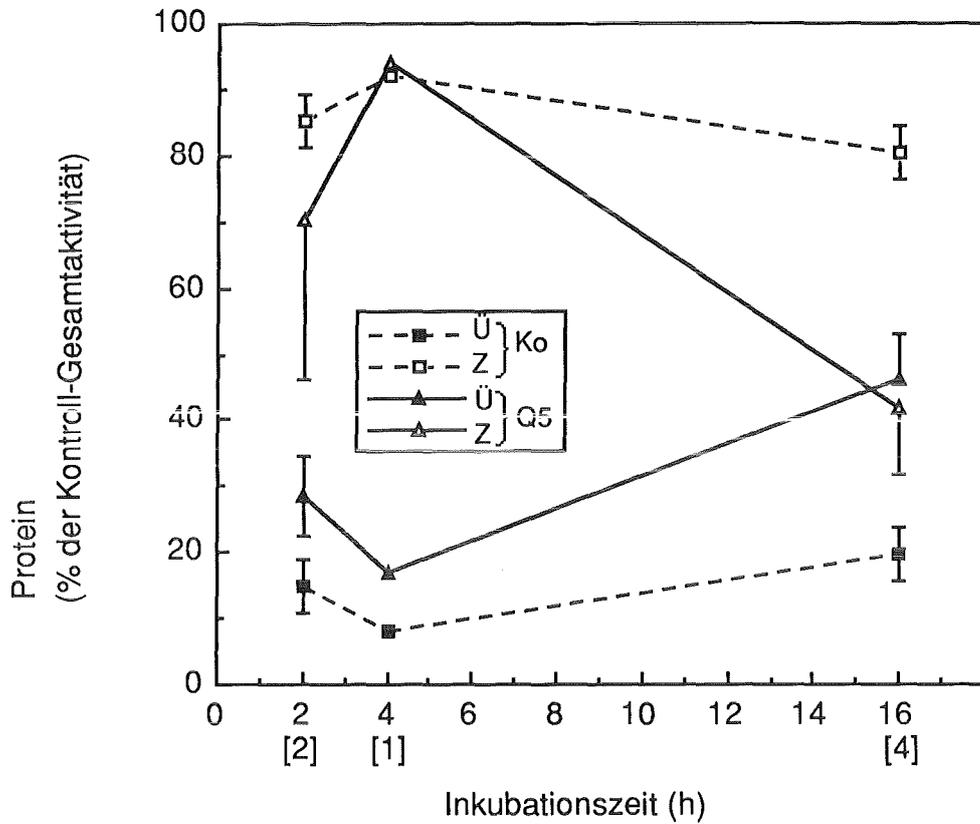


Abb. 20: Einfluß der Inkubationsdauer mit nativem Quarz (Q5, 250 µg/ml, 37°C) auf die Verteilung des Gesamtproteins von Alveolar-makrophagen, in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z). (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt)  
Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler  
Zahl der Versuche in Klammern  
Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Die oben beschriebenen Quarzwirkungen konnten durch die DPL-Vorbehandlung des Quarzes vollständig verhindert werden (Abb. 21, 22). Die Kulturen wurden 90 Stunden lang beobachtet. Sowohl die Verteilung der NAG als auch der LDH ist in diesem Zeitraum nahezu identisch mit der Kontrolle. Nach 90 Stunden ist die NAG-Aktivität in den adhaerenten Zellen in den mit Q5+DPL-inkubierten Kulturen sogar signifikant höher ( $2p < 0.025$ ) und der LDH-Gehalt im Überstand signifikant niedriger ( $2p < 0.001$ ) als in der Kontrolle.

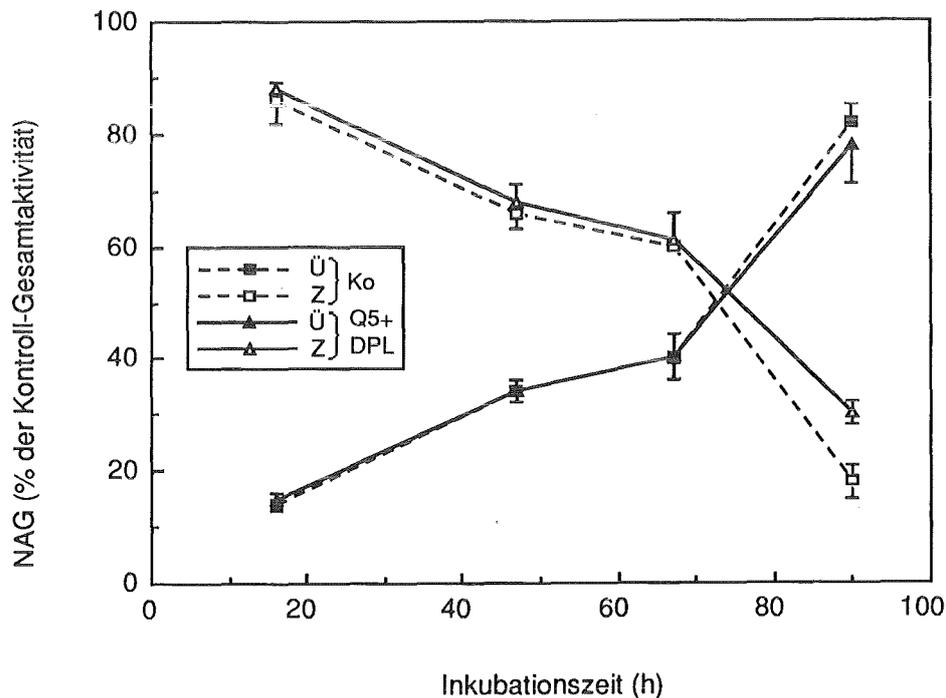


Abb. 21: Einfluß der Inkubationsdauer mit DPL-behandeltem Quarz (Q5+DPL, 250 µg/ml, 37°C) auf die Verteilung der NAG von Alveolar-makrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z). (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt) für Inkubationszeiten  $\geq 47$ h wurden die Zellen in KM 2 inkubiert Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 2 Versuchen Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

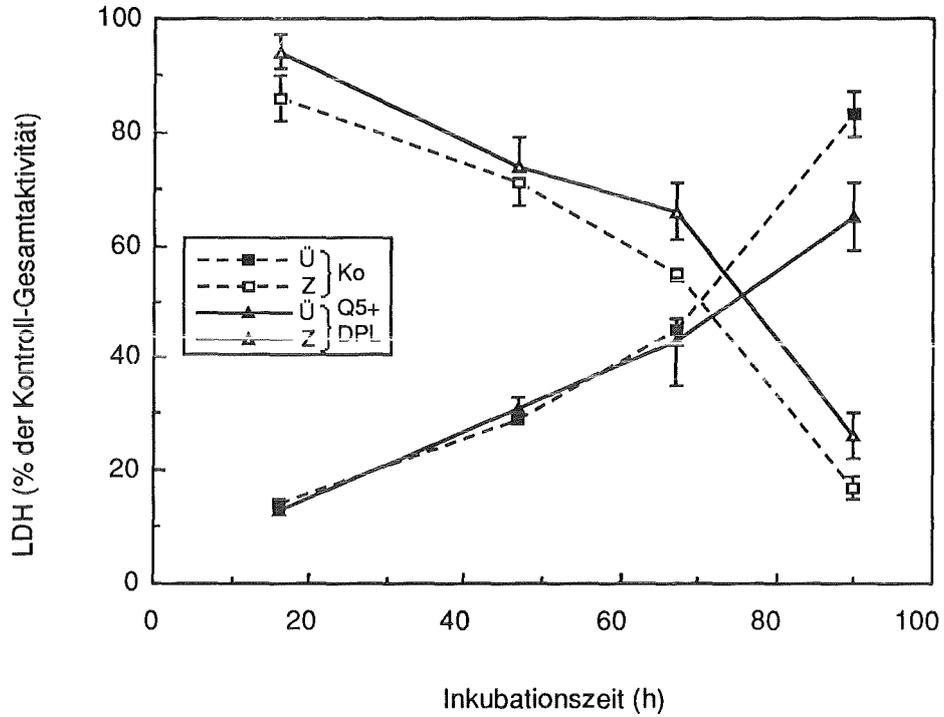


Abb. 22: Einfluß der Inkubationsdauer mit DPL-behandeltem Quarz (Q5+DPL, 250 µg/ml, 37°C) auf die Verteilung der LDH von Alveolar-makrophagen in Kulturüberstand (Ü) und adhaerenten Zellen (Z). (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+Z) zum jeweiligen Zeitpunkt) für Inkubationszeiten  $\geq 47$ h wurden die Zellen in KM 2 inkubiert Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 2 Versuchen Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

### 3.3. Untersuchungen an fraktionierten Zellen

#### 3.3.1. Trägerfreie Elektrophorese der "ML"-Fraktion

Aus angereichertem "ML" von Kontroll-AM (s. 2.5.2.) wurden durch Trägerfreie Elektrophorese reine Lysosomen dargestellt. Abb. 23 zeigt die Profile der Leitenzyme NAG und SP für Lysosomen und GLDH für Mitochondrien in den ersten 55 der insgesamt 90 Fraktionen. Während die NAG nur ein Maximum in der 17. Fraktion zeigt, weist die SP ein Profil mit zwei Maxima auf. Der erste Gipfel fällt mit dem der NAG zusammen, der zweite liegt in Fraktion 27. Das Profil der GLDH zeigt ebenfalls zwei Maxima in Fraktion 26 und 30 und liegt somit an vergleichbarer Stelle wie der zweite Gipfel der SP.

##### 3.3.1.1. Verhalten gelöster Enzyme in der Trägerfreien Elektrophorese

Kontroll-"ML" wurde mit Ultraschall behandelt, die sedimentierbaren Anteile abzentrifugiert und sowohl der Überstand (Ü) als auch das Sediment (ML) in der Trägerfreien Elektrophorese aufgetrennt (Abb. 24).

In Ü zeigen die Enzymprofile übereinstimmend eine Verschiebung nach rechts verglichen mit den sedimentierbaren Anteilen in ML. Besonders ausgeprägt ist dieser Befund bei der gelösten NAG, deren Profil zwei Gipfel in Fraktion 52 und 64 aufweist. In ML hat die NAG nur ein einziges Maximum in Fraktion 21/22. Die gelöste SP in Ü zeigt ein Maximum in Fraktion 33, die sedimentierbare SP dagegen zwei Maxima in Fraktion 22 und 31. Für die GLDH ergibt sich nur in Ü ein einheitliches Profil mit einem Hauptgipfel in Fraktion 38 und einem kleineren, jedoch sehr scharf ausgeprägten Gipfel in Fraktion 55. Die Verteilung der sedimentierbaren GLDH in ML ist ohne deutliches Maximum und reicht von Fraktion 5 bis 48.

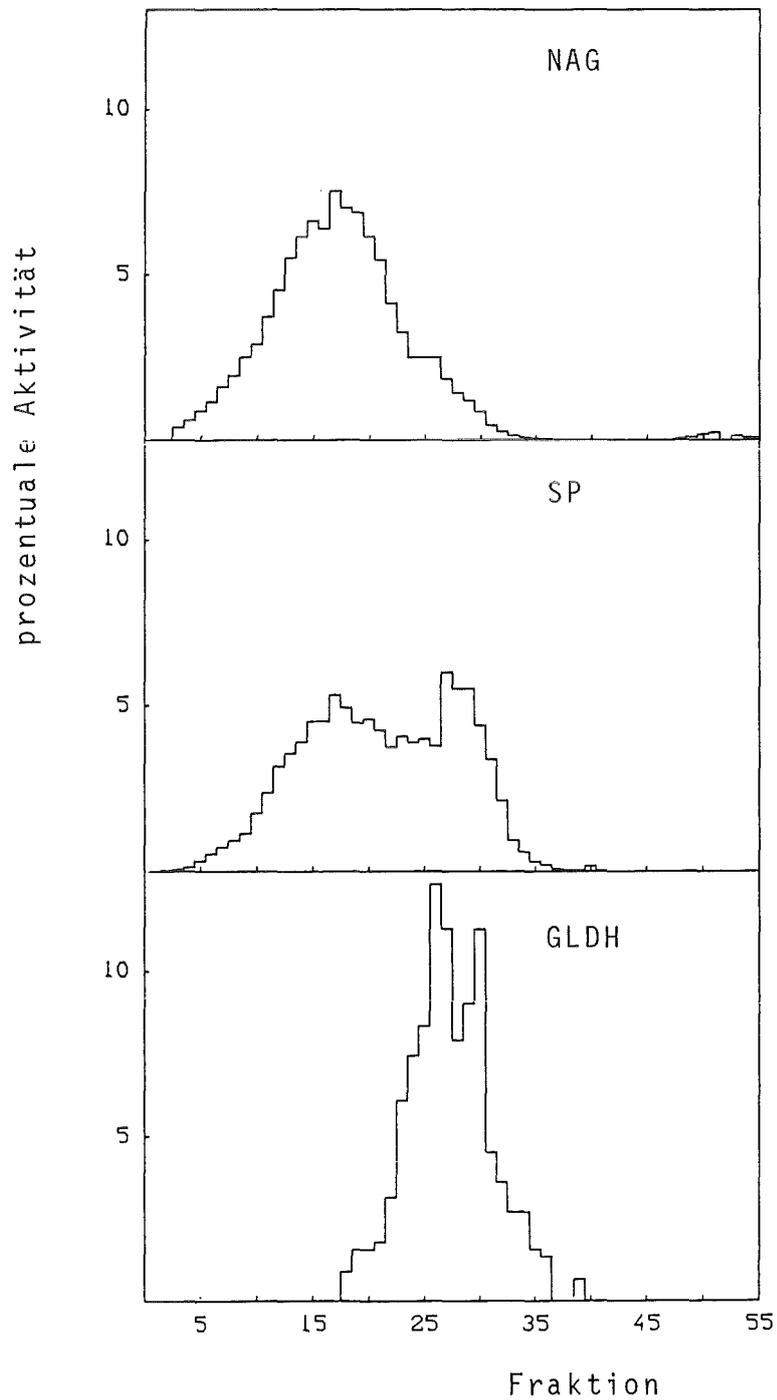


Abb. 23: Verteilung der NAG, SP und GLDH aus der frisch isolierten "ML"-Fraktion von Kontroll-Alveolarmakrophagen nach Trägerfreier Elektrophorese (Anode auf der linken Seite).  
Repräsentativ für 3 Versuche  
Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

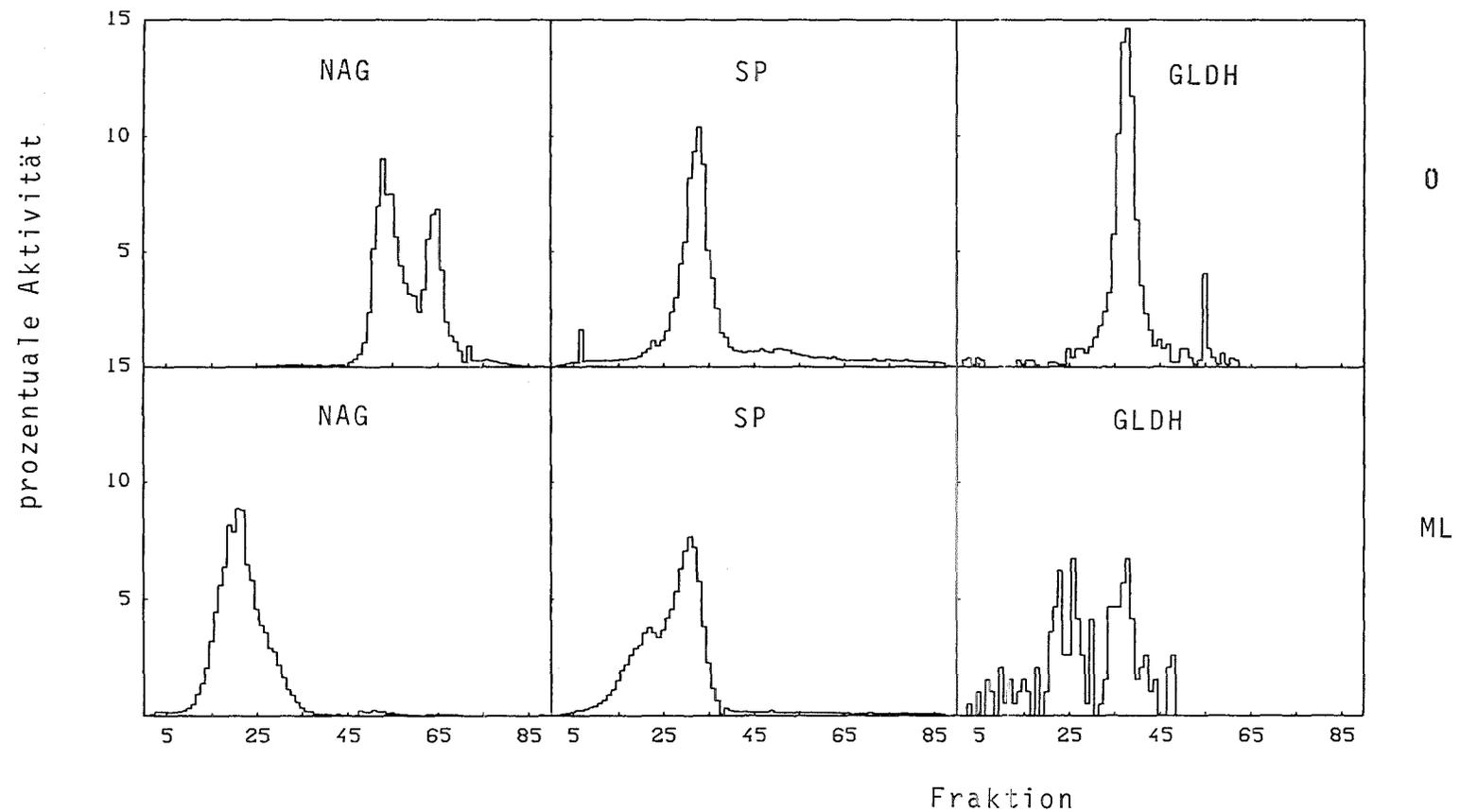


Abb. 24: Verteilung der NAG, SP und GLDH aus der mit Ultraschall behandelten "ML"-Fraktion von Kontroll-Alveolarmakrophagen nach Trägerfreier Elektrophorese (Anode auf der linken Seite).

Ü : gelöste Enzyme im 16,000g-Überstand

ML: sedimentierbare Enzyme im 16,000g-Sediment

Einzelversuch

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

### 3.3.2. Morphologische Untersuchungen an isolierten Organellen

Durch differentielle Zentrifugation wurden aus Kontrollzellen die Fraktionen "N" und "ML" isoliert, die wie unter 2.3.3.3. beschrieben für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert wurden.

Die frisch isolierte "ML"-Fraktion aus Kontrollzellen ist in Abb. 25 zu sehen. Innerhalb der zahlreichen Membranvesikel können Mitochondrien und Lysosomen angesprochen werden. Hochreine Lysosomen, die durch Auftrennung der "ML"-Fraktion in der Trägerfreien Elektrophorese isoliert wurden (s. 2.5.2.2.), sind in Abb. 26 abgebildet. Auch hier handelt es sich um eine heterogene Population. Einige Vesikel zeigen membranumschlossene Vakuolen, andere wiederum zeigen Bereiche geringer Elektronendichte, die nicht von Membranen begrenzt sind. Möglicherweise handelt es sich um sekundäre Lysosomen. Am Bildrand ist ein großes primäres Lysosom zu erkennen, das anhand der gleichmäßigen Elektronendichte identifiziert werden kann.

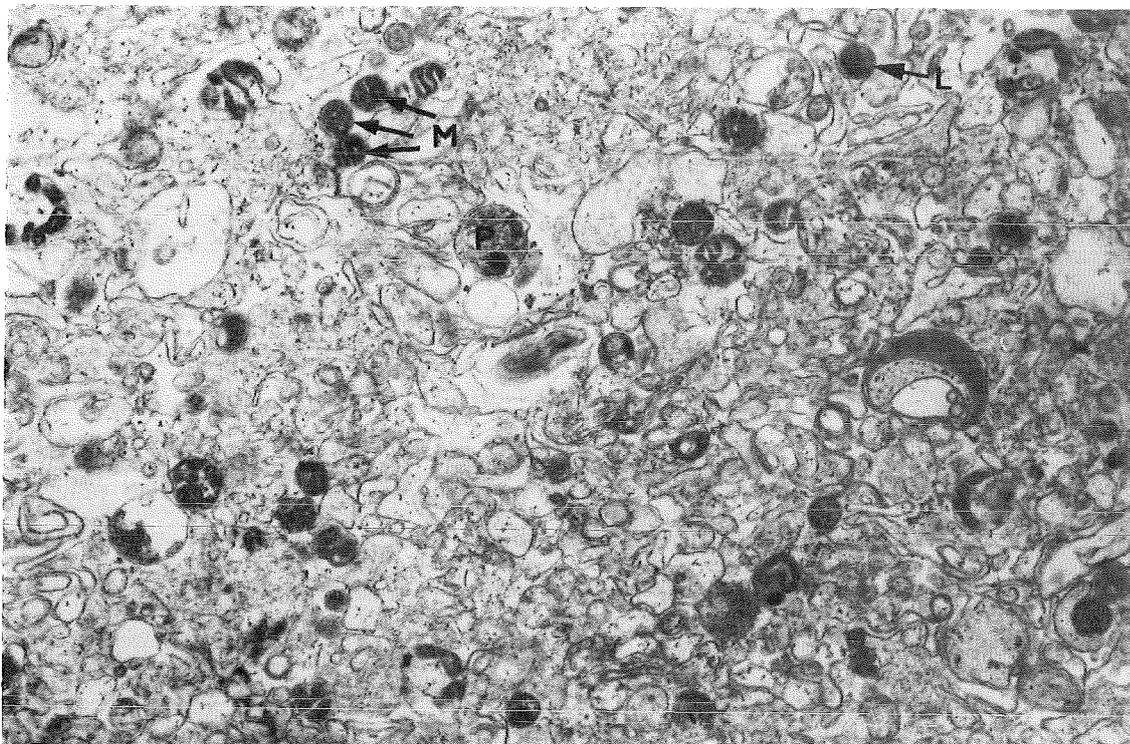


Abb. 25: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der frisch isolierten "ML"-Fraktion aus Kontroll-Alveolarmakrophagen.

Vergrößerung: x 15,000

M: Mitochondrien, L: primäres Lysosom, P: Phagosom

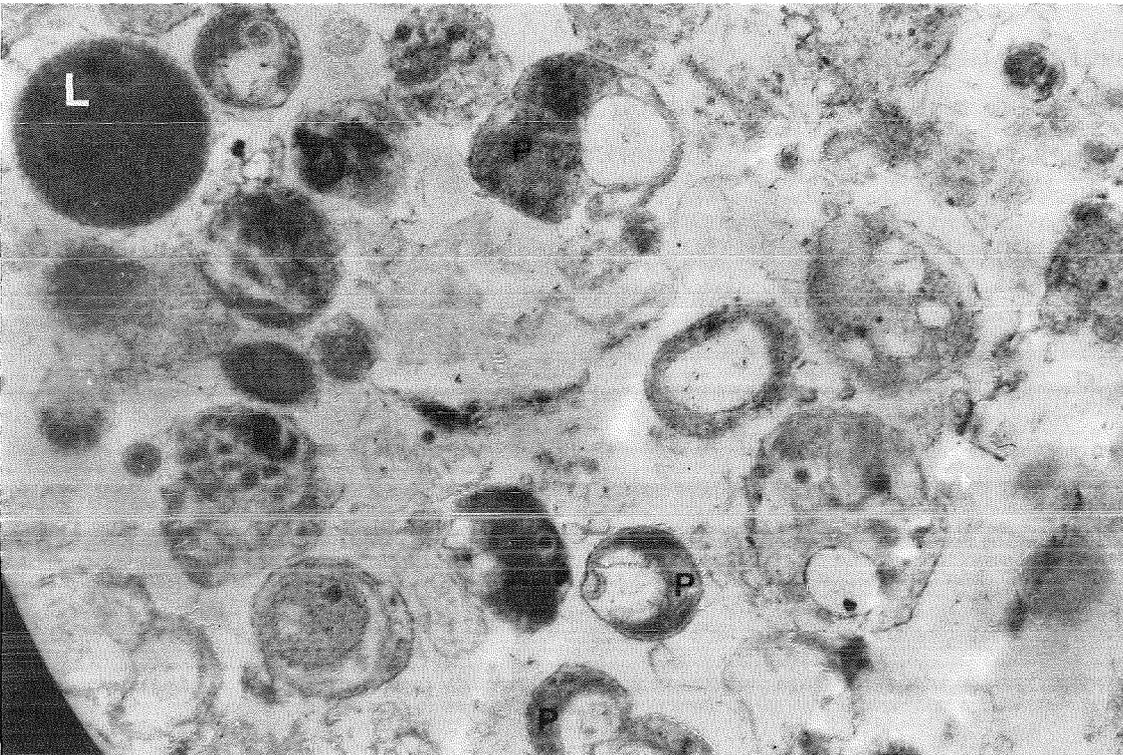


Abb. 26: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme hochreiner Lysosomen nach Trägerfreier Elektrophorese der "ML"-Fraktion von Kontroll-Alveolarmakrophagen.  
Vergrößerung: x 30,000  
L: primäres Lysosom, P: Phagosomen

Auch in der Fraktion "N" aus Kontrollzellen sind einige Vesikel als primäre Lysosomen und Phagosomen zu unterscheiden (Abb. 27). Die stellenweise auftretenden Bereiche mit feiner körniger Struktur stellen die Überreste aus zerstörten Zellkernen dar.

Organellen aus Zellen, die zuvor mit Acridin Orange angefärbt worden waren, wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 28). Die Lysosomen erweisen sich als erstaunlich stabil und behalten über einen längeren Beobachtungszeitraum hinweg die für einen niedrigen pH-Wert typische rote Fluoreszenz.

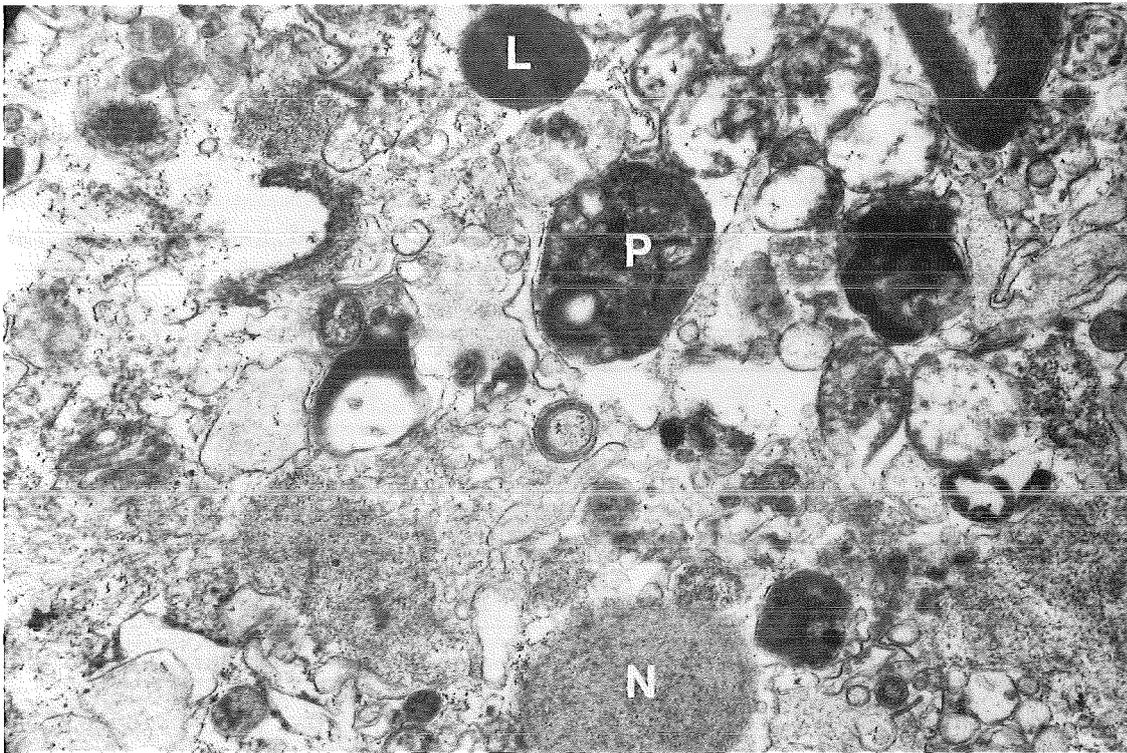


Abb. 27: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der frisch isolierten "N"-Fraktion aus Kontroll-Alveolarmakrophagen. Vergrößerung: x 30,000  
L: primäres Lysosom, P: Phagosom, N: Nucleus-Material

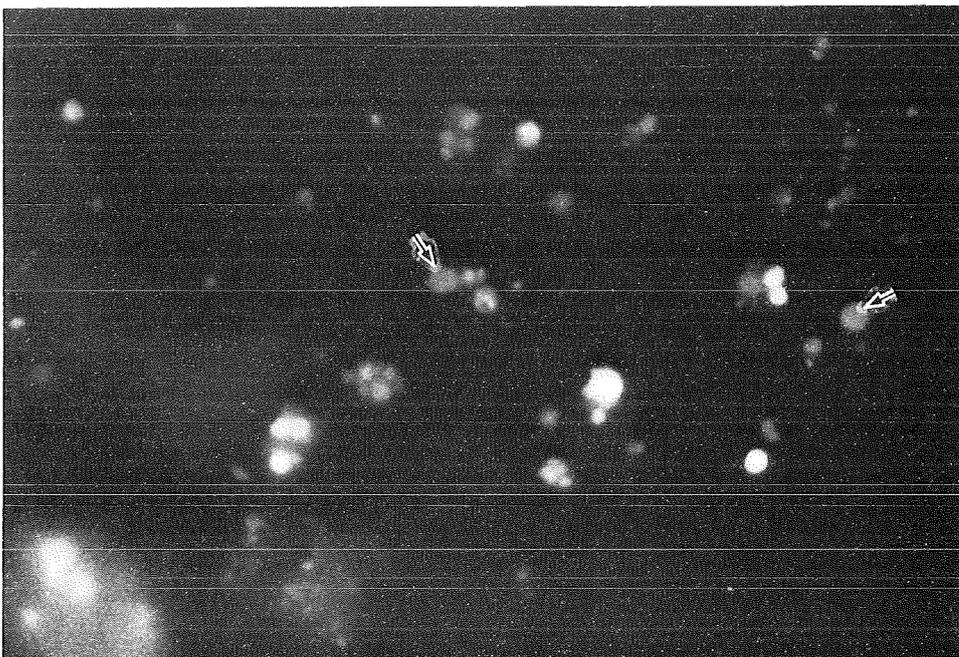


Abb. 28: Isolierte Lysosomen (Pfeile) aus Acridin Orange gefärbten Kontroll-Alveolarmakrophagen. Vergrößerung: x 1600

### 3.3.2.1. isolierte Organellen aus quarzinkubierten Zellen

Aus den quarzinkubierten Zellen wurden die Fraktionen "N" und "ML" isoliert und elektronenmikroskopisch untersucht, um den Verbleib des Quarzes in den Zellen nach der Phagozytose zu klären. Abb. 29 zeigt eine "ML"-Fraktion, die aus Zellen nach 2-stündiger Quarzphagozytose isoliert und nach der Isolierung

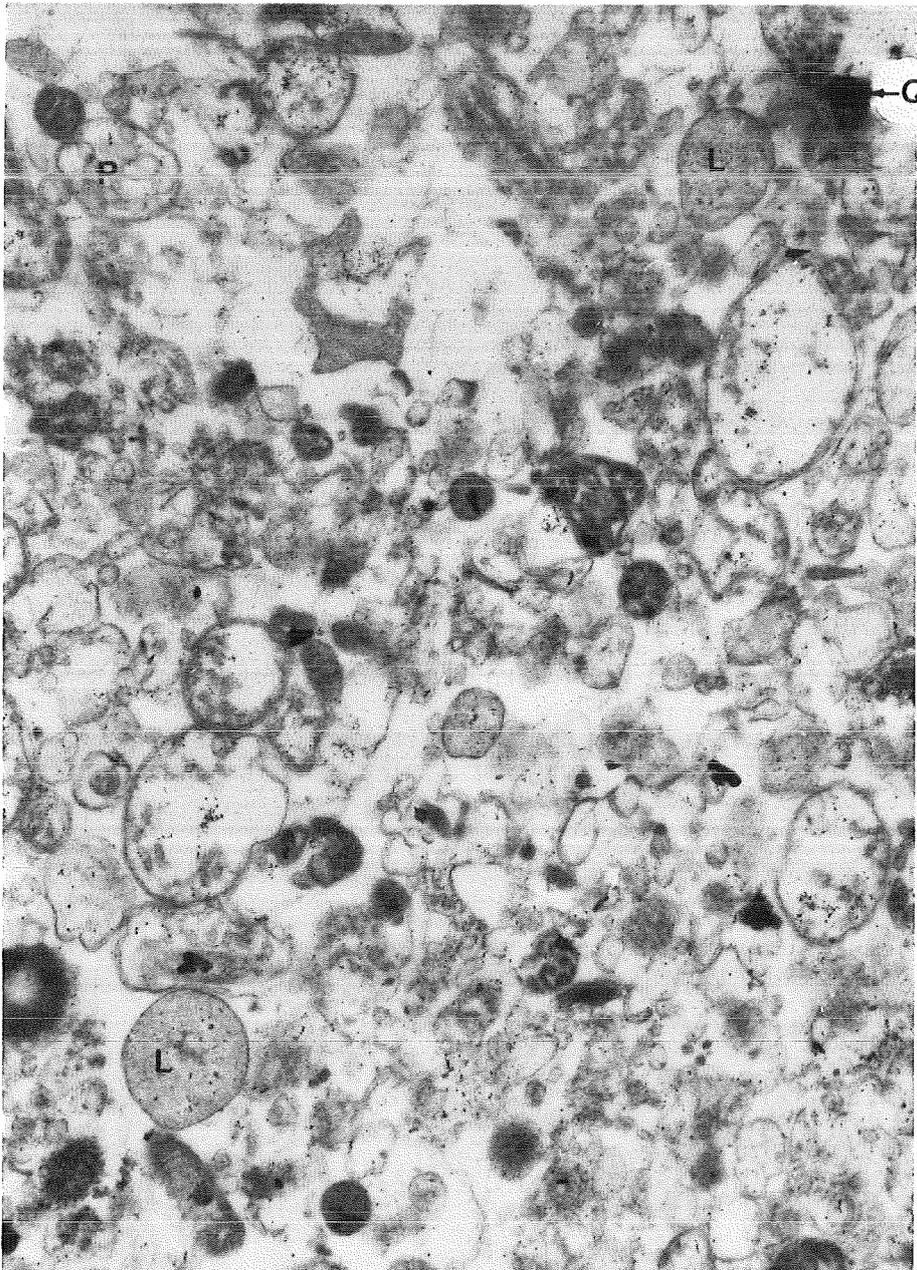


Abb. 29: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der "ML"-Fraktion nach 120 Min. Inkubation bei 37°C; isoliert aus Alveolarmakrophagen nach 2 Stunden Inkubation mit nativem Quarz (Q5, 250 µg/ml).

Vergrößerung: x 15,000

L: primäre Lysosomen, P: Phagosom, Q: Quarzpartikel

für weitere 120 Min. bei 37°C inkubiert worden ist. Sie weist keine erkennbaren Unterschiede zu einem Kontroll-"ML" auf (s. Abb. 25). Primäre Lysosomen sowie Phagosomen und Mitochondrien sind zu erkennen. In der Fraktion "ML" sedimentiert nur ein äußerst geringer Teil des eingesetzten Quarzes. Der Hauptanteil des Quarzes sedimentiert in der Fraktion "N". Hier liegen die Partikel häufig in membranumschlossenen Phagosomen vor (Abb. 30). Bedingt durch die Härte des Quarzes kommt es hier unmittelbar um die Partikel herum oft zu Präparationsartefakten.

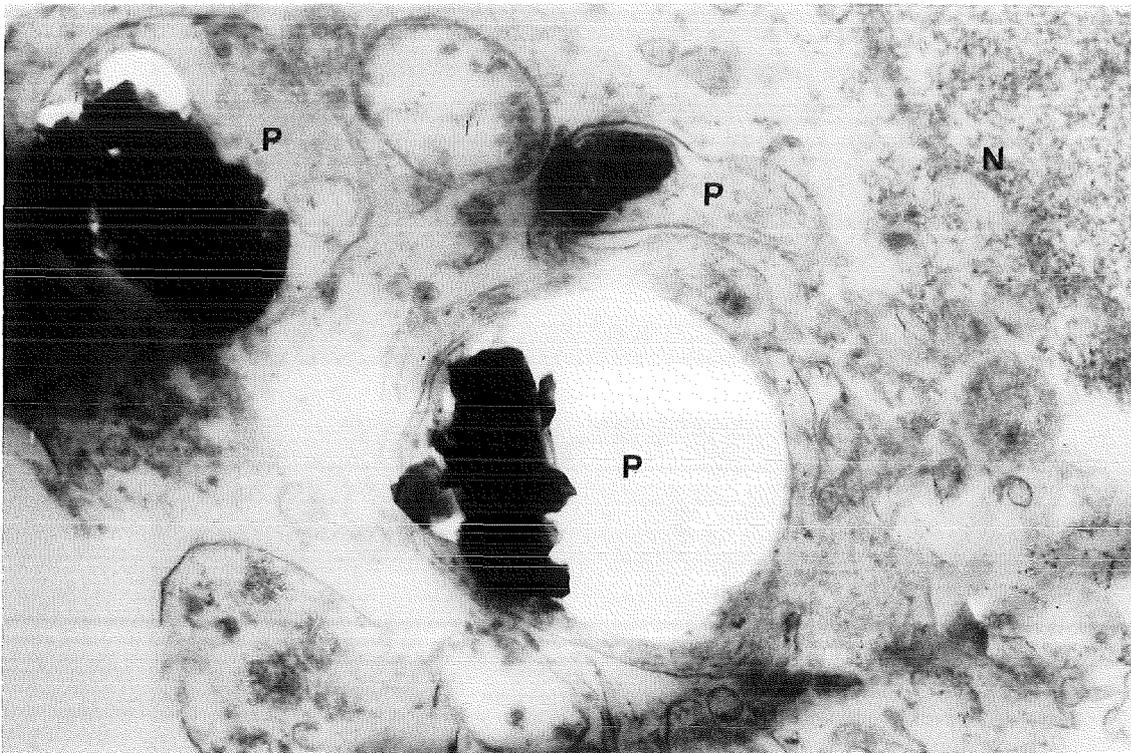


Abb. 30: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der frisch isolierten "N"-Fraktion von Alveolarmakrophagen nach 16 Stunden Inkubation mit nativem Quarz (Q5, 250 µg/ml).  
Vergrößerung: x 16,500  
P: quarzhaltige Phagosomen, N: Nucleus-Material

Aus Kontroll- und quarzinkubierten Zellen wurden die "ML"- und "N"-Fraktionen isoliert und für das Rasterelektronenmikroskop präpariert.

Die "ML"-Fraktionen sind in Abb. 31 dargestellt. In Abb. 31a ist das Kontroll-"ML", in Abb. 31b das "ML" aus den quarzinkubierten Zellen zu sehen. In beiden Fällen erkennt man neben schlauchförmigen Strukturen auch Vesikel von maximal 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Auffallend ist das Größenverhältnis von Quarzpartikeln zu Vesikeln.

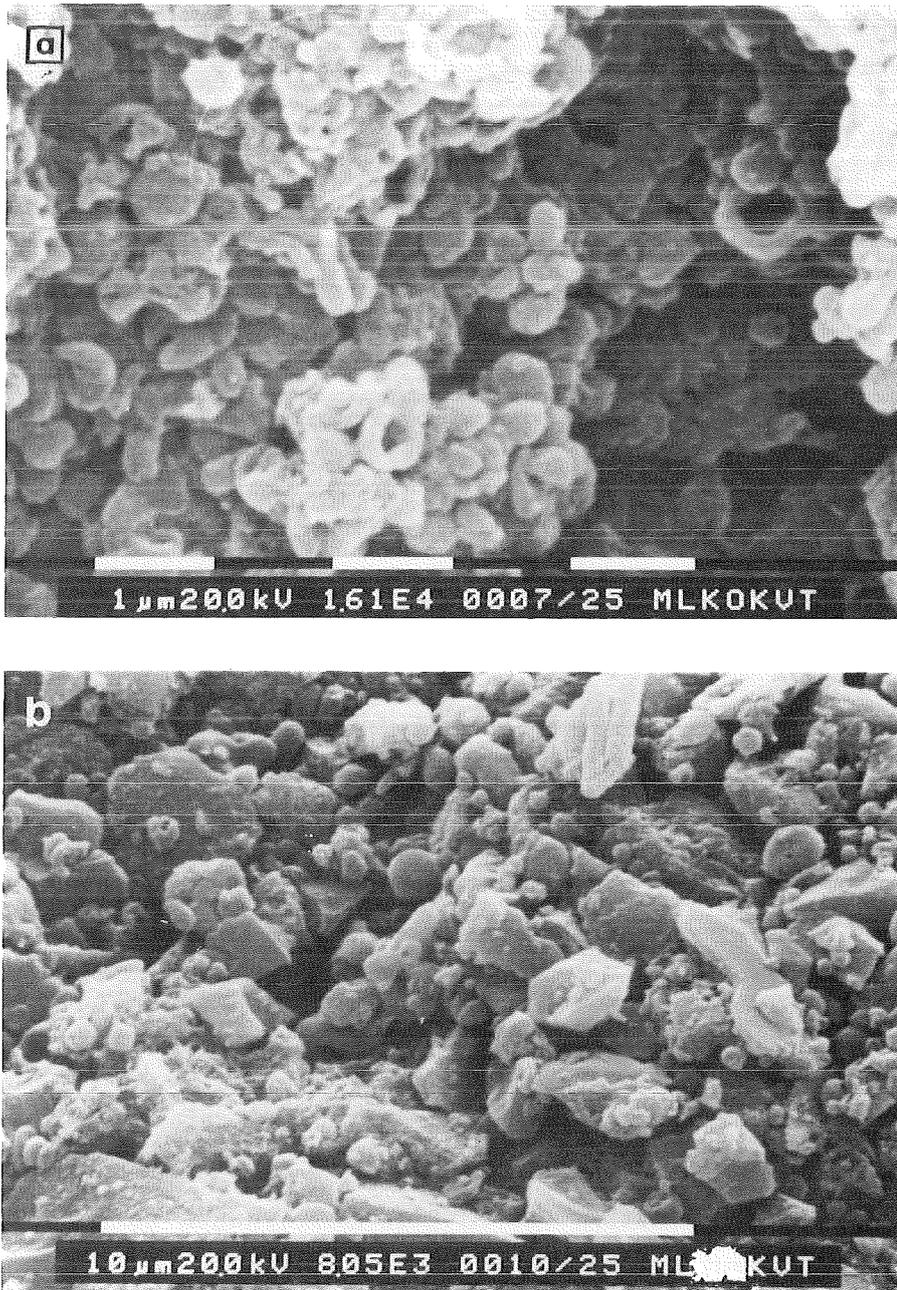


Abb. 31: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der frisch isolierten "ML"-Fraktion; isoliert aus Alveolarmakrophagen nach 16 Stunden Inkubation mit nativem Quarz.

(a) aus Kontrollzellen

(b) aus quarzinkubierten Zellen (Q5, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

In Abb. 32a ist die "N"-Fraktion von Kontrollzellen abgebildet. In "N" sind relativ große schollenförmige Gebilde zu erkennen, bei denen es sich eventuell um Zellkerne oder um Zelltrümmer handelt. Abb. 32b zeigt die "N"-Fraktion aus quarzinkubierten Zellen. Die in dieser Fraktion sedimentierenden Quarzpartikel (Pfeile) sind von zellulärem Material überzogen. Ob es sich hierbei um die im Transmissionselektronenmikroskop beobachteten Membranen oder um aggregiertes zytoplasmatisches Material handelt, kann aufgrund dieser Aufnahme nicht abschließend beurteilt werden.

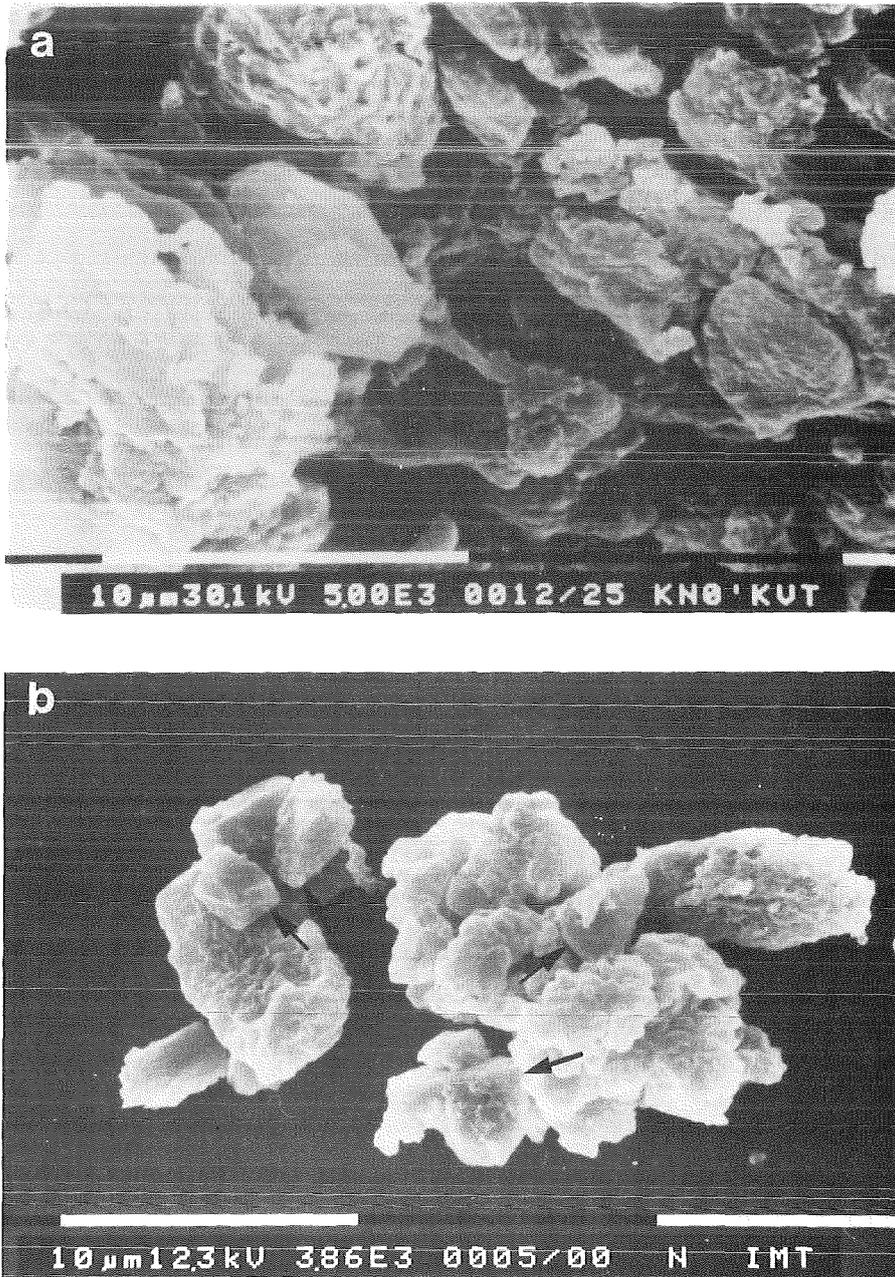


Abb. 32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der frisch isolierten "N"-Fraktion; isoliert aus Alveolarmakrophagen nach 16 Stunden Inkubation mit nativem Quarz.  
(a) aus Kontrollzellen  
(b) aus quarzinkubierten Zellen (Q5, 250 µg/ml)

### 3.3.3. Quarzeinfluß auf Freisetzung und subzelluläre Verteilung von Enzymen und Protein

Kultivierte Alveolarmakrophagen wurden für 2 und 16 Stunden mit nativem und für 16 und 47 Stunden mit DPL-behandeltem Quarz (Q5) inkubiert (s. 2.2.3. bzw. 2.2.4.). Die Quarzdosis betrug 250 µg/ml. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände entnommen und wie unter 2.3.2. beschrieben behandelt. Die Zellen (Z) wurden in KP abgeschabt und homogenisiert (s. 2.5.1.). Die subzellulären Fraktionen "N" und "ML" wurden sowohl elektronenmikroskopisch als auch biochemisch anhand der Markerenzyme für Lysosomen und des Proteingehaltes charakterisiert. Auch in den Zellen, die aus den Überständen abzentrifugiert wurden (ZÜ), sowie in den zellfreien Überständen (ÜÜ) wurden Markerenzyme für Lysosomen und der Proteingehalt gemessen. Die Gesamtausbeute der Kontroll-Kulturen (ÜÜ+ZÜ+Z) wurde jeweils zu 100% gesetzt. Anhand dieser Werte wurde die Ausbeute und Freisetzung sowie die subzelluläre Verteilung der Enzyme und des Proteins unter Quarzeinfluß bestimmt.

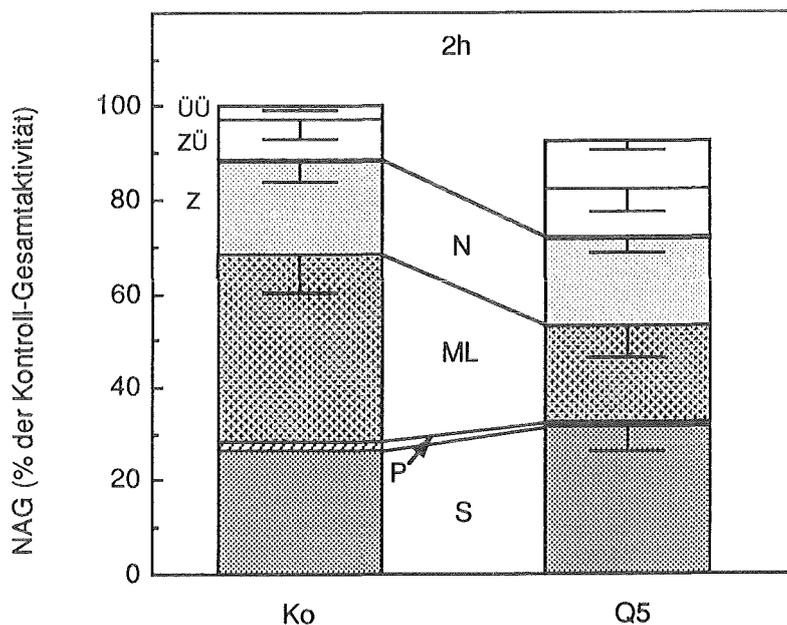


Abb. 33: Einfluß von 2 Stunden Inkubation der Alveolarmakrophagen mit Quarz (Q5, 250 µg/ml) auf die Freisetzung der NAG in den Kulturüberstand (ÜÜ+ZÜ) und ihre Verteilung in den fraktionierten Zellen (Z). (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z))

ÜÜ = zellfreier Kulturüberstand

ZÜ = Zellen im Kulturüberstand

Z = adhaerente Zellen

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler von 3 Versuchen

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

### 3.3.3.1. Einfluß von nativem Quarz

Abb. 33 und 34 zeigen die Verteilung der NAG nach 2- bzw. 16- stündiger Inkubation mit nativem Q5. In diesem Zeitraum bleibt die Gesamtausbeute in Kontrolle und Q5-inkubierten Zellen nahezu unverändert. Der prozentuale Anteil in Überstand und adhaerenten Zellen zeigt nach 2 Stunden Inkubation mit Q5 nur geringe Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 33). Dagegen sind nach 16 Stunden in den quarzbehandelten Zellen bereits 53% der NAG in den Überstand freigesetzt (Kontrolle: 24%), davon 40% in den zellfreien Überstand (Kontrolle: 4%,  $2p < 0.001$ , Abb. 34).

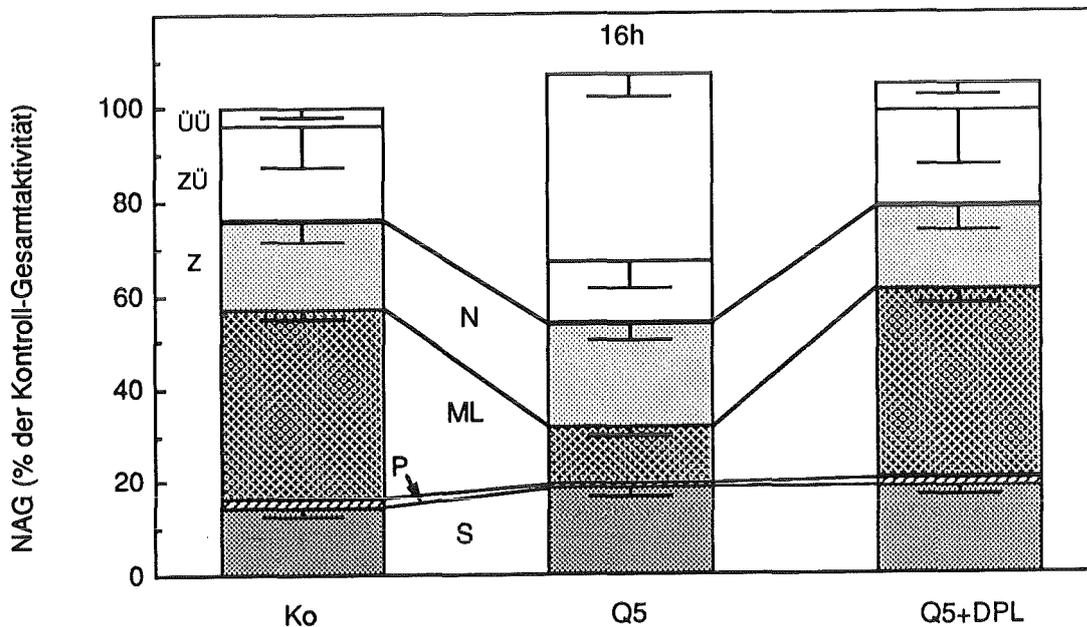


Abb. 34: Einfluß von 16 Stunden Inkubation der Alveolarmakrophagen mit nativem (Q5) und DPL-behandeltem Quarz (Q5+DPL, je 250 µg/ml) auf die Freisetzung der NAG in den Kulturüberstand (ÜÜ+ZÜ) und ihre Verteilung in den fraktionierten Zellen (Z).

(in % der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z))

ÜÜ = zellfreier Kulturüberstand

ZÜ = Zellen im Kulturüberstand

Z = adhaerente Zellen

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler von 3 Versuchen

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

In den subzellulären Fraktionen zeigt die NAG folgende Verteilung: Gemessen an der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z) sind in "N" und "S" der quarz-behandelten Zellen weder nach 2 Stunden noch nach 16 Stunden Inkubation Unterschiede zur Kontrolle zu erkennen. Der Anteil der NAG in "ML" nimmt im Vergleich zur Kontrolle mit zunehmender Inkubationszeit stark ab, von 20% nach 2 Stunden (Kontrolle: 41%,  $2p < 0.05$ ) auf 12% nach 16 Stunden (Kontrolle: 41%,  $2p < 0.01$ ).

Die Verteilung der SP wurde nach 2 Stunden Inkubation mit nativem Q5 bestimmt (Abb. 35). Unterschiede zur Kontrolle sind bei "N" und "ML" zu erkennen. Gemessen an der Kontroll-Gesamtaktivität steigt der SP-Anteil in "N" auf 20% an (Kontrolle: 8%), gleichzeitig verringert er sich in "ML" auf 29% (Kontrolle: 50%).

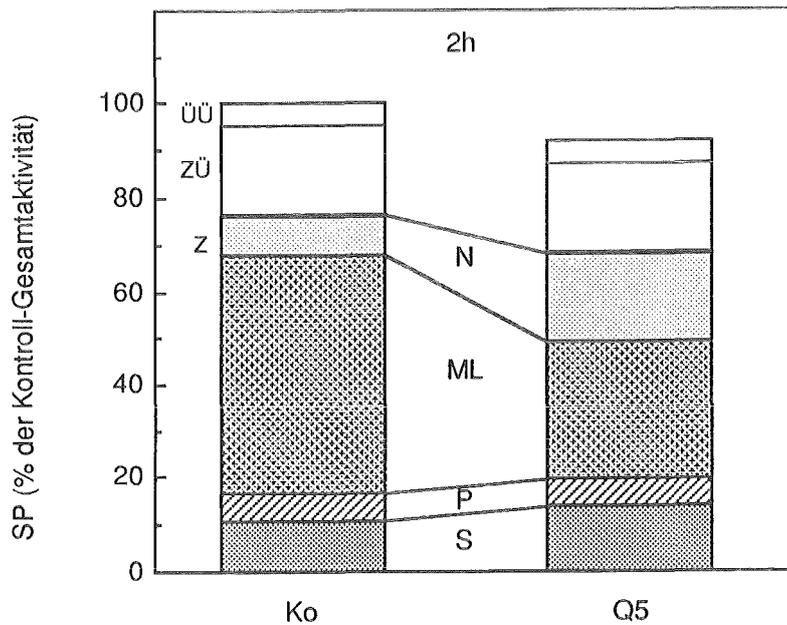


Abb. 35: Einfluß von 2 Stunden Inkubation der Alveolarmakrophagen mit nativem Quarz (Q5, 250 µg/ml) auf die Freisetzung der SP in den Kulturüberstand (ÜÜ+ZÜ) und ihre Verteilung in den fraktionierten Zellen (Z). (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z))

ÜÜ = zellfreier Kulturüberstand

ZÜ = Zellen im Kulturüberstand

Z = adhaerente Zellen

Einzelversuch

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Nach 16 Stunden Inkubation wurde neben der NAG auch Cathepsin B gemessen (Abb. 36). Durch die Inkubation mit nativem Quarz kommt es zu einem Verlust an Gesamt-Enzymaktivität von 52%. Die meßbare Aktivität verteilt sich zu 29% auf die adhaerenten Zellen (Z) und zu 19% auf den Gesamtüberstand (ÜÜ+ZÜ). Die Verteilung zwischen zellfreiem Überstand und sedimentierbaren Zellen aus dem Überstand verhält sich ähnlich wie bei der NAG: der Hauptanteil der Aktivität befindet sich im zellfreien Überstand (ÜÜ). Ebenfalls vergleichbar mit der NAG ist der Befund der subzellulären Verteilung. "N" und "S" der quarzinkubierten Zellen bleiben, berechnet in Prozent der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z), unverändert. "ML" nimmt durch die Inkubation mit Quarz auf 11% ab (Kontrolle: 52%,  $2p < 0.001$ ).

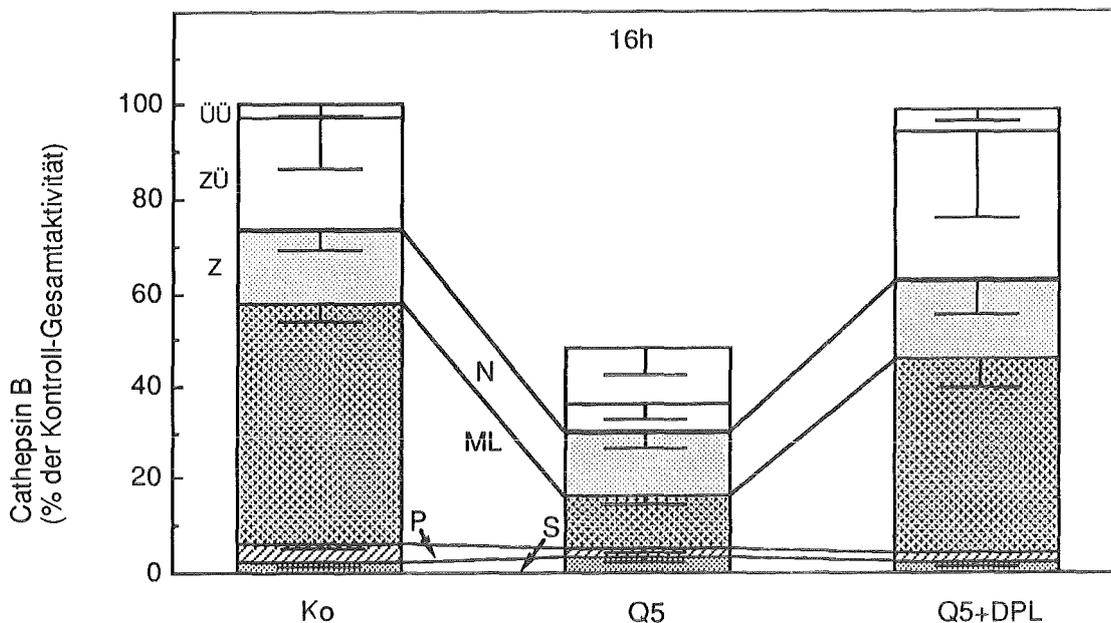


Abb. 36: Einfluß von 16 Stunden Inkubation der Alveolarmakrophagen mit nativem (Q5) und DPL-behandeltem Quarz (Q5+DPL, je 250 µg/ml) auf die Freisetzung von Cathepsin B in den Kulturüberstand (ÜÜ+ZÜ) und die Enzymverteilung in den fraktionierten Zellen (Z). (in % der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z))

ÜÜ = zellfreier Kulturüberstand

ZÜ = Zellen im Kulturüberstand

Z = adhaerente Zellen

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler von 3 Versuchen

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Die Verteilung des Gesamtproteins wurde ebenfalls nach 2 und 16 Stunden gemessen (Abb. 37 und 38). Nach 2 Stunden zeigen sich Unterschiede im zellfreien Überstand (ÜÜ), in "N", "ML" und "S" (Abb. 37).

Gemessen an der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z) steigt der Proteinanteil im zellfreien Überstand (ÜÜ) auf 14% (Kontrolle: 3%, ( $2p < 0.01$ )) und in "N" auf 25% an (Kontrolle: 9%). Dagegen nimmt der Proteingehalt in "ML" bis auf 11% (Kontrolle: 17%, ( $2p < 0.05$ )) und in "S" bis auf 37% ab (Kontrolle: 56%).

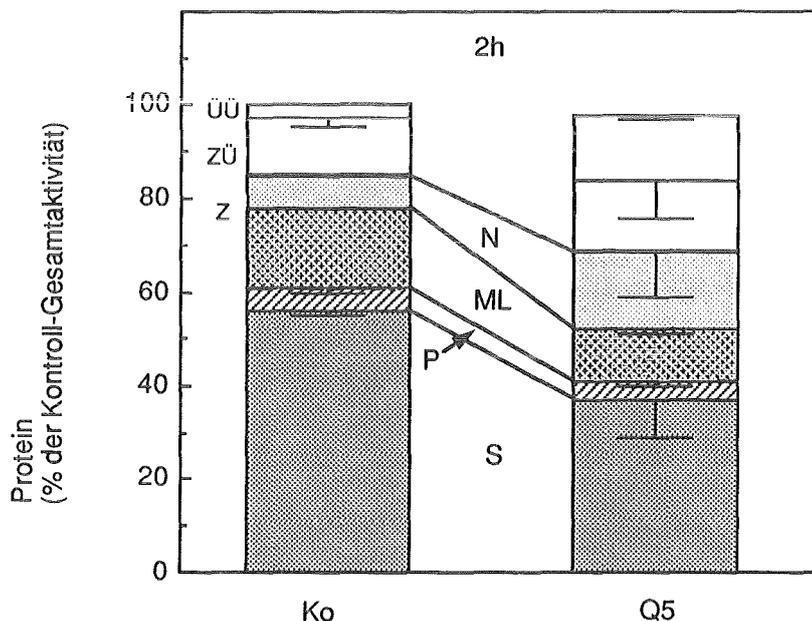


Abb. 37: Einfluß von 2 Stunden Inkubation der Alveolarmakrophagen mit Quarz (Q5, 250 µg/ml) auf die Freisetzung von Protein in den Kulturüberstand (ÜÜ+ZÜ) und die Proteinverteilung in den fraktionierten Zellen (Z).

(in % der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z))

ÜÜ = zellfreier Kulturüberstand

ZÜ = Zellen im Kulturüberstand

Z = adhaerente Zellen

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler von 3 Versuchen

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Nach 16 Stunden Inkubation mit nativem Q5 (Abb. 38) ist der Proteinanteil im gesamten Überstand auf 46% angestiegen, wobei der größte Anstieg im zellfreien Überstand (ÜÜ) zu beobachten ist (Q5: 37%, Kontrolle: 3%,  $2p < 0.001$ ). Der Proteinanteil in "ML" und "S" der quarzbehandelten Zellen ist gemessen an der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z) mit zunehmender Inkubationszeit deutlich reduziert: in "ML" auf 5% (Kontrolle: 13%,  $2p < 0.05$ ) und in "S" auf 17% (Kontrolle: 47%,  $2p < 0.005$ ).

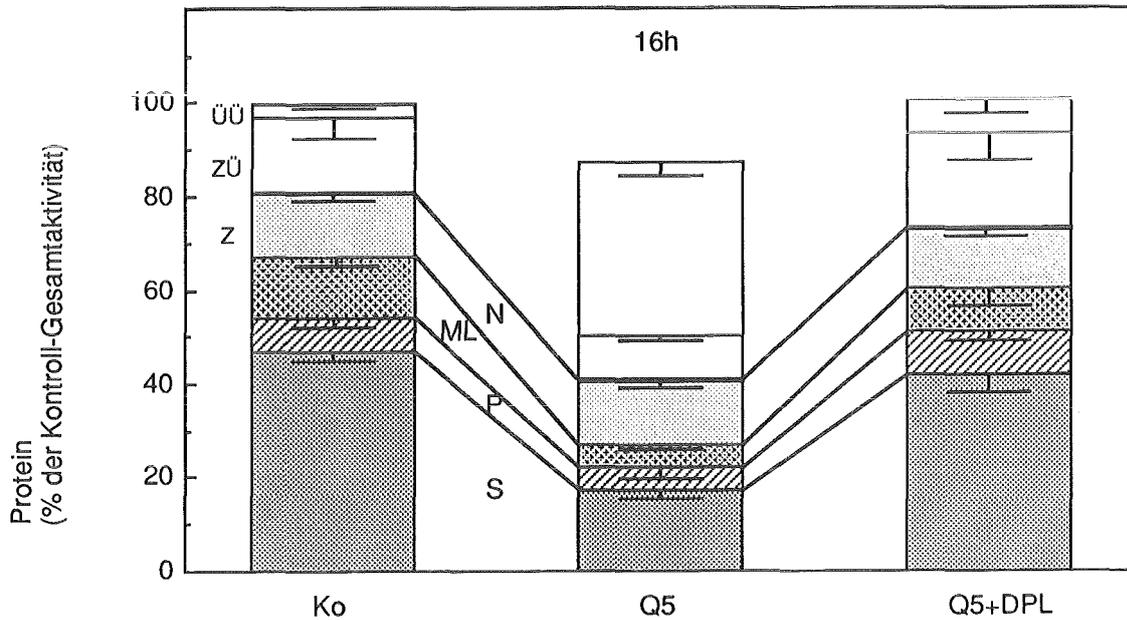


Abb. 38: Einfluß von 16 Stunden Inkubation der Alveolarmakrophagen mit nativem (Q5) und DPL-behandeltem Quarz (Q5+DPL, je 250 µg/ml) auf die Freisetzung von Protein in den Kulturüberstand (ÜÜ+ZÜ) und die Proteinverteilung in den fraktionierten Zellen (Z).

(in % der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z))

ÜÜ = zellfreier Kulturüberstand

ZÜ = Zellen im Kulturüberstand

Z = adhaerente Zellen

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler von 3 Versuchen

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

Wird die subzelluläre Verteilung der Enzyme und des Proteins nach 16 Stunden Inkubation mit nativem Q5 nicht anhand der Kontroll-Gesamtaktivität ( $\text{ÜÜ}+\text{ZÜ}+\text{Z}$ ) berechnet sondern nur anhand der Aktivitäten bzw. des Gehaltes in den adhaerenten Zellen (Z) der jeweiligen Kultur, so ergibt sich für die Fraktionen "N" und "S" ein anderes Bild.

Der Anteil der lysosomalen Enzymaktivität, der in "N" und "S" sedimentiert, ist nahezu verdoppelt. Die NAG-Aktivität steigt in "N" auf 41% (Kontrolle: 25%) und in "S" auf 35% (Kontrolle: 19%). Ähnlich verhält es sich mit der Cathepsin B-Aktivität, die in "N" auf 46% (Kontrolle: 21%) und in "S" auf 12% (Kontrolle: 3%) steigt.

Dasselbe gilt für den Proteingehalt in "N". Auch hier verdoppelt sich der Gehalt auf 34% (Kontrolle: 17%,  $2p<0.025$ ). In "S" sedimentiert mit 42% dagegen etwas weniger Protein (Kontrolle: 58%)

Die Abnahme der lysosomalen Enzymaktivität in "ML" wird dagegen auch nach dieser Berechnungsmethode deutlich. Nach 16-stündiger Inkubation mit Q5 beträgt die NAG-Aktivität in "ML" nur noch 22% (Kontrolle: 53%,  $2p<0.02$ ) und die Cathepsin B-Aktivität nur noch 39% (Kontrolle: 70%,  $2p<0.05$ ).

Der Proteingehalt in "ML" ist nur wenig verändert, von 16% in der Kontrolle auf 11% in "ML" der quarzinkubierten Zellen.

### 3.3.3.2. Einfluß von Phospholipid-behandeltem Quarz

Der Einfluß von DPL-behandeltem Quarz (Q5+DPL) auf Freisetzung und intrazelluläre Verteilung von NAG, Cathepsin B und Protein wurde nach 16 Stunden und für die NAG auch nach 47 Stunden Inkubation bestimmt.

Abb. 34, 36, 38 und 39 zeigen in der jeweils rechten Säule die Ergebnisse dieser Versuche.

Weder in der Freisetzung in den Überstand noch in der Ausbeute oder der subzellulären Verteilung konnten im untersuchten Zeitraum für die gemessenen Parameter Unterschiede zu den Kontrollen nachgewiesen werden. Interessant ist der Befund, daß durch die Behandlung des Quarzes mit DPL kein Verlust der Cathepsin B-Gesamtaktivität auftritt (Abb. 36).

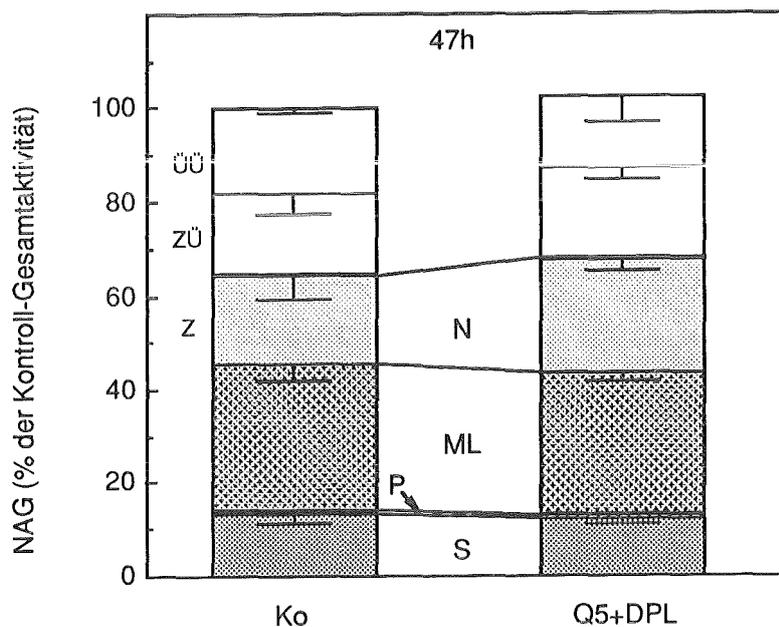


Abb. 39: Einfluß von 47 Stunden Inkubation der Alveolarmakrophagen mit DPL behandeltem Quarz (Q5+DPL, 250 µg/ml, Inkubation in KM 2) auf die Freisetzung der NAG in den Kulturüberstand (ÜÜ+ZÜ) und ihre Verteilung in den fraktionierten Zellen (Z).

(in % der Kontroll-Gesamtaktivität (ÜÜ+ZÜ+Z))

ÜÜ = zellfreier Kulturüberstand

ZÜ = Zellen im Kulturüberstand

Z = adhaerente Zellen

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler von 2 Versuchen

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

### 3.3.4. Stabilität der Lysosomen aus quarzinkubierten Zellen

Aus Zellen, die mit nativem bzw. DPL-behandeltem Quarz (Q5 und Q5+DPL) inkubiert worden waren, wurden die Fraktionen "N" und "ML" isoliert (s. 2.5.1.). In KP oder DPBS resuspendiert wurden sie für die Untersuchung der Lysosomenstabilität nach Quarzphagozytose verwendet (s. 2.5.3.). Als Kontrolle dienten "N" und "ML" aus unbehandelten Zellen. Die Summe von "N" und "ML" aus jedem Ansatz wurde zu 100% gesetzt und für die Berechnung der prozentualen Verteilung zugrunde gelegt.

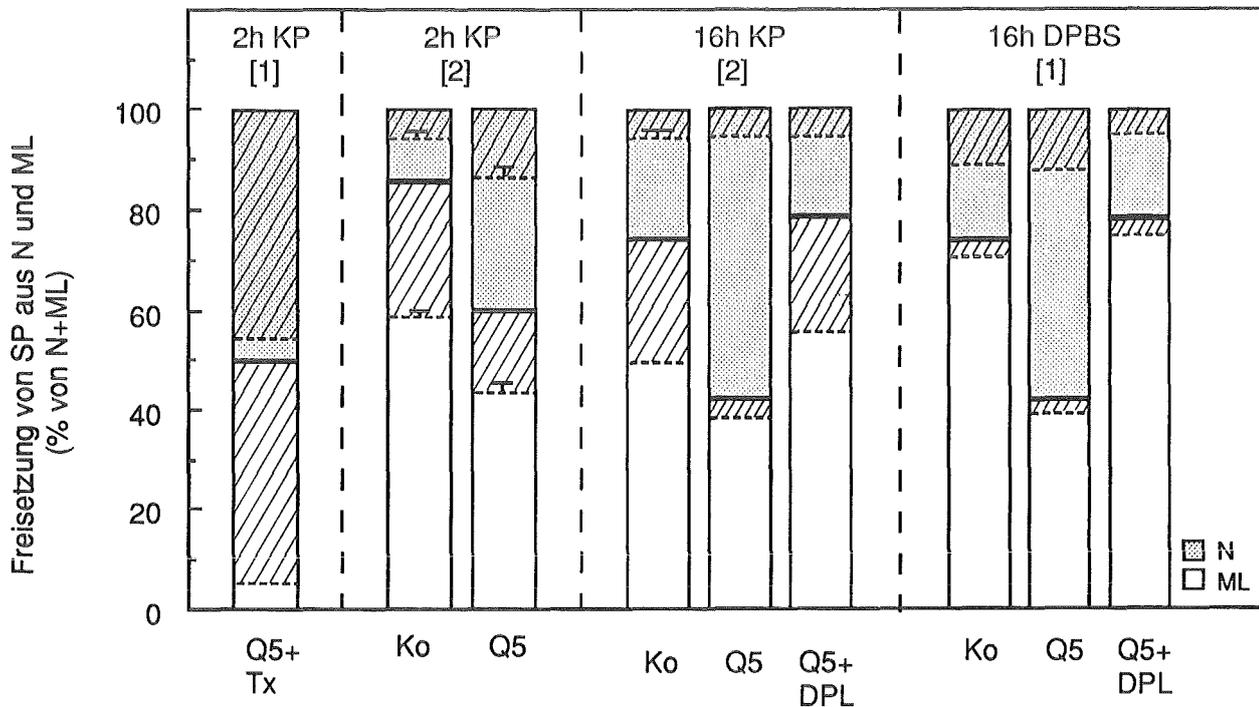


Abb. 40: Einfluß von *in vitro*-Inkubation und von 1% TX-100 auf die Freisetzung von SP aus isolierten "N"- und "ML"-Fraktionen (120 Min. Inkubation in KP und DPBS bei 37°C); (in % der Ausbeute ("N"+"ML") in jedem Ansatz); "N" und "ML" isoliert nach 2 und 16 Stunden Inkubation der Zellen mit Quarz (Q5 und Q5+DPL, je 250 µg/ml) Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler  
Zahl der Versuche in Klammern  
Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

schraffierte Flächen: nach 120 Minuten freigesetzter Enzymanteil

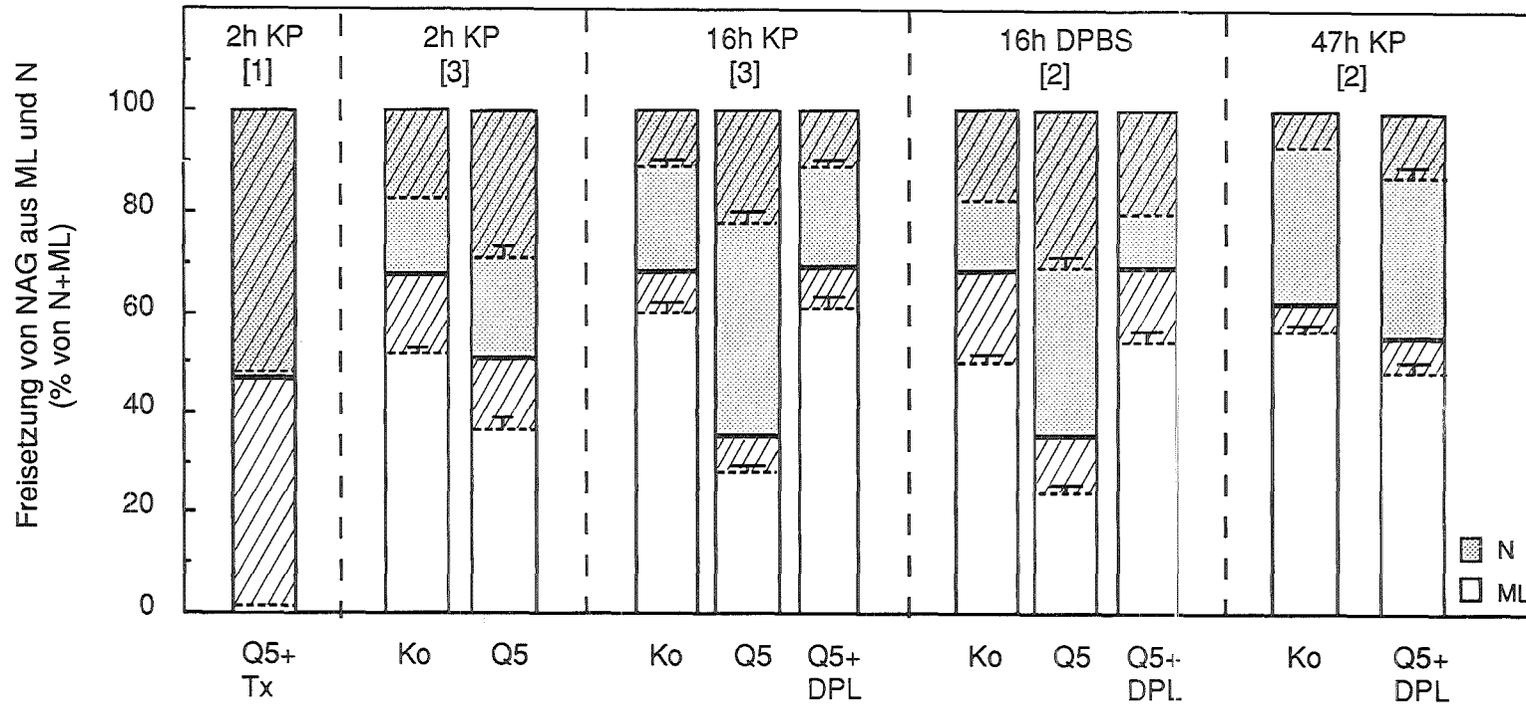


Abb. 41: Einfluß von in vitro-Inkubation und von 1% TX-100 auf die Freisetzung von NAG aus isolierten "N"- und "ML"-Fraktionen (120 Min. Inkubation in KP und DPBS bei 37°C); (in % der Ausbeute ("N"+"ML") in jedem Ansatz); "N" und "ML" isoliert nach 2, 16 und 47 Stunden Inkubation der Zellen mit Quarz (Q5 und Q5+DPL, je 250 µg/ml).  
Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler

Zahl der Versuche in Klammern

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

schraffierte Flächen: nach 120 Minuten freigesetzter Enzymanteil

In Abb. 40 - 42 ist die Freisetzung von drei lysosomalen Markerenzymen nach 120 Min. Inkubation von "N" und "ML" aus quarzinkubierten Zellen dargestellt. Bei den mit nativem Q5 inkubierten Zellen nimmt der Anteil der lysosomalen Enzymaktivität, der in "N" lokalisiert ist, mit zunehmender Inkubationszeit zu, in "ML" entsprechend ab. Die Verteilung der Enzymaktivität in "N" und "ML" aus den Zellen, die mit Q5+DPL inkubiert worden waren, ist dagegen identisch mit der Verteilung aus den Kontrollzellen (s. Abb. 40, 41).

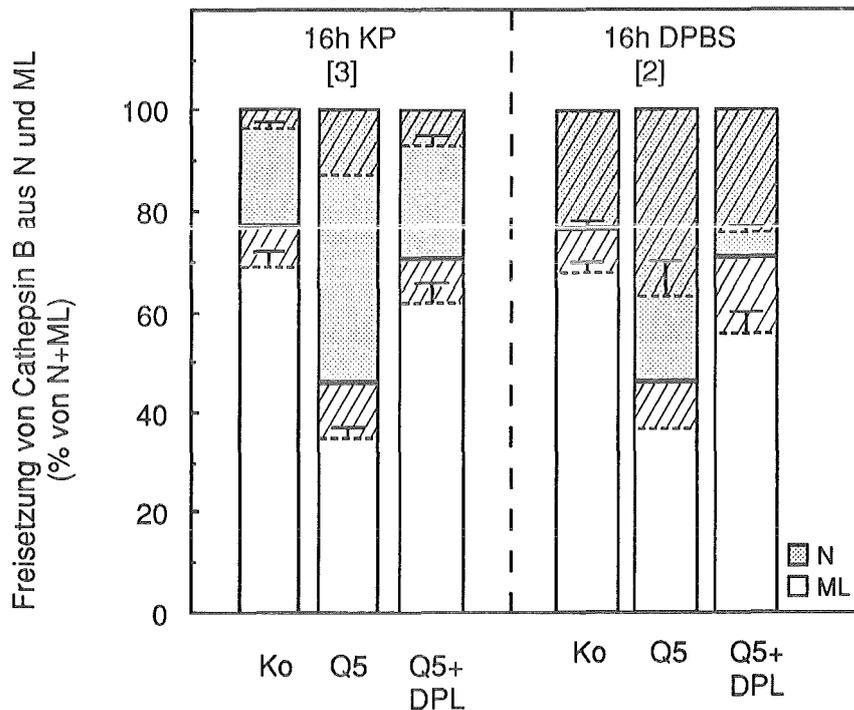


Abb. 42: Einfluß von in vitro-Inkubation auf die Freisetzung von Cathepsin B aus isolierten "N"- und "ML"-Fraktionen (120 Min. Inkubation in KP und DPBS bei 37°C); (in % der Ausbeute ("N"+"ML") in jedem Ansatz) "N" und "ML" isoliert nach 16 Stunden Inkubation der Zellen mit Quarz (Q5 und Q5+DPL, je 250 µg/ml).

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler

Zahl der Versuche in Klammern

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

schraffierte Flächen: nach 120 Minuten freigesetzter Enzymanteil

Unabhängig von der Inkubationsdauer der Zellen mit Quarz gibt keiner der untersuchten Parameter einen Hinweis auf eine hierdurch bedingte höhere Fragilität der isolierten Lysosomen in "N" oder "ML". Die maximal mögliche Enzymfreisetzung aus "N" und "ML" unter dem Einfluß von TX-100 ist in der jeweils ersten Säule in Abb. 40 und 41 dargestellt.

Der Einfluß des Inkubationspuffers auf die Enzymfreisetzung wurde an Fraktionen untersucht, die aus Zellen nach 16-stündiger Quarz-Inkubation isoliert worden waren. Auch hier gibt es keine Unterschiede zwischen den Fraktionen aus Kontroll- und aus quarzinkubierten Zellen. Die Organellen in "N" sind jedoch in DPBS weniger stabil als in KP. Dieser Effekt ist am deutlichsten bei Cathepsin B zu erkennen (Abb. 42).

Auch die Proteinverteilung und -freisetzung aus "N" und "ML" zeigt dieselben Tendenzen wie die lysosomalen Enzyme (Abb. 43). Der Proteingehalt in "N" aus den mit nativem Q5 behandelten Zellen ist höher, in "ML" dagegen niedriger als in der Kontrolle und in den mit DPL-behandeltem Q5 inkubierten Zellen. Hier ist die Verteilung nahezu identisch. Unterschiede in der Proteinfreisetzung zwischen den in KP und DPBS inkubierten Ansätzen treten nicht auf.

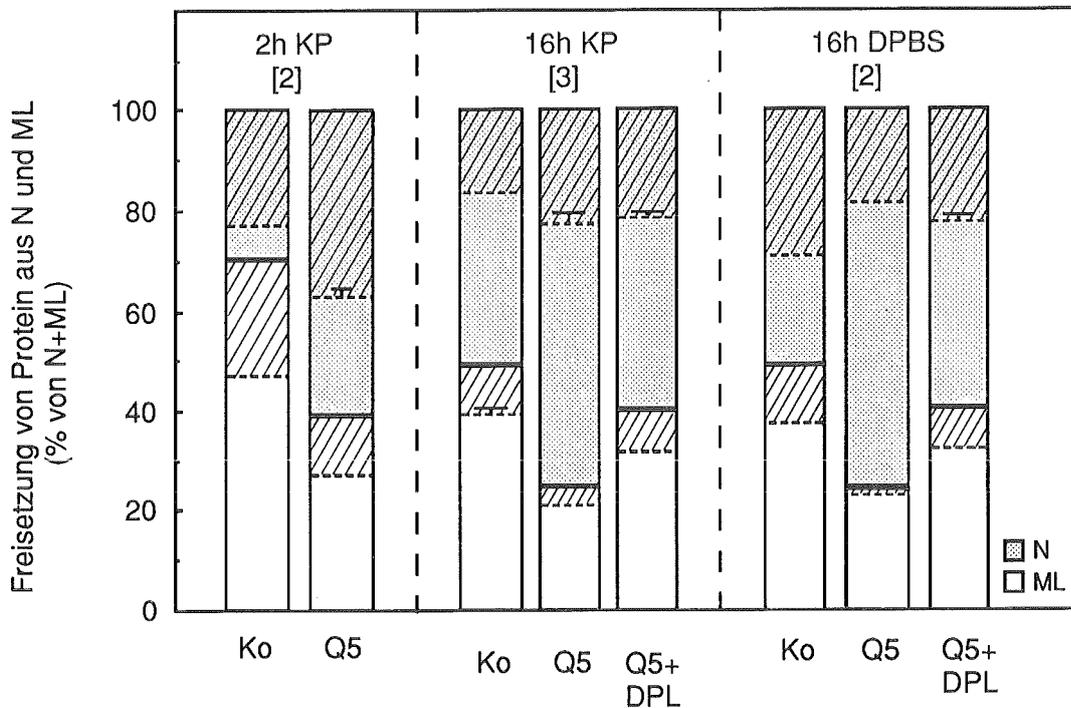


Abb. 43: Einfluß von in vitro-Inkubation auf die Freisetzung von Protein aus isolierten "N"- und "ML"-Fraktionen (120 Min. Inkubation in KP und DPBS bei 37°C); (in % der Ausbeute ("N"+"ML") in jedem Ansatz); "N" und "ML" isoliert nach 2 und 16 Stunden Inkubation der Zellen mit Quarz (Q5 und Q5+DPL, je 250 µg/ml).

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler

Zahl der Versuche in Klammern

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

schraffierte Flächen: nach 120 Minuten freigesetzter Enzymanteil

### 3.3.5. Dichtegradientenzentrifugation der "N"- und "ML"-Fraktion

#### 3.3.5.1. Verteilungsprofile im linearen Saccharosedichtegradienten

Aliquots der frisch isolierten "N"- und "ML"-Fraktionen von unbehandelten Kontrollzellen und von Zellen, die zuvor 2 und 16 Stunden mit nativem Quarz (Q5) inkubiert worden waren, wurden in linearen Saccharosegradienten zentrifugiert (s. 2.5.3.1.).

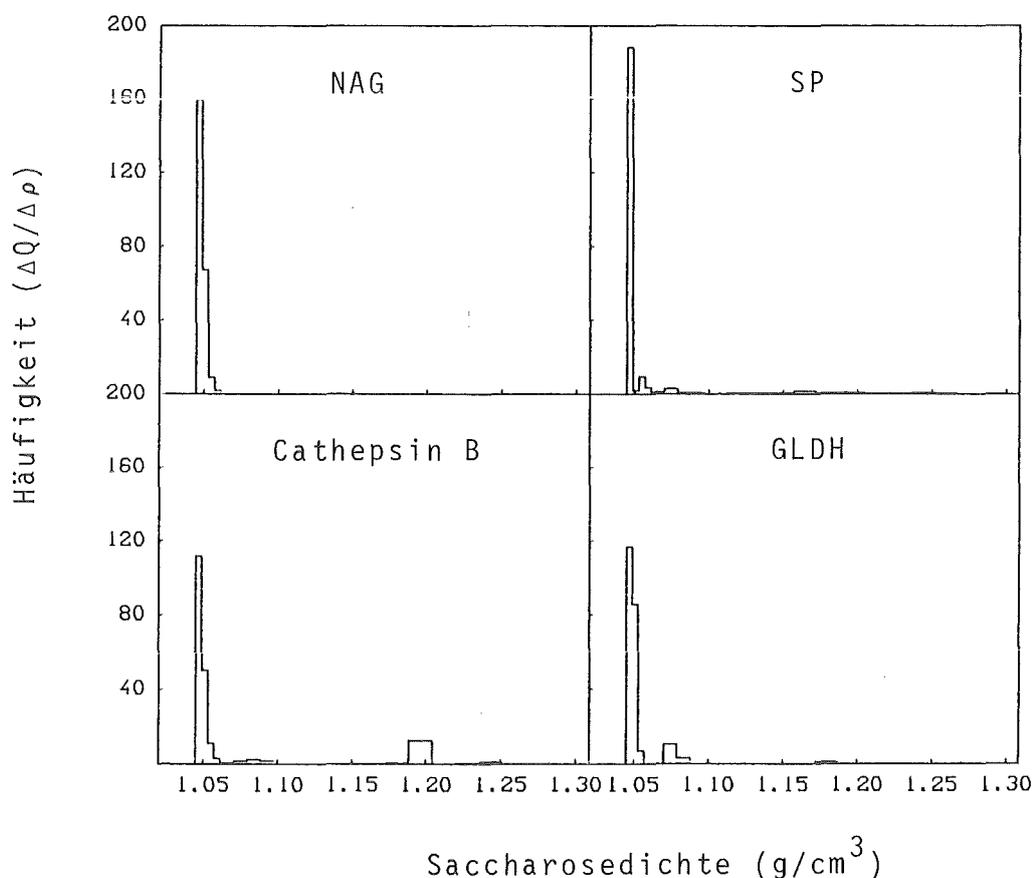


Abb. 44: Verteilung von lysosomalen Enzymen und GLDH aus der mit TX-100 (Endkonzentration 1%) behandelten "ML"-Fraktion von Kontroll-Alveolarmakrophagen nach Zentrifugation im linearen Saccharosedichtegradienten (60,000g/2 Stunden; Vertikalrotor).

$\Delta Q$  = relativer Gehalt der Komponente in der Fraktion

$\Delta \rho$  = Dichteunterschied zwischen den Fraktionen

Repräsentativ für 2 Versuche

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

In Abb. 44 ist der Einfluß von TX-100 auf das Verhalten von lysosomalen und mitochondrialen Markerenzymen aus Kontroll-"ML" dargestellt. Die Zugabe von TX-100 zu "ML" vor der Zentrifugation bewirkt eine vollständige Zerstörung von Lysosomen und Mitochondrien, deren freie Enzyme sich in den Fraktionen mit der geringsten Dichte ( $1.05 \text{ g/cm}^3$ ) anreichern. Während bei NAG, SP und GLDH dieser Effekt nahezu 100%ig ist, zeigt Cathepsin B einen kleinen Gipfel von 20% in der Dichte  $1.20 \text{ g/cm}^3$ .

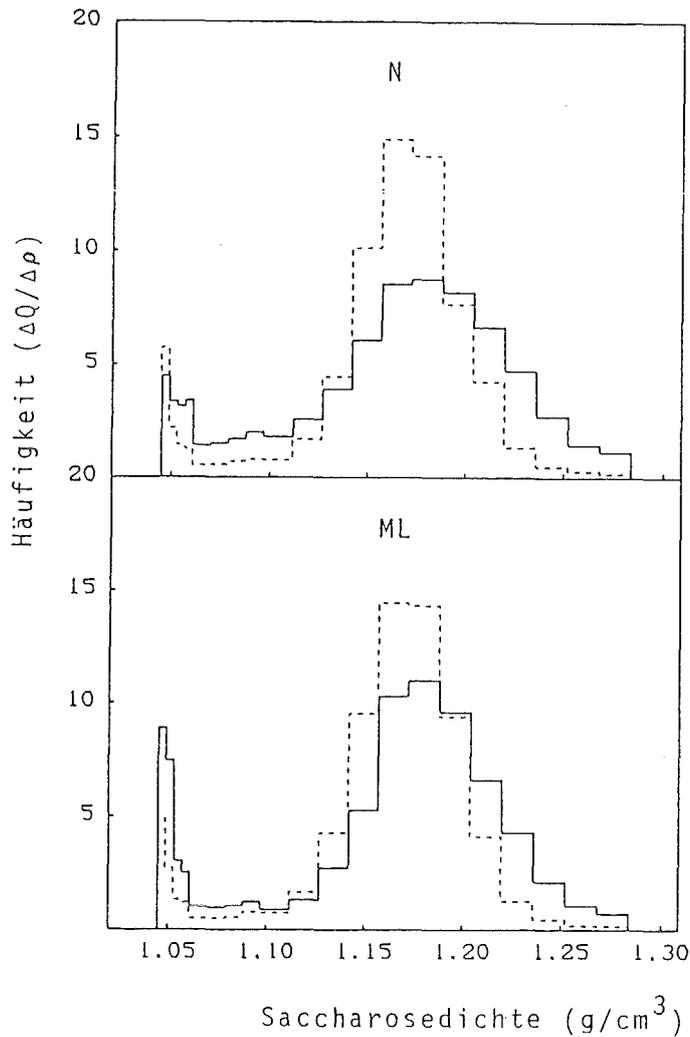


Abb. 45: Verteilung der NAG der frisch isolierten "N"- und "ML"-Fraktionen von Kontroll- und quarzinkubierten Alveolarmakrophagen (Q5,  $250 \mu\text{g/ml}$ , Inkubationszeit 2 Stunden) nach Zentrifugation im linearen Saccharosedichtegradienten ( $60,000\text{g}/2$  Stunden; Vertikalrotor).

nähere Einzelheiten siehe Abb. 44

Einzelversuch

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

----- Kontrolle

————— quarzinkubierte Zellen

Die Enzymprofile der NAG aus der frisch isolierten "N"- und "ML"-Fraktion von Zellen nach 2-stündiger Quarzphagozytose sind in Abb. 45 dargestellt. Anhand der medianen Dichten ("ML" Kontrolle: 1.166, Q5-inkubierte Zellen: 1.170; "N" Kontrolle: 1.165, Q5-inkubierte Zellen: 1.171, Einheit jeweils g/cm<sup>3</sup>) können keine Unterschiede zwischen den Fraktionen aus Kontroll- und Q5-behandelten Zellen festgestellt werden. Sowohl in "N" als auch in "ML" zeigt die Verteilung ein Hauptmaximum im Dichtebereich von 1.15 bis 1.20 g/cm<sup>3</sup> und einen kleinen Gipfel in dem Bereich geringster Dichte (1.05 g/cm<sup>3</sup>).

In den Abb. 46 und 47 sind die Profile von NAG, Cathepsin B, Protein und GLDH aus der "N"- und "ML"-Fraktion von Zellen dargestellt, die für 16 Stunden mit Quarz inkubiert worden waren. Abb. 46 zeigt die Verteilung aus den frisch isolierten Fraktionen, Abb. 47 die Verteilung nachdem die Isolate für 120 Minuten bei 37°C inkubiert worden waren (s. 2.5.3.1.). Auch hier sind keine deutlichen quarzspezifischen Veränderungen in den Profilen zu erkennen. Die lysosomalen Enzyme der Fraktionen "N" reichern sich in einem etwas breiteren Dichtebereich (1.15 bis 1.22 g/cm<sup>3</sup>) an als die der entsprechenden "ML"-Fraktionen (1.14 bis 1.19 g/cm<sup>3</sup>). Beide Fraktionen aus den quarz-inkubierten Zellen zeigen im niedrigen Dichtebereich von 1.05 g/cm<sup>3</sup> einen etwas größeren Gipfel als die Kontrolle.

Die Profile von Protein und GLDH sind sehr breit über den gesamten Gradienten verteilt. In "N" liegt das Maximum jeweils bei einer Dichte von 1.15 g/cm<sup>3</sup>, in "ML" bei 1.13 bis 1.17 g/cm<sup>3</sup>. Auffallend ist das fast völlige Fehlen eines GLDH-Gipfels im Dichtebereich von 1.05 g/cm<sup>3</sup>, vor allem bei der "ML"-Fraktion.

Auch nach 2-stündiger Inkubation der isolierten Fraktionen stimmen die Enzym- und Proteinprofile aus Kontroll- und Q5-behandelten Zellen überein (Abb. 47). Im Vergleich zu den frischen Isolaten (Abb. 46) reichern sich hier die Enzyme und besonders das Protein der Fraktion "N" verstärkt im Bereich geringster Dichte an.

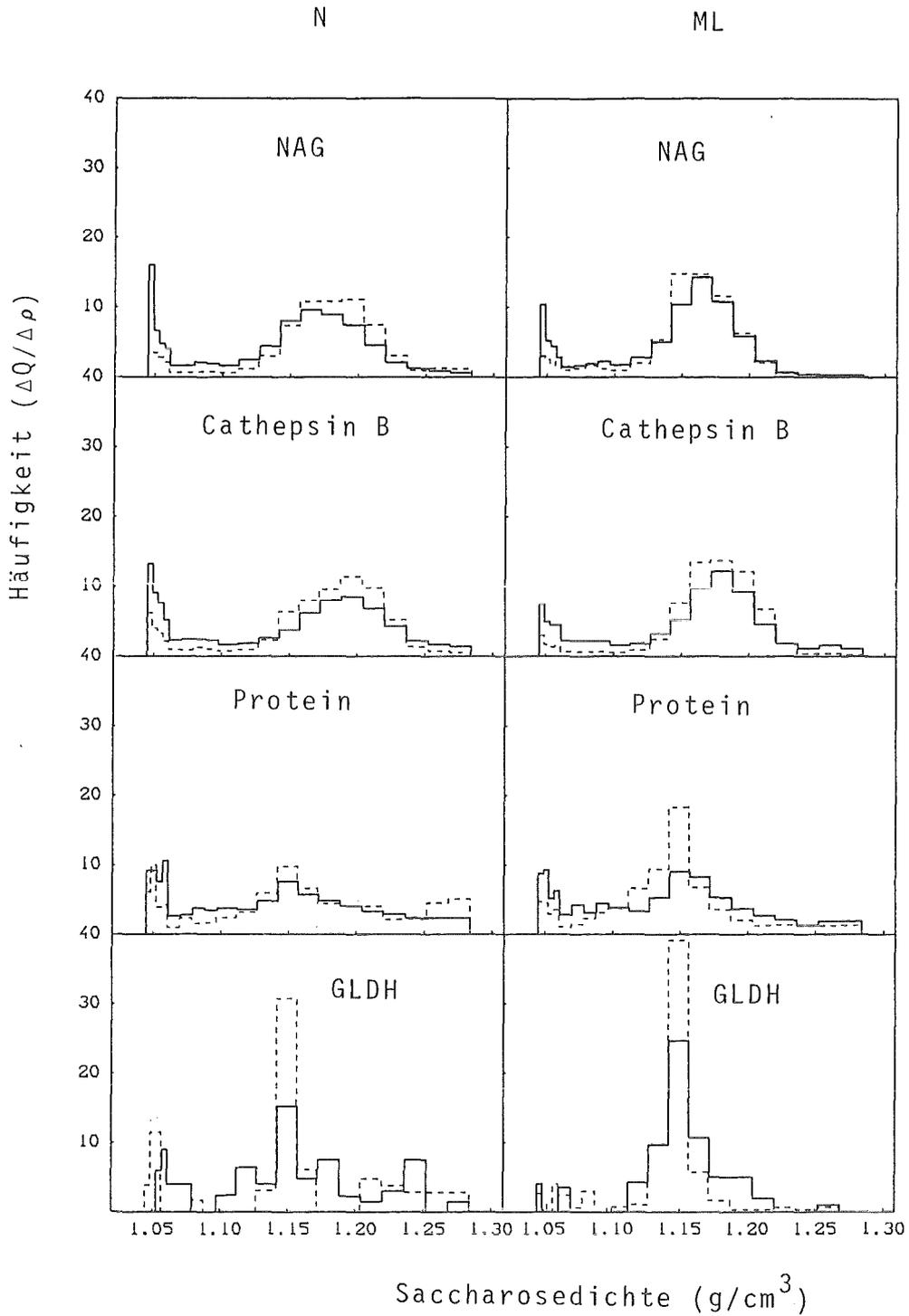


Abb. 46: Verteilung von NAG, Cathepsin B, GLDH und Protein der frisch isolierten "N"- und "ML"-Fraktionen von Kontroll- und quarzinkubierten Alveolarmakrophagen (Q5, 250 µg/ml, Inkubationszeit 16 Stunden) nach Zentrifugation im linearen Saccharosedichtegradienten (60,000g/2 Stunden; Vertikalrotor).  
nähere Einzelheiten siehe Abb. 44  
Repräsentativ für 2 Versuche  
Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

----- Kontrolle      ————— quarzinkubierte Zellen

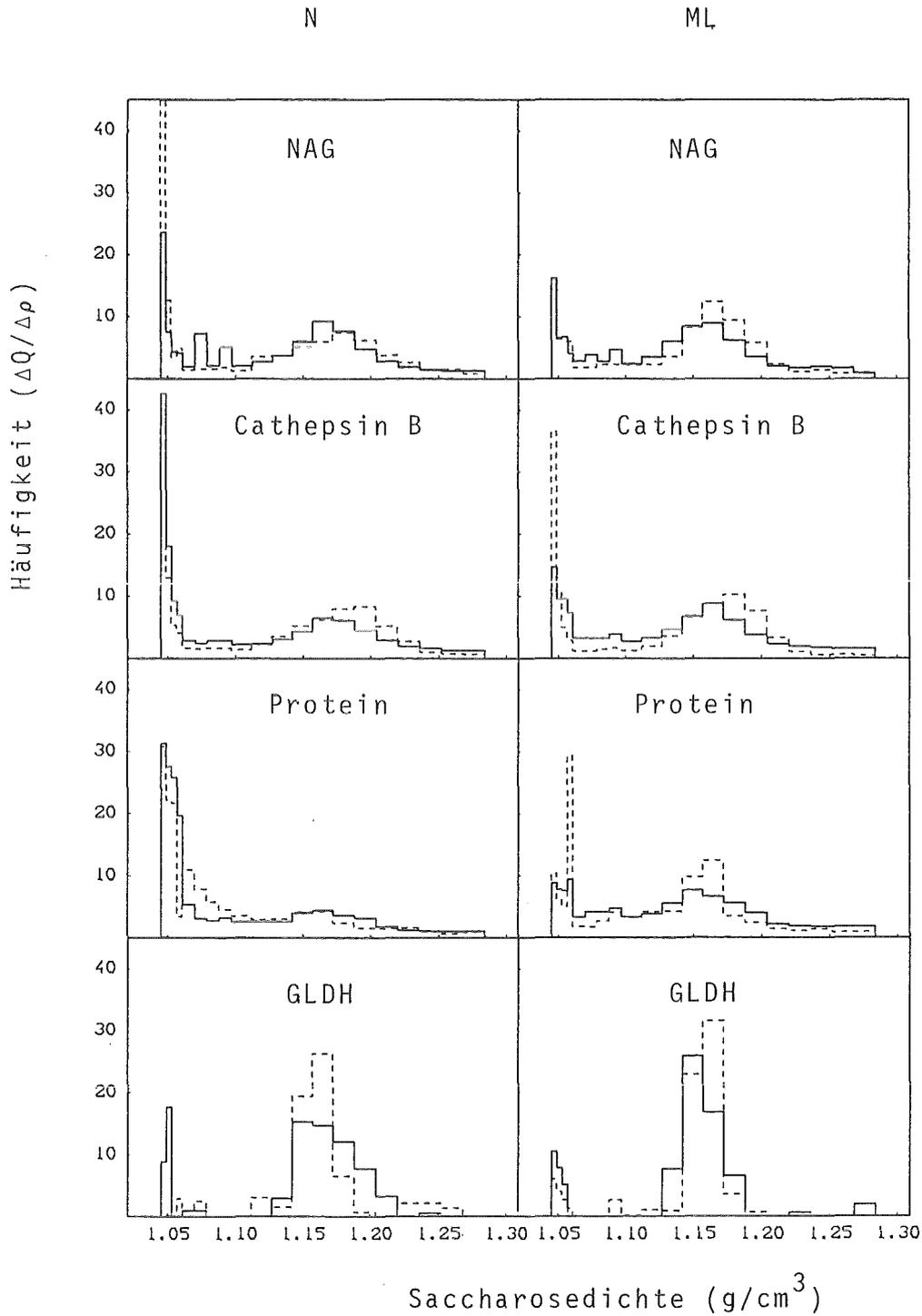


Abb. 47: Einfluß der *in vitro*-Inkubation (120 Min. in KP bei 37°C) auf die Verteilung von NAG, Cathepsin B, GLDH und Protein der "N"- und "ML"-Fraktion von Kontroll- und quarzinkubierten Alveolarmakrophagen (Q5, 250 µg/ml, Inkubationszeit 16 Stunden) nach Zentrifugation im linearen Saccharosedichtegradienten (60,000g/2 Stunden Vertikalrotor).

nähere Einzelheiten siehe Abb. 44

Repräsentativ für 2 Versuche

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

----- Kontrolle

————— quarzinkubierte Zellen

### 3.3.5.2. Verteilungsprofil der NAG im linearen Metrizamiddichtegradienten

Parallel zu den Zentrifugationen im Saccharosedichtegradienten wurde das Verhalten der NAG der Fraktionen "N" und "ML" aus quarzbehandelten Zellen im linearen Metrizamiddichtegradienten untersucht (s. 2.5.3.1.). Hierbei stellte es sich als sinnvoll heraus, die Gradienten zu unter- statt zu überschichten. Abb. 48 zeigt den Vergleich dieser beiden Möglichkeiten. Das NAG-Profil des überschichteten Gradienten weist eine starke Anreicherung im geringen Dichtebereich (1.06 bis 1.08 g/cm<sup>3</sup>) auf. Im unterschichteten Gradienten liegt das Maximum dagegen im Dichtebereich von 1.12 bis 1.16 g/cm<sup>3</sup>.

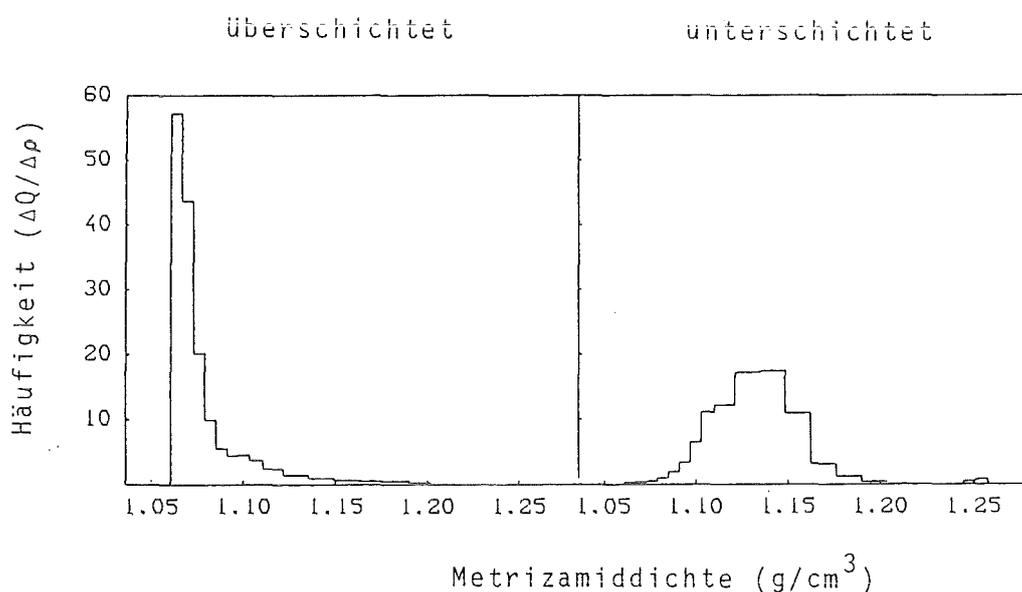


Abb. 48: Verteilung der NAG der frisch isolierten "ML"-Fraktion von Kontroll Alveolarmakrophagen nach Zentrifugation im linearen Metrizamid-dichtegradienten (60,000g/2 Stunden; Vertikalrotor).

links : Gradient mit 1.7ml "ML" überschichtet

rechts: Gradient mit 1.7ml "ML" unterschichtet

nähere Einzelheiten siehe Abb. 44

Repräsentativ für 2 Versuche

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

In Abb. 49 sind die NAG-Profile der frisch isolierten sowie der 120 Minuten inkubierten "N"- und "ML"-Fraktionen aus Zellen dargestellt, die 16 Stunden mit Quarz inkubiert worden waren. Die Verteilungen aus "ML" stimmen mit der Kontrolle überein. In "N" ist das Maximum des NAG-Profiles der quarz-inkubierten Zellen geringfügig zu geringeren Dichtebereichen hin verschoben.

Die medianen Dichten stimmen jedoch weitgehend überein (0 Min.: Kontrolle: 1.138, Q5-inkubierte Zellen: 1.139; 120 Min.: Kontrolle: 1.156, Q5-inkubierte Zellen: 1.152, Einheit jeweils  $\text{g}/\text{cm}^3$ ).

Während die Profile aus den frischen Isolaten relativ scharfe Maxima zeigen, verteilt sich die NAG-Aktivität nach 120 Minuten Inkubation über einen breiten Dichtebereich. Bei allen Gradienten fehlt der Gipfel in der geringsten Dichtefraktion.

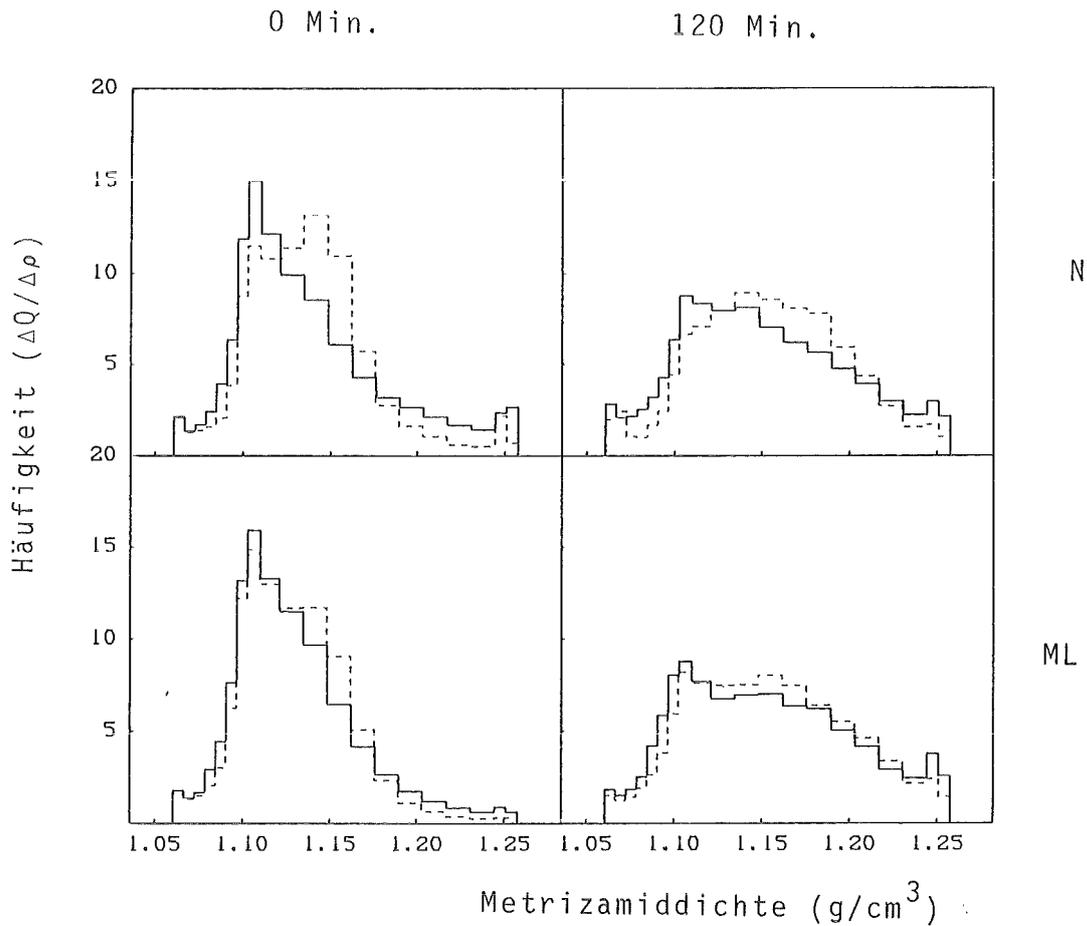


Abb. 49: Verteilung der NAG der "N"- und "ML"- Fraktionen von Kontroll- und quarzinkubierten Alveolarmakrophagen (Q5, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Inkubationszeit 16 Stunden) nach Zentrifugation im linearen Metrizamid-dichtegradienten (60,000g/2 Stunden; Vertikalrotor), sofort nach der Isolierung von "N" und "ML" (0 Min.) und nach 120 Min. Inkubation von "N" und "ML" in KP bei 37°C.

nähere Einzelheiten siehe Abb. 44

Einzelversuch

Abkürzungen siehe Abkürzungsliste

----- Kontrolle                      ————— quarzinkubierte Zellen

### 3.3.6. Inkubationsversuche mit der "ML"-Fraktion aus Kontrollzellen

#### 3.3.6.1. "ML" aus Alveolarmakrophagen

Die isolierte "ML"-Fraktion aus Kontroll-AM wurde bei 37°C in DPBS-Puffer mit Latex-, TiO<sub>2</sub>- und Quarzsuspensionen (Q8) vermischt (s. 2.5.4.1.). Die Stabilität der Lysosomen unter dem Einfluß der Staubinkubation wurde nach 0 und 120 Minuten anhand der Verteilung von NAG, SP und Protein untersucht. In Tab. 2 - 4 sind die Ergebnisse dieser Versuche aufgeführt.

Tab. 2 und 3 zeigen die Verteilung der NAG und der SP. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes kommt es bei keinem der beiden lysosomalen Enzyme zu einer deutlichen staubbedingten Freisetzung in den 16,000g-Überstand.

Tab. 2: Verteilung der NAG der "ML"-Fraktion von Alveolarmakrophagen ("ML"-Inkubation in DPBS, 37°C)

in % der Kontroll-Gesamtaktivität <sup>a</sup>					
	Inkubationszeit (Min.)	500g-Sediment (S2)	16,000g-Sediment (S1)	16,000g-Überstand (Ü)	Ausbeute
Kontrolle	0	17 ± 1	59 ± 1	24 ± 1	100
	120	15 ± 2	51 ± 1	33 ± 0.4	100
Latex <sup>1</sup>	0	23 ± 1*	53 ± 3	24 ± 0.5	100
	120	19 ± 1	50 ± 2	33 ± 2	101
TiO <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0	28 ± 1*	35 ± 0.5*	23 ± 0.5	86
	120	27 ± 1*	30 ± 0.4*	36 ± 0.4*	93
Quarz <sup>3</sup>	0	33 ± 4*	39 ± 0.5*	23 ± 0.5	95
	120	29 ± 2*	33 ± 0.4*	37 ± 0.4*	99

<sup>a</sup>Ko: 0 Min.= 21.0 mU/ml, 120 Min.= 23.4 mU/ml

1 Unit (U) katalysiert die Umsetzung von 1 µMol Substrat pro Minute bei 37°C Repräsentativ für 3 Versuche

Mittelwert ± Standardfehler, n=3

\*statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2p<0.05)

<sup>1</sup>100 µg/ml, ø 1.1µm

<sup>2</sup>150 µg/ml, Anatas

<sup>3</sup>150 µg/ml, DQ12-Quarz (Q8)

Eine Umverteilung findet hingegen zwischen den bei 500g (zusammen mit den Stäuben) und den bei 16,000g sedimentierbaren Anteilen statt. Schon unmittelbar nach dem Mischen der "ML"-Fraktionen mit den Staubsuspensionen (= Zeitpunkt 0 Min.) sind die Aktivitäten beider Enzyme in den 500g-Sedimenten signifikant höher als in der Kontrolle. Bei den mit Latex inkubierten Proben ist dieser Effekt im Verlauf der Inkubationszeit reversibel, bei den mit TiO<sub>2</sub> und Q8 behandelten Proben dagegen nicht. Hier bleiben die bei 500g sedimentierbaren Enzymaktivitäten im gesamten Beobachtungszeitraum etwa doppelt so hoch wie bei der Kontrolle. Gleichzeitig sind die Anteile in den 16,000g-Sedimenten deutlich geringer als in der Kontrolle und in den mit Latex inkubierten Proben.

Tab. 3: Verteilung der SP der "ML"-Fraktion von Alveolarmakrophagen ("ML"-Inkubation in DPBS, 37°C)

in % der Kontroll-Gesamtaktivität <sup>a</sup>					
	Inkubationszeit (Min.)	500g-Sediment (S2)	16,000g-Sediment (S1)	16,000g-Überstand (Ü)	Ausbeute
Kontrolle	0	13 ± 2	76 ± 3	11 ± 1	100
	120	8 ± 1	71 ± 2	20 ± 0.5	100
Latex <sup>1</sup>	0	18 ± 1*	72 ± 4	9 ± 0.3	99
	120	10 ± 0.2	71 ± 2	22 ± 0.5*	103
TiO <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0	21 ± 1*	43 ± 1*	7 ± 1	71
	120	18 ± 1*	44 ± 1*	23 ± 0.2*	85
Quarz <sup>3</sup>	0	27 ± 3*	49 ± 1*	8 ± 1	84
	120	18 ± 1*	51 ± 1*	23 ± 1*	92

<sup>a</sup>Ko: 0 Min.= 3.8 mU/ml, 120 Min.= 4.2 mU/ml

1 Unit (U) katalysiert die Umsetzung von 1 µMol Substrat pro Minute bei 37°C  
Repräsentativ für 3 Versuche

Mittelwert ± Standardfehler, n=3.

\*statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2p<0.05)

<sup>1</sup>100 µg/ml, ø 1.1µm

<sup>2</sup>150 µg/ml, Anatas

<sup>3</sup>150 µg/ml, DQ12-Quarz (Q8)

In Tab. 4 ist die Verteilung des Proteingehaltes dargestellt, die sich im wesentlichen so verhält wie für die lysosomalen Enzyme beschrieben. Es ist ebenfalls keine staubbedingte Freisetzung in den Überstand feststellbar, wohl aber eine signifikant höhere Sedimentierbarkeit bei 500g. Der Proteingehalt in den 16,000g-Sedimenten ist bei den mit TiO<sub>2</sub> und Q8 behandelten Proben signifikant geringer als in der Kontrolle.

Tab. 4: Verteilung des Proteingehalts der "ML"-Fraktion von Alveolar-makrophagen ("ML" Inkubation in DPBS, 37°C)

in % der Kontroll-Gesamtaktivität <sup>a</sup>					
	Inkubations- zeit (Min.)	500g- Sediment (S2)	16,000g- Sediment (S1)	16,000g- Überstand (Ü)	Ausbeute
Kontrolle	0	69 ± 3	28 ± 3	3 ± 1	100
	120	59 ± 4	32 ± 1	9 ± 1	100
Latex <sup>1</sup>	0	81 ± 1*	35 ± 2	6 ± 1*	122
	120	72 ± 1*	41 ± 1*	7 ± 0.1	120
TiO <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0	88 ± 12	20 ± 0.4*	1 ± 0.1*	109
	120	87 ± 4*	21 ± 2*	8 ± 0.3	116
Quarz <sup>3</sup>	0	87 ± 4*	21 ± 1*	3 ± 0.3	111
	120	93 ± 1*	24 ± 0.4*	9 ± 0.3	126

<sup>a</sup>Ko: 0 Min.= 77.4 µg/ml, 120 Min.= 71.1 µg/ml

Repräsentativ für 3 Versuche

Mittelwert ± Standardfehler, n=3

\*statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2p<0.05)

<sup>1</sup>100 µg/ml, ø 1.1µm

<sup>2</sup>150 µg/ml, Anatas

<sup>3</sup>150 µg/ml, DQ12-Quarz (Q8)

### 3.3.6.2. "ML" aus Rattenleber

Neben der "ML"-Fraktion aus Alveolarmakrophagen wurde "ML" aus Rattenleber hergestellt (s. 2.5.4.2.) und ebenfalls mit verschiedenen Stäuben inkubiert. Das Verhalten der mit Quarz (Q1) behandelten Proben wurde in zwei verschiedenen Puffern (DPBS und KP) vergleichend untersucht. Tab. 5 zeigt die Verteilung der NAG. In DPBS waren die Organellen in "ML" weniger stabil als in KP. Wie schon bei der "ML"-Fraktion aus Alveolarmakrophagen (Tab. 2) erfolgt auch hier weder in KP noch in DPBS nach 120 Min. Inkubation eine quarzbedingte Enzymfreisetzung in den 16,000g-Überstand. Allerdings konnte bei "ML" aus Rattenleber keine Umverteilung der Enzymaktivität zwischen dem 500g- und dem 16,000g-Sediment festgestellt werden.

Tab. 5: Verteilung der NAG der "ML"-Fraktion von Rattenleber  
("ML"-Inkubation in KP oder DPBS, 37°C)

% der Kontroll-Gesamtaktivität <sup>a</sup>					
	Inkubations- zeit (Min.)	500g- Sediment (S2)	16,000g- Sediment (S1)	16,000g- Überstand (Ü)	Ausbeute
<b>KP</b>					
Kontrolle	0	4 ± 1	89 ± 1	7 ± 1	100
	120	4 ± 0.6	80 ± 47	17 ± 0.1	100
Latex <sup>1</sup>	0	3 ± 0.1	84 ± 2	5 ± 0.1	92
	120	4 ± 0.3	89 ± 3	12 ± 0.4	105
TiO <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0	5 ± 0.3	86 ± 3	6 ± 1	97
	120	4 ± 0.4	87 ± 2	15 ± 1	106
Quarz <sup>3</sup>	0	3 ± 0.1	83 ± 1	5 ± 0.1	91
	120	4 ± 0.5	90 ± 2	13 ± 0.1	107
<b>DPBS</b>					
Kontrolle	0	5 ± 1	73 ± 2	22 ± 0.3	100
	120	3 ± 0.2	44 ± 0.5	53 ± 0.5	100
Quarz <sup>3</sup>	0	3 ± 0.2	68 ± 3	28 ± 2	99
	120	3 ± 0.5	51 ± 2	55 ± 2	109

<sup>a</sup>Ko: KP: 0 Min.= 19 mU/ml, 120 Min.= 17 mU/ml

DPBS: 0 Min.= 13 mU/ml, 120 Min.= 12 mU/ml

1 Unit (U) katalysiert die Umsetzung von 1 µMol Substrat pro Minute bei 37°C  
Repräsentativ für 3 Versuche, Mittelwerte ± Standardfehler, n=3

<sup>1</sup>100 µg/ml, ø 1.1µm

<sup>2</sup>150 µg/ml, Anatas

<sup>3</sup>150 µg/ml, Sicron F600 (Q1)

### 3.3.6.3. Einfluß der Quarzdosis auf "ML" aus Alveolarmakrophagen

Um zu überprüfen, ob die Enzym- bzw. Proteinfreisetzung in den 16,000g-Überstand von der eingesetzten Quarzdosis abhängt, wurde Kontroll-"ML" mit steigenden Quarzdosen (Q8) bei 37°C in DPBS inkubiert (s. 2.5.4.) und die Verteilung der Markerenzyme sowie des Proteins im 500g- und 16,000g-Sediment sowie im 16,000g-Überstand bestimmt.

Abb. 50 - 52 zeigen die Verteilungen der NAG, SP und des Cathepsin B. Auch mit ansteigender Quarzdosis ist weder sofort nach dem Mischen der "ML"-Fraktion mit den Staubsuspensionen noch nach 120 Min. Inkubation der Gemische bei 37°C eine erhöhte quarzbedingte Enzymfreisetzung in den Überstand zu erkennen.

Ein Dosiseffekt ist dagegen im Anstieg der lysosomalen Enzymaktivität im 500g-Sediment gegeben. Dieser Effekt tritt spontan schon zum Zeitpunkt 0 Min. auf. In allen untersuchten Dosisbereichen ist der bei 500g sedimentierbare Anteil lysosomaler Enzyme signifikant höher als in der Kontrolle. Besonders deutlich ist dies bei Cathepsin B zu sehen, hier beträgt die Enzymaktivität im 500g-Sediment der mit 500 µg Q8/ml inkubierten Probe das Doppelte des Kontrollwertes. Nach 120 Min. Inkubation sedimentieren insgesamt weniger lysosomale Enzyme bei 500g, die Werte der beiden höheren Quarzdosen können jedoch auch hier statistisch abgesichert werden.

Einen umgekehrten Dosiseffekt zeigen dagegen die 16,000g-Sedimente, die mit steigender Dosis gegenüber der Kontrolle signifikant abnehmen. Die Ausbeute aus Überstand, 500g- und 16,000g-Sediment der untersuchten Enzyme wird durch die Inkubation mit Quarz nicht beeinflusst.

Vergleichbar mit den lysosomalen Enzymen ist die Situation auch für die Proteinverteilung (Abb. 53). Mit steigender Quarzdosis nimmt der Proteingehalt im 500g-Sediment zu und im 16,000g-Sediment ab. Nach 120 Min. Inkubation ist dies etwas deutlicher zu sehen als zum Zeitpunkt 0 Min. Bei den beiden höheren Dosen ist der Unterschied zur Kontrolle statistisch zu sichern. Im Überstand findet, wie schon für die lysosomalen Enzyme beschrieben, keine staubbedingte Veränderung statt.

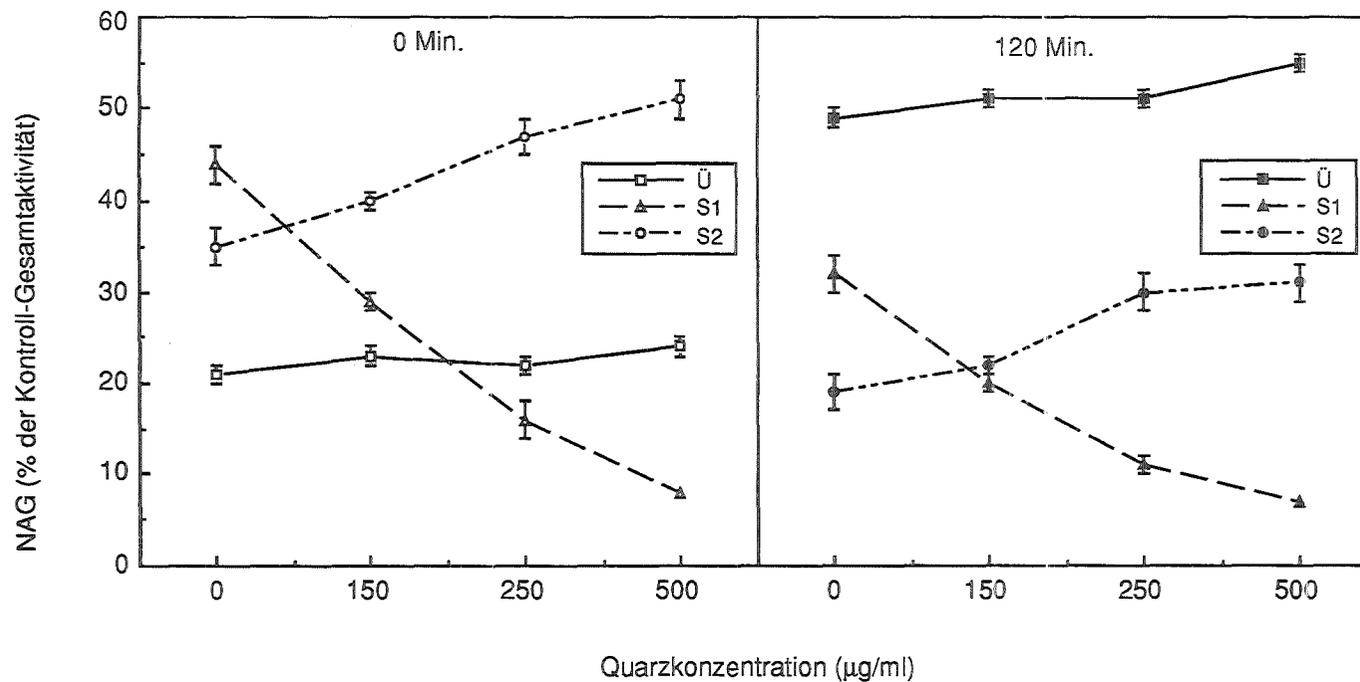


Abb. 50: Einfluß steigender Quarzdosen (Q8) auf die Verteilung der NAG der "ML" Fraktion aus Kontroll-Alveolarmakrophagen sofort nach dem Mischen von "ML" mit Q8 (0 Min.) und nach 120 Min. Inkubation in DPBS bei 37°C.

(in % der entsprechenden Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+S1+S2))

Ü = gelöste Enzyme im 16,000g-Überstand

S1 = bei 16,000g sedimentierbare Enzyme

S2 = bei 500g sedimentierbare Enzyme

Repräsentativ für 2 Versuche

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3

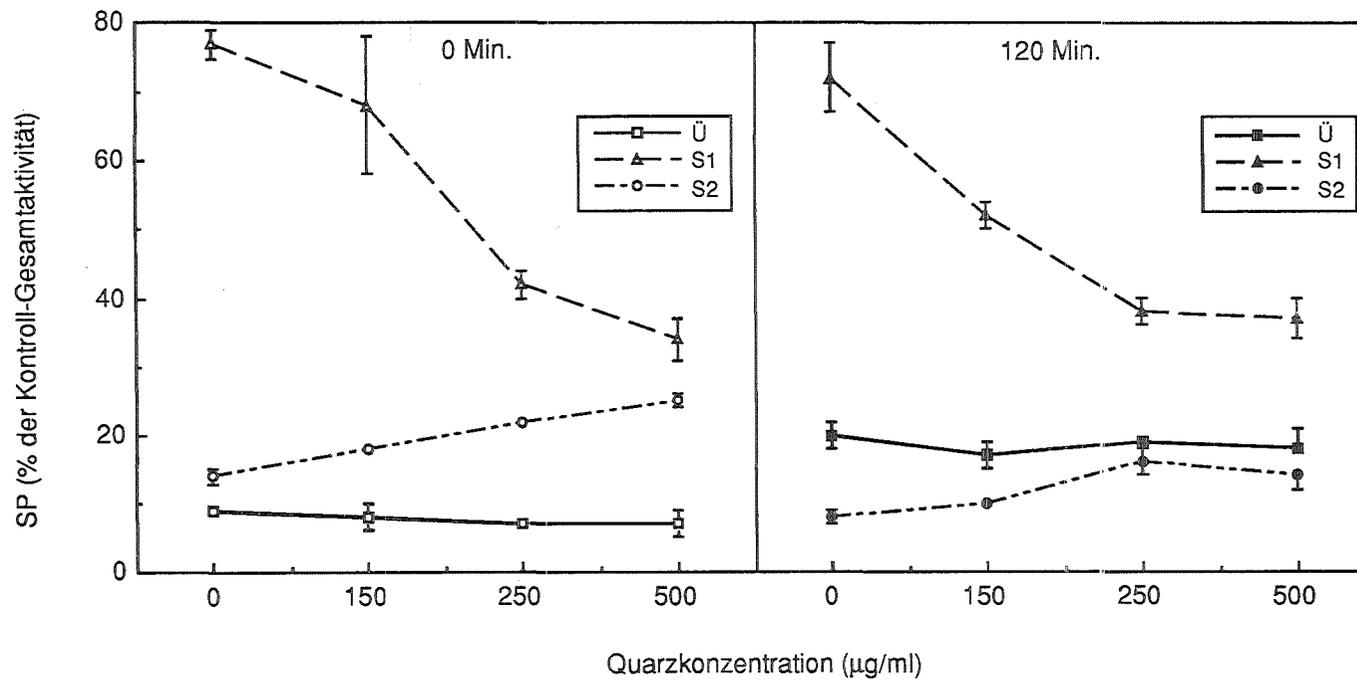


Abb. 51: Einfluß steigender Quarzdosen (Q8) auf die Verteilung der SP der "ML"-Fraktion aus Kontroll-Alveolarmakrophagen sofort nach dem Mischen von "ML" mit Q8 (0 Min.) und nach 120 Min. Inkubation in DPBS bei 37°C.

(in % der entsprechenden Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+S1+S2))

nähere Einzelheiten siehe Abb. 50

Repräsentativ für 2 Versuche

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3

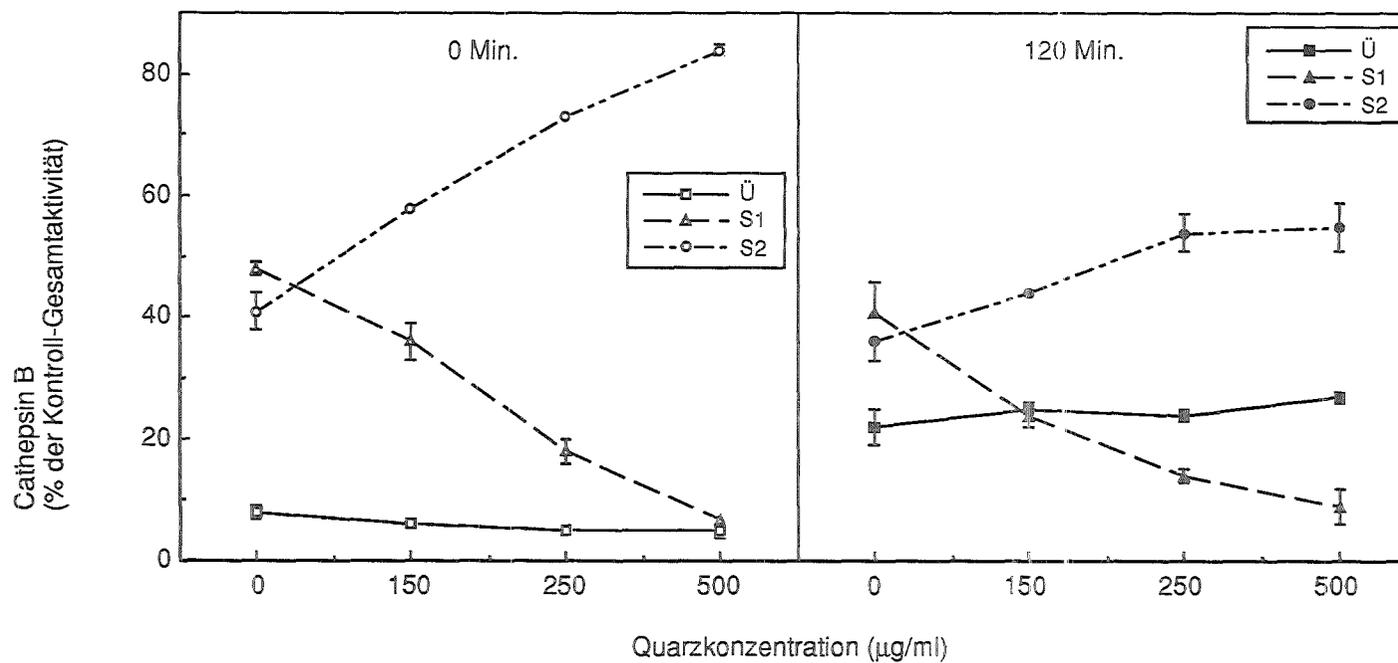


Abb. 52: Einfluß steigender Quarzdosen (Q8) auf die Verteilung der Cathepsin B der "ML"-Fraktion aus Kontroll-Alveolarmakrophagen sofort nach dem Mischen von "ML" mit Q8 (0 Min.) und nach 120 Min. Inkubation in DPBS bei 37°C. (in % der entsprechenden Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+S1+S2))  
nähere Einzelheiten siehe Abb. 50  
Repräsentativ für 2 Versuche  
Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3

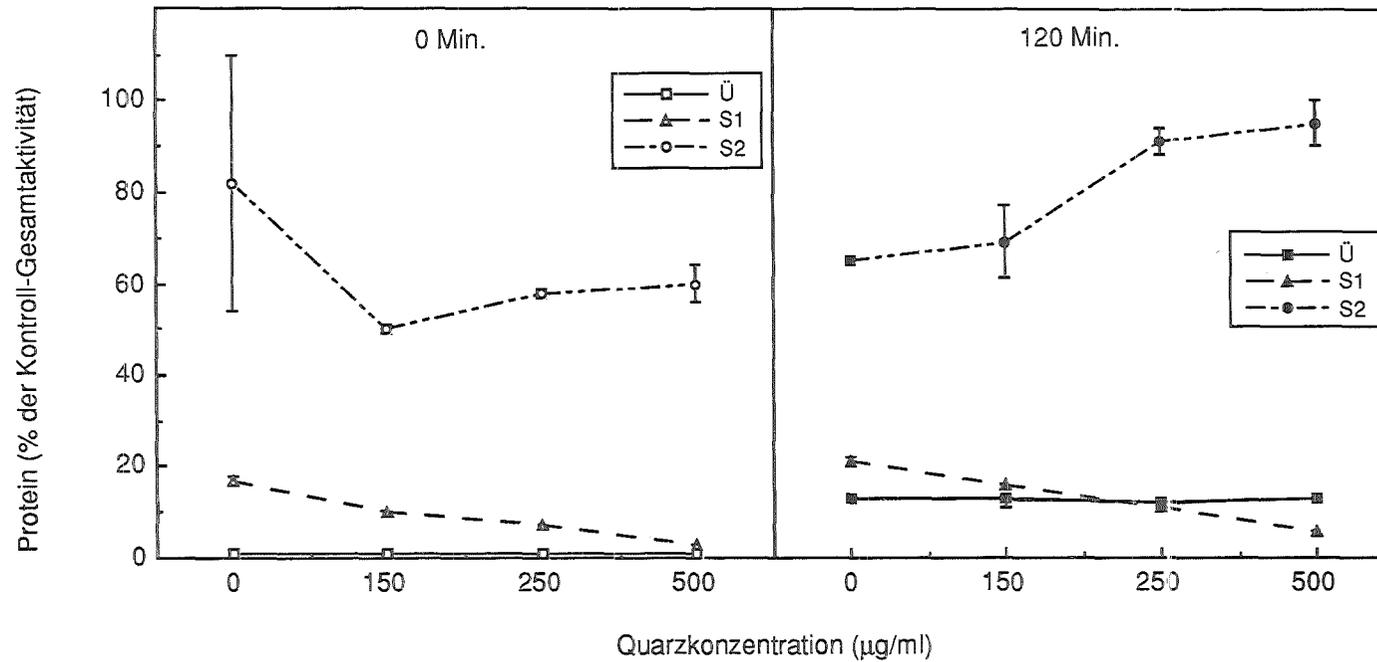


Abb. 53: Einfluß steigender Quarzdosen (Q8) auf die Verteilung des Proteingehalts der "ML"-Fraktion aus Kontroll-Alveolarmakrophagen sofort nach dem Mischen von "ML" mit Q8 (0 Min.) und nach 120 Min. Inkubation in DPBS bei 37°C. (in % der entsprechenden Kontroll-Gesamtaktivität (Ü+S1+S2))  
nähere Einzelheiten siehe Abb. 50  
Repräsentativ für 2 Versuche  
Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n=3

### 3.3.6.4. Quarzeinfluß auf "P" und "S" aus Alveolarmakrophagen

Um zu klären, ob sich die bei der "ML"-Fraktion beobachtete Adsorption der lysosomalen Enzyme an den Quarz im 500g-Sediment auf die gelösten Enzyme im Zytosol oder auf Komponenten in "P" zurückführen läßt, wurden diese beiden Fraktionen ebenfalls mit Quarz (Q8) inkubiert (Tab. 6 und 7).

Die Inkubation von "P" ist in Tab. 6 dargestellt. Im untersuchten Dosisbereich von 250 und 500 µg/ml ist in den Überständen keine Veränderung gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Zwischen dem 500g- und dem 16,000g-Sediment findet dagegen die bei der "ML"-Inkubation beobachtete Umverteilung statt. Mit steigender Dosis nimmt der NAG-Anteil im 500g-Sediment zu und im 16,000g-Sediment ab.

Tab. 6: Einfluß von Quarz auf die Verteilung der NAG in der "P"- Fraktion von Alveolarmakrophagen ("P"- Inkubation in DPBS, 37 °C)

in % der Kontroll-Gesamtaktivität <sup>a</sup>					
	Inkubationszeit (Min.)	500g-Sediment (S2)	16,000g-Sediment (S1)	16,000g-Überstand (Ü)	Ausbeute
Kontrolle	0	14 ± 0.3	31 ± 3	55 ± 3	100
	120	10 ± 1	33 ± 3	57 ± 2	100
250 µg/ml Quarz <sup>1</sup>	0	24 ± 1*	34 ± 3	69 ± 7	127
	120	20 ± 1*	10 ± 3*	57 ± 0.3	87
500 µg/ml Quarz <sup>1</sup>	0	34 ± 1*	7 ± 2*	34 ± 3*	75
	120	23 ± 1*	3 ± 0.3*	53 ± 3	79

<sup>a</sup>Ko: 0 Min.= 3 mU/ml, 120 Min.= 3 mU/ml

1 Unit (U) katalysiert die Umsetzung von 1 µMol Substrat pro Minute bei 37°C Einzelversuch

Mittelwerte ± Standardfehler, n=3

\*statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2p<0.05)

<sup>1</sup>DQ12-Quarz (Q8)

Tab. 7 gibt die Verteilung von NAG, SP und Protein aus der "S"-Fraktion nach Inkubation mit 500 µg Quarz/ml wieder. Hier tritt die in "ML" und "P" beobachtete Umverteilung zwischen dem 500g- und dem 16,000g-Sediment nicht auf. Mindestens 90% der Enzymaktivität bzw. des Proteingehaltes liegen auch nach 120 Min. Inkubation noch gelöst im 16,000g-Überstand vor.

Tab. 7: Einfluß von Quarz auf die "S"-Fraktion von Alveolarmakrophagen ("S"-Inkubation in DPBS, 37°C)

in % der Kontroll-Gesamtaktivität <sup>a</sup>					
	Inkubationszeit (Min.)	500g-Sediment (S2)	16,000g-Sediment (S1)	16,000g-Überstand (Ü)	Ausbeute
<b><u>NAG</u></b>					
Kontrolle	0	1 ± 0.2	4 ± 1	95 ± 0.2	100
	120	3 ± 0.1	4 ± 0.5	93 ± 1	100
Quarz <sup>1</sup>	0	3 ± 0.4*	5 ± 1	97 ± 1	105
	120	1 ± 0.1*	4 ± 1	93 ± 1	108
-----					
<b><u>SP</u></b>					
Kontrolle	0	3 ± 1	6 ± 0.3	91 ± 5	100
	120	5 ± 0.5	9 ± 0.5	86 ± 27	100
Quarz <sup>1</sup>	0	3 ± 0.1	6 ± 0.3	83 ± 8	92
	120	5 ± 0.3	7 ± 0.5*	105 ± 5	117
-----					
<b><u>Proteingehalt</u></b>					
Kontrolle	0	1 ± 0.1	4 ± 0.5	95 ± 0.03	100
	120	1 ± 0.1	4 ± 0.4	95 ± 1	100
Quarz <sup>1</sup>	0	4 ± 1*	5 ± 0.3	94 ± 1	103
	120	2 ± 0.1*	4 ± 1	86 ± 7	92

<sup>a</sup>Ko: NAG: 0 Min.= 10 mU/ml, 120 Min.= 10 mU/ml

SP: 0 Min.= 3 mU/ml, 120 Min.= 2 mU/ml

Prot.: 0 Min.= 345 µg/ml, 120 Min.= 348 µg/ml

1 Unit (U) katalysiert die Umsetzung von 1 µMol Substrat pro Minute bei 37°C Einzelversuch

Mittelwerte ± Standardfehler, n=3

\*statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (2p<0.05)

<sup>1</sup>DQ12-Quarz (Q8), 500 µg/ml

#### 4. DISKUSSION

Das zentrale Anliegen der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Eigenschaften von Lysosomen aus Rinderalveolarmakrophagen (RAM) zu charakterisieren und ihre Reaktion auf Quarz als mögliches primäres Schadensereignis zu prüfen. In direktem Zusammenhang hiermit stand die Untersuchung der in vitro kultivierten RAM als Testsystem für die Wirkung von Quarz und anderen Stäuben und die Bedeutung von Schutzmechanismen wie z.B. die Vorbehandlung des Quarzes mit Phospholipiden. In dieser Reihenfolge sollen im weiteren unsere Befunde diskutiert werden.

##### 4.1. Lysosomen und ihre Reaktion auf Partikel

In der Vergangenheit wurden für Untersuchungen an isolierten Lysosomen hauptsächlich Zellorganellen aus Leberhomogenat verwendet (AHLBERG & GLAUMANN 1985, DEHNEN & FETZER 1967, MARZELLA et al. 1980, SÜTTERLIN 1982). Aus Alveolarmakrophagen (AM) wurden Organellen bisher nur bei Kaninchen isoliert (COHN & WIENER 1963, LOWRIE et al. 1979, PILATTE et al. 1987) während Untersuchungen an isolierten Lysosomen aus RAM noch nicht durchgeführt wurden.

Die Lysosomen der RAM lassen sich morphologisch sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch im Elektronenmikroskop darstellen. Sie sind in Acridin Orange (AO) markierten Zellen als Population unterschiedlich großer Vesikel zu erkennen, die aufgrund ihres sauren Milieus rot fluoreszieren. Auch isolierte Lysosomen aus AO-markierten Zellen behalten in vitro ihre rote Fluoreszenz. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß auch in vitro die Lysosomenmembran der isolierten Organellen ihre Eigenschaft, einen Protonengradienten aufzubauen, behält. Die Untersuchung der isolierten und in der Trägerfreien Elektrophorese gereinigten Organellen im Transmissionselektronenmikroskop (Abb. 26) belegt ihre Ähnlichkeit mit isolierten Lysosomen anderer Tierarten (ADAMSKI et al 1987, STAHN et al. 1970). In der rasterelektronenmikroskopischen Präparation der isolierten "ML"-Fraktion sind die Organellen als kleine Vesikel von maximal einem  $\mu\text{m}$  Durchmesser zu erkennen, jedoch können mit dieser Methode die verschiedenen Organellen im Gegensatz zur Transmissionselektronenmikroskopie nicht unterschieden werden.

Der Vergleich der Enzymprofile in der Trägerfreien Elektrophorese der "ML"-Fraktion vor und nach ihrer Behandlung mit Ultraschall zeigt, daß die

Organellen weitgehend intakt isoliert werden können (3.3.1.). Die Profile der lysosomalen Enzyme aus der "ML"-Fraktion nach der Trägerfreien Elektrophorese stimmen gut mit den von SEIDEL et al. (1986) ermittelten Profilen von Leberlysosomen verschiedener Tierarten überein. Eine Besonderheit ist das zweigipfelige Profil der Sauren Phosphatase, das im Profil von Rattenleberlysosomen nicht beobachtet wird (WIENER 1988). Ob es sich hier um eine heterogene Lysosomenpopulation mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld handelt, ist nicht bekannt. Auffällig ist, daß der langsam wandernde Gipfel an der selben Stelle liegt wie der Gipfel der Sauren Phosphatase nach der Behandlung von "ML" mit Ultraschall (Abb.24). Für die Untersuchung quarzspezifischer Lysosomenschäden wurden diese hochreinen Lysosomen nicht verwendet, da sich die Ausbeute nach der Trägerfreien Elektrophorese als zu gering erwiesen hat.

Die Zentrifugation in ionischen und nicht-ionischen Dichtegradienten bestätigt ebenfalls die Integrität der isolierten Organellen, die auch durch eine 2-stündige in vitro-Inkubation weder Veränderungen der Latenz noch der Dichte erkennen lassen. Die Lage der Gipfel der lysosomalen Enzyme im linearen Saccharosegradienten stimmt gut mit den Befunden von LOWRIE et al. (1979) überein, die für Lysosomen aus Kaninchen-AM ein Dichtemaximum von 1.16 g/cm<sup>3</sup> angeben. Isolierte Lysosomen aus AM weisen somit eine geringere Dichte auf als Lysosomen aus Rattenleber (1.20 g/cm<sup>3</sup>, SÜTTERLIN 1982).

Für die Untersuchung der Quarzwirkung auf intrazelluläre Strukturen als mögliches primäres Schadensereignis wurde die Quarzfraktion Q5 verwendet. Der Durchmesser der Quarzpartikel dieser Fraktion betrug 0.7 - 1.1 µm (CMAD). Die Partikel entsprechen somit der Größe der Lysosomen und sind daher gut zur Isolierung quarzhaltiger Phagolysosomen und zur Untersuchung der Bedeutung ihrer Ablagerung in diesen Organellen geeignet.

Die intrazelluläre Lokalisation des phagozytierten Quarzes in Vesikeln kann elektronenmikroskopisch in der Fraktion "N" gezeigt werden (s. 3.3.2.1.), in der der größte Anteil des Quarzes sedimentiert. Die Phagosomen mit dem aufgenommenen Material fusionieren in den Zellen mit Lysosomen, die ihre sauren Hydrolasen an die Phagosomen abgeben. Die fusionierten Vesikel sind im Elektronenmikroskop anhand ihrer Aktivität für Saure Phosphatase charakterisierbar (SEIDEL et al. 1989). Auch im Fluoreszenzmikroskop zeigen die aufgenommenen Partikel in Acridin Orange-markierten Zellen eine rote Fluoreszenz (s. 3.1.2.). Dieser Befund wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nach der Phagozytose von partikulären Substanzen beobachtet (CAPO et al. 1983, D'ARCY HART et al. 1983, MOR & GOREN 1987) und wird allgemein als Zeichen einer erfolgten Phagosomen-Lysosomen-Fusion gedeutet. Im REM

erscheinen die Quarzpartikel aus "N" von zellulären Bestandteilen umhüllt (s. 3.3.2.1.). Ob es sich hierbei allerdings um die Phagosomenmembranen handelt kann bezweifelt werden, da diese durch die angewandte Präparationsmethode wahrscheinlich nicht erhalten werden können. Zur genaueren rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung quarzhaltiger Vesikel könnte sich die Methode des Gefrierbruchs als nützlich erweisen.

Mit zunehmender Inkubationszeit hat die Quarzexposition der Zellen und die Phagozytose der Partikel eine Abnahme der Aktivität saurer Hydrolasen in der subzellulären Fraktion "ML" und eine Zunahme in "N" und "S" zur Folge (s. 3.3.3.). Die Fusion partikelhaltiger Phagosomen mit primären Lysosomen und die Bildung sekundärer Lysosomen oder zumindest eine Assoziation von Phagosomen und Lysosomen können die Zunahme der Aktivität in "N" erklären. Die lysosomale Aktivität sedimentiert daher nicht mehr in "ML" sondern in "N". Da sich die LDH-Verteilung in den subzellulären Fraktionen aus quarzinkubierten Zellen nicht von den aus Kontrollzellen unterscheidet (Ergebnis nicht dargestellt), handelt es sich bei der lysosomalen Enzymaktivität in "N" nicht um unvollständig homogenisierte Zellen, sondern in der Tat um isolierte Organellen. Dies kann auch durch die Behandlung von "N" mit dem Detergens TX-100 nachgewiesen werden, durch das die Lipidmembranen zerstört werden und die lysosomalen Enzyme nicht mehr sedimentierbar sind (Abb. 40, 41, LOWRIE et al. 1979).

Die Aktivitätszunahme in der Fraktion "S" ist entweder auf die Zerstörung von Organellen während der Homogenisation oder auf eine Permeabilitätsänderung der Organellen bereits in den Zellen zurückzuführen. Dieser Effekt tritt nicht auf, wenn die Zellen mit DPL-behandeltem Quarz inkubiert werden (Abb. 34). Es handelt sich hier also um einen spezifischen Effekt des nativen Quarzes, der die Phagosomenmembranen in ihrer Stabilität verändert. Möglicherweise ist dies auf eine direkte Interaktion zwischen den Quarzpartikeln und den Phagosomenmembranen zurückzuführen.

Dagegen zeigen die aus quarzinkubierten Zellen isolierten Organellen in "ML" und "N" nach in vitro-Inkubation weder eine verminderte Latenz (s. 3.3.4.) noch eine Änderung der Dichte (Abb. 47, 49) im Vergleich mit den Organellen aus unbehandelten Kontrollen. Diese Befunde sind überraschend, da sowohl eine höhere Permeabilität der Organellenmembranen als auch eine Verschiebung des Dichtemaximums der partikelhaltigen sekundären Lysosomen aufgrund der hohen Quarzdichte zu erwarten gewesen wären.

Eine denkbare Erklärung hierfür könnte sein, daß Phagosomen und Lysosomen nicht vollständig fusioniert, sondern nur assoziiert sind, und sich während der

in vitro-Inkubation und der Gradientenzentrifugation wieder voneinander lösen. Die enzymatisch verfolgbaren Organellen könnten sich daraufhin wieder wie Organellen aus unbehandelten Kontrollen verhalten. Aufschluß darüber könnte ein Vergleich der Enzym- mit der Quarzverteilung im Gradienten geben, der jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden konnte. Gegen diese Möglichkeit spricht allerdings der Befund von SEIDEL et al. (1989), wonach in partikelhaltigen Vesikeln histochemisch Saure Phosphataseaktivität nachgewiesen werden kann. Da dieser elektronenmikroskopische Nachweis keine quantitative Beurteilung erlaubt, ist eine Aussage über den Anteil der Saure Phosphatase-positiven partikelhaltigen Vesikel nicht möglich. Andere Autoren weisen darauf hin, daß nach Quarzinkubation die Saure Phosphataseaktivität der Phagosomen nachläßt (ZIESCHE et al. 1985) bzw. nur noch diffus im Zytoplasma vorkommt (ALLISON et al. 1966).

Denkbar ist auch, daß durch Quarz bereits vorgeschädigte Phagolysosomen durch die Homogenisation selektiv zerstört worden sind und den Anstieg in "S" bewirkt haben. Möglicherweise konnten daher nur diejenigen Organellen isoliert werden, die durch Quarz noch nicht beeinträchtigt waren, sei es, weil die Phagolysosomen erst relativ neu gebildet waren oder, weil aufgrund eines noch unbekanntem Schutzmechanismus keine Schädigung erfolgt ist. Diese letztgenannte Hypothese wird durch den morphologischen Befund gestützt, wonach selbst nach langen Inkubationszeiten von über 47 Stunden einige Zellen noch intakt erscheinen (Abb. 4d, 7d). Diese müssen über einen bislang unbekanntem Mechanismus verfügen, der sie vor der Toxizität des intrazellulär abgelagerten Quarzes schützt (auf diesen Punkt wird später genauer eingegangen).

Zur Prüfung der membranolytischen Aktivität von Quarz, die in der Literatur gut belegt ist (ALLISON & MORGAN 1979, NASH et al. 1966), wurden aus Kontrollzellen isolierte, native Lysosomen in vitro mit Quarz inkubiert. Mit diesem Versuchsansatz konnten DEHNEN & FETZER (1967) sowie WEISSMANN & RITA (1972) eine Freisetzung von lysosomalen Enzymen aus isolierten Leberorganellen nachweisen. Im Gegensatz hierzu zeigen die in vitro mit Quarz inkubierten Organellen aus RAM keinerlei Anzeichen einer quarzbedingten Lyse (Tab. 2, 3). Somit ist die in der Literatur beschriebene Freisetzung saurer Hydrolasen aus Lysosomen durch in vitro-Inkubation der isolierten Organellen mit Quarz in diesem System nicht reproduzierbar. Auch isolierte Lysosomen aus Rattenleber (Tab. 5) und aus Makrophagen, die aus HL-60-Zellen differenziert wurden (NIEDER, persönliche Mitteilung), werden durch in vitro Inkubation mit Quarz nicht lysiert.

Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in den deutlichen Differenzen der

methodischen Ansätze. So verwendeten WEISSMANN & RITA (1972) für die Inkubation isolierter Kaninchenleberlysosomen sehr kleine Quarzpartikel ( $\phi$  30 - 150 Å) mit großer spezifischer Oberfläche (380 m<sup>2</sup>/g) und DEHNEN & FETZER (1967) inkubierten Rattenleberlysosomen mit einer sehr hohen Quarzdosis von 10 mg/ml Lysosomensuspension. Im vorliegenden Fall wurden dagegen Quarzpartikel des Durchmessers 0.7 - 1.1  $\mu$ m in der Dosis 250  $\mu$ g Quarz/ml Lysosomensuspension verwendet.

Bei diesen Versuchen zeigt sich dagegen eine spontane dosisabhängige Adsorption von enzymhaltigen Organellen an die Partikel (s. 3.3.6.3.), bei der es sich nicht um die Adsorption von gelösten Enzymen (Tab. 7), sondern vielmehr von membrangebundener Enzymaktivität (Tab. 6) handelt. Da hier die dem Zytoplasma zugewandte Seite der Lysosomenmembranen in Kontakt zu den Quarzpartikeln stand, liegt eine Erklärung für diesen Befund möglicherweise in der Geometrie der Versuchsanordnung. Interessanterweise findet eine Organellenadsorption auch an Anatase, aber nicht an Latexpartikel statt.

Die von ALLISON & MORGAN (1979) entwickelte Hypothese der Permeabilitätsänderung der Membran sekundärer Lysosomen durch Quarz, wodurch saure Hydrolasen ins Zytoplasma freigesetzt werden und den Zelltod auslösen, kann anhand der beiden in vitro-Inkubationen somit nicht nachvollzogen werden. Keine der beiden benutzten Versuchsanordnungen erbrachte Hinweise für eine verminderte Stabilität der Organellen. Weder durch die intralysosomale Ablagerung von Quarz noch durch den Kontakt der Lysosomenmembran mit Quarz "von außen" war die Latenz reduziert. Die Umverteilung der Enzymaktivität von "ML" in die Fraktionen "N" und "S", die durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL verhindert werden kann, kann jedoch ein Hinweis für eine quarzbedingte Beeinträchtigung der Membranintegrität sein, die mit den benutzten Methoden nicht erfaßbar ist.

Eine Ursache für das Fehlen eines meßbaren Effekts könnte in der relativ kurzen 2-stündigen in vitro-Inkubation der isolierten Organellen begründet liegen. Möglicherweise ist die Permeabilitätsänderung der Phagolysosomenmembran und die Freisetzung lysosomaler Enzyme erst zu einem späteren Zeitpunkt erkennbar. Es wäre auch denkbar, daß der Quarz in dem in vitro-System mit einer Schutzschicht, die möglicherweise aus Proteinen besteht, überzogen wurde, bevor er in Kontakt mit den Organellen kommen konnte. Die Adsorption von Proteinen an Quarzoberflächen wird von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (DESAI & RICHARDS 1978, SINGH et al. 1984, JONES et al. 1972, RAINBOW et al. 1987). Die Adsorption von Rinderserumalbumin an Quarz schützt jedoch Meerschweinchen-AM nicht vor der toxischen Wirkung dieser Partikel, und auch Serumzusatz bewirkt erst in einer

Konzentration von 30 - 40% eine Schutzwirkung (s. 4.2., TILKES & BECK 1983). Der Proteingehalt in den Inkubationsansätzen ist mit maximal 75 µg/ml sehr gering, so daß ihm hier keine Bedeutung zukommt.

Neben den sauren Hydrolasen sind die sauren Proteasen wichtige Enzyme der Säugerzellen, deren Existenz erstmals von SALKOWSKI (1890) postuliert wurde. Saure Proteasen in Makrophagen wurden zuerst von OPIE (1906) beim Hund nachgewiesen.

Die saure Protease Cathepsin B, ein Glycoprotein, gehört zur Gruppe der Thiol- oder Cystein-Proteasen, die im aktiven Zentrum eine Thiolgruppe besitzen (OTTO 1971, SNELLMAN 1971). Im Proteaserepertoire der AM gehören die Cystein-Proteinasen zu den wichtigsten elastinolytischen Enzymen (CHAPMAN & STONE 1984). Cathepsin B ist zusammen mit anderen sauren Proteasen am intrazellulären Abbau von Bindegewebsfragmenten beteiligt, die zuvor von neutralen Proteasen, wie z.B. Collagenasen und Elastasen, extrazellulär vorverdaut werden (BURLEIGH 1977, PARAKKAL 1969, WIBO & POOLE 1974). Eine weitere Bedeutung kommt Cathepsin B in der Prozessierung von Fremdproteinen oder Antigenen zu (SCHNEIDER et al. 1978). Isoliertes, gereinigtes Cathepsin B baut in vitro lösliches und unlösliches Kollagen, Kollagenfragmente, Elastin und Glycoproteine (BURLEIGH et al. 1974, ETHERINGTON 1976, MASON et al. 1986, WERB et al. 1980) sowie Aktin und Myosin ab (SCHWARTZ & BIRD 1977). Das Enzym wird als hochmolekulares Procathepsin B an membrangebundenen Polysomen des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Durch limitierte Proteolyse, die im sauren Milieu der Lysosomen wahrscheinlich durch die lysosomale Aspartyl-Protease Cathepsin D stattfindet, wird das Procathepsin B zum funktionsfähigen Glycoprotein prozessiert (NISHIMURA & KATO 1987). Diese Prozessierung findet nur bei saurem pH (pH 3.0) statt und ist durch Chloroquin hemmbar (SCHNEIDER et al. 1978). Da es sich bei Chloroquin um eine schwache Base handelt diffundiert diese Substanz in saure Kompartimente, in denen sie sich in protonierter Form anreichert und so die Acidifikation stört. Infolgedessen kommt es dort zum Anstieg des pH-Wertes (DARNELL et al 1986, KIRSCHKE & BARRETT 1987).

In den Makrophagen kommt es nach Inkubation mit Quarz zu einer drastischen Abnahme der Cathepsin B-Gesamtaktivität (Abb. 14, 18). Der Enzymgehalt in den Überständen ist nach 16 Stunden Inkubation signifikant geringer als in der Kontrolle. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu den anderen untersuchten lysosomalen Enzymen, deren Aktivität in den Überständen durch Quarzinkubation zeitabhängig zunimmt. Ein ähnliches Ergebnis an Maus-

peritonealmakrophagen erzielte LOCK et al. (1987), der nach 17 Stunden Quarzinkubation zwar eine Freisetzung von 85% LDH und 82% NAG, jedoch keine Freisetzung von sauren Proteasen in den Überstand feststellen konnte. Über den Gehalt an sauren Proteasen in den Zellen nach Quarzphagozytose werden jedoch keine Angaben gemacht. Nach 24 stündiger Phagozytose von inerten Latexpartikeln durch Mausperitonealmakrophagen nimmt die intrazelluläre Cathepsin B-Aktivität dagegen zu (MØRLAND & PEDERSEN 1979).

Die Reduktion der Cathepsin B-Aktivität nach Quarzphagozytose kann verschiedene Ursachen haben. Da die Inkubation isolierter Lysosomen aus Kontrollzellen mit Quarz keinen Verlust der Cathepsin B Aktivität bewirkt (Abb. 52) und auch die Aktivität von gereinigtem Cathepsin B (Sigma) durch Quarz nicht gehemmt wird (Ergebnis nicht dargestellt), ist eine direkte Hemmung oder Zerstörung dieses Enzyms durch Quarz auszuschließen. Der Effekt tritt nur auf, wenn die nativen Quarzpartikel von den Zellen aufgenommen werden und in intrazelluläre Kompartimente gelangen. Da Cathepsin B ein Enzym mit relativ kurzer biologischer Halbwertszeit ist (20 - 24 Stunden bei Rattenleberisolaten, KATUNUMA et al. 1983), spricht der Befund für eine verminderte Synthese und/oder für eine Störung der Prozessierung des inaktiven Procathepsin B. Eine quarzbedingte Erhöhung des intralysosomalen pH dadurch, daß der Quarz mit der Phagosomenmembran reagiert und die ATP-abhängige Protonenpumpe inaktiviert, könnte hierfür eine Erklärung sein. Ebenso ist auch ein zytoplasmatischer Inhibitor denkbar, der entweder induziert wird oder durch eine erhöhte Permeabilität der Membranen quarzhaltiger Phagolysosomen (ALLISON & MORGAN 1979, KANE et al. 1985, NASH et al. 1966) mit dem intralysosomalen Cathepsin B in Kontakt kommt. Die Existenz endogener Inhibitoren für dieses Enzym wurde bereits für Skelett- und Herzmuskelzellen verschiedener Spezies nachgewiesen (SCHWARTZ & BIRD 1977). Ein wichtiges inhibitorisches Plasmaprotein ist z.B. das Alpha<sub>2</sub>-Makroglobulin (STARKEY & BARRETT 1973). Für die Aktivität eines Inhibitors spricht auch die Tatsache, daß in der zytosolischen Fraktion "S" sowohl von homogenisierten Kontroll- als auch von quarzinkubierten Zellen nur eine äußerst geringe Cathepsin B-Aktivität gemessen werden kann (Abb. 36), während NAG zu 15% in "S" vorhanden ist (Abb. 34).

Die geringe meßbare Enzymaktivität in den Kulturüberständen könnte auch eine Folge der von KIRSCHKE & BARRETT (1987) beschriebenen Instabilität von Cathepsin B im neutralen pH-Bereich sein. KEILOVA (1971) gibt dagegen einen pH-Bereich von 4 - 7.8 an, in dem das Enzym stabil ist, und auch MØRLAND & PEDERSEN (1979) beschreiben einen meßbaren Anstieg von Cathepsin B im Kulturmedium nach 72 stündiger Latexpagozytose.

Wichtig sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von PADILLA et. al. (1988). Durch in vivo-Instillation von Elastase bzw. Bleomycin wurden in Ratten Lungenemphyseme bzw. -fibrosen induziert. In den emphysematösen Lungen, die durch einen verstärkten Abbau von Bindegewebe charakterisiert sind, wurde eine erhöhte Cathepsin B-Aktivität in den AM gemessen. Im Gegensatz hierzu war die Cathepsin B-Aktivität in den AM der Bleomycin-behandelten Tiere, die Fibrosen entwickelten, reduziert. Fibrosen sind durch verstärkte Ablagerungen von Bindegewebe charakterisiert, so daß dieser Befund für einen gestörten Proteinmetabolismus spricht. Neben Cathepsin B können daran auch andere Proteasen beteiligt sein. In diesem Zusammenhang wäre es daher wichtig zu untersuchen, ob der für Cathepsin B beobachtete Aktivitätsverlust durch die Inkubation mit Quarz möglicherweise auch für weitere Proteasen zutrifft und an welcher Stelle im Proteinmetabolismus eine Störung vorliegt.

#### 4.2. Rinderalveolarmakrophagen und ihre Reaktion auf Partikel

Die in vitro-Kultur von RAM ist über einen Beobachtungszeitraum von mehreren Stunden ohne Vitalitätsverlust (Abb. 12), Veränderung von Enzym- und Proteingehalt (Tab. 1) oder morphologische Veränderungen möglich. Auch für menschliche AM wird dieses in vitro-Verhalten von GOLDER & DOE (1981) beschrieben. Die Morphologie der RAM ist durch kugelige Zellkörper, reich strukturierte Zelloberflächen und weit auf dem Substrat ausgebreitete Pseudopodien charakterisiert und wurde u.a. von MILLER (1980) und PARAKKAL et al. (1974) für Ratten-AM und von SCHIMMELPFENG (1989) für AM verschiedener Tierarten beschrieben. An diesem in vitro-Modell mit RAM, das bereits für anderen Fragestellungen eingesetzt wurde (BIELEFELDT OHMANN & BABIUK 1986, FINCH et al. 1987, FOX 1973, McGUIRE & BABIUK 1982), konnten Quarze verschiedener Herkunft und unterschiedlicher Korngröße und Oberfläche getestet und mit Stäuben, die als inert gelten, verglichen werden. Als Testparameter wurden Vitalität, Morphologie und das Verhalten verschiedener Markerenzyme untersucht.

Die Inkubation mit Latex ergibt weder morphologische noch enzymatische Veränderungen (s. 3.2.2.). Der Befund, daß die Phagozytose unverdaulicher, inerter Partikel (Latex, Polystyren) im Gegensatz zu der Aufnahme z.B. von Proteinen nicht zu einem intrazellulären Anstieg lysosomaler Enzyme führt, wird übereinstimmend auch von AXLINE & COHN (1970) und DAVIES & ALLISON

(1984) berichtet. Morphologisch erscheinen die Zellen nach Latexphagozytose groß und abgerundet mit nur wenigen Pseudopodien (Abb. 7b, s.a. PARAKKAL et al. 1974).

Im Gegensatz hierzu zeigen sich durch die Inkubation mit den Stäuben Anatase und Quarz morphologisch und biochemisch meßbare Veränderungen in den Zellkulturen.

Obwohl  $\text{TiO}_2$  als Inertstaub gilt, wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen in vitro-Effekte auf Zellen beobachtet. So berichten FINCH et al. (1987) und SCHIMMELPFENG (1989) von morphologischen Veränderungen von RAM, HEDENBORG (1988) von verstärkter Chemolumineszenz von humanen polymorphkernigen Leukozyten und ZITTING & SKYTTÄ (1979) sowie NOLAN et al. (1987b) von membranolytischer Aktivität von  $\text{TiO}_2$  im Haemolyseversuch mit Erythrozyten.  $\text{TiO}_2$  verhält sich demnach zwar in vivo weitgehend inert und induziert nach Inhalation keine fibrosierenden Lungenveränderungen (ELO et al. 1972, FERIN & OBERDÖRSTER 1985, KLOSTERKÖTTER & EINBRODT 1969, RICHARDS et al. 1985, SJÖSTRAND & RYLANDER 1987), in vitro besitzt es jedoch durchaus biologische Aktivität.

Durch die Inkubation mit Anatase sind bereits nach 2 Stunden deutliche morphologische Veränderungen in Form einer starken Vakuolisierung der Zellen erkennbar, während die Vitalität der Zellen nicht reduziert ist (Ergebnis nicht dargestellt). Nach 16 Stunden erscheinen die Zellen sehr stark aufgebläht (Abb. 1b, c), das Zytoplasma und die aufgenommenen Anatase-Partikel sind an der Membran dicht zusammengedrängt. Nach 47 Stunden sind im Rasterelektronenmikroskop (REM) große "Löcher" oder "Einstülpungen" in den Zellen zu erkennen, die wahrscheinlich die genannten Vakuolen darstellen. Diese können möglicherweise durch die Präparation nicht erhalten werden. Ein ähnliches Phänomen beschreibt WIENER (1988) nach Inkubation von RAM mit  $\text{CeCl}_3$ . Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung Acridin Orange-markierter Zellen zeigt keine rote Färbung (s. 3.1.2.). Dies deutet darauf hin, daß der pH-Wert in diesen Vakuolen vom sauren in den neutralen Bereich verschoben ist.

Die durch  $\text{TiO}_2$  induzierten Effekte sind jedoch sehr gering verglichen mit der zytotoxischen Wirkung von  $\alpha$ -kristallinem Quarz auf in vitro-kultivierte Zellen. Rapider Vitalitätsverlust sowie starke Veränderungen der Morphologie und des Verhaltens verschiedener Markerenzyme sind in der Literatur gut dokumentiert (u.a. ALLISON et al. 1966, DOGRA & KAW 1988, KANE et al. 1980, KRIEGSEIS et al. 1987, LOCK et al. 1987, MILLER 1980, SEEMAYER 1985).

Die wichtigsten Ergebnisse der Inkubation von RAM mit nativem Quarz sind:

1. morphologische Veränderungen der Zellen,
2. eine erhöhte Aufnahme von Trypanblau als Folge verminderter Vitalität,
3. Freisetzung verschiedener Markerenzyme in den Überstand und
4. Verlust von Cathepsin B-Gesamtaktivität in den Kulturen.

Die Morphologie der RAM ist nach Exposition mit  $\alpha$ -kristallinem Quarz deutlich verändert. Bereits nach zwei Stunden sind die Zellkörper abgeflacht mit Löchern und glatter, wenig strukturierter Zellmembran (Abb. 5c), die auch MILLER (1980) bei Ratten-AM nach Quarzphagozytose beobachtet hat. Nach längeren Inkubationszeiten (16 und 47 Stunden) mit nativem Quarz sind die meisten Zellen entweder vollständig lysiert oder zumindest sehr stark geschädigt, so daß sie im Lichtmikroskop zunehmend "konturlos" erscheinen. Die wenigen morphologisch intakten Zellen, die einen klar begrenzten Zellkörper haben (Abb. 2b), weisen jedoch im REM genau wie die Kontrollen eine unregelmäßige Oberfläche mit Mikrovilli, ausgebreitete Pseudopodien und einen kugeligen Zellkörper auf (Abb. 6b - d, 7d).

Da die Zellen in 47-stündiger Kultur in serumhaltigem Medium (10% FCS) inkubiert wurden, könnte hierdurch die Quarzwirkung reduziert worden sein (ALLISON & MORGAN 1979). TILKES & BECK (1983) beobachten jedoch erst bei 30 - 40% Serumzusatz eine Schutzwirkung bei  $\alpha$ -kristallinem Quarz. Die Serumkomponenten, die diesen Schutz bewirken, werden nicht spezifiziert. Von anderen Autoren wird jedoch die Adsorption von Proteinen an mineralische Stäube beschrieben (DESAI & RICHARDS 1978 und 1983, JONES et al. 1972, RAINBOW et al. 1987, SINGH et al. 1984, VALERIO et al. 1986).

Die Beobachtung, daß einige Zellen durch die Phagozytose von Quarz nicht geschädigt werden, deutet auf unterschiedlich empfindliche Populationen innerhalb der Kultur hin. Während der weitaus größte Teil der Zellen innerhalb der ersten 16 Stunden zugrunde geht, überleben einige die Phagozytose des Quarzes und bleiben zumindest morphologisch noch über einen längeren Zeitraum hinweg intakt (s. 3.1.2., 3.1.3.). Die Mechanismen, mit denen sich diese Zellen vor der toxischen Quarzwirkung schützen können, sind nicht bekannt. Ein ähnliches Resultat findet NIEDER (unveröffentlicht) nach Quarzexposition von Makrophagen, die durch TPA-Behandlung aus HL-60 Zellen differenziert wurden. Diese Zellen scheinen ebenfalls resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung der Quarzpartikel zu sein, da sie nach Quarzphagozytose weder Vitalitätsverlust noch Freisetzung von Enzymen in das Kulturmedium zeigen.

Bei den Makrophagen, die trotz Phagozytose von Quarzpartikeln vital bleiben,

könnte es sich um unterschiedliche Subpopulationen handeln, deren Existenz von mehreren Autoren diskutiert wird (BIELEFELDT OHMANN & BABIUK 1986, LEHNERT & MORROW 1984, OGHISO 1987, SEIDEL et al. 1988). Bisher ist jedoch nicht geklärt, ob es sich bei den beobachteten morphologisch und funktionell unterschiedlichen Subpopulationen tatsächlich um verschiedene Makrophagentypen oder aber um unterschiedliche Differenzierungsstadien der selben Zellen handelt, die auch in vivo existieren. Ein Effekt durch die Isolation und in vitro-Kultur der Zellen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Den Zellen, die durch die Quarzphagozytose nicht sofort absterben, kommt möglicherweise in der Entstehung von pathogenen Gewebeveränderungen eine größere Bedeutung zu. Diese Zellen können durch die Wirkung des intrazellulär abgelagerten Quarzes dazu angeregt werden, über einen längeren Zeitraum hinweg Botenstoffe zu synthetisieren und an ihre Umgebung abzugeben. So ist aus der Literatur bekannt, daß in vitro mit Quarz inkubierte Makrophagen verstärkt Faktoren in den Kulturüberstand abgeben, die die Proliferation und Anheftung von Fibroblasten und deren Kollagensynthese stimulieren (AALTO et al. 1979, ALLISON & MORGAN 1979, BROWN et al. 1988). Neben stimulierenden Faktoren geben Makrophagen auch Botenstoffe zur Hemmung der Fibroblasten-Proliferation ab, wie z.B. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Interessant ist, daß die PGE<sub>2</sub>-Synthese durch die in vitro-Inkubation von Makrophagen mit Quarz inhibiert wird (BROWN et al. 1988).

So kann von den überlebenden quarzhaltigen AM durch die Abgabe stimulierender Faktoren einerseits, und durch das Fehlen von Hemmfaktoren andererseits, eine starke Proliferation und sekretorische Aktivität von Fibroblasten induziert werden. Zusätzlich spricht die diskutierte Hemmung der Cathepsin B-Aktivität in den Kulturen dafür, daß durch Quarz auch der Proteinmetabolismus gestört sein könnte. So entsteht möglicherweise in der Lunge ein Kreislauf zwischen Fibroblasten-Proliferation, vermehrter Bildung und gleichzeitig reduziertem Abbau von Bindegewebe. Es wäre daher wichtig zu untersuchen, ob mit dem konditionierten Kulturmedium der beschriebenen RAM-Subpopulationen Fibroblasten zur verstärkten Proliferation und Kollagensynthese angeregt werden können.

Eine weitere auffallende morphologische Veränderung ist das Auftreten langer, dünner Filopodien in den Langzeitkulturen von 47 Stunden. HIRSCH et al. (1985), MILLER (1980) und PARAKKAL et al. (1974) berichten ebenfalls von Filopodien mit bis zu 60 µm Länge bei Makrophagen verschiedener Spezies nach Inkubation mit unterschiedlichen partikulären Substanzen, unter anderem auch mit Quarz. Über die biologische Bedeutung der Filopodien ist bisher

wenig bekannt. Nach PARAKKAL et al. (1974) könnten sie den Makrophagen dazu dienen, ihren Abstand untereinander beizubehalten, und zytoplasmatische Bestandteile oder spezielle Botenstoffe auszutauschen.

Neben den besprochenen morphologischen Veränderungen treten in den RAM-Kulturen auch meßbare biochemische Effekte, sowohl nach Inkubation mit  $\text{TiO}_2$  als auch mit Quarz, auf.

Durch die Exposition mit Anatase kommt es zu einer erhöhten Freisetzung der zytoplasmatischen und lysosomalen Enzyme LDH und NAG in den Überstand (s. 3.2.2.). Diese Beobachtung stimmt gut mit der Freisetzung von LDH und lysosomalen Enzymen überein, die von SCHIMMELPFENG (1989) für RAM und von DAVIES (1980) für Mausperitonealmakrophagen beschrieben wird.

Die Inkubation mit nativem  $\alpha$ -kristallinen Quarz hat im Vergleich zu  $\text{TiO}_2$  wesentlich stärkere Effekte zur Folge. In quarzinkubierten RAM-Kulturen tritt eine zeitabhängige Verminderung der Vitalität auf (s. 3.2.3.1.1.), die gut mit der beobachteten Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms LDH in den Überstand korreliert (s. 3.2.3.1.2.). Vergleichbare Angaben zur LDH-Freisetzung werden von LOCK et al. (1987) und SCHIMMELPFENG (1989) für Makrophagen verschiedener Tierarten nach Quarzinkubation gemacht. Beide Parameter werden als Maß für eine Permeabilitätsänderung der Plasmamembran und für eine toxische Schädigung der Zellen angesehen (KAW & WASEEM 1988, SEEMAYER 1985). Im Gegensatz hierzu stellen KANE et al. (1985) bei der Mausmakrophagen-Zelllinie P388D1 nach Quarzinkubation eine gegenüber dem Vitalitätsverlust verzögerte LDH-Freisetzung fest.

Neben der LDH wird das lysosomale Enzym NAG in das Kulturmedium freigesetzt (3.2.3.1.2.). Dieser Befund stimmt mit den von SCHIMMELPFENG (1989) an RAM und von LOCK et al. (1987) an Mausperitonealmakrophagen ermittelten Ergebnissen überein. Die Freisetzung von zytoplasmatischem und lysosomalem Enzym findet praktisch gleichzeitig statt, auch wenn eine Tendenz zur vorzeitigen Freisetzung der LDH erkennbar ist. In keinem Fall wurde beobachtet, daß lysosomale Enzyme vor dem zytoplasmatischen Enzym freigesetzt wurden.

Auch aus diesen Versuchen geht demnach kein Hinweis für eine primäre Schädigung von Lysosomen nach Quarzphagozytose hervor. Als erstes Ereignis nach der Inkubation der RAM mit nativem Quarz scheint eine Schädigung der Zellmembran aufzutreten, in deren Folge die sauren Hydrolasen ins Medium gelangen. Dies wird auch durch TEM-Beobachtungen von SEIDEL et al. (1989) bestätigt, die als erste quarzbedingte Veränderung Membranschäden und

Desintegration des Zytoplasmas beobachten, während die intrazellulären quarzhaltigen Vesikel zunächst intakt bleiben. Dieser Befund deutet zusammen mit der Beobachtung der unverminderten in vitro-Latenz der isolierten Phagolysosomen darauf hin, daß eine primäre Lysosomenschädigung als erstes Schadensereignis nach Quarzexposition nicht stattzufinden scheint.

Die Reaktionen der Zellen auf die verschiedenen eingesetzten Quarzfraktionen sind für die untersuchten Parameter vergleichbar (s. 3.2.3.1.), obwohl es in der Literatur Hinweise auf die Bedeutung der Partikelgröße für das Ausmaß der schädigenden Wirkung von Quarz gibt. Die Zunahme des fibrogenen bzw. zytotoxischen Potentials mit abnehmender Partikelgröße konnte sowohl in vivo an Ratten nach Inhalation von Quarz der Korngrößen  $< 2 - 16 \mu\text{m}$  (RENDALL et al. 1988) als auch in vitro nach Inkubation von Makrophagen mit Grubenstäuben des Durchmessers  $1.1 - 7.8 \mu\text{m}$  (SEEMAYER 1983) gezeigt werden. Auch NOLAN et al. (1985) fanden einen Zusammenhang zwischen der Korngröße und der haemolytischen Aktivität verschiedener Quarze mit  $1 - 20 \mu\text{m}$  Durchmesser. Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Quarzfraktionen liegen mit  $0.7 - 1.75 \mu\text{m}$  jedoch im unteren Korngrößenbereich, sodaß sich hieraus eine Erklärung für das weitgehend gleichartige Verhalten der Zellen ergibt.

Neben der Teilchengröße gilt als weiterer wichtiger Parameter für die Quarztoxizität die spezifische Oberfläche der Partikel. Sie wird aus der Anzahl der Gasmoleküle berechnet, die bei konstanter Temperatur in Abhängigkeit vom Druck eine vollständige monomolekulare Schicht auf der Feststoffoberfläche bilden (BRUNAUER et al. 1938). So finden VILIM et al. (1987) einen Zusammenhang zwischen der Induktion von Chemolumineszenz bei Makrophagen und NOLAN et al. (1985) eine Abhängigkeit der haemolytischen Aktivität von Quarz in Abhängigkeit der spezifischen Partikeloberfläche.

Die Messung der spezifischen Oberfläche von drei Proben (s. 2.2.3.) ergab einen Anstieg der Werte in der Reihenfolge  $Q_1 < Q_2 < Q_3$ , wobei  $Q_3$  gegenüber  $Q_1$  eine um 25% größere spezifische Oberfläche aufweist. Mit dieser Reihenfolge  $Q_1 < Q_2 < Q_3$  ist die Zunahme der Freisetzung von NAG, LDH und Protein in den Überstand und die gleichzeitige Abnahme dieser Marker in den adhaerenten Zellen nach 4 und 16 Stunden Inkubation korreliert (s.3.2.3.1.2.).

### 4.3. Phospholipid-Schutzeffekt

Staubpartikel, die in die Lungenalveolen eindringen, werden dort von Lungensurfactant umkleidet bevor sie von AM phagozytiert werden. Surfactant kleidet die Alveolen aus und verhindert deren Kollabieren. Beim Rind ist er zu 18% aus Proteinen und zu 79% aus Lipiden zusammengesetzt, die wiederum zu 71% aus Phosphatidylcholin bestehen. Die im Surfactant vorhandenen Fettsäuren bestehen zu 54% aus Palmitinsäure (HARWOOD et al. 1975).

Surfactant, der aus der Lavageflüssigkeit isoliert werden kann, reduziert als Zusatz in der Kultur die Quarztoxizität (SCHIMMELPFENG 1989). In diesem System wurde nach 40 Stunden Inkubation eine Retoxifizierung festgestellt. Möglicherweise kommt den im Surfactant gelösten Proteinen dabei eine entscheidende Rolle zu. Diese können von intralysosomalen Proteasen abgedaut werden und hinterlassen so "Löcher" in der Schutzschicht des Quarzes, von denen aus der Abbau der Lipide erfolgen kann.

Auch die Behandlung des Quarzes mit Dipalmitoyl Lecithin (DPL), dem Hauptbestandteil des Lungensurfactants, reduziert die Quarztoxizität. ALLISON & MORGAN (1979) verweisen auf einen in vitro-Schutzeffekt durch die Behandlung von Quarz mit Phosphatidylcholin und WALLACE et al. (1985) konnten zeigen, daß in vitro kultivierte Ratten-AM durch DPL-Vorbehandlung des Quarzes für einen Zeitraum von 2 Stunden vollständig geschützt waren. Durch Vorinkubation des DPL-geschützten Quarzes mit Phospholipase A2, die die beiden Palmitinsäurereste von der Phosphatgruppe abspaltet (KEANE et al. in Vorbereitung), konnte der Quarz wieder retoxifiziert werden. Nach WALLACE et al. (1986) verliert der Quarz durch den Kontakt mit DPL zunächst seine Toxizität und kann, ohne Membranschäden zu verursachen, in die AM aufgenommen werden. Nach der Fusion der quarzhaltigen Phagosomen mit Lysosomen dauern deren saure Hydrolasen die DPL-Schutzschicht ab und stellen so die toxische Wirkung des Quarzes wieder her. Einen Hinweis für einen ähnlichen Schutzmechanismus in vivo sehen die Autoren im Auftreten der "Lipidose" nach Staubexposition, die durch eine Aktivierung der Typ II-Pneumozyten und eine gesteigerte Surfactantproduktion charakterisiert ist (FASSKE & MORGENROTH 1985). Diese erste Frühreaktion der Lunge wurde u.a. von ESKELSON et al. (1988) für Inhalationsversuche mit Quarz an Ratten beschrieben.

Die vorliegenden Ergebnisse und die Arbeit von SCHIMMELPFENG (1989) an AM verschiedener Tierarten bestätigen die Schutzwirkung von DPL. Durch die Vorbehandlung des Quarzes mit DPL wurde eine vollständige Reduzierung der Quarztoxizität erzielt. Im Gegensatz zu der von WALLACE et al. (1986) postulierten Retoxifizierung des Quarzes durch intrazelluläre Phospholipasen

bleiben die RAM jedoch über einen Zeitraum von bis zu 90 Stunden vollständig geschützt. In dieser Zeit wird der Quarz quantitativ aufgenommen (Abb. 3b - c) und in sauren Kompartimenten abgelagert (Abb. 4e). Dennoch ist weder die Vitalität vermindert noch werden vermehrt zytoplasmatische oder lysosomale Enzyme oder Proteine in das Kulturmedium abgegeben (s. 3.2.3.2.). Auch der Gesamtzymgehalt von Cathepsin B ist nicht reduziert (Abb. 36).

Die Mechanismen, die zum dauerhaften Erhalt der Schutzwirkung des DPL in den Phagosomen der RAM führen, sind bisher nicht geklärt. MILES et al. (1988) konnten an in vitro kultivierten Ratten-AM zeigen, daß diese Zellen aus Surfactant isoliertes Dipalmitoyl Lecithin aufnehmen und innerhalb von 6 Stunden abbauen können. Möglicherweise gilt dies nicht für DPL, das an Quarz adsorbiert ist. Im Gegensatz zu Surfactant besteht die DPL-Schutzschicht ausschließlich aus Lipiden ohne Protein, so daß hierdurch der Lipidabbau verhindert oder zumindest stark verzögert sein kann.

Andererseits gibt es Hinweise für eine Hemmung oder Verzögerung der Fusion von Lysosomen mit Phagosomen, die DPL-behandelten Quarz beinhalten, so daß der DPL-Abbau nicht oder erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen kann. OLIVER & BERLIN (1976) weisen darauf hin, daß die Fusion von Lysosomen und Phagosomen von der Zusammensetzung der Membranen abhängt. Für eine Fusionshemmung oder -verzögerung sprechen die Ergebnisse aus der Homogenisation von mit DPL-Quarz inkubierten Zellen. Die Verteilungen der lysosomalen Enzyme in den Fraktionen "N", "ML", und "S" unterscheiden sich nicht von den Kontrollen (s. 3.3.3.2.). Wenn die quarzhaltigen Phagosomen mit Lysosomen fusioniert wären, müßte die Enzymaktivität in "N" ähnlich wie bei nativem Quarz erhöht sein. Nach 47 Stunden Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz ist die NAG-Aktivität in "N" geringfügig erhöht gegenüber der Kontrolle (Abb. 39). Ob sich diese Tendenz mit zunehmender Inkubationszeit fortsetzt, könnte anhand von längeren Inkubationszeiten geprüft werden. Ein wichtiger Beitrag wäre daher zu überprüfen, ob möglicherweise durch DPL die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen verzögert wird.

Diese Befunde, die für eine Fusionshemmung von Lysosomen und Phagosomen sprechen, werden aufgrund anderer Ergebnisse nicht bestätigt. So ist - zumindest in einem Teil der Phagosomen, die DPL-behandelten Quarz beinhalten - histochemisch Saure Phosphataseaktivität nachweisbar (WILCZEK persönliche Mitteilung). Auch sind in Kulturen, die mit Acridin Orange markiert wurden, die Partikel klar erkennbar in rot fluoreszierenden Organellen lokalisiert (Abb. 4e), die allgemein als fusionierte Phagolysosomen mit saurem pH interpretiert werden (CAPO et al. 1983, D'ARCY HART et al. 1987, MOR & GOREN 1987). Von anderen Arbeitsgruppen wird jedoch berichtet, daß die Phagosomen schon vor der Fusion mit Lysosomen acidifiziert werden

(FELS & COHN 1986, FOK et al. 1987, JACQUES & BAINTON 1978, REEVES 1984) da nur dann die Fusion mit Lysosomen stattfinden kann (FOK et al. 1987). Da Acridin Orange in saurem Milieu immer rot fluoresziert, können die rot markierten quarzhaltigen Vesikel somit auch als unfusionierte, acide Phagosomen interpretiert werden.

Als auffällige Veränderung nach Inkubation mit DPL-behandeltem Quarz ist das vermehrte Auftreten von vielkernigen Riesenzellen zu verzeichnen. Diese Zellen stellen fusionierte Makrophagen im End-Reifestadium dar. Ihre Bildung kann in vitro in Makrophagenkulturen, die aus Blutmonozyten differenziert werden, durch Lymphokine (Interleukin-4) und  $\tau$ -Interferon induziert werden (KREIPE et al. 1988, McINNES & RENNICK 1988, WEINBERG et al. 1984). Vielkernige Riesenzellen sind hochaktiviert. So ist z.B. ihre Sauerstoffradikalbildung nach Zymosan-Stimulierung etwa 20 - 30fach erhöht gegenüber unfusionierten Zellen, und sie zeigen eine erhöhte Aktivität von  $\alpha$ -Naphthyl Acetat-Esterase (KREIPE et al. 1988). In vivo treten Riesenzellen in entzündlichen Granulomen auf, die z.B. 50 Wochen nach Quarzinhalation in Lungen von Meerschweinchen (SJÖSTRAND & RYLANDER 1987) und bei Tuberkulose (VAN DER RHEE et al. 1979) auftreten. Diesen Zellen kommt somit möglicherweise bei der langfristigen Schädigung der Lunge durch Quarz eine wichtige Bedeutung zu.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann folgendes zusammengefaßt werden:

In dem benutzten Modell konnte gezeigt werden, daß sich Titan(IV)Oxid in vitro nicht vollständig inert verhält, sondern Zellreaktionen in Form von Enzymfreisetzung und starker Vakuolisierung hervorruft.

Für die Hypothese einer primären Lysosomenschädigung durch die intrazelluläre Ablagerung von nativem Quarz konnten mit isolierten Lysosomen keine Hinweise gefunden werden. Weder war die Latenz isolierter, quarzhaltiger Organellen in vitro reduziert, noch konnte durch die in vitro-Inkubation von nativen Organellen mit Quarz eine Lyse induziert werden. Vielmehr deuten die Ergebnisse der Zellinkubationen auf eine primäre Schädigung der Plasmamembran hin. Der Verlust an Cathepsin B-Aktivität in den RAM-Kulturen durch Quarz könnte allerdings ein Hinweis für eine intralysosomale Veränderung des pH-Wertes sein, wodurch die Lysosomen funktionell, aber nicht morphologisch verändert werden. Die Beobachtung, daß einige Zellen in den RAM-Kulturen durch die Quarzphagozytose nicht absterben, sowie das Auftreten vielkerniger Riesenzellen in Langzeitkulturen mit DPL-behandeltem Quarz, deuten darauf hin, daß möglicherweise bestimmten Makrophagen-Subpopulationen im pathologischen Geschehen nach Quarzexposition eine wichtige Rolle zukommt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Rinderalveolarmakrophagen wurden in einem in vitro-Kultursystem für die Untersuchung der Toxizität von Quarz untersucht.

1. In Kontrollinkubationen mit Titan(IV)Oxid kommt es bei kultivierten RAM zu Enzymfreisetzungen und starker Vakuollisierung der Zellen. Somit erweist sich dieses Material in vitro als nicht vollständig inert.

2. Die Inkubation mit nativem Quarz führt zu morphologischen Veränderungen, die bereits nach kurzen Inkubationszeiten (2 Stunden) in Form von glatter Zellmembran sowie von "Löchern" auftreten. Nach längeren Inkubationszeiten mit nativem Quarz ( $\geq 47$  Stunden) sind nur noch wenige Zellen adhaerent, die sich jedoch nicht von den unbehandelten Kontrollen unterscheiden. Auffallend ist die Bildung langer Filopodien.

3. Nativer Quarz führt in Abhängigkeit der Inkubationszeit zu einem drastischen Vitalitätsverlust sowie zu einer verstärkten Freisetzung von zytoplasmatischem sowie lysosomalem Enzym (LDH und NAG) und Protein in das Kulturmedium.

4. Ein anderes Ergebnis ergibt die Untersuchung der lysosomalen sauren Protease Cathepsin B. Hier kommt es durch die Inkubation der Zellen mit nativem Quarz zu einer starken Reduzierung der Cathepsin B-Gesamtaktivität in den Kulturen. Dieser Effekt tritt nur auf, wenn der Quarz von den Zellen phagozytiert und intrazellulär abgelagert wird. Werden isolierte Lysosomen in vitro mit Quarz inkubiert, wird kein Enzymverlust beobachtet.

5. In den Zellen kommt es durch nativen Quarz zu einer Umverteilung von lysosomaler Enzymaktivität von der "ML"-Fraktion in die Fraktionen "N" und "S". Weder die Latenz noch die Dichte der isolierten Lysosomen in "N" und "ML" ist durch die vorherige Inkubation der Zellen mit Quarz beeinflusst. In "N" können anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen quarzhaltige Vesikel nachgewiesen werden.

6. Die Latenz isolierter Lysosomen aus Kontrollzellen ist durch die in vitro-Inkubation mit Quarz nicht verändert, jedoch kommt es zu einer spontanen dosisabhängigen Adsorption von lysosomalen Enzymen an die Quarzpartikel.

7. Durch die Vorbehandlung des Quarzes mit  $\alpha$ -Phosphatidylcholin-Dipalmitoyl (DPL) sind die Zellen bis zu 90 Stunden vollständig vor der zytotoxischen Quarzwirkung geschützt. Es kommt weder zur Vitalitätsabnahme noch zur Freisetzung von zytoplasmatischen und lysosomalen Enzymen in den Überstand, noch zur Umverteilung lysosomaler Enzyme in den subzellulären Fraktionen. Auch der Cathepsin B-Verlust wird durch DPL-Behandlung des Quarzes völlig verhindert.

8. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß das primäre Schadensereignis nach Quarzexposition nicht in der Desintegration quarzhaltiger Organellen sondern der Zellmembran begründet liegt. Hinweise deuten auf einen gestörten Proteinmetabolismus der Zellen durch Quarz, sowie auf eine mögliche Bedeutung resistenter Subpopulationen und der Bildung vielkerniger Riesenzellen in den Kulturen hin.



## 6. LITERATUR

- AALTO,M., TURAKAINEN,H., KULONEN,E., 1979  
Effect of silicon dioxide liberated macrophage factor on protein synthesis in connective tissue in-vitro.  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 39: 205-214
- ADAMSKI,J., SIERRALTA,W.D., JUNGBLUT,P.W., 1987  
Harvesting and separation of two populations of lysosomes from porcine endometrium.  
Eur.J.Cell.Biol. 45: 238-245
- AHLBERG,J., GLAUMANN,H., 1985  
Uptake - microautophagy - and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis.  
Exp.Molec.Pathol. 42: 78-88
- ALLISON,A.C., 1971  
Lysosomes and the toxicity of particulate pollutants.  
Arch.Intern.Med. 128: 131-139
- ALLISON,A.C., HARRINGTON,J.S., BIRBECK,M., 1966  
An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages.  
J.Exp.Med. 124: 141-154
- ALLISON,A.C., MORGAN,D.M.L., 1979  
Effects of silica, asbestos, and other particles on macrophage and neutrophil lysosomes.  
in: Lysosomes in applied biology and therapeutics (J.T.DINGLE, P.J.JACQUES, I.H.SHAW, Eds.) North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, Vol.6, 149-159
- 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
- AXLINE,S.G., COHN,Z.A., 1970  
In vitro induction of lysosomal enzymes by phagocytosis.  
J.Exp.Med. 131: 1239-1260
- BEAUFAY,H., AMAR-COSTESECA,A., 1976  
Cell fractionation techniques.  
in: Methods in membrane biology (E.D.KORN, Ed.) Plenum Press, New York, 1-100
- BECK,E.G., HOLUSA,R., JIRAKOVA,D., KYSELA,B., ROBOCK,K., SKODA,V., 1973  
Über die unterschiedliche Wirkung von zwei Quarzen im Tier- und Zellversuch und ihre physikalischen Halbleitereigenschaften.  
Staub-Reinh.Luft 33: 3-7
- BEHRENDT,H., FRIEDRICHS,K.H., GENTZ,R., KAINKA-STÄNICKE,E., 1987  
Einfluß von Quarzstaub DQ12-Inhalation auf die zelluläre Frühreaktion in der Rattenlunge. I. Elektronenmikroskopische Analyse der Broncho-Alveolären Lavage- (BAL-) Zellen.  
Silikosebericht Nordrhein-Westfalen, Bd.16, 253-264
- BIELEFELDT OHMANN,H., BABIUK,L.A., 1986  
Bovine alveolar macrophages: phenotypic and functional properties of subpopulations obtained by percoll density gradient centrifugation.  
J.Leukocyte Biol. 39: 167-181

- BIRNIE,G.D., RICKWOOD,D., HELL,A., 1973  
Buoyant densities and hydration of nucleic acids, proteins and nucleoprotein complexes in Metrizamide.  
Biochim.Biophys.Acta 331: 283-294
- BOWDEN,D.H., ADAMSON,I.Y.R., 1980  
Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages: I Kinetic studies of normal mice.  
Lab.Invest. 42: 511-517
- BOWDEN,D.H., 1984  
The alveolar macrophage.  
Environ.Health Perspect. 55: 327-341
- BRADFORD,M.M., 1976  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding.  
Anal.Biochem. 72: 248
- BROWN,G.P., MONICK,M., HUNNINGHAKE,G.W., 1988  
Fibroblast proliferation induced by silica-exposed human alveolar macrophages.  
Amer.Rev.Respir.Dis. 138: 85-89
- BRUNAUER,S., EMMETT,P.H., TELLER,E., 1938  
Adsorption of gases in multimolecular layers.  
J.Amer.Chem.Soc. 60: 309-319
- BURLEIGH,M.C., 1977  
Degradation of collagen by non-specific proteinases.  
in: Proteinases in mammalian cells and tissues (A.J.BARRETT, Ed.)  
North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, p. 285
- BURLEIGH,M.C., BARRETT,D. CROCKER,J., 1974  
Cathepsin B1: a lysosomal enzyme that degrades native collagen.  
Biochem.J. 137: 387-398
- CAPO,C., FARNARIER,C., BENOLIEL,A.-M., BONGRAND,P., DEPIEDS,R., 1983  
Dissociation between phagocytosis and phagosome-lysosome fusion.  
J.Reticuloendothel.Soc. 34: 359-369
- CARDELLA,C.J., DAVIES,P., ALLISON,A.C., 1974  
Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages.  
Nature 247: 46-48
- CHAPMAN,H.A.jr., STONE,O.L., 1984  
Comparison of live human neutrophil and alveolar macrophage elastinolytic activity in vitro: Relative resistance of macrophage elastinolytic activity to serum and alveolar proteinase inhibitors.  
J.Clin.Invest. 74: 1693-1700
- COHN,Z.A., WIENER,E., 1963  
The particulate hydrolases of macrophages. II. Biochemical and morphological response to particle ingestion.  
J.Exp.Med. 118: 1009-1023
- D'ARCY HART,P., YOUNG,M.R., JORDAN,M.M., PERKINS,W.J., GEISOW,M.J., 1983  
Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements.  
J.Exp.Med. 158: 477-492

- D'ARCY HART,P., YOUNG,M.R., GORDON,A.H., SULLIVAN,K.H., 1987  
Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis.  
J.Exp.Med. 166: 933-946
- DARNELL,J., LODISH,H., BALTIMORE,D., 1986  
Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc. New York
- DAVIES,P., ALLISON,A.C., 1984  
The secretion of lysosomal enzymes.  
in: Lysosomes in biology and pathology (J.T.DINGLE, R.T.DEAN, W.SLY, Eds.) North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, Vol. 7, 61-97
- DAVIES,R., 1980  
The effects of dusts on enzyme release from macrophages.  
in: The in vitro effects of mineral dusts (R.C.BROWN, M.CHAMBERLAIN, R.DAVIES, I.P.GORMLEY, Eds.) Academic Press, London, 67-74
- DE DUVE,C., PRESSMAN,B.C., GIANETTO,R., WATTIAUX,R., APPELMANS,F., 1955  
Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue.  
Bioch. 60:604-617
- DEHNEN,W., FETZER,J., 1967  
Zur Wirkung von Quarz auf Lysosomen in vitro.  
Naturwiss. 54: 23
- DESAI,R., RICHARDS,R.J., 1978  
The adsorption of biological macromolecules by mineral dusts.  
Environ.Res. 16: 449-464
- DESAI,R., RICHARDS,R.J., 1983  
Effects of chrysotile on a lysosomal enzyme preparation and on the hydrolytic enzyme activity of cultured alveolar macrophages.  
Environ.Health Perspect. 51: 125-130
- DETHLOFF,L.A., GLADEN,B.C., GILMORE,L.B., HOOK,G.E.R., 1987  
Quantitation of cellular and extracellular constituents of the pulmonary lining in rats by using bronchoalveolar lavage.  
Amer.Rev.Respir.Dis. 136: 899-907
- DOGRA,S., KAW,J.L., 1988  
Changes in some histochemically demonstrable enzymes in macrophages exposed to quartz dust in vitro.  
J.Appl.Toxicol. 8: 23-27
- ELO,R., MÄÄTTÄ,K., UKSILA,E., ARSTILA,A.U., 1972  
Pulmonary deposits of titanium dioxide in man.  
Arch.Path. 94: 417-424
- ESKELSON,C.D., STIFFEL,V., OWEN,J.A., CHVAPIL,M., VICKERS,A., BRENDDEL,K., 1988  
Changes in the fatty acid profile of lung, liver and serum of rats intratracheally given silica.  
Life Sci. 42: 1455-1467
- ETHERINGTON,D.J., 1976  
Bovine spleen Cathepsin B1 and collagenolytic Cathepsin: a comparative study of the properties of the two enzymes in the degradation of native collagen.  
Biochem.J. 153: 199-209

- FASSKE,E., MORGENROTH,K., 1985  
Functional morphology of phagocytosing alveolar macrophages. Long-term electron microscopic and X-ray microanalytical investigations on the rat model.  
Virchows Arch.B [Cell. Pathol.] 49: 195-208
- FELS,A.O.S., COHN,Z.A., 1986  
The alveolar macrophage.  
J.Appl.Physiol. 60: 353-369
- FERIN,J., OBERDÖRSTER,G., 1985  
Biological effects and toxicity assessment of titanium dioxides: anatase and rutil.  
Amer.Ind.Hyg.Assoc.J. 46: 69-72
- FINCH,G.L., McNEILL,K.L., HAYES,T.L., FISHER,G.L., 1987  
In vitro interactions between pulmonary macrophages and respirable particles.  
Environ.Res. 44: 241-253
- FINLEY,T.N., SWENSON,E.W., CURRAN,W.S., HABER,G.L., LADMAN,A.J., 1967  
Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease.  
Amer.Intern.Med. 66: 651-658
- FOK,A.K., UENO,M.S., AZADA,E.A., ALLAN,R.D., 1987  
Phagosomal acidification in Paramecium: effects on lysosomal fusion.  
Eur.J.Cell.Biol. 43: 412-420
- FOX,M.L., 1973  
The bovine alveolar macrophage. I. Isolation, in vitro cultivation, ultrastructure, and phagocytosis.  
Can.J.Microbiol. 19: 1207-1210
- FUBINI,B., BOLIS,V., GIAMELLO,E., 1987  
The surface chemistry of crushed quartz dust in relation to its pathogenicity.  
Inorg.Chim.Acta 138: 193-197
- GOLDER,J.P., DOE,W.F., 1981  
Biochemical markers of human mononuclear phagocyte maturation - comparison of blood monocytes, alveolar and peritoneal macrophages. in: Heterogeneity of mononuclear phagocytes (O.FÖRSTER, M.LANDY, Eds.) Academic Press, London, 289-292
- HARWOOD,J.L., DESAI,R., HEXT,P., TETLEY,T., RICHARDS,R., 1975  
Characterization of pulmonary surfactant from ox, rabbit, rat and sheep.  
Biochem.J. 151: 707-714
- HEATH,M.F., GANDY,G., JACOBSON,W., 1976  
Lysosomes in the lung.  
in: Lysosomes in biology and pathology (J.T.DINGLE, R.T.DEAN, Eds.) North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, Vol. 5, 33-58
- HEDENBORG,M., 1988  
Titanium dioxide induced chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes.  
Int.Arch.Occup.Environ.Health 61: 1-6

- HENNING,R., HEIDRICH,H.-G., 1974  
Membrane lipids of rat liver lysosomes prepared by free-flow electrophoresis.  
Biochim.Biophys.Acta 345: 326-335
- HILSCHER,W., BEHRENDT,H., IDEL,H., SEEMAYER,N.H., 1987  
Ätiologie und Pathogenese der Anthrakosilikose.  
in: Bericht des medizinischen Instituts für Umwelthygiene, Düsseldorf.  
Umwelthygiene 19: 102-130
- HIRSCH,R.S., SMITH,K., VERNON-ROBERTS,B., 1985  
A morphological study of macrophage and synovial cell interactions with hydroxyapatite crystals.  
Ann.Rheumatic Dis. 44: 844-851
- HOHL,R., 1981  
Die Entwicklungsgeschichte der Erde. Verl. Werner Dausien, Hanau/Main
- HOLT,P.F., 1957  
Pneumoconiosis, Edwin Arnold, London
- HOLT,P.F., 1987  
Inhaled dust and disease, John Wiley & Sons, New York
- JACQUES,Y.V., BAINTON,D.F., 1978  
Changes in pH within the phagocytic vacuoles of human neutrophils and monocytes.  
Lab.Invest. 39: 179-185
- JONES,B.M., EDWARDS,J.H., WAGNER,J.C., 1972  
Absorption of serum proteins by inorganic dusts.  
Brit.J.Ind.Med. 29: 287-292
- KANE,A.B., STANTON,R.P., RAYMOND,E.G., DOBSON,M.E., KNAFELC,M.E., FARBER,J.L., 1980  
Dissociation of intracellular lysosomal rupture from the cell death caused by silica.  
J.Cell Biol. 87: 643-651
- KANE,A.B., PETROVICH,D.R., STERN,R.O., FARBER,J.L., 1985  
ATP depletion and loss of cell integrity in anoxic hepatocytes and silica-treated P388D<sub>1</sub> macrophages.  
Amer.J.Physiol. 249: C256-C266
- KATUNUMA,N., WAKAMATSU,N., TAKIO,K., TITANI,K., KOMINAMI,E., 1983  
in: Proteinase inhibitors: medical and biological aspects (N.KATUNUMA, H.UMEZAWA, H.HOLZER, Eds.) Springer Verl., Berlin, 135-145
- KAW,J.L., WASEEM,M., 1988  
Reaction of macrophages activated by agents in vivo to quartz dust in vitro.  
J.Appl.Toxicol. 8: 211-216

- KEANE,M., WALLACE,W., SEERHA,M., HILL,C., VALLYATHAN,V., RAGHOOTAMA,P., MIKE,P.  
Respirable particulate surface interactions with the lecithin component of pulmonary surfactant.  
(in Vorbereitung)
- KEILOVA,H., 1971  
On the specificity and inhibition of Cathepsin D and B.  
in: Tissue proteinases (A.J.BARRETT, J.T.DINGLE, Eds.) North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, 45-68
- KING,E.J., WRIGHT,B.M., RAY,S.C., HARRISON,C.V., 1950  
Effect of aluminum on the silicosis producing action of inhaled quartz.  
Brit.J.Ind.Med. 7: 27-36
- KIRSCHKE,H., BARRETT,A.J., 1987  
Chemistry of lysosomal proteases.  
in: Lysosomes: their role in protein breakdown (H.GLAUMANN, F.J.BALLARD, Eds.) Academic Press, London, 193-238
- KLOSTERKÖTTER,W., ROBOCK,K., 1975  
New aspects on dust and pneumoconiosis research  
Amer.Ind.Hyg.Assoc.J. 36: 659-668
- KLOSTERKÖTTER,W., EINBRODT,H., 1969  
Studies on the influence of quartz on retention, penetration and elimination of an inert dust.  
Ergeb. Untersuch. Geb. Staub Silikose Bekämpfung 7: 101-104
- KOTTKE,B.A., 1987  
Role of macrophages in lipid metabolism.  
J.Cardiovasc.Pharmakol. 10 (Suppl.9): S7-S10
- KREIPE,H., RADZUN,H.J., RUDOLPH,P., BARTH,J., HANSMANN,M.-L., HEIDORN,K., PARWARESCH,M.R., 1988  
Multinucleated giant cells generated in vitro.  
Amer.J.Pathol. 130: 232-243
- KRIEGSEIS,W., SCHARMANN,A., SERAFIN,J., 1987  
Investigations of surface properties of silica dusts with regard to their cytotoxicity.  
Ann.Occup.Hyg. 31: 417-427
- LEHNERT,B.E., MORROW,P.E., 1984  
Size, adherence, and phagocytic characteristics of alveolar macrophages harvested 'early' and 'later' during bronchoalveolar lavage.  
J.Immunol.Meth. 73: 329-335
- LOCK,S.O., JONES,P.A., FRIEND,J.V., PARISH,W.E., 1987  
Extracellular release of enzymes from macrophages in vitro for measuring cellular interaction with particulate and non-particulate materials.  
Toxic.in vitro 1: 77-83
- LOWRIE,D.B., ANDREW,P.W., PETERS,T.J., 1979  
Analytical subcellular fractionation of alveolar macrophages from normal and BCG-vaccinated rabbits with particular reference to heterogeneity of hydrolase-containing granules.  
Biochem.J. 178: 761-767

- MARKS,J., 1957  
The neutralization of silica toxicity in vitro.  
Brit.J.Ind.Med. 14: 81
- MARKS,J., NAGELSCHMIDT,G., 1959  
Study of the toxicity of dust with use of the in vitro dehydrogenase  
technique  
Arch.Ind.Health 20: 383-389
- MARZELLA,L., AHLBERG,J., GLAUMANN,H., 1980  
In vitro uptake of particles by lysosomes.  
Exp.Cell Res. 129:460-466
- MASON,R.W., JOHNSON,D.A., BARRETT,A.J., CHAPMAN,H.A., 1986  
Elastinolytic activity of human Cathepsin L.  
Biochem.J. 233: 925-927
- MATTHYS,H., 1982  
Pneumologie, Springer-Verlag, Berlin
- McGUIRE,R.L., BABIUK,L.A., 1982  
In vitro culture characteristics of bovine alveolar macrophages.  
J.Reticuloendothel.Soc. 31: 251-260
- McINNES,A., RENNICK,D.M., 1988  
Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant  
multinucleated cells.  
J.Exp.Med. 167: 598-611
- METCHNIKOFF,E., 1887  
Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion de microbes.  
Ann.Inst.Pasteur 1: 321-336
- MILES,P.R., MA,J.Y.C., BOWMAN,L., 1988  
Degradation of pulmonary surfactant disaturated phosphatidylcholines  
by alveolar macrophages.  
J.Appl.Physiol. 64: 2474-2481
- MILLER,K., 1979  
Alterations in the surface-related phenomena of alveolar macrophages  
following inhalation of crocidolite asbestos and quartz dusts: an  
overview.  
Environ.Res. 20: 162-182
- MILLER,K., 1980  
The 'in vitro' effect of different mineral dusts on the mechanism of  
phagocytosis.  
in: The in vitro effects of mineral dusts (R.C.BROWN, M.CHAMBERLAIN,  
R.DAVIES, I.P.GORMLEY, Eds.) Academic Press, London, 89-95
- MOR,N., GOREN,M.B., 1987  
Discrepancy in assessment of phagosome-lysosome fusion with two  
lysosomal markers in murine macrophages infected with *Candida*  
*albicans*.  
Infect.Immunity 55: 1663-1667
- MORLAND,B., PEDERSEN,A., 1979  
Cathepsin B activity in stimulated mouse peritoneal macrophages.  
Lab.Invest. 41: 379-384

- MÜNCH,R., BECK,E.G., MANOJLOVIC,N., 1971  
Untersuchungen über die Reaktion in vitro gezüchteter Zellen nach  
kurzzeitiger Inkubation mit SiO<sub>2</sub>-Staub.  
Beitr. Silikose-Forsch. (Pneumokon.) 23: 174-205
- MYRVIK,Q.N., SOTO LEAKE,E., FARISS,B., 1961  
Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: a  
technique to procure them in a high state of purity.  
J.Immunol. 86: 128-132
- NASH,T., ALLISON,A.C., HARRINGTON,J.S., 1966  
Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity.  
Nature 210: 259-261
- NATION,J.L., 1983  
A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect  
tissues for scanning electron microscopy.  
Stain Technol. 58: 347-351
- NETTER,F.H., 1982  
Farbatlant der Medizin. IV. Atmungsorgane (P.ENDRES, Ed.) Georg  
Thieme Verl., Stuttgart, p. 208
- NEU-MÜLLER,M., 1988  
Vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel von Eisen und Plutonium  
in Hepatocyten.  
Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- NIEDER,U., 1989  
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen,  
Kernforschungszentrum Karlsruhe, persönliche Mitteilung
- NISHIMURA,Y., KATO,K., 1987  
Intracellular transport and processing of lysosomal Cathepsin B.  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 148: 254-259
- NOLAN,R.P., LANGER,A.M., FOSTER,K.W., 1985  
Particle size and chemically-induced variability in the membrolytic  
activity of quartz: preliminary observations.  
in: In vitro effects of mineral dusts (E.G.BECK, J.BIGNON, Eds.)  
Springer Verl., Berlin, Vol.G3, 39-50
- NOLAN,R.P., LANGER,A.M., ESKENAZI,R.A., HERSON,G.B., 1987a  
Membranolytic activities of quartz standards.  
Toxic.in vitro 1: 239-245
- NOLAN,R.P., LANGER,A.M., WEISMAN,I., HERSON,G.B., 1987b  
Surface character and membranolytic activity of rutile and anatase:  
two titanium dioxide polymorphs.  
Brit.J.Ind.Med. 44: 687-698
- OGHISO,Y., 1987  
Morphologic and functional heterogeneity among rat alveolar macrophage  
fractions isolated by centrifugation on density gradients.  
J.Leukocyte Biol. 42: 188-196
- OLIVER,J.M., BERLIN,R.D., 1976  
Macrophage membranes.  
in: Immunobiology of the macrophage (D.S.NELSON,Ed.) Academic Press,  
New York, 259-273

- OPIE, E.L., 1906  
The enzymes in phagocytic cells of inflammatory exudates.  
J.Exp.Med. 8: 410-436
- OTTO, K., 1971  
Cathepsins B1 and B2.  
in: Tissue proteinases (A.J.BARRETT, J.T.DINGLE, Eds.) North-Holland  
Publishing Comp., Amsterdam, 1-28
- PADILLA, M.L., GALICKI, N.I., KLEINERMAN, J., ORLOWSKI, M., LESSER, M., 1988  
High Cathepsin B activity in alveolar macrophages occurs with elastase-  
induced emphysema but not with Bleomycin-induced pulmonary fibrosis  
in hamsters.  
Amer.J.Pathol. 131: 92-101
- PARAKKAL, P.F., 1969  
Involvement of macrophages in collagen resorption.  
J.Cell Biol. 41: 345-354
- PARAKKAL, P., PINTO, J., HANIFIN, J.M., 1974  
Surface morphology of human mononuclear phagocytes during maturation  
and phagocytosis.  
J.Ultrastructure Res. 48: 216-226
- PARKES, R.W., 1982  
Occupational lung disorders, Butterworth, London
- PAROD, R.J., BRAIN, J.D., 1983  
Uptake of latex particles by pulmonary macrophages: role of calcium.  
Amer.J.Physiol. 245: C227-C234
- PILATTE, Y., BIGNON, J., LAMBRE, C.R., 1987  
Lysosomal and cytosolic sialidases in rabbit alveolar macrophages:  
demonstration of increased lysosomal activity after in vivo activation  
with Bacillus Calmette-Guerin.  
Biochim.Biophys.Acta 923: 150-155
- POWELL, D.E.B., GOUGH, J., 1959  
The effect on experimental silicosis of hypersensitivity induced by  
horse serum.  
Brit.J.Exp.Pathol. 40: 40-43
- PSCHYREMBEL, W., 1986  
Klinisches Wörterbuch, Walter de Gryter Verl.
- RAINBOW, M.R., ATHERTON, S., EBERHART, R.C., 1987  
Fluorescence lifetime measurements using total internal reflection  
fluorimetry: evidence for a conformational change in albumin adsorbed  
to quartz.  
J.Biomed.Mat.Res. 21: 539-555
- REEVES, J.P., 1984  
The mechanism of lysosomal acidification.  
in: Lysosomes in biology and pathology (J.T.DINGLE, R.T.DEAN, W.SLY,  
Eds.) North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, Vol.7, 175-199
- REISER, K.M., LAST, J.A., 1979  
Silicosis and fibrogenesis: fact and artifact.  
Toxicology 13: 51-72

- RENDALL,R.E.G., GLODSTEIN,B., COETZEE,F.S.J., 1988  
Importance of particle size in the development of silicosis.  
South African J.Sci. 84: 125-128
- RICHARDS,R.J., WHITE,L.R., EIK-NES,K.B., 1985  
Biological reactivity of different crystalline forms of titanium dioxide  
in vitro and in vivo.  
Scand.J.Work Environ.Health 11: 317-320
- RICHES,D.W.H., CHANNON,J.Y., LESLIE,C.C., HENSON,P.M., 1988  
Receptor-mediated signal transduction in mononuclear phagocytes.  
Prog.Allergy 42: 65-122
- RICKWOOD,D., BIRNIE,G.D., 1975  
Metrizamide, a new density-gradient medium.  
FEBS-Letters 50: 102-110
- SALKOWSKI,E., 1890  
Über Autodigestion der Organe.  
Z.Klin.Med. 17 (Suppl.): 77-100
- SCHIMMELPFENG,J., 1989  
Zytotoxische Wirkungen von Quarz und Asbest: ein in vitro  
Interspeziesvergleich mit Alveolarmakrophagen.  
Dissertation, Universität Karlsruhe, KfK-4624
- SCHLIPKÖTER,H.-W., 1982  
Pathogenese und Therapie der Pneumokoniose.  
Umwelthygiene 15: 207-224
- SCHNEIDER,Y.-J., TULKENS,P., TROUET,A., 1978  
Recycling of membranes during endocytosis.  
in: Transport of macromolecules in cellular systems (S.C.SILVERSTEIN,  
Ed.) Dahlem Konferenzen, Berlin, 181-196
- SCHWARTZ,W.N., BIRD,J.W.C., 1977  
Degradation of myofibrillar proteins by Cathepsins B and D.  
Biochem.J. 167: 811-820
- SEEMAYER,N.H., 1983  
Untersuchungen über die biologische Wirkung von Grubenstäuben. IV.  
Einfluß der Korngröße und des Mineralgehaltes auf die Zytotoxizität.  
Silikosebericht Nordrhein-Westfalen, Bd.14, 313-328
- SEEMAYER,N.H., 1985  
Importance of grain size and mineral content of coal mine dusts for  
cytotoxicity on macrophages in vitro.  
In: In vitro effects of mineral dusts (E.G.BECK, J.BIGNON, Eds.)  
Springer Verl. Berlin, Vol.G3, 497-504
- SEIDEL,A., WIENER,M., KRÜGER,E., WIRTH,R., HAFFNER,H., 1986  
Studies on the lysosomal binding of <sup>141</sup>Ce, <sup>239</sup>Np, <sup>239</sup>Pu and <sup>241</sup>Am in  
rat and syrian hamster liver using carrier-free electrophoresis  
Nucl.Med.Biol. 13: 515-518
- SEIDEL,A., DROSSELMEYER,E., HOTZ,G., PÄTZOLD,S., POLZER,G.,  
SCHIMMELPFENG,J., WILCZEK,W., 1988  
Biochemische Untersuchungen zum Einfluß inhalierbarer Partikel auf  
Lysosomen von Alveolarmakrophagen.  
in: Report des Kernforschungszentrums Karlsruhe, KfK-PEF 35:  
399-410

- SEIDEL, A., WILCZEK, W., PÄTZOLD, S., SCHIMMELPFENG, J., 1989  
Biochemische Untersuchungen zum Einfluß inhalierbarer Partikel auf  
Lysosomen von Alveolarmakrophagen.  
in: Report des Kernforschungszentrums Karlsruhe, KfK-PEF 50: 413-422
- SHARMA, S.D., 1986  
The macrophage.  
in: Clinics in Immunology and allergy (V. BRITTEN, H.P.A. HUGHES, Eds.)  
W.B. Saunders Comp., London, Vol. 6, 1-28
- SINGH, S.V., DAS, B., KHAN, F.M., RAHMAN, Q., VISWANATHAN, P.N., 1984  
The binding of silica to proteins from plasma and lungs of rat: in  
vitro.  
Chem. Biol. Interactions 49: 155-164
- SJÖSTRAND, M., RYLANDER, R., 1987  
Lysosomal enzyme activity and fibroblast stimulation of lavage from  
guinea pigs exposed to silica dust.  
Brit. J. Exp. Pathol. 68: 309-318
- SNELLMAN, O., 1971  
A study on the reactivity of the thiol group of Cathepsin B.  
in: Tissue Proteinases (A.J. BARRETT, J.T. DINGLE, Eds.) North-Holland  
Publishing Comp., Amsterdam, 29-43
- STAHN, R., MAIER, K.-P., HANNIG, K., 1970  
A new method for the preparation of rat liver lysosomes. Separation  
of cell organelles of rat liver by carrier-free continuous  
electrophoresis.  
J. Cell Biol. 46: 576-591
- STARKEY, P.M., BARRETT, A.J., 1973  
Human Cathepsin B1 inhibition by Alpha<sub>2</sub> Macroglobulin and other serum  
proteins.  
Biochem. J. 131: 823-831
- SÜTTERLIN, U., 1982  
Der Einfluß der Zeit auf die subzelluläre Verteilung von Transuranen  
und <sup>59</sup>Fe in der Leber von Ratte und Chinesischem Hamster.  
Dissertation, Universität Karlsruhe, KfK-3385
- TILKES, F., BECK, E.G., 1983  
Macrophage functions after exposure to nonfibrous mineral dusts.  
Environ. Health Perspect. 51: 167-171
- VALERIO, F., BALDUCCI, D., SCARABELLI, L., 1986  
Selective adsorption of serum proteins by chrysotile and crocidolite.  
Environ. Res. 41: 432-439
- VAN DER RHEE, H.J., VAN DER BURGH-DE WINTER, C.P.M., DAEMS, W.Th., 1979  
The differentiation of monocytes into macrophages, epithelioid cells  
and multinucleated giant cells in subcutaneous granulomas.  
Cell Tissue Res. 197: 355-378
- VAN FURTH, R., 1970  
The origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in  
normal mice.  
in: Mononuclear phagocytes (R. VAN FURTH, Ed.) Blackwell, Oxford,  
151-165

- VAN FURTH,R., 1981  
Current view of the mononuclear phagocyte system.  
in: Haematology and blood transfusion (F.SCHMALZL, D.HUHN,  
H.E.SCHAEFER, Eds.) Springer Verl., Berlin, Vol.27, 3-10
- VAN FURTH,R., DIESSELHOFF-DEN DULK,M.M.C., 1980  
Method to prove ingestion of particles by macrophages with light  
microscopy.  
Scand.J.Immunol. 12: 265-269
- VIGLIANI,E.C., PERNIS,B., MONACO,L., 1961  
Study of the action of quartz particles on macrophages in vitro.  
in: Inhaled particles and vapours (C.N.DAVIES, Ed.) Pergamon Press Inc.,  
London, 348
- VILIM,V., WILHELM,J., BRZAK,P., HURYCH,J., 1987  
Stimulation of alveolar macrophages by mineral dusts in vitro: luminol-  
dependent chemiluminescence study.  
Environ.Res. 42: 246-256
- WAGNER,J.C., POOLEY,F.D., GIBBS,A., LYONS,J., SHEERS,G., MONCRIEFF,C.B.,  
1986  
Inhalation of china stone and china clay dusts: relationship between  
the mineralogy of dust retained in the lungs and pathological changes.  
Thorax 41: 190-196
- WALLACE,W.E., VALLYATHAN,V., KEANE,M.J., ROBINSON,V., 1985  
In vitro biologic toxicity of native and surface modified silica and  
kaolin.  
J.Toxicol.Environ.Health 16: 415-424
- WALLACE,W.E., KEANE,M.J., VALLYATHAN,V., ONG,T.-M., CASTRANOVA,V.,  
1986  
Pulmonary surfactant interaction with respirable dust.  
Proc.:Coal Mine Dust conf. (S.PENG, Ed.) Natl.Tech.Conf.Serv.,  
Report BP86, 169380/AS, 180-187
- WEINBERG,J.B., HOBBS,M.M., MISUKONIS,M.A., 1984  
Recombinant human  $\tau$ -interferon induces human monocyte polykaryon  
formation.  
Proc.Natl.Acad.Sci. 81: 4554-4557
- WEISSMANN,G., RITA,G.A., 1972  
Molecular basis of gouty inflammation: interaction of monosodium urate  
crystals with lysosomes and liposomes.  
Nature New Biol. 240: 167-172
- WERB,Z., BANDA,M.J., JONES,P.A., 1980  
Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis  
of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases  
isolated from macrophages.  
J.Exp.Med. 152: 1340-1357
- WIBO,M., POOLE,B., 1974  
Protein degradation in cultured cells. II. The uptake of chloroquine  
by rat fibroblasts and the inhibition of cellular protein degradation  
and Cathepsin B1.  
J.Cell Biol. 63: 430-440

WIENER, M., 1988

Untersuchungen zur Hepatotoxizität von Cer: In vivo-Versuche an Ratten und in vitro-Studien mit Hepatocyten und Makrophagen. Dissertation, Universität Karlsruhe, KfK-4443

WILCZEK, W., 1989

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen, Kernforschungszentrum Karlsruhe, persönliche Mitteilung

ZIESCHE, R., WENNERS, J., BEHRENDT, H., 1985

Morphologische Untersuchungen zur initialen Membranwirkung von Quarz DQ12 in vitro. Silikosebericht Nordrhein-Westfalen, Bd.15, 331-344

ZISKIND, M., JONES, R.N., WEILL, H., 1976

Silicosis. Amer.Rev.Respir.Dis. 113: 643-665

ZITTING, A., SKYTTÄ, E., 1979

Biological activity of titanium dioxides. Int.Arch.Occup.Environ.Health 43: 93-97