



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5774B

***in vitro* Toxizität von Fulleren
C₆₀ und seinen Vorstufen –
Einfluß auf Vitalität, Zytokin-
Freisetzung und Oxidantien-
haushalt**

Th. Baierl
Institut für Toxikologie

Mai 1996

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5774 B

in vitro Toxizität von Fulleren C₆₀ und seinen Vorstufen -
Einfluß auf Vitalität, Zytokin-Freisetzung und Oxidantienhaushalt

Thomas Baierl

Institut für Toxikologie

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1996

Warenzeichen, Gebrauchsmuster, Patente und eingetragene Firmennamen sind in dieser Arbeit
nicht als solche gekennzeichnet.

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

***in vitro* Toxizität von Fulleren C₆₀ und seinen Vorstufen - Einfluß auf Vitalität, Zytokin-Freisetzung und Oxidantienhaushalt**

In der vorliegenden Arbeit wurden die *in vitro* Effekte verschiedener Kohlenstoff-Partikel (Fulleren C₆₀, Fulleren-Rohruß (FRR) und Graphit) auf die Vitalität und die Zytokin-Freisetzung aus Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) und makrophagen-ähnlich differenzierten HL-60-Zellen (HL-60-M) verglichen. Ferner wurde der Einfluß der Kohlenstoffpartikel auf den Oxidantien- und Antioxidantien-Haushalt der genannten Zellen und von humanen bronchialen Epithelzellen (BEAS-2B-Zellen) untersucht. Die Bewertung der Daten erfolgte in Bezug auf den Quarz DQ12 als pathogenen Standard.

Licht- und elektronenmikroskopisch konnte nachgewiesen werden, daß alle verwendeten Partikel sowohl von RAM als auch von HL-60-M phagozytiert werden. Eine Zerstörung der Lysosomen und eine zytotoxische Wirkung wird nur bei DQ12 beobachtet, während C₆₀, FRR und Graphit als nicht-zytotoxisch angesehen werden können.

In Bezug auf die Freisetzung von Zytokinen zeigte FRR die stärksten Effekte, während C₆₀ und Graphit als immunologisch inert angesehen werden können.

Weder C₆₀ noch Graphit oder DQ12 führten bei RAM, HL-60-M und BEAS-2B-Zellen zu einer Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (RSS). FRR war der einzige partikuläre Zusatz, der zu meßbaren Effekten in Bezug auf die Freisetzung von RSS aus RAM, HL-60-M und BEAS-2B-Zellen führte. Bei Inkubationssystemen, in denen RSS durch Zymosan induziert wurde (RAM und HL-60-M), trat eine Erniedrigung der Konzentration von Superoxid-Anionen durch FRR auf, während bei BEAS-2B-Zellen die Freisetzung von RSS durch FRR induziert wurde. Dabei konnte in Hinblick auf die RSS aus BEAS-2B-Zellen die Natur dieser RSS nicht geklärt werden.

Durch die Verwendung von zellfreien Meßsystemen konnte der Nachweis geführt werden, daß FRR *per se* zu radikalischen Reaktionen befähigt ist. Diese sind stark genug, um im Inkubationssystem mit BEAS-2B-Zellen bei diesen zu einem oxidativen Stress zu führen, was sich in Veränderungen des Gehaltes an Glutathion und Superoxid-Dismutase in den Zellen niederschlägt.

Es konnte somit festgestellt werden, daß

- keiner der Kohlenstoff-Partikel zytotoxische Eigenschaften besitzt
- einzig Fulleren-Rohruß einen (geringen) Einfluß auf die Zytokin-Freisetzung ausübt, und
- nur Fulleren-Rohruß in den Oxidantien- und Antioxidantienhaushalt der Lunge eingreifen kann.

***in vitro* Toxicity of Fulleren C₆₀ and its Precursors -
Influence on the Viability, the Release of Cytokines and the Houshold of Oxidants**

In the paper presented here the *in vitro* effects of different carbon particles (Fullerene C₆₀, Fullerene Black (FB) and graphit) on the viability and the release of cytokines from bovine alveolar macrophages (BAM) and macrophage-like differentiated HL-60-cells (HL-60-M) were compared. Furthermore the influence of these carbon particles on the balance of oxidants and antioxidants of the cells as mentioned above and of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B-cells) was investigated. The evaluation of the data was made with reference to the quartz DQ12 as a standard pathogen.

Using light- and transmission-electron-microscopy we could prove that all the particles used were phagocytosed by BAM as well as by HL-60-M. The destruction of lysosomes and cytotoxic effects only occured with DQ12 whilst C₆₀, FB and graphite can be considered as non-cytotoxic.

Neither C₆₀ nor graphite or DQ12 caused the release of reactive oxygen species (ROS) from BAM, HL-60-M or BEAS-2B-cells. FB was the only particulate that lead to measurable release of ROS from BAM, HL-60-M and BEAS-2B-cells. Using incubations where ROS were induced by zymosan (BAM and HL-60-M) a lowering of the concentration of ROS by FB occured whilst using BEAS-2B-cells the release of ROS was induced by FB. Regarding the ROS released by BEAS-2B-cells the nature of these ROS could not be identified until now.

Using cell-free systems it was possible to prove that FB is capable of reacting as a radical per se. These reactions are strong enough to lead to an oxidative stress using incubations with BEAS-2B-cells. This shows by changes of the content of both glutathion and superoxide-dismutase in the cells.

In summary it can be noted that

- none of the carbon particles have cytotoxic properties
- only Fullerene Black has a (low) influence on the release of cytokines and
- only Fullerene Black is able to interfere with the balance of oxidants and antioxidants of the lung.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	
2.1.	Untersuchungen der partikulären Zusätze	
2.1.1.	Kohlenstoff-Stäube	11
2.1.1.1.	Untersuchungen der Partikel mittels Raster-Elektronenmikroskop	11
2.1.1.2.	Untersuchungen auf metallische Verunreinigungen mit Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie	11
	Fulleren C ₆₀	12
	Fulleren-Rohruß	13
	Graphit-Staub	14
2.1.1.3.	Untersuchung des Fulleren-Rohrußes mit Röntgenstruktur-Analyse	15
2.1.2.	Quarz DQ12	17
2.2.	Hämolyse-Test	17
2.3.	Inkubationen mit Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM)	18
2.3.1.	Gewinnung der RAM	18
2.3.2.	Kultur der RAM	19
2.3.3.	Inkubationsversuche mit RAM zur Freisetzung von Zytokinen	19
	Variation der Partikel-Konzentration	20
	Variation der Zeit	20
2.3.4.	Zellzahlbestimmung und photographische Dokumentation	21
2.4.	Inkubation mit differenzierten HL-60-Zellen	21
2.4.1.	Kultur der HL-60-Zellen	22
2.4.2.	Differenzierung zu makrophagen-ähnlichen Zellen (HL-60-M)	22
2.4.3.	Inkubation der HL-60-M mit Partikeln	22
2.4.4.	Zellzahlbestimmung	23
2.5.	Kultur der BEAS-2B-Zellen	23
2.6.	Transmissions-Eletronenmikroskopie (TEM)	25
2.7.	Untersuchungen zur Freisetzung intrazellulärer Enzyme: LDH und NAG	26
2.7.1.	Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)	26
2.7.2.	Bestimmung der N-Acetyl- β -Glucosaminidase (NAG)	27
2.8.	Bestimmung des Tumor-Nekrose-Faktors-α (TNF-α) durch den WEHI-Bioassay	28
2.8.1.	Grundlagen des Verfahrens	28
2.8.2.	Kultur der WEHI 164/13-Zellen	28
2.8.3.	TNF- α Testverfahren für WEHI-164/13	29
2.9.	Bestimmung der chemoattraktiven Faktoren (Chemotaxis)	30
2.9.1.	Chemoattraktive Faktoren für RAM	30
2.9.2.	Chemoattraktive Faktoren für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten	32

2.10.	Zytokin-Quantifizierung mit ELISA	33
2.10.1.	Allgemeines	33
2.10.1.1.	TNF- α	33
2.10.1.2.	IL-8	34
2.10.1.3.	PDGF-AB	34
2.10.1.4.	bFGF	34
2.10.2.	Adsorption von Zytokinen an Kohlenstoff-Partikel am Beispiel TNF- α	35
2.11.	Untersuchungen zum Oxidantien-/Antioxidantienhaushalt <i>in vitro</i>	35
2.11.1.	Nachweise zur <i>in vitro</i> Produktion von Oxidantien	35
2.11.1.1.	Oxidantien-Nachweis mit 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H ₂ DCF-DA)	35
	Versuchsansatz für RAM	36
	Versuchsansatz für HL-60-Makrophagen	37
	Versuchsansatz für BEAS-2B-Zellen	37
2.11.1.2.	Oxidantiennachweis mit Cytochrom C	37
2.11.2.	Bestimmung von Antioxidantien	39
2.11.2.1.	Bestimmung des Glutathion (GSH)	39
2.11.2.2.	Bestimmung der Superoxid-Dismutase (SOD)	40
2.12.	Untersuchungen zur unspezifischen Radikalbildung durch C₆₀ und Rohrß im zellfreien System	41
2.12.1.	Das α -Keto-S-Methyl-Buttersäure (KMB)-Modell	41
2.12.2.	Die Crocin- "Bleichung"	43
2.13.	Datenpräsentation und Statistik	43
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Licht- und transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen	45
3.2.	Hämolyse	45
3.3.	Vitalität, Enzym- und Zytokinfreisetzung aus Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM)	45
3.3.1.	Variation der Partikel-Konzentrationen	46
3.3.1.1.	Einfluß auf die Zellzahl	46
3.3.1.2.	Einfluß auf die Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)	46
3.3.1.3.	Einfluß auf die Freisetzung von Tumor-Nektose-Fator- α (TNF- α)	46
3.3.1.4.	Einfluß auf die chemoattraktive Wirkung (CW) der Inkubations-überstände für RAM	46
3.3.2.	Variation der Inkubationszeiten	47
3.3.2.1.	Einfluß auf die Zellzahl	47
3.3.2.2.	Einfluß auf die Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)	47
3.3.2.3.	Einfluß auf die Freisetzung der N-Acetyl- β -Glucosaminidase (NAG)	48
	Zeitlicher Verlauf der NAG-Freisetzung unter normalen Inkubationsbedingungen	48
	Verlauf der NAG-Freisetzung nach dem Entfernen nicht phagozytierter Partikel	48
3.3.2.4.	Einfluß auf die Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)	49
3.3.2.6.	Einfluß auf die chemoattraktive Wirkung (CW) der Inkubations-überstände für RAM	49

3.3.2.6.	Einfluß auf die chemoattraktive Wirkung (CW) der Inkubationsüberstände für neutrophile Granulozyten	49
3.4.	Vitalität und Zytokinfreisetzung aus makrophagenähnlich-differenzierten HL-60-Zellen (HL-60-M)	50
3.4.1.	Einfluß auf die Zellzahl	50
3.4.2.	Einfluß auf die Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)	50
3.4.3.	Einfluß auf die Freisetzung der Zytokine	51
	Einfluß auf die Freisetzung von TNF- α	51
	Einfluß auf die Freisetzung von IL-8	51
	Einfluß auf die Freisetzung von PDGF	51
	Einfluß auf die Freisetzung von bFGF	52
3.5.	Induktion von Oxidantien und Antioxidantien	52
3.5.1.	Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (RSS) aus RAM	52
3.5.2.	Freisetzung von RSS aus HL-60-Makrophagen	53
3.5.3.	Fluoreszenz-Induktion durch Partikel-Dispersionen im zellfreien Ansatz	54
3.5.4.	Freisetzung von Oxidantien aus BEAS-2B-Zellen	54
	Ergebnisse des Oxidantiennachweises mit Cytochrom C	55
3.5.5.	Produktion von Antioxidantien durch BEAS-2B-Zellen	55
	Glutathion	55
	SOD	55
3.6.	Untersuchungen zur unspezifischen Radikalbildung im zellfreien System	55
3.6.1.	Die Abspaltung von Ethen aus α -Keto-S-Methyl-Buttersäure (KMB)	55
3.6.2.	Die "Bleichung" von Crocin	56
4.	Diskussion	57
5.	Zusammenfassung	67
6.	Literatur	69
7.	Bezugsquellen für Reagenzien, sonstiges Labormaterial und Laborgeräte	83
8.	Abbildungen	87

Abkürzungsverzeichnis

AM	Alveolarmakrophage
Aq. bidest.	Aqua bidestillata (vollentsalztes Wasser, Widerstand > 10 MΩ cm ⁻¹)
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
C ₆₀	Fulleren C₆₀
CB	Carbon Black
CytC	Cytochrom C
CP	chemotaktisches Potential
CW	chemoattraktive Wirkung
DCF	Dichlorofluorescein
DQ12	Quarz DQ12
DR	Dieselfuß
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sandwich Assay
Fa.	Firma
FE	Fluoreszenz-Einheiten
FKS	fötales Kälberserum
FZK	Forschungszentrum Karlsruhe
GSH	Glutathion
GSH _{tot}	Gesamt-Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat
HBS	HEPES buffered saline
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HL-60-M	HL-60-Zellen, makrophagen-ähnlich differenziert
HVT-HZ	Hauptabteilung Versuchstechnik - Heiße Zellen
i.d.R.	in der Regel
IL-8	Interleukin-8
IMF	Institut für Materialforschung
KGM	Keratinocyte Growth Medium
KM	Kultur-Medium
KMB	α-Keto-S-Methyl-Buttersäure
KPP	Kalium-Phosphat-Puffer
KW	Kohlenwasserstoff(e)
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute(n)
MTT	3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid

NADPH	N icotinamid- A denin- D inucleotide- P hosphate h ydrate
NAG	N - A cetyl- β - G lucosaminidase
O_2^-	S uperoxid- A nionradikal
P/S	P encillin/ S treptomycin
PBS	P hosphat B uffered S aline
PDGF	P latelet D erived G rowth F actor
rcE	relative chemotaktische E inheiten
RAM	R inder- A lveolarmakrophagen
REM	R aster- E lektronen m ikroskop
RPMI	R oswell P ark M emorial Institut (Medium)
RR	Fulleren- R ohruß
RSS	reaktive S auerstoffspezies
SBIT	S oy B ean T rypsin I nhibitor
SDS	S odiumdodecyl S ulfate
sh.	siehe
SOD	S uperoxid- D ismutase
TEM	T ransmissions- E lektronen m ikroskop
TNF	T umor- N ekrose- F aktor- α
TNF- α	T umor- N ekrose- F aktor- α
u.A.	u nter A nderem
U	U nit
vgl.	vergleiche
z.B.	zum B eispiel
z.T.	zum T eil
ZAS	z ymosan- a ktiviertes S erum

1. Einleitung

Fullerene stellen neben Graphit und Diamant die dritte bekannte Kohlenstoff-Modifikation dar. Unter dem Pseudonym Daedalus formulierte Jones (1966) (zitiert nach Kroto (1994)) bereits 1966 theoretische Überlegungen zur Bildung von Graphit-Ballonen während der pyrolytischen Graphitherstellung. Osawa (1970) (zitiert nach [Creasy (1993)]) publizierte 1970 das erste Bild eines C_{60} -Balls aus 5- und 6-Ecken, jedoch wurde C_{60} erst 1985 erstmals experimentell massenspektrographisch identifiziert [Kroto et al. (1985)]. Durch die Arbeiten von Krätschmer et al. (1990) wurden makroskopische Mengen von C_{60} und höheren Kohlenstoffkugeln verfügbar.

Fullerene sind dadurch gekennzeichnet, daß sie aus 12 Kohlenstoff-Fünfecken und mindestens 20 Sechsecken aufgebaut sind. Stabile Fullerene folgen der Formel $60 + 6k$ ($k=0, 2, 3, 4, \dots$), so daß das Fulleren C_{60} mit 60 Kohlenstoff-Atomen das kleinste stabile Fulleren darstellt. Der Trivialname "Fulleren" oder "Buckminsterfulleren" für C_{60+6k} wurde *in memoriam* des U.S. amerikanischen Architekten Prof. R. Buckminster Fuller gewählt, der durch zahlreiche geodätische Kuppelbauten berühmt wurde. Da bereits der vollständige IUPAC-Name des einfachsten Fulleren C_{60} mit

Hentriacontacyclo[29,29,0,02,14,03,12,04,59,05,10,06,58,07,55,08,53,09,21,011,20,013,80,015,30,016,28,017,25,019,24,022,52,023,50,026,49,027,47,029,45,032,44,033,60,034,57,035,43,036,56,037,41,038,54,039,51,040,48,042,46]hexacontan

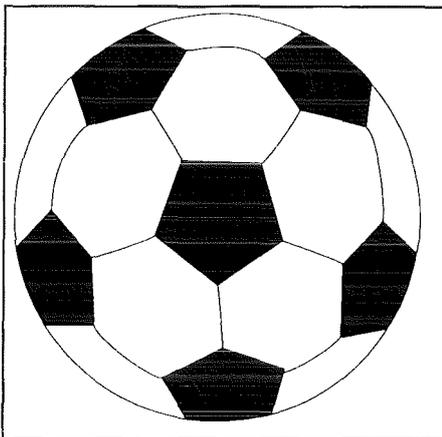


Abb. 1: C_{60} -Molekül
Zur Illustration sind die Fünfecke schwarz unterlegt. Doppelbindungen sind nicht gezeigt.

für die Praxis zu unhandlich ist, hat sich im Sprachgebrauch die Bezeichnung "Fulleren-60" oder "Fulleren C_{60} " durchgesetzt. Ist der Sinnzusammenhang deutlich, so wird auch auf " C_{60} " verkürzt, obwohl Fulleren C_{60} nur eines von 1 812 möglichen C_{60} -Isomeren darstellt [Castells (1994)]. Der Durchmesser des Molekülgerüsts von C_{60} beträgt 0,7 nm, der der Elektronenwolke ca. 0,3 nm, so daß ein Molekül C_{60} etwa 1 nm Durchmesser hat.

Hergestellt werden Fullerene nach der Methode von Krätschmer et al. (1990) durch kontrolliertes, halbautomatisches Abbrennen von hochreinen Graphitstäben im wassergekühlten Lichtbogenofen bei verdünnter Helium-Atmosphäre. Als Zwischenprodukt erhält man hierbei einen "Fulleren-Rohruß". Da sich unter den

gewählten Bedingungen neben C_{60} auch C_{70} und andere Cluster bilden, ist eine chromatographische Aufreinigung der in Benzol oder Toluol gelösten Verbindungen notwendig. Die Lösungen der Fullerene sind gefärbt (C_{60} in Benzol z.B. violett-rot). Besonders C_{60} zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität und Elastizität aus. An Luft und intensivem Licht oxidieren Fullerene und zersetzen sich, so daß Fullerenpräparate nur begrenzt haltbar sind bzw. dunkel und unter Inertgas gelagert werden sollten [Werner et al. (1993b)]. Fullerene sind hydrophob und daher nur in organischen Lösungsmitteln (neben dem genannten Benzol und Toluol auch z.B. Kohlenstoffdisulfid) löslich.

Aufgrund der immer weiter verbesserten Fulleren-Analytik wurden inzwischen Fullerene auch in "natürlichen" Vorkommen nachgewiesen: Daly et al. (1993) wiesen Fullerene in einem Fulgurit, dem geologischen Produkt eines Blitzeinschlags, nach. Becker et al. (1994) fanden C_{60} und C_{70} im dem 1,85 Milliarden Jahre altem Meteoriten-Einschlagskrater von Sudbury (Ontario, Kanada). Dieser Einschlagskrater, dessen Fullerene vermutlich eher von einem kohlenstoffreichen Meteoriten als von irdischen Kohlenstoff stammen, gilt als größtes natürliches Vorkommen von Fullerenen. Heymann et al. (1994) wiesen C_{60} und C_{70} in der iridium- und rußreichen

Grenzschrift zwischen Kalkstein aus der Kreidezeit und Schiefer aus dem Tertiär nach. Sie interpretieren diesen Befund als weiteres Indiz für die oft diskutierte Theorie, daß vor 65 Millionen Jahren ein Meteoriteneinschlag weltweit heftige Wald- und Buschbrände verursacht hat. Auch im Ruß von normalen Haushaltskerzen wurden Fullerene zwischenzeitlich nachgewiesen [Heymann et al. (1994)].

Da Fullerene in ihrem Inneren hohl sind, wird versucht, das Molekül durch den Einbau von Metallen oder anderen Atomen zu dotieren ("Innendotierung", Schreibweise $X@C_{60}$). Beispiele für derartige endohedrale Metallofullerene sind $La@C_{60}$ und $La@C_{82}$ [Edelmann (1995)]. Derartige Innendotierungen sind - rein theoretisch - mit jedem Element des Periodensystems möglich, wobei $X@C_{82}$ wesentlich stabiler als die nicht aus der Lösung isolierbaren $X@C_{60}$ sind. Eine andere angedachte und im Laboratoriumsmaßstab für ^{159}Gd und ^{161}Tb bereits verwirklichte Anwendung ist der Einschluß radioaktiver Atome in C_{60} [Kikuchi et al. (1994)], um einen molekularen Tracer mit definierter Größe und Form zu erhalten.

Die Einlagerung von Alkali-Atomen in das Kristallgitter von C_{60} führt zu supraleitenden C_{60} Kristallen. Hebard (1992) gelang dies bei K_3C_{60} , Tanigaki et al. (1991) bei $Cs_2Rb_1C_{60}$. Beide exohedrale Verbindungen weisen supraleitende Eigenschaften auf (K_3C_{60} hat eine Sprungtemperatur von 19,3 K, $Cs_2Rb_1C_{60}$ von etwa 33 K).

In der medizinischen Grundlagenforschung wurde ein C_{60} -Derivat synthetisiert, das bereits im Bereich von wenigen Mikromol *in vitro* das Schlüßelenzym der AIDS-Viren HIV-1 und HIV-2, die "Reverse Transkriptase", hemmt und dabei nicht zytotoxisch ist [Sijbesma et al. (1993), Friedman et al. (1993)]. Ein weiteres C_{60} -Derivat, das von Toniolo et al. (1994) vorgestellt wurde, besitzt neben einer schwachen Hemmwirkung auf die reverse Transkriptase von HIV eine bemerkenswerte chemotaktische Aktivität für humane Monozyten. C_{60} ist *in vitro* auch in der Lage, spezifisch die Differenzierung von Chondrozyten aus Zellen der Extremitätenknospen von Rattenembryonen zu induzieren [Tsuchiya et al. (1995)]. Bei allen Arbeiten aus der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung wurde festgestellt, daß C_{60} und die verwendeten C_{60} -Derivate keine oder nur eine geringe Zytotoxizität besitzen. Durch Sakai et al. (1995) wird dies präzisiert: Sie geben an, daß bei C_{60} bis $37,5 \text{ mg ml}^{-1}$ keinerlei Zytotoxizität im BALB/3T3-Testsystem beobachtet wurde. Ferner konnten sie weder eine Initiation noch eine Promotion der Transformation von BALB/3T3-Zellen nach Inkubation mit C_{60} nachweisen.

In der Chemie wird C_{60} z.B. als Photooxidans zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff verwendet [Orfanopoulos und Kambourakis (1995)].

1984 gab es noch keine Veröffentlichung zum Thema Fullerene, während alleine 1991 bereits über 500 Arbeiten und Artikel publiziert wurden [Braun (1992)]. Dies gibt einen deutlichen Hinweis auf das theoretisch fast unbegrenzt erscheinende Forschungs- und Anwendungspotential der Fullerene.

Wie oben bereits erwähnt, entsteht bei der Herstellung von C_{60} durch den Abbrand der Graphit-Stäbe ein "Ruß" als Zwischenprodukt. Dieser "Fulleren-Rohruß" (RR), der auch als "Fullerene Black" bezeichnet wird, ist ein amorphes Kohlenstoffpulver, das etwa 10% C_{60} enthält [Werner et al. (1993a)]. Daneben finden sich in diesem Material auch 1-3% höhere Fullerene und Reste des Graphit, aus dem der RR hergestellt wurde ([Atamny et al. (1993), Werner et al. (1993a)] und eigene Beobachtungen (vgl. 2.1.1.3.)). Im Raster-Tunnelmikroskop konnten in RR zwei deutlich unterscheidbare Partikelarten gefunden werden: Sphärische Objekte mit einem Durchmesser von 2 - 3 nm und (in geringerem Umfang) zylindrische Objekte mit einer Länge von 20 - 50 nm und einem Durchmesser von 4 nm [Atamny et al. (1993)].

Der geringe Gehalt an C_{60} bedingt, daß bei der Produktion von C_{60} vergleichsweise große Mengen RR anfallen. Diese Mengen werden z.T. offen gehandhabt [Becke (1993), Fa. High-Tech-Carbon, pers. Mitteilung], so daß es zur Inhalation des RR kommen kann. Aus diesem Grund wurde auch dieses Material in die Untersuchungen mit einbezogen.

Im Umgang mit Partikeln gibt es prinzipiell zwei wichtige Expositionsmöglichkeiten: **Hautkontakt** und **Inhalation**. Die Haut ist hierbei ein relativ unkritisches Organ, da sie mit ca. $1,6 - 2 \text{ m}^2$ gegenüber der Lunge mit ca. 80 m^2 eine vergleichsweise geringe Oberfläche besitzt.

Außerdem ist die Haut besonders durch das verhornende Plattenepithel (Stratum corneum) der Epidermis gut vor dem Eindringen solider Partikel geschützt.

Von [Nelson et al. (1993)] wurden die Effekte von C₆₀, der in Benzol gelöst war, mit den Effekten von Benzol alleine verglichen. Die Applikation der C₆₀/Benzol-Lösung auf Mäusehaut-Epidermis erbrachte hierbei keine akuten toxischen Effekte im Vergleich zu Benzol alleine.

Nach dem Eindringen solider Partikel in den Körper werden diese von Lymphozyten phagozytiert. Moussa et al. (1995) inkubierten daher C₆₀-Kristalle *in vitro* mit Leukozyten, um Effekte von C₆₀-Partikeln auf diese Zellen zu untersuchen. Sie konnten elektronenmikroskopisch nachweisen, daß C₆₀-Partikel phagozytiert werden, fanden dabei jedoch ebenfalls keine besondere Zytotoxizität.

Der zweite wichtige Expositionspfad des Organismus für Partikel - die Atemwege - wurden bislang in Zusammenhang mit C₆₀ kaum betrachtet. Außer den eigenen Veröffentlichungen [Adelmann et al. (1994), Baiertl (1992), Baiertl et al. (1994)] gibt es bislang keine *in vivo* oder *in vitro* Untersuchungen zu immunologischen Effekten von C₆₀ und RR nach **Inhalation**. Das umfangreiche Schrifttum zur Pathogenese von Lungenerkrankungen durch Inhalation von Partikeln gibt aber einen sehr deutlichen Hinweis darauf, wie wichtig Kenntnisse über das Verhalten von Partikeln nach Inhalation sind.

Holt (1982) zeigte bei *in vivo* Versuchen mit Meerschweinchen, daß sehr feine, reine Kohlenstoff-Stäube vollständig von AM aufgenommen werden. Die Zahl der Makrophagen im Lungengewebe steigt nach der Inhalation hierbei zunächst an, sinkt dann aber im Laufe der Zeit wieder auf den Normalwert ab. Die Bildung einer Fibrose, wie sie von Quarz bekannt ist, wird bei diesen Versuchen nicht beobachtet. Ebenso finden Adamson und Prieditis (1995) nach Instillation von **Carbon Black** (CB) zwar einen Anstieg der Zahl der Alveolarmakrophagen, jedoch keine Hinweise auf fibrogene Eigenschaften. Andere Arbeiten an Mäusen von Jakob und Hemenway (1994) erbrachten bei Inhalationsstudien mit CB keine signifikanten inflammatorischen Effekte. Ähnliche Ergebnisse bringt die Veröffentlichung von Anderson et al. (1989): im Unterschied zu den Ergebnissen mit Quarz finden die Autoren bei *in vivo*-Expositionen von Ratten mit Graphit-Staub keine zytotoxischen und proinflammatorischen Effekte.

Darüberhinaus gibt es viele weitere Untersuchungen zur Toxikologie von CB, einem industriell hergestellten Ruß, der z.B. in der Reifen-Produktion eingesetzt wird [z.B. Adamson und Prieditis (1995), Gardiner et al. (1993), Rivin (1993)]. Je nach Herkunftsland kann Carbon Black aber nicht unwesentlich mit Metallen verunreinigt sein: so sind beispielsweise bis zu 4 000 ppm Cadmium, 400 ppm Quecksilber oder 4 000 ppm Zink möglich [Rivin (1993)]. Dies erschwert eine vergleichende Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeiten.

Ein Ansatzpunkt, besonders der Umweltforschung, ist **Dieseluß** (DR), der Kohlenwasserstoffe enthalten kann. Nikula et al. (1995) fanden in ihrem Expositionsmodell mit F344 Ratten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Karzinogenität von Dieseluß und CB, obwohl bei DR typischerweise 5-30% der Masse aus Kohlenwasserstoffen (KW) bestehen kann. Mit der Schlußfolgerung "der organische Anteil von Dieseluß scheint keine wichtige Rolle in der Karzinogenität von DR ... zu spielen" steht diese Gruppe jedoch in Widerspruch zu Claxton (1983), der im Ames *Salmonella* Test die Mutagenität des KW-Anteil aus Dieseluß nachgewiesen hatte. Wallace et al. (1987) stellen sogar fest, daß Lecithin-Surfaktant "in der Lage ist, effizient mutagene Agenzien von Partikeln zu Test-Zellen zu reichen". Rivin (1993) hingegen weist darauf hin, daß "KW, die stark an Kohlenstoff adsorbiert sind, *in vitro* in geringem Maße eluiert werden und nicht ... bioaktiv sind". Die wissenschaftliche Diskussion um die Karzinogenität von Dieseluß geht dabei bereits bis mindestens 1955 [McClellan (1987)] zurück, ohne daß ein Konsens erreichbar scheint.

DR-Partikel katalysieren in Gegenwart von H₂O₂ und Cystein die Bildung von Hydroxyl-Radikalen (•OH) und verursachen so Lipidperoxidationen [Vogl und Elstner (1989)]. Außerdem ist DR photoaktiv [Hippeli und Elstner (1989)], eine Eigenschaft, die auch von C₆₀ bekannt ist: er kann in wäßrigen Lösungen Singulett-Sauerstoff bilden [Orfanopoulos und Kambourakis (1995)].

Radikalische Sauerstoffverbindungen ihrerseits können aber Lungenschäden wie Fibrosen oder Emphyseme induzieren [Burdon und Rice-Evans (1989), Cantin und Crystal (1985), Gillissen et al. (1995)], so daß eine Untersuchung von C₆₀ und der damit zusammenhängenden Stoffe notwendig erscheint. Die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch C₆₀ könnte darüberhinaus auch zu zytotoxischen Effekten führen [Moussa et al. (1995)]. Auch die Flugasche aus kohlegefeuerten thermischen Kraftwerken ("Coal) Fly Ash") wird als möglicher Auslöser von Lungenerkrankungen diskutiert. Hierzu gibt es sowohl *in vitro* Untersuchungen als auch epidemiologische Studien [Mumford et al. (1987)]. Dogra et al. (1995) berichten von Versuchen mit Ratten, bei denen nach inhalativer Exposition mit Fly Ash eine lokale Unterdrückung der Immunfunktion in der Lunge auftrat. Diese Immundefizienz war jedoch reversibel. Fly Ash steht auch im Verdacht, Pneumokoniosen auszulösen [Golden et al. (1983)]. Darüberhinaus wurde auch der Einfluß der Flugasche von Müllverbrennungsanlagen auf die Alveolarmakrophagen von Kaninchen untersucht und gegen den Quarz DQ12 verglichen. Gulyas et al. (1988) stellten dabei fest, daß DQ12 die Freisetzung des Enzyms Elastase kaum, die Aschen hingegen z.T. erheblich beeinflussen. Bei diesen Befunden könnte der Metallgehalt der Aschen (wie z.B. As, Cu und Hg) ein Rolle spielen.

In der Lunge sind zwei große Zellpopulationen bei der Untersuchung toxikologischer Effekte besonders wichtig: die Alveolarmakrophagen, die Partikel aufnehmen, und die Epithelzellen, die die Grenzschicht der Lunge zur Atemluft hin darstellen. Beide Zellarten wurden die Untersuchungen einbezogen: native Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) und makrophagenähnlich differenzierte HL-60-Zellen (HL-60-M) für die Rolle der Makrophagen, sowie BEAS-2B-Zellen als Epithelzellen.

Alveolarmakrophagen (AM) stammen von einer Vorläufer-Population aus dem Knochenmark ab, wandern in die Alveoli ein und können zumindest beim Menschen dort weiter proliferieren [Thomas et al. (1976)]. Blussé van oud Alblas und van Furth (1979) stellen dagegen fest, daß bei Mäusen die Anzahl der Makrophagen in der Lunge nur durch Einwanderung von Monozyten aus dem Blut aufrecht erhalten würde, und sich AM nicht weiter teilen. Die Aufrechterhaltung des "steady state" scheint daher speziesabhängig zu sein.

AM halten die dem Luftraum zugewandte Seite der Alveoli "sauber und steril" [Brain (1980)], indem sie sowohl Bakterien als auch anorganische Partikel aufnehmen und entweder abbauen oder *in situ* akkumulieren [Witmer-Pack et al. (1993)]. Dabei setzen sie eine Reihe von Botenstoffen des Immunsystems (Zytokine, sh. unten) oder reaktiven Intermediaten (z.B. das Superoxid-Anionradikal, O₂⁻, sh. unten) frei, die direkt oder indirekt zu pathogenen Veränderungen der Lunge führen können. Die Spannbreite dieser Veränderungen geht hierbei von fibrotischen Veränderungen bis hin zu Emphysemen und werden in den jeweiligen zugehörigen Kapiteln etwas genauer beleuchtet.

Wesentliche Elemente der Entstehung von Fibrosen nach Inhalation von Partikeln wurden z.B. durch den Vergleich der Freisetzung von Zytokinen aus AM *in vitro* und dem Vergleich der Zytokine *in vivo* erarbeitet: Makrophagen setzen z.B. *in vitro* nach Inkubation mit Partikeln einen Faktor - den PDGF (sh. unten) - frei, der chemoattraktiv und proliferierend auf Fibroblasten wirkt [Schapira et al. (1991), Peterson et al. (1994)]. Die Einwanderung von Fibroblasten in die Lunge und ihre Proliferation sind typisch für die Entwicklung einer Fibrose: tatsächlich läßt sich auch *in vivo* nachweisen, daß bei Patienten mit fibrotischen Lungenerkrankungen PDGF freigesetzt wird [Antoniades et al. (1990), Martinet et al. (1987)]. Schimmelpfeng (1989) stellte außerdem in einem Vergleich verschiedener Spezies (u.a. Mensch und Rind) fest, daß die Antwort der AM unabhängig von der Spezies z.B. auf Quarz qualitativ vergleichbar ist. Aus Rinderlungen lassen sich bis zu etwa 1×10^9 AM isolieren, so daß hier ausreichend Zellmaterial für Versuchsreihen gewinnbar ist.

HL-60-M fanden etwas später Eingang in die Literatur. Sie sind anders als Rinder-Alveolarmakrophagen keine primären Zellen, haben aber den Vorteil, daß sie hinsichtlich ihrer Physiologie und Sekretionsprodukte sehr gut charakterisiert sind. Außerdem können ihre Zytokine mit den Methoden der Human-Medizin genau erfaßt werden.

Anfängliche Arbeiten (z.B. [Schmidt (1992)]) sprechen zwar davon, daß HL-60-M "kein geeignetes Modell ... sind", doch wurden in diesen Arbeiten die HL-60-Zellen mit 12-O-Tetradecanolphorbol-13-acetat (TPA) zu Makrophagen differenziert. In anderen Arbeiten [Baierl (1992), Lind (1994), Mosbach (1994)] wurden die HL-60-Zellen mit Calcitriol (vgl. 2.4.2.) zu Makrophagen differenziert. In diesen Arbeiten wird deutlich, daß calcitriol-differenzierte HL-60-M in ihren immunologischen Antworten auf Stimuli mit RAM vergleichbar sind.

BEAS-2B Zellen sind immortalisierte humane Bronchial-Epithelzellen [Reddel et al. (1995)]. Sie sind stellvertretend für die zweite wichtige Zellpopulation der Lunge, die **Epithelzellen**, gewählt. In den Atemwegen lassen sich mindestens 12 verschiedene Epithelzell-Arten unterscheiden [Breeze und Wheeldon (1977)], wobei nicht alle Arten in allen Spezies zu finden sind. Die Epithelzellen stellen eine Art Barriere dar, die inhalierte Partikel oder Krankheitserreger vom Eindringen in den Organismus abhält. Normalerweise bilden die zilienträgenden Epithelzellen des Flimmerepithels etwa die Hälfte der bronchialen Epithelzellen. In den proximalen Luftwegen sind Basalzellen charakteristisch. In den tieferen Atemwegen wird das Epithel immer dünner, und es sind überwiegend Clara-Zellen zu finden. Die Epithelzellen bilden eine Reihe von Sekretionsprodukten: TNF- α (sh. unten) stimuliert z.B. die Sekretion von Mucin [Fischer et al. (1995)], das die Atemwege auskleidet und feuchthält.

Die Epithelzellen haben in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit erregt, als ihr Einfluß auf den Oxidantien- und Antioxidantienhaushalt der Lunge deutlich wurde [Gillissen et al. (1995), Kinnula et al. (1994), Mossman et al. (1986)].

Oxidantien greifen die Permeabilität der Epithelzellen an: Durch den Einfluß von Oxidantien kommt es zu Schäden an den Zell-Zell-Grenzen ("Tight junctions") und zu einer Hemmung der Zellproliferation [Yamaya et al. (1995)]. Durch den Zusammenbruch der Barriere-Funktion des Bronchialepithels wird dann das Eindringen von Pathogenen etc. in den Organismus ermöglicht. Ob die Oxidantien hierbei aus den Zellen des Immunsystems (z.B. Alveolarmakrophagen) oder exogenen Quellen (z.B. Zigarettenrauch) kommen, ist relativ unwichtig. Um Schädigungen durch Oxidantien und ihren Folgen vorzubeugen, hat der Organismus die Möglichkeit, Antioxidantien zu bilden.

Zu diesen Antioxidantien, die von Epithelzellen gebildet werden können, gehören neben Katalase besonders die Superoxid-Dismutase und das Glutathion, die beide an späterer Stelle noch weiter vorgestellt werden.

Um *in vitro* die akute **zytotoxische Wirkung** von Partikeln beurteilen zu können, gibt es mehrere Möglichkeiten.

Eine dieser Möglichkeiten ist die Analyse der Zahl vitaler Zellen nach Inkubationsende durch Behandlung mit **Trypanblau** [Hanks und Wallace (1958)]. Der Farbstoff dringt durch die zerstörte Zellmembran toter Zellen in die Zellen ein und färbt das Zytoplasma blau. Im Mikroskop können dann blaue (tote) Zellen und nicht-blaue (vitale) Zellen ausgezählt und die Vitalität der Kultur berechnet werden (vgl. 2.3.4.).

Biochemische Marker für die Zytotoxizität von partikulären und apartikelären Stimuli sind die Freisetzung des intrazellulären Enzyms **Lactat-Dehydrogenase** (LDH) und - besonders in Hinblick auf phagozytierende Zellen - des intralysosomalen Enzyms **N-Acetyl- β -Glucosaminidase** (NAG). Beide Parameter sind in der Literatur gut eingeführt.

So verwendet z.B. Seemayer (1985) die Freisetzung von **LDH** aus Alveolarmakrophagen als einen Parameter bei der vergleichenden Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Stäuben aus Kohlenminen mit dem Quarz DQ12. In dieser Arbeit zeigt sich auch die sehr gute Übereinstimmung zwischen der Abnahme der Zahl lebender Zellen und dem Anstieg der LDH im Inkubationsüberstand im Laufe der Inkubation.

NAG wird bei Zerstörung der Lysosomen aus diesen freigesetzt und kann daher zur Beurteilung der Frage, ob ein Partikel nach der Aufnahme die Lysosomen schädigt, herangezogen werden. Drosselmeyer et al. (1988) untersuchten verschiedene Quarze und stellten dabei fest, daß extrem feiner Quarz DQ12 zur stärksten NAG-Freisetzung führte. In Anschlußexperimenten konnten dann

Schimmelpfeng et al. (1989) den Beweis führen, daß durch das Bedecken der Quarz-Partikel mit Dipalmitoyl-Lecithin (DPL) die NAG-Freisetzung deutlich zurückging. Dies wird darauf zurückgeführt, daß DPL die reaktiven Oberflächengruppen von DQ12 abdeckt und so die Lysosomen nicht von innen heraus zerstört werden. In beiden Arbeiten zeigt sich ebenfalls ein klarer Zusammenhang zwischen der Abnahme der Zellzahl und der Zunahme von NAG sowie von LDH im Überstand.

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems, die an der Regulation der Antwort des Organismus auf immunologische Reize beteiligt sind.

Bei diesen Zytokinen unterscheidet man "frühe" und "späte" Zytokine. Zu den "frühen" Zytokinen gehört z.B. der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), der bereits nach 3 - 4 h ein Maximum zeigt [*Bienhoff und Allen (1985)*].

"Späte" Zytokine sind z.B. Interleukin-8 (IL-8) oder der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [*Schapira et al. (1991)*].

Je nach der Art der Zellen können diese Zytokine nur über biologische Methoden anhand ihrer Wirksamkeit bestimmt werden (z.B. TNF aus Rinder-Makrophagen) oder direkt über chemisch-physikalische Verfahren quantifiziert werden (z.B. IL-8 aus HL-60-Makrophagen).

Ein Leitzytokin aus (Alveolar-)Makrophagen ist der **Tumor-Nekrose-Faktor- α** (TNF- α oder verkürzt: TNF), der bei Makrophagen aus Rindern nur über seine Wirksamkeit in einem Bioassay (WEHI-Test, sh. 2.8.) erfasst werden kann. Sein Auftreten innerhalb von ca. 4 h bei Inkubation mit einem Feststoff gibt einen Hinweis darauf, daß die untersuchten Partikel rasch zu einer Stimulation der Makrophagen führen.

TNF kann *in vivo* und *in vitro* Chemotaxine induzieren (z.B. IL-8 [*Smart und Casale (1994)*, *Watanabe et al. (1993)*, *Ohmori et al. (1993)*, *Wolf et al. (1993)*] oder ENA [*Allmann-Iselin et al. (1994)*]), die dann zur Einwanderung anderer Zellen wie z.B. weiterer Makrophagen oder Granulozyten in die Lunge führen. Dieser induktive Effekt wird dadurch verstärkt, daß Makrophagen auf Stimuli hin auch selbst z.B. IL-8 und PDGF (beides chemotaktisch aktive Zytokine) freisetzen können [*Mornex et al. (1986)*, *Shimokado et al. (1985)*]. TNF selbst wirkt ebenfalls chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. TNF wirkt auch chemoattraktiv und mitogen auf Fibroblasten [*Postlethwaite und Seyer (1990)*, *Sugarman et al. (1985)*, *Vilcek et al. (1986)*] und Epithelzellen und er kann *in vivo* die Angiogenese induzieren [*Fräter-Schröder et al. (1987)*]. *Piguet et al. (1990)* bezeichnen TNF als "erforderlich für die Entwicklung einer ... Fibrose". Ferner kann durch TNF auch in den Epithelzellen der Atemwege die Expression von IL-8 induziert werden [*Kwon et al. (1994)*].

Diese pleiotrope Potenz von TNF war auch Ausgangspunkt dafür, daß z.B. in der Arbeit von *Schmidt (1992)* die TNF-Freisetzung aus Makrophagen nach Inkubation mit Quarz untersucht wurde.

TNF kann bei RAM nur über einen Bioassay nachgewiesen werden. Dieser Bioassay ist jedoch in seiner Reproduzierbarkeit nicht sehr gut [*Meager und Gaines Das (1994)*, *Wan et al. (1994)*]. Aufgrund der dem TNF zugeschriebenen Schlüsselstellung bei der Pathogenese von fibrotischen Lungenerkrankungen wurde TNF daher zusätzlich bei HL-60-M untersucht. HL-60-Makrophagen sind Zellen menschlichen Ursprungs. Ihre Zytokine können daher mit den Methoden der Human-Medizin, sog. ELISAs, sehr genau nach Art und Menge untersucht werden.

Neben TNF- α wurden besonders "späte" Zytokine wie IL-8, PDGF und bFGF in das Untersuchungsprogramm aufgenommen, um die Langzeiteffekte der untersuchten Partikel abschätzen zu können.

Die **chemoattraktive Wirkung** (CW) von Inkubationsüberständen ist ein Maß dafür, ob und wie stark RAM oder Granulozyten durch Mediatoren im Inkubationsüberstand zur Wanderung durch eine Membran veranlaßt werden. Dieser Bioassay, der für Überstände aus Inkubationen mit RAM verwendet wird, stellt einen Summenfaktor verschiedener chemoattraktiver Mediatoren aus RAM,

wie z.B. dem "frühen" TNF- α oder den "späten" Zytokinen IL-8 [Mosbach (1994)] und PDGF sowie C5a [Polzer (1992)] dar.

IL-8 ist ein Zytokin, das ursprünglich als "Macrophage-Derived Neutrophil-Chemotactic Factor" (MDNCF [Matsushima et al. (1988)]) bzw. als "Neutrophilen-Aktivierendes Peptid-1" (NAP-1 [Baggiolini et al. (1989), Pevery et al. (1988)]) beschrieben wurde. IL-8 wird auch von phagozytierenden neutrophilen Granulozyten freigesetzt [Bazzoni et al. (1991)] und wirkt besonders auf neutrophile Granulozyten chemoattraktiv [Strieter et al. (1994)]. Die transendotheliale Wanderung von Granulozyten ist IL-8 abhängig [Smart und Casale (1994)]. IL-8 kann auch durch TNF induziert werden, und zeigt *in vivo* einen biphasischen Verlauf seiner Plasmamaxima [DeForge et al. (1992), DeForge und Remick (1991)].

Bei Patienten mit interstitieller Fibrose ist *in vivo* IL-8 erhöht, was einen Hinweis darauf gibt, daß IL-8 an der Pathogenese der Fibrose beteiligt ist [Strieter et al. (1994)]. Außerdem kann IL-8 in den Oxidantienhaushalt der Lunge eingreifen (sh. unten), in dem er eine vorübergehende Freisetzung von O_2^- und H_2O_2 aus neutrophilen Granulozyten verursacht ("respiratory burst" [Wymann et al. (1987)]).

PDGF ist ein kationisches Glykoprotein, das zunächst aus den Blutplättchen isoliert wurde. Er setzt sich aus zwei Monomeren A und/oder B zusammen, die als Kombination AA, AB oder BB auftreten können [Ross et al. (1986)]. Zwischenzeitlich ist bekannt, daß PDGF unter anderem auch aus Makrophagen freigesetzt werden kann.

Schapira et al. (1991) wiesen nach, daß die Freisetzung von PDGF aus Makrophagen sowohl von der Dichte der Partikel, als auch von der Zeit abhängt. Auch Baumann et al. (1990) zeigten, daß PDGF bei *in vitro* Inkubationen mit Partikeln aus Alveolarmakrophagen freigesetzt werden kann.

In vivo-Studien an Patienten zeigen, daß bei Pneumokoniosen der PDGF-Spiegel erhöht ist [Vanhee et al. (1994)]. Auch bei idiopathischen Fibrosen wird PDGF aus den AM freigesetzt [Antoniades et al. (1990), Martinet et al. (1987)]. Diese medizinisch-pathologischen Beobachtungen werden durch Arbeiten von Seppä et al. (1982) und Peterson et al. (1994) gestützt: *in vitro* ist PDGF chemotaktisch für Fibroblasten und führt zu ihrer Proliferation.

PDGF ist außerdem für Neutrophile und Monozyten chemoattraktiv [Deuel et al. (1982)], so daß es durch die Freisetzung von PDGF zu einer Einwanderung dieser Zellen in den Alveolarraum kommen kann.

Ferner ist die Bildung von PDGF in HL-60-M ein eindeutiger Biomarker für die erwünschte Differenzierung zu Makrophagen (sh. 2.4.), da HL-60-Zellen, die zu Granulozyten differenziert wurden, PDGF nicht bilden [Pantazis et al. (1986)].

bFGF gehört zu den heparin-bindenden Wachstumsfaktoren und wurde aus den meisten mesodermalen Geweben isoliert [Isacchi et al. (1990)]. Er stimuliert die Proliferation mesodermaler und neuroektodermaler Zellen wie z.B. Fibroblasten, Astrocyten oder Neuroblasten und spielt bei der Entwicklung und Differenzierung embryonaler Gewebe eine wichtige Rolle. bFGF ist funktionell und strukturell mit MDGF (Macrophage-derived Growth Factor) ähnlich, wenn nicht identisch [Baird et al. (1985)].

In vivo werden **Oxidantien** (reaktive Sauerstoffspezies, RSS) wie das **Superoxid-Anionradikal** (O_2^-) und **Wasserstoffperoxid** (H_2O_2) als Folge der Aktivierung von Zellen des Immunsystems in den tieferen Bereichen der Lunge gebildet. Durch verschiedene antioxidative Schutzmechanismen der Parenchymzellen wie den Glutathion-Zyklus und Katalase wird im Gleichgewicht (Ruhezustand) eine Schädigung der Lunge vermieden [Cantin und Crystal (1985), Gillissen (1993)].

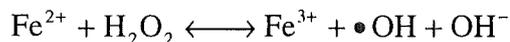
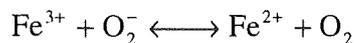
Gerät das System Oxidantien/Antioxidantien z.B. durch bakterielle Infektionen oder exogene Belastungen (Asbest, Ozon) in der Lunge aus dem Gleichgewicht, so können eine unkontrollierte Vermehrung der Fibroblasten auftreten, die Parenchymzellen geschädigt und das Bindegewebe teilweise abgebaut werden, was in der Folge zur Bildung einer Fibrose, eines Emphysems oder

anderer Lungenerkrankungen führen kann [Cantin und Crystal (1985), Gillissen (1993)].

Für Partikel bestehen hierbei mehrere Möglichkeiten, das Oxidantien/Antioxidantien-System zu stören: sind die Partikel immunologisch wirksam, so kann ihr Kontakt mit den Phagozyten der Lunge die Bildung von Oxidantien aus den Phagozyten induzieren [Berg et al. (1993), Wizemann und Laskin (1994)].

Partikel, die an ihrer Oberfläche Radikale bilden können (z.B. Silicate [Castranova (1994)] oder Kohlenstaub [Vallyathan (1994)]), können auch direkt Oxidationsschäden verursachen oder den Antioxidantien-Haushalt beeinflussen. *In vivo*-Beobachtungen zeigen eine Korrelation zwischen der Toxizität eines Mineralstaubes und der Verteilung von Sauerstoff-Atomen auf seiner Oberfläche [Wiessner et al. (1988)].

Drittens können metallhaltige Stäube in Verbindung mit biologischen Reduktionsmitteln und O₂ RSS bilden. Ein Beispiel hierfür die Reaktion von Cu(II) mit Ascorbat zu Cu(I), das dann wiederum mit O₂ O₂⁻ bilden kann [Pézerat (1994)]. Diskutiert wird der Einfluß von Metallen auf die Bildung von Lungenschäden auch von Ghio et al. (1990): Sie stellen die Frage, ob Lungenschäden nicht überwiegend durch den Eisengehalt der Oberfläche der inhalierten Partikel ausgelöst werden. Im Zentrum der Überlegungen steht hierbei die Fenton-Reaktion:



Durch diese Reaktion wird aus dem (vergleichsweise) inaktiven O₂⁻ das sehr viel potentere •OH gebildet. Sie folgern, daß in diesem Fall die Bindung von Eisen durch Chelatbildner ein wirksamer Entgiftungsmechanismus wäre.

Makrophagen können wie neutrophile Granulozyten durch ein Enzym der Zelloberfläche, der NADPH-Oxidase, ein Elektron direkt auf molekularen Sauerstoff der Atmungsluft übertragen und so auf einen Reiz hin O₂⁻ bilden [Badwey und Karnovsky (1970), Dewald et al. (1979)]. O₂⁻ ist nicht sehr zytotoxisch, doch enthalten die Immunzellen auch Superoxid-Dismutase (SOD), die O₂⁻ in H₂O₂ überführt. Obwohl H₂O₂ selbst zytotoxisch ist, liegt sein besonderes Schadpotential darin, daß es in Hydroxyl-Radikale (•OH) und Hypochlorid-Anionen (O₂X⁻, X=Halid, z.B. HOCl⁻), zwei besonders reaktive Oxidantienarten, überführt werden kann [Cantin und Crystal (1985), Ward et al. (1983)].

Ob bronchiale Epithel-Zellen O₂⁻ bilden können, ist noch relativ unbekannt. Dorey et al. (1989) beobachteten am Pigment-Epithel der Schweine-Retina eine deutliche Produktion von O₂⁻, nachdem sie die Zellen mit Latex-Kügelchen inkubiert hatten. Auf diese O₂⁻-Bildung wird u.A. der Verlust von Rhodopsin und die Degeneration der Retina durch Lipidperoxidation zurückgeführt.

Lange Zeit war der Einfluß von RSS auf die Replikation der Fibroblasten unklar. Burdon und Rice-Evans (1989) sowie Murrell et al. (1990) brachten dann Licht in das Dunkel, als sie beobachteten, daß niedrige Konzentrationen an RSS Fibroblasten zur Proliferation anregen. In Kulturschälchen bilden Fibroblasten selbst RSS, bei deren Hemmung auch die Proliferation der Fibroblasten gehemmt wird. Murrell et al. (1990) folgern: RSS "könnten somit einen sehr schnellen, spezifischen und sensitiven Auslösemechanismus für eine Fibroblastenproliferation darstellen." Die Herkunft der RSS (z.B. aus aktivierten Makrophagen) scheint dabei keine besondere Rolle zu spielen. Radikalfänger könnten daher eine fibrose-präventive Funktion haben [Fantone und Ward (1982)].

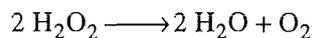
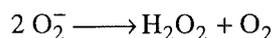
Lungenemphyseme können ebenfalls durch den Einfluß von Oxidantien verursacht werden. Ein Mechanismus hierbei ist die Inaktivierung des Enzyms α 1-Antielastase/Antitrypsin: wird dieses Enzym durch Oxidation an seinem ³⁵S-Methionin inaktiviert, kann es die Elastase, die von neutrophilen Granulozyten gebildet wird, nicht mehr hemmen. Dadurch kommt es zu einer Zerstörung der Alveolar-Wände, was zu einer Abnahme der Oberfläche für den Gasaustausch

führt. Ferner kollabieren die Luftwege während der Ausatemungsphase und die Elastizität des Lungenparenchyms nimmt ab. Typische Folgen dieses Emphysems sind ein Gefühl der Atemlosigkeit und Dispnoe bei Aufregung. Quarz kann (zumindest *in vitro*) über einen H_2O_2 -vermittelten Mechanismus die α 1-Antielastase hemmen, wobei dies als ein Mechanismus zur Induktion eines Lungen-Emphysems nach Quarz-Inhalation diskutiert wird [Zay et al. (1995)]. Aktivierte Phagozyten setzen auch RSS frei, so daß über diesen Mechanismus Lungenschäden auftreten können [Carp und Janoff (1980)]. Außerdem wird dieser Mechanismus z.B. auch für die Entstehung des Emphysems bei Rauchern diskutiert [Carp et al. (1982)].

Aufgrund der Bedeutung der Oxidantien bei der Pathogenese von Lungenerkrankungen wurden die verwendeten Partikel auf ihre Fähigkeit hin untersucht, ob sie *in vitro* die Bildung von Oxidantien (O_2^- und H_2O_2) in RAM und HL-60-M (vgl. 2.11.1.1) und Bronchial-Epithelzellen (BEAS-2B-Zellen) induzieren können.

Antioxidantien werden vom Organismus zum Schutz vor Schädigungen durch reaktive Sauerstoff-Metabolite gebildet [Gillissen (1993), Cantin und Crystal (1985)]. Dabei ist die Genese der Oxidantien (exogen, wie z.B. Ozon, Zigarettenrauch, oder endogen als Immunantwort z.B. der Makrophagen) ohne Bedeutung. Wichtige Antioxidantien sind hierbei das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) und Glutathion.

Die **Superoxid-Dismutase** (SOD) ist ein intrazelluläres Enzym, das spezifisch die Umwandlung von Superoxid-Anionen (O_2^-) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff katalysiert. H_2O_2 wird nachfolgend von Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff dismutiert.



Die Bildung von SOD gilt als ein zellulärer Indikator für exogenen oder endogenen oxidativen Streß [Crapo und Tierney (1974)].

Ein Defizit an **Glutathion** (GSH) und seiner oxidierten Form, dem Glutathiondisulfid (GSSG), gilt als zuverlässiger und sensitiver zellulärer Marker für oxidativen Streß [Gillissen (1993)]. Durch Oxidantien wird GSH zum dimeren GSSG oxidiert. GSSG seinerseits wird durch NADPH/ H^+ zu GSH regeneriert, wobei die Glutathion-Reduktase als katalytisches Enzym dient.

Von kristallinen Silicaten ist bekannt, daß sie bei Kontakt mit Wasser auf ihrer Oberfläche Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$) bilden können [Castranova (1994)]. Für C_{60} gibt es Hinweise, daß Licht die Bildung von Singulett-Sauerstoff induzieren kann [Orfanopoulos und Kambourakis (1995)].

Außerdem wurden im zellfreien Testsystem mit $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ bei RR Fluoreszenz-Veränderungen beobachtet, die auf oxidative Vorgänge zwischen RR und $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ hinweisen (vgl. 3.5.3.).

Aufgrund dieser Daten wurde untersucht, ob die verwendeten Partikel *per se* durch oxidativen Streß in das Oxidantien-/Antioxidantien-Gleichgewicht der Lunge eingreifen können. Da die kritischen Zielzellen von oxidativen Störungen in der Lunge die Epithel-Zellen sind (sh. oben), wurden die Versuche mit BEAS-2B-Zellen durchgeführt.

Bei den Untersuchungen mit C_{60} und RR im zellfreien Ansatz mit 2',7'-Dicholofluorescin-Diacetat (vgl. 3.5.3.) stieg die Fluoreszenz des Systems mit RR deutlich an, was die Frage aufwirft, ob es sich hierbei um eine unspezifische Reaktion des RR mit H_2DCF handelt, oder ob durch RR tatsächlich reaktive Sauerstoffspezies (RSS) induziert werden. Zur Untersuchung dieser Frage können die Abspaltung von Ethen aus α -Keto-S-Methyl-Buttersäure (KMB) [Hippeli und Elstner (1989), Youngman et al. (1985)] durch RSS sowie die "Bleichung" von

Crocin durch RSS herangezogen werden [Hippeli (1990), Hippeli und Elstner (1989)]. Da zumindest für C₆₀ bei Einstrahlung von Licht die Bildung von Sauerstoffradikalen (Singulett-Sauerstoff) aus der Literatur [Orfanopoulos und Kambourakis (1995)] bekannt ist und auch Dieselruß bei Licht freie Radikale bilden kann [Ross et al. (1982)], wurden die Untersuchungen unter Einstrahlung von Licht durchgeführt.

Vor dem schon erwähnten Hintergrund der Dispute über pathogene Effekte von Dieselruß-Partikeln, Carbon Black und Fly Ash ist die sich abzeichnende großtechnische Einführung von C₆₀ und seinem Zwischenprodukt, dem Rohruß, in Industrie und Grundlagenforschung ein weiterer Grund, diese Stoffe auf inhalationstoxikologische Effekte zu untersuchen.

C₆₀ sowie RR als Kohlenstoff-Partikel, die anders als CB weder mit Schwermetallen belastet noch wie DR mit KW kontaminiert sind, scheinen außerdem geeignet zu sein, *in vitro* zur Klärung der Kontroversen über die Pathogenität von Kohlenstoff-Partikeln wie Dieselruß und Carbon Black beizutragen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungen der partikulären Zusätze

2.1.1. Kohlenstoff-Stäube

2.1.1.1. Untersuchung der Partikel mittels Raster-Elektronenmikroskop

Präparation

Fulleren C₆₀, Fulleren-Rohruß (RR) und Graphit wurden auf Leitsilber, Canadabalsam und doppelseitigen Kohlenstoff-Selbstklebern ("Carbon Tabs") präpariert. Dazu wurden die Stäube mit einer feinen Pipette aufgeblasen oder mit einem Spatel aufgetragen. Der Träger und die anhaftenden Partikel wurden im Vakuum mit Gold beschichtet und anschließend im REM (CAM SCAN SC44) auf einem in alle drei Raumrichtungen beweglichen Tisch montiert. Nach der Durchmusterung der Oberfläche wurden repräsentative Objekte zur weiteren Analyse fotografisch dokumentiert.

Die Präparationen der Stäube, wie auch die Aufnahmen und die Analysen, wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Pejsa und Herrn Neufang, beide FZK/HVT-HZ, übernommen.

2.1.1.2. Untersuchung auf metallische Verunreinigungen mit Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie

Reaktive Sauerstoffspezies (RSS, O₂⁻ und H₂O₂, sh. 2.11.1.) sind wichtige Intermediate im Immunsystem. O₂⁻ wird z.B. von RAM bei Inkubation mit Zymosan gebildet. Das Reaktionssystem wird aber durch Schwermetalle gestört: Nickel(II) beispielsweise verhindert die Bildung von O₂⁻, Eisen(III) erhöht die RSS Konzentration [*Schlüter et al. (1995), Stohs und Bagchi (1995)*]. Darüber hinaus können Zn(II)-Ionen *in vitro* bei Monozyten Zytokine wie TNF- α (sh. 2.8.) induzieren [*Driessen et al. (1994)*].

Um ausschließen zu können, daß Schwermetalle im benutzten *in vitro* System zu Verfälschungen der Meßwerte führen, wurde daher zusätzlich zu der Spezifikation des Herstellers mittels Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie untersucht, ob metallische Verunreinigungen aus Produktion und Verarbeitung in den Kohlenstoff-Stäuben vorliegen.

Neben der reinen Bilderstellung bietet das REM die Möglichkeit einer Elementaranalyse der untersuchten Partikel. Diese Analyse basiert auf der Methode der Fluoreszenzspektroskopie. Läßt man auf Atome "höherer Ordnungszahl" Elektronen sehr hoher Energie ("Kathodenstrahlen") auftreffen, so können durch die hohen Energien Elektronen der inneren Schalen angeregt und in höhere Schalen geschleudert werden. Die so in den inneren Schalen (K- und L-Schale) entstandenen Elektronenlücken werden wieder dadurch aufgefüllt, daß Elektronen äußerer Hüllen in die weiter innen aufgetretenen Lücken springen. Die dabei freiwerdende Energie ist vergleichsweise groß, so daß die Wellenlänge des emittierten Lichts sehr kurz (10^{-2} - 10^0 nm) ist; man spricht von "Röntgenfluoreszenz".

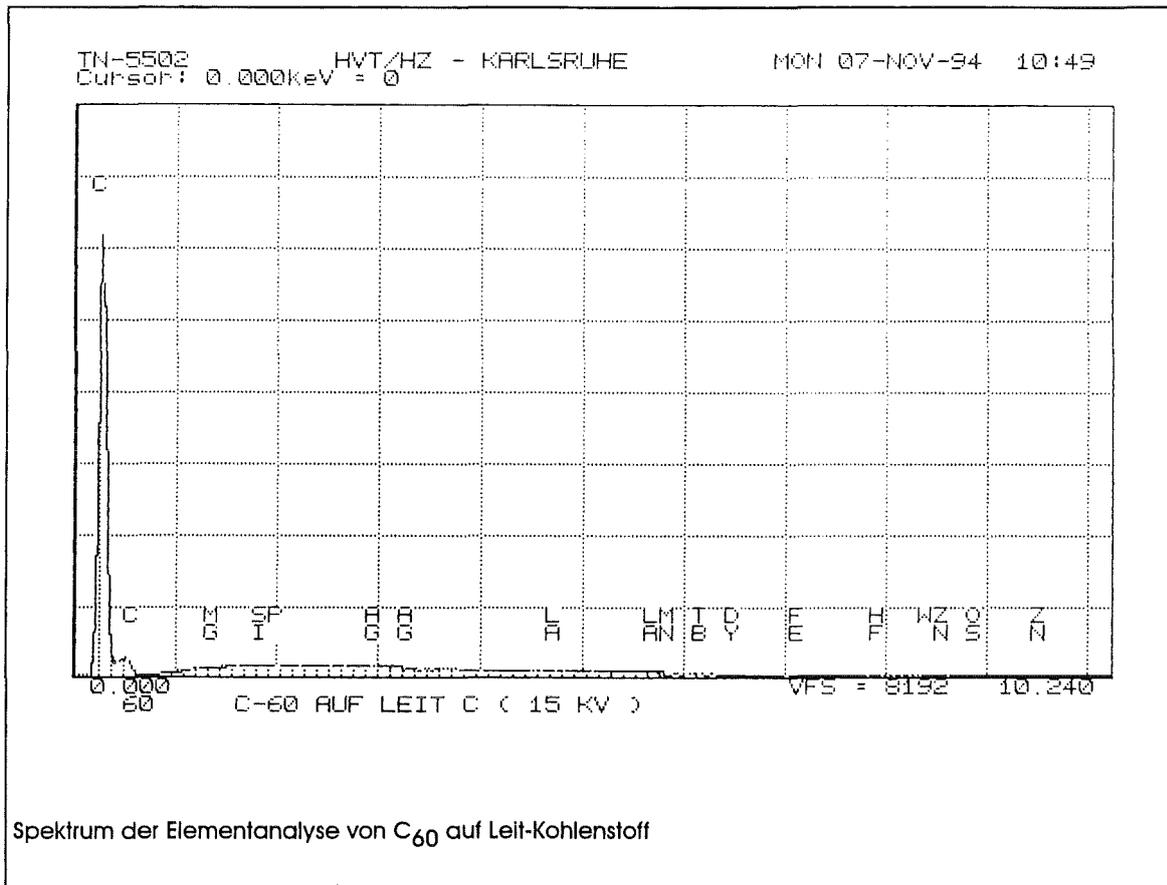
Ein Detektor mißt die Energien der aus dem Partikel austretenden Strahlung als Spektrogramm und ordnet den Spektrallinien die zugehörigen Elemente zu. Ein Element ist dann eindeutig identifiziert, wenn ihm mehrere seiner Spektral-Linien eindeutig zugeordnet werden können.

Bei feinen Stäuben besteht immer die Gefahr, daß durch die Streuung des Elektronenstrahls auch Material des Probensträgers aktiviert wird. Dadurch können falsch positive Elementanalysen erhalten werden (z.B. ein Silbergehalt bei der Präparation auf Leitsilber). Um dies zu vermeiden, wird durch den Vergleich der Meßergebnisse verschiedener Präparationen der Hintergrund ausgefiltert. Von jedem Präparat wurden zwei Bestimmungen durchgeführt; gezeigt wird für jeden Partikel eine Analyse, die auf Leit-Kohlenstoff gefertigt wurde.

Der Vorteil der Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie liegt darin, daß die Röntgenspektren vom Bindungszustand des Atoms praktisch unabhängig sind. Sie eignen sich daher gut für die Anwendung in der Elementaranalyse.

Fulleren C₆₀

C₆₀ wurde bei der Fa. Hoechst nach der Lichtbogenmethode (vgl.1.) hergestellt. Nach der Extraktion aus dem Rohruß mit Toluol, der chromatographischen Auftrennung und einer weiteren Aufreinigung durch Sublimation betrug die Reinheit 99,9999% C₆₀ ("Gold Grade"). Der Restgehalt an Lösungsmitteln und Kohlenwasserstoffen lag an der untersten Nachweisgrenze (Herstellerangaben). Da das gelieferte Material aus 1-5 mm großen Kristallen bestand, wurde C₆₀ im Achat-Mörser unter Schutzgas (Argon) zerrieben.



Bei C₆₀ konnte in den Elementaranalysen mit Röntgenfluoreszenz bei Betrachtung aller untersuchten Präparationen nur Kohlenstoff eindeutig nachgewiesen werden. Signale für andere Elemente lagen entweder an der Detektionsgrenze oder waren durch Überschneidungen mit anderen Signalen nicht eindeutig einem Element zuzuordnen. Es ergab sich somit auch kein Hinweis auf Verunreinigungen durch das Zermörsern (gemessen an Silicium als Hauptelement des Achat).

Die rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung ergab bei Auszählung von 100 Partikeln eine mittlere Partikelgröße von $6 \mu\text{m} \pm 3 \mu\text{m}$. 60% der Partikel sind kleiner als $5 \mu\text{m}$, 90% kleiner als $10 \mu\text{m}$. Der größte hierbei beobachtete Partikel hatte eine Durchmesser von $25 \mu\text{m}$ (Abb. 2 und 3). Kleinere Partikel waren nicht erhältlich. Die durch Zermörserung gewonnenen Partikel zeichnen sich durch eine glatte Oberfläche aus (Abb. 3). Die spezifische Oberfläche¹ beträgt

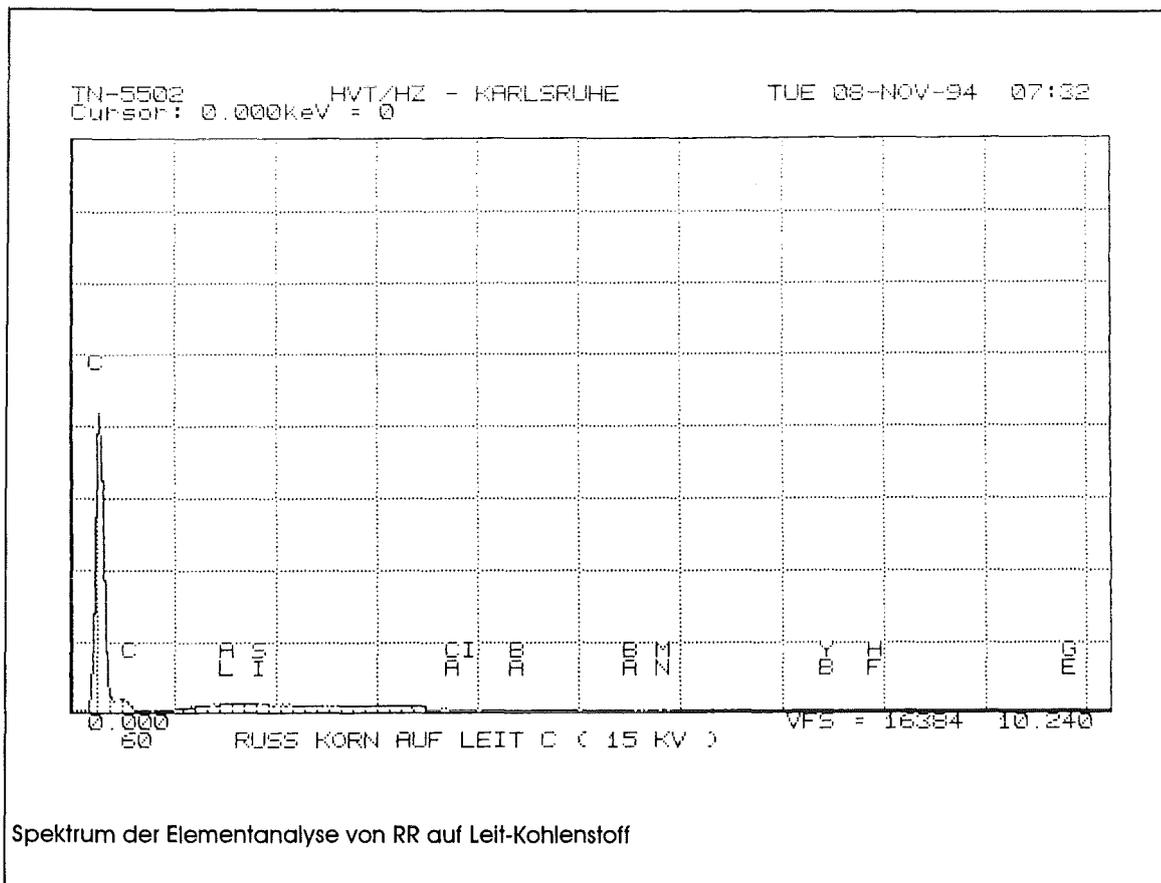
¹Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche von C₆₀ und Rohruß durch N₂-Ausgasung erfolgte durch Frau Dr. Kniffer, FZK/IMF III.

Elementanalyse von C ₆₀ auf Kohlenstoff (15 kV)			
	Peak-Listing		Element and Line
	Energy	Area	
1	0,267	79521	C K α
2	0,526	903	C Sum
3	1,297	146	Mg K α or As L α
4	1,762	382	Si K α or Sr L α
5	2,045	193	P K α or Zr L α
6	2,965	279	Ag K α
7	3,334	153	Ag L β 2
8	4,696	163	La L α
9	5,162	109	unidentified
10	5,743	43	La L γ
11	5,881	53	Mn K α
12	6,234	65	Tb L α
13	6,494	113	Dy L α or Mn K β
14	7,080	4	Fe K β
15	7,907	28	Hf L α
16	8,354	120	W L α
17	8,630	71	Zn K α
18	8,941	81	Os K α
19	9,302	77	unidentified
20	9,582	58	Zn K β

Möglicherweise identifizierte Elemente
 C K α & Sum-Peak
 Si K α or Sr L α or W L α M α
 Ar K α or Ag L α L β 2
 P K α or Zr L α
 La L α L γ
 Mg K α or As L α or Dy L α ? M α
 Cu K β or W L β M β
 Fe K β or Dy L α M α
 Mn K α K β ?
 Zn K α K β Or Os L α
 Zn K α K β
 Fe K β or Tb L α
 Cu K β or Hf L α
 Fe K β

1,2 m² g⁻¹. Das Pulver wurde lichtgeschützt und unter N₂ gelagert, um eine Oxidation des C₆₀ zu verhindern [Werner et al. (1993b)]. Beim Dispergieren im Medium (2.3.3.) bilden sich runde, in ihrem Inneren z.T. hohle Konglomerate mit einem Durchmesser von ca. 3 - 4 μ m (Abb. 4).

Fulleren-Rohruß (RR)



Der RR (vgl. 1.) ist ein Zwischenprodukt der Fullerenproduktion. Er enthält ca. 10% C₆₀ und 1 - 3% höhere Fullerene (C₇₀ etc.) (Herstellerangaben).

Elementanalyse von RR auf Kohlenstoff (15 kV)			
	Peak-Listing		
	Energy	Area	Element and Line
1	0,263	108325	C K α
2	0,520	921	C Sum
3	1,540	155	Al K α or Yb M α
4	1,762	364	Si K α or Sr L α
5	2,118	224	unidentified
6	3,683	105	Ca K α
7	3,926	108	I L α
8	4,430	168	Ba L α
9	4,749	148	unidentified
10	5,554	68	Ba L γ
11	5,862	105	Mn K α
12	6,589	63	unidentified
13	7,410	44	Yb L α
14	7,860	67	Hf L $\alpha\beta$
15	9,886	96	Ge K α

Möglicherweise identifizierte Elemente

C K α & Sum-Peak
 Si K α or Sr L α ?
 Nb L α
 Sc K β or Ba L α Ly
 Al K α or Kr L α or Yb L α M α
 Sc K β or I L α
 Ca K α or Cf M α M β
 Mn K α or Eu L α
 Ge K α
 Hf L α
 Yb L α M α
 Fe K β or Tb L α

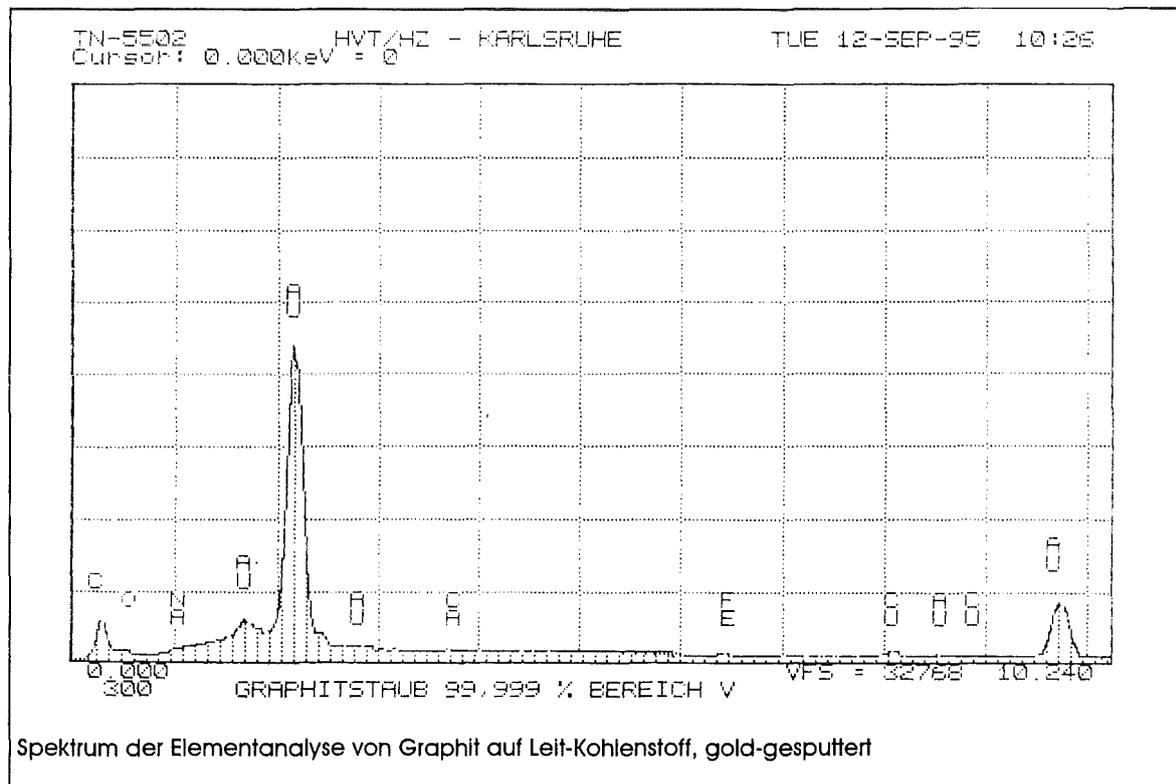
Verunreinigungen durch Kohlenwasserstoffe liegen an der untersten Nachweisgrenze (Herstellerangabe). Bei RR war Kohlenstoff ebenfalls das einzige, eindeutig identifizierbare Element.

Die Partikelgröße ist im REM nicht genau feststellbar, da das Material unter den Versuchsbedingungen stark kohäriert und große

Konglomerate bildet (Abb. 5). In Abb. 7 ist erkennbar, daß sich diese Konglomerate aus Partikeln von 50 - 200 nm aufbauen. Nach dem Dispergieren in Medium (2.3.3.) bildet sich eine stark getrübe Dispersion mit sehr kleinen Partikeln, die z.T. im Durchlicht-Mikroskop gerade noch erkennbar waren (Partikelgröße < 1 μ m). Die Partikelgrößen in der Dispersion waren nicht ermittelbar. Die Partikel besitzen im Vergleich zu C₆₀ eine raue, stark zerklüftete Oberfläche (Abb. 6 und 7). Die spezifische Oberfläche beträgt 255 m² g⁻¹.

Da RR ebenfalls oxidierbar ist [Datta et al. (1994)], wurde auch er lichtgeschützt und unter N₂ gelagert.

Graphit-Staub



Elementanalyse von Graphit auf Kohlenstoff (15kV)			
	Peak-Listing		
	Energy	Area	Element and Line
1	0,281	28956	C K α
2	0,517	925	O K α
3	1,065	1433	Na K α
4	1,679	13190	Au M ζ 1
5	2,160	248025	Au M α
6	2,797	3043	Au M2N4
7	3,728	778	Ca K α
8	6,422	1204	Fe K α
9	8,061	5469	Cu K α
10	8,523	2661	Au L λ
11	9,732	52022	Au L α

Möglicherweise identifizierte Elemente

C K α
 Nb L α or Au L α M α L λ
 O K α
 Cu K α K β
 Na K α
 Fe K α
 Ca K α or Te L α

Der Graphit-Staub dient als Kohlenstoff-Quelle bei der Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens zur Herstellung von C₆₀ durch die Fa. High-Tech-Carbon.

Diese Firma stellte eine Probe eines 99,9999% reinen Graphit-Staubes zur Untersuchung zur Verfügung. Die REM-Analyse erbrachte eine Partikelgröße von $14,2 \pm 7 \mu\text{m}$ (**Abb. 8**). 30%

der Partikel sind $<5 \mu\text{m}$, 60% $<10 \mu\text{m}$. Die Oberflächen der Partikel sind glatt, die Partikel selbst aber in sich z.T. stark zerklüftet (**Abb. 9**).

Neben Kohlenstoff wurde bei Graphit in 5 von 6 untersuchten Präparaten Eisen festgestellt. Dabei handelt es sich um Spuren von wenigen ppm. Andere Verunreinigungen konnten nicht eindeutig identifiziert werden.

2.1.1.3. Untersuchung des Fulleren-Rohrußes mit Röntgenstruktur-Analyse

Fullerene und ihre direkte Vorstufe - der Rohruß (RR) - werden im Lichtbogen-Plasma aus Graphitelektroden gewonnen. Während Fullerene als Kristalle vorliegen, war nicht bekannt, ob der verwendete RR als ein reines amorphes Pulver oder als ein Pulver mit Graphitresten vorliegt. Zur Klärung dieser Frage wurde RR mittels Röntgenstrukturanalyse auf die Anwesenheit von Gitterstrukturen des Graphit untersucht.

Hierzu wurden Röntgenstrahlen (40 kV, 35 mA) durch eine Schlitzblende auf die zu untersuchende Probe gerichtet. Die Probe war auf einem Träger montiert, der so drehbar ist, daß der Einfallswinkel des Strahles auf die Probe variiert werden kann. Die Röntgenstrahlen werden dann in der Probe reflektiert, wenn die *Braggsche* Bedingung

$$2d \sin \theta = \lambda$$

mit d = Abstand der Netzebenen
 λ = Wellenlänge der einfallenden Röntgenstrahlung und
 θ = Winkel zwischen Einfallrichtung und Netzebene

erfüllt ist.

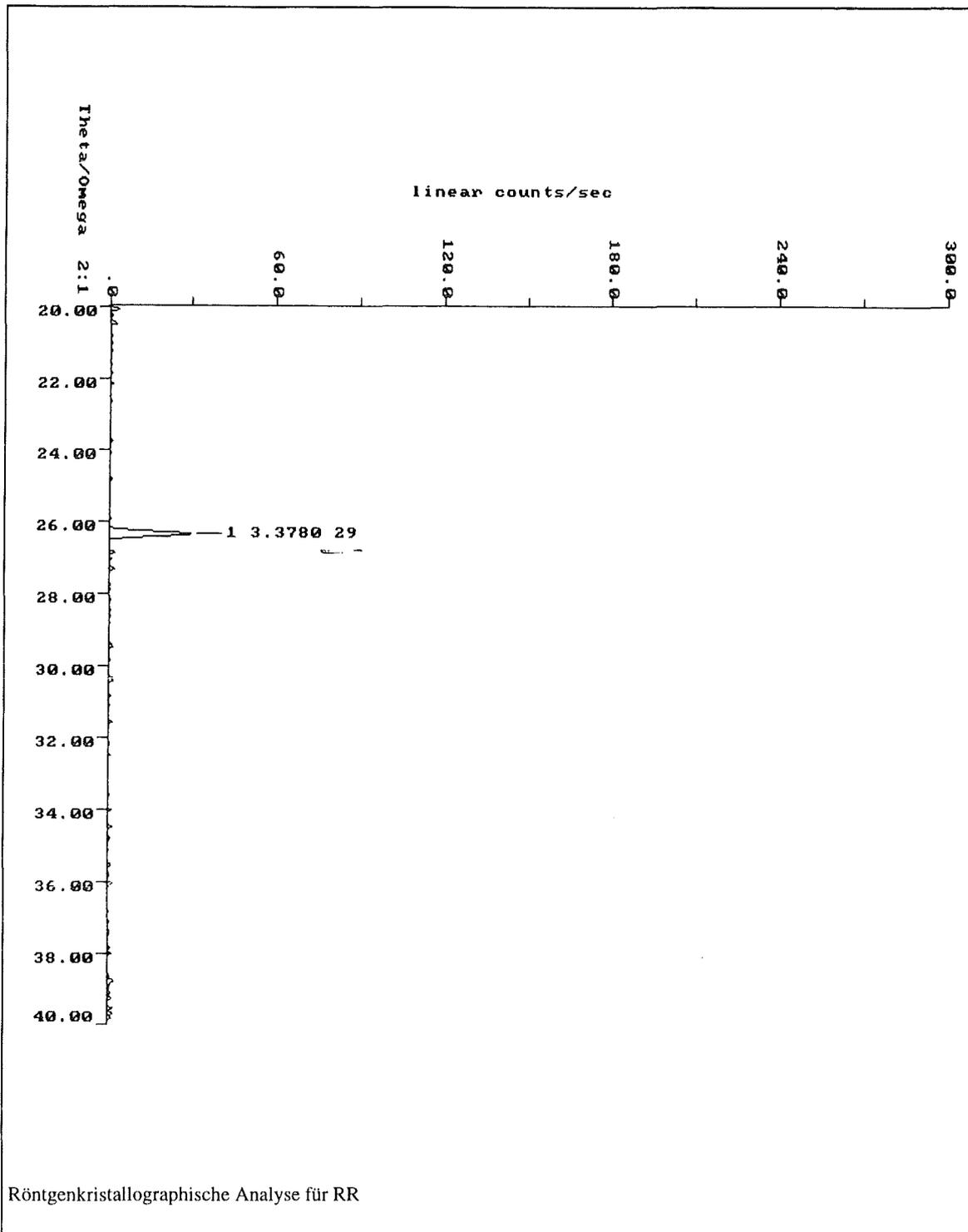
Da die Wellenlänge λ und der Einfallswinkel θ bekannt sind, errechnet sich der Abstand der Netzebenen mit

$$d = \frac{\lambda}{2 \times \sin \theta}$$

Der Abstand der Netzebenen von reinem Graphit liegt bei $3,35 \text{ \AA}$, so daß bei Anwesenheit von Graphit ein Reflektionssignal bei ca. $13,3^\circ$ (Wellenlänge $\lambda = 1,540598 \text{ \AA}$) erwartet würde.

Bei der Röntgenstrukturanalyse trat eine geringe Reflektion des Röntgenstrahls bei einer Wellenlänge $\lambda = 1,540595 \text{ \AA}$ und einem Einfallswinkel $\theta = 13,1935^\circ$ auf. Daraus errechnet sich ein Netzebenen-Abstand von

$$d = \frac{l}{2 \times \sin \theta} = \frac{1,5405}{2 \times 0,2282} = 3,375 \text{ \AA}$$



Das Signal ist jedoch vergleichsweise niedrig. Im Rahmen der Genauigkeit der Methode wurde damit nachgewiesen, daß RR nur noch Spuren von Graphit enthält. Diese Graphit-Spuren können auf Material aus den Elektroden zurückgeführt werden. Da keine weiteren Reflektionssignale beobachtet wurden, stellt RR ansonsten ein amorphes Pulver dar. Die Befunde decken sich qualitativ mit Messergebnissen, die von *Atamny et al. (1993)* und *Werner et al. (1993a)* an zwei

anderen Fulleren-Rohruß-Proben erhalten wurden.

Die Analyse wurde durch Herrn Dr. Pejsa (FZK/HVT-HZ) durchgeführt.

2.1.2. Quarz DQ12

Quarz DQ12 (Dörentruper Quarz) wurde als Positiv-Kontrolle für Partikel eingesetzt. Er ist hinsichtlich seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften und seiner *in vitro* Effekte gut charakterisiert [Schimmelpfeng et al. (1992)]. Der mittlere geometrische Durchmesser liegt bei 0,4 µm, 50% der Partikel sind kleiner als 2 µm.

2.2. Hämolyse-Test

Der Hämolyse-Test bietet eine Möglichkeit zur Beurteilung der zellmembranschädigenden Eigenschaften von Stäuben. Die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten als Folge des Zusammenbruchs der Zellmembran stellt dabei den Meßparameter dar. Der Test wurde u.a. von Wilczek (1991) mit humanen Erythrozyten in Anlehnung an Nolan et al. (1987) zur Untersuchung von Quarz und Hochtemperatursupraleitern verwendet. Nolan und Langer (1983) verwendeten Schafserthrozyten zur Untersuchung der hämolytischen Wirkung von verschiedenen Quarzen. Da in der vorliegenden Arbeit überwiegend Zellmaterial vom Rind benutzt wurde, wurden die Erythrozyten aus Rinderblut isoliert.

Reagenzien und Medien

Gerinnungsgehemmtes Rinderblut

1	l	Rinderblut, aus Halsschlagader
20 000	U l ⁻¹	Heparin zur Gerinnungshemmung

0,9% NaCl-Lösung

9	g	NaCl
1	l	Aq. bidest.

Partikel-Dispersionen

62,5, 125, 250 oder 500 µg ml⁻¹C₆₀, Graphit oder DQ12 in 0,9% NaCl, mit Ultraschall auf Eis dispergiert (Branson Sonifier, Leistungsstufe 5, 60% gepulst, 5 min)

Meßgerät

Beckman-DU-65 Spectrophotometer, Wellenlänge 530 nm, Kalibrierung gegen Luft, ½-Mikroküvetten Ratiolab

Ca. 200 ml Rinderblut wurden in 8 Aliquots von je 25 ml in Zentrifugenröhrchen 1 : 2 mit steriler 0,9% NaCl verdünnt und 10 Minuten bei 4 °C und 1 000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden erneut mit ca. 50 ml 0,9% NaCl aufgenommen, resuspendiert und zentrifugiert. Nach einem dritten identischen Waschgang wurde aus den gepackten Erythrozyten eine 4,2%-ige Suspension in 0,9% NaCl hergestellt. 250 µl dieser Suspension wurden mit Aq. bidest. zur vollständigen Lyse der Erythrozyten auf ein Endvolumen von 5 ml verdünnt. Lag die Absorption dieser Lösung bei 530 nm höher als 0,3, so wurde die Erythrozyten-Suspension nach der Formel

$$\text{Volumen}_{\text{final}} \times \text{Absorption}_{\text{final}} = \text{Volumen}_{\text{initial}} \times \text{Absorption}_{\text{initial}}$$

mit $\text{Absorption}_{\text{final}} = 0,3$ verdünnt. Hierdurch wurde bei allen Versuchsserien eine vergleichbare Hämoglobin-Konzentration in den Ansätzen gewährleistet.

Je 4 ml der Erythrozyten-Suspension und der Staub-Suspensionen bzw. der 0,9% NaCl als Negativ-Kontrolle wurden für 120 Minuten bei 36 °C im Wasserbad inkubiert. In Abständen von je 30 Minuten wurden die Röhrchen vorsichtig geschwenkt, um ein vollständiges Absetzen der

Partikel zu verhindern. Nach Inkubationsende wurden die Röhrchen bei 1 000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und die Absorption des Überstandes im Photometer bestimmt. Die Hämolyse (in relativen %) wurde wie folgt berechnet:

$$\%_{\text{rel. Hämolyse}} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}}}{\text{Absorption}_{\text{final}}} \times 100$$

Je Versuchsansatz wurden drei Parallelen angesetzt und gemessen.

2.3. Inkubationen mit Rinderalveolarmakrophagen (RAM)

2.3.1. Gewinnung der RAM

Die RAM wurden durch broncho-alveoläre Lavage mit isotonischer NaCl-Lösung aus schlachtfrischen Rinderlungen (Städtischer Schlachthof, Karlsruhe, Fa. Langendörfer) isoliert. Die Lungen wurden vor ihrer Verwendung auf äußerlich sichtbare Verletzungen oder Tumore geprüft.

Reagenzien und Medien

0,9% (Isotonische) Kochsalzlösung

9	g	NaCl
1	l	Aq. bidest.

Ficoll-Paque

Aussaat-Medium

450	ml	RPMI 1640
4,5	ml	P/S

Kulturmedium 1 (AM-KM1)

450	ml	RPMI 1640
5	ml	P/S
10	ml	FKS (30 min. bei 56 °C hitzeinaktiviert)

Kulturmedium 2 (AM-KM2)

450	ml	RPMI 1640
5	ml	P/S
50	ml	FKS (30 min. bei 56 °C hitzeinaktiviert)

Trypanblau-Lösung

0,5	g	Trypanblau
100	ml	0,9% NaCl-Lösung

Verbandmull

8-fach gelegt, VM 20 DIN 61 630, BW.Ph.Eur.

Gaze

Polyamid, Maschenweite 150 µm

Für die Lavagierung wurde ein Schlauch mit einer Schlauchklemme in der Trachea der Lunge festgeklemmt. Durch diesen Schlauch wurden (abhängig von der Größe der Lunge) ca. 5 - 6 l der NaCl-Lösung vorsichtig in die Lunge eingefüllt. Beim Einfüllen wurde besonders auf versteckte Leckagen der Lungenwände, durch die die NaCl-Lösung auslaufen kann, geachtet.

Nach maximaler Füllung der Lunge mit NaCl-Lösung wurden durch Massieren und/oder Klopfen der Lunge die RAM von der Lungenoberfläche abgelöst, so daß sie in die Salzlösung übergingen. Die Salzlösung wurde aus der Lunge abgezogen und durch sterilen Verbandmull und autoklavierte Gaze zur Entfernung von Heuresten, Blutgerinnseln etc. filtriert.

Nach diesem ersten Spülgang wurde die Lunge nochmals mit ca. 3 l 0,9% NaCl gefüllt, erneut massiert und die Zellsuspension abgezogen. Insgesamt wurden so ca. 9 l 0,9% NaCl eingesetzt, von denen durchschnittlich ca. 6 l als Suspension aus der Lunge wiedergewonnen wurden.

Nach der Filtration wurde die RAM-haltige Zellsuspension bei 250 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das hierbei gebildete Zellpellet wurde nach Abdekantieren des Überstandes in möglichst wenig eiskalter NaCl-Lösung resuspendiert. Bei einer weiteren Zentrifugation in vorgekühlten Glas-Zentrifugenröhrchen (250 g, 10 min, 4 °C) bildet sich ein Zellpellet, dem evtl. Erythrozyten aufliegen. Diese Erythrozyten werden mit einer sterilen Einmalpipette vorsichtig abgepusht und mit dem Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet wieder in insgesamt ca. 40 ml 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert.

Das Resuspensat wurde in zwei Aliquots geteilt; jedes Aliquot wurde mit 20 ml gekühltem Ficoll-Paque in Zentrifugen-Röhrchen vorsichtig unterschichtet. Es schloß sich eine Zentrifugation bei 250 g und 4 °C über 20 min an; hierdurch bildet sich an der Grenzschicht Ficoll/NaCl-Lösung ein Zellteppich mit vitalen RAM. Der Zellteppich wurde mit einer sterilen Pipette vorsichtig abgezogen, in 0,9%-iger NaCl-Lösung aufgenommen und resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde nochmals bei 250 g und 4 °C über 10 min zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde dann in Aussaat-Medium aufgenommen und resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels der Trypanblau-Methode (analog zu 2.4.4.). Durch Zugabe von Medium wurde eine Zellsuspension von $3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt.

2.3.2. Kultur der RAM

Je 2 ml der unter 2.3.1. erhaltenen Zellsuspension wurden je Schälchen einer Zellkultur-Makroplatte ausplattiert. Die Platten wurden dann über 2 h im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) inkubiert; während dieser Zeit bildete sich auf dem Boden der Schälchen ein adhärenter Monolayer aus vitalen RAM.

Nach 2 h wurde das Medium abgezogen, wobei überschüssige und/oder tote RAM mit entfernt wurden, und je 2 ml neues Medium wurden zugegeben. Bei Kulturzeiten über 24 h wurde AM-KM2, ansonsten AM-KM1 verwendet.

Anschließend wurden die Zellen bis zum Gebrauch (2.3.3.) über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) aufbewahrt.

Für Inkubationen zur Gewinnung von Überständen, aus denen die Freisetzung von Zytokinen bestimmt werden sollte, wurden immer 6-well-Makroplatten verwendet.

Alternativ zu o.g. Makroplatten wurden für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (2.6.) Transwell-Kultursysteme verwendet. In die oberen Kompartimente wurden je 1,5 ml der Zellsuspension oder des Mediums, in die unteren 2,5 ml des jeweiligen Mediums gegeben.

Für die Versuche zur Freisetzung von O₂⁻ mit Cytochrom C fanden 24-well-Platten mit einem Suspensions-/Medien-Volumen von 1 ml je Vertiefung (2.11.1.2.) Verwendung. Der Medienwechsel nach 2 h erfolgte analog zu den Bedingungen der "Standard-Kultur".

Für die Fluoreszenz-Versuche mit H₂DCF-DA wurden in 96-well-Mikrotiterplatten je Vertiefung 200 µl einer Zellsuspension mit $1,5 \times 10^6$ Zellen ml⁻¹ (2.11.1.1.) ausplattiert. Beim Medienwechsel wurde AM-KM1 ohne Phenolrot benutzt.

2.3.3. Inkubationsversuche mit RAM zur Freisetzung von Zytokinen

Die RAM wurden am Morgen nach ihrer Gewinnung (vgl. 2.3.1.) für Versuche genutzt; die Verwendung sofort nach Gewinnung erscheint nicht sinnvoll, da sich bakterielle Kontaminationen erst nach der Übernacht-Inkubation manifestieren. Außerdem klingt eine evtl. durch ihre Isolierung

induzierte Aktivierung der RAM ab.

Variation der Partikel-Konzentration

Reagenzien und Medien

Partikel-Dispersionen

50, 100 und 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ C₆₀, RR, Graphit oder DQ12 in AM-KM1, alle auf Eis mit Ultraschall dispergiert (Branson Sonifier, Leistungs- Stufe 5, 60% gepulst, 5 min)

LPS-Lösung

10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LPS in beschalltem AM-KM1 (Branson Sonifier, Leistungs-Stufe 5, 60 % gepulst, 5 min)

Medium für Kontrolle

AM-KM1, auf Eis beschallt (Branson Sonifier, Leistungs-Stufe 5, 60 % gepulst, 5 min)

Je 50, 100 oder 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ der Stäube (C₆₀, Fulleren-Rohruß [RR], Graphit oder DQ12 Quarz) wurden mit AM-KM1 in Zentrifugenröhrchen eingebracht und mit Ultraschall auf Eis dispergiert. Durch dieses Vorgehen werden die Partikel gleichmäßig dispergiert und eventuelle bakterielle Kontaminationen zerstört [Seemayer (1985)]. Auch die Medien für die Kontrolle und für den Standardstimulus LPS wurden mit Ultraschall behandelt.

Von allen Inkubationsmedien und Dispersionen wurden Aliquots über 24 h bei 36 °C im Wasserbad zur Kontrolle der Sterilität inkubiert.

Nach der optischen Kontrolle der Übernachtskultur auf bakterielle Kontaminationen wurde das alte Medium aus den Vertiefungen abgezogen und durch je 2 ml der Inkubationsmedien ersetzt: je drei Schälchen wurden mit Kontrollmedium (ohne jeden Zusatz), LPS-haltigem Medium oder Partikel-Dispersionen gefüllt. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Partikel zu gewährleisten, wurden die Dispersionen vor dem Ausbringen in die Vertiefungen so geschüttelt, daß kein Bodensatz aus Partikeln mehr erkennbar war.

Die so behandelten Platten wurden nun 4 h im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Überstände abgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Daran anschließend wurden durch Zentrifugation (350 g, 15 min.) alle zellulären Bestandteile aus den Überständen abgetrennt. Die Überstände wurden in Aliquots zu je 1 ml aufgeteilt und sofort weiterbearbeitet (LDH-Bestimmung, sh. 2.7.1.) oder bei -20 °C bis zu weiteren Tests (z.B. TNF-Test, 2.8.3.) eingefroren.

Variation der Zeit

Reagenzien und Medien

Partikel-Dispersionen

100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ C₆₀, RR, Graphit oder DQ12 in AM-KM1 oder AM-KM2, auf Eis mit Ultraschall dispergiert (Branson Sonifier, Leistungs-Stufe 5, 60 % gepulst, 5 min)

LPS-Lösung

10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ LPS in beschalltem AM-KM1 oder AM-KM2 (Branson Sonifier, Leistungs-Stufe 5, 60 % gepulst, 5 min)

Medium für Kontrolle

AM-KM1 oder AM-KM2, auf Eis beschallt (Branson Sonifier, Leistungs-Stufe 5, 60 % gepulst, 5 min)

Je 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ der Stäube (C₆₀, RR, Graphit oder DQ12) wurden mit AM-KM1 oder AM-KM2 (bei Inkubationszeiten über 24 h) in Zentrifugenröhrchen eingebracht und mit Ultraschall auf Eis

dispergiert; auch das Medium für die Kontrolle und für den Standardstimulus LPS wurden mit Ultraschall behandelt.

Das Pipettieren der Dispersionen erfolgte wie oben beschrieben.

Die so behandelten Platten wurden nun 4 h bis 96 h im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Inkubationsüberstände abgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Daran anschließend wurden durch Zentrifugation (350 g, 15 min.) alle zellulären Bestandteile aus den Überständen abgetrennt. Die Überstände wurden in Aliquots zu je 1 ml aufgeteilt und sofort weiterbearbeitet (LDH-Bestimmung, sh. 2.7.1.) oder bei -20 °C bis zu weiteren Tests (z.B. TNF-Test, 2.8.3.) eingefroren.

2.3.4. Zellzahlbestimmung und photographische Dokumentation

Reagenzien und Medien

Trypanblau-Lösung

0,5	g	Trypanblau
100	ml	0,9% NaCl-Lösung

Die in den Schälchen noch haftenden Zellen wurden zunächst mit 150 µl NaCl-Lösung (0,9%) überschichtet, um sie vor Austrocknung zu schützen. Kurz vor der Zählung der Zellen wurden je Schälchen 150 µl der Trypanblau-Lösung [*Hanks und Wallace (1958)*] zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Platte in den Vertiefungen gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden im Mikroskop ausgezählt: jedes der drei Löcher je Inkubation wurden im Mikroskop betrachtet. Ausgezählt wurden in der Mitte jedes Loches 4 Reihen à 10 Quadrate eines Netzokulars (Leitz Periplan GF 10x/18 M).

Die so gewonnenen (relativen) Zellzahlen geben die Zahl der nach der Inkubation noch vitalen RAM wieder. Alle nachfolgenden Versuche (z.B. TNF-Test) wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Aus dem Verhältnis

$$\frac{\text{Zahl vitaler Zellen}}{\text{Zahl vitaler Zellen} + \text{Zahl blaugefärbter Zellen}}$$

läßt sich außerdem die Viabilität der Zellen errechnen.

Gleichzeitig wurden die gefärbten Zellen fotografisch dokumentiert (Ölimmersionsobjektive Leitz/Diaplan, Belichtungseinrichtung Wild MPS 51S).

2.4. Inkubation mit differenzierten HL-60-Zellen

Die HL-60-Zelllinie wurde von *Collins et al. (1977)* etabliert. Sie stammt aus einer akuten promyelotischen Leukämie und kann durch 1,α25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) zu makrophagen-ähnlichen Zellen differenziert werden [*Rossi et al. (1987)*].

Die HL-60-Zellen werden als Zellsuspension kultiviert.

2.4.1. Kultur der HL-60-Zellen

Reagenzien und Medien

Kulturmedium für HL-60-Zellen (HL-KM)

450	ml	RPMI 1640
75	ml	FKS (30 min. bei 56 °C hitzeinaktiviert)
7,5	ml	l-Glutamin, aus 200 mM Stammlösung
5	ml	Natriumpyruvat, aus 100 mM Stammlösung
5	ml	MEM 100x
5	ml	P/S

Je Zellkulturflasche mit einem Nennvolumen von 250 ml wurden 3×10^6 vitaler Zellen in 20 ml Medium ausgebracht. Nach jeweils 3 - 4 Tagen werden die Zellen in neue Kulturflaschen passagiert; hierbei wird mittels der "Trypanblau-Methode" die Vitalität der Zellen festgestellt. Für Versuchszwecke werden die HL-60-Zellen bis max. zur 15. Passage hochgezogen.

2.4.2. Differenzierung zu makrophagen-ähnlichen Zellen (HL-60-M)

Reagenzien und Medien

Calcitriol-Stammlösung

100	μM	Calcitriol in Ethanol _{puriss.}
-----	---------------	--

Differenzierungsmedium (HL-DM)

Calcitriol-Stammlösung und HL-KM im Verhältnis 1 : 100 mischen (Calcitriol-Endkonzentration 10^{-6} M)

Die Differenzierung der HL-60-Zellen zu makrophagen-ähnlichen Zellen erfolgt durch Inkubation mit HL-DM. Hierzu wird aus einer 10^{-4} molaren alkoholischen Calcitriol-Stammlösung mit dem HL-KM ein Differenzierungsmedium mit einer Endkonzentration von 10^{-6} M Calcitriol hergestellt.

Für die Differenzierung zu HL-60-M wurden in Transwell-Kultursystemen je oberes Kompartiment 1,5 ml einer Zellsuspension mit $0,5 \times 10^6$ HL-60-Zellen ml^{-1} HL-DM ausplattiert. Das untere Kompartiment wurde mit 2,5 ml HL-DM gefüllt.

Alternativ hierzu wurden HL-60-Zellen, die in Inkubationen zur Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies verwendet werden sollten, auch in Zellkulturflaschen differenziert. Je Flasche mit einem Nennvolumen von 250 ml wurden dazu 20 ml der o.g. Suspension verwendet.

Die Differenzierung dauert 4 Tage.

2.4.3. Inkubation der HL-60-M mit Partikeln

Reagenzien und Medien

Partikel-Dispersionen

100	$\mu\text{g ml}^{-1}$	C_{60} , RR, Graphit oder DQ12 in HL-KM, alle auf Eis mit Ultraschall dispergiert (Branson Sonifier, Leistungs-Stufe 5, 60% gepulst, 5 min)
-----	-----------------------	--

LPS-Lösung

10	$\mu\text{g ml}^{-1}$	LPS in beschalltem HL-KM (Branson Sonifier, Leistungs-Stufe 5, 60 % gepulst, 5 min)
----	-----------------------	---

Medium für Kontrolle

HL-KM, auf Eis beschallt (Branson Sonifier, Leistungs-Stufe 5, 60 % gepulst, 5 min)

Am 4. Tag der Differenzierung wurde das Medium im Unterstand der Schälchen abgezogen. Das im Schälchen oberhalb der Membran verbliebene Medium lief durch die Membran hindurch in das untere Kompartiment und konnte dort ebenfalls mit einer spitzen Pipette abgesaugt werden. Die HL-60-M verbleiben so auf der Membran des Transwell-Kulturschälchens und die Belastung der Zellen durch Zentrifugation und Resuspendierung wurde vermieden.

Zur Inkubation wurden in die oberen Kompartimente der Transwell-Kulturschälchen je 1,5 ml der jeweiligen Dispersion, der LPS-Lösung oder des Kontrollmediums gegeben. In das untere Kompartiment wurden 2,5 ml HL-KM pipettiert. Jeder Ansatz erfolgte dreifach. Von allen Inkubationsmedien wurden Aliquots über 24 h im Wasserbad bei 36 °C zur Kontrolle der Sterilität inkubiert.

Nach 4 - 24 Stunden Inkubation (Brutschrank, 5% CO₂, 37 °C) wurden zunächst die Überstände in den Luftkultur-Schälchen mit einer Pipette resuspendiert und je 200 µl getrennt in Eppendorf-Zentrifugegefäße überführt. Aus diesen Proben wurden später die Zellzahlen mit der Trypanblau-Methode (2.4.4.) ermittelt. Die verbleibenden Inkubationsüber- und Unterstände aus den Vertiefungen wurden in Zentrifugenröhrchen pipettiert, wobei die Überstände gleicher Ansätze gepoolt wurden.

Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 350 g für 15 min zentrifugiert, um Zellen, die mit den Überständen abgenommen wurden, abzutrennen. Die sich ergebenden Überstände wurden aliquotiert und bei - 18 °C zur späteren Untersuchung (z.B. auf TNF mittels ELISA, 2.10.1.1.) eingefroren.

2.4.4. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl und Viabilität wurden aus den in Eppendorf-Gefäße überführten 200 µl Proben der Zellsuspension (sh. oben) mit Trypanblau bestimmt.

Reagenzien und Medien

Trypanblau-Lösung

0,5	g	Trypanblau
100	ml	0,9% NaCl-Lösung

Je 100 µl der Zell-Suspension und der Trypanblau-Lösung [*Hanks und Wallace (1958)*] wurden gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl wurde auf der Basis von 4 ausgezählten Großquadraten errechnet.

2.5. Kultur der BEAS-2B-Zellen

BEAS-2B-Zellen sind humane bronchiale Epithelzellen, die durch eine SV40-Infektion immortalisiert wurden. Durch eine Transformierung durch das ras-Onkogen proliferieren sie permanent und sind in Mäusen tumorigen [*Reddel et al. (1995)*].

Die BEAS-2B-Zellen werden in Zellkulturflaschen mit einem Nennvolumen von 250 ml als adhärenzte Kultur in KGM-Medium gehalten. Das Passagieren erfolgt, wenn der Boden der Flasche vollständig mit Zellen bedeckt ist (mikroskopische Kontrolle).

Reagenzien und Medien

HEPES Buffered Saline (HBS)

	4,76	g	HEPES
	7,07	g	NaCl
	0,20	g	KCl
	1,70	g	Glucose
	1,29	g	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O
	0,25	ml	Phenolrot
ad	1,0	l	H ₂ O, pH mit 1N NaOH auf 7,5 einstellen, steril filtrieren, im Kühlschrank lagern

PET-Fertiglösung

Soy Bean Trypsin Inhibitor (SBIT)-Lösung

	10	mg	SBIT
	50	ml	HBS

KGM-Fertigmedium

Trypanblau-Lösung

	0,5	g	Trypanblau
	100	ml	0,9% NaCl-Lösung

Zusätzlich für die Versuche zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (2.11.1.1.):

10,65 mM CaCl₂-Lösung

	1,18	g	CaCl ₂
	1	l	Aq. bidest.

10%-Calcium-Supplementiertes Medium (1,2 mM Ca²⁺)

	10	ml	10,65 mM CaCl ₂ -Lösung
	90	ml	KGM-Fertigmedium

Zunächst wird das Medium aus den Flaschen abgezogen. Danach wird der Zellmonolayer mit 10 ml HBS gespült. Nach der Zugabe von 2 ml PET-Lösung wird die Zellkulturflasche für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Da dies nicht ausreicht, alle Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wird die Flasche von beiden Seiten 2 x geschlagen. Durch diese Erschütterungen lösen sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden. Die Flasche wird nun hochkant gestellt, so daß sich die Zellsuspension auf eine kleinere Fläche verteilt. Durch die Zugabe von 0,4 ml SBIT-Lösung wird das Trypsin der PET-Lösung inaktiviert. Die Suspension wird mit einer 1 ml Pipette gut resuspendiert und dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wird die Zellkulturflasche mit 10 ml KGM-Medium gespült und dieses Medium ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 250 g für 10 Minuten. Das Zellpellet wird nach dem Verwerfen des Überstandes vorsichtig mit einer 1 ml Pipette resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen (Trypanblau) wird die Suspension mit KGM-Medium auf $0,5 \times 10^6$ Zellen je ml eingestellt und mit $0,5 \times 10^6$ Zellen je Kulturflasche (Nennvolumen 250 ml) ausgesät.

2.6. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Präparation

Die Präparation der RAM für das Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) erfolgte nach einem Protokoll von *Cornell (1969)*, das von *Wilczek (1991)* abgewandelt wurde.

Reagenzien und Medien:

0,2 M Cacodylat-Puffer

0,2	M	Na-Cacodylat x 3H ₂ O
0,2	M	Sucrose
in Aq. bidest., mit 1 M HCl auf pH 7,0 einstellen		

0,1 M Cacodylat-Puffer

50	ml	0,2 M Cacodylat-Puffer
50	ml	Aq. bidest.

1% Glutaraldehyd-Lösung

0,4	ml	Glutaraldehyd 25%
4,6	ml	Aq. bidest.
5,0	ml	0,2 M Cacodylat-Puffer

Veronal-Puffer

2,94	g	Veronal
1,94	g	Natriumacetat x 3 H ₂ O
ad	100	ml Aq. bidest.

Osmiumtetroxid-/Veronal-Puffer (PALADE)

1	ml	Veronal-Puffer
1,0	ml	0,1 M HCl
1,25	ml	4%-ige OsO ₄ Lösung
1,75	ml	Aq. bidest.

Uranylacetat

2%-ige wässrige Uranylacetat-Lösung

Epon-Araldite

5	ml	Epon 812
11	ml	Araldite-Härter
3	ml	Araldite CY 206
0,44	ml	Araldite-Beschleuniger

Bleicitrat-Lösung

1,33	g	Pb(NO ₃) ₂
2,11	g	Natriumcitrat x 5,5 H ₂ O
1,76	g	Natriumcitrat x 2 H ₂ O
30	ml	Aq. bidest.
5 min Schütteln und nach 30 min 8 ml NaOH (1 M) zugeben		
ad	50	ml Aq. bidest., CO ₂ -frei, am nächsten Tag zugeben

Mikrotom

Ultramikrotom Sorvall MT2-B

Elektronenmikroskope

Siemens Elmiskop 1A
Zeiss EM109

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden RAM nach ihrer Gewinnung (vgl. 2.3.1.) in Transwell-Kultursysteme ausgesät. In das obere Kompartiment der Schälchen wurden 1,5 ml einer Zellsuspension von 3×10^6 Zellen, in das untere Kompartiment 2,5 ml Medium pipettiert. Nach 2 h, in denen vitale RAM als einschichtiger Zellrasen auf der Membran der Schälchen

festwachsen, wurde das Medium gewechselt (vgl. 2.3.2). Nach der Übernachtskultur wurden die RAM mit reinem Medium oder Partikel-Suspensionen in Medium ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$, vgl. 2.3.3.) inkubiert.

Nach 4 h Inkubation wurden die Transwell-Schälchen auf saugfähigen, fusselreifen Zellstoff gestellt, um das Inkubationsmedium durch die Membran nach unten abzusaugen (das Absaugen bei den folgenden Schritten erfolgte ebenso).

Danach wurden die Zellen in 1 % Glutaraldehyd bei 4°C für mindestens 2 h fixiert. (Um eine Faltung der Membran und eine Schädigung der anhaftenden Zellen zu vermeiden, verblieb die Membran bei diesem und dem nächsten Schritt im Transwell-Schälchen.) Anschließend wurde dreimal jeweils für 10 min mit dem 0,1 M Cacodylat/Sucrosepuffer bei 0°C gewaschen. Die Membran wurde nun mit einem spitzen Skalpell aus dem Transwell-Schälchen gelöst und in schmale Streifen geschnitten, die einzeln in Röhrchen überführt wurden. Zur Nachfixierung folgte die Zugabe von je 3 ml PALADE bei 0°C für 2 h. Dem Absaugen der PALADE schloß sich eine Kontrastierung mit 2 % Uranylacetat bei 0°C für 1 h an. Nach der Entfernung des Uranylacetats wurden die Zellen über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert:

50% Ethanol: 10 min.

95% Ethanol: 10 min.

100% Ethanol: 2 x 20 min.

Nach dieser Entwässerung wurden die Membranstückchen in die erste Einbettungsstufe aus einer Mischung aus Epon-Araldite und Ethanol (1 : 2) überführt. Nach 20 min folgten drei Epon-Araldite-Inkubationen im Exsikkator:

Epon-Araldite, über Nacht, bei Raumtemperatur

Epon-Araldite, 24 h, bei Raumtemperatur

Epon-Araldite, 60 min, bei 60°C

Danach wurden die Membranstückchen in Flachformen umgebettet und zur Polymerisation für drei Tage bei 60°C gelagert.

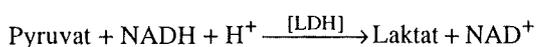
Die Schnitte mit einer Schichtdicke von 100 nm wurden auf Kupfergrids aufgebracht und mit Uranylacetat (1 min) und Bleicitrat (5 min) kontrastiert. Nach zweimaligem Waschen mit CO_2 -freiem Aq. bidest. folgte eine Lufttrocknung. Die Aufnahmen wurden durch Frau Kampmann (FKZ/ITOX) an einem TEM Siemens Elmiskop IA und einem Zeiss EM 109 erstellt.

2.7. Untersuchungen zur Freisetzung intrazellulärer Enzyme: LDH und NAG

2.7.1. Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Das intrazelluläre Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH) wird beim Zelltod aus den Zellen freigesetzt. Ein Anstieg der LDH im Inkubationsüberstand ist streng mit einer Abnahme der vitalen Zellen während der Inkubation verknüpft. Die Bestimmung der LDH über ihre enzymatische Aktivität ist daher eine Möglichkeit, den zytotoxischen Effekt von Partikeln etc. *in vitro* abzuschätzen.

Die Bestimmung der LDH erfolgte photometrisch mit einem kommerziell erhältlichen Reagenziensatz. Durch die Reaktion



kommt es zu einer Abnahme der Extinktion bei 340 nm.

Reagenzien und Medien

Pyruvat-Lösung

aus Reagenziensatz "LDH optimized", Sigma

NADH-Lösung

aus Reagenziensatz "LDH optimized", Sigma

Reagenzlösung

0,4	ml	Pyruvat-Lösung
10	ml	NADH-Lösung

Meßgerät

Beckman DU-65 Spektrophotometer, Meßtemperatur 24 °C, Wellenlänge 340 nm, Kalibrierung gegen Luft, ½-Mikroküvetten Ratiolab

Zur Messung der LDH-Aktivität wurden

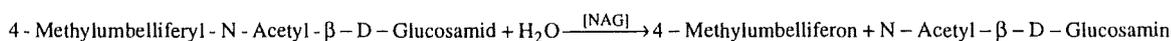
500	µl	Reagenzlösung
20	µl	Probe (Inkubationsüberstand)

in den Küvetten gemischt. Die Extinktionsänderung wurde mit einer Intervallzeit von 30 Sekunden über eine Gesamtmeßzeit von 3 Minuten erfaßt.

2.7.2. Bestimmung der N-Acetyl-β-Glucosaminidase (NAG)

Die N-Acetyl-β-Glucosaminidase (NAG) ist ein lysosomales Enzym, dessen Freisetzung *in vitro* auf eine Schädigung der Lysosomen durch die eingesetzten Substanzen schließen läßt.

Die Bestimmung der NAG in den Inkubationsüberständen erfolgt über ihre enzymatische Aktivität [Andersen et al. (1982)]:



Zur Messung wird hierbei fluoreszenzphotometrisch die Bildung von 4-Methylumbelliferon als Reaktionsprodukt erfaßt.

Reagenzien und Medien:

Lactat-Puffer

4,48	g	Natriumlactat
1	l	Aq. bidest.

ergibt eine 40 mM Lactat-Lösung, mit Milchsäure auf pH 3,7 einstellen

Substrat-Lösung

1	mM	4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamid in Lactat-Puffer
---	----	---

Natriumcarbonat-Lösung (Lösung 1)

21,1	g	Na ₂ CO ₃
1	l	Aq. bidest.

Natriumhydrogencarbonat-Lösung (Lösung 2)

16,8	g	NaHCO ₃
1	l	Aq. bidest.

Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffer

Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH 10,5 titrieren

Triton X-100-Lösung		
10	ml	Triton X-100
100	ml	Aq. bidest.

Meßgerät

Lumineszenzphotometer Perkin Elmer LS 5B, Anregungswellenlänge 371 nm, Emissionswellenlänge 450 nm,
Filter für beide Wellenlängen 1% bei einer Spaltbreite von 5 nm

Zur Messung der NAG-Aktivität wurden

10	µl	Triton X-100-Lösung
100	µl	Probe (Inkubationsüberstand) und
100	µl	Substrat

gemischt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml des Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffers wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Proben im Lumineszenzphotometer gemessen.

2.8. Bestimmung des Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF- α) durch den WEHI-Bioassay

2.8.1. Grundlagen des Verfahrens

TNF- α (oder verkürzt: TNF) ist ein Zytokin, das Tumorzellen zum Absterben bringt. Inkubiert man transformierte, TNF-sensitive Zellen (z.B. WEHI Subklon 164/13) mit TNF-haltigen Medien, so kommt es aufgrund der zytotoxischen Wirkung des Zytokins zu einer Abnahme der Vitalität der Zellkultur, die in bestimmten Konzentrationsbereichen linear mit der TNF-Konzentration korreliert [Espevik und Nissen-Mayer (1986), Ruff und Gifford (1981)].

Setzt man nach dem Einwirken des TNF dem Inkubationsansatz eine Lösung mit MTT (3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) zu, so wird diese gelbliche Verbindung an den Mitochondrien der noch lebenden Zellen zu einem bläulich-violetten chromogenen Formazan umgesetzt.

Das gebildete Formazan wird mit einem organischen Lösemittel in Lösung gebracht; es folgt eine Absorptionsmessung bei 550 nm.

2.8.2. Kultur der WEHI 164/13-Zellen

WEHI-Zellen sind eine Fibroblastenzelllinie der Maus. Der Subklon WEHI 164/13, der in Kultur als adhärenter Monolayer wächst, eignet sich auf Grund seiner sehr hohen Sensitivität gegenüber TNF- α als Bioassay für dieses Zytokin [Espevik und Nissen-Mayer (1986)]. Matejka (1992) etablierte den Test in unserem Labor zur Bestimmung des TNF- α aus RAM.

Reagenzien und Medien

Kulturmedium für WEHI-Zellen (WE-KM)

450	ml	RPMI 1640
5	ml	P/S
50	ml	FKS (30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert)
5	ml	l-Glutamin

Trypsin-Lösung

0,25	%	Trypsin
------	---	---------

Bei Konfluenz des Zellrasens in den Zellkulturflaschen (optische Kontrolle) wurde das Medium abgezogen und mit 5 ml einer 0,25 %igen Trypsin-Lösung kurz gespült. Nach dem Entfernen des Trypsins wurde erneut mit 3 ml der Trypsin-Lösung gespült, wobei etwa 0,5 ml der Lösung in der Flasche verblieben. Nach vollständigem Ablösen des Zellrasens (opt. Kontrolle) wurde die zellhaltige Trypsin-Lösung mit gut 10 - 20 ml Medium aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 250 g für 10 min bei 4 °C.

Der trypsinhaltige Überstand wurde abgezogen und das Zellpellet vorsichtig in Medium (10 - 15 ml) resuspendiert; nach dem Auszählen (Trypanblau-Methode) wurden die Zellen mit $1,0 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ in 20 ml ausgesät (Zellkulturflasche mit 250 ml Nennvolumen). Das Abtrypsinieren und Umsetzen der Zellen war jeweils nach 3 - 4 Tagen notwendig.

Die Zellen wurden jeweils maximal bis zur 15. Passage nach dem Auftauen verwendet.

2.8.3. TNF- α Testverfahren für WEHI 164/13

Reagenzien und Medien

Phosphat-Buffered Saline (PBS)

Inkubationsüberstände aus Versuchen mit RAM, unverdünnt oder 1 : 1 bzw. 1 : 3 verdünnt

TNF- α Standard

100	U ml ⁻¹	TNF- α , human rekombinant	
		daraus durch Verdünnung mit AM-KM1 oder AM-KM2 Standardreihe mit	
		0,04 - 10 U TNF- α ml ⁻¹ (entspricht 2 - 500 pg TNF- α ml ⁻¹)	

Actinomycin D-Lösung (1 mg ml⁻¹)

100	mg	Actinomycin D
100	ml	PBS

Inkubationsmedium mit Actinomycin D (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

99	ml	WE-KM
1	ml	Actinomycin D-Lösung

MTT-Lösung

500	mg	3-[4,5-Dimethyl-2thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT)
100	ml	PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)

SDS-Lösung

200	g	Natriumdodecyl-Sulfat (SDS)
1	l	0,02 M HCl p.A.

Meßgerät

ELISA-Reader Molecular Devices thermo max, Wellenlänge 550 nm

Die Gewinnung der Zellen aus den Kulturflaschen erfolgte wie in 2.8.2. beschrieben; die Zellzahl wurde jedoch auf $3,0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt.

Von dieser Suspension wurden 200 μl je Schälchen einer Mikrotiter-Platte ausplattiert. Auf jeder Platte wurde eine Spalte (i.d.R. Spalte 12) für den Reagenzien-Leerwert freigelassen.

Es folgte eine Inkubation über 4 h (Brutschrank, 5% CO₂, 37 °C), um ein Festsetzen der Zellen auf dem Boden zu erreichen. Dieser Inkubation schloß sich eine Zentrifugation der Platten bei 250 g für 5 min an.

Die Platten wurden zunächst ausgeschlagen (um das Medium zu entfernen) und dann die Testmedien zugegeben. Dabei hat es sich bewährt, zunächst erst 100 μl des Testmediums (Inkubationsüberstand oder Standard) zu pipettieren. Von den zu testenden Inkubationsüberständen wurden auch Verdünnungen (i.d.R. 1 : 1 und 1 : 3) eingesetzt, so daß immer Meßwerte im linearen

Bereich der Standardkurve erhalten wurden. Die Standardreihe wurde bei jedem Versuch mitgeführt und immer mit dem Kulturmedium hergestellt, das auch bei der Gewinnung der Inkubationsüberstände verwendet worden war.

Danach wurden je Loch 100 µl des Inkubationsmediums mit Actinomycin D zugegeben. Die Endkonzentration von Actinomycin D betrug somit 1 µg je Loch bzw. 5 µg ml⁻¹. Actinomycin D hemmt die Zellteilung, so daß in allen Vertiefungen ab Inkubationsbeginn keine Zellvermehrung, die den zytotoxischen Effekt des TNF überdecken könnte, mehr auftritt. Die Actinomycin D-Zugabe stellt damit den Reaktionsstart dar, der durch die Verwendung einer Multipipette gut für alle Vertiefungen synchronisiert wurde. Mit jeder zu messenden Probe bzw. jedem Standard wurden je 4 Vertiefungen der Platte beschickt.

Der Ausplattierung der Proben folgte eine Inkubation über 18 h im Brutschrank (5% CO₂, 37 °C). Zu dem Überstand wurden dann je Vertiefung 20 µl der MTT-Lösung gegeben.

Nach weiteren 4 h Inkubation (Brutschrank, 5% CO₂, 37 °C) folgte die Zugabe von 60 µl SDS-Lösung je Vertiefung.

Die so behandelten Platten wurden erneut über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Morgen wurden die Platten im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen, um die Absorption des gebildeten Formazans zu bestimmen.

Der TNF-Gehalt der Proben (U ml⁻¹) wurde aus dem linearen Bereich der Standardkurve errechnet.

2.9. Bestimmung der chemoattraktiven Faktoren (Chemotaxis)

2.9.1. Chemoattraktive Faktoren für RAM

Mit dieser Methode, die von *Polzer (1992)* in Anlehnung an *Falk et al. (1980)* in der Arbeitsgruppe eingeführt wurde, kann geprüft werden, ob von den RAM während der Inkubation Mediatoren oder Faktoren abgegeben werden, die auf andere RAM als Chemoattraktoren wirken: enthält die untersuchte Probe derartige Faktoren, so wandern Zellen durch eine Membran in Richtung dieser Probe. Die Anzahl der in einer bestimmten Zeit durch die Membran gewanderten Zellen erlaubt eine relative Quantifizierung des Gehaltes an chemoattraktiven Faktoren.

Reagenzien und Medien

Phosphat-Buffered Saline (PBS)

FKS

30 ml FKS, 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert

Zymosanaktiviertes Serum (ZAS)

0,75 g Zymosan A
30 ml PBS

Das Zymosan wurde in 30 ml PBS gewaschen, bei 1000 g 10 min⁻¹ sedimentiert und anschließend in 30 ml FKS resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation im Schüttelwasserbad (bei 37 °C) erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 3500 g 10 min⁻¹. Anschließend wurde der Überstand 1 h bei 56 °C hitzeinaktiviert. Das so aktivierte Serum wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für Versuche wurde es 1 : 10 mit dem Versuchsmedium verdünnt [*Polzer (1992)*].

Kulturmedium für RAM

AM-KM1 oder AM-KM2

Inkubationsüberstände

Chemotaxis-Kammer

NeuroProbe 48 Well Micro Chemotaxis Chamber

Chemotaxis-Membranen

Polycarbonat-Membran Nuclepore, 5 µm Porenweite, NMF-5, PVP frei, 25 x 80 mm

Hemacolor-Färbelösungen 1, 2 und 3

Meßgerät

Laserdensitometer (UltraScan XL, LKB), Geräteeinstellungen: x-Width = 4 und y-Step = 5.

Verwendet wurde eine "blind well" Chemotaxis-Kammer, in deren untere Hälfte blind endende Vertiefungen mit einem Fassungsvermögen von 25 µl eingefräst sind. In diese wurden 26 µl des zu untersuchenden Überstandes, das pure Medium (als Negativkontrolle) oder 10% ZAS (als Positivkontrolle) einpipettiert.

Nach dem Einpipettieren der Probenflüssigkeiten wurde eine Polycarbonatmembran mit einer Porenweite von 5 µm auf die untere Kammerhälfte gelegt. Die glänzende Seite der Membran muß dabei nach "oben" orientiert sein. Über diese Membran wurde eine Silikondichtung gelegt und der obere Kammerteil aufgeschraubt.

In die durchgehenden Löcher der oberen Kammerhälfte wurden nun je 50 µl einer RAM-Suspension (mit 2 - 3 x 10⁶ Zellen ml⁻¹) eingefüllt. Zur Herstellung der Suspension wurde das gleiche Medium verwendet wie bei der Inkubation, aus der die Überstände stammen. Außerdem ist es ratsam, die RAM nicht am Tag nach ihrer Gewinnung, sondern erst am 3. oder 4. Tag nach ihrer Isolierung für die Chemotaxis zu verwenden, da sie vorher aufgrund einer Voraktivierung weniger gut wandern [Mosbach (1994)].

Es folgte eine Inkubation der Kammer im Brutschrank (4 h bei 37 °C, 5% CO₂). Bei allen Schritten war darauf zu achten, daß Luftblasen vermieden werden. Jede Probe wurde in 4 Vertiefungen pipettiert.

Nach dem Abnehmen des oberen Kammerteiles und der Silikondichtung wurde die Membran vorsichtig vom unteren Kammerteil abgehoben. Zur Entfernung von nicht durch die Membran gewanderten Zellen wurde die Oberseite der Membran abgestreift. Dazu wird zunächst der Deckel einer 96-well-Mikrotiterplatte zu ca. ¾ mit 0,9% NaCl oder PBS gefüllt. Die Membran wird dann etwa 10-mal mit der glänzenden Seite nach unten über die Kante des Deckels gezogen.

Die Membran wurde an Luft getrocknet und mit Hemacolor-Reagenzien (je Lösung 1 min) gefärbt. Nach dem dritten Farbreagenz wurde überschüssige Farbe durch Spülen der Membran mit Wasser entfernt. Nach erneuter Trocknung an Luft wurde die Farbintensität der Flecken, die gut mit der Anzahl der gewanderten Zellen korreliert, mit einem Laserdensitometer bestimmt [Cerra und Nathansson (1989)]. Die Peaks wurden mit der zum Gerät gehörenden Software rechnergestützt integriert.

Das chemotaktische Potential (CP) in relativen chemotaktischen Einheiten (rcE) wird aus den integrierten Flächen der Peaks berechnet:

$$CP = \frac{X_{\text{Prob}} - X_{\text{Med}}}{X_{\text{ZAS}} - X_{\text{Med}}} \times 100$$

mit X_{Prob} = chemotakt. Attraktivität der Proben (Peakfläche)
 X_{ZAS} = chemotakt. Attraktivität von ZAS (Peakfläche)
 X_{Med} = spontane Mobilität (Peakfläche)

2.9.2. Chemoattraktive Faktoren für polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten

Die oben beschriebene Methode kann nach leichten Modifikationen auch für die Bestimmung chemotaktischer Faktoren für Granulozyten verwendet werden.

Reagenzien und Medien

Rinderblut, gerinnungsgehemmt

1	l	Rinderblut aus Halsschlagader
20 000	U l ⁻¹	Heparin

Ficoll-Paque

0,9% NaCl-Lösung

9	g	NaCl
1	l	Aq. bidest.

0,2% NaCl-Lösung

2	g	NaCl
1	l	Aq. bidest.

1,6% NaCl-Lösung

16	g	NaCl
1	l	Aq. bidest.

Kulturmedium für RAM

AM-KM1 oder AM-KM2

Trypanblau-Lösung

0,5	g	Trypanblau
100	ml	0,9% NaCl-Lösung

In Anlehnung an die Methode von *Chodirker et al. (1968)* zur Isolierung der Granulozyten wurde Rinderblut 1 : 3 mit 0,9% NaCl auf ein Endvolumen von ca. 200 ml verdünnt. Diese Suspension wurde in Aliquots zu je 20 ml in Zentrifugenröhrchen mit einem Nennvolumen von 50 ml überführt und vorsichtig mit 20 ml Ficoll-Paque unterschichtet. Nach einer Zentrifugation (500 g, 30 Minuten) sind drei Banden in dem Röhrchen zu sehen: die oberste, leicht gelbliche, mit einem Volumen von ca. 20 ml enthält Serumbestandteile und wurde verworfen. Zuunterst ist ein Zellpellet aus Erythrozyten und Granulozyten zu finden, auf dem eine dünne Schicht aus monozytären Leukozyten aufliegt. Diese Monozyten wurden zusammen mit der mittleren Bande aus NaCl-Lösung ebenfalls vorsichtig abgezogen.

Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Pellet zunächst mit 20 ml der 0,2%-igen NaCl-Lösung resuspendiert. Nach 20 Sekunden Einwirkzeit wurden 20 ml der 1,6%-igen NaCl-Lösung zupipettiert, um wieder isotonische Bedingungen zu erhalten. Dadurch wurde vermieden, daß neben den Erythrozyten auch die Granulozyten durch Lyse Schaden nehmen. Die Röhrchen wurden bei 250 g für 7 Minuten zentrifugiert, und der rote Überstand bis auf ca. 5 ml Restvolumen abgenommen. Es folgten mehrere Wiederholungen der Erythrozyten-Lyse, bis der Überstand klar und durchsichtig war. Im Sumpf des Röhrchens fand sich dann ein Pellet, das zu mehr als 80% aus polymorphonukleären, neutrophilen Granulozyten bestand.

Danach wurde das Zellpellet in wenig AM-KM1 oder AM-KM2 resuspendiert und nach der Zellzahlbestimmung (Trypanblau-Zählung) auf $0,6 \times 10^6$ Zellen je ml eingestellt. Die Verwendung von AM-KM1 oder AM-KM2 richtete sich nach den zu untersuchenden Überständen.

Das Versuchsprotokoll für den Chemotaxis-Assay mit Granulozyten folgt im wesentlichen dem für RAM. Unterschiede bestehen nur in zwei Punkten: die Porengröße der Membran betrug nur 3 µm und die Wanderungszeit nur 90 Minuten.

2.10. Zytokin-Quantifizierung mit ELISA

2.10.1. Allgemeines

Anders als ein Bioassay (wie der WEHI-Test für TNF, vgl. 2.8.3.) ist ein **Enzym Linked Immuno Sandwich Assay (ELISA)** ein streng standardisierter Test, der wegen seiner hohen Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit besonders in der klinischen Diagnostik, aber auch in der Routineforschung Verwendung findet. Da ELISAs in der Regel eine hohe (Spezies-)Spezifität besitzen und vor allem für die Humanmedizin etabliert sind, können sie i.d.R. nur bei *in vitro* Versuchen mit Zelltypen humanen Ursprungs (z.B. HL-60-Zellen) eingesetzt werden.

Beim ELISA wird der Boden einer Mikrotiterplatte mit einem Antikörper, der spezifisch für ein bestimmtes Antigen (z.B. ein Zytokin) ist, beschichtet. In die Vertiefungen werden Lösungen mit bekannten Antigengehalten (für die Standardkurve) oder unbekanntem Antigengehalten gegeben. Nach einer bestimmten Reaktionszeit - in der die Antigene an die auf den Böden der Löcher sitzenden Antikörper binden - werden diese Lösungen abgezogen und ihre Reste aus den Löchern ausgewaschen.

Danach wird eine Lösung mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Antigen zupipettiert. An die Antikörper dieser Lösung ist ein Enzym gekoppelt (z.B. Meerrettich-Peroxidase), das in einem späteren Schritt eine Farbreaktion katalysiert. Dieses Konjugat bindet an die Antigene, die von den Antikörpern, die am Boden der Vertiefungen immobilisiert sind, aus den Lösungen eingefangen wurden. Nach einer bestimmten Reaktionszeit werden die nicht gebundenen Enzym-/Antikörper-Komplexe abgewaschen. Eine Substratlösung wird zupipettiert; die Enzyme, die an die Antikörper aus dem zweiten Inkubationsschritt angehängt sind, setzen diese Lösung zu einer Farblösung um. Die Intensität der Farblösung ist proportional zur Menge der gebundenen Enzyme. Nach einer bestimmten Reaktionszeit wird die Reaktion gestoppt, und die Farbtintensität (Absorption bei einer definierten Wellenlänge) gemessen.

Die optische Dichte der Standardkurve wird gegen die bekannten Konzentrationen aufgetragen; durch Vergleich der optischen Dichte der unbekanntem Proben mit der Standardkurve läßt sich der Gehalt der unbekanntem Proben errechnen.

ELISAs mit human-rekombinanten Antikörpern wurden zur Untersuchung von **Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)**, **Interleukin-8 (IL-8)**, **Platelet-Derived Growth Factor AB (PDGF-AB)** und **basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor)** verwendet. Das exakte Vorgehen bei der Verwendung von ELISAs ist der jeweils dem Reagenziensatz beiliegenden Arbeitsanleitung detailliert zu entnehmen.

2.10.1.1. TNF- α

Reagenzien und Medien

Inkubationsüberstände

TNF- α -Reagenzien-Kit "R&D Quantikine" (Fa. Bierman, enthält alle weiteren wichtigen Reagenzien)

Plattenwäscher

ELISA-Plattenwäscher SLT 812 SW 1

Meßgerät

ELISA-Reader Molecular Devices thermo max, Wellenlänge 450 nm

Die Mikrotiterplatte wurde aus der Folientasche entnommen; nicht benötigte Reihen wurden herausgenommen und zur späteren Verwendung kühl und trocken aufbewahrt.

Je Vertiefung wurden 200 μ l der zu untersuchenden Überstände aus HL-60-M Inkubationen (vgl. 2.4.3.) oder der Standardlösungen zugegeben. Medium ohne TNF-Zusatz diente als Nullwert. Die

Platte wurde bei 37 °C (Brutschrank) für 2 h inkubiert.

Anschließend wurde mit Hilfe eines ELISA-Plattenwäschers die Platte dreimal mit je 200 µl eines Waschpuffers (durch 1 : 50-Verdünnung eines mit dem Kit mitgelieferten Konzentrates hergestellt) gespült. Diesem Schritt folgte die Zugabe von je 200 µl des TNF- α -Konjugats.

Nach weiteren 2 h Inkubation (bei 37 °C) wurde die Platte erneut wie oben beschrieben gewaschen. Nach 20 min Inkubation mit 200 µl Substratlösung je Vertiefung bei Raumtemperatur wurden je 50 µl der Stopplösung (2 N Schwefelsäure) zugegeben. Innerhalb von 30 min erfolgte die Messung der optischen Dichten der Proben bei 450 nm.

Über die Daten der Regressionsgeraden der Standardkurve können die TNF-Konzentrationen der Proben berechnet werden. Die Proben mußten nicht verdünnt werden.

2.10.1.2. IL-8

Reagenzien und Medien

IL-8-Reagenzien-Kit "R&D Quantikine"

Sonstiges sh. 2.10.1.1.

Der Test läuft im Wesentlichen wie der TNF- α -Assay in 2.10.1.1.; abweichend waren die Inkubationstemperatur (Raumtemperatur) und die Vorlage von 100 µl eines mit dem Kit mitgelieferten Verdünners je Loch sowie die notwendige Verdünnung der zu untersuchenden Proben um Faktor 50 - 100 mit HL-KM, um in den Bereich der Kalibriergeraden zu kommen (dieser Faktor mußte in einem Vortest ermittelt werden).

2.10.1.3. PDGF-AB

Reagenzien und Medien

PDGF-Reagenzien-Kit "R&D Quantikine"

Sonstiges sh. 2.10.1.1.

Als erster Schritt beim PDGF-AB ELISA wurden 50 µl eines Verdünners, der mit dem Reagenziensatz mitgeliefert wird, je Vertiefung vorgelegt. Für PDGF-AB wurden dann 200 µl der unverdünnten Proben aus den HL-60-M Inkubationen oder der Standardlösungen je Vertiefung zugegeben. Das weitere Vorgehen entsprach der Arbeitsvorschrift für den IL-8 ELISA.

2.10.1.4. bFGF

Reagenzien und Medien

bFGF-Reagenzien-Kit "R&D Quantikine"

Sonstiges sh. 2.10.1.1.

Wie bei PDGF-AB wurden auch hier 50 µl eines Verdünners je Vertiefung vorgelegt. Es folgte die Zugabe von 200 µl Probe oder Standardlösung je Loch. Alle weiteren Schritte stimmten mit dem IL-8 ELISA überein.

2.10.2. Adsorption von Zytokinen an Kohlenstoff-Partikel am Beispiel TNF- α

Zur Untersuchung der Frage, ob Zytokine an die Kohlenstoff-Partikel adsorbieren, wurde das Verhalten von TNF- α in Partikel-Dispersionen untersucht. Die eingesetzten TNF-Konzentrationen wurden hierbei im Rahmen der *in vitro* beobachteten TNF-Konzentrationen völlig zufällig gewählt.

Reagenzien und Medien

TNF- α Standard
 2500 pg ml⁻¹ TNF- α , human rekombinant,
 daraus durch Verdünnung mit HL-KM Lösungen von 280, 134 und 60 pg ml⁻¹

Partikel-Dispersionen
 200 μ g ml⁻¹ C₆₀ oder RR in HL-KM, auf Eis mit Ultraschall dispergiert (Branson Sonifier, Leistungsstufe 5, 60% gepulst, 5 min)

TNF- α Reagenzien-Kit "R&D Quantikine"

Zur Untersuchung von Adsorptionseffekten wurden jeweils 1 ml der TNF-Lösungen und der Partikel-Dispersionen je Loch einer Zellkultur-Makroplatte zusammenpipettiert. Auf diese Weise wurden unter Bedingungen, die denen der Inkubation von Zellen mit Partikel-Dispersionen entsprachen, Endkonzentrationen von 140, 67 und 30 pg ml⁻¹ TNF in Dispersionen mit 100 μ g ml⁻¹ C₆₀ bzw. RR erreicht.

Nach 4 h Inkubationszeit im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) wurden die Dispersionen abgenommen und unter Standardbedingungen (350 g, 15 min) zentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und wie Inkubationsüberstände bei -18 °C einem Gefrierzyklus unterworfen.

Nach dem Auftauen der Proben wurden sie im TNF- α ELISA (vgl. 2.10.1.1.) auf ihren TNF-Gehalt hin untersucht.

Im Versuch wurde kein signifikanter Einfluß der Partikel auf den Zytokin-Meßwert im ELISA gefunden.

2.11. Untersuchungen zum Oxidantien-/Antioxidantienhaushalt *in vitro*

2.11.1. Nachweise zur *in vitro* Produktion von Oxidantien

2.11.1.1. Oxidantien-Nachweis mit 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA)

Der Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (RSS) durch die Verwendung von 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) in 96-well-Mikrotiterplatten wurde ursprünglich von Rosenkranz *et al.* (1992), basierend auf Arbeiten von Keston und Brand (1965) und Bass *et al.* (1983) für Granulozyten etabliert. Das nicht fluoreszierende Reagenz H₂DCF-DA wird durch RSS (wie O₂⁻) zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Die Bildung von DCF wird mit einem Anstieg der Fluoreszenz bei 535 nm nach Anregung mit Licht von 485 nm Wellenlänge nachgewiesen.

Die Testparameter wurden im Labor zur Verwendung mit RAM und HL-60-M optimiert [Gu und Seidel, zur Veröffentlichung eingereicht]. Durch Zugabe von SOD oder Katalase mit H₂DCF-DA in das Außenmedium (anstelle von HBSS alleine) kann außerdem zwischen der Bildung von O₂⁻ und H₂O₂ unterschieden werden. Als Positiv-Kontrolle zur Induktion von RSS dient opsoniertes Zymosan.

Reagenzien und Medien:

HBSS

6,8	g	HBSS
0,35	g	Natriumhydrogencarbonat
1	l	Aq. bidest.

mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, sterilfiltrieren

Katalase-Lösung

6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Katalase in HBSS

SOD-Lösung

40 Units ml^{-1} SOD in HBSS

Zymosan-Suspension

6 mg ml^{-1} opsoniertes Zymosan in HBSS

Die Opsonierung von Zymosan wird wie folgt durchgeführt:

1 g Zymosan wird in 100 ml 0,9 % NaCl-Lösung suspendiert. Die Suspension wird 1 Stunde unter ständigem Rühren gekocht und anschließend bei 2000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wird mit 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Durch Resuspension des Sediments mit 20 ml 0,9 % NaCl-Lösung wird eine Konzentration von 50 mg ml^{-1} eingestellt. Zur Opsonierung werden je Teil Zymosan 3 Teile FKS zugegeben. Diese Mischung wird bei 37 °C und mehrmaligem Rühren für 20 Minuten inkubiert. Nach Inkubationsende wird das opsonierte Zymosan bei 2000 g 15 Minuten⁻¹ abzentrifugiert und erneut in 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation (2000 g 15 min⁻¹) wird das Sediment mit 100 ml 0,9 % NaCl auf eine Zymosan-Suspension von 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ eingestellt. Nach der Aliquotierung ist die Suspension bei -20 °C längere Zeit lagerbar.

Partikel-Dispersionen

600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ C₆₀, RR, Graphit oder DQ12 in HBSS, auf Eis mit Ultraschall dispergiert (Branson Sonifier Leistungsstufe 5, 60 % gepulst, 5 min). Durch die Verdünnung im Versuchsansatz wird so eine effektive Konzentration von 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ erreicht

H₂DCF-DA-Lösung

60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ H₂DCF-DA in HBSS/2,4% Ethanol, hergestellt durch 1 : 40 Verdünnung einer H₂DCF-DA Stammlösung (2,5 mg ml^{-1} H₂DCF-DA in Ethanol p.A.) mit HBSS. H₂DCF-DA Stammlösung bei -20 °C im Dunkeln lagern.

96-well-Mikrotiterplatten

Falcon "Primaria", "Flat Bottom"

Meßgerät

Millipore CytoFluor 2300, Anregungswellenlänge 485 nm (Filter B), Emissionswellenlänge 535 nm (Filter B), Sensitivität 3, bei BEAS-2B-Zellen Sensitivität 2 (ca. 1/7 der Sensitivität 3)

Je nach verwendeter Zellart unterscheidet sich das Versuchsprotokoll geringfügig:

Versuchsansatz für RAM

RAM wurden direkt nach ihrer Gewinnung auf eine Suspension mit $1,5 \times 10^6$ Zellen ml^{-1} in RPMI-1640 (mit P/S) eingestellt. Je Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 200 μl dieser Suspension ausplattiert. Nach 2 h wurden die Platten zur Entfernung nicht adhärenter RAM (vgl. 2.3.2) unter der Sterilbank ausgeschlagen. Es folgte die Zugabe von 200 μl RPMI 1640 (ohne Phenolrot, mit P/S, 2% FKS). Nach der Übernachtskultur (vgl. 2.3.2.) wurden die Platten erneut ausgeschlagen. Um ein Antrocknen der Zellen zu verhindern, wurden sofort 100 μl HBSS je Vertiefung zupipettiert. Es folgte die Zugabe von 50 μl je Vertiefung der Enzymlösung (SOD oder Katalase) bzw. von HBSS. Anschließend wurden je Loch 50 μl der Staub-Dispersionen, der Zymosan-Suspension (Positiv-Kontrolle) oder HBSS (Negativ-Kontrolle) zugegeben. Um Wechselwirkungen von Zymosan mit den Partikeln zu erfassen, wurden zu einem Teil der Löcher

mit Staub-Dispersionen weitere 50 µl der Zymosan-Suspension bzw. HBSS als Volumenausgleich je Vertiefung zugegeben.

Da die Zugabe des Reagents H₂DCF-DA den Reaktionsstart darstellt, wurden die 50 µl je Vertiefung der H₂DCF-DA-Lösung erst unmittelbar vor der ersten Messung am Meßgerät mit einer 12-Kanal Multipipette hinzugefügt. Im Versuchsansatz betrug somit das Endvolumen je Loch 300 µl. Außerdem wurden nach o.g. Schema Ansätze ohne Zellen ausplattiert, um Wechselwirkungen zwischen den Dispersionen und dem Reagenz zu erfassen. Es wurden jeweils 4 Parallelen angesetzt und gemessen.

Die Messungen der Fluoreszenz erfolgten sofort nach Zugabe der Reagenzlösung (t=0) sowie alle 10 Minuten bis zu einer Gesamtmeßzeit von 120 Minuten. Zwischen den Messungen wurden die Mikrotiterplatten bei 37 °C im Wasserbad aufbewahrt. Da intensives Tageslicht H₂DCF-DA unspezifisch anregen kann, und somit falsche Meßwerte entstehen können, erfolgten die Zugabe des H₂DCF-DA (wie auch die Messungen) im teilabgedunkelten Labor.

Versuchsansatz für HL-60-Makrophagen

HL-60-M wurden in Zellkulturflaschen aus HL-60-Zellen differenziert (vgl. 2.4.2.). Nach vier Tagen Differenzierungszeit wurden sie abzentrifugiert (250 g, 5 min), zweimal mit HBSS gewaschen und dann mit HBSS auf eine Suspension von 4×10^6 Zellen ml⁻¹ eingestellt. Von dieser Suspension wurden 100 µl je Loch ausplattiert (4×10^5 Zellen je Vertiefung).

Das weitere Vorgehen unterschied sich nicht vom Versuchsprotokoll für RAM.

Versuchsansatz für BEAS-2B-Zellen

BEAS-2B-Zellen wurden nach der Bildung eines konfluenten Monolayers in den Zellkulturflaschen geerntet (vgl. 2.5.), gewaschen und mit HBSS auf eine Zell-Suspension von $1,5 \times 10^5$ ml⁻¹ eingestellt (sh. oben). Je Vertiefung wurden 200 µl dieser Suspension ($= 3 \times 10^4$ Zellen) zugegeben. Nach dreitägiger Kultur wurden die Platten unter der Sterilbank ausgeschlagen und die in den Vertiefungen haftenden Zellen mit 200 µl Ca²⁺ supplementierten BEAS-2B Mediums (1,2 mM) überschichtet (vgl. 2.5.). Zu diesem Zeitpunkt hat sich bereits ein konfluenter Zellrasen in den Vertiefungen gebildet. Nach weiteren 4 Tagen wurden die Platten erneut unter der Sterilbank ausgeschlagen. Unmittelbar nach dem Ausschlagen erfolgte die Zugabe von 100 µl HBSS je Loch.

Das weitere Vorgehen bei der Zugabe der Reagenzien unterschied sich nicht vom Versuchsprotokoll für RAM. Die Meßzeiten wurden für BEAS-2B-Zellen auf bis zu 24 h ausgedehnt.

2.11.1.2. Oxidantiennachweis mit Cytochrom C

Cytochrom C (CytC) ist ein Protein der Atmungskette, dessen Eisenzentralatom ein Elektron übertragen kann. Ist dieses Zentralatom reduziert (Fe²⁺, CytC_{red}), so tritt im Absorptionsspektrum bei 550 nm ein analytisch nutzbares Maximum auf, das bei der oxidierten Form (Fe³⁺, CytC_{ox}) verschwindet. O₂⁻ ist dabei nicht das einzige oxidative Agens *in vitro*, welches CytC reduzieren kann. Um eine Spezifität für O₂⁻ zu erhalten, etablierte Johnston (1981) einen Test, bei dem stets Absorptionswerte für CytC_{red} mit und ohne SOD, einem Enzym, welches spezifisch O₂⁻ abfängt, verglichen werden.

Für die Messungen wird zunächst CytC_{ox} mit und ohne SOD in den Versuchsansatz gegeben. Liegen im Ansatz Oxidantien vor, so wird CytC_{ox} zu CytC_{red} reduziert. Die Differenz der Absorption zwischen dem Ansatz ohne und mit SOD nach Versuchsende ist hierbei die Absorptionzunahme, die spezifisch durch O₂⁻ verursacht wurde. Die Absorptionzunahme

korreliert streng mit der Menge an Radikalen im Ansatz, so daß über den Unterschied der Absorptionen direkt auf die gebildete Menge O_2^- rückgerechnet werden kann: bei Küvetten mit 1 cm Schichtdicke und einem Reagenzienansatz mit $80 \mu\text{M}$ CytC wird die optische Dichte bei 550 nm (OD_{550}) mit 71,4 multipliziert. Das Ergebnis gibt Nanomol O_2^- an.

Reagenzien und Medien

HBSS

6,8	g	HBSS
0,35	g	Natriumhydrogencarbonat
1	l	Aq. bidest.
mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, sterilfiltrieren		

0,9% NaCl-Lösung

9	g	NaCl
1	l	Aq. bidest.

Cytochrom C-Lösung

14,89	$\mu\text{g ml}^{-1}$	Cytochrom C in HBSS (entspricht einer 1,2 mM Lösung), sterilfiltrieren (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$)
-------	-----------------------	---

SOD-Lösung

1	mg ml^{-1}	SOD in HBSS, entspricht 160 U ml^{-1} im Reaktionsansatz
---	---------------------	--

Zymosan-Lösung

10	mg ml^{-1}	opsoniertes Zymosan in NaCl (sh. 2.11.1.1.)
----	---------------------	---

Partikel-Dispersionen

107	$\mu\text{g ml}^{-1}$	C_{60} , RR, Graphit oder DQ12 in HBSS für die Ansätze ohne SOD
112	$\mu\text{g ml}^{-1}$	C_{60} , RR, Graphit oder DQ12 in HBSS für die Ansätze mit SOD
Alle auf Eis mit Ultraschall dispergiert (Branson Sonifier Leistungstufe 5, 60 % gepulst, 5 min). Durch die Verdünnung im Versuchsansatz wird so eine effektive Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ erreicht.		

24-well Midi(titer)platten

Falcon Primaria, "Flat Bottom"

Meßgerät

Beckmann DU-65 Spektrophotometer, Wellenlänge 550 nm, Kalibrierung gegen Luft. $\frac{1}{2}$ -Mikroküvetten "Ratiolab" mit 1 cm optischen Pfad

Vor der Inkubation mit Zellen wurden alle Reaktionslösungen gebrauchsfertig in Reagenzröhrchen angesetzt. Für Ansätze von 1,5 ml Reaktionslösung je Vertiefung ergibt sich folgendes Schema:

1. Negativ-Kontrolle ohne SOD: $100 \mu\text{l}$ CytC-Lösung + 1,4 ml HBSS
Negativ-Kontrolle mit SOD: $100 \mu\text{l}$ CytC-Lösung, $60 \mu\text{l}$ SOD-Lösung + 1,34 ml HBSS
2. Positiv-Kontrolle (Zymosan) ohne SOD: $100 \mu\text{l}$ CytC-Lösung, $150 \mu\text{l}$ Zymosan-Suspension + 1,25 ml HBSS
Positiv-Kontrolle (Zymosan) mit SOD: $100 \mu\text{l}$ CytC-Lösung, $60 \mu\text{l}$ SOD-Lösung, $150 \mu\text{l}$ Zymosan-Suspension + 1,19 ml HBSS
3. Ansätze mit den zu untersuchenden Partikeln ohne SOD: $100 \mu\text{l}$ CytC-Lösung + 1,4 ml der Suspension mit $107 \mu\text{g ml}^{-1}$
Ansätze mit den zu untersuchenden Partikeln mit SOD: $100 \mu\text{l}$ CytC-Lösung, $60 \mu\text{l}$ SOD + 1,34 ml der Suspension mit $112 \mu\text{g ml}^{-1}$

Diese Mengen sind mit der Anzahl der jeweiligen Parallelen zu multiplizieren.

BEAS-2B-Zellen wurden nach der Bildung eines konfluenten Monolayers aus den Zellkulturflaschen abtrypsiniert, gewaschen (sh. 2.5.) und auf eine Suspension von $1,5 \times 10^5$ Zellen ml^{-1} BEAS-2B-Medium eingestellt. Von dieser Suspension wurde 1 ml je Vertiefung der 24-well-Midiplatte ausgesät. Nach drei Tagen wurde das Medium abgesaugt und durch Ca^{2+} ange-

reichertes ersetzt (vgl. 2.11.1.1.). 4 Tage nach diesem Medienwechsel wurde das Medium abgesaugt und durch je 1 ml je Vertiefung der jeweiligen Reagenzlösung ersetzt. Je Reagenzlösung wurden 3 Parallelen ausgebracht.

Nach 45, 90 und 135 Minuten wurden die Reagenzlösungen abgenommen und in Zentrifugengefäße (2 ml Volumen) überführt. Um die Partikel aus den zu messenden Lösungen zu entfernen folgte eine Zentrifugation bei 340 g und 4 °C über 15 Minuten. Aus den Gefäßen wurden anschließend 500 µl des Überstandes abgenommen, in ½-Mikroküvetten überführt und bei 550 nm die Absorption bestimmt. Aus der Differenz der Werte mit/ohne SOD wurde direkt die Menge des gebildeten O₂⁻ berechnet.

2.11.2. Bestimmung von Antioxidantien

2.11.2.1. Bestimmung des Glutathion (GSH)

Als Parameter wurden die Konzentrationen des GSH und seiner oxidierten Form, dem GSSG, im Inkubationsmedium (extrazelluläres Gesamtglutathion), als auch im Zell-Lysat (intrazelluläres Gesamtglutathion) bestimmt. Die GSH_{tot}-Bestimmung muß hierbei unmittelbar nach Inkubationsende erfolgen, da sonst falsch niedrige GSH_{tot}-Werte erhalten werden [Gillissen et al. (1995)]. Zur Messung des GSH_{tot} wird die Reduktion von 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB, "Ellmans Reagenz") und die dadurch auftretende Absorptionsänderung bei 412 nm herangezogen (DTNB-Reduktase-Recycling-Assay, [Gillissen et al. (1995)]). Die Zugabe von DTNB erfolgt sofort nach Gewinnung der Proben, da diese dadurch stabilisiert werden.

Reagenzien und Medien:

Phosphat-Buffered Saline (PBS)

Partikel-Dispersionen

100 µg ml⁻¹ C₆₀, RR oder DQ12 in PBS

Kalium-Phosphat-Puffer (KPP)

1 M K₂HPO₄, entspricht 174,2 g l⁻¹ in Aq. bidest.
1 M KH₂PO₄, entspricht 136,1 g l⁻¹ in Aq. bidest.

Puffer 1

50 ml KPP
3,2 g Na₂EDTA
ad 500 ml Aq. bidest., auf pH 7,5 einstellen

Puffer 2

50 ml KPP, auf pH 7,8 einstellen
930,5 mg Na₂EDTA
ad 500 ml Aq. bidest., dann auf pH 7,5 einstellen

DTNB-Lösung

0,3964 mg ml⁻¹ 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) in Puffer 1

GSSG-Standard

0,2440 mg ml⁻¹ GSSG in PBS
als 400 µM GSSG-Stammlösung für die Standard-Verdünnungsreihe

Verdünnungsreihe:

100 µl GSSG-Stammlösung
9,9 ml PBS
ergibt einen 4 µM Standard, aus dem durch 1 + 1 Verdünnungen (2 ml + 2 ml) weitere Standardlösungen von 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125 µM GSSG hergestellt werden.

NADPH-Lösung

0,407 mg ml⁻¹ NADPH in Puffer 2

Glutathion-Reduktase-Lösung

40	µl	Glutathion-Reduktase
10	ml	Puffer 2

Triton X100-Lösung

1	ml	Triton X100
99	ml	Aq. bidest.

24-well Midi(titer)platten

Falcon Primaria, "Flat Bottom"

Meßgerät

Beckman DU-70 Spectrophotometer, Kinetik-Programm, Factor 10, Kalibrierung gegen Luft, 412 nm Wellenlänge, 20 sec Intervallzeit, 2 min Gesamtmeßzeit

BEAS-2B-Zellen wurden in 24-well-Midiplatten mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen je Loch (= Zellen je ml) in RPMI mit 10 % FKS und P/S ausgesät. Bei einer Bedeckung des Loch-Bodens von ca. 75 % (Kulturzeit 3 Tage) wurde das Medium abgenommen. Zur Exposition wurden je $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ C₆₀, RR und DQ12 in PBS suspendiert und von diesen Dispersionen je 1 ml je Vertiefung zugegeben. Jeder Inkubationsansatz erfolgte doppelt und die gewonnenen Proben wurden ebenfalls doppelt gemessen. Als Negativ-Kontrolle diente reines PBS. Zu den Zeitpunkten 2, 4 und 24 h nach Inkubationsbeginn wurden die Überstände abgenommen und für die Bestimmung der extrazellulären Antioxidantien aliquotiert. Die am Boden der Löcher haftenden Zellen wurden nun zur Freisetzung der intrazellulären Antioxidantien mit 1 ml je Vertiefung 1% Triton X100 bis zur vollständigen Lyse (mikroskopische Kontrolle) behandelt. Das Lysat wurde ebenfalls zur weiteren Analyse aliquotiert.

Zu Messung der GSSG werden gleiche Volumina von Probe (oder Standard) und DTNB-Lösung gemischt. 50 µl dieser Lösung werden in Halbmikroküvetten vorgelegt und 500 µl Glutathion-Reduktase-Lösung zupipettiert. Nach exakt 1 min Reaktionszeit erfolgt die Zugabe von 450 µl der NADPH-Lösung. Die Messung der Absorptions-Änderung erfolgt sofort nach der Zugabe der NADPH-Lösung.

Die Standardreihe wird vor und nach der Messung der Proben aus dem selben Reagenzienansatz bestimmt, um die Stabilität der GSSG zu überprüfen. Nach der Berechnung der Parameter aus der linearen Regression der Standardreihe kann der GSSG-Gehalt der Proben in µM je mg Protein berechnet werden.

2.11.2.2. Bestimmung der Superoxid-Dismutase (SOD)

Zur Messung der SOD-Aktivität wird die Hemmwirkung der SOD auf die Reduktion von oxidiertem Cytochrom C (CytC_{OX}) durch O₂⁻ herangezogen. O₂⁻ wird dabei *in vitro* aus dem Xanthin/Xanthin-Oxidase-System zur Verfügung gestellt [Gillissen (1993)]

Reagenzien und Medien:

Reaktionspuffer

1	M	K ₂ HPO ₄ , entspricht $174,2 \text{ g l}^{-1}$
1	M	KH ₂ PO ₄ , entspricht $136,1 \text{ g l}^{-1}$
		in Aq. bidest., auf pH=10 einstellen
		Diese Mischung mit Aq. bidest. 1 : 20 verdünnen und mit $33,62 \text{ g l}^{-1}$ NA ₂ EDTA versetzen.

Xanthin-Lösung

8,7	mg	Xanthin
100	ml	Reaktionspuffer

Cytochrom C-Lösung (CytC_{OX}-Lösung)

12,4	mg	Cytochrom C
10	ml	Reaktionspuffer

Reaktions-Lösung

2,6	ml	Reaktionspuffer
0,3	ml	Xanthin-Lösung
0,3	ml	CytC _{OX} -Lösung

Xanthin-Oxidase-Lösung (XO-Lösung)

20	µl	der XO-Stammlösung abzentrifugieren, Pellet in
1	ml	Reaktionspuffer resuspendieren

SOD-Standard

1	mg	SOD
1	ml	Aq. bidest.
Die so erhaltene Lösung 1 : 40 in Aq. bidest. verdünnen.		

Meßgerät

Beckman DU-70 Spectrophotometer, Kinetik-Programm, Faktor 10, Kalibrierung gegen Luft, 550 nm Wellenlänge, 20 sec Intervallzeit, 1 min Gesamtmeßzeit

Zur Kalibrierung der Reaktion werden in Makroküvetten 3,2 ml Reaktionslösung vorgelegt. Danach werden verschiedene Volumina der Xanthin-Oxidase-Lösung zugegeben (10 - 20 µl). Durch diese Zugabe wird O₂⁻ erzeugt, das CytC reduziert. Das Volumen an XO-Lösung, das zu einer Reduktionsrate (Änderung der Absorption [nm]) von 0,02 nm min⁻¹ führt, wird für alle weiteren Messungen verwendet. Die Zugabe der XO-Lösung startet die sehr schnell ablaufende Reaktion und muß daher in den Küvetten synchron erfolgen.

Als weiterer Bezugspunkt für die Reaktion wird ermittelt, bei welcher SOD-Konzentration die Reaktion vollständig gehemmt wird (Rate 0,002 nm min⁻¹). Dazu werden in einem zweiten Ansatz zur Reaktionslösung verschiedene Volumina des SOD-Standards (Erfahrungswerte liegen zwischen 60 und 70 µl) und zuletzt das zuvor ermittelte optimale Volumen der XO-Lösung zupipettiert.

Zur Messung der Proben werden 100 µl der Probe zu Reaktionslösung, Xanthin-Lösung und CytC_{OX}-Lösung zupipettiert und die Reaktion wie oben beschrieben durch die Zugabe von XO-Lösung gestartet. Bei jeder Messung von Proben werden zwei Küvetten ohne Probe mitgeführt, um die Schwankungen des Reaktionssystems Xanthin/Xanthin-Oxidase erfassen zu können. Die Konzentration der SOD (in U ml⁻¹) errechnet sich wie folgt:

$$U_{\text{SOD}} = \frac{\text{Rate}_{\text{XO}}}{\frac{\text{Rate}_{\text{Probe}}}{\text{ml Probe}}} \times 100 \times \text{Verdünnung der Probe}$$

Eine Verdünnung der Probe wird notwendig, wenn die Reaktion vollständig gehemmt ist (Rate 0,002).

Die Bestimmung der SOD erfolgte aus den gleichen Überständen wie die des GSH (sh. oben).

2.12. Untersuchung zur unspezifischen Radikalbildung durch C₆₀ und Rohruß im zellfreien System

2.12.1. Das α-Keto-S-Methyl-Buttersäure (KMB) - Modell

KMB ist ein Transaminierungsprodukt von Methionin und wird durch den Angriff von reaktiven Sauerstoffspezies (RSS) zu Ethen und anderen Produkten gespalten. Das freigesetzte Ethen wird

mittels Gaschromatographie quantifiziert [Hippeli (1990), Hippeli und Elstner (1989), Youngman et al. (1985)].

Reagenzien und Medien:

HBSS

6,8	g	HBSS
0,35	g	Natriumhydrogencarbonat
1	l	Aq. bidest.
mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, sterilfiltrieren		

KMB-Lösung

30	mM	KMB in HBSS, entspricht 0,013 g KMB 2 ml ⁻¹ HBSS
----	----	---

Katalase-Lösung

100	U	Katalase, entspricht 2,28 µl der kommerziellen Stammlösung auf 3 ml HBSS
-----	---	--

SOD-Lösung

100	U	SOD, entspricht 2,8 mg auf 10 ml HBSS
-----	---	---------------------------------------

Partikel-Dispersionen

111	µg ml ⁻¹	C ₆₀ bzw. RR in HBSS
-----	---------------------	---------------------------------

Meßgerät

Gaschromatograph (GC)

Als GC diente ein Varian aerograph 1400 mit Flammenionisationsdetektor. Die gepackte Aluminiumsäule von 1 m Länge erbrachte für Ethen eine Retentionszeit von ca. 10 sec (Trägergas N₂ bei 5 bar). Die Meßergebnisse wurden als Peaks auf einem nachgeschalteten Thermodrucker ausgegeben.

Zur Kalibrierung vor und nach der Meßreihe wurden viermal je 1 ml Ethen bei 1 bar (entspricht 238,56 pmol) in Insulin-Spritzen aus der Vorratsflasche mit Kalibriergas aufgezogen und in das Gerät injiziert. Die Gasinjektion erfolgte jeweils nach der Rückkehr des Schreibers des Gerätes zur Grundlinie.

Inkubationseinrichtung (beleuchtetes Wasserbad)

Zur Inkubation der Proben diente ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad aus Plexiglas, dessen seitliche Kantenlänge 40 x 40 cm und dessen Tiefe etwa 20 cm beträgt. An den inneren Seitenwänden sind Spiegel befestigt, um Verluste des eingestrahlt Lichtes durch Austritt aus den Seitenwänden zu vermeiden. Die Beleuchtung durch 4 Glühlampen (Philips Argaphot (500 Watt)) erfolgte durch den Boden.

In das Wasserbad eingebaut ist ein Taummel-Schüttler, der eine Plexiglasscheibe mit konzentrischen Ringen aus Bohrungen trägt, in die Reagenzglaschen zur Belichtung eingehängt werden können. Am unteren Ende der Röhren trägt die Beleuchtungsstärke etwa 10 000 Lux.

Zur Bestimmung der Ethenbildung aus KMB wurden

1,8	ml	Partikel-Dispersion oder HBSS (negativ Kontrolle)
0,1	ml	KMB-Lösung und
0,1	ml	SOD-Lösung oder HBSS

in kalibrierte Reagenzgläser (ca. 11-12 ml Gesamtvolumen) pipettiert. Die Reagenzgläser wurden sofort mit gasdichten Stopfen verschlossen und im beleuchteten Wasserbad 60 min inkubiert. Nach der Beendigung der Inkubation wurden die Gläser aus dem Wasserbad genommen und der jeweilige Stopfen mit einer Insulin-Spritze durchstoßen. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen der Spritze wurde das Gasvolumen oberhalb der Flüssigkeit durchmischt (die Spritze darf dabei nicht abgezogen werden, da sonst Luft eindringt und das Meßergebnis verfälscht wird). Anschließend wurde aus dem Röhren 1 ml des Gasvolumens in die Spritze aufgesaugt und in den GC injiziert.

Die Menge des gebildeten Ethen wird auf der Basis der Kalibrierwerte berechnet.

Je Ansatz wurden 3 oder 9 Parallelwerte angesetzt, die einzeln gemessen wurden.

2.12.2. Die Crocin-"Bleichung"

Crocin ist ein intensiv orange gefärbtes Carotinoid, das aus Safran extrahiert wird [Hippeli und Elstner (1989), zur Herstellung: Friend und Mayer (1960)]. Es kann aufgrund seines polyenen Charakters sowohl für Pigmente als auch für ungesättigte Fettsäuren als Modellsubstanz verwendet werden. Die Crocin-"Bleichung" als Hinweis auf oxidative Bedingungen im Reaktionssystem wird spektralphotometrisch durch eine Abnahme der Extinktion bei 440 nm (E_{440}) nachgewiesen. Substanzen, die zur Zerstörung des Crocins führen, können prinzipiell auch ungesättigte Fettsäuren peroxidieren.

Reagenzien und Medien

HBSS

6,8	g	HBSS
0,35	g	Natriumhydrogencarbonat
1	l	Aq. bidest.
mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, sterilfiltrieren		

Crocin-Lösung:

Verdünnung der Stammlösung aus der Extraktion mit HBSS auf eine Extinktion von 1 bei 440 nm (E_{440})

Partikel-Dispersionen

105 $\mu\text{g ml}^{-1}$ C₆₀ bzw. RR in HBSS

Meßgerät

Spektralphotometer UVIKON 810/820, Wellenlänge 440 nm

Zur Untersuchung der Frage, ob C₆₀ oder RR in der Lage sind, Crocin zu bleichen, wurden

1,9	ml	Partikel-Dispersion und
0,1	ml	Crocin-Lösung bzw. HBSS (zur Bestimmung der E_{440} durch C ₆₀ bzw. RR)

in Reagenzgläschen pipettiert. Ein Teil der Gläschen wurde im beleuchteten Wasserbad (vgl. 2.12.1.) für 60 min bei 36 °C inkubiert, der andere sofort zur Bestimmung der Extinktionswerte für $t = 0$ gemessen.

Zur Auswertung wurde die prozentuale Bleichung des Crocin im Probenansatz berechnet:

$$\frac{\text{Extinktion}_{t=60}}{\text{Extinktion}_{t=0}} \times 100$$

2.13. Datenpräsentation und Statistik

Alle gezeigten Daten sind arithmetische Mittelwerte. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler des Mittelwertes wieder.

Da die Schwankungen der Meßwerte zwischen den einzelnen Versuchsreihen (Tiere) zum Teil erheblich waren, werden Versuche dargestellt, die repräsentativ für alle gleichartigen Ansätze sind. Die statistische Signifikanzanalyse des Unterschiedes zweier Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Testes nach Student durchgeführt (Software: Origin 3.5). Ein statistischer Unterschied wurde dann angenommen, wenn $p < 0.05$ war.

3. Ergebnisse

3.1. Licht- und transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen

Bereits nach 4 h Inkubationszeit wird erkennbar, daß Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) alle Kohlenstoff- Partikel, mit denen sie im *in vitro* System inkubiert wurden, phagozytieren (**Abb. 10 - 14**).

Bei Fullerenen C₆₀ liegen in der Dispersion auch größere, nicht phagozytierbare Partikel vor. Auch diese werden von RAM erkannt und von mehreren RAM umgeben (**Abb. 10 und 12**). **Abb. 11** zeigt den Schnitt durch einen RAM nach 4 h Inkubation mit C₆₀. Deutlich sind fast runde, schwarze Partikel in und um den RAM zu erkennen. Diese Partikel befinden sich in zellulären Kompartimenten mit deutlichen Abgrenzungen durch eine Membran. Diese Kompartimente können als Lysosomen oder Phagosomen angesprochen werden.

Bei Fulleren-Rohruß (RR) kommt es im Verlauf der Inkubation durch den vergleichsweise feinen Staub zu einer deutlichen Dunkelfärbung der RAM (**Abb. 13**). Graphit als größter untersuchter partikulärer Kohlenstoff wird ebenfalls von RAM angenommen und zum Teil phagozytiert. Große Graphit-Partikel werden ebenfalls von mehreren RAM umgeben (**Abb. 14**).

3.2. Hämolyse

Im Hämolyse-Test lassen sich die zellmembranschädigenden Effekte von Stäuben durch die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten abschätzen.

Im vorliegenden Ansatz mit Fullerenen C₆₀, Graphit und DQ12 Quarz (**Abb. 15**) setzt C₆₀ in allen Konzentrationen am meisten Hämoglobin aus den Rinder-Erythrozyten frei. Die hämolytische Wirkung von Graphit liegt bis 125 µg ml⁻¹ immer im Bereich von DQ12. Bei 250 µg ml⁻¹ ist die hämolytische Wirkung von DQ12 - über alle Versuche betrachtet - nicht immer so ausgeprägt höher als die von Graphit. Die hämolytischen Eigenschaften des Graphit sind - bezogen auf die Massenkonzentration - damit ähnlich wie die von DQ12.

3.3. Vitalität, Enzym- und Zytokinfreisetzung aus Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM)

Für verschiedene Partikel (z.B. Quarz [Wilczek (1991)]) ist ein Zusammenhang zwischen Partikel-Konzentration und Zytotoxizität nachgewiesen. Eine hohe Zytotoxizität stört jedoch bei Langzeit-Inkubationen (> 4 h Inkubationszeit) die Bildung und Freisetzung "später" Zytokine wie z.B. Interleukin-8. Da mit den Partikel-Dispersionen jedoch längere Inkubationen geplant waren, mußte zunächst geprüft werden, bei welchen Partikel-Konzentrationen eine erhöhte Zytotoxizität beobachtet wird. Als Meßgrößen wurden die Zahl der lebenden Zellen nach Inkubationsende und die Freisetzung von LDH gewählt.

Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob bei konstanter Inkubationsdauer (4 h) ein signifikanter Unterschied in der Zytokin-Freisetzung zwischen den verschiedenen Partikel-Konzentrationen besteht. Als Parameter hierzu wurden die Freisetzung von TNF- α und die chemotaktische Aktivität der Inkubationsüberstände herangezogen.

3.3.1. Variation der Partikel-Konzentrationen

3.3.1.1. Einfluß auf die Zellzahl

Ein Maß für die Zytotoxizität ist die absolute oder relative Abnahme der Zellzahl bei Inkubation mit den jeweiligen partikulären oder apartikelären Zusätzen.

Bei Konzentrationen von 50 und 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ lagen die Zellzahlen für alle drei Partikel-Dispersionen im Bereich der Schwankungsbreite der partikelfreien Ansätze (Kontrolle und LPS) (**Abb. 16**). Bei 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nimmt bei DQ12 die Zellzahl deutlich ab. Diese Abnahme ist jedoch statistisch nicht signifikant. Die Zellzahlen bleiben bei Fulleren C₆₀ und Graphit weiter im Schwankungsbereich der apartikelären Proben. Die Zellzahlen für Kontrolle und LPS unterscheiden sich nicht signifikant.

Da die Viabilität (Verhältnis lebende, farblose Zellen : Gesamtzellzahl) immer größer als 95 % war, wird sie nicht gesondert dargestellt.

3.3.1.2. Einfluß auf die Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Die LDH ist ein intrazelluläres Enzym, das beim Zelltod aus den Zellen freigesetzt wird. Der LDH-Gehalt von Inkubationsüberständen eignet sich daher ebenfalls zur Abschätzung der zytotoxischen Eigenschaften von Agenzien.

In den Inkubationsüberständen von C₆₀ und Graphit liegt der LDH-Gehalt bei allen untersuchten Partikel-Konzentrationen im Bereich der partikelfreien Ansätze (Kontrolle und LPS) (**Abb. 17**). Bei der Inkubation mit DQ12 findet sich nur bei 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ein signifikant erhöhter LDH-Gehalt im Inkubationsüberstand. Die Freisetzung von LDH durch LPS ist im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht.

Bei 50 und 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ist damit keine der Partikel-Dispersionen deutlich zytotoxisch. DQ12 zeigt dagegen auf der Basis der LDH-Freisetzung bei 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ eine signifikante Zytotoxizität. Aufgrund dieser Zytotoxizität von DQ12 wurde von der Verwendung der Partikel-Konzentration von 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ abgesehen.

3.3.1.3. Einfluß auf die Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein "frühes" Zytokin, das nach etwa 3-4 h Inkubationszeit sein Maximum im Inkubationsüberstand erreicht [*Bienhoff und Allen (1995)*]. Der TNF- α Gehalt der Überstände kann daher zur Abschätzung der akuten proinflammatorischen Wirkung von Agenzien herangezogen werden.

LPS als bekannte immunologische Positiv-Kontrolle führt innerhalb von 4 h zu einem um Faktor 4 höheren TNF- Signal als bei der Kontrolle (**Abb. 18**). Bei den Inkubationen mit Partikeln ist bei C₆₀ und Graphit bei 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ eine signifikant erhöhte Freisetzung zu finden, während bei DQ12 nur ein geringes, nicht signifikantes Signal beobachtet wird. Darüber hinaus führt Graphit auch bei 50 und 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ zu signifikant hohen TNF- α Gehalten der Inkubationsüberstände. Der Vergleich verschiedener Konzentrationen eines Partikels führt nicht zu signifikanten Unterschieden in der Freisetzung von TNF- α .

3.3.1.4 Einfluß auf die chemoattraktive Wirkung (CW) der Inkubationsüberstände für RAM

Der Überstand der Positiv-Kontrolle (LPS) besitzt ein hohes chemotaktisches Potential, während die Negativ-Kontrolle kaum zu einer Wanderung der RAM führt (**Abb. 19**). Überstände aus Inkubationen mit C₆₀ induzieren bei 4 h Inkubationszeit bei allen Ansätzen keine signifikante

Inkubationen mit C₆₀ induzieren bei 4 h Inkubationszeit bei allen Ansätzen keine signifikante Migration, während solche aus Graphit- und DQ12-Inkubationen bei 50 und 200 µg ml⁻¹ zu deutlichen, zum Teil signifikanten Zellmigrationen führen.

Die Signifikanz des Signals durch LPS war immer reproduzierbar, nicht aber für Graphit. Somit kann eher angenommen werden, daß keiner der Inkubationsüberstände aktiv war.

Da sich in den Versuchen zur Freisetzung von Zytokinen kein Hinweis darauf ergab, daß zwischen 50 und 100 µg Partikel ml⁻¹ ein signifikanter Unterschied besteht, wurde für alle weiteren Untersuchungen eine Konzentration von 100 µg ml⁻¹ gewählt. Damit sind die Ergebnisse mit denen anderer Arbeiten, in denen ebenfalls Partikel-Dispersionen mit 100 µg ml⁻¹ eingesetzt wurden [Polzer (1992), Wilczek (1991)] vergleichbar.

3.3.2. Variation der Inkubationszeiten

Bei der Freisetzung von Zytokinen aus Makrophagen kann zwischen "frühen" Zytokinen wie TNF- α , der nach etwa 3 h sein Maximum erreicht [Bienhoff und Allen (1995)] und "späten" Zytokinen wie IL-8 unterschieden werden. Das Zytokin-Muster, das nach längeren Inkubationszeiten erkennbar wird, erlaubt weitergehende Abschätzungen von "Langzeiteffekten" partikulärer Proben. Daher wurden RAM mit C₆₀, RR, Graphit und Quarz bei einer Partikelkonzentration von 100 µg ml⁻¹ bis zu 96 h inkubiert.

3.3.2.1 Einfluß auf die Zellzahl

Bei allen Inkubationsansätzen konnte versuchsbedingt mit steigender Inkubationszeit eine deutliche Abnahme der lebenden, adhärenen RAM schon bei der Kontrolle beobachtet werden (**Abb. 20**). Das Ausmaß der Abnahme der Zellzahl unterscheidet sich von Versuchsserie zu Versuchsserie.

Bei Ansätzen mit LPS als Positiv-Stimulus geht die Zellzahl wie bei der Kontrolle zunächst zurück. Ab einer Inkubationszeit von ca. 24 h bleibt die Zellzahl dann konstant bei etwa 130 Zellen je Suchfeld.

Bei den partikulären Zusätzen zeigt sich bei DQ12 die hohe Zytotoxizität dieses Partikels: bereits nach nur 4 h Inkubationszeit liegt die Zellzahl nur noch bei ca. 80%, bei 24 h unter 70% der Kontrolle. Ab 48 h liegt die Zellzahl im Bereich der Kontrolle oder darunter, da die Zellzahl der Kontrolle ebenfalls, wenn gleich nicht so rapide wie bei DQ12, abnimmt..

C₆₀ zeigt von allen untersuchten Partikeln die geringste Zytotoxizität. Bis zu 24 h Inkubationszeit wurde nie eine Abnahme der Zellzahl beobachtet, die sich deutlich von der der Kontrolle unterscheidet. Nach ca. 24 h konnte meist eine höhere Zellzahl gefunden werden als bei der Kontrolle, wengleich das Ergebnis nicht immer so signifikant ausfiel wie in **Abb. 20** gezeigt. Auch bei Graphit ist nur eine leichte, nicht signifikante Abweichung der Zellzahl von der der Kontrolle zu beobachten. Eine signifikant niedrigere Zellzahl als bei der Kontrolle wurde jedoch nie beobachtet.

Betrachtet man die Veränderungen der Zellzahlen über die Zeit, so kann nur bei DQ12 von deutlichen zytotoxischen Eigenschaften gesprochen werden.

3.3.2.2. Einfluß auf die Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Abb. 21 zeigt den Verlauf der LDH-Freisetzung aus RAM während der Inkubationsreihen. LPS und Rohruß führen bei allen Zeitpunkten zu einer geringen, nur zum Teil signifikant erhöhten Freisetzung der LDH aus RAM.

Graphit setzt bei längerer Inkubationszeit im Vergleich zur Kontrolle bis zum 2,5-fachen an LDH

aus den Zellen frei. C₆₀ verursacht bis 24 h ebenfalls nur eine geringfügige Freisetzung von LDH, während bei 48 h Inkubationszeit ein Anstieg im LDH-Gehalt der Überstände zu beobachten ist. Das Ausmaß dieses Anstiegs ist jedoch nicht immer so deutlich wie in **Abb. 21** gezeigt.

DQ12 ist bekanntermaßen ein stark zytotoxischer Quarz. Dies bestätigt sich bei der Analyse der LDH im Inkubationsüberstand: Bereits nach nur 8 h ist der LDH-Gehalt beim 4fachen, bei 48 h beim ca. 12fachen Wert der Kontrolle.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen die Eckpunkte der Kurven: Bei 4 h Inkubationszeit führt keiner der Partikel zu einer signifikanten Erhöhung der LDH. Nach 96 h liegen wieder alle LDH-Meßwerte auf oder unter dem Niveau der Kontrolle, bedingt durch die hohe Spontanmortalität zu diesem späten Zeitpunkt.

Bezogen auf LDH als Marker für Zelltod weist damit außer DQ12 keiner der Partikel eine deutliche akute Zytotoxizität auf.

3.3.2.3. Einfluß auf die Freisetzung der N-Acetyl- β -Glucosaminidase (NAG)

Zeitlicher Verlauf der NAG-Freisetzung unter normalen Inkubationsbedingungen

Bei Inkubationen von RAM mit LPS, C₆₀, RR und Graphit folgen die NAG-Kurven im wesentlichen der der Kontrolle (**Abb. 22** und **23**). Einzig DQ12 führt wiederum bereits nach nur 8 h Inkubation zu einer deutlichen Freisetzung von NAG. Auch nach 48 h liegt der Meßwert für DQ12 noch beim 1,4-fachen der Kontrolle.

Unter "üblichen" Zellkultur-Bedingungen besitzt damit keiner der Kohlenstoff-Stäube eine die Lysosomen schädigende Eigenschaft.

Verlauf der NAG-Freisetzung nach dem Entfernen nicht phagozytierter Partikel

Um zu untersuchen, ob die Lysosomen von Partikeln in ihrem Inneren oder von außen geschädigt werden, wurden bei einem Teil der Ansätze die Kulturmedien mit den Partikeln nach 4 h Inkubationszeit abgenommen. Während dieser 4 h Vorinkubation werden die Partikel von den RAM aufgenommen. 4 h und 20 h nach der Abnahme der Partikel wurden die NAG-Gehalte der Überstände gemessen. Diese Werte wurden den der Ansätze gegenübergestellt, bei denen die Partikel in der Kultur verblieben.

In den Kulturen, in denen die Partikel auf den Zellen verblieben (linke Seite von **Abb. 24**) steigt der NAG-Gehalt der Überstände sowohl bei den Kontrollen wie auch den anderen Ansätzen (vgl. oben) mit der Inkubationszeit weiter an.

Bei LPS wird nach Abnahme des LPS-haltigen Mediums ein leichter Anstieg des NAG-Signals beobachtet, während die NAG-Konzentration im Kontroll-Ansatz zurückgeht. Die Werte 4 h nach Abnahme nicht-phagozytierter Kohlenstoff-Partikel liegen im Bereich der Werte bei Entfernung der Partikel-Dispersionen (= 4-Stundenwert auf der linken Bildhälfte). In den 4 h seit Abnahme der Kohlenstoff-Partikel wurde somit keine weitere NAG freigesetzt. Die NAG-Aktivität bleibt bei den Zellen, die RR oder Graphit in ihre Lysosomen aufgenommen haben, auch im weiteren zeitlichen Verlauf auf niedrigem Niveau.

Bei DQ12 hingegen erreicht der NAG-Gehalt des Überstandes 4 h nach Entfernung der Partikel (8 h Gesamtinkubationszeit) das Niveau des Ansatzes, bei dem DQ12 während der gesamten Inkubationszeit in der Zellkultur verblieb. Diese hohe NAG-Aktivität bleibt über 20 h bestehen. Das wesentliche Ergebnis ist also, daß durch Entfernen des Mediums mit den nicht-phagozytierten Partikeln im Fall von DQ12 die Zerstörung der Lysosomen und damit die Freisetzung von NAG nicht verhindert werden konnte.

3.3.2.4. Einfluß auf die Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

Abb. 25 zeigt bei der Inkubation von RAM mit LPS bereits nach nur 4 h einen Anstieg des TNF-Gehaltes auf $2,5 \text{ U ml}^{-1}$ im Überstand. Die TNF-Werte fallen danach deutlich ab und haben bei ca. 24 h Inkubationszeit ein Minimum. Nach 48 h steigt der TNF-Gehalt erneut an und erreicht bei 96 h nicht ganz den doppelten Wert der Kontrolle ($1,25 \text{ U ml}^{-1}$).

RR führt ebenfalls rasch zu einem signifikanten Anstieg des TNF- α , der jedoch anders als bei der Stimulation mit LPS erst nach ca. 8 h sein Maximum erreicht. Nach einem vergleichsweise geringen Abfall der TNF-Werte steigen sie ab 48 h Inkubationszeit erneut an und erreichen bei 96 h das 2,5-fache der Kontrolle. Graphit führt ebenso zu einem raschen und deutlichen Signal nach nur 4 h Inkubationszeit. Die Meßwerte folgen dann denen für LPS: Zunächst kommt es zu einem deutlichen Abfall der Meßwerte, dann aber ab 48 h Inkubationszeit zu einem erneuten Anstieg, der das Niveau von LPS und RR deutlich übertrifft. C₆₀ (**Abb. 26**) hingegen zeigt bis zu 24 h Inkubationszeit keinen Unterschied zur Kontrolle. Auch bei längeren Inkubationszeiten bleiben die Werte auf niedrigem Niveau, wenngleich auch nicht immer unter den Kontrollwerten.

DQ12 führt erst nach 24 h zu einem signifikanten Anstieg des TNF im Kulturüberstand. Verglichen mit RR und Graphit als partikulären Zusätzen bleibt der TNF-Gehalt aber auf niedrigem Niveau.

3.3.2.5. Einfluß auf die chemoattraktive Wirkung (CW) der Inkubationsüberstände für RAM

Die CW ist ein Summenparameter "späterer" Zytokine. Bei Betrachtung von **Abb. 27** wird dies deutlich sichtbar: Anders als bei TNF zeigt sich das erste Maximum des Überstandes aus der LPS-Inkubation mit 0,75 relativen chemotaktischen Einheiten (rcE) erst nach 8 h, bei C₆₀ und Graphit erst nach 24 h Inkubationszeit.

Der Kurvenverlauf ist bei LPS biphasisch: Nach 8 h ist die CW mit 0,75 rcE etwa dreimal so hoch wie bei der Kontrolle und sinkt dann rasch fast auf Kontrollniveau ab. Ab 48 h steigt das CW-Signal wieder an und erreicht bei 96 h den 8 h-Wert. Bei den Kontrollen ist das höchste CW-Signal mit 0,3 rcE erst nach 96 h Inkubation zu beobachten.

Bei C₆₀ und Graphit tritt das erste Maximum nach 24 h Inkubationszeit auf. Dieses Maximum liegt in beiden Fällen bei etwa 300% des Kontrollwertes. Für C₆₀ fällt die CW dann ab und erreicht bei 48 h das Kontrollniveau. Danach steigt die CW bis 96 h auf etwa 0,5 rcE an, ohne den Spitzenwert der LPS-Inkubation zu erreichen. Bei Graphit bleibt die CW zunächst etwa auf dem Niveau des 24 h Wertes und erreicht nach 96 h Inkubationszeit das Kontrollniveau.

DQ12 induziert eine CW, die nach 8 h mit 0,37 rcE ihr Maximum erreicht. Auch hier bleibt die CW bis 48 h über dem Kontrollniveau. Die Stärke der CW ist dabei jedoch geringer als bei Graphit. Wie bei Graphit erreicht die CW bei DQ12 nach 96 h den Kontrollwert.

3.3.2.6. Einfluß auf die chemoattraktive Wirkung (CW) der Inkubationsüberstände für neutrophile Granulozyten

Bei den Kontrollen ist bis zu einer Inkubationszeit von 24 h in nur sehr geringem Maße eine chemoattraktive Wirkung der Überstände auf Granulozyten meßbar (**Abb. 28**). Bei den Überständen der Kontrollen > 24 h konnte keine Wanderung der Granulozyten festgestellt werden. LPS als immunologischer Stimulus induziert eine chemotaktische Aktivität der Überstände, doch unterscheidet sich diese nur in geringem Maße von den Kontrollen.

Die Inkubationsüberstände von RR zeigen bis hin zu 24 h keine Unterschiede zu den Kontrollen. Meßwerte für Graphit konnten nur für 4 und 24 h Inkubation erhalten werden. Bei 4 h Inkubation liegt der Wert mit 4 rcE beim doppelten der Kontrolle, doch fällt der 24 h Wert mit dem Kontrollwert zusammen.

Die CW der Überstände aus der DQ12-Inkubation zeigt bei 4 h Inkubationszeit eine CW, die gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht ist. Diese Signifikanz verschwindet jedoch beim 24-Stundenwert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß im Inkubationssystem mit RAM

- keiner der Kohlenstoff-Partikel starke zytotoxische Eigenschaften aufweist
- keiner der Kohlenstoff-Partikel zu ausgeprägten Schädigungen der Lysosomen führt und
- C₆₀ unter den Kohlenstoff-Partikeln die geringste immunologische Aktivierung verursacht, während Rohruß und Graphit die RAM zu einer deutlichen Freisetzung von Zytokinen stimulieren.

3.4. Vitalität und Zytokinfreisetzung aus makrophagen-ähnlich differenzierten HL-60-Zellen (HL-60-M)

Im Gegensatz zu Rinderalveolarmakrophagen stehen für die Untersuchung der Zytokinfreisetzungen humaner Zelllinien (wie der HL-60-Zellen) ELISAs zur Verfügung. Diese speziesspezifischen Reagenziensätze, bei denen nur geringe oder gar keine Kreuzreaktivitäten zwischen den Zytokinen auftreten, ermöglichen es, die freigesetzten Zytokine einzeln und sehr genau zu erfassen.

Wie in der Einleitung schon erwähnt, wurden deshalb auch HL-60-M in die Untersuchungen einbezogen, um einige spezifische Zytokine, die im Zusammenhang mit der Pathogenese von fibrotischen Lungenerkrankungen besonders von Interesse sind, erfassen zu können.

Als Zytokine von besonderem Interesse wurden TNF- α als "frühes" Zytokin, IL-8 als "spätes" Zytokin sowie die fibroblasten-aktivierenden Zytokine PDGF und bFGF ausgewählt. Ein weiterer Parameter war die Zytotoxizität (gemessen an Zellzahlen und LDH), um die Ergebnisse der Zytokin-Messungen gewichten zu können.

3.4.1. Einfluß auf die Zahl vitaler Zellen

In **Abb. 29** wird gezeigt, daß über den Zeitraum von 24 h die Zahl vitaler Zellen für den Inkubationsansatz mit LPS relativ konstant bleibt. Bei der Kontrolle hingegen ist ein Anstieg der Zellzahl um ca. 35% zu beobachten.

Die Zellzahlentwicklung bei den Inkubationen mit C₆₀ und RR folgt im Wesentlichen der der Kontrolle: Bei C₆₀ ist zwar der Anstieg um 50% deutlicher als bei RR mit 40%, doch unterscheiden sich die jeweiligen Zellzahlen nach 24 h Inkubation nicht signifikant von der Kontrolle. DQ12 als bekannt zytotoxischer Partikel führt während 24 h Inkubation zu einer Abnahme der Zellzahl um etwa ein Drittel.

Die Viabilität der Zellen lag bei allen Proben über 95%, so daß sie nicht gesondert dargestellt wird.

3.4.2. Einfluß auf die Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Zusätzlich zu den Zeitpunkten der Zellzahlbestimmung (4 und 24 h Inkubationszeit) wurde die LDH auch noch bei 8 h bestimmt (**Abb. 30**).

Der LDH-Gehalt der Überstände der Kontrollen steigt über 24 h relativ linear von 8 auf über 30 U ml⁻¹ an.

Bei der LPS-Inkubation verläuft der Anstieg der gefundenen LDH relativ flach von 16 auf 26 U ml⁻¹, wobei von 4 h Inkubationszeit keine Veränderung zum 8 h Wert zu beobachten ist. Nach 24 h liegt der LDH-Gehalt der Überstände leicht unter oder im Bereich der Kontrollen.

C₆₀ und RR führen zu Beginn der Inkubationen (bis 8 h) zu einem leichten Ansteigen der LDH und liegen über den Aktivitätswerten der Kontrollen. Nach 24 h Inkubation verlaufen die Kurven im Bereich der Kontrolle. Bemerkenswert ist hierbei der rasche Anstieg bei RR bereits innerhalb

von nur 4 h Inkubationszeit, während bei C₆₀ das Ausgangsniveau bei 4 h mit unter 20 U ml⁻¹ im Bereich des partikelfreien Ansatzes mit LPS liegt.

Eindeutig ist die Freisetzung der LDH in den Inkubationsansätzen mit DQ12: Nachdem bei 4 h der Meßwert noch im Bereich von LPS und C₆₀ liegt, steigt die LDH-Aktivität über 8 h bis 24 h linear auf über 55 U ml⁻¹ und damit auf etwa das Doppelte der Kontrolle an. DQ12 ist damit der einzige untersuchte Partikel, der zu allen Meßzeiten deutlich höhere LDH-Freisetzungen im Vergleich zur Kontrolle bewirkt.

3.4.3. Einfluß auf die Freisetzung der Zytokine

Bei HL-60-M konnten durch die "Trypanblau-Methode" absolute Zellzahlen (in Millionen Zellen je ml) gewonnen werden. Soweit es nicht anders erwähnt ist, sind alle folgenden Zytokingehalte daher auf 1 Million vitaler Zellen ml⁻¹ nach Inkubationsende normiert.

Einfluß auf die Freisetzung von TNF- α

In **Abb. 31a** sieht man, daß bei den unstimulierten Kontrollen die Meßwerte für TNF über 24 h im Bereich des Leerwertes des Mediums (3 pg ml⁻¹) bleiben.

LPS hingegen setzt bereits nach nur 4 h Inkubationszeit mit über 90 pg ml⁻¹ das ca. 30-fache an TNF aus den HL-60-M frei als bei der Kontrolle. Nach 24 h geht der TNF-Gehalt zwar auf 16 pg ml⁻¹ zurück, liegt aber immer noch deutlich über dem Leerwert des Mediums.

C₆₀ setzt bei 4 h Inkubationszeit mit 30 pg ml⁻¹ deutlich TNF aus den HL-60-M frei. Bei 24 h liegt der Meßwert jedoch wieder im Bereich der Kontrolle und des Leerwertes. Im Gegensatz hierzu findet sich bei RR zu allen betrachteten Zeitpunkten ein deutliches TNF-Signal, das bei 4 h mit 80 pg ml⁻¹ in der Größenordnung des von LPS induzierten liegt. Bis zum 24 h Meßwert geht der TNF-Gehalt zwar um gut 80% zurück, ist aber immer noch beim etwa 3-fachen der Kontrolle. DQ12 liegt bezüglich der TNF-Freisetzung zwischen C₆₀ und RR: bei 4 h Inkubation liegt der Meßwert im Bereich von C₆₀, nach 24 h aber mehr bei RR. Zu jedem Zeitpunkt ist aber für DQ12 ein deutliches TNF-Signal zu beobachten.

Einfluß auf die Freisetzung von IL-8

IL-8 ist im Medium nicht nachweisbar (**Abb. 31b**).

Die Kontrollen zeigen bei 24 h Inkubationszeit mit 10 000 pg ml⁻¹ IL-8 eine deutliche Basalsekretion von IL-8.

Im Gegensatz hierzu führt LPS bereits nach 4 h zu einem fast 6-fach höherem IL-8 Gehalt als bei der Kontrolle. Dieses hohe Niveau bleibt auch bei 24 h erhalten.

Bei C₆₀ beobachtet man nach 4 h ein Signal von 60% des Wertes für LPS. Dieses Signal geht dann aber bis 24 h fast auf das Niveau der Kontrolle zurück. In den Inkubationsüberständen mit RR findet man mit jeweils ca. 20 000 pg ml⁻¹ IL-8 bei 4 und 24 h einen deutlichen IL-8 Gehalt, der beim 4- bzw. 3-fachen der Kontrolle liegt.

DQ12 ist der einzige partikuläre Zusatz, der zu einem Anstieg des IL-8 Gehalts über 24 h führt. Nach 4 h liegt der Meßwert mit 11 000 pg ml⁻¹ zwischen Kontrolle und C₆₀, nach 24 h aber noch über dem Wert für RR.

Einfluß auf die Freisetzung von PDGF

PDGF gilt als ein "spätes" Zytokin-Signal, das erst nach längerer Inkubationszeit freigesetzt wird. Dies läßt sich an den *in vitro* Meßwerten in **Abb. 32a** leicht nachvollziehen: Nach 24 h

Inkubationszeit liegen die Meßwerte für alle Ansätze deutlich über denen für 4 h.

In den Inkubationsüberständen der Kontrollen ist nach 4 h Inkubationszeit noch keine PDGF-Freisetzung meßbar, während nach 24 h mit über 35 pg ml^{-1} ein Anstieg um das 3-fache zu beobachten ist. LPS als immunologischer Stimulus führt bereits nach nur 4 h zu einem eindeutigen PDGF-Signal, das bis 24 h auf 90 pg ml^{-1} ansteigt.

C_{60} ist bei 4 h Inkubationszeit der wirksamste Partikel in Bezug auf die Freisetzung von PDGF: Im Überstand findet sich doppelt soviel PDGF wie bei der Kontrolle. Nach 24 h liegt der PDGF-Gehalt jedoch wieder auf Kontrollniveau. Bei RR ist von 4 auf 24 h Inkubationszeit ein mehr als 3-facher Anstieg des PDGF zu beobachten, so daß der 24 h-Wert deutlich über dem Kontrollwert liegt.

Mit einem Anstieg des PDGF-Signals von 4 h auf 24 h um gut das 5-fache auf ca. 60 pg ml^{-1} ist DQ12 für PDGF erneut der wirksamste partikuläre Zusatz.

Einfluß auf die Freisetzung von bFGF

In den vorliegenden Versuchen konnte die Freisetzung von bFGF bei keinem der Inkubationsansätze beobachtet werden (**Abb. 32b**). Verglichen mit dem Leerwert des Mediums, das ca. 8 pg ml^{-1} bFGF enthält, lagen die Rohdaten der Messungen mit $7\text{-}9 \text{ pg ml}^{-1}$ für alle Inkubationen im gleichen Bereich. Bei Normierung auf die Zellzahl ergeben sich dann rechnerisch bFGF-Konzentrationen, die unter dem Leerwert des Mediums liegen.

In anderen Versuchsansätzen, in denen der Medienleerwert unter 5 pg ml^{-1} war, lagen die bFGF-Gehalte der Inkubationsüberstände an oder unter der Nachweisgrenze des ELISA (1 pg ml^{-1}) (nicht gezeigt).

Aus diesen Daten ergibt sich, daß HL-60-M innerhalb 24 h auf keinen der untersuchten Stimuli mit einer Freisetzung von bFGF reagieren.

3.5. Induktion von Oxidantien und Antioxidantien

3.5.1. Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (RSS) aus RAM

Abb. 33 zeigt eindrucksvoll den Effekt von Zymosan als immunologischen Standardstimulus auf RAM (links oben): bei der Kontrolle steigt die Fluoreszenz selbst bis 90 min Meßzeit nicht über 500 Fluoreszenzeinheiten (FE) an, bei für Zymosan hingegen liegen die Werte bereits nach 30 min deutlich über dem Kontrollwert. Nach 90 min liegt die Fluoreszenz bei der Zymosan-Inkubation knapp unter 2 500 Einheiten.

Im Gegensatz zu Zymosan folgen die Fluoreszenzkurven für C_{60} , Graphit und DQ12 streng dem Verlauf der Kontrollkurve und unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt deutlich von dieser.

Bei RR tritt zu Beginn der Messung eine Erniedrigung der Fluoreszenz unter das Kontrollniveau auf. Nach ca. 40 min Inkubationszeit erreicht die Fluoreszenz dann das Kontrollniveau und folgt dann ebenfalls der Kontrollkurve.

Betrachtet man **Abb. 34**, so wird der Einfluß von SOD auf die Fluoreszenz erkennbar. In allen Ansätzen führt der Zusatz von SOD in das Außenmedium zu einer Erniedrigung der Fluoreszenz. Am deutlichsten ist dieser Effekt bei der Inkubation mit Zymosan: Bereits nach 30 min liegt der Anstieg der Fluoreszenzwerte für die Inkubation mit SOD mit ca. 330 FE bei nur 50% des Vergleichswertes ohne SOD. Damit fällt der Beginn des SOD-Effekts (Erniedrigung der Fluoreszenz) mit dem Beginn des Fluoreszenzanstieges im SOD-freien System mit Zymosan zeitlich zusammen (sh. oben). Der Trend verstärkt sich über die weitere Inkubation leicht, so daß nach 90 min beim Ansatz mit SOD nur noch etwa 40% der Fluoreszenz der Vergleichsansatzes ohne SOD zu finden sind.

Bei der Kontrolle oder den Inkubationen mit C_{60} , Graphit oder DQ12 ist der Effekt nicht so dramatisch, doch selbst bei der Kontrolle findet man nach 90 min eine Erniedrigung der

Fluoreszenz um 25%. Dieser Effekt ist ab ca. 40 min Inkubationszeit beobachtbar. Für C₆₀, Graphit und DQ12 liegt der Effekt von SOD auf die Fluoreszenz in einer ähnlichen Größenordnung.

Bei den Fluoreszenzwerten für RR liegen die Meßwerte für Inkubationsansätze mit SOD bereits nach etwa 20 min über denen der SOD-freien Vergleichsansätze. Nach 90 min beträgt der Meßwert für den SOD-haltigen Ansatz das 1,5-fache des Vergleichswertes.

Der Zusatz von Katalase in die Ansätze hat bei der Inkubation der RAM mit Zymosan keinerlei Einfluß (**Abb. 35**) auf die Fluoreszenz. Selbst nach 90 min sind die Meßwerte für die Ansätze mit und ohne Katalase mit 2 400-2 500 FE nicht voneinander verschieden.

Bei der Kontrolle ohne Zusatz von Partikeln findet man bei Zugabe von Katalase eine Erhöhung der Fluoreszenz nach 90 min um das etwa 1,4-fache auf 550 FE. Bei den Inkubationsansätzen mit Partikeln ist dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, jedoch ist er zumindest bei Graphit und DQ12 mit einer Fluoreszenzerhöhung um 20% nach 90 min gegenüber dem Ansatz ohne Katalase eindeutig meßbar und signifikant. Im Gegensatz zu den Versuchen mit SOD liegen die Werte für RR mit Katalase immer unter denen für RR alleine; dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Es kann aufgrund der o.g. Ergebnisse und der Literaturdaten [*Pick und Keisari (1981)*] davon ausgegangen werden, daß Zymosan aus RAM nahezu ausschließlich O₂⁻ freisetzt. Falls es eine Wechselwirkung zwischen den Kohlenstoff-Partikeln bzw. DQ12 mit O₂⁻ gäbe, müßte sich dies bei der gleichzeitigen Gabe von Zymosan mit den genannten Partikeln zeigen. Wie aus **Abb. 36** ersichtlich ist, hat die gleichzeitige Anwesenheit von C₆₀, Graphit oder DQ12 keinen Einfluß auf die zymosan-induzierte O₂⁻-Produktion durch RAM. Der Kurvenverlauf der Kombinationsansätze "Partikel + Zymosan" folgt streng dem Verlauf der Kurve für "Zymosan alleine".

Einzig in den Ansätzen mit RR sind die Meßwerte im Vergleich zu "Zymosan alleine" deutlich, und zwar auf etwa 30% der Fluoreszenz, vermindert.

3.5.2. Freisetzung von RSS aus HL-60-Makrophagen

HL-60-M setzen wie RAM bei Kontakt mit Zymosan RSS frei. Deutlich wird dies in **Abb. 37**, links: Bereits nach 20 min ist eine Erhöhung der Fluoreszenz über das Kontrollniveau hinaus meßbar. Nach 90 min Inkubation erreicht die Fluoreszenz 2 500 FE und damit das 5-fache der Kontrolle.

Die Fluoreszenzmeßwerte für die Inkubation mit C₆₀ unterscheiden sich nicht von denen der Kontrolle, während bei Graphit nach 90 min mit 800 FE das 1,6-fache der Kontrollfluoreszenz gemessen wird.

Setzt man den Inkubationsansätzen SOD zu (**Abb. 37**, rechts), so werden die Fluoreszenzwerte in allen untersuchten Ansätzen erniedrigt. Am deutlichsten ist dieser Effekt bei der Inkubation mit Zymosan zu beobachten: 2 250 FE ohne SOD stehen 750 FE bei der Inkubation mit SOD gegenüber. Auch hier fällt - wie bei RAM - der Beginn des SOD-Effekts zeitlich mit dem Effekt des Zymosan zusammen. Beim Ansatz ohne SOD beginnt der Fluoreszenzanstieg durch Zymosan nach ca. 10 - 20 min (**Abb. 37**), die Hemmung des Anstieges durch die Zugabe von SOD in den Ansatz mit Zymosan ist ebenfalls nach ca. 20 min Inkubationszeit meßbar.

Bei der Kontrolle, C₆₀ und Graphit ist die SOD-bedingte Verminderung der Meßwerte mit etwa 20-30% nicht so deutlich ausgeprägt, jedoch eindeutig meßbar.

Katalase hat wie bei RAM auch bei HL-60-M keinen Einfluß auf die Fluoreszenz des Inkubationsansatzes mit Zymosan (**Abb. 38**, rechts). Die Meßwerte für den Ansatz mit Katalase unterscheiden sich bis zu einer Meßzeit von 90 min nicht von denen des Ansatzes ohne Katalase.

Im Reaktionssystem mit C₆₀ und bei der Kontrollinkubation ohne Partikel ist ebenfalls kein Einfluß auf die Fluoreszenz der Ansätze meßbar. In beiden Fällen liegen die Werte nach 90 min mit ca. 400 (C₆₀) bzw. 500 FE praktisch gleich.

Im Ansatz für Graphit beobachtet man in dem in **Abb. 38** dargestellten Versuch einen geringen Unterschied zwischen den Inkubationen mit und ohne Katalase. Dieser Unterschied war jedoch bei zwei weiteren Versuchen nicht reproduzierbar, so daß auch bei der Kombination Graphit + Katalase nicht von einem Einfluß der Katalase gesprochen werden kann.

3.5.3. Fluoreszenz-Induktion durch Partikel-Dispersionen im zellfreien Ansatz

Um ausschließen zu können, daß die verwendeten Partikel-Dispersionen *per se* durch Wechselwirkungen mit dem Farbstoff zu einem Ansteigen der Fluoreszenz im benutzten Versuchssystem führen, wurden die Dispersionen mit H₂DCF-DA im zellfreien Ansatz unter Standardbedingungen inkubiert.

In **Abb. 39** wird gezeigt, daß weder für C₆₀ noch für Graphit oder DQ12 die Fluoreszenz über 90 min merklich zunimmt. In beiden Ansätzen bleiben die Meßwerte im Bereich von 80-100 FE. RR zeigt einen Kurvenverlauf, der deutlich von C₆₀ und Graphit abweicht: Zum Zeitpunkt t = 0 liegen die Werte mit ca. 15 FE unter den Vergleichswerten z.B. C₆₀, erreichen nach ca. 40 min das Niveau von C₆₀ und übersteigen dann die Vergleichswerte. Nach 90 min liegt die Fluoreszenz für den RR-Ansatz mit 170 FE ca. 60% über den Werten für C₆₀ und Graphit.

3.5.4. Freisetzung von Oxidantien aus BEAS-2B-Zellen

Bei der Inkubation von BEAS-2B mit Zymosan kommt es erst nach ca. 150 min zu einem Anstieg der Fluoreszenz, der sich von der Kontrolle unterscheidet (**Abb. 40**). Dieser Anstieg ist insgesamt jedoch geringer als bei RAM und HL-60-M: nach 360 min liegt der Meßwert mit 325 FE nur geringfügig über dem Doppelten der Kontrolle.

Bei der Inkubation der BEAS-2B mit C₆₀ und DQ12 kann über die gesamte Inkubationszeit kein Fluoreszenzanstieg gemessen werden, der sich von dem der Kontrolle unterscheidet.

Bei Inkubationen mit RR zeigt sich ein deutlich anderes Bild: Bereits nach 40 min Inkubationszeit steigen die Fluoreszenzmeßwerte über das Kontrollniveau an. Die Meßwerte sind dabei eindeutig wesentlich höher als die Summe der Werte aus "RR alleine" und "Zellen alleine (Kontrolle)". Dieser Anstieg bleibt bis etwa 150 min steil, um dann relativ flach bis zu 200 FE (bei 360 min) auszulaufen und wieder das Kontrollniveau zu erreichen. Vergleicht man den Kurvenverlauf für Zymosan und RR, so stellt man fest, daß der Anstieg der Fluoreszenz bei RR über eine Stunde vor dem Anstieg in der Inkubation mit Zymosan erfolgt. Weiter ist auffällig, daß sich nach ca. 4 h Inkubationszeit die Kurven für Zymosan und RR kreuzen. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zu einer Umkehr der Verhältnisse: War zuvor die Fluoreszenz im RR-System höher als bei Zymosan, so übersteigt nun die Fluoreszenz des Zymosan-Systems im folgenden deutlich die des RR-Systems. Dies ist dadurch bedingt, daß die Fluoreszenz für RR nach 4 h auf eine Art Plateau einschwenkt, die Fluoreszenz in der Inkubation mit Zymosan aber weiter ansteigt.

Der Zusatz von SOD zu den Inkubationsansätzen (**Abb. 41**) bringt lediglich bei der Inkubation mit Zymosan einen deutlichen Effekt: Nach 150 min trennen sich die Kurven der Ansätze mit und ohne SOD. Die Fluoreszenz des Ansatzes mit SOD liegt nach 360 min bei etwa 50% derer ohne SOD.

Der Einfluß der SOD auf die Fluoreszenz fällt auch hier wieder zeitlich mit dem Anstieg der zymosan-induzierten Fluoreszenz zusammen.

C₆₀ und RR induzieren bei Zugabe von SOD in die Ansätze eine Fluoreszenz, die sich zu keiner Zeit von der ohne SOD-Zugabe unterscheidet. Auch bei der Inkubation von DQ12 mit BEAS-2B-Zellen hat die Zugabe von SOD keinerlei Einfluß auf die Fluoreszenzentwicklung.

Der Zusatz von Katalase beeinflusst die Fluoreszenzentwicklung bei keinem der Inkubationsansätze (Abb. 42). Vielmehr liegen die Meßwerte der Inkubationsansätze mit und ohne Katalase so dicht beisammen, daß eine Unterscheidung nicht möglich ist.

Ergebnisse des Oxidantiennachweises mit Cytochrom C

Zusätzlich zu dem erstmals bei BEAS-2B-Zellen angewandten Fluoreszenz-Test wurde mit dem Cytochrom C/SOD-System als fluoreszenz-unabhängige Methode die Bildung von Oxidantien untersucht. Die Meßzeiten wurden hierbei in Anlehnung an die Ergebnisse der Fluoreszenz-Meßungen gewählt.

In Abb. 43 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe gezeigt: Zymosan induziert bei 45 und 90 min eine signifikante Freisetzung von O_2^- , während bei 135 min die Meßwerte zu stark streuen, um daraus einen signifikanten Einfluß von Zymosan auf die O_2^- -Produktion ableiten zu können. Für C₆₀ werden zu allen Zeitpunkten geringe, aber signifikante O_2^- Freisetzungen errechnet. RR führt zu wesentlich höheren O_2^- Freisetzungen als C₆₀: liegt mit 3 pmol nach 30 min der Meßwert noch in der Größenordnung der Zymosaninkubation, so werden nach 135 min mit 13 pmol die höchsten Werte aller Ansätze gemessen.

3.5.5. Produktion von Antioxidantien durch BEAS-2B-Zellen

Glutathion

Glutathion-Defizite in Zellsystemen sind Hinweise auf oxidativen Streß. Daher wurde untersucht, ob eine Inkubation von BEAS-2B-Zellen mit C₆₀, RR oder DQ12 zu einem relativen Glutathion-Defizit führt (Abb. 44).

In den Kontroll-Ansätzen liegt der Gesamtglutathion-Gehalt (GSH_{tot}) über 24 h gleichbleibend bei etwa $0,9 \mu\text{g mg}^{-1}$ Gesamt-Protein. Bei 4 h Inkubationszeit beträgt der GSH_{tot} bei C₆₀ $0,7 \mu\text{g}$, bei DQ12 $0,6 \mu\text{g}$. RR beeinflusst den GSH_{tot} innerhalb von 4 h am wenigsten. Nach 24 h liegen die GSH_{tot} für C₆₀ unverändert bei $0,7 \mu\text{g}$, für DQ12 bei $0,6 \mu\text{g}$. Nur bei RR ist zwischen 4 und 24 h ein Rückgang des GSH_{tot} um 25% auf $0,6 \mu\text{g}$ meßbar.

SOD

Veränderungen des SOD-Spiegels geben ebenfalls Aufschluß über oxidative Belastungen der Zellen.

Abb. 45 zeigt bereits für die Kontrollen erhebliche Schwankungen der SOD-Aktivität zwischen den Einzelwerten ($7 \pm 5 \text{ U ml}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$). C₆₀ und RR beeinflussen die SOD-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle nicht. Bei DQ12 ist eine Erniedrigung der SOD-Aktivität auf 5 U meßbar, doch liegt bedingt durch die hohen Schwankungsbreiten hier kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vor.

3.6 Untersuchungen zur unspezifischen Radikalbildung im zellfreien System

3.6.1. Die Abspaltung von Ethen aus α -Keto-S-Methyl-Buttersäure (KMB)

Die Abspaltung von Ethen aus KMB ist ein hochempfindlicher Nachweis radikalischer Reaktionen [Hippeli (1990), Hippeli und Elstner (1989)].

Unter Einfluß von Licht führt bereits HBSS als partikelfreie Kontrolle zu einer meßbaren Ethen-

der Kontrolle, während RR mit $0,4 \text{ pmol t}^{-1}$ zu einer signifikant höheren Ethen-Bildung führt. Der Effekt von RR läßt sich nicht durch die Zugabe von SOD in den Ansatz unterbinden: Die gebildete Ethen-Menge unterscheidet sich nicht von der des RR-Ansatzes und liegt ebenfalls signifikant über dem Meßwert der Kontrolle.

3.6.2. Die "Bleichung" von Crocin

Crocin als Polyen eignet sich zur Untersuchung, ob in Reaktionssystemen radikalische Vorgänge auftreten, die zur Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren führen können. Diese Peroxidation ist als Abnahme der Absorption bei 440 nm ("Bleichung") meßbar.

Der Vergleichswert der Kontrolle (HBSS) liegt bei 15% Crocin-Bleichung nach 15 min Inkubationszeit (**Abb. 47**). Der errechnete Wert für C_{60} beträgt ebenfalls 15%, so daß hier keine Bleichung durch C_{60} verursacht wurde. Für RR hingegen wird, wie auch bei der Ethen-Freisetzung, mit einer Bleichung von 22,5% ein signifikant höherer Wert erhalten als für HBSS und C_{60} .

4. Diskussion

Die Wirkungen von Kohlenstoff-Partikeln auf die Atemwege sind seit langem Gegenstand zahlreicher vergleichender Untersuchungen. Hierbei erstreckt sich das Gebiet von Dieselruß-Partikeln über Kohlenstaub und Flugasche bis hin zu Carbon Black, einem Industrieruß z.B. für die Reifenindustrie, von dem jährlich ca. 7,1 Mio. Tonnen weltweit produziert werden [Gardiner (1993)]. In den letzten Jahren kam eine neue Kohlenstoff-Modifikation hinzu: die Buckminsterfullerene. Diese Kohlenstoff-Partikel sind nicht nur in Physik und Chemie, sondern auch in der medizinisch-biologischen Grundlagenforschung interessant [Tsuchiya et al. (1995)] und stehen vor einer breiten Markteinführung. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die industrielle Anwendung der Fullerene zu Gesundheitsgefahren der Beschäftigten führen kann. Außerdem stehen mit den C₆₀ hochreine Kohlenstoff-Partikel mit nur geringsten Spuren von Kohlenwasserstoffen (KW) und Lösemitteln zur Verfügung, deren Anwendung in der Grundlagenforschung evtl. neue Aspekte für die Bewertung anderer Kohlenstoff-Stäube wie Carbon Black ergeben.

Neben dem mehr kristallinen C₆₀ ist sein Vorläufer-Produkt bei der Herstellung - der sog. Rohruß (RR) - interessant. Zum einen fällt er quantitativ wesentlich stärker an als C₆₀ (je kg C₆₀ etwa 10 kg RR), zum anderen stellt er ein hochamorphes, lösemittelfreies Kohlenstoff-Pulver dar. Auch in RR sind Kontaminationen mit Kohlenwasserstoffen an der untersten Nachweisgrenze, so daß RR als KW-frei angesehen werden kann.

Rivin (1993) stellt in einem umfangreichen Review fest, daß CB bis zu einer Dosis von > 10 kg kg⁻¹ Körpergewicht keine toxischen Effekte zeigt. Langzeitstudien mit Rhesusaffen, Kaninchen und Nagern zeigten, daß pathologische Veränderungen der Lunge wie z.B. fibrotische Veränderungen bei Inhalation von CB nicht auftreten.

DR-Partikel katalysieren aber in Gegenwart von H₂O₂ und Cystein die Bildung von Hydroxyl-Radikalen (-OH) und verursachen so Lipidperoxidationen [Vogl und Elstner (1989)]. Außerdem ist DR photoaktiv [Hippeli und Elstner (1989)] eine Eigenschaft, die auch von C₆₀ bekannt ist: er kann in wäßrigen Lösungen Singulett-Sauerstoff bilden [Orfanopoulos und Kambourakis (1995)] und als Photo-Katalysator dienen [Muthu et al. (1993)]. Radikalische Sauerstoffverbindungen ihrerseits können aber Lungenschäden wie Fibrosen oder Emphyseme induzieren [Burdon und Rice-Evans (1989), Cantin und Crystal (1985), Gillissen et al. (1995)], so daß eine Untersuchung der C₆₀ und der damit zusammenhängenden Stoffe notwendig erscheint. Die Bildung von Singulett-Sauerstoff könnte darüber hinaus auch zu zytotoxischen Effekten führen [Moussa et al. (1995)].

Im folgenden sollen zunächst die allgemeinen Befunde zur Zytotoxizität, danach Fragen der Zytokin-Freisetzung und abschließend der Problemkreis der Oxidantien bzw. Antioxidantien diskutiert werden.

Die **hämolytischen Eigenschaften** von Partikeln geben oft einen ersten Hinweis auf zytotoxische Eigenschaften von Partikeln: Wilczek (1991) zeigte in Übereinstimmung mit Nolan et al. (1987) z.B. für Quarz, daß die hämolytische Wirkung des Quarzes mit der Dosis ansteigt. Ausgehend von diesem Befund könnte man aus dem Ergebnis des Hämolyse-Tests mit C₆₀ eine Zytotoxizität erwarten, die bereits im Bereich von 100 µg ml⁻¹ über der von Quarz liegt. Bei Inkubationen von Flugasche aus Kohlekraftwerken (über 3 h) fanden Kaw et al. (1988) im Vergleich zu Quarz jedoch keine besonderen hämolytischen Effekte.

Betrachtet man vor diesem Hintergrund die Inkubationen mit RAM, so stellt man fest, daß bei einer Inkubationszeit von 4 h selbst bis 200 µg DQ12 ml⁻¹ die **Zahl** der lebend wiedergefundenen **Zellen** nach Inkubationsende voll in der Schwankungsbreite der apartikelären Kontrollansätze liegt. Ähnliches gilt für Graphit, einem anderen Kohlenstoff-Partikel. DQ12, der als zytotoxisch bekannte Quarz [Drosselmeyer et al. (1988), Schimmelpfeng et al. (1989), Seemayer (1985)] zeigt bei 200 µg ml⁻¹ deutliche zytotoxische Effekte, die an der Grenze zur Signifikanz liegen. Bei Inkubationen mit Partikel-Dispersionen von 100 µg ml⁻¹ zeigen C₆₀ und Graphit bis hin zu 96 h

Inkubationszeit ebenfalls keine signifikanten negativen Einflüsse auf die Zellzahlen von RAM. Bei HL-60-Makrophagen (HL-60-M) ist an den Zellzahlen ebenfalls kein negativer Effekt der Kohlenstoff-Partikel C₆₀ und Rohruß (RR) zu beobachten.

Ein Blick auf die Freisetzung des intrazellulären Enzyms **Lactat-Dehydrogenase** (LDH) - ebenfalls ein Marker für Zytotoxizität - bestätigt die Beobachtungen an den Zellzahlen. Weder C₆₀ noch Graphit führen bis zu einer Konzentration von 200 µg ml⁻¹ zu einer deutlichen Freisetzung von LDH. Im zeitlichen Verlauf über 96 h Inkubationszeit führen RR und Graphit zwar zum Teil zu signifikant erhöhten Freisetzungen von LDH aus RAM, doch bleibt die LDH-Freisetzung stets unter dem Ausmaß, das bei der Inkubation mit DQ12 nach nur 8 h zu beobachten ist. Vergleicht man im Fall von Graphit diesen Verlauf der LDH mit beobachteten Zellzahlen, so stimmen die Trends überein: der geringen Abnahme der Zellzahl entspricht die niedrige LDH-Freisetzung. Selbst bei C₆₀ bleibt die LDH-Aktivität der Überstände bis zu 24 h sehr niedrig; einzig nach 48 h ist ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, der aber auf der anderen Seite nicht mit einer dramatischen Abnahme der Zellzahl zu korrelieren ist. *Anderson et al. (1989)* bestätigen diese Befunde: bei *in vivo*-Versuchen mit Ratten finden sie keine zytotoxischen Effekte von synthetischem Graphit.

Eine sehr gute qualitative Übereinstimmung mit Literaturwerten, die allerdings nur bis zu 22 h Inkubationszeit zur Verfügung stehen [*Seemayer (1985)*], zeigt der Kurvenverlauf für DQ12. Der gut dokumentierte steile Anstieg der LDH fügt sich dabei gut mit der dramatischen Abnahme der Zellzahlen zusammen.

Nach 96 h Inkubationszeit liegen LDH-Meßwerte aller Ansätze im Bereich der Kontrollen. Eine Ursache hierfür könnte eine "allgemeine" Erschöpfung sein, die mit einem Vitalitätsverlust der kultivierten RAM verbunden ist, so daß es in allen Ansätzen gleichermaßen zur LDH-Freisetzung kommt. Einen Hinweis in diese Richtung gibt die verstärkte Abnahme der vitalen RAM von 24 zu 48 h Inkubationszeit. Ferner deuten unveröffentlichte Beobachtungen unseres Labors [*Mosbach*] darauf hin, daß bei Kulturzeiten von 96 h bis zu 50% der eingesetzten, vitalen Zellen verloren gehen. Dieser Effekt läßt sich durch eine höhere FKS-Zugabe in das Kulturmedium nur verringern, nicht aber aufheben [*Mosbach (unveröffentlicht)*].

Die Ergebnisse der LDH-Bestimmungen bei den HL-60-M unterstützen die Beobachtungen der Inkubationen mit RAM: C₆₀ und RR führen zwar zunächst zu leicht erhöhten LDH-Gehalten im Außenmedium, doch innerhalb von 24 h schwenken die Werte auf das Kontrollniveau ein. DQ12 unterscheidet sich hierbei deutlich von C₆₀ und RR: ein massiver Anstieg der LDH korreliert gut mit der 25% Abnahme vitaler Zellen innerhalb von 24 h.

Weitere Rückschlüsse auf zytotoxische Effekte erlaubt die Freisetzung der **N-Acetyl-β-Glucosaminidase** (NAG). Dieses Enzym liegt in Lysosomen vor und wird nur durch deren Zerstörung freigesetzt. Die freigesetzten lysosomalen Enzyme wiederum zerstören die RAM "von innen heraus", so daß die RAM zugrunde gehen und NAG in das Medium freigesetzt wird.

Schimmelpfeng et al. (1989) zeigten dies am Beispiel von DQ12: mit dem Anstieg der Konzentration von DQ12 stieg auch die NAG-Freisetzung aus RAM an. In den zitierten Versuchen führten 100 µg ml⁻¹ DQ12 innerhalb von 20 h Inkubationszeit zu einer NAG-Freisetzung von etwa dem Doppelten der Kontrolle. Diesem Bild entspricht der 24 h Wert der DQ12-Inkubation der vorliegenden Versuchsserien. Bis zu 48 h ist DQ12 der partikuläre Zusatz, der zur höchsten NAG-Freisetzung führt.

C₆₀, RR, und Graphit zeigen über die gesamte Inkubationszeit von 96 h keinen deutlichen Einfluß auf die NAG-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Der starke Anstieg der NAG-Aktivität auch in den Kulturüberständen der Kontrollen nach 96 h weist in die bereits bei LDH diskutierte Richtung: durch eine Erschöpfung der kultivierten RAM kommt es zu einem Vitalitätsverlust der Kultur. Durch den Zelltod wird dann vermehrt NAG freigesetzt. Da nur vitale RAM adhären sind, werden mit der Abnahme der Inkubationsüberstände auch die nicht(mehr) vitalen RAM abgenommen. Dieses Phänomen erklärt, weshalb trotz der Abnahme der Zellzahlen in den 96 h Kulturen die Viabilität stets über 95% bleibt.

Aus der photographischen Beobachtung und den transmissions-elektronenmikroskopischen

Aufnahmen ist bekannt, daß alle Kohlenstoff-Partikel von RAM phagozytiert werden. Unabhängig von den eigenen Beobachtungen wurde dies für C₆₀ auch von *Moussa et al. (1995)* elektronenmikroskopisch an humanen Leukozyten dokumentiert. Diese phagozytierten Partikel führen jedoch offensichtlich zu keiner Zerstörung der Lysosomen von innen.

Um dies detaillierter zu überprüfen, wurden in einem parallelen Ansatz RAM zunächst 4 h mit den Partikel-Dispersionen inkubiert. Bei einem Teil der Ansätze wurden dann die Partikel-Dispersionen abgenommen, und partikelfreies Medium zugegeben. Bei den anderen Ansätzen verblieben die Partikel-Dispersionen auf den Zellen. Ausgehend von der Hypothese, daß die phagozytierten Kohlenstoff-Stäube die Lysosomen nicht schädigen, DQ12 dies aber wohl tut, wurde nach weiteren 4 und 20 h die NAG-Aktivität in allen Ansätzen geprüft.

Tatsächlich entspricht das Ergebnis den Schlußfolgerungen aus der Langzeitinkubation. Nur bei DQ12 ist ein unverändert hohes Niveau der NAG-Aktivität zu beobachten, während die NAG-Werte der Ansätze mit den Kohlenstoff-Partikeln und LPS deutlich unter die Vergleichswerte, bei denen die Partikel in der Kultur verblieben, fallen.

Tokuyama et al. (1993) berichten zwar von der zytotoxischen Wirkung einer C₆₀-Carbonsäure unter Lichteinfluß, doch gab es bislang keine grundlegenden Untersuchungen zur Zytotoxizität von C₆₀ alleine. *Moussa et al. (1995)* beobachten bei der Inkubation von C₆₀ mit humanen Leukozyten innerhalb von 24 h eine Abnahme der überlebenden Zellen um ca. 35% (Kontrolle: 20%) und einen LDH-Index von etwas über 50% (Kontrolle: ca. 35%). Die Korngröße des eingesetzten C₆₀ war dabei mit einer Schwankungsbreite zwischen 1 und 20 µm größer als in den vorliegenden Versuchen. *Moussa et al. (1995)* folgern aus ihren Beobachtungen "selbst ein hoher Überschuß [an C₆₀, Anm. d. Autors] hat im Falle von kultivierten humanen Leukozyten keine akute Toxizität".

Auf der Basis der eigenen und der veröffentlichten Befunde kann daher eine akut-zytotoxische Wirkung von C₆₀ ausgeschlossen werden.

Die sehr gute Übereinstimmung der Parameter zur Zytotoxizität von DQ12 als partikuläre Positiv-Kontrolle mit Literaturwerten stellt sicher, daß die Versuche mit den bislang erstmals verwendeten Kohlenstoff-Stäuben dem allgemein üblichen Vorgehen entsprechen. Die gewonnenen Daten zur Zytotoxizität der Kohlenstoff-Stäube sind damit jederzeit belastbar.

Eines der wichtigsten **Zytokine** für die Pathogenese von fibrotischen Lungenerkrankungen ist die Freisetzung des **Tumor-Nekrose-Faktor- α** (TNF- α) aus Makrophagen [*Griwatz und Seemayer (1994)*].

TNF hat *in vivo* eine sehr kurze Serum-Halbwertszeit von 6 - 20 min [*Tracey und Cerami (1994)*]. *Schmidt (1992)* ermittelte hingegen *in vitro* für TNF (human-rekombinant) in Zellkulturmedium, daß über 20 h bei 37 °C die TNF-Aktivität konstant bleibt.

Der TNF-Biotest mit TNF-sensitiven Zellen ist stark fehlerbehaftet: *Meager und Gaines Das (1994)* zeigten in einer internationalen Studie, daß bei 20 beteiligten Laboratorien die Meßwerte für TNF (human-rekombinant) bei einem geometrischen Mittel von $54,3 \times 10^{-3}$ U und einem 95% Konfidenz-Intervall von $48,1-61,4 \times 10^{-3}$ U zwischen 35 und 75×10^{-3} U schwanken. Ein Einfluß der verwendeten Zellart (WEHI, L-929 u.a.) ist dabei nicht zu erkennen. Auch *Wan et al. (1994)* sprechen davon, daß die Reproduzierbarkeit des MTT-Tests "nicht gut" sei.

Ferner liegt in den Inkubationsüberständen eine analytisch nicht erfaßte Mischung verschiedenster Sekretionsprodukte der Zellen vor [*Nathan (1987)*], so daß das Ergebnis des Assays auch durch Wechselwirkungen dieser Produkte auf die WEHI-Zellen untereinander beeinflusst wird. Um ausgewählte Zytokine gezielt und genau erfassen zu können, wurden daher menschliche HL-60-M in die Versuche einbezogen, da hierfür ELISAs aus der medizinischen Diagnostik verfügbar sind.

Die Wirkung von LPS als einem physiologisch-immunologischen Standardstimulus wird rezeptorvermittelt [*Tobias und Ulevitch (1993)*, *Steinemann et al. (1994)*]. Entsprechend ist sowohl bei RAM als auch bei HL-60-M nach bereits 4 h ein deutliches TNF-Signal zu finden.

Dieses Signal geht zwar bei beiden Inkubationssystemen innerhalb der folgenden 20 h zurück, bleibt jedoch gegenüber der Kontrolle erhöht. *Ryan et al. (1994)* berichten von Versuchen mit organischen Stäuben (Baumwolle) und LPS, bei denen bereits nach 3 h Instillation von mit LPS in Mäuselungen, aber erst 6 h nach Instillation von Baumwolle deutliche TNF-Signale beobachtet wurden.

Die Kohlenstoff-Partikel (RR und Graphit) induzieren schon bei 4 h Inkubationszeit deutliche TNF-Effekte, die aber nur in geringem Umfang konzentrationsabhängig sind. Bis 8 h Inkubation mit RAM verbleiben die Werte auf sehr hohem Niveau oder erreichen dort erst ihr Maximum (RR). Danach fallen die Werte ab, jedoch bleibt der TNF-Gehalt sowohl bei den RAM als auch bei den HL-60-M bis 24 h über den Kontrollwerten. Die Langzeitinkubationen mit RAM belegen außerdem, daß sich auch noch nach 96 h Inkubationszeit TNF-Gehalte im Medium finden, die denen des LPS-Ansatzes entsprechen oder diese übertreffen.

C₆₀ hingegen hat keinen besonderen Einfluß auf die TNF-Freisetzung: bei RAM liegen die TNF-Gehalte im Bereich der Kontrolle oder darunter. Bei HL-60-M wird zwar bei 4 h TNF im Überstand gefunden, jedoch sind dies nur knapp 33% des LPS oder RR-Effekts. Der 24 h Meßwert liegt dann bereits wieder im Bereich der Kontrolle.

Der Effekt von DQ12 auf die Freisetzung von TNF aus RAM und HL-60-M ist im wesentlichen schwächer ausgeprägt als bei RR oder Graphit. Bei RAM ist erst nach 24 h Inkubationszeit ein Anstieg des TNF zu beobachten, der aber deutlich unter den RR und Graphit-Werten bleibt. Bei HL-60-M ist die Größenordnung des 4-Stunden Signals vergleichbar dem des C₆₀. Nach 24 h liegt aber auch hier der TNF-Gehalt der Überstände über den Kontrollwerten, so daß insgesamt von einem leichten Effekt auf die TNF-Freisetzung gesprochen werden kann.

Schmidt (1992) geht besonders bei Inkubationen mit Quarz von einer Unterbewertung der tatsächlich freigesetzten TNF-Menge aus. Sie argumentiert auf der Basis der hohen Zytotoxizität des Quarzes: durch die Zerstörung der Zellen würden zytoplasmatische und lysosomale Proteasen freigesetzt, die zu einem Abbau des TNF führen könnten. Eine Abnahme der TNF-Aktivität bei längeren Inkubationszeiten wäre damit besonders bei Inkubationen mit DQ12 erklärbar.

Vor diesem Hintergrund sind fibrotische Langzeiteffekte durch TNF bei fortwährendem inhalativem Kontakt mit Graphit-Pulver oder RR nicht auszuschließen.

Ob nun *in vitro* durch den Einfluß von LPS oder der Partikel-Dispersionen eine **chemotaktische Aktivität** direkt (IL-8) oder indirekt (über TNF) induziert wurde, kann mit dem Chemotaxis-Assay geprüft werden. *Mosbach (1994)* konnte dabei in ihren Versuchen nachweisen, daß zumindest ein erheblicher Teil der Chemotaxis bei Inkubationsüberständen von RAM auf IL-8 zurückgeführt werden kann. Auf der Basis dieser Versuche wurde daher erwartet, daß ein biphasischer Verlauf der Chemotaxis auf RAM-Inkubationsüberstände zu finden ist, da *DeForge et al. (1992)* einen derartigen biphasischen Verlauf für die IL-8 Freisetzung *in vivo* eindeutig nachgewiesen haben.

Für diesen Chemotaxis-Bioassay gilt aber ebenfalls, daß hier in den Überständen chemoattraktive und evtl. repelente Sekretionsprodukte der inkubierten Zellen gemeinsam und in Wechselwirkung miteinander auf die Zielzellen (RAM oder Granulozyten) wirken. Deshalb wurden zusätzlich in ELISAs die bekannten Chemoattraktoren IL-8 [*Strieter et al. (1994)*] und PDGF [*Deuel et al. 1982*], die aus HL-60-M freigesetzt wurden, untersucht.

Der Verlauf der chemoattraktiven Wirkung (CW) am Beispiel der Inkubation von RAM mit LPS zeigt, daß die Chemotaxis durch "späte" Signale bestimmt wird: der erste Spitzenwert tritt erst nach 8 h Inkubationszeit auf. Obwohl die CW dann vorübergehend zurückgeht, bleibt sie im weiteren Verlauf deutlich über den Kontrollwerten.

Bei C₆₀ und Graphit tritt das Maximum der CW erst nach 24 h auf. Während bei C₆₀ ein biphasischer Verlauf ähnlich wie bei LPS zu beobachten ist, verbleibt die CW für Graphit jedoch auf hohem Niveau. Der Anstieg der CW bei Graphit von 4 zu 24 h Inkubationszeit entspricht qualitativ bereits veröffentlichten Daten [*Baierl (1992)*]. Die Abnahme der CW bei der C₆₀-Inkubation wurde - wenn auch zeitlich verschoben - ebenfalls beobachtet.

DQ12 zeigt ebenfalls einen biphasischen Verlauf der CW mit einem ersten Maximum nach 12 h. Die CW liegt jedoch z.T. niedriger als für Graphit. Unklar hierbei ist, inwieweit die starke

Zytotoxizität des DQ12 in den Langzeitinkubationen durch die Abnahme der Vitalität der Kultur die CW beeinflusst. Denkbar wäre, daß die Kultur bereits bei 24 h so stark geschädigt ist, daß keine Zytokine mehr gebildet werden. Außerdem könnte es auch hier - analog zu der Situation bei TNF - durch die Zerstörung der RAM zur Freisetzung von Proteasen etc. aus den RAM kommen, die zu einer Zerstörung von chemoattraktiven (und repelenten) Faktoren führen [Schmidt (1992)]. Dies hätte eine Unterbewertung der CW besonders bei DQ12-Inkubationen zur Folge.

Zieht man die Ergebnisse der **ELISAs** für **IL-8** und **PDGF** hinzu, so bestätigen diese die Tendenzen aus dem Chemotaxis-Bioassay. Bei beiden Zytokinen verursacht LPS einen deutlichen Anstieg dieser Chemotaxine von 4 auf 24 h Inkubationszeit. Dieser Anstieg korreliert gut mit Daten, die Schapira et al. (1991) veröffentlichten: auch hier wird von einem Anstieg des PDGF *in vitro* über 24 h berichtet. Der Spitzenwert ist damit gegenüber dem Ergebnis im Bioassay zwar um 12 h verschoben, doch entspricht dies für IL-8 bei HL-60-M einem bereits zuvor beobachteten Verlauf [Baierl (1992)].

Bei C₆₀ geht der IL-8 Gehalt von 4 zu 24 h fast auf Kontrollniveau zurück, die PDGF-Konzentration stellt sich nach 24 h auf das Kontrollniveau ein. Das Ergebnis für IL-8 scheint dabei in Widerspruch zu früheren Daten zu stehen [Baierl (1992)], bei denen ein Anstieg der IL-8 Konzentration von 4 auf 24 h beobachtet wurde. Diese Abweichung könnte zwei Gründe haben: zum einen wurde bei der Arbeit von 1992 ein anderes C₆₀-Material (geringere Reinheit) verwendet, zum anderen wurde das Differenzierungs-Protokoll für die HL-60-M etwas modifiziert, wodurch sich Inkubationsvolumina geändert haben. Eigene Ergebnisse [Baierl (1992)] stützen eher das aktuelle Ergebnis aus dem Chemotaxis-Assay als daß sie im Widerspruch dazu stehen.

RR setzt aus HL-60-M zu beiden Zeitpunkten deutlich IL-8 frei, und bei PDGF ist ein Anstieg vom Kontrollniveau auf mehr als den halben LPS-Effekt zu beobachten.

DQ12 verursacht sowohl in Hinblick auf IL-8 als auch auf PDGF einen deutlichen Anstieg der Zytokin-Konzentrationen in den HL-60-Überständen.

LPS und DQ12 zeigen damit in beiden Testsystemen, daß sie chemoattraktive Faktoren aus Makrophagen freisetzen. Beide zeigen bei Inkubationen mit RAM einen deutlichen biphasischen Verlauf.

IL-8 und PDGF sind aber nur 2 mögliche Chemotaxine, die von Makrophagen freigesetzt werden können. Damit sind Abweichungen zwischen dem Verlauf der CW und der Freisetzung von Chemoattraktoren nicht nur durch die Verwendung unterschiedlicher Zellarten erklärbar. Vielmehr können auch Verschiebungen der Konzentrationen von Zytokinen gegeneinander auftreten und sich damit synergistische und antagonistische Wirkungen verändern.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob HL-60-M **bFGF** freisetzen. Zur Freisetzung von bFGF aus HL-60-M liegen keine Literaturdaten vor, jedoch ist bekannt, daß native Makrophagen einen Wachstumsfaktor freisetzen, der mit bFGF identisch zu sein scheint [Baird et al. (1985)]. In keinem der Inkubationsansätze von HL-60-M konnte bFGF nachgewiesen werden. Es ist damit wahrscheinlich, daß HL-60-M keinen bFGF sezernieren. Dabei kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß RAM als native Makrophagen nicht doch bFGF freisetzen, und dadurch die Entstehung einer fibrotischen Lungenerkrankung begünstigt wird.

Faßt man die Ergebnisse der *in vitro* Zytokin-Freisetzungen und der CW zusammen, so stellt man fest, daß Graphit und RR zu deutlicheren Zytokin-Signalen führen als C₆₀.

Die Ergebnisse für DQ12 entsprechen in ihren Trends den Literatur-Werten. Für Quarz ist darüber hinaus ausreichend belegt, daß er zu fibrotischen Lungenerkrankungen (Silikosen) führen kann. Im Vergleich zu Quarz kann davon ausgegangen werden, daß C₆₀ in der verwendeten Form kaum fibrogen ist. RR und Graphit hingegen könnten bei längerem inhalativem Kontakt zu Beeinträchtigungen der Lungenfunktion führen, wobei besonders TNF und PDGF kritische Mediatoren sind.

Das Gleichgewicht von **Oxidantien** auf der einen und **Antioxidantien** auf der anderen Seite stellt

einen empfindlichen Parameter dar, dessen Störung in schweren pathologischen Veränderungen des betreffenden Organs resultieren kann. So induziert z.B. ein geringer Überschuß an O_2^- die Proliferation von Fibroblasten, wodurch bei anhaltendem Reiz eine Fibrose entstehen kann [Murrell *et al.* (1990)].

Ein anderer Mechanismus, durch den **reaktive Sauerstoffspezies** (RSS) ein Lungenemphysem hervorrufen können, ist die Störung des Gleichgewichts α 1-Antitrypsin/Elastase. Wird durch Oxidantien das α 1-Antitrypsin zerstört, so kann die Aktivität der Elastase aus neutrophilen Granulozyten nicht mehr gehemmt werden: es kommt zur Zerstörung des Lungengewebes [Cantin und Crystal (1985)]. Dabei können die Oxidantien sowohl endogen aus Phagozyten [Carp und Janoff (1980)] als auch exogen z.B. aus Zigarettenrauch [Carp *et al.* (1982)] kommen.

Aus der Literatur ist hinreichend bekannt, daß Partikel einen Anstieg der RSS-Freisetzung aus RAM und anderen Phagozyten bewirken können. Berg *et al.* (1993) zeigten dies z.B. für Inkubationen von RAM mit DQ12 und Sikron F 600 als Quarz-Proben sowie mit verschiedenen anderen Stäuben. In ihrem Inkubations- und Meßsystem führten die Stäube DQ12 aber - anders als in der Literatur beschrieben - zu vergleichsweise hohen H_2O_2 -Meßwerten, während die Werte O_2^- zu niedrig waren. Dieses Phänomen wird über nicht-zelluläre Nebenreaktionen der RSS mit Metallen (z.B. Fenton-Reaktion über Fe(II)/Fe(III)) im Reaktionssystem erklärt. Tatsächlich sollte bei Makrophagen erwartet werden, daß auf Stimuli hin überwiegend O_2^- gebildet wird [Pick und Keisari (1980)].

Zur Untersuchung der Frage, ob durch die verwendeten Partikel die **Freisetzung von RSS** aus Zellen induziert wird, wurde ein Meßsystem mit einem **Fluoreszenzfarbstoff** verwendet. Durch Oxidation wird das nicht-fluoreszierende 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H_2DCF -DA) in das fluoreszierende 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) überführt [Rosenkranz *et al.* (1992)]. Ein Anstieg der Fluoreszenz gibt einen Hinweis auf die Bildung von RSS im Inkubationssystem, wobei durch die Zugabe von Superoxid-Dismutase (SOD) oder Katalase zwischen O_2^- und H_2O_2 unterschieden werden kann: Sinkt die Fluoreszenz des Ansatzes mit SOD gegenüber dem ohne SOD ab, so wurde O_2^- gebildet, das durch SOD abgebaut wurde. Analoges gilt für die Inkubationsansätze mit Katalase.

Die Meßergebnisse mit diesem System entsprechen sowohl für RAM als auch für HL-60-M voll den aufgrund der Literatur erwarteten Ergebnissen: Beide Zellarten setzten bei Inkubation mit Zymosan als einem immunologischen Stimulus nahezu ausschließlich O_2^- frei. Besonders deutlich wird dies beim Vergleich der Fluoreszenzen der Inkubationssysteme "Zymosan alleine" und "Zymosan mit SOD". Die Zugabe von Superoxid-Dismutase verringert die zymosan-induzierte Fluoreszenz um bis zu 75%. Eine vollständige Hemmung der Fluoreszenz kann in diesem System nicht erreicht werden, da sonst soviel SOD zugegeben werden müßte, daß unspezifische Nebenreaktionen die Meßergebnisse verfälschen [Gu, unveröffentlicht]. Die Zugabe von Katalase, durch die H_2O_2 abgefangen würde, hat in diesem Fall nahezu keinen Einfluß auf die Fluoreszenz.

Bei den Inkubationen mit Zymosan alleine liegen die Fluoreszenzwerte bei beiden Zellarten mit jeweils etwa 2 500 Fluoreszenzeinheiten (FE) in gut vergleichbaren Größenordnungen. Der Einfluß der SOD auf die Verringerung der Fluoreszenz der Inkubationsansätze mit jeweils ca. 60 - 80% ist bei beiden Zellarten ebenfalls gleich stark ausgeprägt.

Auch bei den Kontrollen sind die Fluoreszenzen der Versuche mit RAM und HL-60-M in ihrer Größenordnung vergleichbar: nach 90 min Inkubationszeit liegen die Werte mit 400 - 600 FE über alle Versuche vergleichbar hoch. Die Zugabe von SOD zu den Kontrollen erniedrigt die Fluoreszenz jeweils um ca. 25% und unterstreicht somit, daß RAM und HL-60-M unter den gewählten Bedingungen in Bezug auf RSS vergleichbare Inkubationssysteme darstellen.

Bei Inkubation mit Partikeln zeigen RAM weder mit C_{60} noch mit Graphit oder DQ12 eine Freisetzung von RSS. Vielmehr laufen die Fluoreszenz-Kurven nahezu völlig deckungsgleich. Die genannten Partikel induzieren über diese Basalsekretion hinaus keine weiteren RSS.

Die Zugabe von SOD in den Inkubationsansatz ändert nichts an dieser Aussage; die Fluoreszenz

der Ansätze mit Partikeln und SOD entspricht dem Rückgang im Kontroll-Ansatz mit SOD. Durch die Zugabe von SOD wird somit lediglich der Anteil an O_2^- abgefangen, der spontan aus RAM freigesetzt wird.

Der Zusatz von Katalase zu den Inkubationen mit C_{60} , Graphit und DQ12 führt, ebenso wie bei der Kontrolle, zu mitunter geringfügigen Erhöhungen der Fluoreszenz. Dieses Phänomen wird bei Zugabe von Katalase regelmäßig beobachtet [Gu, unveröffentlicht].

Für Inkubationen von C_{60} mit HL-60-M gilt prinzipiell das für RAM beobachtete: C_{60} setzt aus HL-60-M über die Basalsekretion hinaus ebenfalls keine RSS frei. Die Kurven der Inkubation mit C_{60} und der Kontrolle laufen nahezu deckungsgleich, wie auch der Effekt von SOD bzw. Katalase im C_{60} -Ansatz voll dem Effekt im Kontrollansatz entspricht.

Im Unterschied zu den Beobachtungen bei RAM führt Graphit im System mit HL-60-M über das Maß der Kontrolle hinaus zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Mit SOD ist diese Fluoreszenz geringfügig vermindierbar (in der Größenordnung wie bei der Kontrolle), doch liegt nach 90 min. auch der Wert "Graphit + SOD" über dem Kontrollwert. Ähnliches gilt für die Kombination "Graphit + Katalase": Die Fluoreszenz ist gegenüber dem Ansatz "Graphit alleine" kaum hemmbar und deutlich höher als der Kontrollwert. Da - wie oben festgestellt - RAM und HL-60-M ansonsten tendenziell zu den gleichen Ergebnissen führen, ist die Beobachtung, daß HL-60-M auf Graphit mit vermehrter Produktion von RSS reagieren, bemerkenswert.

DQ12 unterscheidet sich in Bezug auf die Fluoreszenz-Induktion nicht deutlich von Kontrolle und C_{60} , so daß seine Eigenschaften in Bezug auf die Induktion von RSS keiner besonderen Diskussion bedürfen.

Die Fluoreszenz-Kurve für Rohruß zeigt bei RAM einen interessanten Verlauf: Anfangs liegt die Fluoreszenz unter dem Kontrollwert. Nach ca. 30 - 40 min. schwenkt die Fluoreszenzkurve auf die Kurve der Kontrolle ein, und im Nachfolgenden folgt sie dieser, wie es bei den anderen Kohlenstoff-Partikeln ebenfalls beobachtet wurde. Bei den Inkubationen mit SOD und Katalase tritt dieser Effekt nicht auf. Vielmehr liegt hier die Fluoreszenz während der ersten ca. 40 min. unter den Vergleichswerten der Kontrolle. Danach divergiert der Kurvenverlauf zwischen SOD- und Katalase-Ansatz: die Meßwerte für die Kombination "RR + SOD" steigen über das Niveau sowohl der Kontrolle als auch des Ansatzes "RR alleine" hinaus an. Katalase zeigt in Bezug zu "RR alleine" in diesem System keinerlei Einfluß auf den Kurvenverlauf. Diese Beobachtung läßt zwei Schlußfolgerungen zu: Erstens könnte RR SOD inaktivieren und zweitens könnte RR selbst RSS im System induzieren. Bei einer Inaktivierung der SOD dürfte der Verlauf der Fluoreszenz-Kurve nicht so ausgeprägt höher liegen wie beobachtet: schließlich wird ja nur das gebildete O_2^- nicht abgefangen, und die Effektivität der Katalase legt nahe, daß auch H_2O_2 nicht im Reaktionssystem vorliegt, so daß H_2O_2 als Ursache für diesen Kurvenverlauf ausscheidet.

Induziert RR also im gewählten Inkubationssystem - evtl. durch das anregende Licht - *per se* RSS? Die Wirkung von RR wäre dann damit der von Dieselruß-Partikeln vergleichbar, denn für diese ist die Bildung von Radikalen unter Licht gut dokumentiert [Hippeli und Elstner (1989)]. Zur weiteren Untersuchung dieser Arbeitshypothese wurden drei Ansätze gewählt: die Untersuchung des Fluoreszenz-Verlaufes von RR mit H_2DCF -DA im zellfreien System, die Abspaltung von Ethen aus α -Keto-S-Methyl-Buttersäure (KMB [Hippeli und Elstner (1989), Youngman et al. (1985)]) und die Abnahme der Absorption einer Farbstoff-Lösung (Crocine-"Bleichung" [Hippeli und Elstner (1989), Friend und Mayer (1960)]).

Betrachtet man den Verlauf der Fluoreszenz von RR mit H_2DCF -DA ohne Zellen, so stellt man fest, daß RR der einzige der verwendeten Partikel ist, der im Versuchssystem zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz führt. C_{60} , Graphit und DQ12 verursachen bei einer Gesamt-Meßzeit von 90 min. Fluoreszenzen in der Größenordnung von etwa 60 bis 110 FE; diese Werte sind bei einem Partikel dabei relativ konstant. Dabei beeinflussen weder SOD noch Katalase die Meßwerte. Anders stellt sich das Bild bei RR dar: Innerhalb der 90-minütigen Inkubation steigt die Fluoreszenz von 20 auf über 150 FE an. Zwar haben auch bei RR weder SOD noch Katalase einen

Einfluß auf die Fluoreszenz, doch liegen die Werte ab etwa 50 min deutlich über den Meßwerten der anderen Partikel. Das niedrige Anfangsniveau der Fluoreszenz paßt hierbei sehr gut zu den beobachteten zu niedrigen Meßwerten für die ersten ca. 30 min. in den Inkubations-Ansätzen mit RAM.

Um ausschließen zu können, daß es sich bei den beobachteten Effekten im zellfreien System mit H₂DCF-DA um unspezifische Wechselwirkungen zwischen RR und Farbstoff handelt, wurde RR im **KMB-** und **Crocin-**Modell auf radikalische Effekte untersucht. Dabei gilt besonders die Abspaltung von Ethen aus KMB als ein sensitiver Marker für die Produktion starker Oxidantien [Elstner (1987)]. RR führt im Vergleich zu C₆₀ zu einer deutlichen Bildung von Ethen aus KMB, was auf oxidative Vorgänge im Inkubationssystem schließen läßt. Diese Vorgänge sind anders als bei Dieselruß-Partikeln [Hippeli und Elstner (1989)] aber nicht durch SOD hemmbar. Bei dem Versuchsansatz mit Crocin ist eine deutliche Abnahme der Absorption des Crocin bei Inkubation mit RR zu beobachten, während C₆₀ die Absorptionsänderung nicht beeinflusst. Inkubationsansätze der Partikel mit KMB und Crocin sowie Katalase ergaben durch hohe Streubreiten der Meßwerte in keinem Fall auswertbare Daten. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß RR tatsächlich die Bildung von RSS im zellfreien System induziert. Diese Induktion kann auch im Ansatz mit Zellen angenommen werden.

Ungeklärt sind dabei aber noch drei andere beobachtete Phänomene: Die Fluoreszenz im Inkubationssystem mit RAM und "RR + SOD" liegt höher als im SOD-freien Ansatz, Katalase hat auf die RR-induzierte Fluoreszenz keinen Einfluß und bei den Inkubationen der Partikel mit Zymosan und RAM ist RR der einzige Partikel, der die Fluoreszenz erniedrigt.

Ersteres wäre erklärbar, wenn RR auf der einen Seite SOD inaktiviert, auf der anderen Seite zusätzliche Radikale in das Inkubationssystem abgäbe. Eine Inaktivierung der SOD durch eine Anlagerung der SOD an RR erscheint möglich, ähnlich wie Aktivkohle durch Adsorptionseffekte andere Moleküle binden kann. Die Bildung von Radikalen durch RSS ist ebenfalls erwiesen (sh. oben). Dem widerspricht aber die Beobachtung, daß RR mit RAM alleine keine Erhöhung der Fluoreszenz verursacht. Auch Katalase beeinflusst die Fluoreszenz nicht, und RR scheint RSS aus RAM abzufangen, denn nur so wäre die Erniedrigung der Fluoreszenz bei Inkubation von RAM und Zymosan durch RR zu erklären.

Zieht man die Ergebnisse der Inkubationen von Bronchial-Epithelzellen (BEAS-2B) mit RR hinzu, so wird es noch schwieriger, die Effekte durch RR im Zusammenspiel mit Zellen zu interpretieren. In diesen Versuchen war die Sensitivität des Meßgerätes um etwa Faktor 7 geringer als bei RAM und HL-60-M. Berücksichtigt man dies, so stellt man fest, daß die Fluoreszenzwerte für die Kontrollen, Zymosan und den SOD-Effekt bei Zymosan in ihrer Größenordnung ebenfalls mit denen von RAM vergleichbar sind.

RR ist der einzige untersuchte partikuläre Zusatz, der mit BEAS-2B-Zellen zu einem Anstieg der Fluoreszenz über das Kontrollniveau hinaus führt. Dieser Anstieg erfolgt sogar deutlich schneller, als der durch Zymosan induzierte, bleibt aber am Ende unter dessen Niveau. SOD erniedrigt im Ansatz mit Zymosan die Fluoreszenz deutlich und Katalase bleibt ohne Einfluß auf die zymosan-induzierte Fluoreszenz, was darauf hinweist, daß BEAS-2B bei Inkubation mit Zymosan O₂⁻ bilden.

Bei Verwendung von **Cytochrom C** als Indikator für die Bildung von O₂⁻ zeigt RR nach 135 min gegenüber C₆₀ und Zymosan eine deutlich erhöhte O₂⁻ Freisetzung. Die Relationen der O₂⁻ Freisetzungen zwischen C₆₀, Zymosan und RR sind dabei in etwa die wie bei H₂DCF-DA: nahezu kein Einfluß von C₆₀, geringe Freisetzung durch Zymosan und sehr deutliche Freisetzung durch RR. Für Retina-Epithelzellen ist die Bildung von O₂⁻ nach Inkubation mit Latex-Kügelchen bekannt [Dorey et al. (1989)], so daß dieses Ergebnis mit Cytochrom C nicht abwegig erscheint.

Im Ansatz mit RR haben jedoch weder SOD noch Katalase irgendeinen Einfluß auf den Anstieg der Fluoreszenz im Inkubationssystem, was eigentlich z.B. die Bildung von O₂⁻ aus BEAS-2B ausschloße. Der Fluoreszenzanstieg bei "BEAS-2B + RR" ist dabei gegenüber "BEAS-2B alleine" (Basalsekretion) und "RR alleine" überadditiv, so daß in diesem System zusätzliche oxidative

Effekte auf H₂DCF-DA wirken müssen.

Denkbar wäre die Bildung von NO als Mediator zwischen den Epithelzellen auf einen Reiz hin, doch dies ist nach den derzeitigen Versuchsergebnissen unwahrscheinlich [Hofer, unveröffentlicht].

Betrachtet man die Ergebnisse aller Versuche mit RR, so stellt man fest, daß eine eindeutige Aussage zum *in vitro*-Verhalten des RR unterbleiben muß. RR hat mit 255 m² eine extrem hohe Oberfläche (im Bereich von Aktivkohle), was Adsorptionseffekte erklärt, auf der anderen Seite zeigt er Eigenschaften, wie sie für Dieselruß-Partikel bekannt sind, ohne wie diese durch Metalle oder Kohlenwasserstoffe verunreinigt zu sein. Die komplexe Radikal-Chemie des RR macht weitere Untersuchungen notwendig, um eventuelle Schadmechanismen aufklären zu können.

Zum Schutz vor den pathogenen Wirkungen der RSS stellt der Organismus Antioxidantien bereit. Zwei dieser Antioxidantien sind die **Superoxid-Dismutase** (SOD) und **Glutathion** (GSH).

Die Aktivität der SOD besteht darin, zwei Moleküle O₂⁻ mit 2 Protonen zu H₂O₂ umzusetzen, das dann von dem fast ubiquitär vorkommenden Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff weiter dismutiert wird. Glutathion hingegen fängt RSS dadurch ab, daß zwei Moleküle GSH zu einem Dimer (GSSG) oxidiert werden, wobei Wasser gebildet wird. Diese Reaktion wird durch die GSH-Peroxidase katalysiert. GSSG wird in einer nachfolgenden Reaktion durch GSSG-Reduktase/NADPH wieder zu zwei Molekülen GSH reduziert.

Durch Veränderungen des Antioxidantienhaushaltes wie z.B. einem relativen Glutathiondefizit kann der Schutz vor Oxidationsschäden verlorengehen. Dieser Verlust des Oxidationsschutzes wird z.B. als eine Ursache für die Entstehung eines Emphysems angesehen.

Gillissen *et al.* (1995) inkubierten humane Bronchial-Epithelzellen unter anderem mit Quarz, um den Einfluß von Partikeln auf den **Glutathion**-Haushalt zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, daß Quarz zwar im Vergleich zur Kontrolle innerhalb von 24 h tendenziell zu einer leichten Abnahme des Glutathions führt, sich die Werte jedoch nicht signifikant unterscheiden. Die Relation $\text{GSH}_{\text{Kontrolle}} : \text{GSH}_{\text{Quarz}}$ bleibt dabei von 4 zu 24 h Inkubationszeit erhalten. Dieses Bild ergibt sich auch aus den Inkubationen von C₆₀ und DQ12 mit BEAS-2B-Zellen: Das GSH-Verhältnis Kontrolle : Partikel-Inkubation bleibt relativ konstant. Bei RR verschiebt sich dieses Verhältnis dadurch, daß die GSH-Konzentration merklich zurückgeht. Unklar ist dabei, ob dieser Rückgang auf oxidativen Streß oder eine einsetzende toxische Wirkung des RR auf die Zellen, verbunden mit einem Rückgang der *de novo*-Synthese von Glutathion, zurückzuführen ist. Da RR generell nicht besonders zytotoxisch ist, kann wohl eher oxidativer Streß für den Rückgang des GSH verantwortlich gemacht werden.

Ebenfalls Gillissen *et al.* (1995) zeigten in Bezug auf **SOD**, daß Quarz bei niedrigen Konzentrationen in BEAS-2B Zellen SOD induzieren kann.

Bei höheren Quarz- und Faserkonzentrationen (100 µg ml⁻¹) kam es zu einem Abfall der SOD-Aktivitäten *in vitro*. Die Werte für Kontrolle und DQ12-Inkubation nach 24 h unterscheiden sich hierbei aber nicht signifikant. Bei den vorliegenden SOD-Meßwerten wurden 100 µg ml⁻¹ der Partikel eingesetzt. Ein signifikanter Einfluß auf die SOD-Aktivität ist hierbei weder für C₆₀ noch für RR oder DQ12 meßbar. Da das Ergebnis für DQ12 den Literaturwerten nahekommt, kann damit gefolgert werden, daß auch C₆₀ und RR *in vitro* innerhalb von 24 h Inkubationszeit keinen Einfluß auf die SOD-Aktivität nehmen.

In vivo hingegen wurde von Mossman *et al.* (1986) ein Anstieg der SOD-Aktivität nach Asbest-Exposition beobachtet, der nach einem vorübergehenden geringem Abfall der Meßwerte aber erst nach 72 h Inkubationszeit signifikant wurde. Diese lange Inkubationszeit wird mit dem *in vitro*-System bislang nicht erreicht, so daß zu fragen ist, ob nicht bei längerer Exposition *in vitro* doch ein Anstieg der SOD-Aktivität aus BEAS-2B Zellen nach Inkubation mit Quarz zu beobachten wäre. Weitere Untersuchungen zum direkten Einfluß der Kohlenstoff-Partikel auf den Antioxidantien-Haushalt in Langzeit-Expositionssystemen sind vor diesem Hintergrund anzustreben. Sollte sich dabei herausstellen, daß die *in vitro* erreichbaren Expositionszeiten unter

der 72 h-Grenze von *Mossman et al. (1986)* liegen, so muß auf tierische Modelle ausgewichen werden.

Fassen wir den Diskussionsteil zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

Keiner der untersuchten Kohlenstoff-Partikel zeigt eine deutliche akute Zytotoxizität, während die Daten für Quarz DQ12 mit den Literaturwerten übereinstimmen. Anders als DQ12 schädigen die Kohlenstoff-Partikel die Lysosomen nicht.

Von den untersuchten Kohlenstoff-Stäuben zeigt lediglich der Fulleren-Rohruß (RR) in nahezu allen Inkubationssystemen deutliche Effekte: Er induziert neben Graphit die höchste TNF- α Freisetzung aus Rinder-Alveolarmakrophagen und ist dabei im System mit HL-60-Makrophagen in Bezug auf TNF, IL-8 und PDGF innerhalb der Kohlenstoff-Partikel der effektivste Stimulus. Ungeklärt sind die Effekte von RR bei Inkubation mit Bronchial-Epithelzellen (BEAS-2B), doch induzieren alle anderen partikulären Kohlenstoffe keine Reaktion der BEAS-2B. In Inkubation mit Zymosan kann RR als Radikal-Fänger wirken, auf der anderen Seite ist RR der einzige Kohlenstoff-Partikel, der *per se* radikalische Vorgänge in verschiedenen Inkubationssystemen induzieren kann. RR könnte damit in den Oxidantienhaushalt der Lungenzellen eingreifen, wengleich die verschiedenen Effekte noch nicht gegeneinander abgewogen werden können. Weitere Hinweise zur Pathogenität von RR könnten tierische Expositionsmodelle, in den beide Effekte - Radikal-Fänger und -Induktor - gegeneinander wirken und sich so beeinflussen, geben. C60 und - mit geringen Einschränkungen - Graphit sind im Rahmen der vorgestellten Ergebnisse mit Quarz DQ12 als Bezugspunkt als immunologisch inert zu werten.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte verschiedener Kohlenstoff-Partikel (Fulleren C₆₀ (C₆₀), Fulleren-Rohruß (RR) und Graphit) auf Vitalität und Freisetzung von Zytokinen aus Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM) und makrophagen-ähnlichen HL-60-Zellen (HL-60-M) verglichen. Außerdem wurde an den genannten Zellen und humanen Bronchial-Epithelzellen (BEAS-2B-Zellen) der Einfluß dieser Kohlenstoff-Partikel auf den Oxidantien- und Antioxidantienhaushalt der Lunge untersucht.

Ziel war es hierbei, Daten zur Bewertung der Toxizität und Immunreaktivität dieser Kohlenstoff-Partikel zu erhalten, wobei als Vergleichsstandard der gut charakterisierte pathogene Quarz DQ12 gewählt wurde.

Licht- und transmissions-elektronenmikroskopisch konnte nachgewiesen werden, daß alle verwendeten Kohlenstoff-Partikel von RAM phagozytiert werden. Dabei kommt es nur bei DQ12 zu einer Zerstörung der Lysosomen und der Freisetzung ihres Inhaltes. Ferner besitzen die Kohlenstoff-Partikel weder in Bezug auf RAM noch in Bezug auf HL-60-M zytotoxische Eigenschaften, während DQ12 als Positiv-Kontrolle bei beiden Zellarten eine starke Vitalitätsabnahme der Kulturen und eine hohe LDH-Freisetzung bewirkt.

In Bezug auf die Freisetzung von Zytokinen zeigte RR die stärksten Effekte, während C₆₀ und Graphit zu keinen eindeutigen Effekten führten.

Ein umfangreicher Teil der Arbeit widmete sich dem Einfluß der Kohlenstoff-Partikel auf das Gleichgewicht von Oxidantien (und Antioxidantien) in der Lunge. Unter Verwendung eines Fluoreszenz-Meßsystems konnte gezeigt werden, daß C₆₀, Graphit und DQ12 weder bei RAM noch bei HL-60-M oder BEAS-2B-Zellen zu einer Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führen. Einzig RR zeigte Interferenzen in den Systemen, in denen die Oxidantien durch Zymosan induziert wurden (RAM, HL-60-M): hier kam es zu einer Erniedrigung der Oxidantien-Konzentration. Im System mit BEAS-2B-Zellen wurden durch RR Meßwerte erhalten, die auf eine Induktion von Oxidantien durch RR hinweisen. Mittels des Cytochrom C-Systems konnte zwar Freisetzung von O₂⁻ aus den BEAS-2B-Zellen beobachtet werden, doch widerspricht dies den Ergebnissen aus den Fluoreszenz-Versuchen. Es konnte nicht geklärt werden, welcher Natur diese Oxidantien sind. Unter Verwendung zweier weiterer chemischer (zellfreier) Meßsysteme - dem α -Keto-S-Methyl-Buttersäure-Modell und dem Crocin-System - wurde außerdem festgestellt, daß RR in der Lage ist, *per se* radikalische Vorgänge - ähnlich wie Dieselruß - zu induzieren. Bei der Untersuchung des Einflusses auf den Antioxidantienhaushalt (SOD und Glutathion) der BEAS-2B-Zellen zeigte sich ferner, daß RR einen meßbaren (aber geringen) oxidativen Streß der Zellen verursacht. Ein direkter Einfluß von RR auf den Oxidantien- und Antioxidantienhaushalt der Lunge kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Es kann somit festgestellt werden, daß

- keiner der Kohlenstoff-Partikel akut-zytotoxische Eigenschaften aufweist
- einzig RR einen - wenn auch geringen - Einfluß auf die Zytokin-Freisetzung aus RAM und HL-60-M ausübt, und
- nur RR in den Oxidantien- und Antioxidantienhaushalt der Lunge eingreifen kann.

6. Literatur

Adamson, I.Y.R. and Prieditis, H., 1995

Response of Mouse Lung to Carbon Deposition During Injury and Repair.
Environmental Health Perspectives, *103*, 72-76.

Adelmann, P., Baierl, T., Drosselmeyer, E., Politis, C., Polzer, G., Seidel, A. and Steinleitner, C., 1994

Effects of Fullerenes on Alveolar Macrophages *in vitro*.
in: Toxic and Carcinogenic Effects of Solid Particles in the Respiratory Tract, Eds. Dungworth, D.L., Mauderley, J.L and Oberdörster, G., ILSI Press, Washington, D.C., 405-407

Allmann-Iselin, I., Car, B.D., Zwahlen, R.D., Mueller-Schüpbach, R., Wyder-Walther, M., Steckholzer, U. and Walz, A., 1994

Bovine ENA, a New Monocyte-Macrophage Derived Cytokine of the Interleukin-8 Family.
American Journal of Pathology, *145(6)*, 1382-1389.

Andersen, O.K., Stenvold, S.E. and Volden, G., 1982

Optimized Assay Conditions of 3T3 Cell Lysosomal Hydrolases.
European Review for Medical & Pharmacological Sciences, *IV*, 265-274.

Anderson, R.S., Thomson, S.A. and Gutshall, L.L. Jr., 1989

Comparative Effects of Inhaled Silica or Synthetic Graphite Dusts on Rat Alveolar Cells.
Archives of Environmental Contamination and Toxicology, *18*, 844-849.

Antoniades, H.N., Bravo, M.A., Avila, R.E., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., Maxwell, M. and Selman, M., 1990

Platelet-Derived Growth Factor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.
The Journal of Clinical Investigation, *86*, 1055-1064.

Atamny, F., Kollmann, H., Bartl, H. and Schlögl, R., 1993

Microstructure of Nanocrystalline Carbon Allotropes: Application of STM to Loose Particles.
Ultramicroscopy, *48*, 281-289.

Badwey, J.A. and Karnovsky, M.L., 1970

Active Oxygen Species and the Functions of Phagocytic Leukocytes.
Annual Review of Biochemistry, *49*, 695-726.

Baggiolini, M., Walz, A. and Kunkel, S.L., 1989

Neutrophil-Activating Peptide-1/IL-8, a Novel Cytokine that Activates Neutrophils.
The Journal of Clinical Investigation, *84*, 1045-1049.

Baierl, T., 1992

Cytokin-Freisetzung aus Makrophagen unter dem Einfluß von Hochtemperatur-Supraleitern und Fullerenen.
Diplomarbeit, Universität Karlsruhe, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften.

Baierl, T., Drosselmeyer, E. and Seidel, A., 1994

Biological Effects of a New Type of Pure Carbon (Fullerenes) *in vitro*.
in: NATO ASI Series, Vol. H85, Eds.: Davis, J.M.G. and Jaurand, M.-C., Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Baird, A., Momède, P. and Böhlen, P., 1985

Immunoreactive Fibroblast Growth Factor in Cells of Peritoneal Exudate Suggests its Identity with Macrophage-Derived Growth Factor.
Biochemical and Biophysical Research Communications, *126(1)*, 358-364.

- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. and Thomas, M., 1983**
Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophils: A Graded Response to Membrane Stimulation.
The Journal of Immunology, *130*(4), 1910-1917.
- Baumann, M.D., Jetten, A.M., Bonner, J.C., Kumar, R.K., Bennett, R.A. and Brody, A.R., 1990**
Secretion of a Platelet-Derived Growth Factor Homologue by Rat Alveolar Macrophages Exposed to Particulates *in vitro*.
European Journal of Cell Biology, *51*, 327-334.
- Bazzoni, F., Cassatella, M.A., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B. and Baggiolini, M., 1991**
Phagocytosing Neutrophils Produce and Release High Amounts of the Neutrophil-Activating Peptide 1/Interleukin-8.
The Journal of Experimental Medicine, *173*, 771-774.
- Becker, L., Bada, J.L., Winans, R.E., Hunt, J.E., Bunch, T.E. and French, B.M., 1994**
Fullerenes in the 1.85-Billion-Year-Old Sudbury Impact Structure.
Science, *265*, 642-644.
- Berg, I., Schlüter, T. and Gercken, G., 1993**
Increase of Bovine Alveolar Macrophage Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Release by Dusts of Different Origin.
Journal of Toxicology and Environmental Health, *39*, 341-354.
- Bienhoff, S.E. and Allen, G.K., 1995**
Quantitation of Bovine TNF- α mRNA by Reverse Transcription and Competitive Polymerase Chain Reaction Amplification.
Veterinary Immunology and Immunopathology, *44*, 129-140.
- Blussé van oud Alblas, A. and van Furth, R., 1979**
Origin, Kinetics and Characteristics of Pulmonary Macrophages in the Normal Steady State.
The Journal of Experimental Medicine, *149*, 1504-1518.
- Brain, J.D., 1980**
Macrophages Damage in Relation to the Pathogenesis of Lung Diseases.
Environmental Health Perspectives, *35*, 21-28.
- Braun, T., 1992**
Die epidemische Ausbreitung der Fulleren-Forschung.
Angewandte Chemie, *104*(5), 602-603.
- Breeze, R.G. and Wheeldon, E.B., 1977**
The Cells of the Pulmonary Airways.
American Review of Respiratory Diseases, *116*, 105-177.
- Burdon, R.H. and Rice-Evans, C., 1989**
Free Radicals and the Regulation of Mammalian Cell Proliferation.
Free Radical Research Communications, *6*(6), 345-358.
- Cantin, A. and Crystal, R.G., 1985**
Oxidants, Antioxidants and the Pathogenesis of Emphysema.
European Journal of Respiratory Diseases, *66* (Suppl. 139), 7-17.

Carp, H. and Janoff, A., 1980

Potential Mediators of Inflammation: Phagocyte-Derived Oxidants Suppress the Elastase-Inhibitory Capacity of Alpha₁-Proteinase Inhibitor *in vitro*.
Journal of Clinical Investigation, 66, 987-995.

Carp, H., Miller, F., Hoidal, R. and Janoff, A., 1982

Potential Mechanism of Emphysema: α 1-Proteinase Inhibitor Recovered from Lungs of Cigarette Smokers Contains Oxidized Methionine and Has Decreased Elastase Inhibitory Effects.
Proceedings of the National Academie of Science of the United States of America, 779, 2041-2045.

Castells, J., 1994

Some Comments on Fullerene Terminology, Nomenclature and Aromaticity.
Fullerene Science & Technology, 2(4), 367-379.

Castranova, V., 1994

Generation of Oxygen Radicals and Mechanisms of Injury Prevention.
Environmental Health Perspectives, 102 (Suppl. 10), 65-68.

Cerra, R.F. and Nathansson, S.D., 1989

Organ-Specific Chemotactic Factors Present in Lung Extracellular Matrix.
Journal of Surgical Research, 46, 422-426.

Chodirker, W.B., Bock, G.N. and Vaughan, J.H., 1968

Isolation of Human PMN Leucocytes and Granules: Observations on Early Blood Dilution and on Heparin.
Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 71, 9-19.

Claxton, L.D., 1983

Characterization of Automobile Emissions by Bacterial Mutagenesis Bioassay: A Review.
Environmental Mutagens, 5, 609-631.

Collins, S.J., Gallo, R.C and Gallagher, R.E., 1977

Continuous Growth and Differentiation of Human Myeloid Leukaemic Cells in Suspension Culture.
Nature, 270, 347-349.

Cornell, R., 1969

The Use of Nucleopore Filters in Ultrastructural Studies of Cell Cultures.
Experimental Cell Research, 56, 156-158.

Crapo, J.D. and Tierney, D.F., 1974

Superoxide-Dismutase and Pulmonary Oxygen Toxicity.
American Journal of Physiology, 226(6), 1401-1407.

Creasy, W.R., 1993

A Survey on the Research Areas Related to Buckminsterfullerene.
Fullerene Science & Technology, 1(1), 23-44.

Daly, T.K., Busek, P.R., Williams, P. and Lewis, C.F., 1993

Fullerenes from a Fulgurite.
Science, 259, 1599-1601.

Datta, A., Kelkar, R.Y. and Datta, M., 1994

Thermal Stability in Pure Oxygen of Soot Generated During the Production of C₆₀ by the Contact Arc Vaporization of Graphite.
Fullerene Science & Technology, 2(1), 25-34.

DeForge L.E. and Remick, D.G., 1991

Kinetics of TNF, IL-6 and IL-8 Gene Expression in LPS-Stimulated Human Whole Blood. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174, 18-24.

DeForge, L.E., Kenney, J.S., Jones, M.L., Warren, J.S. and Remick, D.G., 1992

Biphasic Production of IL-8 in Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human Whole Blood. *The Journal of Immunology*, 148, 2133-2141.

Deuel, T.F., Senior, R.M., Huang, J.S. and Griffin, G.L., 1982

Chemotaxis of Monocytes and Neutrophils to Platelet-Derived Growth Factor. *The Journal of Clinical Investigation*, 69, 1046-1049.

Dewald, B., Baggiolini, M., Curnutte, J.T. and Babior, B.M., 1979

Subcellular Localization of the Superoxide-Forming Enzyme in Human Neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 63, 21-29.

Dogra, S., Khanna, A.K. and Kaw, J.L., 1995

Alterations in the Pulmonary and Systemic Immune Response in Rats Exposed to Coal Fly Ash. *Immunopharmacology*, 29, 103-109.

Dorey, C.K., Khouri, G.G., Syniuta, L.A., Curran, S.A. and Weiter, J.J., 1989

Superoxide Production by Porcine Retinal Pigment Epithelium *in vitro*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 30(6), 1047-1054.

Driessen, C., Hirv, K., Fink, L. and Kirchner, H., 1994

Induction of Cytokines by Zinc Ions in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Separated Monocytes. *Lymphokine and Cytokine Research*, 13(1), 15-20.

Drosselmeyer, E., Hofheinz, V., Pätzold, S., Polzer, G., Schimmelpfeng, J. and Seidel, A., 1988

Parameters Influencing the Effects of Quartz on Alveolar Macrophages. *Journal of Aerosol Science*, 19(7), 1157-1160.

Edelmann, F.T., 1995

Filled Buckballs: Recent Developments from the Endohedral Metallofullerenes of Lanthanides. *Angewandte Chemie. International Edition in English.*, 34(9), 981-985.

Espevik, T. and Nissen-Maeyer, J., 1986

A Highly Sensitive Cell Line, WEHI 164 Clone 13 for Measuring Cytotoxic Factor/Tumor Necrosis Factor from Human Monocytes. *Journal of Immunological Methods*, 95, 99-105.

Falk, W., Goodwin, R.H. and Leonhard, E.J., 1980

A 48-well Micro Chemotaxis Assembly for Rapid and Accurate Measurement of Leucocyte Migration. *Journal of Immunological Methods*, 33, 239-247.

Fantone, J.C. and Ward, P.A., 1982

Role of Oxygen-Derived Free Radicals and Metabolites in Leukocyte-Dependent Inflammatory Reactions. *American Journal of Pathology*, 107(3), 397-418

Fischer, B.M., Krunkosky, T.M., Wright, D.T., Dolan-O`Keefe, M. and Adler, K.B., 1995

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) Stimulates Mucin Secretion and Gene Expression in Airway Epithelium *in vitro*. *Chest*, 107(3), 133S-135S.

- Fräter-Schröder, M., Risau, W., Hallmann, R. Gautschi, P. and Böhlen, P., 1987**
Tumor Necrosis Factor Type Alpha, a Potent Inhibitor of Endothelial Cell Growth *in vitro*, is Angiogenic *in vivo*.
Proceedings of the National Academie of Science of the United States of America, *84*, 5277-5281.
- Friedman, S.H., DeCamp, D.L., Sijbesma, R.P., Srdanov, G., Wudl, F. and Kenyon, G.L., 1993**
Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification.
Journal of the American Chemical Society, *115*, 6506-6509.
- Friend, J. and Mayer, A.M., 1960**
The Enzymic Destruction of Carotenoids by Isolated Chloroplasts.
Biochimica et Biophysica Acta, *41*, 422-429.
- Gardiner, K., Trethowan, N.W., Harrington, J.M., Rossiter, C.E. and Calvert, I.A., 1993**
Respiratory Health Effects of Carbon Black: A Survey of European Carbon Black Workers.
British Journal of Industrial Medicine, *50*, 1082-1096
- Ghio, A.J., Kennedy, T.P., Schapira, R.M., Crumbliss, A.L. and Hoidal, J.R., 1990**
Hypothesis: Is Lung Disease After Silicate Inhalation Caused by Oxidant Generation?
The Lancet, *336*, 967-996.
- Gillissen, A., 1993**
Oxidantien und der protektive Effekt von Glutathion in der Lunge.
Atemwegs- und Lungenkrankheiten, *19(6)*, 225-231.
- Gillissen, A., Jaworska, M., Wickenburg, D., Marks-Konczalik, J., Schmitz, I. und Schultze-Werninghaus, G. 1995**
Oxidantienmetabolismus und anti-oxidative Schutzmechanismen in staubbelasteten humanen Lungenzellen.
in: Berichtsband zum 4. Statuskolloquium des Projektes Umwelt und Gesundheit, Karlsruhe, FZKA-PUG 17, 219-242.
- Golden, E.B., Warnock, M.L., Hulett, L.D. and Chung, A.M., 1983**
Fly Ash Lung: A New Pneumoconiosis.
American Review of Respiratory Diseases, *125*, 108-111.
- Griwatz, U. und Seemayer, N.H., 1994**
Neue Erkenntnisse über die Rolle von Zytokinen in der Pathogenese von Pneumokoniosen, insbesondere der Silikose.
in: Umwelthygiene, Jahresbericht 1993/94, Herausg.: Gesellschaft zur Förderung der Lufthygiene und Silikoseforschung e.V., Düsseldorf, *26*, 190-211.
- Gulyas, H., Labedzka, M., Schmidt, N. and Gercken, G., 1988**
Effects of Quartz, Airborne Particulates and Fly Ash Fractions From a Waste Incinerator on Elastase Release by Activated and Nonactivated Rabbit Alveolar Macrophages.
Archives of Environmental Health, *43*, 28-33.
- Hanks, J.H. and Wallace, J.H., 1958**
Determination of Cell Viability.
Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine, *98*, 156-160.
- Hebard, A.F., 1992**
Superconductivity in Doped Fullerenes.
Physics Today, *45(11)*, 26-32

- Heymann, D., Chibante, L.P.F., Brooks, R.R., Wolbach, W.S. and Smalley, R.E., 1994**
Fullerenes in the Cretaceous-Tertiary Boundary Layer.
Science, 265, 645-647.
- Hippeli, S., 1990**
Biochemische Modellreaktionen zur Dieselruß-Toxikologie - Kooperative Effekte mit Sulfit.
Dissertation an der TU München, Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften.
- Hippeli, S.C. und Elstner, E.F., 1989**
Diesel Soot - Catalyzed Production of Reactive Oxygen Species: Cooperative Effects with Bisulfite.
Zeitschrift für Naturforschung, 44, 514-523.
- Holt, P.F., 1982**
Submicron Carbon Dust in the Guinea Pig Lung.
Environmental Research, 28, 434-442.
- Isacchi, A., Caccia, P., Cauet, G., Bertolero, F., Bergonzoni, L., Roletto, F., Ziliotto, R., Garofano, L., Jacob, C., Sarmientos, P., Mazué, G., Carminati, P. and Roncucci, R., 1990**
Human Basic Fibroblast Growth Factor.
Chimicaoggi, 6, 72-74.
- Jakab, G.J. and Hemenway, D.R., 1994**
Concomitant Exposure to Carbon Black Enhances Ozone-Induced Lung Inflammation and Suppression of Alveolar Macrophage Phagocytosis.
Journal of Toxicology and Environmental Health, 41, 221-231.
- Johnston, R.B., 1981**
Secretion of Superoxide Anion.
in: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, Edited by Adams, D.O., Edelson, P.J. and Koren H.S., Academic Press, New York, 489-497.
- Kaw, J.L., Khanna, A.K. and Waseem, M., 1988**
In Vitro Cytotoxic and Hemolytical Potential of Coal Fly Ash.
Journal of Environmental Sciences and Health, A23(7), 711-723.
- Keston, A.S. and Brandt, R., 1965**
The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide.
Analytical Biochemistry, 11, 1-10.
- Kikuchi, K., Kobayashi, K., Sueki, K., Suzuki, S., Nakahara, H., Achiba, Y., Tomura, K. and Katada, M., 1994**
Encapsulation of Radioactive Gd-159 and Tb-161 Atoms in Fullerene Cages.
Journal of the American Chemical Society, 116, 9775-9776.
- Kinnula, V.L., Yankaskas, J.R., Virtanen, I., Linnala, A., Kang, B.H. and Crapo, J.D., 1994**
Primary and Immortalized (BEAS 2B) Human Bronchial Epithelial Cells Have Significant Antioxidative Capacity *in vitro*.
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 11, 568-576.
- Krätschmer, W., Lamb, L.D., Fostiropoulos, K. and Huffman, D.R., 1990.**
Solid C₆₀: A New Form of Carbon.
Nature, 318, 354-358.

Kroto, H., 1994

The First Predictions in the Buckminsterfullerene Crystal Ball.
Fullerene Science & Technology, 2(4), 333-342.

Kroto H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F. and Smalley, R.E., 1985

C₆₀: Buckminsterfullerene.
Nature, 318, 162-163.

Kwon, O.J., Au, B.T., Collins, P.D., Adcock, I.M., Mak, J.C., Robbins, R.R., Chung, K.F. and Barnes, P.J., 1994

Tumor Necrosis Factor-Induced Interleukin-8 Expression in Cultured Human Alveolar Epithelial Cells.
American Journal of Physiology (Lung Cellular and Molecular Physiology 11), 267, L398-L405.

Lind, I., 1994

Untersuchungen der Wirkungen von NO₂ auf Immunfunktionen von Rinderalveolarmakrophagen in einem realitätsnahen *in vitro*-System.
Kernforschungszentrum Karlsruhe Bericht, KfK 5248 B.

Martinet, Y., Rom, W.N., Grotendorst, G.R., Martin, G.R. and Crystal, R.G., 1987

Exaggerated Spontaneous Release of Platelet-Derived Growth Factor by Alveolar Macrophages from Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis.
The New England Journal of Medicine, 317, 202-209.

Matejka, M., 1992

Einfluß von Lanthan und Cer auf die Freisetzung des Tumornekrosefaktors durch Makrophagen.
Universität Karlsruhe, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften.

Matsushima, K., Morishita, T., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H., Leonard, E.J. and Oppenheim, J.J., 1988

Molecular Cloning of a Human Monocyte-Derived Neutrophil Chemotactic Factor (MDNCF) and Induction of MDNCF mRNA by Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor.
The Journal of Experimental Medicine, 167, 1883-1893.

McClellan, R.O., 1987

Health-Effects of Exposure to Diesel Exhaust Particles.
Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology, 27, 279-300.

Meager, A. and Gaines Das, R.E., 1994

International Collaborative Study of the Candidate International Standards for Human Tumor Necrosis Factor Alpha (hTNF- α) and Beta (hTNF- β) and for Murine Tumor Necrosis Factor alpha (mTNF- α).
Journal of Immunological Methods, 170, 1-13.

Mornex, J.-F., Martinet, Y., Yamauchi, K., Bitterman, P.B., Grotendorst, G.R., Chytil-Weir, A., Martin, G.R. and Crystal, R.G., 1986

Spontaneous Expression of the c-sis Gene and Release of a Platelet-Derived Growth Factor Like Molecule by Human Alveolar Macrophages.
The Journal of Clinical Investigation, 78, 61-66.

Mosbach, M.M., 1994

In vitro-Untersuchungen zum Einfluß von Ozon auf Immunfunktionen von Alveolarmakrophagen.
Kernforschungszentrum Karlsruhe Report, KfK 5443 B.

- Mossman, B.T., Marsh, J.P. and Shatos, M.A.**, 1986
Alteration of Superoxide Dismutase Activity in Tracheal Epithelial Cells by Asbestos and Inhibition of Cytotoxicity by Antioxidants.
Laboratory Investigation, *54*(2), 204-212.
- Moussa, F., Chretien, P., Dubois, P., Chuniaud, L., Dessante, M., Trivin, F., Sizaret, P.-Y., Agafonov, V., Céolin, R., Szwarc, H., Greugny, V., Fabre, C. and Rassat, A.**, 1995
The Influence of C₆₀ Powders on Cultured Human Leukocytes.
Fullerene Science & Technology, *3*(3), 333-342.
- Mumford, J.L., He, X.Z., Chapman, R.S., Cao, S.R., Harris, D.B., Li, X.M., Xian, Y.L., Jiang, W.Z., Xu, C.W., Chuang, J.C., Wilson, W.E. and Cooke, M.**, 1987
Lung Cancer and Indoor Air Pollution in Xuan Wei, China.
Science, *235*, 217-220.
- Murrell, G.A.C., Francis, M.J.O. and Bromley, L.**, 1990
Modulation of Fibroblast Proliferation by Oxygen Free Radicals.
Biochemical Journal, *265*, 659-665.
- Muthu, S., Maruthamuthu, P. and Vasudeva Rao, P.R.**, 1993
Fullerenes as Photocatalysts: Studies on Decomposition of Water and Oxalic Acid.
Fullerene Science & Technology, *1*(4), 481-497.
- Nathan, C.F.**, 1987
Secretory Products of Macrophages.
The Journal of Clinical Investigation, *79*, 319-326.
- Nelson, M.A., Domann, F.E., Bowden, G.T., Hooser, S.B., Fernando, Q. and Carter, D.E.**, 1993
Effects of Acute and Subchronic Exposure of Topically Applied Fullerene Extracts on the Mouse Skin.
Toxicology and Industrial Health, *9*(4), 623-630.
- Nikula, K.J., Snipes, M.B., Barr, E.B., Griffith, W.C., Hendersson, R.F. and Mauderly, J.L.**, 1995
Comparative Pulmonary Toxicities and Carcinogenicities of Chronically Inhaled Diesel Exhaust and Carbon Black in F344 Rats.
Fundamental and Applied Toxicology, *25*, 80-94.
- Nolan, R.P. and Langer, A.M.**, 1983
Quartz and Hemolysis: Physicochemical Factors Controlling Membrane Activity.
in: Health Issues Related to Metal and Nonmetallic Mining, Ed. Wagner, W., New York London, 63-81.
- Nolan, R.P., Langer, A.M., Eskenazi, R.A. and Herson, G.B.**, 1987
Membranolytic Activities of Quartz Standards.
Toxicology *in vitro*, *1*(4), 239-245.
- Ohmori, Y., Wyner, L., Narumi, S., Armstrong, D., Stoler, M. and Hamilton, T.A.**, 1993
Tumor Necrosis Factor- α Induces Cell Type and Tissue-Specific Expression of Chemoattractant Cytokines *in vivo*.
American Journal of Pathology, *142*(3), 861-870.
- Orfanopoulos, M. and Kambourakis, S.**, 1995
Chemical Evidence of Singlet Oxygen Production from C₆₀ and C₇₀ in Aqueous and Other Polar Media.
Tetrahedron Letters, *36*(3), 435-438.

Pantazis, P., Sariban, E., Kufe, D. and Antoniades, H.N., 1986

Induction of c-sis Gene Expression and Synthesis of Platelet-Derived Growth Factor in Human Myeloid Leukemia Cells During Monocytic Differentiation.

Proceedings of the National Academie of Science of the United States of America, 83, 6455-6459.

Peterson, T.C., Isbrucker, R.A. and Hooper, M.L., 1994

In vitro Effect of Platelet-Derived Growth Factor on Fibroproliferation and Effect of Cytokine Antagonists.

Immunopharmacology, 28, 259-270.

Pevery, P., Walz, A., DeWald, B. and Baggiolini, M., 1988

A Novel Neutrophil-Activating Factor Produced by Human Mononuclear Phagocytes.

The Journal of Experimental Medicine, 167, 1547-1549.

Pézerat, H., 1994

Role of Transition Metal Compounds in the Capacity of Dust to Generate Electrophilic Spieces.

in: NATO ASI Series, Vol. H85, Eds.: Davis, J.M.G. and Jaurand, M.-C., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 359-367.

Pick, E. and Keisari, Y., 1980

A Simple Colorimetric Method for the Measurement of Hydrogen Peroxide Produced by Cells in Culture.

Journal of Immunological Methods, 38, 161-171.

Piguet, P.F., Collart, M.A., Grau, G.E., Sappino, A.-P. and Vassali, P., 1990

Requirement of Tumor Necrosis Factor for Development of Silica-Induced Pulmonary Fibrosis.

Nature, 344, 245-247.

Polzer, G., 1992

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe Report, KfK 5097 B.

Postlethwaite, A.E. and Seyer, J.M., 1990

Stimulation of Fibroblast Chemotaxis by Human Recombinant Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) and a Synthetic TNF- α 31-68 Peptide.

The Journal of Experimental Medicine, 172, 1749-1756.

Reddel, R.R., de Silva, R., Duncan, E.L., Rogan, E.M., Whitaker, N.J., Zahra, D.G., Ke, Y., McMenamin, M.G., Gerwin, B.I. and Harris, C.C., 1995

SV40-Induced Immortalization and ras-Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells.

International Journal of Cancer, 61, 199-205.

Rivin, D., 1993

Health Effects of Carbon Black.

in: Carbon Black: Science and Technology, 2nd Ed., New York, 423-430.

Rosenkranz, A.R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K.M., Chen, W., Knapp, W. and Zlabinger, G.J., 1992

A Microplate Assay for the Detection of Oxidative Products Using 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetate.

Journal of Immunological Methods, 156, 39-45.

Ross, M.M., Chedekel, M.R., Risby, T.H., Lestz, S.S. and Yasbin, R.E., 1982

Electron Paramagnetic Resonance Spectrometry of Diesel Particulate Matter.

Environment International, 7, 325-329.

Ross, R., Raines, E.W. and Bowen-Pope, D.F., 1986

The Biology of Platelet-Derived Growth Factor.
Cell, 46, 155-169.

Rossi, P., Chini, L., Fattorossi, A., Gidlund, M., Galli, E., Laan, K., Jondal, M. and Wigzell, H., 1987

1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Phorbol Esters (TPA) May Induce Select *in vitro* Differentiation Pathways in the HL-60 Promyelocytic Cell Line.
Clinical Immunology and Immunopathology, 44, 308-316.

Ruff, M.R. and Gifford, G.E., 1981

Tumor Necrosis Factor.
in: Lymphokines, Ed.: Pick, E., Academic press, N.Y., 235-272.

Ryan, L.K., Jin, R., Boggs, S.S., Karol, M.H. and Day, B.W., 1994

Mouse Model for Assessing Endotoxin Involvement in the Lung Inflammation and Cytokine Production Resulting from Inhaled Organic Dust.
Inhalation Toxicology, 6, 485-499.

Sakai, A., Yamakoshi, Y.N. and Miyata, N., 1995

The Effects of Fullerenes on the Initiation and Promotion Stages of BALB/3T3 Cell Transformation.
Fullerene Science & Technology, 3(4), 377-388.

Schapira, R.M., Osornio-Vargas, A.R. and Brody, A.R., 1991

Inorganic Particles Induce Secretion of a Macrophage Homologue of Platelet-Derived Growth Factor in a Density- and Time-Dependent Manner *in vitro*.
Experimental Lung Research, 17, 1011-1024.

Schimmelpfeng, J., 1989

Zytotoxische Wirkungen von Quarz und Asbest: ein *in vitro* Interspeziesvergleich mit Alveolarmakrophagen.
Kernforschungszentrum Karlsruhe Bericht, KfK 4624.

Schimmelpfeng, J., Drosselmeyer, E., Hammer, G., Polzer, G. and Seidel, A., 1989

Effects of Native and Phospholipid Treated Quartz on Bovine and Rat Alveolar Macrophages.
Journal of Aerosol Medicine, 2(1), 39-47.

Schimmelpfeng, J., Drosselmeyer, E., Hofheinz, V. and Seidel, A., 1992

Influence of Surfactant Components and Exposure Geometry on the Effects of Quartz and Asbestos on Alveolar Macrophages.
Environmental Health Perspectives, 97, 225-231.

Schlüter, T., Berg, I., Dörger, M. and Gercken, G., 1995

Effect of Heavy Metal Ions on the Release of Reactive Oxygen Intermediates by Bovine Alveolar Macrophages.
Toxicology, 98, 47-55.

Schmidt, A.M., 1992

Die Wirkung von Quarz auf die Lysosomen und die "Tumor-Nekrose-Faktor"-Produktion von Alveolarmakrophagen.
Kernforschungszentrum Karlsruhe Report, KfK 5098 B.

Seemayer, N.H., 1985

Importance of the Grain Size and Mineral Content of Coal Mine Dusts for Cytotoxicity on Macrophages *in vitro*.
in: NATO ASI Series, Vol. G3, Eds. Beck, E.G and Bignon, J., Springer Verlag Berlin Heidelberg, 497-504.

Seppä, H., Grotendorst, G., Seppä, S., Schiffmann, E. and Martin, G.R., 1982

Platelet-Derived Growth Factor is Chemotactic for Fibroblasts.
The Journal of Cell Biology, 92, 584-588.

Sherry, B. and Cerami, A., 1988

Cachectin/Tumor Necrosis Factor Exerts Endocrine, Paracrine and Autocrine Control of Inflammatory Responses.
The Journal of Cell Biology, 107, 1269-1277.

Shimokado, K., Raines, E.W., Madtes, D.K., Barrett, T.B., Benditt, E.P. and Ross, R., 1985

A Significant Part of Macrophage-Derived Growth Factor Consists of at Least Two Forms of PDGF.
Cell, 43, 277-286

Sijbesma, R., Srdanov, G., Wudl, F., Castoro, J.A., Wilkins, C., Friedman, S.H., DeCamp, D.L. and Kenyon, G.L., 1993

Synthesis of a Fullerene Derivate for the Inhibition of HIV Enzymes.
Journal of the American Chemical Society, 115, 6510-6512.

Smart, S.J. and Casale, T.B., 1994

TNF- α -induced Transendothelial Neutrophil Migration is IL-8 Dependent.
American Journal of Physiology (Lung Cellular and Molecular Physiology 10), 266, L238-L245.

Steinemann, S., Ulevitch, R.J. and Mackman, N., 1994

Role of the Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein/CD14 Pathway in LPS Induction of Tissue Factor Expression in Monocytic Cells.
Arteriosclerosis and Thrombosis, 14(7), 1202-1209.

Stohs, S.J. and Bagchi, D., 1995

Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions.
Free Radical Biology and Medicine, 18(2), 321-336.

Strieter, R.M, Koch, A.E., Antony, V.B., Fick, R.B., Standiford, T.J. and Kunkel, S.L., 1994

The Immunopathology of Chemotactic Cytokines: The Role of Interleukin-8 and Monocyte Chemoattractant Protein-1.
Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 123, 183-197.

Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino Jr., M.A. and Shepard, H.M., 1985

Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α : Effects on Proliferation of Normal and Transformed Cells *in vitro*.
Science, 230, 943-945.

Tanigaki, K., Ebbesen, T.W., Saito, S., Mizuki, J., Tsai, J.S., Kubo, Y. and Kuroshima, S., 1991

Superconductivity at 33K in $Cs_xRb_yC_{60}$.
Nature, 352, 222-223

Thomas, E.D., Ramberg, R.E. and Sale, G.E., 1976

Direct Evidence for a Bone Marrow Origin of the Alveolar Macrophage in Man.
Science, 192, 1016-1018.

Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J., 1993

Lipopolysaccharide Binding Protein and CD14 in LPS Dependent Macrophage Activation.
Immunobiology, 187, 227-232.

- Tokuyama, H., Yamago, S. and Nakamura, E., 1993**
Photoinduced Biochemical Activity of Fullerene Carboxylic Acid.
Journal of the American Chemical Society, *115*, 7918-7919.
- Toniolo, C., Bianco, A., Maggini, M., Scorrano, G., Prato, M., Marastoni, M., Tomatis, R., Spisani, S., Palú, G. and Blair, E.D., 1994**
A Bioactive Fullerene Peptide.
Journal of Medical Chemistry, *37*, 4558-4562.
- Tracey, K.J. and Cerami, A., 1993**
Tumor Necrosis Factor, Other Cytokines and Disease.
Annual Review of Cell Biology, *9*, 317-343.
- Tracey, K.J. and Cerami, A., 1994**
Tumor Necrosis Factor: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target.
Annual Review of Medicine, *45*, 491-503.
- Tsuchida, H., Takeda, Y., Takei, H., Shinzawa, H., Takahashi, T. and Sendo, F., 1995**
In vivo Regulation of Rat Neutrophil Apoptosis Occuring Spontaneously or Induced with TNF- α or Cycloheximide.
The Journal of Immunology, *154*, 2403-2412.
- Tsuchiya, T., Yamakoshi Y.N. and Miyata, N., 1995**
A Novel Action of Fullerene C₆₀ on the Chondrogenesis in Rat Limb Bud Cell Culture System
Biochemical and Biophysical Research Communications, *206(3)*, 885-894.
- Vallyathan, V., 1994**
Generation of Oxygen Radicals by Minerals and Its Correlation to Cytotoxicity.
Environmental Health Perspectives, *102(Suppl. 10)*, 111-115.
- Vanhee, D., Gosset, P., Wallaert, B., Voisin, C. and Tonnel, A.B., 1994**
Mechanisms of Fibrosis in Coal Workers' Pneumoconiosis: Increased Production of Platelet-Derived Growth Factor, Insulin-Like Growth Factor Type I and Transforming Growth Factor β and Relationship to Disease Severity.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, *150(4)*, 1049-1055.
- Vilcek, J., Palombella, V.J., Henriksen-DeStefano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hirai, M. and Tsujimoto, M., 1986**
Fibroblast Growth Enhancing Activity of Tumor Necrosis Factor and Its Relationship to Other Polypeptide Growth Factors.
The Journal of Experimental Medicine, *163*, 632-643.
- Vogl, G. and Elstner, E.F., 1989**
Diesel Soot Particles Catalyze the Production of Oxy-Radicals.
Toxicology Letters, *47(1)*, 17-23.
- Wallace, W.E., Keane, M.J., Hill, C.A., Xu, J. and Ong, T., 1987**
Mutagenicity of Diesel Exhaust Particles and Oil Shale Particles Dispersed in Lecithin Surfactant.
Journal of Toxicology and Environmental Health, *21*, 163-171.
- Wan, C.P., Myung, E. and Lau, B.H.S., 1993**
An Automated Micro-Fluorimetric Assay for Monitoring Oxidative Burst Activity of Phagocytes.
Journal of Immunological Methods, *159*, 131-138.

Wan, H., Williams, R., Doherty, P. and Williams, D.F., 1994

A Study of the Reproducibility of the MTT Test
Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 5, 154-159

Ward, P.A., Till, G.O., Kunkel, R. and Beauchamp, C., 1983

Evidence for Role of Hydroxyl Radical in Complement and Neutrophil-Dependent Tissue Injury.
The Journal of Clinical Investigation, 72, 789-801.

Watanabe, K., Iida, M., Takaishi, K., Suzuki, T., Hamada, Y., Iizuka, Y. and Tsurufuji, S., 1993

Chemoattractants for Neutrophils in Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Exudate from Rats are not Interleukin-8 Counterparts but gro-Gene-Product/Melanoma-Growth-Activity-Related Factors.
European Journal of Biochemistry, 214, 267-270.

Werner, H., Wohlers, M., Bublak, D., Blöcker, J. and Schlögl, R., 1993b

Interaction of Molecular Oxygen with Solid C₆₀.
Fullerene Science & Technology, 1(4), 457-57.

Werner, H., Wohlers, M., Herein, D., Bublak, D., Blöcker, J. Schlögl, R. and Reller, A., 1993a

Fullerene Black - Soot or Something New?
Fullerene Science & Technology, 1(2), 199-219.

Wiessner, J.H., Henderson, J.D.Jr., Sohnle, P.G., Mandel, N.S. and Mandel, G.S., 1988

The Effect of Crystal Structure on Mouse Lung Inflammation and Fibrosis.
American Review of Respiratory Diseases, 138, 445-450.

Wilczek, W., 1991

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

Witmer-Pack, M.D., Crowley, M.T., Inaba, K. and Steinman, R.M., 1993

Macrophages, but not Dendritic Cells, Accumulate Colloidal Carbon Following Administration *in situ*.
Journal of Cell Science, 105, 965-973.

Wizemann, T.M. and Laskin, D.L., 1994

Enhanced Phagocytosis, Chemotaxis, and Production of Reactive Oxygen Intermediates by Interstitial Lung Macrophages Following Acute Endotoxemia.
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 11, 358-365.

Wolf, G., Aberle, S., Thaiss, F., Nelson, P., Krensky, A.M., Neilson, E.G. and Stahl, R.A.K., 1993

TNF α Induces Expression of the Chemoattractant Cytokine RANTES in Cultured Mouse Mesangial Cells.
Kidney International, 44, 795-804.

Wymann, M.P., von Tscherner, V., Deranleau, D.A., Baggiolini, M., 1987

The Onset of the Respiratory Burst in Human Neutrophils. Real-time Studies on H₂O₂ Formation Reveal a Rapid Agonist-induced Transduction Process.
The Journal of Biological Chemistry, 262, 12048-12053.

Yamaya, M., Sekizawa, K., Masuda, T., Morikawa, M., Sawai, T. and Sasaki, H., 1995

Oxidants Affect Permeability and Repair of the Cultured Human Tracheal Epithelium.
American Journal of Physiology (Lung Cellular and Molecular Physiology 12), 268, L284-L293.

Youngman, R.J., Wagner, G.R., Kühne, F.W. and Elstner, E.F., 1985

Biochemical Oxygen Activation as the Basis for the Physiological Action of Tetrachlorodecaoxide (TCDO).
Zeitschrift für Naturforschung, *40c*, 409-414.

Zay, K., Devine, D. and Churg, A., 1995

Quartz Inactivates α 1-Antiprotease: Possible Role in Mineral Dust-Induced Emphysema.
Journal of Applied Physiology, *78(1)*, 53-58.

7. Bezugsquellen für Reagenzien, sonstiges Labormaterial und Laborgeräte**Reagenzien:**

α -Keto-S-Methyl-Buttersäure	Sigma
1 , α -25-Dihydroxy-Vitamin D ₃	La Roche
2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat	Molecular Probe
	MoBiTec
(3-[4,5-Dimethyl-2thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)	Serva
4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamid	Sigma
5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)	Sigma
Actinomycin-D	Sigma
Araldite-Beschleuniger	Serva
Araldite-Härter	Serva
Araldite CY 206	Serva
Argon	Messer-Griesheim
B leinitrat	Merck
C ₆₀ , sh. Fulleren C ₆₀	
Calcium, p.A.	Merck
Calciumchlorid, anhydr.	Merck
CO ₂ , sh. Kohlendioxid	
Crocin	Universität Freising- Weihenstephan, Lehrstuhl für Phytopathologie, Frau Dr. S. Hippeli
Calcitriol, sh. 1, α -25-Dihydroxy-Vitamin D ₃	
Cytochrom C	Sigma
DQ12, sh. Quarz DQ12	
D TNB, sh. 5,5 α -Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)	
E LISA (TNF- α , IL-8, PDGF-AB und bFGF)	Bierman/R&D Systems
Epon	Serva
Ethanol, p.A.	Merck
Ethen, für Gaschromatographie	Messer-Griesheim
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	Merck
F KS, sh. Fötale Kälberserum	
Ficoll-Paque	Pharmacia
Fötale Kälberserum	Gibco, BioWhittaker
Fulleren C ₆₀ , 99,9999% (Gold Grade, sublimiert)	Hoechst
Fulleren-Rohruß	Hoechst
G lukose	Merck
l-Glutamin (200 mM-Lösung)	Sigma
Glutaraldehyd	Serva
Glutathion, oxidierte Form, Grade III	Sigma
Glutathion-Reduktase	Sigma

Graphit, 99,9999%	HighTech Carbon
H ₂ DCF-DA, sh. 2',7'-Dichlorofluorescin-Diacetat	
HBSS	Sigma
HCl, sh. Salzsäure	
Hemacolor-Färbelösungen	Merck
Heparin, sh. Liquemin	
HEPES, sh. N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	
K aliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Merck
Kaliumhydrogenphosphat, K ₂ HPO ₄	Merck
Katalase	Sigma
außer: KMB/Crocin-Versuche	Boehringer Mannheim
KGM-Fertigmedium	BREFF
KH ₂ PO ₄ , sh. Kaliumdihydrogenphosphat	
KMB, sh. α-Keto-S-Methylbuttersäure	
Kohlendioxid	Messer-Griesheim
K ₂ HPO ₄ , sh. Kaliumhydrogenphosphat	
L atex-Partikel (Latex-Milch)	Sigma
LDH-Test ("LDH Optimized")	Sigma
Lipopolysaccharid <i>Salmonella abortus equi</i>	Sigma
Liquemin	La Roche
LPS, sh. Lipopolysaccharide	
MEM 100x (Non Essential Aminoacids)	GIBCO
Milchsäure	Merck
MTT, sh. (3-[4,5-Dimethyl-2thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)	
N ₂ , sh. Stickstoff	
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	Sigma
NaCl, sh. Natriumchlorid	
NaHCO ₃ , sh. Natriumhydrogencarbonat	
Na ₂ CO ₃ , sh Natriumcarbonat	
Na ₂ EDTA, sh. Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	
NADPH	Sigma
Natriumcacodylat	Serva
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid, p.A.	Merck
Natriumcitrat x 5.5 H ₂ O	Merck
Natriumcitrat x 2 H ₂ O	Merck
Natriumdiethylbarbitursäure	Balzer Union
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumlaktat	Merck
Natriumpyruvat (100 mM-Lösung)	Sigma
P/S , sh. Penicillin/Streptomycin	
PBS	Sigma

10 000 U Penicillin ml ⁻¹ , 10 mg ml ⁻¹ Streptomycin in 0,95 % NaCl PET-Lösung Phenolrot	Sigma, GIBCO BREFF Sigma
Osmiumtetroxid	Serva, Roth
Quarz DQ12	Prof. Dr. Seemayer
Rohruß , sh. Fulleren-Rohruß RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institut) RPMI 1640, ohne Phenolrot	GIBCO Sigma
Salzsäure, p.A.	Merck
SDS, sh. Natriumdodecylsulfat SBIT, sh. Soy Bean Trypsin Inhibitor SOD, sh. Superoxid-Dismutase Soy Bean Trypsin Inhibitor Stickstoff Sucrose Superoxid-Dismutase	Sigma Messer-Griesheim Serva Sigma
TNF-α , sh. Tumor-Nekrose-Faktor- α Triton X-100 Trypanblau Trypsin Tumor-Nekrose-Faktor- α , human-rekombinant	Serva Sigma Sigma Boehringer Mannheim
Uranylacetat	Fluka
Veronal , sh. Natriumdiethylbarbitursäure	
Xanthin Xanthin-Oxidase	Sigma Sigma
Zymosan , von <i>Saccharomyces cerevisisae</i>	Sigma
sonstiges Labormaterial:	
6-Well-Makroplatten, ebener Boden 24-Well-Midiplatten, ebener Boden 96-Well-Mikrotiterplatten, ebener Boden	Greiner Falcon "Primaria" Falcon "Primaria" und Nunc "Nuculon"
Zentrifugen-Röhrchen "Bluecap", alle Volumina Zentrifugen-Röhrchen "Eppendorf" Zellkulturflaschen, alle Volumina Transwell-Kultursysteme	Greiner Bender + Hobein Greiner Costar
Insulinspritzen Microfine III Einwegtransferpipetten, steril 8-Kanal-Multipipetten Steril-Filter	Plastipac Renner Micronic (Integra) Millipore

Steril-Filter	Millipore
½-Mikroküvetten	Ratiolab
Makroküvetten	Ratiolab
Gaze, 150 µm Maschenweite, nybold Polyamid mono PA-103/39	Schweizerische Seidengazefabrik
Polycarbonatmembran, für Chemotaxis mit RAM, 5 µm Porenweite, NMF-5, PVP frei, 25 x 80 mm	Nuclepore
Polycarbonatmembran, für Chemotaxis mit Granulozyten, 3 µm Porenweite, NMF-5, PVP frei, 25 x 80 mm	Nuclepore
Verbandsmull, 8-fach gelegt, VM 20 DIN 61 630, Bw.Ph.Eur.	Michalik
Flachformen, für EM-Einbettung	Balzer Union

Laborgeräte

Brutschrank	Heraeus
ELISA-Plattenwäscher	SLT
ELISA-Reader	Molekular Devices
Fluoreszenz-Meßgerät	Millipore
Gaschromatograph	Varian
Laborwaagen	Sartorius
Laserdensitometer	LKB
Lumineszenzphotometer	Perkin Elmer
Mikroskope	Leitz
Mikroskop-Kamera und Belichtungseinrichtung	Wild
Mikrotom	Sorval
pH-Meter	Knick
Peristaltikpumpe	Millipore
Raster-Elektronenmikroskop	CAM SAN CS44
Spektrophotometer	Beckmann, UVIKON
Transmissions-Elektronenmikroskop	Siemens, Zeiss
Wasserentsalzungsanlage	Millipore

Software:

Datenbank	Paradox 3.5D
	Paradox für Windows
Graphik	Corel Draw 5.1D
Statistik und Datenpräsentation	Origin 3.50E
Tabellenkalkulationen	Excel 4.0D,
	Quattro Pro 5.0D
Textverarbeitung	Word für Windows 2.0D (rev.B)
	Describe 4.0D
	WordStar 6.0D

8. Abbildungen

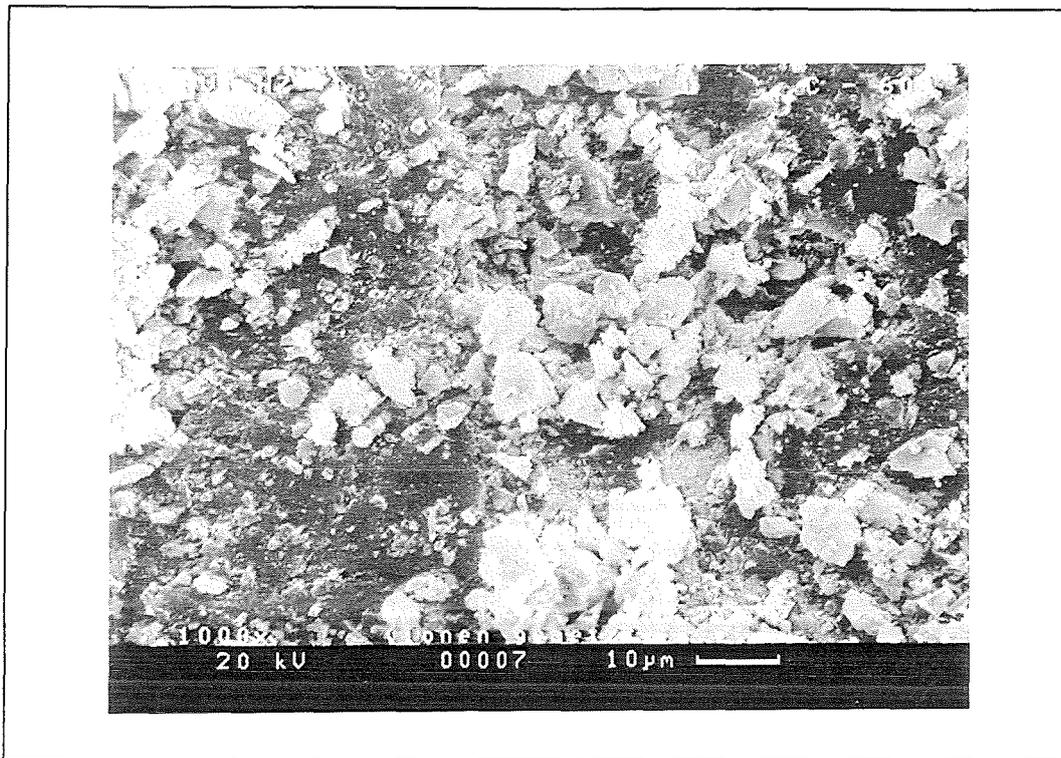


Abb. 2: C₆₀-Partikel

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Partikel nach dem Zerreiben im Achat-Mörser.

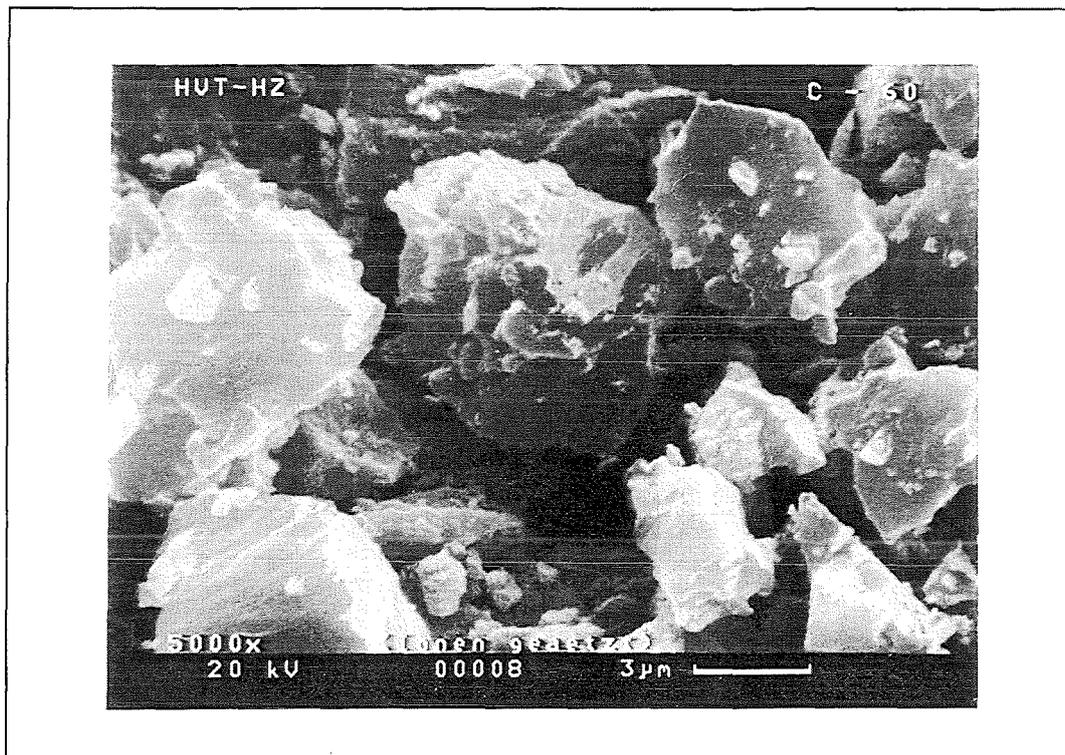


Abb. 3: C₆₀-Partikel

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Partikel nach dem Zerreiben im Achat-Mörser. Auffällig sind die glatten Oberflächen der Partikel.

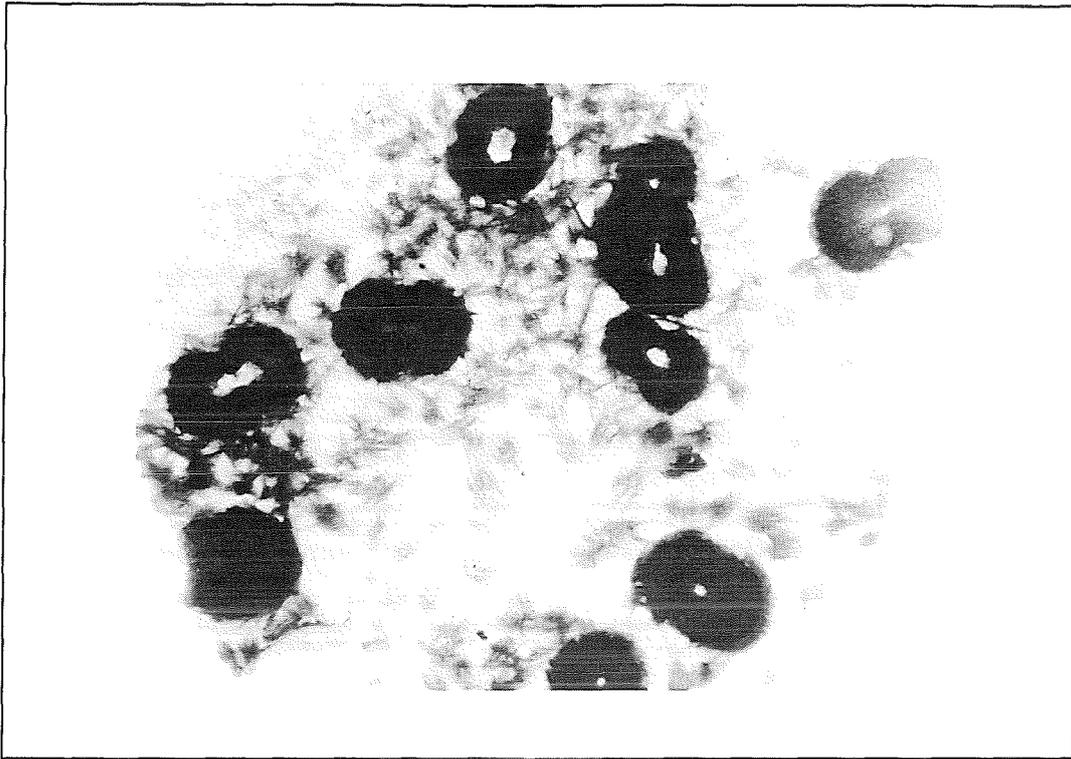


Abb. 4: C₆₀-Partikel

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Partikel nach Suspendierung und Inkubation in Medium.

Vergrößerung 5 500 x, Partikeldurchmesser ca. 3,7 μm . Präparation durch Frau Kampmann, FZK/ITOX.

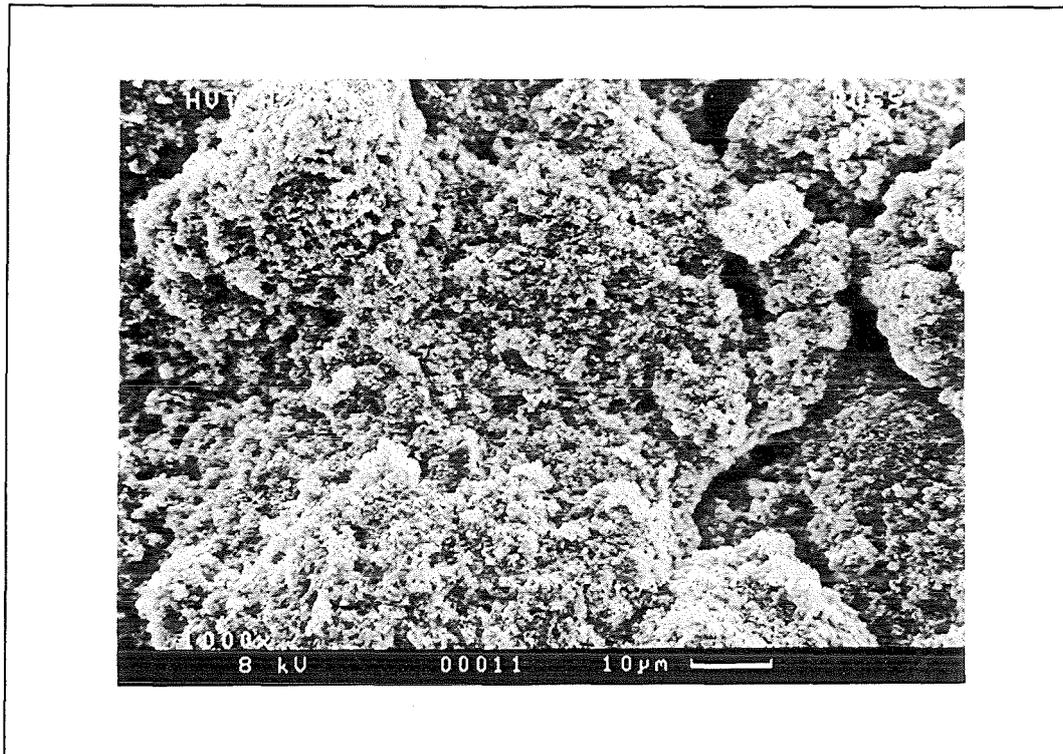


Abb. 5: Rohruß-Partikel

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Fulleren-Rohruß.

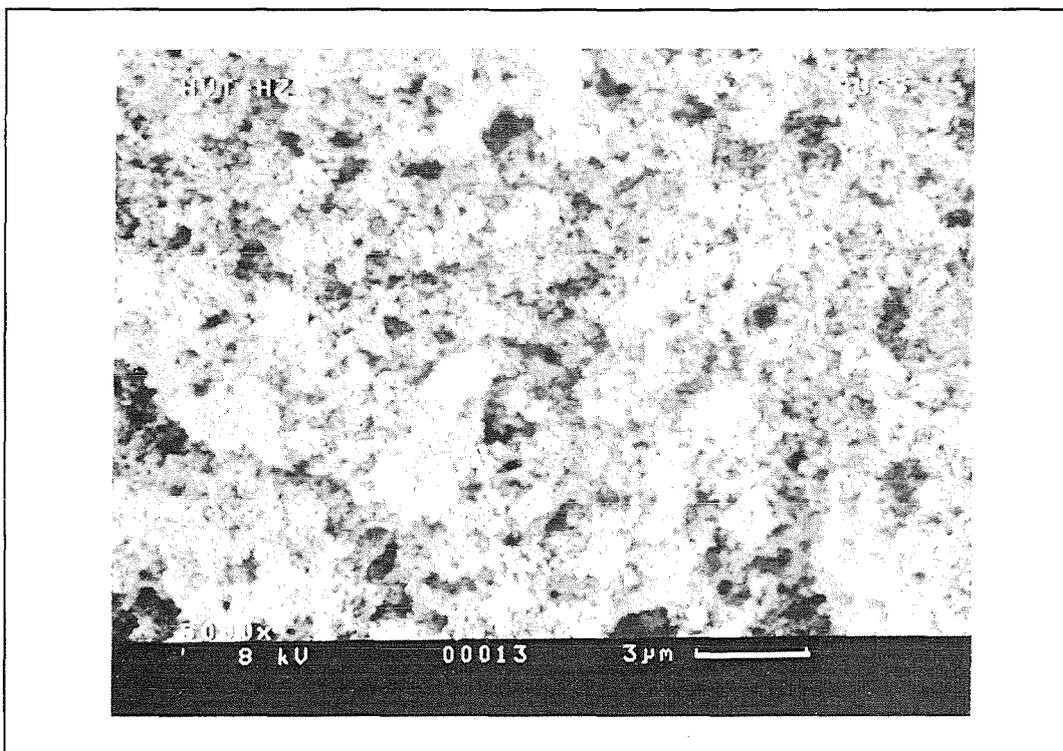
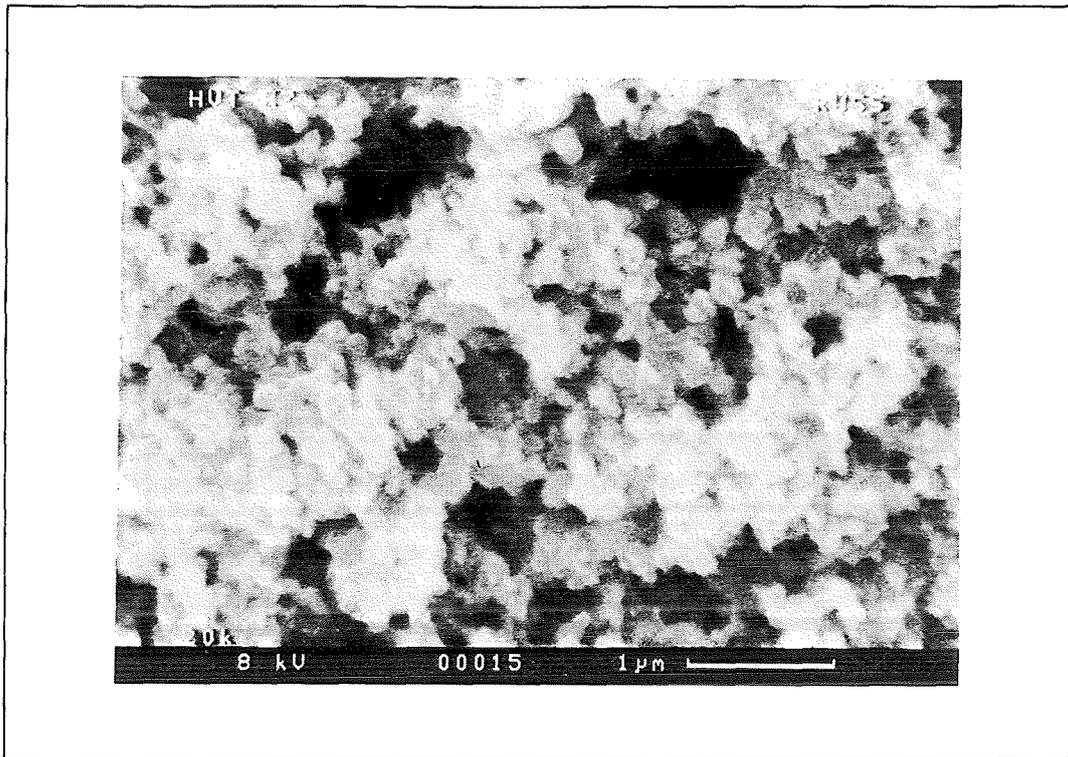


Abb. 6: Rohruß-Partikel

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Fulleren-Rohruß. Die Oberfläche des Materials ist extrem rauh (vgl. Abb. 3).

**Abb. 7: Rohruß-Partikel**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Fulleren-Rohruß. Der Aufbau des Konglomerates aus kleineren Partikeln (50 - 200 nm) ist deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 5 und Kapitel 2.1.1.2).

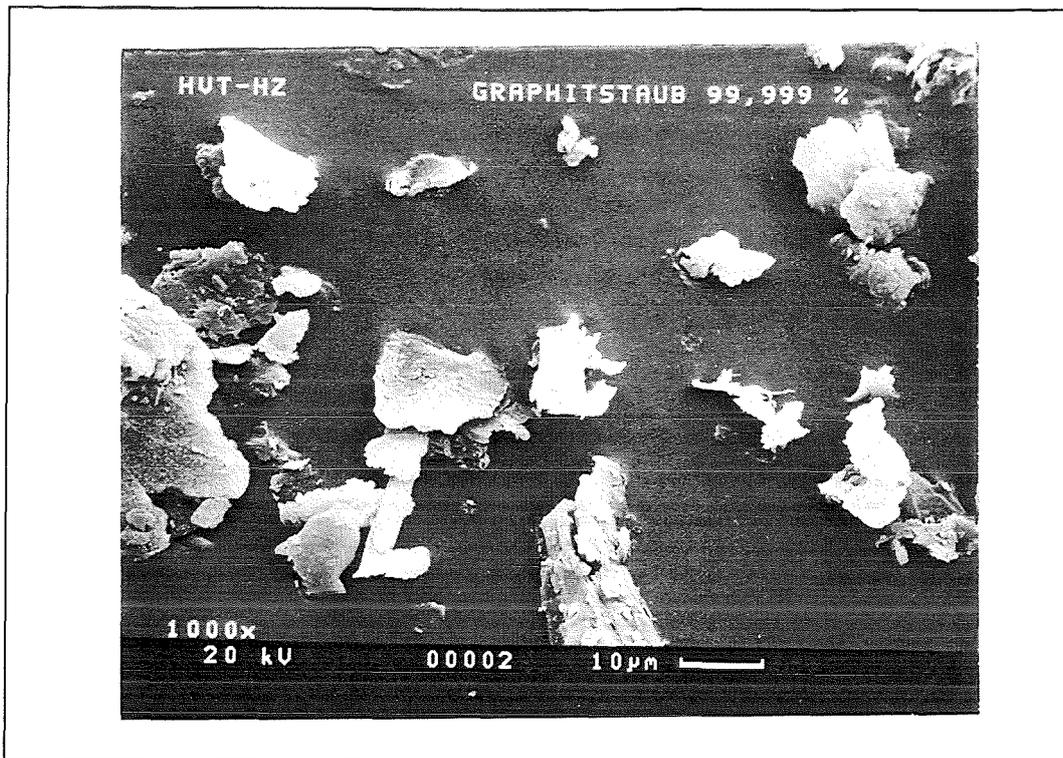


Abb. 8: Graphit-Partikel

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Graphit.

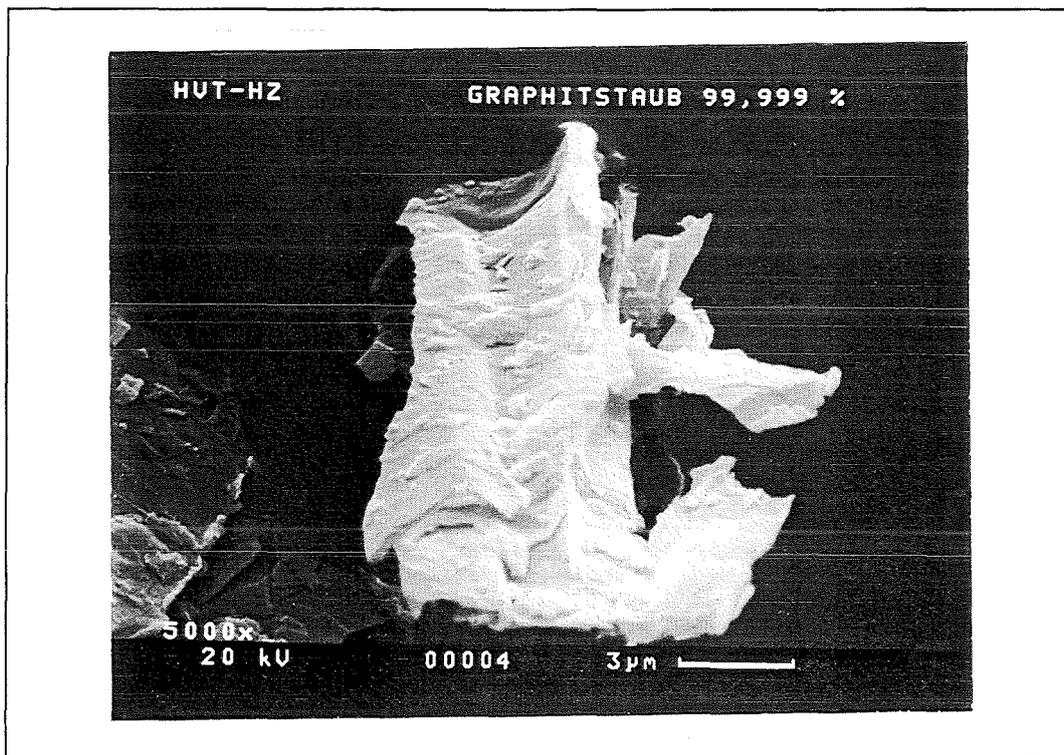


Abb. 9: Graphit-Partikel

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Graphit-Partikels. Die Oberfläche des Materials ist relativ glatt, der Partikel aber stark unregelmäßig geformt.

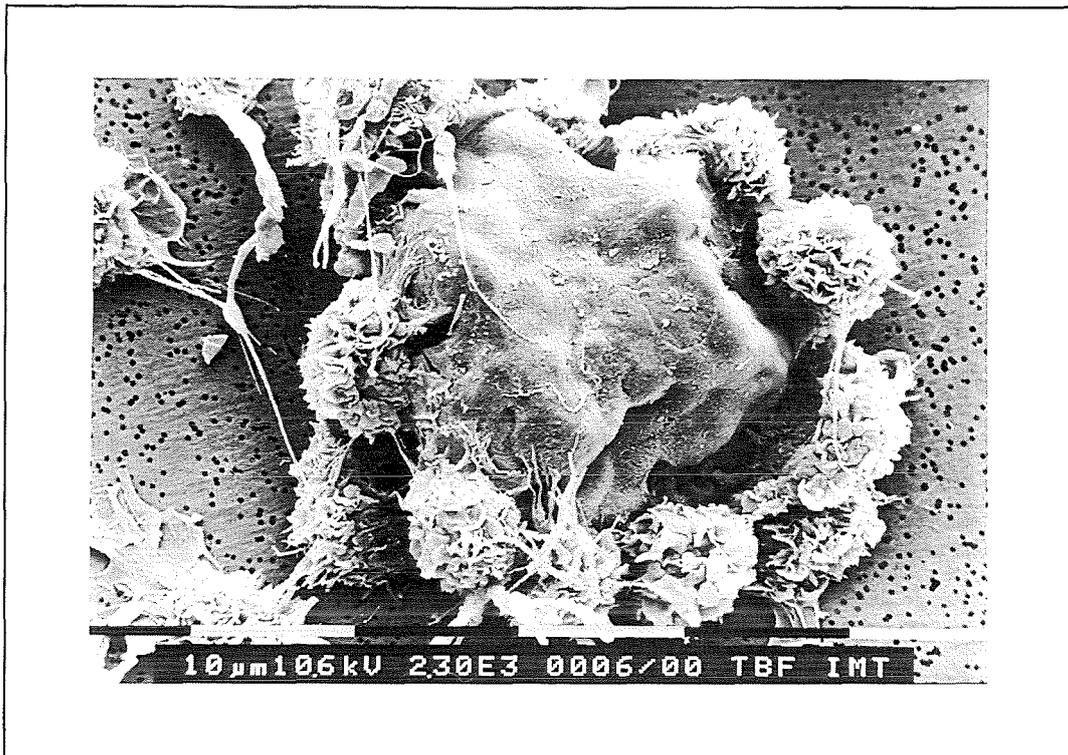


Abb. 10: Fulleren-Konglomerat

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Fulleren-Konglomerates, das von mehreren Rinder-Alveolarmakrophagen umgeben ist.

Aus *Baierl (1992)*



Abb. 11: Schnitt durch einen Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM)

Transmissionselektronenmikroskopisches Bild durch einen RAM, der C_{60} -Partikel phagozytiert hat (dunkle, runde bis ellipsoide Partikel).

Vergrößerung ca. 3 800 x, Durchmesser der Partikel ca. 5 μm .

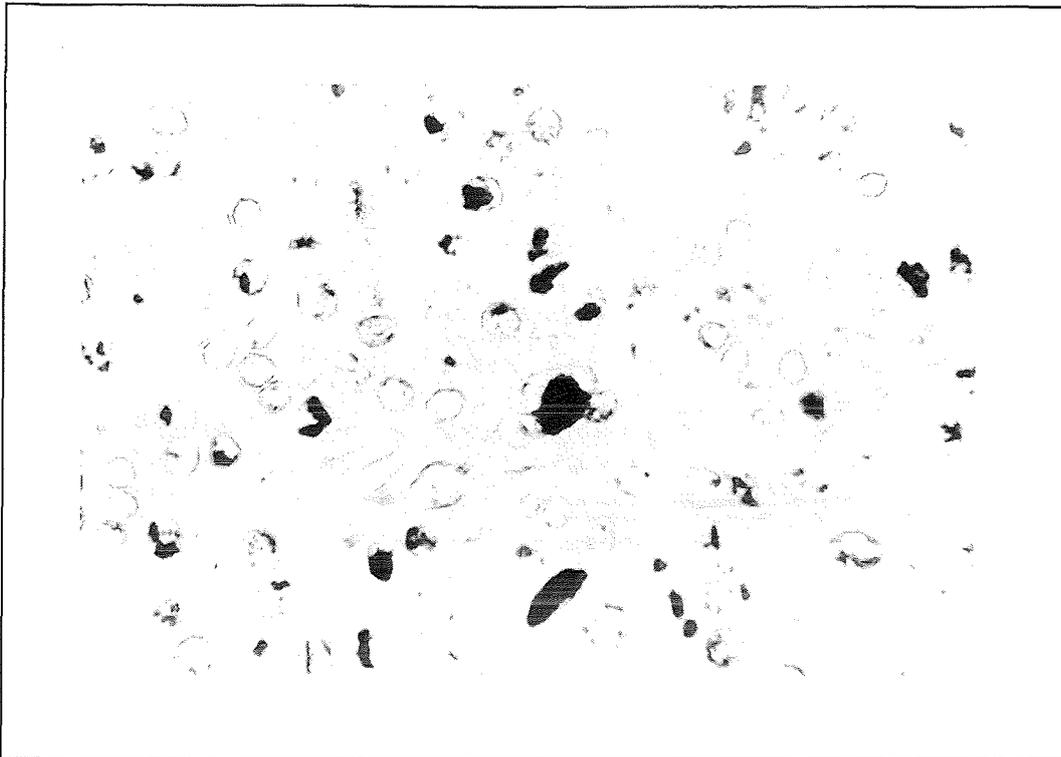


Abb. 12: RAM mit C₆₀

RAM wurden mit C₆₀ 4 h inkubiert. Deutlich sind in den Zellen die phagozytierten C₆₀-Partikel zu erkennen.

Vergrößerung ca. 800 x.

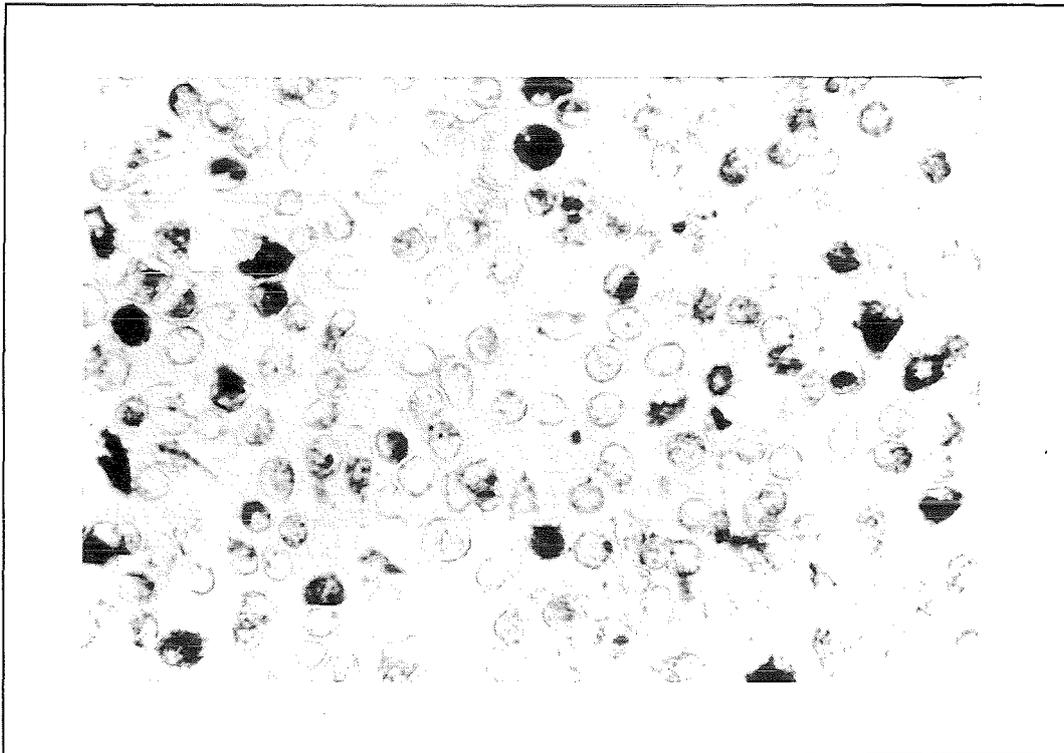
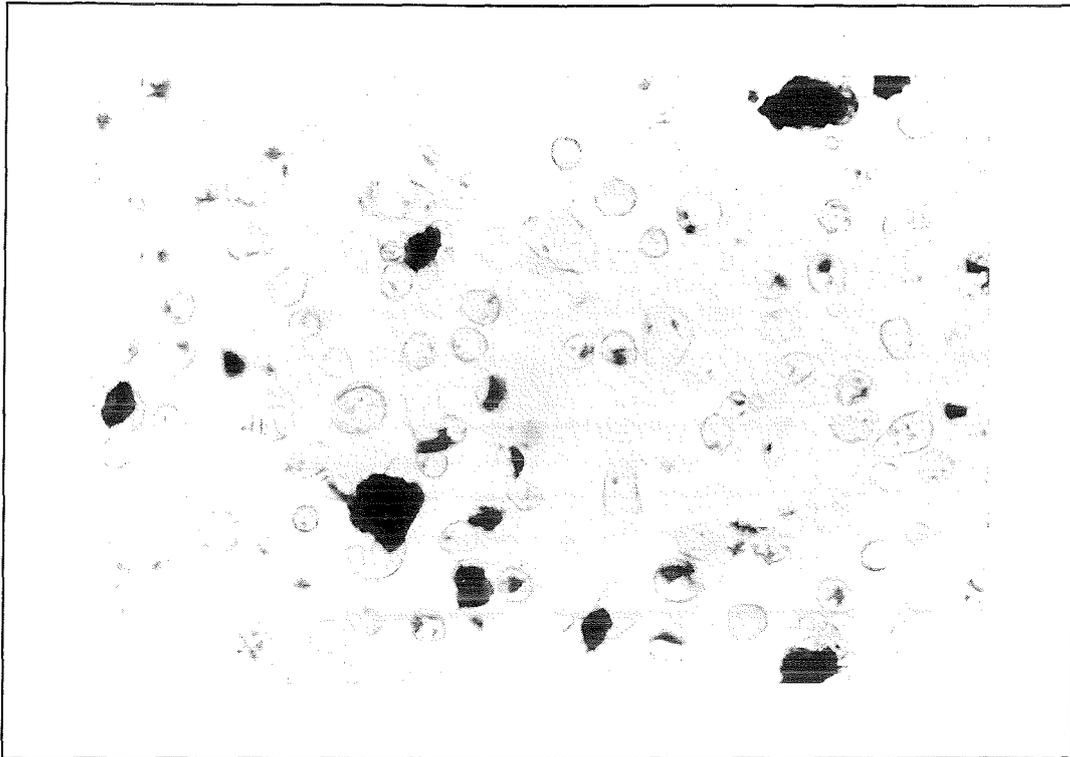


Abb. 13: RAM mit Rohruß

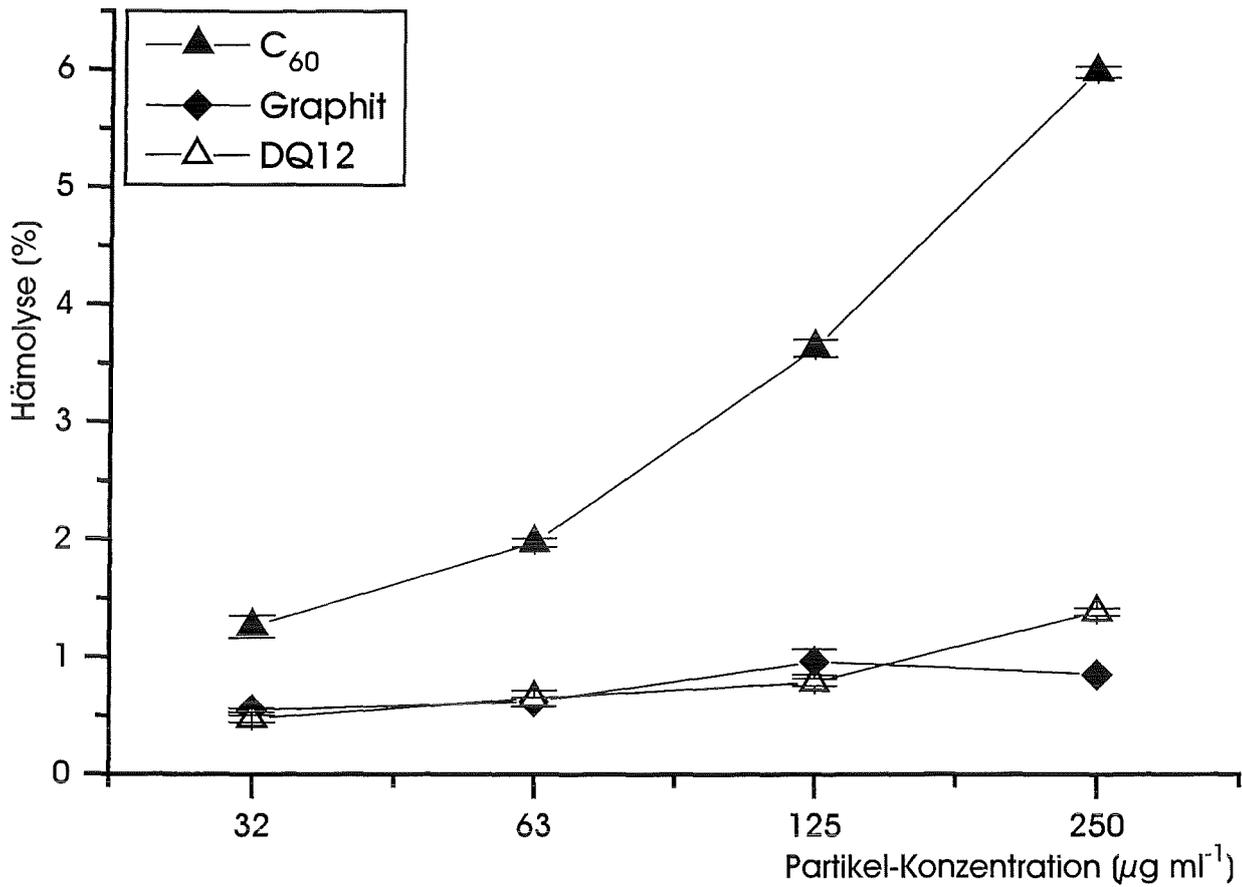
RAM wurden mit Rohruß 4 h inkubiert. Deutlich sind in den Zellen die phagozytierten Rohruß-Partikel zu erkennen. Die Partikel sind kleiner als C₆₀ (Abb. 12).

Vergrößerung ca. 800 x.

**Abb. 14: RAM mit Graphit**

RAM wurden mit Graphit 4 h inkubiert. Deutlich sind in den Zellen einzelne phagozytierte Graphit-Partikel zu erkennen. Die Partikel sind größer als C₆₀ (Abb. 12) und Rohruß (Abb. 13). In der Bildmitte ist ein ca. 12 μm großer Partikel zu erkennen, der von 3 RAM umgeben wird.

Vergrößerung ca. 800 x.

**Abb. 15: Hämolyse von Rinderblut**

Rindererythrozyten in 0,9% NaCl wurden 120 min mit Partikel-Dispersionen inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Erythrozyten und Partikel abzentrifugiert und die Absorption des klaren Überstandes bei 530 nm gemessen.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=3, repräsentativ für 3 Versuche.

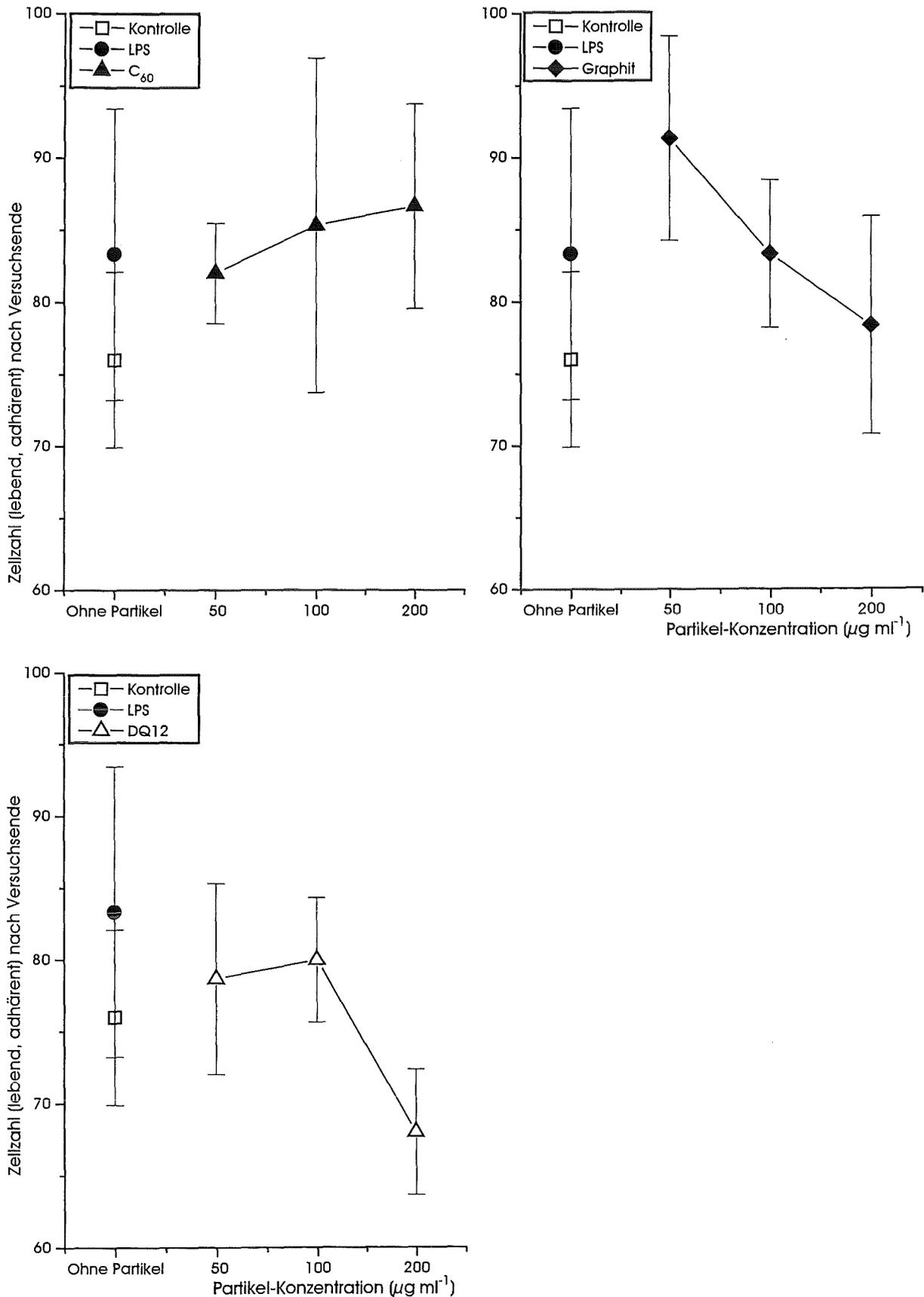


Abb. 16: Zellzahl nach Inkubationsende (Rinder-Alveolarmakrophagen (RAM))
Einfluß von LPS und verschiedenen Partikel-Konzentrationen auf die Zahl lebender und adhärenter RAM nach Inkubationsende.

(In diesem und allen anderen Versuchen mit RAM war die LPS-Konzentration $10 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=3$, repräsentativ für 3 Versuche.

Die Ordinate gibt Absolutzahlen an (sh. 2.3.4.). Die Inkubationszeit betrug 4h.

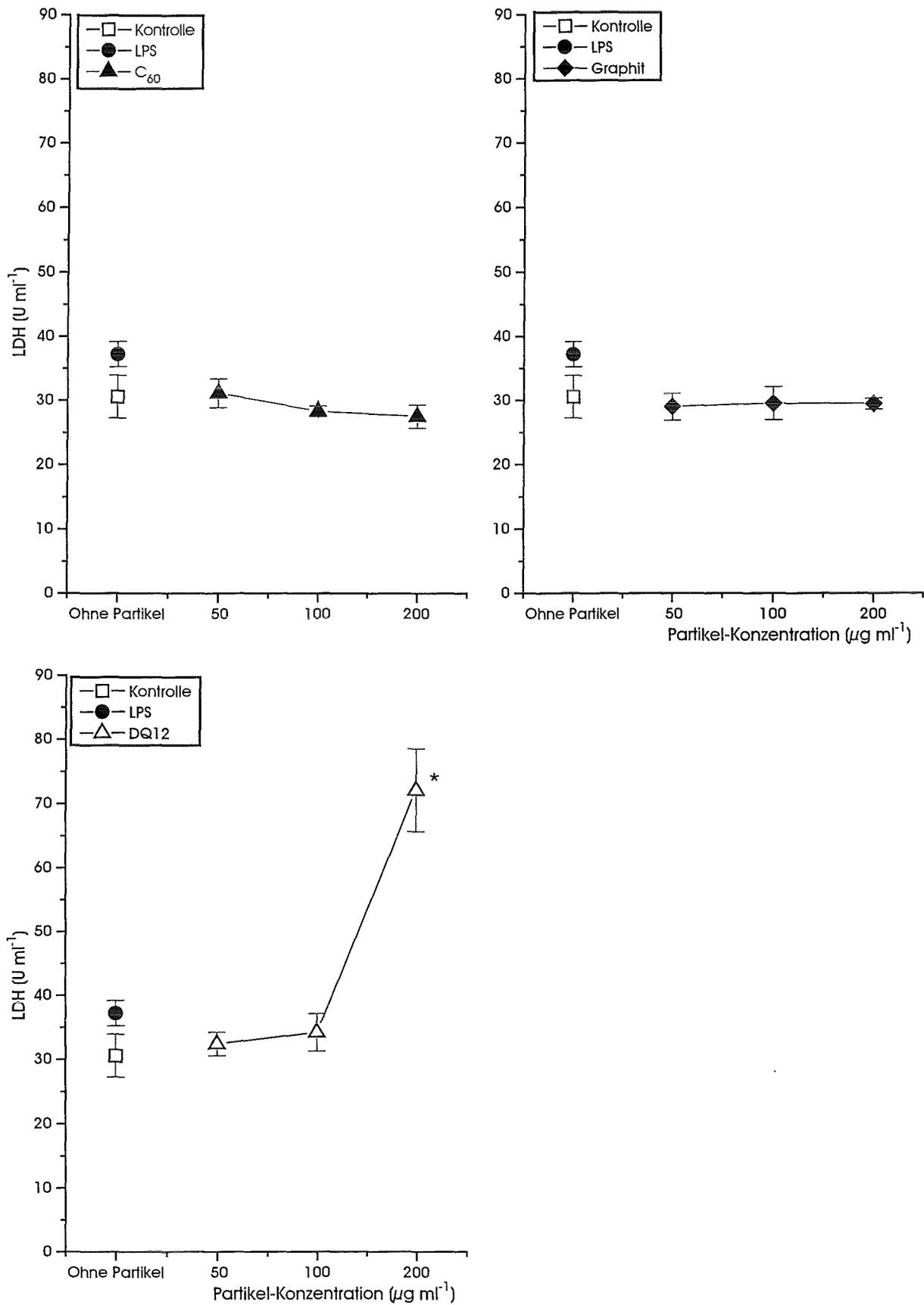


Abb. 17: LDH-Freisetzung (RAM)

Einfluß von LPS und verschiedenen Partikel-Konzentrationen auf die Freisetzung von LDH aus RAM.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=3, repräsentativ für 3 Versuche, * =signifikant verschieden von Kontrolle ($p < 0,05$). Die Inkubationszeit betrug 4h.

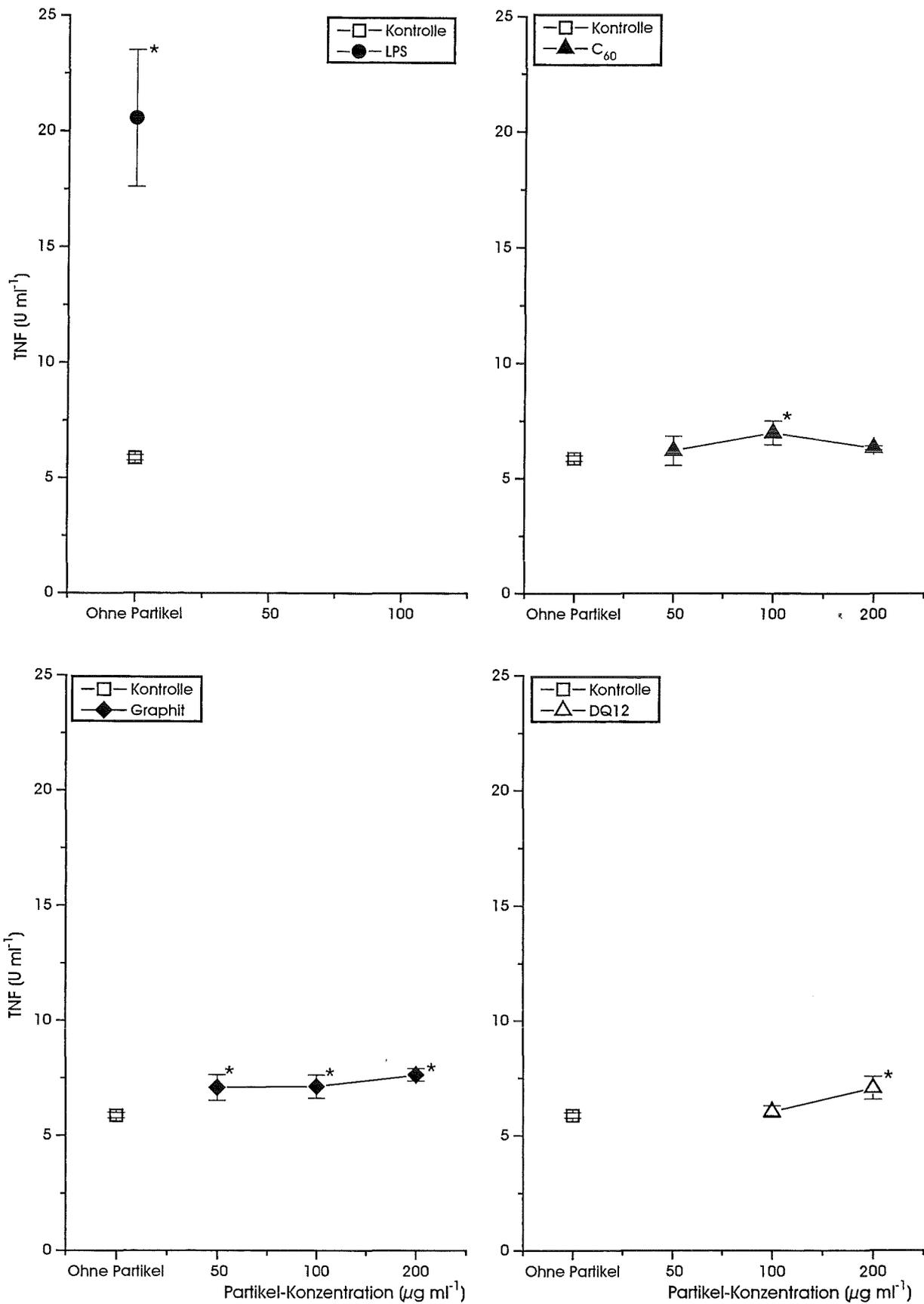


Abb. 18: TNF-Freisetzung (RAM)

Einfluß von LPS und verschiedenen Partikel-Konzentrationen auf die Freisetzung von TNF aus RAM (TNF-Bestimmung durch WEHI-Assay).

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=3, repräsentativ für 3 Versuche, * = signifikant verschieden von Kontrolle (p < 0,05). Im Fall von DQ12 bestand nur in einem von 3 Versuchen Signifikanz. Die Inkubationszeit betrug 4 h.

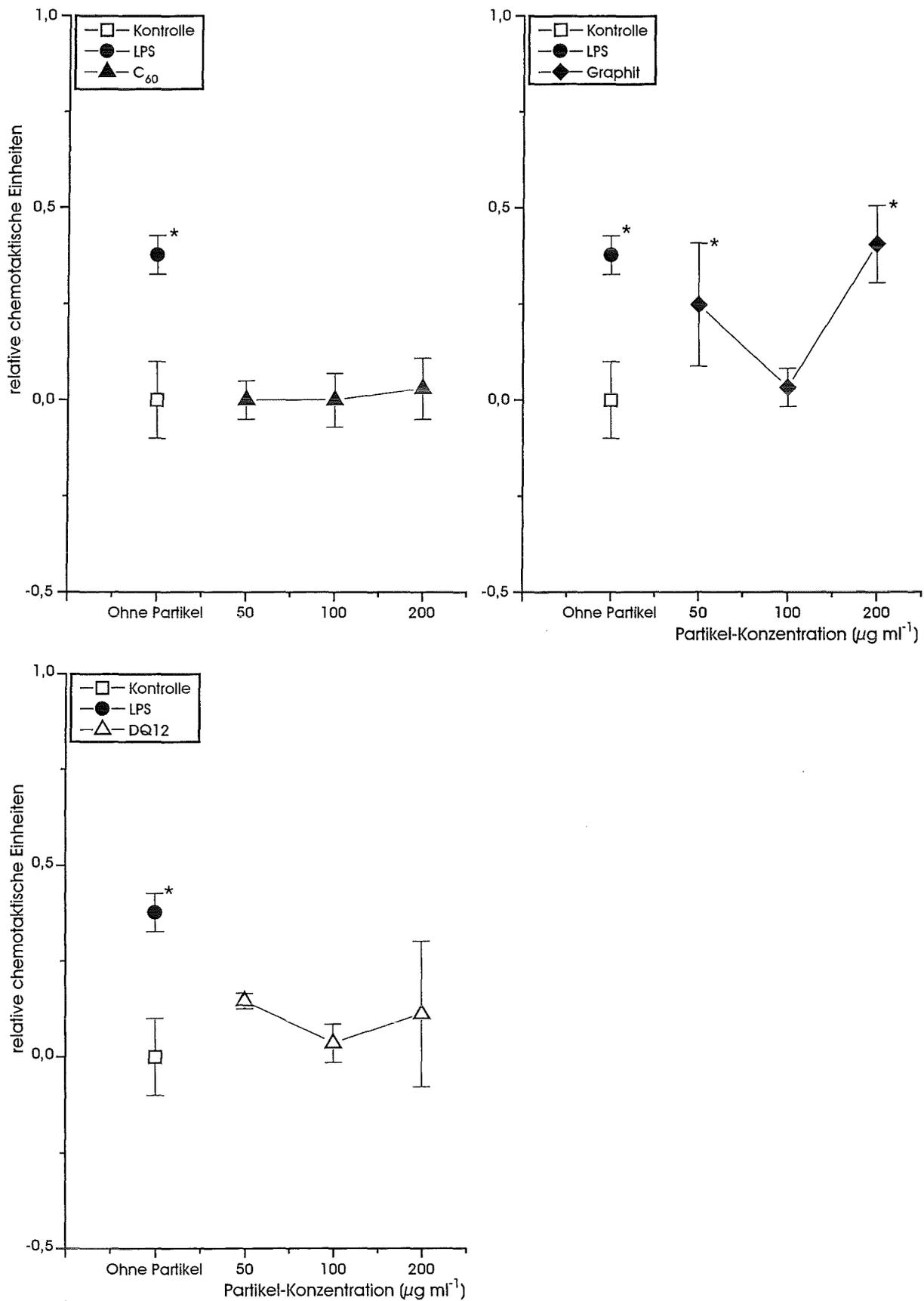


Abb. 19: Chemoattraktive Wirkung (für RAM)

Einfluß von LPS und verschiedenen Partikel-Konzentrationen auf die Freisetzung von Chemotaxinen für Makrophagen aus RAM.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, repräsentativ für 3 Versuche, * = signifikant verschieden von Kontrolle ($p < 0,05$). Die Inkubationszeit betrug 4h.

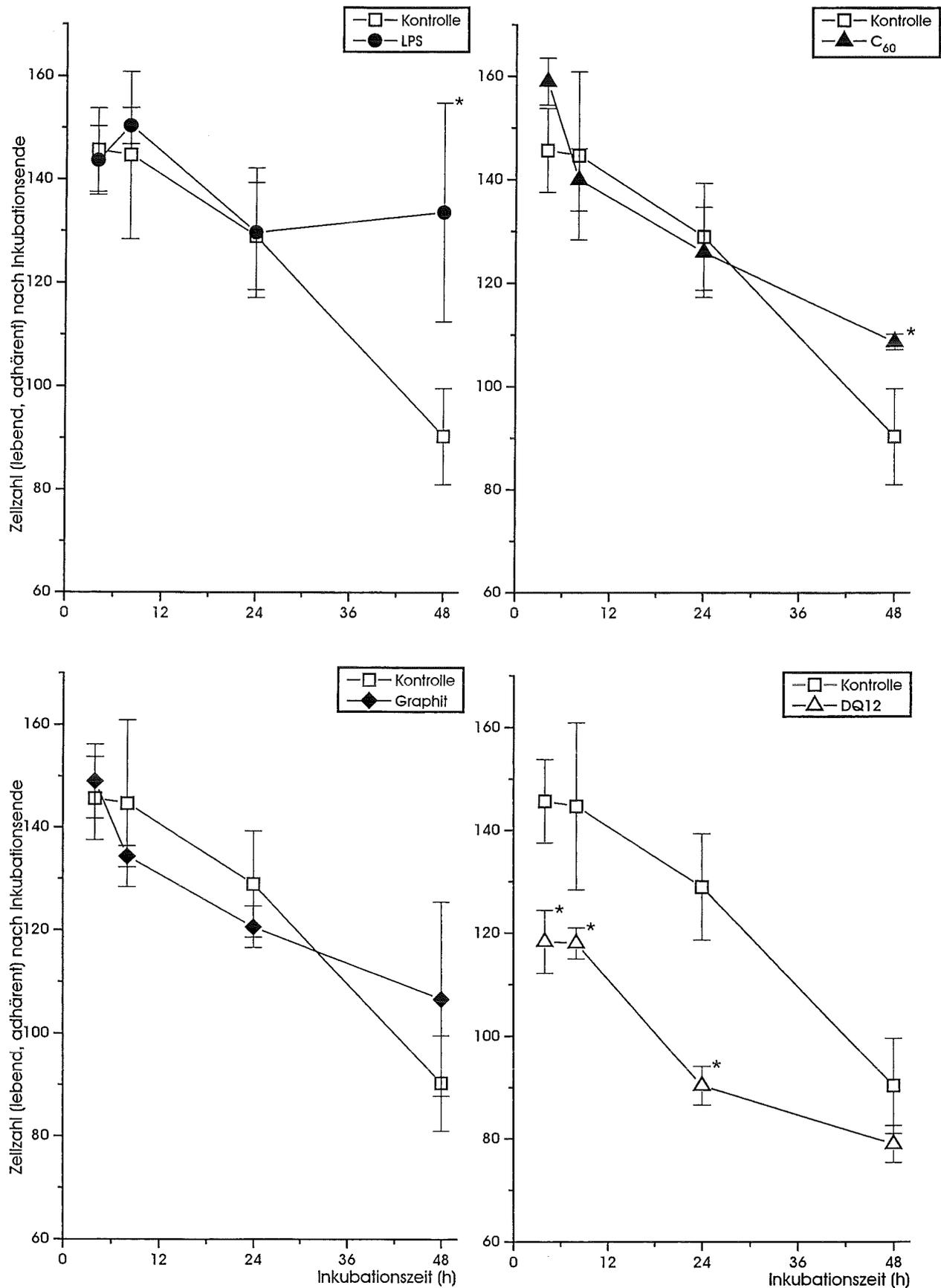


Abb. 20: Zellzahl nach Inkubationsende (RAM)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Zahl lebender, adhärenter RAM nach Inkubation mit LPS oder Partikeln ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=3$, repräsentativ für 3 Versuche, *= signifikant verschieden von Kontrolle ($p < 0,05$). Die Ordinate gibt Absolutzahlen an (sh. 2.3.4.).

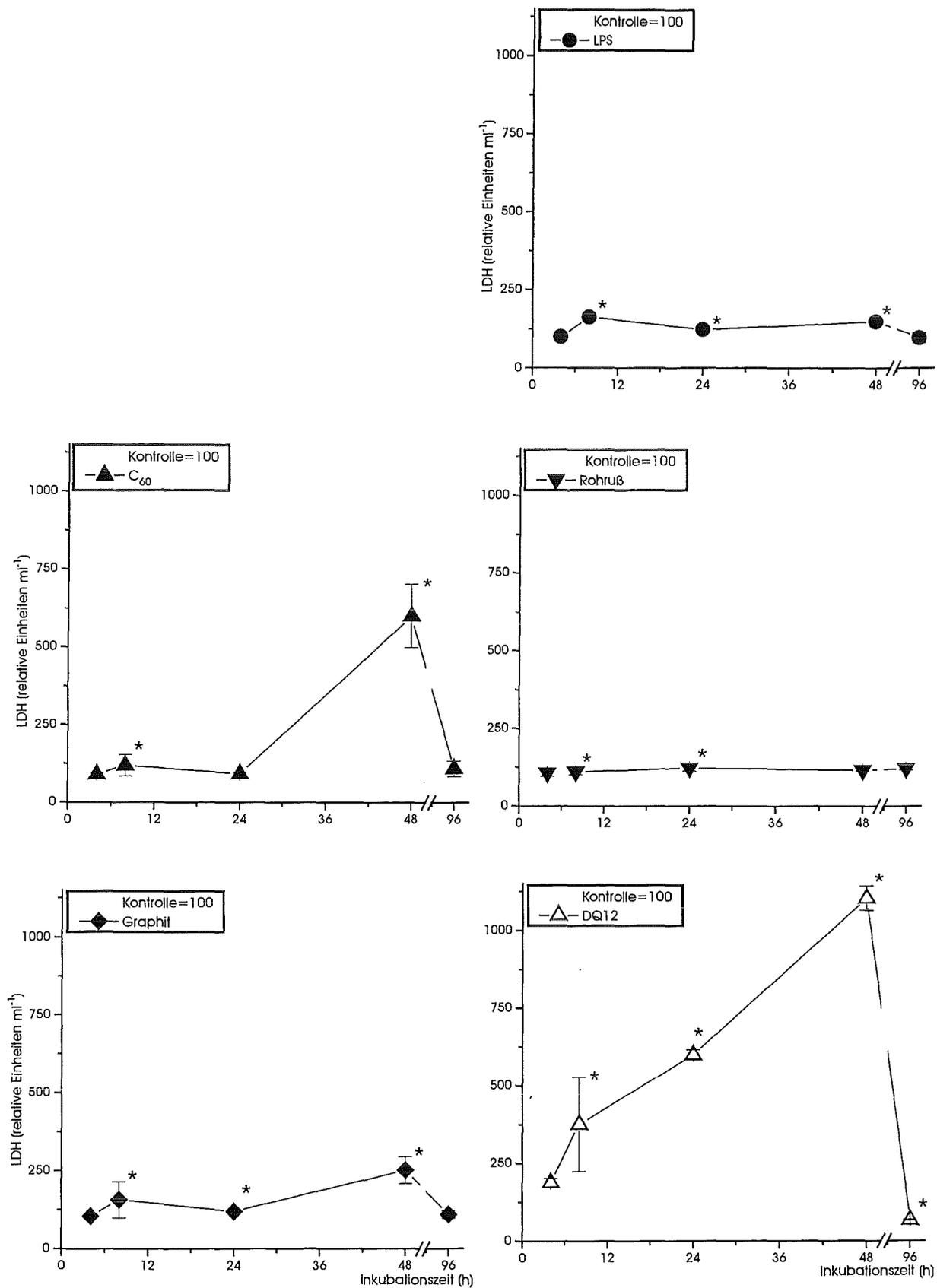


Abb. 21: LDH-Freisetzung (RAM)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von LDH aus RAM bei Inkubation mit LPS oder Partikeln ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=3$, repräsentativ für 3 Versuche, * = signifikant verschieden von Kontrolle ($p < 0,05$, Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt = 100).

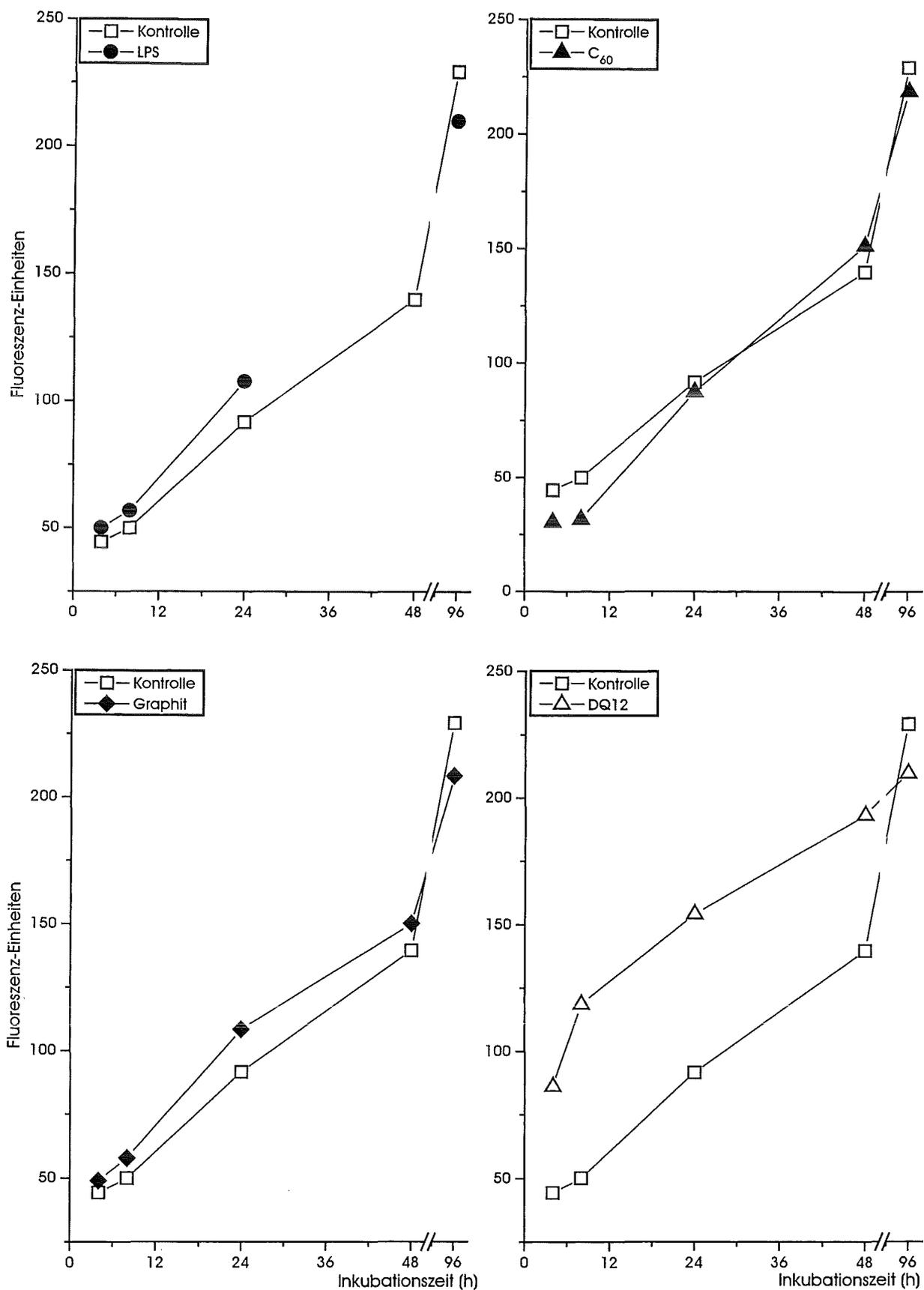


Abb. 22: NAG-Freisetzung (RAM)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von NAG aus RAM bei Inkubation mit LPS oder Partikeln ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Arithmetische Mittelwerte, $n=2$, repräsentativ für 3 Versuche.

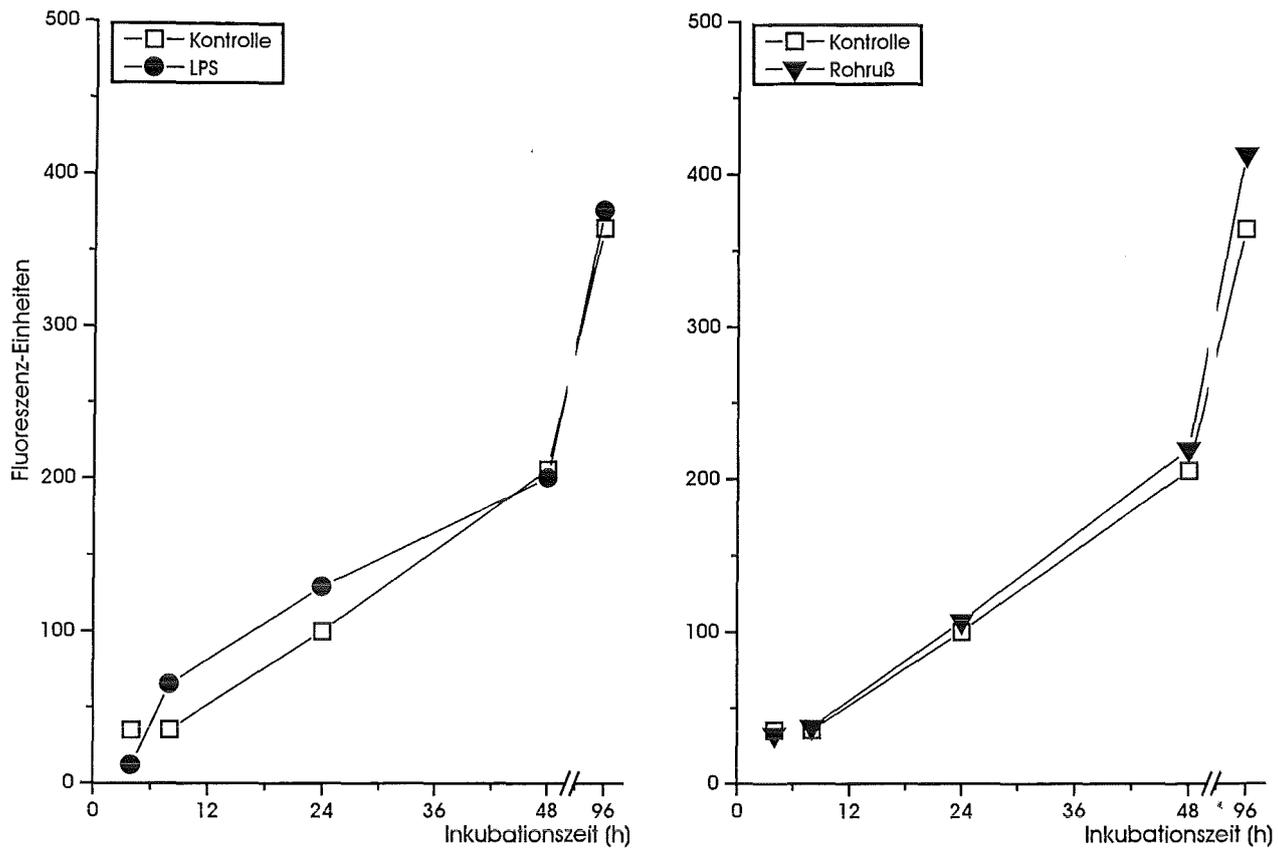


Abb. 23: NAG-Freisetzung (RAM)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von NAG aus RAM bei Inkubation mit LPS oder Partikeln ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Arithmetische Mittelwerte, $n=2$, repräsentativ für 3 Versuche.

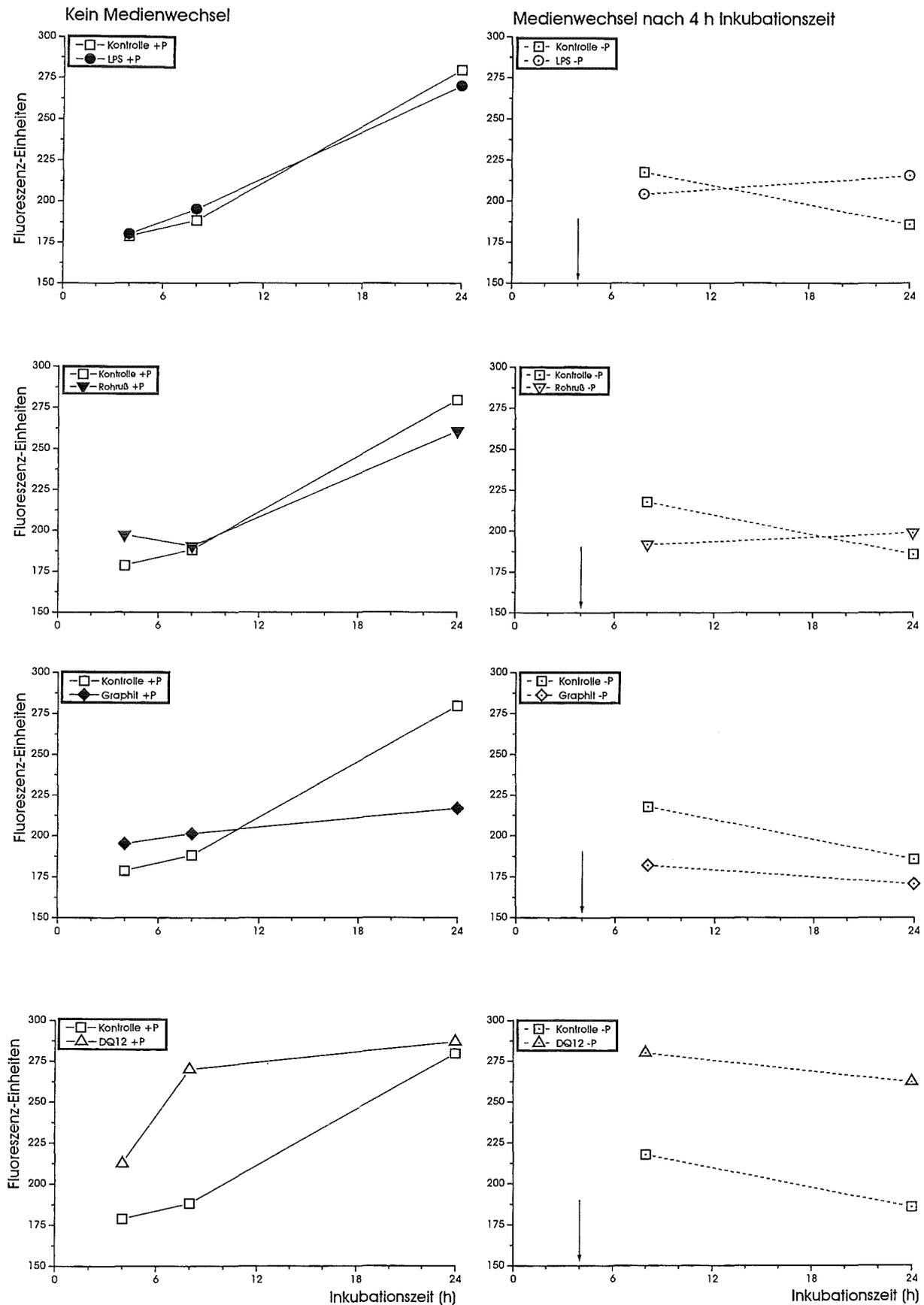


Abb. 24: NAG-Freisetzung (RAM)

Vergleich der Wirkung von Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder LPS nach 4 h Vorinkubation. Nach 4 h wurden die Dispersionen abgenommen ("P") und durch partikelfreies Medium ersetzt. Bei "+P" verblieb die Partikel-Dispersion auf den Zellen. 4 bzw. 20 h nach der Abnahme der Dispersionen wurde NAG bestimmt.

Arithmetische Mittelwerte, $n=2$, dreifach-paralleler Ansatz. ↓ = Abnahme der Partikel-Dispersionen.

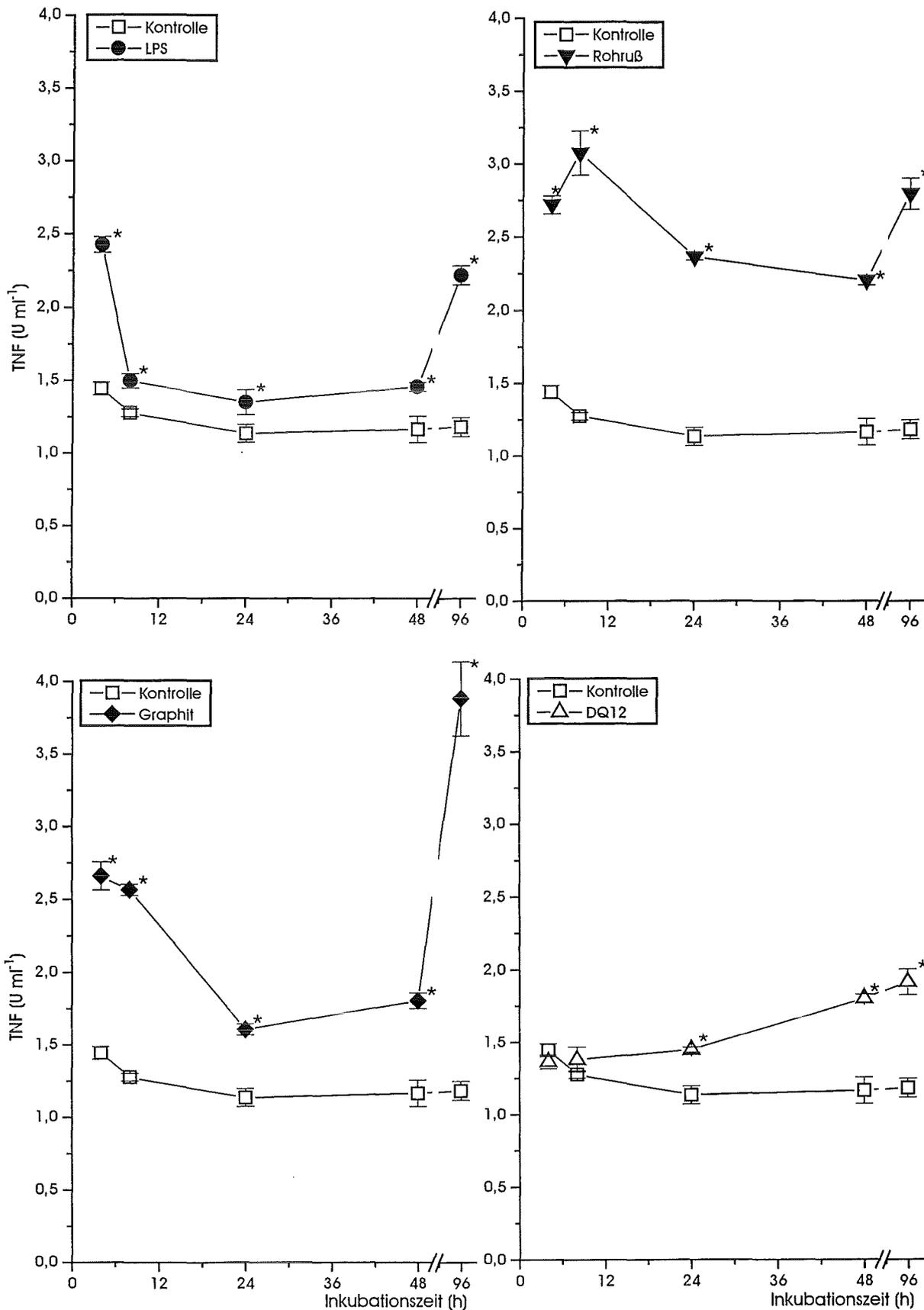


Abb. 25: TNF-Freisetzung (RAM)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von TNF aus RAM bei Inkubation mit LPS oder Partikeln (100 µg ml⁻¹). (TNF-Bestimmung mit WEHI-Assay).

Arithmetische Mittelwerte ±S.E., n=4, repräsentativ für 3 Versuche, * = signifikant verschieden von Kontrolle (p<0,05). TNF-Gehalt ist auf vitale Zellen nach Inkubationsende normiert (Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt=1).

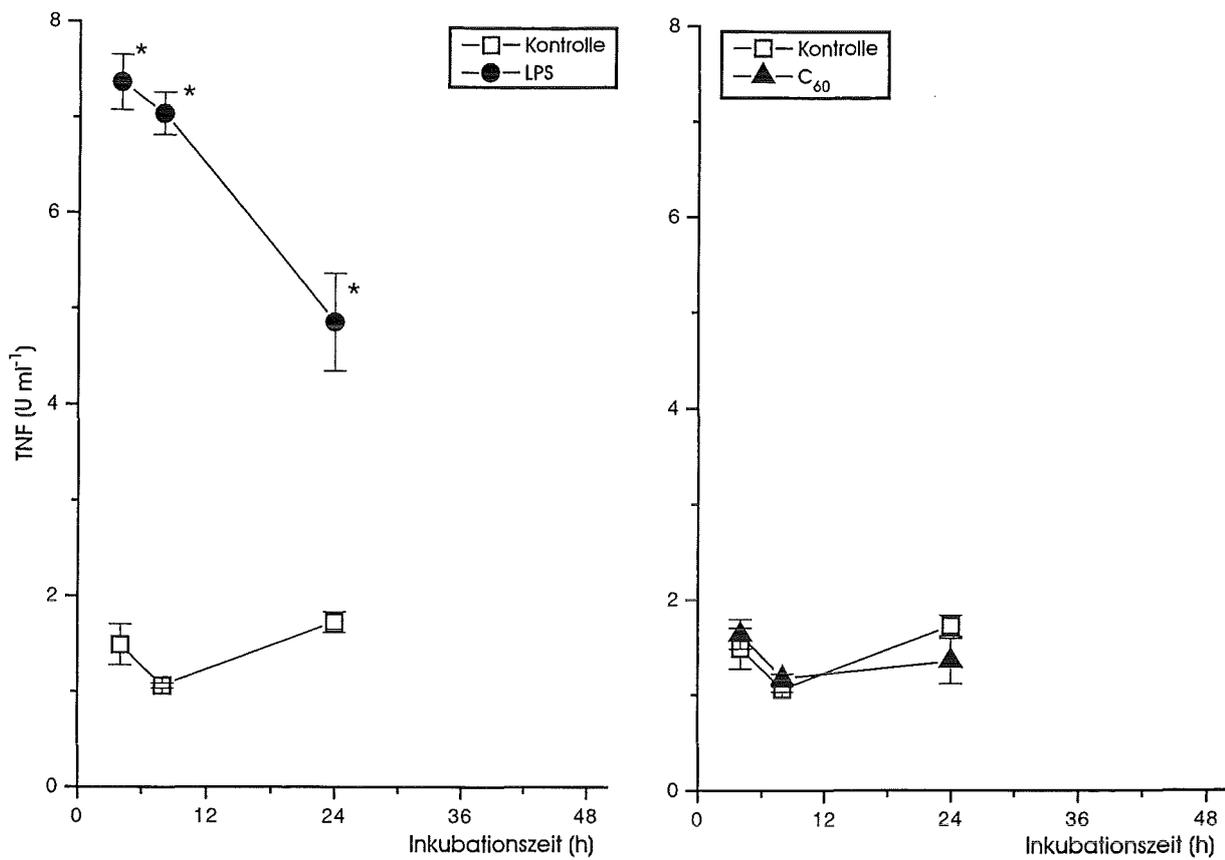


Abb. 26: TNF-Freisetzung (RAM)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von TNF aus RAM bei Inkubation mit LPS oder Partikeln ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). (TNF-Bestimmung mit WEHI-Assay).

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=4$, repräsentativ für 2 Versuche, * = signifikant verschieden von Kontrolle ($p < 0,05$). TNF-Gehalt ist auf vitale Zellen nach Inkubationsende normiert (Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt = 1).

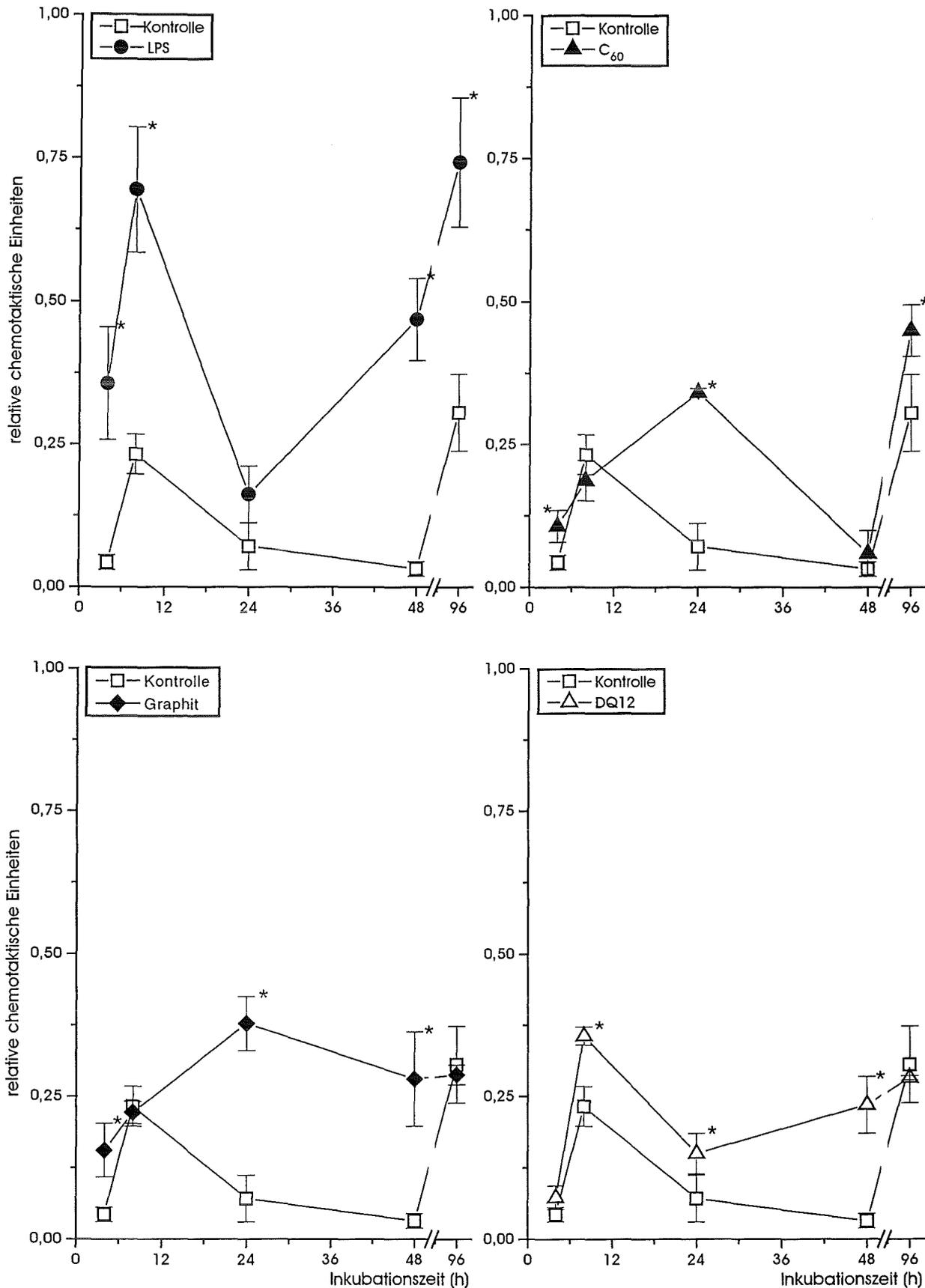


Abb. 27: Chemoattraktive Wirkung (für RAM)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von Chemotaxinen für Makrophagen aus RAM bei Inkubation mit LPS oder Partikeln ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=4$, repräsentativ für 3 Versuche, *= signifikant verschieden von Kontrolle ($p<0,05$). Relative chemotaktische Einheiten sind auf vitale Zellen nach Inkubationsende normiert (Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt=1).

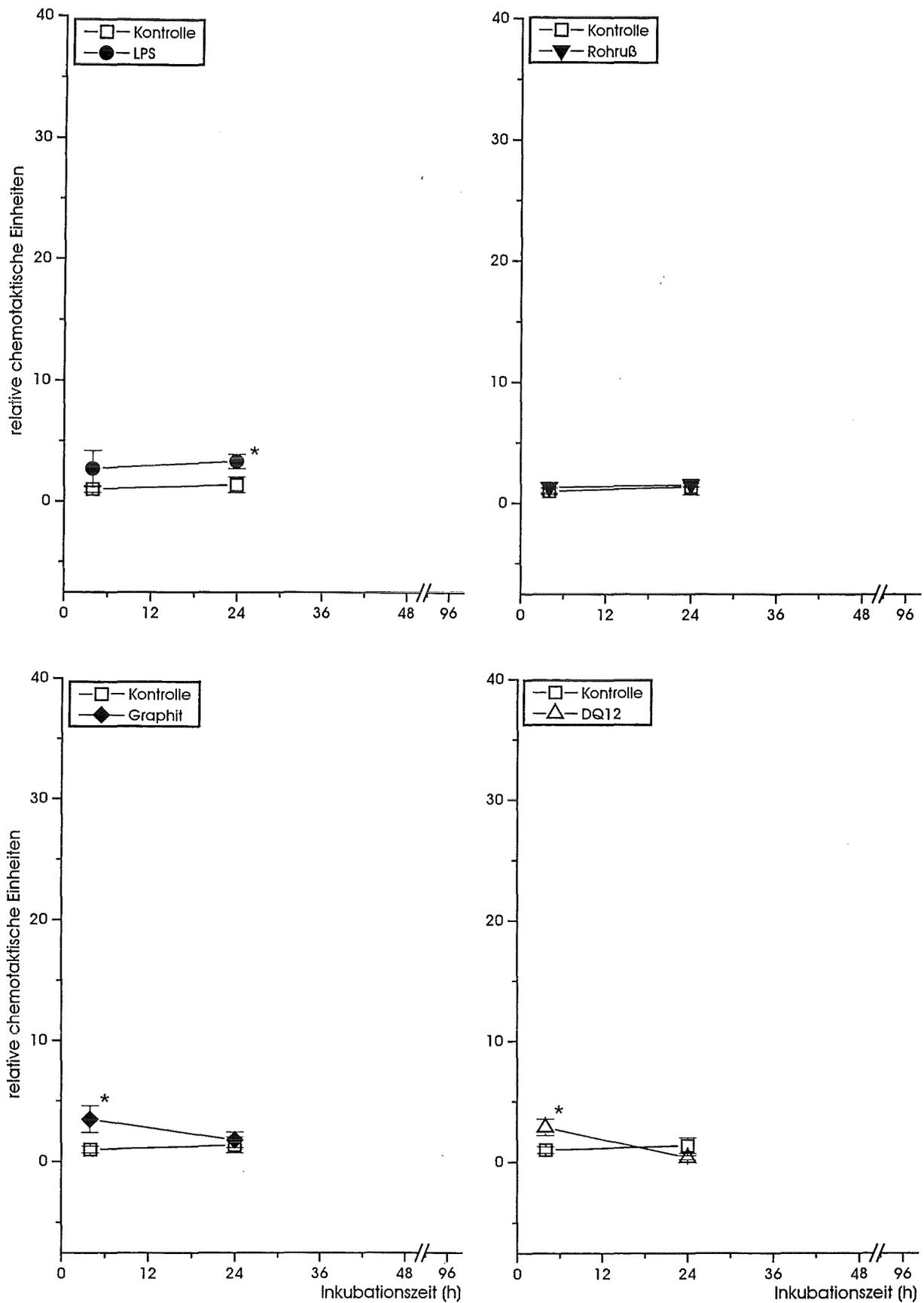


Abb. 28: Chemoattraktive Wirkung (für Rinder-Granulozyten)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von Chemotaxinen für Rinder-Granulozyten aus RAM bei Inkubation mit LPS oder Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=4$, * =signifikant verschieden von Kontrolle ($p < 0,05$), Einzelversuch, auf vitale Zellen nach Inkubationsende normiert (Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt=1).

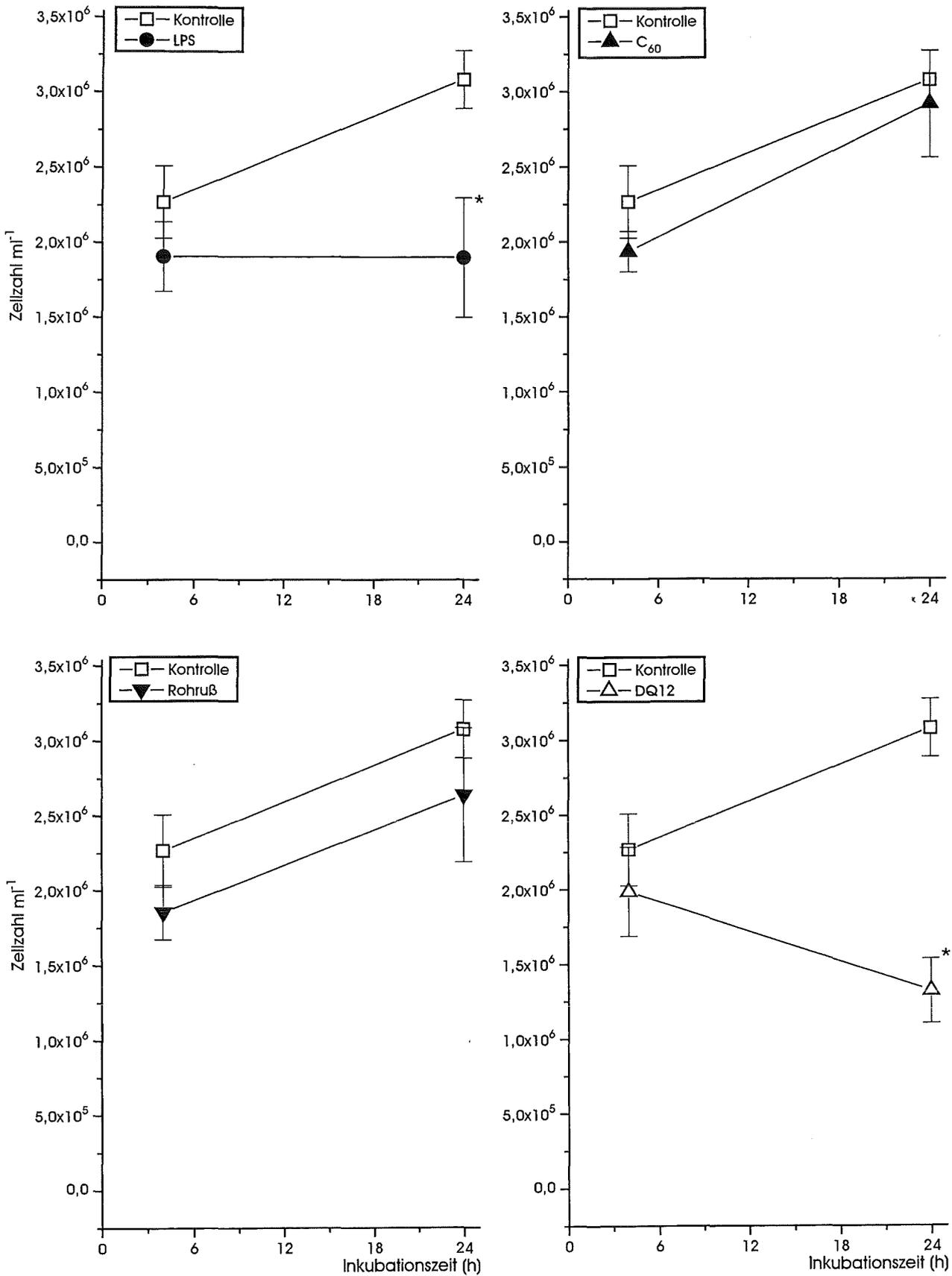


Abb. 29: Zellzahl nach Inkubationsende (HL-60-Makrophagen (HL-60-M))
 Einfluß der Inkubationszeit auf die Zahl vitaler HL-60-M nach Inkubation mit LPS oder Partikeln (100 µg ml⁻¹).

(In diesem und allen anderen Versuchen mit HL-60-M war die LPS-Konzentration 10 µg ml⁻¹).
 Arithmetische Mittelwerte ±S.E., n=3, repräsentativ für 3 Versuche, *= signifikant verschieden von Kontrolle (p<0,05).

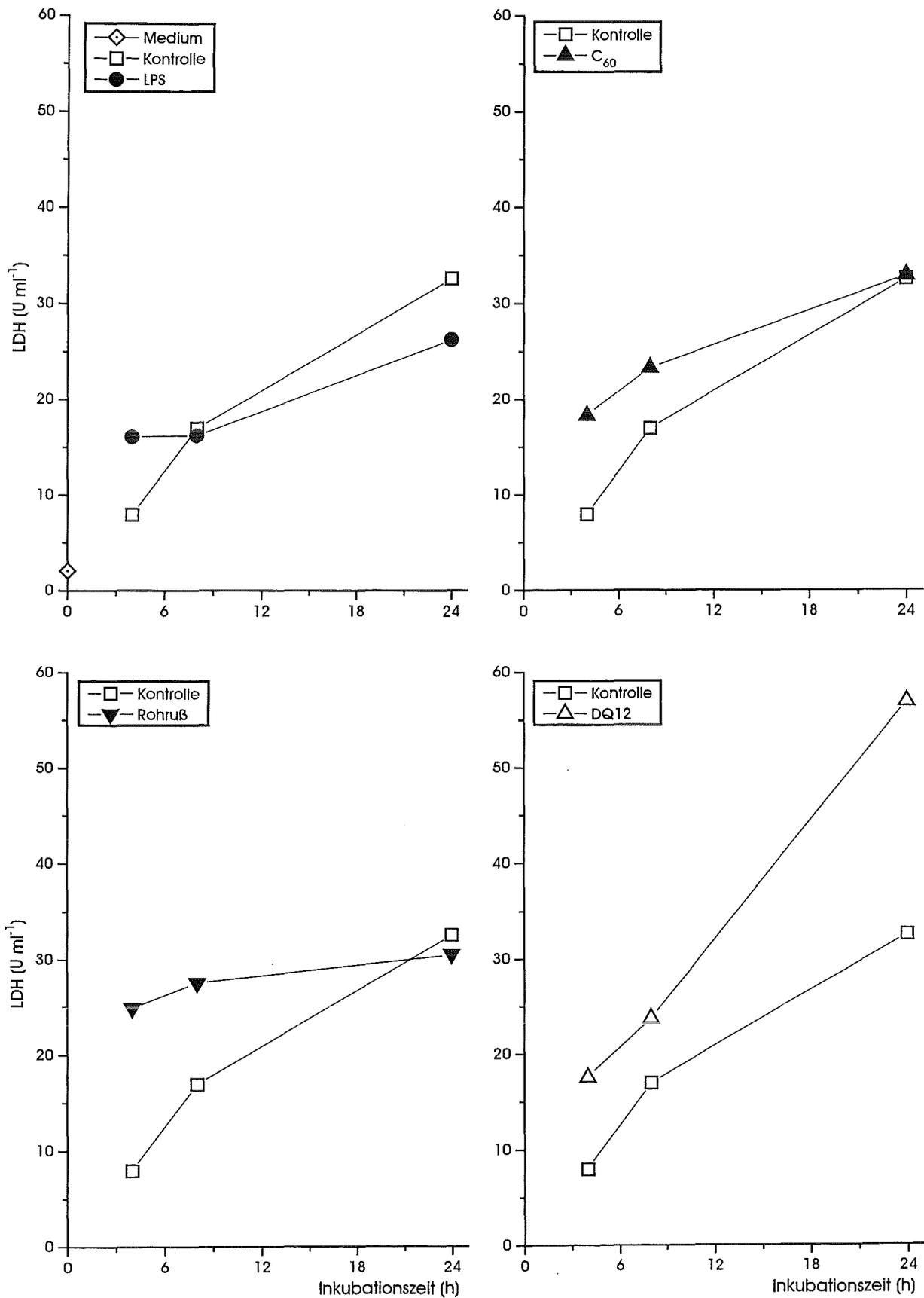


Abb. 30: LDH-Freisetzung (HL-60-M)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von LDH aus HL-60-M nach Inkubation mit LPS oder Partikeln (100 µg ml⁻¹).

Arithmetische Mittelwerte, n=2, repräsentativ für 3 Versuche.

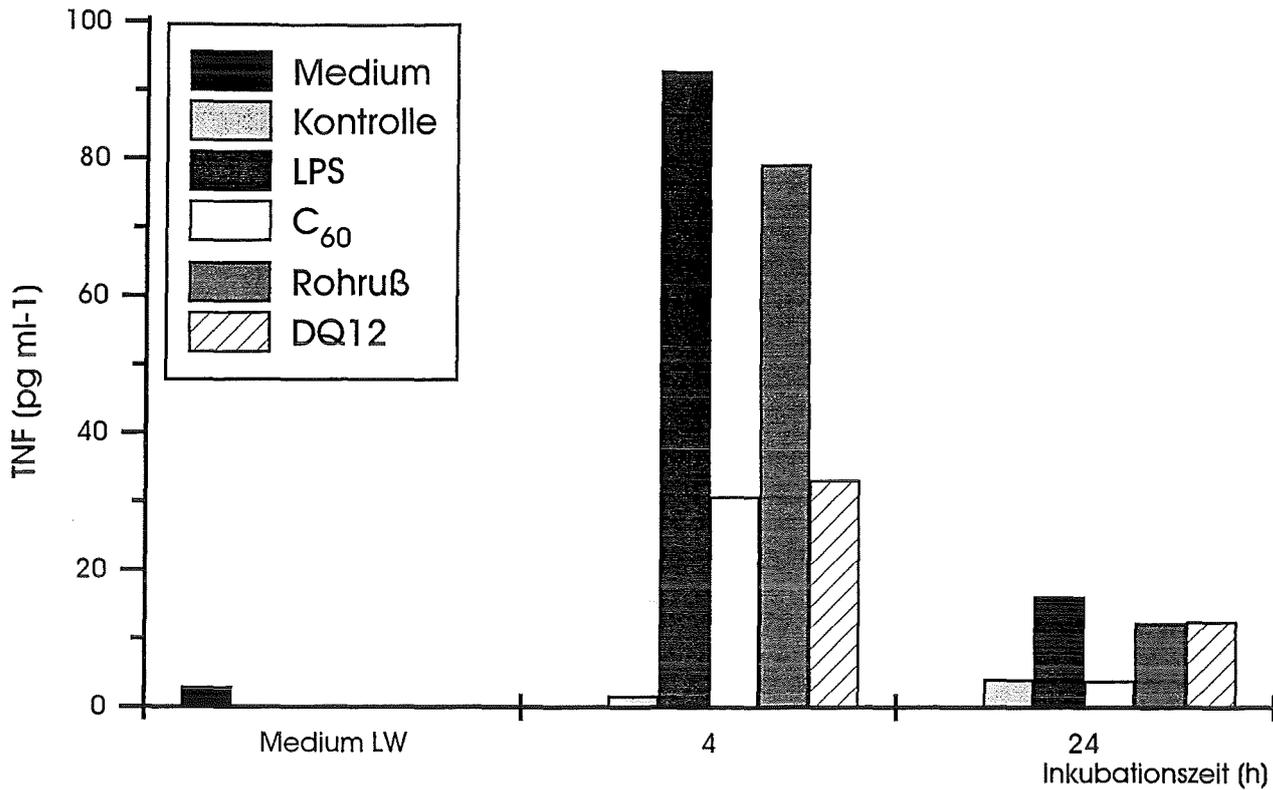


Abb. 31a: TNF-Freisetzung (HL-60-M)

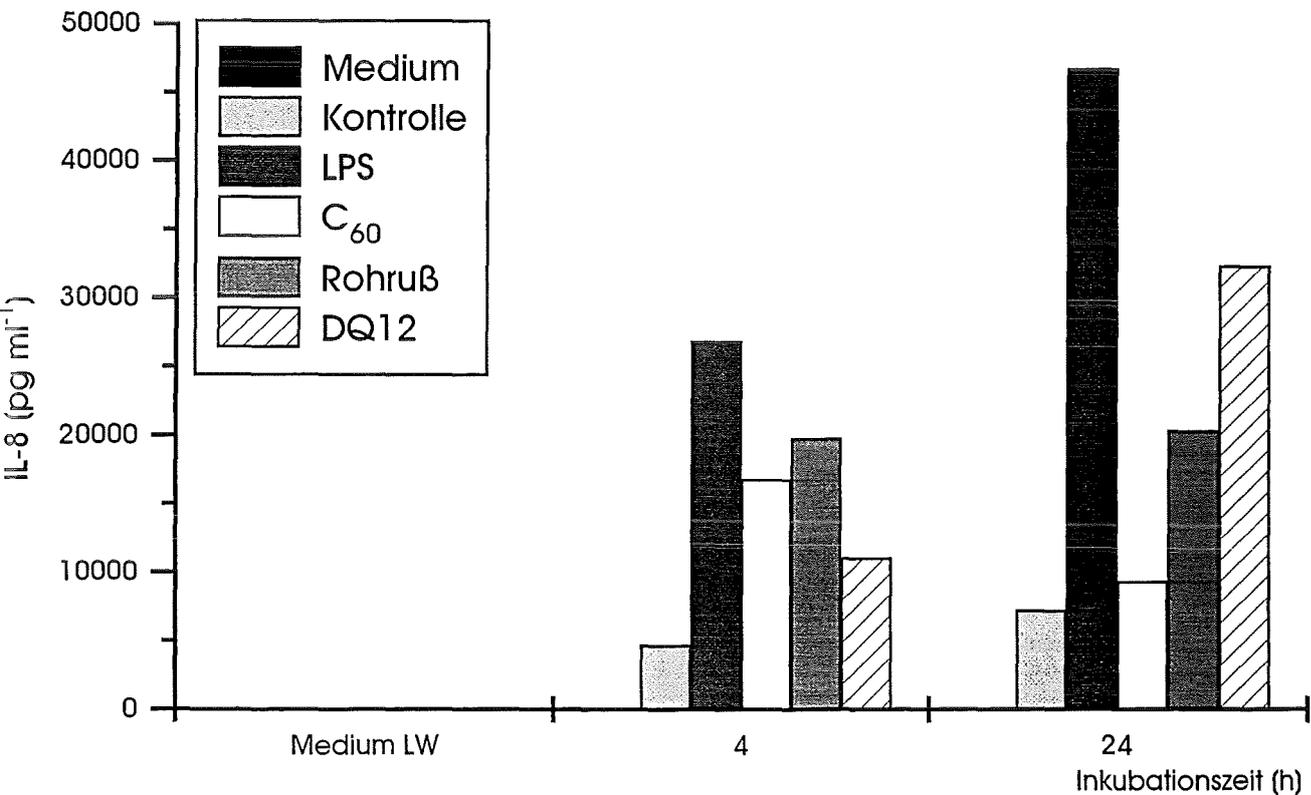


Abb. 31b: IL-8-Freisetzung (HL-60-M)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von TNF (Abb. 31a) oder IL-8 (Abb. 31b) aus HL-60-M bei Inkubation mit LPS oder Partikeln. (TNF- und IL-8-Bestimmung mit ELISA.)
 Arithmetische Mittelwerte, n=2, repräsentativ für 3 Versuche, LPS- und Partikel-Konzentrationen sh. Abb. 29.
 Werte sind auf 1 Million vitaler Zellen nach Inkubationsende normiert.

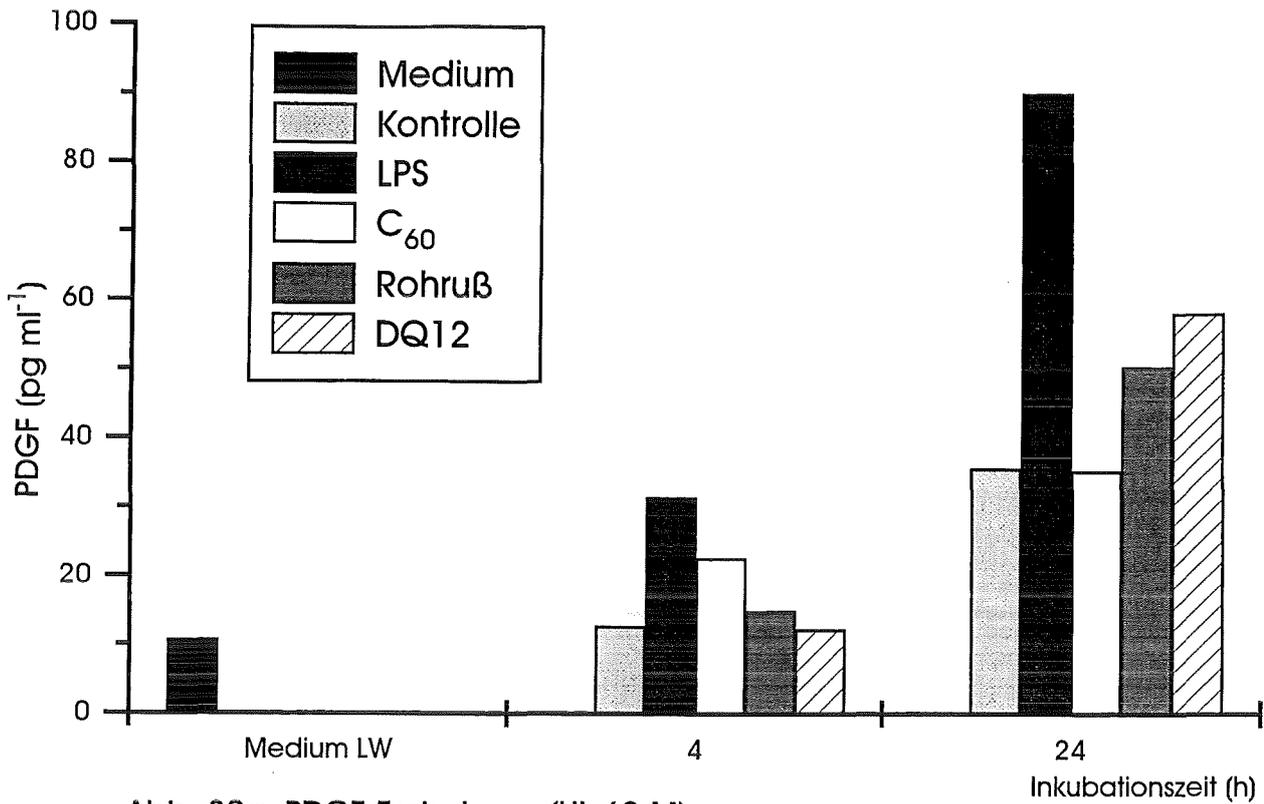


Abb. 32a: PDGF-Freisetzung (HL-60-M)

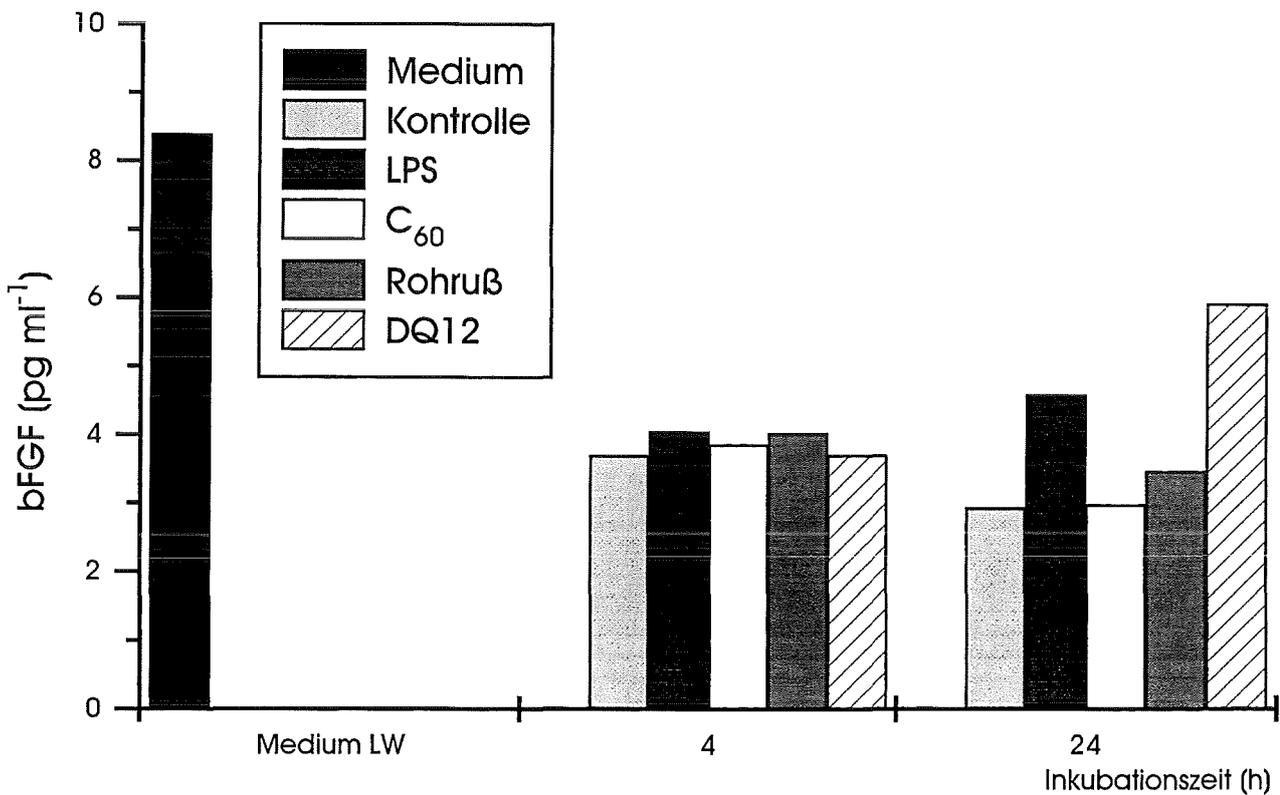


Abb. 32b: bFGF-Freisetzung (HL-60-M)

Einfluß der Inkubationszeit auf die Freisetzung von PGDF (Abb. 32a) oder bFGF (Abb. 32b) aus HL-60-M bei Inkubation mit LPS oder Partikeln. (PDGF- und bFGF-Bestimmung mit ELISA.) Arithmetische Mittelwerte, n=2, repräsentativ für 3 Versuche, LPS- und Partikel-Konzentrationen sh. Abb. 29. Werte sind auf 1 Million vitaler Zellen nach Inkubationsende normiert.

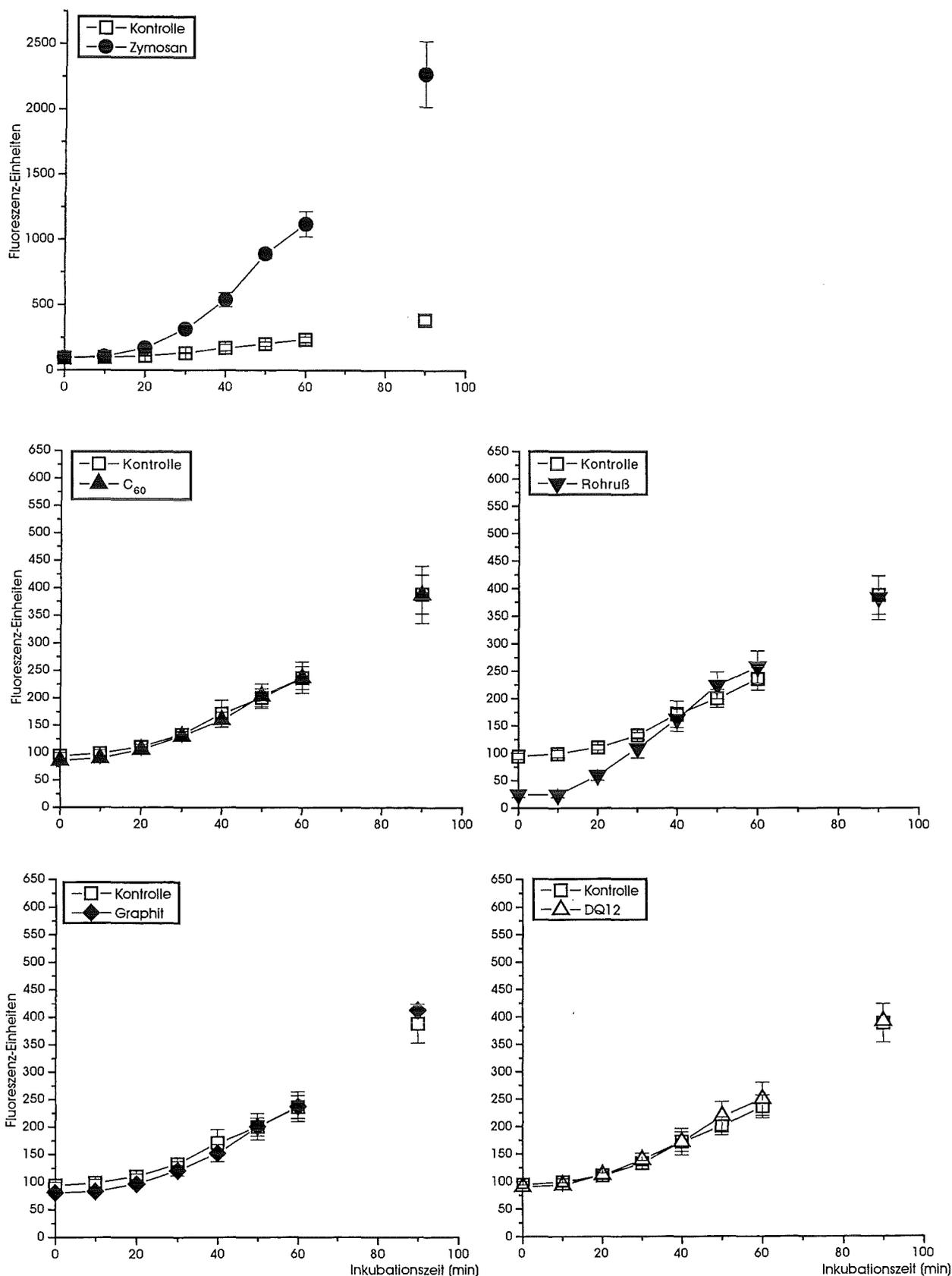


Abb. 33: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (RAM)

RAM wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert. Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, repräsentativ für 3 Versuche.

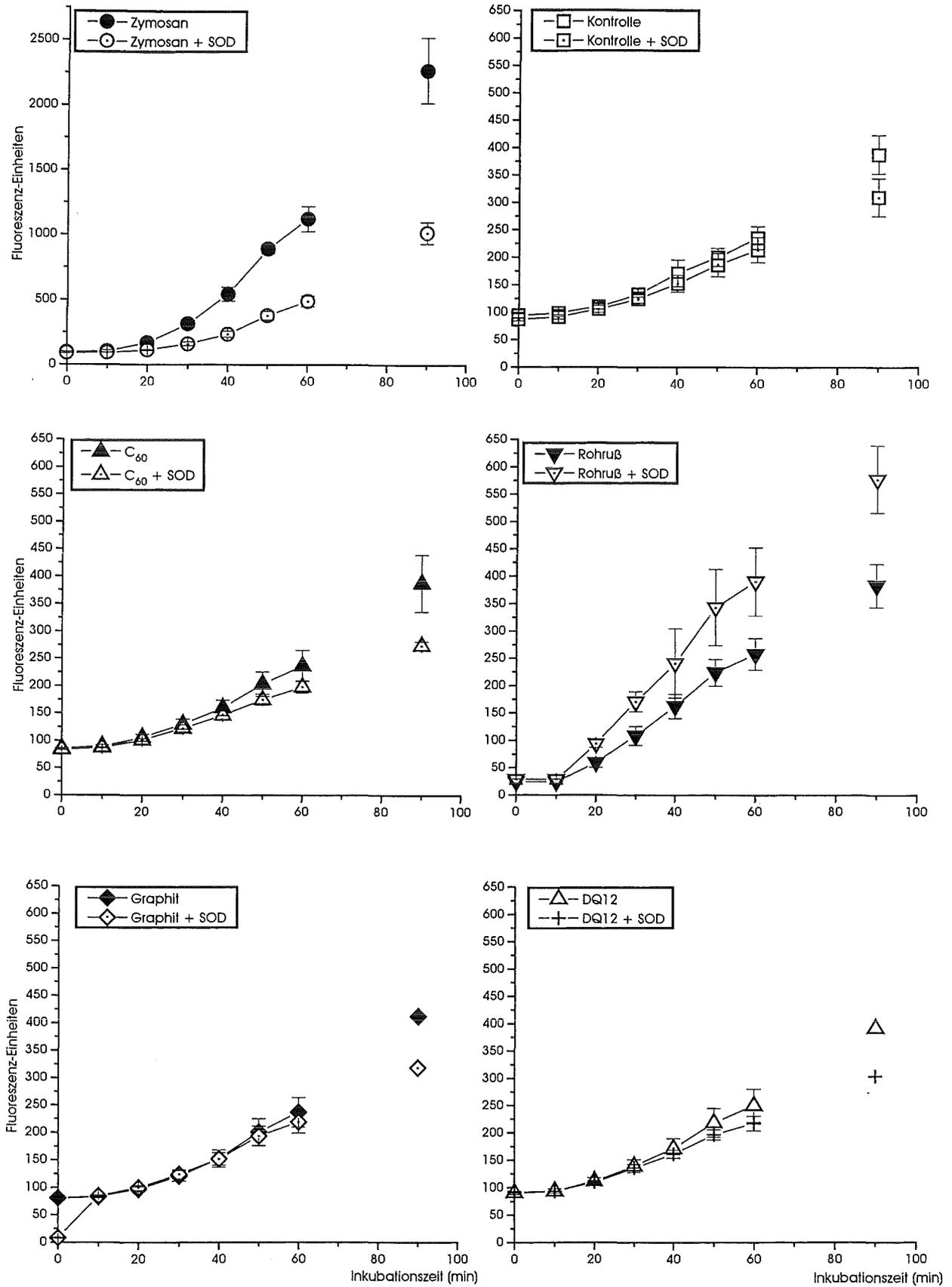


Abb. 34: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (RAM)

Einfluß von SOD

RAM wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) mit und ohne SOD inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, repräsentativ für 3 Versuche.

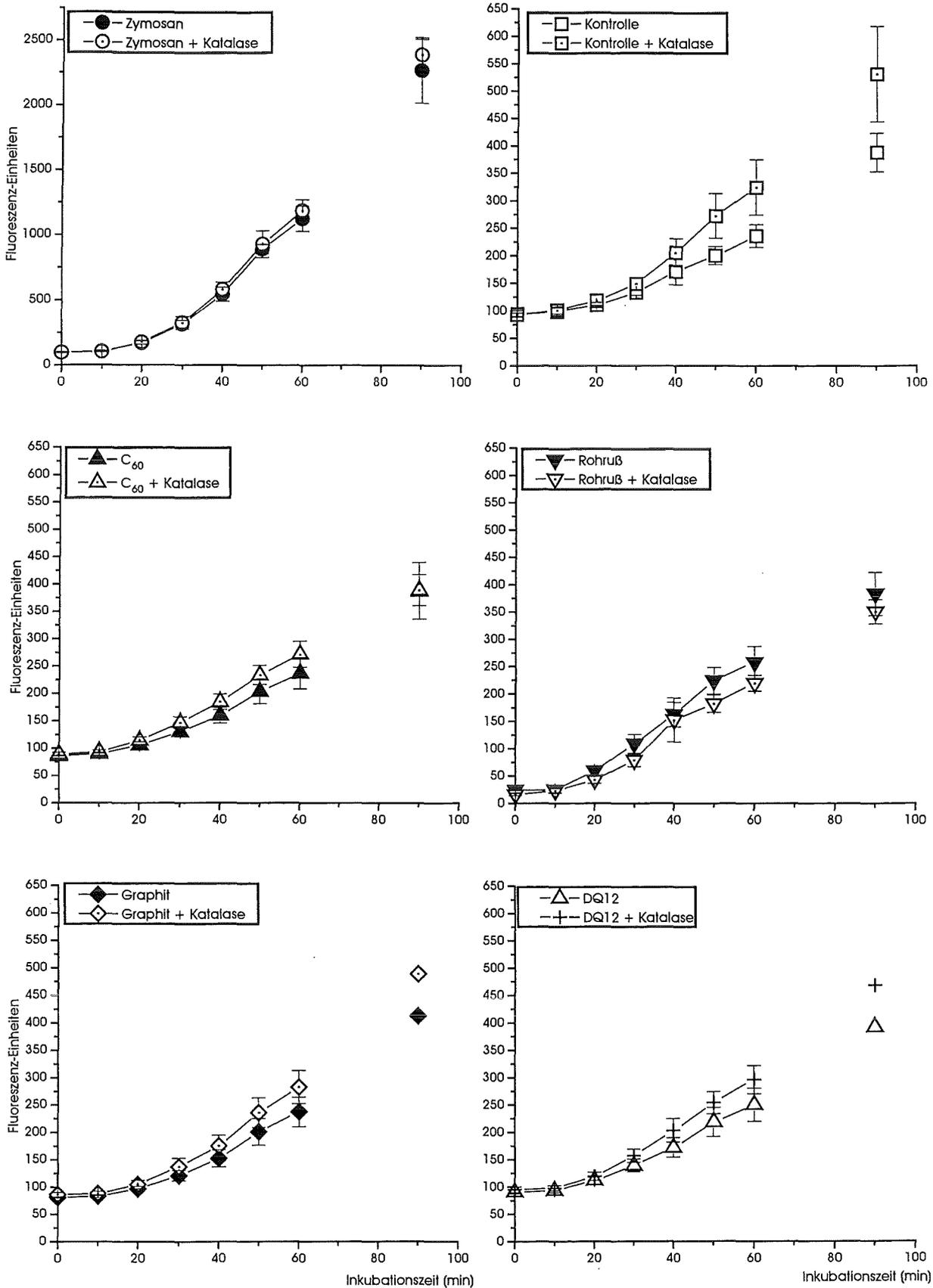


Abb. 35: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (RAM)

Einfluß von Katalase

RAM wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) mit und ohne Katalase inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, repräsentativ für 3 Versuche.

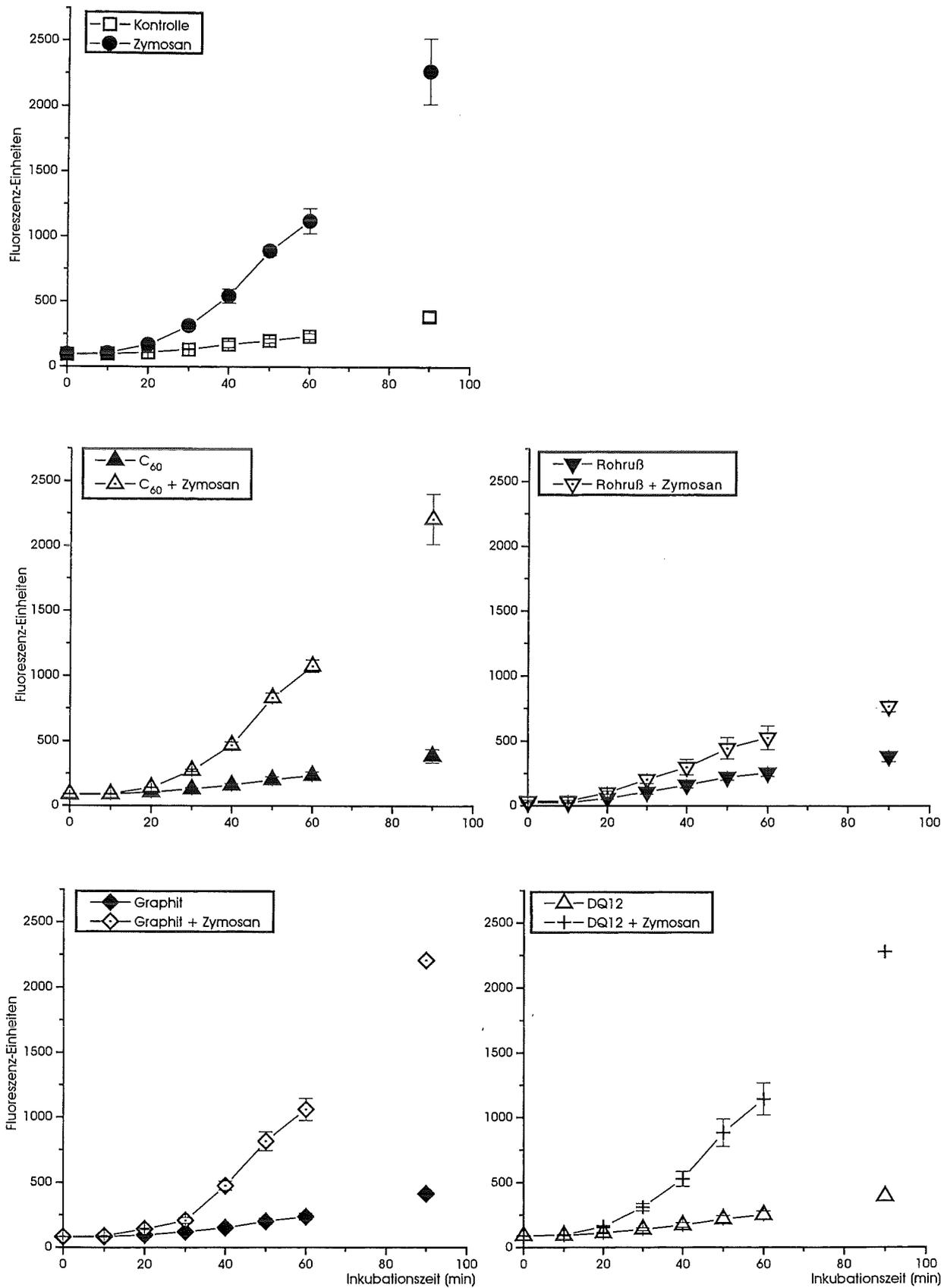


Abb. 36: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (RAM)

Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Zymosan

RAM wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) alleine oder in Kombination mit Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, repräsentativ für 3 Versuche.

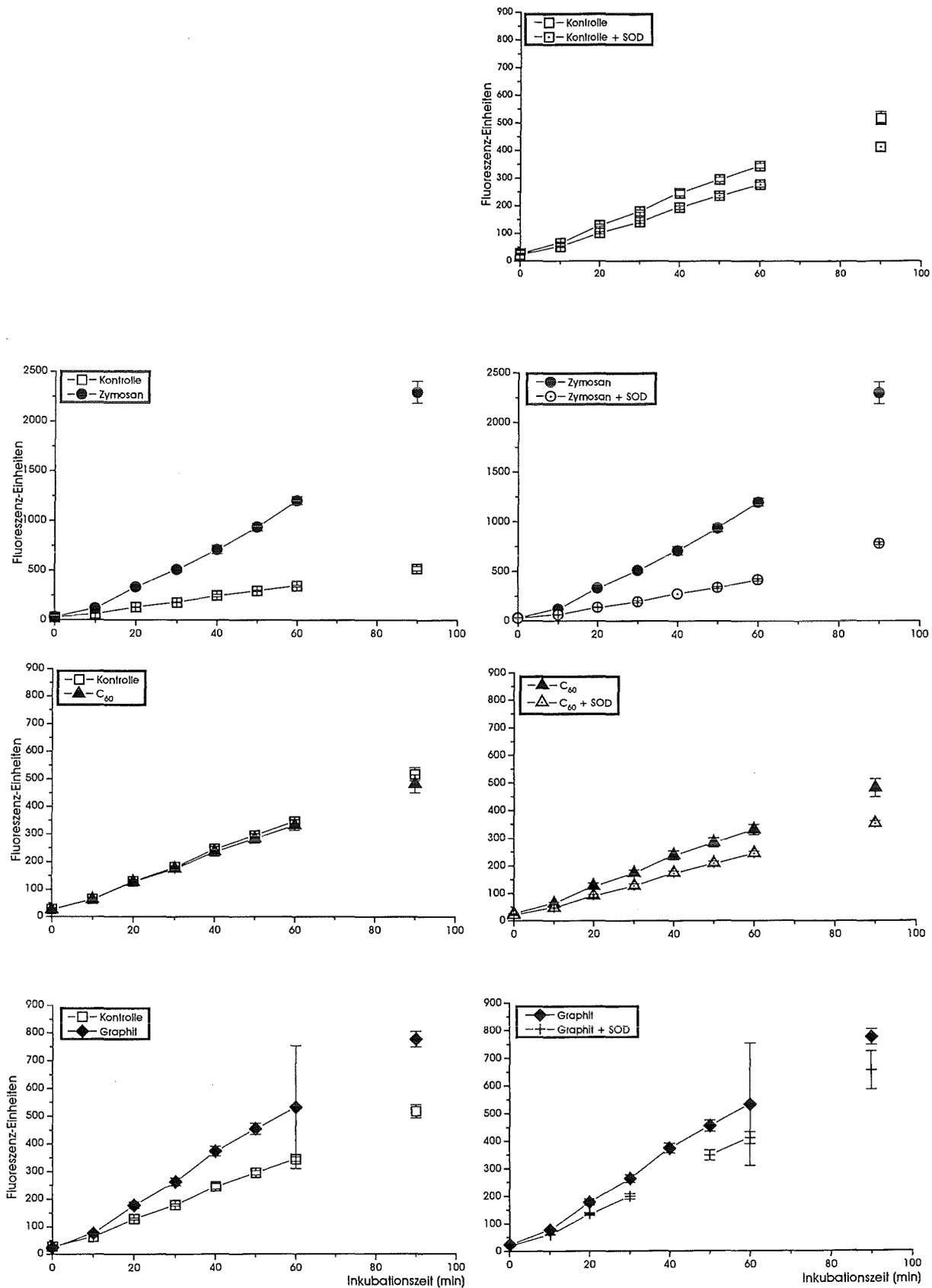


Abb. 37: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (HL-60-M)

Einfluß von SOD

HL-60-M wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) mit oder ohne SOD inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, repräsentativ für 3 Versuche.

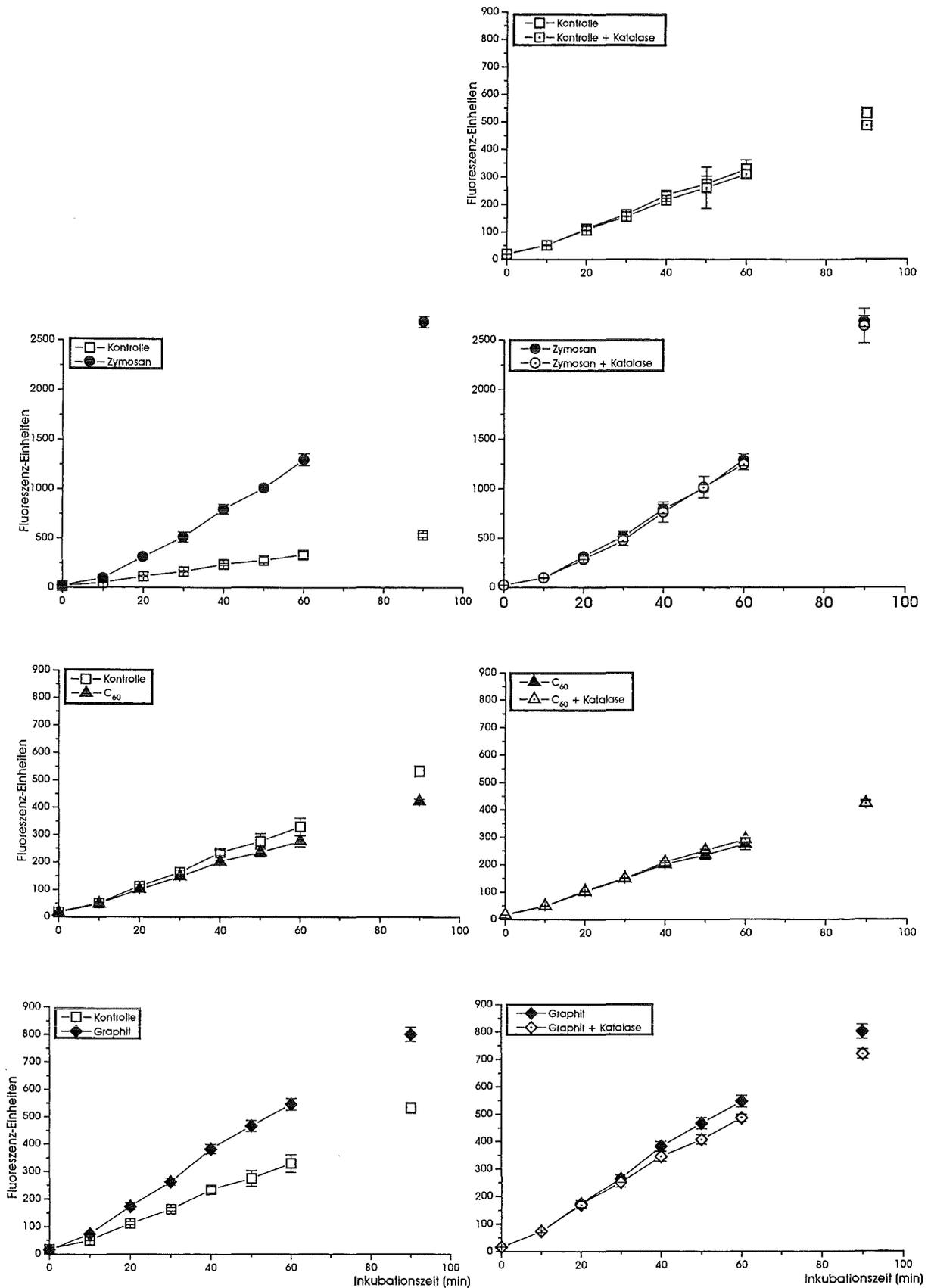


Abb. 38: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (HL-60-M)

Einfluß von Katalase

HL-60-M wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) mit oder ohne Katalase inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=4$, repräsentativ für 3 Versuche.

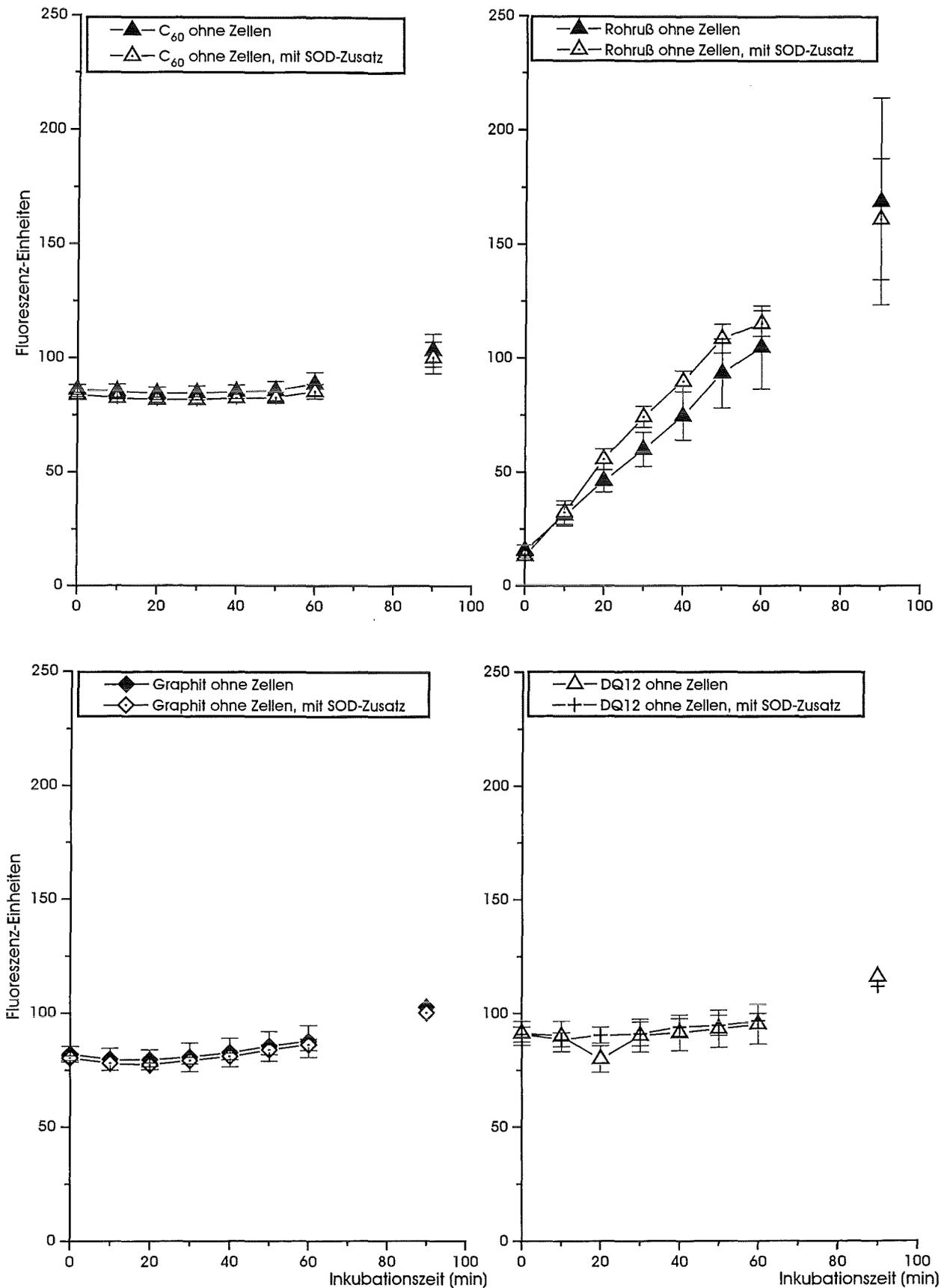


Abb. 39: Fluoreszenz-Induktion durch Partikel-Dispersionen

Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) wurden ohne Zellen mit und ohne SOD inkubiert.

Die Meßwerte von Inkubationen von Partikel-Dispersionen und Katalase entsprechen diesem Bild und werden daher nicht gesondert gezeigt.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=4$, repräsentativ für 3 Versuche.

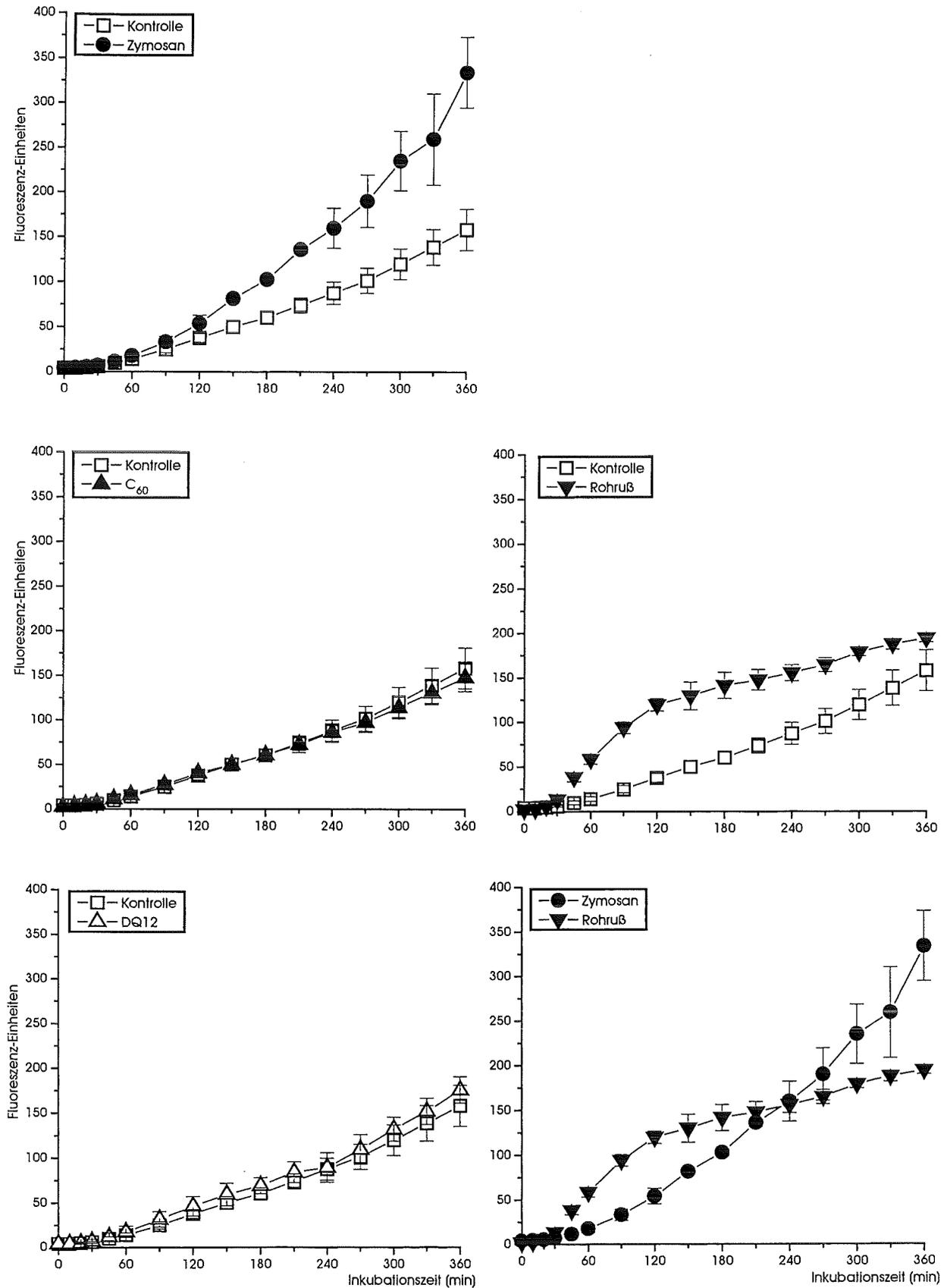


Abb. 40: Bildung von Oxidantien (BEAS-2B-Zellen)

BEAS-2B-Zellen wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=4$, repräsentativ für 3 Versuche.

Die Sensitivität des Meßgerätes bei Meßreihen mit BEAS-2B war um Faktor 7 geringer als bei den Versuchen mit RAM und HL-60-M.

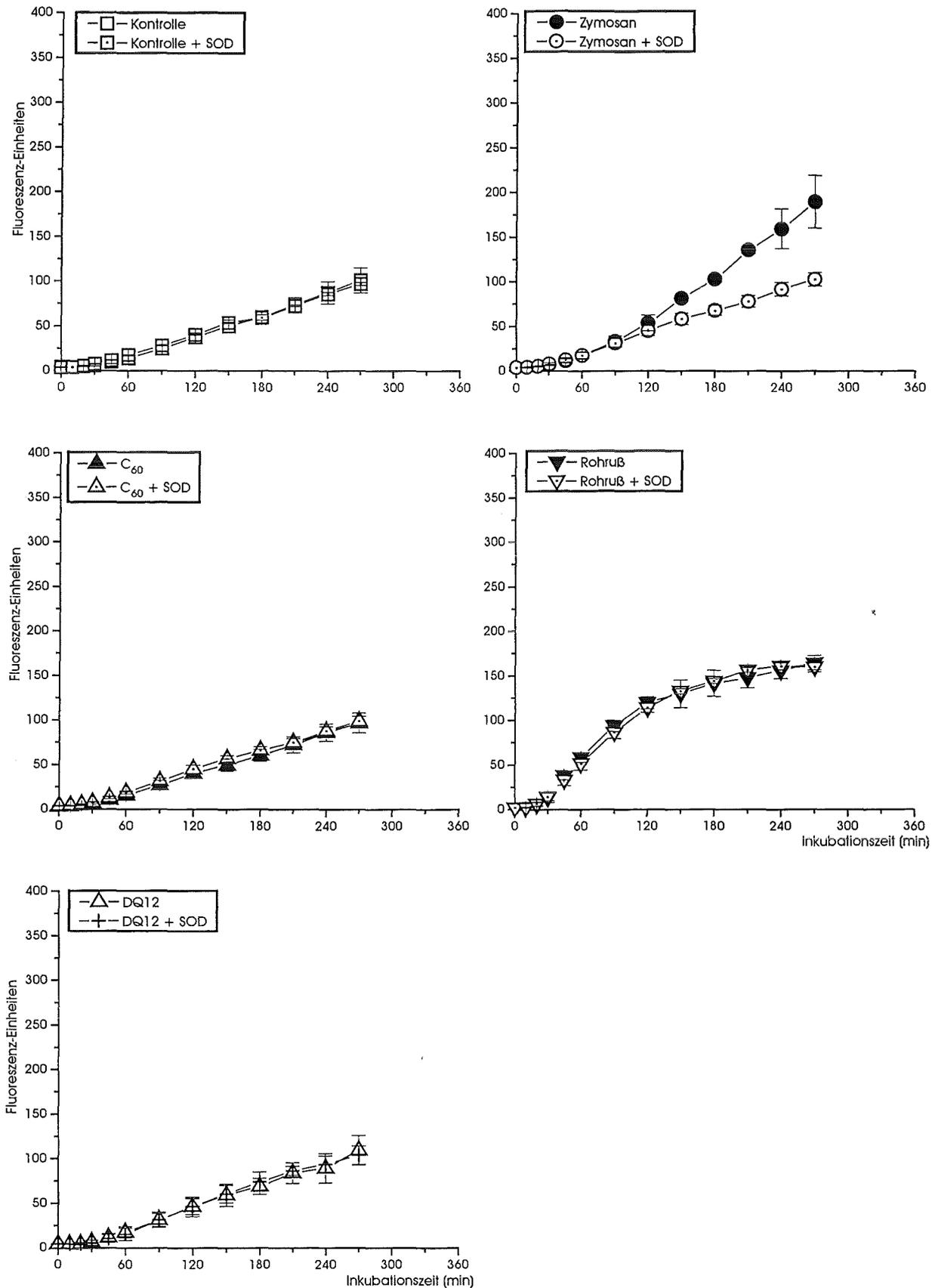


Abb. 41: Bildung von Oxidantien (BEAS-2B-Zellen)

Einfluß von SOD

BEAS-2B-Zellen wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) mit oder ohne SOD inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., $n=4$, repräsentativ für 3 Versuche.

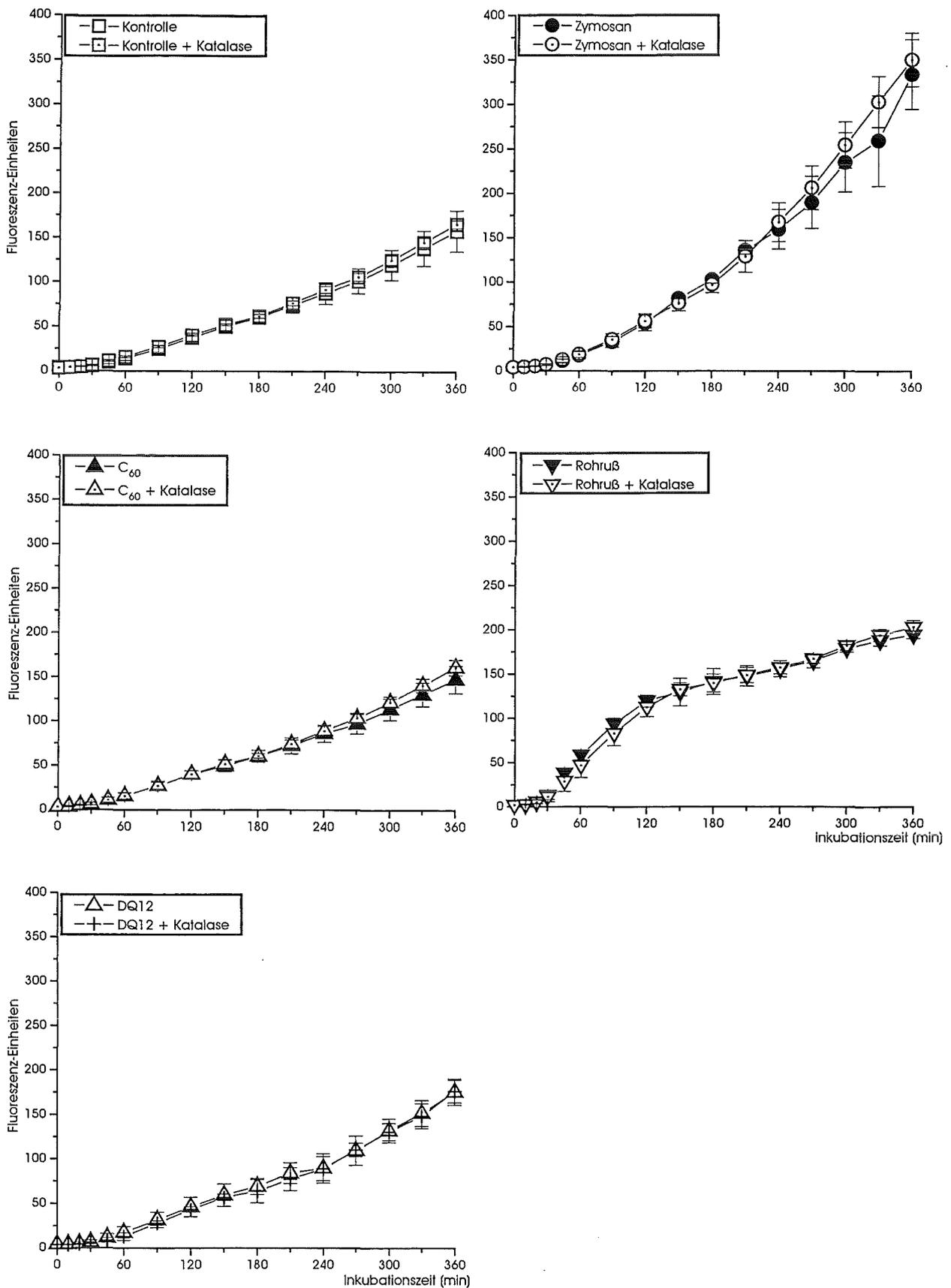


Abb. 42: Bildung von Oxidantien (BEAS-2B-Zellen)

Einfluß von Katalase

BEAS-2B-Zellen wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) mit oder ohne Katalase inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, repräsentativ für 3 Versuche.

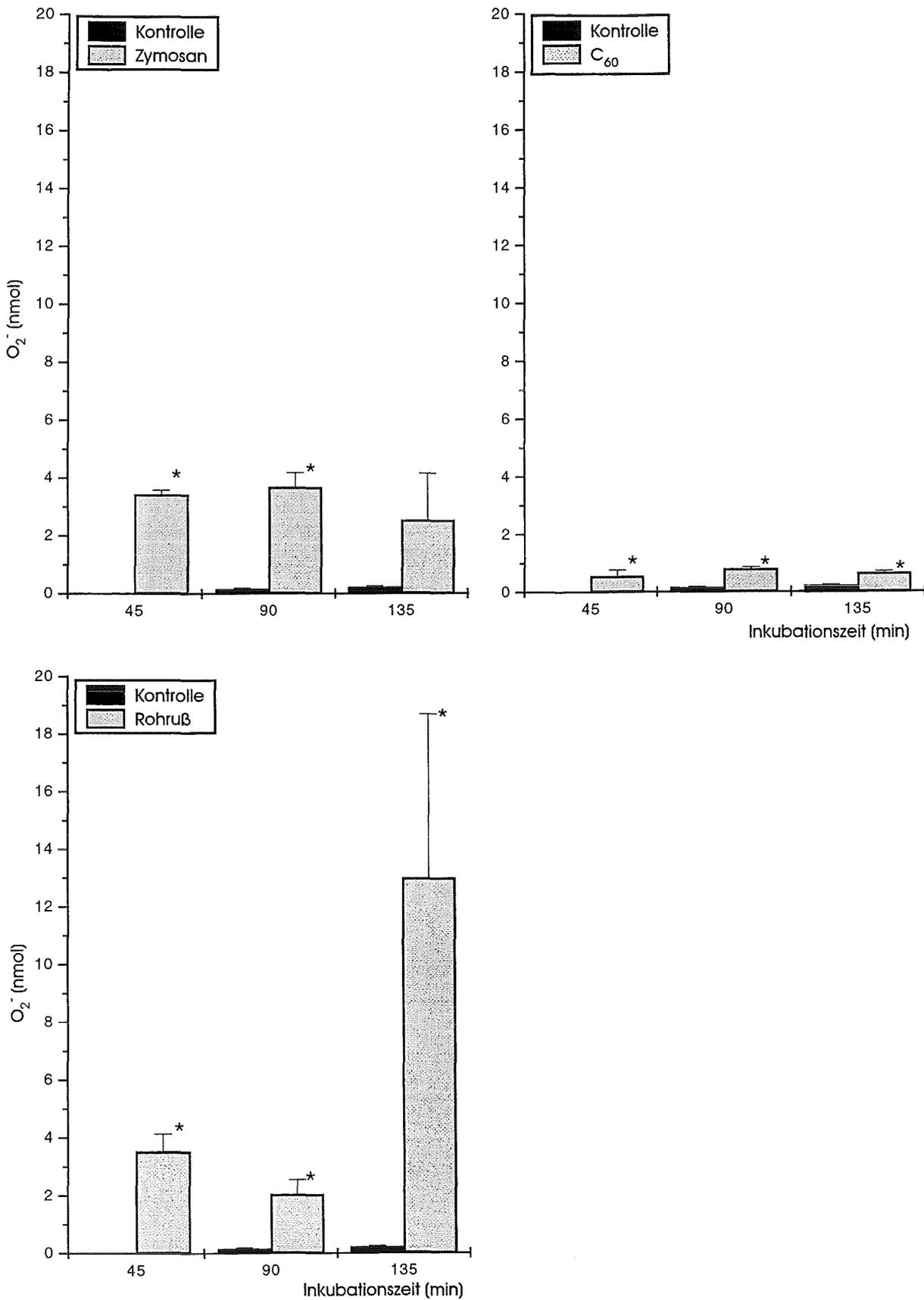


Abb. 43: O_2^- -Freisetzung (BEAS-2B-Zellen, Cytochrom C-Methode)

BEAS-2B-Zellen wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder Zymosan ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, einmaliger Versuch mit Doppelansatz, *=signifikant verschieden von Kontrolle ($p < 0,05$).

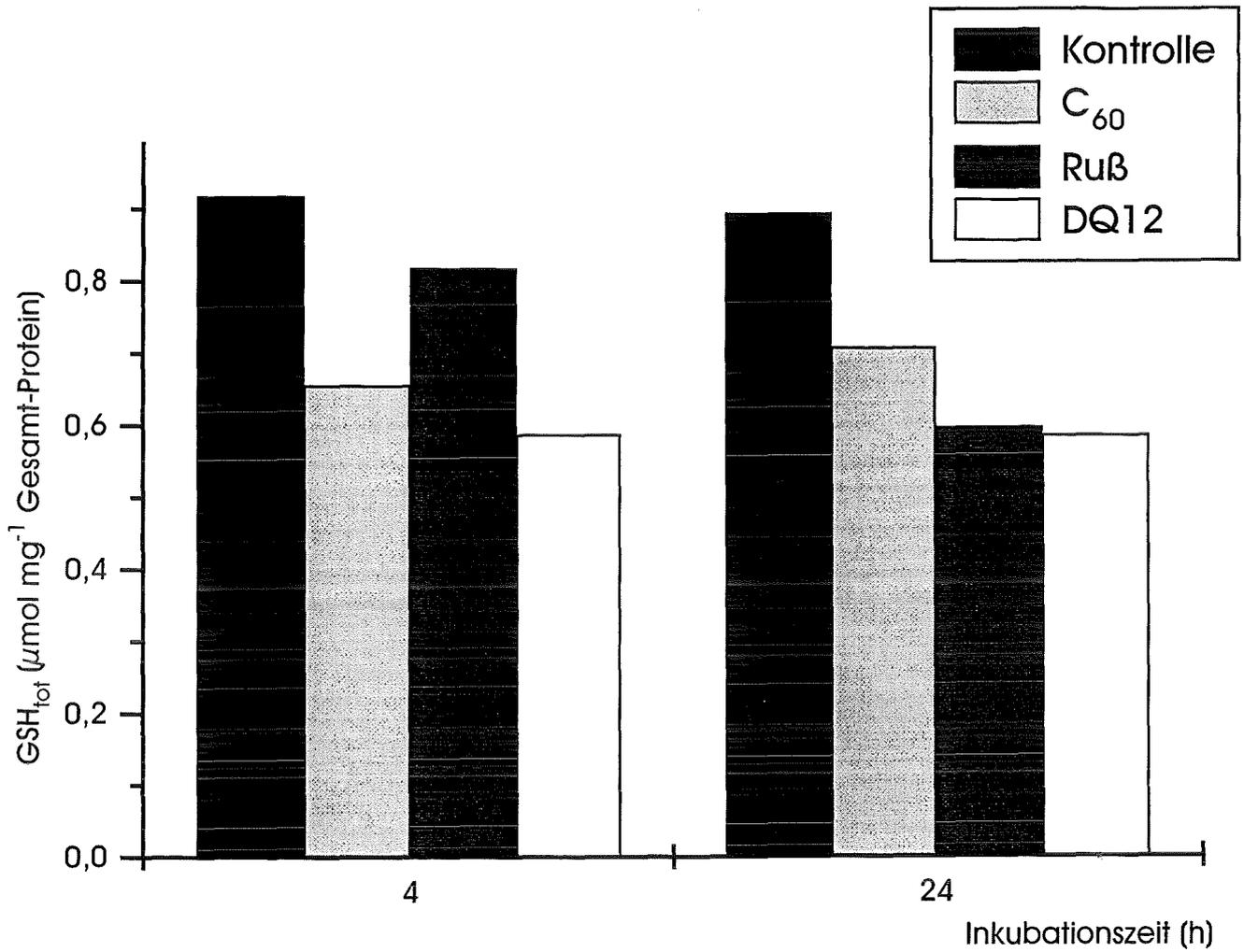


Abb. 44: Gesamt-Glutathion (BEAS-2B-Zellen)

BEAS-2B Zellen wurden mit Partikel-Dispersionen ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert.

Das Gesamtglutathion errechnet sich aus extrazellulärem und intrazellulärem Glutathion.

Arithmetische Mittelwerte, $n=2$, einmaliger Versuch mit Doppelansatz.

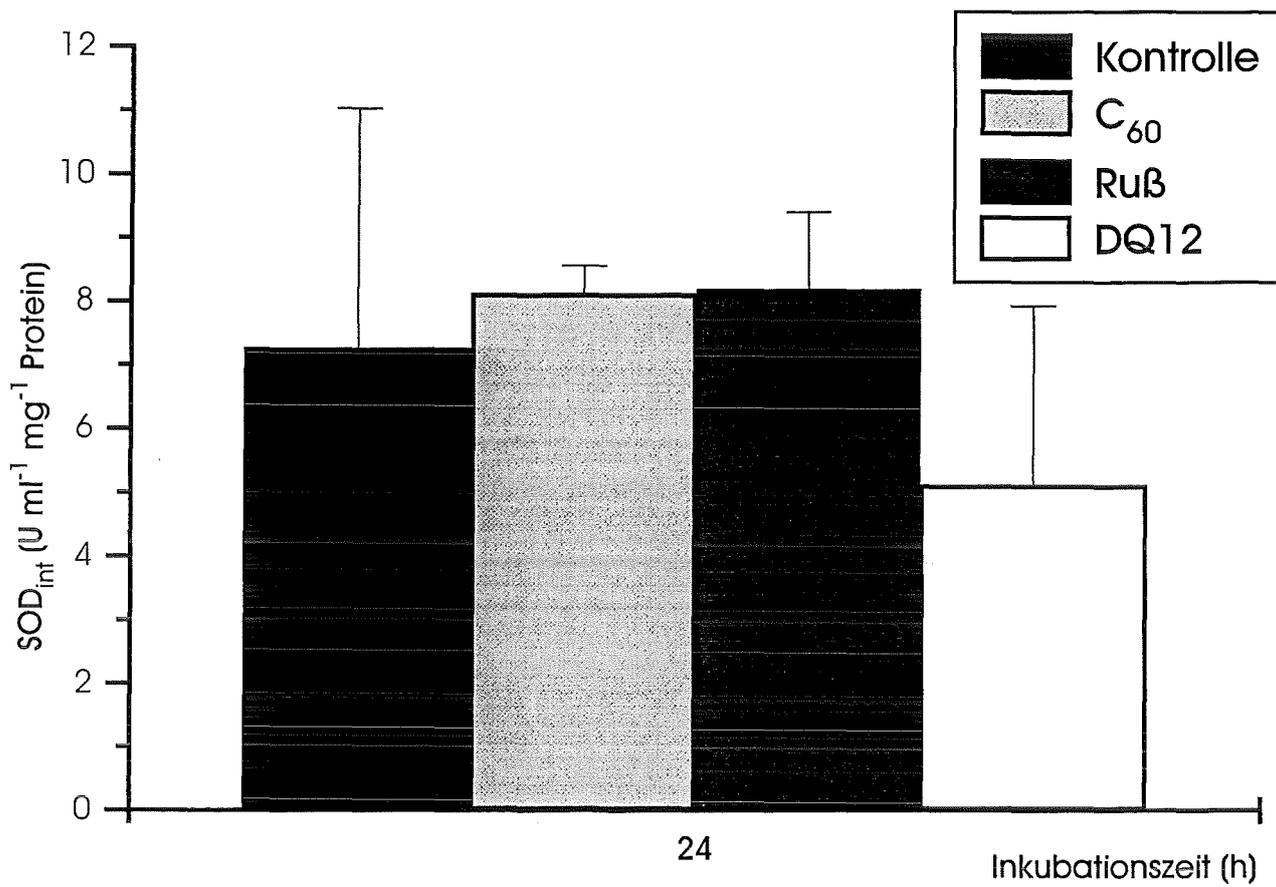


Abb. 45: Bildung von Superoxid-Dismutase (BEAS-2B-Zellen)

BEAS-2B-Zellen wurden mit Partikel-Dispersionen (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=4, einmaliger Versuch.

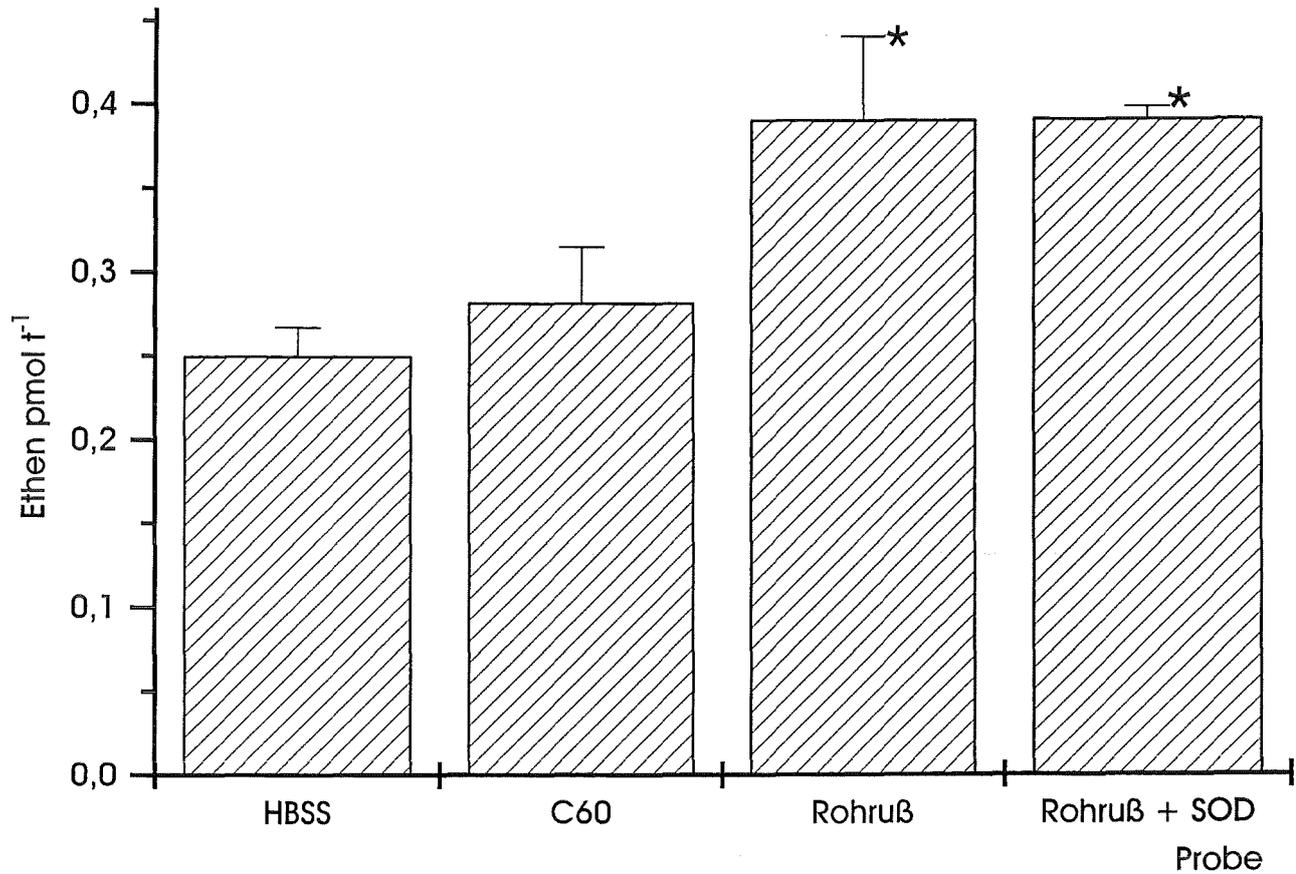


Abb. 46: Ethen aus α -Keto-S-Methyl-Buttersäure (KMB)

Abspaltung von Ethen aus KMB bei Inkubation mit einer C₆₀- oder Rohruß-Dispersion

(100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) bei 10 000 Lux und 37°C für 60 min im Schüttelwasserbad.

Arithmetische Mittelwerte \pm S.E., n=9 (außer Rohruß + SOD: n=3), repräsentativ für 2 Versuche, *= signifikant verschieden von Kontrolle (p<0,05).

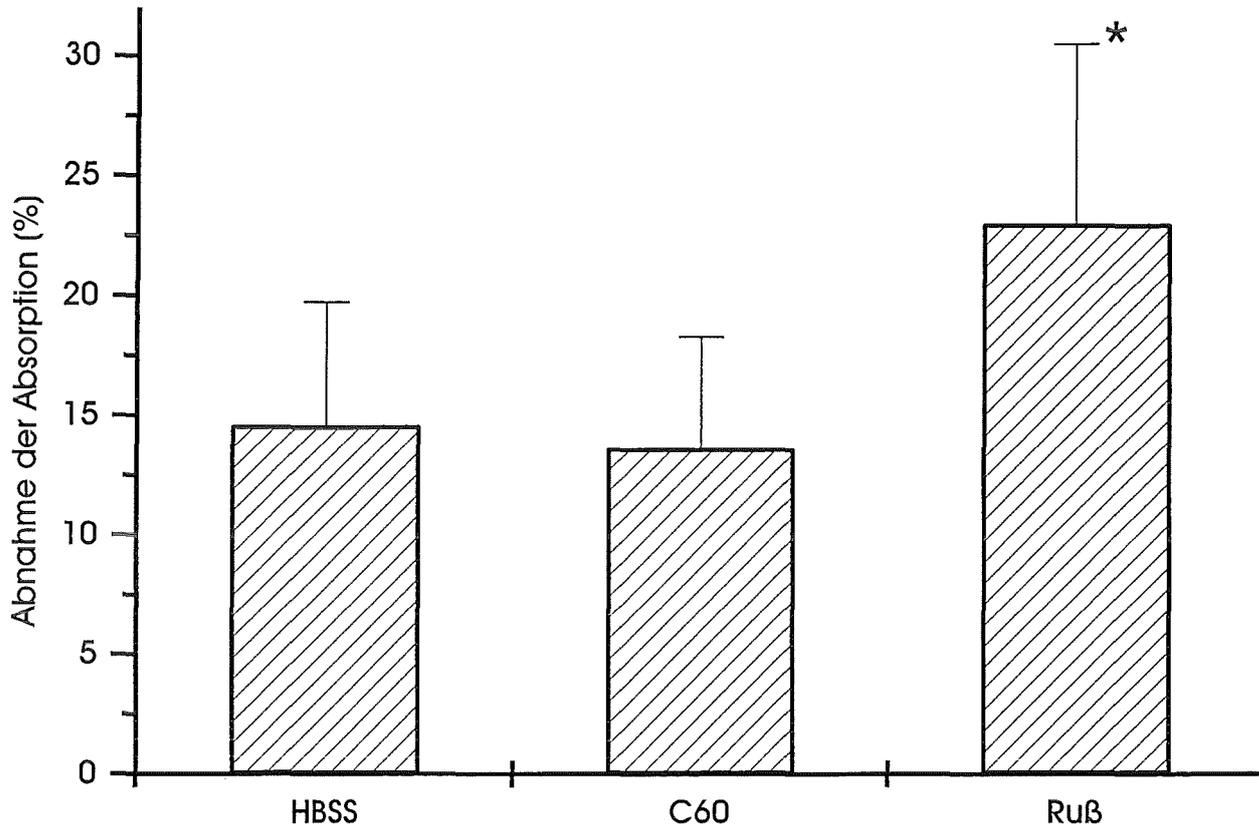


Abb. 47: Prozentuale "Bleichung" von Crocin

Crocin wurde mit einer C₆₀- oder Rohruß-Dispersion (100 µg ml⁻¹) bei 10 000 LUX und 37 °C für 60 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Daten geben die prozentuale Abnahme der Absorption in Bezug zum Ausgangswert (t=0 min, 440 nm) des selben Ansatzes an.

Arithmetische Mittelwerte ±S.E., n=7, repräsentativ für 3 Versuche, *= signifikant verschieden von der Kontrolle (HBSS, p<0,05).