

KfK 4624  
Oktober 1989

# **Zytotoxische Wirkungen von Quarz und Asbest: Ein in vitro Interspeziesvergleich mit Alveolarmakrophagen**

**J. Schimmelpfeng**  
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

**Kernforschungszentrum Karlsruhe**



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4624

**Zytotoxische Wirkungen von Quarz und  
Asbest: Ein in vitro Interspeziesvergleich  
mit Alveolarmakrophagen**

Jutta Schimmelpfeng

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

## **Zytotoxische Wirkungen von Quarz und Asbest: Ein in vitro Interspeziesvergleich mit Alveolarmakrophagen**

### Zusammenfassung

In dieser in vitro Studie wurde die zytotoxische Wirkung von Quarz und Chrysotil Asbest auf Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies verglichen. Qualitativ war die Reaktion der Zellen auf die Stäube gleich: Ihre Vitalität nahm ab, und die Freisetzung von zytoplasmatischem und lysosomalem Enzym nahm zu. Diese Vorgänge waren verbunden mit morphologischen Zellveränderungen. Das Ausmaß der Zellschädigung war konzentrationsabhängig. Dabei zeigte sich im Vergleich mit Angaben anderer Arbeitsgruppen, daß die Flächenbelegung der Kulturgefäße mit Stäuben der für das Ausmaß der Zellschädigung entscheidende Faktor war. Quantitativ ergaben sich Unterschiede in der Empfindlichkeit der Zellen auf geringe Mengen an Quarz und Chrysotil Asbest (50-100 µg/ml). Die Alveolarmakrophagen von Hund, Affe und Mensch wurden in diesem Konzentrationsbereich stärker geschädigt als die Zellen von Ratte und Rind. Eine gleichzeitige Inkubation der Alveolarmakrophagen mit Dipalmitoyl-Lecithin und Quarz (250 µg/ml) bewirkte einen Schutz vor der toxischen Quarzoberfläche. Das Ausmaß des Schutzeffektes variierte speziesspezifisch. Im Fall von Chrysotil Asbest konnte keine Reduktion der Fasertoxizität durch Dipalmitoyl-Lecithin beobachtet werden.

## **Cytotoxic effects of quartz and asbestos: Interspecies comparison of alveolar macrophages in vitro**

### Abstract

Cytotoxic effects of quartz and chrysotile asbestos on alveolar macrophages of different species were compared in vitro. The type of cell reaction towards the toxic dusts was always the same: a loss of viability was accompanied by the release of cytoplasmic and lysosomal enzymes. In addition, morphological changes were visible. The extent of cellular destruction depended on the applied dust concentration. In comparison with the results from other groups it could be concluded, that the amount of cell damage correlated with the surface cover of the culture vessel with dust. In the range of 50-100 µg quartz or chrysotile asbestos/ml species specific variations in the sensitivity of the cells were observed. At this concentration alveolar macrophages from dog, monkey and man were destroyed to a greater extent than the cells from rat and cattle. Simultaneous incubation of the cells with dipalmitoyl-lecithin and quartz (250 µg/ml) resulted in a reduction of the cytotoxic effect of quartz. The extent of this protective effect varied according to the species. In the case of chrysotile asbestos, no reduction in the toxicity of the fibres was observed in the presence of dipalmitoyl-lecithin.

## **Abkürzungen**

### Zellen

Ab-sRBC	Antikörpermarkierte Schafserythrozyten
sRBC	Schafserythrozyten
U937	Zellen der menschlichen, monozytären Zelllinie U937

### Kulturzusätze

BSA	Rinderserumalbumin
DPL	L- $\alpha$ -Dipalmitoyl-Lecithin
FCS	Fötales Kälberserum
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-2-Piperazinäthansulfonsäure
LF <sub>pur</sub>	Lavageflüssigkeit
LF <sub>konz.</sub>	Angereicherte Lavageflüssigkeit
PVPNO	Poly (2-Vinylpyridin-1-Oxid)
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Vit E	Vitamin E (D- $\alpha$ -Tocopherolacetat)

### Zellkultur-Fractionen

P	Fraktion der abgelösten Zellen (Pelletfraktion)
Ü	Überstandsfraktion
Z	Fraktion der adhärennten Zellen

### Injektionsorte

i.m.	intramusculär
i.p.	intraperitoneal
s.c.	subcutan

### Meßparameter

LDH	Lactat-Dehydrogenase
NAG	N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase
Prot	Protein
Vit	Vitalität

### Sonstiges

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
REM	Raster-Elektronenmikroskop
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

## **Inhaltsverzeichnis**

	Seite
<b>I. Einleitung</b>	7
<b>II. Material und Methoden</b>	
2.1. Gewinnung der Alveolarmakrophagen	12
2.1.1. Rinder-Alveolarmakrophagen	12
2.1.2. Ratten-Alveolarmakrophagen	12
2.1.3. Hunde-Alveolarmakrophagen	13
2.1.4. Affen-Alveolarmakrophagen	13
2.1.5. Menschliche Alveolarmakrophagen	13
2.2. Zellkulturen	
2.2.1. Anzucht der monozytären Zelllinie U937	14
2.2.2. Aussaat der Zellen	14
2.2.2.1. Morphologischer Ansatz	15
2.2.2.2. Biochemischer Ansatz	15
2.3. Verwendete Stäube	
2.3.1. Latex	16
2.3.2. Titandioxid	16
2.3.3. Dörentruper Quarz	17
2.3.4. Chrysotil Asbest	18
2.4. Kulturzusätze	
2.4.1. Lavageflüssigkeit	19
2.4.2. L- $\alpha$ -Dipalmitoyl-Lecithin	20
2.4.3. Rinderserumalbumin	20
2.4.4. D- $\alpha$ -Tocopherolacetat	20
2.5. Staubexposition und weitere Verarbeitung der Kultur- ansätze	
2.5.1. Vitalitätsbestimmung	21
2.5.2. Biochemische Untersuchungen	21
2.5.3. Fc-Rezeptor vermittelte Rosettenformation	24
2.5.4. Morphologische Untersuchungen	25
2.5.4.1. Lichtmikroskopie	25
2.5.4.2. Raster-Elektronenmikroskopie	28
2.6. Auswertung der Ergebnisse	30
2.7. Statistik	30

<b>III. Ergebnisse</b>	<b>Seite</b>
3.1. Wirkungen von Kontrollstäuben auf Rinder-Alveolar- makrophagen	31
3.2. Wirkungen von Quarz und Asbest auf Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und auf eine monozytäre Zelllinie	
3.2.1. Rinder-Alveolarmakrophagen	32
3.2.2. Ratten-Alveolarmakrophagen	35
3.2.3. Hunde-Alveolarmakrophagen	36
3.2.4. Affen-Alveolarmakrophagen	38
3.2.5. Menschliche Alveolarmakrophagen	39
3.2.6. Monozytäre Zelllinie U937	42
3.3. Interspeziesvergleich	
3.3.1. Kontrollzellen	44
3.3.2. Kontrollstäube	45
3.3.3. Toxische Stäube	45
3.3.3.1. Vitalitätsminderung durch Quarz und Asbest	45
3.3.3.2. Protein- und Enzymfreisetzung durch Quarz und Asbest	46
3.3.3.3. Morphologische Veränderungen	50
3.3.4. DPL-Schutzeffekt	51
3.3.5. Latex-Phagozytose	52
3.4. Weitere Kulturzusätze	52
<b>IV. Diskussion</b>	<b>54</b>
<b>V. Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>VI. Tabellen und Abbildungen</b>	<b>71</b>
<b>VII. Literatur</b>	<b>153</b>

## I. Einleitung

Die Emission gesundheitsgefährdender Feinstäube bildet in den Industrieländern ein Problem mit zunehmender Bedeutung. Spezifische Stäube sind für berufsbedingte Lungenerkrankungen wie Silikose, Silikotuberkulose, rheumatische Pneumokoniose, Kohlenarbeiterpneumokoniose (Anthrakose), Asbestose, Gewebsreaktion durch Metalle und Mischstäube (Eisenoxid, Wolfram, Nickel, Kadmium und Beryllium) und Pneumokoniosen durch verschiedene Minerale (Graphit, Bleicherde und Kaolin) verantwortlich (Netter, 1982).

Asbestinduzierte Erkrankungen der Atemwege fanden in der letzten Zeit große Beachtung in den Medien. So war von der Verseuchung von Schulgebäuden durch die Verwendung von asbesthaltigem Baumaterial die Rede (Asbestfrei nur auf Helgoland, Mackenthun, 1988). Asbest zeichnet sich durch Feuer- und Hitzebeständigkeit, Verspinnbarkeit der Fasern zu feuerfesten Geweben und durch mechanische Festigkeit aus. Er findet Anwendung in Hochdruck-Zementröhren, Filtertüten für die chemische Industrie, Gasmasken, Brems- und Kupplungsbelägen. Eine weitere Verwendung findet er auch als hitzebeständiger Asbestzement und in Form gepreßter Dachplatten. Der weitverbreitete Arbeitsstoff Asbest nimmt heute den ersten Platz unter den krebserzeugenden Arbeitsnoxen ein (Woitowitz et al., 1986).

Bei einer Inhalation von Asbest gelangen nur atemwegsgängige Fasern bis zu 50  $\mu\text{m}$  Länge und einem Durchmesser  $< 0,5 \mu\text{m}$  in die Alveolen. Die Asbestose läßt sich meist durch die Anwesenheit von Asbestkörperchen (Asbestfasern mit eisenreicher bräunlicher Eiweißhülle) im Sputum und in der Lunge nachweisen. Sie führt in ihrem weiteren Verlauf zu der sogenannten "Wabellunge" und in fortgeschrittenen Stadien zur Entstehung peripherer Adenokarzinome oder Plattenepithelkarzinome. In der letzten Zeit wurde die Zunahme der besonders bösartigen Pleura- und Peritonealmesotheliome nach kurzer Asbestexposition beobachtet (Netter, 1982).

Bei der Inhalation von Quarz gelangen lediglich Partikel  $< 10 \mu\text{m}$  in die Lunge und Partikel mit 1-3  $\mu\text{m}$  Durchmesser in die Alveolen. Diese Teilchen führen dort zu einer Freisetzung von Makrophagenenzymen, gefolgt von einer knötchenförmigen Agglomeration. Eine Zuwanderung von weiteren Makrophagen und Fibroblasten führt zu einer peripheren Zellreaktion, die das bekannte "Zwiebelschalenmuster" verursacht. Es besteht aus konzentrisch geschichteten Kollagenfasern. Bei Silikoseerkrankten besteht außerdem eine hohe Prädisposition für eine Tuberkulose (Netter, 1982). Gefährdet sind Bergleute, Steinmetzen, Porzellan- und Glasarbeiter, Sandstrahler, Gießereiarbeiter und Industrie-Ofenbauer.

Die Mechanismen der Fibroseentstehung sind heute noch nicht völlig aufgeklärt. Bekannt ist, daß die Inhalation von Asbest und Quarz zunächst eine entzündliche Reaktion in der Lunge verursacht. Diese kann drei Ursachen haben: eine hohe Enzymfreisetzung durch Zelltod als Folge der zytotoxischen Wirkung, die Abgabe von Mediatoren als Folge einer Zellstimulierung und eine

zelluläre Immunantwort in Form einer gesteigerten Lymphozytenproliferation, Immunglobulinsynthese oder Antigenpräsentation. In allen drei Fällen spielen Alveolarmakrophagen eine zentrale Rolle. Andere Zelltypen wie Granulozyten, Endothel- und Epithelzellen, Pneumozyten und Fibroblasten sind ebenfalls aktiv am staubinduzierten pathologischen Ablauf beteiligt. Sie können die primäre Reaktion verstärken oder modulieren. Die pathologische Proliferation von Fibroblasten führt zur Entstehung der interstitiellen Fibrose, die Asbest-induzierte Transformation von Epithelzellen und Mesothelzellen zur Entstehung von bronchogenen Karzinomen und den besonders bösartigen Mesotheliomen (Mossman und Marsh, 1985).

Durch Inhalationsstudien am Tier konnte gezeigt werden, daß staubinduzierte, beim Menschen beobachtete Krankheitsbilder auch im tierischen Modell künstlich induziert werden konnten. An diesen Tiermodellen konnte die Dosis-Effekt-Abhängigkeit und die Pathogenität der getesteten Substanzen festgestellt werden, um definitive Grenzwerte für den Menschen festzulegen. Seit einiger Zeit können Tierversuche reduziert und einzelne Aspekte toxischer Reaktionen *in vitro* an Zellkulturen untersucht werden. Eines der ersten Testsysteme zur Untersuchung der Zytotoxizität von Stäuben war das Erythrozyten-Hämolysemodell (Nash et al., 1966; Harington et al., 1971). *In vitro* Untersuchungen an Alveolar- und Peritonealmakrophagen folgten (Harington und Allison, 1965, Robock et al., 1973 b, Beck et al., 1973; Davies et al., 1974). Nach Morgan et al. (1980) war die Reaktion von Peritoneal- und Alveolarmakrophagen qualitativ vergleichbar.

Die Toxizität von Stäuben wird heute von zahlreichen Arbeitsgruppen an Makrophagen verschiedener Spezies untersucht, allerdings zum Teil mit völlig unterschiedlichen Versuchsanordnungen (Hill und Hobbs, 1982; Emerson und Davis, 1983; Jaurand et al., 1984; White et al., 1983, Wallace et al., 1985, Hannon et al., 1986; Lock et al., 1986; Morrison et al., 1986; Pasanen und Gustafsson, 1986; Donaldson et al., 1987, Benson et al., 1988 und Behrendt et al., 1989). Manche Arbeitsgruppen bevorzugen auch Zelllinien wie die Makrophagen-ähnliche Mauszelllinie P388 D1 (Kane et al., 1980), die menschliche, monozytäre Zelllinie U937 (Leoni und Dean, 1983) oder aus Monozyten *in vitro* gewonnene primäre Makrophagen (Seemayer und Braumann, 1985). Es ist jedoch nicht bekannt, wie weit die Reaktion der Makrophagen verschiedener Spezies auf toxische Stäube vergleichbar ist. Daher ist ein Interspeziesvergleich unter methodisch gleichen Bedingungen von großem Interesse. Um die Reaktion der tierischen Zellen auf den Menschen extrapolieren zu können, müssen auch menschliche Alveolarmakrophagen in diese Untersuchung mit einbezogen werden. Außerdem ist über die Vergleichbarkeit von Ergebnissen in verschiedenen Testsystemen mit anderen Zelldichten, Volumina, Staubkonzentrationen oder Kulturflächen nichts bekannt. Informationen über den Einfluß dieser Parameter sind unbedingt notwendig, damit die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen überhaupt miteinander verglichen werden können. Diese drei Aspekte, Interspeziesvergleich, Extrapolation auf menschliche Zellen und Ver-

gleichbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen methodischen Ansätzen, sollen in dieser Arbeit behandelt werden. Zusätzlich soll die Wirkung toxischer Stäube auf eine undifferenzierte menschliche monozytäre Zelllinie (U937) untersucht werden. Monozyten sind die Vorläuferzellen von Makrophagen. Sie wandern bei Entzündungsreaktionen der Lunge verstärkt in das Gewebe ein. Bei einer Übereinstimmung der Ergebnisse von primären Alveolarmakrophagen und der Zelllinie könnte bei weiteren Untersuchungen zum Mechanismus der Zytotoxizität von Stäuben ganz auf die Verwendung primärer Alveolarmakrophagen verzichtet werden.

Für die Untersuchungen wurden DQ12 Quarz, ein in der Forschung häufig verwendeter Standardquarz, und Chrysotil Asbest, ein ebenfalls häufig verwendeter Serpentinasbest, ausgewählt. Beide Stäube unterscheiden sich in Form, chemischer Zusammensetzung, Oberflächenladung und Oberflächeneigenschaften (Robock, 1973 a; Beck et al., 1973; Harington, 1976). Aus der Literatur ist bekannt, daß positiv oder negativ geladene Eisenpartikel durch unterschiedliche Mechanismen in die Zelle aufgenommen werden (Ono und Seno, 1986). Anionische Partikel werden selektiv nur von Makrophagen über Bindung an kationische Oberflächenrezeptoren in die Zelle aufgenommen und sehr schnell in Phago lysosomen in ihre Bestandteile aufgelöst. Kationische Partikel werden an negativ geladene Oberflächenmoleküle der Zellmembranen gebunden und ähnlich wie die anionischen Partikel in die Zelle aufgenommen. Sie gelangen jedoch nicht sofort, sondern frühestens 4-9 Stunden nach Aufnahme in Kontakt mit Lysosomen, wobei sie in dieser Zeit in kanalartigen Zellstrukturen verweilen. Es soll überprüft werden, ob die unterschiedliche Oberflächenladung von Quarz (negativ) und Chrysotil Asbest (positiv) auch zu nachweisbar unterschiedlichen Schädigungen bei den Alveolarmakrophagen führt.

Aus der Literatur war bekannt, daß die Abnahme der Zellvitalität und die Freisetzung von zytoplasmatischer Laktat-Dehydrogenase Indikatoren für Zellschädigung sind. Da eine Aktivierung von Zellen eine selektive Freisetzung lysosomaler Enzyme bewirkt (Unanue et al., 1976), soll auch die Freisetzung von N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase, einem lysosomalen Markerenzym, gemessen werden. Als zusätzlicher Parameter wird die Freisetzung von Gesamtprotein bestimmt, damit zu erkennen ist, wann eine spezifische Enzymfreisetzung erfolgt. Morphologische Untersuchungen auf Zellveränderungen sollen gemeinsame oder unterschiedliche Schadenscharakteristika aufdecken. Durch diese Kombination sollen, sofern vorhanden, Unterschiede im Reaktionsmuster der Zellen auf Quarz und Asbest sichtbar gemacht werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wird zunächst die Konzentrationsabhängigkeit toxischer Wirkungen von nativem Quarz und Asbest bestimmt. Dabei kann es zu einer schnellen Schädigung der Plasmamembran kommen, wie es im Erythrozyten-Hämolysemodell der Fall ist. Die Schädigung der Plasmamembran wird bei Quarz nach aktuellen Schadenstheorien durch eine Protonenübertragung (Nash et al., 1966) oder durch einen Elektronentransfer nach Wolkenstein (1964) verursacht. Die Folge ist eine Permeabilitätsstörung der Plasmamembran

und ein unkontrollierter Ein- und Ausstrom von Molekülen. Dabei sind die Protonen an der Quarzoberfläche für die Anheftung der Partikel und die Sauerstoffatome für die Lyse der Zelle verantwortlich (Nolan et al, 1981).

Die Möglichkeit einer Schädigung der Plasmamembran bestand auch bei der Inkubation von Zellen mit nativem Asbest. Gallagher et al. (1987) spekulierten, daß positive Partikel an Sialinsäure der Zellmembran gebunden werden. Diese Annahme konnte durch Neuraminidasebehandlung von Erythrozyten bestätigt werden. Nach der Entfernung der Sialinreste von der Membranoberfläche waren die behandelten Erythrozyten weniger empfindlich für Chrysotil Asbest (Harington, 1976). Hier verursacht die Interaktion der an der Oberfläche positiv geladenen Asbestfasern mit negativ geladenen Glykoproteinen der Zellmembran die Gruppenbildung von Proteinen (Leyko und Gendek, 1985). Dadurch wird die Zellmembran für kleine Ionen durchlässiger, was zu einem osmotischen Ungleichgewicht und ähnlich wie bei Quarz zur Lyse der Zellen führen kann.

Untersuchungen an Rinder-Alveolarmakrophagen mit nicht phagozytierbarem, festgeklebtem Quarz und Asbest (Hofheinz, 1988) haben jedoch ergeben, daß die hier beobachtete äußere Schädigung der Plasmamembran zu geringeren Schäden führte, als die Schädigung durch phagozytierbaren Quarz oder Asbest. Eine Schädigung der Zellen durch Quarz-induzierte Zerstörung der Lysosomen beschrieben schon Harington und Allison (1965). Es kommt demnach zu einem kombinierten Schaden von außen und von innen.

Um das *in vitro* Kultursystem möglichst realistisch zu gestalten, wird in zusätzlichen Untersuchungen der modifizierende Effekt von Dipalmitoyl-Lecithin (DPL) auf die Wirkung von Quarz und Asbest bestimmt. Damit werden die natürlichen Verhältnisse in der Lunge *in vitro* simuliert. Die Alveolen sind mit einem Gemisch aus Proteinen und Lipiden, dem Surfactant, ausgekleidet (Harwood, 1987). Die Lipide werden von den Typ II Epithelzellen synthetisiert und machen ca. 85-90 % des Surfactants aus. Sie sorgen für die geringe Oberflächenspannung des Surfactants, die das expiratorische Kollabieren der Alveolen verhindert. Phosphatidylcholine, zu denen auch Dipalmitoyl-Lecithin gehört, machen 70-80 % der Lipidmasse aus. Bezüglich des Gehaltes an Phosphatidylcholinen konnten keine speziesspezifischen Unterschiede bei Ratte, Rind, Hund und Mensch beobachtet werden. (Harwood, 1987). Die Proteine setzen sich aus Serumalbumin und zwei niedermolekularen Proteinen zusammen. Sie machen ca. 10 % der Masse aus. Die Funktion des Serumalbumins ist noch unbekannt, während die Funktion der beiden anderen Proteine in der schnellen Bildung des Phospholipidfilmes in den Alveolen liegt. Die Inhalation von Quarz, Asbest oder Nickel führt zu einem Anstieg des gesamten Lungen-Phospholipidgehaltes mit besonders hohen DPL-Werten. Dieses wird als körpereigener Schutz gedeutet, da die Partikel kurzfristig weniger zytotoxisch wirken (Harwood, 1987). Durch Spülung von Lungen erhaltene Lavageflüssigkeit beinhaltet zusätzlich einige Enzyme und andere Substanzen, die von Zellen durch Lyse oder Synthese in das Lungenlumen abgegeben wurden.

Hendersen et al. (1987) beschrieben bis auf kleinere speziesspezifische Variationen ähnliche Werte für Protein- und Enzymgehalte in Lavageflüssigkeiten von Hamster, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen. Staubpartikel können, bevor sie von Makrophagen phagozytiert werden von diesem Surfactant umhüllt werden. Aus diesem Grund soll die modifizierende Wirkung von Lavageflüssigkeit und synthetischem DPL auf die Quarz- und Asbesttoxizität an Rinder-Alveolarmakrophagen untersucht werden und auf speziesspezifische Variationen bezüglich der DPL-Wirkung überprüft werden.

In dieser Arbeit soll geprüft werden, wie Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und U937-Zellen qualitativ und quantitativ auf die Exposition mit nativem Quarz oder Asbest reagieren. Dabei wird darauf geachtet, ob das Muster der Protein- und Enzymfreisetzung durch die Zellen auf unterschiedliche Mechanismen der Zellschädigung durch Quarz- oder Asbest schließen läßt. Eine Untersuchung des modifizierten Effektes von Quarz und Asbest in Gegenwart von DPL soll zeigen, ob speziesspezifische Unterschiede im DPL-Schutzeffekt bestehen. Rinder-Alveolarmakrophagen stellen durch die hohe Ausbeute an genetisch homogenem Zellmaterial (ca.  $1,5 \times 10^9$  Zellen/Lunge) ein geeignetes Testsystem zur Untersuchung der toxischen Wirkung auf Zellen oder deren Organellen (siehe Pätzold, 1989) dar. Durch einen Vergleich mit menschlichen Alveolarmakrophagen soll festgestellt werden, ob sie als Modell zur Untersuchung der toxischen Wirkung von Stäuben geeignet sind. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur besseren Vergleichbarkeit der in vitro an verschiedenen tierischen Zellen gewonnenen Ergebnisse geleistet werden.

## II. Material und Methoden

### 2.1. Gewinnung der Alveolarmakrophagen

(Zellzusammensetzung in der Lavageflüssigkeit siehe Tabelle 1)

#### 2.1.1. Rinder-Alveolarmakrophagen

Rinder-Alveolarmakrophagen wurden aus Lungen frisch geschlachteter Tiere, hauptsächlich männlicher Jungbullen, durch bronchoalveoläre Lavage gewonnen. Dabei wurden die Lungen ca. 6 mal mit 3 bis 5 l 0,9 %iger Kochsalzlösung gespült. Die Flüssigkeit wurde anschließend durch mehrere Lagen Mull und feine Gaze (ca. 150 µm Maschenweite) filtriert, danach wurden die Zellen 10 Minuten bei 250g und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in wenig eiskalter Kochsalzlösung aufgenommen, auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 40 ml eiskalter Kochsalzlösung resuspendiert, und je 10 ml Zellsuspension wurden in einem Plastikzentrifugenröhrchen mit 15 ml Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) unterschichtet. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 250 g (4°C) waren die vitalen Alveolarmakrophagen in einer dicken Bande über der Ficoll-Paque-Schicht angereichert. Diese Zellbande wurde abgenommen, in Kochsalzlösung gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI 1640 Medium mit 100 U Penicillin/ml und 100 µg Streptomycin/ml resuspendiert und bis zur Aussaat der Zellen auf Eis aufbewahrt.

#### 2.1.2. Ratten-Alveolarmakrophagen

Ratten-Alveolarmakrophagen wurden aus den Lungen ca. 250 g schwerer männlicher Sprague-Dawley Ratten (Wiga Versuchstierzucht, Sulzfeld) durch bronchoalveoläre Lavage gewonnen. In einem Vorversuch wurde der Einfluß des Narkosemittels (Äther versus Nembutal) auf die Vitalität und die Enzymfreisetzung der Ratten-Alveolarmakrophagen untersucht. Wegen geringerer Ausgangsvitalität der Zellen und (Abb. 1) erhöhter Enzymfreisetzung (LDH) durch die Kontrollzellen nach Betäubung der Tiere mit Äther wurden alle weiteren Tiere mit Nembutal (Serva, Heidelberg, 120 mg/kg i.p.) narkotisiert und durch Ausbluten (Öffnen der Vena cava) getötet. Nach dem Eröffnen des Brustraumes und der Freilegung der Trachea wurde eine Kanüle mit abgerundeter Spitze in die Luftröhre eingeführt und dort festgebunden. Anschließend wurde 6 mal mit je 5 ml 0,85 %iger Kochsalzlösung (Brain, 1971) gespült. Nach jeder Füllung wurde die Lunge 30 Sekunden vorsichtig massiert. Da die Zellausbeute bei 2 bis 3 x 10<sup>6</sup> Zellen je Lunge lag, wurden die Zellen verschiedener Tiere in anfänglichen Versuchen (n = 4) separat verwendet und in späteren vereinigt. Bezüglich der Vitalität der Zellen und deren Enzymfreiset-

zung konnte kein Unterschied gegenüber den von mehreren Tieren vereinigten Zellen festgestellt werden. Die Zellen wurden bis zu ihrer Aussaat auf Eis aufbewahrt.

### **2.1.3. Hunde-Alveolarmakrophagen**

Die Lavage wurde von Dr. W. G. Kreyling, Dr. L. Ruprecht und Dr. E. Matejkova (GSF, München) durchgeführt.

Männlichen Beagle Hunden (ca. 2-3 Jahre alt, 10-13 kg Körpergewicht) wurde 10-15 Minuten vor der Narkose 1 ml 0,5 mg Atropin/ml s.c. (Fresenius, Bad Homburg) injiziert. Danach wurde ihnen 15- 20 mg Surital/kg Körpergewicht (Parke-Davis & Company, München) verabreicht. Nach Einführung eines Fiberbronchoskopes durch die Mundöffnung wurden 3 Segmente von verschiedenen Lungenlappen (Vorder-, Mittel- und Hinterlappen) der rechten Lunge mit jeweils 3 x 15 ml gepufferter Kochsalzlösung PM 16 (Serva 33842, Heidelberg) gespült. Die instillierte Flüssigkeit wurde durch Erzeugung eines geringen Unterdrucks zurückgewonnen. Die Zellen verschiedener Tiere wurden nicht vereinigt und bis zu ihrer Aussaat auf Eis aufbewahrt.

### **2.1.4. Affen-Alveolarmakrophagen**

Die Lavage wurde von Dr. F. Krombach (Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, Universität München) durchgeführt.

Männliche Rhesusaffen der Spezies *Macaca fascicularis* (ca. 3 Jahre alt, 3 - 4 kg Körpergewicht) wurden mit 15 mg Ketamin/kg Körpergewicht i.m. (Parke-Davis & Company, München) und 2 mg Xylazin/kg Körpergewicht i.m. (Bayer, Leverkusen) anästhesiert. Über ein flexibles fiberoptisches Bronchoskop (BF P10, Olympus, München) wurden insgesamt 100 ml sterile Kochsalzlösung in 20 ml Aliquots in den Hauptbronchus der linken Lunge instilliert. Nach jeder Instillation wurde die Spülflüssigkeit sofort wieder von Hand in eine Spritze zurückgezogen. Die Zellen der verschiedenen Tiere wurden nicht vereinigt und bis zu ihrer Aussaat auf Eis aufbewahrt.

### **2.1.5. Menschliche Alveolarmakrophagen**

Diese Lavage wurde von Dr. G. Würtemberger (Robert-Koch-Klinik, Universität Freiburg) durchgeführt.

Zu diagnostischen Zwecken wurden Patienten beiderlei Geschlechts nach Injektion eines Beruhigungsmittels mit 1 %iger Novesine-Lösung lokal anästhesiert. Die Einführung eines Fiberbronchoskopes erfolgte im Gegensatz zu Hund und Affe durch die Nasenöffnung. Terminale Bronchiolen und die Alveolen wurden 5 mal mit je 20 ml steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung gespült und sofort nach Instillation von Hand vorsichtig in die Spritze zurückgezogen. Die Zellen,

Alveolarmakrophagen eines Rauchers (69 Jahre, 50 - 66 "man pack years" mit chronischer Bronchitis, sonst kein Lungenbefund) und zweier Sarkoidose Patienten (einer Frau, 40 Jahre, Stadium I ohne Steroidvorbehandlung und eines Mannes, 31 Jahre, Stadium II, mit 9-monatiger Steroidvorbehandlung, vor Zellentnahme 4 Monate behandlungsfrei) wurden auf Eis transportiert und konnten ca. 2 Stunden nach ihrer Gewinnung in die Kulturschalen ausgesät werden.

## **2.2. Zellkulturen** (Übersichtsschema zum gesamten Versuchsablauf siehe Abbildung 2)

### **2.2.1. Anzucht der monozytären Zelllinie U937**

Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus einem histiozytären menschlichen Lymphom durch einfaches Passagieren gewonnen. Sie besitzt monozytäre Merkmale (Fc-Rezeptoren, Tab. 2) und Eigenschaften (Fähigkeit zur Phagozytose, Tab. 2). In Gegenwart von TPA können die Zellen zu Makrophagen differenzieren (Sundström und Nilson, 1976). Wir erhielten diese Zelllinie (im folgenden als Tübinger U937-Zellen bezeichnet) über Herrn Prof. Dr. H. Rahmsdorf (KfK, Karlsruhe) aus dem Labor von Herrn Prof. Dr. A. Ziegler (Universität Tübingen). Da sich die Tübinger U937-Zellen in einigen Parametern anders verhielten als die in der Literatur beschriebenen Klassischen U937-Zellen, wurden bei der ATCC-Gesellschaft (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) Amerikanische U937-Zellen zum Vergleich mit den bisher verwendeten Tübinger U937-Zellen bestellt. Die Tübinger U937-Zellen wurden zusätzlich von Herrn Dr. R. Hass (Medizinische Hochschule Hannover, Molekularpharmakologie) auf immunologische und biochemische Parameter, wie Prostaglandinsynthese nach TPA-Differenzierung und Oberflächenantigene Determinanten der Zellmembran untersucht (Tab. 3). Diese Untersuchungen ergaben, daß es sich bei der von uns verwendeten Tübinger U937-Zelllinie voraussichtlich um einen in Richtung Monozyt weiter entwickelten Subklon der ursprünglichen U937-Zellen handelt. Die Tübinger U937-Zellen (Tab. 3) wiesen gegenüber den dort verwendeten U937-Zellen (ATCC) vermehrt CD14 Antigen, einen spezifischen Monozytenmarker, an der Oberfläche der Plasmamembran auf. Die Tübinger U937-Zellen waren jedoch im Gegensatz zu den Klassischen U937-Zellen Esterase negativ und synthetisierten kein Prostaglandin nach TPA induzierter Differenzierung. Die Anzucht der Zellen erfolgte als Suspensionskultur in 250 ml Gewebekulturflaschen (Greiner 658170, Nürtingen) in RPMI 1640 Medium (Gibco limited, Paisley, Schottland) mit 15 % FCS, 100 µg Ampicillin/ml (Boehringer T3258, Mannheim) und 10 µg Tetracyclin/ml (Sigma 104397 25/01, St. Louis). Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 0,1 bis 0,2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml ausgesät, Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag. Die Verdopplungszeit betrug unter diesen Bedingungen 4 bis 6 Tage (Tab 2).

### 2.2.2. Aussaat der Zellen

Nach der Bestimmung von Zellzahl (Neubauerkammer) und Vitalität der Zellen (Trypanblau-Ausschlußverfahren) erfolgte die Aussaat der Zellen in 35 mm Zellkulturschalen (Falcon 3046/Becton Dickinson & Company, New Jersey). Es wurde in zwei verschiedenen Ansätzen gearbeitet:

#### 2.2.2.1. Morphologischer Ansatz

Zur Bestimmung der **Vitalität** der Zellen nach Staubexposition wurden die Alveolarmakrophagen aller Spezies und die U937-Zellen in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml RPMI 1640 Medium mit 100 U Penicillin/ml und 100 µg Streptomycin/ml ausgesät.

Für weitere histochemische Ansätze (**Hemacolor- und Esterase Färbungen**) und für Raster-Elektronenmikroskopische Präparationen (**REM-Präparate**) wurden auf Deckgläser (24 x 24 mm, Firma Menzel) oder in Plastikgewebekulturschalen ausgesäte Monolayer Kulturen verwendet. Die Rinder-Alveolarmakrophagen wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml, die Ratten- und U937-Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät. Bei den Alveolarmakrophagen von Hund, Affe und Mensch wurden aus Gründen der Zelleinsparung auf Deckgläser aufgesetzte Silikonumrandungen (Heraeus Flexiperm, München) mit 1 cm Durchmesser verwendet. In diese wurden 300 µl Zellsuspension ( $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml) gegeben. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Umrandung entfernt und die Zellen wie in den anderen Ansätzen in 1 ml Medium mit und ohne Staubzugabe inkubiert. Eine Variation der Zelldichte war möglich, da sie keinen Einfluß auf das Ausmaß der zytotoxischen Quarzeffekte hatte (Abb. 3).

#### 2.2.2.2. Biochemischer Ansatz

Für die biochemischen Untersuchungen (**Freisetzung von Protein und Enzymen**) wurden die Zellen in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät. Eine Ausnahme bildeten die Rinder-Alveolarmakrophagen, die im Gegensatz zu den Alveolarmakrophagen der anderen Spezies in ausreichender Menge vorhanden waren (ca.  $1,5 \times 10^9$  Zellen/Lunge). Sie wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät. Die eingebrachte Zellzahl hatte auch bei den biochemischen Parametern keinen Einfluß auf das Ausmaß der Zytotoxizität von Quarz (Abb. 4). Die Alveolarmakrophagen wurden 2 Stunden zum Anheften inkubiert (37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>). Danach erfolgte ein Mediumwechsel, und anschließend wurden die Zellen 2 oder 20 Stunden mit den verschiedenen Stäuben inkubiert. Die Vorinkubationszeit zur Anheftung entfiel bei den U937-Zellen, da sie in diesem Zeitraum in Suspension blieben. Innerhalb des 20-stündigen Inkubationsintervalls heftete sich jedoch der größte Teil der U937-Zellen an den Plastikuntergrund an (Abb. 35 und 36).

## 2.3. Verwendete Stäube

(Übersicht siehe Tabelle 4)

### 2.3.1. Latex

Es wurde mit zwei verschiedenen Latex Partikelgrößen gearbeitet:

**Standard Dow Latex: 0,822  $\mu\text{m}$   $\pm$  0,0083  $\mu\text{m}$  (Serva 41947, Heidelberg)**

**Standard Dow Latex: 2,020  $\mu\text{m}$   $\pm$  0,0135  $\mu\text{m}$  (Serva 41953, Heidelberg)**

### 2.3.2. Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ )

Titandioxid kommt in drei natürlichen kristallinen Modifikationen vor: Rutil, Anatas und Brookit, wobei Rutil die stabilste und häufigste Form darstellt. Verwendet wurden folgende Formen:

**Titandioxid, Anatas (Aldrich Chemical Company 23203, Milwaukee, Wisconsin)**

Die Spurenelementanalyse (spektrografisch) der Herstellerfirma ergab folgende Verunreinigungen:

Element	ppm
Zr	100 - 200
Ca	40
Al	30 - 50
Si	3 - 10
Fe	2 - 5
Mn	1 - 3
V	1 - 3
Ag	1
Cu	1
Mg	1
Pb	1

**Titandioxid, Rutil (Aldrich Chemical Company 22422-7, Milwaukee, Wisconsin)**

Die Spurenelementanalyse (spektrografisch) der Herstellerfirma ergab folgende Verunreinigungen:

<b>Element</b>	<b>ppm</b>
Ca	90
Al	10
Fe	10

**Titandioxid, 98 % Anatas, 2 % Rutil (Polysciences, Inc. 16941, St Goar)**

Vom Hersteller angegebene Verunreinigungen:

<b>Element</b>	<b>(% w/w)</b>
Si	0,03
Pb	0,01
Ca	0,001
Mg	0,001

**2.3.3. Dörentruper Quarz, Fraktion 12 (DQ12)**

Zusammensetzung des DQ12 Standard Quarzes nach Robock (1973 a):

<b>Element</b>	<b>(%)</b>
kristalliner Quarz	87
amorphes SiO <sub>2</sub> und Kaolinit	13
Ca	1,0
Ti	0,6
Fe	0,2
K	0,2
Al	0,1
Na <sub>2</sub> O	0,01
K <sub>2</sub> O	0,01
LiO <sub>2</sub>	< 0,01

In dieser Arbeit wurde eine auf 300 mg limitierte DQ12 Fraktion (Sack 28, 1969) verwendet, die uns von Herrn Prof. Dr. N. H. Seemayer (Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde.

Eine Röntgenstrahlen-Beugungs-Spektroskopie, durchgeführt von Herrn Prof. Dr. C. Politis (KfK, INFP) ergab die gleiche hexagonale Kristallstruktur wie für einen Standard-Nieder-( $\alpha$ )-Quarz des National Bureau of Standards der USA.

#### 2.3.4. Chrysotil Asbest (Kanadischer UICC Chrysotil A Asbest)

Es handelt sich bei Chrysotil Asbest um einen Serpentin Asbest. Die in dieser Arbeit verwendeten Fasern wurden uns von Herrn Prof. Dr. K. Spurny (Fraunhofer-Institut, Schmallenberg-Grafschaft) zur Verfügung gestellt. Die Faserlängenverteilung für den verwendeten Asbest wurde uns von Herrn Spurny wie folgt angegeben:

Länge ( $\mu\text{m}$ )	< 0,5	< 1,0	< 2,0	< 5,0	< 10,0	< 25,0	< 50,0
Anteil (%)	30,6	64,0	83,8	97,0	98,9	99,7	99,9

Folgende Verunreinigungen wurden von Frau Dr. C. Adelhelm (KfK, IMF I) nachgewiesen:

Element	(% Gewicht)
Fe	1,73 $\pm$ 0,35
Al	0,55 $\pm$ 0,09
Ti	0,012 $\pm$ 0,005

Alle Stäube wurden auf einer Analysenwaage frisch eingewogen, in RPMI 1640 Medium mit 100 U Penicillin/ml und 100  $\mu\text{g}$  Streptomycin/ml suspendiert und 50 mal mit einem Branson Sonifier B15 bei 75 W pulsbeschallt. Der Asbest wurde nicht beschallt, sondern intensiv geschüttelt, damit er nicht unkontrolliert in dünnere Fasern aufspaltete (Woitowitz et al., 1986).

Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche der Stäube wurde größtenteils von Frau Dr. E. Drosselmeyer (KfK, IGT) durchgeführt. Sie erfolgte nach dem Brunauer, Emmet und Teller (BET) Verfahren.

Die Durchmesser der Partikel wurden an Transmissions- oder Raster-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemessen. Die Stäube wurden jedoch nach Gewicht verabreicht, da eine genaue Bestimmung der Partikelzahl nicht möglich war. Bei Titandioxid, Quarz und Asbest konnten nur mittlere Größen angegeben werden. Die Auswertung von Raster-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergab eine sehr starke Streuung der Partikelgrößen (Tab. 4). Zusätzlich wurde die Bildung von Aggregaten aus mehreren Partikeln beobachtet. 500 µg Titandioxid (Anatas, Aldrich) entsprachen ca.  $2,9 \times 10^9$  Teilchen, und 500 µg Titandioxid (Rutil, Aldrich) entsprachen ca.  $2,3 \times 10^8$  Teilchen. 250 µg DQ12 Quarz entsprachen ca.  $3,8 \times 10^8$  Teilchen. Bei den monodispersen Latex- und Titandioxid-Teilchen war eine genauere Bestimmung der Partikelzahl möglich. 50 µg Latex (0,8 µm) entsprachen  $7,4 \times 10^8$  Teilchen, 250 µg Latex (2,0 µm) entsprachen  $5,7 \times 10^7$  Teilchen, und 500 µg Titandioxid (Anatas, Polysciences) entsprachen  $1,1 \times 10^9$  Teilchen.

Die Herstellung der unterschiedlichen Titandioxide erfolgte durch Hochtemperatur Hydrolyse von Titan-tetrachlorid Aerosoltropfen (Anatas, Polysciences), die Sulfat-Methode (Anatas, Aldrich/mdl. Mitteilung, Frau v. Celiz, Firma Aldrich) oder die Pyrit-Methode (Rutil, Aldrich/mdl. Mitteilung, Frau v. Celiz, Firma Aldrich).

## **2.4. Kulturzusätze**

### **2.4.1. Lavageflüssigkeit**

#### **2.4.1.1. Gewinnung der Lavageflüssigkeit ( $LF_{pur}$ )**

Die erste Kochsalzfällung einer Rinderlunge (ca. 3 l, siehe 2.1.1.) wurde 10 Minuten (250 g, 4°C) zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde anschließend 30 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, um größere Zellbestandteile (Zelltrümmer) aus der Lösung zu entfernen. Für anfängliche Versuche wurde die Lavageflüssigkeit sterilfiltriert. Dieser Vorgang reduzierte jedoch die Phospholipid- und Proteinkonzentration auf ca. 36 % der Ausgangsmenge. Bei den letzten Versuchen wurde daher auf die Sterilfiltration verzichtet. Untersuchungen von Herrn Dr. W. Bernhard (Polyklinik, Phillips Universität Marburg) nach Mason et al. (1976) ergaben einen Gehalt von ca.  $14 \pm 4$  µg desaturierten Phosphatidylcholinen/ml Lavageflüssigkeit, die zu 70-86 % aus DPL bestanden. Die Endkonzentration in den Kulturansätzen betrug ca.  $7 \pm 2$  µg DPL/ml und ca. 4 µg Protein/ml.

#### **2.4.1.2. Anreicherung der Lavageflüssigkeit (LF<sub>konz.</sub>)**

Nach dem 3000 g Zentrifugationsschritt folgte eine weitere 30-minütige Zentrifugation bei 190000 g und 4°C, um Phospholipide und Proteine aus dem Überstand anzureichern. Die Pellets (Ausgangsvolumen 30 ml) wurden in 1,5 ml RPMI 1640 Medium aufgenommen.

#### **2.4.2. L- $\alpha$ -Dipalmitoyl-Lecithin (DPL)**

L- $\alpha$ -Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (Sigma 0763, St. Louis) wurde simultan mit Quarz- oder Asbest auf die Zellen gegeben, so daß die Endkonzentration der Stäube 250  $\mu$ g/ml und die Endkonzentration der Lecithinlösung 333  $\mu$ g/ml RPMI 1640 Medium betrug (modifiziert nach Wallace et al., 1985). Eine Vorinkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit DPL-Lösung (Abb. 5) und anschließende Inkubation mit nativem Quarz (20 Stunden-Intervall) bewirkte keinerlei Schutzeffekt für die Zellen und keine Minderung der zytotoxischen Quarzwirkung.

#### **2.4.4. Rinderserumalbumin (BSA)**

Verwendet wurde eine doppelt konzentrierte BSA-Lösung (Serva, Heidelberg), deren Endkonzentration nach Mischung mit der Staubsuspension 5 mg/ml RPMI 1640 Medium betrug.

#### **2.4.5. D- $\alpha$ -Tocopherolacetat (Vitamin E-Derivat)**

Verwendet wurde eine doppelt konzentrierte D- $\alpha$ -Tocopherolacetatlösung (Dr. Schiefer Arzneimittel GmbH, Köln), deren Konzentration nach Mischung mit der Staubsuspension 1 mg/ml RPMI 1640 Medium betrug.

Die vier Suspensionen wurden in RPMI 1640 Medium mit Antibiotikazusatz in den genannten Konzentrationen angesetzt und vor Gebrauch 3 Minuten auf Eis beschallt.

## **2. 5. Staubexposition und weitere Verarbeitung der Kulturen**

Nach einer Anheftungszeit von 2 Stunden wurden die Zellen 2 oder 20 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 100 U Penicillin/ml und 100 µg Streptomycin/ml ohne und mit Stäuben (50-500 µg/ml) inkubiert. Nach Ablauf dieses Zeitintervalls wurde die Vitalität der adhärenen Zellen in den dafür vorgesehenen **Vitalitätsansätzen** durch das Trypanblau-Ausschlußverfahren bestimmt.

In den **biochemischen Ansätzen** wurden die Medienüberstände abgenommen und zur Abtrennung der abgelösten Zellen und Zelltrümmer 10 Minuten (250 g, 4°C) zentrifugiert. Lichtmikroskopische Untersuchungen nach Färbung mit Trypanblau ergaben, daß die aus den Überständen von Kontrollkulturen gewonnenen Pellets zu 80% aus lebenden Zellen, die Pellets von quarzbehandelten Kulturen zu 80 % aus Zelltrümmern bestanden. Diese Pellets (**P**) wurden in je 1 ml Medium aufgenommen und zusammen mit den nun zellbestandteilsfreien Überständen (**Ü**) bei - 20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Die adhärenen Zellen (**Z**) wurden mit einem Plastischaber vom Untergrund abgekratzt, in 1 ml Medium aufgenommen und ebenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20°C eingefroren.

### **2.5.1. Vitalitätsbestimmung**

Die Vitalitätsbestimmungen wurden in zwei Parallelansätzen angelegt. Die Medienüberstände wurden bei anfänglichen Versuchen mituntersucht, bei späteren verworfen. Da Makrophagen Trypanblau bei ausreichender Inkubationsdauer (> 5 Minuten) phagozytieren, wurden die adhärenen Zellen genau 3 Minuten mit einer 0,25 %igen Trypanblau-Lösung gefärbt. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und jeweils 3 bis 5 Gesichtsfelder unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Um die Aussagekraft der Vitalitätsbestimmung bei adhärenen Zellen beurteilen zu können, wurde nachgeprüft, ob sich die mit Stäuben inkubierten Zellen stärker abgelöst hatten als die entsprechenden Kontrollzellen. Das war nicht der Fall (Tab. 8). Aus diesem Grund geben die Vitalitätsbestimmungen adhärenen Zellen ein realistisches Bild wieder.

### **2.5.2. Biochemische Untersuchungen**

#### **2.5.2.1. Protein-Bestimmung**

Die Protein-Bestimmung wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, München) durchgeführt. Als Eichsubstanz wurde Rinderserumalbumin verwendet.

### Reaktionsprinzip

Gemessen wurde die Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm nach 595 nm durch Bindung von Protein.

Für die Bestimmung der Proteinverteilung in den einzelnen Fraktionen (Z, Ü und P) wurde bei anfänglichen Versuchen mit Rinder-Alveolarmakrophagen die Makro-Methode verwendet, für alle späteren Messungen wurde die Mikro-Methode verwendet.

### Makro-Methode

50 µl Probe und 2,5 ml Farbreagenz (Konzentrat 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt) wurden sofort intensiv gemischt. Die optische Dichte bei 595 nm konnte nach 5 Minuten in einem Zeitraum bis zu einer Stunde gemessen werden. Die Nachweisgrenze lag bei 200-1400 µg Protein/ml.

### Mikro-Methode

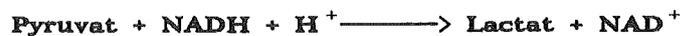
400 µl verdünnte Probe und 100 µl Farbreagenz-Konzentrat wurden sofort gemischt. Die Nachweisgrenze lag bei < 26 µg Protein/ml.

## **2.5.2.2. Lactat-Dehydrogenase-Bestimmung (LDH)**

Die LDH-Bestimmung wurde mit dem Monotest a LDH opt. (Boehringer, Mannheim; 158 186) bei 25°C durchgeführt. Als Kontrollserum wurde Precinorm E verwendet.

### Reaktionsprinzip

Gemessen wurde die Extinktionsabnahme aufgrund der Umsetzung von NADH zu NAD<sup>+</sup>. Im Gegensatz zu NAD<sup>+</sup> weist NADH bei 340 nm ein Absorptionsmaximum auf. Es kommt zu folgender chemischer Umsetzung:



### Methode

20 µl Probe (max. einmal aufgetaut) und 500 µl Reagenzlösung (25°C) wurden in eine Küvette pipettiert und gemischt. Nach ca. 30 Sekunden wurde die Extinktion bei 340 nm gemessen. Die Messung wurde nach 1, 2 und 3 Minuten wiederholt. Die Extinktionsabnahme pro Minute ergab mit dem Faktor 4127 multipliziert die gemessenen mUnits LDH/ml Probe. Die Nachweisgrenze dieser Meßmethode lag bei 4-8 mU LDH/ml Probe.

Für die Messung der LDH-Gehalte in den Hunde- und Affen-Alveolarmakrophagen-Proben wurde eine LDH-Mikromethode verwendet. Dabei wurde das eingebrachte Probenvolumen auf 40 µl und die Messung der Extinktionsabnahme auf 6 Minuten verdoppelt. Die Nachweisgrenze lag unter diesen Bedingungen bei 1-2 mU LDH/ml Probe.

### Lösungen

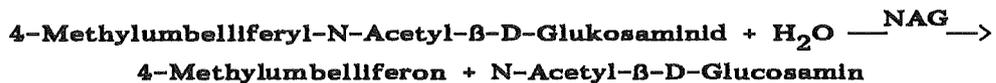
Substratlösung                    50 mmol/l Phosphatpuffer (pH 7,5)  
    0,6 mmol/l Pyrovat  
    0,18 mmol/l NADH

### **2.5.2.3. N-Acetyl-β-Glucosaminidase-Bestimmung (NAG)**

Die NAG-Bestimmung wurde modifiziert nach Andersen et al. (1982) durchgeführt. Als Eichsubstanz diente 4-Methylumbelliferon. Nach Durchführung einer Messung mit konstanter Emissionswellenlänge wurde 358 nm als Anregungswellenlänge gewählt, nach Durchführung einer Messung mit konstanter Anregungswellenlänge wurde 447 nm als Emissionswellenlänge gewählt.

### Reaktionsprinzip

Gemessen wurde die Fluoreszenz des 4-Methylumbelliferon, das in folgender Reaktion entsteht:



### Methode

100 µl Probe wurden mit 100 µl Substratlösung gemischt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der Reaktionsstop erfolgte mit 1 ml Carbonat-Bicarbonat-Puffer (4°C). Jede Probe wurde als zweifacher Ansatz gegen einen Leerwert (Probe ohne Substrat inkubiert, Substratlösung nach Stoppen dazu pipettiert) gemessen.

### Lösungen

Substratlösung                    1 mmol/l 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid in Lactat-Puffer.

Lactatpuffer	40 mmol/l Natriumlactat (pH 3,7)
Stoppuffer	0,2 mol/l Carbonat-Bicarbonatpuffer (pH 10,5):
	21,2 g/l Natriumcarbonat
	16,8 g/l Natriumbicarbonat

Die Protein- und LDH-Messungen wurden an einem Beckmann DU-65 Photometer durchgeführt. Die NAG-Messung erfolgte in einem Perkin Elmer LS-5B Lumineszenz Spektrometer.

Bei einer 20-stündigen Inkubation bei 37°C von Zellhomogenat aus  $3 \times 10^6$  Rinder-Alveolarmakrophagen/ml (bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen 50 mal auf Eis bei 75 W pulsbeschallt) reduzierte sich die NAG-Aktivität im Homogenat von 30-40 auf 5-10 mU/ml. Um die Auswirkung der Quarz- oder Asbestanwesenheit auf die meßbare Proteinmenge und die Enzymaktivitäten zu bestimmen, wurde das Zellhomogenat 20 Stunden in der Gegenwart von Quarz oder Asbest (250 µg/ml) inkubiert. Auffällig war eine Reduktion der LDH-Aktivität in Gegenwart von Quarz auf 81% und Asbest auf 64% des Kontrollansatzes nach 20 Stunden Inkubation (Abb. 6).

### **2.5.3. Fc-Rezeptor vermittelte Rosettenformation**

#### **2.5.3.1. Bestimmung des Subagglutinationstiters**

1 ml 0,25 %ige Schafserythrozyten-Lösung (ca.  $2,5 \times 10^7$  sRBC/ml RPMI 1640 Medium) wurde mit 1 ml verdünnter Antikörperlösung (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 7000 und 1 : 10000) gemischt und 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Gesucht war die schwächste Antikörperverdünnung, bei der die Erythrozyten gerade noch nicht agglutinierten.

#### **2.5.3.2. Kopplung von Antikörpern und Erythrozyten**

1 ml Hammelblut (Behringwerke RAW 30, Marburg) wurde mit 1 ml Antikörperverdünnung (Anti Schafserythrozyten Serum vom Kaninchen, RLC 24 (1 : 300), Ambozeptor 6000, Behringwerke, Marburg) gemischt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die gleiche Menge an Hammelblut wurde mit 1 ml RPMI 1640 Medium gemischt und wie das Antikörper-Kopplungsgemisch behandelt. Beide Lösungen wurden 10 Minuten (700 g, 4°C) zentrifugiert, die Pellets wurden in je 2 ml RPMI Medium aufgenommen. Dieser Schritt wurde 2 mal wiederholt.

### **2.5.3.3. Inkubation von Zellen mit Erythrozyten (sRBC) und Antikörpermarkierten Erythrozyten (Ab-sRBC)**

Bei den U937-Suspensionskulturen wurden  $1 \times 10^5$  U937-Zellen 10 Minuten (700 g) abzentrifugiert. Das Pellet wurde gelockert und mit 2 ml erythrozytenhaltigem Medium ( $5 \times 10^6$  sRBC/ml) 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Zellen mit  $> 3$  sRBC/Zelle wurden als sRBC positiv gewertet. Die Differenz zwischen sRBC-positiven und Fc-sRBC-positiven Zellen gab den Anteil der Zellen mit Fc-Rezeptoren wieder.

### **2.5.4. Morphologische Untersuchungen**

#### **2.5.4.1. Lichtmikroskopie**

**Hemacolor Schnellfärbung** (Merck Diagnostika, Darmstadt)

##### Nachweisprinzip

Bei dieser Färbung handelt es sich um eine der May-Grünwald adäquate Färbung. Das Färbeset enthält eine Fixierlösung (11955, enthält Methanol) und zwei gepufferte Farblösungen: das Farbreagenz rot (11956, enthält Eosin) und das Farbreagenz blau (11957, enthält Thiazinlösung).

##### Methode

1. Zellausstriche oder Kulturen lufttrocknen lassen.
2. 14 mal in den Fixierpuffer tauchen.
3. 8 mal in Farblösung rot tauchen.
4. 3 - 6 mal in Farblösung blau tauchen.
5. Präparat in Wasser tauchen, bis überschüssiger Farbstoff entfernt ist.

### **Xylol-Behandlung zur Bestimmung der Latexphagozytose**

Zur Bestimmung der Anzahl phagozytierter Latexpartikel wurden die 20 Stunden mit 250 µg Latex (2,0 µm) inkubierten Zellen mit Hemacolor gefärbt und dann 4 Stunden in Xylol eingetaucht, um äußerlich gebundenes Latex abzulösen.

## **$\alpha$ -Naphthyl-acetat-Esterase Färbung** (Sigma Diagnostics, 91-A, Deisenhofen)

### Reaktionsprinzip

Die Anfärbung der Zellen beruht auf der Ausbildung eines braunschwarzen Niederschlages in den positiven Zellen. Durch Hydrolyse von  $\alpha$ -Naphthyl-acetat entsteht eine Naphtolverbindung, die über eine Kopplungsreaktion mit einem Diazoniumsalz reagiert.

### Methode

1. Dest. Wasser auf 37°C vorwärmen (ca. 50 ml).
2. Zellausstriche nach der Lavage, adhärente Zellen auf Plastik oder Deckgläsern 10 Sekunden fixieren.
3. Gründlich mit dest. Wasser spülen (10 - 15 Sekunden).
4. Zu 1 ml Fast-Blue BB Lösung 1 ml Natriumnitritlösung zugeben. 30 Sekunden kräftig schütteln und 2 Minuten stehen lassen. 40 ml Wasser (37°C) zufügen. Mischen.
5. 5 ml Trizmal<sup>TM</sup> 7,6 Pufferkonzentrat und 1 ml  $\alpha$ -Naphthylacetatlösung zugeben. Mischen.
6. Ausstriche lichtgeschützt 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
7. Gründlich mit dest. Wasser spülen.
8. 2 Minuten mit Hämatoxylinlösung gegenfärben.
9. Mit Leitungswasser spülen, lufttrocknen.
10. Mikroskopisch auswerten.

### Lösungen

#### **Citratlösung**

18 mmol/l Zitronensäure  
9 mmol/l Natriumcitrat  
12 mmol/l Natriumchlorid  
pH 3,6  $\pm$  0,1

#### **Citrat-Aceton-Formaldehyd-Fixierlösung**

25 ml Citratlösung mit 65 ml Aceton und 8 ml Formaldehyd z.A. (37 %) mischen.

#### **Fast Blue BB (Base) Lösung (91-7)**

15 mg/ml Fast Blue BB Base in 0,4 mol/l Salzsäure.

#### **Natriumnitritlösung**

0,1 mol/l Natriumnitrit

#### **Trizmal 7,6 Pufferkonzentrat (91-8)**

1 mol/l Trizma<sup>R</sup> Maleat, pH 7,6  $\pm$  0,15

### **$\alpha$ -Naphtyl-acetat-Lösung**

12,5 mg/ml Naphtylacetat in Methanol

### **Hämatoxylin-Lösung Gill Nr.3** (Dunkel lagern!)

6,0 g/l Hämatoxylin (mit Zertifikat)

0,6 g/l Natriumjodat

52,8 g/l Aluminiumsulfat

### **$\alpha$ -Naphtyl-butytrat-Esterase Färbung** (Sigma Diagnostics, 181-B, Deisenhofen)

#### Reaktionsprinzip

Durch Hydrolyse von  $\alpha$ -Naphtyl-butytrat und Kopplung an ein azotiertes Pararosanilin entsteht in positiven Zellen ein rot-brauner, unlöslicher, chromogener  $\alpha$ -Naphtyl-Hydrogen-Pararosanilin-Komplex.

#### Methode

1. 40 ml Phosphatpufferlösung auf 37°C vorwärmen.
2. Zellausstriche (nach der Lavage, vor Aussaat der Zellen), adhärente Zellen in Plastik Kulturschalen oder auf Deckgläsern werden 30 Sekunden bei RT fixiert.
3. Mit dest. Wasser spülen (10 - 15 Sekunden).
4. Zu 1,5 ml Pararosanilinlösung 1,5 ml Natriumnitritlösung zufügen. 30 Sekunden kräftig schütteln und mindestens 5 Minuten stehen lassen. 40 ml vorgewärmte Phosphatpufferlösung dazugeben.
5. 5 ml  $\alpha$ -Naphtyl-butytrat-Lösung zugeben. Gut mischen.
6. Ausstriche 1 Stunde lichtgeschützt bei 37°C inkubieren.
7. 2 - 3 Minuten in dest. Wasser spülen.
8. Ausstriche mindestens 15 Minuten lufttrocknen lassen.
9. 5 Minuten mit Methylenblau gegenfärben.
10. Mit dest. Wasser abspülen, lufttrocknen lassen und mikroskopieren.

#### Lösungen

##### **Citratlösung**

18 mmol/l Zitronensäure

9 mmol/l Natriumcitrat

12 mmol/l Natriumchlorid

pH 5,36  $\pm$  0,1

##### **Citrat-Aceton-Formaldehyd-Fixierlösung**

25 ml Citratlösung mit 65 ml Aceton und 8 ml Formaldehyd (37 %) mischen.

### **Pararosanilinlösung**

40 g/l Pararosanilin in 2 mol/l Salzsäure. (Dunkel lagern!)

### **Natriumnitritlösung**

250 mg Natriumnitrit in 6 ml dest. Wasser lösen. (Frisch ansetzen!)

### **Phosphatpuffer (Sigma 180-5)**

Enthält 0,067 mol/l Natrium- und Kaliumphosphat (pH 7,7). Der Flascheninhalt wird in 500 ml dest. Wasser gelöst.

### **$\alpha$ -Naphtyl-butyrat-Lösung**

2,4 g/l  $\alpha$ -Naphtyl-butyrat in Methanol

### **Methylenblau-Färbelösung**

5 ml 1,4 %iges Methylenblau in 95 %igem Ethanol mit 45 ml dest. Wasser mischen. (Frisch ansetzen!).

## Fotodokumentation

Vitale Zellkulturen wurden in einem Leitz Flurovert Mikroskop (Ernst Leitz, Wetzlar), gefärbte Zellkulturen in einem Leitz Diaplan Mikroskop betrachtet. Auf beide Mikroskope ist über einen Adapter ein Kameragehäuse (Wild MPS 51) aufsetzbar, das mit einem Fotoautomaten (Wild MPS 45, Heerbrugg) in Verbindung steht. Als Filmmaterial wurden Kunstlicht Farbdiafilme (Kodak Ektachrome 50, Hemel Hemstead, England) verwendet.

### **2.5.4.2 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)**

(Kurzmethode zur Vorbereitung von Zellen für Raster-Elektronenmikroskopische Untersuchungen unter Umgehung der Kritischen-Punkt-Trocknung, Millipore)

#### Methode

Schritte 1 - 4 bei 4°C (auf Eis) durchführen.

1. Kultur 30 Sekunden in physiologischer Kochsalzlösung waschen.
2. Wechsel der Probe in Puffer A, 30 Minuten inkubieren.
3. Probe in Puffer B transferieren, 30 Minuten inkubieren.
4. 30 Minuten in Puffer C inkubieren.

Schritte 5 - 11 bei RT durchführen.

5. Probe 5 Minuten in Wasser waschen. Schritt wiederholen.
6. Schrittweises Entwässern der Probe durch Inkubation in aufsteigender Alkoholreihe.
  - a. 35 % EtOH, 5 Minuten
  - b. 70 % EtOH, 5 Minuten
  - c. 85 % EtOH, 5 Minuten
  - d. 95 % EtOH, 5 Minuten
  - e. 100 % EtOH, 5 Minuten
7. Probe in HMDS-Lösung 5 Minuten unter einem Abzug inkubieren. (Dieser Schritt ersetzt die Kritische-Punkt-Trocknung).
8. Probe 30 Minuten Lufttrocknen lassen und auf Trockengel bis zur weiteren Bearbeitung für das Raster-Elektronenmikroskop aufbewahren.

Die weitere Verarbeitung wurde von Herrn G. Schueler (KfK, IKVT) durchgeführt:

9. Probe auf REM Halter mit Leit-C nach Göcke (Graphit in Acrylharzen, Gerhard Neubauer, Münster) elektrisch leitend befestigen.
11. Probe ca. 2 Minuten mit leitendem Metall (Gold) in einer Klein-Beschichtungsanlage Balzers MED 010 (Balzers, Liechtenstein) besputtern. Beschichtungsdicke ca. 15 - 20 nm.
12. Untersuchung am REM (PHILIPS 525, Eindhofen) bei einer variierten Beschleunigungsspannung von 10 - 20 KV.

### Lösungen

<b>Puffer A</b>	0,1 M Cacodylat 5 % Glutaraldehyd (Serva 23114, Heidelberg) pH ca. 7,2
<b>Puffer B</b>	0,1 M Cacodylat 7 % Sucrose (7g/100ml)
<b>Puffer C</b>	0,1 M Cacodylat 2 % Osmiumtetroxid
<b>HMDS</b>	Hexamethyldisilizane (Sigma H-4875, Deisenhofen)

## Fotodokumentation

Die fotografischen Aufnahmen wurden mit einer am Aufnahmebildschirm des REM's angebrachten Kamera, Typ Contax 137 MA Quarz (Yashica, Tokio), erstellt. Als Film wurde der Panatomic X 32 ASA (Kodak, Hemel Hemstead, England) verwendet.

## **2.6. Auswertung der Ergebnisse**

Bei der Auswertung der biochemischen Meßwerte wurde die im Gesamtansatz vorhandene Protein- oder Enzymmenge jedes Ansatzes gleich 100 % gesetzt. Danach wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Fraktionen (Z, P und Ü) bestimmt und das Ergebnis in Form eines Balkendiagrammes dargestellt.

Für den Interspeziesvergleich wurden die Absolutwerte der Protein- oder Enzymfreisetzung in den Überstand auf die jeweilige Kontrollfreisetzung bezogen. Die Ergebnisse wurden in Tabellen oder Kurvendiagramm dargestellt. Hier wurde auch die Vitalität der adhärennten Zellen in Prozent der Kontrollvitalität angegeben.

Um eine Information über die Selektivität der staubinduzierten LDH- oder NAG-Freisetzung in den Überstand zu erhalten, wurde das Verhältnis von LDH zu NAG in dieser Fraktion ermittelt. Es wird im folgenden vom LDH/NAG-Quotienten gesprochen. Zusätzlich wurden die Enzymkonzentrationen im Überstand auf die ermittelte Proteinmenge bezogen. Diese Aktivitäten (U LDH oder NAG)/mg Protein werden im folgenden als spezifische Enzymaktivitäten bezeichnet.

Für die Berechnung des DPL-Schutzeffektes wurde von der durch Quarz oder Asbest induziert freigesetzten Absolutmenge an Protein, LDH oder NAG die durch die Kontrollzellen freigesetzte Absolutmenge abgezogen. Man erhielt so die durch den Staub verursachte Nettofreisetzung, den reinen Schadenseffekt. Zu diesen Werten wurde die auf die gleiche Weise berechnete durch Staub und DPL induzierte Restfreisetzung in Relation gesetzt. Die Differenz zum 100-prozentigen Schaden ergab das Ausmaß des Schutzeffektes (Tab. 13).

## **2.7. Statistik**

Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's T-Test überprüft. Der Entscheidung über die statistische Signifikanz wurde ein 95 %iges Signifikanzniveau zugrunde gelegt. War  $2p < 0,05$  lag ein statistisch signifikanter Unterschied vor.

### **III. Ergebnisse**

#### **3.1. Wirkungen von Kontrollstäuben auf Rinder-Alveolarmakrophagen**

##### **Veränderungen in der Vitalität und den biochemischen Parametern**

Da Rinder-Alveolarmakrophagen einfach und in großer Quantität (ca.  $1,5 \times 10^9$  Zellen/Lunge) zu gewinnen waren, wurde mit ihnen das Testsystem zur Bestimmung der Zytotoxizität von Stäuben etabliert.

Als erstes wurde die Freisetzung von lysosomalem Enzym (NAG, Tab. 5 und Abb. 7) nach 2- und 20-stündiger Inkubation der Rinder-Alveolarmakrophagen mit Latex (50  $\mu\text{g/ml}$ ) und Titandioxid (Rutil und Anatas, jeweils 500  $\mu\text{g/ml}$ ) bestimmt. Es erfolgte eine zeitabhängige Freisetzung von NAG in den Überstand. Im Gegensatz zu den Latex-inkubierten Zellen und den Kontrollzellen setzten Titandioxid-inkubierte Zellen zu beiden Zeitpunkten signifikant mehr NAG in den Medienüberstand frei (Tab. 5).

Weitere Versuche zur 20-stündigen Inkubation von Zellen mit verschiedenen Titandioxiden ergaben interessante Unterschiede in der Protein- und Enzymfreisetzung (Tab. 6). Verglichen wurde die Reaktion der Zellen auf Anataspartikel der Firmen Aldrich oder Polysciences. Sie unterschieden sich in der Herstellungsweise (siehe Kapitel 2.3.2.), der Partikelform und dem geometrischen Durchmesser (siehe Tab. 4). In beiden Fällen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Freisetzung von Proteinen und Enzymen (Tab. 6), wobei die NAG-Freisetzung bei beiden Formen jeweils bei der 500  $\mu\text{g/ml}$  Konzentration signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht war (Tab. 5). Die NAG-Freisetzung war im Fall des Titandioxides der Firma Aldrich wesentlich stärker als im Fall des Titandioxides der Firma Polysciences und von einer höheren Protein- und LDH-Freisetzung begleitet.

##### **Morphologische Veränderungen**

Die 20-stündige Inkubation der Zellen mit Titandioxid (Anatas, Aldrich, 250  $\mu\text{g/ml}$ ) führte zu deutlichen morphologischen Veränderungen (Abb. 8 a-c). Die Zellen wiesen nach der Präparation für die Raster-Elektronenmikroskopie große Vertiefungen auf, wie sie bei Latex-inkubierten Zellen (2,0  $\mu\text{m}$  geometrischer Durchmesser, 250  $\mu\text{g/ml}$ ) seltener zu beobachten waren (Abb. 8 d-e). Diese Vertiefungen waren vermutlich Präparationsartefakte durch Kollabieren von instabilen Vakuolen (siehe 3.2.1.).

### **3. 2. Wirkungen von Quarz und Asbest auf Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und auf eine monozytäre Zelllinie**

Die Dosis-Effekt-Abhängigkeit der Vitalität von Alveolarmakrophagen und monozytären U937-Zellen nach Inkubation mit 0-500 µg DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest/ml wurde im linearen Maßstab für alle Spezies gemeinsam schematisch in Abbildung 9 und 10 dargestellt. Zur weiteren Auswertung wurden die Daten mit Angabe der Stichprobengröße und der Standardfehler im halblogarithmischen Maßstab in Abbildung 40 und 41 aufgetragen. Im folgenden werden die Ergebnisse zuerst für jede Spezies einzeln betrachtet, eine zusammenfassende Darstellung erfolgt in Kapitel 3.3.3..

#### **3.2.1. Rinder-Alveolarmakrophagen**

##### **Veränderungen in der Vitalität und den biochemischen Parametern**

Die Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 50-500 µg DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest/ml führte zu einer linearen Abnahme der Zellvitalität (Abb. 9 und 10) im Bereich von 50-250 µg/ml. Die Vitalität blieb dann im Bereich von 250-500 µg/ml relativ konstant. Bei einer Konzentration von 100-250 µg Quarz/ml waren 50 % der Zellen mit Trypanblau angefärbt (Abb. 9). Quarz erwies sich in diesem Parameter als toxischer, als die gleiche Konzentration an Asbest. Die 50 % Vitalitätsmarke wurde bei 250 µg Chrysotil Asbest/ml unterschritten (Abb. 10).

Bei den biochemischen Ergebnissen zeigte sich eine lineare, konzentrationsabhängige Protein- und Enzymfreisetzung in den Überstand (Abb. 11 und 12). Im niedrigen Konzentrationsbereich (50 µg/ml) wurde von den Zellen zunächst vermehrt NAG freigesetzt, ohne daß sich eine weitere Veränderung ergab. Hier zeigte sich, wie sinnvoll es war, die Kulturüberstände abzuzentrifugieren; man hätte sonst die Veränderungen im niedrigen Konzentrationsbereich (50-100 µg/ml) nicht bemerken können. Im Konzentrationsbereich von 100-250 µg/ml nahmen die Protein-, LDH- und NAG-Freisetzung in den Überstand linear und im quantitativ gleichen Umfang zu. Die Vitalität der Zellen nahm entsprechend der freigesetzten Protein- und Enzymmenge in den Überstand ab.

Die ansteigende Protein- und Enzymfreisetzung beruhte nicht auf einer Neusynthese, da die Gesamtmengen an Protein- und Enzym in den Quarz- und Asbest-Ansätzen im Vergleich zu den Kontrollansätzen nicht anstiegen, sondern teilweise sogar abnahmen. Bei Quarz-inkubierten Zellen (250 µg/ml)

erfolgte eine Abnahme der LDH-Gesamtmenge auf  $65,6 \pm 4,2$  % des Kontrollansatzes ( $n = 9$ ); bei Asbest-inkubierten Kulturen ( $250 \mu\text{g/ml}$ ) reduzierte sich der LDH-Gehalt auf  $82,9 \pm 2,8$  % des Kontrollwertes ( $n = 5$ ).

Interessant war auch die Abnahme des Protein-, LDH- und NAG-Gehaltes der Fraktion der adhärennten Zellen nach Inkubation der Zellen mit Quarz (Abb. 11) oder Asbest (Abb. 12), obwohl die Zellen sich nicht ablösten (Tab. 8). Zusätzlich nahm auch die spezifische LDH-Aktivität in den Zellen ab (Tab. 7), während die spezifische NAG-Aktivität konstant blieb, so daß der Quotient aus LDH/NAG in der Fraktion der adhärennten Zellen kleiner wurde. Der Proteingehalt dieser Fraktion war bei Quarz- oder Asbest-exponierten Zellen gegenüber dem Proteingehalt der Pelletfraktion von Kontrollansätzen reduziert (Tab. 8). Zusätzlich waren die spezifischen Aktivitäten von NAG und LDH im gleichen quantitativen Ausmaß vermindert (Tab. 7), so daß der Quotient LDH/NAG gegenüber der Kontrolle konstant blieb.

Insgesamt fiel auf, daß die Freisetzung von Protein, LDH und NAG im Konzentrationsbereich  $50$ - $250 \mu\text{g}$  Quarz oder Asbest/ml parallel und im gleichen Ausmaß verlief. Dies blieb auch bei der  $500 \mu\text{g}$  Quarz/ml Konzentration der Fall. Bei  $250$ - $500 \mu\text{g}$  Asbest/ml stieg die LDH-Freisetzung im Gegensatz zu der NAG- und der Protein-Freisetzung in den Medienüberstand weiter an. Dieser Effekt war jedoch nicht von einer weiteren Vitalitätsabnahme begleitet (Abb. 12).

Bei der Inkubation von Zellen mit Quarz oder Asbest ( $250 \mu\text{g/ml}$ ) in Gegenwart von DPL kam es im Fall von Quarz zu einem modifizierten Effekt (Abb. 15). Die Enzymfreisetzung der Zellen war nach gleichzeitiger Inkubation mit Quarz und DPL signifikant gegenüber der durch nativen Quarz induzierten Freisetzung vermindert, verbunden mit einer geringen Vitalitätsabnahme gegenüber der Kontrolle. Die durch Quarz und DPL induzierte Freisetzung unterschied sich nicht signifikant von der Freisetzung durch Kontrollzellen mit DPL. Der Schutzeffekt betrug fast  $100$  % (Tab. 13). Im Fall von Asbest konnte jedoch überhaupt kein Schutzeffekt durch DPL-Zusatz beobachtet werden (Abb. 15, Tab. 13).

Bei diesen Versuchsansätzen zeigte sich wiederum, wie nützlich das Abzentrifugieren des Überstandes war. Es wäre sonst, trotz reduzierter Vitalität, ein DPL-Schutzeffekt vor Asbest zu vermuten gewesen (Abb. 15). Dabei hatte die Protein- und Enzymfreisetzung in den Überstand zu- und der Anteil der drei Komponenten in der Pelletfraktion abgenommen.

Die Vitalität der Zellen korrelierte bei Kontrollen mit den Protein-, LDH- oder NAG-Anteilen der Fraktion der adhärennten Zellen und des Überstandspellets (Abb. 15), also invers zur Freisetzung der drei Komponenten in den Überstand. Bei Quarz- oder Asbest-behandelten Zellen korrelierte die Vitalität mit dem Anteil des LDH-Gehaltes in der Fraktion der adhärennten Zellen, im wesentlichen auch mit der freigesetzten Menge an Protein, LDH oder NAG.

## Morphologische Veränderungen

Die Population der Rinder-Alveolarmakrophagen setzte sich aus unterschiedlich stark an den Untergrund angehefteten und ausgebreiteten Zellen zusammen (Abb. 13 a und d). Dabei kam es zu großflächigen Zellausläufern (Lamellipodien) oder zu feinen, fadenförmigen (Filopodien) Zellausläufern (Abb. 16 A). Die Zelloberfläche war mit Mikrolamellae bedeckt.

Nach der Inkubation der Zellen mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) besaßen ca. 30 % der Zellen eine glatte Oberfläche, weitere 30 % der Zellen wirkten wie abgestorben; die restlichen 40 % der Zellen sahen intakt aus (Abb. 16 A). Nach der Hemacolor-Methode gefärbte Zellen mit Quarz waren deutlich schwächer angefärbt, als die Kontrollzellen (Abb. 16 B, Bild a und b). Ca. 40 % der Zellen waren nur diffus angefärbt; einige kräftiger angefärbte Zellen wiesen randständige Zellkerne, quarzhaltige Einschlüsse und kleine Vakuolen (ca. 75 % der Zellen) auf. Bei ca. 40 % der Zellen war eine intakte Zellkern- und Zytoplasmabegrenzung zu beobachten. Sie wirkten trotz ihres quarzhaltigen Zytoplasmas intakt.

Bei der Inkubation der Zellen mit Chrysotil Asbest fiel bei Vitalitätsbestimmungen im Lichtmikroskop (Abb. 13) die Vakuolisierung von ca. 30 % der Zellen auf. Dieser Effekt trat schon bei der niedrigsten Asbestkonzentration (50 µg/ml, Abb. 13 b, e) auf. Interessanterweise waren die vakuolenhaltigen Zellen meist vital (Abb. 13 b und c). Eine weitere Besonderheit nach Inkubation der Zellen mit Asbest war die Formation zu Faser-assoziierten Zellgruppen (Abb. 14). Diese Gruppenbildung konnte man bei Quarz-inkubierten Zellen und Kontrollzellen nicht beobachten. Bei Raster-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 16 A) fiel auf, daß ca. 30 % der Zellen eine gegenüber der Kontrolle geglättete Oberfläche besaßen und ca. 15 % der Zellen porös und funktionsunfähig wirkten. Von diesen beiden Zellgruppen hatten ca. 30 % der Zellen große Zellvertiefungen. Bei den Vertiefungen handelte es sich, wie schon erwähnt, sehr wahrscheinlich um Präparationsartefakte. Im Lichtmikroskop waren sehr große, nahe der Plasmamembran gelegene Vakuolen gesehen worden (Abb. 13), die bei der Präparation für das Raster-Elektronenmikroskop kollabiert sein konnten. In Abbildung 16 B (Bild c) ist eine Zelle zu erkennen, in der die Vakuolen entlang einer besonders dicken Asbestfaser orientiert liegen. Im Raster-Elektronenmikroskop könnte diese Zelle wie in Abb. 16 A aussehen.

Die Inkubation der Zellen mit DPL veränderte das morphologische Aussehen der Kontrollzellen nicht (Abb. 16 A), sie färbten sich jedoch intensiver bei der Hemacolor-Färbung an (Abb. 16 B). Mit Quarz und DPL inkubierte Zellen sahen bezüglich ihrer Oberflächenstrukturen wie intakte Kontrollzellen aus. Weniger als 10 % der Zellen waren glatt oder mit Löchern in der Zellmembran versehen. Einige mit Quarz und DPL inkubierte Zellen, die sichtbar Quarzpartikel phagozytiert hatten und ein großflächig ausgebreitetes Zytoplasma besaßen, wiesen im Vergleich zu den Kontrollen mit DPL ein weniger angefärbtes Zytoplasma auf (Abb. 16 B).

Nach gleichzeitiger Asbest- und DPL-Inkubation war kein Unterschied zu den nur mit nativem Asbest inkubierten Zellen zu beobachten (Abb. 16 A und B). Ca. 30 % der Zellen hatten eine glatte Zelloberfläche, weitere 30 % der Zellen waren mit Vertiefungen in der Plasmamembran versehen (Abb. 16 A). Bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen der mit der Hemacolor-Methode gefärbten Zellen waren ca. 50 % der Zellen voller großer Vakuolen, weitere 25 % der Zellen besaßen segmentierte Zellkerne, und bei ca. 40 % der Zellen wirkte das Zytoplasma in einigen Bereichen der Frontlamellen wie ausgelaufen (Abb. 16 B). Die einzelnen Beobachtungsmerkmale überschritten sich bei einigen Zellen.

### 3.2.2. Ratten-Alveolarmakrophagen

#### Veränderungen in der Vitalität und den biochemischen Parametern

Bei der Inkubation von Ratten-Alveolarmakrophagen mit 50-500  $\mu\text{g}$  DQ12 Quarz/ml kam es zu einem linearen Vitalitätsabfall (Abb. 9). Dabei waren bei einer Inkubation der Zellen mit 100-250  $\mu\text{g}$  Quarz/ml mehr als 50 % der Zellen nach der Trypanblau-Methode abgestorben, die 50 % Vitalitätsmarke wurde jedoch mit bis zu 500  $\mu\text{g}$  Asbest/ml nicht unterschritten (Abb. 10). Die Reaktion der Ratten-Alveolarmakrophagen auf Chrysotil Asbest war gering ausgeprägt.

Die Inkubation der Zellen mit 50-500  $\mu\text{g}$  Quarz/ml (Abb. 17) führte zu einer im Bereich zwischen 50 und 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  linearen Protein- und Enzymfreisetzung in den Überstand. Dabei stieg die Freisetzung von Proteinen und Enzymen gleichmäßig an. Da die Kontrollzellen sehr viel LDH freisetzten, überragte die Freisetzung von LDH immer die von Protein und NAG. Die Vitalität der Zellen korrelierte im Bereich von 50-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mit dem Protein- und NAG-Gehalt der Fraktion der adhärennten Zellen bzw. mit der freigesetzten Menge. Im Bereich von 250-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  entsprach der Anteil vitaler Zellen dem LDH-Anteil der Fraktion der adhärennten Zellen (Abb. 17). Bei der Inkubation der Ratten-Alveolarmakrophagen mit 50-500  $\mu\text{g}$  Asbest/ml (Abb. 18) änderte sich der Proteinanteil der Überstandsfraction gegenüber den unbehandelten Zellen nicht, in der Fraktion der adhärennten Zellen nahm er jedoch ab. Es fand eine Verschiebung in die aus dem Überstand abzentrifugierte Pelletfraktion statt, die im Bereich von 100-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  deutlich gegenüber der Kontrolle zunahm. Im gesamten Konzentrationsbereich fand eine lineare Freisetzung von LDH in den Überstand statt. NAG wurde nur im Bereich von 50-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  linear freigesetzt. Ihr Anteil im Überstand blieb dann konstant. Die Abnahme der NAG in der Fraktion der adhärennten Zellen verlief jedoch über den gesamten Konzentrationsbereich linear, so daß auch hier im Bereich von 100-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ein geringer Zuwachs des Pelletanteiles stattfand. Bei der Inkubation der Zellen mit Asbest korrelierte die Vitalität der Zellen mit ihrem Anteil an Gesamtprotein und an NAG.

Bei der Inkubation von Zellen mit Quarz oder Asbest (250 µg/ml) in Gegenwart von DPL kam es im Fall von Quarz zu einem modifizierten Effekt. Die Freisetzung von Protein und Enzymen war signifikant vermindert gegenüber dem nativen Quarzeffekt (Abb. 19). Der Schutz betrug 81 % für die Reduktion der Freisetzung von Protein, 64 % für die Reduktion der Freisetzung von LDH (Tab. 13). Die Freisetzung von NAG blieb jedoch erhöht. Bei Chrysotil Asbest wurde kein DPL-Schutzeffekt beobachtet (Abb. 19, Tab. 13).

### **Morphologische Veränderungen**

Die Ratten-Alveolarmakrophagen wirkten relativ homogen in ihrer äußeren Erscheinung. Auch sie besaßen Filopodien- und Lamellipodien-artige Zellausläufer (Abb. 20 A). Einige Kontrollzellen (< 20 %) enthielten größere Vakuolen (Abb. 20 B).

Nach 20-stündiger Inkubation der Zellen mit Quarz (250 µg/ml) hatte sich die Zelloberfläche vieler Zellen stark verändert (Abb. 20 A). Das Zytoplasma der meisten Zellen war weniger mit Hemacolor angefärbt und stärker vakuolisiert als bei den entsprechenden Kontrollzellen (Abb. 20 B). Bei ca. 25 % der Zellen war das Zytoplasma weit ausgebreitet (Abb. 20 B, Bild b) und blieb völlig ungefärbt.

Die Inkubation der Zellen mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml) bewirkte auch bei den Ratten-Alveolarmakrophagen eine Vakuolisierung der Zellen, zum Teil entlang zellassoziierter Fasern (Abb. 20 B, Bild c). Im Raster-Elektronenmikroskop war eine Vergrößerung des Zelldurchmessers einiger Zellen durch ein stark ausgebreitetes Zytoplasma zu sehen (Abb. 20 A und B). Die Inkubation der Zellen mit DPL bewirkte keine Veränderung der Zellmorphologie (Abb. 20 A). Die Zellen ließen sich jedoch auch hier stärker mit Hemacolor anfärben (Abb. 20 B).

Die mit Quarz und DPL inkubierten Zellen entsprachen in ihrem Aussehen eher den Kontrollzellen, als den mit nativem Quarz inkubierten Zellen. Der Zelldurchmesser von ca. 25 % der mit Quarz und DPL inkubierten Zellen war vergrößert (Abb. 20 A und B). Bei den mit Asbest und DPL inkubierten Zellen war kein Schutzeffekt zu beobachten. Ca. 70 % der Zellen mit nativem oder DPL-Asbest enthielten sehr viele Vakuolen (Abb. 20 B, Bild c und f).

### **3.2.3. Hunde-Alveolarmakrophagen**

#### **Veränderungen in der Vitalität und den biochemischen Parametern**

Nach 20-stündiger Inkubation von Hunde-Alveolarmakrophagen mit 50-500 µg DQ12 Quarz/ml nahm die Vitalität der adhärennten Zellen im Konzentrationsbereich von 50-100 µg Quarz/ml sehr stark ab (Abb. 9) und unterschritt

schon im Bereich  $< 50 \mu\text{g/ml}$  die 50 % Vitalitätsmarke. Bei höheren Konzentrationen (100–500  $\mu\text{g}$  Quarz/ml) verlief die Vitalitätsabnahme gemäßigt. Die Inkubation der Zellen mit gleichen Chrysotil Asbestkonzentrationen (50–500  $\mu\text{g/ml}$ ) führte zu einem ähnlichen Kurvenverlauf (Abb. 10) mit deutlich geringerer Vitalitätsabnahme im Vergleich zu den gleichen Quarzkonzentrationen. Dabei unterschritt die Vitalität die 50 % Marke erst im Bereich von 100–250  $\mu\text{g}$  Asbest/ml.

Die biochemischen Daten unterstützten diesen Befund. Die Freisetzung von Protein-, LDH- und NAG in den Medienüberstand war bei gleicher Konzentration von Quarz und Asbest (250  $\mu\text{g/ml}$ , Abb. 23) bei Asbest-exponierten Zellen geringer. Auffällig hoch war, wie im Fall der Ratten-Alveolarmakrophagen, die LDH-Freisetzung durch die Kontrollzellen. Sie überragte in allen Konzentrationsbereichen die Freisetzung von Protein und NAG in den Medienüberstand. Die Inkubation mit 50  $\mu\text{g}$  Quarz/ml führte zu einer mehr als 100 %-igen Steigerung der Protein- und Enzymfreisetzung in den Überstand (Abb. 21). Die NAG-Freisetzung betrug sogar fast 500 % der Freisetzung durch die Kontrolle (Tab. 10). Im Bereich von 50–500  $\mu\text{g}$  Quarz/ml änderte sich das Ausmaß der Protein- und NAG-Freisetzung nicht mehr; die LDH-Freisetzung nahm jedoch noch geringfügig mit steigender Konzentration zu, der LDH-Gehalt der Fraktion der adhärennten Zellen entsprechend ab. Die Pelletfraktion blieb, nachdem sie sich bei 50  $\mu\text{g}$  Quarz/ml gegenüber der Kontrolle stark vermindert hatte, im Bereich von 50–500  $\mu\text{g/ml}$  konstant. Der Protein- und NAG-Gehalt der Pelletfraktion verhielt sich entsprechend. Die Vitalität der Zellen korrelierte bei den Ansätzen mit 50–500  $\mu\text{g}$  Quarz/ml mit dem Anteil des LDH-Gehaltes in der Fraktion der adhärennten Zellen, bei der Kontrolle mit der Summe des LDH-Anteiles aus Zell- und Pelletfraktion, also mit der freigesetzten Menge.

Die Inkubation der Hunde-Alveolarmakrophagen mit 50–250  $\mu\text{g}$  Chrysotil Asbest/ml führte zu einer konzentrationsabhängigen, gegenüber den Kontrollzellen ansteigenden Protein-, LDH- und NAG-Freisetzung in den Überstand (Abb. 22). Durch die hohe LDH-Freisetzung der Kontrollzellen überragte der LDH-Gehalt des Überstandes in allen Ansätzen den NAG-Gehalt dieser Fraktion. Im Bereich von 100–250  $\mu\text{g/ml}$  war die Asbest-induzierte Freisetzung von LDH in den Überstand deutlich höher als die Freisetzung von Proteinen und NAG. Das Verteilungsmuster in den Kulturansätzen änderte sich im Bereich von 250–500  $\mu\text{g/ml}$  nicht mehr. Die Vitalität der Zellen nahm jedoch noch weiter ab. Der Anteil vitaler Zellen entsprach im wesentlichen dem LDH-Anteil der Fraktion der adhärennten Zellen, bei Kontrollansätzen der Summe des LDH-Anteiles der Pelletfraktion und der Fraktion der adhärennten Zellen.

### **Morphologische Veränderungen**

Hunde-Alveolarmakrophagen wiesen wie die Alveolarmakrophagen der anderen Spezies verschiedene Formen von Zellausläufern auf (Abb. 24 A). Sie hatten dünne fadenförmige Filopodien und flächige Lamellipodien über den Unter-

grund aus Glas ausgebreitet und besaßen außerdem auch unterschiedliche Formen von Mikrovilli an der Zelloberfläche. Die Hunde-Alveolarmakrophagen fielen durch besonders lange, dünne Zellausläufer auf.

Die Inkubation der Zellen mit 250 µg DQ12 Quarz/ml führte bei den meisten Zellen zu einer drastischen Zerstörung der Zellmorphologie. Die Zellgrenzen einiger Zellen waren im Lichtmikroskop nicht mehr zu erkennen (Abb. 24 B). Außerdem waren Asbest-exponierte Zellen gegenüber den Kontrollzellen nur schwach mit Hemacolor gefärbt. Ca. 70 % der Zellen enthielten große Vakuolen, die im Raster-Elektronenmikroskop wieder als Vertiefungen der Plasmamembran erschienen (Abb. 24 A).

Nach 20-stündiger Inkubation mit 250 µg Chrysotil Asbest/ml war ein ähnlicher Schaden an den Zellen zu erkennen. Ca. 50 % der Zellen enthielten große Vakuolen (Abb. 24 B). Bei einigen Zellen war kein Zellkern oder kein Zytoplasma mehr zu erkennen. Auch waren die Grenzen zwischen Zelle und Umgebung an manchen Stellen fließend. Die mit Asbest inkubierten Zellen waren jedoch stärker mit Hemacolor gefärbt als die mit Quarz behandelten Zellen. Bei ca. 60 % der Zellen war eine glatte Zelloberfläche zu beobachten (Abb. 24 A). Besonders interessant war auch, daß bei den Hunde-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Quarz oder Asbest die Filopodien und Lamellipodien trotz der übrigen morphologischen Zellveränderung erhalten blieben (Abb. 24 A).

#### **3.2.4. Affen-Alveolarmakrophagen**

##### **Veränderungen in der Vitalität und den biochemischen Parametern**

Bei Affen-Alveolarmakrophagen war eine drastische Minderung der Zellvitalität nach 20-stündiger Inkubation mit 50-500 µg DQ12 Quarz/ml zu beobachten (Abb. 9). Die Vitalität der Zellen sank im Konzentrationsbereich < 50 µg Quarz/ml unter die 50 % Vitalitätsmarke. Im Konzentrationsbereich von 100-250 µg/ml nahm sie weiter linear ab und erreichte bei 500 µg/ml den Nullpunkt. Ein ähnlicher Verlauf der Vitalitätsabnahme war bei der Inkubation von Affen-Alveolarmakrophagen mit 50-500 µg Chrysotil Asbest/ml zu beobachten (Abb. 10).

Im Kontrollansatz hatten sich während des 20-stündigen Inkubationsintervalls ca. 25 % der Zellen abgelöst. Dieses war durch einen gleichmäßig hohen Anteil von Protein und Enzymen in der Pelletfraktion zu erkennen (Abb. 25). Die Vitalität der adhärennten Zellen korrelierte mit dem LDH-Anteil der Fraktion der adhärennten Zellen oder mit dem Anteil an nicht freigesetzten Proteinen, LDH oder NAG.

Die Inkubation der Zellen mit 100 µg DQ12 Quarz/ml führte zu einem Anstieg von Proteinen, LDH und NAG im Überstand. Dabei wurde deutlich mehr LDH als NAG freigesetzt (Tab. 14). Durch die Freisetzung großer Protein- und LDH-Mengen, aber relativ geringer NAG-Mengen, war die spezifische LDH-

Aktivität im Überstand deutlich erhöht, die spezifische Aktivität der NAG jedoch nicht (Tab. 14). Während die Freisetzung von Protein und LDH bei einer Erhöhung der Quarzkonzentration auf 250 µg/ml weiter zunahm, blieb der NAG-Anteil in der Überstandsfraktion konstant. Die Vitalität der mit 100 oder 250 µg Quarz/ml behandelten Zellen entsprach dem Anteil des LDH-Gehaltes in der Fraktion der adhärennten Zellen. Die Inkubation der Zellen mit 100 oder 250 µg Chrysotil Asbest/ml bewirkte den gleichen Effekt in quantitativ geringerem Ausmaß (Abb. 26). Bei 250 µg Asbest/ml war die spezifische LDH-Aktivität im Überstand gegenüber den Kontrollwerten stärker erhöht als bei 250 µg Quarz/ml (Tab. 14).

### **Morphologische Veränderungen**

Adhärennte Affen-Alveolarmakrophagen besaßen wie die Alveolarmakrophagen der anderen Spezies Filopodien- und Lamellipodien-artige Ausläufer auf dem Glasuntergrund. Auch hier wiesen einige Kontrollzellen Vakuolen auf (Abb. 27 B).

Die mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) inkubierten Zellen waren stark zerstört (Abb. 27 A). Einige noch intakt wirkende Zellen hatten großflächige Zellausläufer ausgebildet. Bei den mit Quarz oder Asbest behandelten Zellen war das Zytoplasma nur gering durch Hemacolor angefärbt (Abb. 27 B). Bei einigen Zellen war kein Zytoplasma, bei anderen Zellen kein Zellkern zu erkennen. Nur ca. 25 % der Zellen wirkten intakt. Nach der Inkubation mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml) waren im Raster-Elektronenmikroskop fast nur runde oder abgeflachte Zellen mit glatter Oberfläche zu sehen, die nicht mehr intakt wirkten (Abb. 27 A). Bei den Hemacolor-gefärbten Zellen waren Vakuolen im Zytoplasma zu erkennen (Abb. 27 B). Ca. 30 % der Zellen besaßen einen vergrößerten Zelldurchmesser.

#### **3.2.5. Menschliche Alveolarmakrophagen**

Leider konnten keine Alveolarmakrophagen von gesunden Nichtrauchern untersucht werden. Es war jedoch möglich, durch Untersuchungen an Alveolarmakrophagen von Patienten (Raucher, Sarkoidose Patienten) ein Maß für die Reaktion von Zellen verschieden vorbelasteter Personenkreise zu erhalten.

#### **Veränderungen in der Vitalität und den biochemischen Parametern**

##### **Raucher**

Die Inkubation von Alveolarmakrophagen eines Rauchers mit chronischer Bronchitis mit 50-500 µg DQ12 Quarz/ml führte zu einer konzentrationsabhängigen

Vitalitätsabnahme der Zellen (Abb. 9). Im Bereich von 50-100 µg Quarz/ml erfolgte eine sehr starke lineare Abnahme der Zellvitalität, bei der die 50 % Marke unterschritten wurde. Im Bereich 100-500 µg Quarz/ml war die Vitalitätsabnahme deutlich geringer. Die 20-stündige Inkubation der Zellen mit 50-500 µg Chrysotil Asbest/ml (Abb. 10) führte zu einer wesentlich geringeren konzentrationsabhängigen Vitalitätsabnahme als die Inkubation mit der gleichen Quarzkonzentration. Die 50 % Vitalitätsmarke wurde zwischen 250 und 500 µg Asbest/ml unterschritten.

Die Kontrollzellen des Rauchers besaßen im Vergleich zu den Alveolarmakrophagen anderer Herkunft die höchste Vitalität nach dem 20-Stunden-Intervall und den höchsten Anteil an Protein und Enzymen in der Fraktion der adhären-ten Zellen (Abb. 28). Die Pelletfraktion war daher vernachlässigbar klein. Nach der Inkubation mit 100 µg DQ12 Quarz/ml war der Anteil der Fraktion der adhären-ten Zellen drastisch reduziert. Dabei war die Verlagerung von LDH in den Überstand am größten und die Freisetzung von Gesamtprotein am geringsten. Anteilsmäßig wurde etwas weniger NAG als LDH freigesetzt. Auf Grund der geringen Freisetzung durch die Kontrollen kam es zu einer Veränderung des LDH/NAG-Verhältnisses (Tab. 14). Die spezifische LDH-Aktivität im Überstand blieb bei Quarz-exponierten Zellen konstant, die spezifische NAG-Aktivität war jedoch gegenüber der Kontrolle erhöht. Daraus resultierte eine Abnahme des LDH/NAG-Quotienten. Die Vitalität der Zellen korrelierte mit dem LDH-Anteil der Fraktion der adhären-ten Zellen.

Die Inkubation der Zellen mit 50-250 µg Chrysotil Asbest/ml führte zu einer linearen Freisetzung von Gesamtprotein und den gemessenen Enzymen (Abb. 29). Dabei folgte die Freisetzung dem gleichen Muster wie beim Quarz. Durch eine geringere spezifische LDH-Aktivität und eine höhere NAG-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle kam es gegenüber Quarz-inkubierten- und Kontrollzellen zu einem noch kleineren Quotienten aus LDH/NAG (Tab. 14). Die Vitalität der Zellen korrelierte mit dem Anteil von Protein, LDH und NAG in der Fraktion der adhären-ten Zellen.

Bei der gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit Quarz und DPL wurde signifikant weniger Protein und Enzym freigesetzt als bei der Inkubation mit nativem Quarz (Abb. 28). Die Freisetzung blieb jedoch signifikant von der Freisetzung durch die Kontrollzellen verschieden. Die Vitalität der Zellen war nach Inkubation mit DPL und Quarz nur geringfügig höher als nach Inkubation mit nativem Quarz (Abb. 28). Der DPL-Schutzeffekt betrug je nach gemessenem Parameter 30-55 % (Tab. 13). Der Schutzeffekt von DPL auf die Wirkung von Chrysotil Asbest konnte wegen zu geringen Zellmaterials nicht bestimmt werden.

### **Sarkoidose Patienten**

Die Vitalitätsabnahme von Alveolarmakrophagen eines Sarkoidose Patienten nach 20-stündiger Quarzexposition erfolgte ähnlich wie bei den Alveolarmakro-

phagen des Rauchers (Abb. 9). Die 50 % Vitalitätsmarke wurde bei  $< 50 \mu\text{g/ml}$  unterschritten. Möglicherweise waren die Zellen des Sarkoidose Patienten in diesem Bereich empfindlicher. Der beobachtete Unterschied könnte aber auch im Bereich interindividueller statistischer Schwankungen liegen.

Bei einer Inkubation der Zellen mit  $50\text{--}500 \mu\text{g Chrysotil Asbest/ml}$  kam es bei  $100\text{--}250 \mu\text{g/ml}$  zu einer Abnahme der Zellvitalität unter die 50 %-Marke (Abb. 10). Bei  $500 \mu\text{g/ml}$  lag die Vitalität der Zellen unter 10 %.

Die biochemischen Untersuchungen blieben wegen des geringen Zellmaterials auf die  $250 \mu\text{g/ml}$  Konzentration beschränkt. Die Ergebnisse mit Alveolarmakrophagen eines Patienten (Abb. 31 a) und einer Patientin (Abb. 31 b) unterschieden sich nicht. Vergleich man jedoch die spezifischen Enzymaktivitäten, so konnte man feststellen, daß bei den Zellen der Patientin das Verhältnis von LDH zu NAG im Überstand in allen Ansätzen konstant blieb, während es bei der Inkubation der Zellen des Patienten mit Quarz und Asbest zu einer Erhöhung der LDH gegenüber der NAG kam (Tab. 14). Die Vitalität der Zellen korrelierte mit dem LDH-Anteil der Fraktion der adhärenen Zellen.

Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Quarz und DPL führte zu einem geringen, aber signifikanten Schutzeffekt für die Zellen (Abb. 31 a). Dabei verminderte sich die Freisetzung von Protein und Enzymen in den Überstand. Die Vitalität der Zellen blieb unverändert niedrig. Der DPL-Schutzeffekt betrug je nach gemessenem Parameter 7 - 37 % (Tab. 13). Im Fall von Asbest war kein DPL-Schutzeffekt zu beobachten (Abb. 31 a, Tab. 13).

## **Morphologische Veränderungen**

### **Raucher**

Die menschlichen Alveolarmakrophagen besaßen von allen untersuchten Spezies den größten Zelldurchmesser. Er reichte von  $10 - 40 \mu\text{m}$  (Abb. 30). Ca. 20 % der Zellen des Rauchers hatten besonders weite Zellausläufer (Lamellipodien) ausgebildet, und ca. 40 % der Zellen waren abgerundet.

Nach 20-stündiger Inkubation der Alveolarmakrophagen mit DQ12 Quarz ( $250 \mu\text{g/ml}$ ) waren keine intakten Zellen mehr in der Kulturschale zu erkennen (Abb. 30). Die Zelloberfläche war völlig zerstört.

Die mit Chrysotil Asbest ( $250 \mu\text{g/ml}$ ) inkubierten Zellen wirkten nicht so beschädigt (Abb. 30). Ihre Oberflächenstrukturen waren jedoch gegenüber den Kontrollzellen teilweise verändert. Bei einigen Zellen war die Oberfläche glatt geworden, bei anderen hatte sich die Gestalt der Mikrovilli verändert (Abb. 30). Es gab auch Zellen, die völlig abgerundet vorlagen und wie ein Zellskelett wirkten.

Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit DPL und Quarz konnte ein Schutzeffekt beobachtet werden. Die Zellen glichen den Kontrollzellen, es waren je-

doch mehr Zellen (ca. 40 %) besonders stark auf dem Untergrund ausgebreitet. Einige Zellen (ca. 10 %) wiesen die gleichen Zellvertiefungen auf (Abb. 30), wie sie schon bei Rinder-Alveolarmakrophagen mit Titandioxid und seltener mit Latex beobachtet worden waren (Abb. 8).

### **Sarkoidose Patienten**

Auch bei den Alveolarmakrophagen eines Sarkoidose Patienten fiel zunächst die Größe der Zellen auf (Abb. 32).

Die mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) inkubierten Zellen besaßen viele mit Hema-color nicht angefärbte Vakuolen (Abb. 32 b). Der Zellkern war oft randständig, das Zytoplasma enthielt zahlreiche Quarzpartikel. Die Zellgrenzen waren nicht eindeutig zu erkennen.

Bei den mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml) inkubierten Zellen waren einzelne Asbestfasern im Bereich des Zytoplasmas zu erkennen (Abb. 32 c). Das Zytoplasma war völlig von Vakuolen durchsetzt.

In Gegenwart von Quarz und DPL war kein Unterschied zu nur mit nativem Quarz behandelten Zellen zu erkennen (Abb. 32 e). Das Zytoplasma war genauso stark vakuolisiert. Bei der gleichzeitigen Inkubation von Zellen mit Asbest und DPL war kein Unterschied zum nativen Asbesteffekt zu sehen (Abb. 32 f).

### **3.2.6. Monozytäre Zelllinie U937**

#### **Veränderungen in der Vitalität und den biochemischen Parametern**

Die menschliche, monozytäre Zelllinie U937 zeigte sich gegenüber 50-500 µg DQ12 Quarz/ml als wesentlich unempfindlicher als die menschlichen Alveolarmakrophagen (Abb. 9). Dabei nahm die Vitalität der Zellen zunächst stärker im Bereich von 50-100 µg/ml ab und dann schwächer im Bereich von 100-500 µg Quarz/ml. Dabei unterschritt sie die 50 %-Marke nicht.

Die Kontrollzellen der Tübinger U937-Zellen fielen durch eine sehr geringe Freisetzung von Proteinen, LDH und NAG im 20 Stunden Intervall auf (Abb. 33). Nach Inkubation mit 50-100 µg Quarz/ml war zunächst der Anteil von LDH und NAG im Überstand erhöht, so daß es zu einer gegenüber der Kontrolle sehr großen Zunahme an spezifischer LDH- und NAG-Aktivität kam. Der Anteil von NAG in der Überstandsfraktion blieb im Bereich von 50-500 µg Quarz/ml fast unverändert, es erfolgte jedoch eine bis zur Konzentration 250 µg/ml lineare LDH-Freisetzung. Der Proteinanteil in der Überstandsfraktion nahm erst im Bereich 100-500 µg/ml linear zu. Bei der Konzentration 500 µg Quarz/ml nahm der Anteil der nicht adhärent gewordenen Zellen (Pelletfraktion) deutlich zu.

Diese Reaktion der Tübinger U937-Zellen glich der Reaktion von Amerikanischen U937-Zellen (Abb. 35 c), die schon bei der 250 µg/ml Konzentration deutlich weniger adhärent wurden als die Kontrollzellen ohne Quarz. Es kam bei den Amerikanischen U937-Zellen während des 20-Stunden-Intervalls nicht zu einer verstärkten Protein- oder Enzymfreisetzung gegenüber der Kontrolle. Die Vitalität der Zellen war jedoch auf 73 % der Kontrollvitalität reduziert (Abb. 35 c).

In einem späteren Wiederholungsversuch mit Tübinger U937-Zellen zeigte sich keine deutliche Protein- oder Enzymfreisetzung in den Überstand (Abb. 35 b). Nur die Vitalität der Zellen reduzierte sich auf 81 % der Kontrolle. Es ist möglich, daß sich die Zellen durch Einfrieren oder durch höhere Passagenzahlen verändert hatten.

Die Tübinger U937-Zellen erwiesen sich gegenüber Chrysotil Asbest bezüglich ihrer Vitalität als resistent (Abb. 10). Es kam auch bei der Verteilung von Protein, LDH und NAG nur zu einer ganz schwachen Veränderung. Es erfolgte eine kleine Erhöhung des LDH-Gehaltes der Überstandsfraktion. Durch eine konzentrationsabhängige Erhöhung der spezifischen LDH-Aktivität in der Überstandsfraktion bei konstanter NAG-Aktivität kam es zu einer Erhöhung des Quotienten aus LDH/NAG (Tab. 14). Es wurde demnach selektiv LDH in den Überstand freigesetzt.

In allen Ansätzen mit Quarz und DPL konnte eine Modifikation gegenüber dem nativen Quarzeffekt beobachtet werden (Abb. 35). Die Tübinger U937-Zellen setzten deutlich weniger Protein und Enzym in den Medienüberstand frei (Abb. 35 a). Der Schutzeffekt betrug 66 - 97 % (Tab. 13). Die Vitalität der mit Quarz und DPL inkubierten Zellen entsprach der Kontrolle. Die Amerikanischen U937-Zellen wurden deutlich adhärenter in Gegenwart von Quarz und DPL (Abb. 35 c), ihre Vitalität entsprach der Kontrolle.

### **Morphologische Veränderungen**

Bei den Raster-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren nur adhärent gewordene U937-Zellen zu sehen (Abb. 36 A). Sie besaßen einige filopodienartige Zellausläufer, die sie auf dem Glasuntergrund ausgebreitet hatten. Bei den mit Hemacolor gefärbten Zellen waren zwei verschieden angefärbte Zellgruppen zu erkennen (Abb. 36 B). Die dunkler gefärbten Zellen waren möglicherweise weniger auf dem Untergrund ausgebreitet, als die heller gefärbten Zellen. Insgesamt waren die Zellkerne der Zellen schlecht vom Zytoplasma abzugrenzen. Nach einer 20-stündigen Inkubation mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) waren nur wenige U937-Zellen geschädigt, die meisten Zellen wirkten völlig intakt (Abb. 36 A). Im Lichtmikroskop waren einzelne mit Hemacolor kaum gefärbte weit ausgebreitete Zellreste zu sehen (Abb. 36 B, Bild b) und weiterhin viele dunkel angefärbte Zellen. Nur wenige Zellen enthielten Vakuolen, und nur ca. 25 % der Zellen schienen Quarz aufgenommen zu haben.

Mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml) inkubierte U937-Zellen wirkten völlig intakt, einige Zellen waren jedoch deutlich abgeflachter (Abb. 36 A). Die mit Quarz oder Asbest inkubierten Zellen wiesen verstärkt Mikrovilli an ihrer Zelloberfläche auf (Abb. 36 A). Bei den mit der Hemacolor-Methode gefärbten Zellen, die 20 Stunden mit Asbest inkubiert worden waren, enthielten ca. 25 % der Zellen Vakuolen und ca. 40 % der Zellen segmentierte Zellkerne (Abb. 36 B, Bild c). Insgesamt waren mehr Zellen dunkler angefärbt als bei den Kontrollen.

In Gegenwart von Quarz und DPL sahen fast alle Zellen intakt aus (Abb. 36 A). Sie wiesen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich vermehrte Oberflächenstrukturen auf. Die mit Hemacolor gefärbten Zellen mit Quarz und DPL sahen wie die Kontrollen mit DPL aus. Einige Zellen hatten vermehrt Zellausläufer an ihrer Oberfläche ausgebildet (Abb. 36 A). Ca. 21 % der Zellen hatten sich stärker ausgebreitet, Quarzpartikel phagozytiert und größere Vakuolen ausgebildet (Abb. 36 B).

### **3.3. Interspezies Vergleich**

#### **3.3.1. Kontrollzellen**

Die Kontrollzellen der verschiedenen Spezies zeigten im 20-Stunden-Inkubationsintervall ein unterschiedliches Ablöseverhalten (Abb. 39 a). Daher war es sinnvoll, die Überstände zur Entfernung der abgelösten Zellen zu zentrifugieren. Es erfolgte außerdem eine unterschiedliche Freisetzung von Protein und Enzymen in den Medienüberstand unter den gewählten Kulturbedingungen. Verglich man die Gesamtmengen an Protein und Enzym, so fiel auf, daß die Kontrollzellen der verschiedenen Spezies und der Zelllinie unterschiedliche Mengen enthielten (Tab. 9). Daraus ergaben sich unterschiedliche spezifische Enzymaktivitäten (Abb. 37), obwohl bei den meisten Alveolarmakrophagen mehr LDH als NAG vorhanden war (Tab. 9). Eine Ausnahme bildeten die Affen-Alveolarmakrophagen. Sie enthielten mehr NAG als LDH.

Bezogen auf die Zellzahl fielen die Alveolarmakrophagen des Rauchers mit einem sehr hohen und die Alveolarmakrophagen der Hunde mit einem sehr niedrigen Proteingehalt auf (Tab. 9). Die Hunde-Alveolarmakrophagen enthielten außerdem sehr wenig LDH bezogen auf  $1 \times 10^6$  Zellen, während die Tübinger U937-Zellen in diesem Rahmen wegen eines ungewöhnlich hohen LDH-Gehaltes auffielen. Gemeinsam mit den Ratten-Alveolarmakrophagen wiesen sie den höchsten LDH/NAG-Quotienten auf (Tab. 9). Der NAG-Gehalt der verschiedenen Zellen variierte am stärksten (Tab. 9).

Ähnliche speziesspezifische Variationen wie bei dem Gehalt an biochemisch nachgewiesener lysosomaler NAG zeigten sich auch bei dem Gehalt an histochemisch nachgewiesenen substratspezifischen Esterasen in den Lysosomen der Alveolarmakrophagen. Rinder- und Ratten-Alveolarmakrophagen waren stark

$\alpha$ -Naphthyl-butyrate-Esterase positiv (Abb. 38 A), während die Alveolarmakrophagen von Hund, Affe und Mensch (Raucher und Sarkoidose Patient) nur wenige positive Bereiche aufwiesen. Die Reaktion auf  $\alpha$ -Naphthyl-acetat-Esterase war bei den Zellen einheitlicher (Abb. 38 B). Amerikanische und Tübinger U937 erwiesen sich bezüglich beider Enzyme bis auf wenige positive Bereiche in den Zellen (Abb. 38 A und B) als negativ.

Die Anwesenheit von DPL hatte während des 20-Stunden-Intervalls keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen und ihre Protein- und Enzymverteilung (Abb. 15 und 19). Daher wurde bei den meisten Darstellungen auf die Angabe der Werte für die Kontrolle mit DPL verzichtet.

### **3.3.2. Kontrollstäube**

Eine 20-stündige Inkubation von Rinder- und Ratten-Alveolarmakrophagen und U937-Zellen mit 250  $\mu\text{g/ml}$  Titandioxid (Anatas, Aldrich) bewirkte keine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Freisetzung von Proteinen oder Enzymen (Abb. 39). Die Inkubation der Zellen mit Titandioxid bewirkte auch keine Veränderung der spezifischen Enzymaktivitäten in den verschiedenen Fraktionen des Kulturansatzes gegenüber der Kontrolle.

### **3.3.3. Toxische Stäube**

Die Wirkung der Stäube wurde in verschiedenen Parametern gemessen. Im Folgenden wird zunächst auf jeden Parameter einzeln eingegangen. Dabei werden die Ergebnisse bei den Alveolarmakrophagen der verschiedenen Spezies und der menschlichen Zelllinie untereinander verglichen.

#### **3.3.3.1. Vitalitätsminderung durch Quarz und Asbest**

Bei der Inkubation der Zellen mit 50-500  $\mu\text{g DQ12 Quarz/ml}$  und 20-stündiger Exposition zeigte sich eine dosisabhängige Vitalitätsabnahme in zwei Abschnitten (Abb. 9 und 40). Eine steil verlaufende lineare Vitalitätsabnahme im Bereich von 50-100  $\mu\text{g Quarz/ml}$  ging in einen weniger steilen linearen Verlauf im Bereich von 100-500  $\mu\text{g Quarz/ml}$  über. Dabei kristallisierten sich im Bereich von 50-100  $\mu\text{g Quarz/ml}$  zwei unterschiedlich empfindliche Zellgruppen heraus (Abb. 9). Die Alveolarmakrophagen von Hund, Affe und Mensch waren in diesem Konzentrationsbereich deutlich empfindlicher (Vitalität  $< 50\%$ ) als die Alveolarmakrophagen von Rind und Ratte und die U937-Zellen (Vitalität  $> 50\%$ ). Betrachtete man den Verlauf der Vitalitätsabnahme im Konzentrationsbereich von 250-500  $\mu\text{g Quarz/ml}$ , so näherten sich die Alveolarmakrophagen

der verschiedenen Spezies einem gemeinsamen Endpunkt bei 500 µg/ml (Abb. 9). Bei logarithmischer Darstellung der Vitalitätsachse wurde im Konzentrationsbereich von 100-500 µg/ml ein fast paralleler Verlauf der Vitalitätsabnahme bei den Zellen der verschiedenen Spezies sichtbar (Abb. 40). Eine Ausnahme in Bezug auf die Empfindlichkeit der Zellen bildeten die U937-Zellen, deren Vitalität zwar im niedrigen Konzentrationsbereich 50-100 µg Quarz/ml stärker, im hohen Konzentrationsbereich (250-500 µg/ml) jedoch kaum noch abnahm. Die Vitalität der Zellen von Hund, Affe und Mensch (Sarkoidose Patient) unterschritt bei < 50 µg Quarz/ml die 50 % Vitalitätsmarke, bei den menschlichen Alveolarmakrophagen vom Raucher bei < 100 µg/ml und bei den Alveolarmakrophagen von Rind und Ratte bei < 250 µg/ml. Für die U937-Zellen lag die 50 %-Marke bei 500 µg/ml.

Bei der Vitalitätsabnahme der Zellen nach Inkubation mit 50-500 µg Asbest/ml zeigte sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Geradenverlauf in zwei Abschnitten (Abb. 10). Im Konzentrationsbereich von 50-100 µg Asbest/ml waren dieselben unterschiedlich empfindlichen Gruppen wie im Fall der niedrigen Quarzkonzentrationen zu beobachten. Im Vergleich zur zytotoxischen Quarzwirkung war jedoch das Ausmaß der Zellzerstörung durch Asbest bei gleicher Staubkonzentration geringer. Dies zeigte sich auch in einem weniger steilen Verlauf der Vitalitätsabnahme nach Inkubation der Zellen mit 100-500 µg Asbest/ml (Abb. 9 und 10). Ein gemeinsamer Endpunkt war vermutlich erst bei einer Konzentration > 500 µg Asbest/ml zu erreichen (Abb. 10). Bei logarithmischer Darstellung der Vitalitätsachse zeigte sich ein annähernd paralleler Verlauf in der Vitalitätsabnahme der Alveolarmakrophagen von Ratte, Rind, Affe und Raucher im Dosisbereich von 100-500 µg Asbest/ml (Abb. 41). Die 50 % Vitalitätsmarke lag für die Alveolarmakrophagen der Affen bei 50-100 µg/ml, für die Zellen von Hund und Mensch (Sarkoidose Patient) bei < 250 µg/ml, für die Rinder-Alveolarmakrophagen bei ca. 250 µg/ml und für die menschlichen Zellen (Raucher) bei < 500 µg/ml. Die Ratten-Alveolarmakrophagen und die U937-Zellen erwiesen sich als am unempfindlichsten gegenüber Chrysotil Asbest. Ihre Vitalität nahm bei den getesteten Asbestkonzentrationen kaum ab.

### **3.3.3.2. Protein- und Enzymfreisetzung durch Quarz und Asbest**

#### **Bezug der freigesetzten Menge auf den Gesamtgehalt des Kulturansatzes**

Die erste Berechnung der Protein- und Enzymfreisetzung erfolgte als % Freisetzung von der Gesamtmenge des gemessenen Parameters (% von **Z + P + Ü**). Bei allen untersuchten Spezies war eine durch die toxischen Stäube induzierte Erhöhung von Protein und Enzymen im Überstand zu beobachten. Die meßbare

zytotoxische Wirkung der Stäube setzte bei der Staubkonzentration ein, bei der durch eine Schadigung der Plasmamembran (von außen durch die Stäube oder von innen durch den Zerfall staubhaltiger Lysosomen und anschließender Schadigung der Plasmamembran) zytoplasmatische LDH aus der Zelle austreten konnte. Diese LDH-Freisetzung war nicht auf eine Sezernierung durch die Zellen zurückzuführen, da die im Kulturansatz enthaltene Gesamtmenge an LDH durch den Einfluß der Stäube nicht zunahm. Die LDH konnte allein oder in Begleitung von NAG und anderen Proteinen aus der Zelle ausströmen. Die Gesamtmenge an Protein und NAG im Kulturansatz blieb ebenfalls konstant.

Bei den Rinder-Alveolarmakrophagen erfolgte die erste staubinduzierte LDH-Freisetzung im Bereich von 100  $\mu\text{g}$  DQ12 Quarz/ml (Abb. 11) und 100-250  $\mu\text{g}$  Chrysotil Asbest/ml (Abb. 12). Bei den Ratten-Alveolarmakrophagen fand sie bei 50-100  $\mu\text{g}$  Quarz/ml (Abb. 17) und bei 250  $\mu\text{g}$  Asbest/ml (Abb. 18) statt. Hunde-Alveolarmakrophagen setzten gegenüber den unbehandelten Zellen verstarkt LDH bei  $< 50$   $\mu\text{g}$  Quarz/ml (Abb. 21) und zwischen 50 und 100  $\mu\text{g}$  Asbest/ml (Abb. 22) frei. Bei den Affen-Alveolarmakrophagen erfolgte die LDH-Freisetzung bei  $< 100$   $\mu\text{g}$  Quarz/ml (Abb. 25) und bei  $< 100$   $\mu\text{g}$  Asbest/ml (Abb. 26). Menschliche Alveolarmakrophagen (Raucher) reagierten in gleicher Weise. Bei ihnen wurde ebenfalls LDH bei  $< 100$   $\mu\text{g}$  Quarz (Abb. 28) oder Asbest (Abb. 29) freigesetzt. Da bei den Alveolarmakrophagen der beiden **Sarkoidose Patienten** nur eine Staubkonzentration getestet werden konnte, kann an dieser Stelle nur ausgesagt werden, daß die Zellen im Bereich bis 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  auf beide Stäube reagierten (Abb. 31). Die Tübinger U937-Zellen setzten deutlich mehr LDH als unbehandelte Zellen bei  $< 50$   $\mu\text{g}$  Quarz/ml (Abb. 33) und 100-500  $\mu\text{g}$  Asbest/ml (Abb. 34) frei.

In Bezug auf den ersten deutlichen staubinduzierten Anstieg der LDH im Überstand erwiesen sich die Alveolarmakrophagen von Hunden, Affen und Menschen und die Tübinger U937-Zellen als am empfindlichsten gegenüber Quarz. In Bezug auf Asbest reagierten die Alveolarmakrophagen von Hunden, Affen und Menschen am empfindlichsten. Dieses Ergebnis entspricht mit einer Ausnahme, den U937-Zellen, dem Ergebnis der Vitalitatsbestimmungen (Abb. 9 und 10).

#### **Bezug der freigesetzten Menge mit der durch Kontrollzellen freigesetzten Menge an Enzymen**

Da die Enzymfreisetzungen durch die Kontrollzellen bei den verschiedenen Spezies stark unterschiedlich waren (Abb. 39), wurden in einem weiteren Vergleichsschritt die durch Quarz oder Asbest induzierten Enzymleckagen durch Bezug auf die jeweiligen Kontrollwerte (**% Kontrolle**) relativiert (Abb. 42).

In Abbildung 42 ist die Quarz-induzierte LDH-Freisetzung dargestellt. Menschliche Alveolarmakrophagen eines Rauchers und U937-Zellen setzten

relativ mehr LDH im Vergleich zu ihren Kontrollen in den Überstand frei, als die Alveolarmakrophagen von Affen, Rindern und Sarkoidose Patienten. Am geringsten war bei dieser Art des Vergleiches die LDH-Freisetzung bei Ratten-, Hunde- und Rinder-Alveolarmakrophagen. Im Fall der Rinder-Alveolarmakrophagen ergab eine mehrfache Reproduktion des Versuchsansatzes mit 250 µg Quarz/ml (n = 9) einen höheren Wert für die Quarz-induzierte Enzymfreisetzung. Er betrug  $781 \pm 153$  % der Kontrollfreisetzung. Die relativ niedrigen Enzymfreisetzungen durch Quarzexposition bei Hund und Affe resultierten aus hohen LDH-Freisetzungen bereits durch die Kontrollzellen (Abb. 23 und 25). Ähnlich der LDH-Freisetzung verlief auch die Freisetzung von NAG in der gleichen Reihenfolge (Tab. 10).

In Abbildung 43 sind die durch Chrysotil Asbest induzierten LDH-Freisetzungen dargestellt. Auch hier erfolgte bei den Alveolarmakrophagen von Mensch (Raucher), Affe und Rind die relativ höchste und bei den Zellen der Sarkoidose Patienten, Hunde und Ratten die relativ niedrigste Enzymfreisetzung gegenüber der Kontrolle. Die NAG-Freisetzung entsprach wieder der gleichen Reihenfolge (Tab. 10).

### **Spezifische Enzymaktivitäten**

Ein weiterer Aspekt betraf die Selektivität der LDH- oder NAG-Freisetzung in den Medienüberstand. Betrachtete man zunächst die Ergebnisse mit Rinder-Alveolarmakrophagen, so war festzustellen, daß der Quotient aus LDH/NAG in der Überstandsfraktion von Quarz-exponierten Zellen konstant blieb. Protein, LDH und NAG wurden in gleichem Umfang in den Überstand freigesetzt (Tab. 14). Bei der Bestimmung der Dosis-Effekt-Verhältnisse (Abb. 11, n = 1) wurde allerdings eine konzentrationsabhängige lineare Abnahme des LDH/NAG-Quotienten und eine Zunahme der spezifischen NAG-Aktivität im Überstand beobachtet. Bei der Inkubation der Zellen mit Asbest ergab sich im Konzentrationsbereich bis 250 µg/ml eine Abnahme des LDH/NAG-Quotienten gegenüber der Kontrolle. Die spezifische NAG-Aktivität nahm in diesem Bereich im Überstand zu (Tab. 14). Im Bereich von 250-500 µg Asbest/ml nahm jedoch die LDH-Freisetzung zu (Abb. 12), was zu einer Zunahme des LDH/NAG-Quotienten führte. Hier nahm die spezifische NAG-Aktivität ab.

Bei den Alveolarmakrophagen der Ratte erhöhte sich nach Inkubation der Zellen mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) der LDH/NAG-Quotient gegenüber dem Kontrollwert (Tab. 14). Die spezifische LDH-Aktivität der Überstandsfraktion war gegenüber der Kontrolle erhöht. Bei der Inkubation der Zellen mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml) blieb das Verhältnis von LDH zu NAG im Überstand gleich. Die beiden spezifischen Aktivitäten von LDH und NAG waren erhöht.

Bei den U937-Zellen kam es nach Inkubation der Zellen mit DQ12 Quarz (50-500 µg/ml) zu einem deutlichen konzentrationsabhängigen Anstieg des

LDH/NAG-Quotienten gegenüber der Kontrolle. Die spezifische LDH-Aktivität im Überstand war erhöht (Tab. 14), während die spezifische NAG-Aktivität konstant blieb. Bei der gemessenen minimalen Asbest-induzierten Enzymfreisetzung wurde ebenfalls ein mit der Asbestkonzentration zunehmender Anstieg der spezifischen LDH-Aktivität in der Überstandsfraction beobachtet (Tab. 14). Der Quotient aus LDH/NAG nahm zu.

Obwohl die Alveolarmakrophagen von Rind und Ratte und die U937-Zellen zu den im niedrigen Dosisbereich von Quarz und Asbest unempfindlicher reagierenden Zellen gehörten, zeigten sie doch speziesspezifische Unterschiede im Reaktionsmuster auf DQ12 Quarz. Die Rinder-Alveolarmakrophagen setzten nicht wie die Zellen von Ratten oder der U937-Zelllinie selektiv vermehrt LDH in den Überstand frei. Betrachtete man das entsprechende Reaktionsmuster der Zellen auf Chrysotil Asbest, so stellte man fest, daß die Rinder-Alveolarmakrophagen im niedrigen Konzentrationsbereich verstärkt NAG freisetzen und im hohen Konzentrationsbereich verstärkt LDH. Bei den Ratten-Alveolarmakrophagen blieb der LDH/NAG-Quotient über den gesamten Konzentrationsbereich konstant, da eine quantitativ gleiche, konzentrationsabhängige Zunahme der LDH- und NAG-Freisetzung erfolgte. Bei den Tübinger U937-Zellen erfolgte eine geringe selektive LDH-Freisetzung in den Überstand. Nach diesen Ergebnissen existieren speziesspezifische Unterschiede unabhängig von dem verwendeten Staub. Zusätzlich bestehen auch Unterschiede im Reaktionsmuster der Zellen gleicher Herkunft auf die beiden unterschiedlichen Stäube. Dieses galt auch für die Alveolarmakrophagen der Spezies, die besonders empfindlich auf Quarz und Asbest reagierten. Die Alveolarmakrophagen von Hunden, Affen und Menschen reagierten ebenfalls ganz unterschiedlich in Bezug auf die Selektivität der durch die Stäube verursachten Freisetzung.

Bei den Hunde-Alveolarmakrophagen blieb der Quotient aus LDH/NAG in der Überstandsfraction bei Quarz-exponierten Zellen gegenüber der Kontrolle konstant. Es erfolgte eine konzentrationsabhängige lineare Zunahme der spezifischen LDH- und NAG-Aktivität. Die Inkubation der Zellen mit Chrysotil Asbest bewirkte eine der Kontrolle gegenüber gesteigerte spezifische NAG-Aktivität im Überstand (Tab. 14). Die spezifische LDH erhöhte sich nur leicht. Es kam zu einer Abnahme des LDH/NAG-Quotienten gegenüber der Kontrolle.

Bei den Affen-Alveolarmakrophagen kam es bei der Inkubation der Zellen mit 250 µg/ml Quarz zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der spezifischen LDH-Freisetzung (Tab 14). Es ergab sich ein gegenüber der Kontrolle erhöhter LDH/NAG-Quotient. Im Fall von Asbest erhöhte sich auch die spezifische NAG-Aktivität im Überstand mit der Konzentration des Staubes. Der Quotient aus LDH/NAG stieg durch die stärkere Erhöhung der spezifischen LDH-Aktivität ähnlich wie beim Quarzeffekt an (Tab. 14).

Bei den menschlichen Alveolarmakrophagen (Raucher) sank das Verhältnis von LDH/NAG im Überstand DQ12 Quarz-inkubierter Zellen ab. Die spezifische LDH-Aktivität in dieser Fraktion blieb konstant, während die spezifische NAG-Aktivität im Überstand zunahm. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch nach der Inkubation der Zellen mit Asbest (Tab. 14).

Die Alveolarmakrophagen des **Sarkoidose Patienten** zeigten eine andere Reaktion. Hier stieg im Fall von Quarz und Asbest der LDH/NAG-Quotient an, verursacht durch eine Abnahme der spezifischen NAG-Aktivität, die in Gegenwart von Quarz (250 µg/ml) stärker ausgeprägt war als bei Asbest (Tab. 14). Die spezifische LDH-Aktivität der Überstandsfraktion Quarz-exponierter Zellen blieb gegenüber der Kontrolle konstant, während sie bei Asbest-exponierten Zellen anstieg (Tab. 14).

Bei den Zellen einer **Sarkoidose Patientin** war der gleiche LDH/NAG-Quotient wie bei der Kontrolle zu beobachten, da die spezifischen Aktivitäten von LDH und NAG im Überstand im gleichen Ausmaß erhöht waren (Tab. 14).

Diese Unterschiede in den spezifischen Enzymaktivitäten oder in den LDH/NAG-Quotienten der Medienüberstände können ein Hinweis auf unterschiedliche Schadensabläufe (Mechanismen oder zeitliche Effekte) bei den Zellen der verschiedenen Spezies und den beiden untersuchten Stäuben sein.

### 3.3.3.3. Morphologische Veränderungen

Mit der Vitalitätsabnahme und der Freisetzung von Gesamtprotein, LDH und NAG fanden morphologische Veränderungen an den Zellen statt. Die Form der Veränderung hing mit dem Ausmaß der Zellschädigung zusammen.

Bei der Inkubation der Zellen mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) kam es bei allen Spezies zur Ausbildung von Vakuolen in den Zellen (Abb. 16 B, 20 B, 24 B, 27 B, 32 und 36 B). Bei den Rinder-Alveolarmakrophagen enthielten ca. 75 % der Zellen Vakuolen, bei den Ratten ca. 70 % (hier enthielten jedoch auch < 20 % der Kontrollzellen Vakuolen), bei den Hunden ca. 70 %, bei den Affen ca. 62 %, bei den Tübinger U937-Zellen ca. 25 %, und bei den menschlichen Zellen enthielten 100 % der Zellen Vakuolen. Die Anzahl vakuolenhaltiger Zellen konnte also keine Auskunft über die Vitalität oder das Ausmaß der Zellschädigung geben, da alle phagozytierenden Zellen ähnlich viele Vakuolen nach der Inkubation mit Quarz enthielten, aber unterschiedlich stark geschädigt waren.

Bei stark geschädigten Zellen war der Anteil der Zellen mit glatter Oberfläche erhöht. Bei den Rinder-Alveolarmakrophagen waren ca. 30 % der Zellen glatt und 30 % der Zellen deformiert, bei den Hunden waren ca. 80 % der Zellen glatt oder anderweitig entstellt. Bei den Affen sahen ca. 85 % der Zellen glatt oder anders defekt aus, und beim Menschen (Raucher) waren alle Zellen bei dieser Konzentration so stark geschädigt, daß sie entweder glatt oder wie zertrümmert aussahen (Abb. 30). Bei Kontrollzellen wurden solche deformierten Zellen fast nie beobachtet (< 10 %).

Bei der Inkubation mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml) wurden die gleichen Phänomene beobachtet. Es war kein großer Unterschied in der Anzahl der Asbest-induzierten Vakuolen zu der gleichen Quarzkonzentration zu beobachten. Die Asbest-induzierten Vakuolen schienen jedoch größer zu sein als die Quarz-induzierten, wurden aber nicht quantitativ vermessen.

Die Veränderung der Zelloberfläche fiel nach der Inkubation mit Asbest zum Teil gleich (Hund und Affe) und zum Teil etwas geringer als bei der gleichen Quarzkonzentration aus. Bei den Rinder-Alveolarmakrophagen sahen ca. 30 % der Zellen glatt und 15 % brüchig aus, bei der Ratte waren ca. 30 % der Zellen glatt. Bei den menschlichen Alveolarmakrophagen des Rauchers wurden neben porös wirkenden Zellen (ca. 20 %) auch Zellen mit modifizierten Mikrovilli an der Oberfläche (Abb. 30) beobachtet. Bei den Tübinger U937-Zellen wurden überhaupt keine glatten Zellen beobachtet.

Durch die Inkubation der Zellen mit Quarz oder Asbest ergab sich eine Zunahme der vakuolenhaltigen Zellen gegenüber den Kontrollen. Das Ausmaß der toxischen Wirkung der Stäube korrelierte mit dem Erscheinen von glatten und wie ein eingefallenes Zellgerüst wirkenden Zellen.

#### **3.3.4. DPL-Schutzeffekt**

Einen wichtigen Aspekt stellte der DPL-Schutzeffekt dar. Ein Vergleich der Protein- und Enzymfreisetzungen als % der Kontrollwerte nach Inkubation der Zellen mit 250 µg/ml Quarz (Tab. 11) oder Asbest (Tab. 12) mit und ohne DPL-Zusatz ergab jedoch kein quantitatives Maß für den Schutzeffekt. Zur quantitativen Bestimmung der Güte des DPL-Schutzeffektes wurde eine weitere Art der Berechnung durchgeführt (siehe Kapitel 2.6.) Auf diese Weise konnte sichtbar gemacht werden, daß es bei allen getesteten Spezies einen DPL-Schutzeffekt vor Quarz, nicht aber vor Asbest gab. Das Ausmaß war jedoch unterschiedlich. Bei den Rinder-Alveolarmakrophagen und den Tübinger U937-Zellen war der Schutzeffekt hoch signifikant ( $2 p < 0,001$ , Tab. 13). Etwas geringer war der Schutzeffekt bei den Ratten-Alveolarmakrophagen ( $2 p < 0,05$ ). Die NAG-Freisetzung blieb nach Inkubation der Zellen mit Quarz (250 µg/ml) und DPL unvermindert hoch (Tab. 13). Der DPL-Schutzeffekt war bei menschlichen Alveolarmakrophagen deutlich geringer als bei den Alveolarmakrophagen von Rind und Ratte und den U937-Zellen (Tab. 13). Bei den Alveolarmakrophagen des Rauchers schien ein höherer DPL-Schutzeffekt vor Quarz vorzuliegen als beim Sarkoidose Patienten. Dieser Befund bedarf aber dringend einer weiteren Überprüfung, da eine zu geringe Zahl an Versuchen vorliegt.

Leider konnten die Daten der DPL-Schutzeffekte für Hund und Affe nicht verwertet werden, da nicht klar war, ob durch die Benutzung der in den auswärtigen Labors vorhandenen Ultraschall-Wasserbäder die DPL-Stammlösungen

ausreichend intensiv dispergiert vorlagen. Bei den im eigenen Labor durchgeführten Versuchen stand ein wesentlich stärker dispergierendes Gerät, ein Branson Sonifier B15, zur Verfügung. Die Mikroverteilung der DPL-Suspension hat bei der simultanen Gabe von DPL-Lösung und Stäuben sicher einen Einfluß auf das Ausmaß der Partikelumhüllung und somit auf den resultierenden Schutzeffekt.

### **Morphologische Veränderungen**

Nach Inkubation der Zellen mit Quarz und DPL waren die Vakuolen in den Zellen und die bei einigen Zellen beobachtete starke Ausbreitung des Zellzytoplasmas noch vorhanden, die Oberflächenstruktur der Zellen jedoch besser erhalten. Bei den Ratten- und Rinder-Alveolarmakrophagen wurden mit Quarz und DPL wie bei den Kontrollzellen keine glatten oder porösen Zellen beobachtet. Aus diesem Grund sind die beiden zuerst genannten Phänomene eher der Aktivierung der Zellen durch die Phagozytose zuzuordnen. Die Oberflächenstruktur der Zellmembran stellt einen Indikator für die Zytotoxizität von Quarz und Asbest dar.

Die Inkubation der Zellen mit Asbest und DPL bewirkte in keinem der untersuchten Fälle einen morphologischen Unterschied zur Wirkung von nativem Asbest.

#### **3.3.5. Latex-Phagozytose**

Eine mögliche Ursache für die speziesspezifischen Unterschiede in der Sensitivität der Zellen gegenüber Quarz und Asbest könnte in einer unterschiedlichen Phagozytoseleistung der Zellen begründet sein. Dieses vor allem dann, wenn Schaden erst nach der Aufnahme der Partikel durch Phagozytose initiiert wird, was aber sicher nicht der einzige Mechanismus ist (vergleiche Hofheinz, 1988). Da die Phagozytose von Quarz und Asbest wegen der starken Zellzerstörung nach 20-stündiger Inkubation nicht bestimmt werden konnte, wurde stellvertretend die Phagozytose von 2 µm Latexpartikeln nach 20-stündiger Inkubation bestimmt. Am Beispiel der Latexphagozytose ist zu sehen, daß Zellen mit ähnlicher Phagozytoseleistung (Alveolarmakrophagen von Rind und Affe, Abb. 44), dennoch unterschiedlich geschädigt werden können (Abb. 11 und 25).

### **3.4. Weitere Kulturzusätze**

Um das *in vitro* Testsystem so realistisch wie möglich zu gestalten, wurde die Schutzwirkung von Lavageflüssigkeit bestimmt. Die Anwesenheit einer durch physiologische Kochsalzlösung und RPMI 1640 Medium verdünnten

Lavageflüssigkeit ( $LF_{\text{pur}}$ ) bewirkte bei Rinder-Alveolarmakrophagen einen deutlichen Schutzeffekt vor bis zu 250  $\mu\text{g}$  DQ12 Quarz/ml. Dabei entsprach die Vitalität der Zellen der von Kontrollzellen (Abb. 45). Die Inkubation der Zellen mit Quarz (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und verdünnter Lavageflüssigkeit führte gegenüber nativem Quarz zu einer signifikant verminderten Protein- und Enzymfreisetzung (Abb. 46). Dabei wurde die LDH-Freisetzung am stärksten reduziert, blieb aber gegenüber der Kontrollfreisetzung erhöht.

Wurde statt der ursprünglichen Lavageflüssigkeit eine durch Ultrazentrifugation angereicherte Fraktion ( $LF_{\text{konz.}}$ ) verwendet, konnte der Schutzeffekt auf höhere Quarzkonzentrationen (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ausgedehnt werden (Abb. 45). Dieser Schutz hielt nur 20 Stunden an (Abb. 47 c). Bei einer 40-stündigen Inkubation von Zellen mit 250  $\mu\text{g}$  Quarz/ml und verdünnter Lavageflüssigkeit zeigte sich eine deutliche Vitalitätsabnahme bei den Zellen (Abb. 47 b) verbunden mit einer gegenüber der Kontrolle verstärkten Protein- und Enzymfreisetzung (Abb. 48). Im Gegensatz dazu hielt der DPL-Schutz länger als 40 Stunden an (Abb. 47). Es kam zu keiner gegenüber der Kontrolle verstärkten Protein- und Enzymfreisetzung in den Überstand (Abb. 48). Untersuchungen zur Bestimmung der DPL-Konzentration der verwendeten Lavageflüssigkeit ergaben einen Gehalt von ca.  $7 \pm 2$   $\mu\text{g}$  disaturierter Phosphatidylcholine, die zu 70-86 % aus DPL bestanden (siehe Kapitel 2.4.1.) im Gegensatz zu der verwendeten DPL-Stammlösung mit 333  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Da in der Lunge auch andere Substanzen wie Serumalbumin (Harwood, 1987) oder antioxidative Substanzen wie z.B. Vitamin E vorhanden sind (Pacht et al., 1986), wurde stichprobenartig überprüft, welche der Substanzen den höchsten Modifikationseffekt bei DQ12 Quarz und Chrysotil Asbest bewirkten. Serumalbumin hatte in beiden Fällen keinen ausgeprägten Schutzeffekt (Abb. 46 und 49). Erstaunlich war eine scheinbare Erhöhung der Vitalität Quarz- oder Asbest-inkubierter Zellen mit BSA gegenüber der Vitalität von Zellen, die nur mit den nativen Stäuben inkubiert waren. Bei diesem Phänomen handelte es sich vermutlich um ein ähnliches Artefakt, wie es bei der Vitalitätsbestimmung in serumhaltigem Medium vorkommt (Phillips, 1973).

Lavageflüssigkeit und Vitamin-E-Zusatz zeigten eine Tendenz zum Schutzeffekt vor Chrysotil Asbest, was die Freisetzung der zytoplasmatischen LDH betraf. Eine leichte Erhöhung der NAG-Freisetzung wie beim nativen Asbesteffekt blieb bestehen (Abb. 49).

## IV. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Analyse zytotoxischer Wirkungen von Quarz und Asbest mit dem Schwerpunkt eines Interspeziesvergleiches. Es sollte herausgefunden werden, ob die Alveolarmakrophagen verschiedener Säugetiere qualitativ und quantitativ unterschiedlich auf toxische Stäube reagieren. Zu diesem Zweck wurden zwei in vielen Parametern sehr unterschiedliche Stäube, DQ12 Quarz und Chrysotil Asbest, ausgewählt. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Zellen unterschiedliche Reaktionsmuster auf verschiedene Stäube zeigen und ob sich diesbezüglich speziesspezifische Variationen ergeben. Von großem Interesse war auch die Reaktion der monozytären menschlichen Zelllinie U937 auf die ausgewählten Stäube. Dabei sollte geklärt werden, ob diese Zellen als Ersatz für primäre Alveolarmakrophagen zur Untersuchung zytotoxischer Quarz- und Asbesteffekte geeignet sind. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Testsystem mit Rinder-Alveolarmakrophagen und Kontrollstäuben etabliert.

### Kontrollstäube

Um das Ausmaß zytotoxischer Wirkungen von Phagozytose-induzierten Effekten zu unterscheiden, wurden Rinder-Alveolarmakrophagen 2 und 20 Stunden mit Latex- oder Titandioxidpartikeln inkubiert. Dabei zeigte sich, daß die Inkubation der Zellen mit Latex (0,8  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ ) keine wesentlichen Veränderungen bewirkte, was die Vitalität der Zellen und ihre Protein- und Enzymverteilung im Kultursystem betraf (Abb. 7, Tab. 5), während Titandioxid-inkubierte Zellen einige Modifikationen aufwiesen.

Monodisperses Titandioxid (Anatas, Polysciences, 500  $\mu\text{g/ml}$ ) bewirkte eine geringe, gegenüber Kontrollzellen signifikant erhöhte NAG-Freisetzung in den Überstand (Tab. 6), ohne eine begleitende LDH-Freisetzung zu verursachen. Die Freisetzung von lysosomalen Enzymen entspricht der normalen sekretorischen Funktion von Makrophagen (Rich, 1988). Dieser Vorgang wird durch einen Stimulus induziert und als reverse Endozytose bezeichnet (Unanue et al., 1976). Dabei beträgt die selektive Enzymfreisetzung höchstens 10-25 % der Gesamtmenge und wird nie von einer LDH-Freisetzung begleitet. Da dieser Vorgang Stimulus-induziert ist, kann man in diesem Zusammenhang von einer Aktivierung der Zellen durch Titandioxid sprechen.

Titandioxid (Anatas, Aldrich, 500  $\mu\text{g/ml}$ ) hingegen bewirkte eine kombinierte, von der Kontrolle signifikant verschiedene LDH- und NAG-Freisetzung (Abb. 7, Tab. 6) nach 20-stündiger Inkubationsdauer. Im Gegensatz zu monodispersen Titandioxid (500  $\mu\text{g/ml}$ ) war hier eine Vitalitätsminderung von  $95,4 \pm 2,1$  % auf  $82,6 \pm 1,5$  % zu beobachten. Die Merkmale Vitalitätsminderung und LDH-Freisetzung gelten allgemein als Indikatoren für die Zytotoxizität von Stäuben.

Bei der Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit Titandioxid (Anatas, Aldrich, 250  $\mu\text{g/ml}$ ) fielen morphologische Veränderungen an den Zellen auf.

Cirka 40% der Zellen wiesen auf Raster-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen große Vertiefungen der Plasmamembran auf (Abb. 8 a-c). Da jedoch im Lichtmikroskop große Vakuolen in Titandioxid-exponierten Zellen beobachtet wurden (Pätzold, 1989), können die im Raster-Elektronenmikroskop beobachteten Löcher ein Präparationsartefakt durch kollabierte Vakuolen sein. Dieses Phänomen wurde auch bei ca. 18 % der mit Latex (2  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubierten Zellen beobachtet (Abb. 8 d-f). Im Gegensatz zu den mit Latex inkubierten Zellen fanden sich nach 20-stündiger Inkubation mit Titandioxid (Anatas, Aldrich, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) einzelne Zellen mit einer glatten Oberfläche (Abb. 8 c). Die glatte Zelloberfläche kann auf die starke Ausdehnung dieser Zellen zurückzuführen sein, sie kann aber auch Indikator einer Staub-induzierten Zelldegeneration sein (Coin und Stevens, 1986; Finch et al., 1987). Bei den durch Titandioxid (Anatas, Aldrich) induzierten Veränderungen (Anstieg der LDH im Medium, Vitalitätsabnahme und Veränderungen an der Zellmembran) handelt es sich daher um geringe zytotoxische Effekte.

Die Ansichten über die Zytotoxizität von Titandioxid sind in der Literatur geteilt. Einige Autoren fanden hämolytische Effekte im Erythrozytenmodell (Zitting und Skyttä, 1979) und schlossen leichte Lungenschädigungen (Elo et al., 1972) oder die Entstehung von Lungenkrebs (Yamadori et al., 1986) durch Inhalation von Titandioxid nicht aus. Andere Autoren bezeichneten Titandioxid als inert, obwohl sie ähnliche Vitalitätsabnahmen und LDH-Freisetzungen bei Makrophagen fanden (White et al., 1983; Pasanen und Gustafsson, 1986; Donaldson et al., 1987). Dabei wurden oft die verwendeten Stäube zu wenig charakterisiert. Einen sehr wesentlichen Beitrag in dieser Hinsicht leisteten Nolan et al. (1987) mit ihren in vitro Untersuchungen am Erythrozytenmodell. Sie untersuchten die Wirkung verschiedener Titandioxidpolymorphe an einem Erythrozyten-Hämolyse-Modell mit dem Ergebnis, daß ihre hämolytische Wirkung sehr variierte. Die Toxizität hing von der Wasserstoffbindungsfähigkeit der Mineraloberfläche ab, und diese war bei natürlichen und synthetischen Titandioxiden verschieden. Am Beispiel des Titandioxides wird hier sehr gut sichtbar, daß eine chemische Substanz je nach Beschaffenheit ihrer Oberfläche sowohl inert, als auch toxisch wirken kann. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der einzelnen Spezies mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen.

### **Reaktion der einzelnen Spezies auf toxische Stäube**

Die Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit niedrigen Konzentrationen toxischer Stäube (50  $\mu\text{g}$  Quarz oder Asbest/ml) führte zu dem bei Titandioxid Anatas (Polysciences, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beobachteten Phänomen der Zellaktivierung (selektive NAG-Freisetzung ohne Vitalitätsminderung, Tab. 6, Abb. 9-12). Über eine Zellstimulation bei niedrigen Quarzkonzentrationen berichtete auch Hilscher (1984). Nach 40-stündiger Inkubation der Zellen mit 50  $\mu\text{g}$  Quarz/ml kam es jedoch zu einer Vitalitätsminderung auf ca. 59 % der Kontrollvitalität (Abb. 47 a).

Die Abnahme der Zellvitalität nach 20-stündiger Inkubation mit Chrysotil Asbest stimmte mit der bei White et al. (1983) beschriebenen Vitalitätsabnahme überein (Tab. 15). Die Ergebnisse sind sehr ähnlich, trotz unterschiedlicher Asbestkonzentrationen. Die Ähnlichkeit beruht sehr wahrscheinlich auf der gleichen Flächenbelegung mit Asbest. Sie betrug in beiden Systemen 25-26  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Bei der Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit Quarz oder Asbest (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) nahm der Gesamtgehalt an LDH im Kulturansatz ab. Der Gehalt an NAG blieb konstant. Über die Abnahme des LDH-Gehaltes im Vergleich zu einem konstant bleibenden NAG-Gehalt nach 17-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit Chrysotil Asbest berichteten auch White et al. (1983). Eine Inkubation von Zellhomogenat und Stäuben in gleicher Konzentration wie sie im Zellkulturansatz verwendet wurden ( $3 \times 10^6$  Zellen und 250  $\mu\text{g}$  Staub/ml), führte zu einem interessanten Ergebnis: Quarz und Asbest reduzierten die LDH-Konzentration während einer 20-stündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  (Abb. 6). Im Fall von DQ12 Quarz wurde auch eine Inaktivierung von Cathepsin B, einem lysosomalen Enzym, beobachtet (Pätzold, 1989). Proteinabsorptionseffekte sind seit längerem für Quarz (Desai et al., 1975/78, Emerson und Davis, 1983) und für Asbest (Desai et al., 1975/78, Bignon und Jaurand, 1983) bekannt. Der Effekt der Enzyminhibierung beruht möglicherweise auf der Maskierung des aktiven Enzymzentrums oder auf der Denaturierung des Enzyms nach elektrostatischer Bindung an die Stäube. Eine der Denaturierung ähnliche Konformationsänderung bei Interaktion mit Quarz konnte für BSA beobachtet werden (Rainbow et al., 1987).

Bei den Ratten-Alveolarmakrophagen (Abb. 19 a) fiel im Vergleich zu den Alveolarmakrophagen der anderen Spezies und im Vergleich zu den Ergebnissen einiger anderer Arbeitsgruppen (Emerson, 1983; Nadeau, 1987) eine ungewöhnlich hohe selektive LDH-Freisetzung in den Medienüberstand auf. Die Vitalität der Zellen korrelierte nicht mit der LDH-Freisetzung. Sie entsprach jedoch der von unbehandelten Zellen anderer Spezies. Da die Zellen nach 20-stündiger Kulturdauer einen höheren LDH/ NAG-Quotienten als die Alveolarmakrophagen der anderen Spezies aufwiesen (Tab. 9), bestand die Möglichkeit, daß sie im Gegensatz zu den Zellen der anderen Spezies LDH synthetisiert und sezerniert hatten. In unserer Arbeitsgruppe setzten in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung kultivierte Ratten-Alveolarmakrophagen desselben Rattenstammes (ebenfalls männliche Tiere) nach 18-stündiger Inkubation deutlich weniger LDH frei (Wiener-Schmuck, persönliche Mitteilung). Möglicherweise hing die selektive LDH-Freisetzung der Zellen in meinem Testsystem mit RPMI 1640 Medium mit den Kulturbedingungen zusammen. In der Literatur waren dazu keine Anhaltspunkte zu finden.

Nach Inkubation der Ratten-Alveolarmakrophagen mit Quarz wurde eine dosisabhängige Vitalitätsabnahme und Enzymfreisetzung beobachtet. Die aus der Literatur bekannten Ergebnisse wirkten zunächst sehr unterschiedlich. Bezog

man den Quarzeffekt jedoch nicht auf die Konzentration der Staubsuspensionen, sondern auf die Flächenbelegung der Kulturschale, so ergaben sich erstaunliche Übereinstimmungen in den Ergebnissen der verschiedenen Arbeitsgruppen (Tab. 15). Bei Pasanen und Gustafsson (1986) war bei einer Flächenbelegung von  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine Reduktion der Vitalität um 69 % gegenüber der Kontrolle (24 Stunden Exposition) zu beobachten, was der Vitalitätsminderung um 48 % bei einer Flächenbelegung von  $26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (20-Stunden-Exposition) in meinem System entsprach (Tab. 15). Bei Donaldson et al. (1987) könnte die Flächenbelegung mit DQ12 Quarz bei  $56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) gelegen haben, was die hohe Vitalitätsabnahme bei 24-stündiger Inkubation auf ca. 11 % der Kontrollzellen erklären würde. Emerson und Davis (1983) fanden ebenfalls eine dosisabhängige LDH-Freisetzung bei Ratten-Alveolarmakrophagen, die 24 Stunden mit 50-400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  thermalfusioniertem Quarz (Montville, N.J.) inkubiert worden waren. Danach stieg die LDH-Freisetzung von  $18 \pm 3 \%$  bei unbehandelten Zellen auf  $74 \pm 5 \%$  bei mit 400  $\mu\text{g}$  Quarz/ml behandelten Zellen an, was meinen Ergebnissen entspricht (Abb. 17). Die Flächenbelegung mit Stäuben könnte wie in meinem System gewesen sein, die Angaben zur Methodik waren jedoch diesbezüglich nicht vollständig. Emerson et al. (1983) führten ihre Versuche in DMEM Medium mit 10 % FCS durch. FCS bietet keinen Schutz vor Quarz, was auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigten (Tilkes und Beck, 1983).

Die Inkubation der Ratten-Alveolarmakrophagen mit Chrysotil Asbest ergab eine starke Unempfindlichkeit der Zellen mit geringer Asbest-induzierter Protein- und Enzymfreisetzung. Andere Autoren fanden scheinbar höhere LDH-Freisetzungen nach Inkubation von Ratten-Alveolarmakrophagen mit Chrysotil Asbest. Ging man jedoch wieder von der Flächenbelegung aus (Tab. 15), so fand man auch hier große Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen der Arbeitsgruppen. Bei Nadeau et al. (1987) kam es zu einer gegenüber unbehandelten Zellen um 15 % höheren LDH-Freisetzung nach Inkubation der Zellen mit 25  $\mu\text{g}$  Chrysotil Asbest/ $\text{cm}^2$ . Diese Differenz zu den Kontrollzellen entspricht der in meinen Ansätzen mit  $26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  gefundenen um 18 % erhöhten LDH-Freisetzung (Tab. 15). Donaldson et al. (1987) beobachteten nach 24-stündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{g}$  Chrysotil Asbest/ml ( $\leq 56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) eine Abnahme der Vitalität auf ca. 55 % der Kontrollvitalität. Dieses Ergebnis stimmt mit der in meinem Testsystem beobachteten Vitalitätsabnahme auf 51 % der Kontrollvitalität bei 500  $\mu\text{g}$  Asbest/ml ( $52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) überein.

Unbehandelte Hunde-Alveolarmakrophagen setzten wie die Kontrollzellen der Ratten ungewöhnlich viel LDH selektiv während der 20-stündigen Inkubationszeit frei. Die Gründe sind vermutlich ähnlich. Hill und Hobbs (1982) fanden nach 2 x 48-stündiger Vorinkubation von Beagle-Alveolarmakrophagen eine deutlich geringere LDH-Freisetzung durch die Kontrollzellen. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 100  $\mu\text{g}$  DQ12 Quarz/ml ( $7,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

fanden sie eine LDH-Freisetzung von ca.  $50 \pm 10 \%$ , 43 % mehr als bei den unbehandelten Zellen. In meinem Testsystem setzten die Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit  $50 \mu\text{g DQ12 Quarz/ml}$  ( $5,2 \mu\text{g/cm}^2$ )  $79,1 \pm 0,6 \%$  LDH in den Überstand frei, 47 % mehr, als die Kontrollzellen mit  $32,5 \pm 7,5 \%$  LDH-Freisetzung.

Die Affen-Alveolarmakrophagen reagierten in diesem in vitro Testsystem besonders empfindlich. Dieses war auch bei in vivo Inhalationsstudien (Krombach et al., 1987) beobachtet worden. Nach 22-monatiger Exposition der Affen mit  $5 \text{ mg DQ12 Quarz/m}^3$  (8 Stunden/Tag, 5 Tage/Woche) fanden sich starke fibrotische Gewebeeränderungen und große Mengen LDH in der Lavageflüssigkeit Quarz-exponierter Tiere. Bei den Kontrolltieren fand man 1,3 U/l, bei den Quarz-exponierten Tieren waren es 82,6 U/l. Hier sind noch keine in vitro Daten für Quarz und Asbest bekannt.

Nach 60-minütiger in vitro Inkubation im Schüttelwasserbad von Alveolarmakrophagen der Kontrolltiere mit  $5 \times 10^7$  Latexpartikeln ( $1,91 \mu\text{m}$ ) hatten  $52,2 \pm 7,6 \%$  der Zellen Latexpartikel phagozytiert (Krombach et al., 1987). Dieses entspricht der Phagozytoseaktivität nach 20-stündiger Inkubation mit  $5,7 \times 10^7$  Latexpartikel ( $2,0 \mu\text{m}$ , Abb. 44) in meinem Testsystem.

In meinem Testsystem erwiesen sich die menschlichen Alveolarmakrophagen eines Rauchers und zweier Sarkoidose-Patienten als deutlich Quarz-empfindlicher als z. B. Ratten-Alveolarmakrophagen (Vitalität siehe Abb. 9, Enzyme siehe Abb. 17, 28, 31). Zu entgegengesetzten Ergebnissen kamen Behrendt et al. (1989) mit Rattenmakrophagen und menschlichen, aus Monozyten gewonnenen Makrophagen. Die menschlichen Monozyten waren nach 24-stündiger Inkubation mit DQ12 Quarz ( $225 \mu\text{g/ml}$ ,  $\leq 94 \mu\text{g/cm}^2$ , Tab. 15) zu 55 % vital (Kontrolle: 95 %) und setzten ca. 24 mU LDH/ml (Kontrolle: 4 mU/ml) frei (Seemayer und Braumann, 1985). In meinem Kultursystem waren 11 % der menschlichen Alveolarmakrophagen (Raucher) nach 20-stündiger Inkubation mit DQ12 Quarz ( $250 \mu\text{g/ml}$ ,  $26 \mu\text{g/cm}^2$ ) vital (Kontrolle: 99,5 %) und setzten 69 mU LDH/ml frei (Kontrolle: 3 mU/ml).

In einer anderen Studie von Martin et al. (1984) wurden menschliche Alveolarmakrophagen gesunder Probanden 24 Stunden mit  $1 \text{ mg Min-U-Sil/ml}$  (ca.  $104 \mu\text{g/cm}^2$ ), einem anderen Referenz- $\alpha$ -Quarz, inkubiert. Sie setzten in diesem Zeitraum ca. 220 mU LDH/ml gegenüber ca. 100 mU/ml bei unbehandelten Zellen frei. Die Vitalität der Zellen betrug nach Inkubation mit Quarz ca. 60 % (Kontrolle: ca. 85 %). Andererseits beschrieb auch Morrison et al. (1986) eine sehr hohe Empfindlichkeit von menschlichen Alveolarmakrophagen gesunder Probanden nach 24-stündiger Inkubation mit  $50 \mu\text{g Chrysotil Asbest/ml}$ . Die Flächenbelegung betrug ca. 5 oder  $28 \mu\text{g/cm}^2$  (genaue Angaben fehlen). Bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  überlebten ca. 35 % der Zellen die 24-stündige Inkubation. In diesem Testsystem waren die menschlichen Zellen besonders empfindlich.

Alveolarmakrophagen von Sarkoidose Patienten (Kelly et al., 1988) oder Rauchern (Davis et al., 1988 und Pacht et al., 1986) sind im Vergleich zu Alveolarmakrophagen von gesunden, nicht rauchenden Personen aktiviert. Um die Validität meiner Ergebnisse richtig einschätzen zu können, müßte bekannt sein, ob aktivierte Alveolarmakrophagen in zytotoxischen Parametern empfindlicher gegenüber Quarz und Asbest reagieren als nicht aktivierte Zellen. Von Endotoxin-stimulierten Makrophagen ist z. B. eine erhöhte Mediatorsynthese (Interleukin-1) nach Inkubation mit Quarz bekannt (Kampschmidt et al., 1986). Welchen Einfluß die Aktivierung von Makrophagen auf die Empfindlichkeit der Zellen hat ist jedoch noch unklar.

Unter der Annahme, daß menschliche Alveolarmakrophagen durch ihre nahe Verwandtschaft ähnlich wie Affen-Alveolarmakrophagen reagieren, scheint eine hohe Empfindlichkeit der menschlichen Zellen gegenüber Quarz und Asbest wahrscheinlich.

Bei der Charakterisierung der Tübinger U937-Zellen fiel auf, daß die Zellen weder  $\alpha$ -Naphthyl-acetat-, noch  $\alpha$ -Naphthyl-butyratesterase-positiv waren (Tab. 2, Abb. 38). Dies ist nicht in Einklang mit Literaturangaben zu bringen (Harris und Ralph, 1985; Rozenszajn et al., 1968). Da sie vermehrt CD14 Antigen, einen spezifischen Monozytenmarker, an ihrer Zelloberfläche exponiert hatten, kann aber davon ausgegangen werden, daß sie einen stärker monozytären Charakter besitzen als die klassischen U937-Zellen.

Die Inkubation von Tübinger U937-Zellen mit 250  $\mu\text{g}$  DQ12 Quarz/ml bewirkte eine Minderung der Zellvitalität von 85 auf 47 % (Tab. 15). Die Enzymfreisetzung nach Quarzinkubation war im Vergleich zu den Alveolarmakrophagen der verschiedenen Spezies am geringsten. Eine makrophagenähnliche Zelllinie (P388 D1 -Zellen der Maus) erwies sich als deutlich empfindlicher gegenüber Quarz als die U937-Zellen (Kane, 1980). In dieser Studie wurden adhärente Zellen 3 Stunden mit 150  $\mu\text{g}$  Quarz inkubiert. Danach waren ca. 60 % der Zellen abgestorben. Leider finden sich auch in dieser Arbeit keine vollständigen Angaben zur Berechnung der Flächenbelegung mit Quarz. Die Flächenbelegung könnte bei ca. 74,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  gelegen haben, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären würde. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Zelllinien bestand darin, daß die P388 D1-Zellen im Vergleich zu den Tübinger U937-Zellen sehr stark Quarz phagozytierten. Mehr als 80 % der Zellen nahmen in 3 Stunden  $\geq 5$  Partikel auf. Die Tübinger U937-Zellen phagozytierten nur zu ca. 25 % Quarz innerhalb 20 Stunden und zu 30 % Latex, davon sogar nur 6 %  $\geq 5$  Teilchen pro Zelle (Abb. 44).

Interessant waren in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von Nieder (1989). Bei den von ihr verwendeten TPA-differenzierten HL60-Zellen (menschliche Zellen aus dem peripheren Blut eines Patienten mit promyelozytärer Leukämie, Harris und Ralph, 1985) war eine völlige Resistenz gegenüber verschiedenen Fraktionen von Sikron F 600 Quarz (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 52  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und 20 Stunden Inkubation) zu beobachten. Die Zellen hatten jedoch Quarzpartikel

phagozytiert. Möglicherweise besitzen die verschiedenen transformierten Zelllinien unterschiedlich empfindliche Membranen oder bilden sogar eine extrazelluläre Matrix aus, die sie vor dem Quarzeinfluß schützt.

Bei den verwendeten Amerikanischen U937-Zellen wurde ein ganz anderes Phänomen sichtbar (Abb. 35 c). Die mit Quarz (250 µg/ml) inkubierten Zellen wurden während der 20-stündigen Inkubationsdauer deutlich weniger adhärenent als ihre jeweiligen Kontrollen. Dabei kam es zu keiner signifikant erhöhten Freisetzung von Enzymen. Hier besteht der Verdacht, daß die Quarzpartikel an Oberflächenstrukturen der Zellen binden, die die Adhärenz an das Substrat vermitteln. Diese Glykoproteine und ihre Funktionen wurden durch die Entdeckung von Defektmutationen bekannt (Fischer und Lisowska-Grosperre, 1988). Das Phänomen der verminderten Adhärenz, Motilität und Phagozytose war auch bei Makrophagen beobachtet worden, die mit einer subletalen Quarzkonzentration behandelt worden waren (Daniele, 1985).

In vitro Inkubationen von Maus-Peritonealmakrophagen mit *Listeria* Bakterien führten, nachdem die Zellen eine Stunde mit Quarz (100 µg/ml) vorbehandelt wurden, zu einer verminderten Fähigkeit der Zellen, *Listeria* Bakterien zu phagozytieren und intrazellulär abzutöten (Zimmerman et al., 1986). Aus diesem Phänomen könnte die verminderte Immunabwehr bei Patienten mit silikotischer Staublunge resultieren.

Die Inkubation von Tübinger U937-Zellen mit bis zu 500 µg Chrysotil Asbest/ml bewirkte keine große Veränderung gegenüber Kontrollzellen (Abb. 10 und 34). Zu dem gleichen Ergebnis (Tab. 15) kamen auch Leoni und Dean (1983).

### **Interspeziesvergleich**

Ein Vergleich von Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies ergab große Unterschiede in der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber kleineren Quarz- und Asbestkonzentrationen (Abb. 9 und 10, 42 und 43). Die unterschiedliche Empfindlichkeit zeigte sich in der Abnahme der Zellvitalität, der Zunahme von freigesetzten Proteinen und Enzymen in den Überstand. Je stärker die Reaktion der Zellen war, desto häufiger wurden Zellen mit glatter Oberfläche im Raster-Elektronenmikroskop beobachtet. Die Alveolarmakrophagen von Ratte und Rind waren gegenüber Quarz und Asbest resistenter als die Alveolarmakrophagen von Hund, Affe und Mensch. Ähnliche Unterschiede waren schon von Benson et al. (1988) für andere toxische Partikel beschrieben worden. Bei der Inkubation von Ratten-, Maus- und Hunde-Alveolarmakrophagen mit Nickeloxiden oder Nickel-Kupferoxiden erwiesen sich die Zellen von Ratte und Maus als resistenter als die Hunde-Alveolarmakrophagen.

Eine selektive NAG-Freisetzung im geringen Konzentrationsbereich von Quarz oder Asbest konnte nur bei Rinder-Alveolarmakrophagen beobachtet werden. Bei den Alveolarmakrophagen von Hund, Affe und Mensch (Sarkoidose Patienten) war das Ausmaß der Zellschädigung, definiert durch die Abnahme der Vitalität und die Freisetzung von LDH in den Medienüberstand, schon bei der

kleinsten verwendeten Konzentration der Stäube sehr stark ausgeprägt. Möglicherweise hätte bei diesen Spezies eine selektive NAG-Freisetzung als Zeichen einer Aktivierung der Zellen bei kleineren Staubkonzentrationen als den getesteten beobachtet werden können. Im Folgenden wird zunächst auf die Vitalität, das LDH/NAG-Verhältnis, die freigesetzte Protein- und Enzymmenge bezogen auf den Gesamtgehalt des Kulturansatzes sowie auf die durch Kontrollzellen freigesetzte Menge näher eingegangen.

### Vitalität

Die staubinduzierte Vitalitätsabnahme wurde mit dem Trypanblau-Ausschlußverfahren bestimmt. Die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung deuten auf speziesspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit der Zellen hin, da sich im niedrigen Konzentrationsbereich von Quarz oder Asbest (50-100 µg/ml) zwei unterschiedlich empfindliche Gruppen gebildet haben (Abb. 9 und 10) mit der Rangfolge Affe  $\geq$  Hund  $\geq$  Mensch  $>$  Rind  $\geq$  Ratte  $>$  U937-Zellen. Bei der Bestimmung der Vitalität von Zellen muß jedoch beachtet werden, daß das Trypanblau-Ausschlußverfahren als einziges Kriterium unzulänglich ist, da es lediglich eine Aussage über die Integrität der Plasmamembran ermöglicht und nicht über den metabolischen Zelltod (Roper und Drewinko, 1976; Bhuyan et al., 1976 und Tsukeda et al., 1978).

### LDH/NAG-Verhältnis

Die Alveolarmakrophagen der getesteten Spezies setzten entweder verstärkt LDH in den Überstand frei (LDH/NAG nahm gegenüber der Kontrolle zu bei Alveolarmakrophagen von Ratte, Affe, Sarkoidose Patient und U937-Zellen) oder LDH und NAG in gleicher Quantität (LDH/NAG blieb konstant bei Alveolarmakrophagen von Rind, Hund, Sarkoidose Patientin). Dabei waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Säugetierspezies größer als die Unterschiede zwischen Quarz und Asbest. Es fielen jedoch schon bei den Überständen der Kontrollzellen starke interindividuelle und speziesspezifische Unterschiede im LDH/NAG-Quotienten auf (Tab. 14).

### Bezug der freigesetzten Protein- und Enzymmenge auf den Gesamtgehalt des Kulturansatzes

Betrachtete man nicht die Veränderung des LDH/NAG-Verhältnisses, sondern die prozentuale Enzymfreisetzung in Bezug auf die Gesamtmenge, so ergaben sich etwas andere Gruppen. Alveolarmakrophagen von Rind und Mensch (Raucher) setzten nach Inkubation mit Quarz ungefähr gleiche Mengen an LDH und NAG in den Medienüberstand frei, Alveolarmakrophagen von Hund, Ratte

(beide bei hoher LDH-Freisetzung durch die Kontrollzellen), Affe und Mensch (Sarkoidose Patienten) und die Tübinger U937-Zellen setzten deutlich mehr LDH als NAG in den Überstand frei. Die Proteinfreisetzung entsprach der NAG-Freisetzung, so daß es sich bei den zuletzt genannten Spezies um eine selektive LDH-Freisetzung handeln mußte.

Nach Inkubation mit Chrysotil Asbest setzten die Alveolarmakrophagen von Rind (mit Tendenz zu mehr NAG bei  $\leq 500 \mu\text{g/ml}$ ), Ratte (bei hoher LDH-Freisetzung durch die Kontrollzellen), Hund, Affe und Sarkoidose Patienten und die Tübinger U937-Zellen mehr LDH als NAG frei. Die Alveolarmakrophagen vom Raucher setzten als einzige gleiche Mengen an LDH und NAG in den Überstand frei. Auch nach dieser Berechnungsweise variiert das Reaktionsmuster der Zellen nicht zwischen den beiden Stäuben, sondern innerhalb der verschiedenen Spezies. In den meisten Fällen wurde jedoch mehr LDH als NAG durch die Stäube freigesetzt, was für eine Schädigung der Plasmamembran durch native Stäube spricht. Die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber 50-100  $\mu\text{g}$  Quarz oder Asbest/ml entspricht der im Abschnitt "Vitalität" genannten.

#### Bezug der freigesetzten Protein- und Enzymmenge auf die durch Kontrollzellen freigesetzte Menge

Bei der Berechnung der Enzymfreisetzung nach Inkubation mit Quarz oder Asbest als Prozent der durch die Kontrollzellen freigesetzte Enzymmenge wurde ein ganz anderer Aspekt berücksichtigt, die Höhe der Kontrollfreisetzung. Um ein relatives Maß für die Quarz- oder Asbest-induzierte Enzymfreisetzung zu erhalten, wurde sie mit der von unbehandelten Zellen verglichen. Da die Kontrollfreisetzungen bei Alveolarmakrophagen von Ratte und Hund sehr hoch (vielleicht durch die für sie ungünstigeren in vitro Bedingungen) und bei U937-Zellen besonders niedrig waren, führte diese Art der Berechnung zu einer modifizierten Aussage, die sich nicht mit den beobachteten Vitalitätswerten korrelieren ließ (Abb. 40-43). So konnte diese Berechnungsweise grundsätzlich für jede Spezies einzeln betrachtet Auskunft über die Quarz- und Asbest-induzierte Steigerung der relativen Freisetzungen geben. Für einen Vergleich der Zellreaktionen innerhalb der verschiedenen Spezies war sie weniger gut geeignet, da sie nicht mit den Vitalitätsdaten korrelierte.

Um die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Quarz und Asbest zu ermitteln, erwiesen sich vor allem die Vitalitätsbestimmungen und die damit korrelierende LDH-Freisetzung sowie der LDH-Anteil der adhärennten Zellen als geeignet. Die Untersuchungen an U937-Zellen ergaben, daß sie nicht als Ersatz für Alveolarmakrophagen geeignet sind, da sie wesentlich unempfindlicher auf Quarz und Asbest reagieren. Die Reaktion aller Zellen war auf Quarz immer stärker als auf die gleiche Asbestkonzentration (Abb. 42 und 43). Titandioxid (Anatas, Aldrich, 250  $\mu\text{g/ml}$ ) erwies sich in dieser Konzentration

als inert. Ein Vergleich der Toxizität von Titandioxid, Quarz und Chrysotil Asbest führte bei anderen Arbeitsgruppen (Lock et al., 1986; Pasanen und Gustafsson, 1986; Donaldson et al., 1987; White et al., 1983) zu derselben Rangfolge.

Bei Morgan und Allison (1980) war eine selektive, hohe NAG-Freisetzung nach 18-stündiger Inkubation mit Chrysotil Asbest (100 µg/ml) bei Maus-Peritonealmakrophagen und bei Meerschweinchen-Alveolarmakrophagen zu sehen, die nicht von einer starken LDH-Freisetzung begleitet wurde. Die Asbest-induzierte NAG-Freisetzung durch menschliche Alveolarmakrophagen entsprach in ihrem Testsystem der Freisetzung durch Meerschweinchen-Alveolarmakrophagen. Im Gegensatz zu diesen und den Ergebnissen von Davies et al. (1974) mit Maus-Peritonealmakrophagen und Jaurand et al. (1980) mit Kaninchen-Alveolarmakrophagen wurde in meinem Testsystem keine hohe, selektive NAG-Freisetzung gefunden. Die durch Chrysotil Asbest induzierte NAG-Freisetzung wurde immer von einer hohen LDH-Freisetzung begleitet.

Nadeau et al. (1987) fanden bei der Inkubation von Ratten-Alveolarmakrophagen mit Chrysotil Asbest den gleichen Kombinationseffekt. Auch Hannon (1986) fand nach zweistündiger Inkubation von Ratten-Alveolarmakrophagen mit 1 mg/ml Chrysotil Asbest eine hohe LDH- und NAG-Freisetzung in den Medienüberstand. In Übereinstimmung hierzu fanden auch Harington et al. (1971) eine ausgeprägte toxische Wirkung von Chrysotil Asbest bei menschlichen Erythrozyten.

Es wäre interessant herauszufinden, worauf die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen. Möglicherweise existieren auch bei UICC Chrysotil A Asbestproben Modifikationen, die unterschiedlich toxisch wirken. Diese Beobachtung wurde in unserem Labor für DQ12 Quarze (< 5 µm) aus verschiedenen Quellen gemacht (Drosselmeyer, 1988).

Bei der Phagozytose von Latex wurden speziesspezifische Variationen festgestellt (Abb. 44). Benson et al. (1988) fanden ebenfalls Unterschiede in der Phagozytoseleistung von Ab-sRBC bei verschiedenen Alveolarmakrophagen mit folgender Rangfolge: Hund > Ratte > Maus. Warheit et al. (1987) berichteten über speziesspezifische Unterschiede bei der Phagozytoseaktivität von Nagern. Da Alveolarmakrophagen von Rind und Affe in einem ähnlichen Umfang Latex phagozytierten, aber unterschiedlich stark durch geringe Quarz- oder Asbestkonzentrationen geschädigt wurden, lag der Schluß nahe, daß weitere Faktoren für die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen verantwortlich sind. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, daß Alveolarmakrophagen, die durch das Festkleben von Quarz oder Asbest diese nicht phagozytieren konnten, weniger geschädigt wurden als im gleichen Ansatz mit phagozytierbarem Quarz oder Asbest (Hofheinz, 1988).

Gründe für die Interspeziesunterschiede bei der Zytotoxizität von nativem Quarz oder Asbest könnten auf eine unterschiedlich starke Schädigung der Plasmamembran und/oder der Lysosomenmembran zurückzuführen sein. Die

Stabilität von Membranen hängt nach Weissmann und Rita (1972) und nach Ruiz et al. (1988) von ihrer Zusammensetzung ab. Diese könnte bei den verschiedenen Spezies variieren. Godleski (1984) fand z. B. eine unterschiedliche Zusammensetzung von Antigenen Determinanten in der Plasmamembran von Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies.

Untersuchungen zur Empfindlichkeit einzelner Subpopulationen bei Rinder-Alveolarmakrophagen auf Quarz (Schimmelpfeng et al., 1989) deuten ferner darauf hin, daß nicht alle Alveolarmakrophagen gleich geschädigt werden, sondern bestimmte Subpopulationen mehr als andere. In der Zusammensetzung dieser Subpopulationen wäre demnach auch eine mögliche Ursache für Inter-speziesunterschiede zu sehen.

Beide Stäube, Quarz und Asbest, übertragen Elektronen auf biologische Membranen (Robock et al., 1973 b, Beck et al., 1973, Fisher et al., 1987; Fubini et al., 1987). Dadurch kann in aerober Umgebung die Bildung von  $O^{2-}$  induziert werden (Roitt et al., 1987). Über die Quarz- und Asbest-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies berichteten Hedenborg und Klockars (1987). Viele Reaktionen der Zellen auf Quarz und Asbest, wie Vitalitätsverlust und Freisetzung von LDH, entsprechen den Reaktionen von Zellen bei Oxidanzstress (Forman et al., 1987). Die Zellen verschiedener Spezies könnten demnach auch durch eine unterschiedliche Toleranz für radikale speziesspezifische Variationen im Ausmaß der Quarz- und Asbest-induzierten Schädigung aufweisen. In dieser für Asbest und Quarz gleichen Wirkung auf die Zellen ist auch ein Grund für die ähnliche Reaktion der Zellen auf beide Stäube zu sehen.

### **Modifizierung der Partikeloberfläche**

Nach Wallace et al. (1985) bewirkte die Vorinkubation von Quarzteilchen mit DPL eine völlige Inhibierung der zytotoxischen Quarzwirkung. Da dieser Ansatz unrealistisch war, wurde in unserem Testsystem DPL simultan mit den verwendeten Stäuben appliziert, was auch in der Lunge der Fall ist.

Da eine einstündige Vorinkubation der Zellen mit DPL, gefolgt von einer 20-stündigen Quarzinkubation (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), keinerlei Schutz bewirkte (Abb. 5), handelte es sich nicht um einen durch Interaktion mit der Makrophagenmembran ausgelösten, sondern um einen durch Interaktion von DPL mit Quarz induzierten Schutzeffekt für die Zellen. Als Bestätigung ergaben Untersuchungen von Yui und Yamazaki (1987), daß Phosphatidylcholin überhaupt nicht an Makrophagenmembranen bindet.

Bei der Quarz-DPL-Interaktion ist zu vermuten, daß es zu einer elektrostatischen Anziehung zwischen der negativ geladenen Quarzoberfläche und positiv geladenen Gruppen ( $\text{R-N}(\text{CH}_3)_3^{\delta+}$ ) in der polaren Kopfregion der DPL-Moleküle kommt (Depasse, 1985). Dabei kann es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit Phosphatestern kommen. Da beide Komponenten (Quarz und Phospholipid) von einem wässrigen Milieu umgeben waren, bildete sich möglicherweise eine schützende DPL-Doppelschicht um die

Quarzpartikel, ähnlich einer Zellmembran. Dieser Vorgang dauert im Fall von BSA und Chrysotil Asbestfasern 20 Minuten (Valerio et al., 1986). Die Dauer des Adsorptionsvorganges für Quarz und DPL ist nicht bekannt. Am Beispiel der Rinder-Alveolarmakrophagen war jedoch zu sehen, daß dieser Prozess rechtzeitig abgeschlossen ist, so daß die Zellen nicht mehr in Kontakt mit der zytotoxisch wirkenden Quarzoberfläche kamen. Ein ähnlicher Schutzeffekt wurde durch die Verwendung von PVPNO, einer synthetischen Substanz, erreicht (Nash et al., 1966; Robock et al., 1973 b). Die zytotoxische Wirkung des Quarzes beruht demnach auf einer Oberflächeneigenschaft und ist durch Um-mantelung der Quarzpartikel mit DPL oder PVPNO zu unterbinden.

In der vorliegenden Arbeit konnte für jede der getesteten Spezies ein DPL-Schutz beobachtet werden. Dieser Schutz fiel jedoch unterschiedlich stark aus (Tab. 13). Je nach getestetem Parameter war der Schutzeffekt für Rinder-Alveolarmakrophagen und Tübinger U937-Zellen am stärksten, gefolgt von einem geringeren Schutzeffekt bei Ratten-Alveolarmakrophagen. Der geringste Schutz war bei menschlichen Alveolarmakrophagen zu beobachten, wobei die Zellen des Rauchers resistenter gegenüber Quarz und DPL zu sein schienen, als die Zellen des Sarkoidose Patienten. Dieser Befund bedarf jedoch einer erneuten Überprüfung.

Diese Ergebnisse deuten an, daß es einen intrazellulären Prozess der DPL-Quarzretoxifizierung gibt, der auf die Entfernung des DPL durch lysosomale Phospholipasen zurückgeführt werden kann (Keane et al., 1989; Miles et al., 1988). Bei dieser Retoxifizierung existieren speziesspezifische Variationen (Tab. 13). Eine unterschiedliche Geschwindigkeit oder ein unterschiedliches Potential der Partikelretoxifizierung könnte die Ursache sein. Die Unterschiede bei den Zellen verschiedener Spezies könnten durch den Einsatz unterschiedlicher Enzyme (PL-A<sub>1</sub>, PL-A<sub>2</sub>, PL-C, Lysophospholipasen oder Diacylglycerol-Lipasen), durch unterschiedliche Enzymaktivitäten oder unterschiedliche Enzymkonzentrationen zustande kommen. Einen Hinweis auf diese Erklärung geben die Unterschiede bezüglich der  $\alpha$ -Naphthyl-butyrate-Esterase bei den Zellen (Abb. 36 a und b) und ihre unterschiedlichen NAG-Gehalte (Tab. 9). Hier besitzen die Spezies mit den höchsten DPL-Schutzeffekten (Rind, Ratte und U937) auch die geringsten NAG-Gehalte. Speziesspezifische Unterschiede in den lysosomalen pH-Werten könnten die Aktivität der Phospholipasen beeinflussen (van den Bosch, 1980). Auch eine Kombination aus unterschiedlicher Phagozytosegeschwindigkeit, gefolgt von einer frühen oder späten Fusion der quarzhaltigen Phagosomen mit den enzymhaltigen Lysosomen könnte eine Auswirkung auf die Geschwindigkeit der DPL-Quarz Retoxifizierung haben.

In meinem Testsystem war der DPL-Schutz bei Ratten-Alveolarmakrophagen geringer ausgeprägt, als bei Wallace et al. (1985). Dieser Unterschied beruhte sicher nicht auf der unterschiedlichen DPL-Behandlung. Bei Rinder-Alveolarmakrophagen war der DPL-Schutz bei beiden Inkubationsweisen derselbe, siehe Pätzold (1989) zum DPL-Schutzeffekt nach Vorinkubation von Quarz mit DPL. Er hielt in beiden Systemen sogar 40 Stunden und länger an (Abb. 47, 48 und Pätzold (1989). Der unterschiedliche DPL-Schutz bei den Ratten-Alveo-

larmakrophagen beruht wahrscheinlich auf der kürzeren Inkubationszeit bei Wallace. Sie betrug nur 2 Stunden, und es ist sehr wahrscheinlich, daß in diesem kurzen Zeitraum die Phospholipasen oder andere lysosomale Enzyme den DPL-Quarz nicht retoxifizieren konnten.

Mit Hinblick auf realistische Vorgänge in der Lunge konnte in Anwesenheit von Lavageflüssigkeit ein deutlicher Schutzeffekt vor DQ12 Quarz beobachtet werden (Abb. 45-48). Eine Adsorption von Surfactant an die Quarzoberfläche wurde von Desai und Richards (1978) nachgewiesen. Danach adsorbieren 250 µg Min-U-Sil Quarz ca. 42 µg Surfactant oder 4 µg BSA. Das Ausmaß des mit Rinder-Alveolarmakrophagen beobachteten Schutzes vor Quarz in Gegenwart von angereicherter Lavageflüssigkeit stimmte mit den Ergebnissen von Emerson und Davis (1983) überein. In beiden Studien wurden ähnliche Flächenbelegungen mit Quarz verwendet (Tab. 15). Bei Emerson und Davis nahm die Freisetzung von LDH durch Ratten-Alveolarmakrophagen in Anwesenheit von angereicherter Lavageflüssigkeit nach 20-stündiger Inkubation mit Quarz von 18 % (Kontrolle) auf 39 % (400 µg/ml) zu. In meinem Testsystem mit Rinder-Alveolarmakrophagen und angereicherter Lavageflüssigkeit wurde ein Anstieg der LDH-Freisetzung von 6 % (Kontrolle) auf 14 % bei 20-stündiger Inkubation mit 500 µg Quarz/ml gemessen. Der Schutz durch die Lavageflüssigkeit nahm im Gegensatz zum DPL-Schutz im Zeitraum zwischen 20 und 40 Stunden ab (Abb. 47 und 48). Die Ursachen sind noch unbekannt. Entweder war die DPL-Konzentration in der Lavageflüssigkeit zu gering (ca. 7 µg/250 µg Quarz), so daß die wenigen schützenden DPL-Moleküle nach 20-40 Stunden durch lysosomale Enzyme von der Quarzoberfläche abgelöst worden waren oder der Schutz der Lavageflüssigkeit war nicht allein auf den DPL-Gehalt zurückzuführen. Lavageflüssigkeit enthält neben dem DPL auch andere Komponenten, wie Proteine und Enzyme (Hendersen et al., 1987) oder auch Antioxidantien, wie Vitamin E (Pacht et al., 1986). Möglicherweise war die Schutzwirkung ein Kombinationseffekt verschiedener Komponenten, deren Schutzwirkung unterschiedlich lange anhielt.

Obwohl BSA an Quarz adsorbierte (Rainbow et al., 1983), schützte es Rinder-Alveolarmakrophagen nicht vor der zytotoxischen Quarzwirkung (Abb. 46). Dieser Befund wurde durch Untersuchungen von Tilkes und Beck (1983) an Meerschweinchen-Alveolarmakrophagen bestätigt. Bei BSA wurde eine sehr lockere Adsorption einer äußeren BSA-Schicht an Quarz beobachtet und eine irreversible Adsorption, verbunden mit einer hitzedenaturierungsähnlichen Konformationsänderung bei einer inneren BSA-Schicht (Rainbow et al., 1987). Da BSA eine Halbwertszeit von 20 Stunden in Lysosomen besitzt (Dice et al., 1987), kann nicht eine schnelle Degradierung des BSA von der Quarzoberfläche durch lysosomale Enzyme die Ursache für die beobachteten zytotoxischen Quarzeffekte sein. Die adsorbierte Menge, 4 µg BSA/250 µg Quarz im Gegensatz zu 42 µg Surfactant/250 µg Quarz reichte vermutlich nicht aus, um die toxische Wirkung der Quarzoberfläche zu inhibieren.

Bei Chrysotil Asbest wurde bei keiner getesteten Spezies ein DPL-Schutz-

effekt beobachtet (Tab. 13), obwohl DPL an der Oberfläche von Chrysotil Asbest adsorbiert wird (Bignon und Jaurand, 1983). Dieses steht im Einklang mit den Beobachtungen anderer Autoren (White et al., 1983 und Morrison et al., 1986). PVPNO, eine synthetische Substanz, die wie DPL vor Quarz schützte, bot ebenfalls keinen Schutz vor Chrysotil Asbest (Robock et al., 1973 b). BSA adsorbierte zwar an Chrysotil Asbest (Valerio et al., 1986/87), schützte jedoch auch nicht vor Asbest (Abb. 49). Zu diesem Ergebnis gelangten auch White et al. (1983).

Aus der Literatur war bekannt, daß die Oberfläche von Chrysotil Asbest durch Behandlung mit Säure modifiziert werden konnte (Sample und Horn, 1979; Morrison et al., 1986). In einer Studie von Jaurand et al. (1984) wurde ein pH-abhängiges Herauslösen des Magnesiums in Lysosomen (pH 4) von Kaninchen-Alveolarmakrophagen gemessen. Die innerhalb eines Tages nach Phagozytose von Chrysotil Asbest in den Lysosomen herausgelöste Magnesiummenge betrug fast 40 % und wurde auch durch die vorherige Adsorption von Erythrozytenmembranen an Asbest nicht wesentlich gemindert. Kam Chrysotil Asbest in Kontakt mit Säuren, so wurde demnach die äußere Brucit-schicht herausgelöst (Jaurand et al., 1984) und die darunterliegenden Silanolgruppen exponiert (Sample und Horn, 1979). Dieses könnte hier genauso wie bei den RBC-ummantelten Fasern trotz DPL-Adsorption der Fall gewesen sein. Die geschützte Asbestoberfläche würde abgetragen und eine Quarz-ähnliche Oberfläche käme darunter zum Vorschein.

Lavageflüssigkeit wurde ebenfalls von Chrysotil Asbest adsorbiert, ca. 51 µg Surfactant/250 µg Asbest (Desai und Richards, 1978). Im Gegensatz zu DPL bewirkte Lavageflüssigkeit zumindest tendentiell einen Schutzeffekt vor Asbest (Abb. 49). Die schützende Wirkung von Lavageflüssigkeit vor der hämolytischen Wirkung von Chrysotil Asbest war schon von Desai et al. (1975) und Light und Wei (1980) beschrieben worden. Dieser Schutzeffekt kann also auf einen Schutz der Plasmamembran zurückzuführen sein. Da Alveolarmakrophagen die Asbestfasern phagozytieren, muß der Schutzeffekt auf jeden Fall auf eine andere Komponente als das unwirksame DPL zurückzuführen sein. Die Ursache für die leichte Schutzwirkung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt. Es war jedoch auffällig, daß sich die Reaktionsmuster der mit Chrysotil Asbest und Lavageflüssigkeit oder mit Chrysotil Asbest und Vitamin E behandelten Ansätze glichen (Abb. 49). Bei beiden war die LDH-Freisetzung gegenüber nativem Asbest reduziert, während die NAG-Freisetzung ungemindert erschien. Nach Fisher et al. (1987) beruhen zytotoxische Asbesteffekte auch auf der Fähigkeit von Chrysotil Asbest, Elektronen auf die biologische Zellmembran zu übertragen. Es ist also denkbar, daß Vitamin E oder andere Antioxidantien aus der Lavageflüssigkeit diese zytotoxischen Prozesse reduzierten und daher eine geringe Minderung des Schadens verursachen konnten. Andere zytotoxische Effekte wie das Exponieren der Quarz-ähnlichen Oberfläche nach Herauslösen der Brucitschicht in den Lysosomen blieben bestehen. Ein weiterer Aspekt der Asbest-induzierten Zytotoxizität betrifft die Dimen-

sion der Asbestfaser. In einer Arbeit von Hannon et al. (1986) wurde ersichtlich, daß intermediäre Fasern ( $21 \times 0,17 \mu\text{m}$ ) in ihrer Toxizität weniger durch Beschichtung mit Metallsalzen ( $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ ) reduziert werden konnten als kürzere Fasern ( $2,1 \times 0,07 \mu\text{m}$ ). Nach diesen Ergebnissen zu urteilen bildet die Faserlänge eine weitere Ursache für die zytotoxische Asbestwirkung. Dieser Effekt wäre demnach auch nicht durch eine Veränderung der Faseroberfläche zu modifizieren.

Ähnlich wie bei Whydler et al. (1988) ergibt sich folgende Schlußfolgerung: Die meßbare Toxizität von Chrysotil Asbest könnte ein Resultat von drei Faser-eigenschaften sein: der Faserdimension, der chemischen Zusammensetzung und dem Potential zur Radikalkatalyse.

### Allgemeine Probleme

Um die Ergebnisse von Toxizitätstests unter verschiedenen Bedingungen (Variationen in Zellzahl, Kulturfläche, Medienvolumen und Staubkonzentration) besser vergleichbar zu machen, wurde der Einfluß einzelner Parameter genau untersucht. Dabei stellt sich heraus, daß das Ausmaß des Quarzeffektes überhaupt nicht von der Flächenbelegung mit Zellen abhing (Abb. 3 und 4). Hierfür gibt es folgende Erklärung. Die Quarzpartikel sanken auf den Plastikuntergrund und kamen dort in Kontakt mit den adhären Zellen (Robock et al., 1973 b). Dieser Kontakt reduzierte die Mobilität der Zellen und ihre Phagozytoseaktivität (Daniele, 1985; Zimmerman et al., 1985), so daß die Zellen keinen weiteren Quarz aufnehmen konnten. Bansal und Kaw (1981) berichteten ergänzend von der Quarz-induzierten Veränderung des LDH-Isoenzymmusters in den Makrophagen. Dabei kam es zu einer Verschiebung von aerober zu anaerober Glykolyse in den Quarz-behandelten Zellen. Die Folge war ein Mangel an Energienachschub in der Zelle, der zur Abnahme der Phagozytoseaktivität führte. Unter der Annahme, daß die Zellen durch Quarz sehr schnell immobilisiert und in ihrer Phagozytoseaktivität gehemmt werden, kann die Zerstörung der Zellen direkt von der applizierten Flächenbelegung mit Quarz abhängen. Ein Vergleich von Literaturwerten unter diesem Aspekt läßt sehr schnell eine starke Übereinstimmung der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bei gleicher Flächenbelegung mit Stäuben (Tab. 15) erkennen. Daraus ergibt sich die Schlußfolgerung, daß das quantitative Ausmaß des Quarzeffektes nicht allein von der Konzentration der Staubsuspensionen, sondern hauptsächlich von der Flächenbelegung mit Stäuben abhängt.

Extrapolationen von in vitro gewonnenen Daten sind nicht leicht. Genaue Ergebnisse ähnlicher in vivo Studien sind dazu notwendig, da im Organismus eine Vielzahl von Parametern die Fibroseentstehung beeinflußt. Dabei spielen die Lungenvolumina, die Atemfrequenz und der Aufbau des gesamten Respirationstraktes eine Rolle für die tatsächliche Lungenbelastung bei Individuen ver-

schiedener Spezies trotz gleicher Staubkonzentration in der Außenluft. Die Reaktion der lokal vorhandenen Zellen hängt wiederum von der Art der Wechselwirkung verschiedener Zelltypen, der Abgabe von Mediatoren, der Zellzusammensetzung und von körpereigenen Schutzmechanismen ab. In allen aufgezählten Komponenten kann es speziesspezifische Variationen geben.

Eine interessante, neue Variante eines erweiterten *in vitro* Testsystems bot das Kultursystem von Placke et al. (1987). Gewebeschnitte von Lungen verschiedener Spezies wurden mit 0-5000 µg Krokidolit Asbest/ml länger als 4 Wochen in Kultur genommen. Dabei kam es zu einer konzentrationsabhängigen Schädigung des Lungengewebes mit ähnlichen fibrotischen Veränderungen, wie sie *in vivo* beobachtet wurden. Die Schädigungsmerkmale waren bei dem Gewebe von Mensch und Ratte stärker ausgeprägt als bei dem Gewebe von Rind und Hamster. In meiner Untersuchung reagierten die menschlichen Alveolarmakrophagen ebenfalls am empfindlichsten auf Chrysotil Asbest und die Alveolarmakrophagen vom Rind resistenter. Die Zellen der Ratte waren jedoch gegenüber Asbest besonders unempfindlich, möglicherweise jedoch stark aktiviert. Sie könnten fibroseinduzierende Mediatoren abgegeben haben, deren Wirkung in meinem Testsystem nicht erfaßt wurde, wohl aber in dem Testsystem von Placke et al..

Da *in vivo* sehr kleine Quarz- oder Asbestmengen inhaliert werden, kann neben der Freisetzung lysischer Enzyme durch absterbende Alveolarmakrophagen die Aktivierung der übrigen Zellen wichtige Auswirkungen haben. Nicht letal geschädigte Alveolarmakrophagen mit intakten Stoffwechselfunktionen können Mediatoren freisetzen, die sekundär zur Fibroseentstehung führen (Heppleston, 1984; Bowden, 1987). Die Länge der bis zum Eintreten der zytotoxischen Wirkung andauernden Latenzzeit entscheidet daher möglicherweise über die Intensität der nachfolgenden fibrotischen Reaktion der betroffenen Zellen.

Daher bietet das Kultursystem von Placke et al. (1987) eine sinnvolle Erweiterung und ein Bindeglied zwischen den *in vitro* Untersuchungen an reinen Monokulturen und den wesentlich komplexeren *in vivo* Studien. Die *in vitro* Untersuchungen an Monokulturen bleiben jedoch weiter sehr geeignet, um einzelne Aspekte an bestimmten Zelltypen zu untersuchen. Placke et al. (1987) konnte zwar die Schädigung von Alveolarmakrophagen durch Asbest beobachten, jedoch keine nähere Aussage über den Mechanismus der Schädigung machen. Leider gibt es zur Zeit noch zu wenige direkt vergleichbare *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen. Hier liegt eine sinnvolle Zielsetzung für zukünftige Studien.

## V. Zusammenfassung

Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies reagierten auf DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest qualitativ gleich. Dabei nahm die Vitalität der Zellen ab und die Freisetzung von zytoplasmatischer Laktat-Dehydrogenase (LDH) und lysosomaler N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (NAG) in den Überstand zu. Es zeigte sich folgendes:

- (1) Es bestand eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Quarz- und Asbesttoxizität in allen getesteten Parametern.
- (2) Chrysotil Asbest erwies sich bei der Applikation gleicher Konzentrationen als weniger toxisch als DQ12 Quarz.
- (3) Die Quarztoxizität hing nicht von der Flächenbelegung mit Zellen, sondern von der Flächenbelegung mit Quarzpartikeln ab. Ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zeigte, daß das Ausmaß der Zellschädigung direkt von der Flächenbelegung mit Stäuben und nicht von der Konzentration der Staublösung abhängt.
- (4) Quantitativ betrachtet variierte die Empfindlichkeit der Alveolarmakrophagen gegenüber Quarz und Asbest speziesspezifisch. Es kristallisierten sich zwei verschiedene Gruppen heraus. Die Alveolarmakrophagen von Mensch, Affe und Hund waren im niedrigen Konzentrationsbereich (50-100  $\mu\text{g/ml}$ ) in allen getesteten Parametern empfindlicher als die Zellen von Rind und Ratte. Bei 500  $\mu\text{g/ml}$  zeigte sich in der Reaktion Quarz-exponierter Zellen ein gemeinsamer Endpunkt bezüglich der Vitalitätsabnahme, der bei Asbest-exponierten Zellen vermutlich bei einer höheren Asbestkonzentration lag.
- (5) Die undifferenzierten U937-Zellen erwiesen sich als wesentlich unempfindlicher gegenüber Quarz und Asbest als die untersuchten primären Alveolarmakrophagen.
- (6) Die in Punkt 4 und 5 genannten Unterschiede ließen sich nicht allein auf eine unterschiedliche Phagozytoseaktivität der Zellen zurückführen.
- (7) Bei der beobachteten Reaktion der Zellen auf die Stäube ließen sich keine einheitlichen Reaktionsmuster feststellen. Die Interspeziesvariationen innerhalb eines getesteten Staubes waren größer als die Unterschiede in der Reaktion auf die verschiedenen Stäube.
- (8) Die zytotoxische Quarzwirkung konnte durch simultane Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit Quarz und Dipalmitoyl-Lecithin (DPL) oder Lavageflüssigkeit aufgehoben werden. Dabei hielt der DPL-Schutzeffekt länger als 40 Stunden an, während die Wirkung der Lavageflüssigkeit etwa 20 Stunden nach Quarz-Phagozytose nachließ. Bei der Verwendung von Rinderserumalbumin statt DPL wurde kein Schutzeffekt vor Quarz oder Asbest bei Rinder-Alveolarmakrophagen beobachtet.
- (9) Der DPL-Schutz vor der zytotoxischen Quarzwirkung trat bei allen getesteten Spezies auf, jedoch in unterschiedlicher Quantität. Bei den Alveolarmakrophagen von Rind, Ratte und den U937-Zellen war der Schutz am stärksten, bei menschlichen Alveolarmakrophagen am schwächsten.
- (10) Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Chrysotil Asbest und DPL war kein DPL-Schutzeffekt bei den getesteten Spezies zu beobachten.

## **VI . Tabellen und Abbildungen**



**Tabelle 1:**

Zusammensetzung der Zelltypen in der Lavageflüssigkeit bei verschiedenen Spezies<sup>a</sup>. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Literaturangaben

	<b>Makrophagen</b> (%)	<b>Granulozyten</b> (%)	<b>Lymphozyten</b> (%)	<b>Autoren</b>
<b>Rind</b>	> 95			b
	> 90			c
	93 ± 2	3 ± 2	5 ± 1	d
	<b>92 ± 3</b>	<b>2 ± 2</b>	<b>6 ± 4</b>	e
<b>Ratte</b>	96 ± 1	1 ± 1	0	f
	92 ± 1	1 ± 1	1 ± 2	f
	93 ± 2	6 ± 3	2	g
	<b>91 ± 2</b>	<b>0</b>	<b>9 ± 3</b>	e
<b>Hund</b>	81 ± 5	12 ± 4	9 ± 3	h
	<b>75</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	e
<b>Affe</b>	90 ± 2	< 1	6 ± 2	i
	<b>79 ± 1</b>	<b>0</b>	<b>21 ± 1</b>	e
<b>MENSCH</b>				
<b>Kontrolle</b>	92	1	7	j
	91 ± 2	1	8 ± 7	k
	71 ± 7	7 ± 2	23 ± 7	l
<b>Raucher</b>	96	1	3	j
	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	e
<b>Sarkoidose Patient</b>	61	2	37	j
	44 ± 6	2	58 ± 6	k
	70 ± 5	2	28 ± 5	l
	<b>59 ± 9</b>	<b>2 ± 1</b>	<b>39 ± 9</b>	e

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler.

a Angaben in % der erhaltenen Gesamtzellzahl

b Bielefeldt Ohmann et al. (1984)

c White et al. (1983)

d Bielefeldt Ohmann et al. (1986)

e Schimmelpfeng, diese Arbeit

f Henderson et al. (1987)

g Miller (1979)

h Harmsen et al. (1985)

i Krombach et al. (1987)

j Costabel et al. (1986)

k Shindoh et al. (1986)

l Duffy et al. (1986)

**Tabelle 2:** Eigenschaften von U937-Zellen aus verschiedenen Quellen<sup>a</sup> (Teil 1)

	Klassische U937	Tübinger U937	Amerikanische U937
<b><math>\alpha</math>-Naphthyl-acetat-Esterase</b>	stark positiv <sub>b</sub>	negativ	negativ
<b><math>\alpha</math>-Naphthyl-butyrat-Esterase</b>	-	negativ	negativ
<b>Verdopplungszeit</b>	4 Tage <sub>c</sub>	5 $\pm$ 1 Tage	5 $\pm$ 1 Tage
<b>Suspensionskulturform</b>	Zellen vereinzelt	Aggregatbildung	Zellen vereinzelt
<b>Phagozytose von:</b>			
<b>2 <math>\mu</math>m Latex (1h 37°C)</b> (2-5 Latexpartikel/Zelle)	20 % <sub>c</sub>	-	-
<b>2 <math>\mu</math>m Latex (20h 37°C)</b> (1-5 Latexpartikel/Zelle)	-	23 $\pm$ 4 %	-
( $>$ 5 Latexpartikel/Zelle)	-	6 $\pm$ 1 %	-
<b>Rosettenformation mit:</b>			
<b>sRBC (<math>\geq</math> 3 sRBC/Zelle)</b>	0 % <sub>c,d</sub>	15 $\pm$ 10 %	-
<b>Ab-sRBC (<math>\geq</math> 3 sRBC/Zelle)</b>	31 % <sub>c</sub>	49 $\pm$ 23 %	-
<b><math>\Delta</math> (Ab-sRBC - sRBC)</b>	31 % <sub>c</sub>	34 $\pm$ 13 %	-

Abkürzungen siehe Liste.

a Nähere Beschreibung der Quellen siehe Kapitel 2.2.1.

b Rozensjain et al. (1968)

c Sundström et al. (1976)

d Die verwendeten Schafserythrozyten (sRBC) wurden mit Neuraminidase behandelt

**Tabelle 3:** Eigenschaften von U937-Zellen aus verschiedenen Quellen<sup>a</sup> (Teil 2)

	Klassische U937	Tübinger U937	Amerikanische U937
<b>Adhärenz nach 20h in RPMI-Medium</b>	negativ <sub>b</sub>	sehr stark	stark
<b>Adhärenz nach TPA</b>	sehr stark <sub>b</sub>	sehr stark	sehr stark
<b>PGE<sub>2</sub> Synthese nach TPA</b>	positiv <sub>b</sub>	negativ	-
<b>Oberflächenepitope <sub>c</sub></b>			
<b>CD11a</b>	0,6 % <sub>b</sub>	4,0 % <sub>b</sub>	-
<b>CD11b</b>	8,4 % <sub>b</sub>	6,8 % <sub>b</sub>	-
<b>CD11c</b>	14,1 % <sub>b</sub>	5,3 % <sub>b</sub>	-
<b>Transferrin-Rezeptor</b>	99,6 % <sub>b</sub>	99,7 % <sub>b</sub>	-
<b>CD14</b>	0,5 % <sub>b</sub>	20,2 % <sub>b</sub>	-
<b>Fc-Rezeptor</b>	0,7 % <sub>b</sub>	6,3 % <sub>b</sub>	-
<b>CD18</b>	84,2 % <sub>b</sub>	89,9 % <sub>b</sub>	-

Abkürzungen siehe Liste.

a Nähere Beschreibung der Quellen siehe Kapitel 2.2.1.

b Hass, schriftliche Mitteilung (1989)

c Immunologischer Nachweis, siehe Hass et al. (1989), Bedeutung der Epitope siehe auch Fischer et al. (1988)

**Tabelle 4:**

Zusammenfassung verschiedener physikalischer Eigenschaften der verwendeten Stäube  
(Näheres siehe Kapitel 2.3.)

	Chemische Formel	Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	Spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Geometrischer Durchmesser [µm]
<b>Latax</b>	(Polystyrol)	1,05 <sub>a</sub>		0,82 ± 0,01 2,02 ± 0,01
<b>Titandioxid Anatas (Aldrich)</b>	TiO <sub>2</sub>	3,9 <sub>a,b</sub>	6,7 <sub>f</sub>	0,44 ± 0,11
<b>Titandioxid Rutil (Aldrich)</b>	TiO <sub>2</sub>	3,9 <sub>a</sub> 4,25 <sub>b</sub>	2,1 <sub>f</sub>	1,00 ± 0,46
<b>Titandioxid Anatas (Polysciences)</b>	TiO <sub>2</sub>	3,9 <sub>a</sub>	4,5 <sub>a</sub>	0,6
<b>Quarz DQ12</b>	SiO <sub>2</sub>	2,7 <sub>b</sub>	7,4 <sub>c</sub>	0,80 ± 0,20
<b>Asbest Chrysotil A UICC</b>	3MgO·2SiO <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,6 <sub>e</sub>	17-54 <sub>d,e</sub>	<b>Faserdurchmesser:</b> ca. 95 % < 0,5 µm <sub>g</sub> <b>Faserlänge:</b> 97 % < 5 µm <sub>h</sub>

- a Angaben der Herstellerfirma
- b Lax (1964)
- c Robock (1973)
- d Nadeau et al. (1987)
- e Hahnon et al. (1986)
- f Drosselmeyer, schriftliche Mitteilung (1988)
- g,h Spurny, schriftliche Mitteilung (g: 1989, h: 1986)

**Tabelle 5:**

Freisetzung von N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (mU/ml) durch Rinder-Alveolarmakrophagen nach 2- oder 20-stündiger Inkubation mit Latex (0,8  $\mu$ m, 50  $\mu$ g/ml) oder Titandioxid (Rutil und Anatas, Aldrich, 500  $\mu$ g/ml)

	(n)	2 Stunden	(n)	20 Stunden
<b>Kontrolle</b>	(5)	0,5 $\pm$ 0,1	(7)	6,3 $\pm$ 1,5
<b>Latex</b>	(5)	0,6 $\pm$ 0,1	(3)	4,8 $\pm$ 2,8
<b>Rutil</b>	(5)	1,3 $\pm$ 0,3 <sub>a</sub>	(5)	19,9 $\pm$ 3,5 <sub>b</sub>
<b>Anatas</b>	(5)	1,3 $\pm$ 0,2 <sub>b</sub>	(5)	18,7 $\pm$ 2,3 <sub>c</sub>

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Signifikant von der Kontrolle verschieden mit **a** (2p < 0,05), **b** (2p < 0,01) oder **c** (2p < 0,005).  
n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 6:**

Protein-, LDH- und NAG-Freisetzung durch Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation mit Titandioxid (Anatas, Aldrich und Polysciences)

<b>Titandioxid-Konz. (µg/ml)</b>	<b>(n)</b>	<b>Protein (µg/ml)</b>	<b>LDH (mU/ml)</b>	<b>NAG (mU/ml)</b>
<b>Kontrolle</b>	(13)	20 ± 6	14 ± 5	2 ± 0,3
<b>Aldrich:</b>				
<b>250</b>	(4)	18 ± 3	24 ± 10	6 ± 4
<b>500</b>	(2)	68 ± 8 <sub>b</sub>	27 ± 2 <sub>a</sub>	23 ± 8 <sub>a</sub>
<b>Polysciences:</b>				
<b>250</b>	(1)	8 ± 8	3 ± 2	3 ± 0,2
<b>500</b>	(2)	47 ± 37	11 ± 3	6 ± 0,1 <sub>b</sub>

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Signifikant von der Kontrolle verschieden mit **a** (2p < 0,05) oder **b** (2p < 0,001). Abkürzungen siehe Liste.

n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 7:**

Spezifischer Enzymgehalt und LDH/NAG-Verhältnis in verschiedenen Kulturfraktionen nach 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest (250 µg/ml)

	(n)	U LDH/mg Prot	U NAG/mg Prot	LDH/NAG
<b><u>Zellen:</u></b>				
Kontrolle	(13)	0,69 ± 0,11	0,14 ± 0,02	5,4 ± 0,9
Quarz	(9)	0,35 ± 0,11	0,18 ± 0,05	2,5 ± 0,7
Asbest	(4)	0,35 ± 0,11	0,18 ± 0,03	2,1 ± 0,5
<b><u>Überstände:</u></b>				
Kontrolle	(13)	0,94 ± 0,26	0,15 ± 0,03	5,8 ± 1,2
Quarz	(9)	0,66 ± 0,12	0,12 ± 0,01	5,4 ± 1,0
Asbest	(4)	0,56 ± 0,07	0,21 ± 0,01	2,8 ± 0,4
<b><u>Pellets:</u></b>				
Kontrolle	(13)	1,15 ± 0,39	0,50 ± 0,31	5,7 ± 1,3
Quarz	(9)	0,50 ± 0,10	0,33 ± 0,11	4,0 ± 1,1
Asbest	(4)	0,41 ± 0,10	0,16 ± 0,04	4,4 ± 1,8
<b><u>Summe:</u></b>				
Kontrolle	(13)	0,66 ± 0,10	0,14 ± 0,02	5,5 ± 1,0
Quarz	(9)	0,59 ± 0,14	0,16 ± 0,04	4,6 ± 1,2
Asbest	(4)	0,39 ± 0,09	0,16 ± 0,03	2,5 ± 0,4

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.

n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 8:**

Vitalität, Adhärenz und Proteinfreisetzung nach 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Stäuben (250 µg/ml) ohne und in Gegenwart von DPL

	(n)	Zahl der adhärenten Zellen [% Kontrolle]	Vitalität [% Kontrolle]	Protein im Überstand [% der Ge- samtmenge]	Protein im Überstands- pellet [% der Gesamtmenge]
Kontrolle	(13-15)	100	100	7 ± 2	15 ± 2
Kontrolle + DPL	(6-10)	101 ± 9	105 ± 3	7 ± 1	23 ± 6
Latex 0,8 µm	(1-2)	115	105	3 ± 2	5 ± 5
<b>Titandioxid</b>					
Anatas (Aldrich)	(4)	84 ± 16	104 ± 3	6 ± 2	25 ± 7
Quarz	(7-9)	96 ± 7	27 ± 7 <sub>b</sub>	58 ± 4 <sub>b</sub>	8 ± 3
Quarz + DPL	(3-6)	90 ± 10	93 ± 3	6 ± 3	16 ± 4
Asbest	(4-5)	100 ± 11	48 ± 8 <sub>b</sub>	24 ± 5 <sub>a</sub>	9 ± 4
Asbest + DPL	(4)	74 ± 12	61 ± 2 <sub>b</sub>	22 ± 3 <sub>b</sub>	14 ± 4

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Signifikant von der Kontrolle verschieden mit **a** (2p < 0,01) oder **b** (2p < 0,001). Abkürzungen siehe Liste.

n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 9:**

Zellzahl bezogene Protein- und Enzymgehalte von Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und Tübinger U937-Zellen<sup>a</sup>

	(n)	Protein ( $\mu\text{g}/10^6\text{Z}$ )	LDH ( $\text{mU}/10^6\text{Z}$ )	NAG ( $\text{mU}/10^6\text{Z}$ )	LDH/NAG
<b>Rind</b>	(13)	81 $\pm$ 9	59 $\pm$ 12	11 $\pm$ 2	5
<b>Ratte</b>	(8)	127 $\pm$ 32	80 $\pm$ 15	5 $\pm$ 1	15
<b>Hund</b>	(4)	38 $\pm$ 6	8 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	2
<b>Affe</b>	(3)	80 $\pm$ 14	40 $\pm$ 6	67 $\pm$ 12	< 1
<b>Raucher</b>	(1)	386 $\pm$ 8	73 $\pm$ 14	50 $\pm$ 4	2
<b>Sarkoidose Patienten</b>	(2)	159 $\pm$ 42	95 $\pm$ 47	49 $\pm$ 10	2
<b>Tübinger U937</b>	(3)	225 $\pm$ 38	268 $\pm$ 50	2 $\pm$ 1	27
<b>Amerikanische U937</b>	(1)	267 $\pm$ 5	95 $\pm$ 12	27 $\pm$ 1	4

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.

a Die Zellen befanden sich vor der Analyse 20 Stunden in Kultur

n Anzahl der untersuchten Individuen

**Tabelle 10:**

Konzentrationsabhängige Freisetzung von N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase nach 20-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und U937-Zellen mit DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest<sup>a</sup>

	(n)	50 $\mu\text{g/ml}$	(n)	100 $\mu\text{g/ml}$	(n)	250 $\mu\text{g/ml}$	(n)	500 $\mu\text{g/ml}$
<b><u>Quarz:</u></b>								
<b>Rind</b>	(1)	126	(1)	206	(9)	1226 $\pm$ 200	(1)	650
<b>Ratte</b>	(1)	168	(1)	228	(4)	244 $\pm$ 22	(1)	266
<b>Hund</b>	(1)	523	(1)	400	(3)	260 $\pm$ 64	(1)	492
<b>Affe</b>			(2)	384 $\pm$ 121	(3)	487 $\pm$ 84		
<b>Raucher</b>			(1)	3936	(1)	3760		
<b>Tübinger U937</b>	(1)	298	(1)	177	(2)	345 $\pm$ 56	(1)	395
<b><u>Asbest:</u></b>								
<b>Rind</b>	(2)	241 $\pm$ 56	(2)	394 $\pm$ 57	(4)	578 $\pm$ 38	(2)	574 $\pm$ 129
<b>Ratte</b>	(2)	124 $\pm$ 3	(2)	95 $\pm$ 22	(4)	143 $\pm$ 22	(2)	103 $\pm$ 34
<b>Hund</b>	(1)	256	(1)	300	(3)	270 $\pm$ 86	(1)	263
<b>Affe</b>			(2)	280 $\pm$ 129	(3)	566 $\pm$ 84		
<b>Raucher</b>			(1)	1691	(1)	2705		
<b>Tübinger U937</b>	(1)	84	(1)	76	(1)	80	(1)	52

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern.

a Die Werte sind in % der der Freisetzung durch die Kontrollzellen ausgedrückt

n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 11:**

Vitalität, Protein- und Enzymfreisetzung durch Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und U937-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) mit und ohne DPL-Zusatz<sup>a</sup>

	(n)	Vitalität	Protein	LDH	NAG
<b>nativer Quarz:</b>					
<b>Rind</b>	(7-9)	27 ± 7	1474 ± 404	782 ± 153	1226 ± 200
<b>Ratte</b>	(4)	41 ± 14	217 ± 20	294 ± 24	244 ± 22
<b>Raucher</b>	(1)	11	1908	2021	3760
<b>Sarkoidose Patienten</b>	(2)	12 ± 10	657 ± 421	737 ± 381	392 ± 67
<b>Tübinger U937</b>	(1-2)	56	351 ± 200	1436 ± 431	345 ± 56

**Quarz mit DPL:**

<b>Rind</b>	(3-6)	93 ± 3	117 ± 72	312 ± 176	193 ± 92
<b>Ratte</b>	(3)	69 ± 4	134 ± 52	164 ± 7	174 ± 11
<b>Raucher</b>	(1)	30	1172	966	2282
<b>Sarkoidose Patient</b>	(1)	14	1005	746	417
<b>Tübinger U937</b>	(1-2)	96	110 ± 13	564 ± 413	100 ± 3

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.

a Die Werte sind in % der Freisetzung durch die Kontrollzellen ausgedrückt

n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 12:**

Vitalität, Protein- und Enzymfreisetzung in den Medienüberstand von Alveolar-makrophagen verschiedener Spezies nach 20-stündiger Inkubation mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml) mit und ohne DPL-Zusatz<sup>a</sup>

	(n)	Vitalität	Protein	LDH	NAG
<b>Nativer Asbest:</b>					
<b>Rind</b>	(5)	48 ± 8	565 ± 171	629 ± 141	578 ± 38
<b>Ratte</b>	(4)	63 ± 8	90 ± 7	132 ± 16	143 ± 22
<b>Sarkoidose Patienten</b>	(2)	29 ± 10	354 ± 235	511 ± 296	298 ± 112
<b>Asbest mit DPL:</b>					
<b>Rind</b>	(4)	61 ± 2	351 ± 67	618 ± 90	466 ± 36
<b>Ratte</b>	(4)	66 ± 3	92 ± 15	112 ± 22	90 ± 15
<b>Sarkoidose Patient</b>	(1)	13	744	806	387

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.

a Die Werte sind in % der Freisetzung durch die Kontrollzellen ausgedrückt

n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 13:**

Quantitative Angaben zum DPL-Schutzeffekt bei Inkubation von Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und U937-Zellen mit DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest (250 µg/ml) mit DPL <sup>a</sup>

	(n)	Vitalität [% Kontrolle]	DPL-Schutzeffekt [%]		
			Protein	LDH	NAG
<b>Quarz mit DPL:</b>					
Rind	(3)	93 ± 4	95 ± 5	90 ± 7	90 ± 10
Ratte	(2-3)	69 ± 4	81 ± 19	64 ± 10	0 ± 0
Raucher	(1) <sub>b</sub>	30	35	55	40
Sarkoidose Patient	(1) <sub>b</sub>	14	7	37	12
Tübinger U937	(1-2)	96	78 ± 23	66 ± 24	97 ± 3
<b>Asbest mit DPL:</b>					
Rind	(4)	61 ± 2	25,3 ± 1	15,6 ± 9	6,2 ± 4
Ratte	(4)	66 ± 3	n.b.	n.b.	n.b.
Sarkoidose Patient	(1) <sub>b</sub>	13	0	0	7

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.

a 100 % entspricht vollständiger Schadensverhütung, Berechnung siehe Kapitel 2.6.

b Bezogen auf die Kontrolle ohne DPL

n Anzahl der getesteten Individuen

n.b. Nicht berechenbar, da bei diesen Parametern keine statistisch signifikante Änderung auftrat

**Tabelle 14:**

Spezifischer Enzymgehalt und LDH/NAG-Verhältnis in der Überstandsfraktion von Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und U937-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest (250 µg/ml)

	(n)	LDH/NAG	U LDH/mg Prot	U NAG/mg Prot
<b><u>Rind:</u></b>				
Kontrolle	(13)	5,8 ± 1,2	0,94 ± 0,26	0,15 ± 0,03
Quarz	(9)	5,4 ± 1,0	0,66 ± 0,12	0,12 ± 0,01
Asbest	(4)	2,8 ± 0,4	0,56 ± 0,07	0,21 ± 0,01
<b><u>Ratte:</u></b>				
Kontrolle	(8)	36,4 ± 4,2	1,60 ± 0,28	0,05 ± 0,01
Quarz	(4)	59,9 ± 6,0	3,34 ± 0,96	0,06 ± 0,01
Asbest	(4)	36,8 ± 12,0	2,73 ± 0,77	0,10 ± 0,05
<b><u>Hund:</u></b>				
Kontrolle	(4)	6,9 ± 2,3	0,32 ± 0,04	0,05 ± 0,01
Quarz	(3)	7,7 ± 0,2	0,43 ± 0,04	0,04 ± 0,01
Asbest	(3)	4,8 ± 0,1	0,58 ± 0,06	0,09 ± 0,03
<b><u>Affe:</u></b>				
Kontrolle	(3)	1,0 ± 0,2	0,38 ± 0,04	0,43 ± 0,11
Quarz	(3)	1,8 ± 0,5	0,74 ± 0,16	0,44 ± 0,06
Asbest	(3)	1,6 ± 0,4	1,10 ± 0,24	0,74 ± 0,12

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.

n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 14:** (Fortsetzung)

	(n)	LDH/NAG	U LDH/mg Prot	U NAG/mg Prot
<b><u>Raucher:</u></b>				
Kontrolle	(1)	3,9	0,32	0,08
Quarz	(1)	2,1	0,34	0,16
Asbest	(1)	1,7	0,25	0,15
<b><u>Sarkoidose Patient:</u></b>				
Kontrolle	(1)	1,1	0,86	0,77
Quarz	(1)	2,7	0,89	0,33
Asbest	(1)	2,2	1,18	0,54
<b><u>Sarkoidose Patientin:</u></b>				
Kontrolle	(1)	4,6	0,76	0,16
Quarz	(1)	5,0	1,15	0,23
Asbest	(1)	5,3	1,38	0,26
<b><u>U937-Zellen<sub>a</sub></u></b>				
Kontrolle <sub>b</sub>	(2)	113,2 ± 40,5	0,56 ± 0,01	0,006 ± 0,002
Quarz <sub>b</sub>	(2)	427,3 ± 41,8	2,84 ± 0,97	0,007 ± 0,003
Kontrolle <sub>c</sub>	(1)	22,7	0,05	0,002
Asbest <sub>c</sub>	(1)	39,1	0,17	0,004

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.

a Tübinger U937-Zellen

b Zellen wie in Abbildung 35 a

c Zellen wie in Abbildung 35 b

n Anzahl der getesteten Individuen

**Tabelle 15:**

Vergleich von Literaturwerten und Ergebnissen dieser Arbeit unter Berücksichtigung der Konzentration und der Flächenbelegung mit Stäuben

Spezies	Autoren	Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Flächenbelegung ( $\mu\text{g/cm}^2$ )	Expositions- dauer (h)	Ergebnisse (Differenz zur Kontrolle, (%))
<u>Quarz</u>					
	Pasanen et al. (1986)	50	10	24	Vit. - 69 LDH + 44
	Emerson et al. (1983)	200	21	24	LDH + 43
<b>Ratte</b>	Schimmelpfeng	250	26	20	Vit. - 48 LDH + 46
<u>Asbest</u>					
	Nadeau et al. (1987)	33	25	18	LDH + 15
	Schimmelpfeng	250	26	20	LDH + 18
<u>Asbest</u>					
	White et al. (1983)	100	25	17	Vit. - 32 LDH + 31
<b>Rind</b>	Schimmelpfeng	250	26	20	Vit. - 46 LDH + 29

Legende siehe Fortsetzung auf der nächsten Seite

**Tabelle 15:** (Fortsetzung)

Spezies	Autoren	Konzentration (µg/ml)	Flächenbelegung (µg/cm <sup>2</sup> )	Expositions- dauer (h)	Ergebnisse (Differenz zur Kontrolle, (%))
<u>Quarz</u>					
Hund	Hill et al. (1982)	100	7	24	LDH + 43
	Schimmelpfeng	100	5	20	LDH + 47
<u>Quarz</u>					
Mensch	Seemayer et al. (1985) <sub>a</sub>	225	≤ 94	24	Vit. - 40 LDH 600 % K
	Schimmelpfeng <sub>b</sub>	250	26	20	Vit. - 88 LDH 2021 % K
	Schimmelpfeng <sub>c</sub>	250	26	20	Vit. - 71 LDH 737 % K
<u>Quarz</u>					
	Schimmelpfeng <sub>d</sub>	250	26	20	Vit. - 38 LDH 1436 % K
<u>Asbest</u>					
	Leoni et al. (1983) <sub>e</sub>	50	25	18	LDH + 1
	Schimmelpfeng <sub>d</sub>	250	26	20	LDH + 2

a Menschliche, aus Monozyten gewonnene Makrophagen

b Menschliche Alveolarmakrophagen von einem Raucher

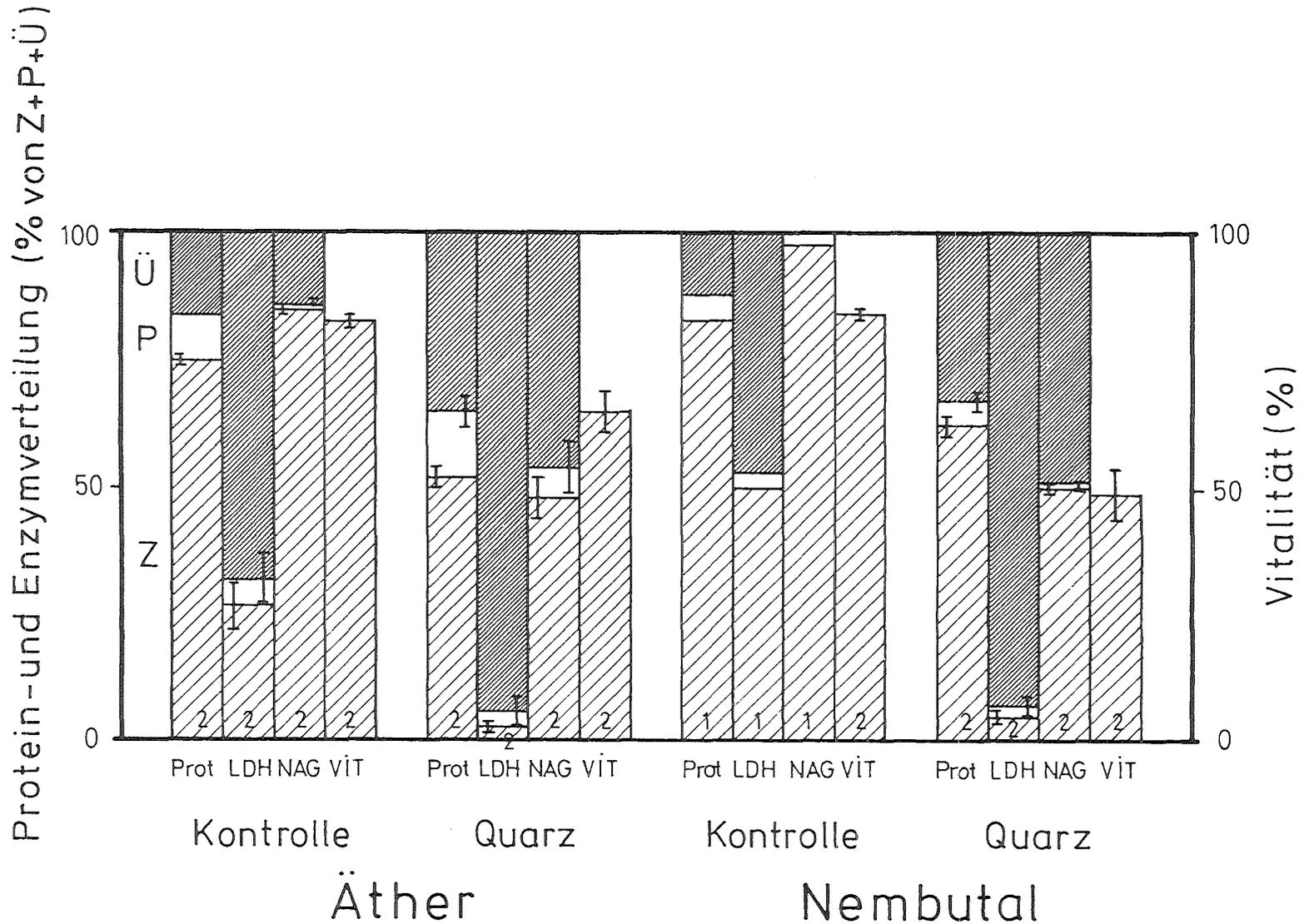
c Menschliche Alveolarmakrophagen von Sarkoidose Patienten

d Tübinger U937-Zellen, monozytäre Zelllinie

e Monozytäre Zelllinie U937; hier wurde die verwendete Asbestsorte nicht genannt und die Staubinkubation erfolgte in Gegenwart von Serum

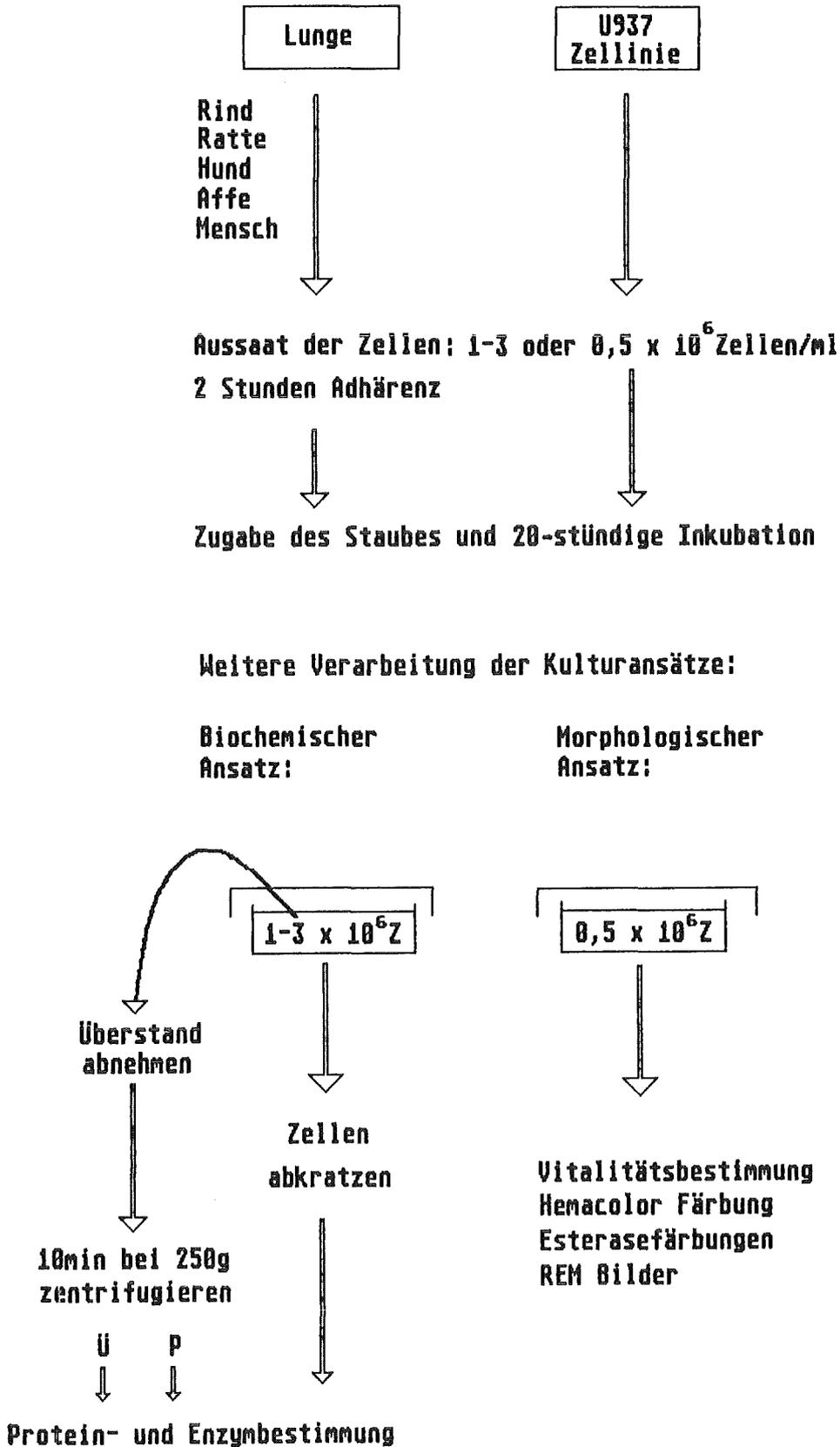
Vit. Vitalität

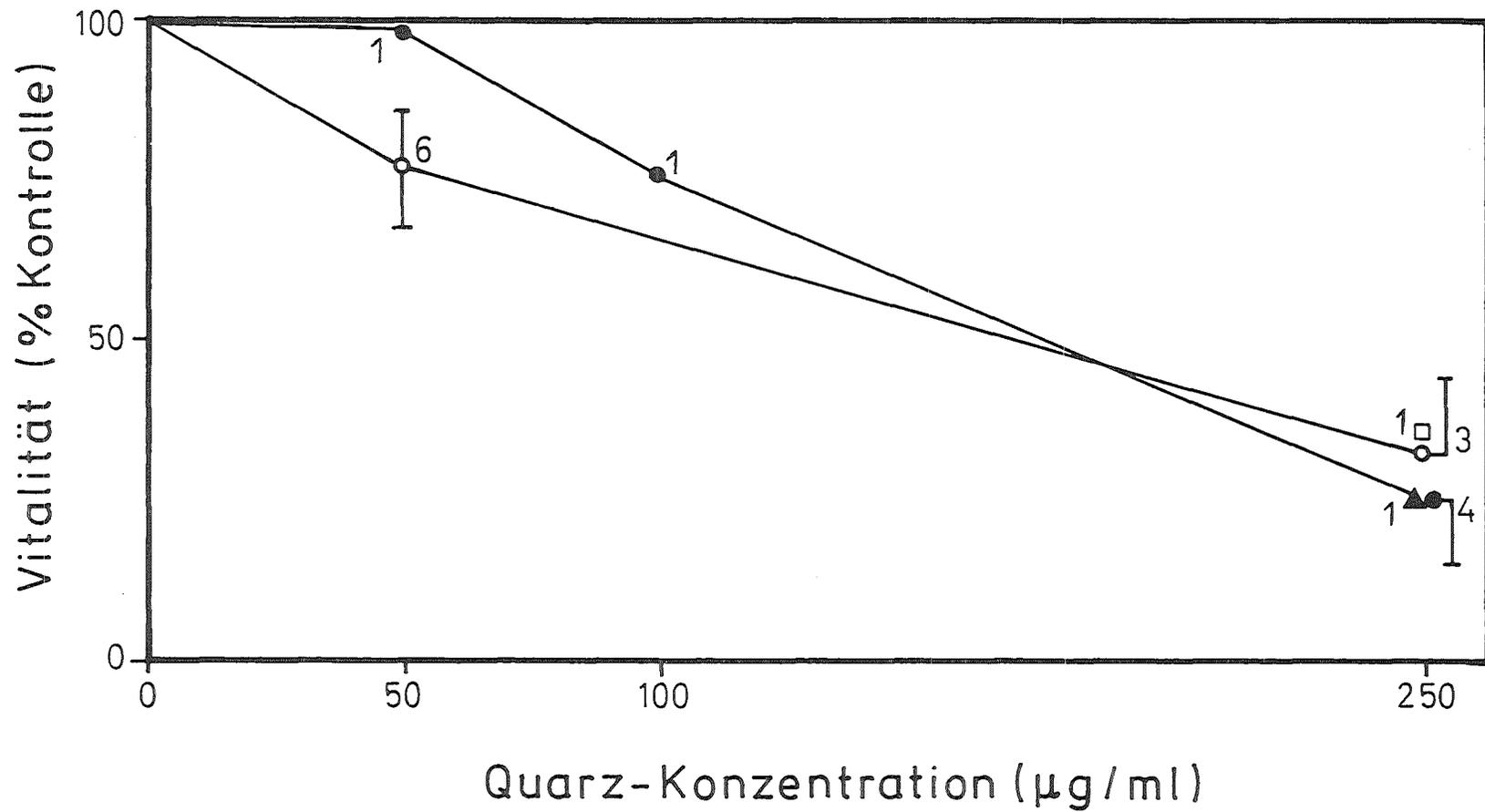
LDH Laktat-Dehydrogenase



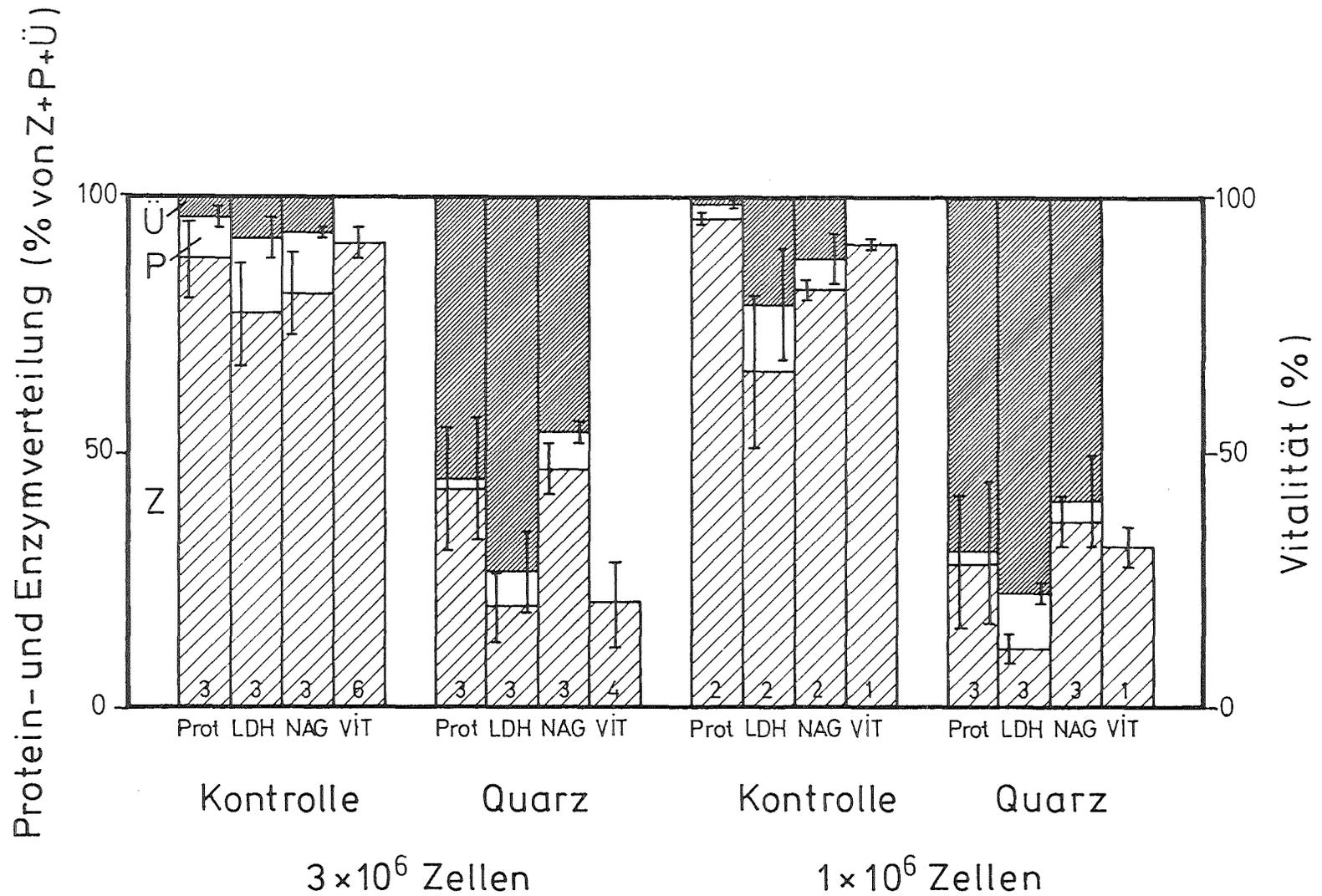
**Abb. 1:** Einfluß des Betäubungsmittels auf Vitalität, Protein- und Enzymfreisetzung von Ratten-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation mit und ohne DQ12 Quarz (250 µg/ml). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern eines Versuches mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.

**Abb. 2: Präparationsübersicht**

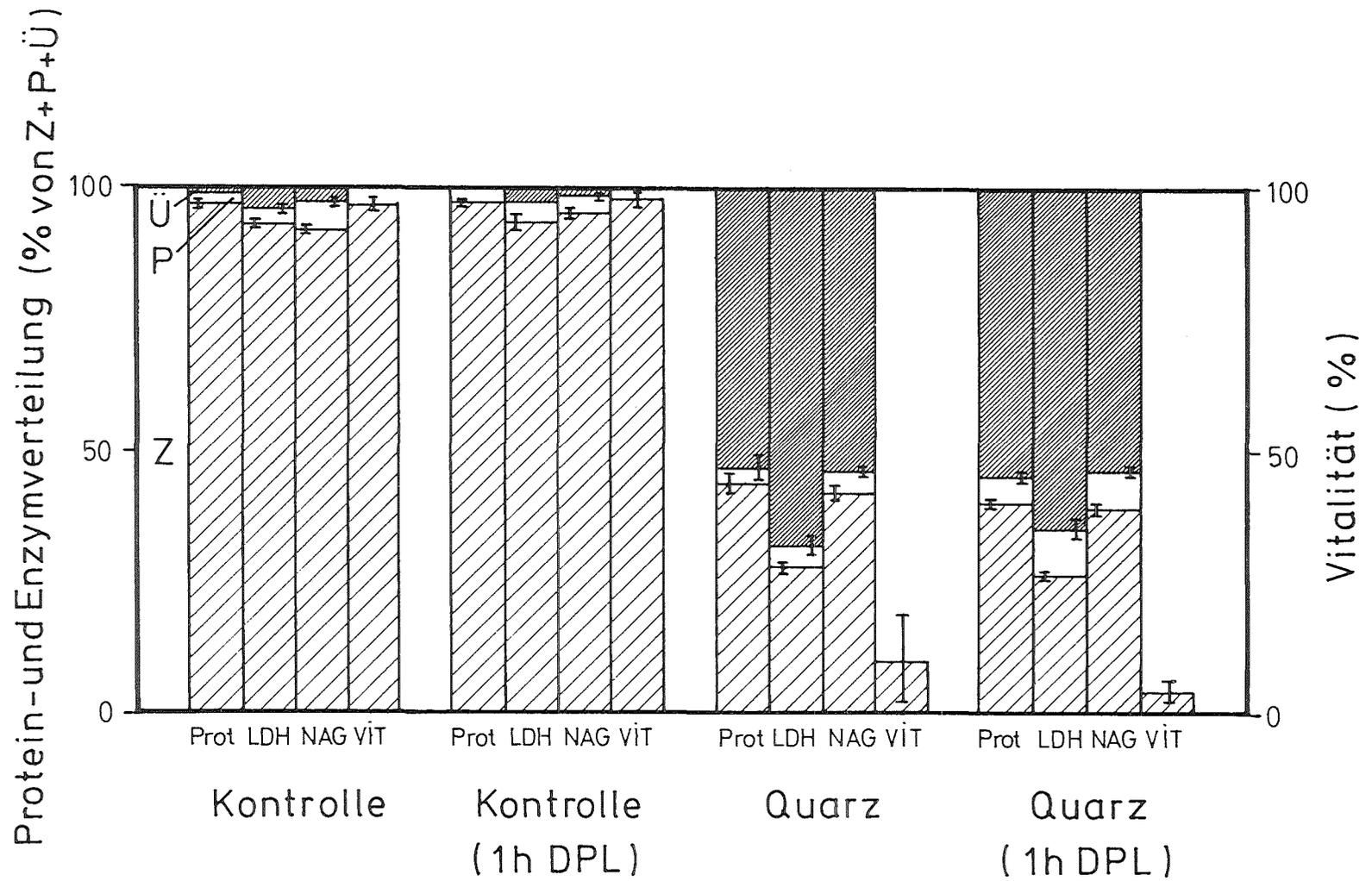




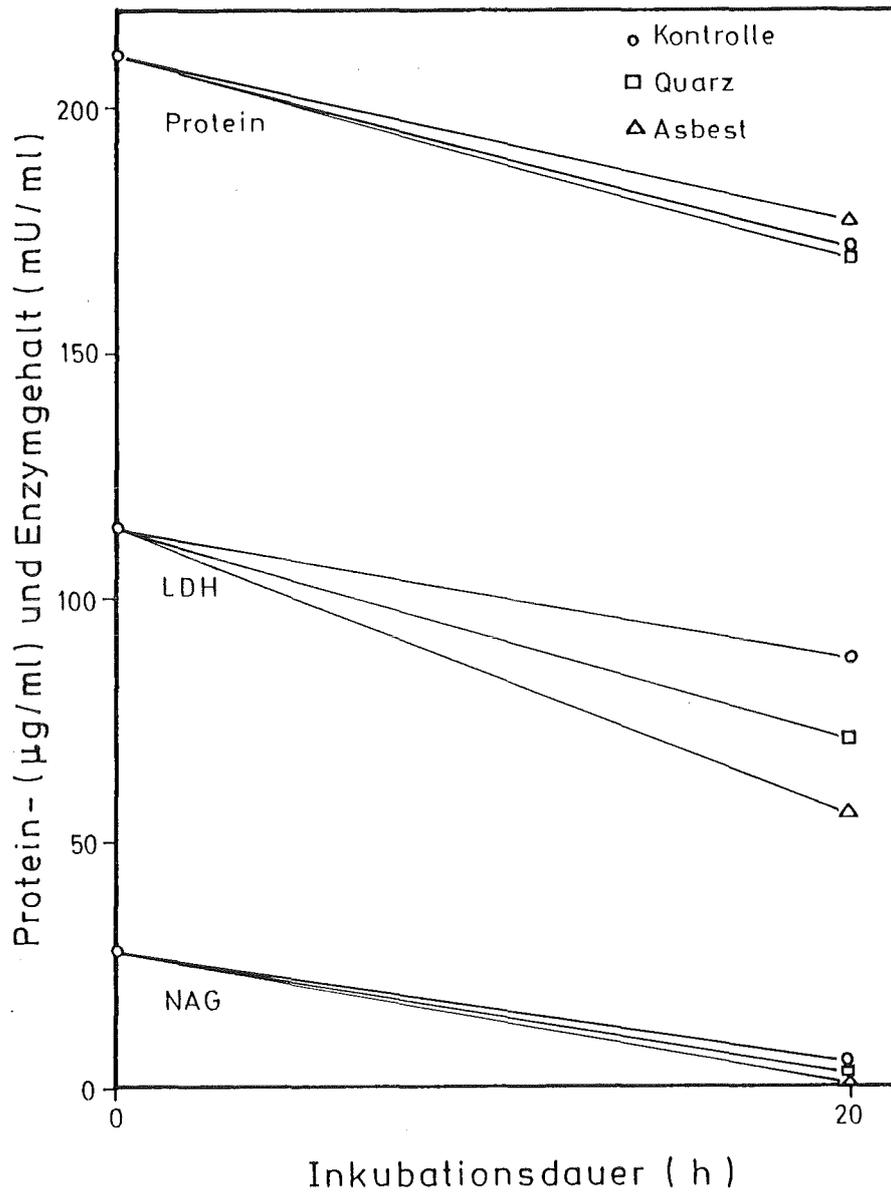
**Abb. 3:** Einfluß der Zelldichte auf das Ausmaß der DQ12 Quarz-induzierten Vitalitätsabnahme bei Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation mit 250 µg/ml. Die Aussaatdichte betrug 3 (●), 1 (Δ), 0,5 (○) und 0,1 x 10<sup>6</sup> (□) Zellen/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Die Anzahl der getesteten Individuen ist neben den Meßpunkten angegeben.



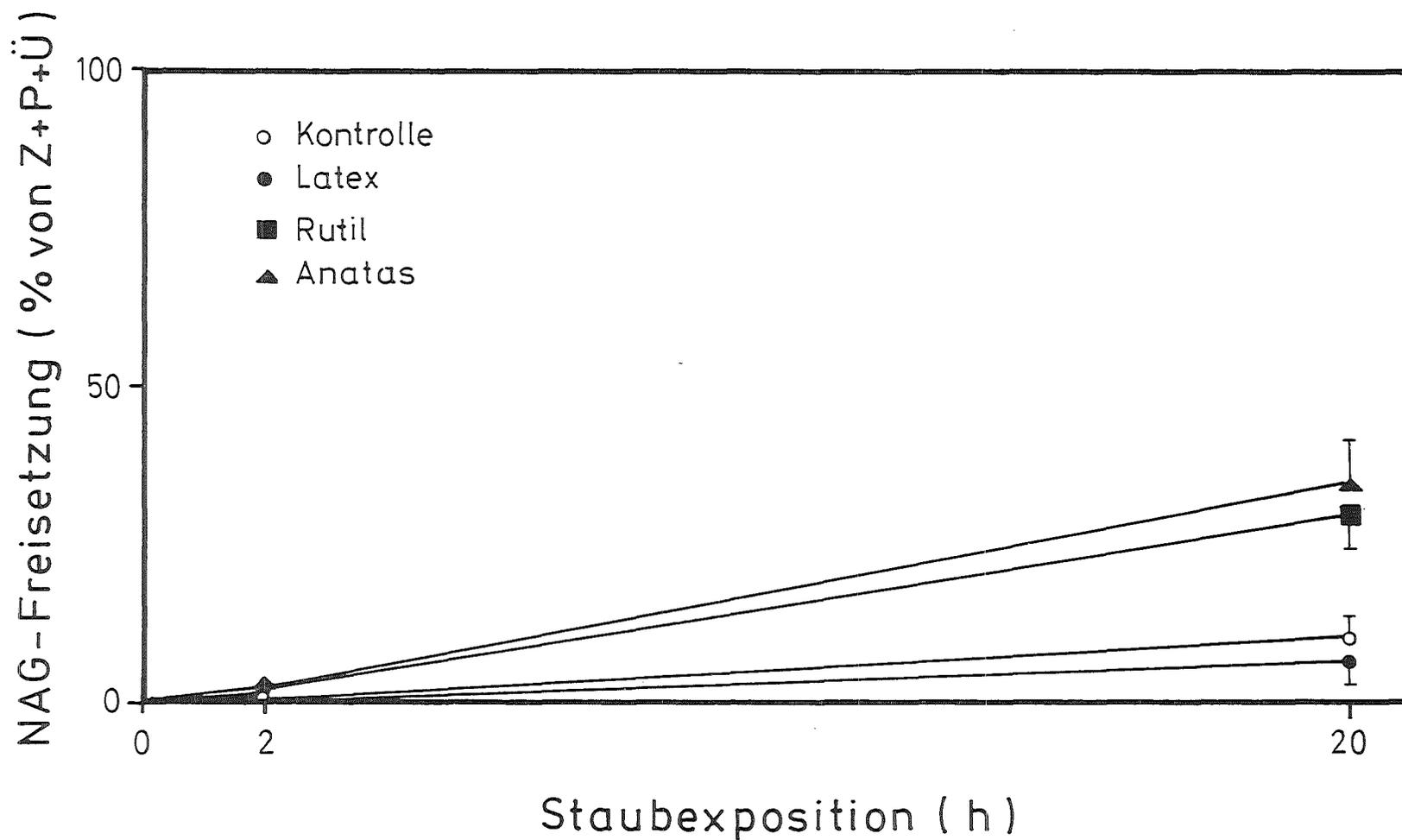
**Abb. 4:** Einfluß der Zelldichte auf das Ausmaß der DQ12 Quarz (250 µg/ml) induzierten Enzymfreisetzung und die Vitalität von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste. Anzahl der getesteten Individuen an der Basis jeder Säule.



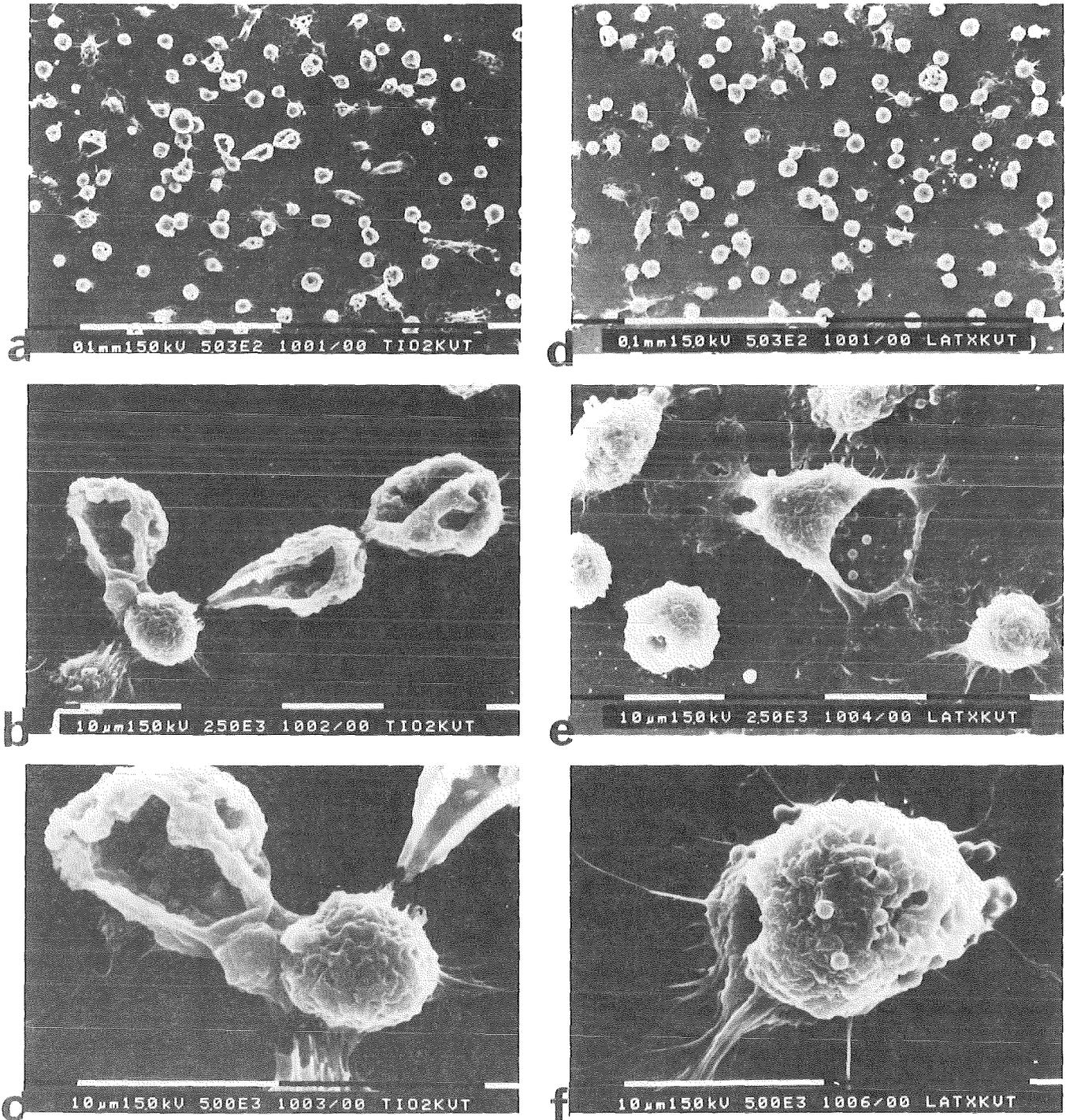
**Abb. 5:** Einfluß einer einstündigen DPL-Vorinkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen auf die DQ12 Quarz (250µg/ml) induzierte Vitalitätsminderung und Protein- und Enzymfreisetzung nach 20-stündiger Inkubation. Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.



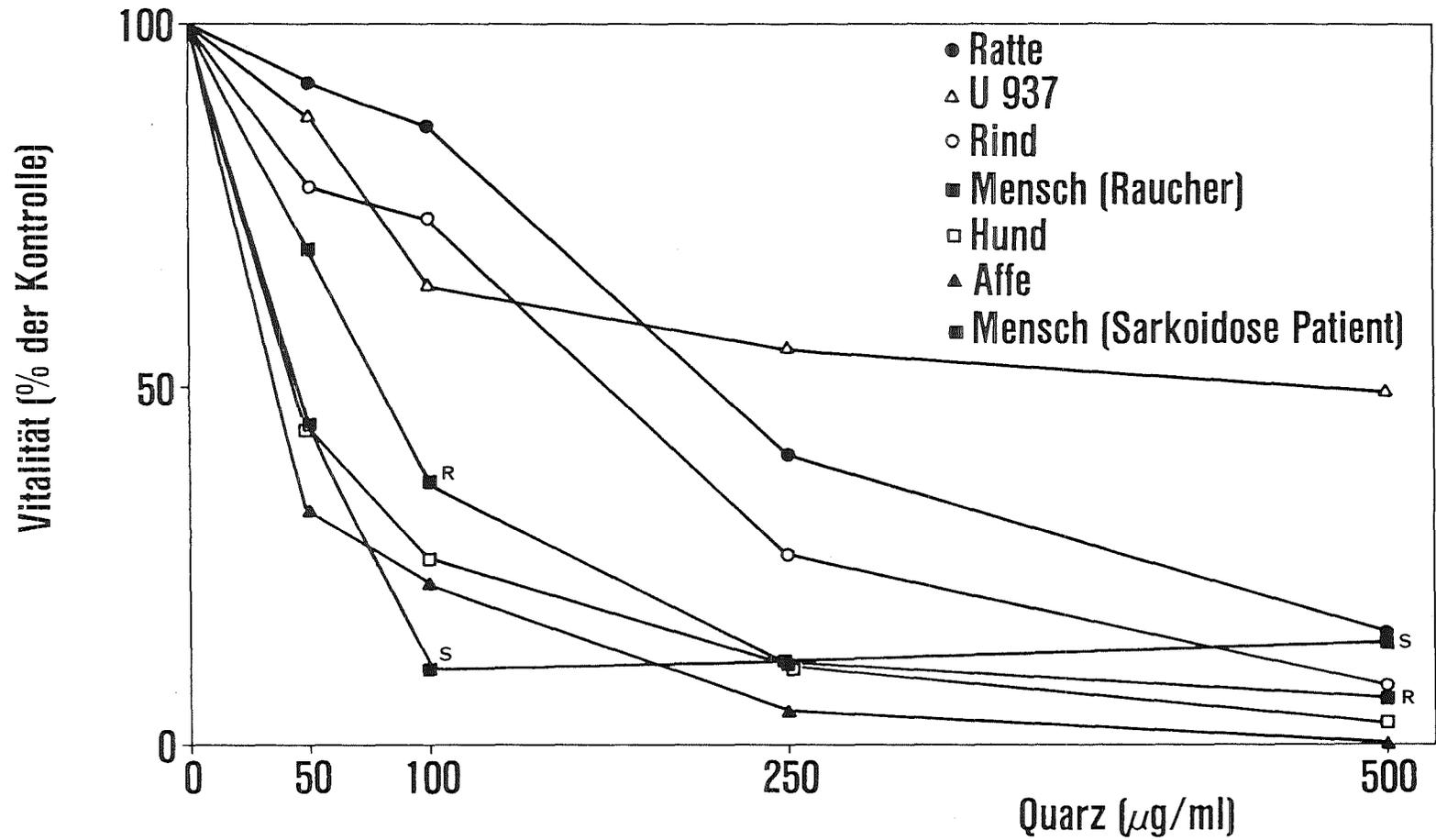
**Abb. 6:** Einfluß von 250  $\mu\text{g/ml}$  DQ12 Quarz (□) oder Chrysotil Asbest (Δ) auf die Protein- und Enzymkonzentration eines Zellhomogenates aus Rinder-Alveolarmakrophagen (o) nach 20-stündiger Inkubation mit und ohne Stäube (n = 1). Methodik siehe Kapitel 2.5.2., Abkürzungen siehe Liste.



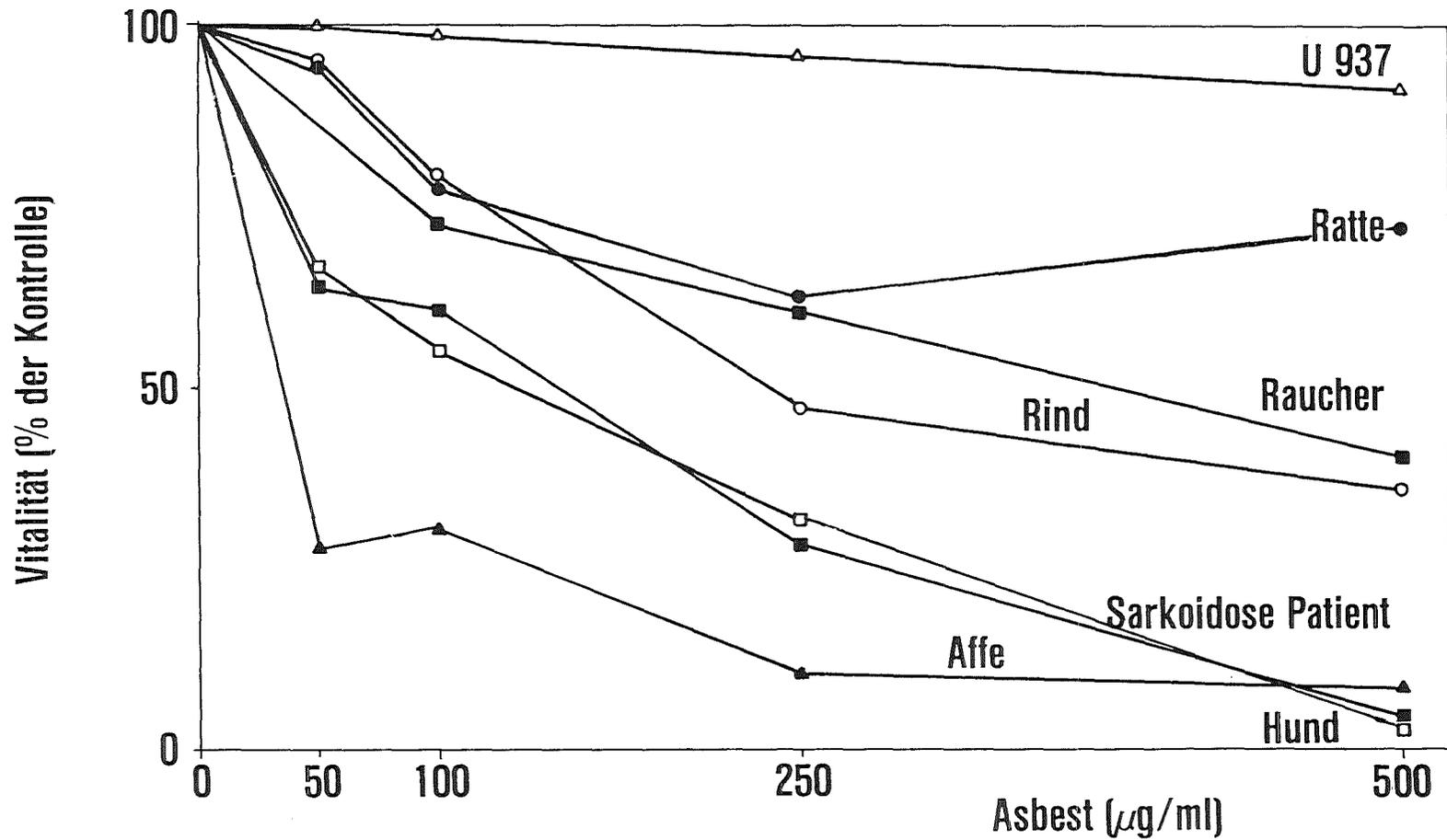
**Abb. 7:** Staubinduzierte Freisetzung von N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase in das Kulturmedium nach 2- und 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit Latex (50  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Titandioxid (Rutil oder Anatas, 500  $\mu\text{g/ml}$ ). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, (n = 5).



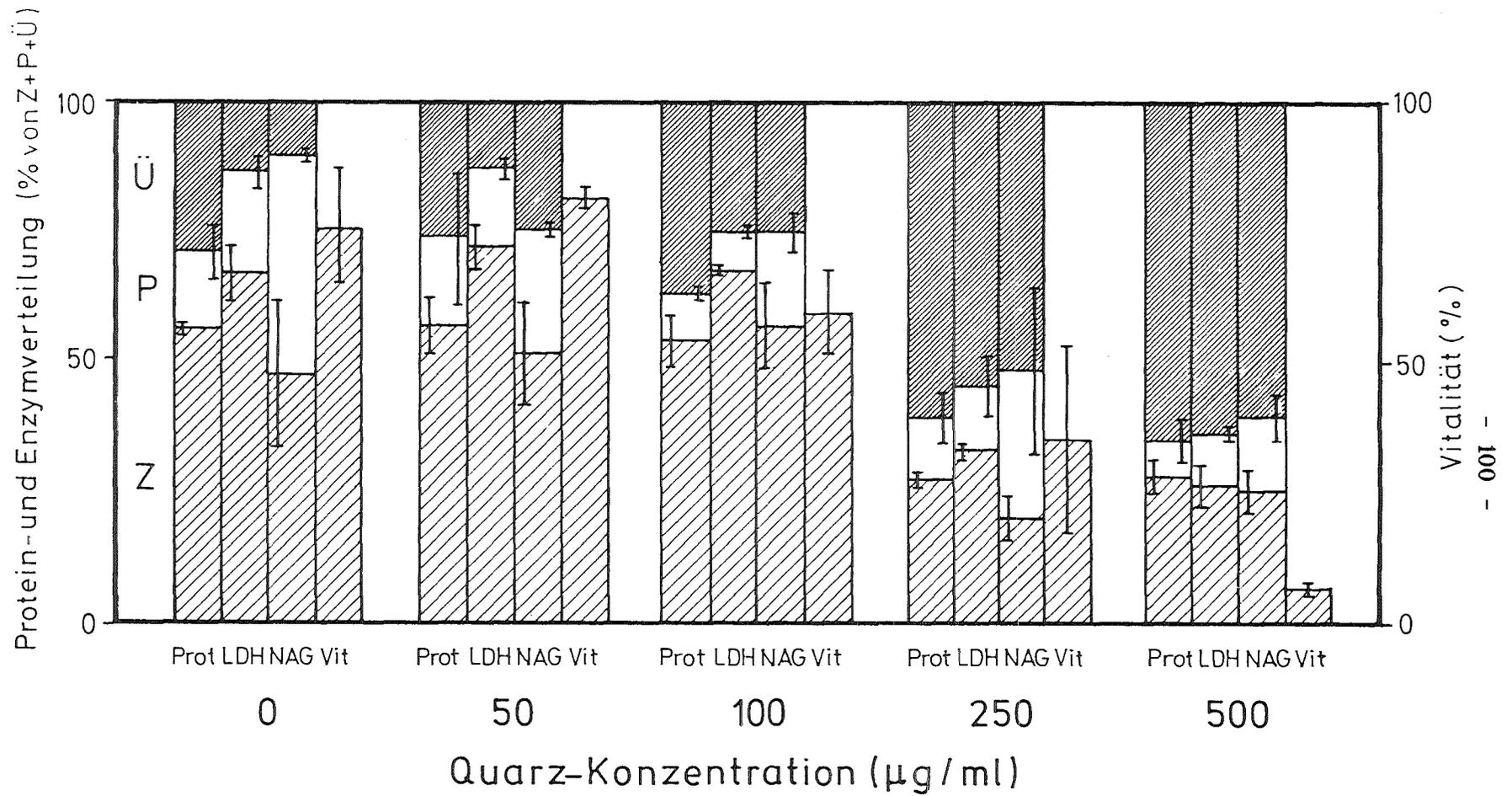
**Abb. 8:** Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation mit 250 µg/ml Titandioxid (Anatas, Aldrich; a - c) oder Latex (0,8 µm; d - f). Die Länge des weißen Balken entspricht der im Bildtext angegebenen Länge.



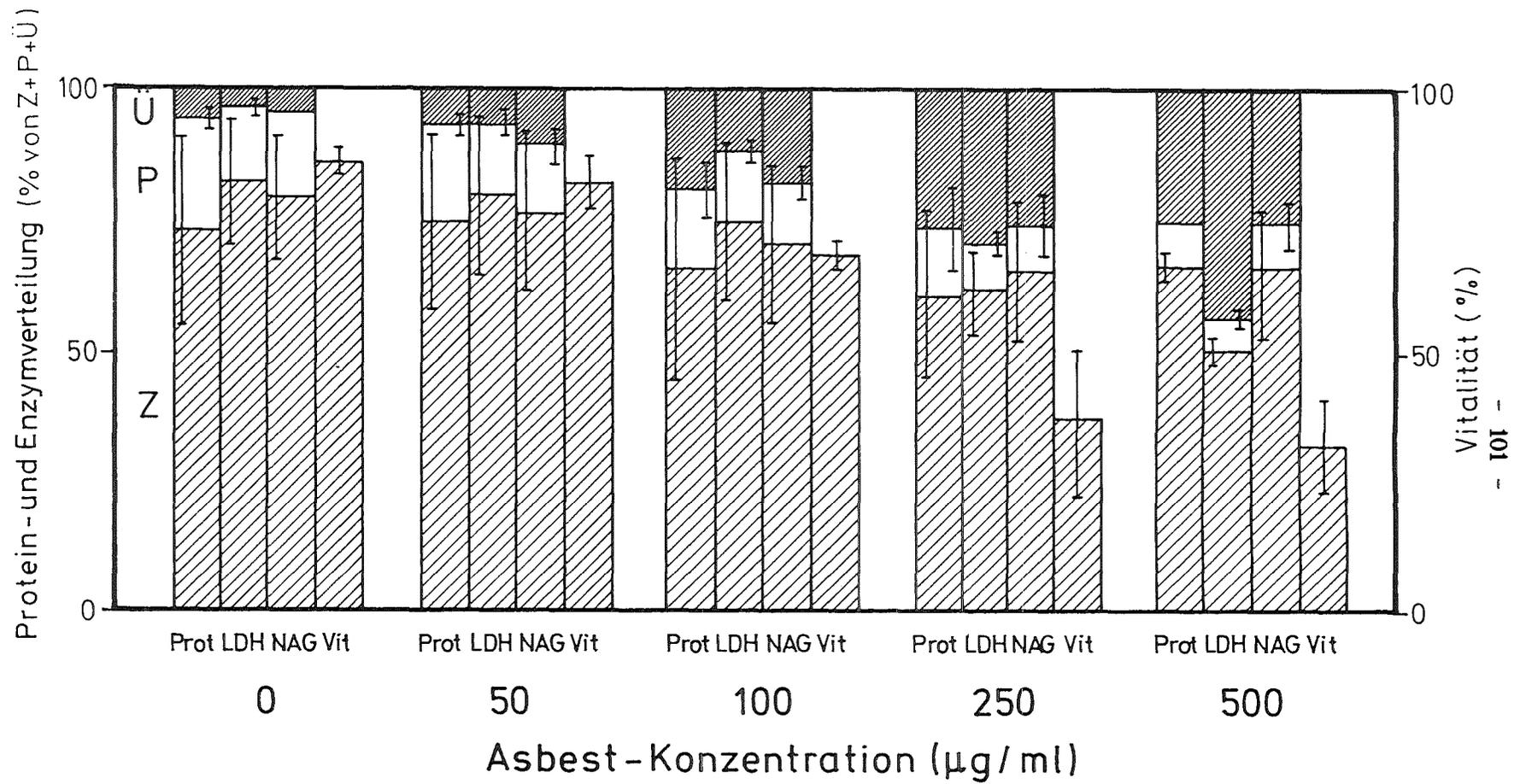
**Abb. 9:** Vitalitätsabnahme nach 20-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und U937-Zellen mit 0-500  $\mu\text{g}$  DQ12 Quarz/ml. Anzahl der getesteten Individuen und Standardfehler siehe Abb. 40.



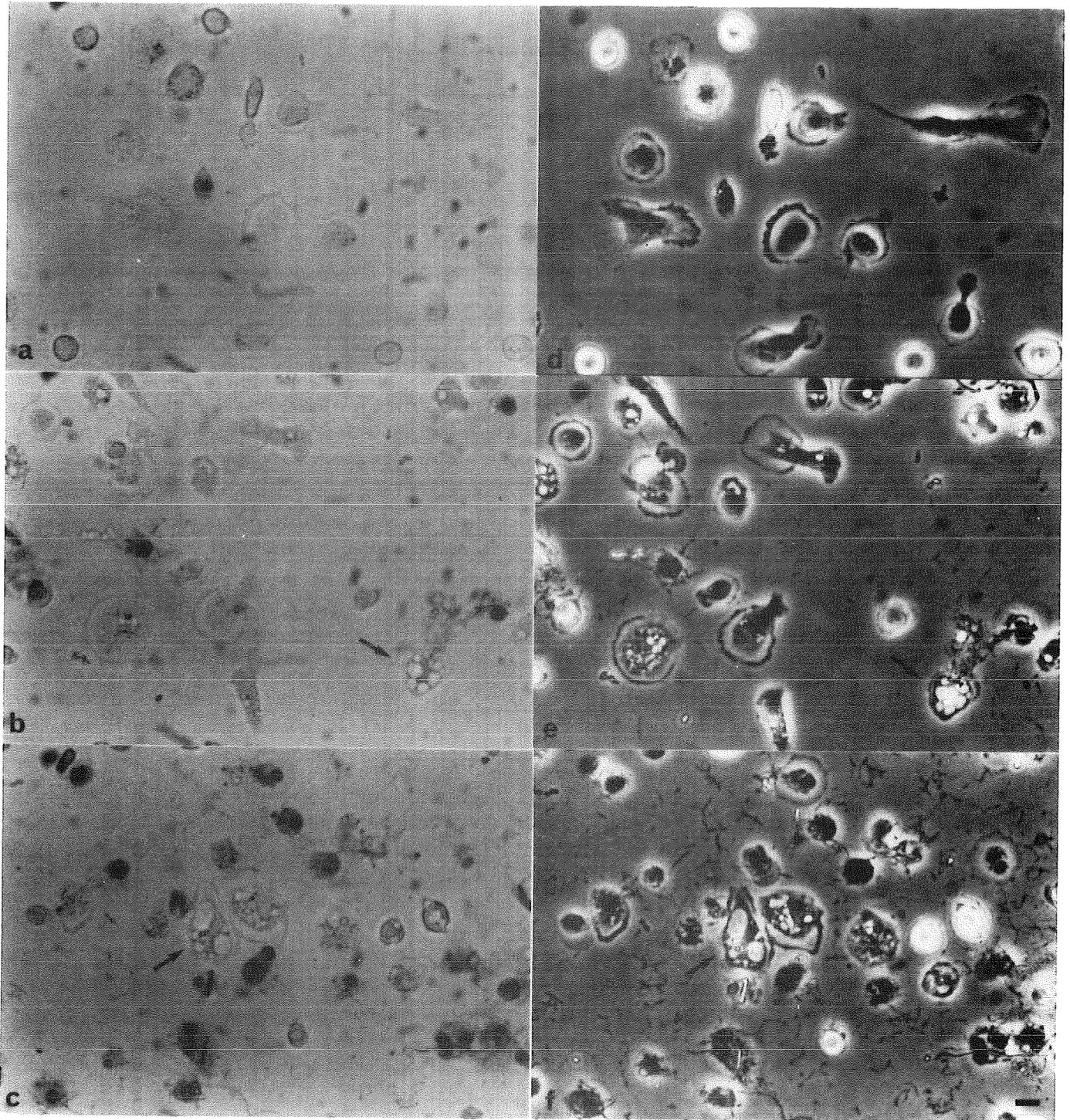
**Abb. 10:** Vitalitätsabnahme nach 20-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies und U937-Zellen mit 0-500 µg Chrysotil Asbest/ml. Anzahl der getesteten Individuen und Standardfehler siehe Abb. 41.



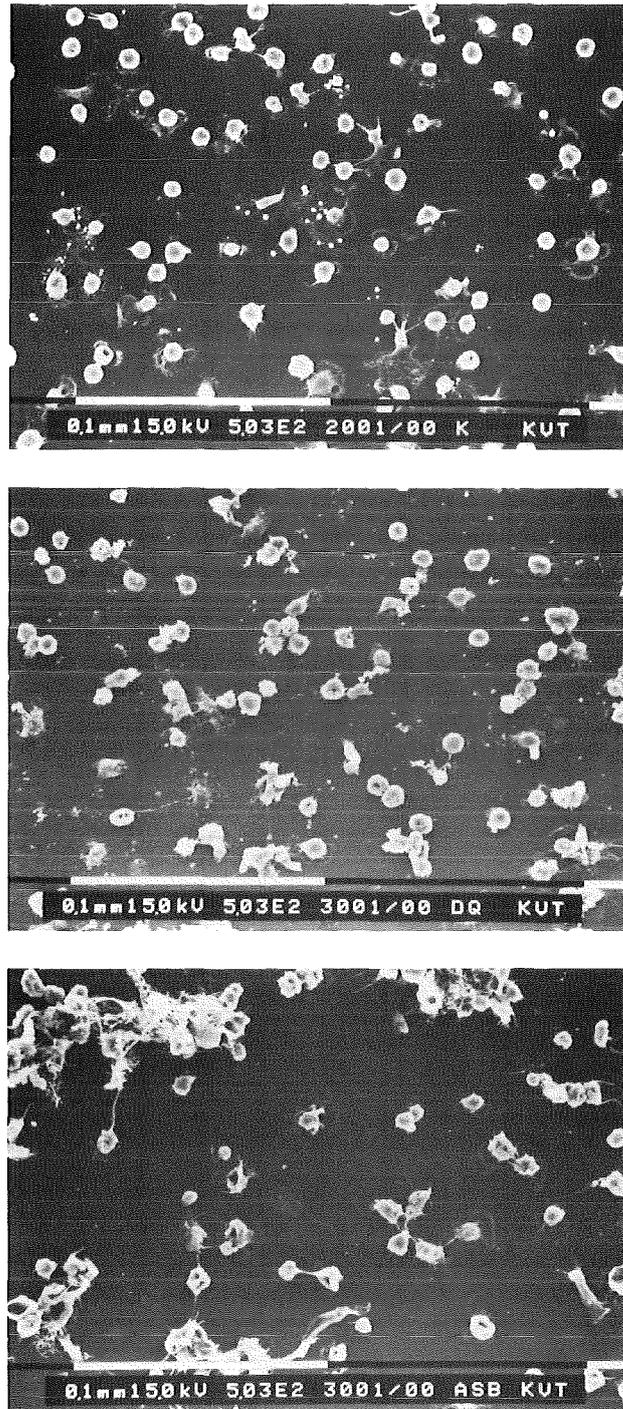
**Abb. 11:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg DQ12 Quarz/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.



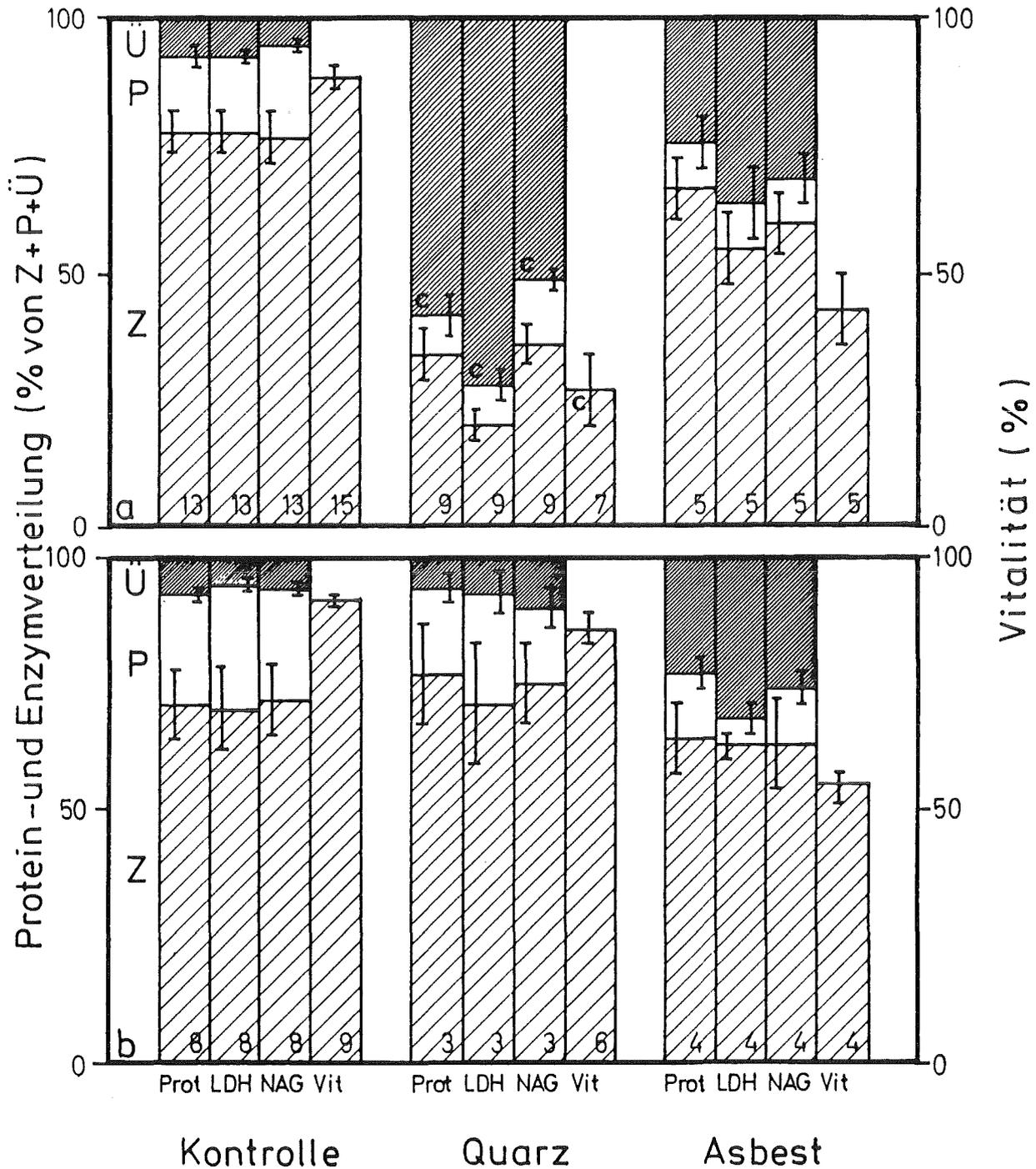
**Abb. 12:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg Chrysotil Asbest/ml. Arithmetische Mittelwerte zweier Versuche mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.



**Abb. 13:** Vitalitätsbestimmungen (Trypanblau) bei Rinder-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation (a, d) ohne Zusatz, (b, e) mit 50 µg/ml und (c, f) mit 250 µg/ml Chrysotil Asbest. Die Abbildungen d, e und f wurden mit Phasenkontrast aufgenommen. Die Länge des schwarzen Balkens entspricht 10 µm.



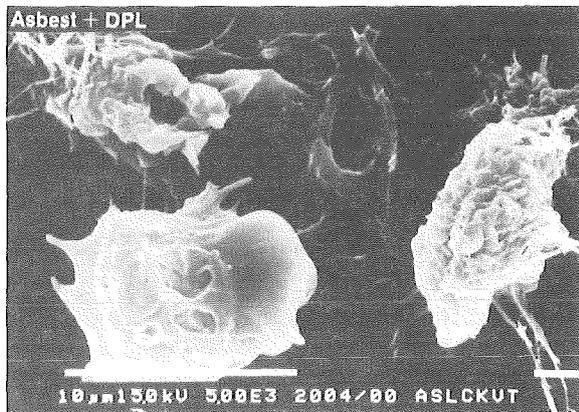
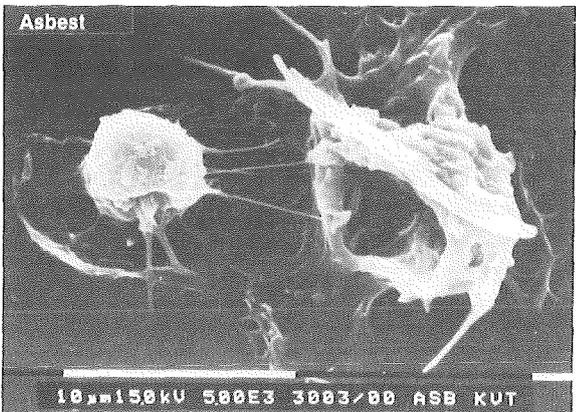
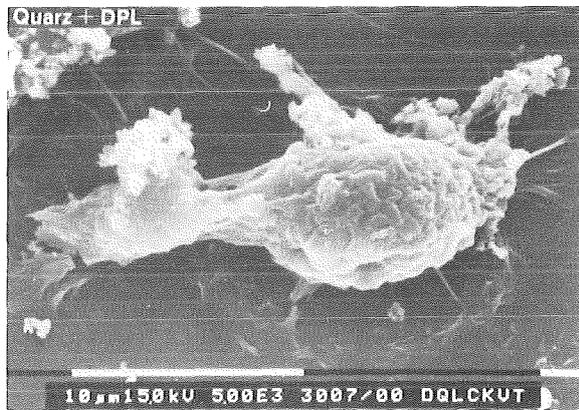
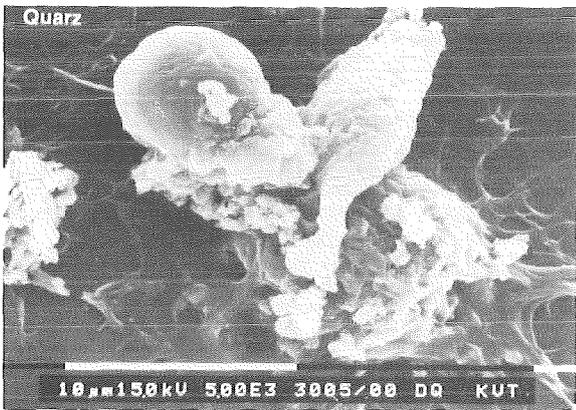
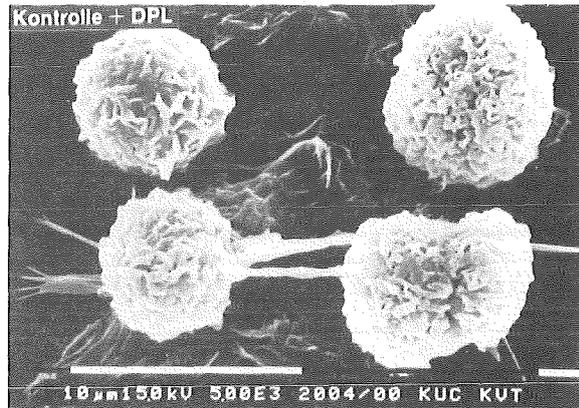
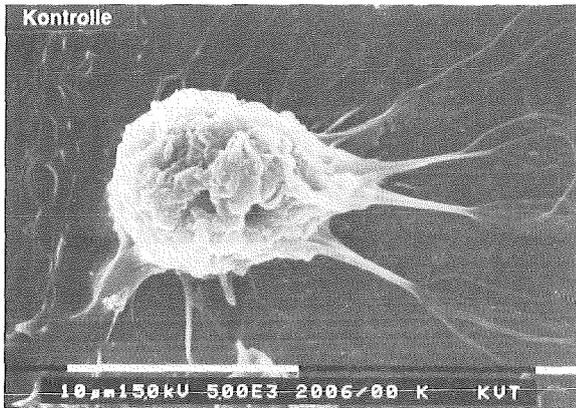
**Abb. 14:** Raster-Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen von Rinder-Alveolar-makrophagen nach 20 Stunden Kultur. Kontrollzellen (oben) und DQ12 Quarz (250 µg/ml) behandelte Zellen (Mitte) sind gleichmäßig über den gesamten Bildausschnitt verteilt. Chrysotil Asbest (250 µg/ml) exponierte Zellen (unten) befinden sich in Trauben an den Asbestfasern. Die Länge der weißen Balken entspricht 100 µm.

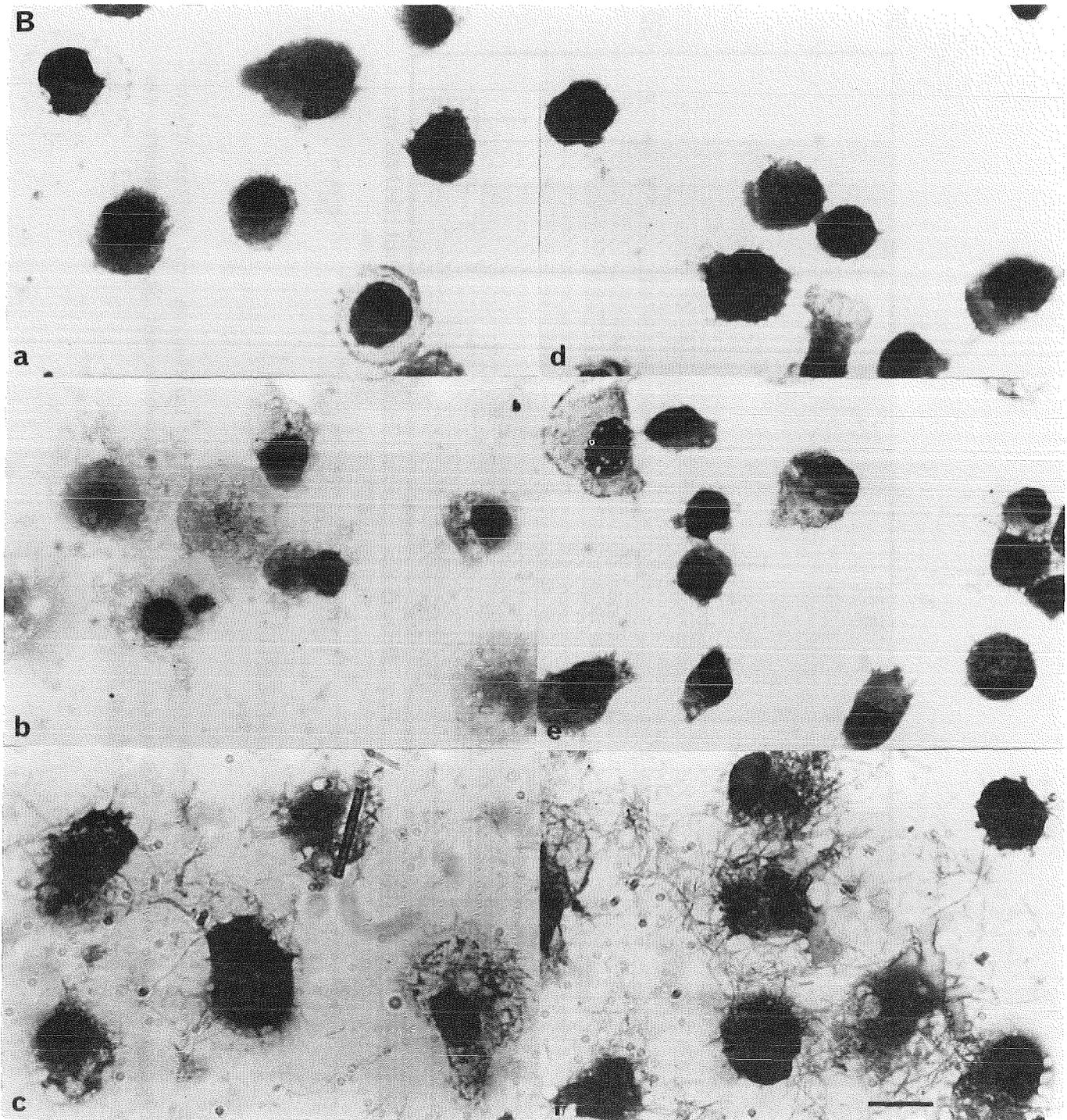


**Abb. 15:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 250 µg/ml DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, Anzahl der Versuche an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste. (a) Nativer Staubeffekt; (b) Modifizierter Staubeffekt in Gegenwart von DPL. c: Von der Kontrolle und von Quarz mit DPL signifikant verschieden ( $2p < 0,001$ ).



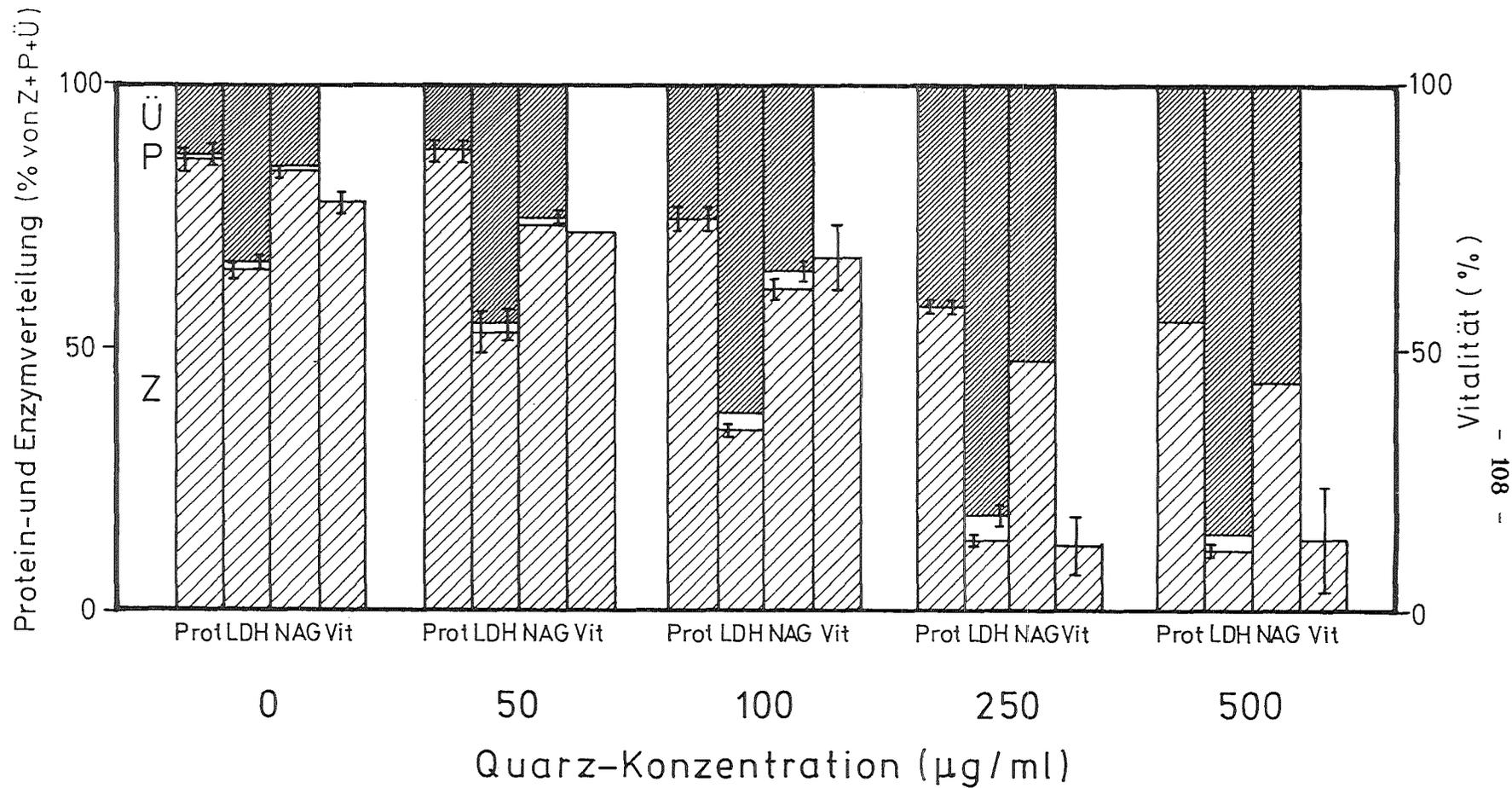
# A Rind



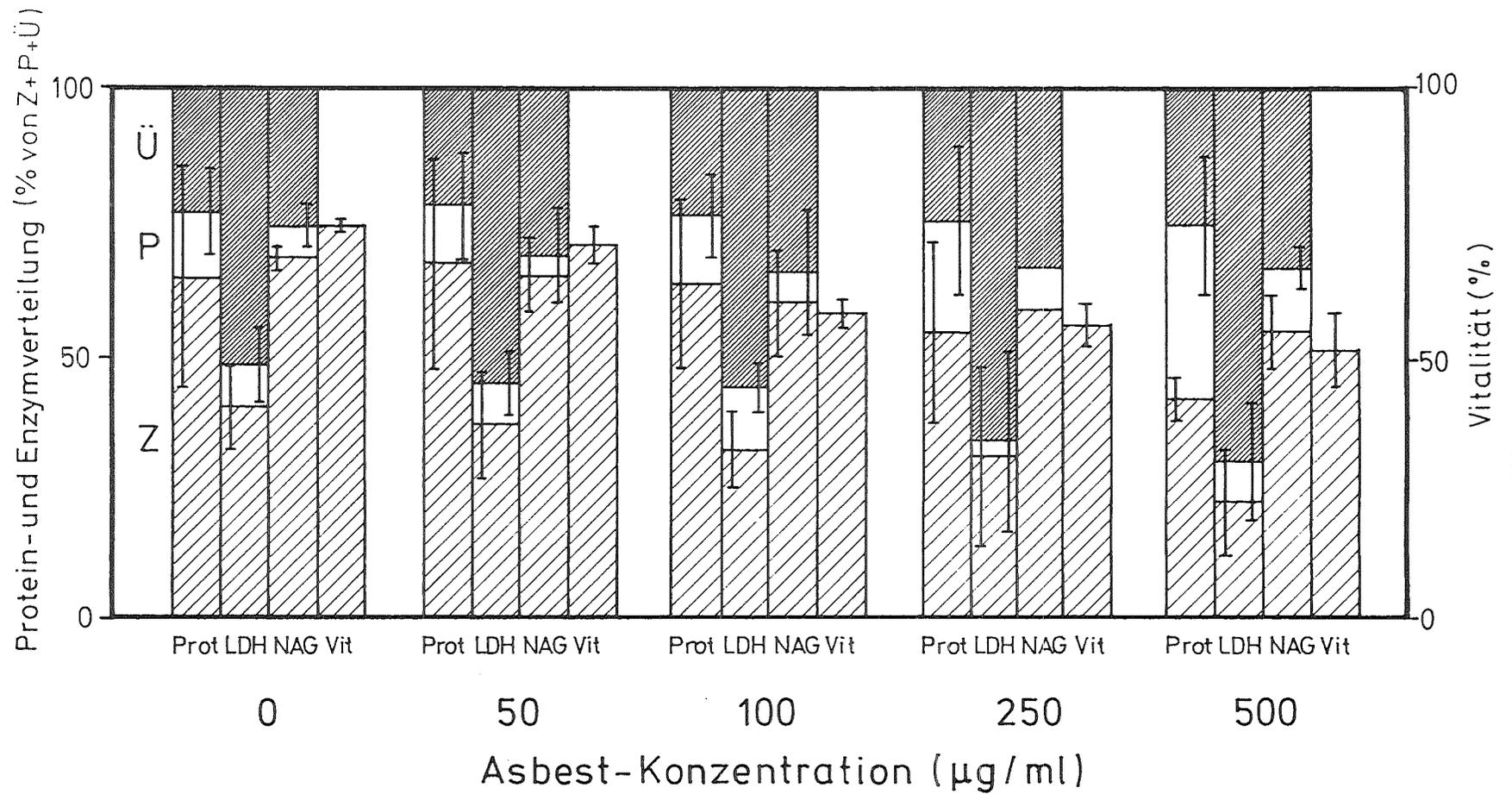


**Abb. 16:**

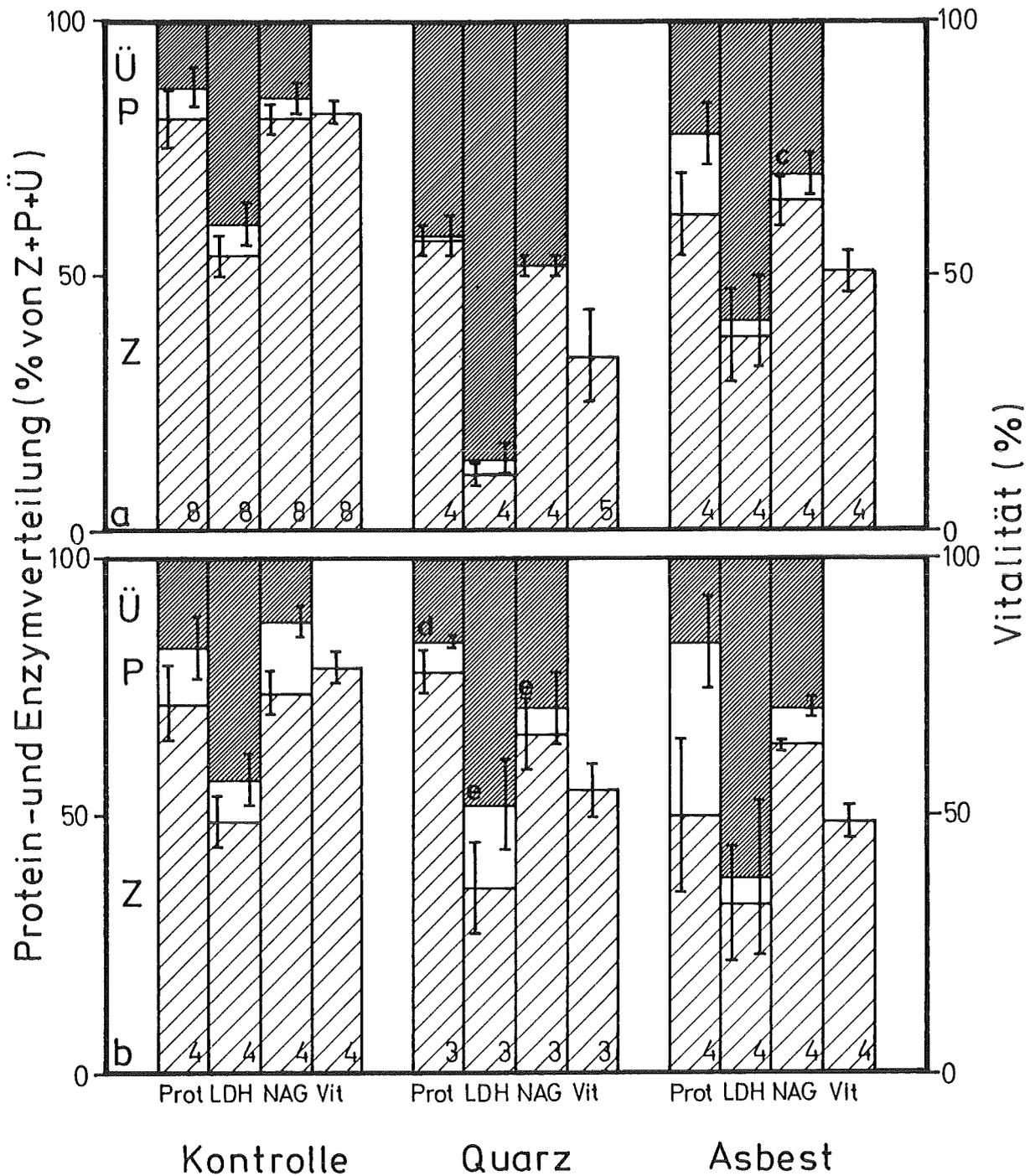
(A) Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Rinder-Alveolarmakrophagen  
(B) Hemacolor-gefärbte Rinder-Alveolarmakrophagen  
nach 20-stündiger Inkubation ohne (a-c) und mit Zusatz von Dipalmitoyl-Lecithin  
(d-f); (a, d) Kontrollzellen, (b, e) Zellen mit DQ12 Quarz (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), (c, f) Zellen  
mit Chrysotil Asbest (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Länge des angegebenen Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 17:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Ratten-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg DQ12 Quarz/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.



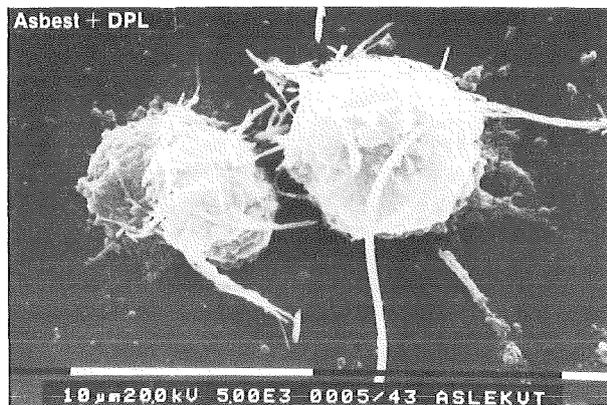
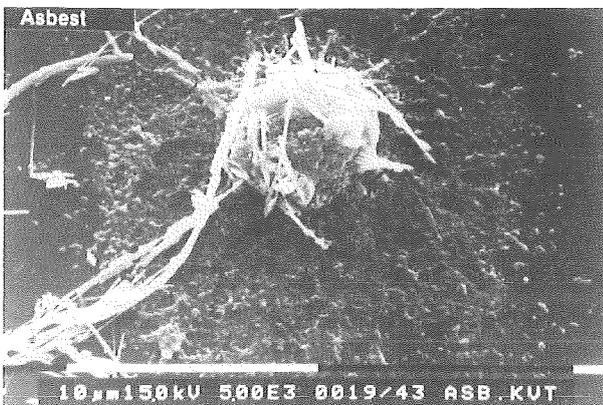
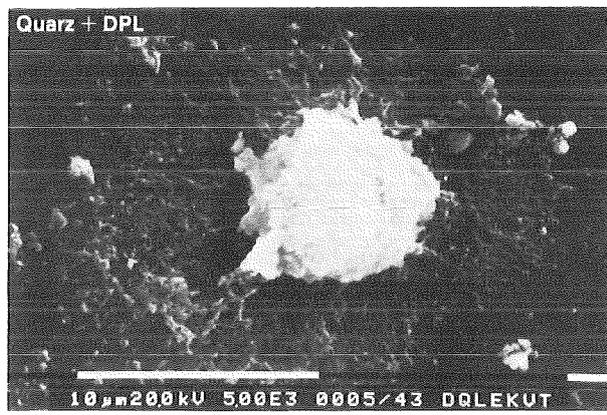
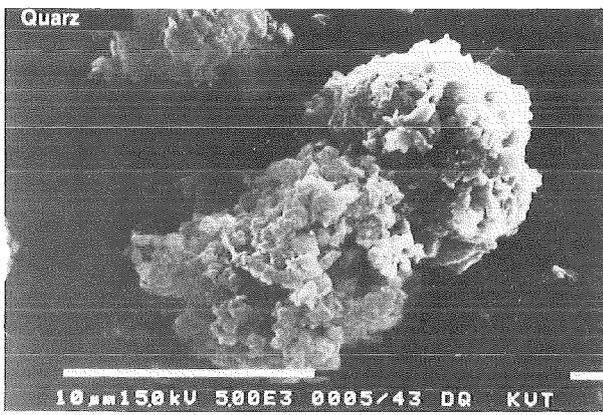
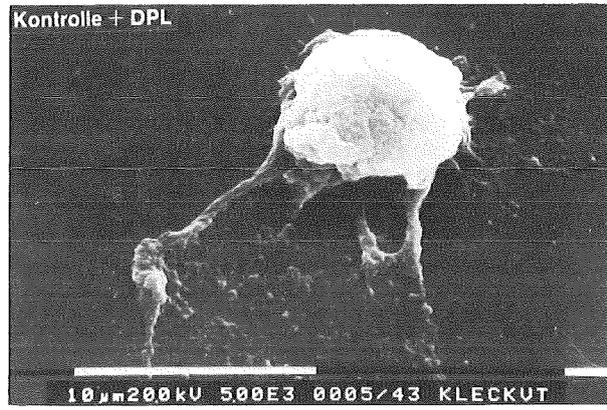
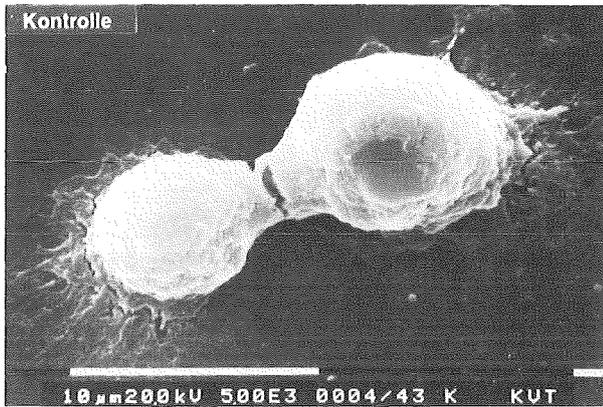
**Abb. 18:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Ratten-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg Chrysotil Asbest/ml. Arithmetische Mittelwerte zweier Versuche mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste.

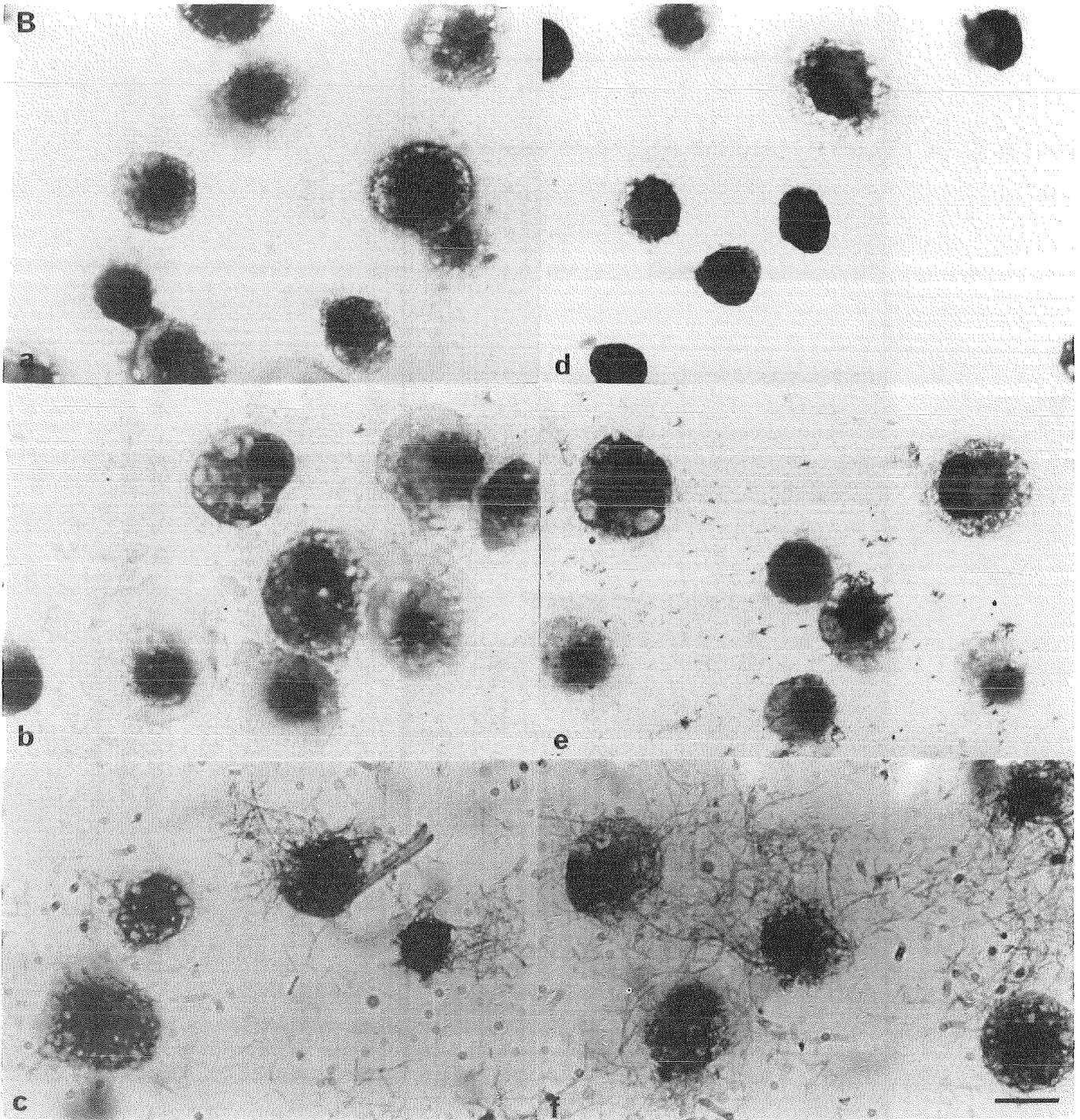


**Abb. 19:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung bei Ratten-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation mit 250 µg/ml DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern; Anzahl der getesteten Individuen an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste. (a) Nativer Staubeffekt, (b) Modifizierter Staubeffekt in Gegenwart von DPL. c: Von der Kontrolle signifikant verschieden ( $2p < 0,02$ ). d, e: Vom Quarzansatz signifikant verschieden (d:  $2p < 0,005$ , e:  $2p < 0,05$ )



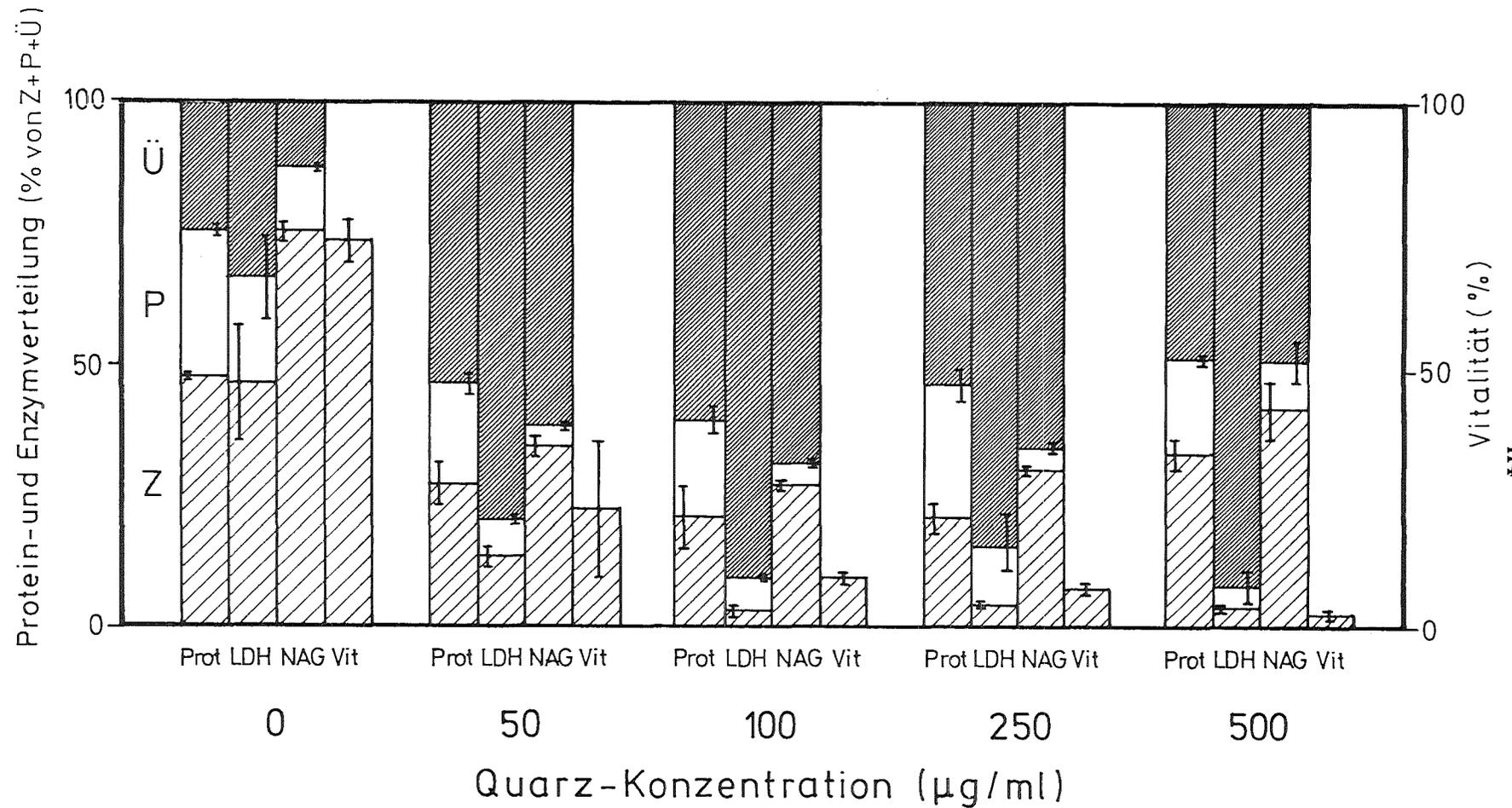
# A Ratte



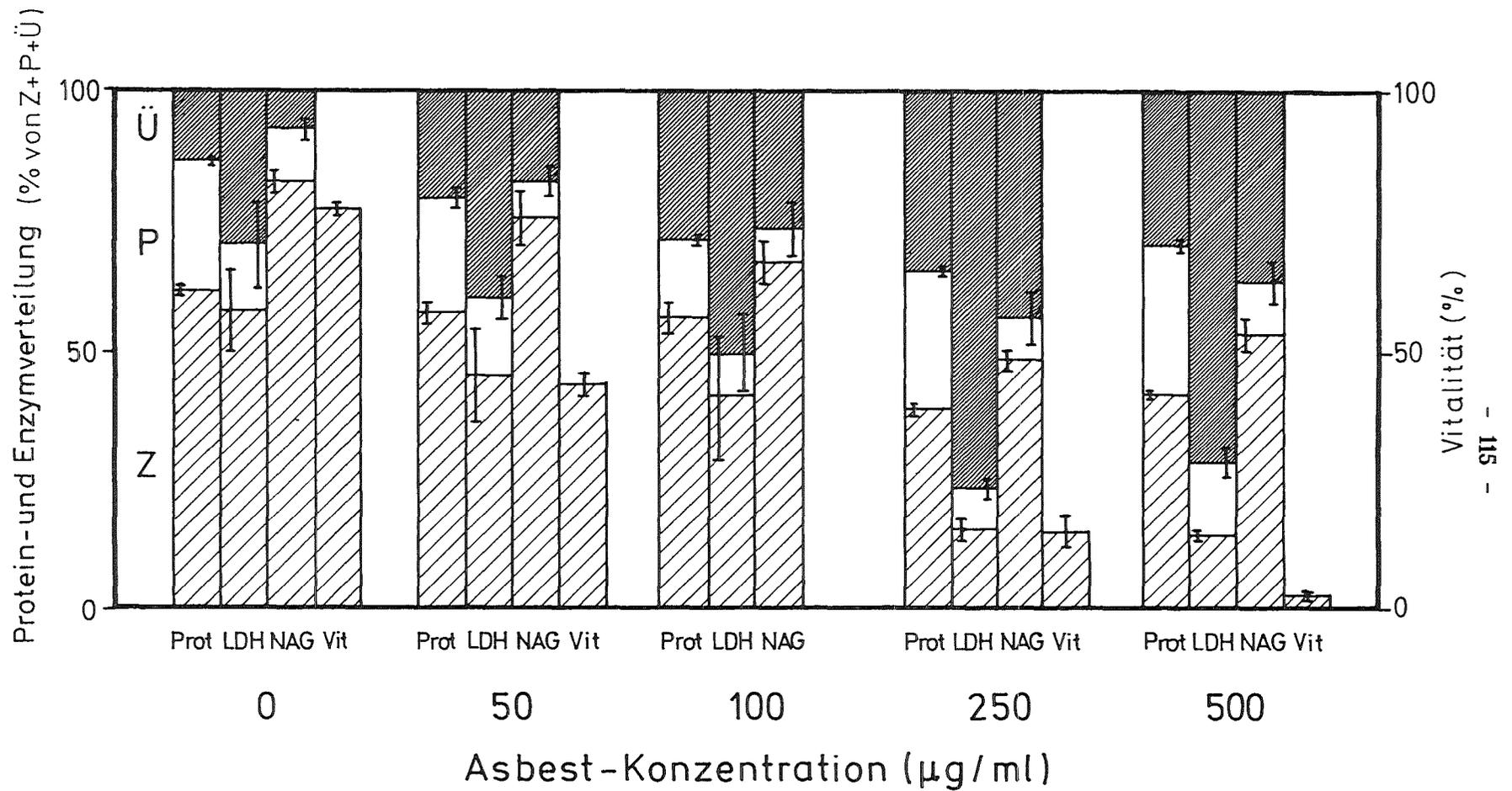


**Abb. 20:**

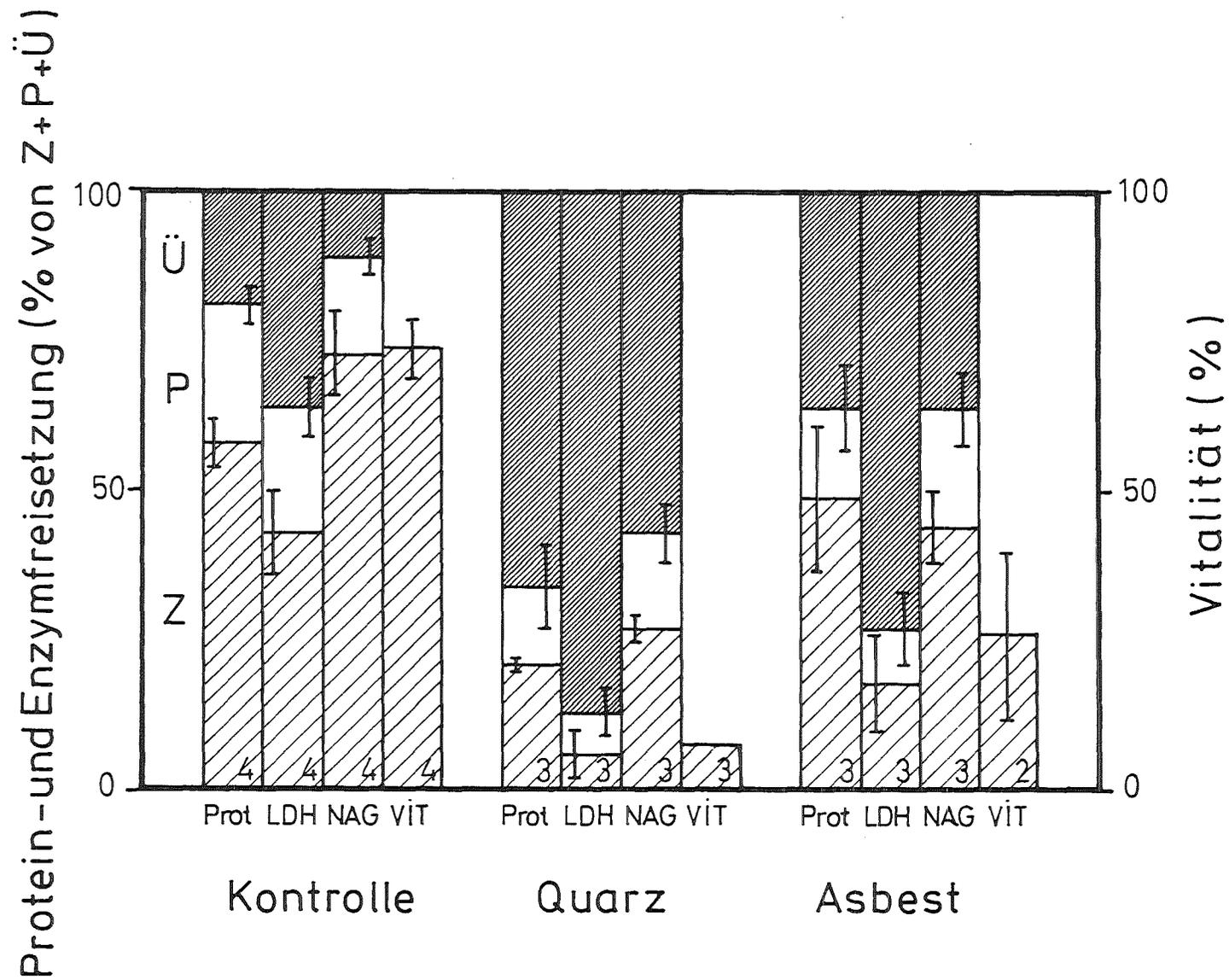
(A) Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ratten-Alveolarmakrophagen  
(B) Hemacolor gefärbte Ratten-Alveolarmakrophagen  
nach 20-stündiger Inkubation ohne (a-c) und mit Zusatz von Dipalmitoyl-Lecithin  
(d-f); (a, d) Kontrollzellen, (b, e) Zellen mit DQ12 Quarz (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), (c, f) Zellen  
mit Chrysotil Asbest (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Länge des angegebenen Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 21:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Hunde-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg DQ12 Quarz/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.



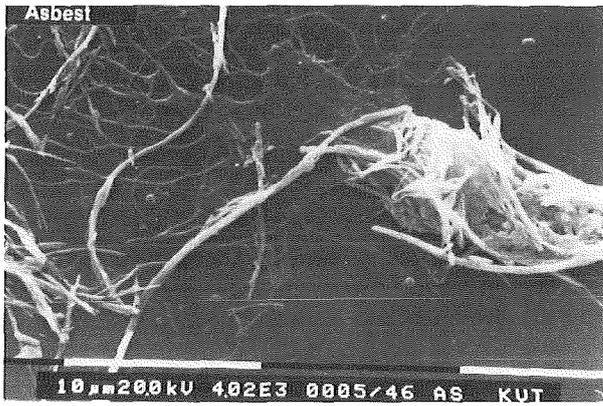
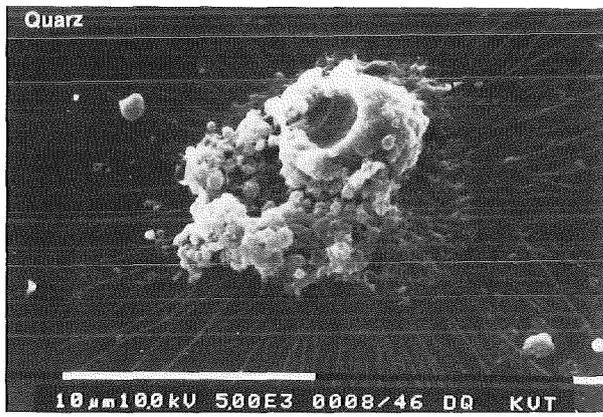
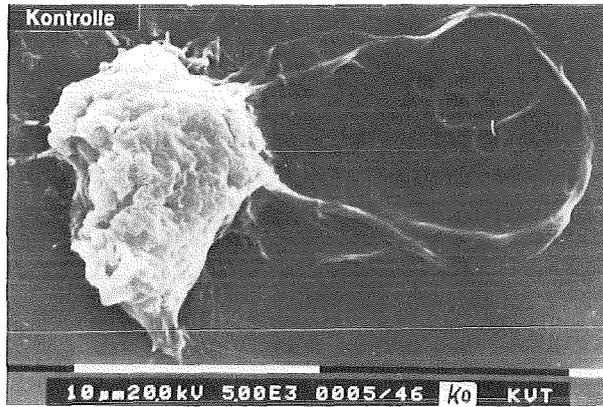
**Abb. 22:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Hunde-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg Chrysotil Asbest/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.

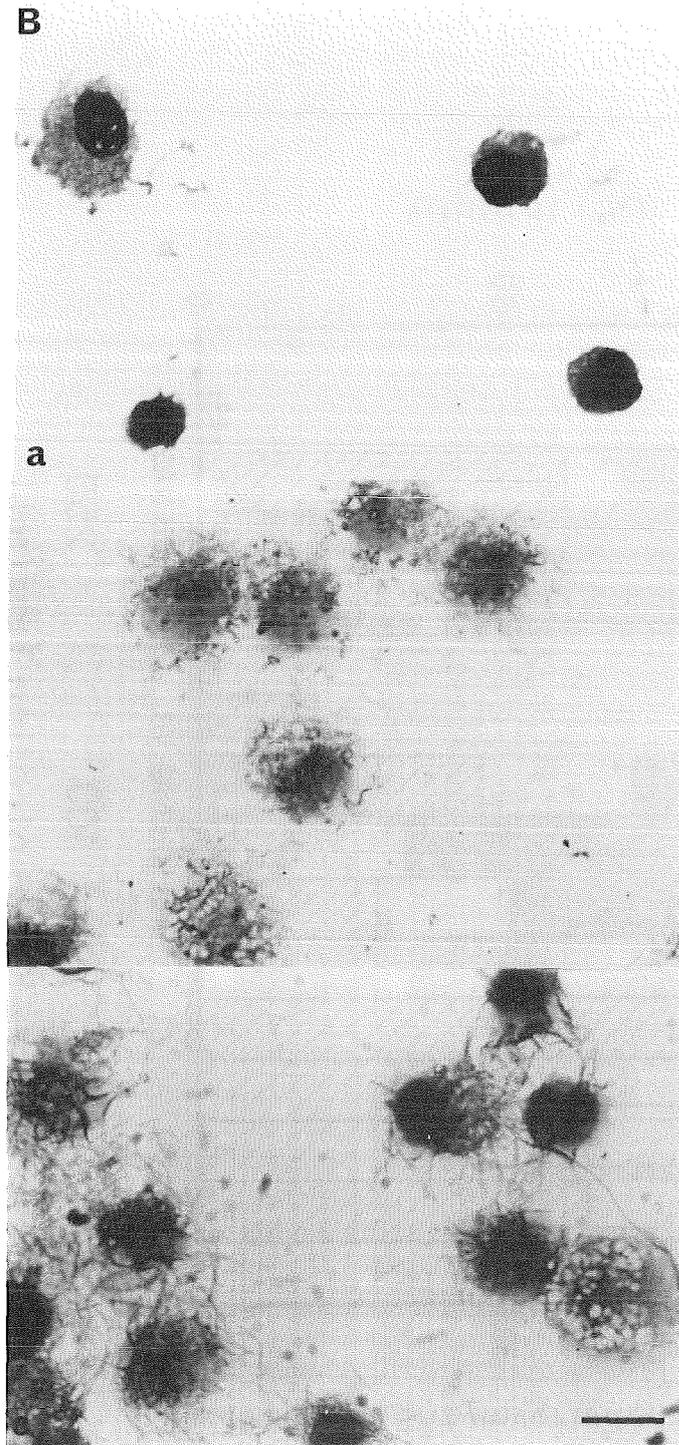


**Abb. 23:** Vitalität, Protein- und Enzymfreisetzung nach 20-stündiger Inkubation von Hunde-Alveolarmakrophagen mit 250 µg/ml DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest. Anzahl der getesteten Individuen an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste.



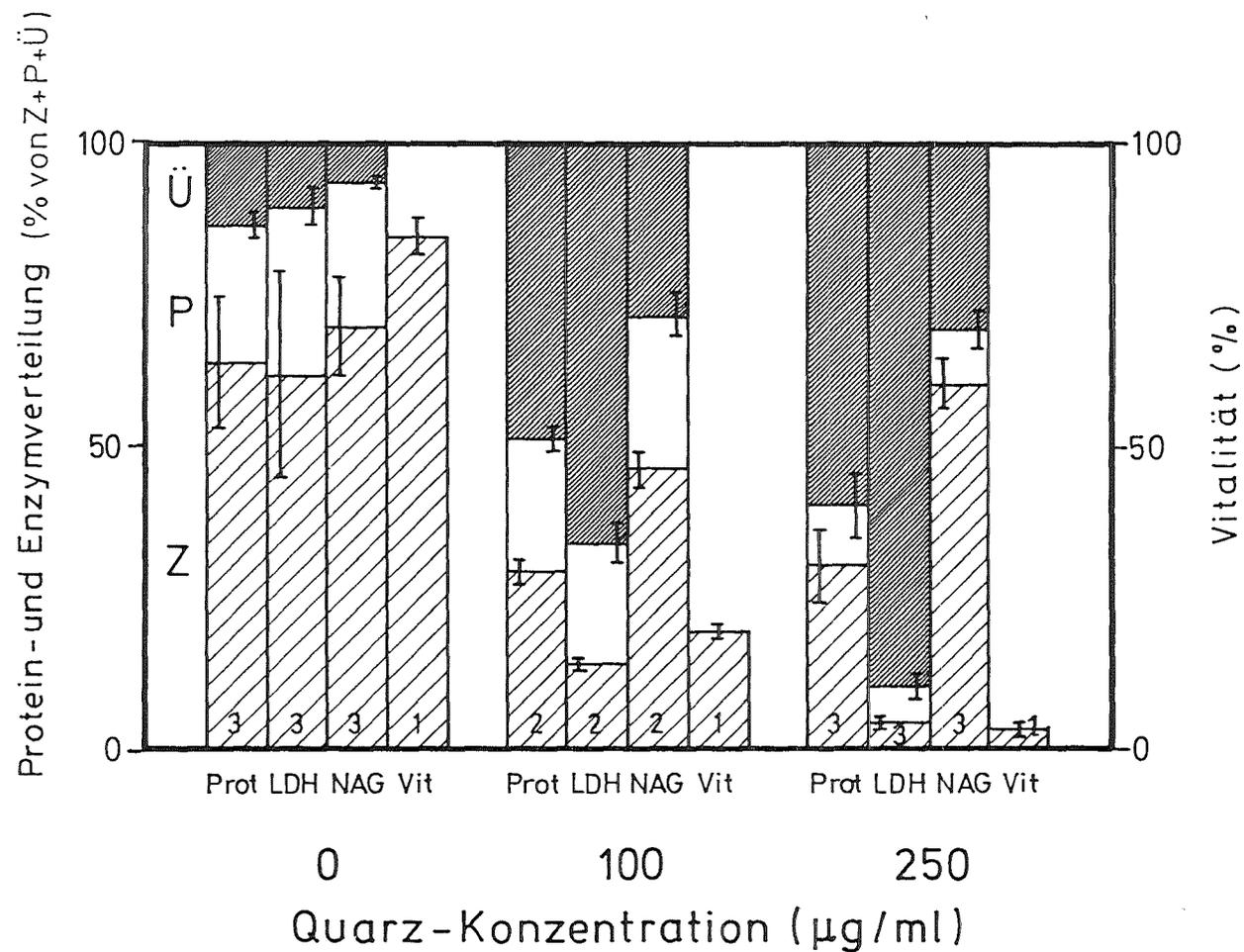
# A Hund



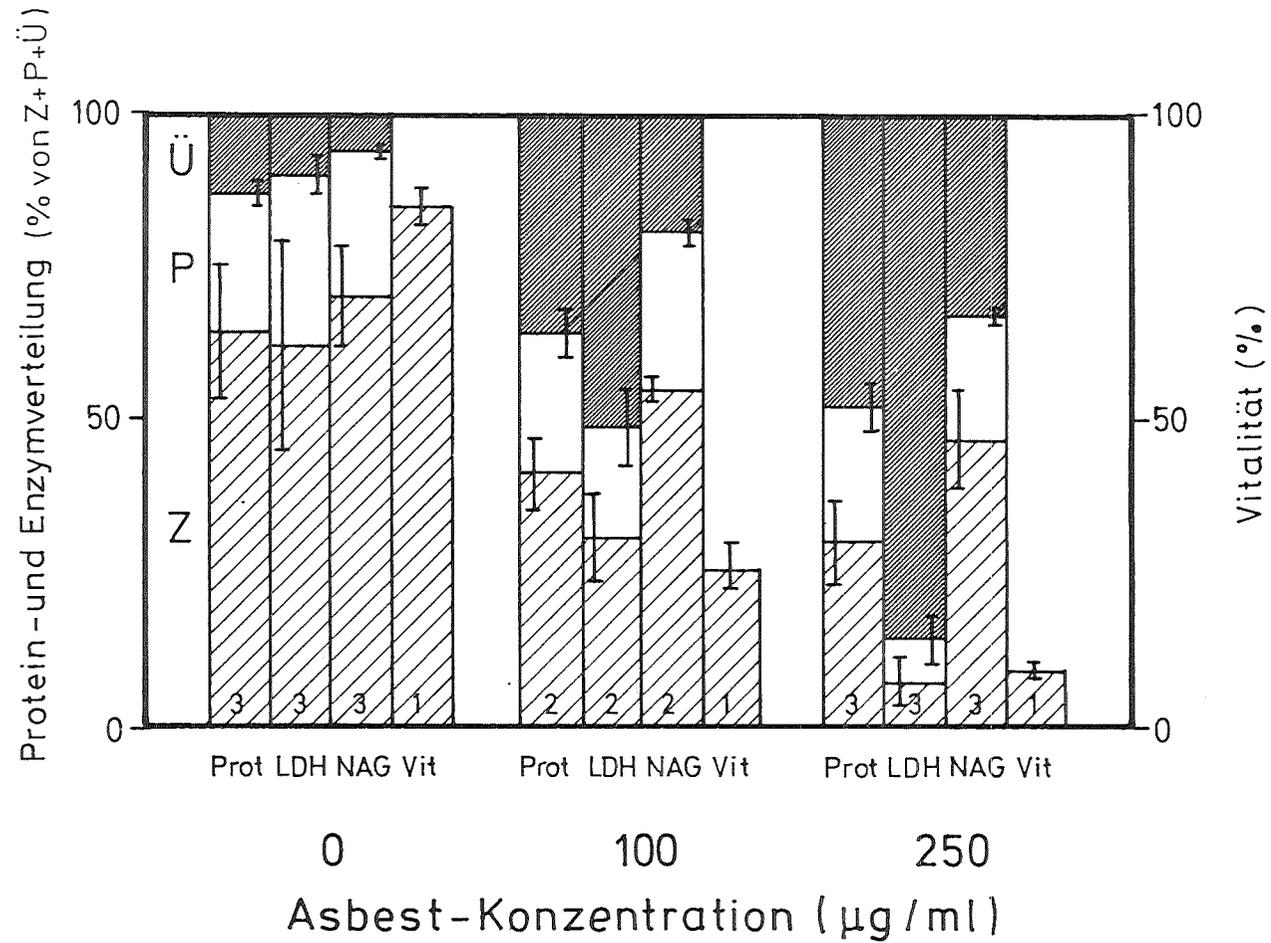


**Abb. 24:**

(A) Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hunde-Alveolarmakrophagen  
(B) Hemacolor-gefärbte Hunde-Alveolarmakrophagen  
nach 20-stündiger Inkubation. (a) Kontrollzellen, (b) Zellen mit DQ12 Quarz (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
und (c) Zellen mit Chrysotil Asbest (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Länge des angegebenen  
Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

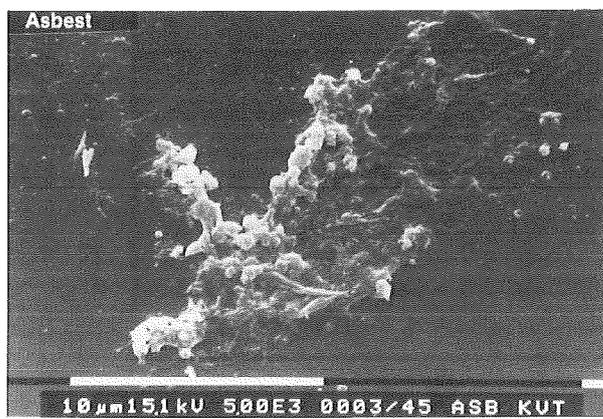
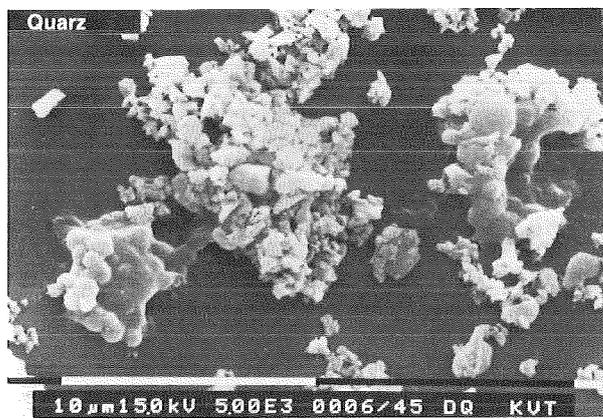
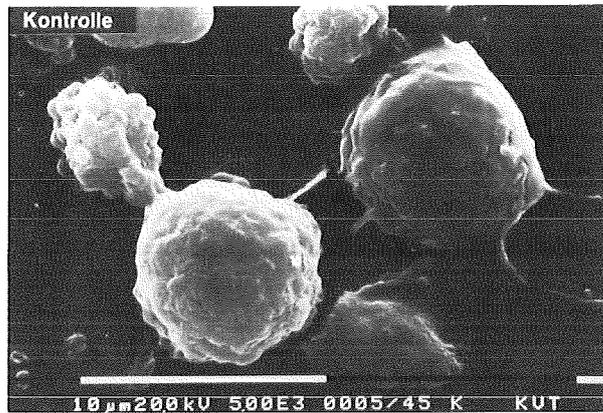


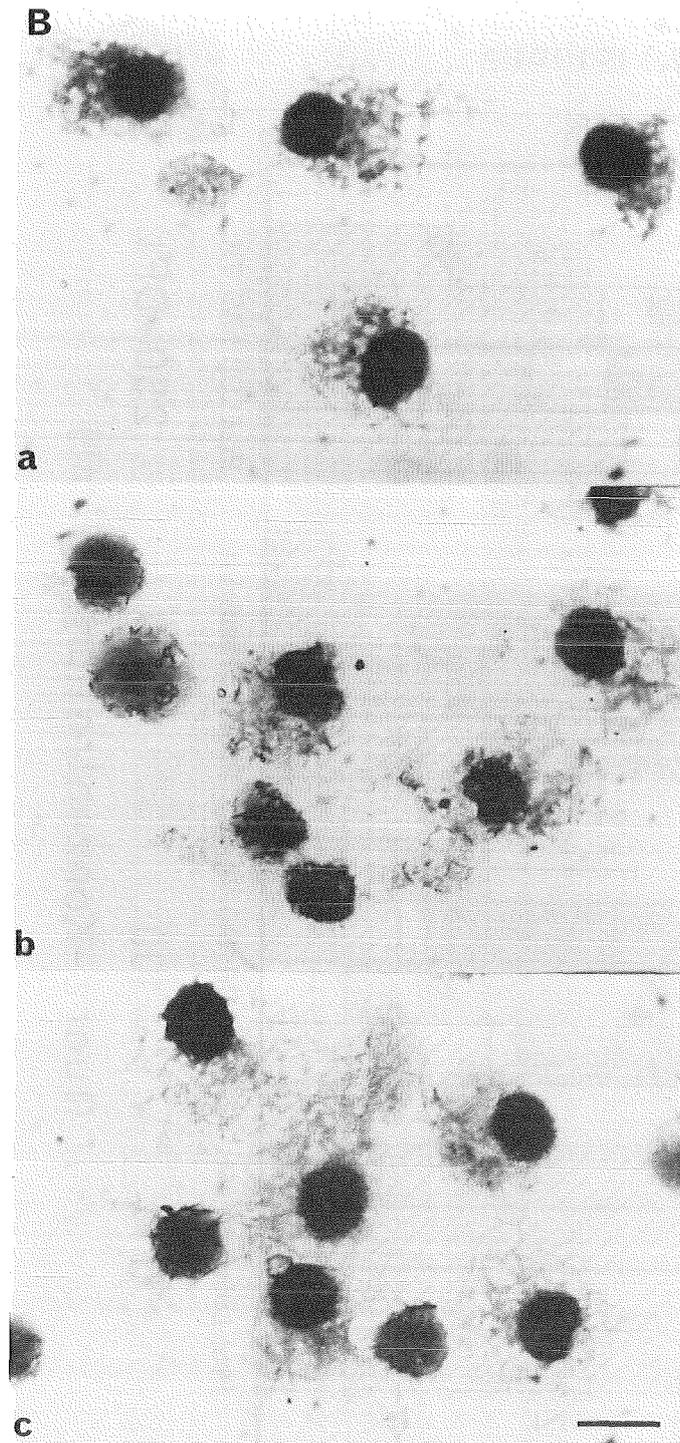
**Abb. 25:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Affen-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg DQ12 Quarz/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Anzahl der getesteten Individuen an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste.



**Abb. 26:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Affen-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg Chrysotil Asbest/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Anzahl der getesteten Individuen an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste.

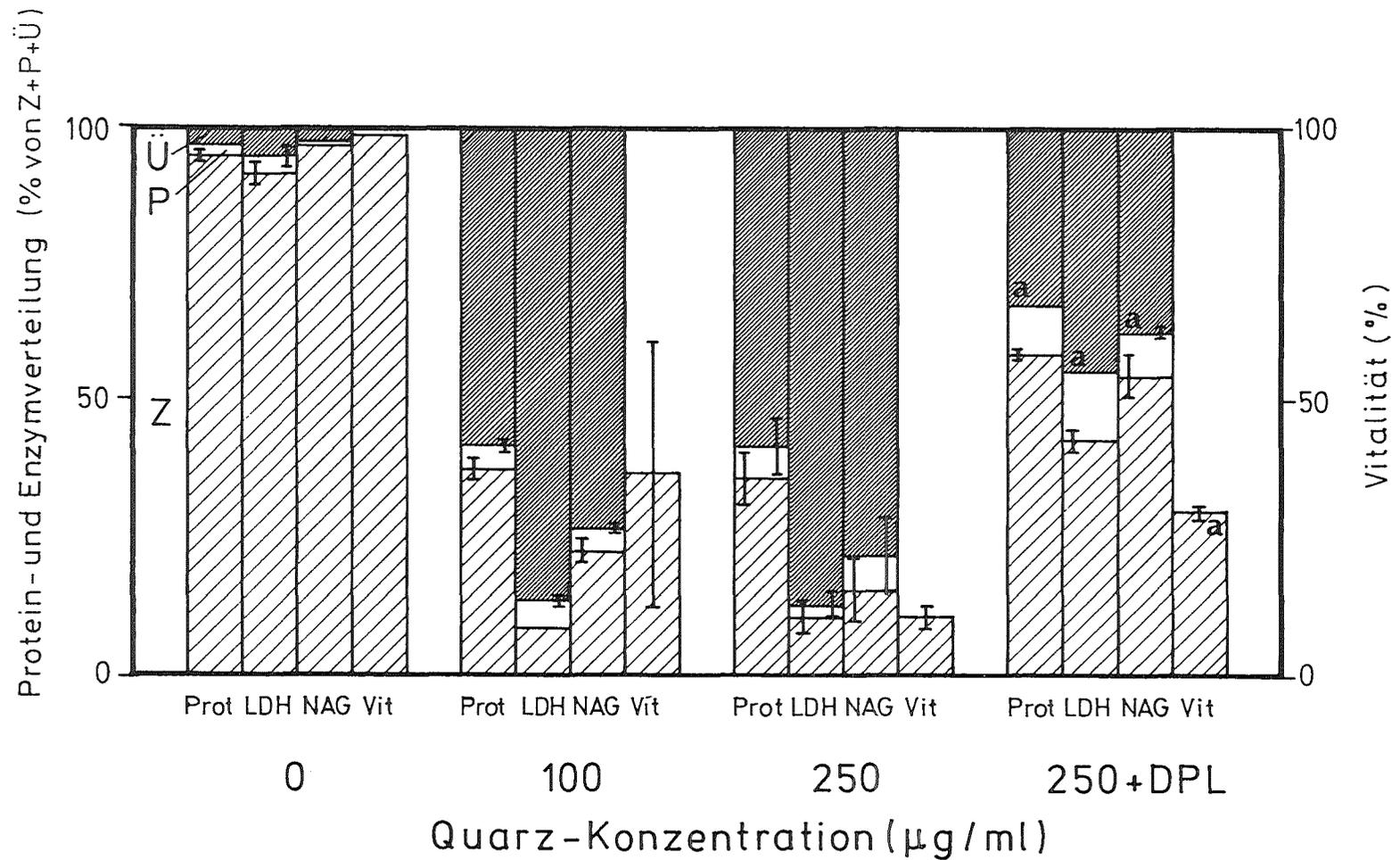
# A Affe



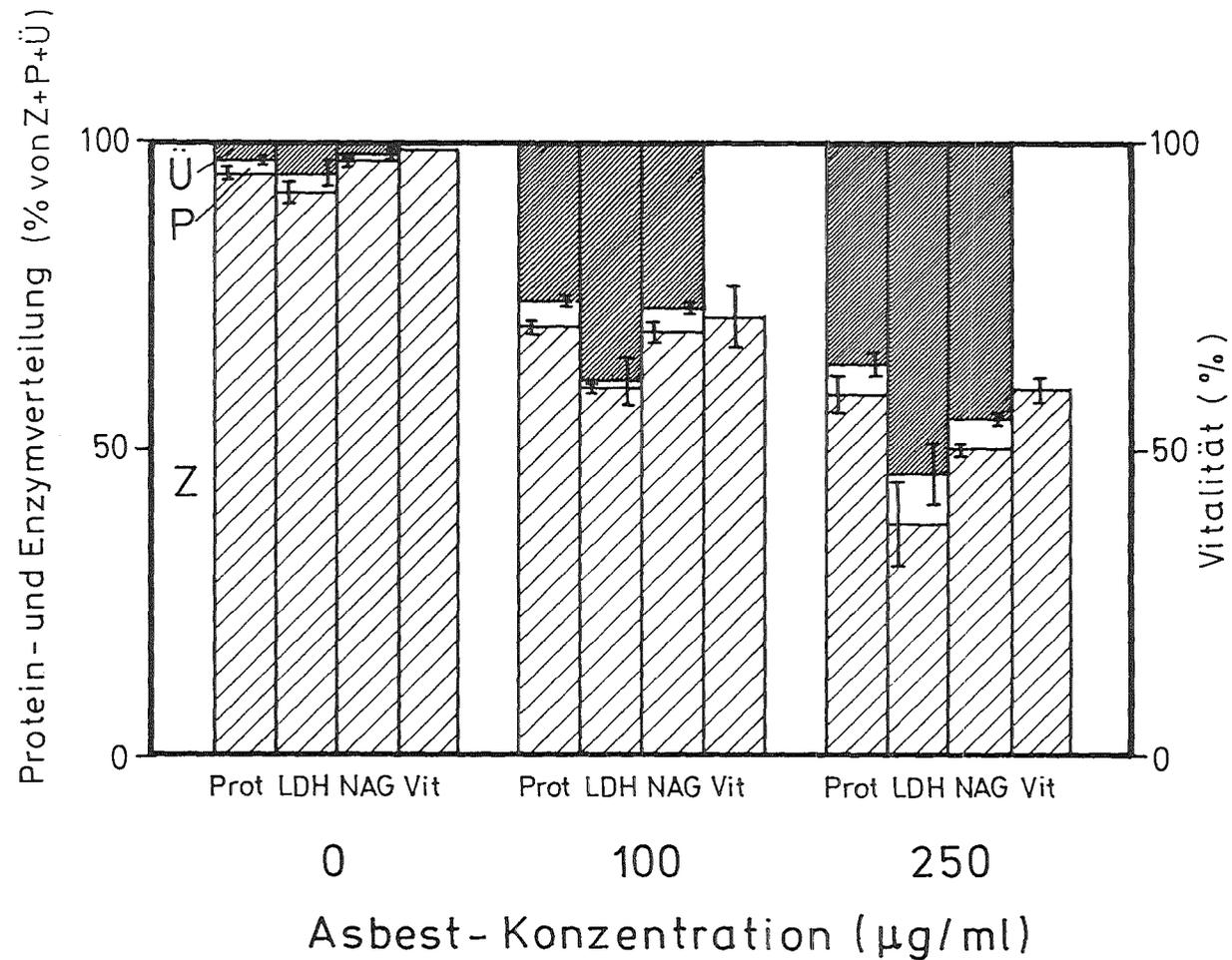


**Abb. 27:**

(A) Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Affen-Alveolarmakrophagen  
(B) Hemacolor-gefärbte Affen-Alveolarmakrophagen nach 20-stündiger Inkubation. (a) Kontrollzellen, (b) Zellen mit DQ12 Quarz (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und (c) Zellen mit Chrysotil Asbest (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Länge des angegebenen Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



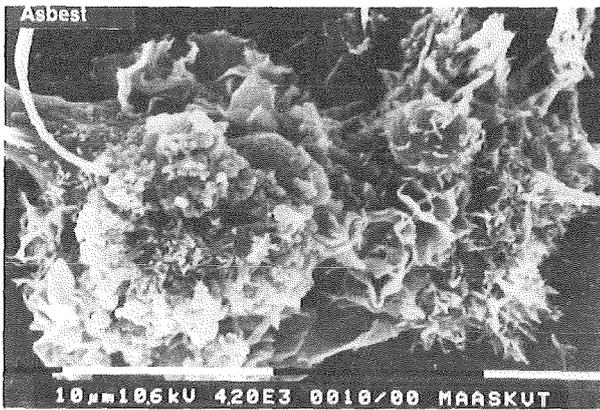
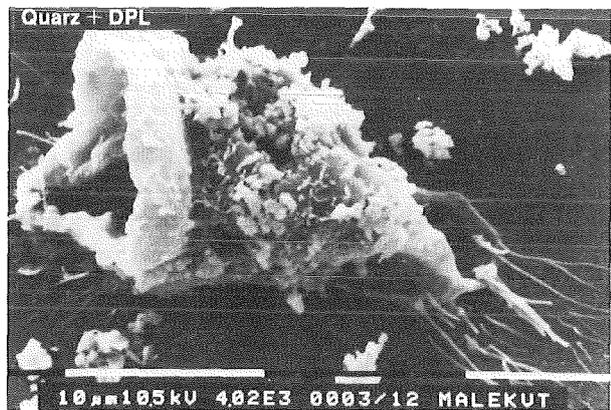
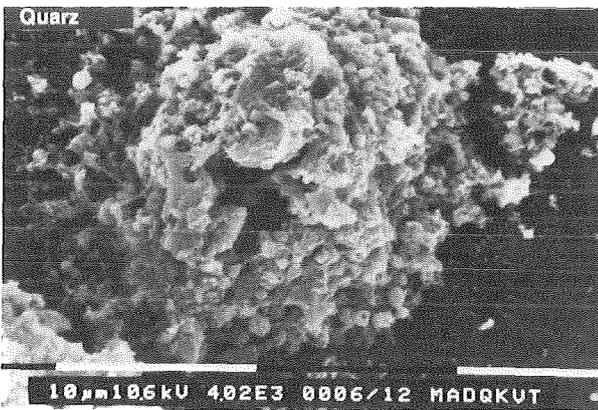
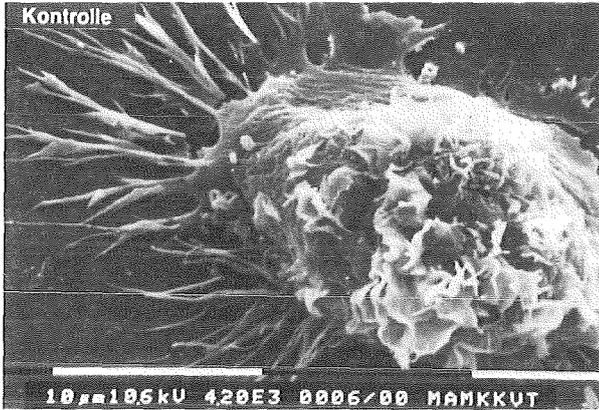
**Abb. 28:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von menschlichen Alveolarmakrophagen (Raucher) mit 0-250 µg DQ12 Quarz/ml ohne und mit Zusatz von DPL. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste. a: Vom nativen Quarzschaden signifikant verschieden ( $2p < 0,05$ ).

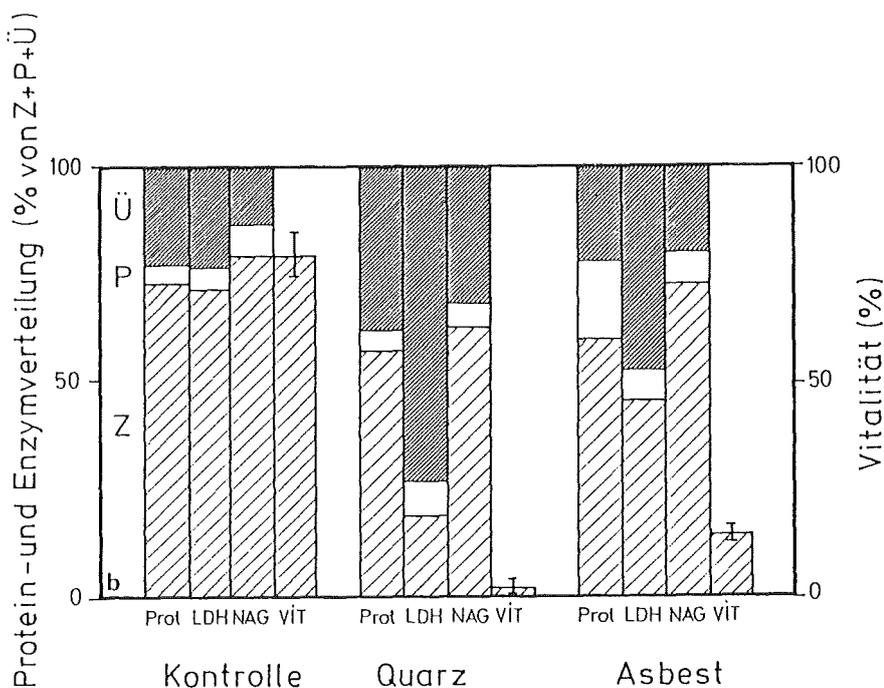
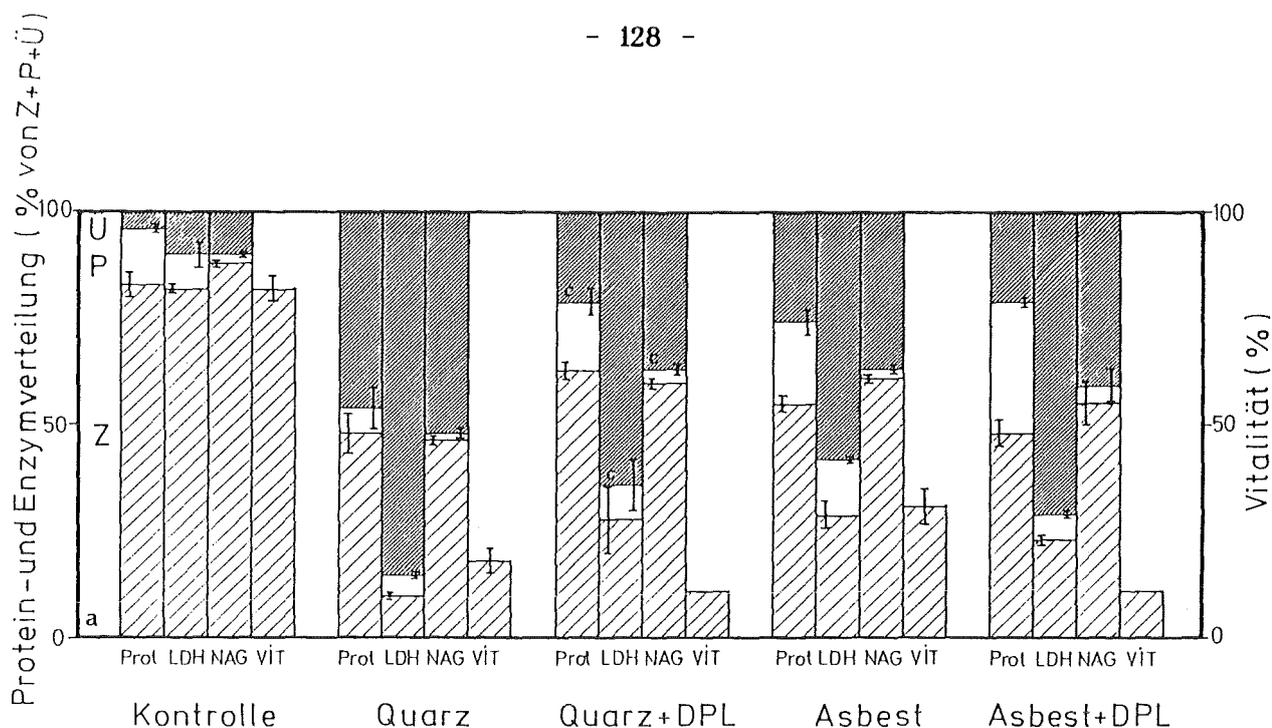


**Abb. 29:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von menschlichen Alveolarmakrophagen (Raucher) mit 0-250 µg Chrysotil Asbest/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.

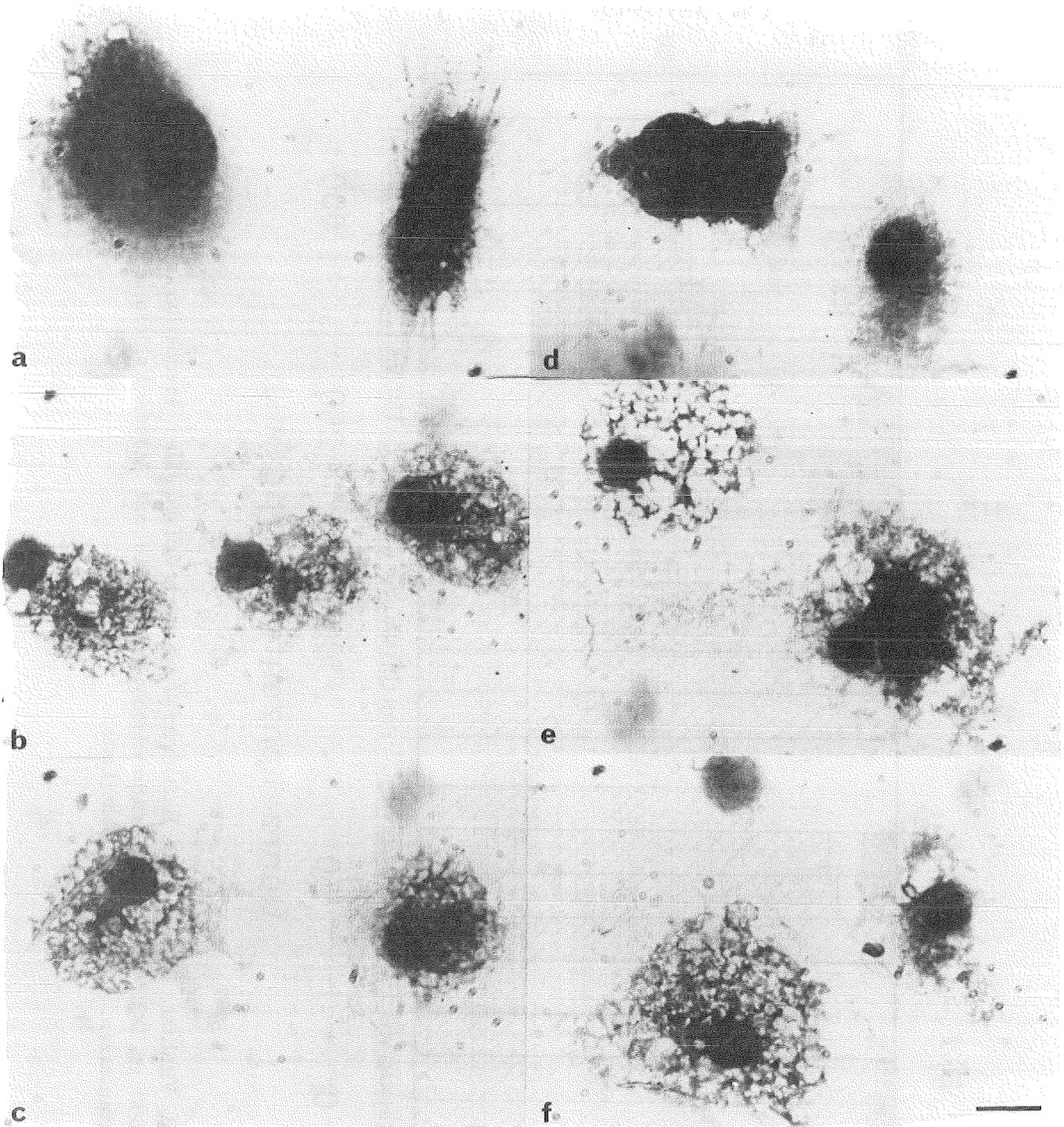
**Abb. 30:** Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von menschlichen Alveolar-  
krophagen (Raucher) nach 20-stündiger Inkubation mit und ohne 250 µg/ml DQ12  
Quarz oder Chrysotil Asbest. Linke Seite: ohne Zusatz. Rechte Seite: mit Zusatz von  
Dipalmitoyl-Lecithin (DPL). Die Kontrollzellen sind oben, Quarz behandelte Zellen in  
der Mitte und Asbest behandelte Zellen unten abgebildet. Die Länge des weißen  
Balken entspricht 10 µm.

**A**  
**Mensch**

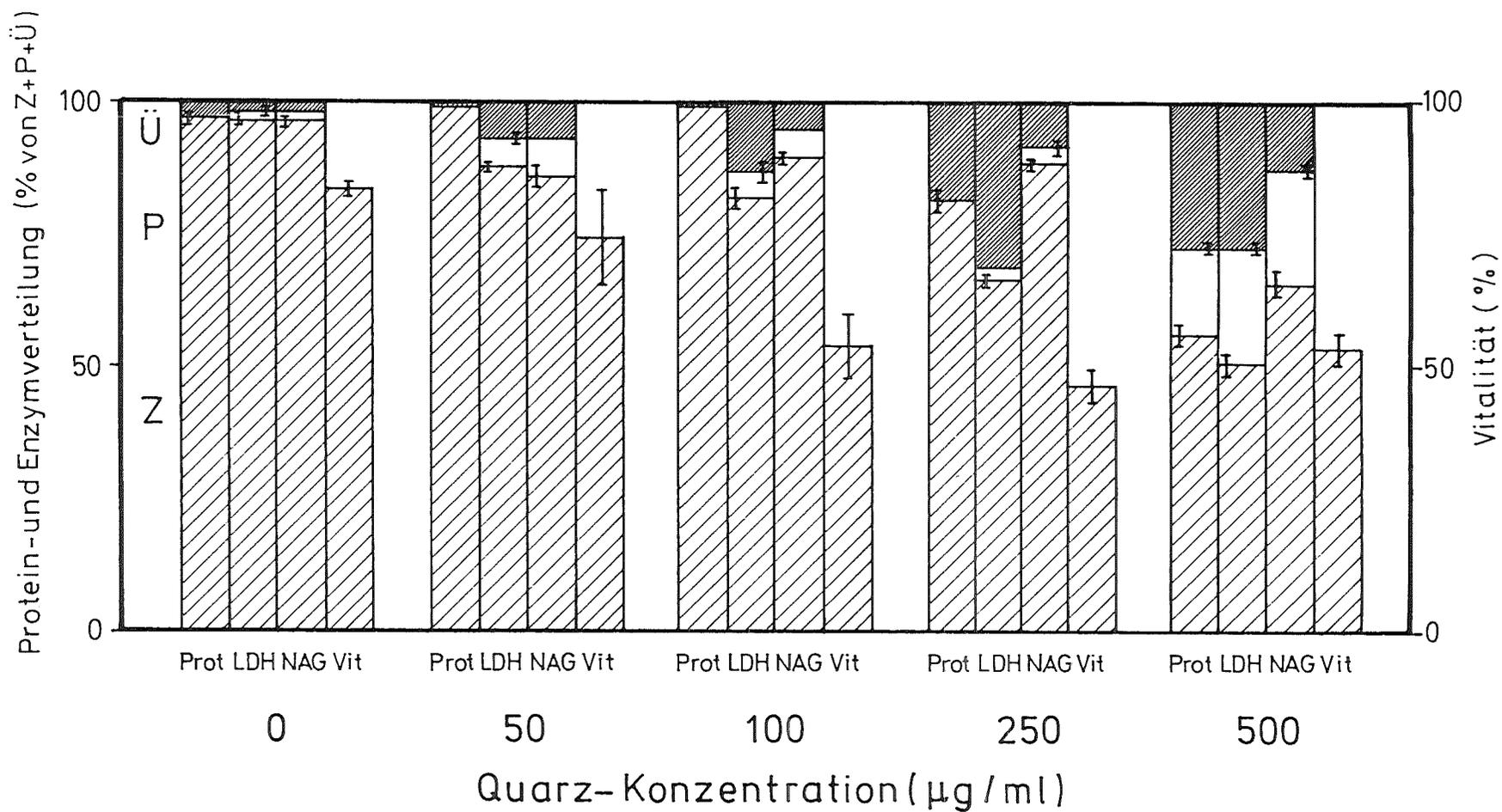




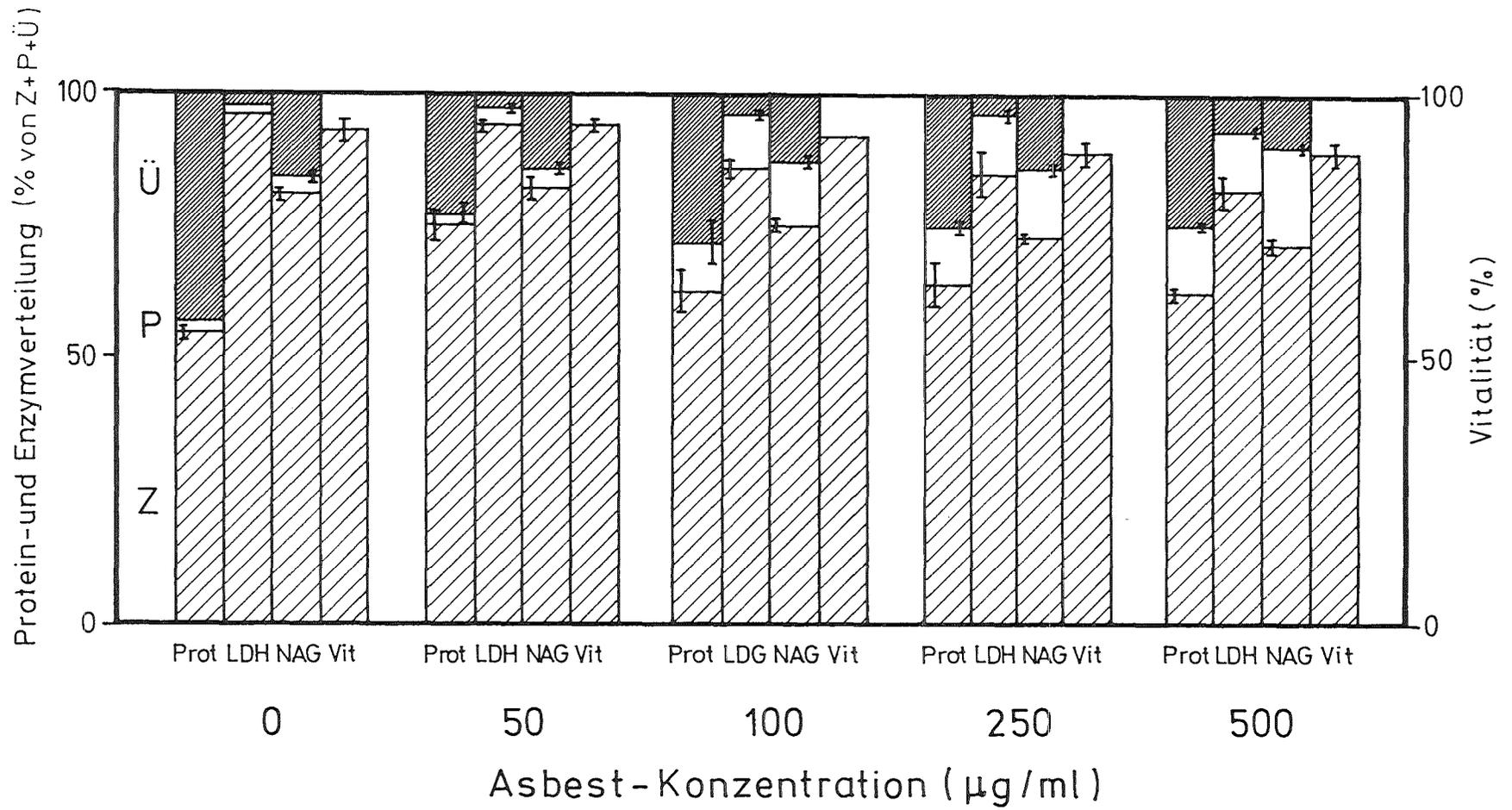
**Abb. 31:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von menschlichen Alveolarmakrophagen (Sarkoidose Patienten) mit 250 µg/ml DQ12 Quarz oder Chrysotil Asbest. Die Kulturen wurden ohne und mit Zusatz von DPL angelegt. Abkürzungen siehe Liste. Arithmetische Mittelwerte eines Versuches, (a) mit Duplikatansätzen (Zellen eines Patienten), (b) mit einer Stichprobe (Zellen einer Patientin). c: Vom nativen Quarzansatz signifikant verschieden ( $2p < 0,05$ ).



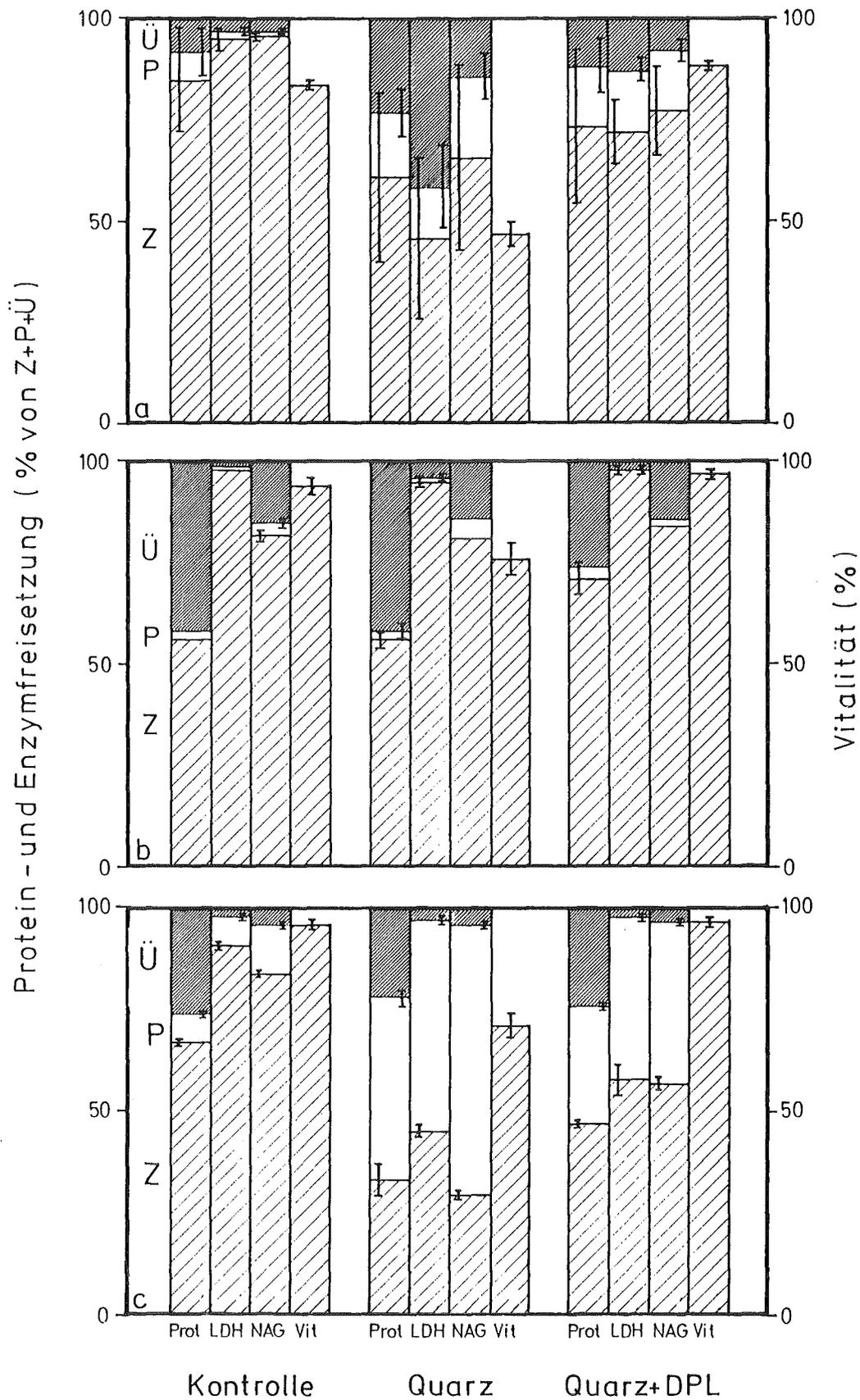
**Abb. 32:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Hemacolor-gefärbten menschlichen Alveolarmakrophagen eines Sarkoidose Patienten nach 20-stündiger Inkubation der Zellen ohne (a-c) und mit Zusatz von Dipalmitoyl-Lecithin (d-f); (a, d) Kontrollzellen, (b, e) Zellen mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) und (c, f) Zellen mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml). Die Länge des angegebenen Balken entspricht 10 µm.



**Abb. 33:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von U937-Zellen mit 0-500 µg DQ12 Quarz/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.



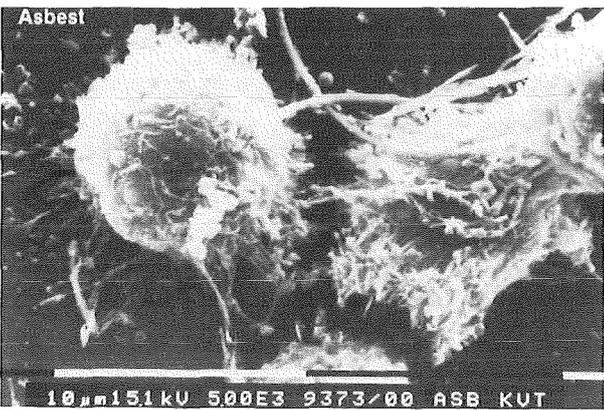
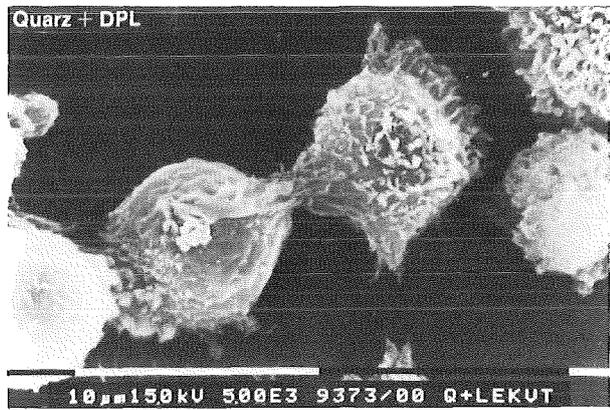
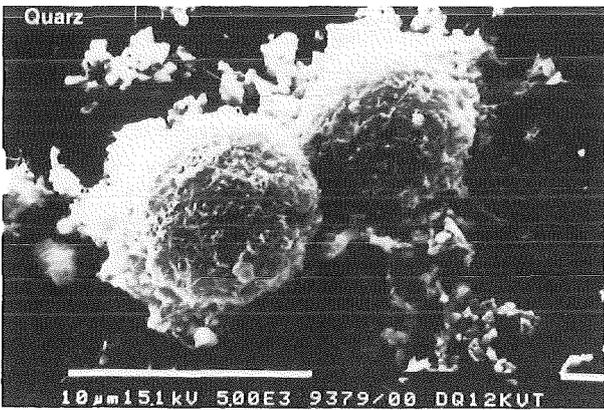
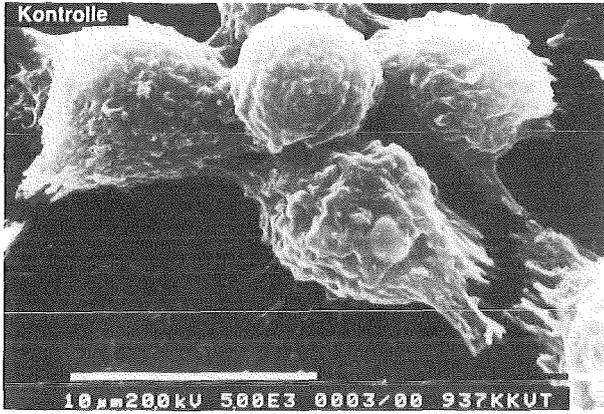
**Abb. 34:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von U937-Zellen mit 0-500 µg Chrysotil Asbest/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, ein Versuch mit Duplikatansätzen. Abkürzungen siehe Liste.

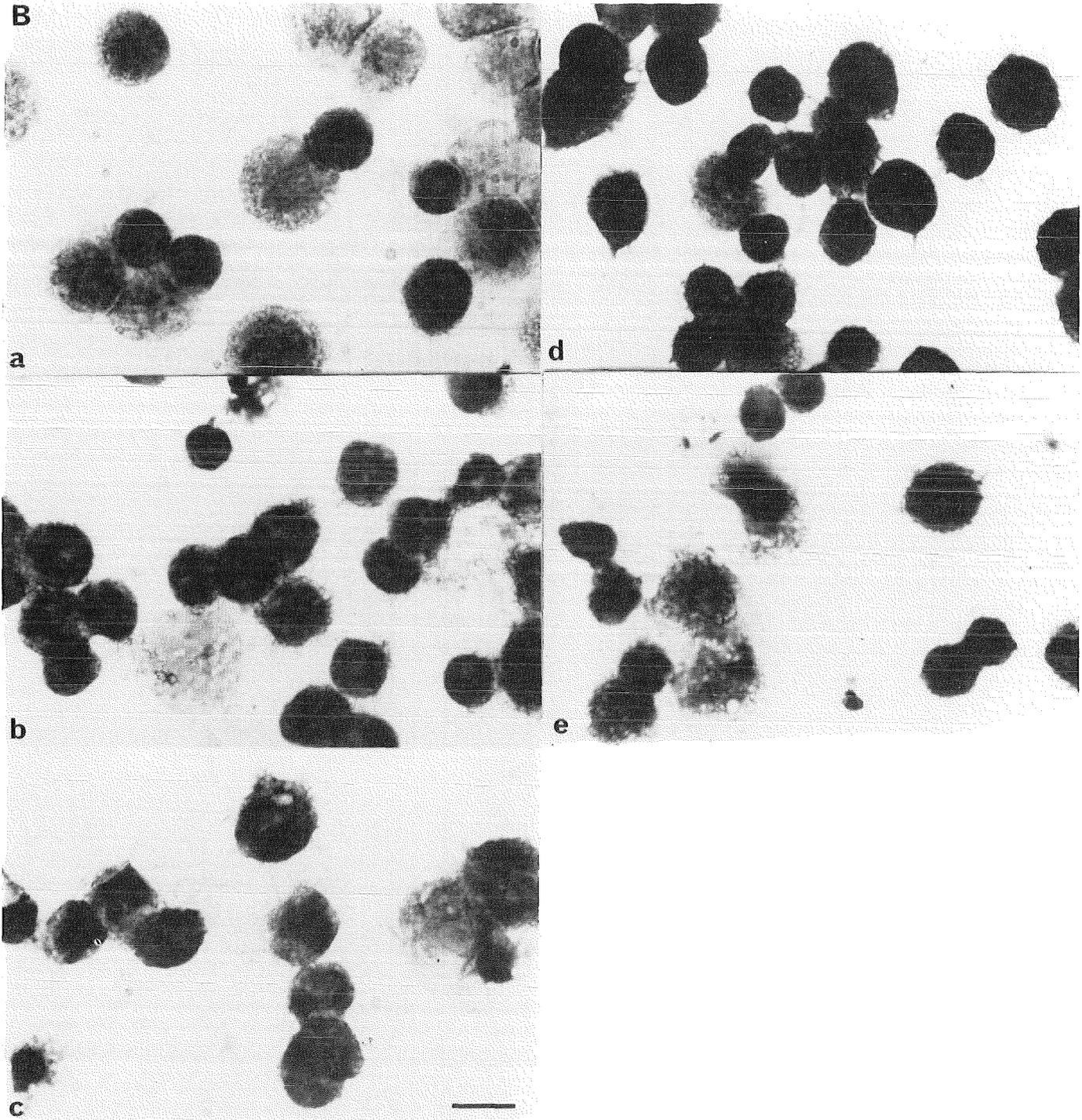


**Abb. 35:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation mit 250 µg DQ12 Quarz/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Abkürzungen siehe Liste. (n) Anzahl der durchgeführten Versuche. (a) Tübinger U937-Zellen, (n = 2), (b) Tübinger U937-Zellen, (n = 1), (c) Amerikanische U937-Zellen, (n = 1)



A  
U 937

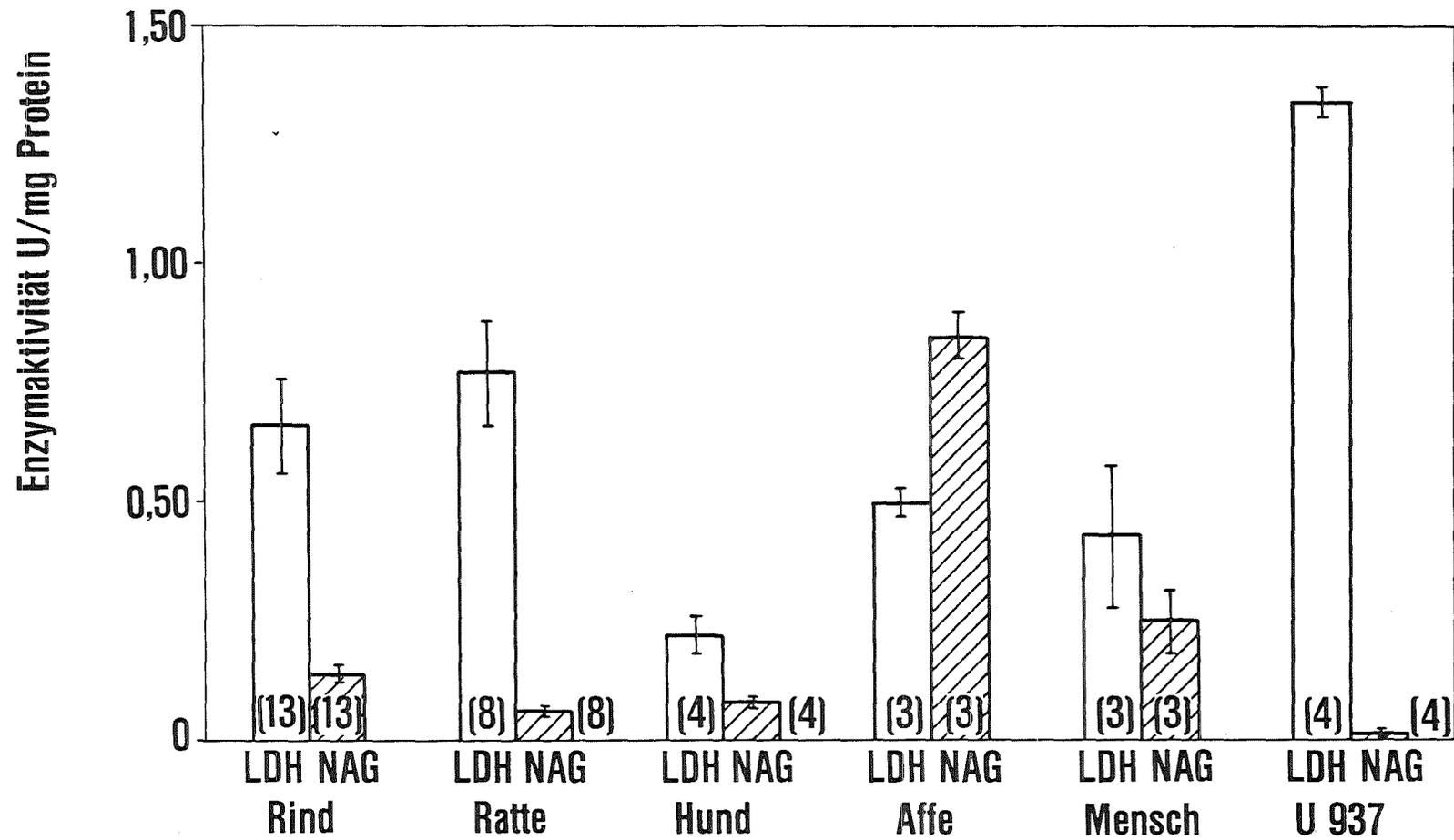




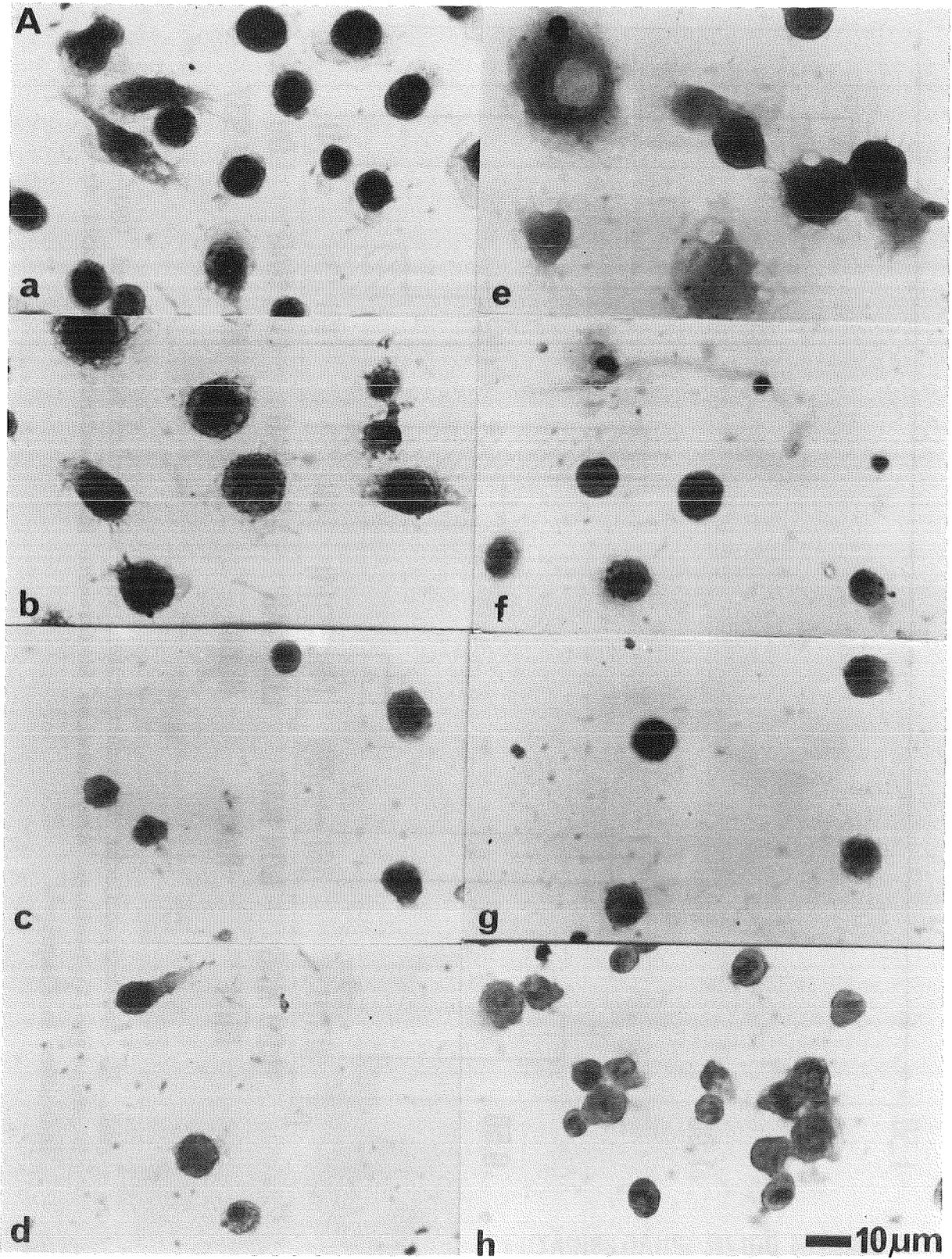
**Abb. 36:**

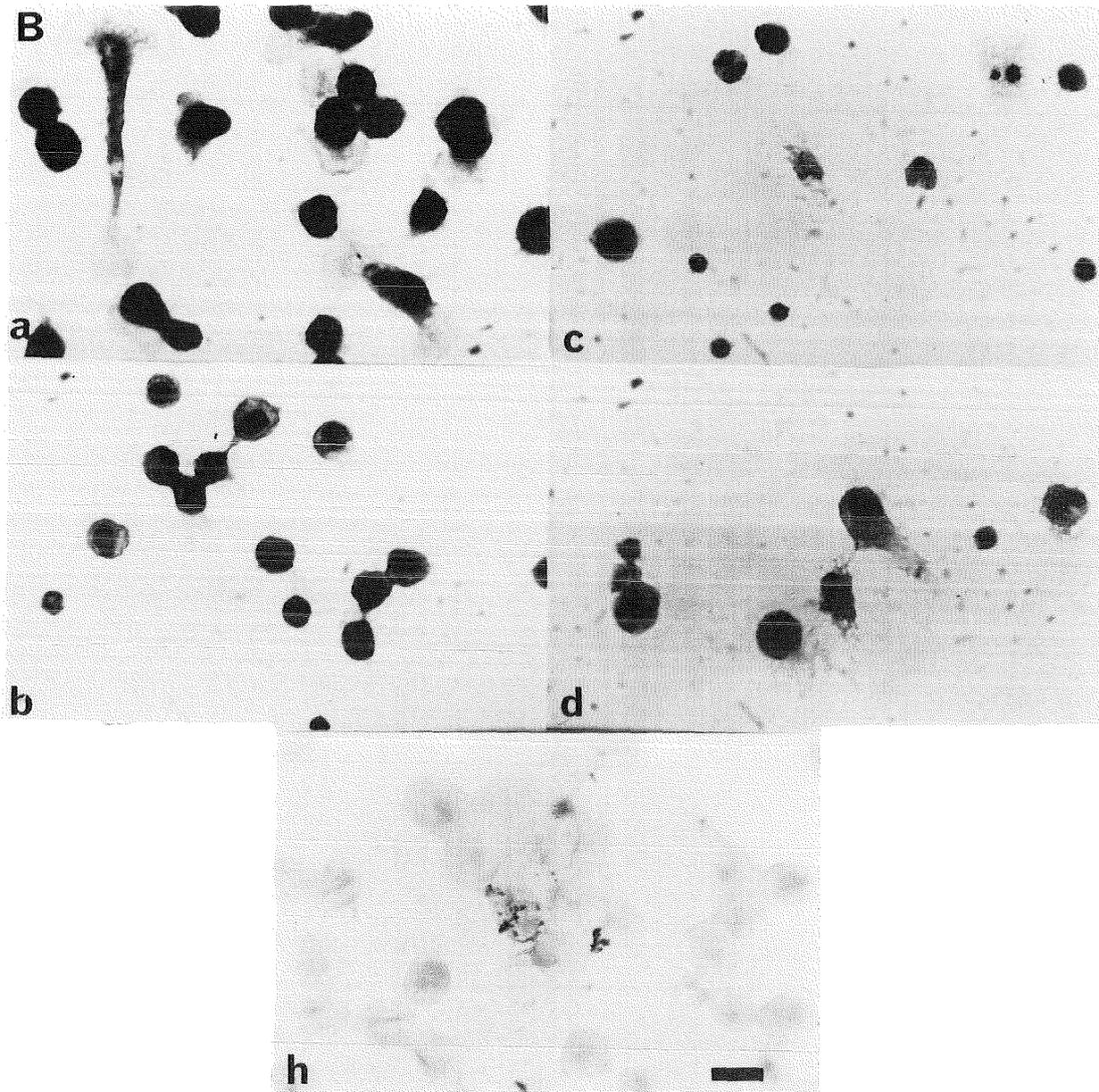
(A) Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Tübinger U937-Zellen  
(B) Hemacolor-gefärbte Tübinger U937-Zellen  
nach 20-stündiger Inkubation ohne (a-c) und mit Zusatz von Dipalmitoyl-Lecithin  
(d-f); (a, d) Kontrollzellen, (b, e) Zellen mit DQ12 Quarz (250 µg/ml) und (c, f) Zellen  
mit Chrysotil Asbest (250 µg/ml). Die Länge des angegebenen Balken entspricht 10 µm.





**Abb. 37:** Speziesspezifische Enzymaktivitäten von Alveolarmakrophagen und U937-Zellen nach 20-stündiger Kulturdauer. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern, Anzahl der getesteten Individuen in Klammern.





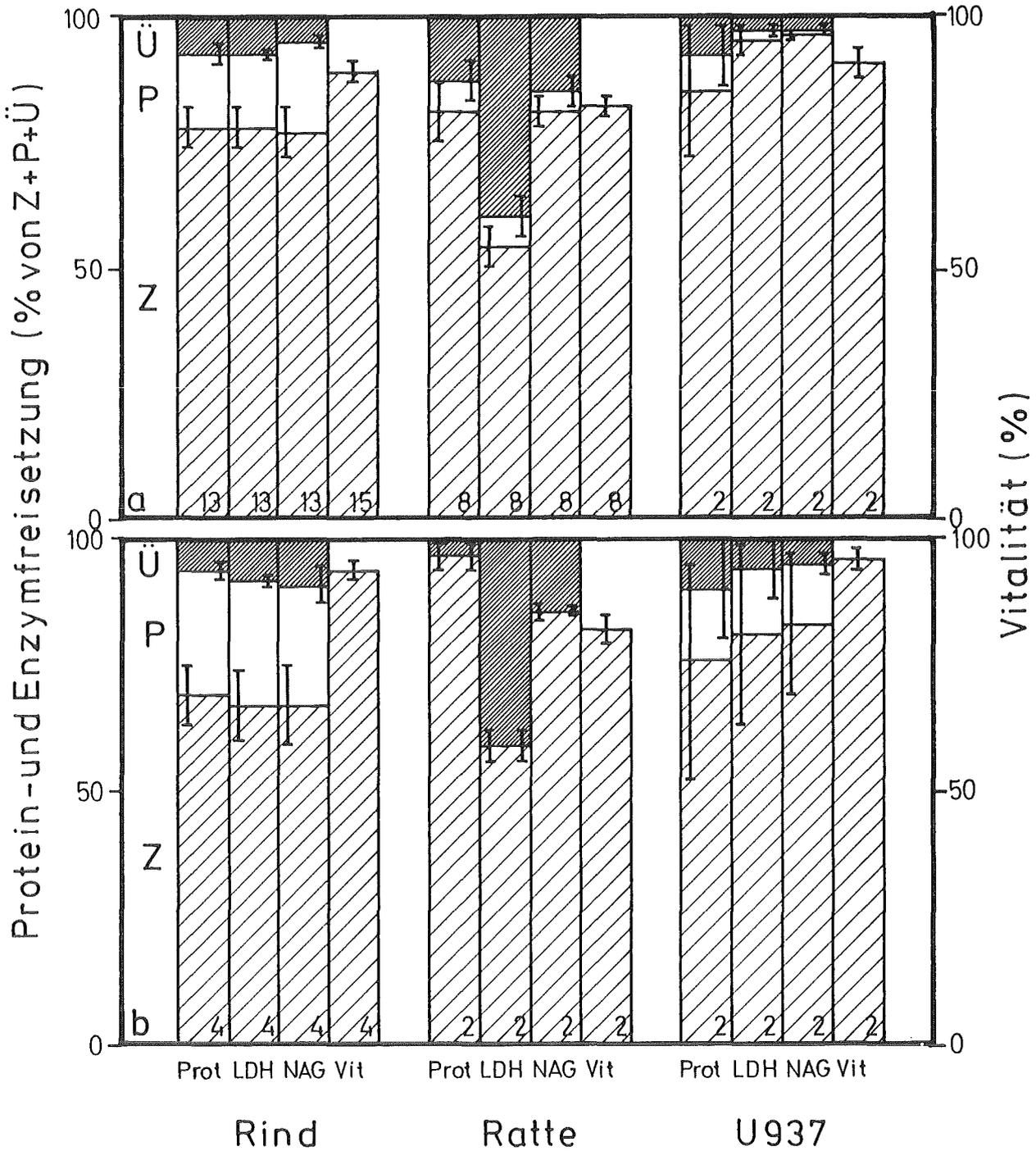
**Abb. 38:**

(A)  $\alpha$ -Naphthyl-butyrat-Esterase gefärbte Zellen. Positive Zellen sind am rotbraunen Niederschlag zu erkennen.

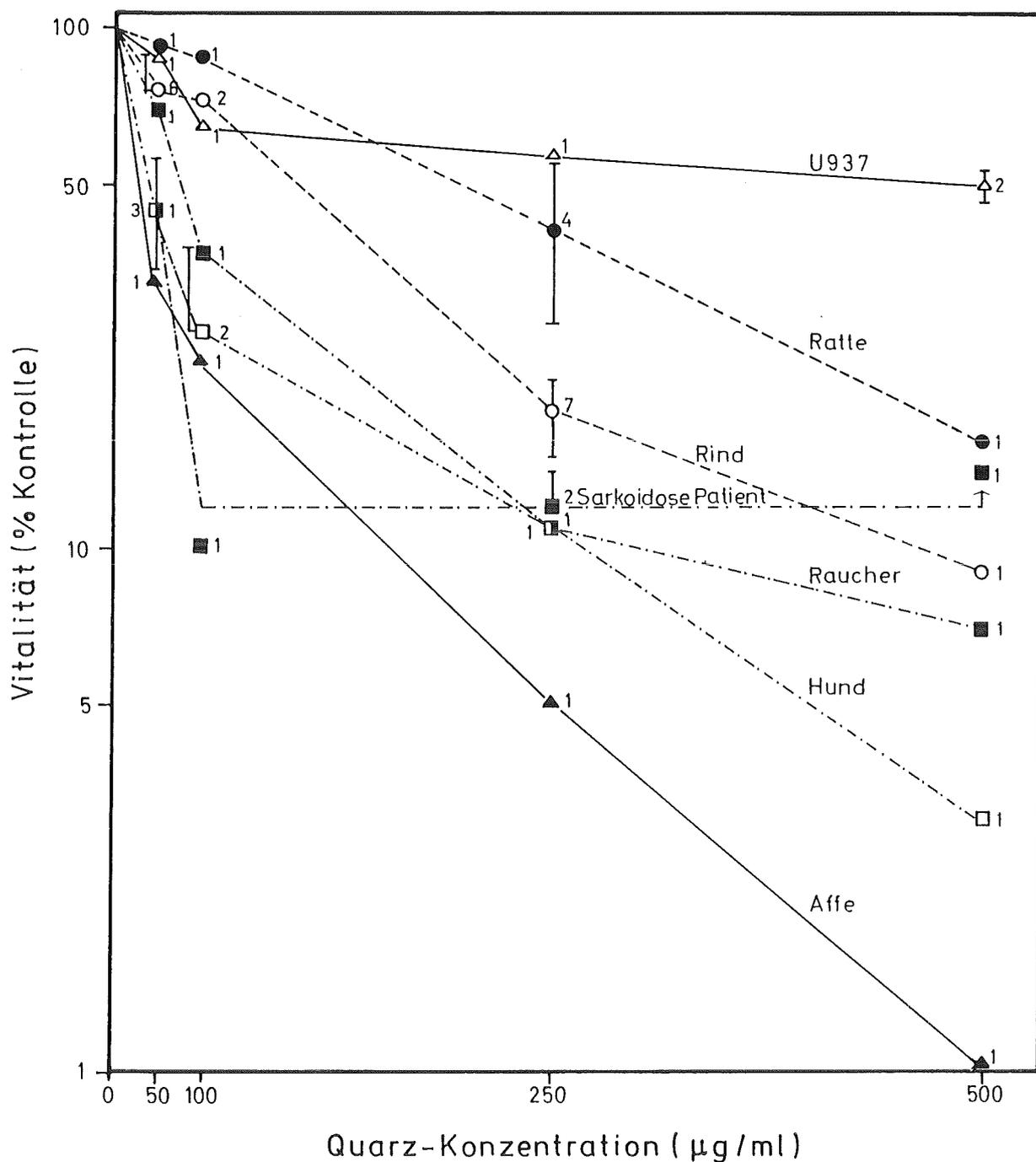
(B)  $\alpha$ -Naphthyl-acetat-Esterase gefärbte Zellen. Positive Zellen sind am schwarzbraunen Niederschlag zu erkennen.

Die Alveolarmakrophagen von Rind (a), Ratte (b), Hund (c), Affe (d) und Mensch ((e) Raucher, (f) Sarkoidose Patient und (g) Sarkoidose Patientin) und die Tübinger U937-Zellen (h) waren 20 Stunden ohne Zusätze kultiviert worden.

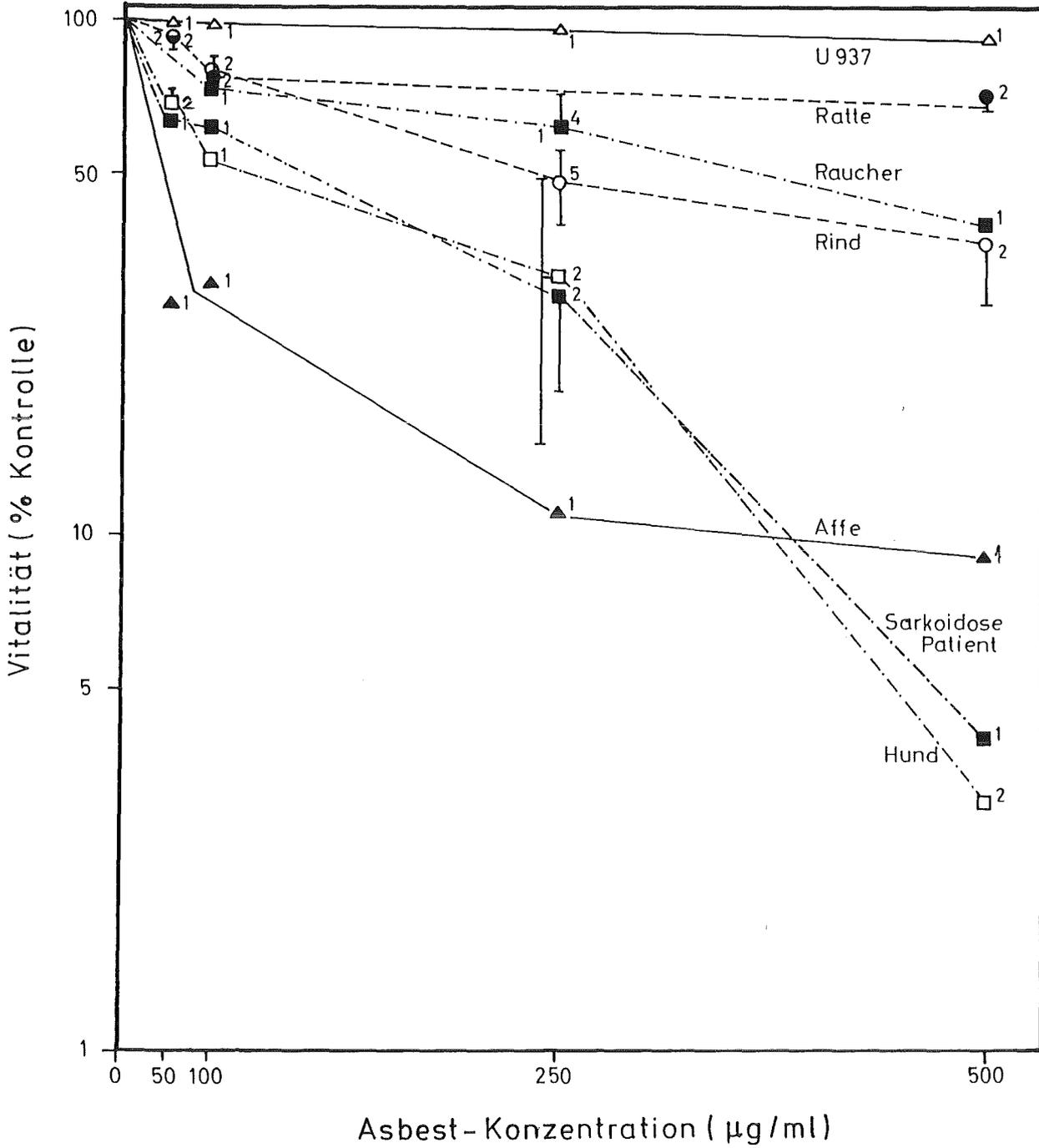




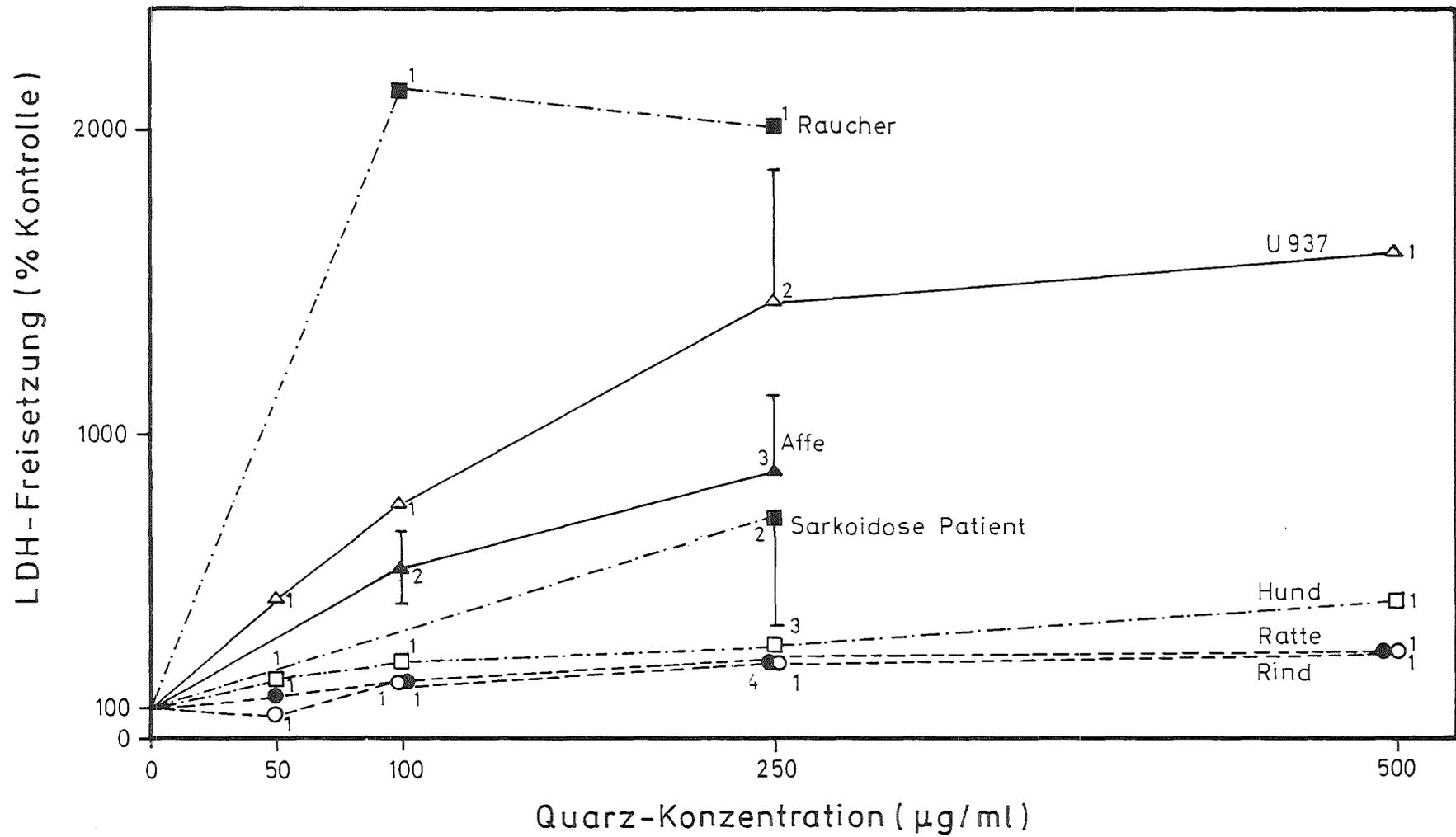
**Abb 39:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Rinder- und Ratten-Alveolarmakrophagen und Tübinger U937-Zellen mit 250 µg Titan-dioxid/ml (Anatas, Aldrich). Mittelwerte mit Standardfehlern. Anzahl der Versuchsdurchführung an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste. (a) Kontrollen, (b) Titandioxid-inkubierte Zellen



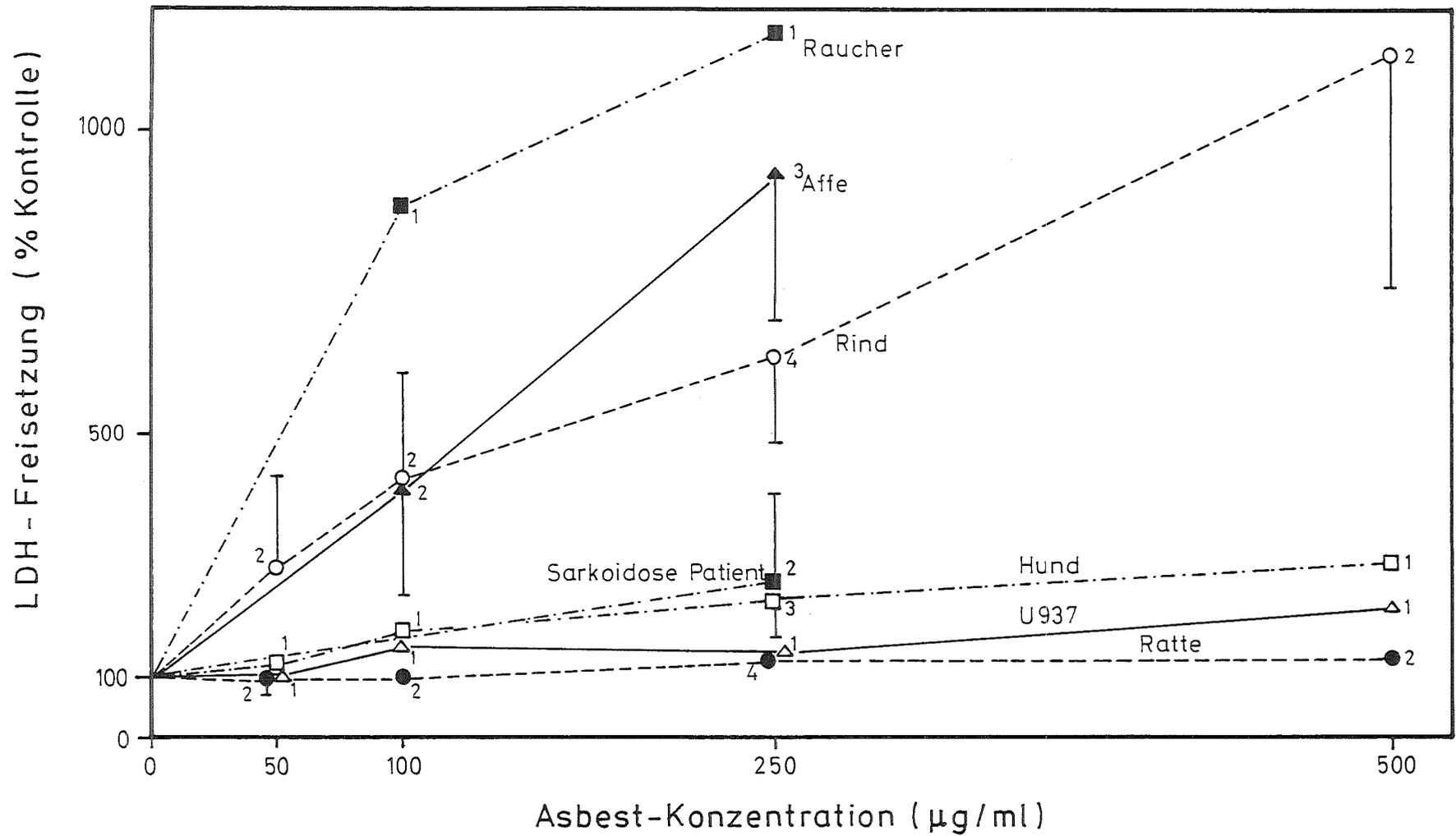
**Abb. 40:** Speziespezifische Vitalitätsabnahme von Alveolarmakrophagen und Tübinger U937-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit 0-500 µg DQ12 Quarz/ml. Die Vitalitätsachse ist logarithmisch dargestellt. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Die Anzahl der getesteten Individuen ist neben den Meßwerten angegeben.



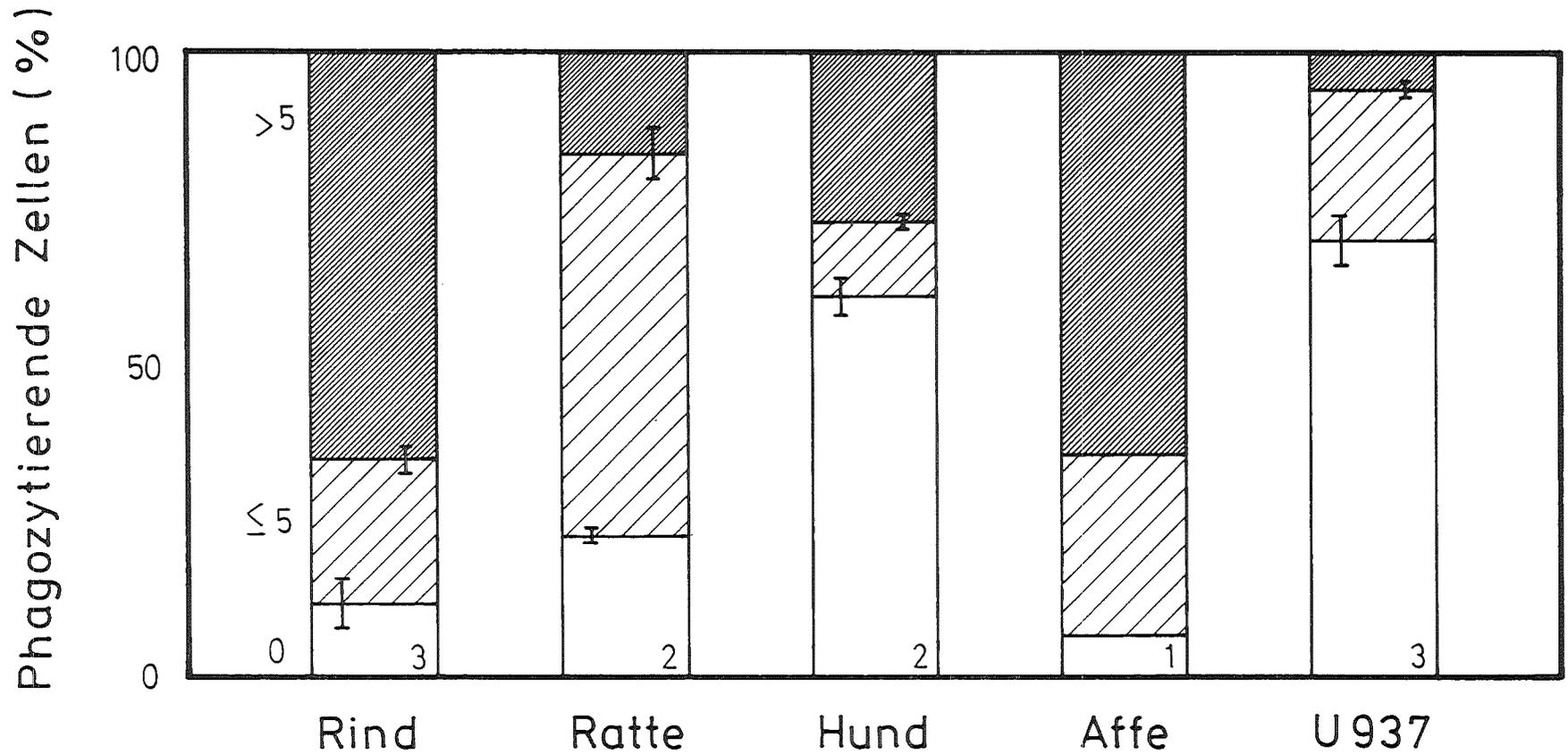
**Abb. 41:** Speziespezifische Vitalitätsabnahme von Alveolarmakrophagen und Tübinger U937-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit 0-500  $\mu\text{g}$  Chrysotil Asbest/ml. Die Vitalitätsachse ist logarithmisch dargestellt. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Die Anzahl der getesteten Individuen ist neben den Meßwerten angegeben.



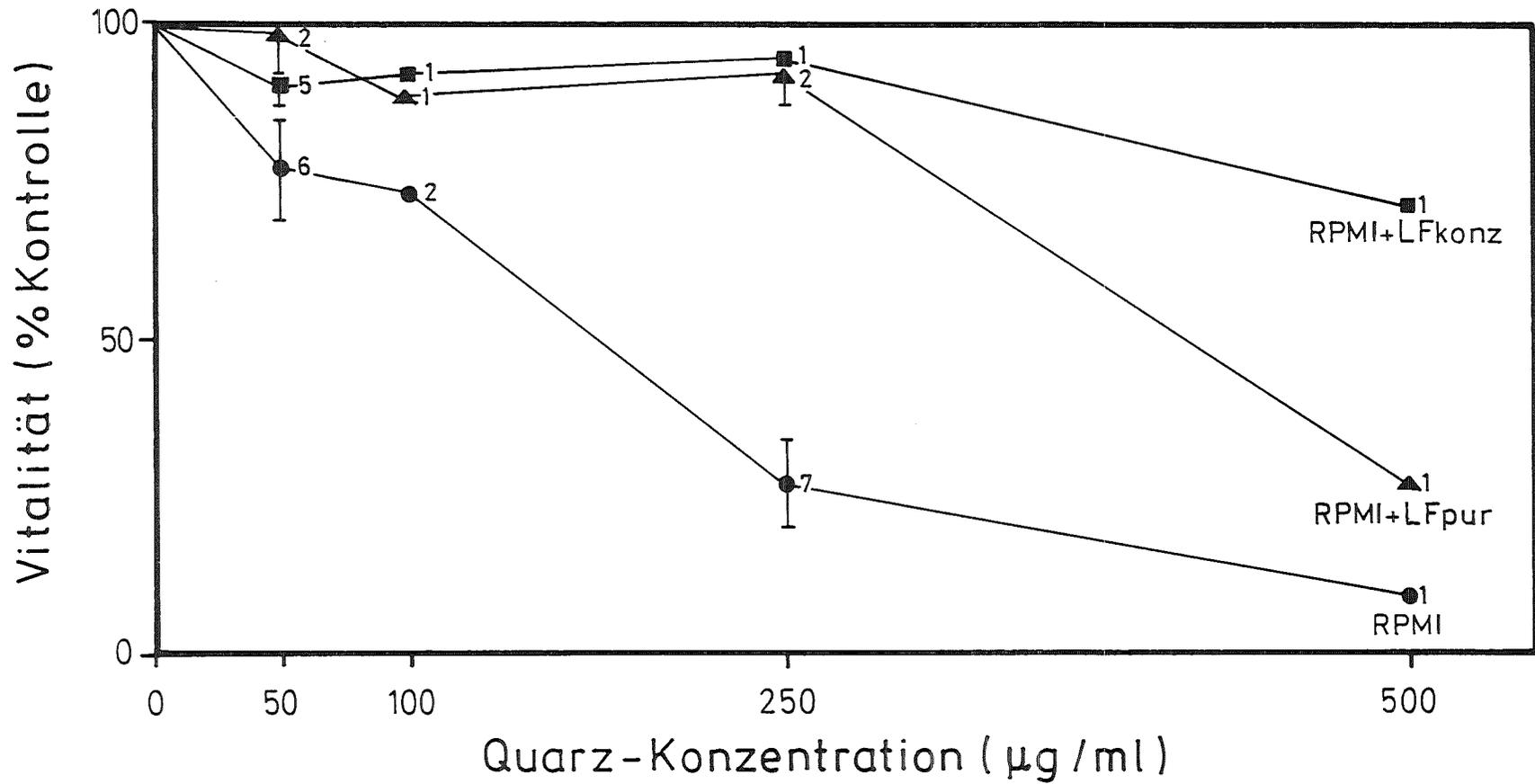
**Abb. 42:** Speziesspezifische Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) in den Überstand nach 20-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen und U937-Zellen mit 0-500 µg DQ12 Quarz/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Die Anzahl der getesteten Individuen ist neben den Meßwerten angegeben.



**Abb. 43:** Speziesspezifische Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) in den Überstand nach 20-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen und U937-Zellen mit 0-500 µg Chrysotil Asbest/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Die Anzahl der getesteten Individuen ist neben den Meßwerten angegeben.

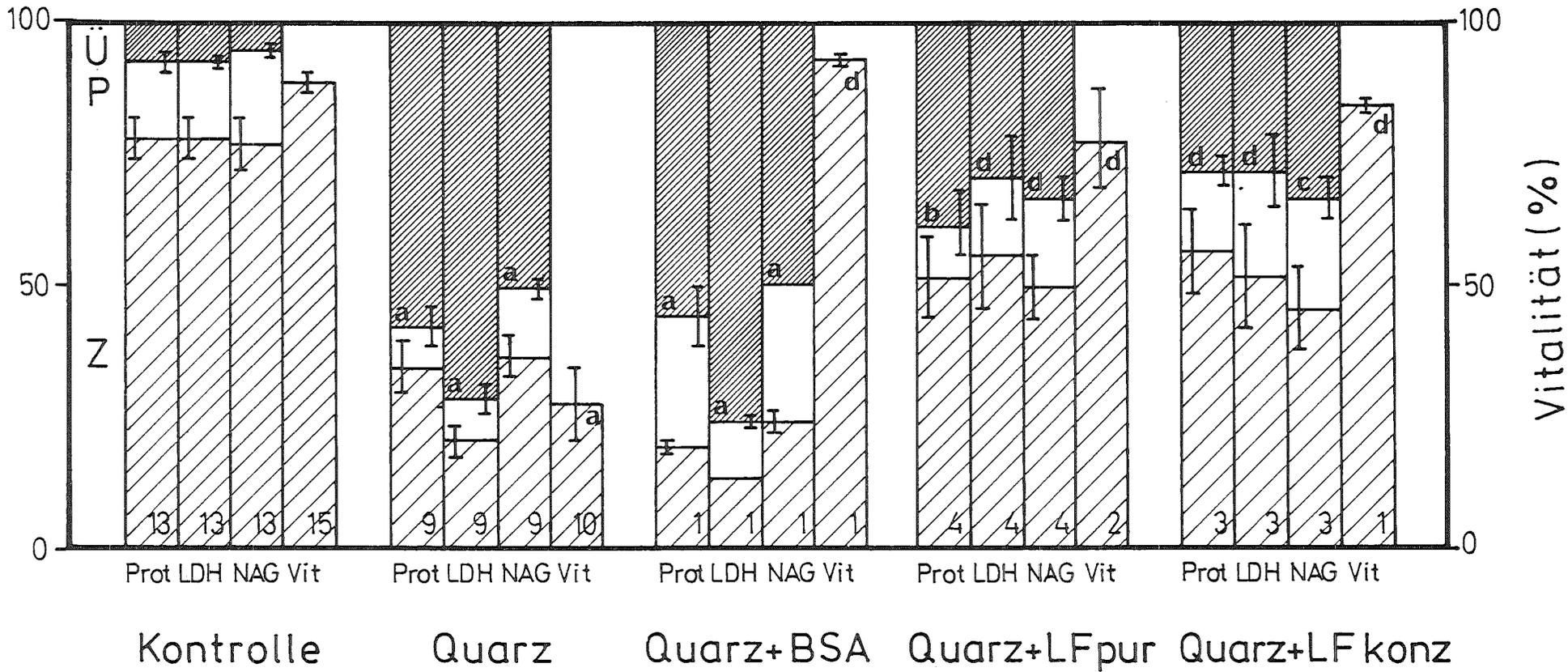


**Abb. 44:** Speziespezifische Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen und U937-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit 250  $\mu\text{g}$  Latex (2  $\mu\text{m}$ )/ml. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Die Anzahl der getesteten Individuen ist an der Basis jeder Säule angegeben. Es wurde zwischen der Aufnahme von keinem (0), 1 - 4 ( $< 5$ ) oder mehr als 5 ( $> 5$ ) Teilchen/Zelle unterschieden.

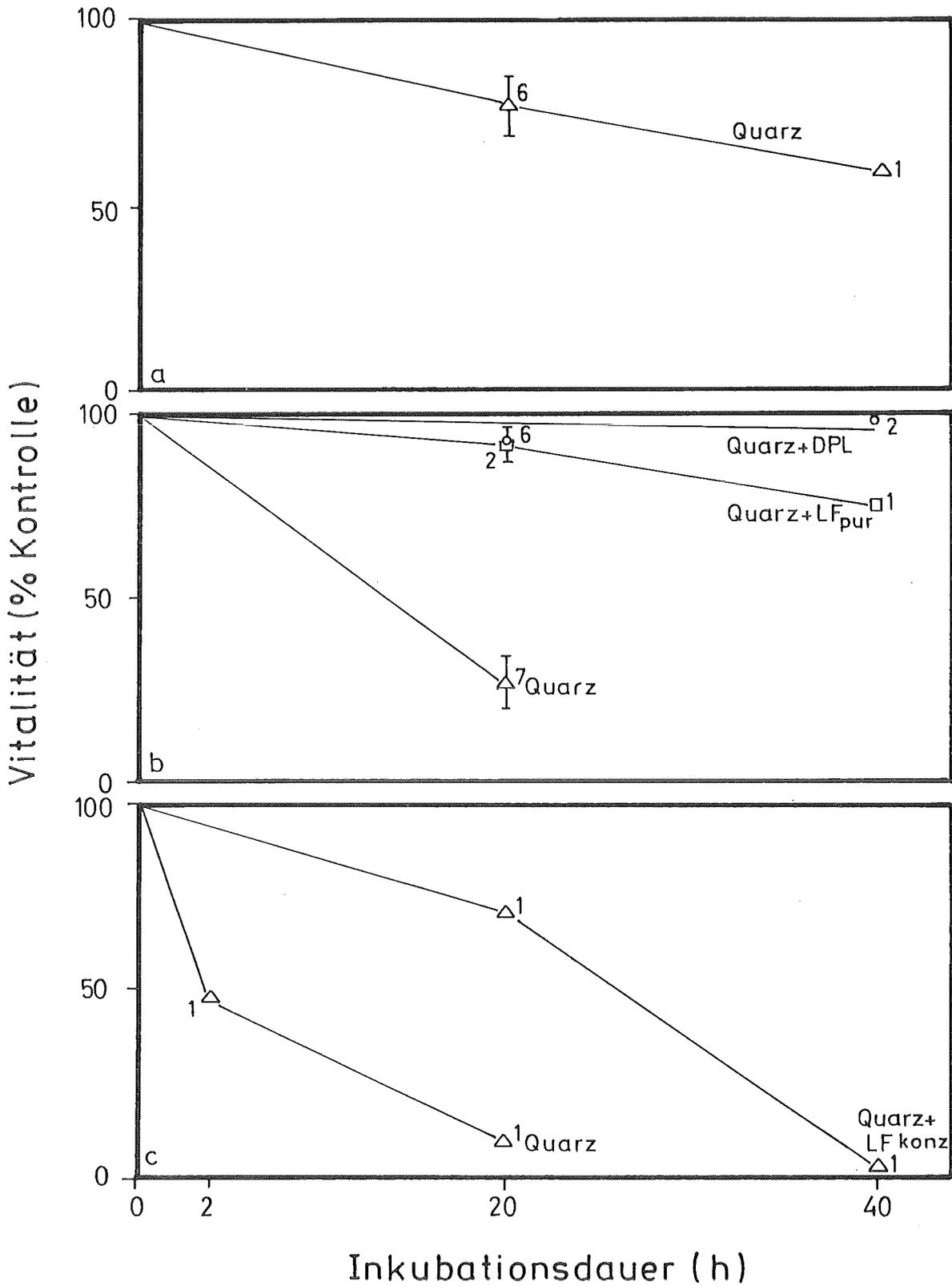


**Abb. 45:** Vitalitätsabnahme nach 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 0-500 µg DQ12 Quarz/ml im nativen Zustand und in Gegenwart von Lavageflüssigkeit (LF). Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Die Anzahl der Versuche ist neben den Meßwerten angegeben. Abkürzungen siehe Liste.

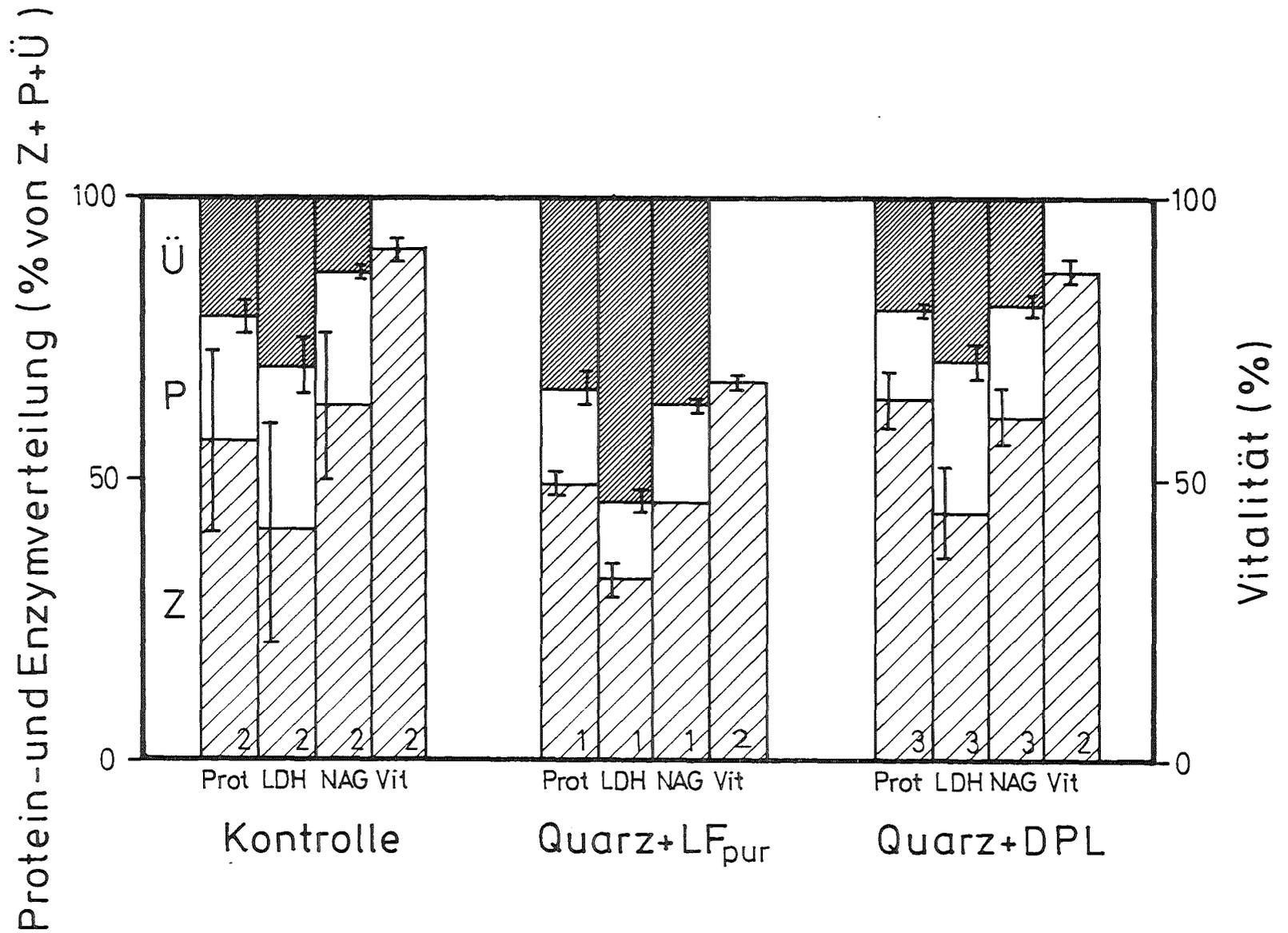
Protein- und Enzymfreisetzung (% von Z+P+Ü)



**Abb. 46:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 250 µg DQ12 Quarz/ml ohne oder mit verschiedenen Zusätzen. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Anzahl der getesteten Individuen an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste. (a) Signifikant verschieden von der Kontrolle ( $2p < 0,001$ ). (b-d) Signifikant verschieden vom nativen Quarzeffekt (b)  $2p < 0,02$ , (c)  $2p < 0,005$ , (d)  $2p < 0,001$ .

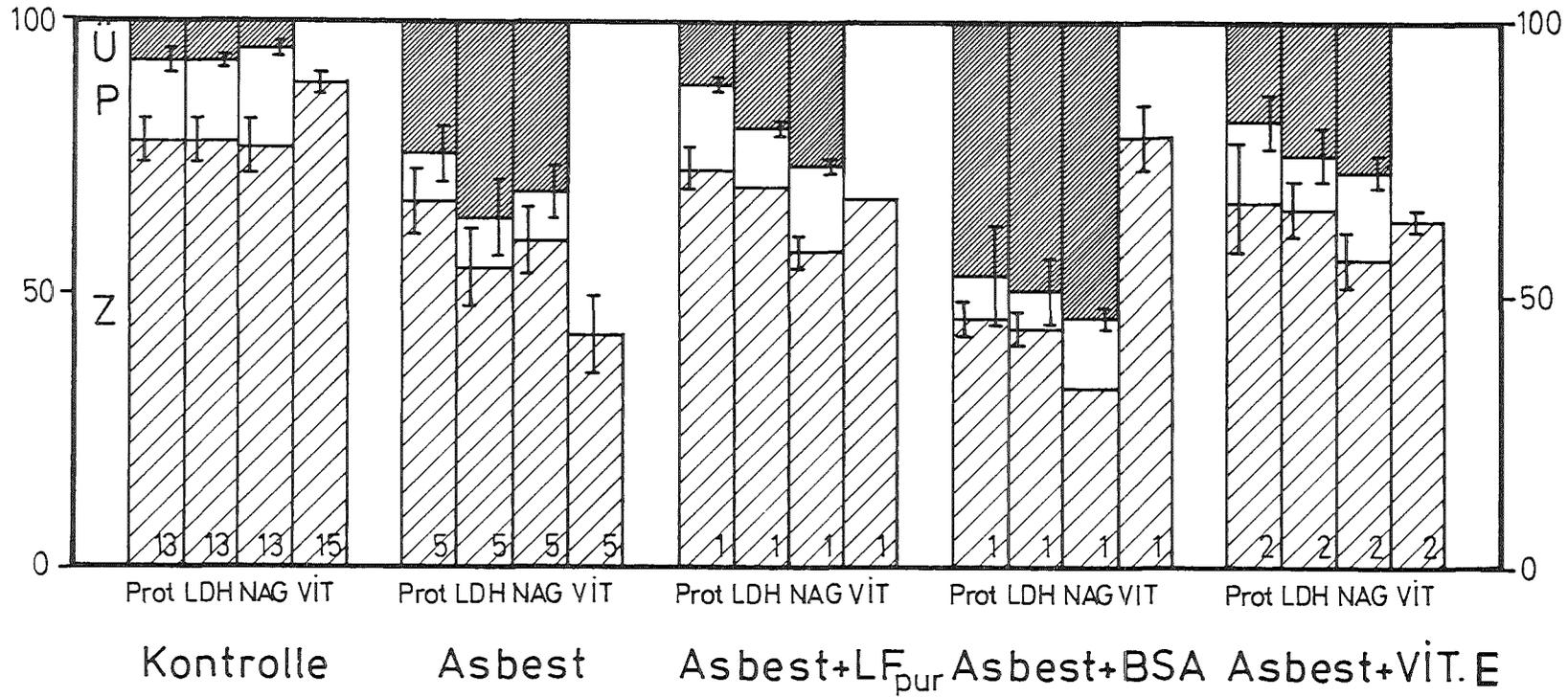


**Abb. 47:** Zeitlicher Verlauf der Vitalitätsabnahme bei Rinder-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit (a) 50 (b) 250 und (c) 500 µg DQ12 Quarz/ml und verschiedenen Zusätzen. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Anzahl der getesteten Individuen neben den Meßwerten. Abkürzungen siehe Liste.



**Abb. 48:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 40-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 250 µg DQ12 Quarz/ml ohne und mit Zusatz von Lavageflüssigkeit (LF) oder DPL. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Anzahl der getesteten Individuen an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste.

Protein- und Enzymverteilung ( % von Z+P+Ü )



Vitalität ( % )

**Abb. 49:** Vitalität, Protein- und Enzymverteilung nach 20-stündiger Inkubation von Rinder-Alveolarmakrophagen mit 250 µg Chrysotil Asbest/ml ohne und mit verschiedenen Zusätzen. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehlern. Anzahl der Versuche an der Basis jeder Säule. Abkürzungen siehe Liste.



## VII . Literatur

**Andersen, O. K.; Stenvold, S. E. and Volden, G. (1982):** Optimized assay conditions of 3T3 cell lysosomal hydrolases. *European Review for Medical & Pharmacol. Sci.* IV, 265-272

**Bansal, S. K. and Kaw, J. L. (1981):** Lactate dehydrogenase isoenzymes in macrophages and serum during the development of pulmonary silicosis in the rat. *Toxicol. Letters* 7, 279-283

**Beck, E. G.; Holusa, R.; Jirakova', D. ; Kysela', B.; Robock, K. und Skoda, V. (1973):** Über die unterschiedliche Wirkung von zwei Quarzen im Tier- und Zellversuch und ihre physikalischen Halbleitereigenschaften. *Staub-Reinhalt. Luft* 33, 3-7

**Behrendt, H.; Seemayer, N. H. and Ziesche, R. (1989):** Comparative study of quartz dust induced cytotoxicity on rodent and human macrophages. In: *Assessment of inhaled hazards: Integration and extrapolation using diverse data.* February, 19-24, 1989, ILSI, Hannover, Abstract Book, 50

**Benson, J. M.; Henderson, R. F. and Pickrell, J. A. (1988):** Comparative in vitro cytotoxicity of nickel oxides and nickel-copper oxides to rat, mouse, and dog pulmonary alveolar macrophages. *J. Toxicol. & Environ. Health* 24, 373-383

**Bhuyan, B. K.; Loughman, B. E.; Fraser, T. J. and Day, K. J. (1976):** Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp. Cell Res.* 97, 275-280

**Bielefeldt Ohmann, H. and Babiuk, L. A. (1984):** In vitro generation of hydrogen peroxide and of superoxide anion by bovine polymorphonuclear neutrophilic granulocytes, blood monocytes, and alveolar macrophages. *Inflammation* 8, 251-275

**Bielefeldt Ohmann, H. and Babiuk, L. A. (1986):** Bovine alveolar macrophages: Phenotypic and functional properties of subpopulations obtained by percoll density gradient centrifugation. *J. Leuco. Biol.* 39, 167-181

**Bignon, J. and Jaurand, M. C. (1983):** Biological in vitro and in vivo responses of chrysotile versus amphiboles. *Environ. Health Perspec.* 51, 73-80

**Van den Bosch, H. (1980):** Intracellular Phospholipases A. *Biochim. Biophys. Acta* 604, 191-246

**Bowden, D. H. (1987):** Macrophages, dust, and pulmonary diseases. *Exp. Lung Res.* 12, 89-107

**Brain, J. D. (1971):** The effects of increased particles on the number of alveolar macrophages. In: *Inhaled Particles III*, Walton, W. H. (Ed), 209-225, Unwin, London

**Coin, P. G. and Stevens, J. B. (1986):** Toxicity of cadmium chloride in vitro: indices of cytotoxicity with the pulmonary alveolar macrophage. *Toxicol. & Appl. Pharmacol.* 82, 140-150

**Costabel, U.; Bross, K. J.; Andreesen, R. and Matthys, H. (1986):** HLA-DR antigens on human macrophages from bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 41, 261-265

**Daniele, R. P. (1985):** Immune responses induced by mineral dusts. In: *In vitro effects of mineral dusts*, Beck, E. G. and Bignon, J. (Eds), 109-119, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

**Davies, P.; Allison, A. C.; Ackerman, J. Butterfield, A. and Williams, S. (1974):** Asbestos induces selective release of lysosomal enzymes from mononuclear phagocytes. *Nature* 251, 423-425

**Davis, W. B.; Pacht, E. R.; Spatafora, M. and Martin, W. J. (1988):** Enhanced cytotoxic potential of alveolar macrophages from cigarette smokers. *J. Lab. Clin. Med.* 111, 293-298

**Depasse, J. (1985):** Mechanism of the haemolysis by colloidal silica. In: *The in vitro effects of mineral dusts*, Beck, E. G. and Bignon, J. (Eds), 125-130, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

**Desai, R.; Hext, P. and Richards, R. (1975):** The prevention of asbestos-induced hemolysis. *Life Sci.* 16, 1931-1938

**Desai, R. and Richards, R. J. (1978):** The adsorption of biological macromolecules by mineral dusts. *Environ. Res.* 16, 449-464

**Dice, J. F.; Backer, J. M.; Chiang, H.-L. and Goff, S. A. (1987):** Lysosomal degradation of microinjected proteins. *Biochem. Soc. Transact.* 15, 824-826

**Donaldson, K.; Slight, J. and Bolton, R. E. (1987):** In vitro fibinolytic activity and viability of rat alveolar macrophages treated with inflammation generating mineral dusts. *Agents & Actions* 20, 87-92

**Drosselmeyer, E.; Hofheinz, V; Pätzold, S.; Polzer, G.; Schimmelpfeng, J. and Seidel, A. (1988):** Parameters influencing the effects of quartz on alveolar macrophages. *J. Aerosol Sci.* 19, 1157-1160

**Duffy, A. M.; Stevens, M. W. and Lennan, G. (1986):** The Immunogold staining technique for the measurement of lymphocyte subpopulations in broncho-alveolar lavage fluid. *Acta Cytologica* 30, 152-156

**Elo, R.; Määttä, K.; Uksila, E. and Arstila, A. U. (1972):** Pulmonary deposits of titanium dioxide in man. *Arch. Path.* 94, 417-424

**Emerson, E. and Davis, G. S. (1983):** Effect of alveolar lining material-coated silica on rat alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect.* 51, 81-84

**Finch, G. L.; McNeill, K. L.; Hayes, T. L. and Fisher, G. L. (1987):** In vitro interactions between pulmonary macrophages and respirable particles. *Environ. Res.* 44, 241-253

**Fischer, A. and Lisowska-Groszpiette, B. (1988):** Leukocyte adhesion deficiency: Molecular basis and functional consequences. *Immunodeficiency Reviews* 1, 39-54

**Fisher, G. L.; Mossman, B. T.; McFarland, A. R. and Hart, R. W. (1987):** A possible mechanism of chrysotile asbestos toxicity. *Drug & Chem. Toxicol.* 10, 109-131

**Forman, H. J.; Dorio, R. J. and Skelton, D. C. (1987):** Hydroperoxide-induced damage to alveolar macrophage function and membrane integrity: Alterations in intracellular-free  $Ca^{2+}$  and membrane potential. *Arch. Biochem. & Biophys.* 259, 457-465

**Fubini, B.; Bolis, V. and Giamello, E. (1987):** The surface chemistry of crushed quartz dust in relation to its pathogenicity. *Inorganica Chim. Acta* 138, 193-197

**Gallagher, J. E.; George, G. and Brody, A. R. (1987):** Sialic acid mediates the initial binding of positively charged inorganic particles to alveolar macrophage membranes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 1345-1352

**Hahnon, N.; Vallyathan, V.; Booth, J. A. and Sepulveda, M. J. (1986):** In vitro biologic responses to native and surface-modified asbestos. *Environ. Res.* 39, 345-355

**Harington, J. S. and Allison, A. C. (1965):** Lysosomal enzymes in relation to the toxicity of silica. *Med. Lavoro* 56, 471-484

**Harington, J. S.; Miller, K. and Macnab, G. (1971):** Hemolysis by asbestos. *Environ. Res.* 4, 95-117

**Harington, J. S. (1976):** The biological effects of mineral fibres, especially asbestos, as seen from in vitro and in vivo studies. *Annales d' Anatomie pathologique*, 21, 155-198

**Harmsen, A. G., Bice, D. E. and Muggenburg, B. A. (1985):** The effect of local antibody responses on in vivo and in vitro phagocytosis by pulmonary alveolar macrophages. *J. Leuco. Biol.* 37, 483-492

**Harris, P. and Ralph, P. (1985):** Human leukemic models of myelomonocytic development: A review of the HL-60 and U937 cell lines. *J. Leuco. Biol.* 37, 407-422

**Harwood, J. L. (1987):** Lung surfactant. *Prog. Lipid Res.* 26, 211-256

**Hass, R.; Bartels, H.; Topley, N.; Hadam, M.; Köhler, L.; Goppelt-Strübe, M. and Resch, K. (1989):** TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: Changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens. *Europ. J. Cell Biol.* 48, 282-293

**Hedenborg, M. and Klockars, M. (1987):** Production of reactive oxygen metabolites induced by asbestos fibres in human polymorphonuclear leucocytes. *J. Clin. Pathol.* 40, 1189-1193

**Henderson, R. F.; Mauderly, J. L., Pickrell, J. A. Hahn, F. F.; Muhle, H. and Rebar, A. H. (1987):** Comparative study of bronchoalveolar lavage fluid: Effect of species, age, and method of lavage. *Exp. Lung. Res.* 13, 329-342

**Heppleston, A. G. (1984):** Pulmonary toxicology of silica, coal and asbestos. *Environ. Health Perspec.* 55, 111-127

**Hill, J. O. and Hobbs, C. H. (1982):** Comparative cytotoxicity of DQ12 quartz and fly ash particles from coal combustion. *Toxicol. Letters* 10, 399-403

**Hilscher, W. (1984):** Staublungenforschung. In: Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Jahresbericht 1984: Umwelthygiene, Band 17, 8-12, Gesellschaft zur Förderung der Lufthygiene und Silikoseforschung e. V. (Hrsg.), Düsseldorf

**Hofheinz, V. (1988):** Einfluß der Konfiguration auf die Zytotoxizität von Quarz. Diplomarbeit, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften, Universität Karlsruhe

**Jaurand, M. C.; Magne, L. and Bignon, J. (1980):** The significance of lysosomal enzyme release induced by asbestos. In: The in vitro effects of mineral dusts, Brown, R. C.; Chamberlain, M.; Davies, R. and Gormley, I. P. (Eds), 83-87, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco

**Jaurand, M. C.; Gaudichet, A. Halpern, S. and Bignon, J. (1984):** In vitro biodegradation of chrysotile fibres by alveolar macrophages and mesothelial cells in culture: Comparison with a pH effect. *Brith. J. Indust. Med.* 41, 389-395

**Kampschmidt, R. F.; Wortington, M. L., III and Mesecher, M. I. (1986):** Release of Interleukin-1 (IL-1) and IL-1-like factors from rabbit macrophages with silica. *J. Leuco. Biol.* 39, 123-132

**Kane, A. B.; Stanton, R. P.; Raymond, E. G.; Dobson, M. E.; Knafelc, M. E. and Farber, J. L. (1980):** Dissociation of intracellular lysosomal rupture from the cell death caused by silica. *J. Cell Biol.* 87, 643-651

**Keane, M.; Wallace, W.; Seerha, M.; Hill, C.; Vallyathan, V.; Raghootama; P. and Mike, P. :** Respirable particulate surface interactions with lecithin component of pulmonary surfactant. In: ILO Conference Proceedings, VIIth international Pneumoconiosis Conference, August, 23-26, 1988, Pittsburg PA, in prep.)

**Kelly, C. A.; Ward, C.; Stenton, S. C.; Hendrick, D. J. and Walters, E. H. (1988):** Assessment of pulmonary macrophage and neutrophil function in sequential bronchoalveolar lavage aspirates in sarcoidosis. *Thorax* 43, 787-791

**Krombach, F.; Ronge, R.; Hildemann, S.; Fiehl, E.; Wanders, A.; Burkhardt, D.; Allmeling, A. and Hammer, C. (1987):** A model of experimental silicosis in a compressed air environmental. In: *Surgical Research: Recent Concepts and Results*, Baethmann, Messmer (Eds), 59-68, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

**Lax, E. (1964):** Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Erster Band, 538-539, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

**Leoni, P. and Dean, R. T. (1983):** Mechanisms of lysosomal enzyme secretion by human U-937 monocytes. *Expl. Cell Biol.* 51, 148-157

**Leyko, W. and Gendek, E. (1985):** A spin label study of the effects of asbestos, quartz, and titanium dioxide dusts on the bovine erythrocyte membran. *Brit. J. Indust. Med.* 42, 281-284

**Light, W. G. and Wei, E. T. (1980):** Surface charge and a molecular basis for asbestos toxicity. In: *The in vitro effects of mineral dusts*, Brown, R. C.; Chamberlain, M.; Davies, R. and Gormley, I. P. (Eds), 139-145, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco

**Lock, S. O.; Jones, P. A.; Friend, J. V. and Parish, W. E. (1986):** Extracellular release of enzymes from macrophages in vitro for measuring cellular interaction with particulate and non-particulate materials. *Toxic. in vitro* 1, 77-83

**Mackenthun, G. (1988):** Asbestfrei nur auf Helgoland. *Bild der Wissenschaft* 8, 15

**Martin, R. R.; Lawrence, E. C.; Teague, R. B.; Gottlieb, M. S. and Putman, M. (1986):** Chemiluminescence of lung macrophages and blood leucocytes in sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133, 298-301

**Martin, T. R., Ayars, G., Butler, J. and Altman, L. C. (1984):** The comparative toxicity of volcanic ash and quartz. *Am. Rev. Resp. Dis.* 130, 778-782

**Mason, R. J.; Nellenbogen, J. and Clements, J. A. (1976):** Isolation of disaturated phosphatidylcholines with osmium tetroxide. *J. Lipid Res.* 17, 181-184

**Miles, P. R.; Ma, J. Y. C. and Bowman, L. (1988):** Degradation of pulmonary surfactant disaturated phosphatidylcholines by alveolar macrophages. *J. Appl. Physiol.* 64, 2474-2481

**Miller, K. (1979):** Alterations in the surface-related phenomena of alveolar macrophages following inhalation of crocidolite asbestos and quartz dusts: An overview. *Environ. Res.* 20, 162-182

**Morgan, D. M. L. and Allison, A. C. (1980):** Effects of silica and asbestos on alveolar and peritoneal macrophages: A comparative study. In: *The in vitro effects of mineral dusts*, Brown, R. C.; Chamberlain, M.; Davies, R. and Gormley, I. P. (Eds), 75-81, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco

**Morgan, A and Holmes, A. (1986):** Solubility of asbestos and man-made mineral fibers in vitro and in vivo: Its significance in lung disease. *Environ. Res.* 39, 475-484

**Morrison, D. G.; McLemore, T. L.; Lawrence, E. C.; Feuerbacher, D. G.; Mace, M. L, Jr.; Busbee, D. L.; Giffin, A. C. and Marshall, M. V. (1986):** In vitro cytotoxicity of chrysotile asbestos to human pulmonary alveolar macrophages is decreased by organosilane coating and surfactant. *Cell Biol. & Toxicol.* 2, 293-309

**Mossman, B. T. and Marsh, J. P. (1985):** Mechanisms of toxic injury by asbestos fibers: Role of oxygen-free radicals. In: *In vitro effects of mineral dusts*, Beck, E. G. and Bignon, J. (Eds), 66-74, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

**Nadeau, D.; Fouquette-Couture, L.; Paradis, D.; Khorami, J.; Lane, D. and Dunningan, J. (1987):** Cytotoxicity of respirable dusts from industrial minerals: Comparison of two naturally occurring and two man-made silicates. *Drug & Chem. Toxicol.* 10, 49-86

**Nash, T.; Allison, A. C. and Harington, J. S. (1966):** Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. *Nature* 210, 259-261

**Netter, F. H. (1982):** *Farbatlant der Medizin, Band 4: Atmungsorgane*, 209, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

- Nieder, U. (1989):** Morphologische und biochemische Studien zur Differenzierung von HL60 Zellen und deren Reaktion auf Quarz. Diplomarbeit, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften, Universität Karlsruhe
- Nolan, R. P.; Langer, A. M.; Harington, J. S.; Oster, G. and Selikoff, I. J. (1981):** Quartz hemolysis as related to its surface functionalities. *Environ. Res.* 26, 503-520
- Nolan, R. P.; Langer, A. M.; Weisman, I. and Herson, G. B. (1987):** Surface character and membranolytic activity of rutile and anatase: two titanium dioxide polymorphs. *Brith. J. Indust. Med.* 44, 687-698
- Ono, T. and Seno, S. (1986):** Endocytosis of cationic and anionic iron colloid particles by rat macrophages. *Acta Histochem. Cytochem.* 19, 105-118
- Pacht, E. R.; Kaseki, H.; Mohammed, J. R.; Cornwell, D. G. and Davis, W. B. (1986):** Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers. Influence on alveolar cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 77, 789-796
- Pätzold, S. (1989):** Morphologische und biochemische Untersuchungen zur Wirkung von Quarz auf Rinderalveolarmakrophagen und deren Organellen. Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften, Universität Karlsruhe
- Pasanen, J. T. and Gustafsson, T. E. (1986):** Cytotoxic effects of four types of welding fumes on macrophages in vitro: A comparative study. *J. Toxicol. & Environ. Health* 18, 143-152
- Phillips, H. J. (1973):** Dye exclusion tests for cell viability. In: *Tissue Culture: Methods and Applications*, Kruse, P. F. and Patterson, M. J.; Jr., 406-408, Academic Press, New York
- Placke, M. E. and Fisher, G. L. (1987):** Asbestos in peripheral lung culture. A species comparison of pulmonary tissue response. *Drug & Chem. Toxicol.* 10, 133-156
- Rainbow, M. R.; Atherton, S. and Eberhart, R. C. (1987):** Fluorescence lifetime measurements using total reflection fluorimetry: Evidence for a conformational change in albumin adsorbed to quartz. *J. Biomed. Mat. Res.* 21, 539-555
- Rich, I. N. (1988):** The macrophage as a production site for hematopoietic regulator molecules: Sensing and responding to normal and pathophysiological signals. *Anticancer Res.* 8, 1015-1040
- Robock, K. (1973 a):** Standard quartz DQ12 < 5 µm for experimental pneumoconiosis research projects in the federal republic of germany. *Ann. Occup. Hyg.* 16, 63-66

**Robock, K.; Beck, E. G. and Manojilovic', N. (1973 b):** Die Sofortreaktion von Makrophagen auf SiO<sub>2</sub>-Stäube in vitro. In: Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbauverein. Silikosebericht Nordrhein-Westfalen, Band 9, Essen: Steinkohlenbergbauverein, 91-98

**Roitt, I. M.; Brostoff, J. und Male, D. K. (1987):** Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 179

**Roper, P. R. and Drewinko, B. (1976):** Comparison of in vitro methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res.* 36, 2182-2188

**Rozensjain, L.; Leibovich, M.; Shoham, D. and Epstein, J. (1968):** The esterase activity in megaloblasts, leucaemic and normal haemopoietic cells. *Brit. J. Haemat.* 14, 605-610

**Ruiz, J.; Goni, F. M. and Alonso, A. (1988):** Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. *Biochim. Biophys. Acta* 937, 127-134

**Sample, T. E. and Horn, J. M. (1979):** Silane coated silicate minerals and method for preparing same. US Patent 4137367, 30. Jan. 1979

**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. *J. Aeros. Med.* 2, 39-47

**Seemayer, N. H. und Braumann, A. (1985):** Untersuchungen über die zytotoxische Wirkung von Quarz- und Grubenstäuben auf menschliche Makrophagen in vitro. In: Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau. Silikosebericht Nordrhein-Westfalen, Band 15, Essen: Steinkohlenbergbauverein, 301-320

**Shindoh, Y.; Shimura, S.; Tomioka, M.; Aikawa, T.; Sasaki, H. and Takishima, T. (1986):** Cellular analysis in BAL fluids in infiltrative and fibrotic stages of idiopathic pulmonary fibrosis. *Tohoku J. exp. Med.* 146, 47-60

**Sundström, C. and Nilson, K. (1976):** Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577

**Tilkes, F. and Beck, E. G. (1983):** Macrophage functions after exposure to nonfibrous mineral dusts. *Environ. Health Perspect.* 51, 167-171

**Trosic', I.; Horvat, D. and Racic', J. (1986):** The effect of asbestos on cells in culture. *Period. Biol.* 88, 269-276

**Trosic', I. and Stilinovic', L. (1987):** Direct haemolysis of erythrocytes produced by chrysotile asbestos fibres and soluble constituents of chrysotile asbestos in vitro. *Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* 23, 189-197

**Tsukeda, H.; Mizuno, S. and Nitta, K. (1978):** Cell survival following treatment with antitumor drugs. *Cancer Res.* 39, 1428-1430

**Unanue, E. R.; Beller, D. I.; Calderon, J.; Kiely, J. M. and Stadecker, M. J. (1976):** Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. *Am. J. Pathol.* 85, 465-478

**Valerio, F.; Balducci, D. and Scarabelli, L. (1986):** Selective Adsorption of serum proteins by chrysotile and crocidolite. *Environ. Res.* 41, 432-439

**Valerio, F.; Balducci, D. and Lazzarotto, A. (1987):** Adsorption of proteins by chrysotile and crocidolite: Role of molecular weight and charge density. *Environ. Res.* 44, 312-320

**Wallace, W. E. Jr.; Vallyathan, V.; Keane, M. J. and Robinson, V. (1985):** In vitro biologic toxicity of native and surface-modified silica and kaolin. *J. Toxicol. & Environ. Health* 16, 415-424

**Warheit, D. B.; Stefaniak, M. S. and Hartsky, M. A. (1987):** Interspecies comparisons of pulmonary responses to inhaled particles and fibers: Implications for toxicologic evaluations. In: *The design and interpretation of inhalation studies and their use in risk assessment*, March, 23-27, 1987, ILSI, Hannover, Abstract Book, 63

**Weissmann, G. and Rita, G. A. (1972):** Molecular basis of gouty inflammation: Interaction of monosodium urate crystals with lysosomes and liposomes. *Nature New Biol.* 240, 167-172

**White, L. R.; Marthinsen, A. B. L.; Jakobsen, K. and Eik-Nes, B. (1983):** Response of bovine alveolar macrophages in vitro to welding fume particles. *Environ. Health Perspect.* 51, 211-215

**Whydler, M.; Maier, P. and Zbinden, G. (1988):** Differential cytotoxic, growth-inhibiting and lipid-peroxidative activities of four different asbestos fibres in vitro. *Toxic. In Vitro* 2, 297-302

**Wiener-Schmuck, M. (1989):** Kernforschungszentrum Karlsruhe, Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen, persönliche Mitteilung

**Woltowitz, H.-J.; Manke, J. Breit, S. Brückel und Rödelsperger, K. (1986):** Asbest- und sonstige Mineralfasern in der menschlichen Lunge. *Pathologe* 7, 248-257

**Wolkenstein, T. (1964):** Elektronentheorie der Katalyse an Halbleitern, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin

**Yamadori, I.; Ohsumi, S. and Taguchi, K. (1986):** Titanium dioxide deposition and adenocarcinoma of the lung. *Acta Pathol. Jpn.* 36, 783-790

**Yui, S. and Yamazaki, M. (1987):** Relationship of ability of phospholipids to stimulate growth and bind to macrophages. *J. Leuco. Biol.* 41, 392-399

**Zimmerman, B. T.; Canono, B. P. and Campbell, P. A. (1985):** Silica decreases phagocytosis and bacterial activity of both macrophages and neutrophils in vitro. *Immunol.* 59, 521-525

**Zitting, A. and Skyttä, E. (1979):** Biological activity of titanium dioxides. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 43, 93-97