

Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS)

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

Aufklärung von Toxizitätsmechanismen partikulärer Emissionen  
mit Hilfe biochemischer Modellreaktionen

von

S. Hippeli, S. Schneider, K. Dornisch, E.F. Elstner

Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München  
Freising-Weihenstephan

Die Arbeiten des Projekts Umwelt und Gesundheit  
wurden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Förderzeichen: PUG L 94 006

97 Seiten  
12 Abbildungen  
124 Literaturstellen

August 1999



<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einführung</b> .....	<b>01</b>
<b>2. Aufgabenstellung und Ziele des Forschungsvorhabens</b> .....	<b>07</b>
<b>3. Herkunft und Charakterisierung der Ruß- und Mineralfaserproben</b> .....	<b>08</b>
<b>3.1 Rußproben</b> .....	<b>08</b>
3.1.1 Rußproben aus Verbrennungskraftmaschinen.....	08
3.1.2 Rußproben aus dem Hausbrand.....	09
3.1.3 Hochreine Kohlenstoffstäube.....	10
<b>3.2 Mineralfasern</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3 Fraktionierung der Ruß- und Mineralfaserproben</b> .....	<b>12</b>
<b>4. Methoden</b> .....	<b>13</b>
<b>4.1 Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten</b> .....	<b>13</b>
4.1.1 Isolierung der neutrophilen Granulozyten.....	13
4.1.2 Gewinnung autologen Serums und Opsonierung von Zymosan bzw. Latexbeads.....	13
4.1.3 Methoden zur Erfassung des respiratory bursts.....	14
4.1.3.1 Nachweis der phagosomalen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion.....	14
4.1.3.2 Nachweis der O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> -Bildung mit Hilfe der Hydroxylaminoxidation.....	14
4.1.3.3 Nachweis der Produkte des respiratory bursts mit Hilfe der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz.....	15
4.1.4 Methoden zur Erfassung der Degranulation.....	15
4.1.4.1 Nachweis der intrazellulären Elastaseaktivität.....	15
4.1.4.2 Nachweis der Myeloperoxidase (MPO)-Freisetzung.....	16
4.1.5 Methoden zur Erfassung der Phagozytose.....	16

<b>4.2</b>	<b>Zellfreie Untersuchungen.....</b>	<b>17</b>
4.2.1	Nachweis einer Interaktion mit Superoxid.....	17
4.2.2	Nachweis einer Interaktion mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	17
4.2.3	Nachweis einer Interaktion mit HOCl.....	18
4.2.4	Nachweis einer Beeinflussung der Myeloperoxidase (MPO).....	18
4.2.5	Nachweis einer Beeinflussung der Elastase.....	18
4.2.6	Nachweis einer Inaktivierung des $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitors ( $\alpha_1$ -PI).....	19
4.2.7	Nachweis einer Initiierung bzw. Propagation der Lipidperoxidation (LPO).....	19
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>20</b>
<b>5.1.</b>	<b>Rußproben.....</b>	<b>20</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Die Modellpartikel „Graphitstaub“ und „Rohruß“.....</b>	<b>20</b>
5.1.1.1	Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten.....	21
5.1.1.1.1	Beeinflussung des Respiratory burst.....	21
5.1.1.1.2	Beeinflussung der Degranulation.....	22
5.1.1.1.3	Beeinflussung der Phagozytose.....	22
5.1.1.2	Zellfreie Untersuchungen.....	22
5.1.1.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	23
<b>5.1.2</b>	<b>LKW-Dieseluß.....</b>	<b>24</b>
5.1.2.1	Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten.....	24
5.1.2.2	Zellfreie Untersuchungen.....	24
5.1.2.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	25
<b>5.1.3</b>	<b>Ölheizungsruß.....</b>	<b>26</b>
5.1.3.1	Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten.....	26
5.1.3.1.1	Beeinflussung des Respiratory burst.....	27
5.1.3.1.2	Beeinflussung der Degranulation.....	27
5.1.3.1.3	Beeinflussung der Phagozytose.....	28
5.1.3.2	Zellfreie Untersuchungen.....	28
5.1.3.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	28
<b>5.1.4</b>	<b>Holzheizungsruß.....</b>	<b>31</b>
5.1.4.1	Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten.....	31
5.1.4.1.1	Beeinflussung des Respiratory burst.....	31
5.1.4.1.2	Beeinflussung der Degranulation.....	32
5.1.4.1.3	Beeinflussung der Phagozytose.....	32
5.1.4.2	Zellfreie Untersuchungen.....	32
5.1.4.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	32

<b>5.2</b>	<b>Mineralfasern.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Blauasbest oder Krokydolith.....</b>	<b>33</b>
5.2.1.1	Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten.....	33
5.2.1.1.1	Beeinflussung des Respiratory burst.....	33
5.2.1.1.2	Beeinflussung der Degranulation.....	34
5.2.1.1.3	Beeinflussung der Phagozytose.....	34
5.2.1.2	Zellfreie Untersuchungen.....	34
5.2.1.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	34
<b>5.2.2</b>	<b>Künstliche Mineralfasern (Steinwollfaser 8 und 13).....</b>	<b>35</b>
5.2.2.1	Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten.....	35
5.2.2.2	Zellfreie Untersuchungen.....	35
5.2.2.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	36
<b>6.</b>	<b>Vergleichende Diskussion.....</b>	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>43</b>

## Anhang 1

## Anhang 2

## Anhang 3

## Abkürzungen

Abb	Abbildung
ACC	1-Amino-1-Carboxyl-Cyclopropan
$\alpha_1$ -PI	$\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor
Ca	Calcium
Co	Kobalt
COL	Chronisch Obstruktive Lungenkrankheit
Desf	Desferrioxamin
DHR	Dihydrorhodamin 123
DR	Dieselruß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	U.S. Environmental protection agency
FS	Fettsäure
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
HBSS	Hanks´ Balanced Salts
IgG	Immunglobulin G
KMB	$\alpha$ -Keto-S-Methylbuttersäure
LAI	Länderausschuß für Immissionsschutz
LPO	Lipidperoxidation
MPO	Myeloperoxidase
n.b.	nicht bestimmbar
Ni	Nickel
PAH	Polycyclic aromatic Hydrocarbons
PBS	Phosphate buffered solution
PI	Phagozytoseindex
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PM10	Particulate matter (lungengängige Partikel <10 $\mu$ m)
REM	Rasterelektronen-Mikroskopie
ROS	Reactive oxygen species
SANA	N-Succinyl-ala-ala-ala-p-Nitroanilid
SOD	Superoxiddismutase
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose Faktor $\alpha$
UFP	Ultrafeine Partikel
WEP	wäßrig extrahierte Partikel
WF	wäßriges Filtrat
WS	wäßrige Suspension
XOD	Xanthinoxidase

## **Aufklärung von Toxizitätsmechanismen partikulärer Emissionen mit Hilfe biochemischer Modellreaktionen**

S. Hippeli, S. Schneider, K. Dornisch, E.F. Elstner  
Lehrstuhl für Phytopathologie (Arbeitsbereich biochemische Toxikologie)  
Technische Universität München-Weihenstephan

### **Zusammenfassung**

Zur Aufklärung von Toxizitätsmechanismen sphärischer und faserförmiger Feinstäube wurden Interaktionen mit neutrophilen Granulozyten sowie Interaktionen mit wichtigen Metaboliten dieser Zellen (reaktive Sauerstoffspezies, Elastase, Myeloperoxidase und  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor) in in vitro Modellen untersucht.

Als partikuläres Untersuchungsmaterial dienten hochreine Kohlenstoffstäube mit unterschiedlich großen spezifischen Oberflächen, LKW-Dieselmotorenruß, Öl- und Holzheizungsruß sowie natürliche und künstliche Mineralfasern.

Für Rußpartikel mit einer spezifischen Oberfläche  $>15\text{m}^2/\text{g}$  ergab sich, daß diese wahrscheinlich über Bindung und Aufnahme durch Komplementrezeptoren eine selektive Downregulation des Respiratory burst neutrophiler Granulozyten bewirken. Zumindest für den Ölheizungsruß konnte gezeigt werden, daß er den fMLP-Rezeptor der Phagozyten blockiert.

Mineralfasern scheinen dagegen nicht mit Oberflächenrezeptoren neutrophiler Granulozyten zu reagieren, sondern lösen vielmehr durch mechanische Reizung eine Veränderung von Membranpotentialen aus, die zur Öffnung von Ca-Kanälen und zur Stimulation Ca-abhängiger Prozesse wie Respiratory burst und Degranulation führen. Außerdem können Mineralfasern neutrophile Granulozyten "primen", denn in Anwesenheit löslicher Aktivatoren (PMA,  $\text{TNF}\alpha/\text{fMLP}$ ) werden überadditive Effekte beobachtet.

Rußpartikel mit einer spezifischen Oberfläche von  $\geq 50\text{m}^2/\text{g}$  können wichtige Enzyme (Elastase, Myeloperoxidase,  $\alpha_1$ -PI) adsorptiv inaktivieren. Rußpartikeln mit kleineren spezifischen Oberflächen bzw. Mineralfasern, die ebenfalls über geringe spezifische Oberflächen verfügen, fehlt diese Eigenschaft, unabhängig von der chemischen Zusammensetzung.

Eisen als Bestandteil von Rußpartikeln läßt sich wässrig mobilisieren und sowohl in gelöster als auch gebundener Form biologisch aktivieren. Fasergebundenes Eisen konnte nicht wässrig mobilisiert werden, zeigte aber in gebundenen Zustand Aktivität.

Rußpartikel und Fasern unterscheiden sich grundsätzlich in der Art, wie sie mit neutrophilen Granulozyten interagieren. Das Ausmaß der spezifischen Oberfläche spielt eine bisher weit unterschätzte Rolle bei der Wirksamkeit von Feinstäuben.

## **Investigations into toxic mechanisms of particulate emissions using biochemical model reactions**

S. Hippeli, S. Schneider, K. Dornisch, E.F. Elstner

### **Summary**

In order to elucidate mechanisms of toxicity of different dust particles (soot and fibers) interactions with neutrophil granulocytes as well as interactions with important metabolites of these cells (reactive oxygen species, elastase, myeloperoxidase and  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor) have been investigated in biochemical model reactions in vitro.

In the case of particulate matter ultra pure carbon particles with different specific surfaces, truck diesel soot, oil- and woodstove soot as well as natural and man made mineral fibers have been studied.

As to soot particles with a specific surface  $> 15 \text{ m}^2/\text{g}$  we found that these particles achieve a selective down regulation of the respiratory burst of neutrophil granulocytes probably via binding and uptake by complement receptors. Soot from oilstove seems to block the fMLP-receptor of phagocytes. In contrast mineral fibers apparently show no reaction with surface receptors of neutrophil granulocytes. Mainly via mechanical interactions fibers seem to induce changes of membrane potentials which in turn achieve the opening of calcium channels which in turn are responsible for calcium dependent processes such as respiratory burst and degranulation. Furthermore mineral fibers seem to prime neutrophil granulocytes since in the presence of soluble activators such as PMA or TNF $\alpha$ /fMLP overadditive effects can be observed.

Soot particles with a specific surface  $> 50 \text{ m}^2/\text{g}$  adsorptively inactivate important extracellular enzymes such as elastase, myeloperoxidase and  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor. Soot particles with smaller specific surfaces or mineral fibers which also expose a relatively small surface, independent of their chemical composition, miss these adsorptive properties.

Iron as one component of soot particles can be partially extracted into aqueous solutions and can be biologically activated both in solubilized and bound form. Fiber bound iron can not be solubilized into aqueous solution, but shows redox properties in its bound state.

All together soot particles and mineral fibers can be differentiated by their interactions with neutrophil granulocytes. The size of the specific surface seems to play a by far underestimated role as to potential toxicity of airborne particles.

# 1. Einführung

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen, daß vor allem partikuläre Luftschadstoffe negative Auswirkungen auf die Gesundheit haben (EPA, 1996; BASCOM et al., 1996; BRUNEKREEF et al., 1995). Von besonderem Interesse sind inhalierbare lungengängige Feinstäube. Feinstäube mit einer Größe  $<5\mu\text{m}$  setzen sich zu zwei Dritteln aus anorganischen und zu einem Drittel aus organischen Aerosolbestandteilen zusammen (NIEßNER, 1995). Zu ihnen gehören faserförmige Stäube wie Asbest oder künstliche Mineralfasern und partikuläre Feinstäube wie Dieselruß oder Rußpartikel aus stationären Verbrennungsanlagen. Der Länderausschuß für Immissionsschutz gibt in seinem Bericht 1991 die Emission von DR-Partikeln mit 70,000t/a an. Mit 60% tragen die Diesel-Nutzfahrzeuge den größten Teil des DR-Partikelausstoßes bei. Diesel-PKW sind mit 18% und stationäre Dieselmotoren mit 0.7-1.4% beteiligt (LAI, 1991). Diese ungleiche Verteilung beruht auf dem hohen Partikelaustoß bei Nutzfahrzeugen. WESTERHOLM & EGEBÄCK (1994) geben einen Wert von 500-700mg Partikel/km an, TÖRNQVIST & EHRENBURG (1994) bestimmten sogar Werte von 1,030mg Partikel/km.

Die Immissionsbelastung der Bevölkerung durch DR ist sehr stark abhängig vom Expositionsort. So beträgt die Immission von DR in ländlichen Gebieten  $0.5-1.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ , in Ballungsgebieten  $5-10\mu\text{g}/\text{m}^3$  und im Emittentennahbereich  $15-25\mu\text{g}/\text{m}^3$  (LAI, 1991; KLINGENBERG & WINNEKE, 1990). ABEN et al. (1991) geben für Holland eine durchschnittliche Immissionsbelastung von  $3-6\mu\text{g}/\text{m}^3$  an, MAUDERLY (1992) für die USA von  $2.4-2.6\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Diese Angaben beruhen allerdings auf Rechenmodellen, da eine spezifische Erfassung von DR-Partikeln, wie PETZOLD & NIEßNER (1994 a und b) gezeigt haben, aufgrund der Partikelalterung und der damit verbundenen Veränderung der Partikelgrößenverteilung und des PAH-Profiles nicht möglich ist. FRUHSTORFER & NIEßNER (1994) konnten aber den Anteil an Rußteilchen im Münchner Stadtaerosol mit 63.6% bestimmen. Zu diesen Rußteilchen gehören neben DR auch Partikel aus dem Reifenabrieb und Staubemissionen aus stationären Feuerungsanlagen, die in der BRD in einer Größenordnung von 1275t/a freigesetzt werden (SCHMIDT & WICHMANN, 1995).

Rußpartikel besitzen einen charakteristischen Aufbau. Sie sind definiert als Kettenaggregate aus schmalen sphärischen Primärpartikeln (10-80nm im Durchmesser) (CHENG et al., 1984) und besitzen je nach Entstehungstemperatur eine spezifische Oberfläche von  $10\text{m}^2/\text{g}$  Partikel bei  $25^\circ\text{C}$  bis  $400\text{m}^2/\text{g}$  Partikel bei  $450^\circ\text{C}$  (ROTHENBERG et al., 1985). Da der Kohlenstoff ein hohes Adsorptionsvermögen besitzt, lagern sich z.B. bei der Verbrennung von Dieseldieselkraftstoff eine Vielzahl von organischen, aber auch anorganischen Verbindungen an. Zu diesen gehören Sulfide, Sulfate und in Spuren Schwer- und Alkalimetallverbindungen

(FRÄNKLE & STEIN, 1988). Insgesamt bestehen jedoch 15-65% der DR-Partikelmasse aus extrahierbaren organischen Verbindungen wie PAHs, Chinonen und Nitroaromaten (HIPPELI & ELSTNER, 1989).

Über die chemische Zusammensetzung von Rußpartikeln aus Heizungsanlagen (Öl- oder Holzheizung) gibt es weniger Informationen. Prinzipiell dürften sich die Partikel aus einer Ölheizungsanlage und die Dieselrußpartikel in ihrer Struktur ähnlicher sein, da beiden die gleiche Grundsubstanz als Brennstoff dient. Allerdings wird Heizöl bei einer anderen Temperatur verbrannt als Dieselkraftstoff, wodurch sich die spezifische Oberfläche des Partikels verändert. Da zudem die DIN-Vorschriften für Heizöl weniger restriktiv sind, enthält Heizöl Verunreinigungen in größeren Konzentrationen (z.B. Schwefel), die sich auf die chemische Zusammensetzung des Partikels auswirken. Für Rußpartikel aus der Holzfeuerung ist bekannt, daß sie einen viel höheren Anteil an organischen Verbindungen besitzen (CUPITT et al., 1994). TAN & QUANCI (1992) konnten nachweisen, daß bei der Verbrennung (Schwelbrand) von Tannenholz und Torf die Konzentration von PAHs auf 20mg/g Partikelmasse ansteigen kann.

Aufgrund des Aufbaus und der chemischen Zusammensetzung der Partikel werden heute drei verschiedene Theorien zur toxischen Wirkung von Rußpartikeln, insbesondere Dieselruß, diskutiert:

- Theorie des PAH-Depoteffekts
- Theorie des unspezifischen Partikelmasse-Effekts
- Theorie der Teilchenanzahl

Grundgedanke der ersten Theorie ist, daß der Partikel als Vehikel und in der Lunge angekommen als Depot gefährlicher PAHs dient. In der Lunge erfolgt dann eine stetige Abgabe der organischen Verbindungen an das umliegende Lungengewebe. Bei chronischer Exposition kann es aufgrund der mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften dieser Substanzen zur Tumorbildung kommen.

Die zweite Theorie beruht auf Erkenntnissen aus einer Reihe von Inhalationsversuchen, bei denen Tiere gegenüber hohen (bis zu  $7\text{mg/m}^3$ ) Konzentrationen an Dieselruß, reinem Kohlenstaub oder Titandioxid exponiert wurden (MAUDERLY, 1992 und 1994; HENDERSON et al., 1988; ISHINISHI et al., 1986; IWAI et al., 1986; NIKULA et al., 1995; MUHLE et al., 1989; NTP; 1993). Mit allen Stäuben wurden Lungentumore, aber auch pulmonale Entzündungen und fibrotische Veränderungen erzeugt. Diese Ergebnisse legten den Schluß nahe, daß für die toxische Wirkung von Partikeln ihr partikulärer Charakter und nicht ihre chemische Zusammensetzung ausschlaggebend sei. In niedrigeren Konzentrationen (unter

2mg/m<sup>3</sup>) konnten allerdings keine Veränderungen im Atemtrakt von Ratten nachgewiesen werden (HENDERSON et al., 1988; KAPLAN et al., 1986; LEWIS et al., 1986). Durch die in den oben genannten Tierversuchen verwendeten hohen Konzentrationen kam es zum "Overload", der zytotoxische Effekte auslöst, physiologische Reinigungsmechanismen (Clearance) ausschaltet und einen möglichen PAH-Depoteffekt überlagern könnte. Tierversuche unter Overloadbedingungen lassen sich nur schwierig interpretieren.

Die dritte Theorie entsprang der Tatsache, daß trotz einer deutlichen Senkung der mittleren Massenkonzentration von Partikeln in der Atmosphäre durch gesetzliche und bautechnische Maßnahmen ein Anstieg der Inzidenz und Prävalenz von Lungenerkrankungen zu beobachten ist. Die Deutsche Gesellschaft für Pneumologie prognostiziert eine 25%ige Zunahme der Erkrankungen bis zum Jahr 2010. Für diesen paradoxen Trend gibt es bisher keine befriedigende Erklärung.

Einen ersten Anhaltspunkt zur Aufklärung dieser Zusammenhänge gab die Untersuchung von FERIN & MITARBEITERN (1992). Sie exponierten Ratten sowohl gegenüber 23mg/m<sup>3</sup> ultrafeiner TiO<sub>2</sub>-Teilchen (mittlerer Durchmesser 0.02µm) als auch gegenüber 23mg/m<sup>3</sup> feiner TiO<sub>2</sub>-Teilchen (mittlerer Durchmesser 0.25µm). Obwohl die gleiche Massenkonzentration chemisch identischer Partikel appliziert wurde, reagierten die Ratten auf die ultrafeinen Partikel (UFP) mit einer wesentlich stärkeren entzündlichen Reaktion als auf die feinen Partikel. Dies muß bedeuten, daß nicht die Partikelmasse, wie bisher angenommen, sondern vielmehr die Partikelanzahl die mit der Wirkung korrelierende Größe ist, denn der einzige Unterschied zwischen den verwendeten Teilchen bestand in der ungleich größeren Anzahlkonzentration der UFP im Vergleich zu den feinen Partikeln. Der in epidemiologischen Studien belegte Zusammenhang zwischen dem Grad der Luftverschmutzung durch lungengängige Partikel (PM10) und der Morbiditäts- bzw. Mortalitätsrate (THURSTON, 1996) wurde nun vor dem Hintergrund der Rolle der UFP diskutiert, die bezogen auf ihre Anzahl mit 75% die mit Abstand größte Fraktion der PM10 darstellen (SEATON et al., 1995; OBERDÖRSTER et al., 1995).

Neue epidemiologische Studien, die sich explizit mit der Abschätzung des Gesundheitsrisikos von UFP befassen, kommen allerdings zu widersprüchlichen Aussagen. PETERS et al. (1997) fanden in ihrer Untersuchung an erwachsenen Asthmatikern aus dem Raum Erfurt eine Korrelation zwischen der Luftbelastung durch UFP und gesundheitlichen Beeinträchtigungen. In einer finnischen Follow-Up-Studie mit asthmatischen Kindern konnte zwar eine statistisch signifikante Assoziation zwischen PM10 und einer Veränderung von Lungenfunktionen nachgewiesen werden, aber keine spezielle Bedeutung der UFP-Fraktion (PEKKANEN et al., 1997). Auch die Ergebnisse aus den bisher vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen mit UFP sind sehr heterogen. Die Spannbreite der Befunde reicht von Todesfällen durch akute

hämorrhagische Lungenentzündung (OBERDÖRSTER et al., 1995) bis hin zum Ausbleiben einer nachweisbaren Reaktion (ZIESENIS et al., 1998).

Zu den faserförmigen Feinstäuben gehören Asbestfasern, die in der BRD in einer Größenordnung von 105-120t/a freigesetzt werden (LAI, 1991). Der weitaus größte Anteil mit ca. 100t/a stammt dabei aus Verwitterungsprozessen, weniger als 7t/a werden durch den Abrieb von Bremsbelägen und weniger als 10t/a aus Straßendecken freigesetzt. Die Immissionsbelastung der Bevölkerung liegt in ländlichen Gebieten bei 38Fasern/m<sup>3</sup> und in Ballungsgebieten bei 110Fasern/m<sup>3</sup>. Gebäude nach Asbestsanierungsmaßnahmen weisen bis zu 900,000Fasern/m<sup>3</sup> auf. Bei Bohrarbeiten an Asbestzement wurden bis zu 600,000Fasern/m<sup>3</sup> und Reinigung von Asbestzement bis zu 1,5MioFasern/m<sup>3</sup> gemessen (MÜLLER & KRISMANN, 1994 und 1996).

Für künstlicher Mineralfasern ergaben sich in Produktionsbetrieben in Europa und USA Konzentrationsmittelwerte von 30,000-70,000Fasern/m<sup>3</sup> (Stein- und Schlackenwollen). Die Arbeitsplatzkonzentrationen in Anwendungs- und Verarbeitungsbereichen lagen zwischen 100,000 und 1MioFasern/m<sup>3</sup> (GREIM, 1993).

Alle anorganischen Faserfeinstäube werden als potentiell krebserzeugend angesehen (GREIM, 1993). Das Toxizitätsprinzip beruht nach heutigem Stand des Wissens ganz wesentlich auf der Geometrie dieser Partikel. Die Abmessungen kanzerogener Faserstäube sind durch die MAK-Kommission wie folgt definiert: Länge >5µm, Durchmesser <3µm, Verhältnis von Länge zu Durchmesser ≥3:1.

Eine Korrelation zwischen Lungentumorinzidenz und Fasergeometrie ist nach STANTON & WRENCH (1972) und STANTON et al. (1977) ab einer Faserlänge von 8µm und einem Durchmesser von <0.25µm nachweisbar. Respirable Asbestfasern mit einem Durchmesser von 0.1µm und 20µm Länge wird eine maximale kanzerogene Potenz zugeschrieben, die mit größerer Dicke und kleinerer Länge abnimmt (LAI, 1991).

Neben der Geometrie als Toxizitätsprinzip scheint die Biobeständigkeit eine zweite Eigenschaft von Fasern zu sein, die ihre Toxizität beeinflusst. Aus zahlreichen Untersuchungen zur Biobeständigkeit wird abgeleitet, daß weniger persistente Fasern auch ein geringeres Toxizitätspotential aufweisen als persistente Fasern (STANTON & WRENCH, 1972; POTT et al., 1990).

Auch bei den faserförmigen Feinstäuben stellt sich die Frage, ob die chemische Zusammensetzung der Faser eine Rolle im Toxizitätsgeschehen spielt. Sicherlich hängt die Biobeständigkeit einer Faser von deren chemischen Zusammensetzung ab. Fasern mit hohem Aluminiumgehalt (z.B. Keramikfasern) weisen eine geringe Löslichkeit auf; hohe Konzentrationen an Alkali- und Erdalkalioxiden (moderne künstliche Mineralfasern) steigern

die Löslichkeit. Da aber die Strukturierung vor allem von Mineralfasern komplex ist, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der chemischen Zusammensetzung und der Löslichkeit (MERINGO et al., 1994). Hinzu kommt, daß bei identischer chemischer Zusammensetzung die Löslichkeit von spezifischen Eigenschaften der Faseroberfläche abhängt (SEARL, 1994). Hydrophile oder hydrophobe Eigenschaften der Faseroberfläche bestimmten dabei die Zell-Oberflächen-Adhäsion und die Neigung zur Membranolyse.

Eisen, das sich auf der Faseroberfläche befindet, kann unter bestimmten Bedingungen in Redoxreaktionen eingreifen und zum Beispiel die Katalyse der aggressiven Hydroxylradikale über eine Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion ermöglichen. Eine Beteiligung von Eisen und reaktiven Sauerstoffabkömmlingen an der Asbesttoxizität wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen in den letzten 10 Jahren bewiesen.

LEANDERSON & MITARBEITER (1989) gelang es die direkte Hydroxylierung von DNA durch OH-Radikal, die über eisenhaltige künstliche Mineralfasern generiert wurden, zu zeigen. Es bleibt unklar, warum nicht alle eisenhaltigen Mineralfasern toxisch sind. Offenbar ist nur der Anteil an Eisen reaktiv, der als Reduktionsmittel (FeII) dienen kann (ZALMA et al., 1987). Die Frage ist auch, ob das reaktive Eisen auf der Faser verbleibt oder ob es mobilisiert werden muß, um seine katalytische Aktivität zu entfalten (AUST & LUND, 1990; LUND & AUST, 1992).

Allen bisher erwähnten Partikeln ist gemeinsam, daß sie durch Inhalation bis in den Alveolarraum der Lunge vordringen können und entzündliche, fibrotische und kanzerogene Veränderungen im Respirationstrakt verursachen. Es gibt demnach keine spezifischen Reaktionen der Lunge auf eine Belastung mit spezifischen Partikeln, aber unterschiedliche Auslösemechanismen.

Die Entstehung der Lungenfibrose beruht zum heutigen Stand der Kenntnisse auf folgendem Grundprinzip: Inhalierete Feinstäube lagern sich im Alveolarbereich der Lunge ab. Ein Teil der Fasern wandert über die Typ I-Zellen in das Interstitium ein und wird dort von interstitiellen Makrophagen oder Fibroblasten phagozytiert. Fibroblasten produzieren und/oder reagieren auf mitogene Faktoren mit der Bildung von Kollagen. Auf der Alveolaroberfläche hingegen akkumulieren Alveolarmakrophagen, die ebenfalls die Fasern phagozytieren und über die Ausschüttung von Cytokinen das Wachstum und die Proliferation von endothelialen, epithelialen und mesenchymalen Zellen modulieren. Die Interaktion von Makrophagen mit Lymphozyten führt zu einer weiteren Aktivierung der Makrophagen, die neben Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren auch reaktive Sauerstoffspezies in das umliegende Lungengewebe abgeben und dieses oxidativ belasten. Darüber hinaus kommt es zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten, die ihrerseits mit einer Reihe von

Entzündungsmediatoren, proteolytischen Enzymen und Oxidantien ins Geschehen eingreifen. Letztendlich kommt es über diese Prozesse zur Ausbildung von Fibrosen.

Über die Entstehung der Bronchialkarzinome bzw. der Asbestfaser-induzierten Mesotheliome ist weniger bekannt. Die kausale Pathogenese der Kanzerogenität ist trotz erheblicher Forschungsanstrengung und enormen Zuwachs der Erkenntnisse auf dem Gebiet der Tumorbiologie immer noch unverstanden.

Zur Aufklärung der Frage, welche Toxizitätsprinzipien von Ruß- und Faser-förmigen Partikeln an initialen pathologischen Prozessen beteiligt sind, können vergleichende Untersuchungen mit Modell- und "Umwelt"-Partikeln beitragen. Biochemische Modellsysteme eignen sich trotz ihres abstraktem Charakters zum Studium mechanistischer Fragestellungen.

## 2. Aufgabenstellung und Ziele des Forschungsvorhabens

In dem vorliegenden Forschungsvorhaben wurde der Einfluß unterschiedlicher Rußproben (Kohlenstoff-Modellpartikel, LKW-Dieselfuß, Ruß aus stationären Verbrennungsanlagen) sowie natürlicher (Krokydolith) und künstlicher (Steinwollen) Mineralfasern auf isolierte neutrophile Granulozyten untersucht.

Es sollte gezeigt werden, ob der Respiratory burst, die Degranulation und das Phagozytoseverhalten als charakteristische Funktionen dieser Entzündungszellen modifiziert werden können und welche Partikeleigenschaft dafür verantwortlich ist. Außerdem interessierten Interaktionen zwischen den Partikeln und wichtigen Metaboliten der Neutrophilen. Im einzelnen handelte es sich um Produkte des Respiratory burst ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  und HOCl) und um die Enzyme Myeloperoxidase und Elastase, die bei der Degranulation freigesetzt werden.

Auch eine mögliche Inaktivierung des in der lining fluid in großen Konzentrationen vorliegenden Gegenspielers der Elastase, des  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitors, wurde in diesem Zusammenhang untersucht. Eine durch die Partikel ausgelöste Initiation oder Propagation der Lipidperoxidation stand ebenfalls im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Um die Abhängigkeit von Reaktionen sowohl von Oberflächeneigenschaften als auch von der chemischen Zusammensetzung aufzeigen zu können, wurden hochreine Kohlenstoffstäube mit unterschiedlich großen spezifischen Oberflächen und Rußpartikeln aus mobilen (LKW) und stationären (Öl- und Holzheizung) Verbrennungsanlagen untersucht. Diese Rußpartikel unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung als auch hinsichtlich der Größe ihrer spezifischen Oberfläche. Bei den untersuchten Fasern handelt es sich um Blauasbest, der aufgrund seines hohen Gehaltes an kritischen Fasern und seines aktivierbaren Eisengehalts als besonders gefährlich gilt, und um zwei Steinwollfasertypen, die gleiche geometrische Abmessungen aber eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung aufweisen. Ziel des Forschungsvorhabens war die Aufklärung der Beteiligung bestimmter Toxizitätsprinzipien von Feinstäuben. Folgende grundlegende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1) Spielt die chemische Zusammensetzung von Rußpartikeln bzw. Fasern eine Rolle hinsichtlich ihrer Reaktivität?
- 2) Welchen Einfluß hat das Ausmaß der spezifischen Oberfläche?
- 3) Können grundsätzliche Unterschiede in den Reaktionsmechanismen sphärischer bzw. Faser-

Material

förmiger Partikel gefunden werden?



### **3. Herkunft und Charakterisierung der Ruß- und Mineralfaserproben**

#### **3.1 Rußproben**

Für die unterschiedlichen Rußproben liegen REM-Aufnahmen vor, die einen Vergleich der Oberflächenbeschaffenheiten erlauben. Neben der reinen Bilderstellung bietet das REM die Möglichkeit einer semiquantitativen Elementanalyse, die auf dem Prinzip der Fluoreszenzspektroskopie aufbaut. Die Bestimmung der spezifischen Oberflächen erfolgt durch Ein-Punkt-BET-Messung nach BRUNAUER et al. (1938).

Sowohl die REM-Aufnahmen und die chemischen Analysen als auch die Bestimmung der spezifischen Oberflächen wurden im Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Toxikologie ausgeführt. Die Angaben zur Partikelcharakterisierung der hochreinen Kohlenstoffstäube (Graphitstaub und Rohruß) entstammen der Dissertation von BAIERL (1996) und der Diplomarbeit von HOFER (1996).

##### **3.1.1 Rußproben aus Verbrennungskraftmaschinen**

Die von BMW zur Verfügung gestellten PKW-Dieselußproben können nicht bearbeitet werden, weil sie, wie REM-Aufnahmen aufklärten, Silikatfaser-haltig sind. Es war unmöglich, diese Fasern von den Rußpartikeln abzutrennen. Die Faserverunreinigung geht auf den bei der Partikelgewinnung von BMW versehentlich verwendeten Rußfilter zurück, der „silikatisiert“ war.

Den LKW-Dieseluß stellte die Mercedes-Benz AG Stuttgart zur Verfügung. Er stammt von einem ladeluftgekühlten Sechszylinder-Reihenmotor mit einer Leistung von 261kW. Die bei unterschiedlicher Betriebsweise des Motors entstandene Rußpartikelmasse wurde durch Ausfiltern des mit Luft verdünnten Abgasstroms bei einer Probertemperatur von höchstens 52°C unter Verwendung eines Cellulose-Nitrat-Filters gewonnen.

Die Oberfläche der LKW-Rußpartikel gestaltet sich amorph mit unzähligen Einbuchtungen und Kavitäten. Die spezifische Oberfläche wurde mit  $178.8\text{m}^2/\text{g}$  bestimmt. Die semiquantitative Analyse der chemischen Zusammensetzung ist in Tab. 1 wiedergegeben.

Element	prozentualer Anteil
<b>C</b>	96.7
<b>O</b>	1.1
<b>S</b>	1.6
<b>Fe</b>	0.1

Tab. 1: Semiquantitative Analyse der LKW-Rußprobe

### 3.1.2 Rußproben aus dem Hausbrand

Die Rußproben aus dem Hausbrand stellte das Umweltreferat München zur Verfügung. Es handelt sich um Material, das aus folgenden Anlagen gewonnen wurde:

**Holzheizungsrußprobe:** Dampfkessel, der mit Holzverarbeitungsresten beschickt wird (730kW); die Probe stammt aus dem Kamin;

**Ölheizungsrußprobe:** Heizölbeschickter Zentralheizungskessel (35kW); die Probe stammt aus dem Rauchrohr.

Der Aufbau des Ölheizungs-Partikels erscheint mehr geschichtet und die Zerklüftung der Oberfläche scheint weniger stark ausgeprägt zu sein. Das Ausmaß der spezifischen Oberfläche beträgt  $53.3\text{m}^2/\text{g}$  und liegt damit deutlich unter dem der LKW-Rußprobe.

In der chemischen Zusammensetzung gibt es ebenfalls deutliche Unterschiede: der Kohlenstoffanteil beträgt nur 65%, Sauerstoff ist mit 12%, Schwefel mit 10% und Eisen (!) mit 11% vertreten.

Die Holzheizungsprobe besteht aus Partikeln unterschiedlichster Abmessungen, wobei die größten unvollständig verbrannte Holzreste darstellen, die eine glatte Oberfläche besitzen. Holzheizungsrußpartikel haben dagegen eine ähnliche Oberflächenbeschaffenheit wie die übrigen Rußpartikel. Insgesamt ergibt sich dadurch eine spezifische Oberfläche von nur  $15.3\text{m}^2/\text{g}$ .

Charakteristisch für diesen Partikeltyp ist der hohe Anteil an Calcium (16%); zu 57% besteht er aus Kohlenstoff, zu 16% aus Sauerstoff, zu 3% aus Schwefel und zu 1.1% aus Eisen.

### 3.1.3 Hochreine Kohlenstoffstäube

Sowohl der Graphitstaub als auch der sogenannte Rohruß wurden vom Forschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Der Graphitstaub besitzt eine Reinheit von 99.9999%. Der Graphit zeigt sich als Partikel mit glatter Oberfläche und scharf abgegrenzten Kanten. Nach REM-Analysen beträgt die mittlere Partikelgröße  $14.2 \pm 7 \mu\text{m}$ .

Bei der Herstellung von Fullerenen über die sogenannte Lichtbogenmethode dient der verwendete hochreine Graphitstaub als Ausgangssubstanz. Als Zwischenprodukt fällt ein Fulleren-Rohruß an, der 0.82%  $\text{C}_{60}$  enthält und sonst aus amorphem Kohlenstoff besteht.

Die Beschaffenheit der Rohruß-Oberfläche gleicht derjenigen der Kfz- und Hausbrandpartikel. Die spezifische Oberfläche wurde mit  $255 \text{m}^2/\text{g}$  bestimmt. In der chemischen Analyse findet sich kein Unterschied zum Graphitstaub.

Über die rasterelektronenmikroskopische Bestimmung der Partikelgröße wurde ein mittlerer Durchmesser von  $0.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$  ermittelt. 30% der Partikel lagen in einem Größenbereich zwischen  $0.28$  und  $0.75 \mu\text{m}$  mittleren Durchmessers. Werden die Partikel in Wasser oder Puffer suspendiert, kommt es zur Aggregation, wie Laserbeugungsmessungen ergaben. 50% der Partikel sind nun kleiner als  $8 \mu\text{m}$  (mittlerer Durchmesser) (HOFER, 1996).

## 3.2 Mineralfasern

**Krokydolith** als natürliche Mineralfaser und als interner "Reaktivitätsstandard" wurde vom National Inst. of Standards and Technology, USA bezogen.

Die **künstlichen Mineralfaserproben (Steinwolle Nr. 8 und 13)** stammen von der Firma Dt. ROCKWOOL GmbH. Es handelt sich um Experimentalfasern, die aber auf einer normalen Linie produziert wurden. Sie zeichnen sich durch einen niedrigeren Aluminiumoxid- und einen wesentlich höheren Calciumoxid-Gehalt im Vergleich zu kommerziellen Steinwollfasern aus.

In der Tab. 2 sind die chemischen Zusammensetzungen und die Ausmaße der spezifischen Oberflächen der Mineralfasern wiedergegeben. Die Daten zur spezifischen Oberfläche sind der Literatur entnommen und können nur grobe Anhaltspunkte liefern. Auf jeden Fall sind die spezifischen Oberflächen der Mineralfasern, insbesondere der künstlichen, deutlich kleiner als diejenigen der Rußproben.

Anteile in %	Krokydolith	Steinwollfaser Nr. 8	Steinwollfaser Nr. 13
SiO <sub>2</sub>	49.1	44.0	47.0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.5	10.1	5.5
TiO <sub>2</sub>		1.3	0.6
FeO		3.3	1.2
FeO+Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	27.0		
CaO		27.0	32.2
MgO	3.6	9.8	11.4
Na <sub>2</sub> O	5.8	1.3	0.1
K <sub>2</sub> O		1.2	0.5
spez. Oberfläche in m <sup>2</sup> /g	2-15 <sup>1</sup> 8.3 ± 0.5	0.105 - 0.208 <sup>1</sup>	

Tab. 2: Chemische Zusammensetzung und spezifische Oberfläche der Mineralfasern (Krokydolith-Daten aus PLANO (1990); Daten zur chem. Zusammensetzung der künstlichen Mineralfasern: priv. Information der Dt. Rockwool GmbH; <sup>1</sup>Angaben aus GREIM (1993))

### 3.3 Fraktionierung der Ruß- und Mineralfaserproben

Zur näheren Charakterisierung der reaktiven Komponenten des partikulären Untersuchungsmaterials wurden die Partikel einer wäßrigen Extraktion unterzogen, aus der pro Partikelprobe drei Fraktionen hervorgehen: wäßrige Suspension (WS): 20mg Partikelprobe/10ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; wäßriges Filtrat (WF) und wäßrig extrahierte Partikel (WEP): 20mg Partikelprobe werden in 10ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> vier Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad extrahiert. Anschließend werden diese Extrakte in Filtrat und extrahierte Partikel geschieden. Die Partikelmasse wird vorsichtig getrocknet und in 10ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Die Fraktionen werden in äquivalenten Volumina eingesetzt, d.h. 0.1ml Suspension (enthält 200µg Partikelmasse) = 0.1ml Filtrat = 0.1ml resuspendierte extrahierte Partikel.

Material

Insgesamt entsteht ein Partikelprobenumfang von  $24!$  unterschiedlichen Fraktionen, die in jedem der folgenden Testsysteme auf ihre Eigenschaften überprüft wurden.

## **4. Methoden**

### **4.1. Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten**

#### **4.1.1 Isolierung der neutrophilen Granulozyten**

Schweineleukozyten: Die Isolierung neutrophiler Granulozyten erfolgt in Anlehnung an STAHL (1988) aus dem Leukozyten-reichen Plasmaüberstand heparinisierten Vollbluts von Schlachtschweinen nach Erythrozytensedimentation, wobei die gesuchte Zellfraktion durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wird. Die neutrophilen Granulozyten werden in PBS-Puffer aufgenommen, in einer Neubauerkammer die Zellzahl bestimmt und die Vitalität mit Trypanblau überprüft.

Die Schweineleukozyten finden in folgenden Testsystemen Anwendung: Messung des Respiratory burst mit Hilfe der Hydroxylaminoxidation und der Chemilumineszenz; Messung der Degranulation mit Hilfe der ACC-Spaltung.

Humane neutrophile Granulozyten: 3ml Histopaque 1077 werden mit 3ml heparinisiertem Humanvollblut überschichtet. Die Erythrozyten sedimentieren ohne Zentrifugation bei Raumtemperatur durch Aggregation an der Grenzfläche. Nach ca. 40 Minuten bildet sich ein klarer Plasmaüberstand. Hiervon werden die obersten 0.8ml abgezogen und die Zellzahl bzw. die Vitalität der Zellen bestimmt.

Die Humanleukozyten werden beim Nachweis der phagosomalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, beim Nachweis der intrazellulären Elastaseaktivität sowie bei dem Phagozytostest eingesetzt. Diese Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anästhesiologie der Universität München, Klinikum Großhadern.

#### **4.1.2 Gewinnung autologen Serums und Opsonierung von Zymosan bzw. Latexbeads**

Human- bzw. Schweineblut wird ohne Antikoagulans eine Stunde bei Raumtemperatur im Serumröhrchen inkubiert und anschließend bei 2000 x g 20min. zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und das überstehende Serum bis zum Gebrauch eingefroren.

50mg Zymosan werden mit 5ml PBS und 2ml Serum versetzt und 60min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wird die Suspension bei 1700 x g und 20°C für 10min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in PBS-Puffer aufgenommen. Dieser

Waschvorgang wird noch zweimal wiederholt und anschließend das Pellet in 5ml PBS-Puffer resuspendiert. Oponisiertes Zymosan wird an jedem Versuchstag frisch hergestellt.

Carboxylierte Latexbeads ( $\varnothing$  1.03 $\mu$ m, Polyscience Europe GmbH, Eppelheim) werden in einer Konzentration von  $4 \times 10^8$ /ml in 50%-igem autologem Serum (in HBSS) bei 37°C für 30min. unter Schütteln inkubiert. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 2000 x g resuspendiert man die Latexbeads in HBSS und stellt sie auf eine Stammkonzentration von  $2 \times 10^8$ /ml ein. Vor Gebrauch werden die Beads 5 Minuten ultrabeschallt und durchflußzytometrisch auf Verklumpung untersucht.

### **4.1.3 Methoden zur Erfassung des Respiratory burst**

#### **4.1.3.1 Nachweis der phagosomalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion**

Das während des Respiratory burst gebildete phagosomale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Oxidation des nichtfluoreszenten Dihydrorhodamins 123 (DHR) zu grünfluoreszentem Rhodamin 123 nachgewiesen werden (ROTHER et al., 1988).

400.000 Zellen in HBSS werden in einem Gesamtvolumen von 1ml mit 0.1ml Partikelprobe und DHR (100 $\mu$ M) bis zu 30min. bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgt die Aktivierung der Zellen mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat, 10 $\mu$ M) bzw. TNF $\alpha$  (0.01 $\mu$ g) /fMLP (N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin, 10 $\mu$ M). Nach 25min. wird zur Lebend/Tot-Bestimmung Propidiumjodid (30 $\mu$ M) zugegeben und der Versuch durch Überführen auf Eis gestoppt. Die Fluoreszenzmessung geschieht FACScan-durchflußzytometrisch. Die Fluoreszenzintensität der Kontrolle (Zellsuspension ohne Zusatz einer Partikelproben-Fraktion) wird gleich 100% gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

#### **4.1.3.2 Nachweis der O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Bildung mit Hilfe der Hydroxylaminoxidation**

O<sub>2</sub><sup>-</sup> oxidiert extern angebotenes Hydroxylamin zu Nitrit. Der Nachweis von Nitrit erfolgt durch Fixierung mittels Sulfanilamid zum Diazoniumsalz, das unter Azokopplung an  $\alpha$ -Naphthyl-ethylendiamin einen roten Farbstoff bildet, der photometrisch bei 540nm nachgewiesen werden kann (GREEN et al., 1982). Die Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) soll die Abhängigkeit der Reaktion von der Superoxidbildung belegen.

In einem Gesamtvolumen von 2ml (PBS) werden  $10^7$  Zellen in Gegenwart von 0.1ml der Partikelproben, 0.5mM Hydroxylamin und  $\pm$  SOD (100U) inkubiert. Die Aktivierung erfolgt

durch Zugabe von opsonisiertem Zymosan (2.5mg). Nach 60min. werden die Reaktionsansätze zentrifugiert, 1ml des Überstandes mit Sulfanilamid und  $\alpha$ -Naphthylethylendiamin versetzt und 50min. später die Rotfärbung photometrisch quantifiziert. Die Extinktionswerte der Kontrolle (Zellsuspension ohne Zusatz einer Partikelproben-Fraktion) werden gleich 100% gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

#### **4.1.3.3 Nachweis der Produkte des Respiratory burst mit Hilfe der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz**

Die während des Respiratory burst gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies oxidieren Luminol, welches über elektronisch angeregte Zwischenstufen unter Aussendung von Licht zum 3-Aminophtalat abreagiert. Mit empfindlichen Luminometern kann die Freisetzung dieser Photonen gemessen werden.

5Mio Zellen (in PBS) werden in einem Gesamtvolumen von 650 $\mu$ l mit 0.1ml Partikelprobe 30min. bei 37°C vorinkubiert. Zu 150 $\mu$ l dieses Vorinkubationsansatzes werden 80 $\mu$ M Luminol und 80 $\mu$ g opsonisiertes Zymosan zur Aktivierung der Zellen gegeben und die Entstehung der Chemilumineszenz über 50min. beobachtet.

#### **4.1.4 Methoden zur Erfassung der Degranulation**

##### **4.1.4.1 Nachweis der intrazellulären Elastaseaktivität**

Die intrazelluläre Elastaseaktivität kann durch die sequenzielle proteolytische Elastase-katalysierte Spaltung des nicht fluoreszenten (Z-Ala-Ala)<sub>2</sub>-Rhodamins 110 zu den grünfluoreszierenden Produkten (Z-Ala-Ala)-Rhodamin 110 und Rhodamin 110 mit Hilfe der FACScan-Durchflußzytometrie erfaßt werden (LEYTUS et al., 1983)

400.000 Zellen werden in einem Gesamtvolumen von 1ml (HBSS) mit 0.1ml der Partikelproben 30min. bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgt die Aktivierung der Zellen mit PMA (10 $\mu$ M). Nach 10min. wird (Z-Ala-Ala)<sub>2</sub>-Rhodamin 110 (4 $\mu$ M) zugegeben und nach weiteren 25min. die Reaktion durch Überführen auf Eis gestoppt. Die Lebend/Tot-Färbung erfolgt mit Propidiumjodid (30 $\mu$ M). Die Fluoreszenzintensität der Kontrolle (Zellsuspension ohne Zusatz einer Partikelproben-Fraktion) wird gleich 100% gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

#### **4.1.4.2 Nachweis der Myeloperoxidase (MPO)-Freisetzung**

Die durch Degranulation freigesetzte MPO katalysiert die Bildung von HOCl, das selektiv ACC (1-Amino-1-carboxyl-cyclopropan) zu Ethen und Produkten spaltet (v.KRUEDENER et al., 1995). Ethen kann dann gaschromatographisch detektiert werden.

In einem Gesamtvolumen von 2ml (PBS) werden  $10^7$  Zellen in Gegenwart von 0.1ml der Partikelproben, 1.25mM ACC und 2.5mg opsonisiertem Zymosan 60min. bei 37°C in gasdicht verschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert. Mit einer Insulinspritze wird anschließend 1ml Gas aus dem „Head Space“ der Reaktionsgefäßen abgezogen und der Ethengehalt gaschromatographisch analysiert. Die durch den Kontrollansatz (Zellsuspension ohne Zusatz einer Partikelproben-Fraktion) freigesetzte Ethenmenge wird gleich 100% gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

#### **4.1.5 Methoden zur Erfassung der Phagozytose**

Die Messung der Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten erfolgt in Anlehnung an FÖRSTER (1991). Opsonierte, coumarinhaltige Latexbeads werden von Granulozyten aufgenommen und deren Phagozytoseindex (PI), d.h. die pro Zelle phagozytierten Latexbeads) durchflußzytometrisch bestimmt. Dies geschieht über eine Laserlicht-induzierte Anregung des in den Beads befindlichen Coumarins bei 488nm und der Detektion der resultierenden Fluoreszenz, deren Intensität direkt proportional zur Anzahl phagozytierter Latexpartikel ist.

Wichtig ist nun eine Unterscheidung zwischen lediglich adhärerten und wirklich ingestierten Latexbeads. Da der Ingestionsvorgang im Gegensatz zur Adhäsion streng temperaturabhängig ist, findet bei Inkubation der Zellen auf Eis keine Phagozytose, sondern nur eine Anlagerung von Beads an die Zelloberfläche statt. Die aus diesem Testansatz ermittelte Fluoreszenzintensität wird von derjenigen des entsprechend bei 37°C inkubierten Testansatzes abgezogen, um so die Fluoreszenz (und damit gekoppelt den PI) tatsächlich ingestierter Latexbeads zu erhalten.

400.000 Zellen werden in einem Gesamtvolumen von 1ml (HBSS) mit 0.1ml der Partikelproben 30min. bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgt zur Einengung des Probenvolumens eine Zentrifugation bei 400 x g für 10min.. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 50µl HBSS resuspendiert. Die Phagozytose wird durch Zugabe von 20Mio opsonierten, coumarinhaltigen Latexbeads in 0.1ml HBSS ermöglicht und die Ansätze bei

37°C bzw. auf Eis inkubiert. Das Abstoppen des Ingestionsvorganges erfolgt durch Überführen der 37°C-Ansätze auf Eis.

Der PI des Kontrollansatzes (Zellsuspension ohne Zusatz einer Partikelproben-Fraktion) wird gleich 100% gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

## **4.2 Zellfreie Untersuchungen**

### **4.2.1 Nachweis einer Interaktion mit Superoxid**

Durch das Enzymsystem Xanthin/Xanthinoxidase werden Superoxidanionen generiert, die Hydroxylamin zu Nitrit oxidieren.

Der Reaktionsansatz enthält in einem Gesamtvolumen von 2ml 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.4), 0.5mM Xanthin, 0.08U Xanthinoxidase, 0.1ml der Partikelproben und 0.5mM Hydroxylamin. Nach einer Inkubationszeit von 30min. bei 37°C werden die Ansätze zentrifugiert, 1ml des Überstandes mit 0.25ml Sulfanilamid (1%-ig in 8%-iger HCl) und 0.25ml  $\alpha$ -Naphthylethylendiamin (0.02%-ig) für die Farbstoffbildung versetzt und die Ansätze nach 50min. photometrisch ausgewertet. Die Extinktionswerte des Kontrollansatzes (ohne Zusatz einer Partikelproben-Fraktion) werden gleich 100% gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

### **4.2.2 Nachweis einer Interaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

$\alpha$ -Keto-S-Methylbuttersäure (KMB) fragmentiert unter dem Angriff starker Oxidantien (z.B. OH $\cdot$ ) zu Ethen und anderen Produkten, wobei das Ethen gaschromatographisch nachgewiesen wird (ELSTNER et al., 1987). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seinerseits zerfällt Übergangsmetall-katalysiert zu OH $\cdot$  und OH $\cdot$ . Wenn in diesem Testsystem eine Ethenfreisetzung, die Desferrioxamin-hemmbare ist, auftritt, so kann diese auf eine Interaktion des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit dem in der Partikelprobe enthaltenen Eisen zurückgeführt werden.

Die Reaktionsansätze enthalten in einem Gesamtvolumen von 2ml 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.4), 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1ml der Partikelprobe, 1.5mM KMB und  $\pm$  1mM Desferrioxamin. Die Ethenfreisetzung durch den Kontrollansatz entspricht wiederum 100%, alle anderen Meßwerte werden darauf bezogen.

### **4.2.3 Nachweis einer Interaktion mit HOCl**

HOCl (25 $\mu$ M) wird zusammen mit 0.1ml der Partikelfractionen 15min. bei 37°C phosphatgepuffert (0,1M, pH 7.4) in gasdicht zu verschließenden Reaktionsgefäßen vorinkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1.25mM ACC, das durch HOCl zu Ethen und anderen Produkten gespalten wird. Nach weiteren 15min. erfolgt die Gasentnahme mit geeichten Spritzen aus dem „Head Space“ der Reaktionsröhrchen und die gaschromatographische Ethen-Detektion. Die durch den Kontrollansatz freigesetzte Ethenmenge wird gleich 100% gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

#### **4.2.4 Nachweis einer Beeinflussung der Myeloperoxidase (MPO)**

Die Aktivität käuflicher MPO kann indirekt über das Ausmaß der enzymatischen HOCl-Bildung beurteilt werden.

Der Reaktionsansatz enthält in einem Gesamtvolumen von 1.8ml 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.4), 0.1U MPO, 0.1ml der Partikelproben, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 $\mu$ M) und ACC (1.25mM). Nach 30min. Inkubation bei 37°C erfolgt die Messung der Ethenbildung. Die Ethenfreisetzung durch den Kontrollansatz entspricht wiederum 100%, alle anderen Meßwerte werden darauf bezogen.

#### **4.2.5 Nachweis einer Beeinflussung der Elastase**

Die photometrische Elastase-Aktivitätsbestimmung beruht auf der enzymatischen Umsetzung des künstlichen Substrats N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilid (SANA), aus welchem proteolytisch das gelbgefärbte p-Nitroanilin freigesetzt wird (MORENO & PRYOR, 1992).

In einem Gesamtvolumen von 0.5ml wird käufliche Elastase (1.12U) mit 0.1ml der Partikelproben trisgepuffert (pH 8.0) 180min. vorinkubiert. 50 $\mu$ l dieses Ansatzes werden in 1ml Trispuffer (pH 8.0) überführt und die proteolytische Reaktion durch die Substratzugabe von 0.1ml SANA (14.38mM) gestartet. Nach 15min. kann das gelbe p-Nitroanilin bei 410nm quantifiziert werden. Die Extinktionswerte des Kontrollansatzes (ohne Zusatz einer Partikelproben-Fraktion) werden gleich 100% gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

#### **4.2.6 Nachweis einer Inaktivierung des $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitors ( $\alpha_1$ -PI)**

Eine Inaktivierung des  $\alpha_1$ -PI durch das partikuläre Untersuchungsmaterial wird durch die ausbleibende Hemmung der Elastase überprüft.

In einem Gesamtvolumen von 0.5ml (trisgepuffert, pH 8.0) wird der  $\alpha_1$ -PI (15 $\mu$ g) mit 0.1ml der Partikelproben für 180min. vorinkubiert. Anschließend werden 0.1ml des Vorinkubationsansatzes mit 0.7ml Trispuffer vermischt und Elastase (1.12U) sowie 0.1ml SANA (14.38mM) für die p-Nitroanilinbildung zugegeben. Die Elastase wird in ihrer Ausgangs-Aktivität (= 100%) durch den  $\alpha_1$ -PI eingeschränkt (Restaktivität von 45.3% = Kontrollwert). Bei Schädigung des  $\alpha_1$ -PI durch eine der Partikelproben erhöht sich die Restaktivität der Elastase wieder. Die prozentuale Umrechnung der Meßwerte bezieht sich also auf 100% Elastaseaktivität.

#### **4.2.7 Nachweis einer Initiierung bzw. Propagation der Lipidperoxidation (LPO)**

Bestimmte Produkte der LPO, nämlich Tripletketone und Singulett-Sauerstoff, können über ihre Lichtemission bei Rückkehr in den Grundzustand quantifiziert werden.

Initiation der LPO:  $\alpha$ -Linolensäure (1.35mM) wird in Phosphatpuffer (0.2M, pH 7.4) mit 0.1ml der Partikelfractionen bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsküvette befindet sich in einem thermostatisierbaren Einkanal-Bioluminaten, der nach automatischer Zugabe der Fettsäure die entstehende Chemilumineszenz über 60 Sekunden integriert. Die Chemilumineszenzwerte der Kontrolle (Ansatz ohne Partikelproben-Fraktion) wird gleich 0% (keine LPO!) gesetzt und alle anderen Meßwerte entsprechend umgerechnet.

Propagation der LPO: Die Peroxidation der  $\alpha$ -Linolensäure kann durch Zugabe von Sulfit (0.5mM) initiiert werden (Kontrollansatz). Die nun auf jeden Fall generierte Chemilumineszenz (wird gleich 100% gesetzt) kann in Anwesenheit der Partikelproben möglicherweise gesteigert werden.

## **5. Ergebnisse und Diskussion**

Keine der Ruß- und Mineralfaserproben wirkte unter unseren Versuchsbedingungen zytotoxisch auf neutrophile Granulozyten.

Bei den Chemilumineszenzmessungen ergaben sich Probleme mit den partikelhaltigen Rußfraktionen, die aufgrund ihrer Schwärzung die Lichtemission quenchten. Die Ergebnisse aus diesem Versuchen sind nicht interpretierbar und werden deshalb nicht vorgestellt.

Von jeder Rußprobe existieren drei Fraktionen (siehe auch Punkt 3.3 „Fraktionierung der Ruß- und Mineralfaserproben“): Die wäßrige Suspension (WS) enthält die partikuläre Phase mit den (wenn vorhanden) am Partikel immobilisierten Übergangsmetallen und adsorbierten organischen und anorganischen Verbindungen sowie die wäßrige Phase, in der die wasserlöslichen Anteile vorliegen. Das wäßrige Filtrat (WF) repräsentiert nur diesen wasserlöslichen Anteil, während die Fraktion der wäßrig extrahierten Partikel (WEP) die Reaktivität der am Partikel verbleibenden Verbindungen bzw. des Partikels selbst zeigen soll. Die Fraktionierung dient also der näheren Charakterisierung der reaktiven Komponenten des partikulären Untersuchungsmaterials.

Auf Vorschlag des Projektrates wurden die Ruß- und Mineralfaserproben nicht nur in Wasser, sondern auch in „Gamble-Solution“, pH 7.4 extrahiert. Die Gamble-Solution stellt in ihrer Zusammensetzung das Blutplasma ohne Proteine dar (genaue Zusammensetzung siehe SCHOLZE & CONRADT, 1987) und soll die Gewebsflüssigkeit simulieren. Die mit diesem Medium gewonnenen Partikelfraktionen wurden exemplarisch in einige der Untersuchungssysteme eingesetzt. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht von denen, die mit den „Reinwasser“-Fraktionen erzielt wurden, weshalb auf eine Dokumentation dieser Daten verzichtet wird.

Aufgrund der Fülle der Einzeldaten werden die Ergebnisse jeden Partikeltyps im folgenden dargestellt und an Ort und Stelle diskutiert. Alle Abbildungen finden sich im Anhang 1.

Im nächsten Kapitel erfolgt dann eine vergleichende Diskussion über die Eigenschaften der untersuchten Ruß- und Mineralfaserproben.

### **5.1. Rußproben**

#### **5.1.1 Die Modellpartikel „Graphitstaub“ und „Rohruß“**

Wie schon im Kapitel 3 (Herkunft und Charakterisierung der Ruß- und Mineralfaserproben) erläutert, handelt es sich bei den Modellpartikeln um hochreine Kohlenstoffstäube, die sich nur

im Ausmaß ihrer spezifischen Oberfläche unterscheiden. Der Graphitstaub weist mit einer spezifischen Oberfläche von  $15\text{m}^2/\text{g}$  eine vergleichsweise kleine, der Rohruß mit  $255\text{m}^2/\text{g}$  eine große spezifische Oberfläche auf. Mit Hilfe dieser Modellpartikel lassen sich zum einen Oberflächen-abhängige Effekte untersuchen, zum anderen können Wirkungen, die lediglich vom Kohlenstoffteilchen verursacht sind, von Wirkungen, die auf die am Kohlenstoffkern angelagerten Verbindungen (z.B. PAHs, Metalle) zurückgehen, unterschieden werden.

### **5.1.1.1 Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten**

#### **5.1.1.1.1 Beeinflussung des Respiratory burst**

Der Respiratory burst wird über die intrazelluläre (phagosomale)  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung und über die extrazelluläre Superoxidgenerierung bestimmt. In An- und Abwesenheit der Modellpartikelfractionen wird der Respiratory burst mit  $\text{TNF}\alpha/\text{fMLP}$  bzw. mit PMA induziert und die intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung während des Respiratory burst durchflußzytometrisch gemessen. Außerdem werden die Zellen 30min. mit den Kohlenstoffstäuben vorinkubiert und dann erst mit den entsprechenden Aktivatoren stimuliert. Im Unterschied zur rezeptorvermittelten Aktivierung des Respiratory burst durch  $\text{TNF}\alpha/\text{fMLP}$  kann PMA direkt die Proteinkinase C aktivieren, die nun die für den Respiratory burst verantwortliche NADPH-Oxidase „anschaltet“.

Aus den Abb. 1a und 2a geht hervor, daß bei einer Konzentration von  $50\mu\text{g}/100.000$  Zellen (das ist jeweils die höchste Konzentration, die in allen Versuchsreihen verwendet wurde) die phagosomale  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung durch Graphitstaub nicht verändert wurde. Auch das wäßrige Filtrat (WF) des Rohrußes bleibt ohne Wirkung, während die partikelhaltigen Fraktionen scheinbar zu einer 100%igen Hemmung sowohl des  $\text{TNF}\alpha/\text{fMLP}$ - als auch des PMA-induzierten Respiratory burst und auch unabhängig von einer Vorinkubation führen. Genauere Untersuchungen ergaben, daß sowohl der Fluoreszenzindikator DHR als auch PMA an den Rohrußpartikel gebunden wurden und damit dieses Testsystem für die Beurteilung des Respiratory burst ausscheiden mußte (Daten nicht gezeigt).

In der Abb. 3a sind die Ergebnisse zur Messung der extrazellulären Superoxid-Bildung wiedergegeben. Die Zugabe von SOD (Superoxiddismutase) soll die Abhängigkeit der Reaktion von  $\text{O}_2^-$  dokumentieren. Als Stimulans des Respiratory burst diente opsonisiertes Zymosan, das über die Bindung an den Fc- und Komplement-Rezeptor die Zellen aktiviert. Auf eine Vorinkubation wurde in dieser Testreihe verzichtet.

Auch in dieser Versuchsanordnung bleiben alle Fraktionen des Graphitstaubes und das wässrige Filtrat des Rohrußes ohne Wirkung. Die wäßrige Suspension des Rohrußes

verursacht eine ca. 50%ige Verminderung der extrazellulären Superoxidproduktion, die Fraktion der wäßrig extrahierten Partikel eine 25%ige.

#### **5.1.1.1.2 Beeinflussung der Degranulation**

Bei der Degranulation werden u.a. die Enzyme Elastase und Myeloperoxidase (MPO) in den extrazellulären Raum abgegeben. Deshalb kann das Ausmaß der Degranulation nach Aktivierung der Zellen über die Abnahme der intrazellulären Elastaseaktivität und durch die extrazelluläre MPO-Aktivität bestimmt werden.

Die Graphitstaubfraktionen und auch das wäßrige Filtrat des Rohrußes zeigten bei einer Konzentration von 50µg/100.000 Zellen keinen Einfluß auf das Degranulationsverhalten der neutrophilen Granulozyten (Abb. 4a).

Bei der durchflußzytometrischen Messung zum Degranulationsverhalten der neutrophilen Granulozyten ergaben sich für die partikelhaltigen Rohrußfraktionen ähnliche Schwierigkeiten wie schon bei den Respiratory burst Versuchen. Auch (Z-Ala-Ala)<sub>2</sub>-Rhodamin 110 bindet an die Rohrußpartikel der WS und WEP. Bei der indirekten Bestimmung der Degranulation über die MPO-Aktivität führte nur die WS (20µg/1Mio Zellen) zu einer 30%igen Hemmung (Abb. 5a). In Abb. 10 ist die Dosis-Wirkungsbeziehung dieser Reaktion wiedergegeben.

#### **5.1.1.1.3 Beeinflussung der Phagozytose**

Die Phagozytose opsonisierter Latexbeads wird durch eine 30min. Vorinkubation der Zellen mit den Fraktionen des Graphitstaubs nicht modifiziert (50µg/100.000 Zellen) (Abb. 6a). Im Gegensatz dazu verursachen die partikelhaltigen Fraktionen des Rohrußes in gleicher Konzentration eine um das Doppelte gegenüber der Kontrolle gesteigerte Phagozytose (Abb. 6a). Interessant ist, daß auch die Adhäsion von Latexbeads an die Zelloberfläche der Granulozyten erheblich gesteigert ist.

#### **5.1.1.2 Zellfreie Untersuchungen**

Die Fraktionen des Graphitstaubes blieben in allen Testsystemen in einer Konzentration von 200µg im Ansatz ohne Effekt, d.h. sie reagierten weder mit den reaktiven Sauerstoffspezies O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und HOCl (Abb. 7a), noch beeinflussen sie die Aktivität der Enzyme

Myeloperoxidase und Elastase sowie des  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitors (Abb. 8a). Sie waren auch nicht in der Lage, eine Lipidperoxidation auszulösen bzw. aufrechtzuerhalten (Abb. 9a).

Auch das wäßrige Filtrat des Rohrußes verhielt sich in allen zellfreien Modellsystemen inert. Interaktionen mit Superoxid und  $H_2O_2$  durch die partikelhaltigen Fraktionen werden ebenfalls nicht beobachtet. Nur die WS ist in der Lage, mit HOCl (80% Reduktion) abzureagieren (Abb. 7a). Sowohl die Elastase als auch der  $\alpha_1$ -PI werden unter vollständigem Verlust ihrer Aktivitäten an die Rohrußpartikel gebunden. Auch bei der MPO treten Bindungseffekte auf. Hier kommt es aber „nur“ zu einer 40%igen Enzymaktivierung (Abb. 8a). Die LPO-Messungen konnten in Anwesenheit der partikelhaltigen Fraktionen nicht durchgeführt werden, da aufgrund des Schwärzungsgrades die Lichtemission gequenchet wurde.

### 5.1.1.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Fraktionen des Graphitstaubes blieben in allen Testsystemen ohne Wirkung. D.h., reine Kohlenstoffpartikel mit einer geringen Oberfläche ( $15m^2/g$ ) können als reaktionsarm eingestuft werden.

Erwartungsgemäß zeigte das wäßrige Filtrat des Rohrußes keine Aktivität in den Modellsystemen, denn es handelt sich um reines Wasser. Durch die partikelhaltigen Fraktionen kommt es hingegen zu einer verminderten Superoxidbildung während des Respiratory burst, die Phagozytoserate und die Adhäsion opsonisierter Latexpartikel nimmt zu, und die Degranulation wird durch die wäßrige Suspension reduziert.

In den zellfreien Untersuchungen zeichneten sich die Rohrußpartikel vor allem durch ihre adsorptiven Eigenschaften gegenüber Proteinen aus, wobei allerdings nicht wahllos jedes Protein adsorbiert wird:  $TNF\alpha$ , fMLP, XOD und SOD werden überhaupt nicht in ihren Funktionen beeinträchtigt (diese Proteine kommen ebenfalls in den Testsystemen zur Anwendung). Elastase,  $\alpha_1$ -PI und z.T. die MPO eignen sich dagegen als „Bindungspartner“. Interessant ist weiterhin, daß nur die Fraktion der WS mit HOCl interagiert und sowohl das Ausmaß des Respiratory burst als auch scheinbar der Degranulation um 30-40% reduziert. Sehr wahrscheinlich werden durch den Prozeß der wäßrigen Extraktion Oberflächeneigenschaften der Rohrußpartikel verändert (Agglomeration der Partikel; Verminderung der spezifischen Oberfläche).

Sowohl die Hemmung des Respiratory burst (induziert durch opsonisiertes Zymosan) als auch die Stimulation der Phagozytose (induziert durch opsonisierte Latexbeads) und die Zunahme der Adhäsion von opsonisierte Latexbeads scheinen auf einer Wechselwirkung der Rohrußpartikel mit bestimmten Oberflächenrezeptoren der neutrophilen Granulozyten zu

beruhen. Für eine ausführliche Erörterung dieser Theorie sei auf die Diskussion der Eigenschaften von Ölheizungsruß verwiesen (Kapitel 5.1.3.3). Denn der Ölheizungsruß reagierte bezüglich Phagozytose- und Adhäsionsverhalten, bzw. Hemmung des Respiratory burst in gleicher Weise wie der Rohruß, nur liegen hier aufgrund der mit dieser Rußprobe möglichen durchflußzytometrischen Untersuchungen mehr Daten vor.

Unabhängig vom Mechanismus führt die Hemmung des Respiratory burst dazu, daß weniger  $H_2O_2$  gebildet wird, das der MPO als Substrat für die HOCl-Generierung dient. Diese HOCl Bildung wird aber gerade im Degranulationstest erfaßt. Ob der Effekt der reduzierten Degranulation also nur eine Folge des gehemmten Respiratory burst ist, muß noch geklärt werden. Auf jeden Fall wird durch den gedämpften Respiratory burst weniger  $H_2O_2$  und in der Folge weniger HOCl gebildet, das dann auch noch sehr effektiv mit der WS abreagieren kann und dann für andere Funktionen nicht mehr zur Verfügung steht.

## **5.1.2 LKW-Dieseluß**

### **5.1.2.1 Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten**

Ähnlich den Rohrußpartikeln binden die partikelhaltigen Fraktionen des LKW-Dieselußes PMA, DHR und (Z-Ala-Ala)<sub>2</sub>-Rhodamin 110, so daß sowohl der phagosomale  $H_2O_2$ -Nachweis als auch die Erfassung der intrazellulären Elastaseaktivität als Testsysteme ausfallen.

Die extrazelluläre Superoxidbildung (als Parameter des Respiratory burst, Abb. 3b) und die extrazelluläre MPO-Aktivität (als Maß für den Degranulationsprozeß, Abb. 5b) bleiben unbeeinflusst.

Das Phagozytoseverhalten neutrophiler Granulozyten wird in ähnlicher Weise verändert wie es durch Rohruß geschieht (Abb. 6b). Dabei bewirken die partikelhaltigen Fraktionen eine stark erhöhte Adhäsion von opsonisierten Latexbeads an die Zelloberfläche, die Phagozytose an sich, also die Aufnahme der Latexbeads in die Zelle, ist ebenfalls gesteigert.

### **5.1.2.2 Zellfreie Untersuchungen**

In den Versuchsreihen erweisen sich die LKW-Dieselußfraktionen reaktiver als diejenigen des Rohrußes. Vor allem kann auch mit dem wäßrigen Filtrat eine Wirkung beobachtet werden. Im einzelnen: Bei den Interaktionen mit Produkten des Respiratory burst kommt es durch alle drei

Fraktionen zu Reaktionen mit Superoxid und HOCl, wobei der Effekt der wäßrigen Suspension am stärksten ausfällt, gefolgt vom WF und den wäßrig extrahierten Partikeln (Abb. 7b). Die Reaktivitäten des WF und der WEP addieren sich zu derjenigen des WS auf. Im Fall des Superoxids kann sowohl die Kontrollreaktion als auch die Reaktion in Gegenwart der LKW-Rußpartikelfraktionen vollständig durch SOD gehemmt werden. Eine Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird nur mit dem WF beobachtet. Die Reaktivitäten in diesem Modellsystem lassen sich durch Desferrioxamin (Desf.), einem Eisen-Komplexbildner, vollständig unterdrücken - ein Hinweis darauf, daß Eisen-Ionen an der Reaktion beteiligt sind (Abb. 7b).

Die LKW-Fraktionen sind nicht in der Lage von selbst eine Lipidperoxidation auszulösen (Daten nicht gezeigt), aber die partikelhaltigen Fraktionen beschleunigen eine durch Sulfit (die wäßrige Lösung des SO<sub>2</sub>) initiierte Fettsäure-Peroxidation (Abb. 9b). Die WS hat hier eine erheblich stärkere Wirkung als der WEP. Das Filtrat reagiert nur schwach. Auch in diesem Modellsystem der initiierten LPO sind die Reaktivitäten Desferrioxamin-hemmbaar.

In Analogie zu den partikelhaltigen Rohrußfraktionen besitzen auch die partikelhaltigen LKW-Fraktionen Protein-bindende Eigenschaften, wobei die Elastase und der  $\alpha_1$ -PI 100% ihrer Funktion einbüßen, während die MPO wiederum nur z.T. inaktiviert werden kann. Das WF besitzt in diesen Systemen keinen Einfluß (Abb. 8b).

### 5.1.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Eine direkte Beeinflussung des Respiratory burst und der Degranulation durch die Fraktionen des LKW-Dieserußes konnte nicht nachgewiesen werden. Die Phagozytoserate und vor allem auch die Anzahl der lediglich adhärennten Latexbeads steigt in Anwesenheit der partikelhaltigen Fraktionen an. Auch hier wird die Ursache in einer Wechselwirkung mit bestimmten Oberflächenrezeptoren der neutrophilen Granulozyten gesehen (siehe Diskussion Punkt 5.1.3.3).

Die partikelhaltigen LKW-Fraktionen besitzen ähnliche Proteinbindungseigenschaften wie die des Rohrußes. Darüber hinaus spielen bei den Interaktionen mit ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl und reaktive Intermediärprodukte der Lipidperoxidation) wasserlösliche Substanzen eine Rolle, wie die Reaktivitäten des WF in diesen Systemen beweisen.

Die LKW-Dieserußprobe weist eine ähnlich große Oberfläche wie die Rohrußpartikel auf. Im Unterschied zum Rohruß, der zu 99.9999% aus reinem Kohlenstoff besteht, setzt sich der LKW-Dieseruß aus 96.7% Kohlenstoff, 1.6% Schwefel, 1.1% Sauerstoff, 0.1% Eisen und 0.5% übrige Substanzen zusammen.

Für die Proteinbindungseigenschaften und für die Veränderung der Adhäsion bzw. Phagozytose opsonisierter Latexpartikel scheint die große spezifische Oberfläche der LKW-Partikel verantwortlich zu sein:

- 1) Mit den Rohrußfraktionen (vergleichbare Größenordnung der spezifischen Oberfläche) werden gleiche Effekte erzielt;
- 2) das Filtrat bleibt in diesen Systemen ohne Wirkung.

Es handelt sich demnach eindeutig um partikelabhängige Effekte, wobei aber Partikel mit z.B.  $15\text{m}^2/\text{g}$  (siehe Graphitstaub) nicht reagieren, wohl aber solche mit erheblich größeren Oberflächen (Rohruß  $255\text{m}^2/\text{g}$ ; LKW  $178.8\text{m}^2/\text{g}$ ).

Interessant sind nur die Reaktivitäten des wäßrigen LKW-Filtrats. Im Unterschied zum Rohruß-Filtrat, das keinerlei Wirkung zeigte, werden mit dem LKW-Filtrat Interaktionen mit  $\text{O}_2^-$ , mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mit  $\text{HOCl}$  und auch mit Metaboliten der durch Sulfid-induzierten FS-Peroxidation beobachtet. Für diese Effekte müssen Eisenionen verantwortlich sein (genaue Beweisführung für diese Behauptung siehe Anhang 2).

Dies bedeutet, daß ein Teil des am Partikel haftenden Eisens wäßrig mobilisierbar und biologisch aktivierbar ist. Offensichtlich kann nicht alles Eisen durch die Extraktion aus dem Partikel entfernt werden, denn auch die Fraktion der extrahierten Partikel (WEP) interagiert mit Superoxid, Unterchloriger Säure und mit Sulfid im Rahmen der Lipidperoxidation. Interessant ist, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  offenbar nur mit gelöstem Eisen reagiert, während die Lipidperoxidation erheblich besser durch das partikelgebundene Eisen stimuliert wird.

Die LKW-Dieselußpartikel besitzen also neben ihrem partikulären Charakter noch mindestens zwei weitere reaktive Prinzipien:

- 1) ihre große spezifische Oberfläche, die mit Proteinen (freie (Enzyme, Antiproteasen) und gebundene (Rezeptoren)) wechselwirken kann, und
- 2) Eisen, das z. T. wäßrig mobilisierbar und sowohl in gelöster als auch gebundener Form biologisch aktivierbar ist.

### **5.1.3 Ölheizungsruß**

#### **5.1.3.1 Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten**

Die partikelhaltigen Fraktionen dieser Rußprobe binden im Gegensatz zum Rohruß und LKW-Dieseluß weder PMA noch die Fluoreszenzmarker DHF und (Z-Ala-Ala)<sub>2</sub>-Rhodamin, so daß hier die durchflußzytometrische Bestimmung des intrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und Elastase-Gehaltes durchgeführt werden konnte.

### 5.1.3.1.1 Beeinflussung des Respiratory burst

Aus der Abb. 1b geht hervor, daß die Fraktionen „wäßrige Suspension“ und „wäßrig extrahierte Partikel“ eine leichte Aktivierung unstimulierter neutrophiler Granulozyten bewirken. Werden die Leukozyten mit TNF $\alpha$ /fMLP stimuliert und gleichzeitig die Ölheizungsfraktionen zugegeben, ist keine Veränderung des Respiratory burst zu beobachten. Werden dagegen die Neutrophilen 30 Minuten mit den Fraktionen vorinkubiert (50 $\mu$ g Ruß/100.000 Zellen), so findet eine 60%ige Hemmung der phagosomalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion im Fall der partikelhaltigen Fraktionen und eine 10%ige Hemmung durch das Filtrat statt.

In Abb. 11 ist die Dosis-Wirkungsbeziehung dieser Reaktion für die WS wiedergegeben. Schon 2.5 $\mu$ g Ölheizungsruß/100.000 Zellen verursachen eine 10%ige Abnahme der phagosomalen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion.

Betrachtet man die intrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung von neutrophilen Granulozyten, die mit 50 $\mu$ g Ölheizungsruß/100.000 Zellen vorinkubiert wurden, in Abhängigkeit von der fMLP-Konzentration, so fällt auf, daß der Respiratory burst, ausgelöst über TNF $\alpha$  allein (kein fMLP im Ansatz), durch den Ölheizungsruß um 90% gesteigert werden kann. Wird zusätzlich mit fMLP aktiviert, findet eine starke Zunahme des Respiratory burst statt, die in Anwesenheit der Ölheizungsrußpartikel zu 90% unterbunden wird. Eine Vorinkubation der Zellen mit der gleichen Massen-Konzentration an Graphitstaub führt dagegen zu keiner Beeinflussung des mit TNF $\alpha$  alleine bzw. in Kombination mit fMLP ausgelösten Respiratory burst (Abb. 1b).

Werden die neutrophilen Granulozyten mit PMA stimuliert, kommt es mit und ohne Vorinkubationszeit durch alle drei Fraktionen der Ölheizung zu einer Stimulation des Respiratory burst (Abb. 2b). Bei der Erfassung des Respiratory burst mit Hilfe der Hydroxylaminoxidation (hier wird mit opsonisiertem Zymosan stimuliert) findet man in Übereinstimmung zur TNF $\alpha$ /fMLP-Stimulation eine Hemmung der Superoxidbildung (Abb. 3b).

### 5.1.3.1.2 Beeinflussung der Degranulation

Die intrazelluläre Elastaseaktivität wird nicht beeinflusst (Abb. 4b). Bestimmt man dagegen die Degranulation indirekt über die MPO-katalysierte HOCl-Bildung, so findet man diese durch die WS und das WF gleichermaßen reduziert (50%) (Abb. 5b). Diese Hemmung beruht aber nicht auf einer eingeschränkten Degranulation, sondern auf einer Abreaktion der Ölheizungsfraktionen mit dem extrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (s.u.).

### 5.1.3.1.3 Beeinflussung der Phagozytose

Aus Materialmangel wurde dieser Versuch leider nur mit der WS durchgeführt. Diese Fraktion bewirkt in einer Konzentration von 50µg/100.000 Zellen sowohl eine Steigerung der Phagozytose als auch eine erhöhte Adhäsion opsonisierter Latexbeads (Abb. 6b).

### 5.1.3.2 Zellfreie Untersuchungen

Alle drei Fraktionen interagieren mit den Produkten des Respiratory burst ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ ) (Abb. 7b). Die WS und das WF besitzen identische Reaktivitäten. Dies deutet auf wasserlösliche Verbindungen (gelöstes Eisen → siehe Desferrioxamineffekte) als reaktives Prinzip hin (siehe Anhang 2).

Eine Beeinflussung der MPO-Aktivität ist nicht gegeben, obwohl im Testsystem der ACC-Spaltung eine deutliche Hemmung der Ethenfreisetzung auftritt (Abb. 8b). Weiterführende kinetische Untersuchungen zeigten, daß die Ölheizungsfraktionen WS und WF mit dem  $H_2O_2$  abreagieren (Daten nicht gezeigt), welches die MPO als Substrat für die  $HOCl$ -Bildung benötigt, und daß durch alle drei Fraktionen das gebildete  $HOCl$ , welches als Maß für die Enzymaktivität gemessen wird, z.T. abgefangen wird.

Nur die Fraktion der WEP ist in der Lage, die Elastase um 40% nach 180 minütiger Inkubation zu hemmen (Abb. 8b). Der  $\alpha_1$ -PI wird nur durch die WS (40%) und das WF (10%) inaktiviert (Abb. 8b).

Keine der Ölheizungsfraktionen kann eine LPO initiieren, wohl aber propagieren. Bei Initiation von Sulfid findet man in Anwesenheit der WEP eine 200%ige Stimulierung der Chemilumineszenz, in Gegenwart der WS und des WF eine totale Unterdrückung der Lichtemission (Abb. 9b). Gibt man Desferrioxamin zu den Ansätzen, wird die Stimulation durch die WEP erheblich verringert, bei den Fraktionen WS und WF kann nun aber auf einmal eine Lichtemission beobachtet werden. Dies bedeutet, daß wiederum Eisenionen ( $Fe^{3+}$ ) verantwortlich für die beobachteten Effekte sind, wobei in den Fraktionen WS und WF soviel reaktives Eisen vorliegt, daß es zu einem Stop der LPO kommt. Wird ein Teil dieses Eisens komplexiert, tritt eine Lichtemission und damit eine LPO wieder auf.

### 5.1.3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Ölheizungspartikel zeichnen sich durch eine mittlere Größe ihrer spezifischen Oberfläche ( $53.3\text{m}^2/\text{g}$ ) und durch einen enorm hohen Eisengehalt (11%) aus. Dieser hohe Eisengehalt ist sicherlich auf die Probenahmetechnik (die Rußprobe stammt aus dem Rauchrohr der Heizungsanlage, Rost) zurückzuführen, aber trotz dieses artefiziellen Charakters lassen sich mit diesen Eisen-angereicherten Partikeln wertvolle mechanistische Untersuchungen durchführen. Der Kohlenstoffanteil liegt mit 65% deutlich unter demjenigen der bisher diskutierten Partikel (immer über 95%). Sauerstoff ist mit 12% und Schwefel mit 10% vertreten. Eine Adsorption der Proteine MPO, Elastase und  $\alpha_1$ -PI werden nicht beobachtet, d.h. eine spezifische Oberfläche von  $53.3\text{m}^2/\text{g}$  ist nicht ausreichend oder aber wichtige Bindungsstellen sind mit anderen assoziierten Substanzen belegt.

Der hohe Eisenanteil ist für die beobachteten Interaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , HOCl und reaktiven Intermediärprodukten der Lipidperoxidation) verantwortlich (siehe Anhang 2). Offenbar kann ein erheblicher Teil des Eisens wäbrig mobilisiert werden, wie die übereinstimmenden Reaktivitäten der Fraktionen WS und WF zeigen, denn auch die wäßrige Suspension enthält den wasserlöslichen Anteil.

Die Hemmung der intrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion durch die partikelhaltigen Fraktionen des Ölheizungsruß läßt sich auf eine Wechselwirkung der Partikel mit dem fMLP-Rezeptor zurückführen:

- 1) Der eingeschränkte Respirator burst wird nur in Gegenwart von Rußpartikeln beobachtet, das Filtrat hat keinen Einfluß.
- 2) Der eingeschränkte Respiratory burst tritt nur nach Vorinkubation der Neutrophilen mit den Ölheizungspartikeln auf, d.h. die Affinität der Rußpartikel zum fMLP-Rezeptor ist (erwartungsgemäß) geringer als diejenige von fMPL selbst, so daß eine Besetzung des Rezeptors mit Rußpartikeln nur in Abwesenheit des leukotaktischen Peptids erfolgen kann. fMLP-Rezeptoren finden sich in einer Dichte von bis zu 70.000 pro Zelle.
- 3) Nur der durch fMLP zusätzlich zu  $\text{TNF}\alpha$  ausgelöste oxidative Metabolismus wird durch den Ölheizungsruß unterdrückt. Das bedeutet, daß durch die Ölheizungspartikel nicht wahllos alle Rezeptoren blockiert werden, sondern eine spezifische Bindung an ganz bestimmte Rezeptoren stattfindet.

Wenn neutrophile Granulozyten mit PMA aktiviert werden, so beobachtet man in Gegenwart aller drei Ölrück-Fraktionen, also auch des Filtrats, eine erhebliche Stimulierung des Respiratory burst, unabhängig von einer Vorinkubationszeit. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, daß durch die partikelhaltigen Fraktionen weder die Proteinkinase C, die durch PMA aktiviert wird, noch die NADPH-Oxidase, die letztlich für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung verantwortlich ist, inhibiert werden können.

Der Mechanismus der Stimulation des durch PMA-induzierten Respiratory burst durch alle drei Ölheizungsruß-Fractionen ist unverstanden. Hier scheinen Rezeptorinteraktionen keine Rolle zu spielen, wohl aber wäßrig mobilisierbare Bestandteile des Ölheizungsrußes, wie die Reaktivität des Filtrats nahelegt.

Sowohl die Adhärenz opsonisierter Latexpartikel an die Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten, als auch die Phagozytose dieser Latexpartikel selbst, ist nach Vorinkubation der Zellen mit den Ölheizungspartikeln erhöht. Dies läßt sich folgendermaßen erklären: Die Kontaktaufnahme und Ingestion nicht opsonisierten Fremdmaterials, wie es die Rußpartikel darstellen, geschieht über die Bindung an spezifische Integrin-Rezeptoren (ANDERSON et al., 1986). Zu den Integrin-Rezeptoren gehören die Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR3 (CD11b/CD18), die sich als die Rezeptoren für unopsonisiertes Fremdmaterial entpuppten (SAKAI et al., 1994). Die Bindung an CR1- und CR3-Rezeptoren und die zusätzliche Bindung der Ölheizungspartikel an den fMLP-Rezeptor bewirkt eine erhöhte Expression der Komplementrezeptoren auf der Zelloberfläche von Neutrophilen (innerhalb von Minuten) (KINDZELSKII et al., 1994; MARRA et al., 1990). Auch opsonisierte Fremdpartikel binden an die Komplementrezeptoren über Komplementbruchstücke, die sich während des Opsonisierungsvorganges an die Oberfläche der Latexbeads geheftet haben.

Durch Vorbehandlung der Neutrophilen mit Ölheizungsruß ist es nun zu einer erhöhten Komplementrezeptordichte auf der Zelloberfläche gekommen, die nun eine erhöhte Adhäsion von opsonisierten Latexbeads nach sich zieht.

Interessant ist die Tatsache, daß eine Bindung an CR3 noch keine Ingestion bewirkt. Eine Aufnahme von Partikeln über CR3-Rezeptoren geschieht erst, wenn dieser Rezeptor „Phagozytose-kompetent“ gemacht wird über ein zusätzliches Signal, z.B. Fibronektin, das neben Komplementbruchstücken und Immunglobulinen zu den Opsoninen zählt und sich ebenfalls auf der Oberfläche der opsonisierten Latexbeads befindet. Über die Adhäsion kommt es nun zur gesteigerten Ingestion der Latexbeads.

Die Aufnahme von Fremdmaterial über CR3-Rezeptoren löst keinen Respiratory burst und keine Degranulation aus (WRIGHT & SILVERSTEIN, 1982).

Erst eine Bindung von opsonisierten Partikeln über den Fc $\gamma$ II-Rezeptor (bindet IgG) führt zur Phagozytose und zur Aktivierung der Degranulation und des oxidativen Metabolismus (WILLIS et al., 1988; CROCKETT-TORABI & FANTONE, 1990). D.h., der neutrophile Granulozyt reagiert auf unopsonierte Fremdpartikel in Richtung Clearance: Er nimmt den Fremdpartikel auf, ohne anschließend mit einer möglicherweise schädigenden proinflammatorischen Antwort zu reagieren, und transportiert ihn ab. Bei opsonierten Partikeln (i.d.R. Fremdorganismen) hingegen führt die Ingestion zur oxidativen und

enzymatischen Zerstörung des Phagosominhalts; hier findet eine echte Infektabwehr mit allen Konsequenzen statt.

Eine selektive Degranulation des Respiratory burst und der Degranulation durch unopsonierte Partikel wird auch für Alveolarmakrophagen beschrieben (KOBZIK et al., 1990), wobei hier unopsonierte Partikel, z.B. Dieselrußpartikel über den Scavenger-Typ-Rezeptor aufgenommen werden (KOBZIK, 1995).

In Anwesenheit von sowohl unopsonierten als auch opsonierten Partikeln werden Mischreaktionen beobachtet, wobei die Adhäsion und Ingestion opsonierter Partikel zunimmt, der Respiratory burst und die Degranulation aber negativ beeinflusst werden (siehe Abnahme der extrazellulären Superoxidbildung und der extrazellulären MPO-Aktivität durch Ölheizungsruß; in diesen Testsystemen wurden die Zellen mit opsoniertem Zymosan stimuliert!).

Zusammenfassend läßt sich für den Ölheizungsruß feststellen, daß er ausgeprägte Interaktionen mit neutrophilen Granulozyten eingehen kann, wobei die Funktionen dieser Phagozyten je nach Situation (Aktivierung mit opsonierten Partikeln (Latexbeads, Zymosan) oder löslichen Substanzen (TNF $\alpha$ , fMLP oder PMA)) unterschiedlich beeinflusst werden. Die Bindungseigenschaften gegenüber freien Proteinen (MPO, Elastase und  $\alpha_1$ -PI) sind nicht mehr so deutlich wie bei den Rohruß- und LKW-Partikeln, die über eine 5- bzw. 4-fach größere spezifische Oberfläche verfügen. Auch beim Ölheizungsruß ist das enthaltene Eisen wäßrig mobilisierbar und biologisch aktiv.

#### **5.1.4 Holzheizungsruß**

##### **5.1.4.1 Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten**

###### **5.1.4.1.1 Beeinflussung des Respiratory burst**

Wie die Ölheizungspartikel interferieren auch die Holzheizungspartikel nicht mit den durchflußzytometrischen Nachweissystemen.

Die phagosomale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion wird bei Aktivierung der Zellen mit TNF $\alpha$ /fMLP, unabhängig von einer Vorinkubation, durch keine der Holzheizungs-Fractionen verändert (Abb. 1b). Bei Aktivierung der Zellen mit PMA führt nur die WS zu einer leichten Stimulation des Respiratory burst, mit und ohne Vorinkubation (Abb. 2b).

Die extrazelluläre Superoxidbildung bleibt scheinbar ebenfalls durch alle drei Fraktionen unbeeinflusst (Abb. 3b), aber diese Superoxidbildung ist im Gegensatz zur Kontrolle (keine

Behandlung der Zellen mit Rußpartikeln) nicht mehr zu 80%, sondern nur noch zu 20% SOD-hemmbar. Die extrazelluläre Superoxidbildung wird mit Hilfe der Hydroxylaminoxidation quantifiziert. Hydroxylamin wird nicht nur von  $O_2^-$ , sondern auch von  $OH\cdot$  oder der Unterchlorigen Säure oxidiert, deshalb überprüft man die Abhängigkeit der Hydroxylaminoxidation von Superoxid immer durch Zugabe von SOD.

Im Gegenwart der Holzheizungsfraktionen, auch des Filtrats, ist es nun offenbar zu einer Verschiebung der gebildeten Oxidantien, nämlich von Superoxid zu HOCl oder  $OH\cdot$ , gekommen.

#### **5.1.4.1.2 Beeinflussung der Degranulation**

Weder die intrazellulären Elastaseaktivität (Abb. 4b) noch die extrazelluläre MPO-Aktivität (Abb. 5b) werden durch die Holzheizungsfraktionen moduliert.

#### **5.1.4.1.3 Beeinflussung der Phagozytose**

In Anwesenheit der partikelhaltigen Fraktionen kommt es zu einer leichten Steigerung der Phagozytose opsonisierter Latexbeads; deren Adhäsion ist nicht deutlich erhöht (Abb. 6b).

#### **5.1.4.2 Zellfreie Untersuchungen**

Alle drei Fraktionen reagieren mit Superoxid,  $H_2O_2$  und HOCl (Abb. 7b). Bei der Interaktion mit Superoxid wird in Anwesenheit der partikelhaltigen Fraktionen eine Hemmung, in Gegenwart des Filtrats eine starke Stimulation beobachtet.

Proteinbindungseffekte werden nicht beobachtet. Die Elastase, MPO und der  $\alpha_1$ -PI bleiben in ihren Funktionen unbeeinflusst (Abb. 8b). Auch durch den Holzheizungsruß kann eine LPO nicht ausgelöst, aber verstärkt werden. Alle drei Fraktionen bewirken eine ausgeprägte Stimulation der Chemilumineszenz, die durch Desferrioxamin hemmbar ist (Abb. 9b).

#### **5.1.4.3 Zusammenfassung und Diskussion**

Der Holzheizungsruß besitzt eine ähnlich kleine spezifische Oberfläche wie der Graphitstaub ( $15.3\text{m}^2/\text{g}$ ). Beide Rußtypen sind nicht in der Lage, Elastase, MPO und  $\alpha_1\text{-PI}$  zu binden. Beide Rußtypen beeinflussen die untersuchten Funktionen neutrophiler Granulozyten in gleicher Weise: Keine Veränderung des Respiratory burst und der Degranulation, nur leichte Steigerung der Phagozytose opsonisierter Latexbeads.

Im Gegensatz zum Graphitstaub (99.9999% Kohlenstoff) besteht der Holzheizungsruß zu 57% aus Kohlenstoff, zu 16% aus Sauerstoff, zu 3% aus Schwefel, zu 1.1% aus Eisen und zu 16% aus Calcium. Diese unterschiedliche chemische Zusammensetzung ist für die unterschiedliche Reaktivität der Holzheizungsfraktionen gegenüber ROS einschließlich LPO-Intermediaten im Vergleich zum Graphit verantwortlich.

Während die Stimulation der Sulfid-induzierten LPO um 400%! durch alle Holzheizungsfraktionen auf eine Beteiligung von Eisen zurückgeführt werden kann, gestaltet sich die Interpretation der Interaktion mit  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und HOCL aufgrund der uneinheitlichen Effekte als schwierig.

Zusammenfassend zeichnet sich diese Rußprobe vor allem durch Reaktivität bestimmter Inhaltsstoffe (u.a. Eisenionen) aus. Aufgrund der geringen spezifischen Oberfläche werden weder Protein-bindende Eigenschaften noch Modulationen der Funktionen neutrophiler Granulozyten beobachtet.

## **5.2 Mineralfasern**

### **5.2.1 Blauasbest oder Krokydolith**

#### **5.2.1.1 Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten**

##### **5.2.1.1.1 Beeinflussung des Respiratory burst**

Werden neutrophile Granulozyten mit  $\text{TNF}\alpha/\text{fMLP}$  und den Krokydolithfraktionen aktiviert, so beobachtet man eine starke Stimulation der phagosomalen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion in Anwesenheit der faserhaltigen Fraktionen (Abb. 1c). Das Filtrat bleibt ohne Einfluß. Werden dagegen die Phagozyten 30min. mit den Fasern vorinkubiert und dann erst mit  $\text{TNF}\alpha/\text{fMLP}$  aktiviert, sind keine Veränderungen des Respiratory burst im Vergleich zur Kontrolle festzustellen, d.h. die Aktivierung durch  $\text{TNF}\alpha/\text{fMLP}$  bleibt ungestört. Auffällig ist, daß Asbestfasern alleine (ohne  $\text{TNF}\alpha/\text{fMLP}$ ) eine erhebliche Aktivierung des Respiratory burst

verursachen. Aktiviert man den Respiratory burst mit PMA, treten sowohl ohne als auch mit Vorinkubationszeit keine Veränderungen des Respiratory burst auf (Abb. 2c).

Auch die extrazelluläre Superoxidbildung (Abb. 3c) kann durch Blauasbest nicht modifiziert werden.

#### **5.2.1.1.2 Beeinflussung der Degranulation**

Asbestfasern per se lösen keine Degranulation aus. Wird die Degranulation durch PMA induziert, fällt sie in Anwesenheit der faserhaltigen Fraktionen stärker aus (Abb. 4c). Auch in Kombination mit TNF $\alpha$ /fMLP wird eine verstärkte Degranulation beobachtet (Daten nicht gezeigt). Das Filtrat beeinflusst die PMA- und TNF $\alpha$ /fMLP-induzierte Degranulation nicht. Eine Beeinflussung der extrazellulären MPO-Aktivität durch die Fraktionen des Blauasbests ist nicht gegeben (Abb. 5c).

#### **5.2.1.1.3 Beeinflussung der Phagozytose**

Sowohl die Adhärenz als auch die Phagozytose opsonisierter Latexbeads ist in Anwesenheit der faserhaltigen Blauasbestfraktionen erheblich gesteigert, während das Filtrat keine Wirkung zeigt (Abb. 6c).

#### **5.2.1.2 Zellfreie Untersuchungen**

Die chemische Reaktivität von Krokydolith ist gering. Proteinbindungseffekte treten nicht auf (Abb. 8c). Schwache Interaktionen werden nur mit Superoxid und HOCl beobachtet (Abb. 7c).

#### **5.2.1.3 Zusammenfassung und Diskussion**

Im Gegensatz zu den Rußpartikeln besitzen die Asbestfasern weder Proteinbindungseigenschaften (spezifische Oberfläche: ca 8m<sup>2</sup>/g) noch eine ausgesprochene chemische Reaktivität in unseren Systemen - trotz des hohen Eisenanteils (30%). Dieses Eisen kann durch die wäßrige Extraktion nicht aus der Faser herausgelöst werden (WF ohne Wirkungen) und ist erst biologische verfügbar, wenn es durch Komplexbildner wie EDTA mobilisiert wird (ELSTNER et al., 1988).

Trotz der geringen spezifischen Oberfläche, aber aufgrund der faserförmigen Gestalt werden Interaktionen mit neutrophilen Granulozyten beobachtet. Die erhöhte Adhärenz und Phagozytose opsonisierter Latexbeads könnte auf den gleichen Mechanismen beruhen wie sie für die Ölheizungspartikel ausführlich diskutiert wurden, obwohl über eine Bindung von unopsonierten Fasern an neutrophile Komplementrezeptoren aus der Literatur überraschenderweise nichts bekannt ist.

Selbst über genaue Aufnahmemechanismen der sonst so intensiv untersuchten Asbestfasern in Alveolarmakrophagen wird in der Literatur nichts berichtet.

Durch mechanische Reizung der Zellen sind Asbestfasern per se in der Lage den Respiratory burst zu aktivieren. Studien mit spezifischen Inhibitoren der Signaltransduktion zeigten, daß die durch Blauasbest induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten abhängig von einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über Ca-Membran-Kanäle ist und mit Phagozytoseprozessen primär nicht korreliert werden kann (ISHIZAKI et al., 1997).

Das Öffnen der Ca-Kanäle beruht auf einer Interaktion der Asbestfasern mit der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten, die zu Membranpotentialveränderungen führt.

Im Gegensatz zur Phagozytose ist die Auslösung des Respiratory burst und der Degranulation strikt Ca-abhängig (SKLAR & OADES, 1985), so daß diese Funktionen durch Krokydolith positiv beeinflusst werden. Insbesondere in Kombination mit löslichen Stimulantien ( $\text{TNF}\alpha$ /fMLP und PMA) werden in unseren Versuchen synergistische Effekte beobachtet, die auch in der Literatur beschrieben sind (KOCKARS & SAVOLAINEN, 1992). Dies bedeutet, daß Krokydolith die Antwort neutrophiler Granulozyten auf Entzündungsmediatoren „primen“ kann.

## **5.2.2 Künstliche Mineralfasern (Steinwollfaser 8 und 13)**

### **5.2.2.1 Untersuchungen mit neutrophilen Granulozyten**

Die Steinwollfasern 8 und 13 beeinflussen den Respiratory burst, die Degranulation und die Phagozytose in gleicher Weise wie Asbest, nur sind die Effekte (wenn vorhanden) weniger stark ausgeprägt (Abb. 1c-5c).

Im Unterschied zum Asbest bewirken die künstlichen Mineralfasern keine erhöhte Phagozytose opsonisierter Latexbeads, obwohl deren Adhärenz erheblich (Steinwollfaser 8) bzw. zumindest deutlich (Steinwollfaser 13) gesteigert ist (Abb. 6c).

### **5.2.2.2 Zellfreie Untersuchungen**

Die Filtrate der künstlichen Mineralfasern verhalten sich in den zellfreien Untersuchungen inert. Die faserhaltigen Fraktionen interagieren lediglich mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wobei insbesondere Fasern der Steinwolle 13 eine ausgeprägte Reaktion zeigen (Abb. 7c). Diese Interaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist auch die Ursache der 80-100%igen Hemmung der ACC-Spaltung im MPO-Testsystem, und nicht eine Inaktivierung der MPO. Die Fraktionen beider Mineralfasern üben keinen Einfluß auf die Funktionen der Elastase, der MPO und des  $\alpha_1$ -PI aus (Abb. 8c) und initiieren auch keine LPO. Im Gegensatz zur Mineralfaser 13 hemmen die faserhaltigen Fraktionen der Mineralfaser 8 die Sulfit-induzierte Chemilumineszenz um 50% (Abb. 9c).

### **5.2.2.3 Zusammenfassung und Diskussion**

Wie die Asbestfasern besitzen auch die künstlichen Mineralfasern keine Protein-bindenden Eigenschaften (spezifische Oberflächen deutlich unter 1m<sup>2</sup>/g). Sie verfügen auch nicht über wässrig mobilisierbare Komponenten, wie die ausbleibende Wirkung der Filtrate in allen Modellsystemen zeigt. Trotzdem sind die Steinwollfasern chemisch reaktiver als der Krokydolith und lassen sich außerdem in unseren (zellfreien) Systemen hinsichtlich ihrer chemischen Reaktivität unterscheiden. Die Ursache dieser Diversität ist noch nicht geklärt, muß aber mit der chemischen Zusammensetzung in Zusammenhang stehen.

In den zellulären Systemen zeigen die künstlichen Mineralfasern große Übereinstimmung mit den durch Asbest ausgelösten Reaktionen, so daß hier prinzipiell auf die gleichen zugrunde liegenden Mechanismen geschlossen werden kann.

## 6. Vergleichende Diskussion und Schlußfolgerungen

Die Reaktivität der Rußproben in unseren Testsystemen hängt eindeutig vom Ausmaß der spezifischen Oberfläche und von der Verfügbarkeit reaktiven Eisens ab.

Die Größe der spezifischen Oberfläche entscheidet dabei einmal über Bindungseigenschaften von löslichen Proteinen wie sie die Myeloperoxidase, die Elastase und der  $\alpha_1$ -PI darstellen. Rußpartikel, die eine spezifische Oberfläche unter  $50\text{m}^2/\text{g}$  besitzen (Graphitstaub und Holzheizungsruß), aber auch die Asbest- und Steinwollfasern (spezifische Oberfläche  $8\text{m}^2/\text{g}$  bzw. unter  $1\text{m}^2/\text{g}$ ) zeigen keine Bindungseigenschaften - unabhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung.

Die Adsorption bzw. Inaktivierung der MPO, der Elastase und des  $\alpha_1$ -PI könnte eine Ursache sein für im Tierexperiment beobachtete emphysematische Veränderungen in der peripheren Lunge (MAUDERLY et al., 1987) und einer eingeschränkten Immunabwehr bei infektiösen Lungenkrankheiten (LEWIS et al., 1989) nach Belastung mit Dieselruß. Für emphysematische Lungenschäden wird als Ursache ein Ungleichgewicht zwischen proteolytischen Enzymen und Proteinaseinhibitoren zugunsten der Proteasen angenommen. Die Aktivitäten proteolytischer Enzyme sind hoch reguliert. Der  $\alpha_1$ -PI ist verantwortlich für die Inhibierung der Elastase, die Elastin, aber auch interstitielles Kollagen, Proteoglycan, Fibronectin und Lamarin abbaut (FALLER et al., 1993). Die Elastase spielt aber auch eine wesentliche Rolle bei der Diapedese neutrophiler Granulozyten (TARGOWSKI & NIEMIALTOWSKI, 1986). ECKLE et al. (1992) schreiben diesem Enzym eine down-regulatorische Funktion für Entzündungen zu. Denn die Elastase spaltet IgG zu Fc- und Fab-Fragmenten. Das Fc-Fragment inhibiert die durch fMLP vermittelte Chemotaxis und die Produktion von Superoxidanionen, das Fab-Fragment stimuliert die Freisetzung der Elastase, die vermehrt IgG spaltet und dadurch die Chemotaxis und Aktivierung weiterer neutrophiler Granulozyten verhindert. Der  $\alpha_1$ -PI wird durch endogene bzw. exogene potente Oxidantien inaktiviert wie z.B. HOCl (MATHESON et al., 1979) oder Oxidantien, die im Tabakrauch vorkommen (JANOFF et al., 1983; CARP & JANOFF, 1978). Das Emphysem ist der typische Endzustand der Chronisch Obstruktiven Lungenkrankheit (COL), der häufigsten chronischen Lungenkrankheit überhaupt (NETTER, 1982). Dem Inhalationsrauchen wird als Ursache der COL die größte Bedeutung zugemessen. Die partikuläre Phase des Tabakrauches, der Tabakteer, ähnelt in gewisser Weise unseren Rußpartikeln; auch er besteht aus einem Kohlenstoffkern mit adhären organischen Verbindungen. Die Inaktivierung des  $\alpha_1$ -PI könnte nach unseren Ergebnissen also nicht nur oxidativ ausgelöst sein, sondern auch durch Adsorptionsvorgänge an den Teerpartikel.

Die Bildung der HOCl wird von der granulozytären MPO katalysiert, ein Enzym, das ja auch in unseren Untersuchungen adsorptiv inaktiviert wurde. HOCl dient nicht nur der Hemmung

des  $\alpha_1$ -PI. Die unterchlorige Säure ist auch verantwortlich für die Aktivierung der Kollagenase und Gelatinase. Die Hauptaufgabe der HOCl besteht aber in der Pathogenabwehr sowie in der Reaktion mit bakteriellen Toxinen (ALBRICH & HURST, 1982). Eine verminderte HOCl-Bildung ist im Rahmen der Infektabwehr eher von Nachteil. Zur adsorptiven Inaktivierung der MPO durch Rußpartikel kommt noch hinzu, daß HOCl selbst an der Oberfläche der Rußpartikel abreagiert, wie unsere Ergebnisse zeigen.

Zum zweiten entscheidet das Ausmaß der spezifischen Oberfläche bei Rußpartikeln über ihre Interaktion mit neutrophilen Granulozyten. Sowohl der Graphitstaub als auch der Holzheizungsruß, die beide eine spezifische Oberfläche von  $15\text{m}^2/\text{g}$  aufweisen, verändern die Funktionen neutrophiler Granulozyten nicht - unabhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung. Rußpartikeln mit einer spezifischen Oberfläche  $>50\text{m}^2/\text{g}$  (Dieselruß, Ölheizungsruß und Rohruß) gehen dagegen ausgeprägte Interaktionen mit neutrophilen Granulozyten ein, wobei die Funktionen dieser Zellen je nach Situation (Aktivierung der Neutrophilen zusätzlich mit opsonisierten Partikeln (Latexbeads, Zymosan) oder löslichen Substanzen ( $\text{TNF}\alpha$ , fMLP und PMA)) unterschiedlich beeinflusst werden. Die in den Zellversuchen ermittelten Ergebnisse lassen, ohne direkten Beweis, den Schluß zu, daß nicht opsonisierte Rußpartikel mit einer entsprechend großen spezifischen Oberfläche an Komplementrezeptoren gebunden werden können, wie dies für andere sphärische unopsonierte Partikel beschrieben wurde (ANDERSON et al., 1986).

Eine Aufnahme von Fremdpartikeln über Komplementrezeptoren in die Zelle führt wie schon dargestellt (Kapitel 5.1.3.3) zu einer selektiven Downregulation des Respiratory burst und der Degranulation. D.h. die Zelle reagiert auf unopsonierte Partikel in Richtung Clearance: Aufnahme, aber keine inflammatorischen Folgereaktionen.

Zumindest für die Ölheizungsrußpartikel kann eine Blockierung des fMLP-Rezeptors angenommen werden. Über diesen Rezeptor werden sowohl die Chemotaxis als auch der Respiratory burst reguliert.

Mit einer Blockade des fMLP-Rezeptors, der im Vergleich zu eindeutig in unseren Untersuchungen nicht beeinflussten Rezeptoren ( $\text{Fc}\gamma\text{II}$ -,  $\text{TNF}\alpha$ - und Komplementrezeptoren) in ungleich größerer Dichte auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten exprimiert sind (bis zu 70,000/Zelle), könnte man auch die oben schon diskutierte eingeschränkte Immunabwehr bei infektiösen Lungenerkrankungen durch Dieselruß im Tierversuch erklären (LEWIS et al., 1989; HATCH et al., 1985).

Partikel mit ausgesprochen großen Oberflächen sind die ultrafeinen Partikel (UFP). Mechanistische Studien zur Wirkungsweise der UFP im Respirationstrakt zeigen, daß die mit der Induktion einer inflammatorischen Antwort korrelierende Größe das Ausmaß der

spezifischen Oberfläche zu sein scheint (OBERDÖRSTER et al., 1996). Auch Untersuchungen zur Tumorentwicklung in Overload-Experimenten mit nicht toxischen feinen und ultrafeinen Stäuben ergaben, daß die Kanzerogenität am besten mit dem Ausmaß der Partikeloberfläche und nicht mit der Masse korrelierte (MORROW et al., 1996). Es besteht demnach die Möglichkeit, daß auch UFP durch adsorptive Eigenschaften ihrer riesigen Oberfläche wirken. Bekannt ist, daß UFP ähnlich wie Asbestfasern oder Quarz einen oxidativen Streß induzieren können. So konnte für ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Partikel gezeigt werden, daß sie im Vergleich zu feinen TiO<sub>2</sub>-Partikeln bei gleicher Masse mehr Plasmid-Strangbrüche verursachen. Dieser Effekt war durch Mannit, einem OH-Radikal-Scavenger, inhibierbar (DONALDSON et al., 1996). Im gleichen Plasmid-Testsystem zeigten ultrafeine Kobalt- und Nickel-Partikel eine stärkerer Aktivität als ultrafeine TiO<sub>2</sub>-Teilchen (ZHANG et al., 1998). Dieses unterschiedliche Reaktionsverhalten der UFP ließ sich auch im Tierexperiment wiederholen, in dem ultrafeine Ni-Partikel nach intratrachealer Instillation eine schwere, anhaltende Lungenentzündung auslösten, während ultrafeine Co-Partikel eine schwächere und ultrafeine TiO<sub>2</sub> eine noch geringere Reaktion verursachten (ZHANG et al., 1998). Die Autoren diskutieren diese abgestufte Reaktivität mit dem unterschiedlichen Potential der drei UFP, freie Radikale zu generieren. JANSSEN & MITARBEITER wiesen schon 1994 eine erhöhte Expression "antioxidativer" Gene in Ratten nach inhalativer Exposition ultrafeiner TiO<sub>2</sub>-Partikel nach (JANSSEN et al., 1994). Unklar ist, ob diese Geninduktion direkt durch von den Partikeln stammende freie Radikale ausgelöst wurde oder indirekt durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten infolge der partikulären Reizung der Lunge.

Darüberhinaus zeigen diese Untersuchungen, daß das oxidative Potential von UFP auch von ihrer chemischen Beschaffenheit abhängen muß, das heißt, die Partikelanzahl und damit verbunden die große Oberfläche allein ist möglicherweise doch nicht das einzige Wirkungskriterium.

Auch der LKW-Dieseluß, der Öl- und Holzheizungsruß zeigen vom Ausmaß der spezifischen Oberfläche unabhängige Effekte, die auf ihre chemische Zusammensetzung zurückzuführen sind. Den hochreinen Kohlenstoffstäuben fehlen diese Eigenschaften. Gemeint sind die beobachteten Interaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies und Intermediärprodukten der Lipidperoxidation. Eine Beteiligung von Eisen an diesen Reaktionen wurde nachgewiesen, wobei ein Teil des Eisens wässrig mobilisierbar war. Nur gelöstes Eisen ist in der Lage eine Fenton-Reaktion auszulösen, d.h. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum OH-Radikal zu reduzieren. Gerade in Anwesenheit des wässrigen Filtrats des Ölheizungsruß und der wässrigen Suspension, die ja auch den wasserlöslichen Anteil beinhaltet, wird eine ausgeprägte Fenton-Reaktion beobachtet. Aber auch das nicht wässrig mobilisierbare Eisen der Rußpartikel ist biologisch

aktivierbar. So werden z.B. Reaktionen mit Superoxid beobachtet, wobei es auch hier im Rahmen einer Haber-Weiss-Reaktion zur OH-Radikalbildung kommt.

Schon in früheren Untersuchungen wurden sauerstoffaktivierende Eigenschaften von Dieselruß, Öl- und Holzheizungsruß dokumentiert (HIPPELI & ELSTNER, 1989; BLAUROCK et al., 1992; HIPPELI et al., 1994; HIPPELI & ELSTNER, 1995).

Reaktive Sauerstoffspezies sind direkt an der Veränderung genetischen Materials beteiligt und bewirken als Initiatoren der LPO eine oxidative Schädigung des betroffenen Gewebes (ELSTNER, 1990). Ist diese primäre Läsion ausreichend intensiv, reagiert das Gewebe in nachgeschalteten Reaktionssequenzen mit einer Entzündung, in deren Verlauf wiederum reaktive Sauerstoffabkömmlinge entstehen, die a. den oxidativen Primärschaden samt den dann einsetzenden Sekundärreaktionen verstärken und b. für genotoxische bzw. kanzerogene Prozesse zur Verfügung stehen. Klassische, gut untersuchte Beispiele der Interaktion von inflammatorischen und kanzerogenen Vorgängen bilden die Schädigung der Lunge durch Tabakrauch und Asbestfaser.

Auch Mineralfasern besitzen sauerstoffaktivierende Eigenschaften, wobei insbesondere für Krokydolith die Übergangsmetall-katalysierte OH-Radikalbildung gezeigt wurde (WEITZMAN & GRACEFFA, 1984; ZALMA et al., 1987). Die Bioverfügbarkeit von Eisen ist bei den von uns untersuchten Mineralfasern in keinem zu den Rußproben vergleichbaren Ausmaß gegeben. Eine wässrige Mobilisierung (ohne Chelatoren) konnte nicht nachgewiesen werden. Die allerdings schwachen Interaktionen der faserhaltigen Asbestfraktionen mit Superoxid und HOCl lassen sich auf fasergebundenes Eisen zurückführen. Die künstlichen Mineralfasern sind chemisch reaktiver. Sie interagieren nicht mit Superoxid, aber dafür mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl und LPO-Metaboliten.

Rezeptor-blockierende oder Protein-bindende Eigenschaften werden bei den Fasern wohl aufgrund ihrer geringen spezifischen Oberfläche nicht beobachtet.

Die direkten Effekte auf neutrophile Granulozyten sind aber im Vergleich zu den Rußpartikeln wesentlich größer. Die Mineralfasern aktivieren im Gegensatz zu Rußpartikeln selbst schon den Respiratory burst und bewirken bei gleichzeitiger Rezeptor-vermittelter Aktivierung eine überadditive Antwort der Zelle. Außerdem wird die PMA- und TNF $\alpha$ /fMLP-induzierte Degranulation erheblich verstärkt. Die Interaktion der Fasern mit Neutrophilen gestaltet sich offenbar völlig anders als die von Rußpartikeln. Unopsonierte Fasern scheinen nicht an Rezeptoren gebunden zu werden; sie bewirken eine Aktivierung der Zelle durch mechanische Reizung der Zellmembran. Diese Reizung führt, wie schon unter Kapitel 5.2.1.3 diskutiert, zur Öffnung von Ca-Kanälen und zu einem Influx von Ca. Im Gegensatz zur Phagozytose ist die Auslösung des Respiratory burst und der Degranulation strikt Ca-abhängig, so daß diese Funktionen durch Krokydolith positiv beeinflusst werden. Insbesondere in Kombination mit

löslichen Stimulantien (TNF $\alpha$ /fMLP und PMA) werden in unseren Versuchen synergistische Effekte beobachtet, die auch in der Literatur beschrieben sind. Dies bedeutet, daß Krokydolith die Antwort neutrophiler Granulozyten auf Entzündungsmediatoren „primen“ kann.

Die Ergebnisse zeigen auch, daß natürliche und künstliche Mineralfasern den gleichen Reaktionsmechanismen unterliegen. Die in vivo beobachtete geringere Pathogenität künstlicher Mineralfasern beruht in erster Linie auf ihrer geringeren Biobeständigkeit, die insbesondere in letzter Zeit durch gesetzliche Vorgaben in zahllosen tierexperimentellen Untersuchungen nachgewiesen wurde (z.B. BERNSTEIN et al., 1995; HESTERBERG et al., 1995; MUSSELMAN et al., 1994; KAMSTRUP et al., 1998).

Zusammenfassend können hinsichtlich der Toxizitätsmechanismen von Feinstäuben folgende Schlüsse gezogen werden:

1) Die Auslösemechanismen für Partikel-induzierte Lungenerkrankungen sind für faserförmige Partikel anders als für sphärische Partikel. Damit läßt sich die eingangs gestellte Frage nach der Existenz grundsätzlicher Unterschiede der Reaktionsmechanismen zwischen diesen Partikeltypen eindeutig mit ja beantworten.

2) Das Ausmaß der spezifische Oberfläche spielt ein bisher wohl weit unterschätzte Rolle im pathogenem Geschehen. Eine große spezifische Oberfläche ist nicht nur Ausdruck einer großen Partikeldichte (hohe Teilchenanzahl, aber geringe Größe der Einzelteilchen), sondern sie besitzt darüber hinaus die Eigenschaft bestimmte Verbindungen zu adsorbieren, die dadurch inaktiv oder durch ungünstige Kompartimentierung dem Reaktionsgeschehen entzogen werden. Die Folge kann eine Störung fein ausbalancierter Stoffwechselfvorgänge und hoch regulierter Prozesse, wie Immunantworten oder allergische Reaktionen darstellen, sein. Gerade für die in jüngster Zeit viel diskutierten UFP bietet sich dieser Erklärungsansatz der Wirkung an. **Hier besteht Forschungsbedarf!**

3) Die unterschiedliche chemische Zusammensetzung von Rußpartikeln bzw. Fasern beeinflusst nicht ihre grundsätzliche Interaktion mit Neutrophilen, wohl aber Folgereaktionen. Ist z.B. der Respiratory burst erst einmal ausgelöst, dann kann es durch biologisch aktivierbares Eisen zur Bildung von OH-Radikalen kommen. Im allgemeinen hängen sauerstoffaktivierende Eigenschaften von der Anwesenheit redoxcyclisierender Verbindungen ab (Übergangsmetalle, Nitroaromaten und Chinone). Insofern spielt die chemische Zusammensetzung natürlich eine Rolle hinsichtlich der Reaktivität. Auch das Vorhandensein oder Fehlen mutagener Substanzen im Rußpartikel beeinflusst dessen tumorigene Wirkung. Bei Mineralfasern entscheidet nicht zuletzt deren chemische Zusammensetzung über ihren Aufenthalt in der Lunge.

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß eines der Toxizitätsprinzipien von Rußpartikeln (PAH-Depot, unspezifischer Partikelmasse-Effekt, chemische Zusammensetzung und Ausmaß der spezifischen Oberfläche) bzw. von Fasern (Geometrie, Biobeständigkeit und chemische Zusammensetzung) für sich allein für die Pathogenität verantwortlich ist.

## 7. Literatur

ABEN J.M.M., M.A.A. SCHUTTER, D. ONDERLINDEN (1991): Luchtkwaliteit Jaaroverzicht 1990. report no. 222101015 RIVM Bilthoven, The Netherlands.

ALBRICH J.M. & J.K. HURST (1982): Oxidative inactivation of Escherichia coli by hypochlorous acid. Rates and differentiation of respiratory from other reaction sites. FEBS Lett **144** (1), 157-161.

ANDERSON D.C., L.J. MILLER, F.C. SCHMALSTIEG, R. ROTHLEIN, T.A. SPRINGER (1986): Contribution of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. J Immunol **137** (1), 15-27.

AUST A.E. & L.G. LUND (1990): The role of iron in asbestos-catalyzed damage to lipids and DNA. Biological Oxidation Systems 2, 597-605.

BAIERL T. (1996): In vitro Toxizität von Fulleren C<sub>60</sub> und seinen Vorstufen - Einfluß auf Vitalität, Zytokinfreisetzung und Oxidantienhaushalt. Dissertation, Universität Karlsruhe.

BASCOM R., P.A. BROMBERG, D.A. COSTA, D.W. DOCKERY, M.W. FRAMPTON, W. LAMPERT, J.M. SAMET, F.E. SPEIZER, M UTELL (1996): Health effects of outdoor air pollution. Am J Respir Crit Care Med 153, 3-50.

BERNSTEIN D.M., C. MORSCHEIDT, H. TIESLER, H.-G. GRIMM, P. THÉVENAZ, U. TEICHERT (1995): Evaluation of the biopersistence of commercial and experimental fibers following inhalation. Inhalation Toxicology **7**, 1031-1058.

BLAUROCK B., S. HIPPELI, N. METZ, E.F. ELSTNER (1992): Oxidative destruction of biomolecules by gasoline engine exhaust products and detoxifying effects of the three-way catalytic converter. Arch Toxicol **66**, 681-687.

BRIGHTWELL J., X. FOUILLET, R. CASSANO-ZOPPI, R. GATZ, F. DUCHOSAL (1986): In: Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust. Ishinishi N., Koizumi A., McClellan R.O., Stöber W. (eds.), Seite: 471, Elsevier Sci Publ, Amsterdam, New York, Oxford.

BRUNAUER S., H.P. EMMETT, E. TELLER (1938): Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Amer Chem Soc* **60**, 309-319.

BRUNEKREEF B., D.W. DOCKERY, M. KRZYZANOWSKI (1995): Epidemiologic studies on short-term effects of low levels of major ambient air pollution components. *Environ Health Perspect* **103** SUPPL 2, 3-13.

CARP H. & A. JANOFF (1978): Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants. *Am Rev Respir Dis* **118** (3), 617-621.

CHENG Y.S., H.C. YEH, J. MAUDERLY, B.V. MOKLER (1984): Characterisation of diesel exhaust in a chronic inhalation study. *Am Ind Hyg Assoc J* **45**, 547-555.

CROCKETT-TORABI E. & J.C. FANTONE (1990): Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fcγ receptor-specific mechanisms. *J Immunol* **145** (9), 3026-3032.

CUPITT L.T., W.G. GLEN, J. LEWTAS (1994): Exposure and Risk from Ambient Particle-bound Pollution in an Airshed Dominated by Residential Wood Combustion and Mobile Sources. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl 4), 75-84.

DONALDSON K., P.H. BESWICK, P.S. GILMOUR (1996): Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol Lett* **88** (1-3), 293-298

ECKLE I., G. KOLB, K. HAVEMANN (1992): Regulation of neutrophil functions by Elastase-generated IgG fragments. *Arch Immunol Ther Exp Warsz* **40** (1), 43-47.

ELSTNER E.F., W. SCHÜTZ, G. VOGL (1987): Modellreaktionen zur Asbesttoxikologie. In: *Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin* (Elstner E.F., Bors W., Wilmanns W., eds.), 1.Auflage, Seite:73-81, Springer Verlag, Berlin.

ELSTNER E.F., W. SCHÜTZ, G. VOGL (1988): Cooperative stimulation by sulfite and crocidolite asbestos fibers of enzyme catalyzed production of reactive oxygen species. *Arch Toxicol* **62**, 424-427.

ELSTNER E.F. (1990): In: Der Sauerstoff, Elstner E.F. (ed.), BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim/ Wien/ Zürich.

EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (1996): Air quality criteria for particulate matter, national center for environmental assessment, office of research and development, EPA/600/P-95/001bF.

EVANS M.D. & W.A. PRYOR (1994): Cigarette Smoking, emphysema, and damage to  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor. *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol)* **10** **266**, L593-L611.

FALLER B., M. CADÈNE, J.G. BIETH (1993): Demonstration of a Two-Step Reaction Mechanism for the Inhibition of Heparin-Bound Neutrophil Elastase by  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor. *Biochemistry* **32** (No. 35), 9230-9235.

FALLMAN M., R. ANDERSSON, T. ANDERSSON (1993): Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J Immunol* **151** (1), 330-338.

FERIN J., G. OBERDÖRSTER, D.P. PENNEY (1992): Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6** (5), 535-42.

FÖRSTER F.J. (1991): Durchflußzytometrische Untersuchungen bezüglich Virusphagozytose von Latexpartikeln und Respiratory-Burst-Aktivität von equinen und humanen polymorphkernigen Blutleukozyten nach in vitro Inkubation mit verschiedenen Pockenviruspräparationen. Dissertation, LM-Universität München.

FRÄNKLE G. & H.-J. STEIN (1988): Instationäre oder stationäre Abgasprüfverfahren für Nutzfahrzeug-Dieselmotoren?. *ATZ Automobiltechnische Zeitschrift* **90**, 1-11.

FRUHSTORFER P. & R. NIEßNER (1994): Identification and Classification of Airborne Soot Particles Using and Automated SEM/EDX. *Mikrochim Acta* **113**, 239-250.

GREEN L.C., D.A. WAGNER, J. GLOGOWSKI, P.L. SKIPPER, J.S. WISHNOK, S.R. TANNENBAUM (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126** (1), 131-138.

GREIM H. (1993): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, Faserstäube. 19. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

GERDE P., M.A. MEDINSKY, J.A. BOND (1991 a): The retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in the broncheal airway and in the alveolar region. A theoretical comparison. *Toxicol Appl Pharmacol* **107**, 239-252.

GERDE P., M.A. MEDINSKY, J.A. BOND (1991 b): Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons. A reappraisal of their possible role in pulmonary carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* **108**, 1-13.

GROSS K.B. (1981): Pulmonary function testing of animals chronically exposed to diluted diesel exhaust. *J Appl Toxicol* **1** (2), 116-123.

HATCH G.E., E. BOYKIN, J.A. GRAHAM, J. LEWTAS, F. POTT, K. LOUD, J.L. MUMFORD (1985): Inhalable particles and pulmonary host defence: in vivo and in vitro effects of ambient air and combustion particles. *Environ Res* **36**, 67-80.

HEINRICH U., H. MUHLE, S. TAKENAKA, H. ERNST, R. FUHST, U. MOHR, F. POTT, W. STÖBER (1986): Chronic effect on respiratory tract of hamsters, mice, and rats after long-term inhalation of high concentrations of filtered and unfiltered diesel engine emissions. *J Appl Toxicol* **6**, 383-395.

HEINRICH U., R. FUHST, C. DASENBROCK, H. MUHLE, W. KOCH, U. MOHR (1992): Long term inhalation exposure of rats and mice to diesel exhaust (DE), carbon black (CB) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>). Abstracts of the Health Effects Institute 9th Annual Conference, Monterey, California.

HEINRICH U., D. DUNGWORTH, F. POTT, A. SHULTE, L. PETERS, C. DASENBROCK, K. LEVSEN, W. KOCH, O. CREUTZENBERG (1993): The carcinogenic effects of carbon black particles and tar pitch condensation aerosol after inhalation exposure of rats. *Ann Occup Hyg*.

HENDERSON R.F., J.A. PICKRELL, R.K. JONES, J.D. SUN, J.M. BENSON, J.L. MAUDERLY, R.O. McCLELLAN (1988): Response of rodents to inhaled diluted diesel

exhaust: Biochemical and cytological changes in bronchoalveolar lavage fluid and in lung tissue. *Fundam Appl Toxicol* **11**, 546-567.

HESTERBERG T.W., W.C. MILLER, P. THEVENAZ, R. ANDERSON (1995): Chronic inhalation studies of man-made-vitreous-fibres: characterization of fibres in the exposure aerosol and lungs. *Ann Occup Hyg* **39** (No. 5), 637-653.

HIPPELI S. & E.F. ELSTNER (1989): Diesel soot-catalyzed production of reactive oxygen species: cooperative effects with bisulfite. *Z Naturforsch* **44c**, 524-532.

HIPPELI S., B. BLAUROCK, A. von PREEN, E.F. ELSTNER (1994): Oxidant effect derived by automobile exhaust products. In: *Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology* Nohl H. H. Esterbauer, C. Rice-Evans (eds.), Seite: 375-392, Richelieu Press, London.

HIPPELI S. & E.F. ELSTNER (1995): Biological and biochemical effects of air pollutants: synergistic effects of sulphite. *Biochem Soc Symp* **61**, 153-161.

HIPPELI S., K. DORNISCH, S. KAISER, U. DRÄGER, E.F. ELSTNER (1997): Biological durability and oxidative potential of a stonewool mineral fibre compared to crocidolite asbestos fibres. *Arch Toxicol* **71**, 532-535.

HOFER T. (1996): Partikelinduzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei Rinder-Alveolarmakrophagen und humanen Bronchialepithelzellen. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.

ISHINISHI N., N. KUWABARA, S. NAGASE, T. SUZUKI, S. ISHIWATA, T. KOHNO (1986): In: *Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust*. Ishinishi N., Koizumi A., McClellan R.O., Stöber W. (eds.), Seite: 329, Elsevier Sci Publ, Amsterdam, New York, Oxford.

ISHIZAKI T., E. YANO, P-H. EVANS (1997): Cellular mechanisms of reactive oxygen metabolite generation from human polymorphonuclear leukocytes induced by crocidolite asbestos. *Env Res* **75**, 135-140.

IWAI K., T. UDAGAWA, M. YAMAGISHI, H. YAMADA (1986): In: Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust. Ishinishi N., Koizumi A., McClellan R.O., Stöber W. (eds.), Seite: 349, Elsevier Sci Publ, Amsterdam, New York, Oxford.

JANOFF A., H. CARP, P. LAURENT, L. RAJU (1983): The role of oxidative processes in emphysema. *Am Rev Respir Dis* **127** (2), S31-38.

JANOFF A., C. GEORGE-NASCIMENTO, S. ROSENBERT (1986): A genetically engineered, mutant human alpha-1-proteinase inhibitor is more resistant than the normal inhibitor to oxidative inactivation by chemicals, enzymes, cells, and cigarette smoke. *Am Rev Respir Dis* **133** (3), 353-356.

JANSSEN Y.M., J.P. MARSH, K.E. DRISCOLL, P.J. BORM, G. OBERDÖRSTER, B.T. MOSSMAN (1994): Increased expression of manganese-containing superoxide dismutase in rat lungs after inhalation of inflammatory and fibrogenic minerals. *Free Radic Biol Med* **16** (3), 315-322.

KAMSTRUP O., J.M. DAVIS, A. ELLEHAUGE, M. GULDBERG (1998): The biopersistence and pathogenicity of man-made vitreous fibres after short- and long-term inhalation. *Ann Occup Hyg* **42** (3), 191-199.

KAPLAN H.L., K.J. SPRINGER, W.F. MACKENZIE (1986): Studies of potential health effects of long-term exposure to diesel exhaust emissions“ Final Report No. 01-0750-103 (SWRI) and No. 1239 (SFRE), Southwest Research Institute, San Antonio, TX.

KINDZELSKII A.L., W. XUE, R.F. TODD 3rd, H.R. PETTY (1994): Imaging the spatial distribution of membrane receptors during neutrophil phagocytosis. *J Struct Biol* **113** (3), 191-198.

KLINGENBERG H. & H. WINNEKE (1990): Studies on health effects of automotive exhaust emissions, how dangerous are diesel emissions?. *The Science of the Total Environment* **93**, 95-105.

KOBZIK L., J.J. GODLESKI, J.D. BRAIN (1990): Selective down-regulation of alveolar macrophage oxidative response to opsonin-independent phagocytosis. *J Immunol* **144** (11), 4312-4319.

KOBZIK L. (1995): Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates, role of scavenger-type receptors. *J Immunol* **155**, 367-376.

KOCKARS M. & H. SAVOLAINEN (1992): Tumor necrosis factor enhances the asbestos-induced production of reactive oxygen metabolites by human polymorphnuclear leucocytes (PMN). *Clin Exp Immunol* **90**, 68-71.

KRUEDENER von S. (1994): Antiinflammatorische Arzneipflanzenextrakte in biochemischen Testsystemen, Dissertation, Technische Universität München.

LAI (1991): Abschlußbericht der Arbeitsgruppe „Krebsrisiko durch Luftverunreinigungen“ des Länderausschußes für Immissionsschutz: „Berurteilungsmaßstäbe zur Begrenzung des Krebsrisiko durch Luftverunreinigungen.“

LEANDERSON P., P. SÖDERKVIST, M. GILLNER, G. TAGESSON (1989): Formation of 8-Hydroxydeoxyguanosine by asbestos and man-made mineral fibers. *Brit J Ind Med* **45**, 309-311.

LEWIS T.R., F.H.Y. GREEN, W.J. MOORMAN, J.A.R. BURG, D.W. LYNCH (1986): A chronic inhalation toxicity study of diesel engine emissions and coal dust, alone and combined. *J Am Coll Toxicol* **8**, 345-375.

LEWIS T.R., F.H.Y. GREEN, W.J. MOORMAN, J.A.R. BURG, D.W. LYNCH (1989A): In: Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust. Ishinishi N., Koizumi A., McClellan R.O., Stöber W. (eds.), Seite: 361, Elsevier Sci Publ, Amsterdam, New York, Oxford.

LEYTUS S.P., L.L. MELHADO, W.F. MANGEL (1983): Rhodamine based compounds as fluorogenic substrates for serine proteases. *Biochem J* **209**, 299-307.

LUND L.G. & A.E. AUST (1992): Iron mobilization from crocidolite asbestos greatly enhances crocidolite-dependent formation of DANN single-strand breaks in phi174 RFI DNA. *Carcinogenesis* **13** (4), 637-642.

MARRA M.N., C.G. WILDE, J.E. GRIFFITH, J.L. SNABLE, R.W. SCOTT (1990): Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin neutralizing activity. *J Immunol* **144** (2), 662-666.

MATHESON N.R., P.S. WONG, J. TRAVIS (1979): Enzymic inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commu* **88** (No.2), 402-409.

MAUDERLY J.L., N.A. GILLET, R.F. HENDERSON, R.K. JONES, R.O. MCCLELLAN (1987): in Proc. 6<sup>th</sup> Int. Symp. Inhaled Particles, Walton W. (ed.), Pergamon Press, Oxford.

MAUDERLY J.L. (1992): Diesel exhaust“ In: *Environmental Toxicants-Human Exposure and Their Health Effects*. Lippmann M. (ed.), Seite 119-162, Van Nostrand Reinhold, New York.

MAUDERLY J.L. (1994): Contribution of inhalation bioassays to the assessment of human health risks from solid airborne particles. In: *Toxic and Carcinogenic Effects of Solid Particles in the Respiratory Tract*, Mohr U., Dungworth D.L., Mauderly J.L., Oberdörster G. (eds.), Seite: 355-366, ILSI Press, Washington, DC.

MERINGO DE A., C. MORSCHEIDT, S. THÉLOHAN, H. TIESLER (1994): In Vitro Assessment of Biodurability: Acellular Systems. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl 5), 47-53.

MORENO J.J. & A.P. PRYOR (1992): Inactivation of  $\alpha_1$ -proteinase unhibitor by peroxyxynitrite. *Chemical Research of Toxicology* **5** (3), 425-431.

MORROW P.E., J.K. HASEMAN, C.H. HOBBS, K.E. DRISCOLL, V. VU, G. OBERDÖRSTER (1996): The Maximum Tolerated Dose for Inhalation Bioassays: Toxicity vs Overload. *Fundamental and Applied Toxicology* **29**, 155-167.

MÜLLER K.-M. & M. KRISMANN (1994): Asbestproblematik - Daten und Fakten des Pathologen. *Atemw Lungenkrkh* **20**, 211-217.

MÜLLER K.-M. & M. KRISMANN (1996): Asbestassoziierte Erkrankungen - Pathologisch-anatomische Befunde und versicherungsmedizinische Aspekte. *Deutsches Ärzteblatt* **93**, A-538-543.

MUHLE H., S. TAKENAKA, U. MOHR, C. DASENBROCK, R. MERMELSTEIN (1989): Lung tumor induction upon long-term low-level inhalation of crystalline silica. *Am J Ind Med* **15**, 343-346.

MUSSELMAN R.P., W.C. MILLER, W. EASTES, J.G. HADLEY, O. KAMSTRUP, P. THEVENAZ, T.W. HESTERBERG (1994): Biopersistences of man-made vitreous fibers and crocidolite fibers in rat lungs following short-term exposures. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl 5), 139-143.

NETTER F.H. (1982): Atmungsorgane. Farbatlanten der Medizin Band 4, Enders P. (ed.); Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

NIEßNER R. (1995): Partikelemission: Quelle, Ausbreitung, Umwandlung - Literaturstudie. FAT-Schriftenreihe Nr. 124, Forschungsvereinigung Automobiltechnik e.V. und Forschungsvereinigung Verbrennungskraftmaschinen e.V., Seite:1-92.

NIKULA K.J., M.B. SNIPES, E.B. BARR, W.C. GRIFFITH, R.F. HENDERSON, J.L. MAUDERLY (1995): Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fundam Appl Toxicol* **25**, 80-94.

NTP (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM) (1993): Toxicology and carcinogenesis studies of TALC in F344/N rats and B6C3F<sub>1</sub> mice. NTP Technical Report 421, NIH Publication No. 92-3152. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC.

OBERDÖRSTER G., R. GELEIN, J. FERIN, B. WEISS (1995): Association of particulate air pollution and acute mortality: Involvement of ultrafine particles? *Inhal Toxicol* **7**, 111-124.

OBERDÖRSTER G., J. FINKELSTEIN, J. FERIN, J. GODLESKI, L.Y. CHANG, R. GELEIN, C. JOHNSTON, J.D. CRAPO (1996): Ultrafine particles as a potential environmental health hazard. Studies with model particles. *Chest* **109** (3 Suppl), 68S-69S.

PANASENKO O.M., S.A. EVGINA, R.K. AIDYRALIEV, V.I. SERGIENKO, Y.A. VLADIMIROV (1994): Peroxidation Of Human Blood Lipoproteins Induced By Exogenous Hypochlorite Or Hypochlorite Generated In The System Of „Myeloperoxidase + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Cl<sup>-</sup>. *Free Radical Biology & Medicine* **16** (No. 2), 143-148.

PEKKANEN J., K.L. TIMONEN, J. RUUSKANEN, A. REPONEN, A. MIRME (1997): Effects of ultrafine and fine particles in urban air on peak expiratory flow among children with asthmatic symptoms. *Environ Res* **74** (1), 24-33.

PEPELKO W.E. & W.B. PEIRANO (1983): Health effects of exposure to diesel engine emissions: A summary of animal studies conducted by the U.S. Environment Protection Agency's Health Effects Research Laboratories at Cincinnati, Ohio. *J Am Coll Toxicol* **2**, 253-306.

PEPPIN G.J. & S.J. WEISS (1986): Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci* **83**, 4322-4326.

PETERS A., H.E. WICHMANN, T. TUCH, J. HEINRICH, J. HEYDER (1997): Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* **155** (4), 1376-1383,

PETZOLD A. & R. NIEßNER (1994 a): Weiterentwicklung und Erprobung eines Immissionsmeßverfahrens zur spezifischen Erfassung von Rußpartikeln. Teilvorhaben 1: Immissionsmessungen an Standorten unterschiedlicher Belastung in München. UBA-Forschungsbericht 94-104 02 274 TU 1.

PETZOLD A. & R. NIEßNER (1994 b): Method Comparison Study on Soot-selective Techniques. *Mikrochim Acta*.

PLANO (1990): Asbestos information - Crocidolite. Plano W. Plannet GmbH, Ernst-Befort-Straße 12, 35578 Wetzlar.

POTT F., N. ROLLER; R.M. RIPPE, P.G. GERMANN, B. BELLMANN (1990): Tumours by the intraperitoneal and intrapleural routes and their significance for the classification of mineral fibers. In: Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Mechanisms in Fiber Carcinogenesis, Albuquerque, New Mexico.

PRYOR W.A., B.J. HALES, P.I. PREMOVIC, D.F. CHURCH (1983): The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science Wash DC* **220**, 425-427.

- RIEU P., T. UEDA, I. HARUTA, C.P. SHARMA, M.A. ARNAOUT (1994): The A-domain of beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is a receptor for the hookworm-derived neutrophil adhesion inhibitor NIF. *J Cell Biol* **127** (6 Pt 2), 2081-2091.
- ROTHER G., A. OSER, G. VALET (1988): Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for Respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwiss* **75**, 354-355.
- ROTHENBERG S., D.B. KITTELSON, Y.S. CHENG, R.O. MCCLELLAN (1985): Adsorption of nitrogen and xylene by light duty diesel exhaust samples. *Aerosol Sci Technol* **4**, 383-400.
- ROUBEY R.A., G.D. ROSS, J.T. MERRILL, F. WALTON, W. REED, R.J. WINCHESTER, J.P. BUYON (1991): Staurosporine inhibits neutrophil phagocytosis but not iC3b binding mediated by CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **146** (10), 3557-3562.
- RUOTSALAINEN M., K.M. SAVOLAINEN (1995): Effects of a protein kinase C inhibitor; RO 31-7549, on the activation of human leukocytes by particulate stimuli. *Hum Exp Toxicol* **14** (3), 266-272.
- SAKAI H., K. MORI, Y. KATAYAMA, T. MATSUYAMA (1994): Studies of comparison with fluorescent bioparticles and microspheres for phagocytosis by flow cytometric assay in polymorphonuclear leukocytes. *Rinsho Byori* **42** (9), 986-991.
- SCHLESINGER R.B. & M. LIPPMANN (1978): Selective particle deposition and bronchogenic carcinoma. *Environ Res* **15**, 424-431.
- SCHMIDT B. & H.E. WICHMANN (1995): Feuerungsanlagen. In: *Handbuch Umweltmedizin* Wichmann H.E., Schlipkötter H.-W., Fülgraff G. (eds.), ecomed Fachverlag, Landsberg/Lech, Kapitel: VIII-1.4.
- SCHOLZE H. & R. CONRADT (1987): An in vitro study of the chemical durability of siliceous fibers. *Ann Occup Hyg* **31** (4B), 683-692.
- SEARL A. (1994): A review of the durability of inhaled fibres and options for the design of safer fibres. *Ann Occup Hyg* **38** (6), 839-855.

SEATON A., W. MACNEE, K. DONALDSON, D. GODDEN (1995): Particulate air pollution and acute health effects [see comments]. *Lancet* **345** (8943), 176-178.

SKLAR L.A. & Z.G. OADES (1985): Signal transduction and ligand-receptor dynamics in the neutrophil.  $Ca^{2+}$  modulation and restoration. *J Biol Chem* **260** (21), 11468-11475.

STAHL M. (1988): Beeinflussung einiger Funktionen neutrophiler Granulozyten des Schweins durch Echinacea-haltige Präparate. Dissertation, Ludwig-Maximilians Universität München.

STANTON M.F. & C. WRENCH (1972): Mechanisms of mesothelioma induction with asbestos and fibrous glass. *J natn Cancer Inst* **48**, 797-822.

STANTON M.F., M. LAYARD, A. TEGERIS, E. MILLER, M. MAY, E. KENT (1977): Carcinogenicity of fibrous glass: pleural response in the rat in relation to fibre dimension. *J natn Cancer Inst* **58**, 587-603.

TAKEMOTO K., H. YOSHIMURA, H. KATAYAMA (1986): In: Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust. Ishinishi N., Koizumi A., McClellan R.O., Stöber W. (eds.), Seite: 311, Elsevier Sci Publ, Amsterdam, New York, Oxford.

TAN Y.L. & J.F. QUANCI (1992): Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoke Particles from Wood and Duff Burning. *Atmos Environ* **26A**, 1177-1181.

TARGOWSKI S.P. & M. NIEMIALTOWSKI (1986): Appearance of Fc receptors on polymorphonuclear leukocytes after migration and their role in phagocytosis. *Infect Immun* **52** (3), 798-802.

THURSTON G.D. (1996): A critical review of PM10-mortality time-series studies. *J Expo Anal Environ Epidemiol* **6** (1), 3-21.

TÖRNQVIST M. & L. EHRENBERG (1994): An Cancer Risk Estimation of Urban Air Pollution. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl 4), 173-181.

- VLAHOS C.J., W.F. MATTER, R.F. BROWN, A.E. TRAYNOR-KAPLAN, P.G. HEYWORTH, E.R. PROSSNITZ, R.D. YE, P. MARDER, J.A. SCHELM, K.J. ROTHFUSS et al. (1995): Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* **154** (5), 2413-2422.
- VOSTAL J.J., H.J. WHITE, K.A. STROM, J.S. SIAK., K.C. CHEN, D. DZIEDZIC (1982): Response of the pulmonary defense system to diesel particulate exposure. *Dev Toxicol Environ Sci* **10**, 201-221.
- WEISS S.J., G. PEPPIN, X. ORITZ, C. RAGSDALE, S.T. TEST (1985): Oxidative autoxidation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* **227**, 747-749.
- WEISS S.J. (1989): Tissue destruction by neutrophils. *N Eng J Med* **320**, 365-376.
- WEITZMAN S.A. & P. GRACEFFA (1984): Asbestos catalyses hydroxyl and superoxide radical generation from hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* **288**, 373-376.
- WESTERHOLM R. & K.-E. EGEBÄCK (1994): Exhaust Emissions from Light- and Heavy-duty Vehicles: Chemical Composition, Impact of Exhaust after Treatment, and Fuel Parameters. *Environ Health Perspect* **102** (Suppl 4), 13-23.
- WHITE H.J. & B.D. GARG (1981): Early pulmonary response of the rat lung to inhalation of high concentration of diesel particles. *J Appl Toxicol* **1** (2), 104-110.
- WILLIS H.E., B. BROWDER, A.J. FEISTER, T. MOHANAKUMAR, S. RUDDY (1988): Monoclonal antibody to human IgG Fc receptors. Cross-linking of receptors induces lysosomal enzyme release and superoxide generation by neutrophils. *J Immunol* **140**, 234-239.
- WRIGHT S.D. & S.C. SILVERSTEIN (1982): Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b-receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med* **156**, 1149-1164.
- ZALMA R., L. BONNEAU, J. GUIGNARD, H. PEZERAT, M.C. JAURAND (1987): Formation of oxy radicals by oxygen reduction arising from the surface activity of asbestos. *Can J Chem* **65**, 2338-2341.

ZHANG Q., . KUSAKA, K. SATO, K. NAKAKUKI, N. KOHYAMA, K. DONALDSON (1998): Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J Toxicol Environ Health* **53** (6), 423-438.

ZIENENIS A., E. KARG, R.E. KORBEL, W.G. KREYLING, K.L. MAIER, S. OSTERMAIER, C. ROTH, H. SCHULZ, S. TAKENAKA, J. HEYDER (1998): Do inhaled ultrafine particles cause acute health effects: III Exposure atmospheres and exposure system. *J Aerosol Sci* 29, suppl.I.

# Anhang 1

## Abbildungen der Ergebnisse

Wenn nicht anders vermerkt, sind in den Abbildungen 1, 2, 4 und 6 50µg Ruß bzw. Mineralfasern/100.000 Zellen eingesetzt; bei den in Abb. 3 und 5 wiedergegebenen Untersuchungen 20µg/1Mio Zellen.

In den zellfreien Versuchen (Abb. 7-9) befinden sich 200µg Ruß bzw. Mineralfasern im Ansatz.

Für genaue Konzentrationsangaben der übrigen Reaktionsteilnehmer und Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 4 (Methoden).



Abb 1a: Beeinflussung des Respiratory burst (intrazelluläre Wasserstoffperoxidbildung) durch Graphitstaub und Rohruß

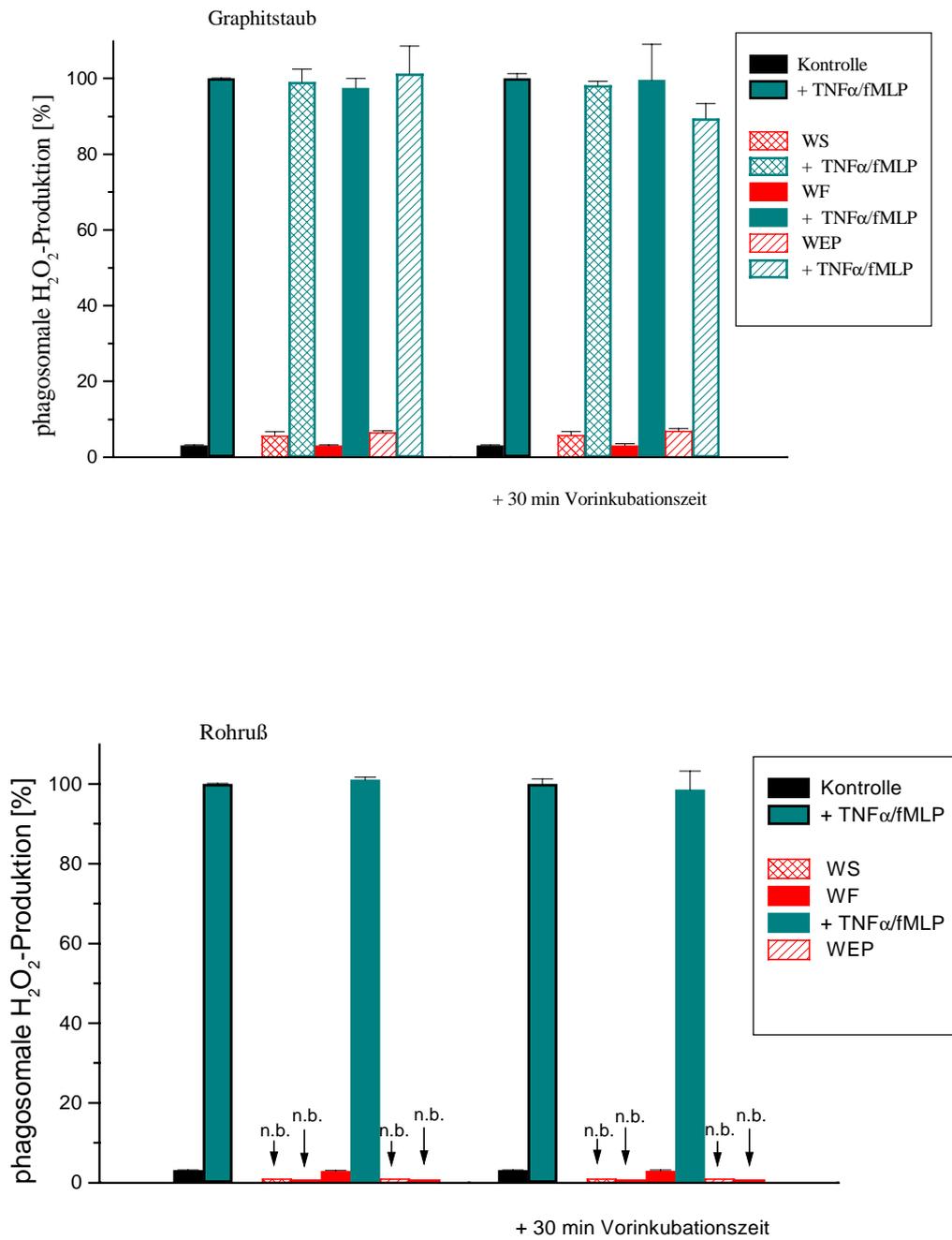


Abb 1b: Beeinflussung des Respiratory burst (intrazelluläre Wasserstoffperoxidbildung) durch LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsruß

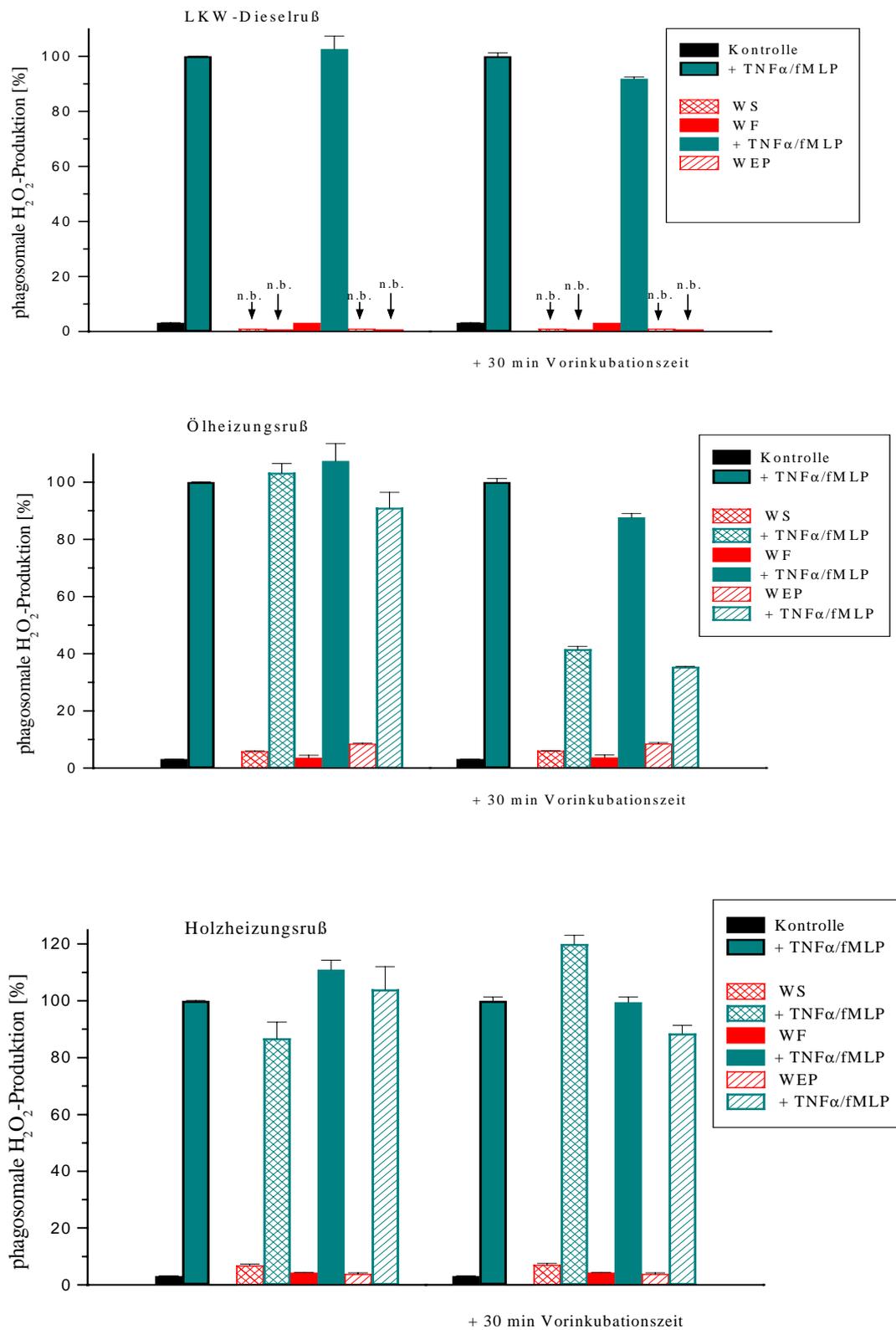


Abb 1c: Beeinflussung des Respiratory burst (intrazelluläre Wasserstoffperoxidbildung) durch die Mineralfaserproben

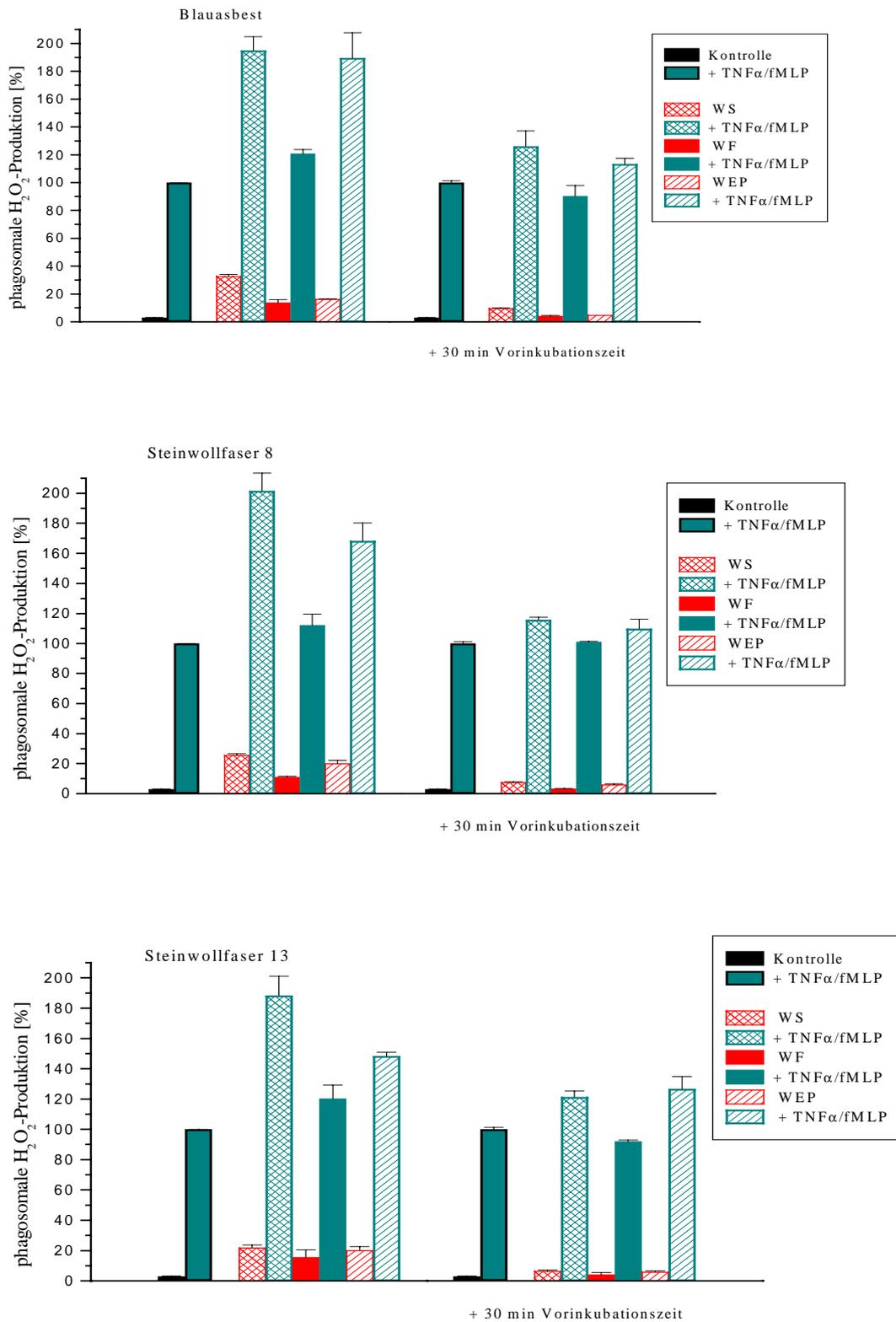


Abb 2a: Beeinflussung des Respiratory burst (intrazelluläre Wasserstoffperoxidbildung) durch Graphitstaub und Rohruß

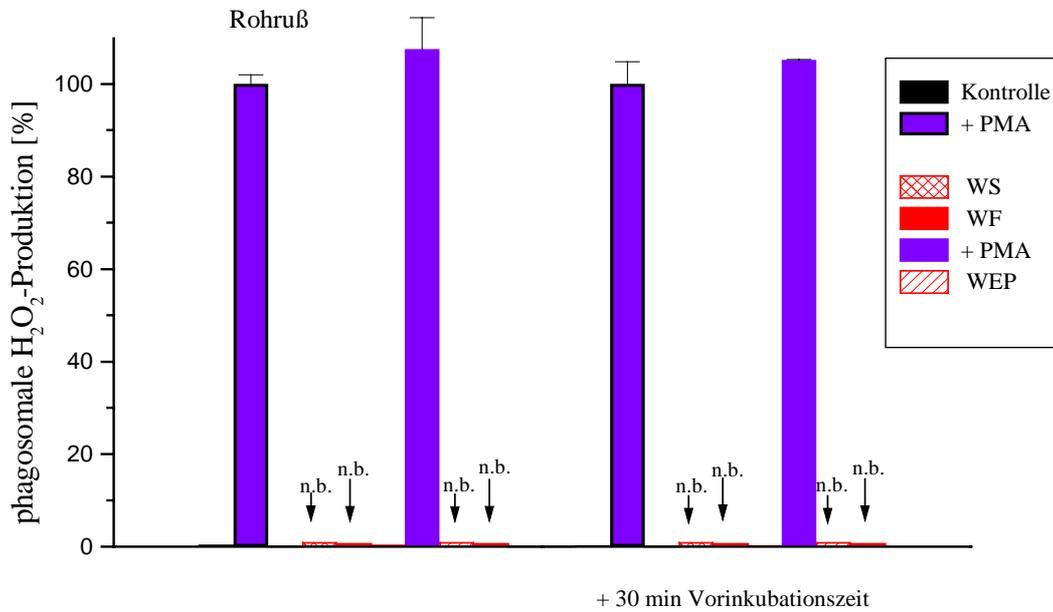
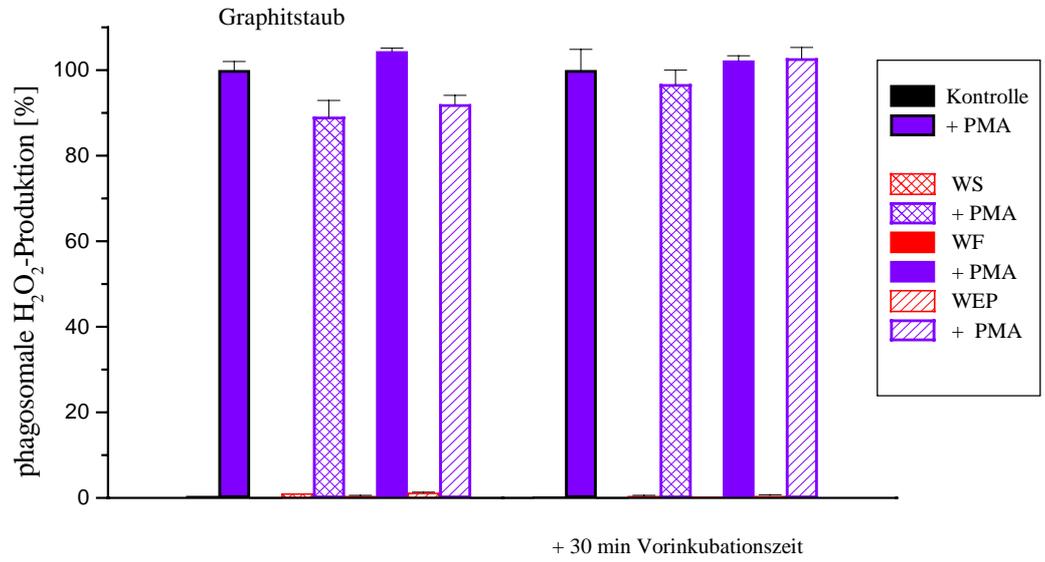


Abb 2b: Beeinflussung des Respiratory burst (intrazelluläre Wasserstoffperoxidbildung) durch LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsruß

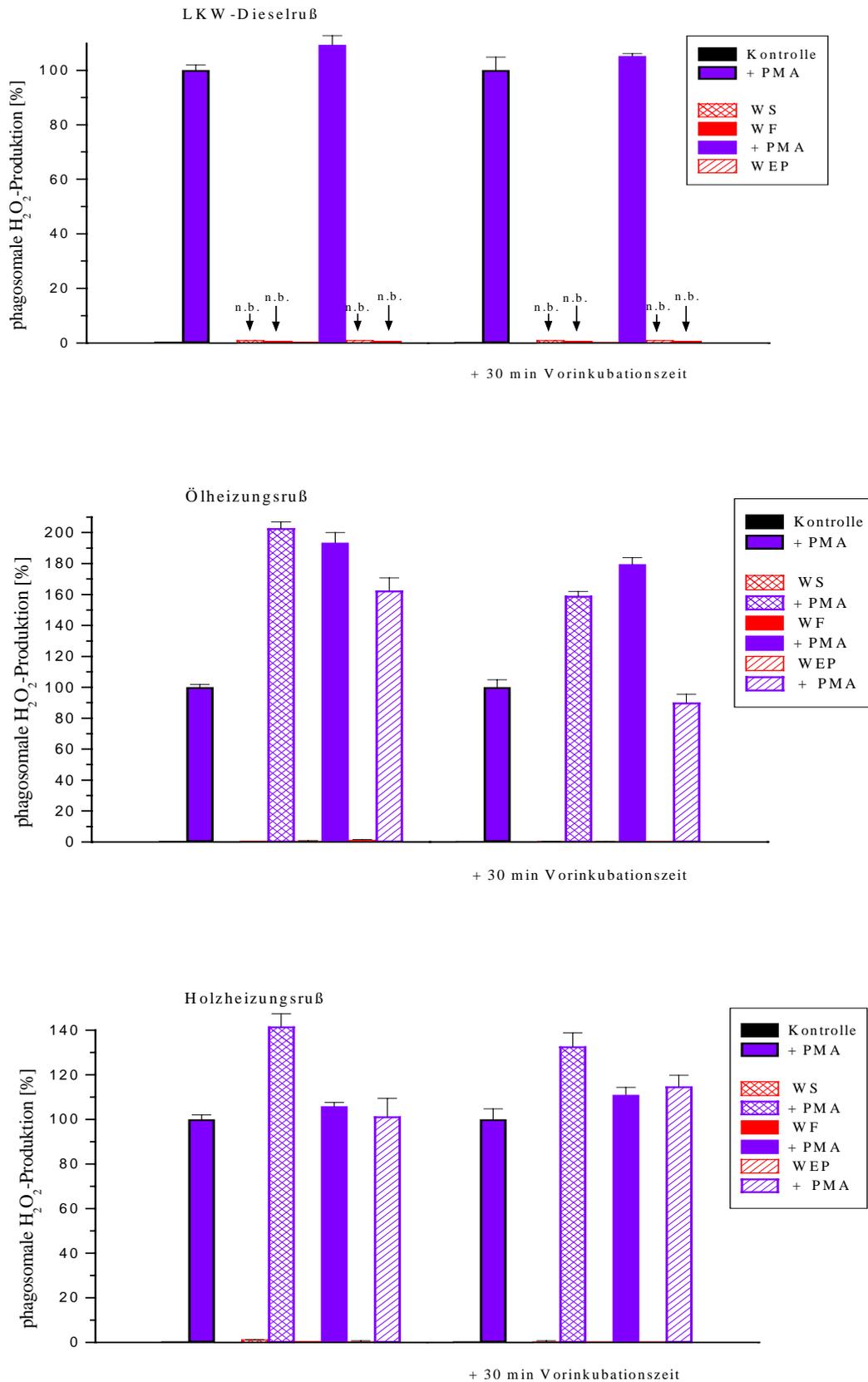


Abb 2c: Beeinflussung des Respiratory burst (intrazelluläre Wasserstoffperoxidbildung) durch die Mineralfaserproben

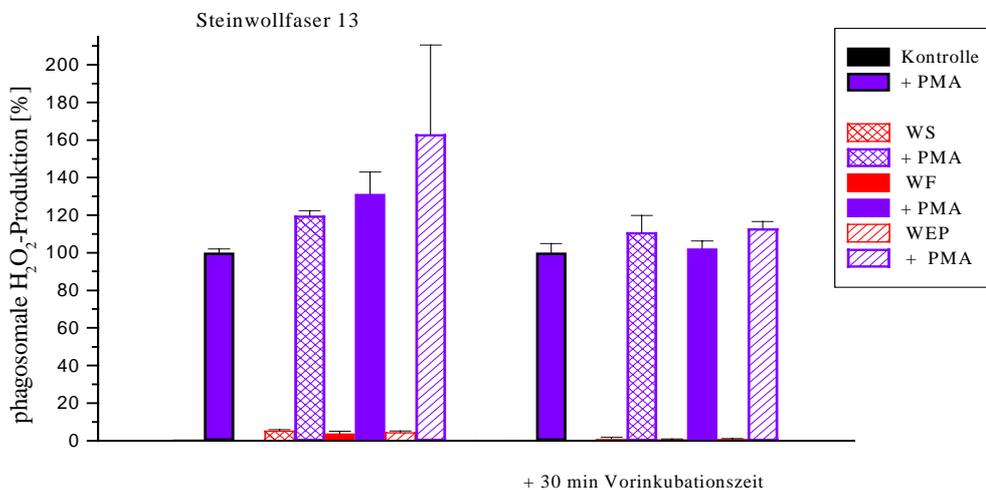
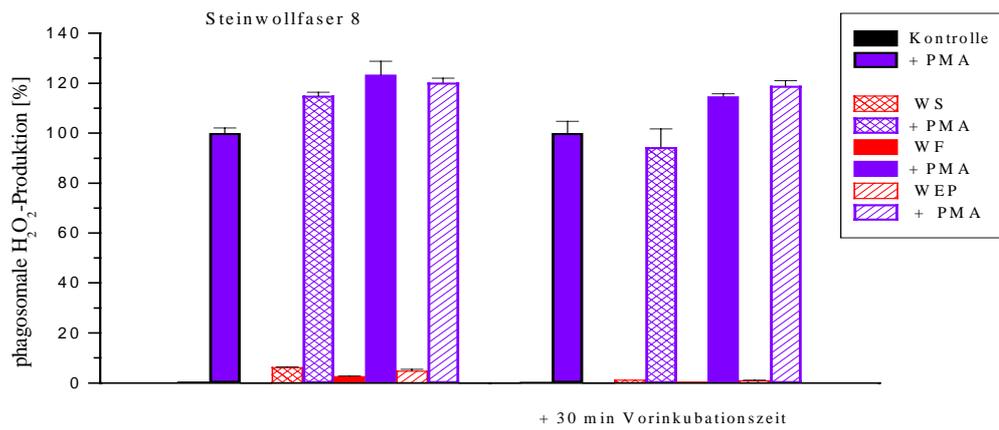
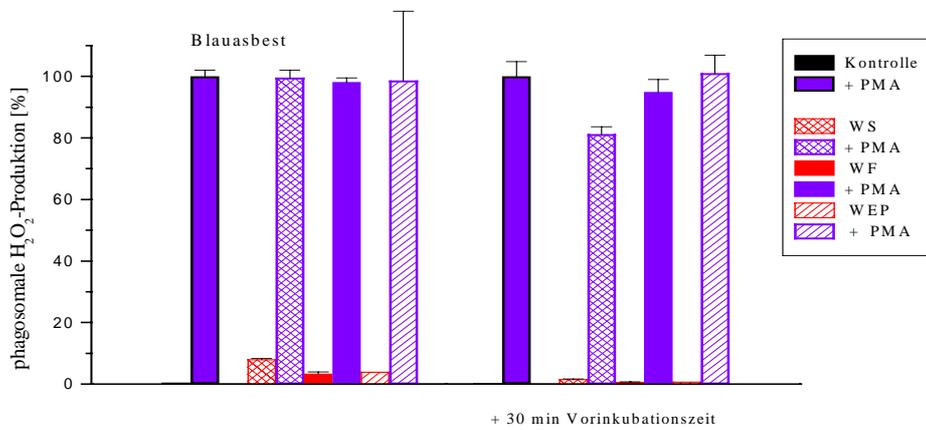


Abb. 3a: Beeinflussung des Respiratory burst (extrazelluläre Superoxidbildung) durch Graphitstaub und Rohruß

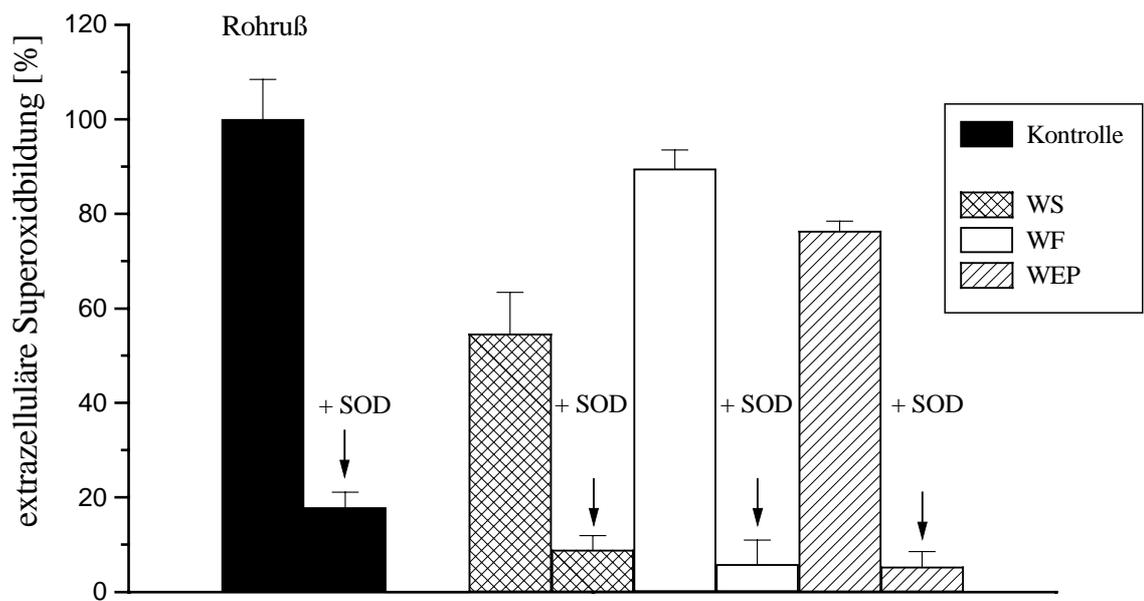
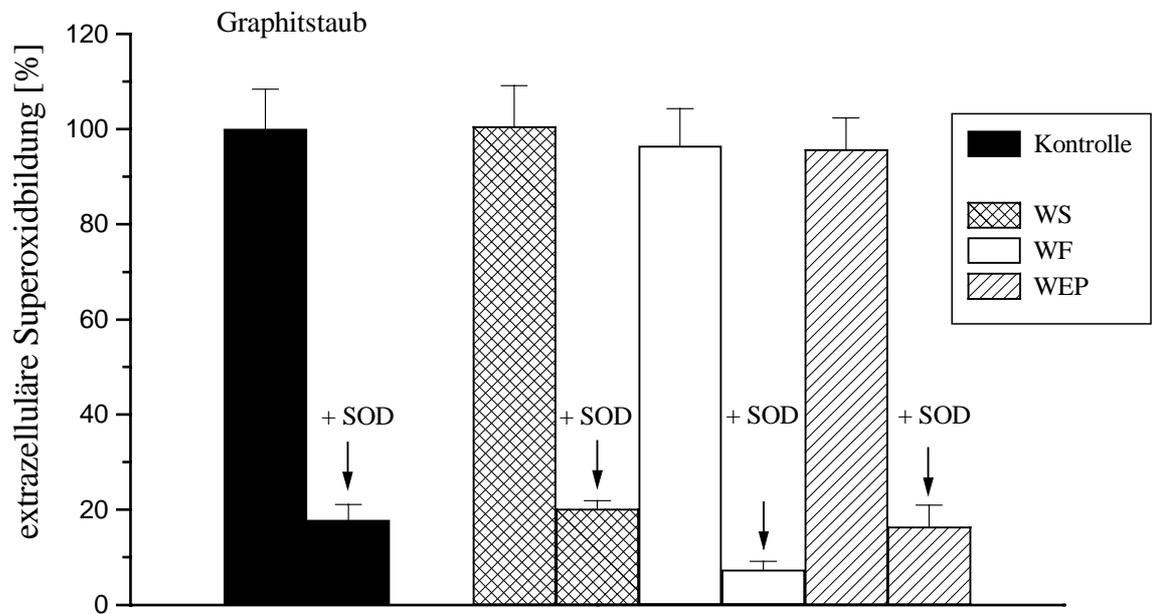


Abb. 3b: Beeinflussung des Respiratory burst (extrazelluläre Superoxidbildung) durch LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsruß

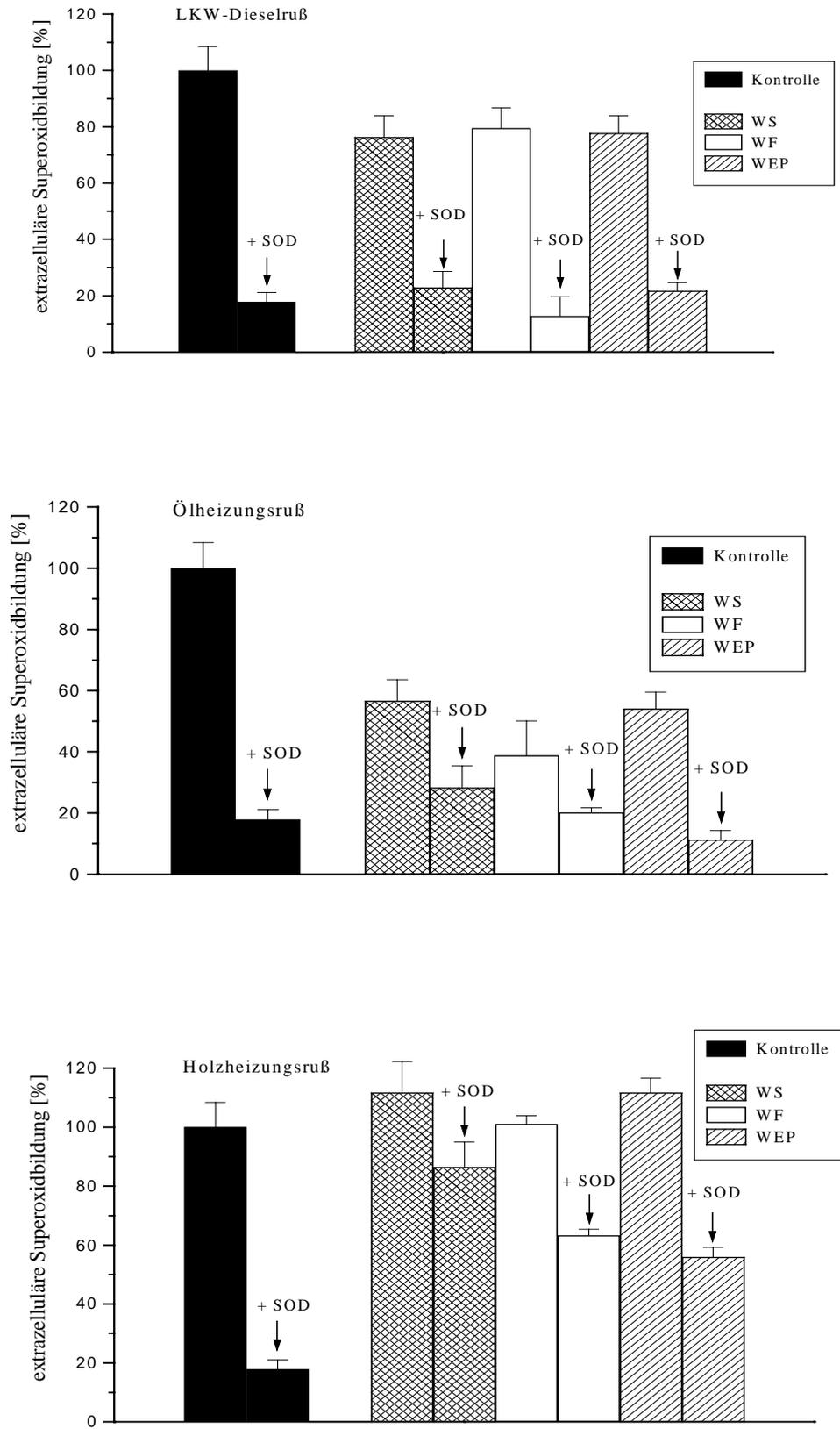


Abb. 3c: Beeinflussung des Respiratory burst (extrazelluläre Superoxidbildung) durch die Mineralfaserproben

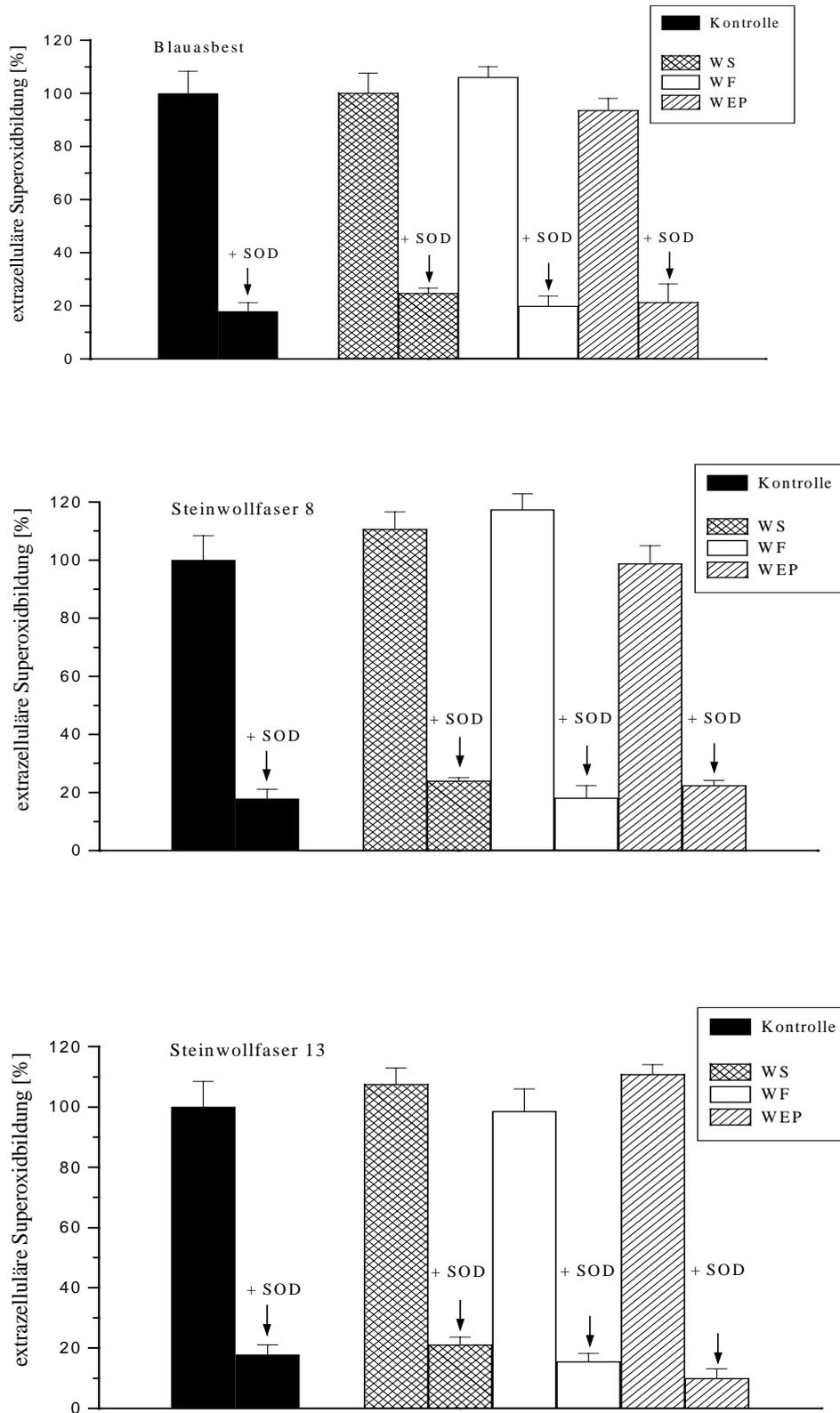


Abb. 4a: Beeinflussung der Degranulation (intrazelluläre Elastaseaktivität) durch Graphitstaub und Rohruß

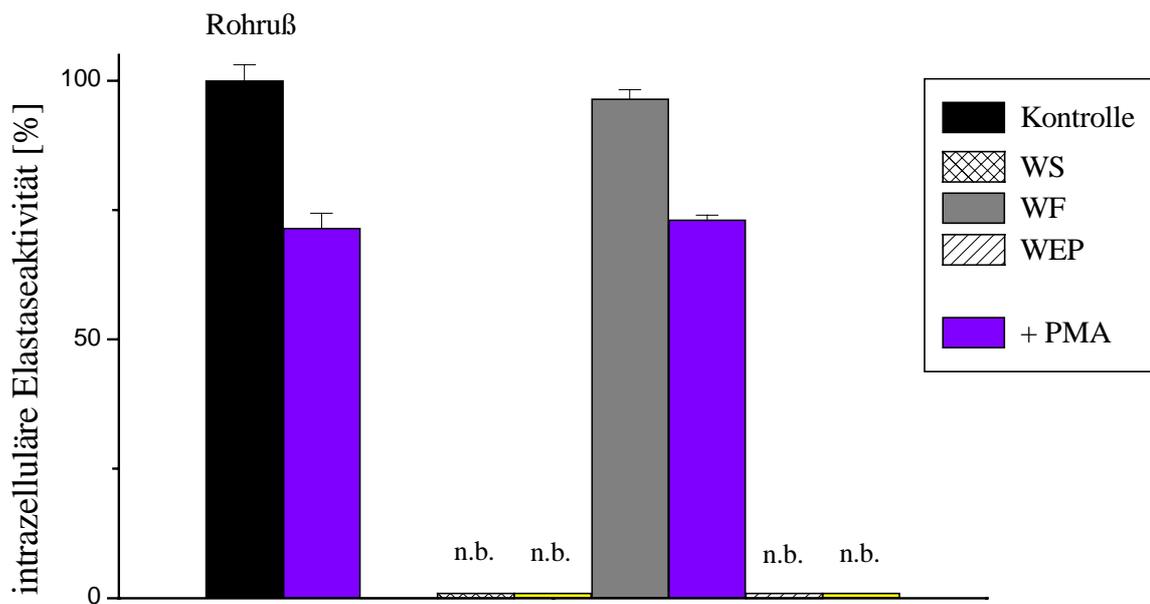
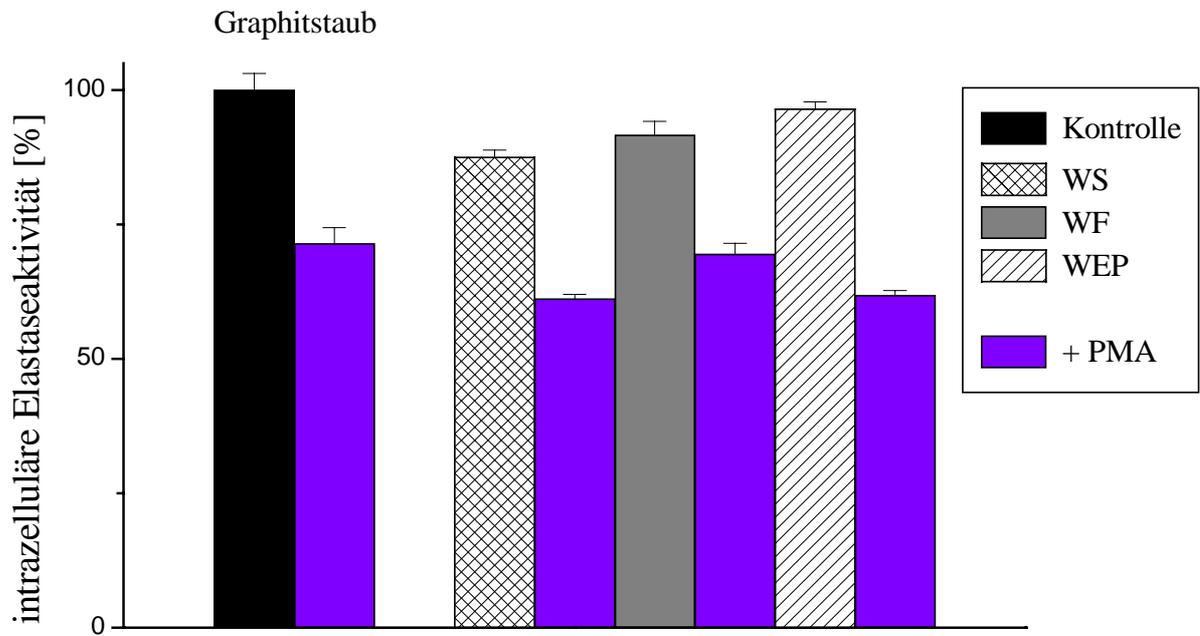


Abb. 4b: Beeinflussung der Degranulation (intrazelluläre Elastaseaktivität) durch LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsruß

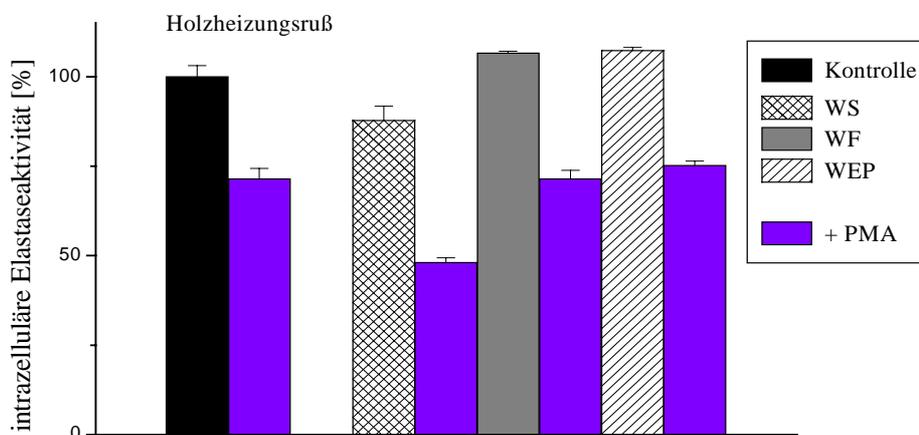
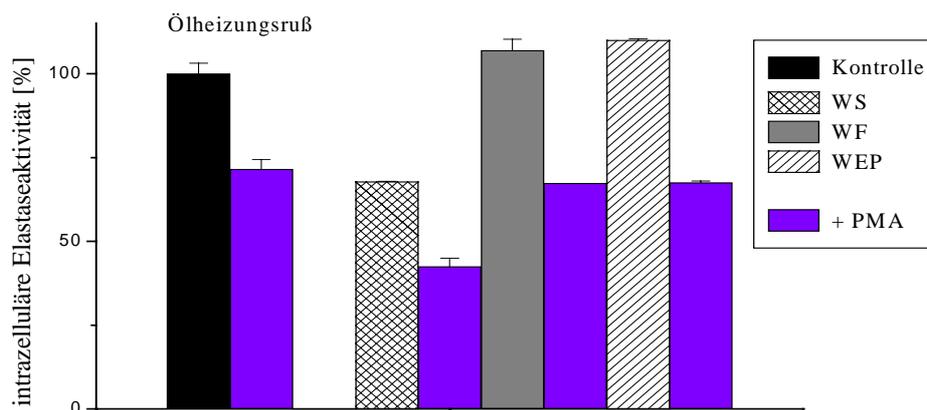
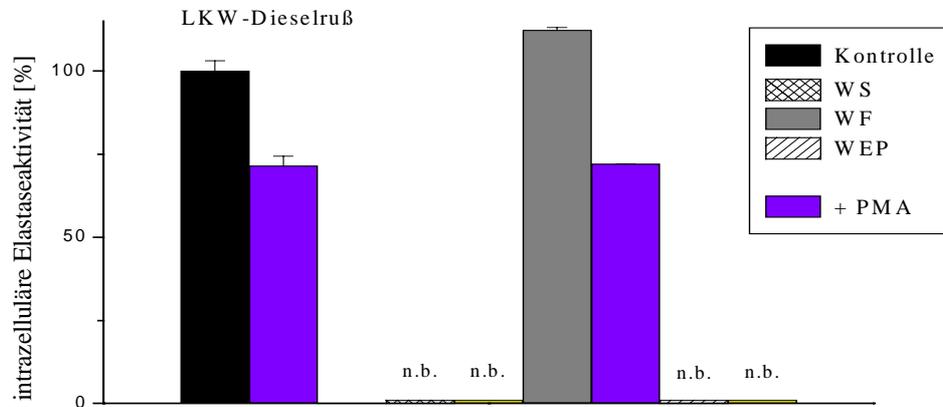


Abb. 4c: Beeinflussung der Degranulation (intrazelluläre Elastaseaktivität) durch die Mineralfaserproben

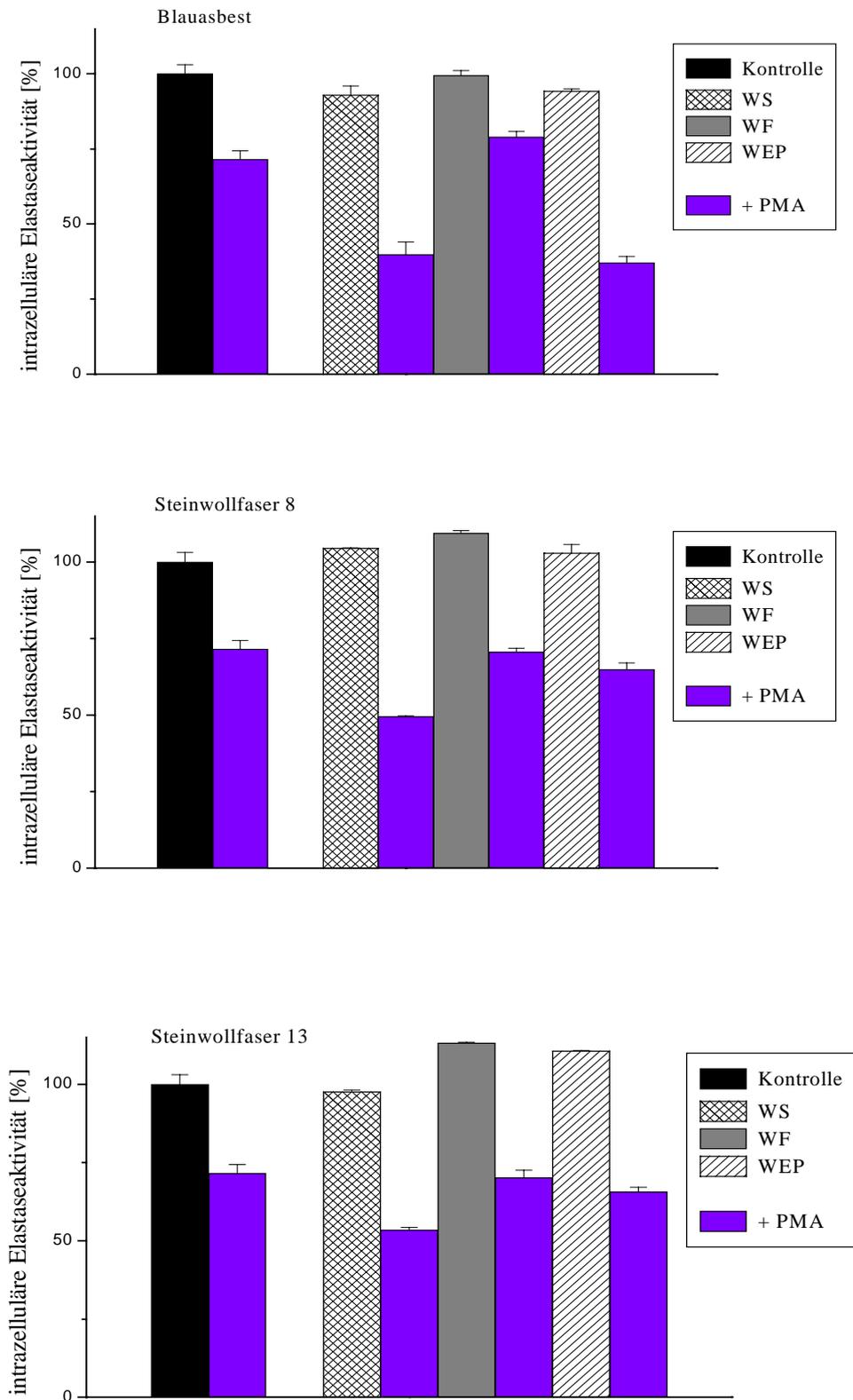


Abb. 5a: Beeinflussung der Degranulation (extrazelluläre Myeloperoxidaseaktivität) durch Graphitstaub und Rohruß

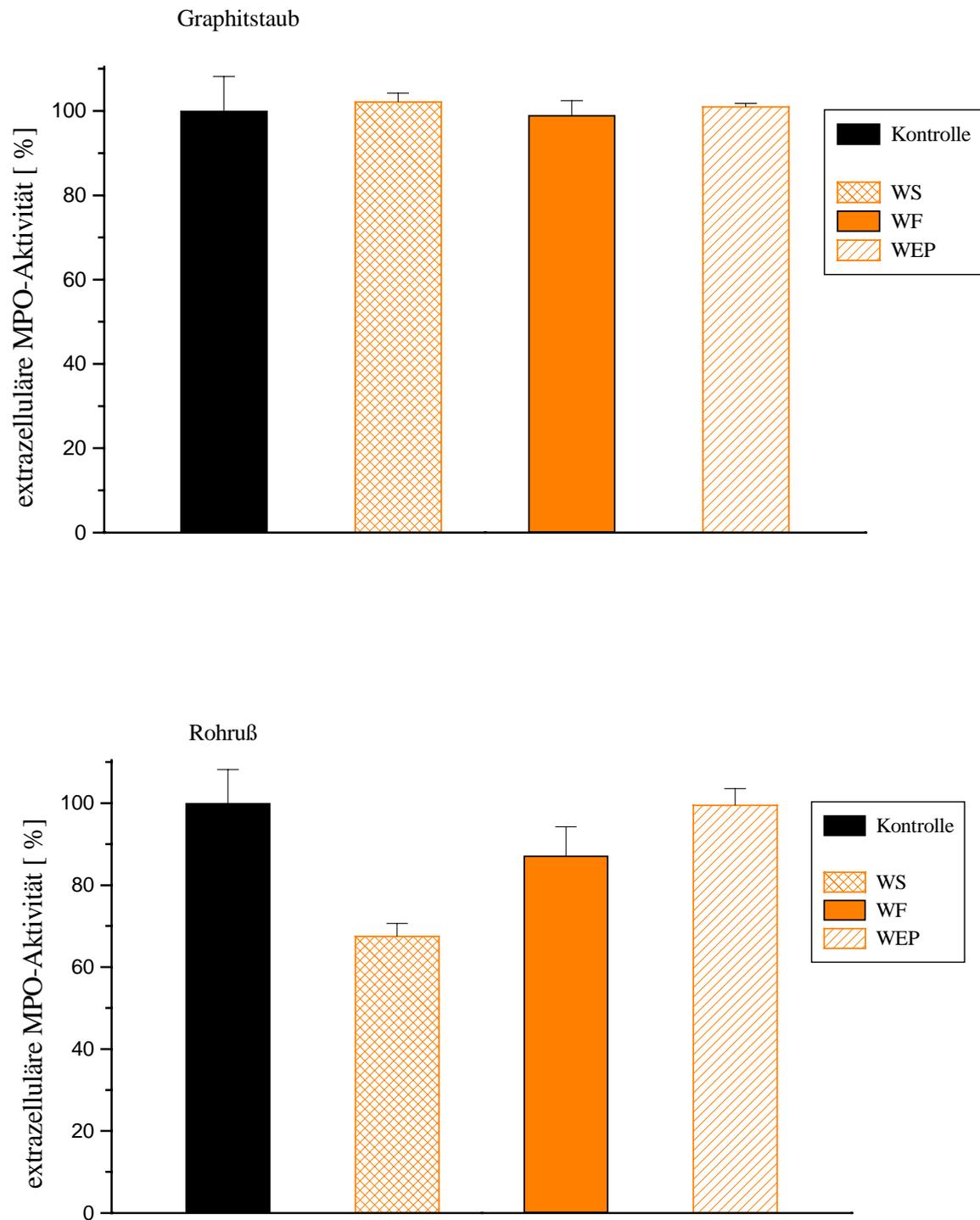


Abb. 5b: Beeinflussung der Degranulation (extrazelluläre Myeloperoxidaseaktivität) durch LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsruß

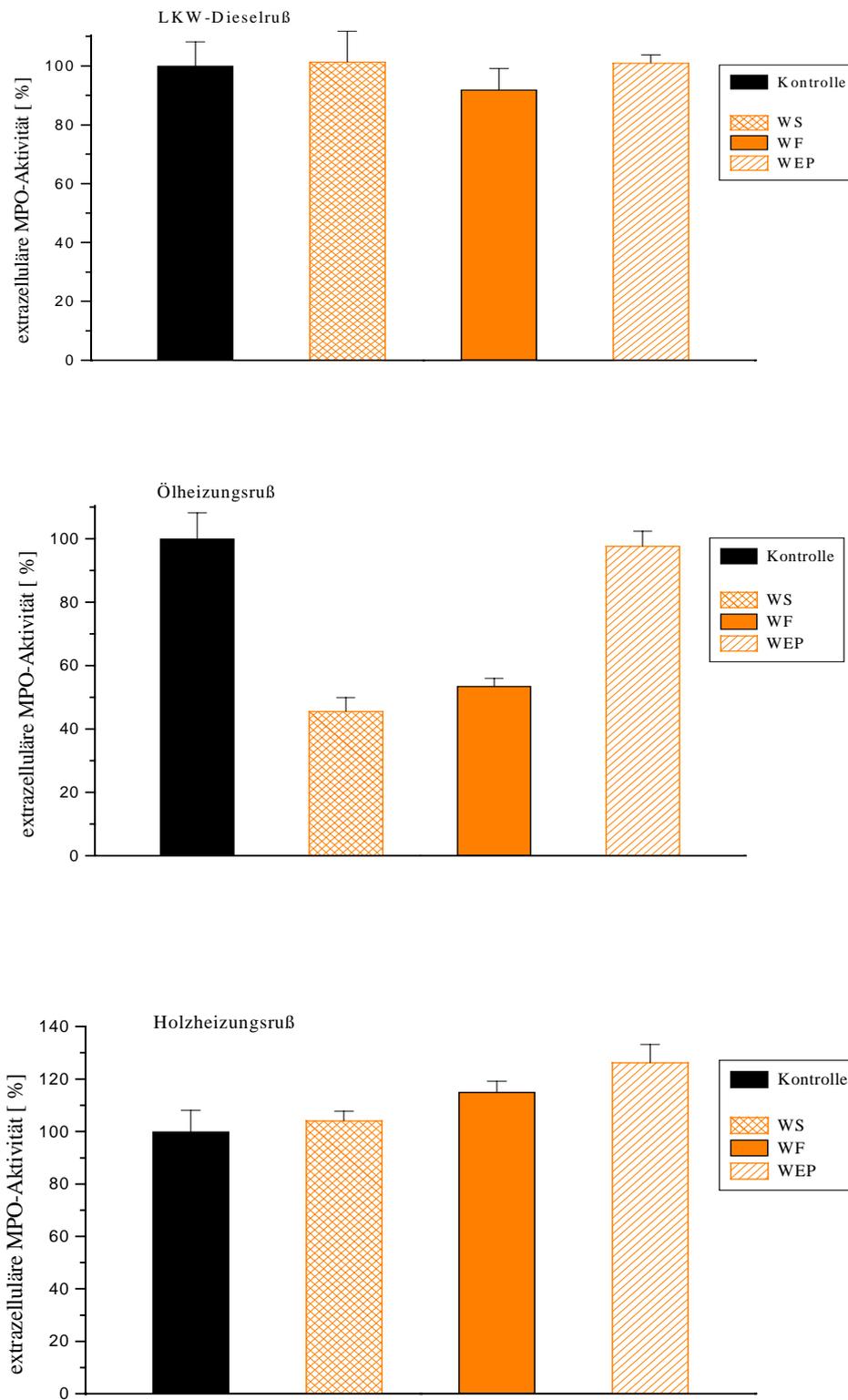


Abb. 5c: Beeinflussung der Degranulation (extrazelluläre Myeloperoxidaseaktivität) durch die Mineralfaserproben

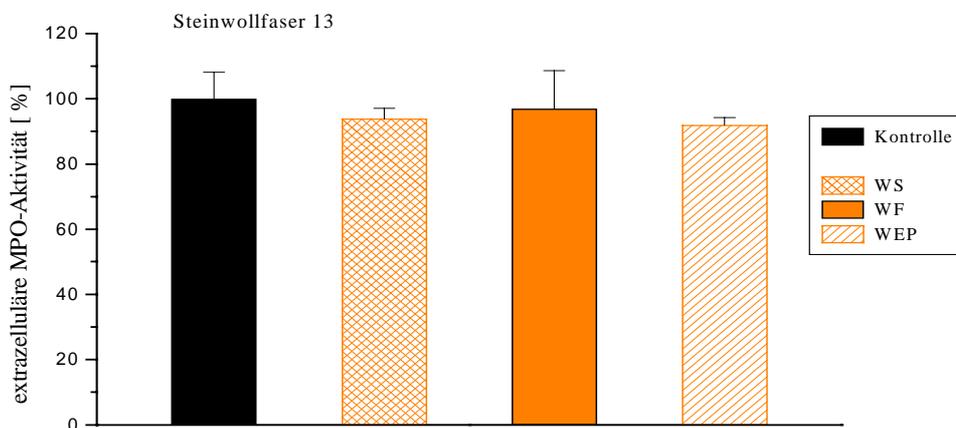
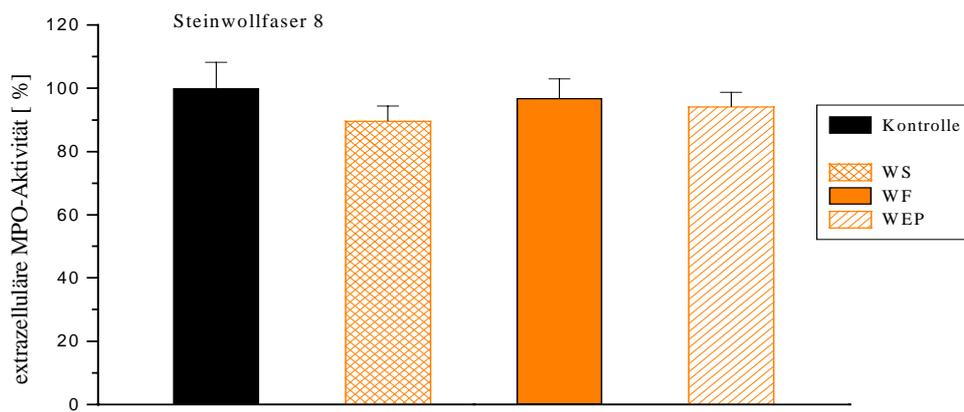
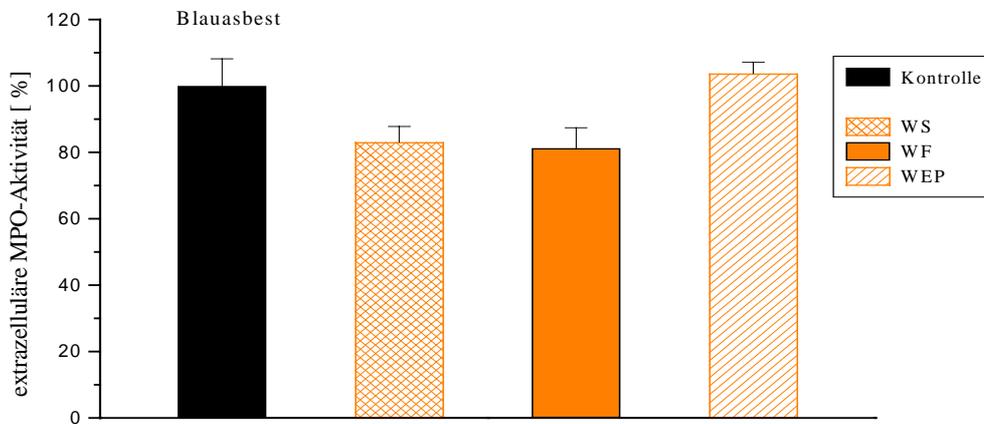


Abb. 6a: Beeinflussung der Phagozytose (Adhäsion und Ingestion von Latexbeads) durch Graphitstaub und Rohruß

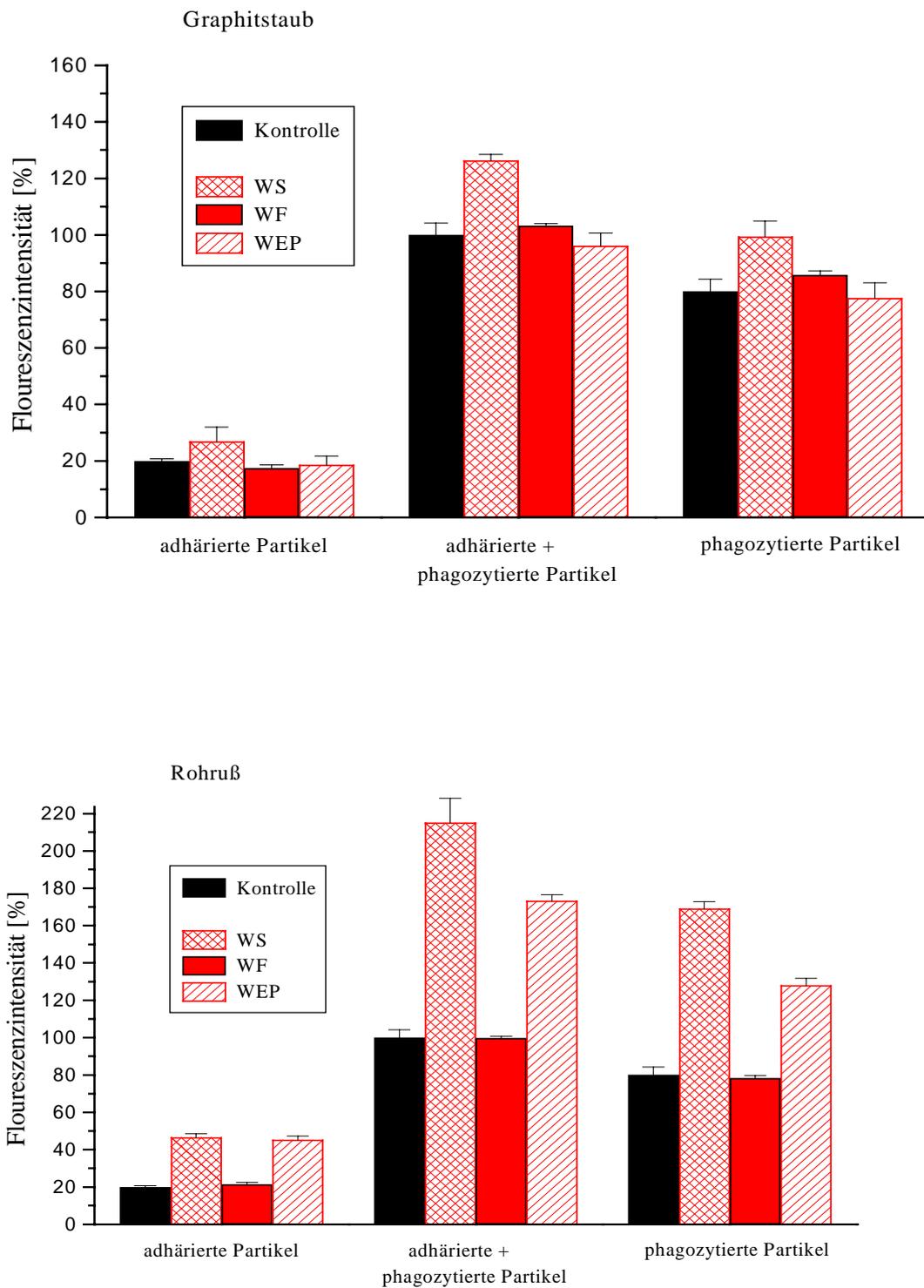


Abb. 6b: Beeinflussung der Phagozytose (Adhäsion und Ingestion von Latexbeads) durch LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsruß

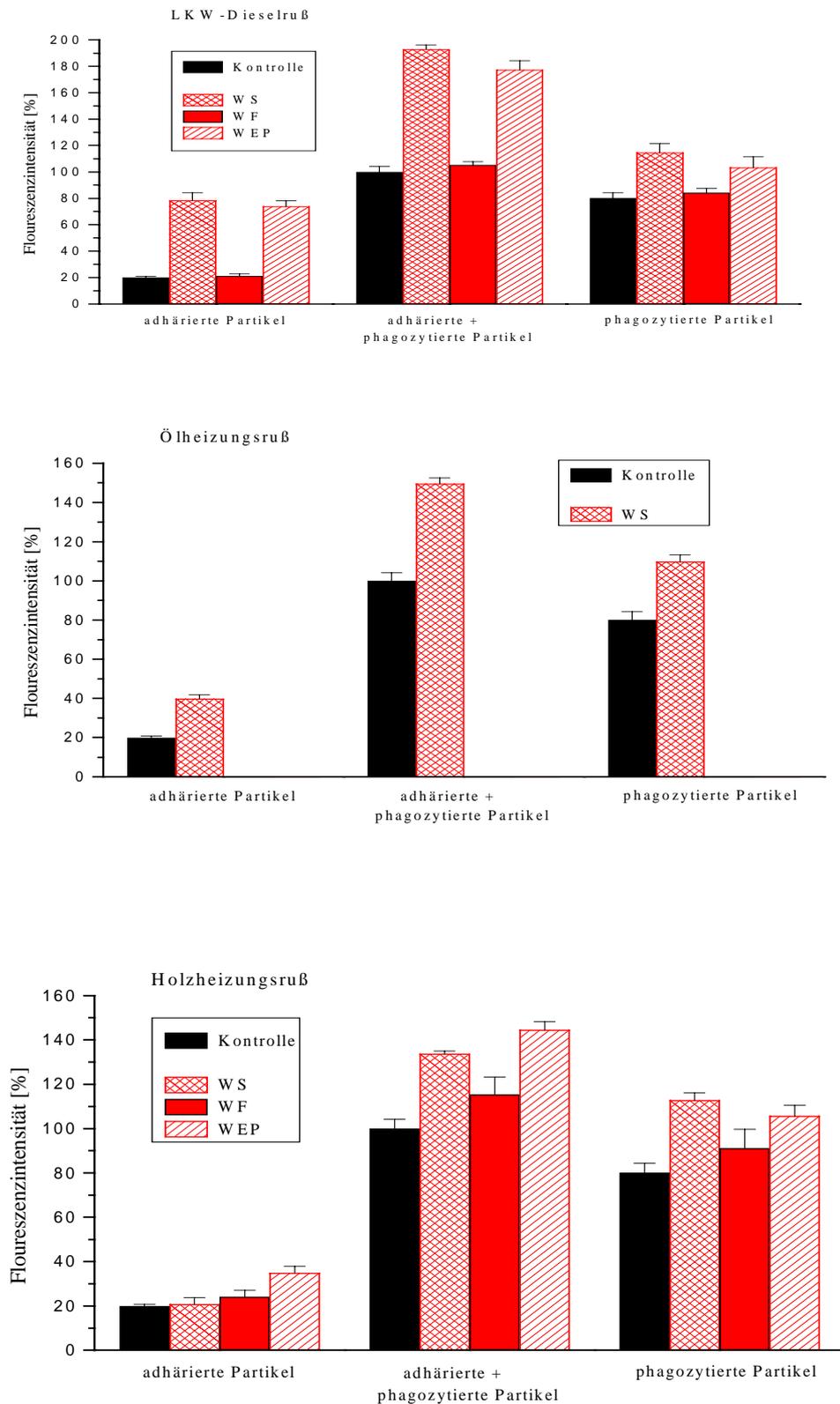


Abb. 6c: Beeinflussung der Phagozytose (Adhäsion und Ingestion von Latexbeads) durch die Mineralfaserproben

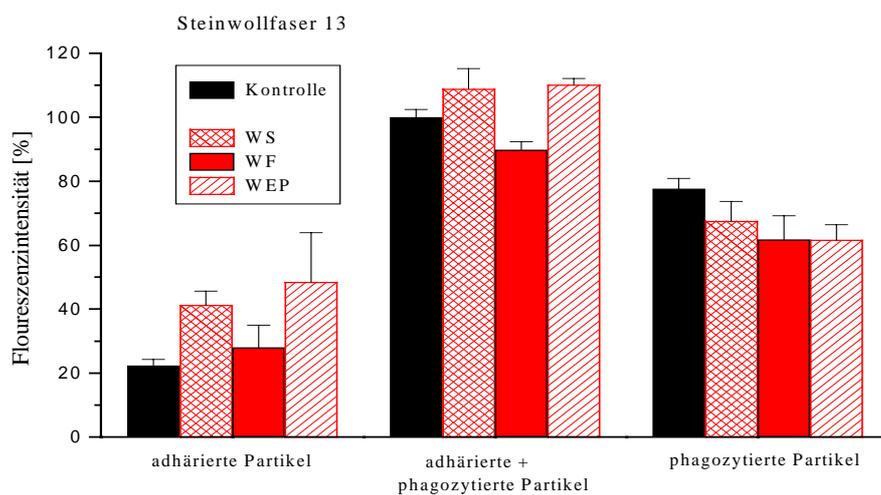
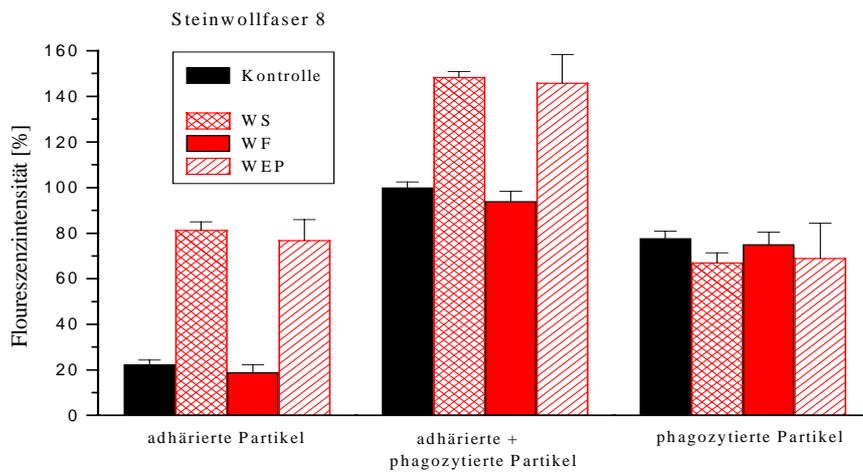
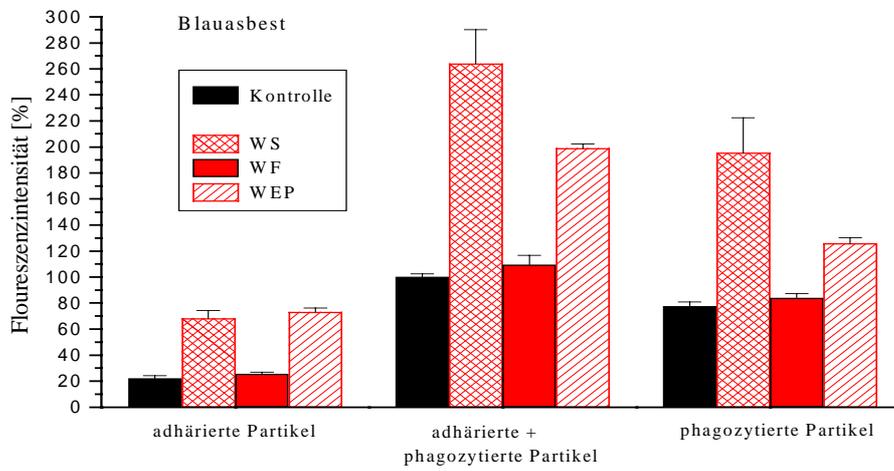


Abb. 7a: Interaktionen des Graphitstaubes und des Rohrußes mit Produkten des respiratory burst

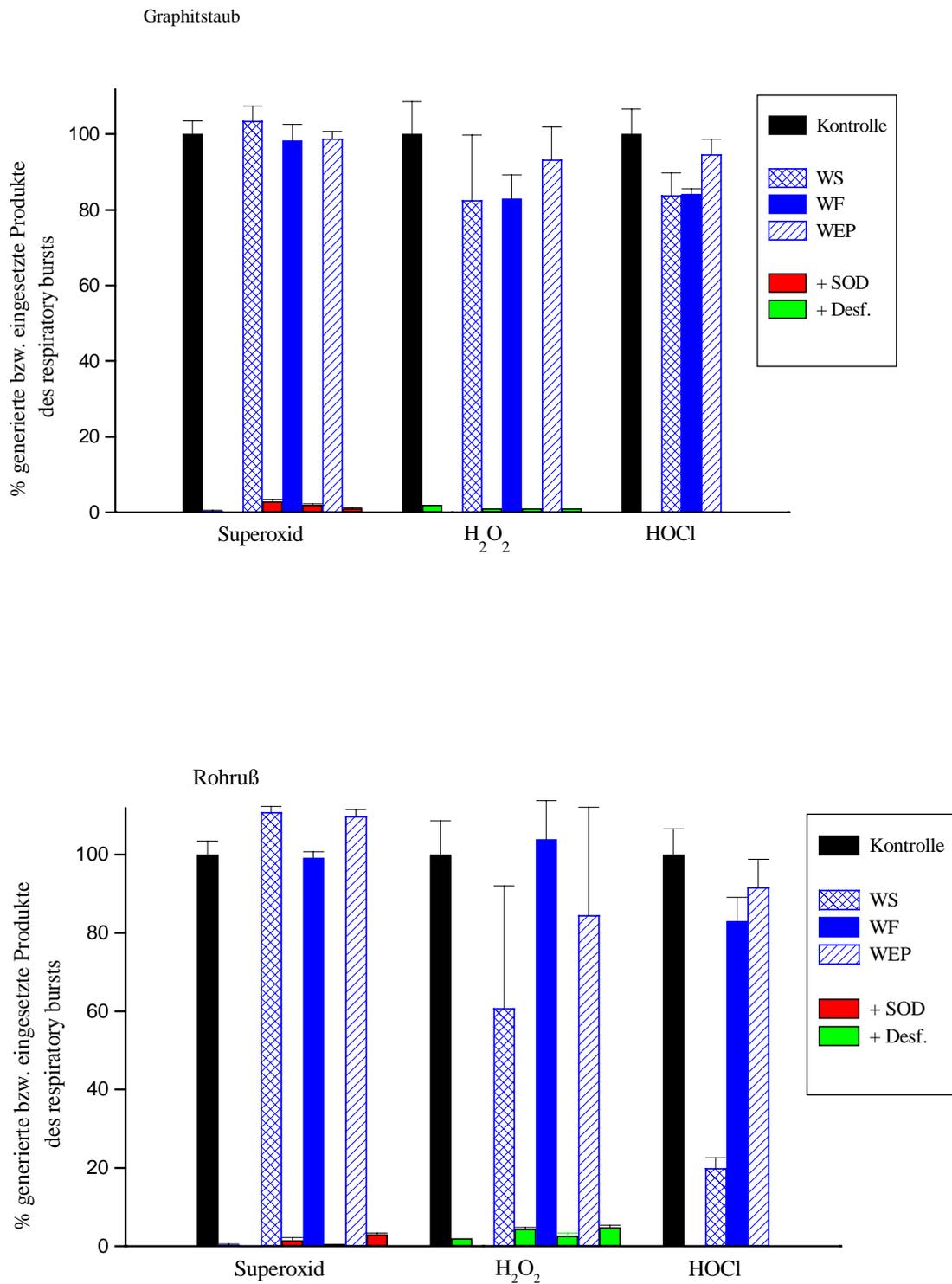


Abb. 7b: Interaktionen des LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsrußes mit Produkten des

Respiratory burst

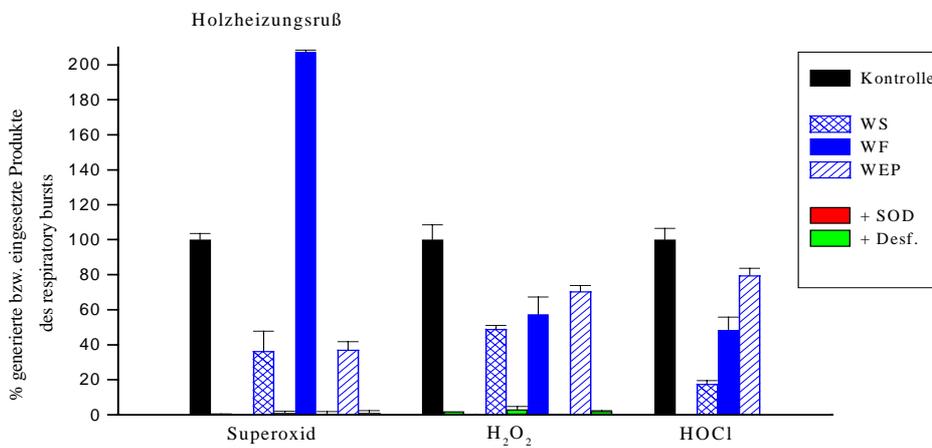
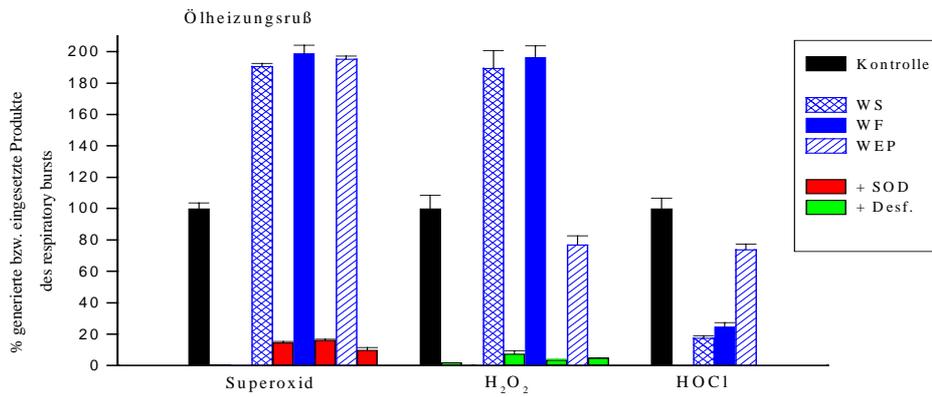
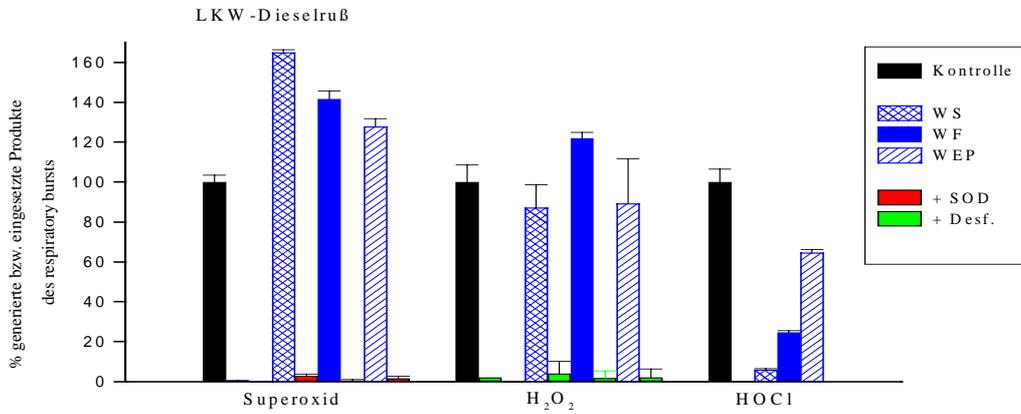


Abb. 7c: Interaktionen der Mineralfaserproben mit Produkten des Respiratory burst

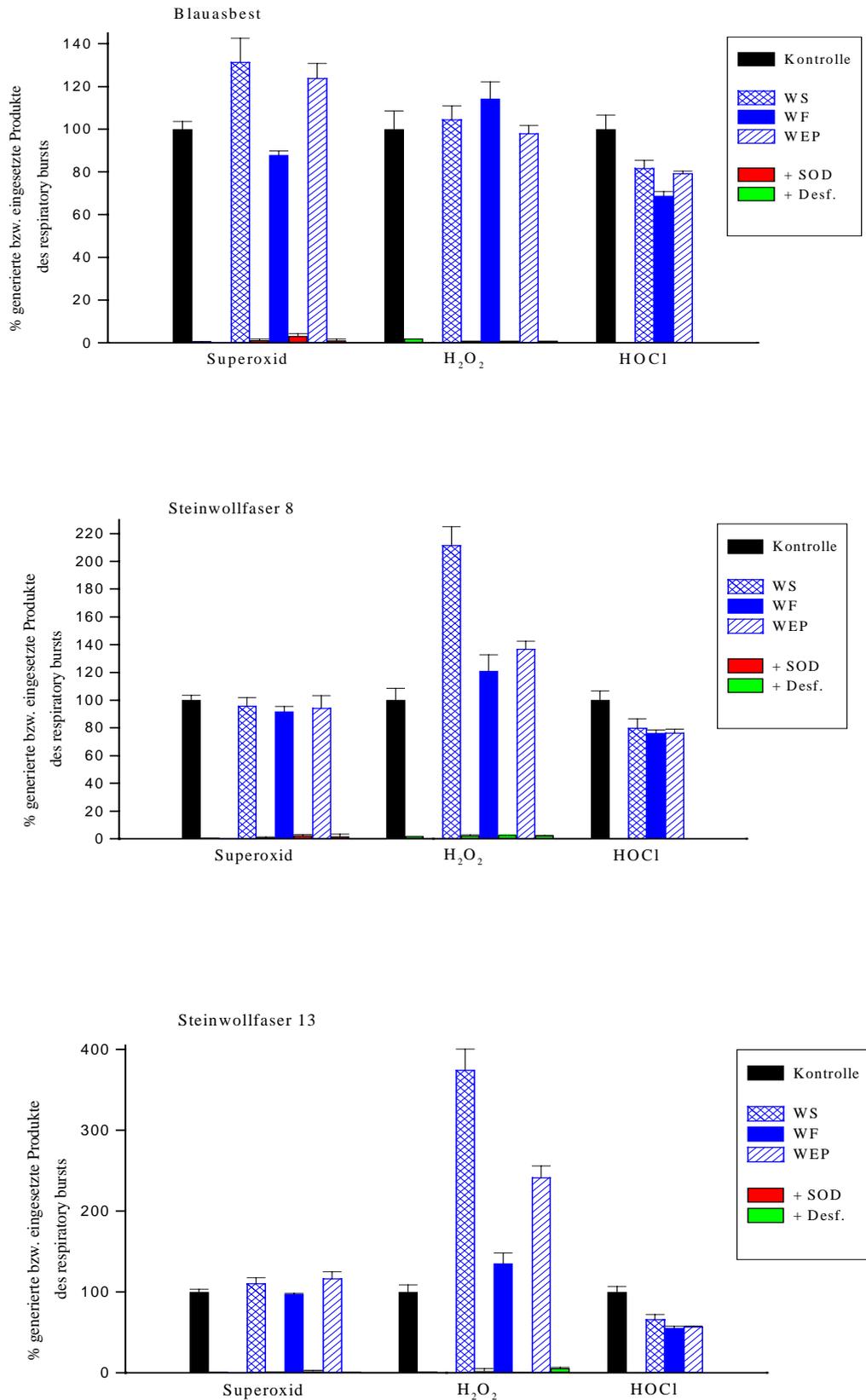


Abb. 8a: Interaktionen des Graphitstaubes und des Rohrußes mit Degranulationsenzymen und mit dem  $\alpha_1$ -PI

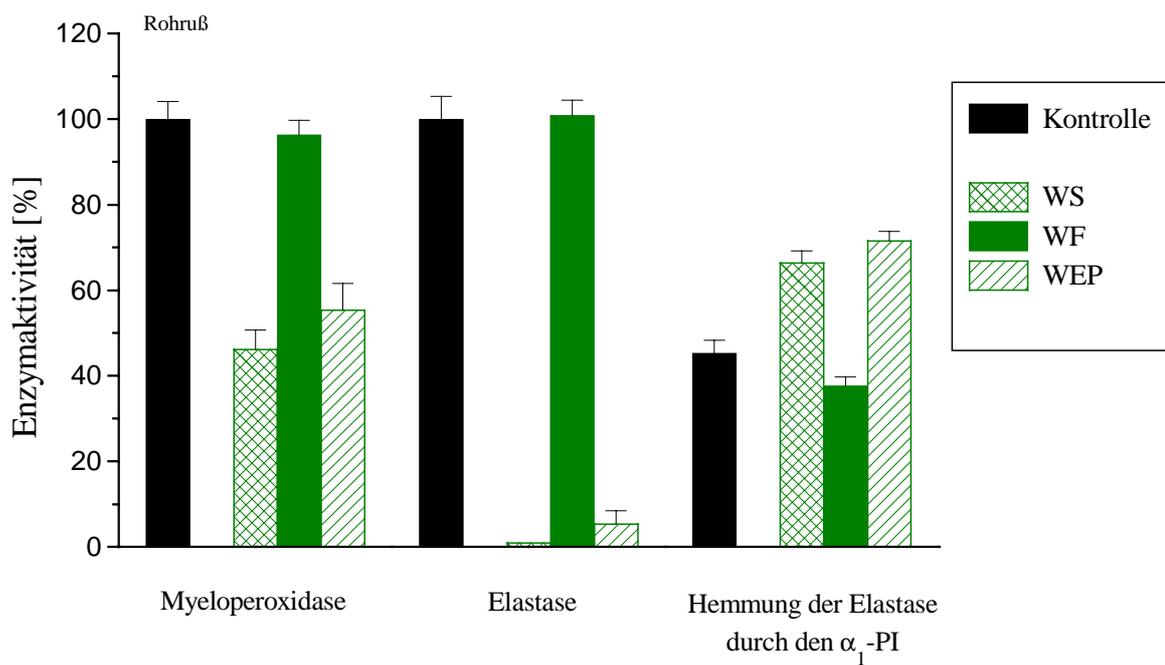
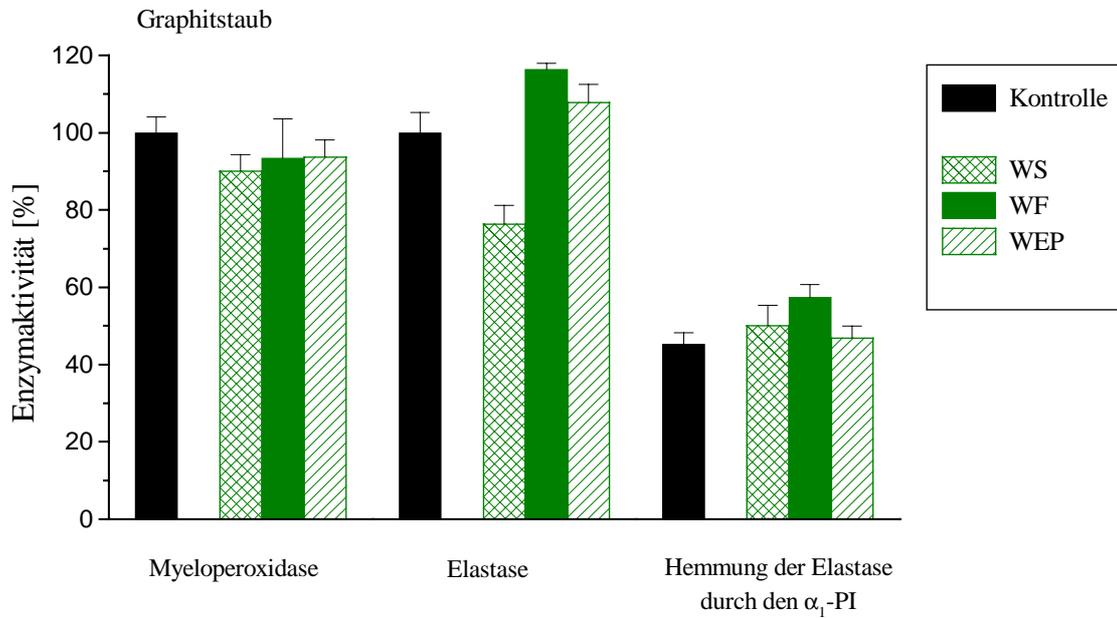


Abb. 8b: Interaktionen des LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsrußes mit Degranulationsenzymen und mit dem  $\alpha_1$ -PI

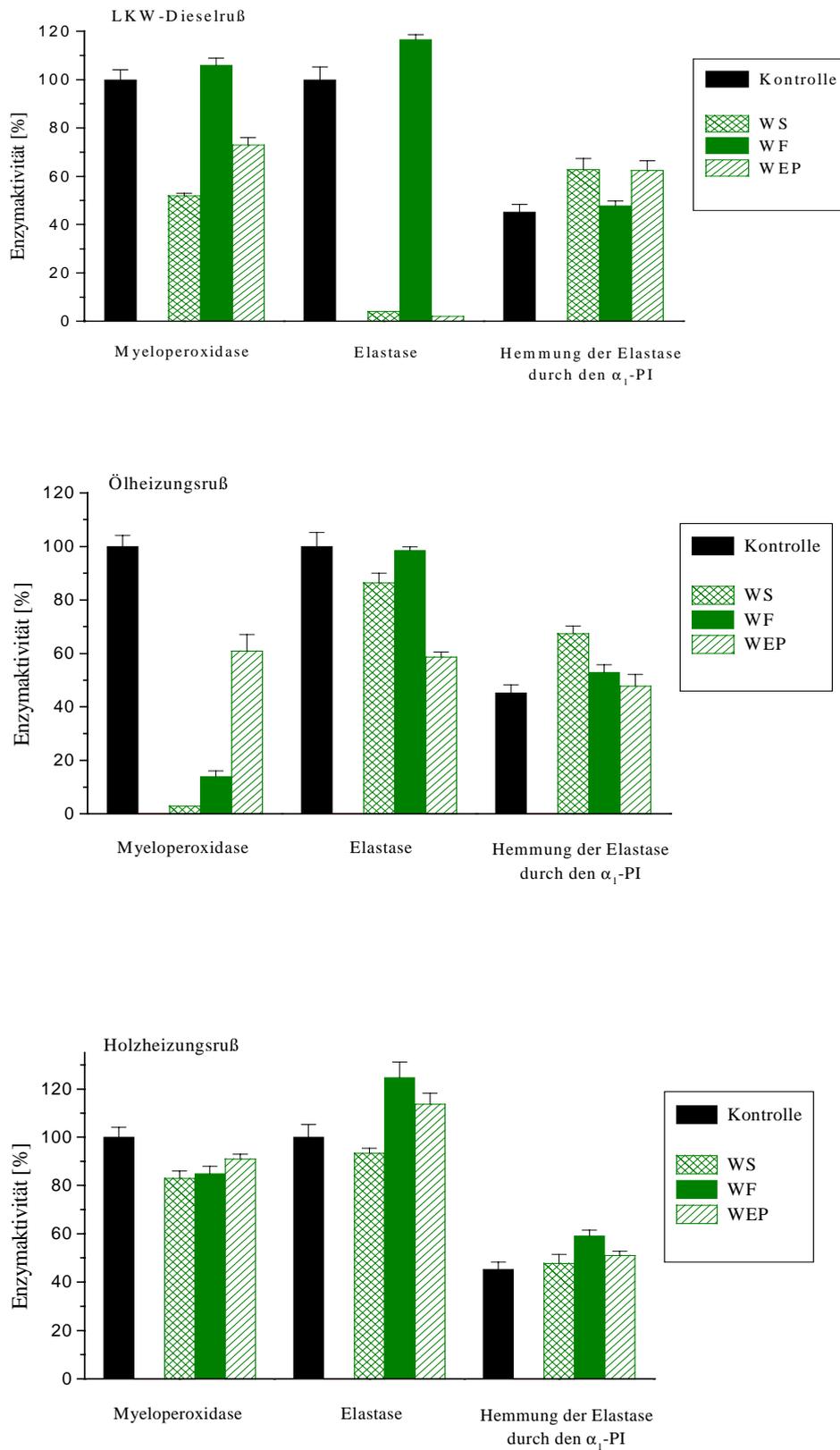


Abb. 8c: Interaktionen der Mineralfaserproben mit Degranulationsenzymen und mit dem  $\alpha_1$ -PI

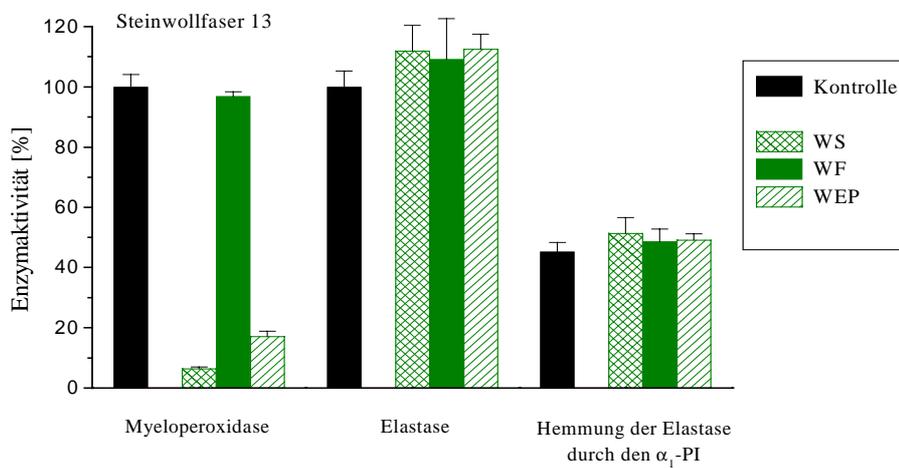
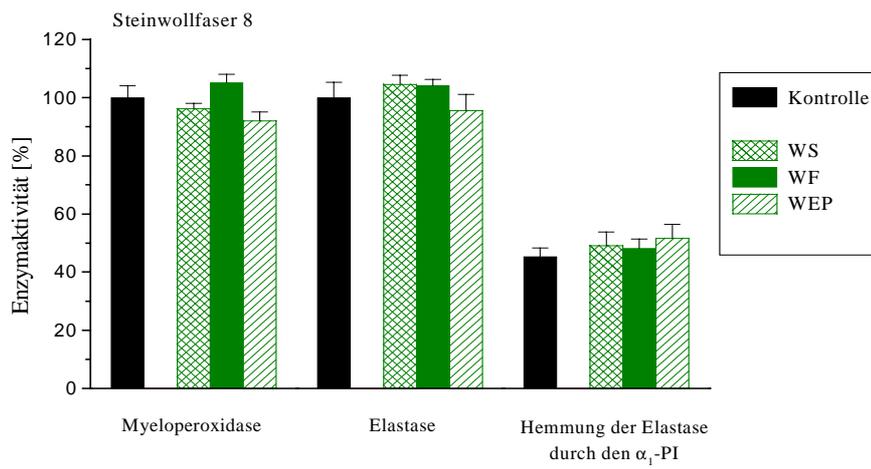
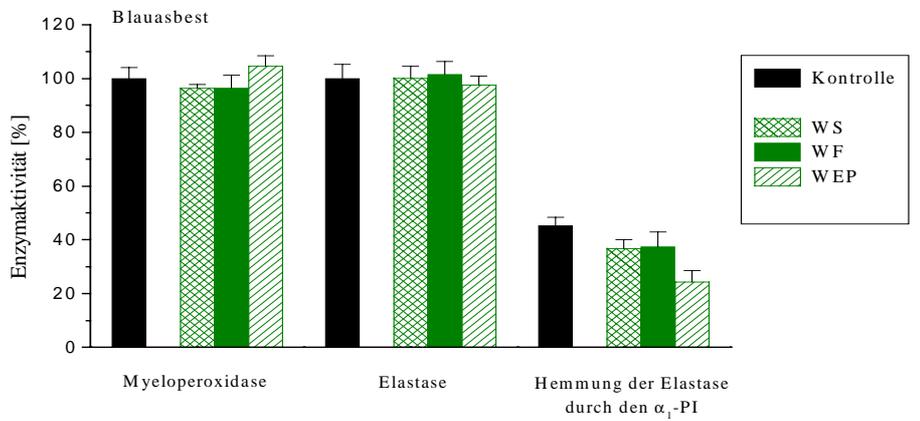


Abb. 9a: Beeinflussung der durch Sulfite ausgelösten Lipidperoxidation durch Graphitstaub und Rohruß

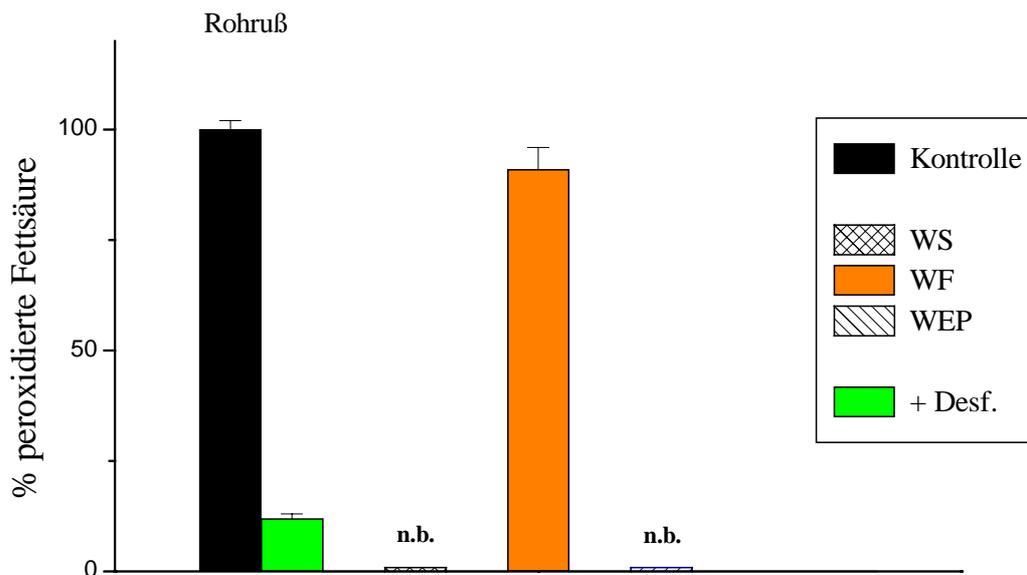
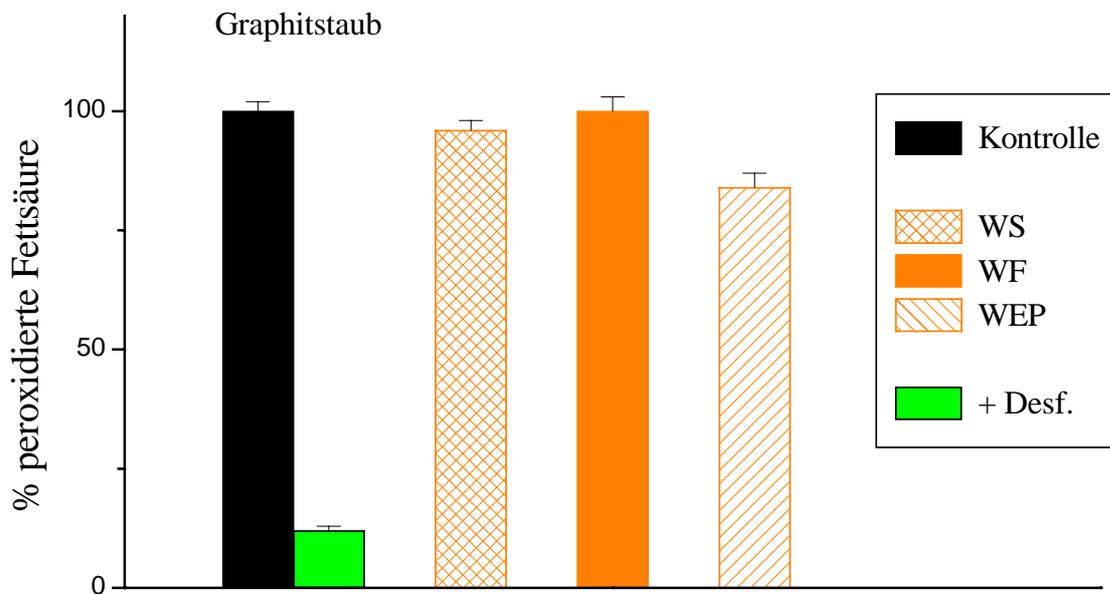


Abb. 9b: Beeinflussung der durch Sulfid ausgelösten Lipidperoxidation durch LKW-, Ölheizungs- und Holzheizungsruß

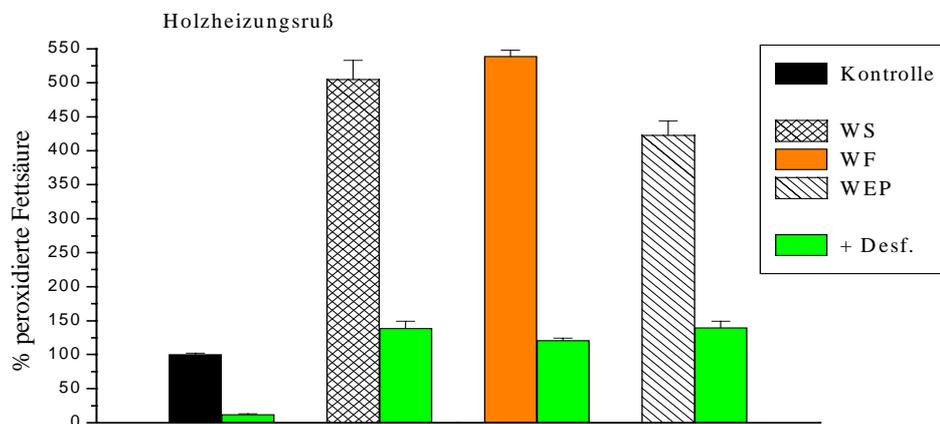
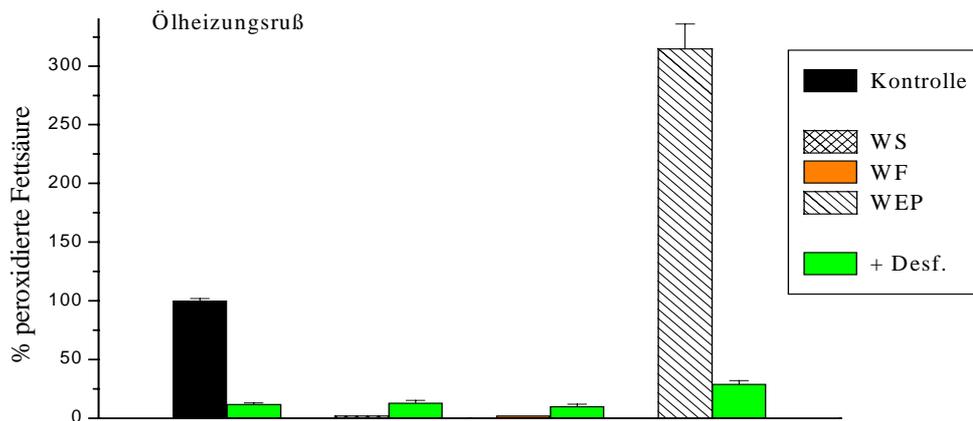
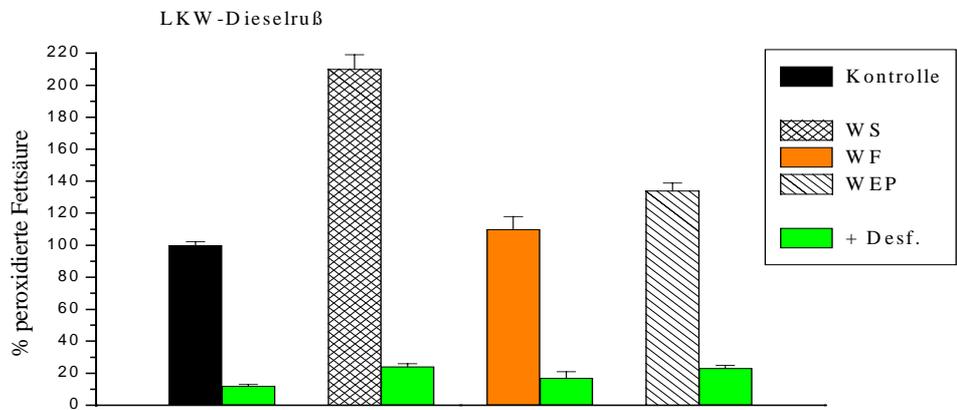


Abb. 9c: Beeinflussung der durch Sulfid ausgelösten Lipidperoxidation durch die Mineralfaserproben

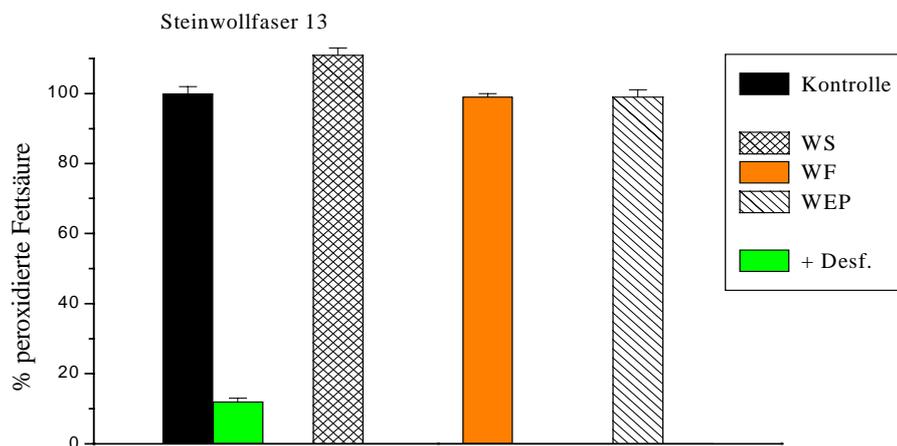
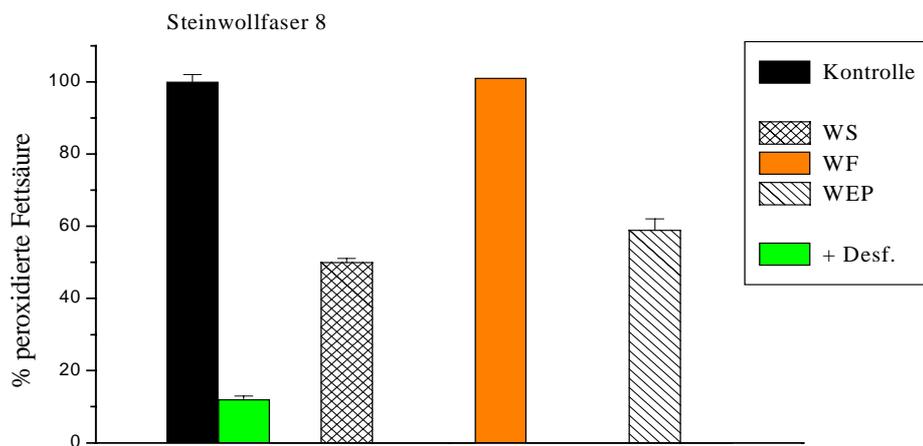
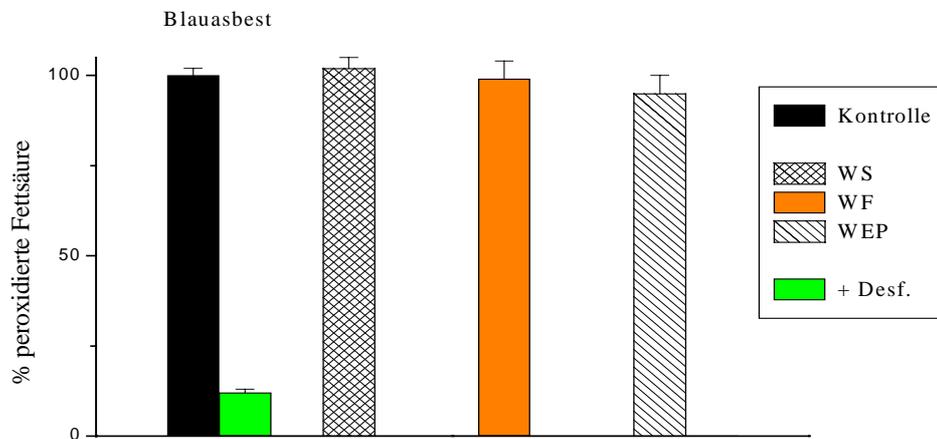


Abb. 10: Beeinflussung der Degranulation neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Rohrußkonzentration

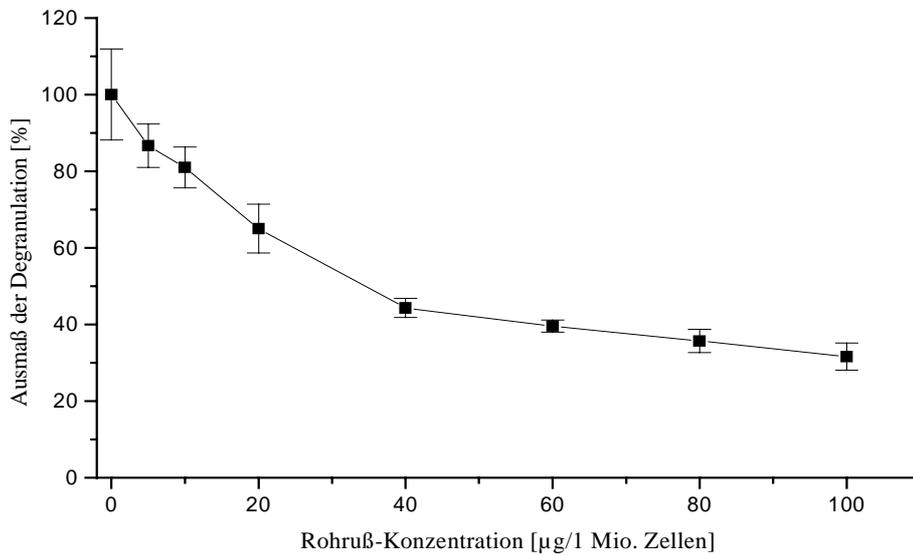


Abb. 11: Beeinflussung der phagosomalen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion in Abhängigkeit von der Ölheizungsrußkonzentration

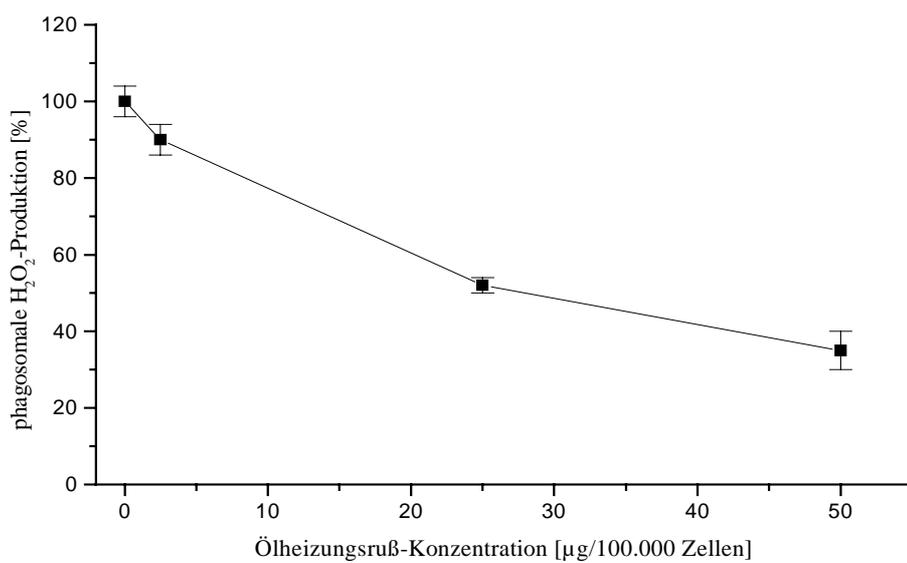
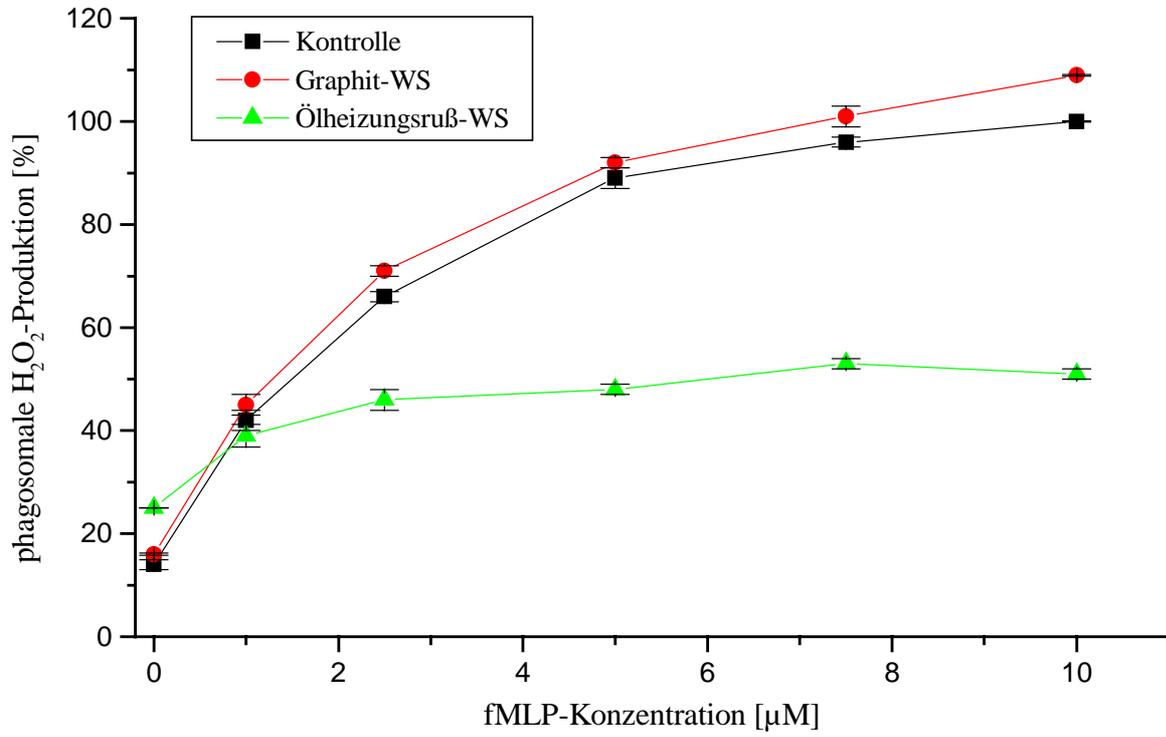


Abb. 12: Beeinflussung der phagosomalen  $H_2O_2$ -Produktion in Abhängigkeit von der fMLP-Konzentration

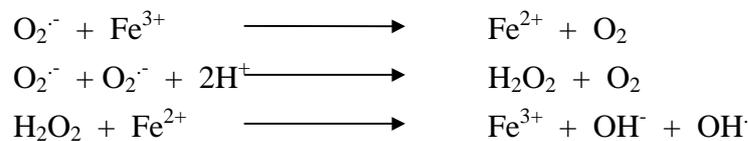


## Anhang 2

### Beweisführung einer Beteiligung von Eisenionen am Reaktionsmechanismus

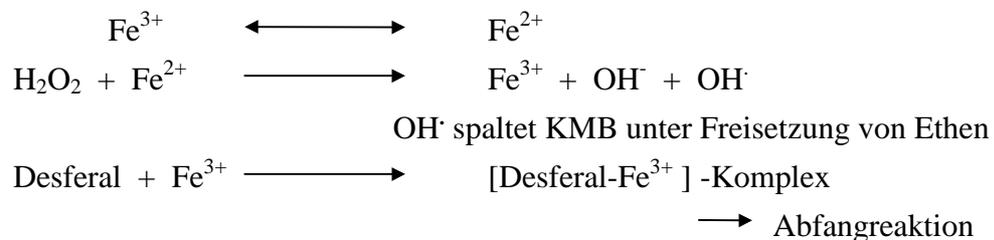
**Interaktion mit Superoxid:** gemessen als Hydroxylaminoxidation:

Superoxid kann  $\text{Fe}^{3+}$  reduzieren, welches dann in der Lage ist Wasserstoffperoxid reaktiv unter OH-Radikalbildung zu spalten (klassische Haber-Weiss-Reaktion):



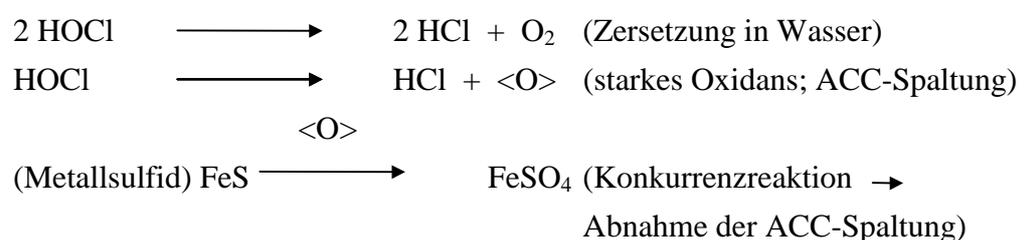
Auch das  $\text{OH}^\cdot$  ist in der Lage Hydroxylamin zu oxidieren. Voraussetzung für die Aktivierung des Eisens ist die Gegenwart von  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Deshalb ist nicht nur die Kontrollreaktion, sondern auch die durch das WF gesteigerte Hydroxylaminoxidation vollständig SOD-hemmbar.

**Interaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ :** gemessen durch entstandenes Ethen aus KMB, das durch Radikale fragmentiert wird.



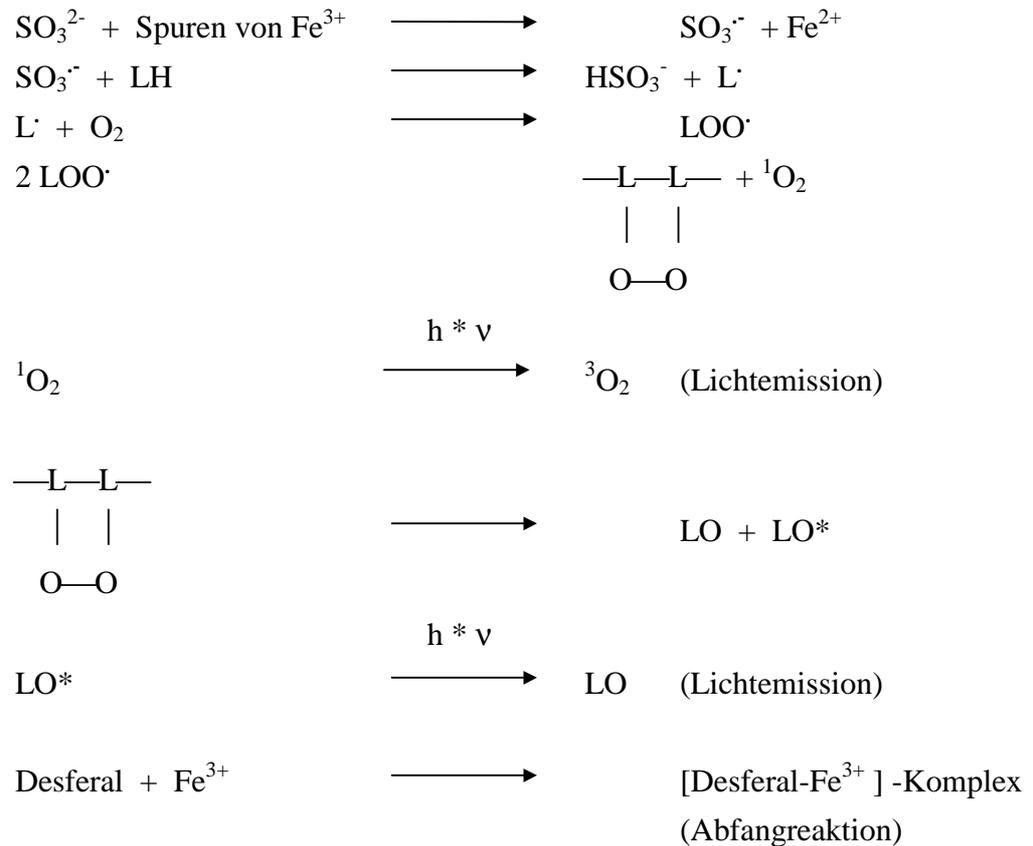
Unterdrückung der Kontrollreaktion durch Desferal: schon Spuren von Eisen im Puffer z.B. genügen, um eine Fenton-Reaktion auszulösen. Auch die durch das WF zusätzlich verursachte KMB-Spaltung wird durch Desferal vollständig unterdrückt.

**Interaktion mit HOCl:** gemessen als Ethenfreisetzung aus ACC:

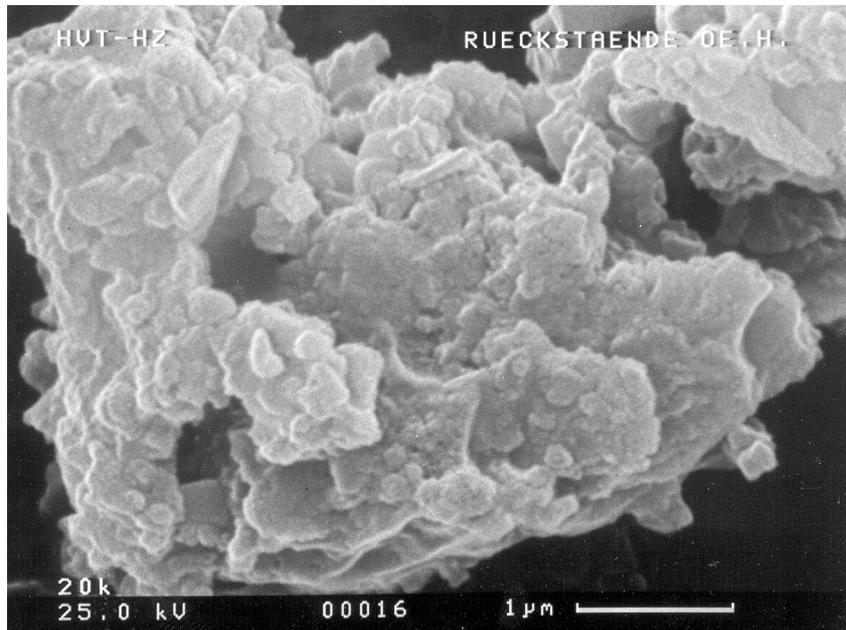


**LPO/Sulfit:** gemessen als Chemilumineszenz während der LPO:

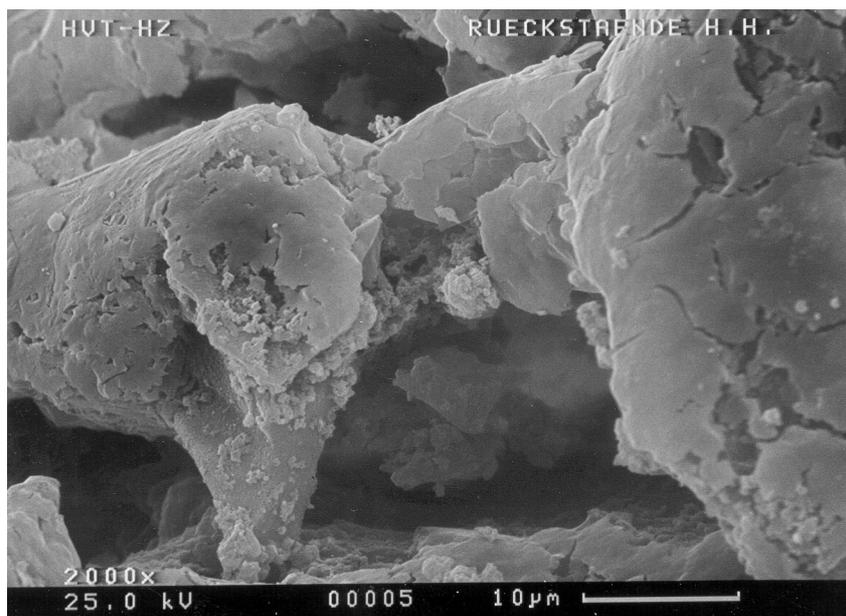
In Anwesenheit von  $\text{Fe}^{3+}$  reagiert Sulfit zum Sulfitradikal, das seinerseits in der Lage ist eine Lipidperoxidation auszulösen. (LH: Linolensäure) Die Lichtemission ist dabei strikt abhängig von der Anwesenheit der Fettsäure, d.h. Eisen und Sulfit alleine reichen nicht aus.

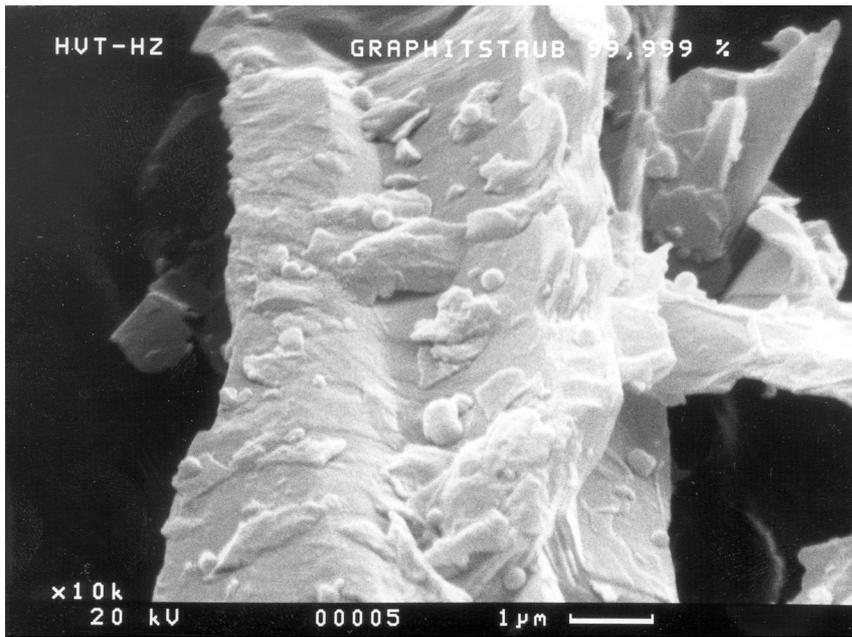


# Anhang 3

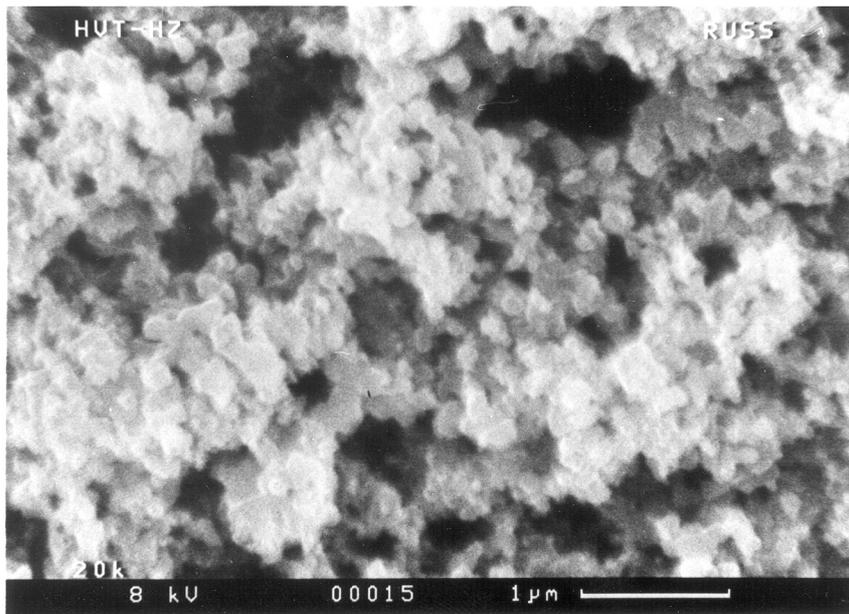


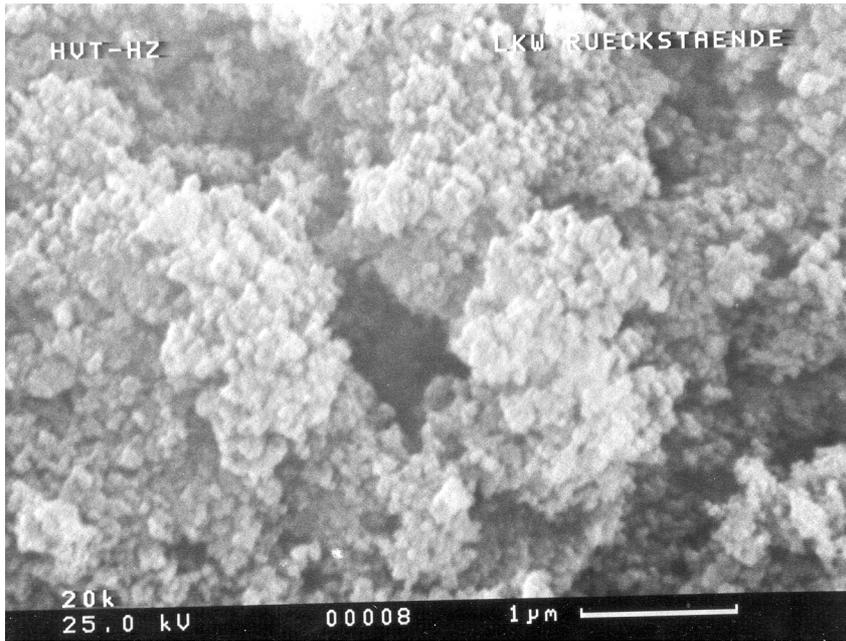
REM-Aufnahmen der Öl- und Heizungsrußproben





REM-Aufnahmen des Graphitstaubs und des Rohrrußes





REM-Aufnahme des LKW-Dieselruß