

Projekt Umwelt und Gesundheit (PUG)

Forschungsbericht FZKA-PUG 29

Wirkung von Ozon auf die in vitro-Bildung und -Freisetzung von
Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren durch
Alveolarmakrophagen bei Patienten mit chronisch bronchopulmonalen
Entzündungen

von

Th. Muley¹, P. Segräfe¹, M. Wiebel², V. Schulz², W. Ebert¹

Thoraxklinik Heidelberg

¹Abt. Klinische Chemie und Bakteriologie

²Innere Medizin und Pneumologie

Die Arbeiten des Projektes "Umwelt und Gesundheit" werden mit Mitteln
des Landes Baden-Württemberg gefördert

Förderkennzeichen: PUG L 94 003

54 Seiten
7 Tabellen
17 Abbildungen
125 Literaturstellen

Oktober 1997

FZKA-PUG-Berichte

Das Projekt Umwelt und Gesundheit (PUG) im Forschungszentrum Karlsruhe GmbH fördert, koordiniert und betreut im Auftrag des Landes Baden-Württemberg Forschungsvorhaben

- zur Aufklärung von Zusammenhängen von Atemwegserkrankungen mit Luftschadstoffen,
- zu Erkrankungen durch Allergien und Unverträglichkeitsreaktionen durch Lebensmittel und
- zu Erkrankungen durch zivilisationsbedingte Umweltpurenstoffe.

Die PUG-Projektleitung gibt die Schriftenreihe PUG-Berichte heraus. Diese Schriftenreihe hat den Zweck, die im PUG-Programm erarbeiteten Erkenntnisse bekannt zu machen und ihre rasche und breite Anwendung und Nutzung in der Praxis zu unterstützen.

Verantwortlich für den Inhalt sind die Autoren. Das Forschungszentrum Karlsruhe GmbH übernimmt keine Gewähr insbesondere für die Richtigkeit, Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter.

ISSN: 0948-5511

Herausgeber:

Projekt Umwelt und Gesundheit (PUG)
im Forschungszentrum Karlsruhe

Druck und Verbreitung:

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH

Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Printed in the Federal Republic of Germany

Wirkung von Ozon auf die *in vitro*-Bildung und -Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren durch Alveolarmakrophagen bei Patienten mit chronisch bronchopulmonalen Entzündungen

Th. Muley¹, P. Segräfe¹, M. Wiebel², V. Schulz², W. Ebert¹, - ¹Abt. Klinische Chemie und Bakteriologie, ²Innere Medizin und Pneumologie, Thoraxklinik, Amalienstr. 5, 69126 Heidelberg

ZUSAMMENFASSUNG

Unter der Fragestellung, ob und wie Ozon die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Alveolarmakrophagen (AM) bei Patienten mit chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen beeinflussen kann, wurden im Projekt die AM von 87 Patienten in 99 *in vitro* Expositionsexperimenten untersucht (13 bei 150 µg, 32 bei 300 µg, 16 bei 700µg und 38 bei 1000 µg Ozon/m³). Die AM wurden in Transwell-Membrankulturgefäßen exponiert und waren apikal der Gasphase 1 Stunde direkt ausgesetzt. Die Befeuchtung erfolgte kapillar von unten durch die poröse Membran hindurch. Nach weiteren 4 Stunden Kultur mit Medium bedeckt, wurden die Parameter im Kulturüberstand gemessen.

Eine signifikant toxische Wirkung ist anhand der erhöhten LDH-Aktivität im Kulturüberstand der ozonexponierten AM ab 300 µg/m³ nachweisbar. Von Patient zu Patient gab es für die einzelnen Parameter eine große individuelle Variabilität bezüglich Richtung und Höhe der Ozonantwort. Die spontane Freisetzung von IL1 α und β sowie IL8 zeigt im Mittel eine diskrete Zunahme nach Ozon (p<0,05 bei 150 µg), während für TNF zumeist eine Hemmung festzustellen ist (p<0,05 bei 300 µg; p<0,01 bei 1000 µg Ozon). Die Patientengruppen Sarkoidose, Fibrose und Bronchitis unterscheiden sich in ihrer Basisfreisetzung, wobei die AM von Sarkoidosepatienten für die untersuchten Zytokine die höchsten Sekretionsraten aufweisen. Die ozonbedingte Sekretionsänderung zeigt keine signifikanten Unterschiede in Höhe und Auslenkung zwischen den Patientengruppen. Der stärkste Ozoneffekt wird nach zusätzlicher Aktivierung der AM mit LPS ermittelt. Man findet eine stark verminderte Freisetzung von TNF und IL6 bei allen untersuchten Ozonkonzentrationen. Die IL1 α -, β - und IL8-Freisetzung wird dagegen wenig beeinflusst. Die murine Makrophagenzelllinie J774A.1 zeigt nach 300 µg Ozon und nachfolgender LPS-Stimulation eine TNF-Reduktion ähnlich den humanen AM. Eine funktionelle Schädigung des LPS-Rezeptors (CD14) durch Ozon kann durch eine verminderte LPS-FITC-Bindung der ozonexponierten Zellen demonstriert werden. Der Nachweis des Rezeptors durch markierten anti-CD14-Antikörper bleibt dagegen weitgehend unbeeinträchtigt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß Ozon auch bei umweltrelevanten Konzentrationen an AM funktionelle Schäden hervorruft und die Zytokinfreisetzung moduliert, insbesondere nach zusätzlicher Aktivierung durch LPS. Die Ozonantwort selbst scheint eher durch individuelle Faktoren als durch die Grunderkrankung der Patienten beeinflusst zu werden.

Effect of ozone on in-vitro synthesis and release of inflammatory mediators and growth factors from alveolar macrophages in patients with chronic inflammatory lung diseases.

Th. Muley, P. Segräfe, M. Wiebel, V. Schulz, W. Ebert, - Thoraxklinik Heidelberg-Rohrbach

SUMMARY

The effect of ozone exposure on cytokine release was studied in alveolar macrophages (AM) from patients with chronic inflammatory lung disease. AM of 87 patients entered 99 exposure experiments (13 at 150 μg , 32 at 300 μg , 16 at 700 μg , and 38 at 1000 μg ozone/ m^3). AM were exposed in a biphasic system consisting of membrane-culture insert of high porosity (transwell). AM were directly exposed to ozone for 1 h, followed by 4 h of culture covered with serum-free medium. The parameters were determined in culture supernatant by ELISA (interleukin (IL) 1 α , β , IL6, IL8, TNF α), by bioassay (TNF α), and by enzyme assay (LDH).

By increased LHD activities in culture supernatants of ozone exposed AM, a significant cytotoxic effect was identified for ozone concentrations equal to or higher than 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Spontaneous release of IL1 α , β and IL8 slightly increased after ozone exposure ($p < 0,05$ at 150 μg ozone]. TNF was released in reduced quantities ($p < 0,05$ at 300 μg ; $p < 0,01$ at 1000 μg ozone/ m^3). Patients with chronic bronchitis, fibrosis, and sarcoidosis differed significantly in basic cytokine release of IL1 α -, β , IL8, and TNF, with sarcoidosis patients showing the highest levels of cytokines measured. Nevertheless, the ozone induced changes for the various cytokines were not significantly different between the above patient groups.

The most obvious effect of ozone could be observed after additional stimulation of AMs with LPS. LPS induced secretion of TNF and IL6 were shown to be strongly inhibited by ozone, even at ambient concentrations (150 and 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Little effect was seen regarding IL8, IL1 α , and β .

The murine macrophage cell line J774A.1, which proved to respond to LPS stimulation in a similar reduction of TNF release after ozone exposure, was used as a model to study LPS receptor binding.

After ozone exposure at 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ LPS-FITC binding was reduced significantly demonstrating impaired receptor function, whereas detection of receptor by monoclonal anti-CD14-antibody was not altered significantly.

In conclusion, ozone impairs macrophage functions even at ambient concentrations, which might interfere with host defence mechanisms. Some, but not all patients might therefore risk of aggravation of their respective disease. Response to ozone seemed to be influenced rather by the individual's conditions than by the underlying disease.

Inhaltsverzeichnis

Seite

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Allgemeine Eigenschaften von Ozon	1
1.2 Die Auswirkung von Ozon auf Tiere	1
1.3 Die Auswirkung von Ozon auf den Menschen	3
1.4 Untersuchung der Ozonwirkung auf isolierte Zellen	5
1.5 Fragestellung	7
2 MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Bezugsquellen	9
2.1.1 Chemikalien	9
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	10
2.1.3 Antikörper und rekombinante Cytokine	10
2.1.4 ELISA und Testkits	10
2.1.5 Zellkulturmaterial	10
2.2 Patienten	11
2.3 Puffer und Zellkulturmedien	12
2.4 Zellkulturtechniken	13
2.4.1 Gewinnung und Kultivierung von humanen Alveolarmakrophagen	13
2.4.2 Kultur der murinen Makrophagenlinie J774A.1	14
2.4.3 Kultur der murinen Fibrosarkomlinie WEHI 164/13	14
2.5 Ozonexposition von Zellen	14
2.5.1 Expositionsanlage	14
2.5.2 Gasexposition von Alveolarmakrophagen	15
2.5.3 Gasexposition von J774A.1	19
2.6 Parameterbestimmung	19
2.6.1 Testkits	19
2.6.2 TNF-Bioassay mit WEHI 164/13	19
2.6.3 Bestimmung der LPS-Bindung an Zellen im FACS	20
2.7 Statistische Analysen	21
3 ERGEBNISSE	22
3.1 Zytotoxischer Effekt des Ozons auf Alveolarmakrophagen	22
3.2 Ozoneffekt auf die spontane Zytokinfreisetzung beim Gesamtkollektiv	23
3.3 Ozoneffekt auf die spontane Zytokinfreisetzung bei Patientengruppen	27
3.4 Ozoneffekt auf die LPS-induzierten Zytokinfreisetzung von Alveolarmakrophagen	30
3.5 Wirkung von Ozon auf den LPS-Rezeptor - Untersuchung mit J774A.1-Makrophagen	32
4 DISKUSSION	35
4.1 Expositionssystem	35
4.2 Ozonwirkung	37
4.2.1 Zytotoxischer Effekt	37

4.2.2 Spontane Zytokinfreisetzung der AM	37
4.2.3 LPS-induzierte Zytokinsekretion der AM	40
4.2.4 Auswirkung von Ozon auf den LPS-Rezeptor CD14	42
4.3 Schlußfolgerungen	43
5 LITERATUR	45

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Eigenschaften von Ozon

Ozon (griech: “das Duftende”) ist ein giftiges, in hohen Konzentrationen blau gefärbtes Gas mit einer sehr geringen Wasserlöslichkeit. Seinen Namen verdankt es seinem stechenden Geruch, der schon in Konzentrationen von 40 - 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft durch den Geruchssinn nachweisbar ist [Wagner, 1991].

Man findet Ozon (O_3) in der Umwelt zum einen in der Stratosphäre (12 - 50 km über der Erde) und dort besonders konzentriert in der sog. “Ozonschicht” in ca. 25 km Höhe, in der es in Konzentrationen von 7 ppm (14.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) vorliegt.

Zum anderen liegt Ozon in wesentlich geringeren Konzentrationen in der Troposphäre vor (0 - 10 km über der Erde), in der Jahresmittelwerte von 0,01 - 0,04 ppm (20 - 80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) auftreten [Schweisfurth, 1994, Elstner, 1996]. Eine drastische Erhöhung der natürlich vorkommenden bodennahen Ozonkonzentrationen auf Werte von bis zu 0,3 ppm (600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) und mehr findet vor allem im Sommer durch die verstärkte Bildung bei intensiver Sonneneinstrahlung in Ballungsgebieten statt [Bascom et al., 1996].

Hierbei katalysieren Substanzen wie Stickoxide und flüchtige Kohlenwasserstoffe (»volatile organic carbon«, VOC) aus Verkehr, Landwirtschaft und biogenen Emissionen die Bildung und auch den Zerfall von Ozon [Chameides et al., 1988, Atkinson, 1988]. Der so entstehende photochemische Smog (Sommersmog, Los Angeles-Smog) beinhaltet als einen der wichtigsten Reizerreger Ozon [Beckett, 1991]. Daneben treten auch Peroxyacetylnitrat (PAN) und Stickoxide in hohen Konzentrationen auf [Elstner, 1996].

1.2 Die Auswirkung von Ozon auf Tiere

Ozon greift als starkes Oxidationsmittel bei biologischen Materialien hauptsächlich Zellmembranen an, in denen die ungesättigten Fettsäuren peroxidiert, aber auch Radikale freigesetzt werden [Pryor et al., 1983, Borek, 1988]. Diese Produkte sind sehr reaktionsfreudig und können im Inneren der Zelle durch Reaktion mit z.B. Proteinen weitere Schäden verursachen. Außerdem werden niedermolekulare Substanzen wie Thiole, Aldehyde,

Ozonkonzentration	Ort	Jahr	Tagesmittelwert
664 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Mannheim	1976	½-Stunden-Mittelwert
546 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Köln-Godorf	1981	½-Stunden-Mittelwert
430 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Braunschweig	1981	½-Stunden-Mittelwert
408 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Mannheim	1982	3-Stunden-Mittelwert
408 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Karlsruhe	1982	3-Stunden-Mittelwert
373 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Köln-Hürth	1990	½-Stunden-Mittelwert
371 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Mühlheim-Styrum	1990	½-Stunden-Mittelwert
317 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Schauinsland	1990	½-Stunden-Mittelwert
346 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Wörth	1994	1-Stunden-Mittelwert
325 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Wiesloch (Baden)	1995	1-Stunden-Mittelwert

Tabelle 0.1. Ozonspitzenwerte (Tagesmittelwerte) [aus: Wagner, 1992, ergänzt aus Janositz, 1995, VDI-Richtlinien, 1987]

Amine, Alkoholgruppen und Proteine durch Ozon bzw. Ozonreaktionsprodukte oxidiert. In biologischen Systemen sind durch diese Reaktionen neben den Zellmembranen Moleküle wie z.B. die Glutathionoxidase, die Superoxiddismutase, die Acetylcholinesterase und die Katalase betroffen. Des weiteren werden Aminosäuren wie Cystein, Methionin und Tryptophan oxidiert [Mudd et al., 1969, Freeman und Mudd, 1981]. Als Antioxidantien wirken in allen Fällen die Vitamine C und E [Menzel, 1992], aber auch Glutathion und Harnsäure [Cross et al., 1992], die in der "lining fluid" der Atemwege vorkommen [Davis und Pacht, 1991].

Laboruntersuchungen über die Ozonwirkungen bei Tieren zeigen, daß z.B. Ratten nach chronischer Ozonexposition mit niedrigen Konzentrationen in der proximalen Alveolarregion Epithelentzündung und interstitielle Fibrose aufweisen, sowie Epithelzellschäden in den Bronchiolen [Last und Greenberg, 1980, Chang et al., 1991]. Bei Langzeitexpositionen über 30 Tage mit umweltrelevanten Ozonkonzentrationen tritt bei diesen Tieren eine Zunahme des Lungenvolumens bei gleichzeitiger Vergrößerung des Alveolarvolumens auf [Bartlett et al., 1975]. Bei Mäusen findet man nach 0,4 ppm ($800 \mu\text{g}/\text{m}^3$) Ozon und einer Aerosol-Infektion

mit Streptococcus-Bakterien eine verminderte antimikrobielle Abwehr, die bei noch höheren Konzentrationen so massiv wird, daß sie zum Tod der Tiere führt [Gilmour et al., 1993]. Bei Hunden induzieren sehr hohe Ozonkonzentrationen von 2,1 ppm ($4200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) sowohl Entzündung der Lunge als auch eine Hyperreaktivität der Atemwege [Holtzman et al., 1983]. Rhesusaffen weisen nach 8-stündiger Ozonexposition mit 0,96 ppm ($1920 \mu\text{g}/\text{m}^3$) einen starken Einstrom von Neutrophilen und Eosinophilen in die Lunge auf [Hyde et al., 1992]. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß Ozon bei Tieren Entzündungsprozesse in der Lunge fördert und Lungenfunktionen einschränkt.

1.3 Die Auswirkung von Ozon auf den Menschen

Die Wirkung von Ozon auf den Menschen wird durch seine geringe Wasserlöslichkeit bestimmt. Aufgrund dieser Eigenschaft dringt Ozon tief in die Lungen ein und verbleibt zu 90% im Atemtrakt in den oberen und proximalen unteren Atemwegen [Gerrity et al., 1988, Biscardi et al., 1993]. Andere Untersuchungen belegen, daß ein Großteil des eingeatmeten Ozons die distalen Atemwegen und die Alveoli erreicht [Ultman et al., 1992, Hu et al., 1992] und dort die oben beschriebene stark oxidierende Wirkung ausübt [Menzel, 1984].

Bei erhöhten Ozonkonzentrationen in der Luft treten bei ozonsensitiven Menschen Beschwerden wie Husten und thorakale Schmerzen bei tiefer Inspiration auf, die sich bei Konzentrationen über 0,12 ppm ($240 \mu\text{g}/\text{m}^3$) noch verstärken [Hazucha et al., 1992, Seal et al., 1993]. Die Untersuchung der Schadgaswirkung auf Bevölkerungsgruppen erfolgt im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen, die den Vorteil bieten, daß die Menschen den in der Umwelt auftretenden Schadstoffen direkt ausgesetzt sind. Allerdings ist darin auch eine Unsicherheit bei der Auswertung dieser Untersuchungen begründet, da beobachtete Effekte auf die Lungenfunktion nicht direkt mit einem individuellen Schadstoff in Verbindung gebracht werden können [Bascom et al., 1996]. Im Rahmen dieser epidemiologischen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen Ozonkonzentrationen der Umgebung und einer erhöhten Zahl an Krankenhauseinweisungen aufgrund von Asthma hergestellt [Ponka, 1991, Thurston et al., 1992, Burnett et al., 1994]. Ein Grund für die verstärkt auftretenden Asthmaanfälle bei erhöhter Ozonbelastung liegt wohl darin, daß sich bei Asthmatikern in Reaktion auf das Schadgas die Atemwege verengen und es so zu lebensbedrohlichen Asthmaanfällen kommen kann [Molfino et al., 1991]. McDonnell et al.

Einleitung

[1985a] zeigten in einer kontrollierten Studie in Expositions-kammern mit Kindern in North Carolina, daß diese nach 2 Stunden Bewegung unter 0,12 ppm Ozon ($240 \mu\text{g}/\text{m}^3$) eine signifikante Abnahme einzelner Lungenfunktionsparameter aufwiesen. Auch andere Arbeitsgruppen fanden diese Reaktion sowie eine Hyperreaktivität auf bronchokonstriktorische Stimuli nach Ozonexposition [Holtzman et al., 1979, Kreit et al., 1989, Higgins et al., 1990, Zwick et al., 1991, Castillejos et al., 1992]. Ähnliche Ergebnisse an gesunden Erwachsenen bei 0,08 - 0,12 ppm ($160 - 240 \mu\text{g}/\text{m}^3$) bestätigen diese Aussage [Folinsbee et al., 1988, Horstman et al., 1989].

Eine Stadt, in der schon seit den fünfziger Jahren die Auswirkung von Ozon auf die Bevölkerung untersucht wird, ist Los Angeles (USA) [Goldstein et al., 1969], da hier der Sommersmog mit Ozonkonzentrationen von $> 0,2 \text{ ppm}$ ($> 400 \mu\text{g}/\text{m}^3$) seit langem bekannt ist. So weiß man, daß diese Konzentrationen im Zusammenwirken mit den anderen Schadstoffen in der Luft zu obstruktiven Lungenerkrankungen führen können [Lippmann, 1989]. Allerdings ist auch bekannt, daß alteingesessene Bürger dieser Stadt wesentlich schwächer auf sehr hohe Ozonkonzentrationen in Bereichen von 0,4 - 0,5 ppm ($800 - 1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) reagieren als neu Hinzugezogene [Hackney et al., 1976, Horvath et al., 1981]. Dieses als Adaptation bekannte Phänomen ist auch aus kontrollierten Ozonexpositionen im Labor bekannt und tritt sogar bei Probanden auf, die ein hyperreagibles Bronchialsystem aufweisen [Hackney et al., 1977, Jörres und Magnussen, 1996].

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nimmt man an, daß besonders Personen mit Bronchitis, Asthma oder einem hyperreagiblen Bronchialsystem durch die hohen Ozonkonzentrationen in der Umwelt betroffen sind, wobei schon die Entstehung dieser Erkrankungen durch Luftverschmutzung sowie durch individuelle Schadstoffbelastung wie Rauchen begünstigt wird [Vedal, 1995, Enarson, 1995]. Eine weitere durch Ozon betroffene Gruppe sind wahrscheinlich Säuglinge und Kleinkinder, da sie durch ihr höheres Atemminutenvolumen einer größeren Schadgasdosis ausgesetzt sind als Erwachsene [Schweisfurth, 1994]. Hinsichtlich der Ozonwirkung ist die Auswirkung bereits bestehender Lungenerkrankungen auf die Reaktivität gegenüber Schadstoffen vor allem anhand von Asthma untersucht worden [Molfino et al., 1991, Ponka, 1991]. Es interessieren aber auch andere die Lunge betreffende Krankheiten, die durch einen chronischen Verlauf zu einer stetigen Beeinträchtigung der Atemfunktionen führen, wie z.B. die im Tierversuch durch

Ozon induzierbare Fibrose [Freeman et al., 1973, 1974] oder chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (Emphysem).

1.4 Untersuchung der Ozonwirkung auf isolierte Zellen

Für Untersuchungen der Schadgaswirkung auf zellulärer Ebene werden bevorzugt prominente Zellen des Atemtraktes verwendet. Die ersten zellulären Bestandteile, die mit inhalierten Gasen und Partikeln in Berührung kommen, sind die Alveolarmakrophagen (AM), weswegen mit diesen häufig in in vitro-Systemen gearbeitet wird. Diese permanent in der Lunge vorhandenen Leukozyten differenzieren sich zum größten Teil immer von neuem aus Monocyten, die permanent aus der Blutbahn emigrieren. Die Gewinnung von humanen AM für in vitro-Expositionen erfolgt mit Hilfe der bronchoalveolaren Lavage (BAL). Hierbei wird ein fiberoptisches Bronchoskop in die Lunge, meist in die Lingula oder den rechten Mittellappen eingeführt, so daß durch Instillation von 100-300 mL Salzlösung in diese Bereiche Zellen unter geringen Verlusten durch Zelltod gewonnen werden können [Reynolds und Newball, 1974, Hunninghake et al., 1979, Strumpf et al., 1981, Reynolds 1987].

Makrophagen haben in allen Geweben, in denen sie auftreten, eine wichtige Schlüsselposition bei der Induktion und Steuerung entzündlicher Prozesse inne. In der Lunge stehen sie in Verdacht, an der Pathogenese von Erkrankungen wie z.B. der Lungenfibrose, der Sarkoidose und dem erworbenen Lungenemphysem maßgeblich beteiligt zu sein. Außerdem vermutet man in den Alveolarmakrophagen einen Induktor der in Reaktion auf die Inhalation von infektiösen Agentien auftretenden Entzündungen [Sibille und Reynolds, 1990], da sie die ersten Zellen des Abwehrsystems sind, die mit den inhalierten Substanzen in Berührung kommen. Pathologische Prozesse in der Lunge werden ebenfalls durch Alveolarmakrophagen beeinflusst. Die Zellen können durch die Sekretion von z.B. Zytokinen Schädigungen des Lungengerüsts hervorrufen oder auch die dort ablaufenden Reparaturprozesse beeinflussen [Sibille und Reynolds, 1990]. Aber auch durch die Aktivierung oder Hemmung anderer Lungenzellen wie Bronchialepithelzellen, Fibroblasten oder auch Leukozyten kommt den AM eine Schlüsselposition bei z.B. der Fibrose [Costabel, 1996] oder der Alveolitis zu [Sibille und Reynolds, 1990].

Eine der wesentlichen Eigenschaften von Makrophagen ist die Phagozytosefähigkeit, die durch Opsonierung der zu phagozytierenden Partikel erleichtert wird [Naegel et al., 1984].

Einleitung

Neben den dafür benötigten Fc-Rezeptoren existieren auf der Zelloberfläche der Makrophagen Komplementrezeptoren, die zu deren Aktivierung führen, sowie Rezeptoren für Zytokine, Leukotriene und weitere Substanzen [Sibille und Reynolds, 1990].

Daneben sezernieren Makrophagen nicht konstitutiv, aber im Rahmen ihrer Funktionen bei der Infektabwehr die unterschiedlichsten Substanzen, angefangen bei Hydroxylradikalen, über verschiedene Zytokine bis hin zu so großen Molekülen wie α_2 -Macroglobulin. Die Sauerstoffmetabolite, die z.B durch Lektine, fMLP, IFN γ und TNF stimuliert werden, nehmen dabei eine wichtige Stellung bei der frühen Infektabwehr ein [Nathan, 1987]. Die ebenfalls synthetisierten und sezernierten Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der parakrinen und autokrinen Zellkommunikation. Mit einem Molekulargewicht von 5 - 35 kDa sind diese extrazellulären Signalmoleküle größer als z.B. Kinine, Prostaglandine oder Leukotriene. Sie wirken über kurze Entfernungen auf Zellwachstum und -differenzierung, auf die Chemotaxis verschiedener Zellen, sowie auf das Zytoskelett, die extrazelluläre Matrix oder auch die Apoptose der sie umgebenden Zellen. Alle Zytokine binden an einen oder mehrere spezielle Membranrezeptoren, die dann über intrazelluläre Signalwege wirken [Kelley, 1990, Calhoun und Kelley, 1993].

Die beiden proinflammatorischen Zytokine IL1 und TNF, die in vitro durch Endotoxin, andere Zytokine, aber auch durch gasförmige Substanzen stimuliert werden [Schollmeier, 1990, Arsalane et al., 1995, Kienast et al., 1996], stehen am Beginn der Entzündungskaskade [Hunninghake, 1984, Bachwich et al., 1986]. Im Netzwerk der Immunantwort aktiviert z.B. IL1 T-Lymphocyten, die daraufhin IL2 sezernieren und IL2-Rezeptoren exprimieren [Smith, 1984]. TNF ist ein wichtiger früher Entzündungsmarker, der eine Schlüsselrolle bei der Induktion der Entzündungsantwort spielt [Aderka et al., 1992]. Seine als erstes erkannte Funktion ist allerdings die Induktion der hämorrhagischen Nekrose von Tumoren [Old und Boyse, 1973]. In vitro wirkt dieses Zytokin zytostatisch oder zytotoxisch auf verschiedene Tumorzelllinien, wobei dieser Effekt durch die Gabe von Inhibitoren des Zellmetabolismus verstärkt werden kann; es hat aber keinen Effekt bei normalen unbehandelten Zellen [Le und Vilcek, 1987]. Die Ergebnisse aus in vitro-Ozonexpositionen sind in Bezug auf die Zytokinsekretion divergierend. Es gibt Resultate, die keine Änderung der Zytokinsekretion nach der Kurzzeitexposition (0,1-1 ppm über 2-4 h) von humanen Alveolarmakrophagen

aufweisen [Becker et al., 1991], andere zeigen eine eindeutige Zunahme in deren Freisetzung nach ähnlichen Expositionsbedingungen (0,1-1 ppm über 1 h) [Arsalane et al., 1995].

Sowohl IL1 als auch TNF modulieren, ähnlich wie IL8, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothel, Epithel und PMN, so daß letztere aus dem Blut emigrieren können [Kohase et al., 1986, Oster et al., 1987, Pfizermaier et al., 1987, Pober, 1987, Springer, 1990, Baggiolini et al., 1994]. IL1 und IL8 üben darüber hinaus auch einen chemotaktischen Effekt auf PMN aus [Pober et al., 1986, Baggiolini et al., 1994], stimulieren die Freisetzung von Enzymen aus der sekundären Granula und die Produktion von Sauerstoffmetaboliten [Le und Vilcek, 1987]. Da nach Ozonexposition von Probanden in der nachfolgend durchgeführten bronchoalveolaren Lavage eine gesteigerte Neutrophilenzahl festgestellt werden konnte [Devlin et al., 1991], ist ein direkter Zusammenhang zwischen Zytokinausschüttung und zellulären Veränderungen in der Lunge nicht auszuschließen. Aber auch andere Substanzen wie FGF, das in vitro die Proliferation von Fibroblasten induziert [Bitterman et al., 1986], das in der extrazellulären Matrix vorliegende Fibronectin [Rennard, 1981], PDGF, TGF- β , verschiedenen Interferone sowie weitere Mediatoren werden nach Stimulation durch das Schadgas von AM sezerniert [Nugent et al., 1985, Robinson et al., 1985, Derynck et al., 1985].

Die Synthese von IL6 durch AM, die ebenso wie die des TNF durch Lipopolysaccharide stark stimuliert wird, wird wahrscheinlich durch die beiden frühen proinflammatorischen Zytokine IL1 und TNF gesteuert [Gershenwald et al., 1990]. Nach Ozonexposition bei umweltrelevanten Konzentrationen kann in der BAL humaner Probanden u.a. auch eine erhöhte Menge an IL6 nachgewiesen werden [Koren et al., 1991]. IL6 spielt im Organismus eine zentrale Rolle bei der Induktion der Akute-Phase-Reaktion, die immer kurzfristig nach verschiedensten Verletzungen und Irritationen abläuft [Ibelgaufts, 1992]. Bei dieser Reaktion werden verschiedenste Zellen aktiviert und daneben in der Leber die Synthese der Akute-Phase-Proteine stimuliert, die dann regulierend in die komplexe Immunantwort eingreifen.

Diese komplexen Zusammenhänge zwischen dem die Lungenoberfläche auskleidenden Epithel, den innerhalb der Lunge ausdifferenzierten Alveolarmakrophagen und den aufgrund verschiedener Faktoren einwandernden Zellen wie PMN bedürfen weiterer Untersuchungen.

1.5 Fragestellung

Ozon kann in der Lunge einen Entzündungsprozess in Gang bringen. Neben den Epithelzellen des oberen und unteren Respirationstraktes sind die Alveolarmakrophagen (AM) mit die Ersten, die sich mit dem Luftschadstoff auseinandersetzen müssen. AM sezernieren eine Vielzahl löslicher Faktoren und steuern dadurch Entzündungsprozesse der Lunge. Außerdem stehen sie im Verdacht, an zahlreichen pathophysiologischen Lungenveränderungen maßgeblich beteiligt zu sein. Im Projekt soll deshalb die Ozonwirkung auf entzündungsrelevante Eigenschaften von AM untersucht werden. Die Exposition gegenüber unterschiedlichen Ozonkonzentrationen erfolgt in einem realitätsnahen, biphasischen in-vitro Modell, bei dem die AM auf porösen Membranen wachsend, apikal der Gasphase direkt ausgesetzt sind. Die AM werden aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit manifester Lungenerkrankung isoliert. Dieser Personenkreis muß aufgrund der bereits bestehenden chronischen Lungenschädigung bei Schadgas bzw. Ozonexposition als besonders gefährdet angesehen werden. In den Experimente soll neben der spontanen Freisetzung ausgewählter Mediatoren der AM auch die LPS-induzierbare Freisetzung, d.h. nach zusätzlicher Aktivierung der AM, im Vergleich zu luftexponierten AM untersucht werden. Neben der Datenanalyse basierend auf dem Gesamtkollektiv, sollen Patientengruppen (Sarkoidose, Fibrose, chronische Bronchitis) miteinander verglichen werden. Dabei interessiert neben einer unterschiedlichen Basisfreisetzung der verschiedenen Mediatoren auch eine ggf. differierende Ozonantwort der AM des Gesamtkollektives sowie eine spezifische Ozonantwort bei den einzelnen Patientengruppen. Erfahren AM - unabhängig vom individuellen Aktivierungsgrad - eine zusätzliche Aktivierung? Die Daten sollen Hinweise dafür geben ob Ozon zu einer Verstärkung bestehender Entzündungen führen und damit zur Chronizität von Lungenerkrankungen beitragen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht näher bezeichnete Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Riedel-de Haën (Seelze) und Fluka (Buchs, CH) bezogen.

2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz- (ABTS-) Lösung	Boehringer, Mannheim
Actinomycin C ₁ (bzw.D)	Boehringer, Mannheim
Aquasol Universal LSC Cocktail	DuPont, Dreieich
Cytochalasin B aus <i>Helminthosporium dematiodeum</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC ₆ (3))	Molecular Probe, Eugene (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lactatdehydrogenase aus Muskel (Kaninchen)	Boehringer Ingelheim, Wien (A)
Lipopolysaccharid <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lipopolysaccharid <i>K. pneumoniae</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fluoresceinisothiocyanat-gekoppeltes Lipopolysaccharid <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mowiol 4,88	Calbiochem, Bad Soden
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumcacodylat	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Prüfgas Synthetische Luft/ 5% CO ₂	Messer Griesheim, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA), endotoxinfrei	Boehringer, Mannheim
Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Riedel-de Haën, Seelze
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Material und Methoden

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Anseros Ozonmonitorcards
Nylonfilter (100 µm Porengröße)
Pipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml

6-Loch-Zellkulturplatten
Membraneinsätze für 6-Loch-Platten, 0,45 µm
Porenweite, high density (HD)
Mikrotest-Platten, Primaria 96-Loch

Anseros, Tübingen
NeoLab, Heidelberg
Becton-Dickinson, Heidelberg
Dunn, Asbach
Nunc, Wiesbaden
Becton-Dickinson, Heidelberg
Becton-Dickinson, Heidelberg

2.1.3 Antikörper und rekombinante Zytokine

monoklonaler Maus anti-human IL8-Antikörper
monoklonaler Ratte anti-Maus CD14-Antikörper,
PE-gekoppelt
humanes rekombinantes IL8
humanes rekombinanter TNF α

Biomar, Marburg
Pharming, Hamburg
DPC Biermann, Bad Nauheim
Boehringer, Mannheim

2.1.4 ELISA und Testkits

IL1 α , β
IL6, IL8, TNF α
Cytotoxicity Detection Kit, LDH

Hofmann-La Roche, Basel (CH)
Cell Systems, Remagen;
Immunotech, Hamburg
Boehringer, Mannheim

2.1.5 Zellkulturmaterial

Nichtessentielle Aminosäuren 100x
Penicillin (10.000 U/ ml)/ Streptomycin
(10.000 µg/ ml) 100x
L-Glutamin 100x
Natriumpyruvat
Fetales Kälberserum (FKS)
RPMI 1640
DMEM
DMEM F12 NutMix
PBS w/o Ca $^{++}$, Mg $^{++}$
PBS
Trypanblau
Trypsin-Lösung

Life Technologies, Eggenstein
Serva, Heidelberg
ccPro, Neustadt

2.2 Patienten

Im Zeitraum von Juni 1994 bis November 1996 wurden Alveolarmakrophagen (AM) nach einem standardisierten Verfahren [Muley et al., 1994] aus der bronchoalveolären Lavage von 87 Patienten isoliert. Diese AM gingen in insgesamt 99 Expositionsexperimente ein. Die Patienten wurden anhand der Synopsis der Parameter Lungenfunktion (Spirometrie, Bodyplethysmographie, Lungendiffusion), Röntgenbefund (Röntgen, Computertomographie), histologischer Befund der Biopsie (transbronchial, ggf. Keilresektat), Laborwerte sowie physische Untersuchung und Krankengeschichte in die Gruppen Sarkoidose, Fibrose und chronische Bronchitis eingeteilt. Die Diagnose Sarkoidose, Fibrose oder chronische Bronchitis konnte für insgesamt 67 Patienten nach folgenden Kriterien gestellt werden:

- Eine chronische Bronchitis liegt nach WHO-Kriterien dann vor, wenn an zwei aufeinanderfolgenden Jahren jeweils mindestens 3 Monate starker Husten und Auswurf auftreten.
- Die Diagnose einer Lungenfibrose wurde mittels der positiven Biopsie und eines entsprechenden Röntgenbefundes (interstitielle Zeichungsvermehrung) diagnostiziert. Eine bei der Lungenfunktionsanalyse erkennbare Restriktion und Diffusionseinschränkung sowie eine erhöhte Neutrophilenzahl in der BAL waren zusätzliche Hinweise für das Vorliegen einer Lungenfibrose.
- Eine Sarkoidose der Röntgenstadien I-III wurde durch Nachweis nicht-verkäsender Granulome in der Biopsie sowie den entsprechenden Röntgenbefunden diagnostiziert. Weitere fakultative Parameter der Diagnosesicherung waren ein erhöhter Lymphozytenanteil in der BAL-Flüssigkeit, ein erhöhtes Verhältnis von CD4-positiven zu CD8-positiven T-Lymphozyten sowie eine erhöhte Neopterin- und/oder ACE-Konzentration im Serum.

20 Patienten, bei denen ein anderes Krankheitsbild imponierte (z.B. Tumorerkrankung, Pneumonie etc.) bzw. mit unsicherem Befund (z.B. keine histologische Sicherung bei Sarkoidoseverdacht), wurden für den Gruppenvergleich (Krankheitsbild) nicht berücksichtigt. Dadurch ergibt sich für die o.g. Patientengruppen folgende Verteilung:

	Sarkoidose	Fibrose	chronische
--	-------------------	----------------	-------------------

			Bronchitis
Patientenanzahl	16	25	26
MW Alter	38,1 ± 13,3	60,4 ± 7,8	52,2 ± 12,4
m / w	6 / 10	13 / 12	21 / 5
R / NR / ExR	4 / 8 / 4	6 / 12 / 7	16 / 2 / 6

Tabelle 2.1. Patientenkollektive (R=Raucher, NR=Nichtraucher, ExR=Exraucher)

2.3 Puffer und Zellkulturmedien

PBS Begasung

500 ml	PBS w/o Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺
5 ml	P/S
5 ml	Na-pyruvat

KM1: für die Kultur von Alveolarmakrophagen

500 ml	DMEM
5 ml	P/S
5 ml	Nichtessentielle Aminosäuren
0,1 %	Rinderserumalbumin (BSA)

KM2: für die Kultur von WEHI 164/13

500 ml	RPMI 1640
50 ml	fetales Kälberserum (FKS; 30 min hitzeinaktiviert bei 56°C)
5 ml	P/S
5 ml	Nichtessentielle Aminosäuren
5 ml	Na-pyruvat
5 ml	L-Glutamin

KM3: für die Kultur von J774.A1

500 ml	DMEM
50 ml	FKS
5 ml	P/S

Lysemedium für Zellyse nach der Gasexposition

KM2 + 1% (v/v) Triton X-100

TNF α -Standard für WEHI-Assay

0,1 μ g hrTNF α in KM1; sterilfiltriert

MTT-Lösung für WEHI-Assay

5 mg MTT/ ml PBS; sterilfiltriert

SDS/ HCl-Lösung für WEHI-Assay

15% SDS in 15 mM HCl

2.4 Zellkulturtechniken

2.4.1 Gewinnung und Kultivierung von humanen Alveolarmakrophagen

AM wurden aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) der Patienten isoliert. Bei der BAL werden 180 ml (9 x 20 ml) physiologische Kochsalzlösung in die Lingula bzw. den rechten Mittellappen des Patienten instilliert. Die rückgewonnene BAL-Flüssigkeit (BALF) wird in silikonisierten Gefäßen aufgefangen. Ein Aliquot der Original-BALF verwendet man zur Bestimmung der Zellzahl und zur Herstellung von Zytospinpräparaten. Die zelluläre Zusammensetzung wird durch Differenzierung gefärbter Zytozentrifugate (Pappenheim-Färbung) ermittelt.

Die BALF wird abzentrifugiert (4°C, 250g, 10 min), die pelletierten Zellen werden 2x mit kaltem DMEM gewaschen, in KM1 suspendiert und auf Membraneinsätze für 6-Loch-Kulturplatten mit einer Zelldichte von 1-1,5x10⁶ AM/ Membraneinsatz ausplattiert. Nach Inkubation (1-2 Std., 37°C / 5% CO₂) im Brutschrank werden nicht-adhärenente Zellen (im wesentlichen Lymphozyten, Eosinophile, Neutrophile) mit KM1 abgewaschen und in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Ca. 80-90% der AM adhäreren nach unserer Erfahrung auf der Membran. Die AM werden über Nacht bei 37°C / 5% CO₂ in 3 ml KM1 submers kultiviert und am nächsten Morgen für die jeweiligen Expositionsexperimente verwendet. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß in diesem Zeitraum die adhärenzinduzierte Zytokinsekretion abklingt.

2.4.2 Kultur der murinen Makrophagenlinie J774A.1

J774A.1 Zellen wurden uns von der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Sie werden in KM3 bei 37°C / 5% CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert und nach Abschaben passagiert. Für die weitere Kultur werden 1x10⁶ Zellen in 175 cm²-Kulturflaschen ausplattiert.

Für die Ozonexposition werden die Zellen von den Flaschenböden abgeschabt und nach Ermittlung des Anteils toter Zellen (Trypanblau-Exklusionstest) in einer Dichte von ~2x10⁶ lebende Zellen/Membraneinsatz in KM3 ausplattiert. Nach 1-2 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ im Brutschrank werden nicht-adhärenenten Zellen abgewaschen und in der Neubauer-Kammer gezählt. Die adhärenenten J774A.1-Zellen werden ebenso wie humane AM vor der Schadgasexposition submers mit 3 ml KM1 über Nacht bei 37°C / 5% CO₂ vorkultiviert.

2.4.3 Kultur der murinen Fibrosarkomlinie WEHI 164/13

WEHI 164/13 Zellen werden für den TNF-Bioassay benötigt und wurden uns von Prof. A. Seidel (ITOX, Forschungszentrum Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Die murine Zelllinie wird in KM2 bis zur Konfluenz bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren werden die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert (10 min, RT) und abzentrifugiert (10 min, 250g). Das Zellpellet wird in KM2 suspendiert und 1x10⁶ Zellen in eine neue 175 cm²-Flasche ausplattiert. Die Zellen werden maximal bis zur Passagenzahl 17 kultiviert.

2.5 Ozonexposition von Zellen

2.5.1 Expositionsanlage

Die Exposition erfolgt in einem biphasischen System in Anlehnung an das Verfahren von Voisin et al. [1977]. Die Exposition der Zellen wird in eigens angefertigten Edelstahlbehältern (DKFZ, Heidelberg) der Maße 26cm x 15cm x 5cm (Vol. ≈ 2l) durchgeführt. Die Zellen kultiviert man auf Membraneinsätzen für 6-Loch-Kulturplatten der Porenweite 0,45 µm mit hoher Porendichte (Falcon high density, Becton-Dickinson). Während der Begasung sind die Zellen apikal direkt der Gasphase ausgesetzt. Die Versorgung mit Nährstoffen und Flüssigkeit erfolgt kapillar von der basolateralen

Seite (Begasungs-PBS). Zur Aufrechterhaltung einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre werden sowohl die Kammer (ca. 1 l) als auch das Reservoir der 6-Loch-Kulturschale mit Wasser gefüllt. Die Expositionskammern werden im Wasserreservoir des Brutschrankes auf 37°C temperiert.

Ozongas wird mittels Ozongenerator (Ozomat GP 6000, Anseros, Tübingen) aus synthetischer Luft mit 5 Vol% CO₂ hergestellt und mittels Analysator (MP 6060, Anseros, Tübingen) ständig gemessen und auf den Sollwert eingeregelt. Ozonhaltige Luft wird über ein Teflonschlauchsystem in die Edelstahlkammer geleitet und strömt direkt unter dem Deckel der 6-Loch-Kulturschale aus. Das Gesamtsystem wird mindestens 24 h vor Versuchsbeginn bei der entsprechenden Ozonkonzentration äquilibriert. An der Ausströmöffnung liegt die eingestellte Ozonkonzentration deshalb ohne nennenswerte Zehrungsverluste an. Die 6-Loch-Kulturplatten, die für die Ozonexposition vorgesehen sind, werden in der Kammer über Nacht mit Ozon abgesättigt. Dadurch wird verhindert, daß Ozon während der Exposition der Zellen bereits an der Plastikoberfläche der Kulturplatten abreagiert. Während der Exposition wird das einwirkende Ozon mittels Ozonindikatorpapier (Ozonmonitorcard, Anseros, Tübingen) direkt unter dem Deckel der Kulturplatte semiquantitativ nachgewiesen. Die Kammer wird bei einem Gasfluß von 20 l pro Stunde mit ozonhaltiger Luft durchspült. Als Kontrolle dienen jeweils Zellen desselben Patienten, die unter ansonsten identischen Bedingungen synthetischer Luft, 5 Vol% CO₂ exponiert waren. Die Expositionskammern sind in Abb. 2.1 dargestellt.

2.5.2 Gasexposition von Alveolarmakrophagen

Die über Nacht in den Membraneinsätzen vorkultivierten AM werden nach dem Entfernen des Mediums 1x mit PBS gewaschen. Daraufhin werden die für die Ozonexposition vorgesehenen Zellen in eine über Nacht mit Ozon abgesättigte 6-Loch-Platte überführt und diejenigen für die Luftexposition in eine frische 6-Loch-Platte. Dann werden unter die Membraneinsätze ca. 700 µl „PBS Begasung“ pipettiert, so daß die Zellen apikal direkt der Luft bzw. dem Ozon ausgesetzt sind und nur von basolateral mit Feuchtigkeit versorgt werden. Die hohe Porendichte der Membran gewährleistet eine ausreichende Versorgung der Zellen während der Expositionsphase (Abb.2.2).

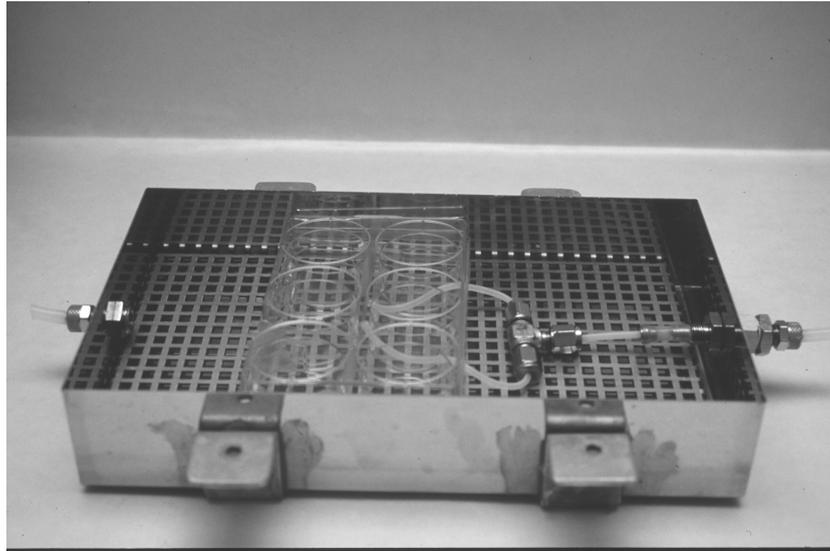


Abb. 2.1. Versuchsanordnung - Expositions-kammer

Die 6-Loch-Platten werden dann in die Expositions-kammern für Luft bzw. Ozon gestellt, die entweder von synthetischer Luft mit 5% CO₂ (Kontrolle) oder von mit Ozon angereicherter synthetischer Luft mit 5% CO₂ durchströmt werden.

Nach der Gasexposition werden die Membraneinsätze in eine frische 6-Loch-Platte umgesetzt. Die Zellen werden dort für weitere 4 Stunden submers in KM1 bzw. in KM1 + 10 µg LPS/ ml bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert. Nach Beendigung der Inkubation wird das Kulturmedium geerntet und abzentrifugiert (15.000g, 20min, 4°C). Der Überstand wird portioniert und bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen werden in den Membraneinsätzen mit „Lysemedium“ 5 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln lysiert, das Lysat wird ebenfalls portioniert und bei -20°C aufbewahrt. Die Expositionsbedingungen sind in Abb. 2.3. schematisch dargestellt. In Tab 2.2. ist die Anzahl der durchgeführten Expositionsexperimente bezüglich Ozonkonzentration und Patientenkollektive zusammengestellt.

Ozonexpositionen		
Ozonkonzentration	unbehandelt	LPS-Aktivierung
150 µg/m³	n=13	n= 9
300 µg/m³	n=32	n= 9
700 µg/m³	n=16	n=15
1000 µg/m³	n=38	n=19
PATIENTENGRUPPEN		
Bronchitis	n=26	(30 Expositionen)
Fibrose	n=25	(31 Expositionen)
Sarkoidose	n=16	(16 Expositionen)
andere	n=20	(22 Expositionen)
Gesamt: 99 Expositionen mit 87 Patienten		

Tab. 2.2. Durchgeführte Expositionsexperimente

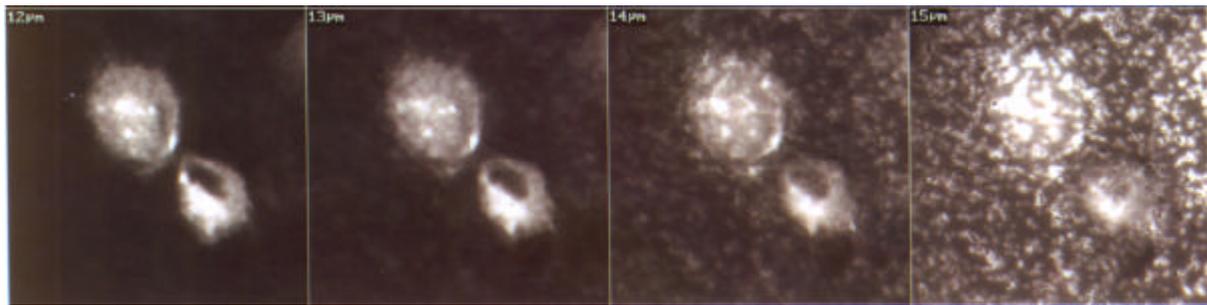


Abb. 2.2. Aufnahmen zweier AM die auf einer Falcon Transwell-Membran der Porenweite 0,45 µm HD (Falcon) kultiviert wurden - Konfokale Laserscanning Mikroskopie.

Die Transwell-Membran mit den AM wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DIOC₃ (6) benetzt, der sowohl Plasmamembranen als auch intrazelluläre Membranen anfärbt. Die Transwell-Membran wird nach Einbettung in Mowiol von der Unterseite her mit dem Laserscanning Mikroskop betrachtet. Das Präparat wurde in 1 µm Schritten schichtweise abgerastert. Die Schnittbildern sind parallel zur Membran angeordnet. Man erkennt 2 Makrophagen sowie durch kapillare Farbstoffeinlagerung unspezifisch angefärbte Poren der Transwell-Membran.

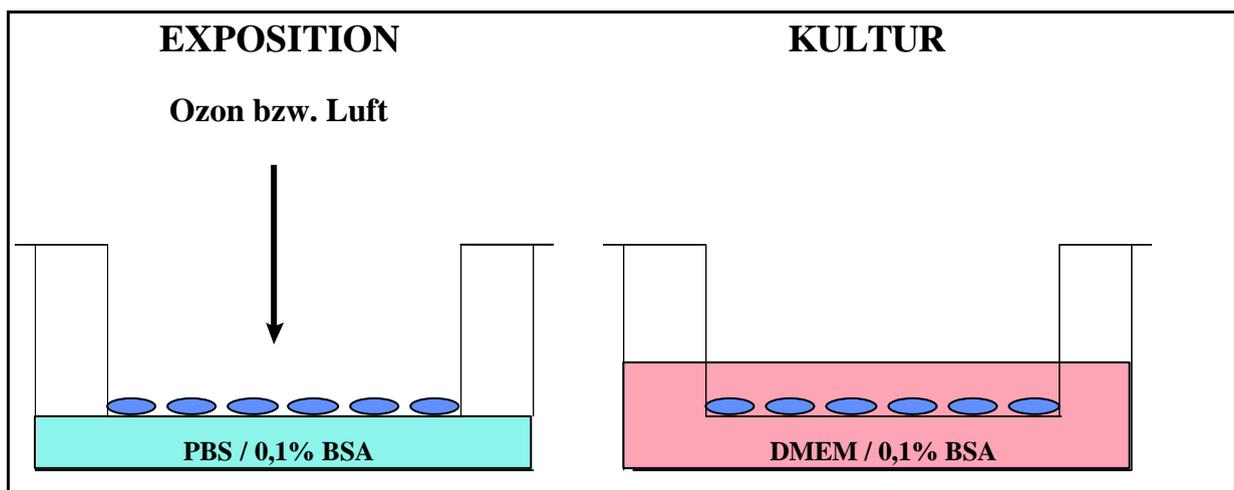


Abb. 2.3. Schema der AM-Kultur in den Membraneinsätzen. Links: während der Gasexposition (1h; 20l/h , **rechts:** während der Submerskultur (4h, mit/ohne 10µg/ml LPS).

2.5.3 Gasexposition von J774A.1

Die Zellen werden, wie bereits für humane AM beschrieben, in Membraneinsätze ausplattiert und über Nacht submers mit KM1 kultiviert. Am nächsten Morgen werden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen, die Hälfte der Membraneinsätze wird in die Ozonkammer überführt, die verbliebenen Membraneinsätze in die Luftexpositions-kammer.

Nach Beendigung der einstündigen Exposition wird das „PBS Begasung“ abgesaugt und die Zellen werden je nach Versuchsablauf entweder für weiter 4 Stunden kultiviert oder für FACS-Messung direkt weiterbehandelt.

2.6 Parameterbestimmung

2.6.1 Testkits

Die Zytokine IL1 α und IL1 β wurden mit ELISA-Testkits der Firma Hoffmann-La Roche bestimmt, die uns von Dr. Fischer (Thoraxklinik, Heidelberg) kostenlos zur Verfügung gestellt wurden. Die Zytokine IL6 (nur nach LPS-Induktion der AM), IL8 und TNF α wurden mit ELISA-Kits der Firma Perseptive Diagnostics (Cellsystems, Remagen) sowie mit Kits der Firma Coulter/ Immunotech (Hamburg) bestimmt. Für die Messung der Laktatdehydrogenaseaktivität - als Maß der direkten Zell-/Membranschädigung - stand der Cytotoxicity Detection Kit der Fa. Boehringer, Mannheim bereit.

2.6.2 TNF-Bioassay mit WEHI 164/13

TNF α wirkt zytotoxisch auf Actinomycin D vorbehandelte WEHI 164/13 Zellen. Die Sensibilität ist konzentrationsabhängig und kann durch den gelblichen Farbstoff MTT sichtbar gemacht werden. MTT dringt in alle Zellen ein, wird aber nur in lebenden Zellen durch die den Tetrazoliumring spaltende mitochondriale Dehydrogenase in das blaue Formazan umgewandelt. Da TNF α auf Actinomycin D-behandelte WEHI-Zellen letal wirkt, korreliert die Menge an gebildetem Formazan mit der Anzahl lebender Zellen. Das Formazan kann nach Lyse der Zellen bei 550 nm photometrisch gemessen werden [Lindl und Bauer, 1989].

Material und Methoden

Für den TNF-Bioassay werden die Zellen trypsinisiert und nach der Pelletierung in KM2 mit 2 µg Actinomycin D/ ml suspendiert. Die Zellzahl wird auf 1×10^6 / ml eingestellt. Es werden 50 µl der Zellsuspension/ Loch mittels einer Multipette in 96-Loch-Mikrotestplatte überführt. Die Zellen werden dann 1 Stunde zum Adhärenen bei 37°C / 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Mit humanem rekombinantem TNFα-Standard (Stammlösung 1280 pg/ ml) wird eine Verdünnungsreihe von 320 pg/ ml bis 1,25 pg/ ml in KM1 erstellt. Die TNFα-haltigen Proben/Kulturüberstände werden routinemässig in 1:10 bzw. 1:20 Verdünnung gemessen. Sofern mit hohen TNFα-Konzentrationen gerechnet wird, werden zusätzlich Verdünnungen von 1:40 erstellt. Nach Ablauf der Adhäsionszeit werden 50 µl Standard bzw. Probe je Loch in 4-fachen Ansätzen pipettiert und die Platten dann für 21 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Daran anschließend werden 10 µl MTT-Lösung/ Loch pipettiert und die Platten für weitere 4 Stunden bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen durch Zugabe von 100 µl SDS/ HCl-Lösung lysiert. Um eine homogene Mischung des gebildeten Formazans zu erhalten und eine vollständige Degradierung der freigewordenen DNA zu gewährleisten, werden die Platten über Nacht bei 37°C / 5% CO₂ im Brutschrank aufbewahrt und am nächsten Morgen im Photometer bei 550 nm gemessen.

2.6.3 Bestimmung der LPS-Bindung an J774A.1-Zellen durch FACS-Analyse

Membrankultivierte J774A.1-Zellen werden entweder ohne besondere Vorbehandlung oder nach der Gasexposition für 15 min mit KM1/ 0,25% PFA im Brutschrank bei 37°C / 5% CO₂ vorfixiert. Dann werden sie mit einem Zellschaber vorsichtig von der Oberfläche gelöst und in KM1/ 0,25% PFA in Suspension gebracht. Nach einmaliger Zentrifugation bei 250g werden die Zellen in 100 µl KM1/ 0,25% PFA suspendiert [Grigg *et al.*, 1994]. Anschließend werden 10 µl Medium für den Leerwert bzw. PE-gekoppelter Antikörper oder FITC-gekoppeltes LPS zugegeben und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen 1x mit NaCl gewaschen und anschließend in 1% PFA suspendiert. Die Messung der gebundenen Fluoreszenz erfolgt anschließend im FACS.

2.7 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software PC-Statistik (Topsoft, Hannover). Die Meßwerte wurden auf 1×10^6 Alveolarmakrophagen normalisiert. Bei normalverteilten Daten (Kolmogorov-Smirnov-Test) wird mittels Student t-Test bzw. Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede geprüft, bei nicht normalverteilten Daten unter Verwendung entsprechender parameterfreier Prüfverfahren (Kruskal Wallis-Test, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben; Friedman-Test, Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben). Signifikante Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ (zweiseitiger Test) angenommen.

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm SEM) oder als Box- und Whisker-Plot (Verteilungsdiagramm) dargestellt. Die Plots stellen die 25 und 75% Perzentile (Box), den Median (-) sowie den Streubereich dar. Extremwerte wurden aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Zytotoxischer Effekt des Ozons auf Alveolarmakrophagen

Der Nachweis der zytoplasmatischen LDH im Kulturüberstand ist ein Indiz für die Zellschädigung. Bei allen verwendeten Ozonkonzentrationen findet man eine erhöhte LDH-Konzentration im Kulturüberstand der ozonexponierten AM verglichen mit den luftexponierten Kontrollansätzen. Die LDH-Aktivitätszunahme ist mit Ausnahme von 150 µg Ozon/m³ bei allen untersuchten Ozonkonzentrationen signifikant, im Trend erkennt man eine annähernd von der Ozonkonzentration abhängige Zunahme der LDH-Aktivität im Kulturüberstand der AM. In Abb. 3.1 ist die Zunahme der LDH-Aktivität in Prozent der korrespondierenden Luftkontrolle dargestellt. Die veränderte LDH Konzentration zeigte keine signifikante Korrelation mit den nachfolgend ausgeführten Änderungen der Zytokinfreisetzung.

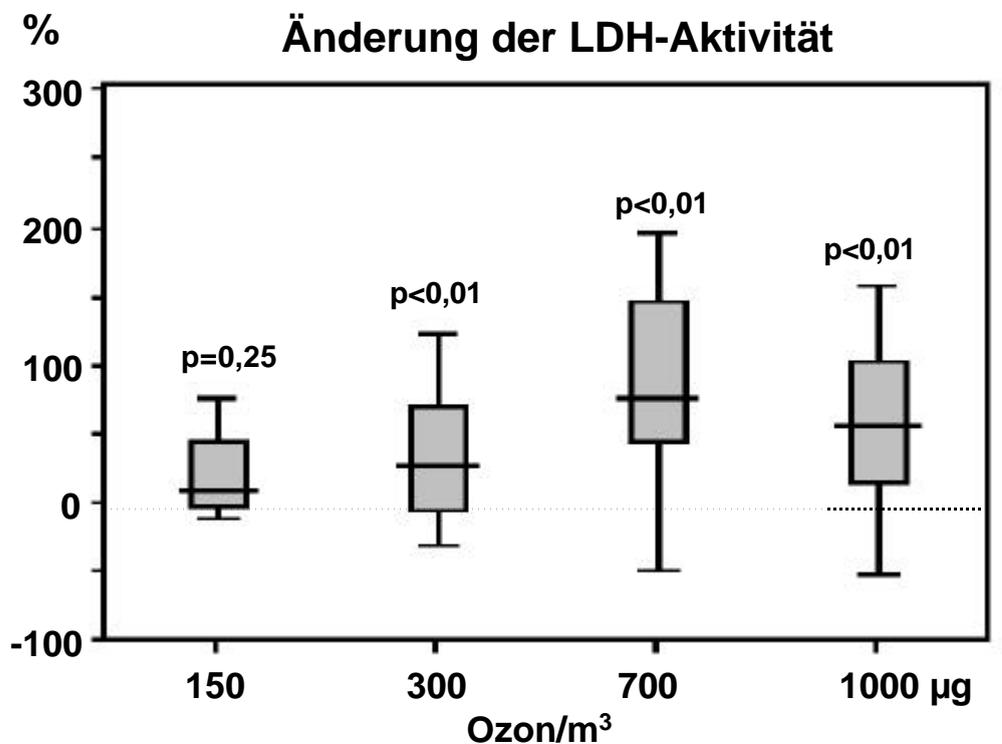


Abb. 3.1 Prozentuale Änderung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand ozonexponierter Alveolarmakrophagen im Vergleich zur korrespondierenden Luftkontrolle.

3.2 Ozoneffekt auf die spontane Zytokinfreisetzung beim Gesamtkollektiv

In Tabelle 3.1 sind die Daten der Zytokinmessungen nach Expositionsexperimenten bei 150, 300, 700 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Ozon zusammengefaßt. Die Konzentration der einzelnen Zytokine zeigt für das Gesamtkollektiv im Mittel nur relativ geringe Unterschiede zwischen Ozon- und Luftexposition. Für IL8, IL1 α und β zeichnet sich bei den meisten Patienten (ca. 2/3 der Fälle) eine diskrete Zunahme nach der jeweiligen Ozonexposition ab. TNF α wird dagegen bereits bei umweltrelevanten Ozonkonzentrationen (300 μg , $p < 0,05$) in verminderter Menge freigesetzt, bei höherer Konzentration (1000 μg) ist die Hemmung hochsignifikant ($p < 0,01$). Innerhalb des Gesamtkollektives findet man jedoch sowohl Patienten mit erhöhter als auch verminderter Sekretion der verschiedenen Zytokine. Außerdem ist neben der Richtung auch die Höhe der Ozonantwort der AM von Patient zu Patient variabel. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhalts ist die prozentuale Änderung in der Zytokinfreisetzung bei den untersuchten Ozonkonzentrationen für die individuellen Zytokine in den Abbildungen 3.2-3.6 als Verteilungsdiagramme (Boxplots) dargestellt.

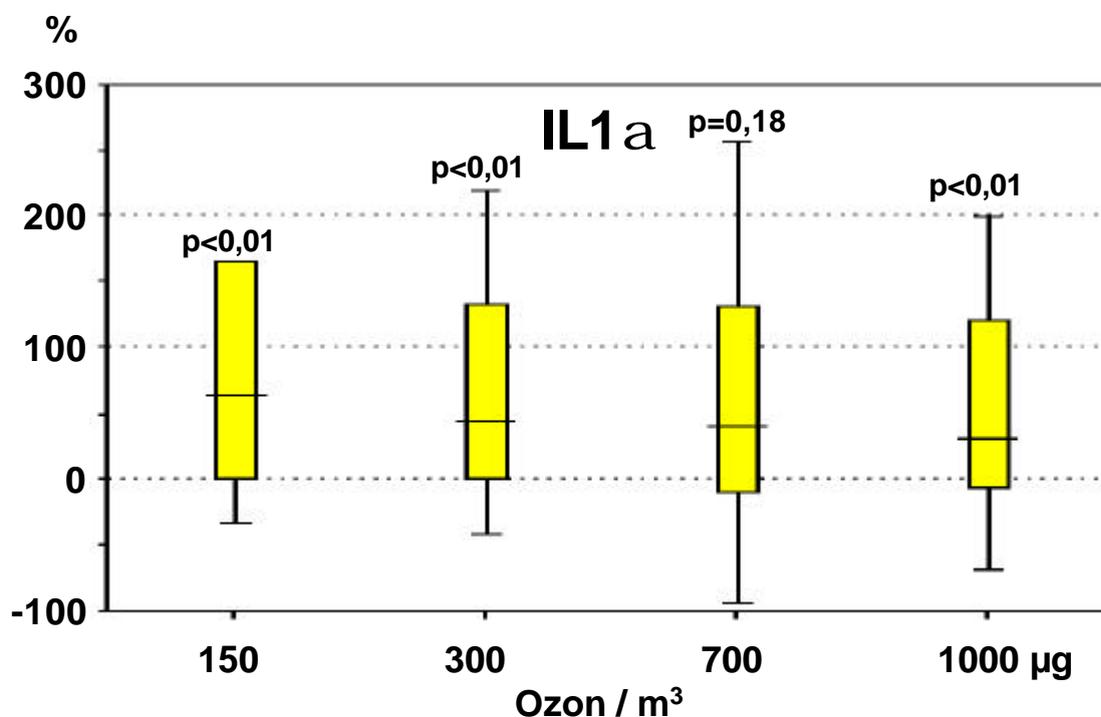


Abb. 3.2 Prozentuale Änderung in der spontanen IL1 α -Freisetzung der AM nach Ozonexposition. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich jeweils auf den Vergleich zur Luftkontrolle.

SPONTANE ZYTOKINFREISETZUNG

Ergebnisse

		LUFT		OZON		
1000 µg	n	MW±SEM	Median	MW±SEM	Median	p-Wert
IL-1α [pg/ml]	36	29,1±8,6	12,7	37,6±8,6	18,7	<0,01
IL-1β [pg/ml]	35	125,8±33,9	29,9	231,1±90,0	46,1	n.s.
IL-8 [ng/ml]	38	18,4±3,4	12,8	19,5±3,2	14,7	=0,16
TNFα [pg/ml]	38	50,8±9,2	38,1	40,0±7,5	25,9	=0,01
Zytotox. [U/ml]	38	38,1±11,3	16,0	26,0±6,4	16,1	<0,01
700 µg						
IL-1α [pg/ml]	13	41,2±21,4	7,6	50,8±19,1	17,8	=0,18
IL-1β [pg/ml]	10	296,0±184,9	20,9	508,9±300,4	92,3	<0,05
IL-8 [ng/ml]	16	14,9±3,9	9,9	18,1±5,7	10,3	=0,05
TNFα [pg/ml]	16	34,4±4,3	30,0	33,2±5,6	26,5	n.s.
Zytotox. [U/ml]	16	17,3±4,0	10,8	20,2±5,1	14,0	=0,14
300 µg						
IL-1α [pg/ml]	32	12,3±3,4	4,1	17,8±4,1	7,6	<0,01
IL-1β [pg/ml]	32	106,5±36,7	26,9	123,2±38,4	25,5	n.s.
IL-8 [ng/ml]	32	9,3±1,8	6,0	9,7±1,7	6,3	n.s.
TNFα [pg/ml]	32	47,8±7,2	38,2	40,4±7,8	24,3	<0,05
Zytotox. [U/ml]	32	23,7±3,6	19,2	20,4±3,4	12,4	=0,09
150 µg						
IL-1α [pg/ml]	12	10,0±4,3	3,5	33,0±22,8	9,7	<0,01
IL-1β [pg/ml]	12	42,5±20,1	7,8	79,8±42,3	25,7	=0,05
IL-8 [ng/ml]	13	12,4±4,6	7,3	13,3±4,8	6,7	<0,05
TNFα [pg/ml]	13	29,5±8,0	21,4	34,9±9,5	26,8	n.s.
Zytotox. [U/ml]	13	27,2±6,5	19,3	27,7±6,7	16,9	n.s.

Tab.3.1 Spontane Zytokinfreisetzung von Alveolarmakrophagen nach Exposition gegenüber synthetischer Luft bzw. Ozon. Zytotox. = TNF durch Bioassay bestimmt; n.s. = nicht signifikant

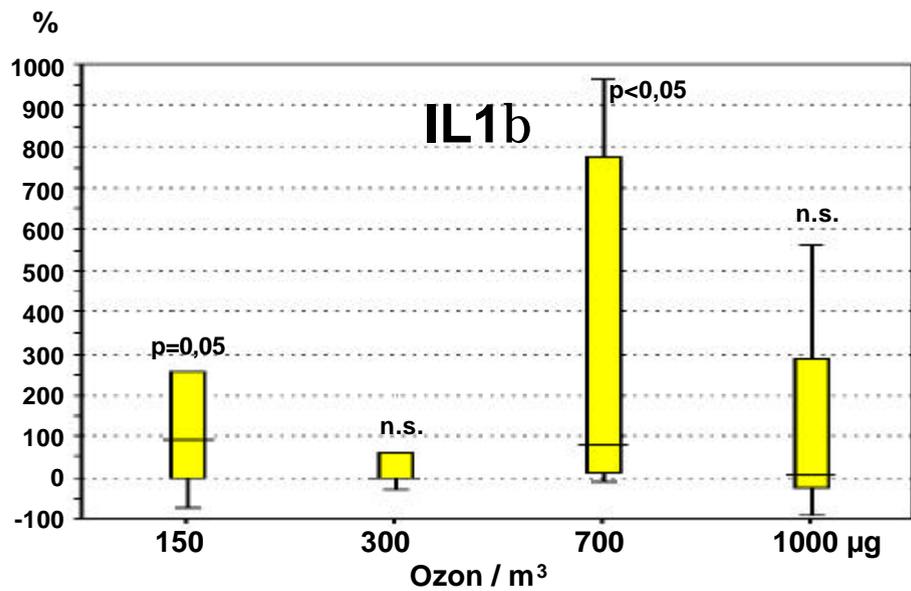


Abb. 3.3 Prozentuale Änderung in der spontanen IL1 β -Freisetzung der AM nach Ozonexposition. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich jeweils auf den Vergleich zur Luftkontrolle.

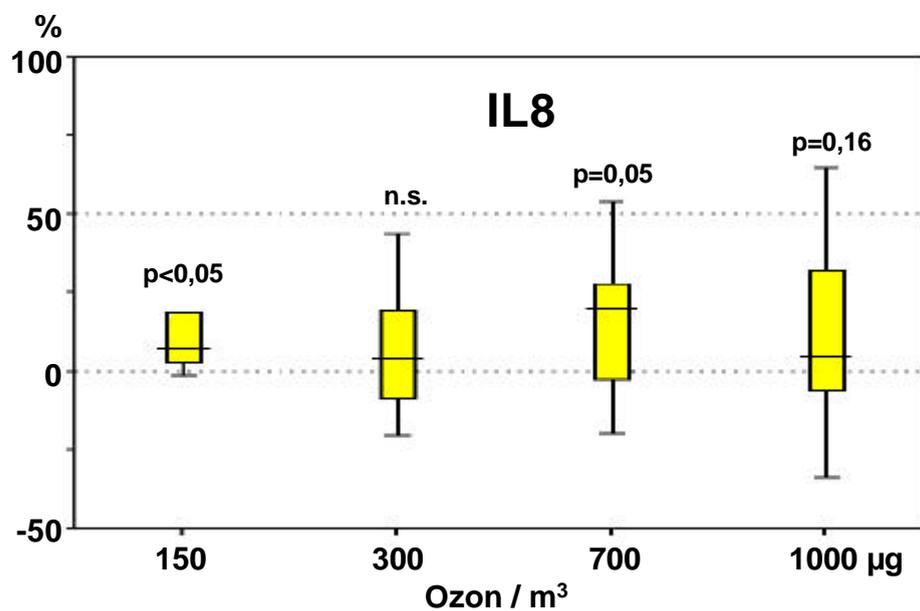


Abb. 3.4 Prozentuale Änderung in der spontanen IL8-Freisetzung der AM nach Ozonexposition. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich jeweils auf den Vergleich zur Luftkontrolle.

Ergebnisse

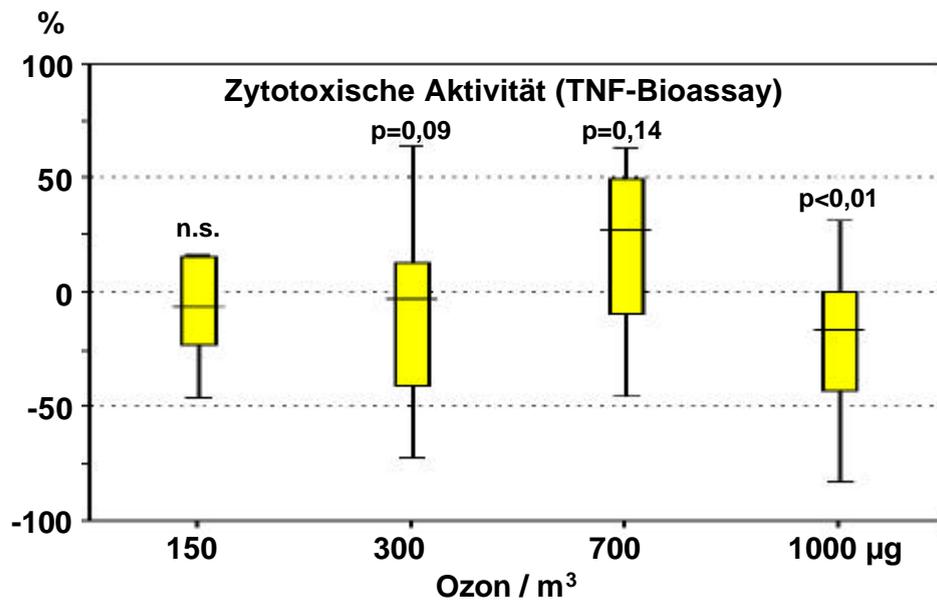


Abb. 3.5 Prozentuale Änderung in der spontanen TNF-Freisetzung (Bioassay-Messung) der AM nach Ozonexposition. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich jeweils auf den Vergleich zur Luftkontrolle.

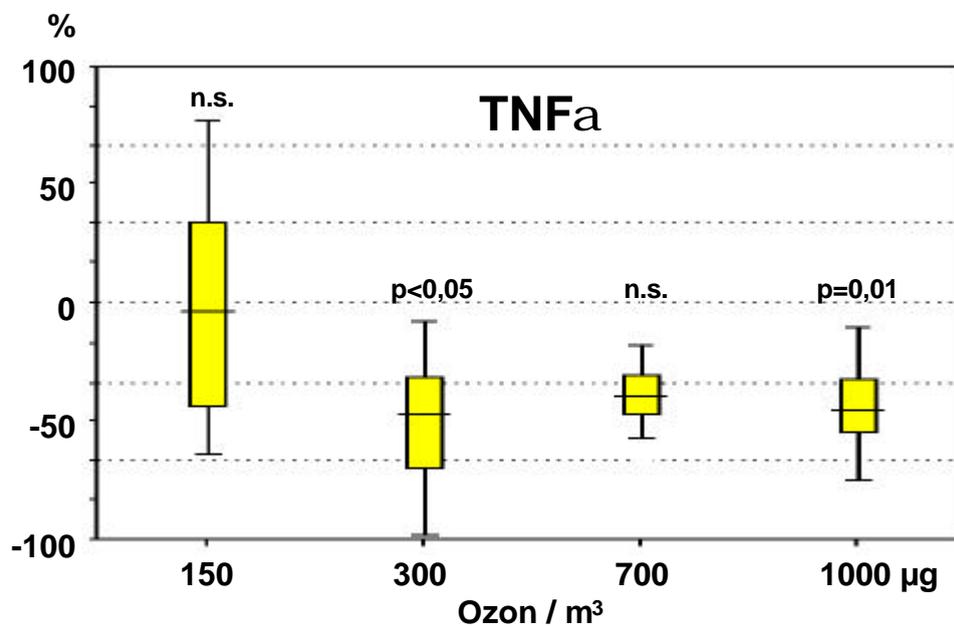


Abb. 3.6 Prozentuale Änderung in der spontanen TNF-Freisetzung (ELISA-Messung) der AM nach Ozonexposition. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich jeweils auf den Vergleich zur Luftkontrolle.

3.3 Ozoneffekt auf die spontane Zytokinfreisetzung bei Patientengruppen

Die Makrophagen der Patientengruppen Fibrose, Sarkoidose und chronische Bronchitis zeigen eine deutlich unterschiedliche Basisfreisetzung für die individuellen Zytokine, wobei die AM von Sarkoidosepatienten die höchsten mittleren Sekretionsraten aller untersuchten Zytokine aufweisen (Tab. 3.2). Die ozonbedingte prozentuale Änderung in der Zytokinfreisetzung unterscheidet jedoch nicht zwischen den einzelnen Patientengruppen. Abb. 3.7 und Abb. 3.8 zeigt diese Daten für die beiden umfangreichsten Patientenkollektive (Exposition bei 300 und 1000 $\mu\text{g Ozon/m}^3$) für die Zytokine IL8 und TNF. Nur für IL1 β nach 300 $\mu\text{g Ozon}$ kann eine signifikant unterschiedliche Änderung der Freisetzung bei Bronchitikern und Fibrosepatienten verglichen mit Sarkoidosepatienten demonstriert werden (Abb. 3.9). Bei höherer Ozonkonzentration ergeben sich jedoch auch für dieses Zytokin im Mittel keine unterschiedlichen Sekretionsraten mehr.

Die Höhe und Richtung der ozonbedingten Änderung der Zytokinsekretion scheint demnach vom individuellen Patienten und nicht von der Grunderkrankung beeinflusst zu werden. In Abb. 3.10 ist dieser Befund am Beispiel der IL8-Sekretion der AM von Sarkoidosepatienten nach 1000 $\mu\text{g Ozon/m}^3$ dargestellt.

	Sarkoidose n = 16	Fibrose n = 25	Bronchitis n = 26
IL-1 α [pg/ml]	25,6 \pm 4,3	17,9 \pm 4,4	14,5 \pm 5,9
IL-1 β [pg/ml]	164,8 \pm 50,2 §	119,3 \pm 41,7	132,2 \pm 71,4 #
IL-8 [ng/ml]	19,9 \pm 3,6	14,7 \pm 4,8	15,0 \pm 3,4
TNF α [pg/ml]	78,22 \pm 16,9 §	46,1 \pm 7,5	30,0 \pm 8,5 *
Cytotox. [U/ml]	52,2 \pm 22,5	31,07 \pm 8,4	22,2 \pm 6,1 *

Tab. 3.2 Basisfreisetzung der Alveolarmakrophagen von Patientengruppen.

(Freisetzung nach Luftexposition) (1h Exposition, 4h mit Kulturmedium bedeckt)

* = $p < 0,05$; signifikant vs. Fibrose, Sarkoidose; # = $p < 0,05$; signifikant vs. Sarkoidose; § = $p < 0,05$; signifikant vs. Fibrose

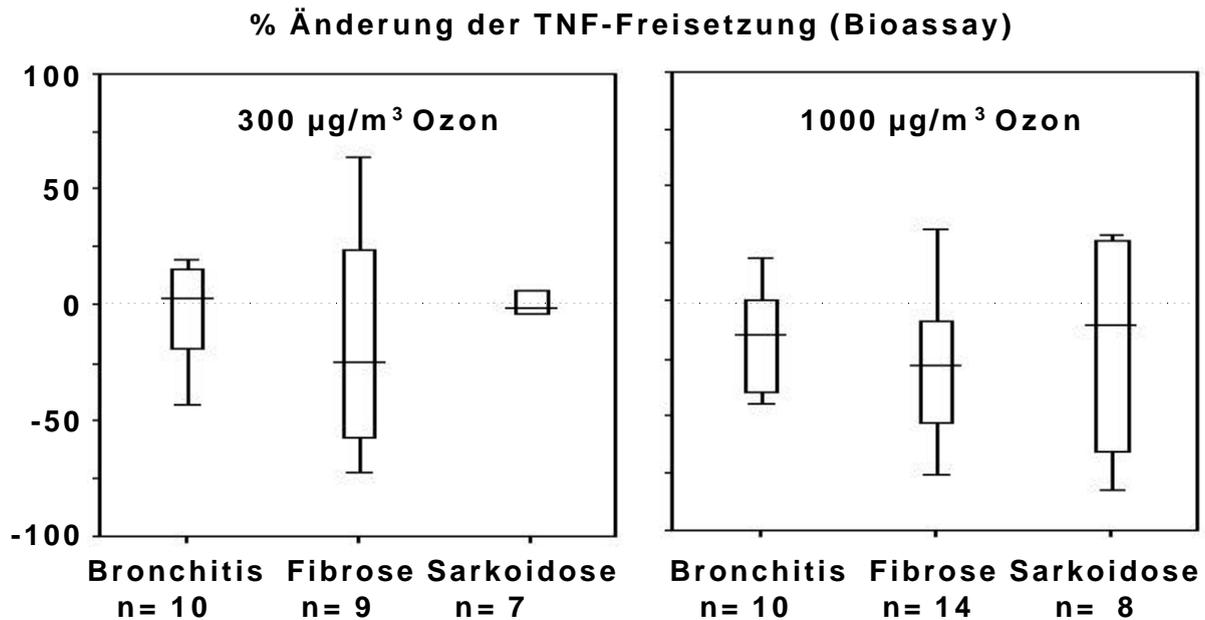


Abb. 3.7 Prozentuale Änderung in der TNF-Freisetzung der AM (Bioassaymessung) nach 300 bzw. 1000 µg Ozon/m³. Es ergeben sich keine signifikant unterschiedlichen Änderungen zwischen den Patientengruppen.

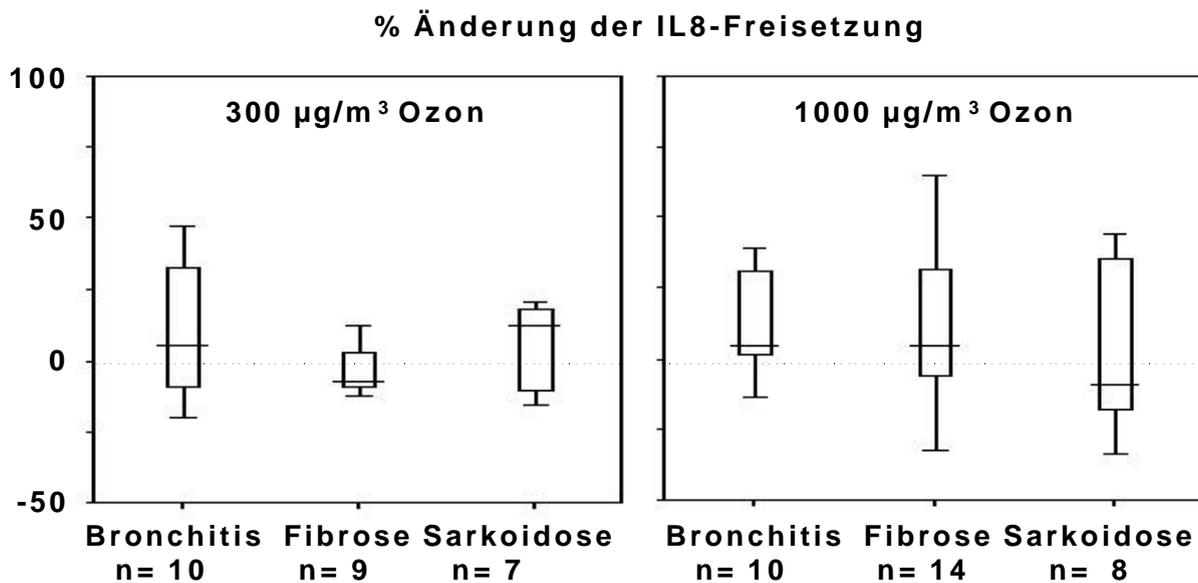


Abb. 3.8 Prozentuale Änderung in der IL8-Freisetzung der AM nach 300 bzw. 1000 µg Ozon/m³. Es ergeben sich keine signifikant unterschiedlichen Änderungen zwischen den Patientengruppen.

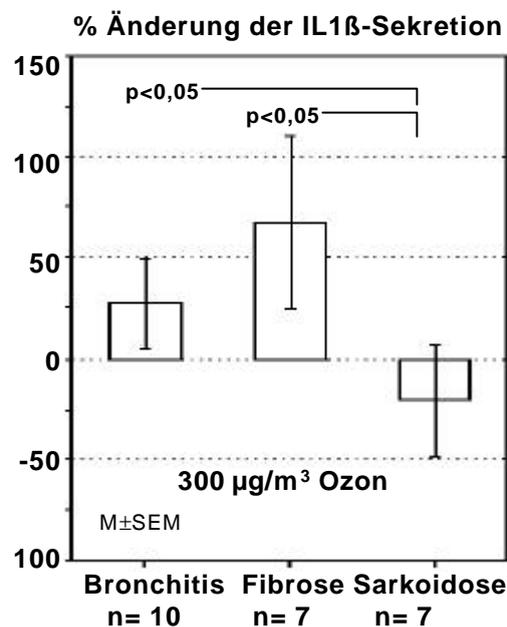


Abb. 3.9 Prozentuale Änderung der IL1β-Sekretion nach 300 µg Ozon/m³. Während die IL1β-Freisetzung bei AM von Sarkoidosepatienten im Mittel vermindert wird, findet man eine erhöhte IL1β-Sekretion bei AM von Bronchitikern und Fibrosepatienten. Die Sarkoidosepatienten unterscheiden sich signifikant von den beiden anderen Patientengruppen.

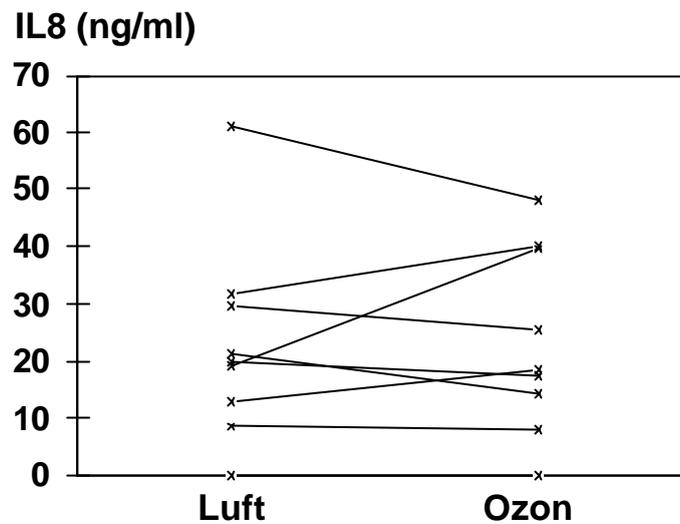


Abb. 3.10 IL8-Sekretion der AM von Sarkoidosepatienten nach Luftexposition und $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Ozon. Darstellung der individuellen Ozonantwort die von Patient zu Patient in Richtung und Höhe variieren kann.

3.4 Ozoneffekt auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung der Alveolarmakrophagen

Lipopolysaccharid (LPS), eine Zellwandkomponente Gram-negativer Bakterien, ist eine Modellschubstanz zur Aktivierung von AM. Diese Aktivierung erfolgt über membranständige Rezeptoren (CD 14-Molekül). Die Aktivierung mit LPS führt zu einer veränderten Zytokinausschüttung der AM.

Ozon bewirkt eine Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung von TNF und IL6 der AM, wohingegen die LPS-induzierte IL1a, IL β sowie IL8 Sekretion unter den gegebenen Bedingungen durch Ozon weitgehend unbeeinflusst bleiben (Tab. 3.3). Die prozentuale Änderung in der Zytokinfreisetzung ist für die Zytokine IL6 und TNF in den Abb.3.11 und Abb.3.12 zusammengefaßt. TNF kann als Indikator für die durch Ozon hervorgerufene Hemmung der LPS-induzierten Makrophagenaktivierung fungieren.

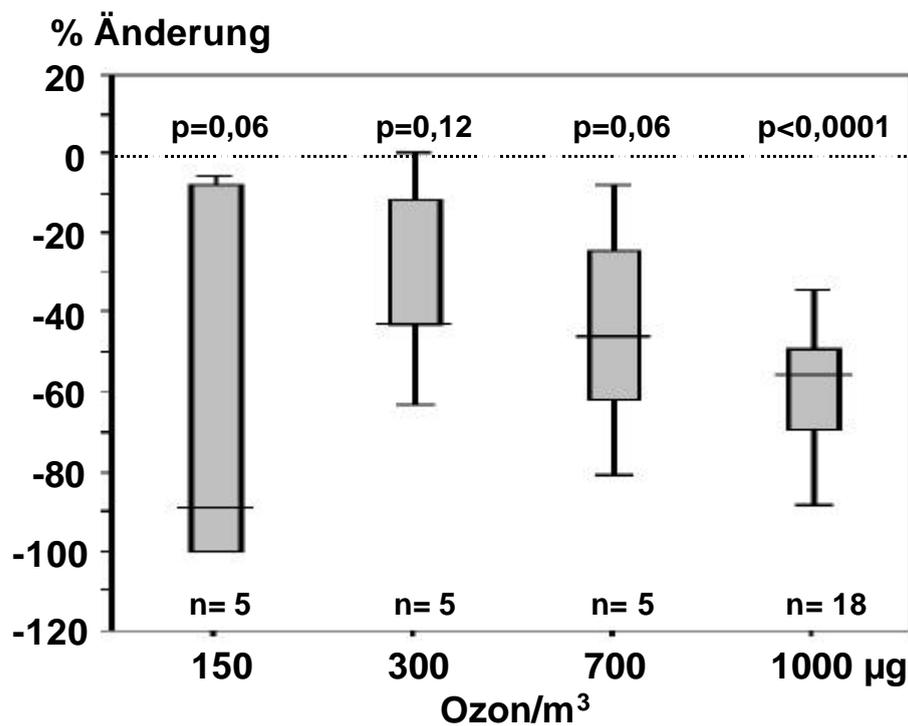


Abb. 3.11 Wirkung von Ozon auf die LPS-induzierte IL6-Sekretion humaner AM. Prozentuale Änderung nach Ozonexposition verglichen mit der Luftexposition. Im Trend findet man eine zunehmende Inhibition der IL6-Sekretion mit steigender Ozonkonzentration.

(p = Signifikanzniveau im Vergleich Luft versus Ozon)

LPS-INDUZIERTE ZYTOKINFREISETZUNG

	LUFT			OZON			
1000 µg	n	MW±SEM	Median	MW±SEM	Median		p
IL-1α [pg/ml]	17	23,1±10,7	8,9	21,9±4,6	18,1		<0,05
IL-1β [pg/ml]	17	54,5±16,0	34,4	190,3±95,5	31,2		n.s.
IL-8 [ng/ml]	19	19,2±2,6	19,2	18,5±2,4	19,2		n.s.
TNFα [pg/ml]	19	802,2±118,0	800,5	365,2±61,6	356,6		<0,0001
Zytotox. [U/ml]	19	632,4±116,0	570,1	298,6±511,9	273,4		<0,0001
IL-6 [pg/ml]	18	57,6±10,1	54,1	25,7±4,8	27,4		<0,0001
700 µg							
IL-1α [pg/ml]	11	55,9±24,6	8,5	58,8±24,7	25,1		n.s.
IL-1β [pg/ml]	9	510,6±342,3	85,5	336,4±141,4	126,5		n.s.
IL-8 [ng/ml]	15	21,5±5,9	15,4	21,2±5,8	14,3		n.s.
TNFα [pg/ml]	14	710,5±149,4	505,6	475,0±78,0	447,5		=0,01
Zytotox. [U/ml]	15	460,8±58,3	479,2	314,5±42,6	193,4		=0,0002

Ergebnisse

IL-6 [pg/ml]	5	68,3±21,4	49,7	42,0±16,1	45,9	=0,06
300 µg						
IL-1α [pg/ml]	9	19,0±8,1	5,1	22,4±6,6	17,3	n.s.
IL-1β [pg/ml]	9	168,8±108,5	7,5	111,5±50,1	47,8	n.s.
IL-8 [ng/ml]	9	15,9±4,9	10,7	15,7±4,6	11,8	n.s.
TNFα [pg/ml]	9	3577,2±979,1	2636,3	2447,8±691,5	2126,4	=0,004
Zytotox. [U/ml]	8	1509,9±262,8	1474,4	883,8±143,3	765,9	=0,008
IL-6 [pg/ml]	5	139,9±61,4	117,0	76,5±29,8	58,5	=0,12
150 µg						
IL-1α [pg/ml]	8	12,5±7,5	2,4	42,4±31,7	9,9	<0,05
IL-1β [pg/ml]	8	120,7±113,4	7,9	27,8±11,1	18,3	n.s.
IL-8 [ng/ml]	9	11,9±1,9	11,6	11,9±2,0	13,6	n.s.
TNFα [pg/ml]	9	3950,5±1156,9	2636,3	3056,6±1102,1	2162,0	=0,12
Zytotox. [U/ml]	8	1172,1±302,1	1092,9	813,2±213,8	873,3	=0,19
IL-6 [pg/ml]	5	62,9±20,6	69,4	35,2±22,0	3,2	=0,06

Tab. 3.3 LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von Alveolarmakrophagen nach Exposition gegenüber synthetischer Luft bzw. Ozon.. (n.s. = nicht signifikant; Zytotox. = TNF durch Bioassay gemessen)

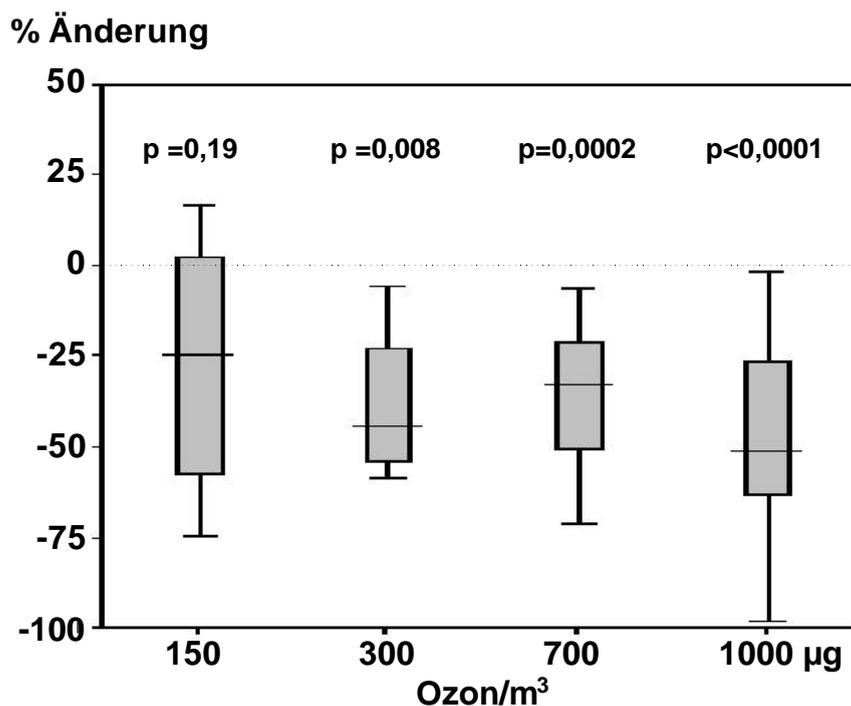


Abb. 3.12 Wirkung von Ozon auf die LPS-induzierte TNF-Sekretion humaner AM. Prozentuale Änderung nach Ozonexposition verglichen mit der Luftexposition. Im Trend findet man eine zunehmende Inhibition der TNF-Sekretion mit steigender Ozonkonzentration. (p = Signifikanzniveau im Vergleich Luft versus Ozon)

3.5 Wirkung von Ozon auf den LPS-Rezeptor - Untersuchung mit J774A.1-Makrophagen

Primärer Angriffspunkt der Schadwirkung von Ozon ist wahrscheinlich die Zellmembran und die darin eingebetteten Rezeptormoleküle. Um zu überprüfen, ob der Hemmeffekt von Ozon auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung (TNF, IL6) auf eine ozonbedingte Schädigung der LPS-Rezeptoren (z.B. Affinitätsverminderung etc.) beruht, wurden Rezeptorbindungsstudien mit fluoreszenzmarkiertem LPS durchgeführt. Diese Experimente können mit humanen AM im allgemeinen nicht durchgeführt werden (Verfügbarkeit, Menge, Heterogenität, starke Autofluoreszenz der AM). Da auch keine brauchbare humane Makrophagenzelllinie zur Verfügung steht, wurde für die Bindungsstudien auf die murine Makrophagenlinie J774A.1 zurückgegriffen. Mittels TNF als Markerzytokin kann gezeigt werden, daß diese Makrophagenlinie ähnlich wie humane AM auf Ozon ($300 \mu\text{g}/\text{m}^3$) reagieren. Während die spontane TNF-Freisetzung weitgehend unbeeinflusst bleibt, wird die LPS-induzierte TNF-Sekretion um durchschnittlich 54% reduziert ($n=6$, $p=0,03$) (Abb. 3.13). Die J774A.1-Zelllinie ist demnach ein geeignetes Modell, um den Hemmeffekt des Ozons auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung näher zu untersuchen. Da Ozon seine Wirkung primär an der Zellmembran entfaltet, scheint ein möglicher Mechanismus dieser Inhibition darin zu liegen, daß unter Ozonwirkung der LPS-Rezeptor (CD14) oxidiert wird und dadurch LPS schlechter bzw. nicht mehr bindet. Mit einem Rezeptorbindungsassay kann bei der murinen Makrophagenlinie nach Exposition bei $300 \mu\text{g}$ Ozon eine um durchschnittlich 44% verminderte Bindung von LPS-FITC an den LPS-Rezeptor nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Die vorhandene Menge an CD14-Rezeptor, nachgewiesen durch den PE-gekoppelten anti-CD14-Antikörper, wird durch Ozon kaum beeinflusst.

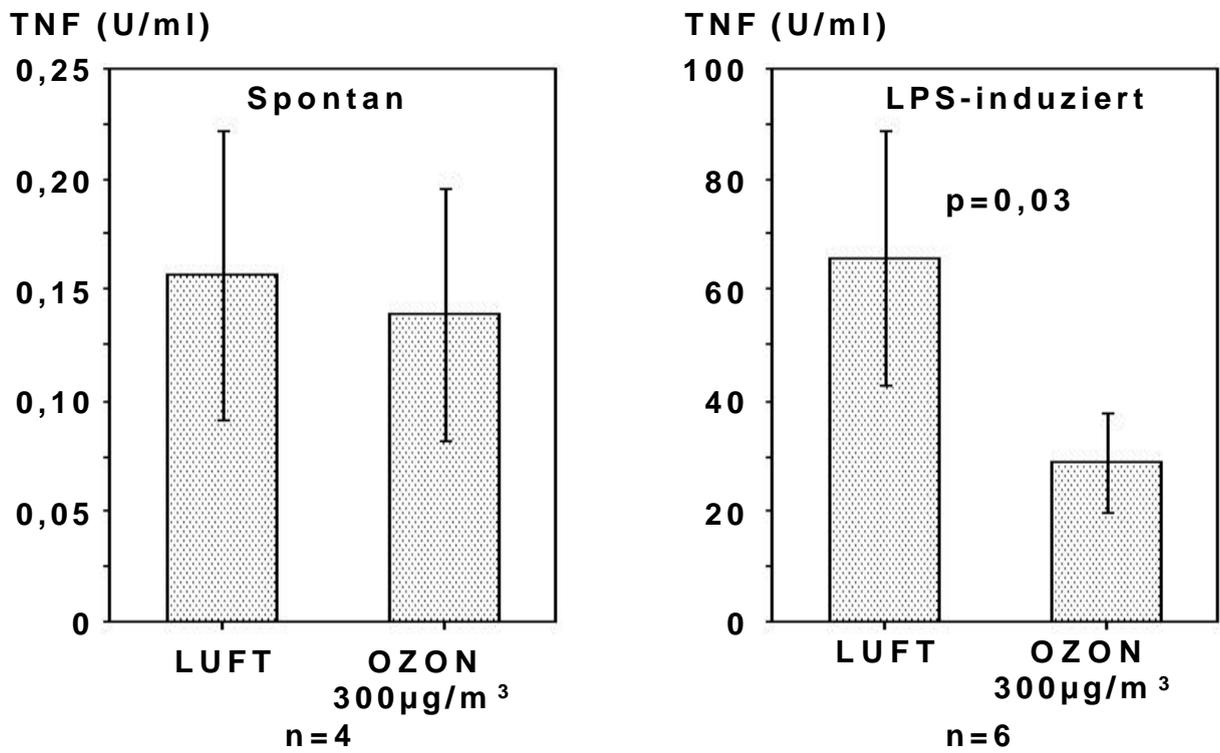


Abb. 3.13 Wirkung von 300 µg Ozon/m³ auf die spontane und LPS-induzierte TNF-Freisetzung von J774A.1-Makrophagen.

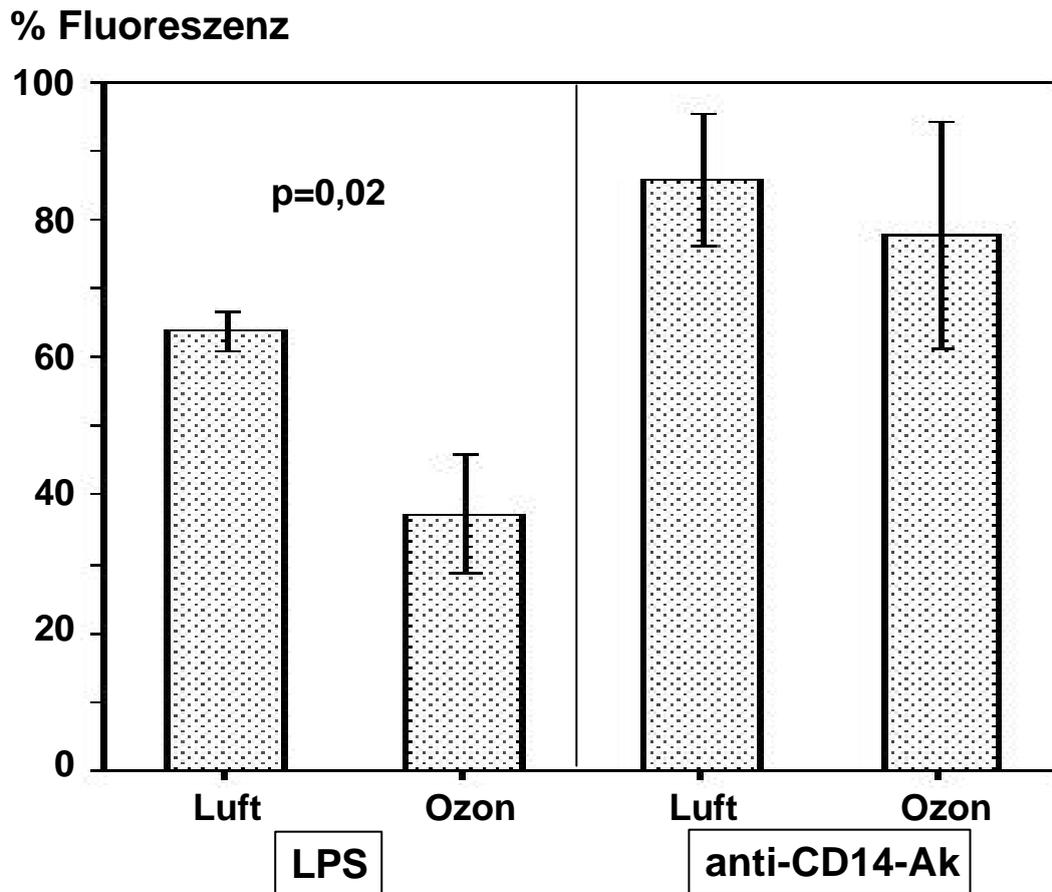


Abb. 3.14 Wirkung von 300 µg Ozon/m³ auf die Bindung von LPS-FITC (links) bzw. anti-CD14-Antikörper (rechts) bei J774A.1-Makrophagen.

4 Diskussion

Zahlreiche Studien belegen, daß das Einatmen von Ozon einen Entzündungsprozeß in der Lunge induzieren kann, der gekennzeichnet ist durch einen Einstrom von Entzündungszellen (Neutrophile) in die Lunge sowie ein Ansteigen von Entzündungsmediatoren in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit [Bascom et al., 1996]. Um die Wirkung von Ozon auf zellulärer Eben besser zu verstehen, sind neben Untersuchungen an Gesamtorganismen auch *in vitro* Untersuchungen an isolierten Zellsystemen notwendig. Verschiedene Expositionssysteme wie das „Wippe-System“ oder biphasische Systeme [Voisin et al., 1977, Becker et al., 1991, Mayer und Branscheid 1992, Devlin et al., 1994, Arsalane et al., 1995] ermöglichen eine kontrollierte direkte Exposition der primär durch das Schadgas betroffenen Zelltypen. So können die den *in vivo* beobachteten physiologischen Veränderungen zugrundeliegenden Mechanismen detailliert untersucht werden. Hierbei werden bevorzugt Kurzzeitexpositionen durchgeführt, da die Problematik der Zellviabilität einen beschränkenden Einfluß auf die Expositionsdauer *in vitro* hat [Bascom et al., 1996]. Aus diesen Untersuchungen können Informationen über die toxische Wirkung des Schadstoffes auf einzelne Zelltypen gewonnen werden. Der Vergleich der *in vitro* Daten mit den Ergebnissen von *in vivo* oder *ex vivo* Studien ergeben dann Anhaltspunkte, um z.B. Grenzwerte für den Umgang mit dem Schadstoff festzulegen.

4.1 Expositionssystem

Die Methode der Zellexposition in einem biphasischen System, bei dem die Zellen auf einer permeablen Membran sitzen und von basolateral mit Feuchtigkeit versorgt werden wurde aus einem ursprünglich von Voisin et al. [1977] beschriebenen System weiterentwickelt. Es hat gegenüber anderen verwendeten Systemen z.B. in Zellkulturflaschen auf der Wippe [Mayer und Branscheid, 1992] oder der permanent submersen Kultur in wenig Medium [Sweet et al., 1980] sowie der Exposition in rotierenden Kulturflaschen [Norgauer und Kownatzki, 1995] den Vorteil, daß die Exposition den *in vivo* herrschenden Bedingungen sehr ähnlich ist, da die Zellen permanent und nicht periodisch dem Gas ausgesetzt sind. Daneben werden mögliche Wechselwirkungen zwischen Schadgas und Kulturmedium minimiert, so daß die

Diskussion

beobachteten Effekte nicht durch eventuell entstehende toxische Zwischenprodukte des Mediums induziert werden. Auch die Dosis, der die Zellen bei der biphasischen Exposition ausgesetzt sind, läßt sich besser ermitteln als im System auf der Wippe oder gar bei der Submerskultur. Als Kontrolle werden in dieser Arbeit die Zellen des gleichen Patienten synthetischer Luft mit 5% CO₂ ausgesetzt, so daß immer ein direkter Vergleich zu den gefundenen Ozoneffekten vorliegt.

Die relativ geringen Kammervolumina von ca. 2 l haben den Vorteil, daß die Expositionskammern nach dem Beladen mit Versuchszellen schnell wieder mit dem jeweiligen Gas gesättigt sind. Durch die Nähe der Ausströmöffnungen zu den Zellen wird gewährleistet, daß diese ohne Verzögerung mit dem Schadgas in Kontakt kommen. Der bei unseren Standardexpositionen gewählte Gasdurchfluß entspricht ungefähr dem 20-fachen des durchströmten Kammerrestvolumens. So kann eine gute Benetzung der Zellen mit Ozon bei vernachlässigbaren Auswirkungen auf die Zellviabilität durch Trocknungseffekte gewährleistet werden. Vorversuche zu vorliegender Arbeit ergaben, ähnlich wie bei Devlin et al. [1994] und Arsalane et al. [1995] beschrieben, einen Einfluß der Gasdurchflußgeschwindigkeit sowie der Expositionsdauer auf die Zytotoxizität weswegen der relativ kurze Expositionszeitraum von 1 Stunde für das Standardexpositionsschema gewählt wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Ozonkonzentrationen zwischen 150 und 1000 µg/ m³ angewendet. Die beiden hohen Konzentrationen von 1000 und 700 µg/ m³ wurden in Anlehnung an die Literatur ausgewählt, in der häufig Expositionen bei 800 - 2000 µg/ m³ (0,4 bis 1,0 ppm) beschrieben sind [Becker et al., 1991, Gilmour et al., 1993, Devlin et al., 1994]. Allerdings treten solch hohe Konzentrationen in unseren Breiten in der Umwelt kaum auf, weswegen hier zusätzliche, wesentlich niedrigere und daher umweltrelevante Konzentrationen mit 300 und 150 µg/ m³ erforderlich sind. Diese Ozonkonzentrationen werden in den Sommermonaten an zahlreichen Orten Deutschlands erreicht oder gar überschritten, z.B. auch im Zentrum Heidelbergs, wie Tabelle 5.1 belegt.

	1992	1993	1994	1995	1996
Mai	522	232	98	237	18
Juni	223	224	208	99	106
Juli	265	154	453	337	62
August	213	194	198	315	69

Tabelle 4.1. $\frac{1}{2}$ -Stunden-Mittelwertmaxima [$\mu\text{g}/\text{m}^3$] in Heidelberg in den Sommermonaten [Quelle: Amt für Umweltschutz und Gesundheitsförderung der Stadt Heidelberg (1996)]

Die Tabellen 1.1 und 5.1 belegen, daß in den Sommermonaten immer wieder Ozonspitzenwerte auftreten, die im Bereich oder oberhalb der von der EU festgesetzten Schwellenwerte (1Std.-Mittelwerte) von $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Grenzwerte für die Unterrichtung der Bevölkerung) bzw. $360 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Schwellenwert für die Auslösung des Warnsystems) liegen (EU Richtlinie 92/72/EWG vom 21.09.92). Die Air-Quality-Guidelines (Richtwerte ohne gesetzliche Verbindlichkeit), 1987 herausgegeben von WHO-Regionalbüro Europa, betragen $150 - 200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (1 Std. Mittelwert).

Die in der Arbeit verwendeten umweltrelevanten Konzentrationen von 150 und $300 \mu\text{g}$ Ozon/ m^3 , denen die Zellen in Kurzzeitexpositionen ausgesetzt wurden, liegen somit innerhalb der hier aufgeführten Spitzenwerte.

4.2 Ozonwirkung

4.2.1 Zytotoxischer Effekte

Ozonexposition führt in unseren Experimenten bereits bei einer Konzentration von $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ zu einem signifikanten Ansteigen der extrazellulären LDH-Konzentration. Dieser Effekt ist auf eine direkte Zellschädigung der AM zurückzuführen. Gleiche Wirkung kann bei nahezu allen *in vitro* untersuchten Zell- und Expositionssystemen aufgezeigt werden [Mayer und Branscheid, 1992; Devlin et al, 1994]. Dabei handelt es sich jedoch nicht um einen ausschließlich *in vitro* auftretenden Effekt. Nach Ozonatmung von Probanden findet man in der BAL ebenfalls einen signifikanten Anstieg der LDH-Konzentration, der auf eine ozonbedingte Zellschädigung auch *in vivo* hindeutet [Devlin et al., 1991; Aris et al 1993]. Der zytotoxische Effekt ist nicht typisch für AM von Patienten, man findet ihn gleichfalls nach Ozonexposition der AM gesunder Probanden [Devlin et al, 1994].

4.2.2 Spontane Zytokinfreisetzung der AM

Entzündungsprozesse sind eine Folge von Reaktionen mit der Zielsetzung, die Ausbreitung einer Gewebeschädigung oder eines Infektionserregers einzudämmen. Zelluläre und humorale Mechanismen interagieren dabei in einem komplexen Netzwerk. Im Mittelpunkt dieses Netzwerkes steht der Alveolarmakrophage, der mit seinen Mediatoren den Verlauf entzündlicher Prozesse der Lunge steuern kann. Neben seinen physiologischen Aufgaben wie Phagozytose von inhalierten Mikroorganismen, Partikeln, Zelleritus usw., sind AM und ihre Mediatoren allerdings auch an einer ganzen Reihe von pathophysiologischen Veränderungen direkt oder indirekt beteiligt. Die in der vorliegenden Studie ausgewählten Zytokine sind zentrale Mediatoren der Entzündungskaskade und spielen als proinflammatorische Effektor bei den untersuchten Lungenerkrankungen wahrscheinlich eine Rolle [Sibille und Reynolds, 1990]. IL1, TNF und IL8 steuern u.a. den Einstrom der Neutrophilen in die Lunge und aktivieren diese [Kelley, 1990]. Die aktivierten Neutrophilen und ihre freigesetzten Produkte wie Sauerstoffanionen, Myeloperoxidase, Elastase, Collagenasen, sowie weitere Proteasen spielen bei der Pathogenese der Lungenfibrose, sowie den chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (Bronchitis, Emphysem) eine wichtige Rolle [Hunninghake et al, 1981, Calhoun und Kelley, 1993]. Eine erhöhte Freisetzung dieser Zytokine nach Ozonexposition hätte eine Verstärkung der Entzündungsreaktion und damit eine erhöhte Gewebsschädigung zur Folge. IL1 und TNF beeinflussen außerdem die Expression und Freisetzung von Zytokinen (z.B. IL8), Wachstumsfaktoren (z.B. Fibronectin) und Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) von Bronchialepithelzellen und Lungenfibroblasten [Sibille und Reynolds, 1990, Kelley, 1990, Calhoun und Kelley, 1993, Costabel, 1996].

Die in dieser Arbeit bei der Untersuchung der Zytokinsekretion ermittelten Ergebnisse zeigen für das Gesamtkollektiv und alle verwendeten Ozonkonzentrationen im Mittel einen diskreten Anstieg in der IL1 α -, IL1 β - und IL8-Sekretion im Vergleich zur luftexponierten Probe. Die TNF-Freisetzung wird dagegen durch das Schadgas bei den hohen Konzentrationen im Mittel signifikant reduziert, bei den umweltrelevanten Konzentrationen ist diese Minderung allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt.

Im Rahmen unserer Studie wurden AM aus Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen der Lunge isoliert. Inwieweit die bestehende Vorerkrankung Einfluß auf die Ozonantwort der AM hat, wird bei der Unterteilung des Gesamtkollektivs in die Gruppen Sarkoidose, Fibrose und chronische Bronchitis deutlich.

Die Sarkoidose ist eine systemische Granulomatose unbekannter Ätiologie, die in 90% der Fälle mit einer Lungenbeteiligung einhergeht [Kirsten, 1996a, b]. Da schon unstimulierte BAL-Zellen aus diesen Patienten im Vergleich zu Lungengesunden erhöhte IL1 β -, IL6-, TNF α - und GM-CSF-Sekretionen aufweisen [Prior et al., 1996], könnte eine weitere Stimulation durch Ozon zu einer Verstärkung der durch die Zytokine *in vivo* hervorgerufenen Effekte bzw. Folgereaktionen führen. Auch in unserer Studie weisen die AM von Sarkoidosepatienten im Vergleich zu Bronchitikern und Fibrosepatienten die höchste Basisfreisetzung der untersuchten Zytokine auf. Allerdings kann im Mittel keine durch Ozon hervorgerufene spezifische Veränderung der Zytokinsekretion für diese oder eine andere Gruppe ermittelt werden. Obwohl bei einzelnen Patienten sehr wohl ein Anstieg oder auch eine Hemmung in der Zytokinfreisetzung auftritt, was auf eine Personen-spezifische und nicht auf eine Krankheits-spezifische Stimulation schließen läßt, findet innerhalb der Sarkoidosepatienten keine Gruppen-spezifische Änderung statt. Diese Resultate decken sich weitgehend mit den Ergebnissen von Vorversuchen die zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. A. Seidel an einer sehr kleinen Serie von Patienten-AM bei höherer Ozonkonzentration mit dem Wippe-Expositionssystem erzielt wurden [Mosbach et al, 1994].

Bei der Lungenfibrose spielen zu Beginn der Erkrankung höchstwahrscheinlich aktivierte AM und PMN eine wichtige Rolle. Durch deren initiale Schädigungen des Lungengerüsts und der extrazellulären Matrix werden Fibroblasten zur Proliferation angeregt, was schließlich mit einem irreversiblen Umbau des Lungengerüsts endet [Costabel, 1996]. Es ist auch bekannt, daß die AM aus Fibrosepatienten in erhöhtem Maße chemotaktische Verbindungen sezernieren [Wesselius et al., 1984]. Dazu gehört auch Fibronectin, das ein Wachstumsfaktor für Fibroblasten ist [Bitterman et al., 1983, Costabel, 1996] und somit ebenfalls zu einer Aktivierung der Kollagen-produzierenden Zellen beiträgt.

Aus Tierversuchen ist bekannt, daß Ozon bei verschiedenen Spezies Veränderungen ähnlich der Lungenfibrose induzieren kann [Last et al., 1979, Fukase und Hashimoto, 1982], die auch nach längerer Erholung der Tiere in sauberer Luft Bestand hat [Gross und White, 1987]. Die im Rahmen der Untersuchungen dieser Autoren beobachteten entzündlichen Prozesse in der Lunge scheinen vorwiegend auf Makrophagen zurückzugehen [Castleman et al., 1973, Hotchkiss et al., 1989].

Diskussion

In der vorliegenden Studie weisen die Patienten mit Lungenfibrose im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen (Sarkoidose, chronische Bronchitis) eine hohe PMN-Zahl in der BAL auf. Dieser Befund zeigt Übereinstimmung mit bekannten Literaturdaten, die sowohl in Lungenbiopsien als auch in der BAL von Fibrosepatienten erhöhte PMN-Werte nachgewiesen haben [Crystal et al., 1974, Reynolds et al., 1977]. In vitro konnte gezeigt werden, daß AM aus Fibrosepatienten spontan Mediatoren wie z.B. IL8 freisetzen, die chemotaktisch auf PMN wirken [Hunninghake et al., 1981, Sibille und Reynolds, 1990, Carré et al., 1991]. AM sind eine Hauptquelle für IL8 in den Lungenalveolen, weswegen deren IL8-Freisetzung im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Daneben können auch Bronchialepithelzellen und Fibroblasten nach entsprechender Stimulation, z.B. mit TNF dieses chemotaktische Zytokin sezernieren. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen aber weder in der Basisfreisetzung der AM von Fibrosepatienten noch nach zusätzlicher Ozonexposition der Zellen eine generell erhöhte IL8-Sekretion.

Es ist bekannt, daß die Umwelt belastende Faktoren und vor allem auch das Zigarettenrauchen einen Einfluß auf Husten und Sputumproduktion haben [Vedal, 1995]. Treten starker produktiver Husten im Laufe von 2 Jahren für mindestens 3 Monate pro Jahr auf, so leidet der Patient laut WHO-Definition an einer chronischen Bronchitis. Da ein Großteil der Patienten (90-95%) mit dieser Diagnose auch Raucher ist, läßt sich der zusätzliche Einfluß von Ozon im Rahmen epidemiologischer Studien nur schwer abschätzen [Vedal, 1995, Schwartz, 1994]. Es scheint allerdings bei Rauchern zu geringeren Abnahmen in der Lungenfunktion und allgemeinen Symptomen in der Ozonantwort zu kommen als bei Nichtrauchern [Frampton et al., 1997]. Ob diese abgeschwächt vorliegenden Effekte auf einer Adaptation der Zellen an Schadstoffbelastungen oder auf einer Vorschädigung beruhen, ist nicht bekannt. Die Bronchitikerin unserer Studie wiesen eine hohe AM-Zahl in der BAL auf, was offensichtlich mit der hohen Anzahl an Rauchern in diesem Patientenkollektiv zusammenhängt. Bei diesen Patienten laufen, induziert durch den Zigarettenrauch, permanent entzündliche Prozesse in der Lunge ab [Sibille und Reynolds, 1990]. Die Basisfreisetzung des TNF α ist bei den AM von Bronchitikern am geringsten, verglichen mit den anderen beiden Krankheitsbildern, aber auch hier ist nach Ozonexposition keinerlei krankheitsspezifische, sondern eine individuelle Reaktion der AM feststellbar.

4.2.3 LPS-induzierte Zytokinsekretion der AM

LPS oder Endotoxin ist ein Zellwandbaustein Gram-negativer Bakterien und induziert in isolierter Form eine Vielzahl von Wirkungen, die als „bakterielle Sepsis“ bekannt sind. LPS aktiviert das Monocyten/ Makrophagensystem, was u.a. in einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine resultiert, z.B. IL1, TNF, TGF- β , IL8 oder IL6 [Leonhard und Yoshimura, 1990, Rietschel et al., 1993, Xing et al., 1994].

Wie sich eine zusätzliche Ozonexposition auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung auswirkt, ist in dieser Arbeit bei verschiedenen Ozonkonzentrationen (150, 300, 700 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) untersucht worden. Das Schadgas reduziert die LPS-induzierte Sekretion des Markerzytokins TNF α teilweise um mehr als 40%, wobei eine annähernd konzentrationsabhängige Minderung erkennbar ist. Auch die IL6-Sekretion wird unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei allen Ozonkonzentrationen stark vermindert. Allerdings wurden die Messungen der Sekretion nicht zum optimalen Zeitpunkt durchgeführt, so daß zu einem späteren Messzeitpunkt (6-8 h post-Aktivierung) wahrscheinlich größere und ggf. deutlichere Differenzen zwischen ozon- und luft-exponierten AM zu erwarten sind. Die LPS-induzierte IL1 α -, IL1 β - sowie IL8-Freisetzung wird durch Ozon unter den gegebenen Bedingungen wenig beeinflusst und ist im Vergleich zur gepaarten Luftkontrolle praktisch unverändert.

Der Vergleich mit den relativ spärlichen Literaturdaten zur Untersuchung von Ozonwirkung auf humane AM ist aufgrund der methodischen Unterschiede (Expositionssystem, Expositionsbedingungen und Probandenauswahl) nur begrenzt möglich. Trotzdem lassen sich einige Übereinstimmungen aufzeigen. Becker et al. [1991] fanden mit einem Wippesystem nach 2-4-stündiger Exposition bei sehr hoher Ozonkonzentration (1ppm = 2000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) keine signifikante Änderung in der spontanen TNF α -, IL1- und IL6-Sekretion mit AM gesunder Probanden. Nach LPS-Aktivierung trat jedoch eine deutlich verminderte Zytokinfreisetzung auf. Zusätzlich beschrieben sie eine verminderte Phagozytoseleistung der AM nach Ozonexposition.

Unsere Daten, die mit AM von Patienten mit manifester Lungenerkrankung gewonnenen wurden, ergaben bereits bei umweltrelevanten Ozonkonzentrationen und nach nur einstündiger Exposition eine vergleichbare Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung, insbesondere für TNF das Markerzytokin der AM-Aktivierung. Der Vergleich der Daten zeigt, daß die Untersuchungskollektive in beiden Studien trotz der

Diskussion

unterschiedlichen gesundheitlichen Voraussetzungen im Mittel sehr ähnlich auf das Schadgas reagieren. Neuere Untersuchungen von Devlin et al. [1994] ergaben nach 10-20 minütigen Kurzzeitexposition bei 200 µg und nachfolgender Zellkultivierung von nur 1-2 h keine signifikant unterschiedliche IL6- und IL8-Freisetzung bei AM gesunder Probanden. Andererseits fanden Arsalane et al (1995) einen Anstieg der Zytokine IL1β, IL8 und TNFα nach 0,4 ppm Ozon sowie von TNFα nach 0,1, 0,2 und 1 ppm Ozon mit AM gesunder Probanden (Raucher). Im Trend finden wir ähnliche Resultat für IL1β und IL8, für TNFα ermitteln wir bei den Patient eher eine Hemmung der Freisetzung, insbesondere bei hoher Ozonkonzentration. Die Unterschiede zur vorgenannten Arbeitsgruppe können sowohl in der Probandenzusammensetzung, als auch durch den unterschiedliche Experimentellen Ansatz begründet sein. Arlsalane et al führten ihrer Zytokinmessung erst 18 h nach der Exposition durch. In unserer Studie wurden die Kulturüberstände bereits nach 4 h gemessen. Arsalane et al kultivierten die AM während der 18 h in serumhaltigen RPMI-Kulturmedium. Dieses Medium enthält u.a. eine hohe Konzentration an Antioxidantien wie z.B. Glutathion, die in dem von uns verwendeten Medium (DMEM, serumfrei) nicht vorhanden waren. Wie bereits von diese Arbeitsgruppe diskutiert scheint die ozoninduzierte Zytokinproduktion erheblich von den Kulturbedingungen abzuhängen.

4.2.4 Auswirkung von Ozon auf den LPS-Rezeptor CD14

Wie Uppu et al. [1995] an Membranen von roten Blutkörperchen nachgewiesen haben, entfaltet Ozon seine schädliche Wirkung an der Zellmembran. Es werden sowohl die darin enthaltenen Proteine als auch ungesättigte Fettsäuren durch Ozon oxidiert. Verschiedene Aminosäuren werden durch das Gas ozonisiert, unter anderem auch Cystein, das bei der Bildung der Tertiärstruktur von Proteinen eine wichtige Rolle spielt [Pryor et al., 1983].

In der Annahme, daß der Hemmung der LPS-induzierten TNF-Freisetzung ein ozoninduzierter Rezeptordefekt zugrunde liegt, wurden weitere Untersuchungen zur Funktion des auf AM exprimierten LPS-Rezeptors (CD14-Molekül) durchgeführt []. Dieses 55 kDa große Protein ist ein myeloides Differenzierungsantigen [Morrison et al., 1993, Striz et al., 1995], das über einen Glycosylphosphatidylinositol-(GPI-) Anker in der Zellmembran verankert ist [Haziot et al., 1988]. Um mit einem kontinuierlich vorhandenen Zellmodell arbeiten zu können, wurde auf die murine Makrophagenlinie J774A.1 zurückgegriffen. Deren LPS-Rezeptor weist eine 66%-ige Homologie mit humanen CD14 auf [Ferrero et al., 1990].

J774A.1-Makrophagen zeigen nach Ozonexposition eine ähnlich Hemmung der LPS-induzierten TNF-Freisetzung wie humane AM. Sie sind deshalb ein adäquates Modell, um den zugrundeliegenden Mechanismus dieser Hemmung zu untersuchen.

Im LPS-Bindungsassay findet man bei ozonexponierten J774A.1-Zellen ($300\mu\text{g}/\text{m}^3$) gegenüber luftexponierten Kontrollen eine um 44% geringere Bindung von fluoreszenzmarkiertem LPS. Dies weist auf eine funktionelle Beeinträchtigung des LPS-Rezeptors hin. Die Bindung eines spezifische CD14-Antikörpers, der Hinweise auf die Menge an vorhandenen Rezeptormolekülen pro Zelle gibt, wird nach Ozonexposition jedoch kaum verändert. Die Ergebnisse demonstrieren eine funktionelle Schädigung der LPS-Rezeptoren bei umweltrelevanter Ozonkonzentration.

Dieses Ergebnis steht im Zusammenhang mit Befunden, nach denen weitere Rezeptorvermittelte Funktionen bei AM aus Mäusen oder humanen Probanden nach Ozonexposition beeinträchtigt sind. So ist z.B. *in vivo* die Clearance von Gram-positiven Bakterien nach dreistündiger Ozonexposition mit 0,4 ppm stark vermindert [Gilmour et al., 1993]. Auch die rezeptorvermittelte Phagozytose humaner AM wird durch Ozon sowohl *ex vivo* (0,08 ppm, 2 h) als auch *in vitro* (0,5 ppm, 4 h) beeinträchtigt [Becker et al., 1991, Devlin et al., 1991]. Alle diese Befunde stützen die Erkenntnis, daß *Ozon in vivo* neben den akuten Reaktionen im Bereich der lungenfunktionellen Parameter einen äußerlich erst mit Verzögerung sichtbaren Einfluß auf wichtige Bereiche der Infektabwehr haben kann.

4.3 Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse zeigen, daß Ozon bereits bei umweltrelevanten Konzentrationen an AM funktionelle Schäden hervorruft und die Zytokinfreisetzung moduliert.

Die Variabilität der Ozonantwort bezüglich der spontanen Zytokinfreisetzung in Höhe und Richtung (Stimulation/Hemmung) und von Patient zu Patient, läßt keine für die verschiedenen Patientengruppen spezifische bzw. typische Reaktion erkennen. Die Ozonantwort der AM scheint von individuellen noch unbekanntem Faktoren der Patienten abzuhängen. Zumindest bei einigen Patienten, deren AM nach Ozon einen entsprechenden Mediatoranstieg aufwiesen, muß jedoch mit einer Verschlimmerung der individuellen Entzündung gerechnet werden.

Die stärksten Ozoneffekte in Form einer Hemmung von z.B. TNF findet man nach zusätzlicher Aktivierung der AM mit Endotoxin (LPS), einer Zellwandkomponente Gram-

Diskussion

negativer Bakterien. Diese Hemmung beruht wahrscheinlich auf einer funktionellen Schädigung der membrangebundenen LPS-Rezeptoren. Die starke Hemmung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung nach Ozonexposition zeigt, daß Mechanismen in Mitleidenschaft gezogen werden, die in Zusammenhang mit der Infektabwehr stehen.

Um eine Annäherung an die in vivo herrschenden Bedingungen zu erreichen und um das komplexe Zusammenspiel („Zytokinnetzwerk“) der verschiedenen in der Lunge lokalisierten Zellsysteme besser zu verstehen, sind weitere Experimente in Richtung einer Co-Kultur von AM mit anderen Lungenzellen, wie Epithelzellen oder Fibroblasten, notwendig.

5 Literatur

- Aderka,D., Engelmann,H., Maor,Y., Brakebusch,C., Wallach,D.: Stabilization of the Bioactivity of Tumor Necrosis Factor by Its Soluble Receptors. *J.Exp.Med.* 175, 1992, 323-329
- Aris, R.M., Christian, P.Q., Hearne, K., Finkenbeiner, W.E. and Balmes, J.R.: Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148, 1993, 1363-1372
- Arsalane,K., Gosset,P., Vanhee,D., Voisin,C., Hamid,Q., Tonnel,A.-B., Wallaert,B.: Ozone Stimulates Synthesis of Inflammatory Cytokines by Alveolar Macrophages In Vitro. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 13, 1995, 60-68
- Atkinson,R.: Atmospheric transformation of automobile emissions. In: Watson,Y.A., Bates,R.R., Kennedy,D. (Hrsg.): *Air Pollution, the Automobile, and Public Health.* Washington, DC: National Academy Press, 1988, 99-132
- Bachwich,P.R., Lynch,J.P., Larrick,J., Spengler,M., Kunkel,S.L.: Tumor necrosis factor production by human sarcoid alveolar macrophages. *Am.J.Pathol.* 125, 1986, 421-425
- Baggiolini,M., Walz,A., Kunkel,S.L.: Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a Novel Cytokine That Activates Neutrophils. *J.Clin.Invest.* 84, 1989, 1045-1049
- Baggiolini,M., Dewald,B., Moser,B.: Interleukin-8 and Related Chemotactic Cytokines-CXC and CC Chemokines. *Advances in Immunology* 55, 1994, 97-179
- Bartlett,D., Faulkner,C.S., Cook,K.: Effect of chronic ozone exposure on lung elasticity in young rats. *J.Appl.Physiol.* 37, 1975, 92-96
- Bascom,R., Bromberg,P.A., Costa,D.A., Devlin,R., Dockery,D.W., Frampton,M.W., Lambert,W., Samet,J.M., Speizer,F.E., Utell,M.: Health Effects of Outdoor Air Pollution. Part 1. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 153, 1996, 3-50
- Becker,S., Madden,M.C., Newman,S.L., Devlin,R.B., KorenH.S.: Modulation of Human Alveolar Macrophage Properties by Ozone Exposure in Vitro. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 110, 1991, 403-415
- Beckett,W.S.: Ozone, air pollution, and respiratory health. *Yale J.Biol.Med.* 64, 1991, 167-175
- Biscardi,F., Gerrity,T., Strong,A., Garlington,R., Bromberg,P.: Ozon uptake in human airways (abstract). *Am.Rev.Respir.Dis.* 147, 1993, A640

Literatur

Bitterman,P.B., Rennard,S.I., Adelberg,S., Crystal,R.G.: Role of fibronectin as a growth factor for fibroblasts. *J.Cell Biol.* 97, 1983, 1925-1932

Bitterman,P.B., Wewers,M.D., Rennard,S.I., Adelberg,S., Crystal,R.G.: Modulation of alveolar macrophage-driven proliferation by alternative macrophage mediators. *J.Clin.Invest.* 77, 1986, 700-708

Borek,C.: Ozone carcinogenesis in vitro and its co-carcinogenesis with radiation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 534, 1988, 106-110

Burnett,R.T., Dales,R.E., Razenne,M.E., Krewski,D., Summers,P.W., Roberts,G.R., Radd-Young,M., Dann,T., Brook,J.: Effects of low ambient levels of ozone and sulfates on the frequency of respiratory admission in Ontario hospitals. *Environ.Res.* 65, 1994, 172-194

Calhoun,W.J., Kelley,J.: Cytokines in the Respiratory Tract. In: Chung,K.F., Barnes,P.J. (Hrsg.): *Pharmacology of the respiratory tract. Experimental and clinical Research.* New York: Marcel Dekker,Inc, 1993, 253-288

Cantin,A.M., Hubbard,A.C., Crystal,R.G.: Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 139, 1989, 370-372

Carré,P.C., Mortenson,R.L., King,T.E.,Jr., Noble,P.W., Sable,C.L., Riches,D.W.H.: Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis.' *J.Clin.Invest.* 88, 1991, 1802-1810

Castillejos,M., Gold,D.R., Dockery,D., Tosteson,T., Baum,T., Speizer,F.E.: Effects of ambient ozone on respiratory function and symptoms in Mexico City schoolchildren. *Am.Rev.Respir.Dis.* 145, 1992, 276-282

Castleman,W.L., Dungworth,D.L., Tyler,W.S.: Cytochemically detected alterations of lung acid phosphatase reactivity following ozone exposure. *Lab.Invest.* 29, 1973, 310-319

Chameides,W.L., Lindsay,R.W., Richardson,J., Kiang,C.S.: The role of biogenic hydrocarbons in urban photochemical smog. Atlanta as a case study. *Science* 241, 1988, 1473-1475

Chang,L., Miller,F.J., Ultman,J., Huang,Y., Stockstill,B.L., Grose,E., Graham,J.A., Ospital,J.J., Crapo,J.D.: Alveolar epithelial cell injuries by subchronic exposure to low concentrations of ozone correlate with cumulative exposure. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 109, 1991, 219-234

Costabel,U.: Zellbiologie für den Pneumologen am Beispiel der Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose. *Atemw.-Lungenkrkh.* 4, Jahrgang 22, 1996, 228-234

- Cross,C.E., Motchnik,P.A., Bruener,B.A., Jones,D.A., Kaur,H., Ames,B.N., Halliwell,B.: Oxidative damage to plasma constituents by ozone. *FEBS Lett.* 298, 1992, 269-272
- Crystal,,R.G., Fulmer, J.D., Roberts,W.C., Moss,M.L., Line,B.R., Reynolds,H.Y.: Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic and biochemical aspects. *Ann.Intern.Med.* 85, 1976, 769-788
- Davis,W.B., Pacht,E.: Extracellular oxidant defenses. In: Crystal,R.G., West,J.B. (Hrsg.): *The Lung: Scientific Foundations.* New York: Raven Press, 1991, 1821-1827
- Derynck,R., Jarrett, J.A., Chen,E.Y., Eaton,D.H., Bell,J.R., Assoian,R.K., Roberts,A.B., Sporn,M.B., Goeddel,D.V.: Human transforming growth factor-beta complementary sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316, 1985, 701-707
- Devlin,R.B., McDonnell,W.F., Mann,R., Becker,S., House,D.E., Schreinemachers,D., Koren,H.S.: Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.* 4, 1991, 72-81
- Devlin,R.B., McKinnon,K.P., Noah,T., Becker,S., Koren,H.S.: Ozone-induced release of cytokines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 266 (Lung Cell Mol.Physiol. 10), 1994, L612-L619
- Elstner,E.F.: Ozon in der Troposphäre - Bildung, Eigenschaften, Wirkungen. Akademie für Technikfolgeabschätzung in Baden-Württemberg (Hrsg.), Stuttgart, 1996
- Enarson,D.A.: Epidemiological evidence for the role of occupational airborne exposure in obstructive lung disease. *Eur.Respir.Rev.* 5, 1995, 327-332
- Ferrero,E., Hsieh,C.-L., Francke,U., Goyert,S.M.: CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. *J.Immunol.* 145, 1990, 331-336
- Folinsbee,L.J., McDonnell,W.F., Horstman,D.H.: Pulmonary function and symptom responses after 6.6 hour exposure to 0.12 ppm ozone with moderate exercise. *JAPCA* 38, 1988, 28-35
- Frampton,M.W., Morrow,P.E., Torres,A., Cox,C., Voter,K.Z., Utell,M.J.: Ozone Responsiveness in Smokers and Nonsmokers. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 155, 1997, 116-121
- Freeman,G., Stephens,R.J., Coffin,D.L., Stara,J.F.: Changes in dogs lungs after longterm exposure to ozone: light and electron microscopy. *Arch.Enviroin.Health* 26, 1973, 209-216
- Freeman,G., Juhos,L.T., Furiosi,N.J., Mussenden,R., Stephens,R.J., Evans,M.J.: Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (nitrogen dioxide and ozone). *Arch.Enviroin.Health* 29, 1974, 203-210

Literatur

Freeman,B.A., Mudd,J.B.: Reaction of ozone with sulfhydryls of human erythrocytes. *Arch.Biochem.Biophys.* 208, 1981, 212-220

Fukase,O., Hashimoto,K.: The effects of exposure to ozone on collagens in lungs and skin. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 37, 1982, 694-700

Gerrity,T., Weaver,R.A., Berntsen,J., House,D.E., O'Neil,J.J.: Extrathoracic and intrathoracic removal of ozone in tidal breathing humans. *J.Appl.Physiol.* 65, 1988, 393-400

Gershenwald,J.E., Fong,Y.M., Fahey,T.J., Calvano,S.E., Chizzonite,R., Kilian,P.L., Lowry,S.F., Moldawer,L.L.: Interleukin 1 receptor blockade attenuates the host inflammatory response. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87, 1990, 4966-4970

Gilmour,M.I., Park,P., Selgrade,M.K.: Ozone-enhanced Pulmonary Infection with *Streptococcus zooepidemicus* in Mice. *Am.Rev.Respir.Dis.* 147, 1993, 753-760

Goldstein,B.D., Lodi,C., Collinson,C., Balchum,O.J.: Ozone and Lipid Peroxidation. *Arch.Environ.Health* 18, 1969, 631-635

Grigg,J., Kukielka,G.L., Berens,K.L., Dreyer,W.J., Entman,M.L., Smith,C.W.: Induction of Intercellular Adhesion Molecule-1 by Lipopolysaccharide in Canine Alveolar Macrophages. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 11, 1994, 304-311

Gross,K.B., White,H.J.: Functional and pathologic consequences of a 52-week exposure to 0.50 ppm ozone following by clear air recovery period. *Lung* 165, 1987, 283-295

Hackney,J.D., Linn,W.S., Buckley,R.D., Hislop,H.J.: Studies in adaptation to ambient oxidant air pollution. Effects of ozone exposure in Los Angeles residents vs. new arrivals. *Environ.Health Persp.* 18, 1976, 141-146

Hackney,J.D., Linn,W.S., Mohler,J.G., Collier,C.R.: Adaptation to short-term respiratory effects of ozone in men exposed repeatedly. *J.Appl.Physiol.* 43, 1977, 82-85

Haziot,A., Chen,S., Ferrero,E., Low,M.G., Silber,R., Goyert,S.M.: The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J.Immunol.* 141, 1988, 547-552

Hazucha,M.J., Folinsbee,L.J., Seal jr,J.: Effects of steady-state and variable ozone concentration profiles on pulmonary function. *Am.Rev.Respir.Dis.* 146, 1992, 1487-1493

Higgins,I.T.T., D'Arcy J.B., Gibbons,D.I., Avol,E.L., Gross,K.B.: Effect of exposures to ambient ozone on ventilatory lung function in children. *Am.Rev.Respir.Dis.* 141, 1990, 1136-1146

Holtzman,M.J.,Cunningham,J.H., Sheller,J.R., Irsigler,G.B., Nadel,J.A., Boushey,H.A.: Effect

of ozone on bronchial reactivity in atopic and nonatopic subjects. *Am.Rev.Respir.Dis.* 120, 1979, 1059-1067

Holtzman,M.J., Fabbri,L.M., O'Byrne,P.M., Gold,B.D., Aizawa,H., Walters,E.H., Walters,S.E., Alpert,S.E., Nadel,J.A.: Importance of airway inflammation for hyperresponsiveness induced by ozone. *Am.Rev.Respir.Dis.* 127, 1983, 686-690

Horstman,D.H., McDonnell,W.F., Folinsbee,L.J., Abdul-Salaam,S., Ives,P.: Changes in pulmonary function and airway reactivity due to prolonged exposure to typical ambient ozone levels. In: Schneider,T., Lee,S.D., Wolters,G.J.R., Grant,L.D. (Hrsg.). *Atmospheric Ozone Research and Its Policy Implications*. Amsterdam: Elsevier Press, 1989, 755-762

Horvath,S.M., Gliner,J.A., Folinsbee,L.J.: Adaptation to ozone. Duration of effect. *Am.Rev.Respir.Dis.* 123, 1981, 496-499

Hotchkiss,J.A., Harkema,J.R., Kirkpatrick,D.T., Henderson,R.F.: Response of rat alveolar macrophages to ozone: quantitative assessment of population size, morphology and proliferation following acute exposure. *Exp.Lung Res.* 15, 1989, 1-16

Hu,S.-C., Ben-Jebria,A., Ultman,J.S.: Longitudinal distribution of ozone absorption in the lung: quiet respiration in healthy subjects. *J.Appl.Physiol.* 73, 1992, 1655-1661

Hunninghake,G., Gadek,J.E., Kawanami,O., Ferrans,V.J., Crystal,R.G.: Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease. Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am.J.Pathol.* 97, 1979, 149-206

Hunninghake,G., Gadek,J.E., Lawley,T.J., Crystal,R.G.: Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J.Clin.Invest.* 58, 1981, 259-269

Hunninghake,G.W.: Release of interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 129, 1984, 569-572

Hyde,D.M., Hubbard,W.C., Wong,V., Wu,R., Pinkerton,K., Plopper,C.G.: Ozone-induced acute tracheobronchial epithelial injury: relationship to granulocyte emigration in the lung. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 6, 1992, 481-497

Ibelgaufts,H.: *Lexikon Cytokine*. München: Medikon Verlag, 1992

Janositz,P.: Sommertheater. *Bild der Wissenschaft* 7, 1995, 58-61

Jörres,R.A., Magnussen,H.: Zelluläre und biochemische Untersuchungen zur Toleranzentwicklung nach wiederholter Einatmung von Ozon beim Menschen. 5. Statuskolloquium des PUG, 5.-6. März 1996, 27-33

Literatur

Kelley,J.: Cytokines of the Lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* 141, 1990, 765-788

Kienast,K., Knorst,M., Müller-Quernheim,J., Ferlinz,R.: Modulation of IL-1 β , TNF- α , and TGF- β Secretions by Alveolar Macrophages under NO₂ Exposure. *Lung* 174, 1996, 57-67

Kirsten,D.: Sarkoidose in Deutschland. In: Deutsche Sarkoidose-Vereinigung gemeinütziger e.V. (Hrsg.): Sarkoidose - Fachbeiträge zum Krankheitsbild auf dem Weg der Synektik. 1. Auflage, Neuss: Der Drucker, Michulsky / Nienhuys, 1996a, 44-55

Kirsten,D.: Sarkoidose. In: Deutsche Sarkoidose-Vereinigung gemeinütziger e.V. (Hrsg.): Sarkoidose - Fachbeiträge zum Krankheitsbild auf dem Weg der Synektik. 1. Auflage, Neuss: Der Drucker, Michulsky / Nienhuys, 1996b, 56-71

Kohase,M., Henriksen-Destefano,D., May,L.T., Vilcek,J., Sengal,P.B.: Induction of β_2 -interferon by tumour necrosis factor: A homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell* 45, 1986, 659-666

Koren,H.S., Devlin,R.B., Graham,D.E., Mann,R., McGee,M.P., Horstman,D.H., Kozumbo,W.J., Becker,S., House,D.E., McDonnell,W.F., Bromberg,P.A.: Ozone-induced Inflammation in the Lower Airways of Human Subjects. *Am.Rev.Respir.Dis.* 139, 1989, 407-415

Koren,H.S., Devlin,R.B., Becker,S., Perez,R., McDonnell,W.F.: Time-dependent Changes of Markers Associated with Inflammation in the Lungs of Humans Exposed to Ambient Levels of Ozone. *Toxicol.Pathol.* 19, 1991, 406-411

Kreit,J.W., Gross,K.B., Moore,T.B., Lorenzen,T.J., D'Arcy,J., Eschenbacher,W.L.: Ozone-induced changes in pulmonary function and bronchial responsiveness in asthmatics. *J.Appl.Physiol.* 66, 1989, 217-222

Last,J.A., Greenberg,D.B., Castleman,W.L.: Ozone-induced alteration in collagen metabolism of rat lungs. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 51, 1979, 247-258

Last,J.A., Greenberg,D.B.: Ozone-induced alterations in collagen metabolism of rat lungs. II. Long-term exposure. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 55, 1980, 108-114

Le,J., Vilcek,J.: Biology of Disease. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Cytokines with Multiple Overlapping Biological Activities. *Lab.Invest.* 56, 1987, 234-248

Leonhard,E.J., Yoshimura,T.: Neutrophil Attractant/Activation Protein-1 (NAP-1 [Interleukin-8]). *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2, 1990, 479-486

Lindl,T., Bauer,J.: Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag, 1989

- Lippmann, M.: Health effects of ozone. A critical review. *J. Air Pollut. Control Ass.* 39, 1989, 672-695
- Mayer, D., Branscheid, D.: Exposure of human lung fibroblasts to ozone: cell mortality and hyaluronan metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health* 35, 1992, 235-246
- McDonnell, W.F., Chapman, R.S., Leigh, M.W., Strobe, G.L., Collier, A.M.: Respiratory responses of vigorously exercising children to 0.12 ppm ozone exposure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132, 1985a, 875-879
- Menzel, D.B.: Ozone. An overview of its toxicity in man and animals. *J. Toxicol. Environ. Health* 13, 1984, 183-204
- Menzel, D.B.: Antioxidant vitamins and prevention of lung disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 669, 1992, 141-155
- Molfino, N.A., Nannini, L., Martelli, A.N., Slutsky, A.S.: Respiratory arrest in near-fatal asthma. *N. Engl. J. Med.* 324, 1991, 285-288
- Morrison, D.C., Lei, M.G., Kirikae, T., Chen, T.Y.: Endotoxin receptors on mammalian cells. *Immunobiology (Germany)* 187, 1993, 212-226
- Mosbach, M., Polzer, G., Lind, I., Krüger, E., Seidel, A.: Untersuchung von Gasen und Stäuben auf Alveolarmakrophagen an einem realitätsnahen in-vitro-Modell. *Kernforschungszentrum Karlsruhe, KfK-PUG* 13, 1994, 175-184
- Mudd, J.B., Leavitt, R., Ongun, A., McManus, T.T.: Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos. Environ.* 3, 1969, 669-682
- Muley, T., Wiebel, M., Schulz, V., Ebert, W.: Elastinolytic activity of alveolar macrophages in smoking-associated pulmonary emphysema. *Clin. Invest.* 72, 1994, 269-276
- Naegel, G.P., Young, R.K., Reynolds, H.Y.: Receptors of human IgG subclasses on human alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129, 1984, 413-418
- Nathan, C.F.: Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79, 1987, 319-326
- Norgauer, J., Kownatzki, E.: Direkte und indirekte Effekte von Ozon auf menschliche neutrophile Granulozyten. 4. Statuskolloquium des PUG, 15.-16. März 1995, 149-160
- Nugent, K.M., Glazier, J., Monick, M.M., Hunninghake, G.W.: Stimulated human alveolar macrophages secrete interferon. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 1985, 714-718
- Old, L.J., Boyse, E.A.: Current enigmas in cancer research. *Harvey Lect.* 67, 1973, 273-315
- Oster, W., Lindemann, A., Horn, S., Mertelsmann, R., Herrmann, F.: Tumor necrosis factor (TNF)-alpha but not TNF-beta induces secretion of colony stimulating factor for macrophages

Literatur

(CSF-1) by human monocytes. *Blood* 70, 1987, 1700-1703

Pfizermaier,K., Scheurich,P., Schluter,C., Kronke,M.: Tumor necrosis factor enhances HLA ABC and HLA DR gene expression in human tumor cells. *J.Immunol.* 138, 1987, 975-980

Pober,J.S. Gimbrone,M.A., Jr., Lapierre,L.A., Mendrick,D.L., Fiers,W., Rothlein,R., Springer,T.A.: Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J.Immunol.* 137, 1986, 1893-1896

Pober,J.S.: Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. In: Bock,G. (Hrsg.): Tumour necrosis factor and related cytokines. Ciba Foundation Symposium, Januar 1987, Chichester: John Wiley, 1987, 170-184

Ponka,A.: Asthma and low level air pollution in Helsinki. *Arch.Environ.Health* 46, 1991, 262-270

Prior,C., Knight,R.A., Herold,M., Ott,G., Spiteri,M.A.: Pulmonary sarcoidosis: patterns of cytokine release in vitro. *Eur.Respir.J.* 9, 1996, 47-53

Pryor,W.A., Dooley,M.M., Church,D.F.: Mechanism for the reaction of ozone with biological molecules, the source of the toxic effects of ozone. In: *The Biological Effects of Ozone and Photochemical Oxidants*. Princeton: Princeton Scientific Publishers, 1983, 7-19

Rennard,S.I., Hunninghake,G.W., Bitterman,P.B., Crystal,R.B.: Production of fibronectin by human alveolar macrophages: mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78, 1981, 7147-7151

Reynolds,H.Y., Newball,H.H.: Analysis of proteins and respiratory cells from human lungs by bronchial lavage. *J.Lab.Clin.Med.* 84, 1974, 559-573

Reynolds,H.Y., Fulmer,J.D., Kazmierowski,J.A., Roberts,W.C., Frank,M.M., Crystal,R.G.: Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J.Clin.Invest.* 59, 1977, 165-175

Reynolds,H.Y.: Bronchoalveolar lavage (state of art). *Am.Rev.Respir.Dis.* 135, 1987, 250-263

Rietschel,E.Th., Brade,L., Schade,F.U., Seydel,U., Zähringer,U., Mamat,U., Schmidt,G., Ulmer,A.-J., Loppnow,H., Flad,H.-D., di Padova,F., Schreier,M.H., Brade,H.: Bakterielle Endotoxine: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung. *Immun.Infekt.* 21, 1993, 26-35

Robinson,B.W.S., McLemore,T.L., Crystal,R.G.: Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J.Clin.Invest.* 75, 1985, 1488-1495

- Schollmeier,K.: Immunologic and pathophysiologic role of tumor necrosis factor. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 3, 1990, 11-12
- Schwartz,J.: Air Pollution and Hospital Admissions for the Elderly in Detroit, Michigan. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 150, 1994, 648-655
- Schweisfurth,H.: Umweltschadstoff Ozon. *Dtsch.med.Wschr.* 119, 1994, 351-355
- Seal,E., McDonnell,W.F., House,D.E., Salaam,S.A., Dewitt,P.J., Butler,S.O., Green,J., Raggio,L.: The pulmonary response of white and black adults to six concentrations of ozone. *Am.Rev.Respir.Dis.* 147, 1993, 804-810
- Sibille,Y., Reynolds,H.Y.: Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils in Lung Defense and Injury (State of the Art). *Am.Rev.Respir.Dis.* 141, 1990, 471-501
- Smith,K.A.: Interleukin 2. *Annu.Rev.Immunol.* 2, 1984, 319-333
- Springer,T.A.: Adhesion receptors of the immune system. *Nature (London)* 346, 1990, 425-434
- Striz,I., Zheng,L., Wang,Y.M., Pokorna,H., Bauer,P.C., Costabel,U.: Soluble CD14 is increased in bronchoalveolar lavage of active sarcoidosis and correlated with alveolar macrophage membrane-bound CD14. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 151, 1995, 544-547
- Strumpf,I.J., Feld,M.K., Cornelius,M., Keogh,B.A., Crystal,R.G.: Safety of fiberoptic bronchoalveolar lavage in evaluation of interstitial lung disease. *Chest* 80, 1981, 268-271
- Sweet,F., Kao,M.-S., Lee,S.-C.D., Hagar,W.L., Sweet,W.E.: Ozone Selectively Inhibits Growth of Human Cancer Cells. *Science* 209, 1980, 931-933
- Thurston,G.D., Ito,K., Kinney,P.L., Lippmann,M.: A multi-year study of air pollution and respiratory hospital admissions in three New York State metropolitan areas: results for 1988 and 1989 summers. *J.Exp.Anal.Care Environ.Epidemiol.* 2, 1992, 429-450
- Ultman,J.S., Hu,S.-C., Ben-Jebria,A.: Ozone distribution in human lungs - effect of respiratory airflow (abstract). *Am.Rev.Respir.Dis.* 145, 1992, A802
- Uppu,R.M., Cueto,R., Squadrito,G.L., Pryor,W.A.: What Does Ozone React with at the Air/Lung Interface? Model Studies Using Human Red Blood Cell Membranes. *Arch.Biochem.Biophys.* 319, 1995, 257-266
- VDI Kommission Reinhaltung der Luft: Maximale Immissions-Konzentrationen für Ozon (und photochemische Oxidantien). In: *VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft*. Band 1, 1987
- Vedal,S.: Outdoor air pollution and obstructive lung disease. *Eur.Respir.Rev.* 5, 1995, 323-326
- Voisin,C., Aerts,E., Jakubczak,E., Tonnel,A.B.: La culture cellulaire en phase gazeuse.

Literatur

Bull.Eur.Physiopathol.Respir. 13, 1977, 69-82

Wagner,H.M.: Anthropogenes Ozon («Sommersmog»). Entstehung, Vorkommen und gesundheitliches Risiko. Wissenschaft und Umwelt 1-2, 1991, 188-189

Wagner,M.: Anorganische Gase: Ozon. In: Wichmann,H.-E., Schlippköter,H.-W., Füllgraff,G. (Hrsg.): Handbuch der Umweltmedizin. Landsberg / Lech: ecomed Fachverlag, 1992, VI-1

Wesselius,L.J., Catanzaro,A., Wasserman,S.I.: Neutrophil chemotactic activity generation by alveolar macrophages after bleomycin injury. Am.Rev.Respir.Dis. 129, 1984, 485-490

Xing,Z., Jordana,M., Kirpalani,H., Driscoll,K.E., Schall,T.J., Gauldie,J.: Cytokine Expression by Neutrophils and Macrophages In Vivo: Endotoxin Induces Tumor Necrosis Factor- α , Macrophage Inflammatory Protein-2, Interleukin-1 β , and Interleukin-6 but Not RANTES or Transforming Growth Factor- β_1 mRNA Expression in Acute Lung Inflammation. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 10, 1994, 148-153

Zwick,H., Popp,W., Wagner,C., Reiser,K., Schmoger,J., Bock,A., Herkner,K., Radunsky,K.: Effects of ozone on the respiratory health, allergic sensitization, and cellular immune system in children. Am.Rev.Respir.Dis. 144, 1991, 1075-1079