

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Gesundheitseffekte durch inhalierbare Feinststäube aus technischen  
Verbrennungsanlagen: *In vitro* Untersuchungen zur Wirkung feiner und  
ultrafeiner Partikel auf kultivierte Lungenzellen**

von

S. Diabaté, R. Günther, K. Völkel, D. Thiele und R. Wottrich

Forschungszentrum Karlsruhe

Förderkennzeichen BWB 20013

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des  
Landes Baden-Württemberg gefördert

November 2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
1.1. HINTERGRUND .....	5
1.2. STAND DES WISSENS .....	5
<i>Welche Partikeleigenschaften verursachen die Gesundheitseffekte?</i> .....	5
<i>Woher kommen die Partikel?</i> .....	6
<i>Wie wirken die Partikel auf Zellebene?</i> .....	7
<i>Welche Zelltypen sind betroffen?</i> .....	7
<i>Welche Mechanismen spielen sich im Zellinneren ab?</i> .....	8
1.3. ZIELE .....	12
1.4. LÖSUNGSKONZEPT .....	12
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
2.1 ZELLEN .....	14
2.2 PARTIKEL .....	14
2.3. HERSTELLUNG VON FLUGSTAUBAEROSOL .....	15
2.4. HERSTELLUNG VERSCHIEDENER GRÖßENFRAKTIONEN VON FLUGSTAUBAEROSOL .....	15
2.5. EXPOSITION VON ZELLEN AN DER LUFT-FLÜSSIGKEITS-GRENZSCHICHT .....	16
2.6. VITALITÄTSTESTS .....	16
2.7. NITRITMESSUNG .....	16
2.8. ZYTOKINMESSUNG .....	16
2.9. EXPRESSION VON CD14 .....	16
2.10. EXPRESSION VON ICAM-1 .....	17
2.11. BESTIMMUNG VON ROS .....	17
2.11. MIKROSKOPIE .....	17
2.12 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	17
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>18</b>
3.1 CHARAKTERISIERUNG DER PARTIKEL .....	18
3.2 AUFNAHME VON ULTRAFEINEN PARTIKELN IN ZELLEN .....	19
3.3 EINFLUSS VON PARTIKELN AUF DIE VITALITÄT VON ZELLEN .....	20
3.4 EINFLUSS VON PARTIKELN AUF DIE BILDUNG VON PRO-INFLAMMATORISCHEN MEDIATOREN .....	22
3.4.1 <i>Zytokine</i> .....	22
3.4.2 <i>Nitrit</i> .....	24
3.4.3 <i>Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies</i> .....	25
3.4.4 <i>ICAM-1</i> .....	28
3.5. KOKULTURVERSUCHE MIT HUMANEN ZELLEN .....	29
3.6. KOKULTURVERSUCHE MIT RATTENZELLEN .....	30
3.7. BIOLOGISCHE EFFEKTE VERSCHIEDENER FLUGASCHE-GRÖßENKLASSEN .....	33
3.8 EXPOSITIONEN AN DER LUFT-FLÜSSIGKEITS-GRENZSCHICHT .....	34
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>40</b>
<b>5. DANKSAGUNG</b> .....	<b>47</b>
<b>6. LITERATUR</b> .....	<b>48</b>

## Zusammenfassung

Verbrennungsaerosole enthalten feine und ultrafeine Partikel in hoher Zahl und mit einer großen Oberfläche. Sie sind Bestandteile des Umweltaerosols und tragen damit zu Gesundheitsschäden bei erhöhten Schwebstaubkonzentrationen bei. In dieser Studie diente Flugstaub aus Hausmüllverbrennungsanlagen als Modell für realistische Stäube, um zu untersuchen, welche Partikelgrößenfraktionen und welche chemischen Bestandteile zu den toxischen Wirkungen beitragen.

Die Flugstäube als auch synthetische Modellpartikel wurden durch *in vitro* Toxizitätstests mit Zelllinien aus der Lunge von Mensch und Ratte in Submerskultur untersucht. Für Flugaschepartikel  $>1 \mu\text{m}$  konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität und die IL-8-Freisetzung mit zunehmender Partikelgröße abnahm. Darüber hinaus war die unlösliche Fraktion der Flugstäube toxischer als die wasserlösliche Fraktion. Makrophagen, die gleichzeitig mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Epithelzellen, die gleichzeitig mit dem Zytokin TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, reagierten deutlich stärker auf die Partikelexposition mit der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Auch die TNF- $\alpha$ -induzierte ICAM-1-Expression in BEAS-2B-Epithelzellen wurde durch Flugasche verstärkt. Die Flugstäube induzierten intrazellulären oxidativen Stress (ROS) nicht nur in NR8383-Makrophagen, sondern auch in RLE-6TN-, BEAS-2B- und A549-Epithelzellen in Abhängigkeit von der Dosis. Diese Wirkung konnte durch Vorbehandlung der Partikel mit Desferrioxamin reduziert werden. Vorbehandlung der Zellen mit N-Acetylcystein hemmte die ROS-Bildung vollständig. In Kokultur-Experimenten wurden Makrophagen auf Epithelzellen ausgesät. Es konnte gezeigt werden, dass die Partikel-induzierten Reaktionen im Vergleich zu den jeweiligen Monokulturen synergistisch verstärkt wurden. Diese Zellsysteme sind somit als Testsystem für Experimente mit Aerosol geeignet, bei denen mit niedrigen Partikeldosen zu rechnen ist.

Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass erhöhte Schwebstaubkonzentrationen bei Risikopersonen zu einer Verschlimmerung der bestehenden Erkrankung führen, indem das empfindliche Netz der Abwehrreaktionen gestört wird.

Die Exposition von Zellen an der Luft/Flüssigkeits-Grenzschicht im CULTEX-Expositionssystem wurden gemeinsam mit dem Institut für Technische Chemie – Thermische Abfallbehandlung am Forschungszentrums Karlsruhe durchgeführt. In diesem Institut wurde Flugstaub-Aerosol in einem Aerosolreaktor generiert und in das Expositionssystem dosiert. Die Versuche mit der humanen Lungenepithelzelllinie BEAS-2B haben ergeben, dass bei geeignetem Volumenstrom keine Beeinträchtigung der Vitalität und der Zellfunktion erfolgt und die Gesamtprozedur somit einschließlich des Transports für die Zellen verträglich ist. Die Expositionstechnik ist damit prinzipiell geeignet für die Exposition von Zellen an der Luft/Flüssigkeits-Grenzschicht.

## Abstract

Aerosols from combustion processes contain high numbers of fine and ultrafine particles with a large surface area. They are constituents of ambient particulate matter (PM), which contribute to adverse health effects at elevated concentrations. In this study, fly ash from municipal waste incinerators was used as a model for realistic types of dust to examine which size fractions and chemical components contribute to the adverse effects.

Fly ash and synthetic model particles were studied by *in vitro* toxicity tests with cell lines from the lung of human and rats in submersed culture. For fly ash particles  $> 1 \mu\text{m}$  it was shown that cytotoxicity and IL-8-Production decreased with increasing particle size. The insoluble fraction of the fly ash was more toxic than the water soluble fraction. Macrophages

exposed to particles and stimulated simultaneously with lipopolysaccharide (LPS) and epithelial cells stimulated simultaneously with TNF- $\alpha$  showed a significant enhanced release of pro-inflammatory Zytokines. The TNF- $\alpha$ -induced expression of the intercellular adhesion protein-1 (ICAM-1) was also increased by fly ash. All fly ashes induced intracellular oxidative stress (ROS) not only in macrophages but also in the epithelial cells RLE-6TN, BEAS-2B and A549 in dependence of dose and could be reduced by pre-treatment of the particles with desferrioxamine. Pre-treatment of the cells with N-acetylcysteine completely inhibited the formation of ROS. In co-culture experiments, macrophages were seeded on epithelial layers. It was shown that particle-induced reactions were synergistically enhanced in comparison to the mono-cultures of the respective cell type. These cellular systems could therefore serve as appropriate test systems for the exposure to aerosol, where low particle doses are expected.

The results support the hypothesis that enhanced particle concentrations course aggravation of existing diseases in susceptible persons by irritating the sensitive network of defence reactions.

The exposure of cells at the air-liquid barrier using the CULTEX-system was performed in co-operation with the Institute of Technical Chemistry – Thermal Waste Treatment of the Research Centre Karlsruhe. In this institute, a fly ash aerosol was generated in an aerosol reactor and drawn through the exposure system. The experiments with BEAS-2B cells showed that the cells survived at appropriate flow rate. The whole procedure including transport had no effects on viability or function of the epithelial cells. The results demonstrate the principal usefulness of this exposure technique.

## 1. Einleitung

### 1.1. Hintergrund

In unserer Atemluft befinden sich feinste Partikel, die bei erhöhten Konzentrationen ein gesundheitliches Risiko darstellen. Die Assoziation der Partikelkonzentration mit einer erhöhten Inzidenz von Atemwegserkrankungen (Asthma, Bronchitis), von Herz-Kreislauf-erkrankungen, sowie von erhöhter Mortalität insbesondere bei sehr jungen, älteren und bereits erkrankten Menschen, wurde übereinstimmend in zahlreichen epidemiologischen Studien nachgewiesen (Samet et al., 2000; Wichmann et al., 2000). Obwohl seit einigen Jahren intensive Untersuchungen zu den verursachenden Aerosoleigenschaften als auch zu den biologischen Mechanismen der Partikelwirkungen durchgeführt werden, gibt es noch keine einheitlichen Meinungen über die Ursachen und Mechanismen, da die Umweltpartikel sehr komplex sind und zeitlich und räumlich stark variieren können.

### 1.2. Stand des Wissens

Die Inhalation von feinen und ultrafeinen Partikeln induziert in Menschen (Salvi et al., 1999; Salvi et al., 2000) und Tieren (Oberdörster, 2001) eine intensive inflammatorische Antwort, die charakterisiert ist durch die Produktion von pro-inflammatorischen Molekülen (Zytokine) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) sowie durch Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in die Alveoli. Die Phagozytose dieser Partikel durch die Entzündungszellen und ihre Aktivierung, die mit der Freisetzung von ROS und von lysosomalen Enzymen verbunden ist, kann das Lungenepithel schädigen. Dadurch kann die Fähigkeit zur Abwehr von Krankheitserregern beeinträchtigt werden.

### Welche Partikeleigenschaften verursachen die Gesundheitseffekte?

Gegenwärtig werden folgende physikalische und chemische Eigenschaften des Aerosols als Ursachen diskutiert:

- Säuregehalt (Review: Schlesinger, 1999): Saure Aerosole haben nur minimale Effekte auf die Lungenfunktion von gesunden Personen bis zu  $2 \text{ mg/m}^3$ , bei Asthmatikern jedoch bereits ab ca.  $70 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ . Chronische Exposition von Tieren gegenüber sauren Aerosolen führte zu Veränderungen der Morphologie der Luftwege. Die beobachteten epidemiologischen Effekte scheinen nicht durch saure Aerosole ausgelöst zu werden, jedoch könnten sie die Toxizität von anderen Partikelkomponenten beeinflussen.
- Partikelgröße, Oberfläche und Anzahl: Die Größe, Oberfläche und Anzahl der Partikel sind voneinander abhängige physikalische Eigenschaften. Diese Parameter beeinflussen die Deposition in der Lunge, die Persistenz und die Toxizität der Partikel. *In vivo* Experimente mit synthetischen unlöslichen Partikeln wie z.B. Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) oder elementarem Kohlenstoff (Carbon Black) haben gezeigt, dass bei gleicher Massenkonzentration die ultrafeinen Partikel ( $< 100 \text{ nm}$ ) stärker wirken als die feinen Partikel ( $200 - 400 \text{ nm}$ ) in Bezug auf akute und persistente Entzündungen in Rattenlungen (Li et al., 1999; Oberdörster, 2001; Oberdorster et al., 1994; Oberdörster et al., 1994). In epidemiologischen Studien im Raum Erfurt (Wichmann et al., 2000) konnte auch eine statistische Korrelation zwischen Mortalität und Konzentration der ultrafeinen Partikel beobachtet werden. Die Wirkungen traten vor allem in suszeptiblen Individuen auf, die aufgrund ihrer genetischen Disposition, ihres Alters oder durch bestehende Erkrankungen zu einer Risikogruppe gehören.
- Organische Bestandteile: Polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe z.B. Phenanthren werden in Dieselrußpartikeln (diesel exhaust particles, DEP) gefunden und sind u.a. für

genotoxische Effekte verantwortlich (Boland et al., 1999; Diaz-Sanchez et al., 1994; Li et al., 2002). Dieselrußpartikel sind Hauptbestandteile der feinen und ultrafeinen Fraktion von Umweltstäuben und dienen somit als Vehikel für organische Verbindungen in die tiefen Lungenbereiche (Heinrich et al. 1999).

- Anorganische Bestandteile: Sulfate, Nitrate, Ammonium und Metalle machen einen großen Teil der Umweltstäube aus. Metalle stammen vor allem aus stationären Verbrennungsanlagen. Studien von (Pritchard et al., 1996) zeigten eine statistische Korrelation zwischen Metallgehalt von Flugaschen aus der Kohle- (CFA = coal fly ash) und Ölverbrennung (ROFA = residual oil fly ash) sowie in PM (particulate matter) und akuten Lungenentzündungen. Diese Effekte wurden durch den bioverfügbaren Metallgehalt ausgelöst (Dreher et al., 1997). Viele Studien zeigten auch, dass Desferrioxamin (DFO), ein Metallchelator mit besonders hoher Stabilitätskonstante für Eisen-III-Ionen von  $10^{31}$ , eine Reihe dieser biologischen Wirkungen reduziert. Diese Untersuchungen belegen, dass an Partikel gebundene Metalle und insbesondere Eisen, zumindest teilweise für die biologischen Wirkungen verantwortlich sind (Goldsmith et al., 1998; Smith et al., 2000; Smith et al., 1998). Studien in Los Angeles zeigten, dass Eisen das häufigste Übergangsmetall in Umweltpartikeln ist (Hughes et al., 1998). Der Metallanteil im Umweltaerosol scheint bei der Auslösung von PM-induzierten Effekten eine wichtige Rolle zu spielen, wie in einer Studie, die experimentelle und epidemiologische Versuchsansätze kombinierte, gezeigt wurde (Ghio et al., 2000). Partikel, die im Utah-Valley zu verschiedenen Zeiten gesammelt wurden, wurden resuspendiert und in den Atemtrakt von gesunden Menschen instilliert. Partikel, die während der Betriebsphase eines lokalen Stahlwerks gesammelt wurden und einen hohen Metallgehalt (v.a. Fe, Cu, Zn, Pb, Ni) aufwiesen, induzierten eine stärkere inflammatorische Antwort als Partikel, die während der Stilllegungsphase des Stahlwerks gesammelt wurden und weniger Metalle enthielten.
- Biologische Agenzien: PM<sub>10</sub> enthält Bioaerosole (Bakterien, Viren, Pollen, Pilzsporen oder Bruchstücke wie Endotoxin), die sich auch an anorganische Partikel anlagern können. Ihr Anteil schwankt saisonell und ihr Beitrag zu erhöhter Mortalität und Morbidität ist nur bei berufsbedingter Exposition (Farmer's disease) erwiesen. Möglicherweise reichen schon niedrige Konzentrationen, um Personen mit schwerem Asthma oder COPD (chronic obstructive pulmonary disease) zu schaden. Urbane Schwebstäube enthalten Endotoxin und *in vitro* Studien mit humanen und Ratten-Alveolarmakrophagen zeigten, dass PM die Expression von proinflammatorischen Zytokine stimulieren, und zwar zum Teil durch ihren Anteil an Endotoxin (Monn & Becker, 1999). Endotoxin-stimulierte Makrophagen verstärken die Ausschüttung von Zytokinen, wenn sie zusätzlich mit PM (Imrich et al., 1999) oder Flugasche (Diabaté et al., 2002) behandelt werden.

Dagegen fanden Dreher et al. (1997) in Studien mit gesunden Ratten, Mäusen und Meerschweinchen jedoch keine Hinweis auf einen Beitrag von Endotoxin in PM.

In welchem Ausmaß die verschiedenen Parameter in Umweltstäuben zu den Gesundheitseffekten beiträgt, ist größtenteils unbekannt.

### Woher kommen die Partikel?

Anthropogene Komponenten von Umweltstäuben stammen vor allem aus Verbrennungsprozessen in Verkehr und Industrie, wobei primäre UFP durch Gas-zu-Partikel Umwandlung oder bei unvollständigen Verbrennungen gebildet werden. Verkehrsbedingte Partikelemissionen stammen vor allem aus der Dieselmotorenverbrennung (Boland et al., 1999), wobei vermehrt Rückhaltemaßnahmen getroffen werden. Die industriellen Emissionen

stammen v.a. aus der Kohle- (Smith et al., 2000; Smith et al., 1998; van Maanen et al., 1999) und Ölverbrennung (Veronesi et al., 1999) mit zum Teil aufwendigen Rückhaltemaßnahmen, allerdings nicht für ultrafeine Partikel.

Industrielle Müllverbrennungsanlagen sind vom technischen Verbrennungsprozess sowie von den Maßnahmen zur Rauchgasreinigung her gesehen ähnlich wie Kohleverbrennungsanlagen und die Elementzusammensetzung der Flugasche ist ähnlich. Flugasche ist die generelle Bezeichnung für alle Feinstäube, die in Rückhalteeinrichtungen von Verbrennungsanlagen nach der Brennkammer und vor Zugabe von Sorptionsmaterialien gesammelt werden (Chandler et al., 1997). Ihre Zusammensetzung hängt ab von Brenngut, Brenntyp, Betriebsbedingungen und Rückhaltesystemen (Elektrofilter, Gewebefilter). Die häufigsten Elemente in der von uns verwendeten Flugasche sind Al, Ca, K, Na, Si, die als Oxide, Chloride, Sulfate und Aluminosilikate vorliegen. In geringeren Mengen kommen Cu, Fe, Pb, Ti und Zn vor, sowie Spuren von Ag, Ba, Cd, Cr, Ga, Hg, Mn, Mo, Ni, Rb, Sb, Se, Sr, V, W u.a. Der C-Gehalt liegt mit 1% (w/w) sehr niedrig; dementsprechend kommen organische Verbindungen wie Dioxine und Furane nur in Spuren vor. Die bei Verbrennungstemperaturen flüchtigen Metalle Pb, Cd und Zn sowie organische Verbindungen werden in der Abkühlphase auf der Oberfläche der Aluminosilikatkerne kondensiert. Dabei werden beträchtliche Mengen vor allem auf den kleineren Flugaschepartikeln abgelagert, da diese ein größeres Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis als die größeren Partikel haben (Fisher et al., 1983).

### **Wie wirken die Partikel auf Zellebene?**

Für anthropogene Stäube aus Verbrennungsprozessen gibt es noch keinen Beweis für einen biologischen Mechanismus, der verantwortlich für erhöhte Mortalität und Morbidität sein könnte. Akute Lungenschäden nach Exposition mit mineralischen Oxiden werden einerseits durch die Freisetzung von toxischen Substanzen aus Zellen, die durch Partikel geschädigt sind (Zytotoxizität), und andererseits durch Freisetzung von Mediatoren aus aktivierten Makrophagen und Epithelzellen, die inflammatorische und fibrotische Prozesse initiieren und koordinieren, ausgelöst. Als Ursache für die zytotoxische Wirkung verbunden mit Membranolyse wird die Oberfläche und das elektrokinetische Potential von Partikeln diskutiert (Devlin et al., 2000). So findet man auf der Oberfläche von Quarzpartikeln reaktive Siloxanbrücken (Si-O-Si) und Silanole (SiOH). Im wässrigen Milieu adsorbieren die Partikel über negative Ladungen ihrer Oberfläche an Oberflächenproteine von Zellen. Durch kommt es zur Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen, die Proteinkonformation wird irreversibel verändert, und es kommt zur Lyse der Membran.

Durch Coating von Partikeln mit positiv geladenen organischen Molekülen wie Dipalmitoyllecithin, Proteinen, Immunglobulinen oder Surfactant kann die negative Oberflächenladung *in vitro* und damit auch die zytotoxische Wirkung reduziert werden. Quarzpartikel, die mit Aluminiumlaktat behandelt und in Rattenlungen instilliert wurden, waren im Vergleich zu unbehandelten Quarzpartikeln deutlich weniger zytotoxisch auf die Epithelzellen. Die Einwanderung von Entzündungszellen, die Expression des Chemokins MIP-2 sowie die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Zellen der BAL (Bronchoalveolarlavage) waren ebenfalls reduziert (Duffin et al., 2001).

### **Welche Zelltypen sind betroffen?**

Nach der Deposition der Partikel auf der Lungenoberfläche sind zwei Zelltypen direkt betroffen: Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelzellen (Abb. 1). Phagozytose von Partikeln ist eine der Hauptaufgaben der Makrophagen, jedoch auch Epithelzellen sind in der Lage, Partikel aufzunehmen, besonders ultrafeine Partikel. Ob diese Partikel durch das intakte Epithel auch zu anderen Zelltypen (interstitielle Makrophagen und Fibroblasten, Endothelzellen) gelangen, wird derzeit erforscht.

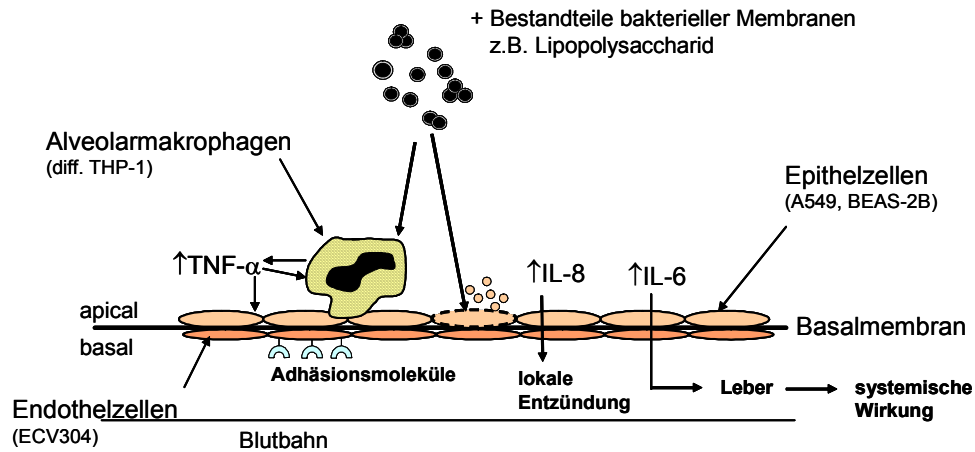


Abb. 1: Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht in der Lunge bei der Exposition mit Partikeln und LPS und Freisetzung von Entzündungsmediatoren. In Klammern sind mögliche Zellmodelle für die entsprechenden Zelltypen in einem humanen System angegeben.

Bei *in vitro* Toxizitätsstudien wird meist nur ein Zelltyp exponiert, obwohl bekannt ist, dass Epithelzellen und Makrophagen zusammen die biologische Antwort koordinieren. Die Bedeutung der Interaktion zwischen Makrophagen und Epithelzellen wird in Studien deutlich, in denen gezeigt wurde, dass z.B. in humanen Kokulturen aus BEAS-2B-Epithelzellen und Monozyten durch Rußexposition eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und der Zytokinproduktion induziert werden konnte (Drumm et al., 2000; Drumm et al., 1999). Bei Verwendung von A549-Zellen (Alveolarepithelzelllinie) und Mono Mac 6-Makrophagen in Kokultur wurde eine erhöhte Produktion von IL-6 und IL-8 beobachtet (Wottrich et al., 2004).

Auch in einem Kokultursystem aus primären Alveolarmakrophagen und einer Alveolarepithelzelllinie aus der Ratte (RLE-6TN) wurde gezeigt, dass die Freisetzung von Zytokinen (MIP-2, TNF- $\alpha$ ) nach Partikelexposition (TiO<sub>2</sub>, Quarz) synergistisch erhöht war (Tao and Kobzik, 2002). Dieser Effekt wurde nicht beobachtet, wenn die Zellen physikalisch durch eine poröse Membran getrennt waren, sondern nur, wenn sie direkten Kontakt hatten. Ähnliche Resultate wurden mit einer Alveolarmakrophagen-Zelllinie (NR8383) und RLE-6TN-Zellen nach Exposition mit Flugasche erhalten (Diabaté et al., 2004). Durch Zusammenführung dieser beiden Zelltypen *in vitro* könnte somit ein besseres Modell für die tatsächlichen Verhältnisse in der Lunge geschaffen werden.

## Welche Mechanismen spielen sich im Zellinneren ab?

Alveolarmakrophagen erkennen fremde Partikel über unspezifische Rezeptoren, nehmen sie ins Zellinnere auf, bauen sie ab und setzen pro-inflammatorische Zytokine (IL-8/MIP-2, TNF- $\alpha$ , IL-6), reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) und Lipide frei, die eine Entzündungsreaktion initiieren (Abb. 1). Die gleichen Erkennungsmechanismen gelten auch für körpereigene gealterte oder entartete Zellen, es wird jedoch keine Entzündungsreaktion ausgelöst. Die freigesetzten Mediatoren sind sehr empfindlich aufeinander abgestimmt. Sie helfen einerseits, dass Mikroorganismen beseitigt werden und dass durch die Entzündungsreaktion beschädigtes Gewebe wieder repariert wird, andererseits kann bei Überproduktion von Mediatoren auch gesundes Gewebe beschädigt werden.

## Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (ROS/RNS)

Aerobe Organismen, die ihre Energie aus der Reduktion von Sauerstoff gewinnen, bilden ständig auch geringe Mengen an Superoxidationradikalen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



oder hoch reaktiven Hydroxylradikalen ( $\cdot\text{OH}$ ), insbesondere durch das Elektronentransportsystem der Mitochondrien. ROS entstehen auch durch Aktivierung der NADPH-Oxidase oder durch chemische Katalyse mit Eisen oder anderen Übergangsmetallen (Abb. 2).

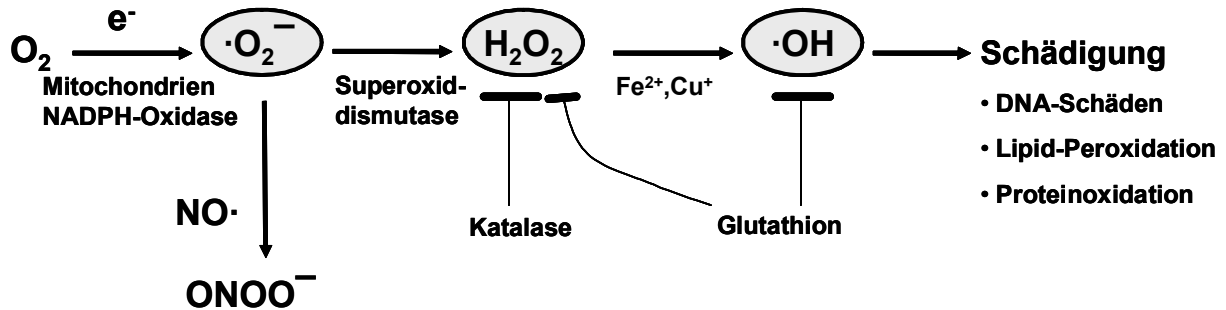


Abb. 2: Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies.

Gegen diese potentiell schädlichen Substanzen wurden in der Evolution Schutzmechanismen entwickelt, die ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen aufrechterhalten. Wenn dieses Gleichgewicht gestört ist oder die antioxidativen Mechanismen eingeschränkt sind, spricht man vom "oxidativen Stress". Das Übermaß an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (ROS/RNS) kann zu Schäden an Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren führen und dadurch die Zelle irreversibel schädigen oder sie in ihrer Funktion beeinträchtigen.

Die Ursachen von oxidativem Stress können externe Faktoren sein, wie z.B. Zigarettenrauch, oder endogene Faktoren, wie Entzündungsprozesse, bei denen Makrophagen und neutrophile Granulozyten durch Phagozytose aktiviert wurden und zusätzlich ROS produzieren (oxidativer Burst). Oxidativer Stress spielt eine Rolle bei einer Reihe von Erkrankungen wie z.B. Asthma, chronisch obstruktiver Bronchitis (COPD) oder Arteriosclerose.

Reaktiven Stickstoffspezies (RNS) spielen bei vielen Erkrankungen, insbesondere in der Lunge, eine wichtige Rolle (Kröncke et al., 1998; Kröncke et al., 2001; Nevin and Broadley, 2002). Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\cdot$ ) wird bei der Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin, die durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert wird, gebildet. Es gibt drei Isoenzyme der NO-Synthase; zwei davon werden konstitutiv exprimiert (eNOS – endotheliale NOS und nNOS – neuronale NOS) und eine ist induzierbar (iNOS). Während die eNOS und die nNOS durch Calcium/Calmodulin reguliert ständig eine niedrige NO-Konzentration aufrechterhalten, ist die iNOS bereits bei niedrigen Ca-Konzentrationen aktiv und produziert große Mengen NO in Abhängigkeit von der Substratkonzentration des L-Arginins. Niedrige NO-Konzentrationen stimulieren die lösliche Guanylatzyklase (sGC) zur Bildung von cGMP, ein physiologischer Messenger, der z.B. eine wichtige Rolle bei der Regulation des Muskeltonus in den Atemwegen spielt (Oury et al., 1996). Hohe NO-Konzentrationen werden nach Induktion der iNOS durch Entzündung-auslösende Substanzen, z.B. LPS (Lipopolysaccharid), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und weitere Zytokine, vor allem in Monozyten und Makrophagen, aber auch in Epithelzellen und neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, gebildet. Während sich die iNOS in Maus- und Rattenzellen über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa\text{B}$  leicht induzieren lässt, ist die iNOS-Induktion bei humanen Zellen weniger erfolgreich. Im humanen System ist für Transkription des iNOS-Gens zusätzlich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-1 durch IFN- $\gamma$  notwendig (Donnelly & Barnes, 2002).

NO in hohen Konzentrationen dient dem Immunsystem als zytotoxisches Agens, z.B. bei der Infektabwehr. NO reagiert selektiv mit Molekülen, die SH-Gruppen tragen, welche über eine Nitrosylierung zu S-NO weiter zu S-S-Gruppen oxidiert werden. So können Enzyme, die SH-Gruppen für ihre Aktivität benötigen, durch NO gehemmt werden. Diese und andere Reaktionen des NO führen in der Zelle zu nitrosativem Stress (Kröncke, 2003). Oxidativer und nitrosativer Stress können gleichzeitig auftreten, was zu schweren Zellschäden führen kann, besonders durch die Wirkung des reaktiven Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>). Peroxynitrit wird mit einer extrem hohen Reaktionskonstanten von  $10^9 \text{ M}^{-1}/\text{sec}^{-1}$  aus NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup> gebildet (Oury et al., 1996) und kann z.B. mit Tyrosinresten unter Bildung von Nitrotyrosin reagieren.

ROS und RNS sind von zentraler Bedeutung für pathophysiologische Mechanismen bei zahlreichen inflammatorischen Gewebeschädigungen, wie z.B. chronischen entzündlichen Erkrankungen der Lunge. Wenn das körpereigene Antioxidanzsystem keinen adäquaten Schutz bietet, führen ROS und RNS zu Zellschäden, indem sie DNA-Strangbrüche induzieren, Proteine inaktivieren oder zu Lipidperoxidation führen. Andererseits wurde kürzlich demonstriert, dass ROS und RNS bei der Signaltransduktion einer Vielzahl physiologischer Zellantworten modulierend eingreifen (Forman et al., 2002). Die aktuellen Forschungen auf diesem Gebiet untersuchen, welche Komponenten der Signaltransduktion verändert werden und welche Rolle antioxidative Systeme spielen. Als sicherster Marker für oxidativen Stress gilt die Hochregulierung von antioxidativen Enzymen, wie z.B. Superoxiddismutase (SOD), oder von nicht-enzymatischen Antioxidantien, wie z.B. Glutathion.

### Zytokine und Adhäsionsmoleküle

Partikel-induzierte oxidative Prozesse in der Zelle können zur Auslösung einer inflammatorischen Antwort beitragen, die von einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und der Expression bestimmter Oberflächenproteine begleitet wird. Deshalb wurde der Einfluss der Flugasche auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1 oder CD54) in Epithelzellen, sowie die Induktion von Zytokinen in humanen (IL-6, IL-8) und Ratten-Zellsystemen (MIP-2, TNF- $\alpha$ ) untersucht. Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 tragen dazu bei, dass Immunzellen in entzündetes Gewebe rekrutiert werden, einschließlich der Wanderung von Immunzellen aus dem Blut durch das Lungeninterstitium in den Alveolarraum. ICAM-1 kann auf Endothelzellen, Fibroblasten, Typ I und Typ II Alveolarepithelzellen sowie auf Monozyten und Makrophagen exprimiert sein (Hubbard et al., 2001; Nario & Hubbard, 1997). Die Expression wird durch Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) oder LPS hochreguliert. ICAM-1 fungiert als Ligand der  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18), die beide auf neutrophilen Granulozyten exprimiert sind. ICAM-1 existiert auch als lösliches Molekül (sICAM-1), das im Blutserum zirkuliert. Die Serumkonzentration von sICAM-1 ist bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen wie septischem Schock erhöht.

Zytokine sind Protein-Mediatoren, die hauptsächlich von Zellen des Immunsystems gebildet werden. Die Rolle von Epithelzellen als Syntheseorte für Zytokine wurde lange unterschätzt, weil man glaubte, dass sie nur als passive Barriere zu betrachten sind. Heute weiß man, dass Epithelzellen auf Schädigungen, z.B. aus der Umwelt, auch mit der Freisetzung von Zytokinen reagieren (Stadnyk, 1994). Zytokine modulieren das Verhalten von Zellen in autokriner und/oder parakriner Weise und signalisieren ihnen, sich auf bestimmte physiologische Veränderungen einzustellen. Eine Gruppe von Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) wird als pro-inflammatorisch oder als endogene Pyrogene (fieber-induzierende Substanzen) bezeichnet. Sie werden nach Aktivierung von immunkompetenten Zellen durch bestimmte Alarmsignale induziert und in die Blutbahn freigesetzt. Diese Alarmsignale können entweder körperfremde (exogene Pyrogene, wie z.B. bakterielle Endo- und Exotoxine, Viren,

Medikamente) oder körpereigene Substanzen sein (z.B. DNA, RNA oder Hitzeschockproteine aus geschädigten Zellen, Interferon- $\gamma$ , das oft von virus-infizierten Zellen sezerniert wird, CD-40L, ein Oberflächenmolekül auf aktivierten Blutplättchen und aktivierten T-Zellen sowie Abbauprodukte von Hyaluron, die bei Schädigung von Blutgefäßen gebildet werden) (Matzinger, 2002).

Die pro-inflammatorischen Zytokine wirken entweder direkt oder über die Freisetzung von Prostaglandin  $E_2$  auf das Temperaturzentrum im Gehirn und führen zu Fieber. Die Blut-Hirn-Schranke können sie nicht passieren, sie induzieren jedoch eine Reihe von Neuropeptiden (Corticotropin-releasing-Hormon, Vasopressin,  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon), die ebenfalls auf das Temperaturzentrum im Gehirn wirken. IL-1 $\nu$  und IL-6 verstärken in der Leber die Syntheseleistung von Akut-Phase-Proteinen um ein Vielfaches als systemische Reaktion des Körpers auf Entzündung und Gewebeverletzung. Diese löslichen Faktoren wie Serum-Amyloid A, Fibrinogen, Komplementfaktoren oder C-reaktives Protein bewirken eine Steigerung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen, aktivieren das Komplementsystem, kontrollieren das Gerinnungssystem und unterstützen Prozesse der Wundheilung. Die Akut-Phase-Antwort ist charakterisiert durch Erhöhung der Leukozytenzahl, Fieber und erhöhte Gefäßdurchlässigkeit. IL-8, das zur Klasse der Chemokine gerechnet wird, wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und führt zur Einwanderung dieser Entzündungszellen in das betroffene Gewebe. MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) ist ein Chemokin der Ratte mit ähnlichen Eigenschaften wie die des humanen IL-8.

Bei überschießender Immunantwort, vor allem bei invasiven Infektionen, kann es zum septischen Schock kommen. Der Schockzustand ist charakterisiert durch hohe TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Blut, was eine sekundäre Zytokinkaskade auslöst. Das äußert sich in schlechter Gewebedurchblutung, hervorgerufen durch den abgesenkten Blutdruck. Wenn dieser Zustand nicht schnell genug behandelt wird, kann es zu schweren Gewebeschäden, Organversagen und Tod kommen. Chronische Entzündungen können ebenso schwerwiegende Folgen auslösen, wie z.B. fibrotische Veränderungen, genotoxische (Tumorbildung) sowie lungenzerstörende Prozesse (Emphysem).

Als Modell für eine entzündliche Veränderung werden Makrophagen sowie Kokulturen zusätzlich mit Lipopolysaccharid (LPS) exponiert. LPS wird bei der Vermehrung und beim Absterben von gram-negativen Bakterien freigesetzt. Im Körper bindet LPS an das Plasmaprotein LBP (LPS binding protein). Dieser Komplex bindet an den Makrophagen-Rezeptor CD14, was jedoch nicht ausreichend ist, um die Makrophagen-Aktivierung zu erklären, denn CD14 ist über Glycosylphosphoinositol in der Membran verankert, hat also keine intrazelluläre Domäne, um das Signal durch die Membran zu transduzieren. Vor einigen Jahren wurde gefunden, dass der LPS-LBP-CD14-Komplex an das Transmembranprotein TLR4 (Toll-like Rezeptor 4) bindet, was zur Induktion der intrazellulären Signalkaskade führt (Abb. 2) (Brightbill & Modlin, 2000; Poltorak et al., 1998). Dabei werden die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 aktiviert und verschiedene Gene u.a. für die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 sowie für Enzyme wie iNOS transkribiert (Abb. 3).

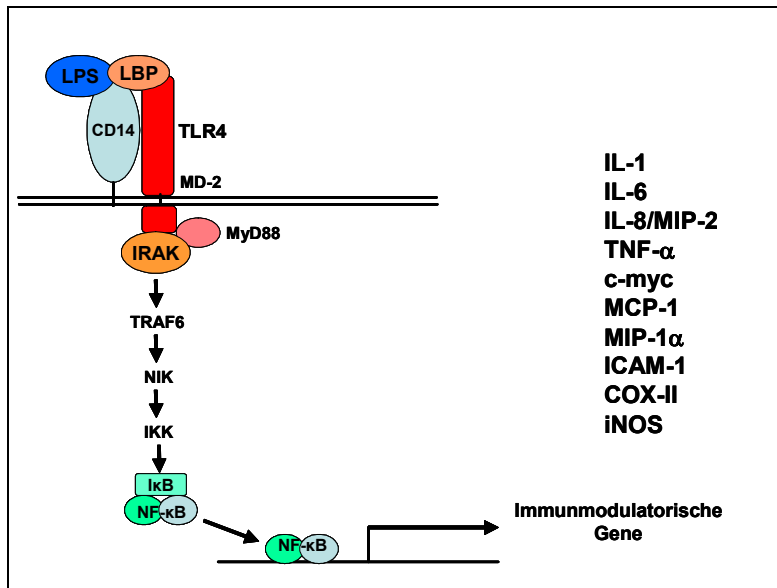


Abb. 3: Aktivierung des Toll-like Rezeptors 4 (TLR-4) durch bakterielles LPS und die anschließende Signaltransduktion (vereinfacht).

### 1.3. Ziele

Ziel der Arbeiten war es einerseits, durch *in vitro* Toxizitätstests in Submerskultur die wirksamen Komponenten in Flugasche (Partikelgrößenfraktionen und chemische Bestandteile) als Modell für umweltrelevante feine und ultrafeine Stäube zu charakterisieren und zu klären, welche zellulären und molekularen Mechanismen zur Auslösung der unerwünschten Gesundheitseffekte führen. Dabei wurde von der Arbeitshypothese "Je kleiner die Partikel, desto stärker die Wirkung" ausgegangen. Es sollte außerdem nach Parametern gesucht werden, die bereits bei niedrigen Partikelkonzentrationen ansprechen.

Darüber hinaus sollte durch Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht überprüft werden, ob diese Mechanismen auch im realitätsnahen System validiert werden können. Die Exposition von Targetzellen direkt mit Aerosol wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie – Thermische Abfallbehandlung (ITC-TAB) des Forschungszentrums Karlsruhe durchgeführt. Diese Arbeiten dienen zusätzlich dem Ziel, ein *in vitro* Standardverfahren zu entwickeln, um die inhalative Aufnahme von Feinstpartikeln mit einem lungenspezifischen Bioassay zu bewerten. Das Verfahren soll dahingehend standardisiert werden, dass in einem Screening die Gesundheitsrisiken durch Inhalation von Aerosolen aus verschiedenen Quellen eingeschätzt werden können.

### 1.4. Lösungskonzept

Für die Untersuchungen sollten Zelllinien eingesetzt werden, welche die verschiedene Targetzellen aus der Lunge repräsentieren: Epithelzellen der Bronchien oder der Alveolen, Endothelzellen und Alveolarmakrophagen. Es wurden Zellen menschlichen Ursprungs als auch Zellen aus der Ratte eingesetzt, um Vergleiche mit entsprechenden *in vivo* Versuchen zu ermöglichen.

Zur Untersuchung von Partikeln ist die Submerskultur zwar geeignet, muss jedoch kritisch betrachtet werden, da die physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel und die Zelloberflächen in der flüssigen Phase andere Eigenschaften aufweisen als in der Gasphase. Für Partikel, die nur in geringen Mengen vorlagen, wie die synthetischen Modellpartikel oder die nach Größenfraktionen aufgetrennten Flugstäube, war dies die einzige Möglichkeit. Ein realitätsnahes Modell für die *in vivo* Situation ist die Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeitskeits-Grenzschicht, die allerdings technisch sehr aufwendig ist und daher nur selten eingesetzt wird. Es muss ein definiertes Aerosol erzeugt werden, das in einer

geeigneten Weise über die Testzellen geleitet wird, und die Zellkulturen müssen durch geeignete Trägersysteme über den Testzeitraum funktionell lebensfähig erhalten werden. Bei dieser Methode ist die Erarbeitung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen meist schwierig, da die quantitative Bestimmung der Ablagerung von Partikeln aus der Gasphase auf die Zellen nur berechnet oder geschätzt werden kann.

Unter Verwendung des kommerziellen Expositionssystems CULTEX<sup>®</sup> (Aufderheide et al., 2002; Aufderheide et al., 2003; Aufderheide & Mohr, 2000) wurden zunächst gut charakterisierte Stäube aus der Müllverbrennung eingesetzt, die in ausreichender Menge zur Verfügung standen, um die Ergebnisse zu reproduzieren. Die Vorteile bei diesem Verfahren sind, dass das Aerosol ohne Zwischenstufen wie Abscheidung im Filter und erneute Resuspension mit den Targetzellen in Kontakt gebracht wird. Es erlaubt die Ermittlung potentieller Emittenten von gesundheitsrelevanten Partikeln.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellen

Für alle Untersuchungen wurden Zelllinien verwendet, welche die entsprechenden Targetzellen der Lunge repräsentieren: humane Lungenepithelzellen (BEAS-2B, A549), Makrophagen (differenzierte THP-1, Mono Mac 6) sowie Alveolarepithelzellen (RLE-6TN) und Alveolarmakrophagen (NR8383) aus der Ratte. Für die Kokulturen wurden Makrophagen in bestimmten Verhältnissen auf konfluente Epithelzellen ausgesät. Die humanen THP-1-Zellen wurden vorher durch Inkubation mit 8 nM (12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) zu Makrophagen differenziert. Die Exposition von Zellen mit Partikelsuspensionen erfolgte in 96-, 24- oder 6-well-Platten. In einigen Versuchen wurden die Zellen zusätzlich zu den Partikeln mit den inflammatorischen Stimuli LPS (Lipopolysaccharid aus *Pseudomonas aeruginosa*, Sigma, Taufkirchen) und TNF- $\alpha$  (Becton dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

Für die Aerosolexposition wurden BEAS-2B-Zellen auf 12 mm Transwell<sup>®</sup>-Membranen in 12-well-Platten oder auf 24 mm Transwell<sup>®</sup>-Membranen in 6-well-Platten (Costar, Wiesbaden) ausgesät. Die Membranen bestanden aus Polyester mit einer Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  und einer Porendichte von  $4 \times 10^6$  Poren/ $\text{cm}^2$ . Kurz vor der Exposition mit Aerosol wurde das Medium auf der apikalen Seite entnommen und die Zellen mit HBSS gespült. Auf der basolateralen Seite wurde das Kulturmedium durch RPMI-1640-Medium mit 10 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure) ersetzt. In HEPES-gepuffertem Medium bleibt der pH-Wert während des Transports und der Exposition, die ohne Zumischung von  $\text{CO}_2$  erfolgte, stabil. Nach der Exposition wurden die Zellen wieder mit Kulturmedium (mit oder ohne zusätzlichen Stimulus) bedeckt und weitere 20 h im Brutschrank inkubiert.

### 2.2 Partikel

Es wurden drei verschiedenen Flugaschechargen aus zwei Hausmüllverbrennungsanlagen eingesetzt, die im Folgenden mit MAF98, MAF02 und TAF98 bezeichnet werden. MAF98 und MAF02 wurden im Elektrofilter und TAF98 in einem Taschenfilter gesammelt. Die Flugstäube wurden gesichtet, d.h. sie enthielten nur noch Partikel  $< 20 \mu\text{m}$ , und auf die enthaltenen Elemente untersucht. Als Referenzmaterial für unlösliche feine und ultrafeine Partikel wurde neben Quarzstaub DQ12 ( $\text{SiO}_2$ , kristallin,  $< 5 \mu\text{m}$ ) auch Hämatit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , 70 nm) und Silicasol ( $\text{SiO}_2$ , amorph, 60 und 100 nm) eingesetzt. DQ12 (Dörentruper Quarzkristallmehl der Mahlung Nr. 12) erhielten wir freundlicherweise von Herrn Prof. Seemayer (Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf). Die Hämatit- und Silicasolpartikel wurden von W. Ferstl (Institut für Technische Chemie – Wasser- und Geotechnologie) hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Aerosil (12 und 40 nm), Titandioxid (21 nm) und Carbon Black (14 und 56 nm) erhielten wir von Degussa, Frankfurt. Für die Submersexposition wurden die Partikel in Medium oder Puffer frisch suspendiert (10 mg/ml), mit Ultraschall behandelt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Zur Auftrennung der Flugasche in wasserlösliche und unlösliche Komponenten wurde die Stammsuspension 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und als "lösliche Fraktion" weiter verwendet. Das Sediment wurde im gleichen Volumen Medium wie die Stammsuspension resuspendiert und im Folgenden als "unlösliche Fraktion" bezeichnet.

Alle Partikel wurden mit dem Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-Test (Sigma, Taufkirchen) gemäß der Vorschrift des Herstellers auf Endotoxin getestet. Der Endotoxin-Gehalt war in allen Partikelsuspensionen von 10 mg/ml unterhalb der Nachweisgrenze ( $< 0,025 \text{ ng/ml}$ ).

### 2.3. Herstellung von Flugstaubaerosol

Die Herstellung von definiertem Aerosol erfolgte im ITC-TAB, indem der Flugstaub mit einem Bürstendosierer in den AEOLA-Reaktor (Aerosol-Laboranlage) dosiert wurde, der mit gefilterter Frischluft bei einem Volumenstrom von 500 Nm<sup>3</sup>/h betrieben wurde (Abb. 4). Um die großen Partikelaggregate abzuschneiden, wurde das Aerosol zusätzlich durch einen Zyklon geleitet, der alle Partikel >1 µm abtrennte. Die Massenkonzentration des Aerosols betrug typischerweise 50 mg/m<sup>3</sup> vor dem Zyklon und 5 mg/m<sup>3</sup> nach dem Zyklon (Mülhopt et al., 2004a).

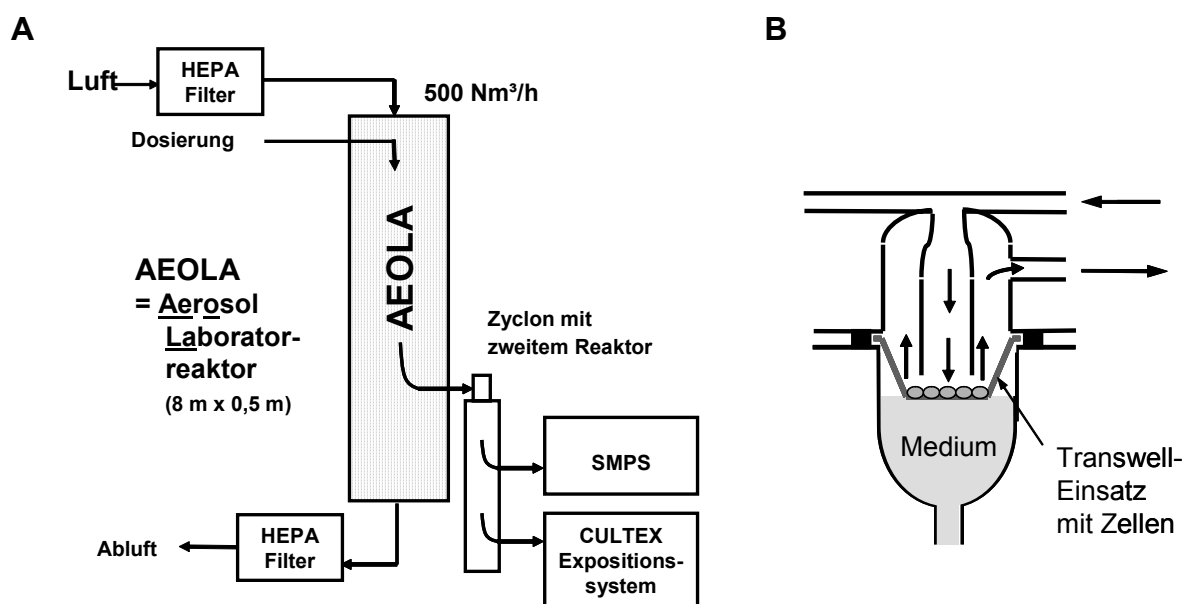


Abb. 4: Erzeugung von definiertem Aerosol im AEOLA-Reaktor (A). Schema einer Expositionseinheit des CULTEX-Systems (B): Das im AEOLA-Reaktor generierte Aerosol wird mit einer Pumpe durch die Expositionseinheit gezogen und in direkten Kontakt mit den Lungenzellen, die auf der porösen Transwell-Membran wachsen, gebracht. Das Testaerosol wird sehr nahe an den Testzellen vorbeigeleitet. Die Zellen werden direkt angeströmt. Die Lungenzellen werden apikal ohne Mediumbedeckung exponiert und basal durch Kulturmedium ernährt und mit Flüssigkeit versorgt (über Kapillarkräfte und Evaporation).

### 2.4. Herstellung verschiedener Größenfraktionen von Flugstaubaerosol

Aus dem Aerosol wurde eine Probe für 30 - 40 min durch einen Berner Niederdruckimpaktor (Hauke, Gmunden) mit 9 Trennstufen gezogen. Der Volumenstrom des Impaktors stellte sich automatisch durch eine kritische Düse am Ausgang auf 9,4 l/min ein. Die Stufe 9 übernahm die Funktion des Vorabscheiders, d.h. die abgelagerten Partikel >16 µm wurden verworfen. Die Stufen 1 - 8 waren mit ringförmigen Scheiben aus Aluminium belegt (Außendurchmesser 6,25 cm, Innendurchmesser 2,5 cm), auf denen die verschiedenen Größenklassen zwischen 60 nm und 16 µm gesammelt wurden. Die Aluminiumscheiben wurden vor und nach dem Versuch in Petrischalen aus Glas gewogen und in einem Exsikkator über Kieselgel aufbewahrt. Die Toxizitätsprüfung der Partikelfraktionen erfolgte meist noch am gleichen Tag, jedoch nicht später als 24h nach der Fraktionierung. Dazu wurden die auf den Aluminiumscheiben liegenden Partikel in ein steriles Gefäß überführt, in Medium resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Aus diesen Partikelsuspensionen wurden die gewünschten Konzentrationen für die Zellexposition hergestellt.

### **2.5. Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht**

Für die Expositionsexperimente wurden modifizierte CULTEX<sup>®</sup>-Einheiten der Fa. Vitrocell (Gutach) eingesetzt (**Abb. 2B**) (Aufderheide et al., 2003). Für die 12 mm (bewachsene Fläche 1 cm<sup>2</sup>) und die 24 mm Transwell-Membranen (bewachsene Fläche 4,7 cm<sup>2</sup>) wurden die entsprechend dimensionierten CULTEX-Einheiten verwendet, die mit jeweils drei Membranen bestückt werden können. Die Füllhöhe des Mediums wurde knapp über dem Zellrasen eingestellt, so dass kein Medium von unten durch die Poren drücken konnte. Die Testatmosphären wurden bei verschiedenen Volumenströmen durch die Module geleitet. Ein zirkulierendes Wasserbad sorgte für die gleichmäßige Temperierung der oberen und unteren Teile der Module bei 37°C.

Die im Labor vorbereiteten Membranen mit Zellen wurden in der Zellkulturschale mit HEPES-gepuffertem RPMI-Medium (Außenmedium) im basalen Kompartiment zur AEOLA-Anlage transportiert (5-10 min) und dort in die Expositionsmodule gesetzt. Bei den Versuchen mit den 12 mm Membranen wurde ein Volumenstrom für die gesamte Einheit geregelt unter der Annahme, dass alle Membranen mit dem gleichen Volumenstrom beaufschlagt werden. Bei einem Volumenstrom von z.B. 100 ml/min für das Modul ergibt sich somit ein Volumenstrom von 33,3 ml/min für jede Membran. Pro Versuch standen drei Expositionsmodule zur Verfügung, so dass durch ein Modul das ungefilterte Aerosol, durch das zweite Aerosol nach dem Zyklon und durch das dritte gefilterte Luft (0,2 µm Partikelfilter) geleitet werden konnte. Bei den Versuchen mit den 24 mm Membranen wurde der Volumenstrom zu jeder Membran getrennt mit einem Mass Flow Controller geregelt.

Nach der Exposition wurden die Membranen wieder in die Zellkulturschale mit Außenmedium gesetzt und zum Labor zurückgebracht. Zur Kontrolle blieben jeweils 1 – 3 Membranen mit Zellen ohne Mediumwechsel im Brutschrank (submers) sowie an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht im Labor auf einer Wärmeplatte bei 37°C (Laborluft). Nach der Exposition wurde bei allen Proben einschließlich der Kontrollproben das Medium entfernt. Über und unter den Zellen wurde frisches Kulturmedium mit/ohne 1 ng/ml TNF-α eingefüllt und für weitere 20 h inkubiert. Anschließend wurden das Medium und die Zellen der Analytik unterzogen.

### **2.6. Vitalitätstests**

Die zytotoxische Wirkung von Partikeln wurde entweder durch ihre Reduktionsfähigkeit von Tetrazolium-Farbstoffen (MTT oder WST-1, Roche, Mannheim) oder von AlamarBlue<sup>™</sup> (Serotec, Düsseldorf), durch Einlagerung von Propidiumjodid (PI) in den Zellkern oder durch Freisetzung von LDH (Roche, Mannheim) ins Medium ermittelt.

### **2.7. Nitritmessung**

Die Induktion von iNOS und die Freisetzung von NO aus Makrophagen wurde durch Messung der Nitritkonzentration im Medium durch den Griess-Test bestimmt.

### **2.8. Zytokinmessung**

Die Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 aus humanen Zellen sowie TNF-α und MIP-2 aus Rattenzellen wurde mit jeweils speziesspezifischen ELISA-Tests (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

### **2.9. Expression von CD14**

Zur Bestimmung der CD14-Expression wurden die differenzierten THP-1-Zellen durch Behandlung mit Accutase (PAA Laboratories, Cölbe) abgelöst und mit den jeweils speziesspezifischen FITC-markierten Antikörpern gegen humanes CD14 sowie mit dem



entsprechenden FITC-markierten IgG-Antikörper als unspezifische Bindungskontrolle inkubiert. Zur Bestimmung der Vitalität wurde PI zugegeben. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse (FACS) wurde der prozentuale Anteil an CD14-positiven Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt, wobei nur die lebenden Zellen (PI-negativ) ausgewertet wurden.

### **2.10. Expression von ICAM-1**

Zur Bestimmung der ICAM-1 Expression wurden die BEAS-2B-Zellen nach der Behandlung mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit den jeweils speziesspezifischen FITC-markierten Antikörpern gegen ICAM-1 sowie mit den entsprechenden FITC-markierten IgG-Antikörpern als unspezifische Bindungskontrolle inkubiert. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse wurde der prozentuale Anteil an ICAM-1-positiven Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt, wobei nur die lebenden Zellen (PI-negativ) ausgewertet wurden.

### **2.11. Bestimmung von ROS**

Zur Bestimmung der Bildung intrazellulärer Oxidanzien wurden die Zellen 40 min mit dem zellpermeablen 2',7'-Dichlor-Dihydro-Fluoreszeindiacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA, 50 µM) beladen und anschließend mit HBSS-Puffer gewaschen. Die Acetatgruppen werden durch unspezifische intrazelluläre Esterasen abgespalten; die nunmehr geladene Substanz kann nur noch langsam aus der Zelle herausdiffundieren. Bei Zugabe von Kontrollstimulanzien wie TPA (O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat), SIN-1 (3-Morpholinopyridin-Hydrochlorid) oder Partikeln wird das nicht-fluoreszierende H<sub>2</sub>DCF durch entstehende Sauerstoffradikale in den Fluoreszenzreporter DCF umgewandelt. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde nach einer bzw. zwei Stunden am Fluoreszenzspektrometer (Anregung 488 nm, Emission 530 nm) gemessen. Zur Untersuchung des Einflusses von Eisen-Ionen wurden die Partikelsuspensionen mit dem Fe<sup>3+</sup>-spezifischen Chelatbildner Desferrioxamin (4 - 40 mM) 30 min vorbehandelt. Für Hemmversuche wurden die Zellen mit N-Acetylcystein (10 mM) oder Rotenon (10 µM) 30 min vorbehandelt.

### **2.11. Mikroskopie**

Die Lichtmikroskopie wurde mit einem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen), kombiniert mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu) und einem Bildverarbeitungsprogramm (Openlab Improvision, Coventry), durchgeführt. Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die auf Transwell-Membranen angezogenen Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und in Osmiumtetroxid/Natrium-Cacodylatpuffer sowie mit Uranylacetat nachfixiert und kontrastiert. Die Entwässerung erfolgte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe. Als Einbettungsharz wurde SPURR verwendet. Nach der Polymerisation wurden mit dem Ultramikrotom LKB 2088 (Bromma) Ultradünnschnitte angefertigt, die am Transmissionselektronenmikroskop EM109T (Zeiss, Oberkochen) analysiert wurden.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Partikeln wurden mit dem JEOL (Philips) angefertigt.

### **2.12 Statistische Auswertung**

Bei den in den Abbildungen dargestellten Messdaten handelt es sich um die arithmetrischen Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (standard error of the mean, SEM) wieder.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Partikel

Als wichtigstes Testaerosol wurde Flugstaub aus Müllverbrennungsanlagen eingesetzt. Diese Partikel sind ein Modell für den anorganischen Anteil von Umweltstäuben, die im Gegensatz zu den hier verwendeten Partikeln große Mengen an elementarem Kohlenstoff enthalten. Der Kohlenstoffanteil der Flugstaubpartikel liegt dagegen nur bei ca. 1% (w/w). Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Feinfraktion des MAF98-Flugstaubes (Abb. 5A) zeigt, dass die Flugstaubpartikel als Aggregate verschiedener Größen vorliegen. Die korrekte Partikelgrößenverteilung, die in Abb. 5B dargestellt ist, wurde mit dem SMPS (scanning mobility particle sizer) gemessen, nachdem der Flugstaub in den AEOLA-Reaktor dosiert wurde. Die Grafik zeigt, dass der Modalwert der Partikelanzahlkonzentration bei 200 nm liegt. Die ultrafeine Fraktion (< 100 nm) trägt mit 3% zur Masse, jedoch mit 31% zur Partikelanzahl bei. Partikel >1 µm kommen selten vor, aber sie haben einen hohen Masseanteil.

Flugaschepartikel bestehen aus einer komplexen Mischung verschiedenster Elemente, die je nach Brenngut und Anlage variiert. So enthielten die verwendeten Stäube ca. 70% (w/w) wasserlösliche Bestandteile, die aus Chloriden und Sulfaten von Erdalkalimetallen bestanden. MAF98 enthielt ca. 6% (w/w) Metalle, vor allem (mg/g) Cd, 0.67; Cu, 2.55; Fe, 7.04; Pb, 23.35; Sb, 1.26; Sn, 2.7; Ti, 1.64; Zn, 21.39, darüber hinaus 10 mg/g C und 1.212 µg/g PCDD/PCDF.

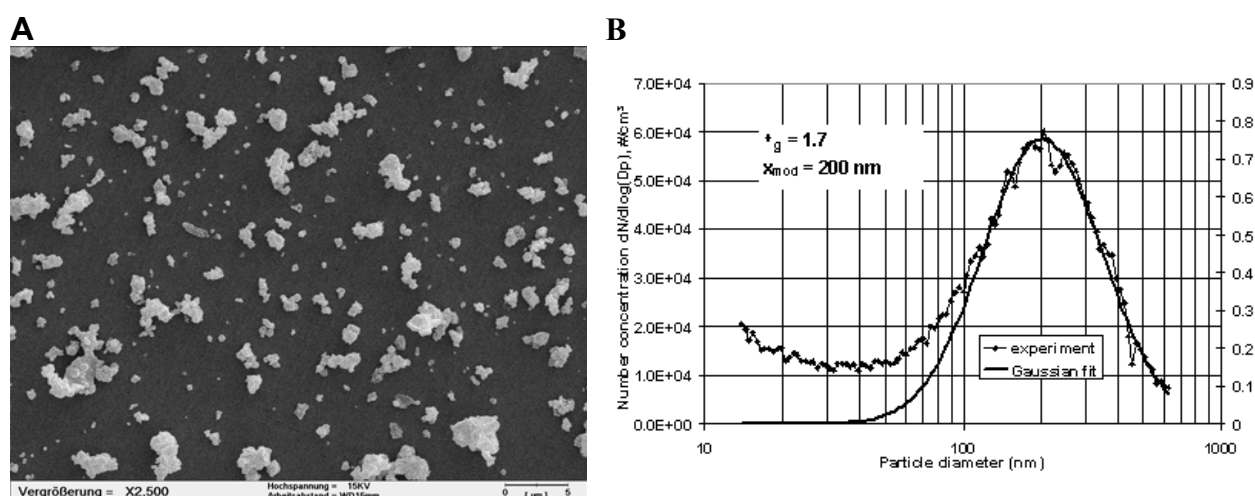


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Feinfraktion des MAF98-Flugstaubes (A) und Partikelgrößenverteilung von resuspendiertem Flugstaub, gemessen mit dem SMPS (B). Die REM-Aufnahme wurde freundlicherweise von Manuela Hauser und die Partikelgrößenverteilung von Sonja Mülhopt (beide ITC-TAB) zur Verfügung gestellt.

Die synthetisch hergestellten ultrafeinen Partikel Hämatit und Silicasol sind in der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 6) als Einzelpartikel oder Agglomerate, bei denen die Primärpartikel gut erkennbar sind, dargestellt. Die Primärpartikel sind sphärisch und haben eine glatte Oberfläche.

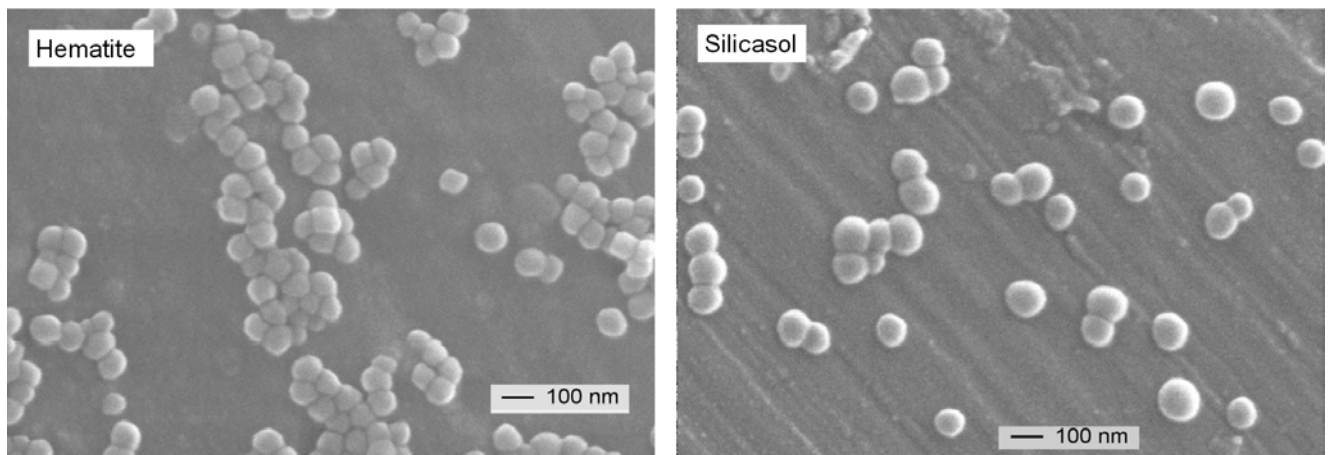


Abb. 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hämatit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , mittlerer Durchmesser 70 nm) und Silicasol (amorphes  $\text{SiO}_2$ , mittlerer Durchmesser 60 nm). Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Bernd Neufang (HVT-HZ) angefertigt.

### 3.2 Aufnahme von ultrafeinen Partikeln in Zellen

Die Aufnahme von in Medium suspendierten Hämatitpartikeln in die Zellen wurde mit Lichtmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Primärpartikel dieser Größenordnung ( $< 100$  nm) sind im Lichtmikroskop nicht erkennbar. Aggregate, die sich außerhalb und innerhalb der Zelle gebildet haben, waren jedoch gut sichtbar. Aufgenommene Hämatitaggregate sammelten sich in A549-Zellen um den Nukleus herum an (Abb. 7 A), ebenso in THP-1-Zellen (nicht gezeigt). Aufnahmen von A549-Zellen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie bestätigten, dass die Hämatitpartikel nach der Aufnahme in die Zelle als Aggregate oder als Einzelpartikel innerhalb des Zytosols lokalisiert sind (Abb. 7 B-D). Dabei sind keine Membranstrukturen um die Partikel erkennbar. Auch Einstülpungen der Plasmamembran, wie bei der Phagozytose oder der Endozytose, wurden nicht beobachtet. Die Aufnahmen zeigen außerdem, dass die Hämatitpartikel intrazellulär von der apikalen zur basolateralen Plasmamembran der Epithelzellen gewandert sind (Abb. 7 D).

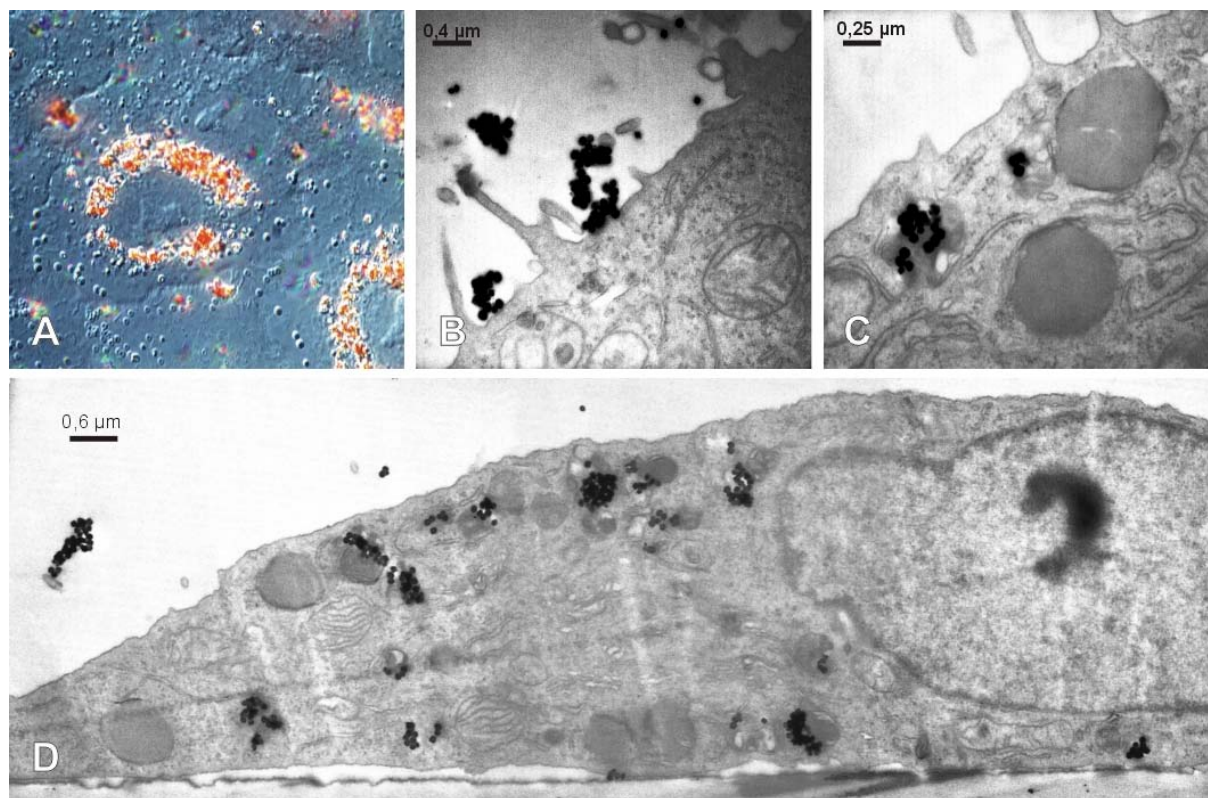


Abb. 7: Aufnahme von ultrafeinen Hämatitpartikeln (ca. 70 nm) ins Zytosol von alveolären Epithelzellen (A549). **A**) Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC, 630 x) nach Exposition mit 100  $\mu\text{g/ml}$  (32  $\mu\text{g/cm}^2$ ) Hämatit für 24 h. **B-D**) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen nach 3 h (**B**, 20.000 x), nach 6 h (**C**, 30.000 x) sowie nach 16 h (**D**, 12.000 x) Exposition mit 50  $\mu\text{g/ml}$  (16  $\mu\text{g/cm}^2$ ) Hämatit.

### 3.3 Einfluss von Partikeln auf die Vitalität von Zellen

Der Flugstaub MAF02 reduzierte dosisabhängig die Vitalität der humanen Lungeneithelzellen A549 und BEAS-2B wie in Abb. 8 anhand des Abfalls der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen gezeigt wird. Die A549-Zellen erwiesen sich dabei als wesentlich unempfindlicher als die BEAS-2B-Zellen. Die  $LD_{50}$  von MAF02 betrug für die A549-Zellen 75  $\mu\text{g/ml}$  (45,5  $\mu\text{g/cm}^2$ ) und von Quarz 150  $\mu\text{g/ml}$  (90  $\mu\text{g/cm}^2$ ). Bei den BEAS-2B-Zellen lag die  $LD_{50}$  von MAF02 und Quarz bereits bei 50  $\mu\text{g/ml}$  (30,3  $\mu\text{g/cm}^2$ ). MAF02 und Quarz hatten ein ähnliches Toxizitätspotential bei den BEAS-2B-Zellen, während in den A549-Zellen die Flugasche deutlich toxischer als Quarz wirkte. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Messung von LDH im Medium als Maß für die Integrität der Plasmamembran (nicht dargestellt). Mit steigender Partikelkonzentration wurden steigende LDH-Konzentrationen im Medium gemessen.

Um zu untersuchen, wie sich die wasserlöslichen und die unlöslichen Bestandteile der Flugasche auf die Vitalität der Zellen auswirken, wurde die Flugasche in die entsprechenden Fraktionen aufgetrennt (siehe Methoden). Die unlösliche Fraktion zeigte dabei einen ähnlichen Dosis-Wirkungs-Verlauf wie die Gesamt-Partikel (Abb. 9). Die wasserlösliche Fraktion reduzierte die Vitalität selbst bei der extrem hohen Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  nur auf 85% bei den NR8383-Makrophagen und auf 90% bei den BEAS-2B-Zellen. Quarzstaub hatte in den Makrophagen eine vergleichbare Zytotoxizität wie die Flugasche, war in den BEAS-Epithelzellen jedoch bei dieser Versuchsserie praktisch ohne Wirkung. In den gezeigten Versuchen wurde die Flugasche MAF98 eingesetzt. Die Flugasche MAF02 zeigte ein ähnliches Verhalten, es wurden jedoch weniger Versuche durchgeführt.

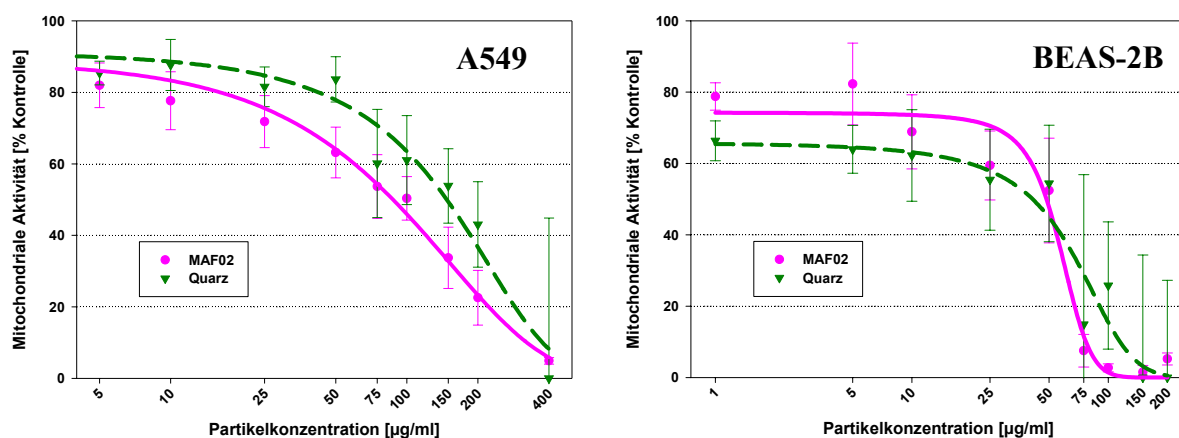


Abb. 8: Einfluss von Flugstaub MAF02 und Quarz DQ12 auf die Vitalität von Epithelzellen A549 und BEAS-2B. Die Zellen wurden 24 h mit Partikelkonzentrationen von 1 bis 400 µg/ml inkubiert. Anschließend wurde die mitochondriale Aktivität mit dem MTT-Test bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente ± SEM.

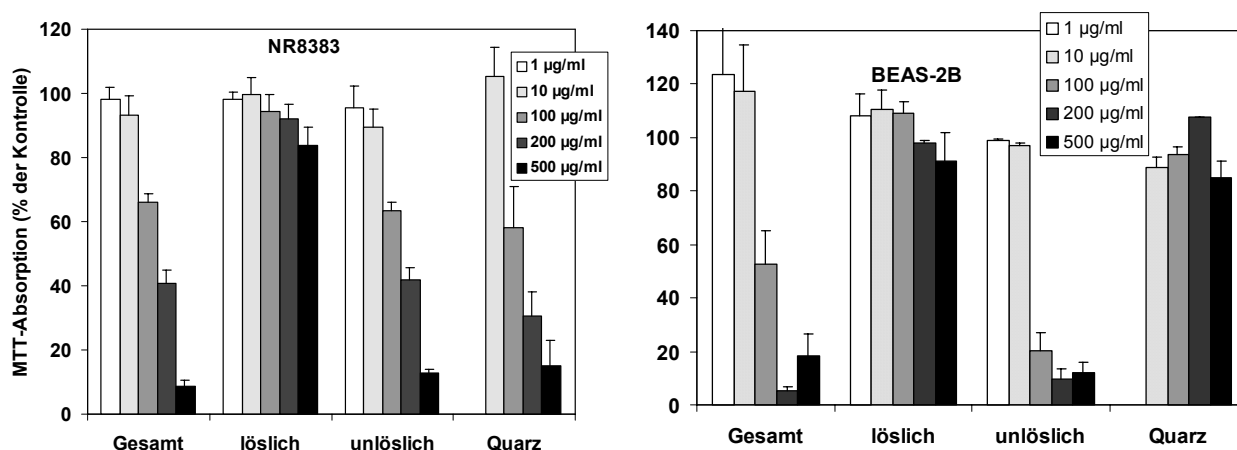


Abb. 9 Einfluss der wasserlöslichen und unlöslichen Fraktionen des Flugstaubes MAF98 im Vergleich zu den Gesamt-Partikeln und Quarz DQ12 auf die Vitalität von NR8383-Makrophagen und BEAS-2B-Epithelzellen. Die Zellen wurden 24 h mit Partikelkonzentrationen von 1 bis 500 µg/ml inkubiert. Anschließend wurde die mitochondriale Aktivität mit dem MTT-Test bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente ± SEM.

### 3.4 Einfluss von Partikeln auf die Bildung von pro-inflammatorischen Mediatoren

#### 3.4.1 Zytokine

Flugasche MAF02 und Quarzpartikel lösten dosisabhängig die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 in den humanen Epithelzellen A549 und BEAS-2B aus (Abb. 10). Die  $EC_{50}$  von MAF02 betrug für die A549-Zellen  $120 \mu\text{g/ml}$  ( $72,2 \mu\text{g/cm}^2$ ) und von Quarz  $100 \mu\text{g/ml}$  ( $60,6 \mu\text{g/cm}^2$ ). Bei den BEAS-2B-Zellen lag die  $EC_{50}$  von MAF02 bereits bei  $25 \mu\text{g/ml}$  ( $15,1 \mu\text{g/cm}^2$ ) und von Quarz bei  $130 \mu\text{g/ml}$  ( $72,7 \mu\text{g/cm}^2$ ). Bei höheren MAF02-Konzentrationen als  $50 \mu\text{g/ml}$  wurde von den BEAS-2B-Zellen praktisch kein IL-8 mehr produziert, weil die Zellen nicht mehr lebensfähig waren. Im Vergleich mit Abb. 8 wird ersichtlich, dass die Freisetzung von IL-8 jeweils im schwach oder nicht zytotoxischen Konzentrationsbereich beginnt.

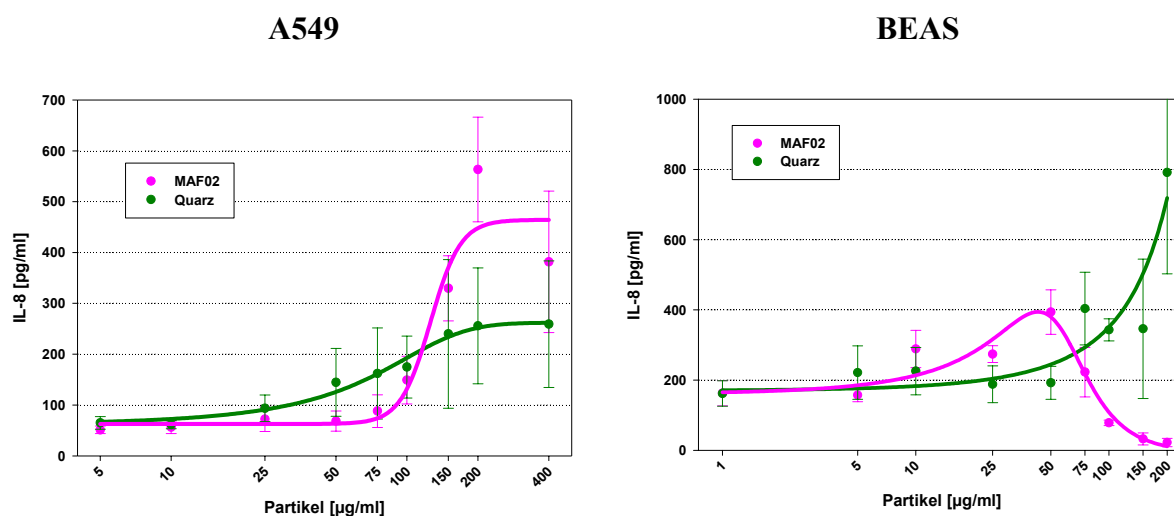


Abb. 10: Einfluss von Flugstaub MAF02 und Quarz DQ12 auf die Freisetzung von IL-8 in A549 und BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit Partikelkonzentrationen von 1 bis  $400 \mu\text{g/ml}$  inkubiert. Anschließend wurde die IL-8-Konzentration im Medium bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente  $\pm$  SEM.

Die Wirkung der wasserlöslichen und der unlöslichen Bestandteile der Flugasche MAF98 auf die Zytokinfreisetzung ist in Abb. 11 dargestellt. Die unlöslichen Partikelbestandteile hatten einen ähnlichen Verlauf der IL-8 Konzentrationen in den BEAS-2B-Zellen wie die Gesamt-Partikel, d.h. Anstieg bis  $100 \mu\text{g/ml}$ , darüber setzte die zytotoxische Wirkung ein, so dass kaum noch IL-8 produziert werden konnte. Bei der wasserlöslichen Fraktion wurde ein leichter dosisabhängiger Anstieg der IL-8-Freisetzung bei hohen Konzentrationen von bis zu  $500 \mu\text{g/ml}$  beobachtet, die nicht zytotoxisch waren (siehe Abb. 9) Ähnliche Verläufe wurden bei der Freisetzung des Zytokins IL-6 beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Bei der gleichen Versuchsserie wurde in NR8383-Zellen das für Makrophagen typische Zytokin  $\text{TNF-}\alpha$  im Medium gemessen (Abb. 11). Die unlösliche Flugaschefraktion induzierte genauso wie die Gesamt-Partikel eine  $\text{TNF-}\alpha$ -Freisetzung erst bei sehr hohen Konzentrationen ab  $200 \mu\text{g/ml}$  ( $121 \mu\text{g/cm}^2$ ), während die wasserlösliche Fraktion völlig unwirksam war. Bei der Behandlung von NR8383-Zellen mit Quarz setzte die  $\text{TNF-}\alpha$ -Bildung bereits ab  $100 \mu\text{g/ml}$  ( $60,6 \mu\text{g/cm}^2$ ) ein und stieg dosisabhängig.



## Ergebnisse

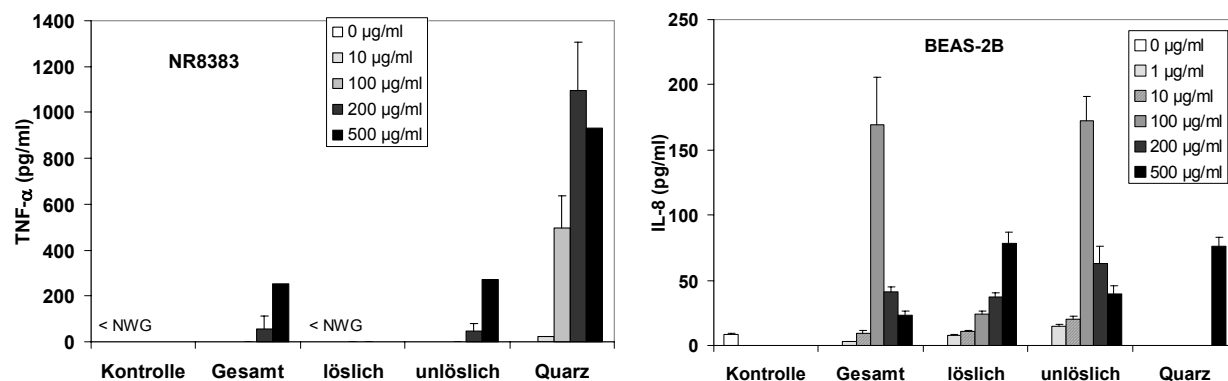


Abb. 11: Einfluss der wasserlöslichen und unlöslichen Fraktionen des Flugstaubes MAF98 im Vergleich zu den Gesamt-Partikeln und Quarz DQ12 auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  in NR8383-Makrophagen und von IL-8 in BEAS-2B-Epithelzellen. Die Zellen wurden 24 h mit Partikelkonzentrationen von 1 bis 500  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration im Medium bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente  $\pm$  SEM.

Um zu untersuchen, wie sich die Partikel auf die Zytokinbildung von stimulierten Zellen auswirken, wurden die Epithelzellen mit TNF- $\alpha$  und MAF98 gleichzeitig behandelt. TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von stimulierten Makrophagen gebildet, die in der Lunge auf den Epithelzellen sitzen. Abb. 12 zeigt, dass eine 24-stündige Behandlung von BEAS-2B-Zellen mit 1 ng/ml TNF- $\alpha$  zu einer signifikanten Erhöhung von IL-8 von 2,4 ng/ml auf 6,2 ng/ml führte, wenn die Zellen gleichzeitig mit einer niedrigen Flugaschekonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  behandelt wurden. Die IL-6-Konzentration stieg unter den gleichen Bedingungen von 1,5 pg/ml auf 2,5 pg/ml. Die Freisetzung beider Zytokine wurde in den TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen deutlich verstärkt. In nicht-stimulierten Zellen wurde durch Flugasche nur eine niedrige IL-8-Freisetzung induziert (0,61 ng/ml), während IL-6 nicht erhöht wurde (<5 pg/ml). Auch wenn die BEAS-2B-Zellen 24 h mit TNF- $\alpha$  vorbehandelt und anschließend mit Flugstaub inkubiert wurden, erhöhte sich die IL-8-Konzentration im Medium deutlich gegenüber der Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

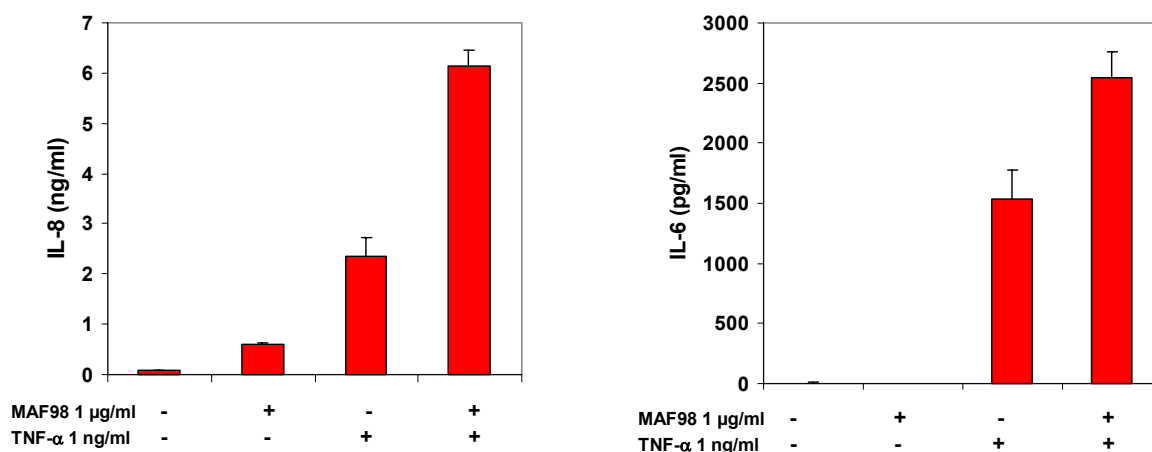


Abb. 12: Einfluss des Flugstaubes MAF98 auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Bildung von IL-6 und IL-8 in BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Partikeln (0,31  $\mu\text{g/cm}^2$ ), mit 1 ng/ml TNF- $\alpha$  oder mit beiden Stimuli gleichzeitig behandelt. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration im Medium bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente  $\pm$  SEM.

NR8383-Makrophagen lassen sich durch LPS zur Induktion der Zytokine TNF- $\alpha$  und MIP-2 sowie der iNOS und damit zur Freisetzung von Nitrit stimulieren. Für die Untersuchungen mit stimulierten Makrophagen wurde die LPS-Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$

ausgewählt, weil bei dieser Konzentration das Potential für eine weitere Erhöhung des Zytokin- und Nitritspiegels durch Partikel gegeben war. Abb. 13 zeigt am Beispiel von MAF02, dass die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und MIP-2 ins Medium in Abhängigkeit der Partikeldosis bei gleichzeitiger LPS-Stimulation deutlich verstärkt wird. Diese Verstärkung tritt bereits bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen auf (siehe auch Abb. 15A). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Verwendung der Partikel MAF98 und Quarz beobachtet und auch, wenn die Zellen mit LPS vorstimuliert wurden. In nicht-stimulierten NR8383-Zellen konnte bei allen untersuchten Partikeln keine Induktion von TNF- $\alpha$  und MIP-2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

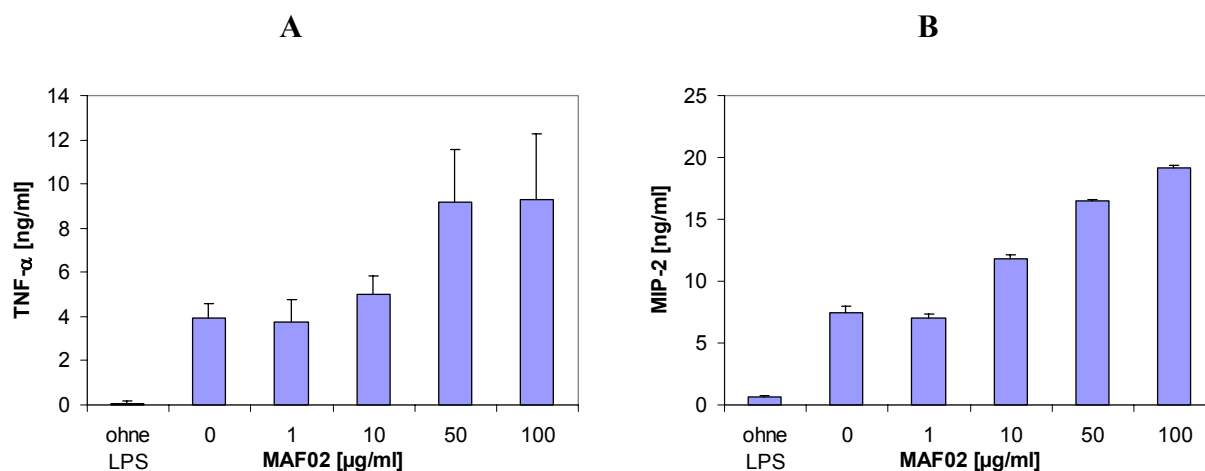


Abb. 13: Einfluss des Flugstaubes MAF02 auf die LPS-induzierte Bildung von TNF- $\alpha$  und MIP-2 in NR8383-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit Partikelkonzentrationen von 0 – 100  $\mu\text{g/ml}$  und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS behandelt. Anschließend wurden die Zytokinkonzentrationen im Medium bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente  $\pm$  SEM.

Abb. 14 zeigt, dass auch synthetische ultrafeine Partikel die MIP-2-Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen deutlich verstärken. Die Partikelkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  war bei Aerosil 12 nm und Aerosil 40 nm bereits schwach zytotoxisch, während bei Titandioxid 21 nm, Carbon Black 14 nm und Carbon Black 56 nm keine zytotoxische Wirkung beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

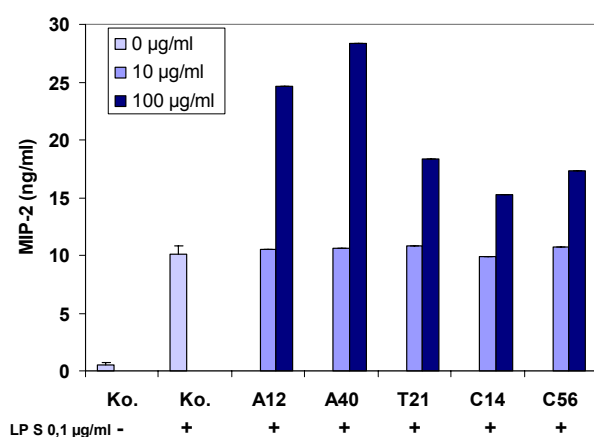


Abb. 14: Einfluss verschiedener synthetischer ultrafeiner Partikel auf die LPS-induzierte Bildung von MIP-2 in NR8383-Makrophagen. Die mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS behandelten Zellen wurden gleichzeitig für 24 h mit 10 und 100  $\mu\text{g/ml}$  Aerosil 12 nm (A12), Aerosil 40 nm (A40), Titandioxid 21 nm (T21), Carbon Black 14 nm (C14) und Carbon Black 56 nm (C65) inkubiert. Anschließend wurden die Zytokinkonzentrationen im Medium bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem repräsentativen Versuch mit 4 Parallelproben.

### 3.4.2 Nitrit

Bakterielles LPS induziert in vielen Zelltypen das Enzym iNOS, welches die Bildung von NO katalysiert. NO ist nur für Sekunden stabil; dann wird es in Nitrit und Nitrat umgewandelt, was leicht detektiert werden kann. Die Nitritkonzentration im Mediumüberstand wird hier als Indikator für die iNOS-Expression angesehen. Alle Zelllinien wurden dahingehend



untersucht, inwieweit sie sich zur Induktion der iNOS und damit zur Freisetzung von Nitrit anregen lassen. Bei den humanen Zellen A549, BEAS-2B, THP-1 und Mono Mac 6 konnte weder durch LPS noch durch einen Zytokin-Mix aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  (jeweils 10 ng/ml) eine Erhöhung der Nitritkonzentration über der Nachweisgrenze des Griess-Tests von 1  $\mu$ M Nitrit beobachtet werden.

Abb. 15B zeigt, dass durch Flugstaub allein keine Freisetzung von Nitrit induziert werden konnte. Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit 0,1  $\mu$ g/ml LPS erhöhte sich die Nitritkonzentration im Medium auf 29  $\mu$ M gegenüber 3,5  $\mu$ M Nitrit in der unbehandelten Kontrolle. In Zellen, die gleichzeitig mit 100  $\mu$ g/ml MAF98 behandelt wurden, wurde deutlich weniger Nitrit produziert, allerdings war bei dieser Konzentration die Vitalität ebenfalls reduziert (Abb. 15A).

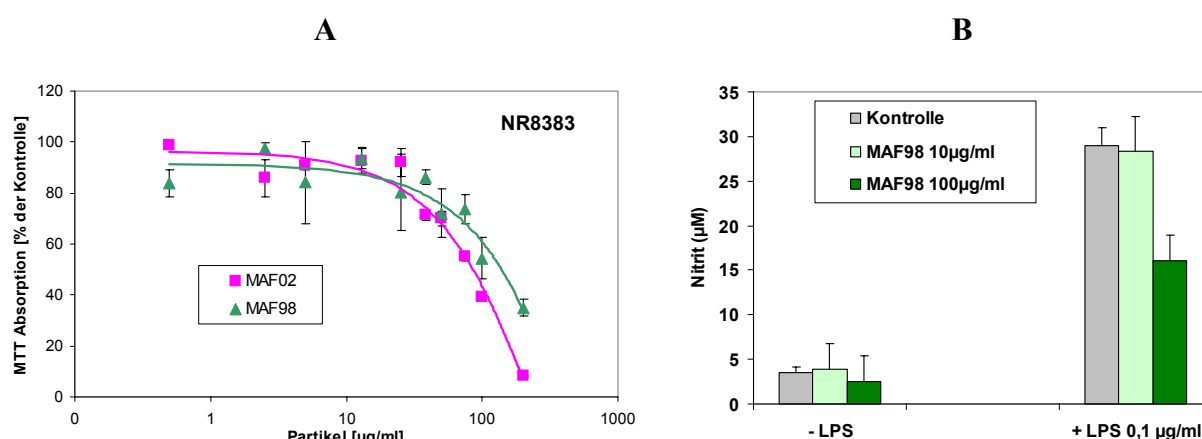


Abb. 15: Einfluss des Flugstäube MAF98 und MAF02 auf die Vitalität von NR8383-Makrophagen (A). Einfluss des Flugstaubes MAF98 auf die LPS-induzierte Bildung von Nitrit in NR8383-Zellen (B). Die Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Partikelkonzentrationen von 0 – 200  $\mu$ g/ml, mit 0,1  $\mu$ g/ml LPS oder mit beiden Stimuli gleichzeitig behandelt. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Medium bestimmt. Die Vitalität der Zellen wurde mit dem MTT-Test bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente  $\pm$  SEM.

### 3.4.3 Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies

In den Studien zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) konnte für alle untersuchten Zelltypen (NR8383-Makrophagen, RLE-6TN- A549- und BEAS-2B-Epithelzellen) gezeigt werden, dass unmittelbar nach Zugabe von Flugasche dosisabhängig intrazelluläre ROS gebildet wurden. Der Nachweis erfolgte fluorenszspektrometrisch mit 2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein (H<sub>2</sub>DCF), ein Indikator für allgemeinen oxidativen Stress, oder Dihydrorhodamine (DHR), ein Farbstoff, der spezifisch mit Peroxynitrit und Peroxid vor allem in den Mitochondrien reagiert. Abb. 16 zeigt am Beispiel von NR8383-Makrophagen, dass die DCF-Fluoreszenz bei einstündiger Inkubation mit 200  $\mu$ g/ml MAF98 um das 3-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht ist; bei der Flugasche TAF98 steigt sie dagegen nur um etwa 50%. Dieser Effekt, der auch mit anderen Partikeln oder mit TPA 0,1  $\mu$ M in unterschiedlicher Intensität beobachtet werden konnte, wurde in Zellen, die mit 10 mM N-Acetylcystein vorbehandelt wurden, vollständig unterdrückt, auch in den Kontrollzellen (Abb. 17).

Die Bildung intrazellulärer ROS konnte durch Vorbehandlung der Partikel mit Desferrioxamin, einem Metallchelator mit einer besonders hohen Stabilitätskonstanten für Fe<sup>3+</sup> ( $10^{31}$ ), reduziert werden: um 71% bei NR8383-Makrophagen (Abb. 18), um 35% bei RLE-6TN-Epithelzellen und um 71% bei BEAS-2B-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die

## Ergebnisse

Vorbehandlung der Partikel mit dem Desferrioxamin hatte jedoch keinen Effekt auf die Partikel-induzierte Zytotoxizität oder die Zytokin-Freisetzung (Daten nicht gezeigt).

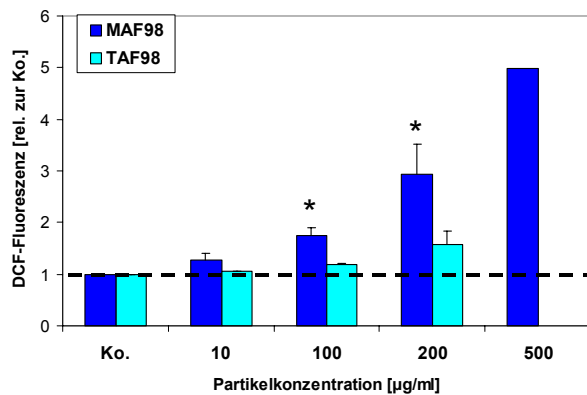


Abb. 16: Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen in NR8383-Makrophagen in Abhängigkeit von der Konzentration der Flugascheinfraktion aus zwei verschiedenen technischen Verbrennungsanlagen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier bis sechs Experimenten  $\pm$  SEM.

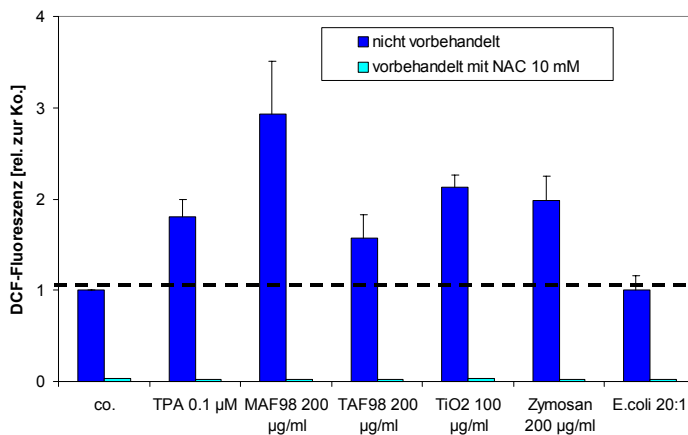


Abb. 17: Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen in NR8383-Makrophagen durch verschiedene Stimuli ohne oder mit Vorbehandlung der Zellen mit 10 mM NAC. Bei den nicht vorbehandelten Zellen sind die Mittelwerte aus drei Experimenten  $\pm$  SEM dargestellt. Mit NAC-vorbehandelten Zellen wurde nur ein Versuch mit drei Parallelproben durchgeführt.

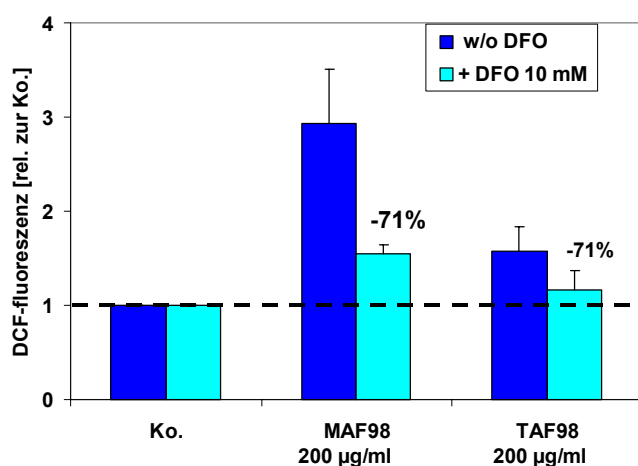


Abb. 18: Reduktion der Flugasche-induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen in NR8383-Makrophagen durch Vorbehandlung der Partikel mit 10 mM Desferrioxamin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Experimenten  $\pm$  SEM.

Mögliche Quellen für intrazelluläre Oxidanzien sind die Mitochondrien, die durch Zugabe von Flugasche unter oxidativen Stress gesetzt werden könnten. Um dies zu überprüfen, wurden Experimente mit einem Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette, durchgeführt. Vorbehandlung der Zellen mit 2 µM Rotenon, ein Komplex-I-Inhibitor, reduzierte die MAF98-induzierte DCF-Fluoreszenz in A549- und BEAS-2B-Epithelzellen nur geringfügig,

## Ergebnisse

die DHR-Fluoreszenz blieb unverändert im Vergleich zu den nur mit MAF98-behandelten Zellen (Abb. 19 und 20).

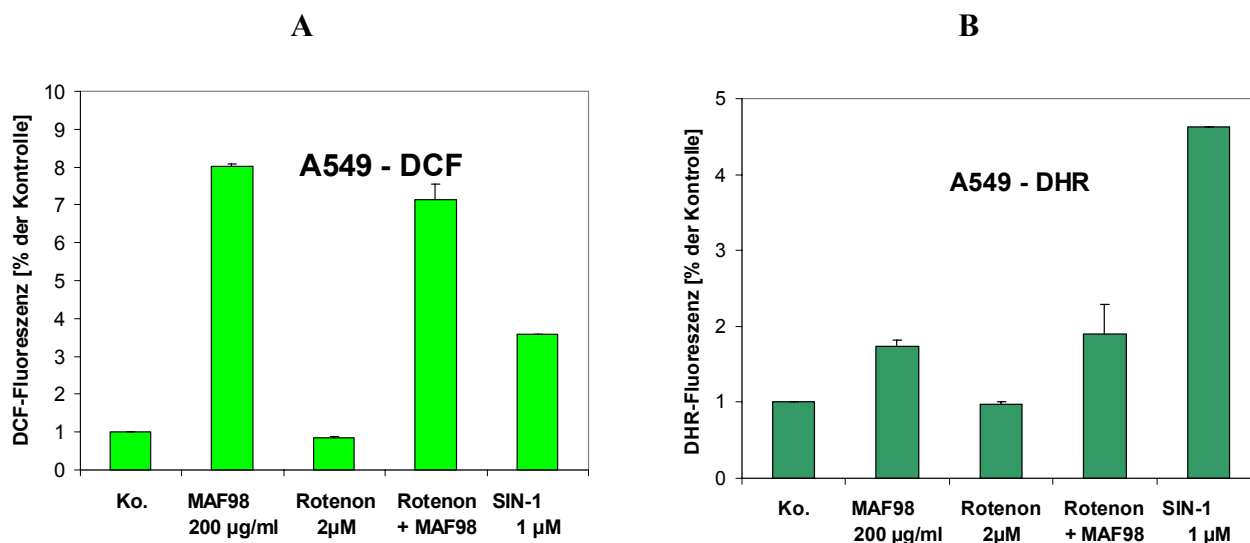


Abb. 19: Einfluss von Rotenon auf die Flugasche-induzierte ROS-Bildung in A549-Zellen. Die Zellen wurden 30 min mit 2 µM Rotenon vorbehandelt. 2h nach Zugabe von 200 µg/ml MAF98 wurde die Fluoreszenzintensität von DCF und DHR bei 530 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurde 1 µM SIN-1 eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte jeweils in Relation zur Kontrolle aus drei Experimenten ± SEM.

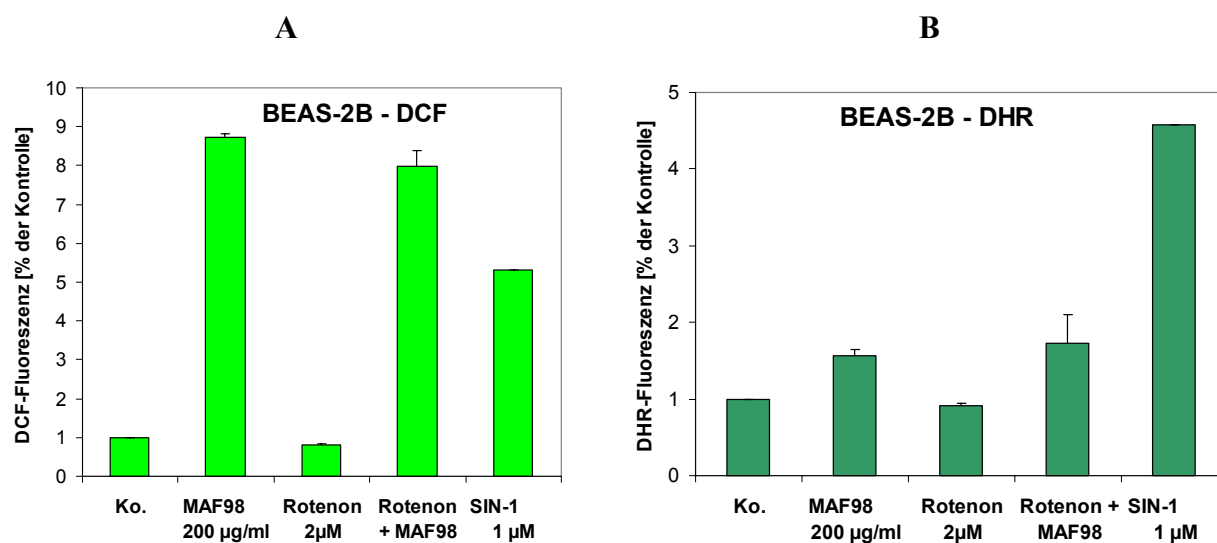


Abb. 20: Einfluss von Rotenon auf die Flugasche-induzierte ROS-Bildung in BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden 30 min mit 2 µM Rotenon vorbehandelt. 2h nach Zugabe von 200 µg/ml MAF98 wurde die Fluoreszenzintensität von DCF und DHR bei 530 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurde 1 µM SIN-1 eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte jeweils in Relation zur Kontrolle aus drei Experimenten ± SEM.

### 3.4.4 ICAM-1

In Lungenepithelzellen kann ICAM-1 durch TNF- $\alpha$  induziert werden. Es wurde untersucht, ob die TNF- $\alpha$ -induzierte Expression von ICAM-1 in BEAS-2B-Zellen durch Flugstaub beeinflusst wird. Abb. 21 A zeigt, dass die Expression von ICAM-1 in BEAS-2B-Zellen mit den eingesetzten spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch gut nachweisbar ist, d.h. die mit spezifischem Antikörper markierten Zellen unterscheiden sich deutlich von der Isotypkontrolle. Da nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  praktisch alle Zellen ICAM-1-positiv waren, wurde der geometrische Mittelwert der relativen Fluoreszenzintensität der positiven Zellen (Marker 2) ausgewertet (Abb. 21 B). Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tab. 1 zusammengefasst.

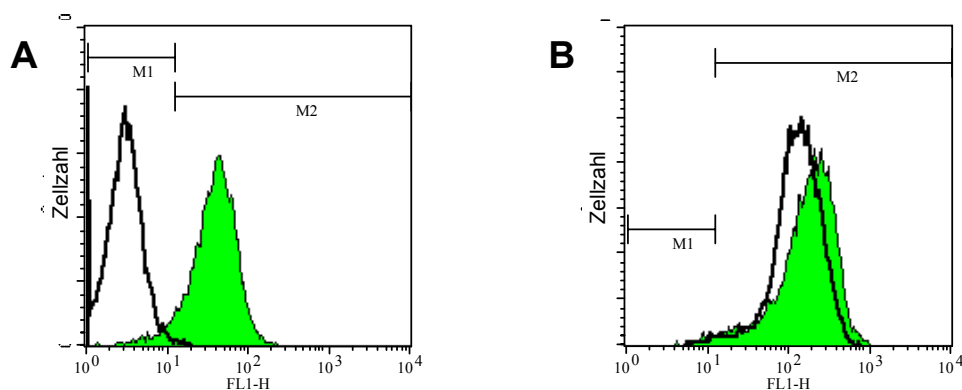


Abb. 21: Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses der Flugasche MAF98 auf die ICAM-1-Expression von BEAS-2B-Zellen. **A:** unbehandelte Zellen gefärbt mit FITC-Isotyp-Kontrollantikörper (schwarze Linie) bzw. mit FITC-anti-ICAM-1 (grün). **B:** TNF- $\alpha$ -behandelte (1 ng/ml, 24h) Zellen (schwarze Linie) im Vergleich zu Zellen, die gleichzeitig mit Flugasche (10  $\mu$ g/ml) behandelt wurden (grün), gefärbt mit FITC-anti-ICAM-1. Dargestellt sind die Histogramme repräsentativer Einzelproben, wobei nur die lebenden Zellen (Propidiumjodid-negativ) ausgewertet wurden. FL1-H: Fluoreszenzintensität gemessen im FITC-Kanal (525 nm).

Tab. 1: Einfluss von Flugaschepartikeln MAF98 auf die Expression von ICAM-1 in BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit 1 und 10  $\mu$ g/ml Partikeln, mit 1 und 5 ng/ml humanem TNF- $\alpha$  oder mit beiden Stimuli gleichzeitig behandelt. Anschließend wurde ICAM-1 immunzytometrisch nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils sowie der relativen Fluoreszenzintensität ICAM-1-positiver Zellen aus vier Experimenten  $\pm$  SEM.

Behandlung	ICAM-1-positive Zellen [%]	Mittlere rel. Fluoreszenzintensität
Kontrolle	76 $\pm$ 8,8	35 $\pm$ 5
MAF98 1 $\mu$ g/ml	77 $\pm$ 9,5	34 $\pm$ 5
MAF98 10 $\mu$ g/ml	81 $\pm$ 5,8	38 $\pm$ 5
TNF- $\alpha$ 1 ng/ml	98 $\pm$ 0,2	93 $\pm$ 13
TNF- $\alpha$ 5 ng/ml	99 $\pm$ 0,1	112 $\pm$ 13
TNF- $\alpha$ 1 ng/ml + MAF98 1 $\mu$ g/ml	98 $\pm$ 0,5	90 $\pm$ 14
TNF- $\alpha$ 1 ng/ml + MAF98 10 $\mu$ g/ml	99 $\pm$ 0,2	113 $\pm$ 15

Bei den unbehandelten BEAS-2B-Zellen waren  $76\% \pm 8,8\%$  der Zellen ICAM-1-positiv mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von  $35 \pm 5$ , ein Maß für die Anzahl von ICAM-1-Oberflächenmolekülen. Der Anteil an ICAM-1-positiven Zellen erhöhte sich durch Flugaschebehandlung mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen bis zu  $10 \mu\text{g/ml}$  geringfügig. Nach Behandlung mit  $1 \text{ ng/ml}$  TNF- $\alpha$  betrug die mittlere Fluoreszenzintensität der ICAM-1-positiven Zellen  $93 \pm 13$ . Durch gleichzeitige Behandlung mit Flugasche  $10 \mu\text{g/ml}$  erhöhte sich die mittlere Fluoreszenzintensität der mit  $1 \text{ ng/ml}$  TNF- $\alpha$  behandelten Zellen um 22% auf  $113 \pm 15$ . Dieser Effekt war bei  $5 \text{ ng/ml}$  TNF- $\alpha$  nicht mehr zu beobachten. In parallel laufenden Versuchen mit RLE-6TN Epithelzellen aus der Ratte wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet (Daten nicht gezeigt).

### 3.5. Kokulturversuche mit humanen Zellen

Um ein Zellsystem zu etablieren, das empfindlich auf eine Partikelexposition reagiert, wurden Kokulturversuche mit menschlichen und Rattenzelllinien durchgeführt, welche die Situation in der Lunge möglichst realitätsnah widerspiegeln sollten. Dazu wurden Makrophagen direkt auf einem Monolayer von Epithelzellen ausgesät. Da keine humane Makrophagenzelllinie verfügbar war, wurden die makrophagen-ähnlichen Zelllinien THP-1 und Mono Mac 6 verwendet. Im Folgenden sind die Ergebnisse mit den THP-Zellen dargestellt, die vor der Aussaat auf die Epithelzellen mit TPA differenziert wurden.

Die myeloide Leukämiezelllinie THP-1 weist nach Behandlung mit TPA einige biologische und morphologische Charakteristika von humanen alveolären Makrophagen auf, wie z.B. Eicosanoid- und Zytokinproduktion (Chen et al., 1996). Um den Differenzierungsgrad der Zellen nach Inkubation mit  $8 \text{ nM}$  TPA zu ermitteln, wurde die Expression des Oberflächenproteins CD14 in Abhängigkeit von der Zeit mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht (Abb. 22). Abb. 23 zeigt, dass weniger als 3% der unbehandelten Zellen CD14 positiv waren. Der Anteil an CD14-positiven Zellen erhöhte sich auf 19% nach 48 h Inkubation mit TPA, auf 63% nach 72 h sowie auf 74% nach 96 h. Bei den Kokultorexperimenten waren die THP-1-Zellen 2 d differenziert, als sie auf die Epithelzellen ausgesät wurden, und 3 d differenziert, als sie mit Partikeln und LPS exponiert wurden.

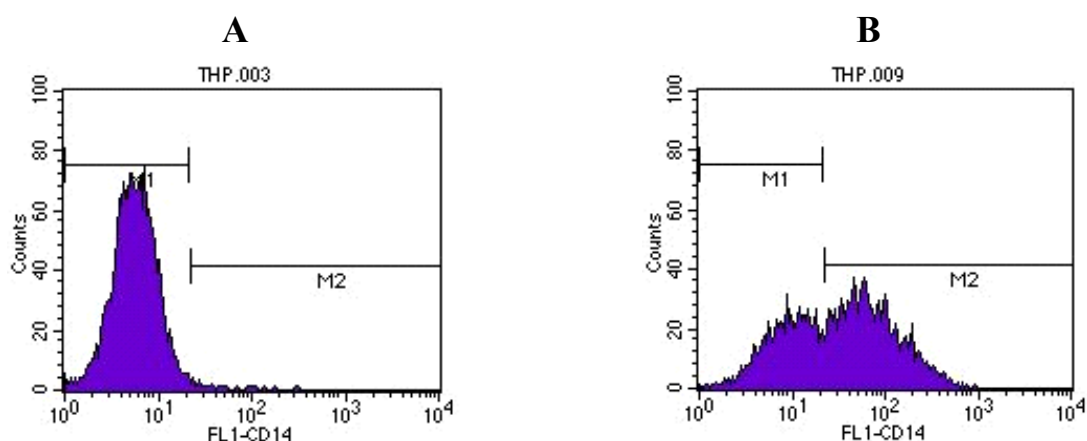


Abb. 22: Durchflusszytometrische Untersuchung der CD14-Expression in THP-1-Zellen. (A) unbehandelte und (B) TPA-behandelte ( $8 \text{ nM}$ , 72 h) THP-1-Zellen gefärbt mit FITC-anti-CD14. Dargestellt sind die Histogramme repräsentativer Einzelproben, wobei nur die lebenden Zellen (Propidiumjodid-negativ) ausgewertet wurden. FL1-H: Fluoreszenzintensität gemessen im FITC-Kanal (525 nm).

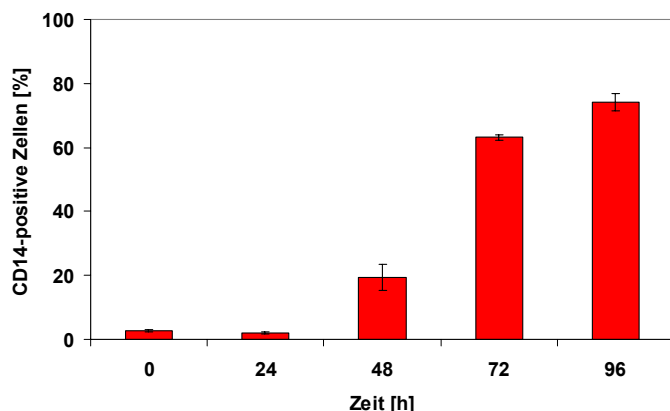


Abb. 23: Differenzierung von humanen THP-1-Zellen zu Makrophagen. THP-1-Zellen wurden 24 h, 48 h, 72 h und 96 h mit 8 nM TPA inkubiert. Der Anteil an CD14-positiven Zellen als Marker für Makrophagen wurde mit FITC-gekoppelten anti-CD14-Antikörpern und FACS Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils CD14-positiver Zellen aus 3 Experimenten  $\pm$  SEM.

Die IL-8-Freisetzung der Lungenepithelzelllinien BEAS-2B und A549, der makrophagenähnlichen THP-1-Zellen sowie der Kokulturen aus Epithelzellen und Makrophagen wurde nach 24 h Exposition mit der Flugasche MAF02 ohne/mit LPS untersucht (Abb. 24). Als Positivkontrolle wurden die Epithelzellen mit humanem TNF- $\alpha$  behandelt. Die Stimuli hatten bei den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt auf die Vitalität, die mit dem MTT-Test untersucht wurde (Daten nicht gezeigt). MAF02 allein induzierte keine IL-8-Freisetzung weder in den Epithelzellen noch in den Makrophagen. Die Behandlung mit 1  $\mu$ g/ml LPS induzierte bei den Epithelzellen eine moderate Erhöhung der IL-8-Konzentration, bei den THP-1-Zellen jedoch eine deutliche Erhöhung von 0,04 ng/ml auf 1,3 ng/ml nach 24 h. Die IL-8-Produktion wurde weiter erhöht auf 2,2 ng/ml, wenn die THP-1-Zellen zusätzlich mit 20  $\mu$ g/ml MAF02 behandelt wurden. Diese Behandlung, LPS und MAF02, induzierte in der Kokultur mit BEAS-2B-Zellen einen Anstieg auf 3,9 ng/ml (Abb. 24 A) und auf 5,3 ng/ml in der Kokultur mit A549-Zellen (Abb. 24 B). Zum Vergleich bewirkte die Behandlung von 1 ng/ml TNF- $\alpha$  die Sekretion von 6,7 ng/ml IL-8 in BEAS-2B-Monokulturen und von 9,5 ng/ml in A549-Monokulturen.

### 3.6. Kokulturversuche mit Rattenzellen

Abb. 25 zeigt die Nitritproduktion nach 24-stündiger Inkubation verschiedener Zellzahlen von NR8383 in Mono- und in Kokultur mit RLE-6TN-Epithelzellen mit 0,1 und 1  $\mu$ g/ml LPS. LPS induziert in NR8383-Zellen einen starken Anstieg der Nitritkonzentration, während die RLE-Zellen mit LPS nicht zur Freisetzung von Nitrit stimulierbar waren. Die Nitritkonzentration steigt mit der Anzahl der NR8383-Zellen und sie wird synergistisch erhöht in der Kokultur mit RLE-Zellen. In den folgenden Kokulturexperimenten wurden 35.000 NR8383-Zellen auf den RLE-Monolayer ausgesät. Nach Exposition mit 0,1  $\mu$ g/ml LPS für 24 h produzierten die Zellen 6,5  $\mu$ M Nitrit in der Kokultur, jedoch nur 2,5  $\mu$ M Nitrit in der Monokultur.

Die Nitritfreisetzung von RLE-6TN und NR8383-Zellen in Mono- und Kokultur nach Exposition mit 10  $\mu$ g/ml MAF98 Flugasche ohne/mit 0,1  $\mu$ g/ml LPS ist in Abb. 26 gezeigt. Die Flugasche allein induzierte keine Nitritbildung, weder in den Monokulturen, noch in der Kokultur. Die LPS-induzierte Nitritfreisetzung in der Kokultur der Epithelzellen mit den Makrophagen wurde weiter gesteigert durch zusätzliche Behandlung mit niedrigen Flugaschekonzentrationen (von 5,9 auf 8,5  $\mu$ M), jedoch nicht in der NR8383-Monokultur.

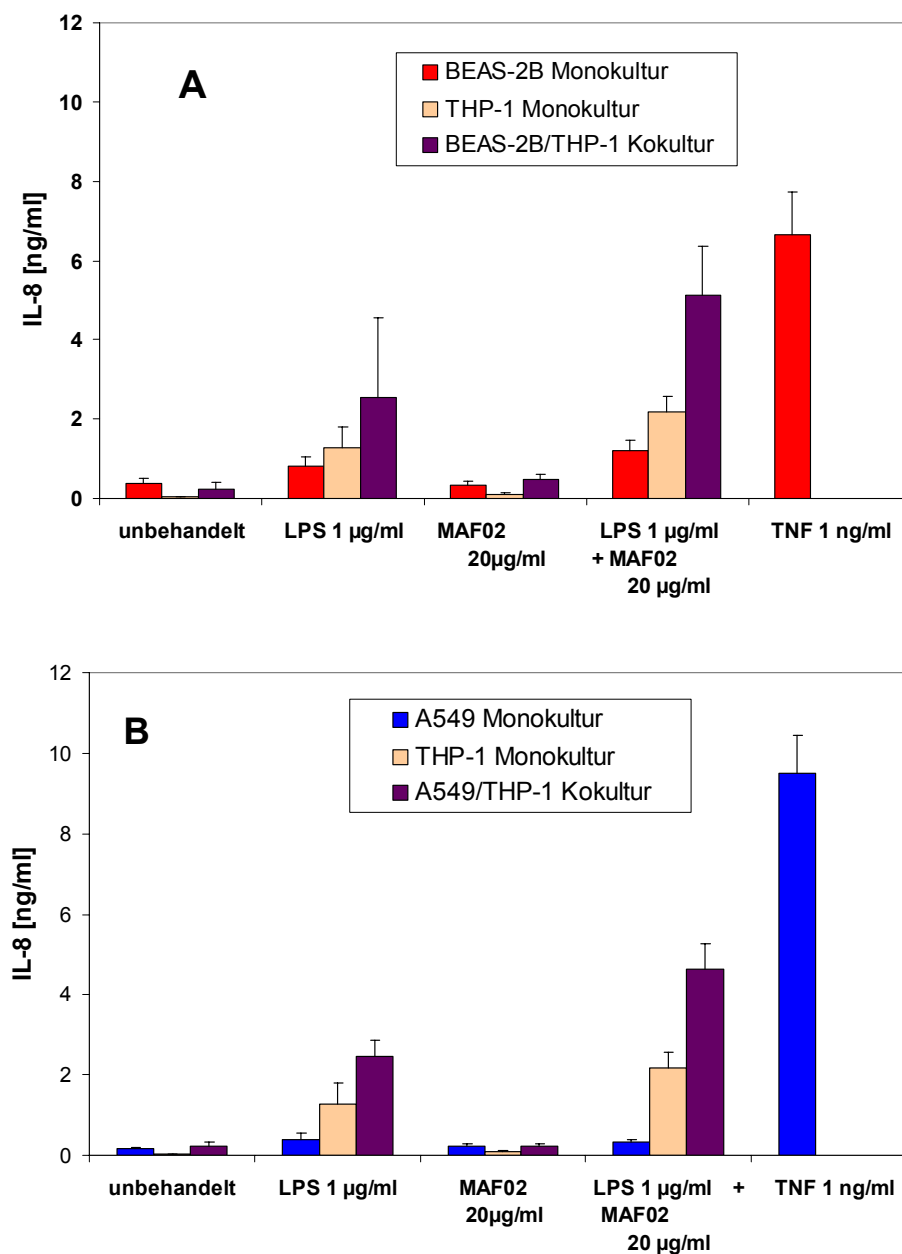


Abb. 24: IL-8-Freisetzung aus BEAS-2B, A549 und differenzierten THP-1-Zellen in Mono- und Kokulturen nach Exposition mit MAF02-Flugasche ohne/mit LPS. Für die Kokulturen wurden 30.000 THP-1-Makrophagen auf die konfluenten BEAS-2B- (A) oder A549-Monolayer (B) ausgesät. Die Zellen wurden mit 20 µg/ml MAF02 ohne/mit 1 µg/ml LPS für 24 h exponiert. Die Behandlung der Epithelzellen mit 1 ng/ml TNF-α diente als Positivkontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von 3 bis 4 Experimenten ±SEM ausgedrückt.

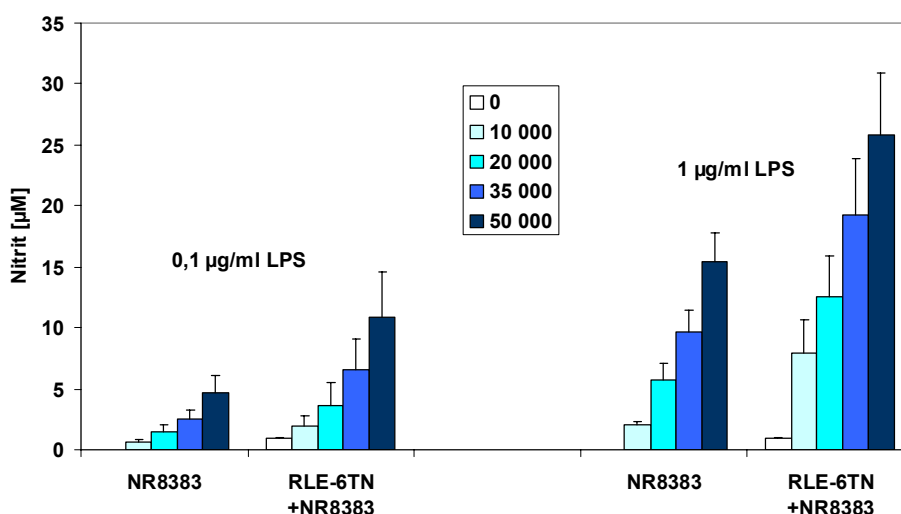


Abb. 25: LPS-induzierte Nitritbildung in NR8383-Makrophagen in Monokultur oder in Kokultur mit RLE-6TN-Zellen in Abhängigkeit von der Makrophagen-Zellzahl. Die NR8383-Zellen wurden in der Monokultur in der gleichen Zellzahl wie in der Kokultur ausgesät und 24 h mit 0,1 oder 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten  $\pm\text{SEM}$ .

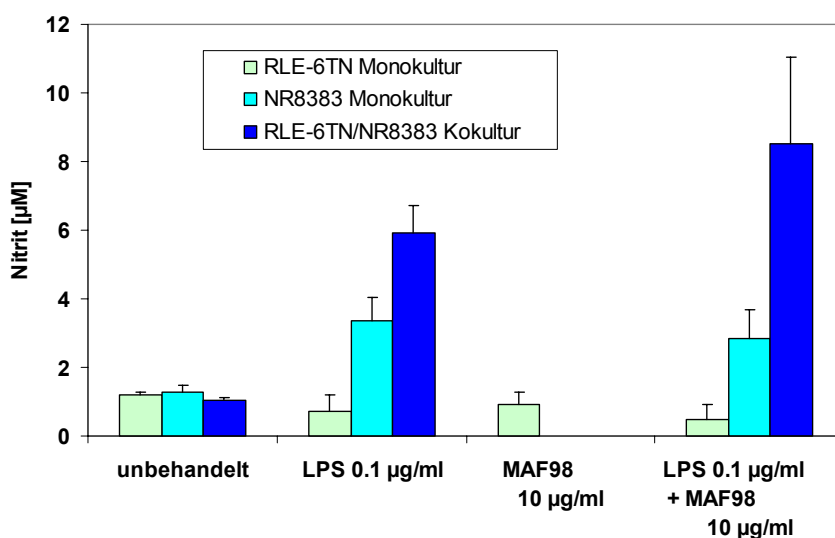


Abb. 26: Nitritfreisetzung aus RLE-6TN- und NR8383-Zellen in Mono- und Kokultur nach Exposition mit MAF98 Flugasche ohne/mit LPS. Für die Kokultur wurden 35.000 NR8383-Zellen auf den RLE-Monolayer ausgesät. Die Zellen wurden mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Partikeln ohne/mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS für 24 h exponiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten  $\pm\text{SEM}$ .

Die Freisetzung des Zytokins MIP-2 aus RLE-6TN- und NR8383-Zellen in Mono- und Kokultur ist in Abb. 27 gezeigt. Für die Messung wurde das Medium aus dem gleichen Experiment wie für die Nitritmessungen verwendet (Abb. 26). Flugasche allein induzierte keine nachweisbare MIP-2-Bildung in den Mono- und Kokulturen. LPS bewirkte in den RLE-Zellen einen moderaten Anstieg der MIP-2-Konzentration von 0,08 auf 0,36 ng/ml. Der basale Level der LPS-induzierten MIP-2-Bildung in NR8383-Zellen von 8,7 ng/ml wurde in der Kokultur mit RLE-Zellen auf 20,9 ng/ml erhöht. Die MIP-2-Konzentration in der



Kokultur erhöhte sich weiter auf 25,8 ng/ml, wenn die Zellen zusätzlich mit 10 µg/ml MAF98 behandelt wurden. Die Inkubation mit 20 ng/ml TNF- $\alpha$  induzierte weder in den Monokulturen, noch in der Kokultur einen signifikanten MIP-2-Anstieg im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

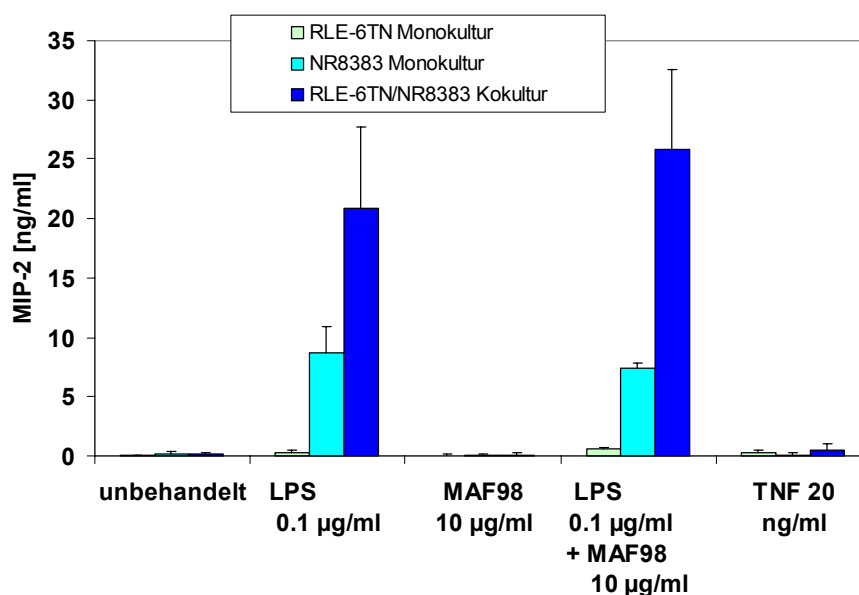


Abb. 27: MIP-2-Freisetzung aus RLE-6TN- und NR8383-Zellen in Mono- und Kokultur nach Exposition mit MAF98 Flugasche ohne/mit LPS. Für die Kokultur wurden 35.000 NR8383-Zellen auf den RLE-Monolayer ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 µg/ml Partikeln ohne/mit 0,1 µg/ml LPS für 24 h exponiert. Die Behandlung mit 20 ng/ml Ratten-TNF- $\alpha$  diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten  $\pm$ SEM.

### 3.7. Biologische Effekte verschiedener Flugasche-Größenklassen

Um die Hypothese der ultrafeinen Partikel weiter zu verfolgen, wurde das in der AEOLA resuspendierte Flugascheaerosol MAF02 mit einem Berner-Impaktor in verschiedene Größenklassen aufgetrennt und diese für Toxizitätsstudien in Submerskultur mit BEAS-2B-Zellen eingesetzt. Abb. 28 zeigt die Massenverteilung der verschiedenen Größenklassen einer repräsentativen Probe. Die Partikelgrößen von 1–8 µm (Stufen 5 – 7) repräsentieren 80% der Partikelmasse, während der Modalwert der Partikelgrößenverteilung bezogen auf die Partikelanzahl bei 300 nm liegt, gemessen mit dem SMPS (scanning mobility particle sizer). Die physikalischen als auch die chemischen Parameter (Daten der Elementanalyse nicht gezeigt) ähneln der Flugaschecharge MAF98 aus der gleichen Quelle.

Für die Toxizitätstests war von den Partikeln auf den Stufen 4 – 8 (> 0,5 µm) genügend Material vorhanden, nicht jedoch von den kleineren Partikeln. Zusätzlich wurden die Effekte mit der Fraktion, die bei Sichtung der Flugasche als Grobfraktion (> 20 µm) anfällt, verglichen. Bei der Konzentration 50 µg/ml konnte für die Partikel > 1 µm gezeigt werden, zeigt, dass die metabolische Aktivität, gemessen im MTT-Test, abnimmt, je kleiner die Partikel sind (Abb. 29). Bei der Stufe 4 (0,5 – 1 µm) scheint die Toxizität wieder abzunehmen und für die noch kleineren Partikel (Stufen 1 – 3) waren die Konzentrationen zu gering, um einen Effekt zu beobachten. Das inflammatorische Potential, gemessen als Freisetzung von IL-8, nahm mit kleiner werdender Partikelgröße zu (Abb. 30). Vergleicht man den Einfluss verschiedener Partikelgrößen auf die MTT-Aktivität bei 100 µg/ml, ist der Effekt noch ausgeprägter zu beobachten, allerdings wird kaum noch IL-8 wegen zu hoher Zytotoxizität gebildet (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse

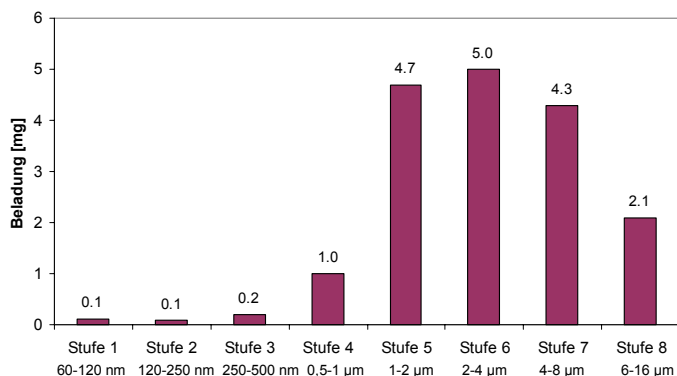


Abb. 28: Massenverteilung verschiedener Größenklassen der Flugasche MAF02, die mit einem Berner-Impaktor aufgetrennt wurde.

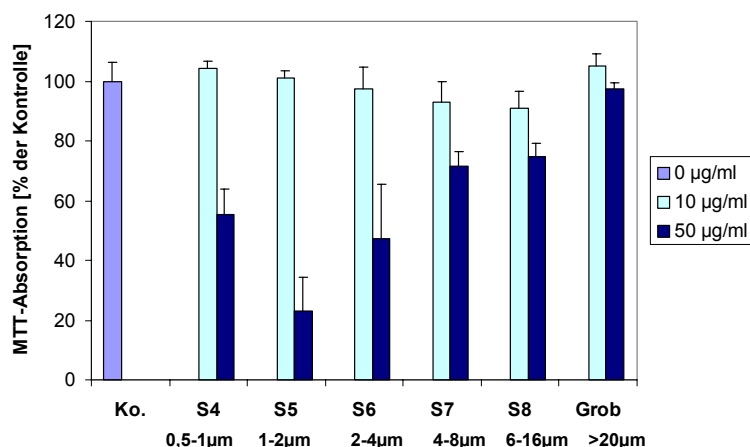


Abb. 29: Zytotoxizität der verschiedenen Größenklassen der Flugasche MAF02 in BEAS-2B-Zellen, gemessen mit dem MTT-Test. Mittelwerte aus 3-4 Experimenten  $\pm$  SEM.

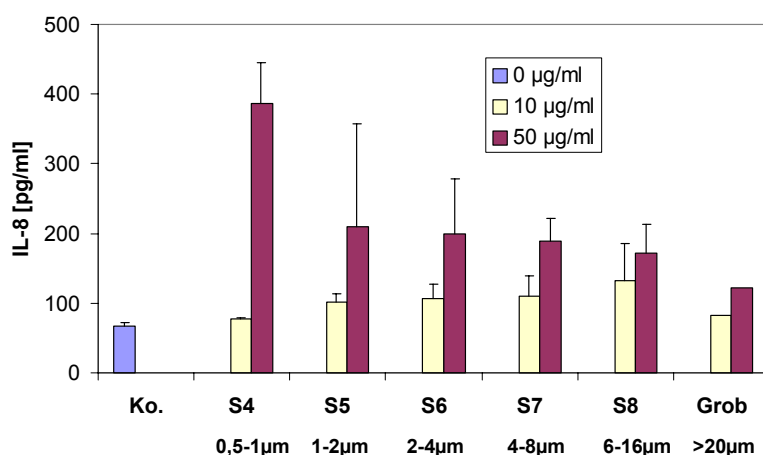


Abb. 30: Induktion der IL-8-Freisetzung in BEAS-2B-Zellen durch verschiedene Größenklassen der Flugasche MAF02. Mittelwerte aus 3-4 Experimenten  $\pm$  SEM.

### 3.8 Expositionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht

Für die Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht wurde in der AEOLA-Anlage ein definiertes Aerosol erzeugt. In der CULTEX-Expositionseinheit wurde das Aerosol an der Zellschicht vorbeigeführt, wo die Partikel durch Diffusions- und/oder Sedimentationsprozesse abgelagert wurden.

Die Depositionseffizienz wurde mit einem Testaerosol bestimmt, das aus Fluoreszein-Partikeln mit einem mittleren Durchmesser von 115 nm bestand (Mülhopt et al., 2004a, 2004b). Die Masse der auf der Membran abgelagerten Partikel wurde bestimmt, nachdem die Membranen gewaschen wurden und die Fluoreszenzintensität der Lösung am

## Ergebnisse

Fluoreszenzspektrometer gemessen wurde. Mit Hilfe von Fluoreszein-Standards wurde die Masse berechnet. Die Depositionseffizienz variierte zwischen 0 – und 10% der Masse, die während einer Zeiteinheit durch die Expositionseinheit strömte, in Abhängigkeit von der Zeit und des Volumenstroms. Nach einer Stunde Exposition bei 300 ml/min betrug die auf einer 24 mm Membran deponierte Masse 3,5 µg mit einer Standardabweichung von 11%. Das entspricht 1,5% der Masse, die während dieser Zeit die Membran passierte.

Die humane Zelllinie BEAS-2B wurde für die Expositionsexperimente eingesetzt, weil sie im Submersversuch am empfindlichsten auf Flugstaubexposition mit der Bildung von IL-8 reagierte. Um jedoch einen Effekt von deponierter Flugasche nachweisen zu können, war es zunächst notwendig zu zeigen, wie die Zellen die Expositionsbedingungen vertragen, d.h. Transport sowie Exposition an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht. Wie unter *in vivo* Bedingungen, muss sichergestellt werden, dass die Vitalität der Zellen durch Austrocknen nicht beeinträchtigt wird. Dazu muss das Wasser, das durch den Gasstrom verdunstet, ersetzt werden durch Befeuchtung über die Poren der Membran. Der Einfluss verschiedener Volumenströme wurde mit gefilterter Luft ohne zusätzliche Befeuchtung untersucht. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben nach der Exposition mit TNF- $\alpha$  behandelt, weil sich in den Versuchen in Submerskultur gezeigt hat, dass die TNF- $\alpha$ -induzierte IL-8-Produktion durch Flugstaub verstärkt wurde, und zwar schon bei niedrigen Konzentrationen (Abb. 12).

### Versuche mit 12 mm-Membranen

In einer ersten Versuchsserie wurden die kleinen CULTEX-Einheiten mit 12 mm Membranen eingesetzt. Der Volumenstrom wurde hier für eine Einheit geregelt und es wurde angenommen, dass sich der Volumenstrom auf alle Membranen gleichmäßig verteilt.

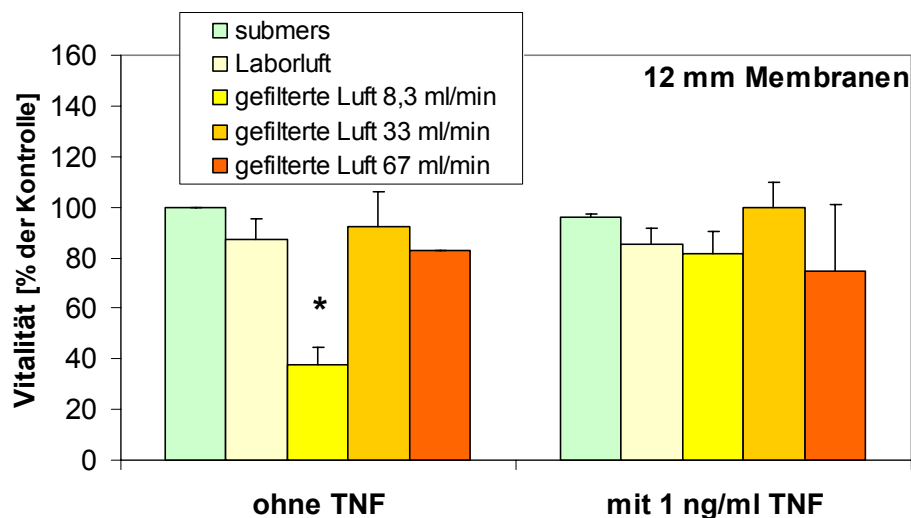


Abb. 31: Vitalität von BEAS-2B-Zellen nach Exposition mit gefilterter Luft in der kleinen CULTEX-Einheit bei verschiedenen Volumenströmen. Die konfluenten BEAS-2B-Zellen auf 12 mm Transwell-Membranen wurden bei den Volumenströmen 8,3, 33 und 67 ml/min pro Membran einer CULTEX-Einheit eine Stunde mit gefilterter Luft exponiert. Die Vitalität wurde 20 h nach der Exposition mit dem WST-1-Test bestimmt und ist relativ zur unbehandelten Submerskontrolle dargestellt. Bei dem mit \* gekennzeichnetem Balken handelt es sich um eine Position in der CULTEX-Einheit, bei der die Vitalität der Zellen aus ungeklärten Gründen beeinträchtigt war.

Abb. 31 zeigt, dass die Vitalität der BEAS-2B-Zellen in der kleinen CULTEX-Einheit durch die Volumenströme 8,3, 33, und 67 ml/min pro Membran und durch zusätzliche Behandlung mit TNF- $\alpha$  praktisch nicht beeinträchtigt wurde.

In Abb. 32 sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment mit Flugstaub-Aerosol dargestellt. Die Vitalität der Zellen, die durch Messung der PI-Einlagerung in die abgelösten Zellen (Abb. 32 A) bzw. durch Messung der LDH-Konzentration im Medium (Abb. 32 B) ermittelt wurde, wurde durch Exposition an der Luft, durch den Transport zur AEOLA (ca. 10 min) und durch die Exposition mit 50 mg/m<sup>3</sup> Flugstaubaerosol bei 100 ml/min pro Modul (d.h. 33 ml/min pro Membran) praktisch nicht beeinflusst. Auf einer Membran allerdings (hier die Probe „vor Zyklon, ohne TNF“) waren die Zellen in jedem Experiment stark beschädigt, was darauf hinweist, dass möglicherweise der Volumenstrom in einem Modul höher als in den anderen war. Auch die IL-8-Produktion (Abb. 32 C) in den nicht stimulierten und in den TNF- $\alpha$ -stimulierten Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede zur jeweiligen Submerskontrolle, wiederum mit Ausnahme der Probe „vor Zyklon, ohne TNF“, in der die Zellen niedrige Vitalität zeigten.

### Versuche mit 24 mm-Membranen

Bei der zweiten Versuchsserie mit 24 mm-Membranen wurde der Volumenstrom an jeder Membran der CULTEX-Einheit getrennt mit einem Mass Flow Controller geregelt. Damit wurde sichergestellt, dass alle Membranen gleichmäßig angeströmt werden. Abb. 33 zeigt die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit vom Volumenstrom, die 20 h nach der Exposition mit dem WST-1-Reagenz bestimmt wurde. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Submerskontrollen, die unbehandelt im Brutschrank standen und den Laborkontrollen, die ohne Medium im apikalen Kompartiment bei 37°C in Laborluft ohne Luftstrom exponiert wurden. Die Vitalität der Zellen, die zur AEOLA-Anlage transportiert und mit gefilterter Luft exponiert wurden, sank mit zunehmendem Volumenstrom. Bei den Zellen, die mit 100 ml/min pro Membran exponiert wurden, lag die Vitalität im Bereich der Kontrollen, d.h. der Transport zwischen Zelllabor und AEOLA und die Exposition an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht hatte keinen Einfluss. Dieser Volumenstrom wurde daher für den ersten Versuch mit Flugstaub-Aerosol gewählt. Das Flugstaub-Aerosol hatte keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen (Abb. 34).

## Ergebnisse

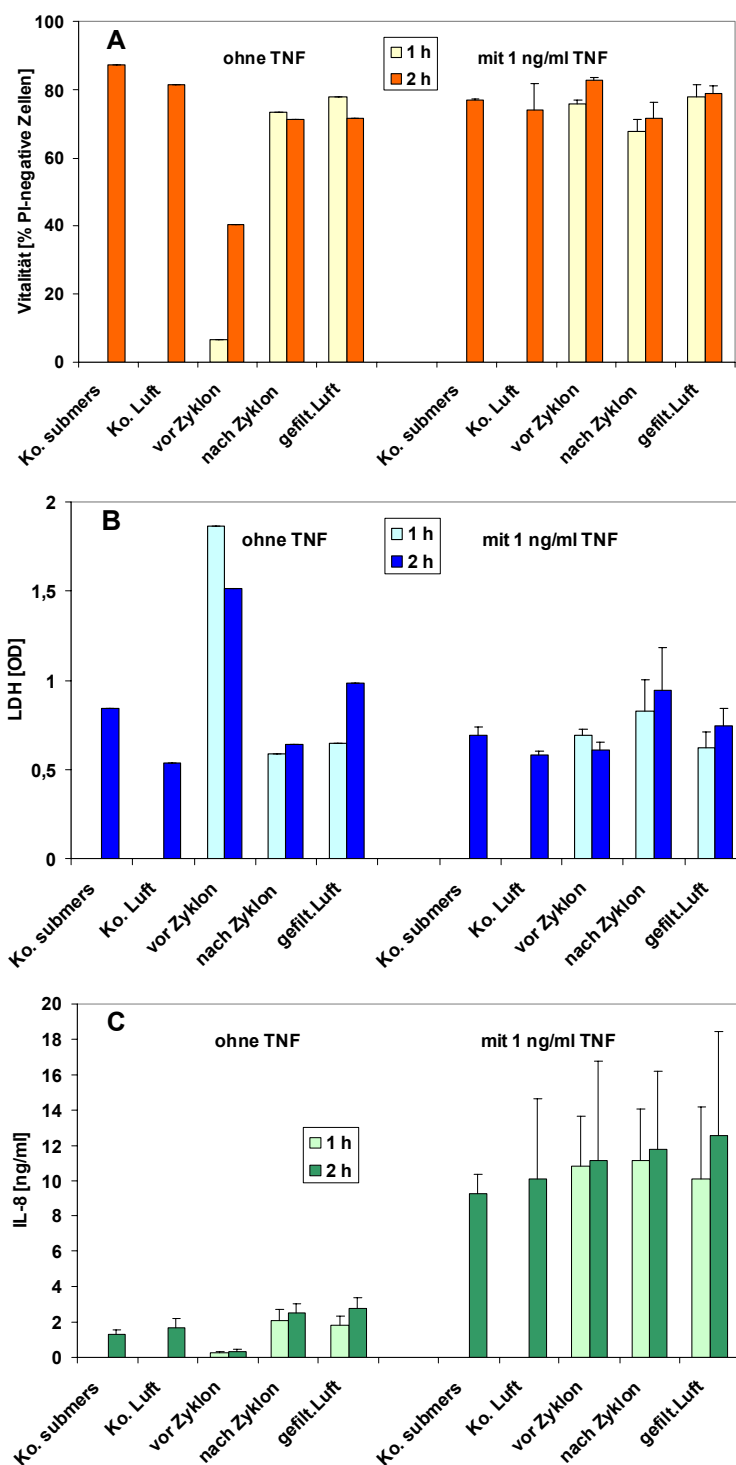


Abb. 32: Vitalität (A, B) und IL-8-Bildung (C) in BEAS-2B-Zellen, die mit Flugstaubaerosol MAF02 exponiert wurden. In der AEOLA-Anlage wurde ein Aerosol von 50 mg/m<sup>3</sup> erzeugt. Dieses Aerosol wurde entweder direkt (vor Zyklon), nach Abscheidung der Partikel > 1 µm (nach Zyklon) oder nach einem Absolutfilter (gefilterte Luft) bei einem Volumenstrom von 100 ml/min pro Modul (= 33,3 ml/min pro Membran) mit dem Zellrasen für 1 h und 2 h in Kontakt gebracht. Die Kontrollzellen blieben entweder unbehandelt im Brutschrank (Ko. submers) oder sie wurden wie die exponierten Zellen vorbereitet, d.h. oben kein Medium, unten Außenmedium, und für 2 h im Labor auf eine Wärmeplatte bei 37°C gestellt (Ko. Luft). Die Zellen wurden danach ohne/mit 1 ng/ml TNF-α für 20 h nachinkubiert. Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment mit 3 Parallelproben.



## Ergebnisse

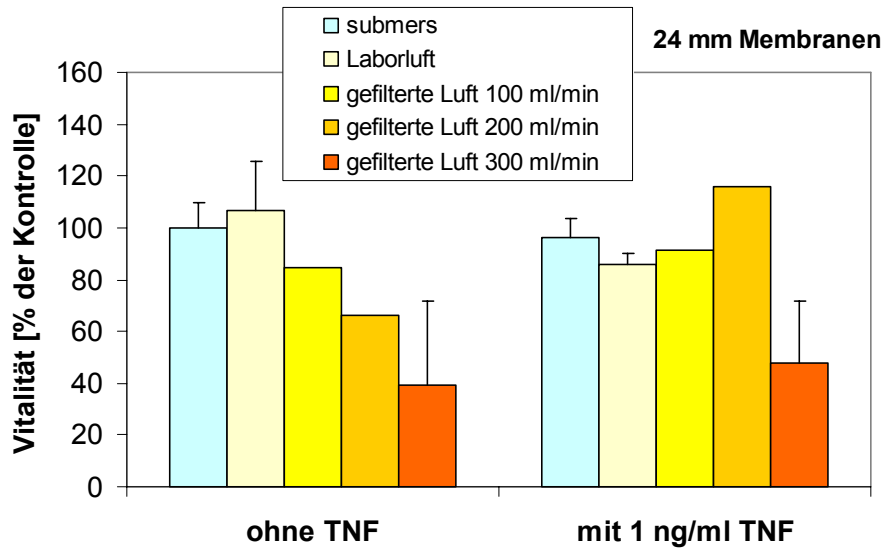


Abb. 33: Vitalität von BEAS-2B-Zellen nach Exposition mit gefilterter Luft in der großen CULTEX-Einheit bei verschiedenen Volumentrömen. Die konfluenten BEAS-2B-Zellen auf 24 mm Transwell-Membranen wurden bei den Volumentrömen 100, 200 und 300 ml/min pro Membran einer CULTEX-Einheit eine Stunde mit gefilterter Luft exponiert. Die Vitalität wurde 20 h nach der Exposition mit dem WST-1-Test bestimmt und ist relativ zur unbehandelten Submerskontrolle dargestellt.

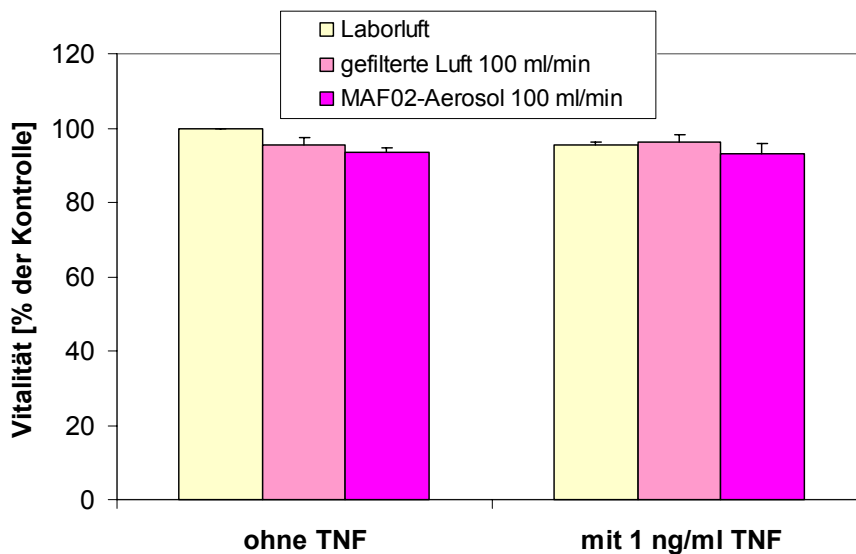


Abb. 34: Vitalität von BEAS-2B-Zellen nach Exposition mit gefilterter Luft und Flugstaub-Aerosol in der großen CULTEX-Einheit. Die konfluenten BEAS-2B-Zellen auf 24 mm Transwell-Membranen wurden bei 100 ml/min pro Membran eine Stunde exponiert. Die Vitalität wurde 20 h nach der Exposition mit dem AlamarBlue-Test bestimmt und ist relativ zur Laborkontrolle (Laborluft) dargestellt.

### 4. Diskussion

Durch Berechnung der Immissionskonzentrationen in der Umgebung von Müllverbrennungsanlagen konnte gezeigt werden, dass für die Bevölkerung durch die Emissionen der Anlagen kein gesundheitliches Risiko durch Inhalation besteht (Eikmann, 1994). In dieser Studie wurden Flugaschepartikel aus Hausmüllverbrennungsanlagen als Modell für potentielle ultrafeine Umweltstäube benutzt, um *in vitro* die biologischen Wirkungen in Lungenzellen in Abhängigkeit verschiedener Partikelparameter zu untersuchen. Da die verwendeten Flugstäube sehr wenig Kohlenstoff enthalten (ca. 1%), sind sie somit ein Modell für den anorganischen Teil der Umweltstäube. In verkehrsreichen Regionen werden im Schwebstaub bis zu 40% elementarer Kohlenstoff und organische Verbindungen beobachtet, während dieser Anteil in ländlichen Regionen bei ca. 20% liegt (Kappos et al., 2003).

Neben den Flugstäuben wurden verschiedene Partikelsorten als Vergleich eingesetzt. Siliziumdioxid oder Silica ( $\text{SiO}_2$ ) existiert in kristalliner und amorpher Form. Der kristalline Quarz ist bekannt als eine toxische Partikelsorte, die in vielen Mineralien und Steinen enthalten ist und bei Arbeitern, die Quarzstaub eingeatmet haben, zu Silikose führte. Diatomen-Erde ist die natürliche Form von amorphem Silica. Diese Substanz wird von der Industrie in großen Mengen hergestellt (Aerosil<sup>®</sup>) und als Füllstoff für Farben, Papier, synthetischen Gummi u.a. verwendet. Carbon Black ist der Oberbegriff für die Familie der amorphen, kolloidalen Kohlenstoffpartikel. Diese Partikel werden ebenfalls in großen Mengen hergestellt und z.B. bei der Reifenherstellung verwendet. Ultrafeine Titandioxidpartikel ( $\text{TiO}_2$ ) werden z.B. in Sonnencremes zur UV-Absorption verwendet. Hämatit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) wird synthetisch hergestellt für eine neuartige Tumorthherapie. Die Partikel werden in magnetisierter Form in Tumoren eingebracht. Der partikelhaltige Bereich kann dann selektiv erwärmt werden, wobei die Tumorzellen absterben (Gneveckow et al., 2004).

Die Toxizität der Partikel oder Partikelkomponenten wurde *in vitro* mit lungenrelevanten Zelllinien sowohl submers als auch als Aerosol untersucht und mit den Wirkungen von synthetisch hergestellten ultrafeinen Partikel sowie Quarzstaub verglichen.

In den Studien zur Partikelaufnahme wurden vor allem ultrafeine Hämatitpartikel verwendet, weil diese im Licht- und Elektronenmikroskop gut erkennbar sind. Als Modell für alveoläre Epithelzellen vom Typ II, die als Targetzellen bei der Inhalation von Partikeln und bei entzündlichen Lungenschäden eine wichtige Rolle spielen, wurden in dieser Studie A549-Zellen verwendet. Typ II-Epithelzellen synthetisieren und sezernieren Surfactant und agieren als Stammzellen für den Ersatz von geschädigten Typ I-Epithelzellen, die den größten Teil der alveolären Lungenoberfläche bilden (Finkelstein et al., 1997). Trotz der Diskussion über eine mögliche Translokation von Partikeln durch die Luft-Blut-Barriere in der Lunge existieren nur wenige Studien zur Aufnahme von ultrafeinen Partikeln in Epithelzellen (Stearns et al., 2001; Stringer et al., 1996). Wir konnten mit Hilfe der Licht- und der Transmissionselektronenmikroskopie zeigen, dass ultrafeine Partikel ins Zytosol von alveolären Epithelzellen, wie z.B. den A549-Zellen, aufgenommen werden. Auf den Aufnahmen ist zu sehen, dass nicht alle aufgenommenen Partikel in einer Membran eingeschlossen sind. Daher kann zum exakten Mechanismus der Partikelaufnahme noch keine Aussage gemacht werden (Wottrich et al., 2004). Diese Beobachtungen wurden auch nach *in vivo* Exposition von Ratten mit ultrafeinen  $\text{TiO}_2$ -Partikeln gemacht (Kapp et al., 2004). In A549-Zellen, die mit ultrafeinen  $\text{TiO}_2$ -Partikeln exponiert wurden, konnten jedoch Partikelaggregate beobachtet werden, die an Membranen und Lamellarkörperchen gebunden waren (Stearns et al., 2001). Diese Arbeitsgruppe fand auch, dass eine Vorbehandlung der



Zellen mit Cytochalasin D, ein Hemmstoff der Aktinpolymerisation und damit der aktiven Aufnahme durch Phagozytose, nicht zur Verminderung der Partikelaufnahme führte. Der Mechanismus der Aufnahme von ultrafeinen Partikeln bleibt somit noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Aus der Beobachtung, dass die Hämatitpartikel intrazellulär von der apikalen zur basolateralen Plasmamembran der Epithelzellen gewandert sind, kann man schließen, dass die Partikel auf der basolateralen Seite die Zelle wieder verlassen könnten, durch die darunterliegende Basalmembran in die Endothelzellen der Blutgefäße eindringen und schließlich mit dem Blut zu anderen Organen gelangen könnten. Dies konnte *in vitro* noch nicht gezeigt werden, *in vivo* gibt es jedoch einige Hinweise darauf (Kreyling et al., 2002; Nemmar et al., 2002; Oberdörster et al., 2002).

### Einfluss von Partikeln auf die Vitalität von Zellen

Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungsbeziehungen mit in Medium resuspendierter Flugasche demonstrieren, dass Flugaschepartikel zytotoxisch sind und einen Einfluss auf Immunreaktionen von Lungenzellen haben, wobei die in Medium unlösliche Fraktion deutlich toxischer und wirksamer war als die lösliche Fraktion. Die wasserlösliche Fraktion enthält hauptsächlich Salze von Alkali- und Erdalkalimetallen, von denen erwartet wird, dass sie geringe biologische Wirkungen auslösen. Möglicherweise werden die toxischen Effekte der unlöslichen Fraktion durch Schwermetalle verursacht, die erst nach einiger Zeit oder erst bei saurem pH in den Lysosomen in Lösung gehen. Für Öl-Flugasche ROFA (Dreher et al., 1997) und Kohle-Flugasche CFA (Smith et al., 2000) wurde bereits gezeigt, dass die bioverfügbaren Übergangsmetalle Vanadium und Eisen dabei eine wichtige Rolle spielen.

In weitergehenden Versuchen, die hier nicht dargestellt sind, wurden zusätzliche Hinweise darauf gefunden, dass der durch Flugasche induzierte Zelltod in den Epithelzellen A549 und BEAS-2B typische Merkmale von Nekrose, nicht von Apoptose zeigte (Blindow, 2003):

- Mit steigender Flugasche-Konzentration erhöhte sich die LDH-Konzentration im Medium. Dies ist ein typisches Merkmal für eine Schädigung der Plasmamembran und damit für nekrotischen Zelltod.
- Im Annexin-Propidiumjodid-Test wurden nur geringe Mengen Annexin-positive (apoptotische) Zellen gefunden (3-5%), deren Anteil sich durch Partikelbehandlung nicht weiter erhöhte. Annexin bindet an Phosphatidylserin, das in frühen Apoptosestadien an der Außenseite der Plasmamembran erscheint, wobei die Membran noch intakt bleibt (PI-negativ).
- In partikelbehandelten Zellen konnte keine Spaltung von PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase) beobachtet werden. Ein typisches Zeichen von Apoptose ist die Spaltung dieses Proteins.
- In partikelbehandelten Zellen war keine Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8 nachweisbar. Die Aktivierung dieser Enzyme ist ein weiteres Kennzeichen von apoptotischen Zellen.

Allerdings wurde das mitochondriale Transmembranpotential  $\Delta\Psi$  in Abhängigkeit von der Zeit und der Partikeldosis zerstört. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ist eines von frühen Ereignissen, die nach Induktion der Apoptose folgen. In welchem Zusammenhang diese Beobachtung mit dem zytotoxischen Wirkungsmechanismus des Flugstaubes zu sehen ist, muss noch weiter untersucht werden.

### Einfluss von Partikeln auf die Bildung von pro-inflammatorischen Mediatoren

Bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen der Flugstäube reagierten die A549- und die BEAS-2B-Zellen mit der Freisetzung des Zytokins IL-8. Bei zusätzlicher Stimulierung mit TNF- $\alpha$  wurde dieser Effekt synergistisch verstärkt. In nicht-stimulierten NR8383-Makrophagen hatte die Flugasche keine Wirkung in Bezug auf die Bildung von TNF- $\alpha$  und MIP-2. In LPS-stimulierten Makrophagen bewirkte die Kostimulation mit Flugasche eine erhöhte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und MIP-2 verglichen mit der Kontrolle, die nur mit LPS behandelt wurde. Auch diese Effekte konnten fast ausschließlich auf die unlösliche Flugaschefraktion zurückgeführt werden. Bei der löslichen Fraktion zeigten sich erste Effekte erst bei 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Darüber hinaus wurde demonstriert, dass die TNF- $\alpha$ -induzierte Expression des Oberflächenproteins ICAM-1 auf BEAS-2B- und RLE-6TN-Zellen durch den Einfluss von Flugasche verstärkt wird.

Das von aktivierten Makrophagen freigesetzte TNF- $\alpha$  wirkt autokrin, verstärkt also die Makrophagenaktivierung, und parakrin, d.h. es induziert in benachbarten Epithel- und Endothelzellen die Expression weiterer Zytokine sowie Oberflächenproteine, an denen weitere Entzündungszellen aus dem Blut andocken können. Die Chemokine IL-8 bzw. MIP-2, die chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken, sorgen dafür, dass die Immunzellen entlang des Konzentrationsgradienten zum Ort der Gefährdung gelangen. Eine Erhöhung dieser beiden Parameter über das normale Maß würde also eine stärkere Entzündungsreaktion bewirken, was gleichzeitig bedeutet, dass mehr gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird.

Flugasche allein war nicht in der Lage, NR8383-Makrophagen zur Bildung von NO anzuregen, allerdings wurde die LPS-induzierte Bildung von NO, gemessen als Nitrit, durch gleichzeitige Exposition mit Flugasche reduziert. Hierbei muss jedoch noch untersucht werden, ob der Hemmeffekt auf der Ebene der iNOS-Enzymexpression oder auf Ebene der Enzymaktivität erfolgt. Das gebildete NO-Radikal dient u.a. dazu, eingedrungene Mikroorganismen abzutöten. Wenn die NO-Produktion gehemmt wird, können sich die Mikroorganismen leichter ausbreiten und damit ebenfalls zur Verschlimmerung einer Erkrankung führen.

Diese Ergebnisse sind experimentelle Belege für die Beobachtung in epidemiologischen Studien, dass bei erhöhten Schwebstaubkonzentrationen insbesondere empfindliche Personen, z.B. an chronischer Bronchitis erkrankte, von einem erhöhten Risiko für Gesundheitsgefährdung betroffen sind. Chronische Entzündungen können schwerwiegendere Folgen auslösen, wie z.B. fibrotische Veränderungen, genotoxische (Tumorbildung) sowie lungenzerstörende Prozesse (Emphysem).

### ROS

Die Phagozytose von Partikeln und die Produktion von ROS als Abwehrreaktion sind die Hauptaufgaben der Makrophagen. Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass auch Epithelzellen in der Lage sind, Partikel aufzunehmen. Wenn das körpereigene Antioxidanzsystem keinen adäquaten Schutz bietet, kann eine übermäßige Bildung von ROS zu DNA-Strangbrüchen, zur Peroxidation von Lipiden und zur Induktion von Entzündungsmediatoren führen.

Als Indikator für intrazellulären oxidativen Stress wurde die Oxidation von Fluoreszenzfarbstoffen, wie 2',7'-Dichlor-Dihydro-Fluoreszein ( $\text{H}_2\text{DCF}$ ) und Dihydrorhodamin (DHR) zu fluoreszierenden Verbindungen beobachtet. Zu den Spezies, die  $\text{H}_2\text{DCF}$  oxidieren, gehören Peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2\text{R}$ ,  $\cdot\text{OR}$ ,  $\cdot\text{HOCl}$  und  $\text{ONOO}^-$ , nicht jedoch  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . DHR wird durch  $\text{ONOO}^-$  und vor allem in den Mitochondrien oxidiert (Halliwell & Gutteridge, 1999). Wie in der Literatur angegeben, wurde 0,2  $\mu\text{M}$  TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) als Aktivator der Proteinkinase C als Positivkontrolle

verwendet. Durch diese Behandlung konnte jedoch bei diesen Untersuchungen nur eine geringe Reaktion beobachtet werden.

Die Flugasche induzierte nicht nur in NR8383-Makrophagen, sondern auch in RLE-6TN-, A549 und BEAS-2B-Epithelzellen intrazellulären oxidativen Stress, der durch Vorbehandlung der Zellen mit N-Acetylcystein (NAC) vollständig gehemmt werden konnte. NAC schützt die Zellen, indem es durch die Membran ins Zytosol eintritt und zu Cystein hydrolysiert wird, welches die Glutathion-Synthese stimuliert. Zusätzlich kann NAC direkt als Radikalfänger für verschiedene ROS/RNS, wie HOCl, ONOO<sup>-</sup>, ·O<sub>2</sub>R, ·OH, und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fungieren (Halliwell & Gutteridge, 1999). Es wurde auch berichtet, dass NAC die Aktivierung von NF-κB in verschiedenen Zelltypen unterdrückt (Rota et al., 2002).

Die Ursache für die Bildung von ROS kann entweder durch verstärkte Freisetzung aus Mitochondrien, durch Aktivierung der NADPH-Oxidase oder durch chemische Katalyse mit Eisenionen oder anderen Übergangsmetallen erfolgen. Übergangsmetalle katalysieren die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen, wie z.B. des schädlichen ·OH-Radikals, über die Fenton-Reaktion.

Durch Vorbehandlung der Partikel mit Desferrioxamin konnte die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies um ca. 40-70 % in Abhängigkeit vom Zelltyp reduziert werden. Desferrioxamin ist ein Chelatbildner, der mit Fe<sup>3+</sup> einen Komplex mit einer sehr hohen Stabilitätskonstanten von 10<sup>31</sup> bildet. Desferrioxamin chelatisiert auch andere Metalle, die in der Flugasche vorkommen, jedoch mit niedrigeren Stabilitätskonstanten. Für die Bildung von intrazellulären Oxidantien durch Flugasche wird daher vermutet, dass Eisen-III-Ionen eine wichtige Rolle spielen. Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtung, dass auch bei anderen Flugaschearten wie ROFA (Dreher et al., 1997) oder CFA (van Maanen et al., 1999) Übergangsmetalle einen wesentlichen Beitrag zur ROS-Bildung leisten. Allerdings wurde für Flugasche aus der Kohleverbrennung das mobilisierbare Eisen als Ursache für Oxidantienbildung identifiziert (Smith et al., 1998). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die an unlösliche Partikel gebundenen Eisenionen die Wirkungen auszulösen.

Für eine Beteiligung der Mitochondrien gibt es erste Hinweise, da eine Vorbehandlung der Zellen mit Rotenon, einem Inhibitor des Komplex-I der mitochondrialen Atmungskette, die Partikel-induzierte ROS-Bildung verminderte.

ROS und RNS sind von zentraler Bedeutung für pathophysiologische Mechanismen bei zahlreichen inflammatorischen Gewebeschädigungen, wie z.B. chronischen entzündlichen Erkrankungen der Lunge. Andererseits wurde kürzlich demonstriert, dass ROS und RNS bei der Signaltransduktion einer Vielzahl physiologischer Zellantworten modulierend eingreifen (Forman et al., 2002), was auch bei der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und der Expression bestimmter Oberflächenproteine eine Rolle spielen könnte.

So könnte z.B. die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) in Epithelzellen durch Flugasche-induzierte ROS moduliert werden. Nach Instillation von Quarz- und Titandioxidpartikeln in Mäuselungen wurde eine markante Induktion von ICAM-1 in Alveolarmakrophagen und Typ II-Alveolarepithelzellen beobachtet (Nario and Hubbard, 1997). Unsere Ergebnisse zeigen, dass zwar Flugasche allein nur einen geringen Effekt auf die ICAM-1-Expression in BEAS-2B- und RLE-6TN-Epithelzellen hatte, dass jedoch die TNF-α-induzierte ICAM-1-Expression durch Flugasche moderat verstärkt wurde.

### Kokulturversuche

Die Kokulturen bestehend aus Lungenepithelzellen und Makrophagen aus Mensch oder Ratte reagierten deutlich empfindlicher mit einer Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine als die jeweiligen Monokulturen nach Stimulation mit LPS. Die Zytokinfreisetzung wurde weiter verstärkt, wenn die Kokulturen zusätzlich mit niedrigen Dosen an Flugaschepartikeln

exponiert wurden. Die Hochregulation der Zytokinfreisetzung in den Kokulturen wird wahrscheinlich durch einen Synergismus der beiden Zelltypen verursacht. Da Makrophagen mit Epithelzellen auch in der Lunge in engem Kontakt stehen, stellt die Kokultur ein realistischeres Zellsystem dar als die jeweiligen Monokulturen. Diese Zellsysteme wären somit auch als Testsystem für Experimente mit Aerosol geeignet, bei denen mit niedrigen Partikeldosen zu rechnen ist.

Drumm et al. (2000) stellten fest, dass humane Lungenepithelzellen (BEAS-2B) eine erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine nach Partikelexposition (Ruß) zeigten, wenn sie mit primären Blut-Monozyten kokultiviert wurden. Diese Daten demonstrieren, dass die Interaktion zwischen Makrophagen und Epithelzellen eine wichtige Rolle bei der inflammatorischen Antwort nach Partikelinhalation spielen und dass die Kokulturen ein brauchbares und sensitives *in vitro* Modell für die Untersuchung der biologischen Effekte von Partikeln sind.

Um die Wechselwirkung der in der Realität benachbarten Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelzellen zu berücksichtigen, wurden Versuche mit Kokulturen aus beiden Zelltypen durchgeführt (Voelkel et al., 2003, Diabaté et al. 2004). Die Zusammensetzung der Alveolarmakrophagen-Zelllinie (NR8383) und der Alveolarepithelzelllinie aus der Ratte (RLE-6TN) zeigte, dass die Freisetzung der LPS-induzierten Zytokine MIP-2 und TNF- $\alpha$  sowie von Nitrit nach Flugascheexposition synergistisch erhöht war verglichen zur den jeweiligen Monokulturen. Ähnliche Effekte wurden von (Tao & Kobzik, 2002) beobachtet, die RLE-6TN-Zellen und primären Alveolarmakrophagen aus der Ratte als Kokultursystem verwendeten und dieses mit TiO<sub>2</sub>- und Quarzpartikeln exponierten. Die Verstärkung der Zytokinbildung war jedoch nicht nachweisbar, wenn die Zellen physikalisch durch eine poröse Membran getrennt waren, sondern nur dann, wenn sie direkten Kontakt hatten.

### Biologische Effekte verschiedener Partikel-Größenklassen

Der Einfluss der Partikelgröße, insbesondere der ultrafeinen Fraktion (UFP) auf biologische Endpunkte, ist eine aktuelle Hypothese, die von verschiedenen experimentellen Ergebnissen unterstützt wird. Bei Inhalationsversuchen mit Ratten verursachten die ultrafeinen Partikel stärkere Entzündungsreaktionen als größere Partikel gleicher chemischer Zusammensetzung (Oberdörster et al., 1994). In eigenen Arbeiten mit synthetisch hergestellten Partikeln wurde demonstriert, dass monodisperse Suspensionen des chemisch inerten Silicasols der Größen 40 und 60 nm in Bezug auf Zytotoxizität und Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 deutlich wirksamer waren als die größeren Partikel des gleichen Materials (Wottrich et al., 2004). Die für dieses Projekt verwendeten Flugaschepartikel enthalten UFP, also ist es auch möglich, dass diese zu den biologischen Wirkungen beitragen. Einen wichtigen Hinweis, dass auch bei realen Stäuben die kleineren Partikel wirksamer sind, wurde von Smith et al. (1998) geliefert. Am Beispiel von CFA wurde gezeigt, dass das unter physiologischen Bedingungen mobilisierbare Eisen vor allem in der Feinpartikel-Fraktion < 2,5  $\mu$ m enthalten war.

Auch mit realen Partikeln konnte die Rolle der ultrafeinen Partikelfraktion bei der Induktion von Entzündungsmechanismen aufgezeigt werden. Gilmour et al. (2004) trennten Kohle-Flugasche in ultrafeine (<0,2  $\mu$ m), feine (< 2,5  $\mu$ m) und grobe (>2,5  $\mu$ m) Partikelfractionen. Die feinen und die groben Partikel wurden mit Hilfe eines Zyklons vor der Abluftkontrolle eines Versuchsbrenners fraktioniert und auf Teflonfiltern gesammelt. Die ultrafeinen Partikel wurden durch Impaktion mit einem Berner Niederdruckimpaktor gesammelt. Auf der Basis gleicher Masse wurden die Partikel in Mäuselungen instilliert. Nach 18 h wurden die Lungen lavagiert und die Bronchoalveolarflüssigkeit auf Zelltypen, biochemische Marker und proinflammatorische Zytokine untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass die ultrafeinen Partikel einen höheren Einstrom von neutrophilen Granulozyten und höhere Zytokinkonzentrationen als die feinen und groben Partikel induzierten.

In dieser Studie wurde nach Auftrennung des Flugascheaerosols in verschiedene Größenklassen untersucht, ob die biologischen Wirkungen auch bei „realen“ Partikeln von der Größe abhängig sind. Für Partikel  $>1 \mu\text{m}$  konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität in BEAS-2B-Zellen bei den kleineren Partikeln stärker als bei den größeren war. Für die Freisetzung von IL-8 gilt dies sogar für Partikel  $>0,5 \mu\text{m}$ . Ob dies auch für die ultrafeinen Partikel gilt, konnte mit dieser Methode nicht untersucht werden, weil keine ausreichenden Mengen an ultrafeinen Flugaschepartikeln mittels Fraktionierung im Berner-Impaktor bereitgestellt werden konnten. Die Studien mit verschiedenen Größenfraktionen von Flugasche wurden nicht weiter verfolgt, weil inzwischen von Wittmaack et al. (2002) demonstriert wurde, dass ultrafeine Partikel durch Impaktion bei hohen Geschwindigkeiten in ihrer Morphologie verändert werden. In einer neuen geplanten Versuchsserie sollen die ultrafeinen Partikel nach Vorabscheidung der größeren Partikel im Impaktor als Aerosol direkt mit den Zellen an der Luft/Flüssigkeits-Grenzschicht in Kontakt gebracht werden. Dadurch soll die Veränderung der Partikel durch Impaktion und Resuspension in Medium vermieden werden. Die Exposition der Zellen mit Aerosol soll mit dem CULTEX-Expositionssystem durchgeführt werden.

Unsere Arbeitshypothese "Je kleiner die Partikel, desto stärker die Wirkung" konnte somit für die Feinfraktion von Flugaschepartikel bestätigt werden, noch nicht jedoch für die ultrafeinen Partikel. Eine stärkere biologische Wirkung der kleineren Partikel im Vergleich zu größeren Partikeln wurde bereits bei CFA beobachtet (Fisher et al., 1983; Smith et al., 1998), allerdings bis zu  $2,5 \mu\text{m}$  Partikelgröße. Als Begründung für die stärkere Wirkung der kleineren Partikel wird diskutiert, dass die bei Verbrennungstemperaturen flüchtigen Metalle Pb, Cd und Zn sowie organische Verbindungen in der Abkühlphase auf der Oberfläche der Aluminosilikatkerne kondensieren. Dabei werden beträchtliche Mengen vor allem auf den kleineren Flugaschepartikeln abgelagert, da diese ein größeres Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis als die größeren Partikel haben.

### **Expositionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht**

In den ersten Versuchen zur Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht wurde eine sogenannte „Voisin-Kammer“ eingesetzt. Dabei wurden die Transwell-Membranen mit den Zellen zusammen mit der Trägerplatte direkt in eine temperierte und befeuchtete Kammer gestellt, durch die das Aerosol strömt. In den mit Flugstaub exponierten Zellen konnten keine Veränderungen im Vergleich zur Luft-exponierten Kontrolle beobachtet werden, selbst bei hohen Partikelkonzentrationen und Expositionszeiten. Wir schlossen daraus, dass durch den Aufbau der Expositionskammer und die dadurch bedingte Strömungsphysik ein effektiver Zugang des Aerosols zu den Zellen möglicherweise verhindert wurde. Die horizontale Strömungsrichtung sowie die in einer Vertiefung sitzenden Zellen sind z.B. solche Merkmale, die eine Deposition von Partikeln behindern können. Aus diesem Grund wurde das Expositionssystem CULTEX der Fa. Vitrocell (Gutach) beschafft, das für Aerosolexpositionen entwickelt wurde (Aufderheide et al., 2001).

Die Experimente zur Exposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht im CULTEX-Expositionssystem zeigten, dass die Expositionsbedingungen an der Luft sowie der Transport vom Zelllabor zum Expositionssystem und zurück praktisch keinen Einfluss auf die Vitalität und die Funktion der Zellen hatten. Dies ist von großer Bedeutung, um mögliche Veränderungen durch Aerosolexposition detektieren zu können. Mit Flugstaub konnten bisher nur ausreichend viele Experimente mit den kleinen CULTEX-Modulen (12 mm Membran) durchgeführt werden. Die mit Flugstaub exponierten Zellen zeigten dabei kaum eine Verminderung der Vitalität und die TNF- $\alpha$  induzierte Zytokinfreisetzung schwankte zu stark, um konkrete Aussagen treffen zu können. Dies hatte unter anderem mit der offenbar nicht gleichmäßigen Verteilung des Volumenstroms auf die drei Eingänge eines Expositionsmoduls

zu tun (Mülhopt et al., 2003). Mit den großen CULTEX-Modulen (24 mm Membran) wurden erst wenige Versuche mit Flugstaub durchgeführt.

Es ist vorgesehen, erste Expositionen an realen Quellen auf dem Gelände des FZK (TAMARA) vorzunehmen, um die Transportwege für das Expositionssystem und die Zellen möglichst kurz zu halten.

### **5. Danksagung**

Die Autoren bedanken sich bei Sonja Mülhopt und Hanns-Rudolf Paur (Institut für Technische Chemie - Thermische Abfallbehandlung, ITC-TAB) für die Bereitstellung der Flugascheprobe sowie für die gute Zusammenarbeit bei den Expositionsversuchen mit Aerosol. Teile der Arbeiten wurden von Claudia Ball und Dirk Blindow durchgeführt.

Bei BWPLUS (Baden-Württemberg Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung) bedanken wir uns für die finanzielle Unterstützung.

## 6. Literatur

- Aufderheide, M. & Mohr, U. CULTEX--an alternative technique for cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne pollutants at the air/liquid interface. *Exp. Toxicol. Pathol.* 52, 265-270 (2000).
- Aufderheide, M., Knebel, J.W. & Ritter, D. A method for the in vitro exposure of human cells to environmental and complex gaseous mixtures: application to various types of atmosphere. *Altern. Lab Anim* 30, 433-441 (2002).
- Aufderheide, M., Knebel, J.W. & Ritter, D. An improved in vitro model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55, 51-57 (2003).
- Aufderheide, M., Knebel, J.W. & Ritter, D. An improved in vitro model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55, 51-57 (2003).
- Aufderheide, M., Ritter, D., Knebel, J.W. & Scherer, G. A method for in vitro analysis of the biological activity of complex mixtures such as sidestream cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53, 141-152 (2001).
- Blindow, D. Untersuchungen zur Vitalität und Inflammation humaner Lungenepithelzellen nach Exposition mit Flugasche und zum Mechanismus des Zelltodes. Diplomarbeit, Institut für Toxikologie und Genetik, Universität Karlsruhe (2003).
- Boland, S., Baeza-Squiban, A., Fournier, T., Houcine, O., Gendron, M.C., Chevrier, M., Jouvenot, G., Coste, A., Aubier, M. & Marano, F. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am. J. Physiol* 276, L604-L613 (1999).
- Brightbill, H.D. & Modlin, R.L. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology* 101, 1-10 (2000).
- Chandler, A.J., Eighmy, T.T., Hartlén, J., Hjelm, O., Kosson, D.S., Sawell, S.E., van der Sloot & H.A., Vehlow, J. The International Ash Working Group (IAWG): Municipal solid waste incinerator residues. *Studies in Environmental Science* 67, Elsevier Science B.V. Amsterdam (1997).
- Chen, F., Kuhn, D.C., Gaydos, L.J. & Demers, L.M. Induction of nitric oxide and nitric oxide synthase mRNA by silica and lipopolysaccharide in PMA-primed THP-1 cells. *APMIS* 104, 176-182 (1996).
- Devlin, R.B., Ghio, A.J. & Costa, D.L. Responses of inflammatory cells. In: *Particle-lung interaction*. (eds. Gehr, P. & Heyder, J.), Vol. 143, 473-489, New York: Marcel Dekker (2000).
- Diabaté, S., Mülhopt, S., Paur, H.R. & Krug, H.F. Pro-inflammatory effects in lung cells after exposure to fly ash aerosol via the atmosphere or the liquid phase. *Ann. Occup. Hyg.* 46, 382-385 (2002).
- Diabaté, S., Völkel, K., Wottrich, R. & Krug, H.F. Macrophages and epithelial cells in co-culture as sensitive targets for pulmonary toxicity assessment. In: *Effects of air contaminants on the respiratory tract - interpretations from molecules to meta analysis* (U. Heinrich ed.), pp. 233-243. Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart (2004).
- Diaz-Sanchez, D., Dotson, A.R., Takenaka, H. & Saxon, A. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J. Clin. Invest* 94, 1417-1425 (1994).
- Donnelly, L.E. & Barnes, P.J. Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 144-151 (2002).
- Dreher, K.L., Jaskot, R.H., Lehmann, J.R., Richards, J.H., Mcgee, J.K., Ghio, A.J. & Costa, D.L. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J. Toxicol. Environ. Health* 50, 285-305 (1997).
- Drumm, K., Attia, D.I., Kannt, S., Micke, P., Buhl, R. & Kienast, K. Soot-exposed mononuclear cells increase inflammatory cytokine mRNA expression and protein secretion in cocultured bronchial epithelial cells. *Respiration* 67, 291-297 (2000).



- Drumm, K., Messner, C. & Kienast, K. Reactive oxygen intermediate-release of fibre-exposed monocytes increases inflammatory cytokine-mRNA level, protein tyrosine kinase and NF-kappaB activity in co-cultured bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Eur. J. Med. Res.* 4, 257-263 (1999).
- Duffin, R., Gilmour, P.S., Schins, R.P., Clouter, A., Guy, K., Brown, D.M., MacNee, W., Borm, P.J., Donaldson, K. & Stone, V. Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression, and nuclear factor-kappaB activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176, 10-17 (2001).
- Eikmann, T. Environmental Toxicological Assessment of Emissions from Waste Incinerators. *Fresenius Environmental Bulletin* 3, 244-249 (1994).
- Finkelstein, J.N., Johnston, C., Barrett, T. & Oberdörster, G. Particulate-cell interactions and pulmonary cytokine expression. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 5, 1179-1182 (1997).
- Fisher, G.L., McNeill, K.L., Prentice, B.A. & McFarland, A.R. Physical and biological studies of coal and oil fly ash. *Environ. Health Perspect.* 51, 181-186 (1983).
- Forman, H.J., Torres, M. & Fukuto, J. Redox signaling. *Mol. Cell Biochem.* 234-235, 49-62 (2002).
- Ghio, A.J., Kim, C. & Devlin, R.B. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 162, 981-988 (2000).
- Gilmour, M.I., O'Connor, S., Dick, C.A.J., Miller, C.A. & Linak, W.P. Differential pulmonary inflammation and in vitro cytotoxicity of size-fractionated fly ash particles from pulverized coal combustion. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 54, 286-295 (2004).
- Gneveckow, U., Jordan, A., Scholz, R., Bruss, V., Waldofner, N., Ricke, J., Feussner, A., Hildebrandt, B., Rau, B. & Wust, P. Description and characterization of the novel hyperthermia- and thermoablation-system MFH 300F for clinical magnetic fluid hyperthermia. *Med. Phys.* 31, 1444-1451 (2004).
- Goldsmith, C.A., Imrich, A., Danaee, H., Ning, Y.Y. & Kobzik, L. Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health A* 54, 529-545 (1998).
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. University Press Oxford (1999).
- Heinrich, U., Mangelsdorf, I., Aufderheide, M., Boehncke, A., Melber, C., Rosner, G., Höpfner, U., Borken, J., Patyk, A., Pott, F., Roller, M., Schneider, K. & Voss, J.U. Durchführung eines Risikovergleichs zwischen Dieselmotoremissionen und Ottomotoremissionen hinsichtlich ihrer kanzerogenen und nicht-kanzerogenen Wirkungen. Bericht 2/99, Umweltbundesamt, Erich Schmidt Verlag Berlin.
- Hubbard, A.K., Thibodeau, M. & Giardina, C. Cellular and molecular mechanisms regulating silica-induced adhesion molecule expression in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 Suppl 1, 45-51 (2001).
- Hughes, L.S., Cass, G.R., Gone, J., Ames, M. & Olmez, I. Physical and chemical characterization of atmospheric ultrafine particles in the Los Angeles area. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1153-1161 (1998).
- Imrich, A., Ning, Y.Y., Koziel, H., Coull, B. & Kobzik, L. Lipopolysaccharide priming amplifies lung macrophage tumor necrosis factor production in response to air particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159, 117-124 (1999).
- Kapp, N., Kreyling, W., Schulz, H., Im Hof, V., Gehr, P., Semmler, M. & Geiser, M. Electron energy loss spectroscopy for analysis of inhaled ultrafine particles in rat lungs. *Microsc. Res. Tech.* 63, 298-305 (2004).
- Kappos, A., Bruckmann, P., Eikmann, T., Englert, N., Heinrich, U., Höpfe, P., Koch, E., Metz, N., Rauchfuss, K., Rombout, P., Schabronath, J., Schulz-Klemp, V., Spallek, M.F., Wichmann, H.E., Kreyling, W. & Krause, G.H.M. Bewertung des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes zur gesundheitlichen Wirkung von Partikeln in der Luft. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 8, 257-278 (2003).

- Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G. & Ziesenis, A. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, 1513-1530 (2002).
- Kröncke, K.D. Mechanisms and biological consequences of nitrosative stress. *Biol. Chem.* 384, 1341 (2003).
- Kröncke, K.D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 113, 147-156 (1998).
- Kröncke, K.D., Fehsel, K., Suschek, C. & Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1407-1420 (2001).
- Li, N., Wang, M., Oberley, T.D., Sempf, J.M. & Nel, A.E. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J. Immunol.* 169, 4531-4541 (2002).
- Li, X.Y., Brown, D., Smith, S., MacNee, W. & Donaldson, K. Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal. Toxicol.* 11, 709-731 (1999).
- Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305 (2002).
- Monn, C. & Becker, S. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM<sub>2.5</sub>) and coarse particles (PM<sub>10-2.5</sub>) in outdoor and indoor air. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155, 245-252 (1999).
- Mülhopt, S., Paur, H-R. & Seifert, H. Expositionsverfahren für einen lungenspezifischen Bioassay zur Bewertung industrieller Feinstpartikel-Emissionen. *BWPLUS-Zwischenbericht 2003*, <http://www.bwplus.fzk.de/> (2003).
- Mülhopt, S., Paur, H-R. & Seifert, H. Expositionsverfahren für einen lungenspezifischen Bioassay zur Bewertung industrieller Feinstpartikel-Emissionen. *BWPLUS-Zwischenbericht 2004*, <http://www.bwplus.fzk.de/> (2004a).
- Mülhopt, S., Paur, H-R. & Seifert, H. Exposure technique for a lung specific bioassay for the assessment of industrial ultra fine particle-emissions. In: 7<sup>th</sup> International Conference on Nanostructured Materials, June 20-24, 2004, Wiesbaden, S. 361 (2004b).
- Nario, R.C. & Hubbard, A.K. Localization of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lungs of silica-exposed mice. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 5, 1183-1190 (1997).
- Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L. & Nemery, B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411-414 (2002).
- Nevin, B.J. & Broadley, K.J. Nitric oxide in respiratory diseases. *Pharmacol. Ther.* 95, 259-293 (2002).
- Oberdörster, G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74, 1-8 (2001).
- Oberdörster, G., Ferin, J. & Lehnert, B.E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 5, 173-179 (1994).
- Oberdörster, G., Ferin, J. & Lehnert, B.E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 5, 173-179 (1994).
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W. & Cox, C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, 1531-1543 (2002).

- Oury, T.D., Day, B.J. & Crapo, J.D. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.* 75, 617-636 (1996).
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M.Y., Van Huffel, C., McNally, O., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., Chan, E.K., Ledesma, J., Roe, B., Clifton, S., Vogel, S.N. & Beutler, B. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol. Dis.* 24, 340-355 (1998).
- Pope, C.A. & Dockery, D.W. Epidemiology of particle effects. In: *Air pollution and health*, Holgate, S.T., Samet, J.M., Koren, H.S. & Manynard, R.L. (eds.) Academic Press, San Diego, 673-705 (1999).
- Pritchard, R.J., Ghio, A.J., Lehmann, J.R., Winsett, D.W., Tepper, J.S., Park, P., Gilmour, M.I., Dreher, K.L. & Costa, D.L. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollution exposure increase with the concentrations of associated metals 8, 457-477 (1996). *Inhal. Toxicol.* 8, 457-477 (1996).
- Rota, C., Bergamini, S., Daneri, F., Tomasi, A., Virgili, F. & Iannone, A. N-Acetylcysteine negatively modulates nitric oxide production in endotoxin-treated rats through inhibition of NF-kappaB activation. *Antioxid. Redox. Signal.* 4, 221-226 (2002).
- Salvi, S., Blomberg, A., Rudell, B., Kelly, F., Sandström, T., Holgate, S.T. & Frew, A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 159, 702-709 (1999).
- Salvi, S.S., Nordenhall, C., Blomberg, A., Rudell, B., Pourazar, J., Kelly, F.J., Wilson, S., Sandström, T., Holgate, S.T. & Frew, A.J. Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 161, 550-557 (2000).
- Samet, J.M., Dominici, F., Curriero, F.C., Coursac, I. & Zeger, S.L. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987- 1994. *N. Engl. J. Med.* 343, 1742-1749 (2000).
- Schlesinger, R.B. Toxicology of sulfur oxides. In: *Air pollution and health*, Holgate, S.T., Samet, J.M., Koren, H.S. & Manynard, R.L. (eds.), pp 587-602. San Diego, Academic Press (1999).
- Smith, K.R., Veranth, J.M., Hu, A.A., Lighty, J.S. & Aust, A.E. Interleukin-8 levels in human lung epithelial cells are increased in response to coal fly ash and vary with the bioavailability of iron, as a function of particle size and source of coal. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 118-125 (2000).
- Smith, K.R., Veranth, J.M., Lighty, J.S. & Aust, A.E. Mobilization of iron from coal fly ash was dependent upon the particle size and the source of coal. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1494-1500 (1998).
- Stadnyk, A.W. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* 8, 1041-1047 (1994).
- Stearns, R.C., Paulauskis, J.D. & Godleski, J.J. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 108-115 (2001).
- Stringer, B., Imrich, A. & Kobzik, L. Lung epithelial cell (A549) interaction with unopsonized environmental particulates: quantitation of particle-specific binding and IL-8 production. *Exp. Lung Res.* 22, 495-508 (1996).
- Tao, F. & Kobzik, L. Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. 26, 499-505 (2002). *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*
- van Maanen, J.M., Borm, P.J., Knaapen, A., van Herwijnen, M., Schilderman, P.A., Smith, K.R., Aust, A.E., Tomatis, M. & Fubini, B. In vitro effects of coal fly ashes: hydroxyl radical generation, iron release, and DNA damage and toxicity in rat lung epithelial cells. *Inhal. Toxicol.* 11, 1123-1141 (1999).
- Veronesi, B., Oortgiesen, M., Carter, J.D. & Devlin, R.B. Particulate matter initiates inflammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human bronchial epithelial cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 106-115 (1999).
- Voelkel, K., Krug, H.F. & Diabaté, S. Formation of reactive oxygen species in rat epithelial cells upon stimulation with fly ash. *J. Biosci.* 28, 51-55 (2003).

Wichmann, H.E., Spix, C., Tuch, T., Wolke, G., Peters, A., Heinrich, J., Kreyling, W.G. & Heyder, J. Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: role of particle number and particle mass. Res. Rep. Health Eff. Inst. 5-86 (2000).

Wittmaack, K. Impact and growth phenomena observed with sub-micrometer atmospheric aerosol particles collected on polished silicon at low coverage. Atmosph. Environ. 36, 3963-3971 (2002).

Wottrich, R. Zur toxikologischen Untersuchung ultrafeiner Partikel: Entwicklung und Einsatz eines realitätsnahen *in vitro* Lungenmodells. Dissertation, Institut für Toxikologie und Genetik, Universität Karlsruhe, FZKA 6899 (2003).

Wottrich, R., Diabaté, S. & Krug, H.F. Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. Int. J. Hyg. Environ. Health 207, 353-361 (2004).