

Thomas Zoller

Dr. med.

Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch phagozytierende Zellen. Entwicklung eines Modellsystems und Abschätzung des Gefährdungspotentials durch künstliche Mineralfasern

Geboren am 17. November 1970 in Freiburg im Breisgau

Reifeprüfung am 11.05.1990 in Eppelheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991 bis SS 1997

Physikum am 06.09.1993 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr Houston (USA), Durham (USA), Heidelberg

Staatsexamen am 02.12.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater Prof. Dr. med. W. J. Zeller

Nach heutigem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, daß freie Radikale das Sauerstoffs, freigesetzt durch Alveolarmakrophagen, größtenteils für die nach Inhalation von Stäuben wie z.B. Quarz oder Asbest entstehenden Folgeerkrankungen wie z.B. Fibrose oder Tumoren verantwortlich sind. Zur Abschätzung des von inhalierten Stäuben ausgehenden Risikos wurden bisher neben epidemiologischen Studien In-vivo-Experimente, zumeist an Nagetieren, oder In-vitro-Experimente an von Tieren gewonnenen Alveolarmakrophagen durchgeführt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem entwickelt, mit welchem durch Einsatz von zu Makrophagen ausdifferenzierten HL-60-Zellen (eine Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie) das Ausmaß der Radikalfreisetzung nach Exposition der Zellen gegenüber verschiedenen Stäuben quantitativ erfaßt werden kann. Die freigesetzten Radikale werden mittels der Chemilumineszenz (CL) detektiert. Durch Einsatz von Calcitriol in geeigneter Konzentration ließen sich Zellen gewinnen, die nach Stimulation mit Stäuben für die Durchführung der Experimente ausreichende Mengen an Sauerstoffradikalen freisetzen. Anhand weiterer Untersuchungen wurden folgende Parameter, die für die Optimierung des Modellsystems wichtig waren, untersucht: Zelldichte im Chemilumineszenz-Reaktionsansatz,

Verwendung von verschiedenen Puffern und Medien im Reaktionsansatz, Einfluß des pH-Indikators Phenolrot auf die Chemilumineszenz, Art der freigesetzten Sauerstoffradikale, Ethanolkonzentration während der Ausdifferenzierungsphase der HL-60-Zellen.

Weiterhin wurde die Chemilumineszenz nach Stimulation der ausdifferenzierten HL-60-Makrophagen (HL-60-M-Zellen) durch eine grobe sowie durch eine feine Quarzstaubprobe bestimmt; anschließend wurden dieselben Zellen in einem zweiten Versuchsschritt mit Phorbol-Myristat-Acetat stimuliert, um anhand der erneuten Radikalproduktion eventuelle Zellschädigungen aufzudecken. Zusätzlich wurde die Viabilität der Zellen nach 3-stündiger Inkubation bestimmt.

Die gewonnenen Ergebnisse wurden Ergebnissen gegenübergestellt, die mit Rinderalveolarmakrophagen gewonnen wurden. Eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse bei beiden Zellsystemen konnte festgestellt werden. Die feinkörnige Quarzfraktion wirkte in beiden Zellsystemen toxischer als die grobkörnige Quarzfraktion.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das entwickelte Modellsystem benutzt, um die Radikalfreisetzung durch HL-60-M-Zellen nach Exposition gegenüber einer Glaswolleprobe, drei Steinwolleproben, einer Krokydolithprobe sowie einer Erionitprobe zu bestimmen. Unmittelbar nach Exposition der HL-60-M-Zellen konnte ein steiler Anstieg der Chemilumineszenz beobachtet werden, der nach ca. 15 Minuten weitgehend abgeklungen war. Die höchste Radikalfreisetzung war jeweils nach Exposition der Zellen gegenüber Quarz zu beobachten. Die HL-60-M-Zellen setzen im Verhältnis zu Quarz (Positivkontrolle, als 100% gesetzt) etwa folgende Mengen an Sauerstoffradikalen (Maximum/Integral der CL-Kurve) frei: Code A 30%/60%, Code G 30%/50%, MMVF21 34%/55%, HT-N 45%/58%, Krokydolith 15%/8%, Erionit 60%/38%. Die gleichen Fasern wurden nach einer Vorinkubation von 3-6 Wochen (i.d.R. 4 Wochen) in physiologischer NaCl-Lösung noch einmal untersucht. Diese Vorinkubation sollte ggf. Hinweise auf die Biodurabilität/Biopersistenz der Fasern in vivo liefern. Hier war bei Code A- und Code G-Fasern ein deutlicher Abfall, bei allen anderen Fasern ein leichter Anstieg der Chemilumineszenz zu beobachten. Da sich der pH-Wert der NaCl-Lösung während der Dauer der Vorinkubation ändert, wurden zusätzlich Experimente durchgeführt, bei denen ausgewählte Faserstäube in pH-gepufferter Lösung bei pH 7,4 und pH 5,5 vorinkubiert wurden. Die gefundenen Ergebnisse deckten sich qualitativ mit denen, die mit in ungepufferter Lösung vorinkubierten Fasern gewonnen wurden. Aufgrund der geringen beobachteten Unterschiede können die Ergebnisse nach Vorinkubation mit einem Veronal-

Puffer pH 7,4 jedoch nur eingeschränkt verwertet werden; ein negativer Einfluß des verwendeten Puffers auf die Chemilumineszenzbestimmung kann nicht ausgeschlossen werden.

Viabilitätstests mit HL-60-M-Zellen nach Faserstaubexposition erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse.

Abschließend betrachtet, eignet sich die Methode der Chemilumineszenzbestimmung nach Exposition der HL-60-M-Zellen gegenüber Stäuben gut als Modellsystem zur schnellen und einfachen Bestimmung der nach Staubexposition von Makrophagen freigesetzten Radikalmenge.

Nach Exposition gegenüber KMF wurden Ergebnisse gewonnen, die sich mit den bisher in der Literatur teilweise vorhandenen Ergebnissen decken. In der vorliegenden Arbeit konnten darüber hinaus erstmals Unterschiede in der Bioreaktivität von KMF nach Vorinkubation bei neutralem und anderen pH-Werten beobachtet werden, was erste Hinweise auf die Langzeittoxizität nach Inhalation der KMF in der Lunge geben könnte. Naheliegend ist insbesondere der Einsatz des vorliegenden Modellsystems für Screening-Untersuchungen bei der Entwicklung neuer Fasertypen.