

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein
Technische Universität München

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt)

Untersuchung der Interaktion von eosinophilen Granulozyten und feinen und ultrafeinen Partikeln

Alexandra Feser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt
2. apl. Prof. Dr. J. T. M. Buters

Die Dissertation wurde am 06.10.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

I	Verzeichnis der Abkürzungen	6
1	Einleitung	8
1.1	Zusammenhang zwischen einem Anstieg der Kfz-bedingten Luftverunreinigung und der Häufigkeit atopischer Erkrankungen	8
2	Grundlagen	
2.1	Der eosinophile Granulozyt	10
2.1.1	Morphologie	10
2.1.2	Endogene Aktivierung von eosinophilen Granulozyten durch Mediatoren	11
2.1.3	Zytokin- und Lipidmediatorenproduktion durch eosinophile Granulozyten	13
2.1.4	Oberflächenrezeptoren auf eosinophilen Granulozyten	14
2.1.5	Eosinophile Granulozyten als Effektorzellen bei atopischen Erkrankungen	17
2.1.6	Exogene Stimuli der Eosinophilen-Aktivierung	20
2.2	Partikuläre Luftschadstoffe	22
2.2.1	Feine und ultrafeine Partikel	22
2.2.2	Organisch-chemische Bestandteile von Dieselrußpartikeln	25
2.2.3	Partikeldeposition im Respirationstrakt	27
2.2.4	Dieselrußpartikel als Adjuvans bei atopischen Erkrankungen	28
3	Zielsetzung	31
4	Material und Methoden	32
4.1	Verwendete Partikel	32
4.1.1	Diesel Standard SRM 1650a	32
4.1.2	Printex 90	32
4.1.3	Printex G	33
4.2	Herstellung der Partikel-Flüssigkeitsgemische	33

4.3	Charakterisierung der Probanden.....	33
4.4	Isolierung und Anreicherung peripherer eosinophiler Granulozyten	34
4.5	Kultivierung von primären humanen Keratinozyten	37
4.6	Stimulation von Eosinophilen und Keratinozyten mit feinen und ultrafeinen Partikeln (UFP)....	38
4.7	Bestimmung der Vitalität von Partikel-stimulierten eosinophilen Granulozyten.....	39
4.8	Vorstimulation der eosinophilen Granulozyten mittels GM-CSF	39
4.9	Morphologische Untersuchungen	40
4.9.1	Herstellung der Zytopräparate und Färbung nach Pappenheim	40
4.9.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	40
4.10	Chemotaxisassay mittels Transwell-Kammersystemen.....	41
4.11	Bestimmung von ECP im Fluoroimmunoassay (FEIA) und von GM-CSF, IL-18, MIP-3 α , IL-5, Eotaxin, RANTES und TARC im Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).....	43
4.12	Detektion des Zelloberflächenantigens CD11b mittels durchflusszytometrischer Methoden	43
4.13	Statistische Auswertung	44
5	Ergebnisse	44
5.1	Wirkung von feinen und ultrafeinen Schadstoffpartikeln auf humane eosinophile Granulozyten	44
5.1.1	Morphologische Untersuchungen	44
5.1.1.1	Lichtmikroskopie.....	44
5.1.1.2	Elektronenmikroskopie	46
5.1.2	Vitalitätsmessung von Partikel-exponierten eosinophilen Granulozyten	51

5.1.3	Einfluss von DEP, Printex G und Printex 90 auf die Migration von eosinophilen Granulozyten	52
5.1.4	Einfluss von DEP, Printex G und Printex 90 auf die Freisetzung von Granulaproteinen aus eosinophilen Granulozyten.....	53
5.1.5	Einfluss von Dieselrußpartikeln auf die CD-11b Aufregulierung von eosinophilen Granulozyten	57
5.2	Wirkung von feinen und ultrafeinen Schadstoffpartikel auf humane primäre Keratinozyten	57
5.2.1	Rasterelektronenmikroskopie	57
5.2.2	Freisetzung Eosinophilen-aktivierender Mediatoren durch Partikel-stimulierte Keratinozyten.....	63
5.3	Partikelinduzierter Crosstalk zwischen Keratinozyten und primären humanen eosinophilen Granulozyten	65
5.3.1	Vitalitätsstudien an mit Keratinozytenüberständen stimulierten Eosinophilen.....	66
5.3.2	Einfluss der Überstände von DEP, Printex G und Printex 90-stimulierten Keratinozyten auf die Chemotaxis von Eosinophilen.....	67
5.3.3	Einfluss der Überstände von DEP, Printex G und Printex 90-stimulierten Keratinozyten auf die Freisetzung von Granulaproteinen aus eosinophilen Granulozyten	69
5.3.4	Einfluss der Überstände von DEP-stimulierten Keratinozyten auf die CD-11b Hochregulierung von eosinophilen Granulozyten.....	72
5.4	Unterschiede zwischen Zellen von atopischen und nicht-atopischen Probanden	73
5.5	Untersuchungen zum auslösenden Agens der beobachteten Partikeleffekte	74
5.5.1	Vergleich der eingesetzten Partikel DEP, Printex G und Printex 90.....	74
5.5.2	Untersuchung Phenanthren- und Benz(a)pyren-stimulierter Keratinozyten	79
6	Diskussion	80
6.1	Bedeutung der direkten Interaktion von Eosinophilen mit Schadstoffpartikeln.....	80
6.2	Bedeutung der indirekten Aktivierung von Eosinophilen durch Schadstoffpartikel	85

6.3	Bedeutung des Einsatzes von Zellen atopischer oder nicht-atopischer Probanden in Bezug auf deren Interaktion mit Schadstoffpartikeln.....	92
6.4	Einfluss der organisch-chemischen Verbindungen auf der Dieselrußpartikeloberfläche.....	94
7	Zusammenfassung	97
8	Literaturverzeichnis	99
9	Danksagung	112
10	Lebenslauf	113
II	Anhang	114

I Verzeichnis der Abkürzungen

AD	Atopische Dermatitis
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin (bovine serum albumine)
CCR	Chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation
CS	Cell sorting
DEP	Diesel exhaust particles
ECP	Eosinophilic cationic protein
EDN	Eosinophil-derived neurotoxin
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbant assay
EPO	Eosinophilen-Peroxidase
EPX	Eosinophilic-derived neurotoxin
5-o-ETE	5-oxo-Eicosatetraensäure
FACS	Fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometer
FcεRI	Hoch-affiner Ig-E Rezeptor
FcεRII	Niedrig-affiner Ig-E Rezeptor
FcγRI	Hoch-affiner Ig-G Rezeptor
FcγRII	Niedrig-affiner Ig-G Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FEIA	Fluoroimmunoassay
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FL	Fluoreszein
GM-CSF	Granulocyte-makrophage colony-stimulating factor
h	Stunde(n)
HDMS	Hexamethyldisilazane
5-o-HETE	5-oxo-15-hydroxy-Eicosatetraensäure
HES	Hypereosinophiliesyndrom
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
MACS	Magnetic cell sorting
mAk	Monoklonaler Antikörper
MBP	Major basic protein
MCP	Makrophage chemo attractant protein
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MIP	Makrophage inflammatory protein
min	Minute
NIST	National Institute of Standards & Technology
PAF	Platelet-activating factor
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate buffered saline
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2a}	Prostaglandin F _{2a}
PM	Particulate matter
PMN	Polymorph nukleäre Granulozyten
RANTES	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
RAST	Radio-Allergo-Sorbent Test
RIA	Radioimmunoassay
ROS	Reaktive Sauerstoff (O ₂) Spezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
TARC	Thymus- and activation-regulated chemoine
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSP	Totals suspended particulates
TXA ₂	Thromboxan A ₂
UFP	Ultrafine particle
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA	Very late antigen

1 Einleitung

1.1 Zusammenhang zwischen einem Anstieg der Kfz-bedingten Luftverunreinigung und der Häufigkeit atopischer Erkrankungen

Der Straßen- bzw. Kraftfahrzeugverkehr bestimmt heute weitgehend das Bild der urbanen Zentren und Kulturlandschaften. Zwischen 1950 und 1990 stieg in der Bundesrepublik Deutschland die Nutzung des Kraftfahrzeugs im Personenverkehr um fast das 10fache auf 800 Mrd. Personenkilometer an (*Mersch-Sundermann und Haße 1997*). Nach neuesten Luftqualitätsmessungen durch die Europäische Kommission im Januar 2005 führten sehr hohe Konzentrationen von partikulären Luftschadstoffen zu annähernd 348.000 frühzeitigen Todesfällen in der EU im Jahre 2000, weshalb eine signifikante Reduktion der partikulären Luftschadstoffe zwischen 2000 bis 2020 angestrebt wird (*Pye und Watkiss 2005*).

Ein wesentlicher Bestandteil der Kfz-bedingten Luftverunreinigung ist der Feinstaub und hier insbesondere der von Dieselmotoren emittierte Ruß (*Wichmann 2007, Schwartz 1994*). Im Blickpunkt stehen derzeit vor allem Feinstäube mit einem Durchmesser kleiner als $0,1 \mu\text{m}$, die so genannten ultrafeinen Partikel. Ultrafeine Partikel entstehen besonders bei Verbrennungsprozessen und sind daher überwiegend anthropogener Natur. Die zunehmende industrielle Luftverschmutzung mit ultrafeinen Partikeln hat entsprechend neuester Untersuchungen großen Einfluss auf die Entwicklung und Exazerbation kardiopulmonaler Erkrankungen, wie zum Beispiel die koronare Herzkrankheit oder die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*Yue et al. 2007, Heinrich und Wichmann 2004, Maier et al. 2008*).

In den letzten Jahren wurde in vielen wissenschaftlichen Untersuchungen ein direkter Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Immissionen und Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis nachgewiesen (*Heinrich und Wichmann 2004*). So wurde 1987 in einer japanischen Studie erstmals dargelegt, dass in verkehrsbelasteten Gebieten signifikant höhere Prävalenzraten für Sensibilisierungen gegen Zedernpollen-Allergene im Vergleich zu wenig belasteten ländlichen Gebieten auftraten (*Ishizaki et al. 1987*). Bereits damals haben die Autoren die hohen Prävalenzen mit der Belastung durch Dieselrußpartikel in Zusammenhang gebracht. 1991/1992 fand sich in einer weiteren Studie an erwachsenen Asthmatikern in Erfurt eine signifikante Assoziation zwischen 5-Tages-Mittelwerten feiner

und ultrafeiner Partikel und der Verschlechterung von Asthma und Lungenfunktion (*Peters et al. 1998*). Im Jahre 2000 wurde bei Kindern, welche an Straßen mit hoher Verkehrsbelastung lebten, eine signifikante Assoziation zwischen der Ausprägung atopischer Erkrankungen und Kfz-bedingter Luftverschmutzung festgestellt (*Krämer et al. 2000*). Diese alarmierenden Ergebnisse konnten durch eine aktuelle wissenschaftliche Studie bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der Nähe des Wohnortes zur nächsten Hauptstraße und der Ausprägung von Atopischem Ekzem, Asthma bronchiale allergicum und Rhinokonjunktivitis allergica, wobei Kinder, welche weniger als 50 Meter von einer verkehrsbelasteten Hauptstraße lebten, besonders stark betroffen waren (*Morgenstern et al. 2008*). Darüber hinaus konnte von anderen Forschungsgruppen im Maus- Model, bei gleichzeitiger Allergenstimulation, eine gesteigerte Eosinophilenrekrutierung in der Lunge und eine Überempfindlichkeit der Luftwege durch Dieselrußpartikelinhalation nachgewiesen werden (*Takano H et al. 1998*).

Eosinophile Granulozyten sind in den Pathomechanismus von zahlreichen entzündlichen Prozessen, z.B. Parasiteninfektionen, Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, zu denen das Asthma bronchiale allergicum, die Rhinokonjunktivitis allergica und das atopische Ekzem zählen, und anderen Erkrankungen (z.B. Churg-Strauß-Syndrom, Hypereosinophiliesyndrom) involviert (*Plötz et al. 2001, La Force 1999, Gleich 2000, Ring et al. 2001*). Eosinophile migrieren ins Entzündungsgewebe und modulieren Immunantworten über verschiedene Wege, so zum Beispiel Antigen-Präsentation, Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und anderen Mediatoren, zudem agieren die als Effektorzellen (*Bousquet J et al. 1990, Gleich 1990, 2000*). Eosinophile werden über Rezeptoren für Zytokine, Immunglobuline und Komplement aktiviert. Sie setzen Zytokine (IL-2, -4, -5, -10, -12, -13, -16, 18, TNF α , β), Chemokine (RANTES, Eotaxin-1) und Lipidmediatoren (PAF, LTC₄) frei. (*Hogan 2007, Plötz et al. 2001*).

Der dargestellte Sachverhalt führte zu der Fragestellung, ob eosinophile Granulozyten, als Effektorzellen atopischer Erkrankungen, mit ultrafeinen oder feinen Partikeln direkt oder indirekt interagieren. Der erste Teil der experimentellen Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob Rußpartikel eosinophile Granulozyten direkt zur Chemotaxis, Freisetzung von Mediatoren oder Aufregulierung von Adhäsionsproteinen aktivieren können. Im zweiten Teil wird untersucht, ob andere Zellsysteme in die Interaktion von Eosinophilen und Schadstoffpartikeln eingebunden sind.

2 Grundlagen

2.1 Der eosinophile Granulozyt

2.1.1 Morphologie

Im Jahre 1879 entdeckte Paul Ehrlich einen Zelltypus, der sich mit dem sauren Anilinfarbstoff Eosin selektiv anfärben ließ (*Ehrlich 1879*). Diese Eigenschaft und die auffallende zytoplasmatische Granulation führten zu ihrer Benennung als eosinophile Granulozyten.

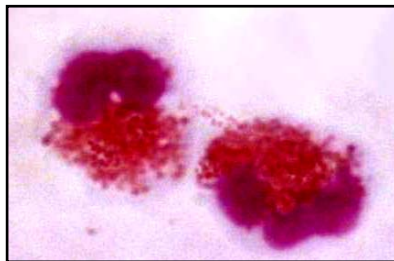


Abbildung 1: Aus peripherem Blut isolierte eosinophile Granulozyten: Zytospinpräparat; Pappenheimfärbung

Eosinophile Granulozyten sind runde bis ovoide Zellen mit einem Durchmesser von 12-15 μm . Lichtmikroskopisch erkennt man einen zweigelappten Kern und große bikonvexe azidophile Granula, wodurch eine Differenzierung von den polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten möglich ist. Morphologisch und biochemisch lassen sich drei Granulatypen unterscheiden:

Kleine, primäre und sekundäre Granula. „Kleine Granula“ enthalten die zwei Enzyme Arylsulfatase B und saure Phosphatase, diese Granula sind nur mit dem Elektronenmikroskop identifizierbar.

Die so genannten „primären Granula“ sind runde und elektronenoptisch uniforme Organellen, die im wesentlichen Lyso-phosphatase enthalten und nur während des Promyelozytenstadiums nachweisbar sind, da sie sich dann zu den „sekundären Granula“ weiterentwickeln.

Die „sekundären Granula“, auch „spezifische Granula“ genannt, sind für das besondere Färbeverhalten der eosinophilen Granulozyten verantwortlich. Sie besitzen einen elektronendichten, kristalloiden Kern (Core), welcher von einer weniger elektronendichten Matrix umgeben ist. Dieser Granulatyp enthält zum einen nichtenzymatische basische Proteine, die charakteristisch zwischen Matrix und Kern verteilt sind, zum anderen eine Reihe von Enzymen (*Bainton und Farquar 1970; Gleich und Adolphson 1986;*

Kroegel und Matthys 1992). Die Granulamatrix enthält die Eosinophilen-Peroxidase (EPO), das „Eosinophil-derived Neurotoxin“ (EDN) und das „Eosinophilic Cationic Protein“ (ECP), während das kristalloide Zentrum der Granula aus kristallisiertem Major Basic Protein (MBP) besteht. Diese verschiedenen granulären Proteine der Eosinophilen sind zytotoxisch und helminthotoxisch (*Spry 1988*) und zeigen zahlreiche Wirkungen, die von der Stimulation bis zur Zerstörung verschiedener Zellen reichen (*Bruijnzeel et al. 1992*).

In Granula, die keine kristalloiden Einschlüsse enthalten, sind hexagonale, bipyramidale Kristalle mit Lysophospholipaseaktivität, die so genannten Charcot-Leyden-Kristalle, lokalisiert (*Gleich et al. 1976; Leiferman 1991; Gleich et al. 1993*). Diese Kristalle wurden erstmals von den Ärzten *Jean Ch. Charcot* (1825-1893) in der Milz eines Leukämiepatienten (*Charcot 1860*) und dem deutschen Internisten *Ernst von Leyden* (1832-1910) im Sputum eines Asthmapatienten (*von Leyden 1872*) beschrieben. Ihre Rolle ist noch weitgehend unklar, eventuell stehen sie durch ihre enzymatische Aktivität in Zusammenhang mit der Atelektaseentstehung beim Asthma bronchiale allergicum (*Gleich et al. 1993*).

Die klassischen Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, freie Ribosomen und Mitochondrien sind im eosinophilen Granulozyten ebenfalls vorhanden, im Verlauf der Zellreifung nehmen sie an Größe und Zahl jedoch ab (*Bainton und Farquhar 1970*).

2.1.2 Endogene Aktivierung von eosinophilen Granulozyten durch Mediatoren

Eosinophile Granulozyten werden im Knochenmark unter dem Einfluss zahlreicher Differenzierungsfaktoren wie IL-3, IL-5 und GM-CSF gebildet (*Weller 1994*). Diese Zytokine hemmen außerdem auch die Apoptose eosinophiler Granulozyten (*Simon 1997*). Darüber hinaus stimulieren sie, wie auch TNF- α , zahlreiche Effektorfunktionen und führen zu einer Voraktivierung (Priming) der Zellen, die daraufhin eine verstärkte Chemotaxis nach Stimulation mit Chemokinen zeigen.

Eine besondere Bedeutung bei der Aktivierung von eosinophilen Granulozyten hat Interleukin-5 (IL-5), das von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, Mastzellen und Eosinophilen produziert wird (*Warren et al. 1995, Sanderson 1995*). So scheint IL-5 das wesentliche Zytokin zu sein, welches das Ausmaß der Produktion von Eosinophilen im Knochenmark bestimmt, wie es im Mausmodell nachgewiesen werden konnte (*Iwana et al. 1992, Metcalf et al. 1996*). Auch beim Menschen kam es

nach der Gabe von monoklonalen Anti-IL5-Antikörpern zu einem raschen und signifikanten Abfall Eosinophiler im peripheren Blut und Gewebe, wie von Plötz et al. bei Patienten mit hypereosinophilen Erkrankungen aufgezeigt wurde (Plötz et al. 2003). IL-5 beeinflusst weiterhin eine Reihe von Eosinophilenfunktionen, wie z.B. die Steigerung der Phagozytose (Lopez et al. 1998), der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität gegen Tumorzellen und Parasiten (Lopez et al. 1988), der Chemotaxis (Warringa et al. 1992), der Degranulation (Horie et al 1996), der Bildung von Entzündungsmediatoren wie LTC₄ (Takafuji et al. 1991) und der Sauerstoffradikalbildung („respiratory burst“) (van der Bruggen et al. 1993).

In den letzten Jahren rückte zusätzlich eine Gruppe von proinflammatorischen Botenstoffen in den Mittelpunkt des Interesses, die aufgrund ihrer chemotaktischen Eigenschaften Chemokine genannt wurden (Baggiolini et al. 1994, Kita und Gleich 1996). Zu ihnen zählen die CC-Chemokine (β -Subfamilie) mit ihren Vertretern RANTES, MIP-1 α , MCP-2, -3, -4, -5 und Eotaxin, welche eosinophile Granulozyten, nicht aber neutrophile Granulozyten zu aktivieren vermögen (Baggiolini et al. 1994). CCR1 und CCR3 stellen bislang identifizierte Chemokinrezeptoren auf Eosinophilen dar (Elsner et al. 1996).

Auch einige Lipidmediatoren sind bislang als Eosinophilen-aktivierende Substanzen identifiziert worden. Das Phosphatidylcholinderivat PAF, welches in der Lage ist die Degranulation und Chemotaxis Eosinophiler zu induzieren (Kroegel et al. 1989, Simon et al. 2000), wird von verschiedenen Zellen (u.a. Makrophagen, Endothelzellen sowie eosinophilen Granulozyten) gebildet. Die chemotaktische Wirkung von den Arachidonsäuremetaboliten LTB₄ und Cysteinyl-Leukotrienen (cys-LTs) auf humane Eosinophile *in vitro* ist gering, jedoch ist LTB₄ in der Lage die Aufregulierung von Adhäsionsproteinen auf Eosinophilen zu induzieren (Powell et al. 1999). Das potente Eosinophilen-Chemotaxin 5-oxo-ETE entsteht aus Arachidonsäure, und es sind neben seiner chemotaktischen Wirkung auch die Induktion von Calciummobilisierung (Schwenk et al. 1992, Powell et al. 1999), Aktinpolymerisierung (Czech et al. 1997, Powell et al. 1999) und die Aufregulierung des Adhäsionsproteins CD11b (Powell et al. 2001) durch 5-oxo-ETE und 5-o-HETE beschrieben. Somit sind bislang eine Reihe endogen gebildeter Stoffe bekannt, welche zu einer Induktion von Effektormechanismen eosinophiler Granulozyten führen können. Ob Eosinophile auch durch exogene Faktoren wie Partikel oder indirekt durch Partikel-stimulierte Zellsysteme aktiviert werden können, ist Fragestellung dieser Dissertation.

2.1.3 Zytokin- und Lipidmediatorenproduktion durch eosinophile Granulozyten

Neben der Freisetzung toxischer Proteine besitzen eosinophile Granulozyten die Fähigkeit, durch eigene Zytokin- und Lipidmediatorenproduktion aktiv in die Immunregulation einzugreifen (*Hansel et al. 1993*).

Vor einigen Jahren beschrieben Horiuchi und Weller eine spontane Freisetzung des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) aus eosinophilen Granulozyten, die durch die Zugabe von IL-5 und GM-CSF gesteigert werden konnte. Dabei handelt es sich um ein pleiotropes Polypeptid, welches für spezifische Endothelzellveränderungen, wie die Induktion der Endothelproliferation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität verantwortlich zu sein scheint (*Horiuchi und Weller 1997*). Über die VEGF-Freisetzung sind Eosinophile mitverantwortlich sowohl für die Gewebsödembildung als auch die Gefäßneubildung im Rahmen akuter und chronischer allergischer Entzündungen.

Zu den Lipidmediatoren, auch Eicosanoide genannt, die von Eosinophilen synthetisiert werden, zählen in erster Linie Leukotrien C₄ (LTC₄), Thromboxan A₂ (TXA₂), PAF, die Prostaglandine (PG) E₂, D₂, und F_{2a}, sowie die erst in den letzten Jahren beachteten 5-oxo-Eicosanoide (*Morita et al. 1990, Kroegel et Matthys 1993, Boyce et al. 1996*). Eicosanoide sind biologisch aktive Arachidonsäuremetaboliten, die im Gegensatz zu den präformierten, Granula-assoziierten Mediatoren erst nach Aktivierung der Zelle *de novo* synthetisiert werden. Diese erfolgt rasch innerhalb weniger Minuten (*Gemsa und Resch 1991*). Diese potenten Entzündungsmediatoren führen im Organismus u.a. zu erhöhter Gefäßpermeabilität, Bronchokonstriktion, Vasokonstriktion, Hypersekretion der Bronchial- und Nasenschleimhautdrüsen als auch zu einer gesteigerten Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten (*Gemsa und Resch 1991, Schwenk et al. 1992*).

In Abbildung 2 sind die verschiedenen, von eosinophilen Granulozyten synthetisierten, Zytokine und Lipidmediatoren zusammengefasst.

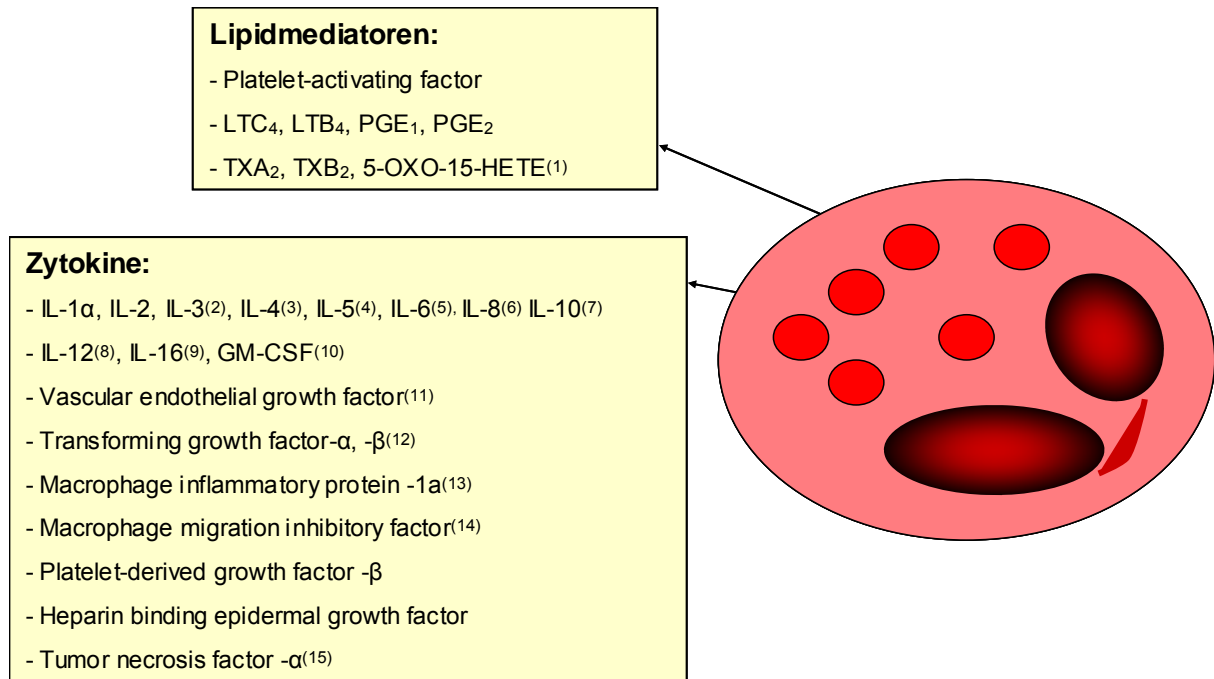


Abbildung 2: Zusammenstellung der verschiedenen Zytokine und Lipidmediatoren des eosinophilen Granulozyten (modifiziert nach Kroegel et al 1994, Moqbel et al 1994, Rothenberg 1998)

Referenzen:

(1) Schwenk und Schröder 1995	(2) Fujisawa et al. 1994, Kita et al. 1991
(3) Moqbel et al. 1995, Nakajima et al. 1996	(4) Dubucquoi et al. 1994
(5) Melani et al. 1993	(6) Nakajima et al. 1996
(7) Nakajima et al. 1996	(8) Grewe et al. 1998
(9) Lim et al. 1996	(10) Kita et al. 1991, Ohno et al. 1991
(11) Horiuchi und Weller 1997	(12) Ohno et al. 1992
(13) Costa et al. 1993	(14) Rossi et al. 1998
(15) Plötz et al. 2001, Costa et al. 1993	

2.1.4 Oberflächenrezeptoren auf eosinophilen Granulozyten

Membranständige Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Zellaktivierung mit Mediatorfreisetzung oder Chemotaxis, da über sie das komplexe Zusammenspiel der an den Entzündungsreaktionen beteiligten Zellen und Mediatoren vermittelt wird. Adhäsionsmoleküle, ebenfalls an der Oberfläche lokalisiert, dienen in erster Linie der Zellanheftung an das Gefäßendothel und an Matrixelemente bei der Migration des eosinophilen Granulozyten in das Gewebe.

Der eosinophile Granulozyt exprimiert Oberflächenrezeptoren für Immunglobuline, Komplementfaktoren, Lipidmediatoren und Adhärenzfaktoren, die auch von anderen Leukozyten exprimiert werden. Hierzu zählen Adhäsionsmoleküle (*Schleimer et al. 1992, Czech et al. 1993, Symon et al. 1994*), F_C-Rezeptoren (*Grangette et al. 1989, Monteiro et al. 1993*) und auch Zytokin- und Chemokinrezeptoren (*Mackay 1996*).

Aktiviert eosinophile Granulozyten exprimieren vermehrt Oberflächenrezeptoren für IgA, IgG, PAF, CD4, CD11, CD24 und CD69. Zu den Oberflächenproteinen der Komplementfaktoren gehören die Rezeptoren für C1q, CD3b/C4b und C5a (*Elsner et al. 1996*).

Die erste Charakterisierung von Zytokinrezeptoren auf Eosinophilen erfolgte durch Bindungsexperimente, die hoch-affine Bindungsstellen für IL-3, IL-5 und GM-CSF aufzeigten (*Lopez et al. 1991*). Die Anzahl dieser hoch-affinen Rezeptoren für IL-3, IL-5 und GM-CSF ist mit etwa 1000 Rezeptoren pro Zelle als gering anzusehen (*Ingley und Young 1991, Chihara et al. 1990, Lopez et al. 1991*). Die Bedeutung des IL-5-Rezeptors für die Bildung und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten, auch beim Menschen, wurde zudem aus einer kürzlich erschienenen therapeutischen Studie deutlich. Bei dieser konnte durch den Einsatz von Anti-IL-5 Antikörpern bei Patienten mit Hypereosinophiliesyndrom [HES] der Krankheitszustand der behandelten Patienten erheblich gebessert und die Anzahl Eosinophiler im Blut und Gewebe reduziert werden (*Plötz et al. 2003*). Eosinophile exprimieren weiterhin Oberflächenrezeptoren für Lipidmediatoren wie PAF und LTB₄ (*Kishimoto et al. 1996*). Ein wichtiges Aktivierungsmolekül auf eosinophilen Granulozyten stellt CD 69 dar, welches nach Stimulation mit IL-3, IL-5 oder GM-CSF vermehrt exprimiert wird (*Nishikawa et al. 1992, Luttmann et al. 1996*). Weiterhin ist die Expression des Apoptosessuppressorogens Bcl-2 nach Stimulation mit IL-5 beschrieben (*Dewson et al. 1999*).

Einen wichtigen zusätzlichen Aktivierungsmarker stellt das Integrin CD11b dar, welches auf der Oberfläche von Eosinophilen nach Stimulation mit Chemokinen oder Lipidmediatoren vermehrt nachweisbar ist (*Powell et al. 1999*).

Von den drei bekannten IgG-Rezeptoren besitzen eosinophile Granulozyten nur den niedrig-affinen FcγRII, der einerseits IgG bindet (*Capron et al. 1981*), andererseits, wie neuere Studien zeigen konnten, mit einer Apoptoseinduktion im Zusammenhang zu stehen scheint (*DeAndres et al. 1997, Kim et al.*

1999). Kontrovers diskutiert wird die Existenz von IgE-Rezeptoren auf Eosinophilen. Die heute vorliegenden Ergebnisse sprechen für das Vorliegen eines niedrig-affinen IgE-Rezeptors (FcεRII) auf Eosinophilen (Kita et al. 1999, Elsner und Kapp 1999, Sano et al. 1999). Neuere Studien konnten den FcεRI auf einer allerdings kleinen Minderheit der Eosinophilen nachweisen und eine vermehrte Rezeptorexpression auf den Zellen von Atopikern aufzeigen (Sihra et al. 1997). Andere Veröffentlichungen gehen davon aus, dass die Untereinheit FcεRI_α nicht auf der Oberfläche, sondern in den Granula Eosinophiler exprimiert werde, der FcεRI_β-Anteil jedoch nicht vorhanden sei (Bjerke et al. 1997, Seminario et al. 1999). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Klärung der Frage, ob und welche IgE-Rezeptoren exprimiert werden, weiterer Studien bedarf.

Als weiteres, nur auf eosinophilen Granulozyten vorkommendes Antigen, gilt das Adhäsionsmolekül VLA-4 (CD49), das nur auf eosinophilen nicht aber auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Walsh et al. 1991, Schleimer et al. 1992). Außerdem wurde zur Differenzierung der Granulozytenpopulationen das CD-9 Antigen beschrieben, es spielt möglicherweise eine Rolle als akzessorisches Molekül und wurde zuerst auf Thrombozyten entdeckt. Eine protektive Funktion wird über das Oberflächenmolekül CD 52, das außer auf Eosinophilen auch auf Makrophagen und T-Lymphozyten vorhanden ist und in der Membran verankert ist, vermittelt. Nach Rezeptoraktivierung konnte ein inhibitorischer Effekt auf den *respiratory burst* beobachtet werden (Elsner et al. 1996).

Über den Prostanoid-Rezeptor EP2 können die Prostaglandine PGE₁ und PGE₂ eine PAF-vermittelte Eosinophilenaggregation hemmen (Teixeira et al. 1997).

Als letztes seien die Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche des eosinophilen Granulozyten genannt. Neben dem CC-Chemokinrezeptor CCR1, der Affinität zu den beiden Chemokinen RANTES und MIP-1_α aufweist (van Riper et al. 1994), spielt der CC-Chemokinrezeptor CCR3, auch Eotaxinrezeptor genannt (Ugucioni et al. 1997), eine bedeutende Rolle. An diesem Rezeptor binden die CC-Chemokine Eotaxin-1, Eotaxin-2, MCP-2, MCP-3 und MCP-4 (Forssman et al. 1997, Sabroe et al. 1999). Über 95% der Chemokin-induzierten Aktivierung eosinophiler Granulozyten wird über diesen Rezeptor vermittelt (Heath et al. 1997, Rothenberg 1998). Anderen CC-Chemokin- oder CXR-Chemokinrezeptoren auf Eosinophilen kommt somit nur eine untergeordnete Bedeutung zu (Daugherty et al. 1996, Teixeira et al. 1997).

2.1.5 Eosinophile Granulozyten als Effektorzellen bei atopischen Erkrankungen

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts war bekannt, dass eosinophile Granulozyten bei Allergien vermehrt im Blut nachweisbar sind. Eosinophile spielen nach neuesten Erkenntnissen eine wichtige Rolle als Effektorzellen bei allergologischen und atopischen Erkrankungen, zu denen das *Asthma bronchiale allergicum*, die *Rhinokonjunktivitis allergica* und das *atopische Ekzem* zählen. Insbesondere ist beschrieben, dass Eosinophile durch die Freisetzung toxischer Mediatoren Gewebsschäden und damit zusätzliche Entzündungskaskaden auslösen können (Bousquet et al. 1990, Gleich 1990, 2000). Atopische Erkrankungen haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung zugenommen, was auch die Prävalenz der einzelnen Krankheiten in Deutschland (s. Tab. 1) bestätigt.

	Kinder < 15 Jahre	Erwachsene > 15 Jahre
allerg. Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen)	7,2 – 18,5 %	9,5 – 19,6 %
Asthma bronchiale	1,4 – 10,6%	1,8 %
Atopisches Ekzem (Neurodermitis)	8,6 – 20,2 %	1 – 3 %

Quelle: *European Allergy White Paper 1997*

Tabelle 1: Prävalenz wichtiger allergischer Erkrankungen in Deutschland

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine entzündliche Hauterkrankung mit familiärer Disposition, die sich klinisch in Pruritus und einer krankheitsspezifischen Verteilung am Integument mit charakteristischer Morphologie äußert. Zu den so genannten MAJOR-Kriterien der Erkrankung zählen Pruritus, typische Morphologie und Verteilung (Lichenifikation im Beugebereich, Gesichts- und Streckseitenbefall bei Kleinkindern und Säuglingen), Chronizität und die entsprechende Anamnese (Hanifin und Rajka 1980). Lange Zeit war die Rolle von Umweltallergenen bei dieser Erkrankung wenig verstanden. Heute ist jedoch eindeutig belegt, dass Umweltallergene nach Hautkontakt bei den Patienten Ekzemreaktionen induzieren oder die Exazerbation eines atopischen Ekzems provozieren können (Ring et al. 1989, Ring 1995, Darsow et al. 1995, 1997, 1999, Darsow und Ring 2001, 2002, Ring et al. 2001). Das Vorhandensein aktivierter Eosinophiler sowohl im peripheren Blut als auch in läsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis mit gleichzeitig nachweisbaren Eosinophilen-spezifischen Mediatoren im Gewebe (Leiferman et al. 1985, Leiferman 1991) und im Serum (Leiferman 1991, Halmerbauer et al. 1997) machen die aktive Beteiligung dieser Zellen an der Pathogenese der

ekzematischen Hautveränderungen wahrscheinlich. Dies wurde durch Studien verdeutlicht, die eine Ekzementstehung mit Eosinophilenmigration in Dermis und später Epidermis, ausgelöst durch extern applizierte inhalative Allergene, aufzeigen (*Bruijnezeel-Koomen et al. 1988, Henocq und Vargaftig 1988*). In therapeutischen Studien konnte hinzukommend bei Patienten mit atopischen Ekzem gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Anti-IL-5 Antikörpern (Mepulizumab) die Eosinophilenanzahl in Blut und Gewebe gesenkt, die Reaktion auf Aeroallergene im Atopie Patch Test vermindert und das klinische Krankheitsbild der Patienten deutlich gebessert werden konnte (*Oldhoff JM et al. 2005*). Dies lässt auf eine wesentliche Bedeutung der eosinophilen Granulozyten bei dem Krankheitsbild des atopischen Ekzems schließen. Bei einer, mittels Atopie Patch Test induzierten Eosinophileninfiltration, sind die teilweise degranulierten Eosinophilen in engem Kontakt zu epidermalen Langerhans-Zellen anzutreffen (*Bruijnezeel-Koomen et al. 1988, Gaga et al. 1991*). Die Bedeutung der Eosinophilen liegt vor allem in der frühen Phase der Ekzementstehung. Mit der Freisetzung toxischer, proinflammatorischer Proteine können sie die Entzündungsreaktion verstärken und durch die Ausschüttung potenter Mediatoren (Interleukine) weitere Endzündungszellen aktivieren und diese somit in das Geschehen einbeziehen. Welche Faktoren für die Migration der Zellen letztendlich verantwortlich sind, ist derzeit nicht geklärt. Sicherlich spielen die für Eosinophile spezifischen chemotaktischen Substanzen wie Eotaxin aus T-Lymphozyten, Makrophagen und Eosinophilen selbst (*Mattoli et al 1997*), TARC (*Kaplan 2001*) und IL-5 aus Th2 Lymphozyten (*Warringa 1992*) eine tragende Rolle. Vordringlich handelt es sich beim atopischen Ekzem um eine IgE-abhängige, vor allem Histamin-medierte inflammatorische Reaktion, unterstützt durch eine Eosinophilen-induzierte Entzündung (*Hoffmann 2000*).

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, die charakterisiert ist durch chronisch-rezidivierende Bronchokonstriktion, bronchiale Hyperreagilität und eine entzündliche Infiltration der Bronchialwand (*Kroegel und Matthys 1992*). Im Infiltrat dominieren Eosinophile, daneben finden sich Makrophagen und andere Leukozyten (*Bousquet et al. 1990, Hoshino und Nakaruma 1997*). Neben einer Bluteosinophilie (*Horn et al. 1975, Pizzichini et al. 1997*) lassen sich Eosinophile auch in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Sputum vermehrt nachweisen (*Grootendorst et al. 1997*). Durch die Aktivierung eosinophiler Granulozyten kommt es zur Freisetzung zytotoxischer Proteine und reaktiver Sauerstoffspezies mit konsekutiver Schädigung des Bronchialepithels, des weiteren zur Aktivierung sogenannter C-Fasern und Generierung proinflammatorischer Mediatoren (*Venge und Hakansson 1991, Gleich und Adolphson 1986, Gleich 1990, 2000*). CD4-positive T-Zellen vom Typ 2 tragen durch Zytokin- und Chemokinfreisetzung (insbesondere IL-5 und RANTES) zur Akkumulation eosinophiler Granulozyten bei und initiieren B-Lymphozyten zum Antikörper-Switch nach IgE (*Mousli et*

al. 1994, Coyle et al. 1996). In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation eines anti-IgE mAK vor Allergenprovokation in Hausstaubmilben-sensibilisierten Mäusen sowohl das Serum-IgE neutralisierte, als auch die Infiltration eosinophiler Granulozyten und die Produktion von IL-4 sowie IL-5 inhibierte (Coyle et al. 1996). In mehreren Studien konnten durch Blockierung von IL-5 verschiedene Aspekte des allergischen Asthma bronchiale unterdrückt werden (Foster et al. 1996, Hamelmann und Gelfand 2001). Eine andere aktuelle Untersuchung zeigte allerdings, dass die Verabreichung von Anti-IL-5-Antikörpern zwar die Zahl der Eosinophilen im Blut und Sputum von Asthmapatienten drastisch reduzierte, aber die bronchiale Spätreaktion und die bronchiale Hyperreaktivität nicht beeinflusste. Dies ließ Zweifel an der Rolle Eosinophiler in der Pathogenese des Asthma bronchiale aufkommen (Leckie et al. 2000, Lacy et al. 2001).

Bei der allergischen Rhinitis handelt es sich um ein Krankheitsbild, welches sich in erster Linie in einem eng umschriebenen Gebiet, der Nasenschleimhaut, oft unter Einbeziehung der Konjunktiven (Rhinokonjunktivitis), abspielt. Die Beschwerden können sowohl saisonal (Pollinose), als auch perennial durch Allergene wie Milben, Tierhaare, Bettfedern oder Berufsallergene auftreten. Sie bestehen aus Juckreiz und Kitzeln in der Nase, Niesattacken, sowie wässrigem Fließschnupfen (Weerda 1989). Einige Stunden nach dieser Sofortreaktion kann es zu einem erneuten Auftreten nasaler Symptome kommen. Dabei steht das Anschwellen der Nasenschleimhaut mit erhöhtem Atemwegswiderstand im Vordergrund (Baraniuk 1999, Naclerio 1999). Durch die massive Infiltration der Nasenschleimhaut mit eosinophilen Granulozyten und die Freisetzung ihrer Mediatoren im Rahmen der allergischen Spätreaktion lässt sich eine allergische Entzündung des oberen Respirationstraktes von Entzündungen anderer Genese abgrenzen. An der Aktivierung, der Verlängerung der Eosinophilen-Überlebenszeit und der verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen sind bei der allergischen Rhinitis Th2-Zytokine wesentlich beteiligt (Van Cauwenberge et al. 1999). Intranasal applizierte Glukokortikoide beeinflussen besonders die allergische Spätreaktion positiv. Sie reduzieren signifikant die Expression der IL-4 und IL-5 Rezeptoren und induzieren die Expression des $\text{INF}\gamma$ -Rezeptors in der Nasenschleimhaut, ändern also das Th2- in ein Th1-Zytokinmuster (Wright et al. 1999). Auch die ECP-Konzentration sowie Eosinophilenanzahl im Nasensekret werden gesenkt (La Force 1999). Die gleichzeitige Besserung der klinischen Symptomatik in Korrelation mit dem Abfall von Eosinophilenprodukten und Eosinophilen im Nasensekret führte zu der Erkenntnis, dass es sich bei der Spätreaktion der allergischen Rhinitis um ein eng mit Eosinophilen assoziiertes Krankheitsbild handelt.

2.1.6 Exogene Stimuli der Eosinophilenaktivierung

Unsere Atemwege kommen bei Inhalation ständig mit Bakterien und bakteriellen Bestandteilen in Kontakt. Organische Stäube pflanzlichen, tierischen oder mikrobiellen Ursprungs sind oft mit zum Teil hohen Mengen von Endotoxin/Lipopolysaccharid (LPS) belastet. LPS ist ein Bestandteil der Umwelt (Jakobs 1997) und in einer Reihe von Staubextrakten nachgewiesen worden. LPS ist in den oberen Luftwegen vorhanden und die LPS-Konzentration steigt bei Infektionen und entzündlichen Prozessen lokal und systemisch an (Rosenthal und Tage 1975). LPS besitzt eine Reihe unterschiedlicher biologischer Wirkungen. Neben der Induktion entzündlicher Reaktionen sind insbesondere seine pyrogenen Eigenschaften zu nennen. So sind in jüngster Zeit Bakterientoxine als Immunstimulantien für eine TH-1 gerichtete Reaktion beschrieben worden. Dies steht im Gegensatz zu Berichten über die Rolle von LPS beim *Asthma bronchiale*. Experimentelle und *in-vivo*-Untersuchungen zeigten auf, dass LPS-Inhalation verschiedene chronisch obstruktive Lungenerkrankungen einschließlich dem *Asthma bronchiale* (Di Luzio und Friedmann 1973, Pauwels et al. 1990, Folkerts et al. 1988, Michel et al. 1989, 1991, 1992) verschlechtern kann. Schon niedrige LPS-Dosen können eine Bronchokonstriktion bei Asthmatikern auslösen (Michel et al. 1989, 1991, 1992). Somit stellt sich die Frage, ob die Inhalation von LPS auch eosinophile Granulozyten als wesentliche Effektorzellen beim *Asthma bronchiale* aktivieren kann. Neueste Studien konnten dementsprechend nachweisen, dass LPS eine dosisabhängige TNF- α und ECP-Freisetzung durch humane eosinophile Granulozyten induzieren kann (Plötz et al. 2001).

Da bei jeder Form der Aktivierung von eosinophilen Granulozyten durch feine und ultrafeine Partikel LPS als Auslöser Betracht gezogen werden musste, war es für dieses Projekt wichtig, LPS als mögliches auslösendes Agens der beobachteten Zellantworten auszuschließen. Deshalb wurde bei fast allen Versuchsabläufen LPS als Kontrolle angesetzt, um sicherzugehen, dass die beobachteten Phänomene nicht allein auf eine LPS-Kontamination der eingesetzten feinen und ultrafeinen Partikel zurückzuführen sind.

Bestandteile von Umweltpollen windbestäubter Pflanzen konnten als exogene Stimuli eosinophiler Granulozyten ausgemacht werden. Gemeinsames Bauprinzip der Pollen ist der Aufbau aus einer Zelle, deren Plasmamembran von der Pollenwand umgeben ist und neben den Zellorganellen den vegetativen Nucleus enthält (Hoekstra und Bruinsma 1975). Pollenallergene befinden sich vorwiegend im

Zytoplasma, oft in Ribosomen-reicher Umgebung (*Grote 1999*). Aber auch in Mitochondrien, P-Partikeln und Stärkegranula sind Allergene beschrieben worden (*Behrendt und Becker 2001*). Kürzlich konnten Behrendt et al. zeigen, dass Pollen neben dem Allergen auch Eikosanoid-ähnliche Stoffe freisetzen (*Behrendt et al. 1999, 2001, Kasche 2002, Jacob et al. 2002, Traidl-Hoffmann et al. 2002, 2005*). Eicosanoide entstehen durch enzymatischen und autoxidativen Abbau aus Arachidonsäure. Es wurde nachgewiesen, dass wässrige Pollenüberstände und die darin enthaltenen Mediatoren eosinophile Granulozyten zur Chemotaxis aktivieren können (*Plötz et al. 2003*). Polleninhaltsstoffe können somit als Adjuvans in der Sensibilisierungs- und Auslösephase allergischer Reaktionen wirken und zur Entstehung bzw. Verstärkung der allergischen Immunantwort beitragen.

2.2 Partikuläre Luftschadstoffe

2.2.1 Feine und ultrafeine Partikel

Unter Aerosolpartikeln versteht man als in Dispersion auftretende kleine Teilchen, die mit der Luft verbreitet werden (Wichmann et al. 2002). Feststoffpartikel werden als Stäube bezeichnet, aber auch Gase und Flüssigkeiten können in der freien Atmosphäre zu Partikeln (Sekundärpartikeln) koagulieren. Partikel können sowohl natürlichen Quellen (marine Aerosole, geogene Mineralstäube und Bioaerosole) als auch einer Reihe anthropogener Quellen entstammen. Sie werden anhand ihres Durchmessers voneinander unterschieden, wie in Abbildung 3 und in Tabelle 2 dargestellt.

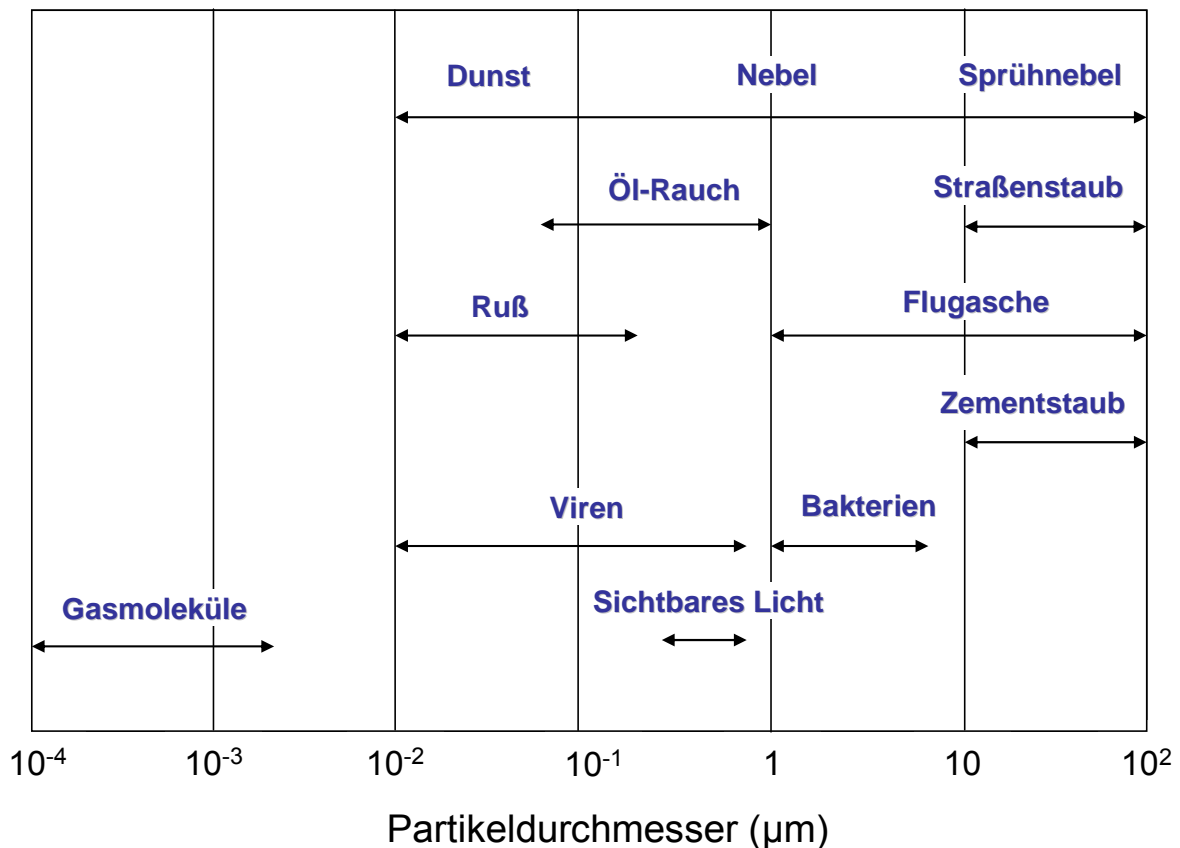


Abbildung 3: Größenordnungen typischer Partikel in der Umgebungsluft.
(modifiziert nach Peters et al. 1998)

Klassifikation	Durchmesser
Gesamtschwebstaub (<i>Total suspended particulates, TSP</i>)	< 15 µm/ früher <35 µm
Grobe Partikel (<i>coarse particle</i>)	2,5-100 µm/ international 2,5-10 µm
Inhalierbarer Schwebstaub (PM ₁₀)	<10 µm
Lungengängiger Schwebstaub (PM _{2,5})	<2,5 µm
Feine Partikel (<i>fine particle, FP</i>)	0,1- 2,5 µm
Ultrafeine Partikel (<i>ultrafine particle, UFP</i>)	<0,1 µm

Tabelle 2: Klassifizierung von Aerosolpartikeln gemäß ihrer Teilchengröße (*Gehr und Heyer 2000*)

Für eine wirkungsbezogene Betrachtung partikulärer Luftinhaltsstoffe ist eine hinreichend physikalische und chemische (s. Kap. 2.2.2) Charakterisierung von großer Bedeutung. Wichtige physikalische Parameter sind die Partikelgrößenverteilung, die Form und Gestalt der Teilchen sowie die Oberflächenbeschaffenheit (Morphologie). Die Komplexität des Umweltaerosols mit allen Teilcheneigenschaften muss bei der Erforschung möglicher kausaler Zusammenhänge zwischen der Prävalenz bzw. dem Schweregrad entsprechender Erkrankungen und der Präsenz partikulärer Luftinhaltsstoffe berücksichtigt werden (*Risse et al. 1999*).

Ein großer Teil der partikulären Luftinhaltsstoffe ist anthropogener Herkunft. In der Regel steht die Emission von Partikeln in engem Zusammenhang mit der Verbrennung von fossilen Brennstoffen. Wesentlich im Außenluftbereich sind vor allem verkehrsbedingte Emissionen (z.B. Dieselruß), aber auch die Vielzahl der Feuerungsanlagen der privaten Haushalte („Hausbrand“) sowie der Industrie (Kraftwerke usw.). Neben der direkten Emission partikelförmiger Stoffe (z.B. Ruß) kann es auch durch Reaktionen in der Atmosphäre zur Bildung von Teilchen kommen (*Risse et al. 1999*).

Trotz der verbesserten lufthygienischen Verhältnisse wurden seit Mitte der 80er Jahre vermehrt Studien veröffentlicht, die Hinweise auf adverse Gesundheitseffekte der Luftschadstoffe in der Bevölkerung auch bei Konzentrationen unterhalb der bisherigen Standards dokumentieren und diese zu einem Großteil auf die inhalierbare Fraktion des Schwebstaubes zurückführen (*Bascom et al. 1996, Brunekreef et al. 1995, Dockery und Pope 1994*).

Bis vor wenigen Jahren wurde den ultrafeinen Partikeln wenig Beachtung geschenkt, denn, gemessen an ihrer Masse, ist ihr Anteil unter den partikulären Bestandteilen der Luft verschwindend gering. Betrachtet man aber ihre Anzahl und ihre spezifische Oberfläche, ist ihr Anteil groß. Darüber hinaus werden ultrafeine Partikel in Gegenwart von feinen und groben Partikeln absorbiert (*scavenging effect*).

Da sich aber insgesamt die Anzahl größerer Partikel in der Außenluft durch Luftreinhaltemaßnahmen reduziert hat, führte dies möglicherweise dazu, dass der früher sehr effektive *scavenging effect* heute einen geringeren Einfluss hat. Dadurch ist die Konzentration ultrafeiner Partikel, auch bei gleich bleibender Emission ultrafeiner Partikel, in der Umwelt relativ angestiegen.

Für die atmosphärische Verweildauer und die Lungengängigkeit ist der Durchmesser von Partikeln entscheidend. Aufgrund ihrer geringen Masse können die Feinstäube und die an sie absorbierten Schadstoffe über weite Strecken transportiert werden. Zur Quellenzuordnung von PM₁₀, PM_{2.5} und ultrafeinen Partikeln liegen Abschätzungen aus Großbritannien vor (*Harrison et al. 2000*), dort stammen mehr als 60% der ultrafeinen Stäube aus dem Verkehr.

Ein Dieselmotor emittiert etwa 100mal mehr Rußpartikel als ein Benzinmotor. Die kurze Bezeichnung „Dieselruß“ bezieht sich dabei auf die Gesamtpartikelmasse von Dieselmotoremissionen. Mehr als 85% der emittierten Partikel haben einen aerodynamischen Durchmesser <0,1 µm und gehören somit der ultrafeinen Fraktion an. An der Luft lagern sie sich zu größeren Agglomeraten zusammen, die aber noch in die lungengängige Feinstaubfraktion (<2,5 µm) fallen (*Peters et al. 1998*). Aktuell werden dem hohen Anteil an partikulären Luftschadstoffen in der Außenluft seitens der Presse auch in Städten wie München vermehrte Aufmerksamkeit zuteil (*Krahlisch 2007, Süddeutsche Zeitung 2005*).

Im Rahmen einer aktuellen Übersichtsarbeit konnte Wichmann darstellen, dass Dieselrußpartikel wegen ihrer großen Oberfläche nach Inhalation leicht resorbiert werden können und somit zu erhöhter kardiopulmonaler Morbidität, Mortalität und Lungenkrebs führen (*Wichmann 2007*).

Wegen ihrer besonderen biologischen und umweltmedizinischen Relevanz richtet sich das Augenmerk dieser Arbeit vor allem auf die Effekte von feinen und ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln auf eosinophile Granulozyten. Weiterführend sollen eventuell vorhandene Unterschiede zwischen mit organischen Bestandteilen behafteten Dieselrußpartikeln und reinen Kohlenstoffpartikeln unterschiedlicher Größe und Oberflächenbeschaffenheit untersucht werden.

2.2.2 Organisch-chemische Bestandteile von Dieselrußpartikeln

Bei der chemischen Charakterisierung von Partikeln ist zu beachten, dass feste Aerosolteilchen, besonders wenn diese durch Verbrennungsvorgänge entstehen, aus einem anorganischem Kern und einer „Hülle“ aus oberflächenabsorbierten Stoffen bestehen. Diese sind in der Regel eine Vielzahl unterschiedlicher organisch-chemischer Substanzen, wie z.B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), halogenierte und nicht-halogenierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, Aldehyde, Ketone oder organische Säuren. Bei leichter flüchtigen Substanzen bestehen praktisch immer temperaturabhängige Gleichgewichte zwischen dem partikelassoziierten Teil und dem, der sich als Dampf in der Gasphase befindet (*Risse et al. 1999*).

Ultrafeine Partikel mit ihrer im Verhältnis zur Masse sehr großen Oberfläche sind ein ideales Vehikel für den Transport toxischer Substanzen in das Körperinnere. Eine Verstärkung der Wirkung kanzerogener Stoffe wie Benz(a)pyren durch Adsorption an alveolengängige Partikel ist experimentell belegt (*Bond 1986; Dasenbrock 1996*).

Die Hülle von Dieselrußpartikel besteht im Wesentlichen aus PAK, die aufgrund unvollständiger Verbrennungsprozesse aus Kraftstoffbestandteilen im Motor gebildet werden. Daneben wurden auch zahlreiche andere Verbindungen, sowie Derivate der Stoffgruppe der PAK, im Dieselruß nachgewiesen (Nitro-PAK, Oxo-PAK usw.) (*Venkataraman et al. 2002*). Insgesamt ist mittlerweile eine dreistellige Anzahl von Einzelsubstanzen auf Dieselrußpartikeln identifiziert worden. Sowohl die genaue Partikelgrößenverteilung als auch die jeweilige Beladung mit organischen Stoffen hängt stark von den unterschiedlichen Betriebsbedingungen in den Motoren (Fahrsituation) ab (*UBA 2003*).

Für die große Gruppe der PAK sind mutagene und kanzerogene Wirkungen sowie immunotoxische Effekte nachgewiesen. Dieselrußpartikel-assoziierte PAK werden mit den Partikeln auf der Oberfläche der Mukosa deponiert. Als hydrophobe Substanzen diffundieren sie problemlos durch die Zellmembran und binden nach heutigem Kenntnisstand an den zytosolischen Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor). Nach Translokation des PAK-Rezeptorkomplexes in den Zellkern werden die Transkriptionsprogramme einer ganzen Reihe von Genen aktiviert und so Wachstum- und Differenzierung von Zellen verändert. Die metabolische Aktivierung der PAK unter Beteiligung von Cytochrom P-450 (CYP 1A1) und Prostaglandin-endo-Peroxid-Synthase führt über reaktive Zwischenstufen zu Diol-Epoxiden, Chinonen und weiteren Zwischenprodukten. Diol-Epoxide sind in der

Lage DNA-Addukte zu bilden, Chinone können über definierte Stoffwechselwege zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen. ROS wiederum aktivieren intrazelluläre Signalwege und Transkriptionsfaktoren (z.B. NF κ B) und so ebenfalls die Transkription bestimmter Gene. Potentielle Ziele könnten die für Zytokine, Chemokine und Adhäsionsfaktoren verantwortlichen Gene sein (*Martin et al. 1997, Nel et al. 1998*).

In neuesten Untersuchungen konnte belegt werden, dass Dieselpartikel-assoziierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe basophile Granulozyten zur Zytokinsekretion und Expression des Oberflächenantigens CD63 anregen und somit Einfluss auf die Ausprägung allergischer Erkrankungen nehmen (*Schober et al. 2006, 2007*).

Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob organische Bestandteile der Dieselrußpartikeloberfläche eosinophile Granulozyten direkt oder indirekt aktivieren können. Ob erstens Rußpartikel direkt eosinophile Granulozyten stimulieren können und ob zweitens Eosinophile indirekt, das heißt durch Freisetzung Eosinophilen-aktivierender Mediatoren aus Rußpartikel-stimulierten anderen Zellsystemen, aktiviert werden können, war die zentrale Fragestellung dieser Dissertation.

2.2.3 Partikeldeposition im Respirationstrakt

Die Lunge stellt mit ihrer inneren Oberfläche von ca. 80-90 m² eine wichtige Eintrittspforte von Umweltschadstoffen dar. Der Mensch atmet 10.000 - 15.000 Liter Umgebungsluft pro Tag ein. Ein Liter typischer „Großstadtluft“ enthält circa 30 Millionen Partikel, die eine Vielzahl von potentiell schädigenden Bestandteilen aus natürlichen und anthropogenen Quellen beinhalten (Kohlhäußl 1998).

Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die Ablagerung von Aerosolpartikeln mit dem Durchmesser zwischen 0,01 und 10 µm als Funktion der Teilchengröße im gesamten Respirationstrakt (Totaldeposition) und die Verteilung der abgelagerten Materie auf den einzelnen Regionen des Atemtrakts (Regionaldeposition). Die Daten wurden bei Normalpersonen in Mundatmung gewonnen.

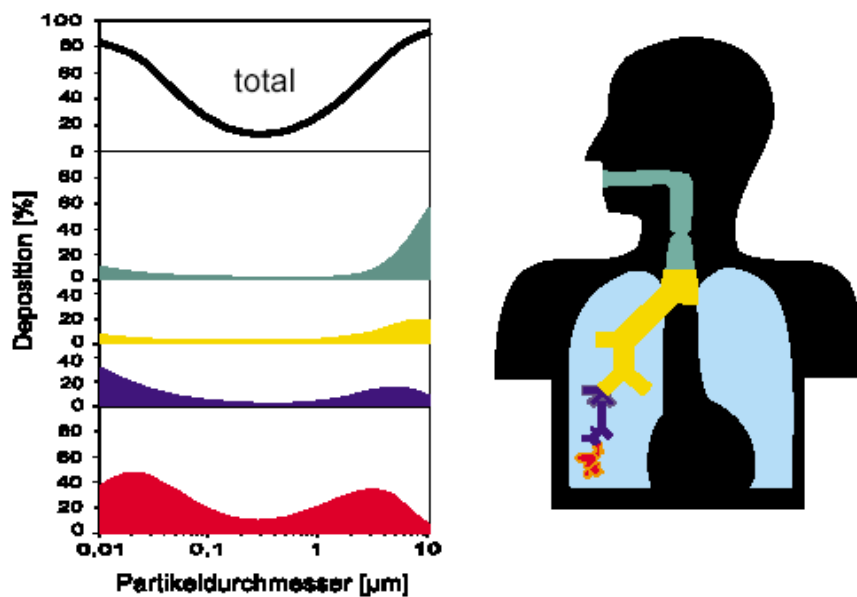


Abbildung 4: Total- und Regionaldeposition von Aerosolteilchen im Respirationstrakt des Menschen in Abhängigkeit vom Durchmesser der eingeatmeten Partikel. Atmung in Ruhe (300 cm³/sec; Dauer des Ein- und Ausatmungsvorgangs: 2,5 sec) (Modifiziert nach Heyder et al. 1986, IPRC 1994)

Der Kurvenverlauf der Totaldeposition zeigt ein Minimum im Partikelgrößenbereich von 0,1 – 1 µm. In diesem Größenbereich ist die Depositionswahrscheinlichkeit am kleinsten, da diese Teilchen zu groß für die effektive Deposition durch Diffusion und zu klein für die effektive Deposition durch Impaktion und Sedimentation sind. Je größer die Partikel sind, desto höher wird die Rate der extrathorakalen Deposition in Mund und Rachen. Eine relevante bronchiale Deposition zeigt sich nur für Teilchen von

5 – 10 µm. Teilchen unter 5 µm Durchmesser werden überwiegend alveolär deponiert. Prinzipiell lässt sich also sagen, dass je schneller ein Aerosol inhaliert wird und je größer die Teilchen sind, desto mehr verschiebt sich der Ort der Teilchenablagerung in der Lunge von peripheren Strukturen in Richtung zentraler Atemwege (*Gerity et al. 1979, Kim et al. 1988*). Partikel mit einem Durchmesser zwischen 0,1 – 1 µm gelangen zwar in den Alveolarraum, werden aber größtenteils wieder ausgeatmet. Partikel mit einem Durchmesser < 0,1 µm werden jedoch besonders effektiv in den Alveolen abgeschieden und sind deshalb besonders von gesundheitsschädlicher Relevanz für den Menschen (*Maulderly et al. 1994, Maulderly 1996*).

2.2.4 Dieselrußpartikel als Adjuvans bei atopischen Erkrankungen

Neuere experimentelle Untersuchungen belegen, dass Dieselrußpartikel mit dem Immunsystem interagieren und spezifisch die IgE-Synthese und andere allergierelevante Parameter beeinflussen (*Nicasinovic et al. 2004*). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Stoffe und Stoffgemische, die per se nicht allergen sind, die Allergieentstehung fördern („Adjuvans-Effekte“) und zur Chronifizierung beitragen (*Bastain et al. 2003*). Letztere werden für den anhaltenden Trend steigender Prävalenzen atopischer Erkrankungen mitverantwortlich gemacht. Bereits frühe Arbeiten aus Japan stellten bei Mäusen einen Anstieg der primären IgE-Antwort auf Ovalbumin oder Zedernpollen dar, wenn diese Allergene mit Dieselrußpartikeln (DEP) zusammen intraperitoneal injiziert wurden (*Muranaka et al. 1986*). Die adjuvanten Effekte auf die IgE-Bildung in Mäusen wurden auch erhalten, wenn aus DEP extrahiertes Pyren anstelle der kompletten Partikel verwendet wurde (*Suzuki et al. 1993*).

Im Lungengewebe und in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) von Mäusen führte Koadministration von Antigen und DEP zu einem Anstieg von IL-5 auf das achtfache der alleinigen Antigenadministration (*Takano et al. 1997*). IL-5 wiederum reguliert Wachstum, Differenzierung und Viabilität von Eosinophilen, steigert die Effektorfunktion von Entzündungszellen und ist ein Kofaktor für die IgE-Synthese. Die wichtige Wirkung von IL-5 auf humane Eosinophile wurde kürzlich auch durch therapeutische Studien mit monoklonalen IL-5 Antikörpern bestätigt (*Plötz et al. 2003*).

Nach intranasaler DEP-Applikation geht eine DEP-induzierte Erhöhung der lokalen IgE-Produktion einher mit einem veränderten Zytokin- und Chemokinmuster (*Diaz-Sanchez et al. 1996*). Üblicherweise lassen sich in der Nasenspülflüssigkeit die mRNA von Interferon- γ , IL-2 und IL-13 nachweisen. Nach

Provokation mit DEP finden sich insgesamt höhere Mengen an Zytokin-mRNA und zusätzlich die mRNA von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. Zudem führte die intranasale Applikation von DEP schon nach 6 Stunden zu einer Erhöhung von RANTES, MIP-1 α und MCP-3, drei Proteinen aus der Familie der CC-Chemokine (*Diaz-Sanchez et al. 2000*). In einer aktuellen Untersuchung konnte in der Nasallavage von PM_{2,5} exponierten Kindern mit Asthma bronchiale eine signifikant höhere Anzahl von Eosinophilen und Alpha1-Antitripsin im Vergleich zu PM_{2,5} exponierten gesunden Kindern nachgewiesen werden (*Nikasinovic 2006*).

Auch in zahlreichen epidemiologischen Untersuchungen waren erhöhte Außenluftkonzentrationen feiner Partikel mit akuten adversen Wirkungen assoziiert, vor allem mit Atemwegserkrankungen und erhöhter Morbidität. Hauptquelle für die Feinstaubfraktion der Außenluft ist dabei der von Dieselmotoren emittierte Ruß (*SRU 2000, Tz. 1010, 1021*). Im Rahmen der Wirkungskatasteruntersuchungen des Landes Nordrhein-Westfalen wurden allergologische Parameter bei Schulanfängern, die in stark verkehrsbelasteten Regionen lebten, untersucht. Dabei zeigten sich signifikant erhöhte Sensibilisierungsraten gegen Pollenallergene bei Kindern aus Köln, die in einer verkehrsbelasteten Region lebten (*MURL 1990*). Im Jahre 1986 und 1987 wurden die Zusammenhänge einer Exposition gegenüber städtischem Kraftfahrzeugverkehr und allergologisch relevanten Parametern an Kindern in innerstädtischen, unterschiedlich stark verkehrsbelasteten Arealen in Düsseldorf untersucht. Neben weiteren Parametern gesundheitsrelevanter Merkmale wurden der Allergiestatus und Erhebungsdaten zu Symptomen und Diagnosen allergischer Erkrankungen in die Auswertung einbezogen. Die Untersuchungen wurden mit 370 Kindern der 3. und 4. Grundschulklasse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass Pollensensibilisierungen in innerstädtischen Arealen mit zunehmender Verkehrsbelastung in ihrer Häufigkeit ansteigen und die Ausprägung von allergischen Symptomen und ekzematösen Hautveränderungen mit zunehmender Verkehrsbelastung überproportional zunimmt (*Krämer et al. 2000, MURL 1998*). Zusätzlich wurde in einer aktuellen großen epidemiologischen Studie mit insgesamt 5921 untersuchten Kindern nachgewiesen, dass die Nähe der Wohnung zu verkehrsbelasteten Hauptstraßen und somit die Exposition zu Feinstaubpartikeln und NO₂ signifikant mit der Ausprägung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis korreliert (*Morgenstern et al. 2008*).

Diese und zahlreiche andere, nicht aufgeführte Ergebnisse belegen die allergiefördernde Wirkung von Dieselruß und organisch-chemischen Bestandteilen auf der Partikeloberfläche.

Die dargelegten Befunde sind von großer umweltmedizinischer Bedeutung, da die Zahl dieselbetriebener Fahrzeuge hoch ist und vermutlich weiter steigen wird. So waren 1998 in Europa von allen verkauften Autos schon etwa 25 % dieselbetrieben (D'Amato 2000), der Anteil der dieselbetriebenen Fahrzeuge ist bis heute weiter gestiegen. Aktuell wird der erhöhten, durch Dieselrußpartikel verursachten, Feinstaubbelastung der Außenluft in Städten wie München seitens der Presse große Aufmerksamkeit zuteil (*Süddeutsche Zeitung 2005, Bayerischer Rundfunk 2005, Kralisch 2007*). Bereits 1985 kam der Dieselpartikelfilter in der Mercedes-Benz S-Klasse (Baureihe W126) auf dem US-Markt zum Einsatz. In Deutschland wird die Nachrüstung von dieselbetriebenen Pkw mit Partikelfiltern rückwirkend bis zum 1. Januar 2006 laut Gesetzesbeschluß vom 1. April 2007 steuerlich gefördert (*Bundesgesetzblatt 2007*). Wie Spiegel-Online am 29. Januar 2007 berichtete, verringerte sich die Rußbelastung der Abgase durch den Filtereinbau um knapp 40 Prozent. Allerdings beobachteten die Experten eine geringfügige Steigerung des Stickstoffoxid-Ausstoßes (NO_x) (*Spiegel-Online 2007, Kralisch 2007*).

3 Zielsetzung

Weil in den letzten Jahren in mehreren wissenschaftlichen Untersuchungen ein signifikanter Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Immissionen und Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis nachgewiesen werden konnte (*Peters et al. 1997, Krämer et al. 2000, Morgenstern et al. 2008*) und eosinophile Granulozyten eine herausragende Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis (Atopisches Ekzem, Asthma bronchiale allergicum, Rhinokonjunktivitis allergica) spielen (*Gleich 1990, 2000, Hogan 2007*), sollte im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion zwischen Rußpartikeln und eosinophilen Granulozyten in vitro untersucht werden.

Hierzu wurden zunächst Dieselrußpartikel (Diesel SRM 1650a) und reine Kohlenstoffpartikel (Printex G, Printex 90) mit eosinophilen Granulozyten für 90min und 120min koinkubiert und anschließend die direkte Auswirkung der Rußpartikel auf eosinophile Granulozyten erforscht. Es erfolgte erstens eine Prüfung auf den Einfluss der Vitalität der eosinophilen Granulozyten durch Rußpartikel und des weiteren wurde festgestellt, ob eosinophile Granulozyten durch Rußpartikel in den Konzentrationen 0,5µg, 5µg und 50µg zur ECP-Freisetzung, Chemotaxis und/oder CD11b-Hochregulation aktiviert werden können. Für die Versuche wurden naive und mit GM-CSF geprimte eosinophile Granulozyten eingesetzt.

Weil Keratinozyten den Hauptbestandteil der Epidermis darstellen, sind diese sowohl eine der Haupttargetzellen für Umweltschadstoffe (z.B. Rußpartikel), als auch maßgeblich in die Entzündungsreaktion beim atopischen Ekzem involviert (*Ring 2004, Giustizieri et al. 2001*). Deshalb wurde im zweiten Teil der Arbeit der Focus auf eine indirekte Aktivierung der eosinophilen Granulozyten durch Rußpartikel-stimulierte Keratinozyten gerichtet. Hierzu wurden Rußpartikel (Diesel SRM 1650a, Printex G, Printex 90) mit Keratinozyten für 48h koinkubiert und anschließend deren Zellüberstände für weitere Untersuchungen verwendet. Es wurde geprüft, ob Überstände von Rußpartikel-stimulierten Keratinozyten dazu in der Lage sind, eosinophile Granulozyten zur ECP-Freisetzung, Chemotaxis und/oder CD11b-Aufregulierung zu stimulieren.

Zuletzt erfolgte eine genaue Untersuchung der Überstände von Rußpartikel-stimulierten Keratinozyten auf Chemokine, welche für die Aktivierung der eosinophilen Granulozyten verantwortlich sein können. Die Zellüberstände der Keratinozyten wurden mittels ELISA auf das Vorhandensein von GM-CSF, IL-18, MIP-3α, Eotaxin, RANTES und TARC, als potentielle Eosinophilenaktivatoren, geprüft.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Partikel

4.1.1 Diesel Standard SRM 1650a

Verwendet wurden Dieselruß Standard Partikel SRM 1650a, hergestellt durch das National Institute of Standards & Technology (NIST). Der Vorteil der Verwendung dieser Partikel liegt darin, dass bedingt durch den Herstellungsprozess, sowohl die Größe der Partikel, als auch die Konzentrationen der organisch-chemischen Bestandteile auf der Partikeloberfläche, standardisiert sind.

Die Dieselrußpartikel haben einen mittleren Durchmesser von 17,1 µm. Dieser ist deshalb relativ groß, weil gerade die Dieselrußpartikel mit ihrer unregelmäßigen Oberfläche dazu tendieren Aggregate aus mehreren Einzelpartikeln zu bilden. Ihre Spezifische Oberfläche beträgt 108 m²/g. Der Partikeloberfläche haften u.a. eine Reihe unterschiedliche polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe [PAHs] an, unter anderem Phenanthrene, Fluoranthene, Pyrene, Benzanthracene, Benz[a]pyrene und weitere (siehe Anhang).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Partikel wurden uns freundlicherweise von Dr. W. Kreyling, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit München, Projektfeld „Gesundheitsrelevanz von Aerosolen“, zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Printex 90

Verwendet wurden Printex-Partikel der Firma Degussa. Die Größe der Printex 90-Primärpartikel beträgt 14 nm, bei einer spezifischen Oberfläche von 300 m²/g. Printex 90 wird somit zu den ultrafeinen Partikeln gezählt. Printex-Partikel sind reine Kohlenstoffpartikel, auf deren Oberfläche keine organischen oder chemischen Bestandteile aufgelagert sind. Printex 90-Partikel haben das Erscheinungsbild von schwarzem, geruchlosem Pulver.

4.1.3 Printex G

Die Größe der Printex G-Primärpartikel beträgt 50 nm Partikeldurchmesser und deren spezifische Oberfläche liegt bei 30 m²/g. Printex G sind wegen Ihrer Durchmessers ebenfalls den ultrafeinen Partikeln zuzuordnen. Auch diese Printex-Partikel sind reine Kohlenstoffpartikel ohne organisch-chemische Ablagerungen auf der Partikeloberfläche.

4.2 Herstellung der Partikel-Flüssigkeits-Gemische

Zur Untersuchung der Wirksamkeit der Partikel wurden sowohl Dieselrußpartikel, als auch die Printex 90 und Printex G Partikel mit dem entsprechenden Standardzellmedium vermischt. Für die Primärkonzentration von 500µg/ml wurden je 500 µg der Schadstoffpartikel abgewogen und mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt. Um eine gute Verteilung der Partikel im Aqua dest. zu erzielen, wurde das Gemisch in einem 15 ml Falcon Tube für 3 min mit dem Ultraschallstab in einem Eisbad sonifiziert. Das Eisbad verhindert eine zu starke Erwärmung der Partikel, mit konsekutiver Minimierung oder Veränderung der organisch-chemischen Bestandteile auf der Partikeloberfläche. Dieses Gemisch wurde mit dem Zellstandardmedium auf die eingesetzten Konzentrationen von 50, 5 und 0,5 µg/ml verdünnt. Diese Konzentrationen wurden nach dem Beispiel anderer veröffentlichter Arbeiten über Dieselrußpartikel gewählt (*Bayram et al. 1998, Yoshino and Sagai 1999*).

4.3 Charakterisierung der Probanden

Die Auswahl der für die Studie geeigneten Probanden wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen. Atopische und nicht-atopische Personen wurden als Probanden für die Studie eingeschlossen. Der Schweregrad der Atopie wurde mittels des SARA-Index (*nach Plötz, Traidl, Rakowski 2003*) bestimmt, der für einen Probanden, jeweils von zwei unabhängigen Untersuchern erstellt wurde und in den auch die Anzahl der positiven Pricktestergebnisse (Auswertung nach *Ring 1999*) für definierte Standardallergene (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lieschgras*, *Roggen*, *Weizenmehl*, *Sellerie*, *Latex*, *Birke*, *Katzenepithelien* und *Beifuß*) und die jeweils positiven spezifischen IgE RAST- Klassen mit

einberechnet wurden. Weitere Kriterien, die mit in den SARA-Index einbezogen wurden, waren Ausprägung von Rhinitis, Konjunktivitis und Pruritus, die Häufigkeit und Art der Medikamenteneinnahme gegen allergische Symptome und der Quotient von spezifischen IgE durch den Gesamt-IgE-Level im Serum. Die Nicht-Atopiker wiesen keinerlei atopische Symptome, sowie RAST-Klasse 0 für alle Standardallergene auf. Zu den Ausschlusskriterien aller Probanden zählten Rauchen, Vorliegen eines akuten Infekts oder auch die Einnahme von antiallergischen Medikamenten, wie oralen Antihistaminika oder Kortikosteroiden, zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Eosinophile Granulozyten von 21 Probanden, wovon 18 Probanden als Atopiker und 3 Probanden als Nicht-Atopiker klassifiziert wurden.

4.4 Isolierung und Anreicherung peripherer eosinophiler Granulozyten

Die Isolierung der polymorphnukleären Granulozyten (PMN), aus denen in der Folge Eosinophile isoliert wurden, erfolgte mit Hilfe der Dichtegradienten Histopaque-1077 und Histopaque-1119 (jeweils SIGMA, Deisenhofen) bei Raumtemperatur. In 50 ml Falcon-Tubes wurden zuerst 13 ml Histopaque-1119 vorgelegt, anschließend wurden 13 ml des Dichtegradienten Histopaque-1077 und zuletzt 25 ml frisches Vollblut überschichtet. Insgesamt wurden pro Experiment etwa 150ml frisches Vollblut verwendet, welches auf sechs Falcon-Tubes à 25 ml verteilt wurde. Die Dichtezentrifugation erfolgte bei 754 g für 45 Minuten und 20°C Temperatur ohne Bremse.

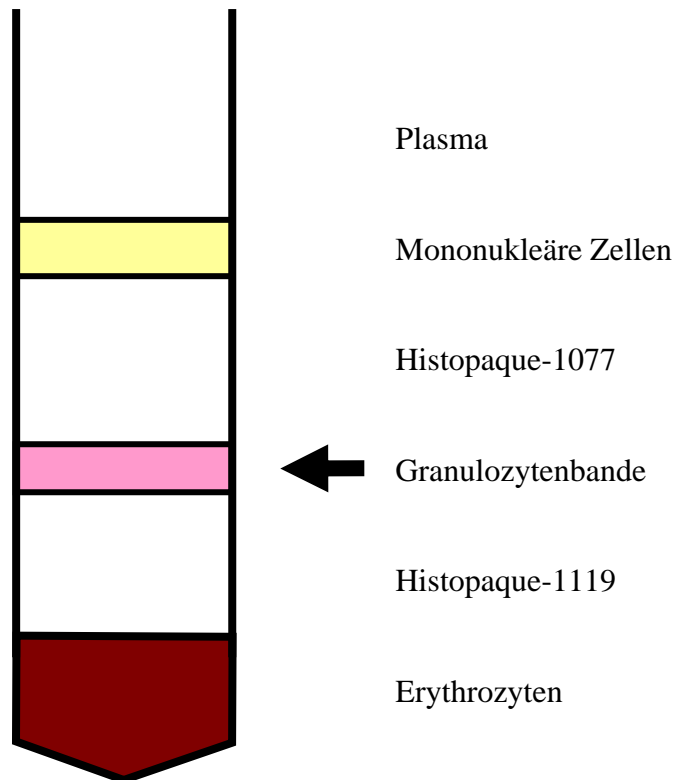


Abbildung 5: Typische Banden nach Dichtezentrifugation

Die oberen Schichten wurden vorsichtig mit der Pasteur-Pipette bis circa 0,5 cm über der 2. Interphase entnommen und verworfen. Die Granulozytenbanden von je 1,5 Rörchen wurden vorsichtig mit der Pasteurpipette entnommen, mit 50 ml MACS-Puffer (siehe Anhang) aufgefüllt und 20 Minuten lang bei 409 g und 20°C zentrifugiert. Das bei dieser Prozedur entstandene Pellet wurde für einen zweiten Waschschrift mit 1 ml MACS- Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Rörchen auf 35ml mit MACS- Puffer aufgefüllt und nun bei 301 g 10 Minuten lang das zweite Mal zentrifugiert. Um die Verunreinigung der Zellsuspension mit Erythrozyten so gering wie möglich zu halten, wurden vor dem dritten Waschschrift Erythrozyten selektiv lysiert. Dazu wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet erneut suspendiert. Auf die Zellsuspension wurden mit der 1000er Pipette 1000 µl Aqua dest. hinzugegeben und die Zellsuspension wurde etwa siebenmal resuspendiert. Nach 30 Sekunden wurde, durch Zugabe von 1000 µl steriler 1,8% NaCl- Lösung, die physiologische Osmolarität von 0,9% NaCl wiederhergestellt. Daraufhin wurde der Ansatz wieder mit MACS- Puffer auf 30 ml aufgefüllt und ein drittes Mal 10 min bei 301 g zentrifugiert. Nun wurde, nach Absaugen des Überstandes, das Pellet aufgewirbelt, mit 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf 30 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt. Diesem Ansatz wurde ein Aliquot von 10 µl entnommen, um nach Färbung mit Türk'scher Lösung, mit Hilfe der

Neugebauer-Zählkammer die Zellkonzentration pro ml zu bestimmen. Diese Zellkonzentration wurde dann auf die absolute Zellzahl in 30 ml hochgerechnet. Nachdem die absolute Zellzahl bestimmt wurde, wurden die Granulozyten bei 301 g, 10 min lang mit Bremse abzentrifugiert.

Anschließend erfolgte die Anreicherung der eosinophilen Granulozyten mittels Negativselektion in der VARIO-MACS-CS-Säule. Dazu wurden die abzentrifugierten PMN mit CD 16-Microbeads 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Bindung der neutrophilen Granulozyten an die CD 16-Microbeads wurden diese in der Magnetsäule zurückgehalten, während die eosinophilen Granulozyten die Säule passierten, da Eosinophile keinen CD 16-Rezeptor an der Zelloberfläche aufweisen.

Die Kapazität der CS- Säule beträgt bis zu 2×10^8 Zellen. Bei der Inkubation wurden in der Regel 200×10^6 PMN, 200 µl CD 16-Microbeads und 200 µl MACS-Puffer hinzugegeben und der Ansatz gut resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubationszeit wurde nochmals 1 ml MACS- Puffer pro 50×10^6 eingesetzte Zellen aufgefüllt.

Die Vorbereitung der CS-Säule erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurde sie mit 60 ml im Ultraschallbad entgasten MACS-Puffer äquilibriert. Die 1-4 ml Zellsuspension wurde auf die Säule aufgetragen und mit 30 ml MACS-Puffer ausgespült. Die eosinophilen Granulozyten wurden auf Eis (50 ml Falcon Tube) gehalten und anschließend bei 301 g, 10 min lang abzentrifugiert, in 1-2 ml Standardmedium (siehe Anhang) aufgenommen die Zellkonzentration mittels der Neugebauer Zählkammer bestimmt. Die Ausbeute der Eosinophilen lag, abhängig von der Eosinophilenzahl des Probanden, bei circa 0,5-6% der eingesetzten Zellzahl der Granulozytenfraktion, dies entspricht etwa $1,0$ bis $4,5 \times 10^6$ eosinophilen Granulozyten pro Isolationsansatz.

4.5 Kultivierung von primären humanen Keratinozyten

Die primären humanen Keratinozyten wurden aus der entfernten Präputialhaut von zirkumzidierten männlichen Kleinkindern gewonnen. Das Biopsiematerial wurde frisch verarbeitet. Eine 6-well-Platte wurde mit 1x10 ml DPBS, mit je 10 ml der verschiedenen Antibiotic-Antimycotic-Lösungen und mit 1x10 ml Dispase Gebrauchslösung beschickt.

Das Transportmedium wurde anschließend vorsichtig aus einem 50 ml Falcon-Tube abgesaugt und das Biopsiematerial mittels Pinzette in eine bereitgestellte 8 cm Petrischale überführt. Die Fettschicht wurde mit einem Skalpell von der Dermis entfernt und zu gleich großen Hautstücken in zwei oder drei Teile geschnitten. Die Hautstücke wurden nun in DPBS gewaschen und anschließend für je 20 min in die drei verschiedenen Antibiotic-Antimycotic-Lösungen mit der Dermis nach unten eingelegt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur auf dem Rotationstisch. Bei Atopikerbiopsien war eine zusätzliche 20-minütige Inkubation mit 1%er Flucloxacillinlösung notwendig.

Darauf folgend wurden die Proben in Dispase Gebrauchslösung eingelegt und für circa 2-3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nun wurde eine Petrischale (3 cm) mit 1 ml Trypsin-EDTA und zwei Minimagneten bestückt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde mit einer spitzen Pinzette die Epidermis vorsichtig von der Dermis abgezogen und in die bereitgestellte Petrischale mit Trypsin-EDTA überführt. Mit dem Rücken der Pinzette wurden noch restliche Zellen der Epidermis von der Dermis gelöst. Die so entstandene Mischung wurde in Trypsin-EDTA aufgenommen und zu der abgelösten Epidermis hinzupipettiert.

Die Petrischale mit der Epidermis wurde nun für 5-10 min auf einen Magnetrührer gestellt. In der Zwischenzeit wurden 15 ml Primärfibroblastenmedium in ein 50 ml Falcon Tube pipettiert. Dann wurden die ersten separierten Keratinozyten in dieses Medium überführt. Daraufhin wurde erneut Trypsin-EDTA auf die Epidermis pipettiert, dies wieder für 5-10 min auf den Magnetrührer gestellt und anschließend das Medium abpipettiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Zellen vollständig vom Stratum corneum abgelöst waren. Die Kontrolle der gewonnenen Keratinozyten erfolgte mikroskopisch. Der Vorgang wurde maximal 10mal wiederholt, danach wurden die restlichen Zellen mit Medium durch Auf- und Abpipettieren vom Stratum corneum gelöst und zu den anderen Zellen pipettiert (Zusammensetzung der verschiedenen Medien siehe Anhang).

Anschließend wurden die Zellen in der Zentrifuge pelletiert (10 min; 1200 UpM), die Zellzahl bestimmt und die Zellen (ca. $5\text{-}10 \times 10^6$) in T25 Zellkulturflaschen in 5 ml Primärkeratinozytenmedium verteilt. Diese Zellen entsprachen dann der Fraktion KP_0 (siehe Anhang).

Am ersten Tag nach der Aussaat der Keratinozyten wurde ein vorsichtiger Mediumwechsel vorgenommen. Apoptotische und letale Zellen wurden entfernt. Danach erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel.

Die KP_1 -Fraktion (siehe Anhang) der Keratinozyten wurde für jeden Stimulationsansatz mit Rußpartikeln frisch aufgetaut. Pro Stimulationsansatz wurden 100.000 Keratinozyten pro 3 ml Medium in je ein Well verteilt. Am darauf folgenden Tag wurde das Keratinozytenmedium erneut gewechselt. Pro Well wurden 3 ml frisches Keratinozytenmedium hinzugegeben. Nach weiteren 2-3 Tagen wurden die Keratinozyten schließlich mit den in Keratinozytenmedium ohne Hydrocortison eingemischten Kohlenstoffpartikeln für 48 h stimuliert. Die einzelnen Zellansätze wurden täglich auf Verunreinigungen oder apoptotische Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert.

4.6 Stimulation von Eosinophilen und Keratinozyten mit feinen und ultrafeinen Partikeln

Eosinophile:

Um die isolierten peripheren eosinophilen Granulozyten mit den verschiedenen Partikelarten zu stimulieren, wurden Eosinophile in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Standardmedium eingestellt und 90 min lang mit in den verschiedenen Partikelkonzentrationen [50, 5, 0,5 $\mu\text{g/ml}$] in einer 24-Well-Platte inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert (10.000 rpm, 10 min) und bis zur Messung der Aktivierungsmarker (ECP, EPX) bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Keratinozyten:

Um die indirekte Stimulation von Eosinophilen durch Mediatoren aus Partikel-stimulierten Keratinozyten zu untersuchen, wurden zunächst die Überstände von Partikel-stimulierten Keratinozyten hergestellt. Hierzu wurden primär humane Keratinozyten isoliert und diese in Keratinozytenmedium ohne den Zusatz von Hydrocortison mit Printex 90, Printex G und Diesel Standard Partikeln [50, 5, 0,5 $\mu\text{g/ml}$] für 48 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände der Keratinozyten abgenommen, zentrifugiert

(10.000 rpm, 10 min) und mit einem 0,2 µm großen Filter filtriert, um auszuschließen, dass noch Rückstände der Keratinozyten oder der Partikel in den Überständen vorhanden waren. Die so gewonnenen Überstände wurden dann entweder sofort für folgende Experimente verwendet, oder bis zur Weiterverwendung bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

4.7 Bestimmung der Vitalität von Partikel-stimulierten eosinophilen Granulozyten

Um zu überprüfen, ob die eingesetzten Stimulantien eventuell toxische Wirkungen auf eosinophile Granulozyten in Bezug auf die Initiation von Nekrose oder Apoptose besitzen, wurden Vitalitätsstudien durchgeführt. Eosinophile Granulozyten wurden 90 min und 16 h mit verschiedenen Partikelkonzentrationen [0,5, 5, 50 µg/ml] im Standardmedium inkubiert und anschließend die Vitalität der Eosinophilen mittels Methylenblaufärbung überprüft. Alle nach der Inkubationszeit abgestorbenen Eosinophilen wurden durch Methylenblau angefärbt und konnten so im Lichtmikroskop mit Hilfe der Neugebauer-Zählkammer bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Vitalitätsindex angegeben, der sich aus den noch verbleibenden überlebenden Zellen geteilt durch alle gezählten Zellen errechnet. Außerdem wurde mittels des Durchflusszytometers und einer Annexin-V-Antikörper, 1 µmol/l Ethidiumbromid Färbemethode (Firma Bender Med Systems, Cat No BMS306FI) die Apoptose- und Nekroserate von mit Keratinozytenüberständen (90 min, 37°C) stimulierten eosinophilen Granulozyten bestimmt. Die Anfärbung der Zellen und die Auswertung mittels des FACS-Geräts erfolgten nach den Angaben des Herstellers der Färbemethode.

4.8 Vorstimulation der eosinophilen Granulozyten mittels GM-CSF

Um eine Vorstimulierung der eosinophilen Granulozyten vor Inkubation mit den verschiedenen Partikelarten zu erreichen (sog. „priming“), das heißt diese für das eingesetzte Stimulans noch sensibler zu machen, wurden die Eosinophilen (1×10^6 Zellen/ml) in einem Teil der Ansätze mit GM-CSF vorstimuliert. Die Vorinkubation erfolgte nach einer publizierten Methode (*Simon et al 2001*) für 25 min mit 1 µg/ml GM-CSF im Standardmedium gelöst bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Es wurden dabei jeweils Doppelansätze durchgeführt. In der Auswertung konnte dann die ECP-Freisetzung von mit GM-CSF vorstimulierten Zellen und nicht vorstimulierten Zellen verglichen werden.

4.9 Morphologische Untersuchungen

4.9.1 Herstellung der Zytopräparate und Färbung nach Pappenheim

Zur lichtmikroskopischen Beurteilung der Wechselwirkung zwischen Eosinophilen und feinen und ultrafeinen Partikeln wurden nach Inkubation Zytopräparate hergestellt. Dazu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, isoliert und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml 1h lang bei 37°C und 5% CO_2 mit den verschiedenen Partikeln (50 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert.

Von den Zellsuspensionen wurden Aliquots (200 μl , entsprechend 2×10^5 Eosinophilen) entnommen, und in Anwesenheit von 0,01% BSA in der Megafuge 1.0 R (500 rpm = 43 g, 5min, RT) zentrifugiert. Die Fixierung der Präparate erfolgte mit vierprozentigem Formaldehyddampf für drei bis fünf Minuten. Anschließend wurden die Präparate nach Pappenheim gefärbt (siehe Anhang). Die getrockneten Präparate wurden mit Estellan-Flüssigkeit (Merck, Darmstadt) fixiert und lichtmikroskopisch begutachtet. Mit Hilfe einer aufgesetzten Photokamera wurden die Präparate photodokumentiert. Es wurden pro Versuchsansatz acht Objektträger mit je zwei Zellpellets hergestellt.

4.9.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Glutaraldehyd-fixierte Ausstrichpräparate von isolierten Eosinophilen, welche mit Partikeln inkubiert wurden (1h, 37°C , 5% CO_2) und Partikel-stimulierte Keratinozyten (48h, 37°C , 5% CO_2) verwendet. Die Fixierung mit Glutaraldehyd erfolgte in zwei aufeinander folgenden Schritten, wobei die Zellen zuerst 19 min in 2% Glutaraldehyd in Tyrodelösung und anschließend 16 min in 2% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer eingelegt wurden. Im zweiten Arbeitsschritt wurden die vorbereiteten Zellen mittels Osmiumtetroxid (1% Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer, 0,1M, pH 7,4) nachfixiert. Daraufhin wurden die Zellen über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, mit Hexamethyldisilizan (HMDS) und Kohlendioxid getrocknet, mit Gold „besputtert“ und im Rasterelektronenmikroskop (JSM 6300 von Jeol) analysiert. Die Präparation und Durchführung erfolgte freundlicherweise durch I. Weichenmacher und C. Weil, Zentrum für Allergie und Umwelt, TUM.

4.10 Chemotaxisassay mittels Transwell-Kammersystemen

Die gerichtete Migration von eosinophilen Granulozyten wurde mit dem Transwell-Kammersystem untersucht. Die chemotaktische Wirkung von den zu untersuchenden potentiellen Chemoattraktanzien wurde mit bekannten Chemoattraktanzien (z.B. Eotaxin) verglichen.

Es wurden so genannte Transwell-Platten (Costar, Bodenheim) mit 24 Fächern pro Platte verwendet. Durch speziell konstruierte Einsätze ließen sich die Fächer in je eine obere und eine untere Kammer trennen. Als Barriere zwischen den Kammern fungiert eine Membran mit 5 µm großen Poren, durch welche eosinophile Granulozyten (10-12 µm) nur aktiv in die untere Kammer gelangen können.

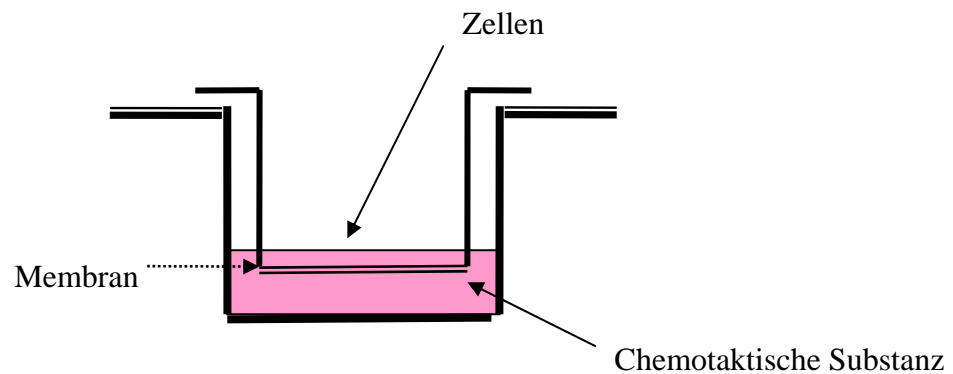


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Transwell-Kammer

Für die Inkubation wurden in die obere Kammer 100 µl der Zellsuspension, welche 1×10^5 Eosinophilen entsprach, vorgelegt. In die untere Kammer wurden jeweils 600 µl der potentiell chemotaktisch wirksamen Substanzen gegeben. Anschließend wurden die Transwell-Platten für 90 min bei 37°C und 5% CO₂ zur Inkubation in den Brutschrank gestellt. Die Einsätze, die die obere Kammer bildeten, wurden vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Nun wurde die verbliebene Lösung, nach Entnahme von 300 µl aus der unteren Kammer und Überführung in ein spezielles FACS-Röhrchen, auf die Anzahl der migrierten Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe unten) untersucht.

Um einen Bezugswert zu bekommen, wie viele Zellen bereits ohne Einfluss eines Chemoattraktans die trennende Membran durchwanderten, zum Beispiel durch ungerichtete Zellwanderung, wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Zu diesem Zweck wurden 600 µl Standardmedium in eine untere Kammer einpipettiert.

Analog wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Diese bestand aus der Migration auf das für eosinophile Granulozyten bekannte Chemokin Eotaxin (100ng/ml). Die übrigen Migrationwerte wurden dann mit Positiv- und Negativkontrolle ins Verhältnis gesetzt. So ließen sich Rückschlüsse auf die chemotaktische Potenz der verwendeten Substanzen ziehen. Die Angabe der chemotaktischen Aktivität der Zellen erfolgte als chemotaktischer Index (siehe Anhang), der sich als Quotient aus den migrierten Zellen des jeweiligen Ansatzes durch die Anzahl der migrierten Zellen der Negativkontrolle errechnet. Es wurden jeweils 2- oder 3-fach Bestimmungen durchgeführt.

Die FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) ist ein Verfahren, das mittels Durchflusszytometrie eine objektive und schnelle Charakterisierung und Zählung von Zellen verschiedener Art ermöglicht. Die Charakterisierung kann anhand folgender Parameter erfolgen:

- relative Größe der Zellen im Vorwärtsstreulicht (FSC- Forward Scatter)
- relative Granularität oder Oberflächenbeschaffenheit der Zellen im Seitwärtsstreulicht (SSC)
- relative Fluoreszenzintensität (FL1, FL2, FL3 und FL4)

Im Rahmen der Arbeit wurde ein FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson (Montan Viel, USA) verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit einzeln durch das Argonlicht geführt. Dabei entstand ein Streulicht, das von verschiedenen Detektoren registriert wurde. So wurde das von der Zelle in Richtung Laserstrahl gestreute Licht vom so genannten FSC-Detektor (Forward Scatter), das Seitwärtsstreulicht vom SSC-Detektor (Side Scatter) aufgenommen. Diese optischen Signale wurden dann in elektronische Signale (Spannungspulse) umgewandelt und anschließend digitalisiert. Daraufhin konnten die Daten im Computer ausgewertet und graphisch dargestellt werden. Durch die Sortierung anhand der oben genannten Parameter entstanden charakteristische Bereiche, die auf dem Computermonitor abgebildet wurden. Die Eosinophilenpopulation wurde mittels eines „Gates“ von beschädigten oder kontaminierenden Zellen abgegrenzt, diese nicht relevanten Zellen gingen somit in der Beurteilung unserer Ergebnisse nicht ein.

4.11 Bestimmung von ECP im Fluoroimmunoassay (FEIA) und von GM-CSF, IL-18, MIP-3 α , IL-5, Eotaxin, RANTES und TARC im Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)

In den Zellüberständen der stimulierten eosinophilen Granulozyten wurde ECP mittels FEIA (Pharmacia, Freiburg) quantitativ bestimmt. Die Zellüberstände der Partikel-stimulierten Keratinozyten wurden auf die Ausschüttung von GM-CSF, IL-18, MIP-3 α , IL-5, Eotaxin, RANTES und TARC mittels ELISA (R&D Systems, Minneapolis) überprüft. Die Messungen erfolgten gemäß den Bestimmungen der Hersteller. Die Durchführung und Auswertung von FEIA erfolgte freundlicherweise durch J. Grosch, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Technische Universität München.

4.12 Detektion des Zelloberflächenantigens CD11b mittels durchflusszytometrischer Methoden

Die Färbung des Oberflächenantigens CD11b mittels Antikörper erfolgte nach einer etablierten Standardtechnik (*Plötz et al 2001*). Die Hochregulation des CD11b- Moleküls wurde nach zweistündiger Inkubation der Eosinophilen mit den Partikeln oder mit den Überständen von mit Partikeln stimulierten Keratinozyten gemessen. Dazu mussten die Zellen direkt nach der zweistündigen Stimulation mittels FACS-Puffer fixiert werden. Die eosinophilen Granulozyten ($1-2 \times 10^5$ /Well) wurden mit der optimalen Konzentration (10 μ l) von Fluoreszeinisothiozyanat (FITC-)markierten Antikörpern (mAK) für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen FITC-markierten Antikörper in mehreren Waschschritten wieder von den eosinophilen Granulozyten entfernt. Die Messung der Antikörper-gefärbten Zellen erfolgte mit dem Durchflusszytometer (FACScan Becton Dickinson). Die Emission für Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-konjugierte Antikörper erfolgte bei 525 nm (Grünfluoreszenz, Fluoreszenz 1). Dabei wurden jeweils 10.000 Ereignisse in einer logarithmischen Skala gemessen. Um eine falsch positive Fluoreszenz der Antikörper weitgehend ausschließen zu können, wurde als Negativprobe jeweils eine FITC-Färbung mit einem unspezifischen Maus-Antikörper durchgeführt. Diese Proben zeigten dann bei der Auswertung mittels der Cellquest-Software (Becton Dickinson) idealerweise keine Fluoreszenzaktivität. Die Auswertung der spezifischen Hochregulation des CD 11b Oberflächenantigens erfolgte mittels der Angabe des Mean Fluoreszenz Indexes (MFI).

4.13 Statistische Auswertung

Falls nicht abweichend im Text erwähnt, sind die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die statistische Analyse erfolgte, falls nicht anders angegeben, durch den einseitigen T-Test.

5 Ergebnisse

5.1 Wirkung von feinen und ultrafeinen Schadstoffpartikeln auf humane eosinophile Granulozyten

5.1.1 Morphologische Untersuchungen

5.1.1.1 Lichtmikroskopie

In den morphologischen Studien zur Interaktion von eosinophilen Granulozyten mit feinen und ultrafeinen Partikeln wurden Eosinophile und die verschiedenen Typen der eingesetzten Partikel (1×10^6 Eosinophile/50 μg Partikel) für die Dauer von 1h in Koinkubation gehalten. Lichtmikroskopisch konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Partikelsorten an eosinophile Granulozyten adhäreren und teilweise von diesen phagozytiert wurden (s. Abb. 7A, 7B und 7C). Ein Unterschied zwischen den drei eingesetzten Partikelarten konnte lichtmikroskopisch nicht festgestellt werden.

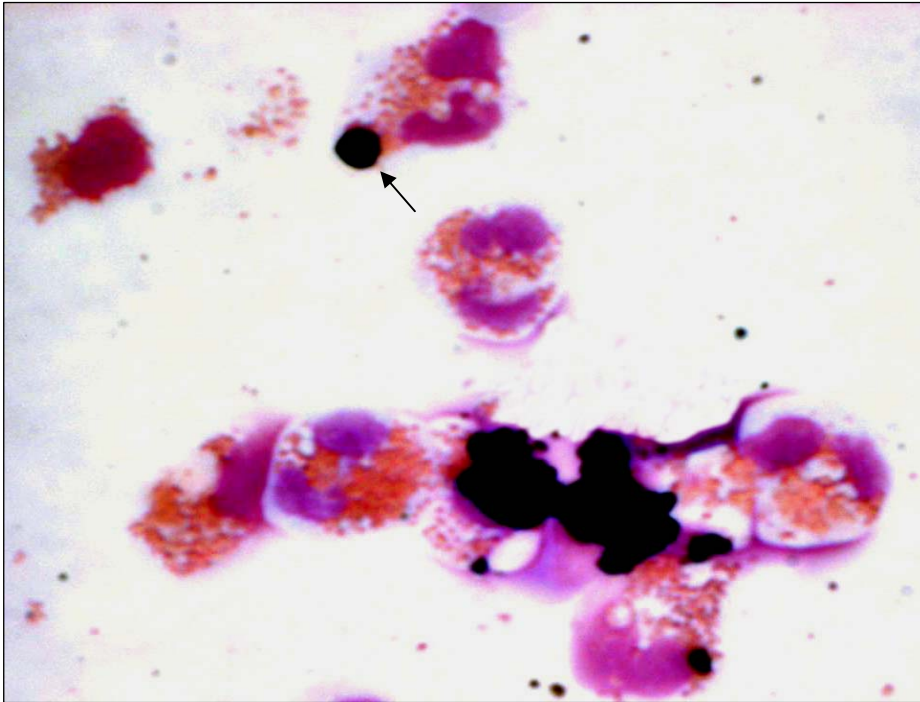


Abbildung 7A: Interaktion von humanen eosinophilen Granulozyten mit Diesel Standard SRM 1650a Partikelaggregaten nach 1h Inkubationszeit [1×10^6 Zellen/ $50 \mu\text{g}$ Partikel; 37°C ; 5 % CO_2]. Zytozentrifugenpräparat, lichtmikroskopische Aufnahme (100x).

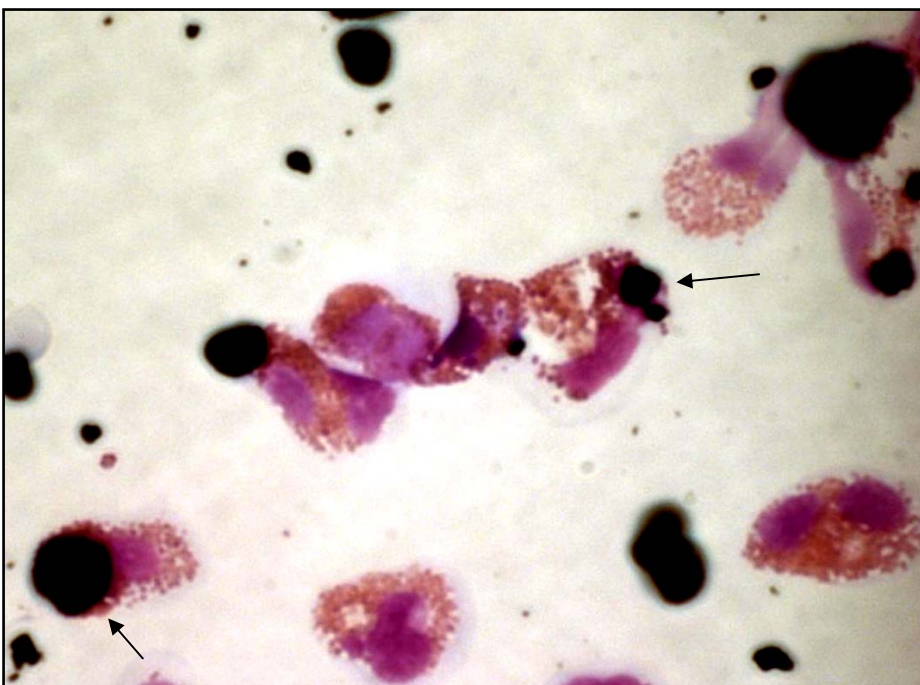


Abbildung 7B: Interaktion von humanen eosinophilen Granulozyten mit Printex 90 Partikeln nach 1h Inkubationszeit [1×10^6 Zellen/ $50 \mu\text{g}$ Partikel; 37°C ; 5 % CO_2]. Zytozentrifugenpräparat, lichtmikroskopische Aufnahme (100x).

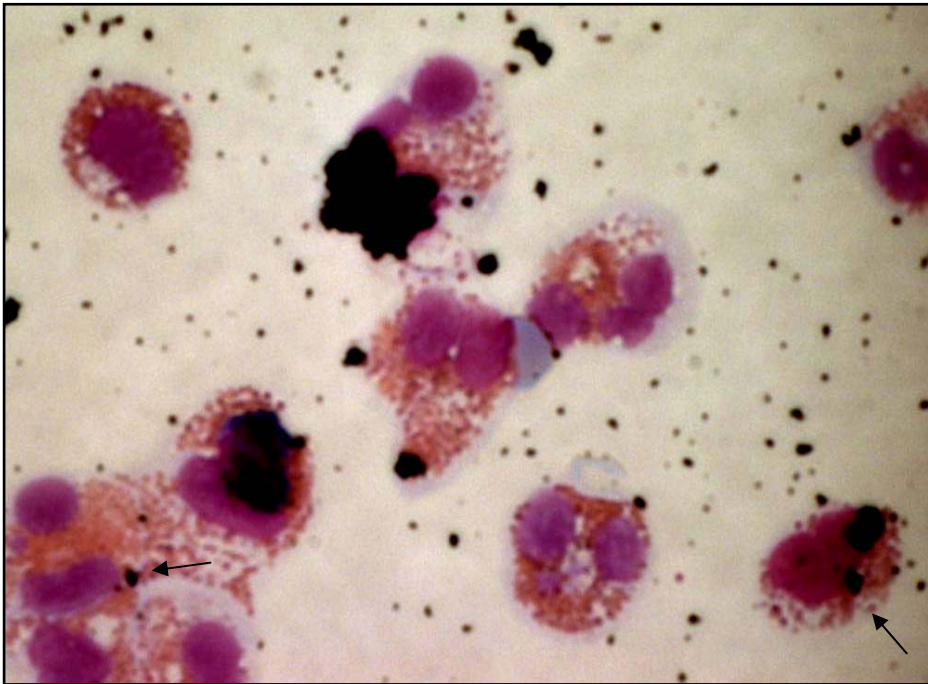


Abbildung 7C: Interaktion von humanen eosinophilen Granulozyten mit Printex G Partikeln nach 1h Inkubationszeit [1×10^6 Zellen/50 μ g Partikel; 37°C; 5 % CO₂]. Zytozentrifugenpräparat, lichtmikroskopische Aufnahme (100x).

5.1.1.2 Elektronenmikroskopie

Zur genaueren Charakterisierung der Interaktion zwischen Rußpartikeln und humanen eosinophilen Granulozyten wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Eosinophilen 1 h mit den verschiedenen eingesetzten Partikelarten [1×10^6 Zellen/50 μ g Partikel] in Koinkubation gehalten. Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung zeigte ähnlich wie in den lichtmikroskopischen Aufnahmen eine Adhärenz von den Partikeln und Dieselpartikelagglomeraten an die Eosinophilen. Die eosinophilen Granulozyten besitzen im Vergleich zu einem nicht stimulierten Granulozyten (s. Abb. 8) ein stärker granuliertes Oberflächenrelief, und es ist vereinzelt die Ausbildung von Lamellopodien erkennbar (siehe Abb. 9A, 9B und 9C). Es konnte morphologisch kein Unterschied bezüglich dem Aktivierungsgrad der Eosinophilen durch die unterschiedlichen Partikelsorten festgestellt werden.

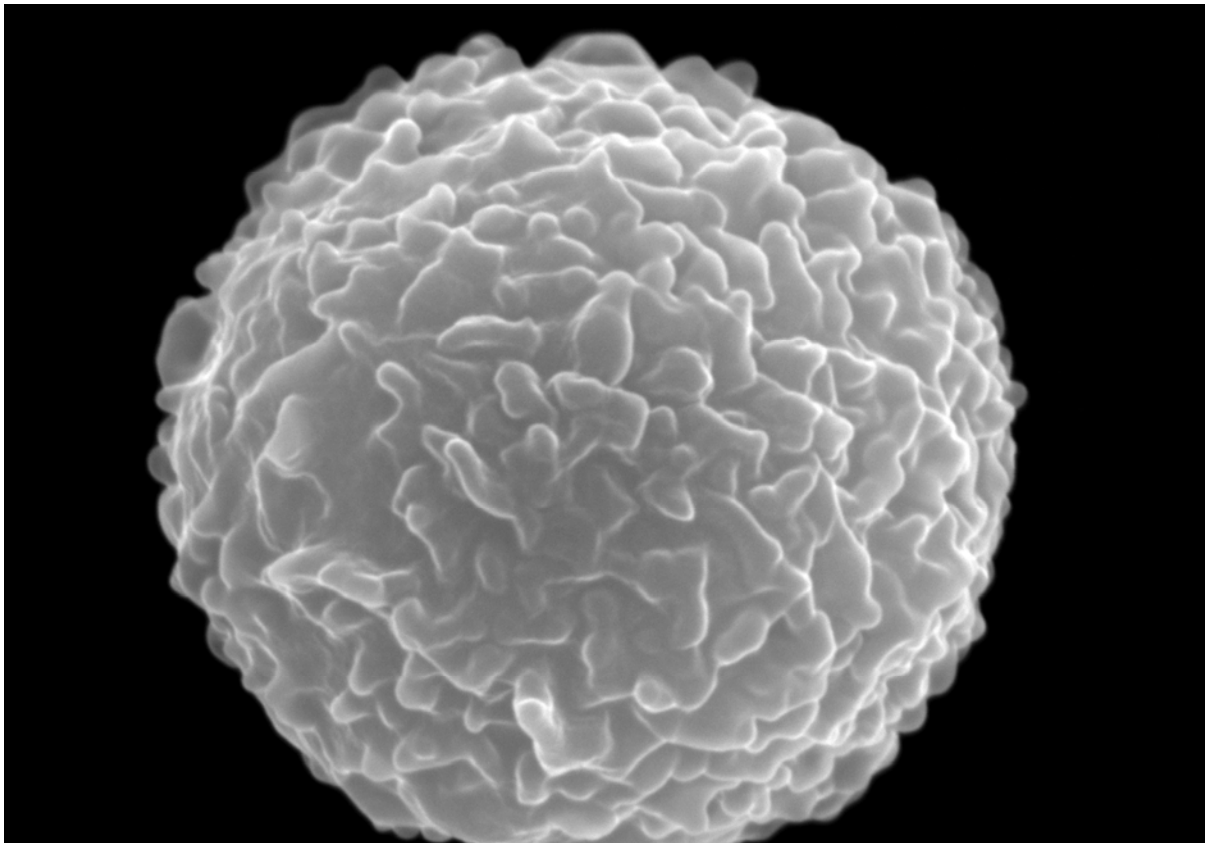


Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines einzelnen, nicht-stimulierten humanen eosinophilen Granulozyten. Balkenlänge $\text{—} = 1\mu\text{m}$

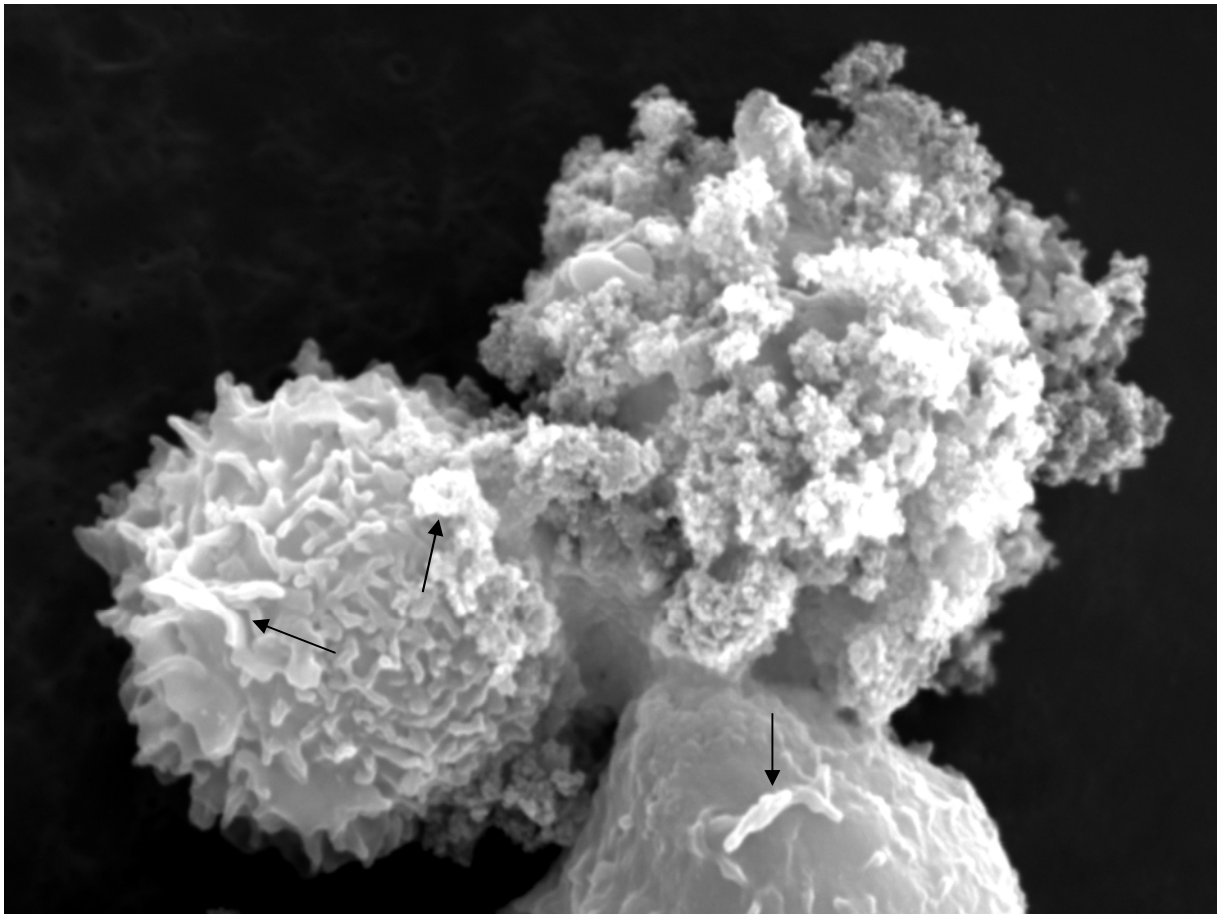


Abbildung 9A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von humanen eosinophilen Granulozyten und Diesel Standard SRM 1650a Partikelagglomeraten nach 1h Inkubationszeit [1×10^6 Zellen/ $50 \mu\text{g}$ Partikel; 37°C ; 5 % CO_2]. Deutlich zu sehen ist die Ausbildung von Spikes und Lamellopodien (Pfeile) von dem Eosinophilen in der linken Bildhälfte. Balkenlänge $\text{—————} = 3 \mu\text{m}$.

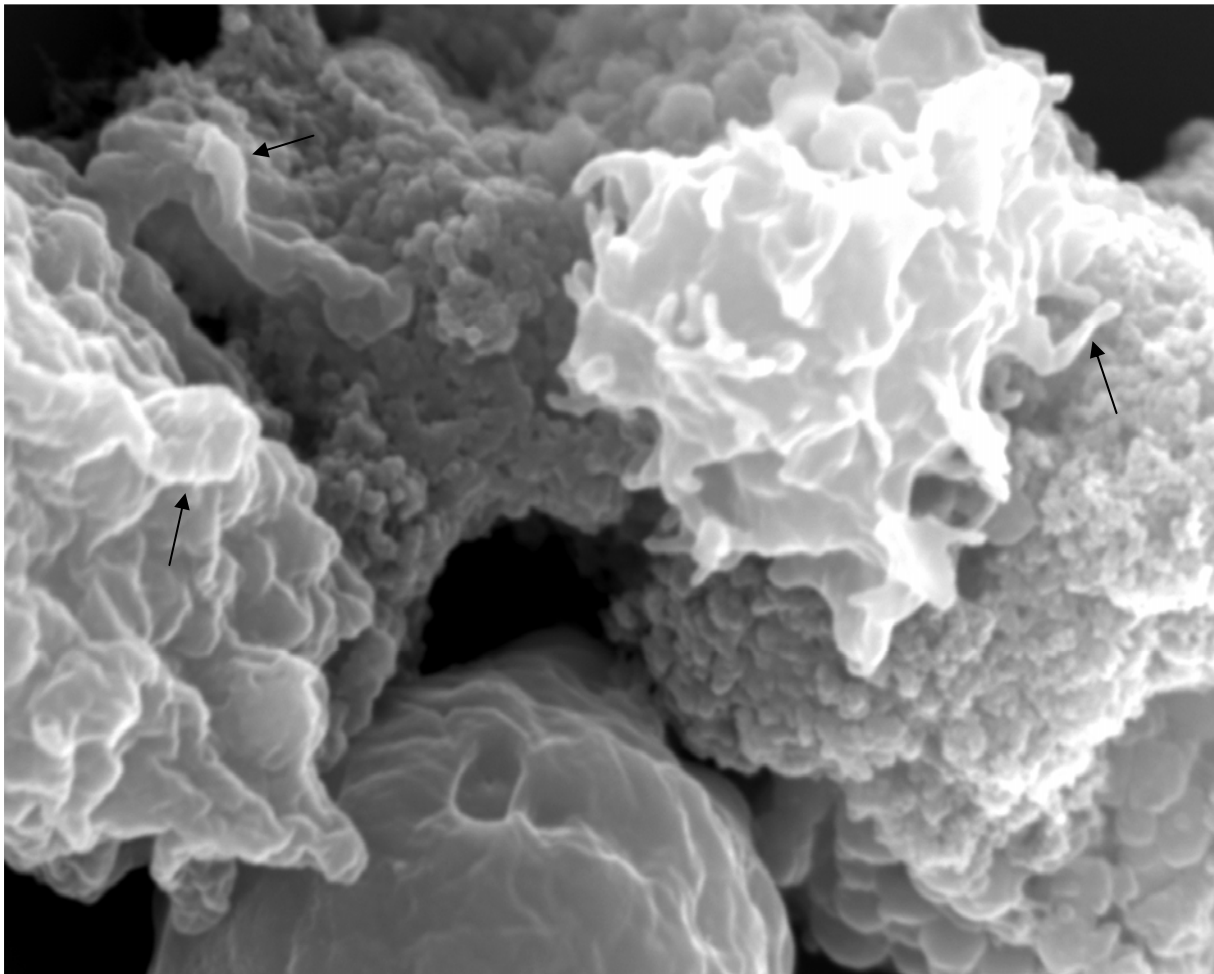


Abbildung 9B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von humanen eosinophilen Granulozyten und Printex 90 Partikelagglomeraten nach 1h Inkubationszeit [1×10^6 Zellen/ $50 \mu\text{g}$ Partikel; 37°C ; 5 % CO_2]. Zu erkennen ist die Ausbildung von Lamellopodien und Spikes durch Eosinophile (Pfeile), an denen Partikelagglomerate anhaften. Balkenlänge $\text{—————} = 1 \mu\text{m}$.

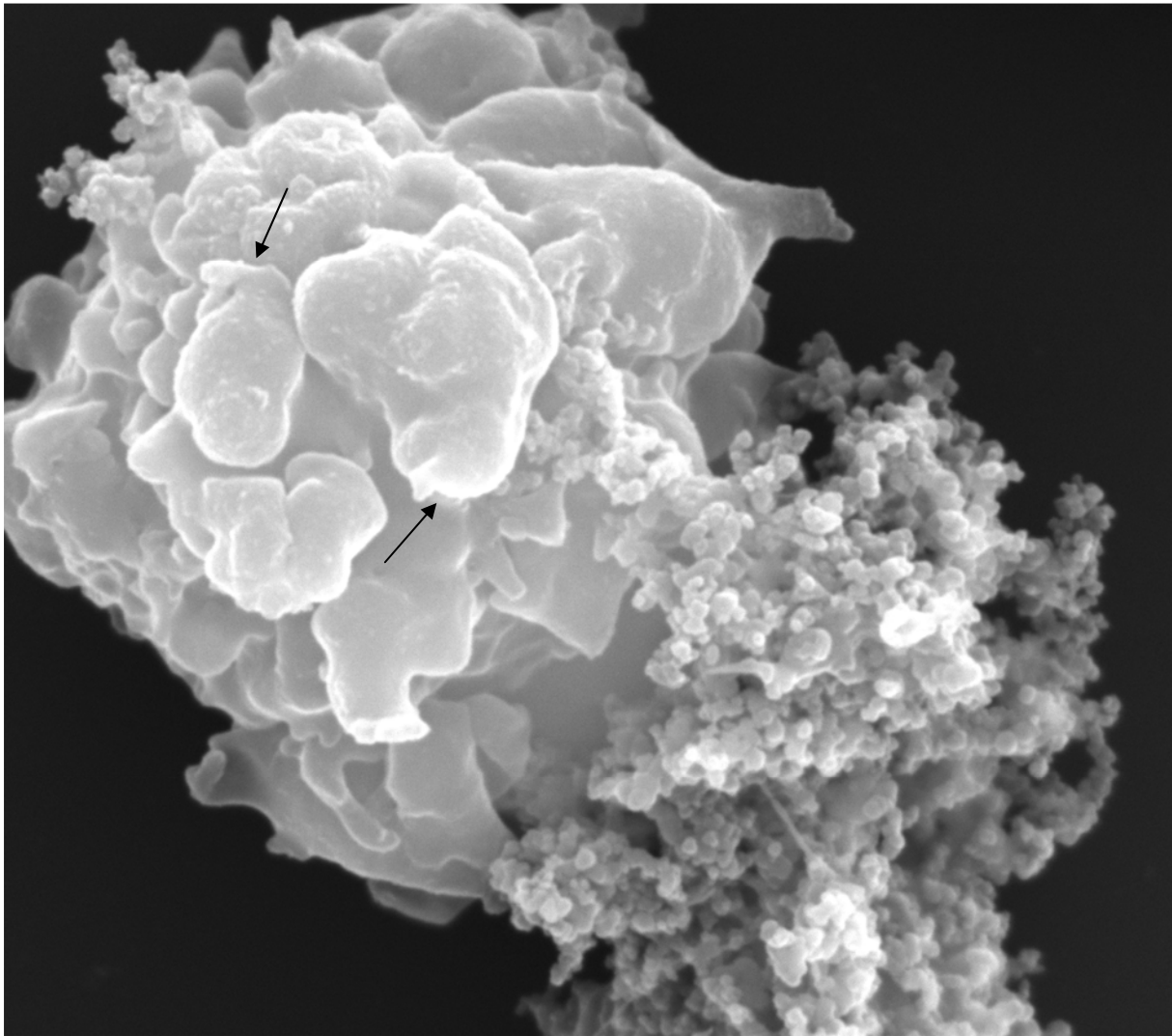


Abbildung 9C: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von einem humanen eosinophilen Granulozyten und Printex G Partikelagglomeraten nach 1h Inkubationszeit [1×10^6 Zellen/ $50 \mu\text{g}$ Partikel; 37°C ; 5 % CO_2]. Die Ausbildung von Spikes und Lamellopodien ist am eosinophilen Granulozyten zu erkennen (Pfeile).

Balkenlänge ————— = $1 \mu\text{m}$.

5.1.2 Vitalitätsmessung von Partikel-exponierten eosinophilen Granulozyten

Um eine toxische Wirkung der Dieselruß Standard Partikel auf humane periphere eosinophile Granulozyten während der Inkubationszeit auszuschließen, wurden Vitalitätsstudien nach 1,5 h und 16 h Inkubationszeit jeweils in Doppelansätzen durchgeführt. Die Länge der Inkubationszeit von 1,5h wurde deshalb so gewählt, da während der meisten Stimulationsansätze die Inkubationszeit 1,5h betrug. Darüber hinaus wurden die Eosinophilen über 16h mit den Partikeln exponiert um auch nach Langzeitexposition einen toxischen Effekt auf die Zellen ausschließen zu können. Es konnte keine relevante toxische Wirkung der verschiedenen eingesetzten Partikelarten (Diesel SRM 1650a, Printex 90, Printex G) auf die Zellen festgestellt werden. Im Vergleich zur Mediumkontrolle konnte keine signifikant erhöhte Apoptose- oder Nekroserate bei Partikel-inkubierten Eosinophilen gesehen werden (s. Abb. 10).

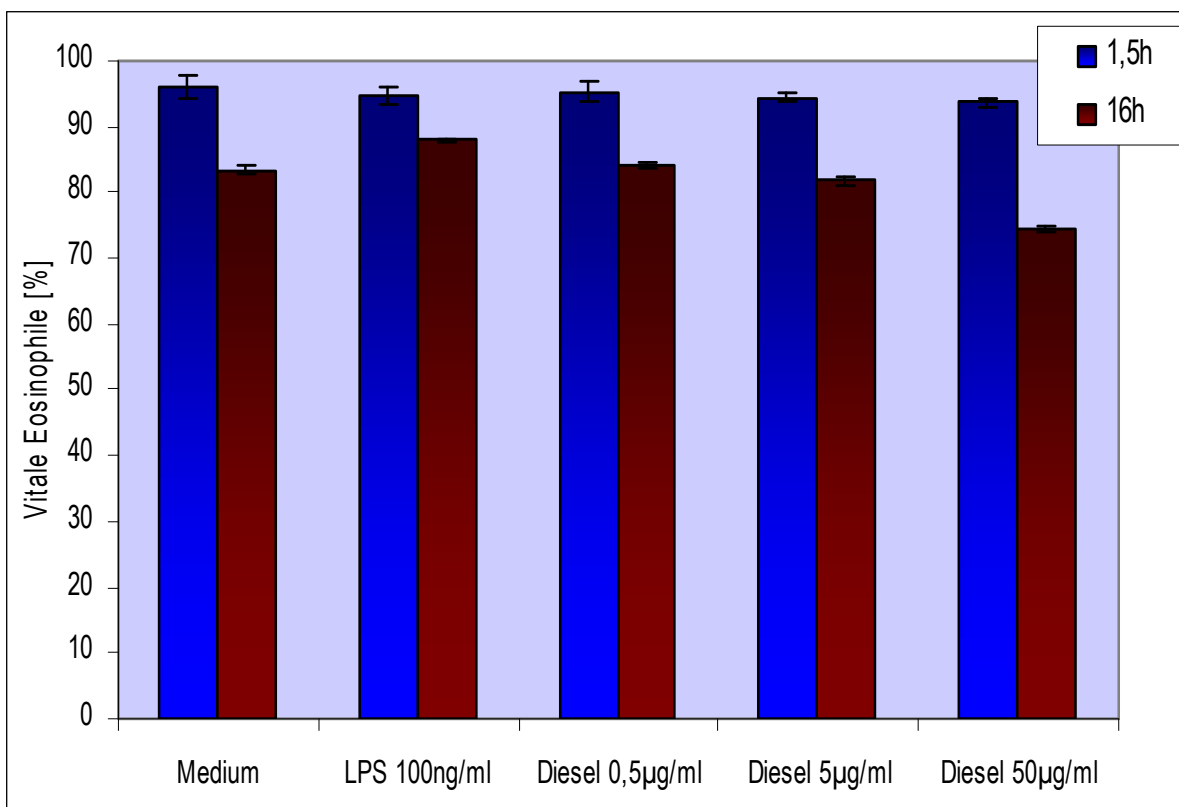


Abbildung 10: Vitalitätsrate von humanen, peripheren Granulozyten [1×10^6 Zellen/ml], die mit Dieselruß Standard Partikeln SRM 1650a [$0,5 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$] und LPS 100 ng/ml für 1,5h und 16h exponiert wurden. Es wurden jeweils Doppelansätze [$n=2$] durchgeführt, Probanden waren Atopiker. Bei der höchsten eingesetzten Partikelkonzentration $50 \mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen waren nach 1,5h über 93% und nach 16h immer noch knapp 75% der eosinophilen Granulozyten vital.

5.1.3 Einfluss von DEP, Printex G und Printex 90 auf die Migration von eosinophilen Granulozyten

Um zu klären, ob die eingesetzten Partikel bzw. an Dieselrußpartikel adsorbierte organisch-chemische Substanzen chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten wirken, wurden funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Es wurden Dosiswirkungsstudien zur Chemotaxis durchgeführt. Als Chemoattraktanz wurden Diesel SRM Standard Partikel, Printex 90 und Printex G Partikel [0,5, 5, 50µg/ml] eingesetzt. Hierzu wurden die Partikel, wie in Kapitel 4.2 ausführlich beschrieben, mit dem Standardzellmedium mittels Sonifikator vermischt. Des Weiteren wurde bei den Migrationsstudien als Negativprobe das Standardzellmedium und als Positivprobe Eotaxin 100ng/ml mitgeführt. Alle Proben wurden als Doppelansatz durchgeführt. Alle eingesetzten Partikelarten in den unterschiedlichen Konzentrationen induzierten selbst keine Migration von eosinophilen Granulozyten (s. Abb. 11). Kohlenstoffpartikel selbst besitzen also keine chemotaktische Aktivität auf Eosinophile.

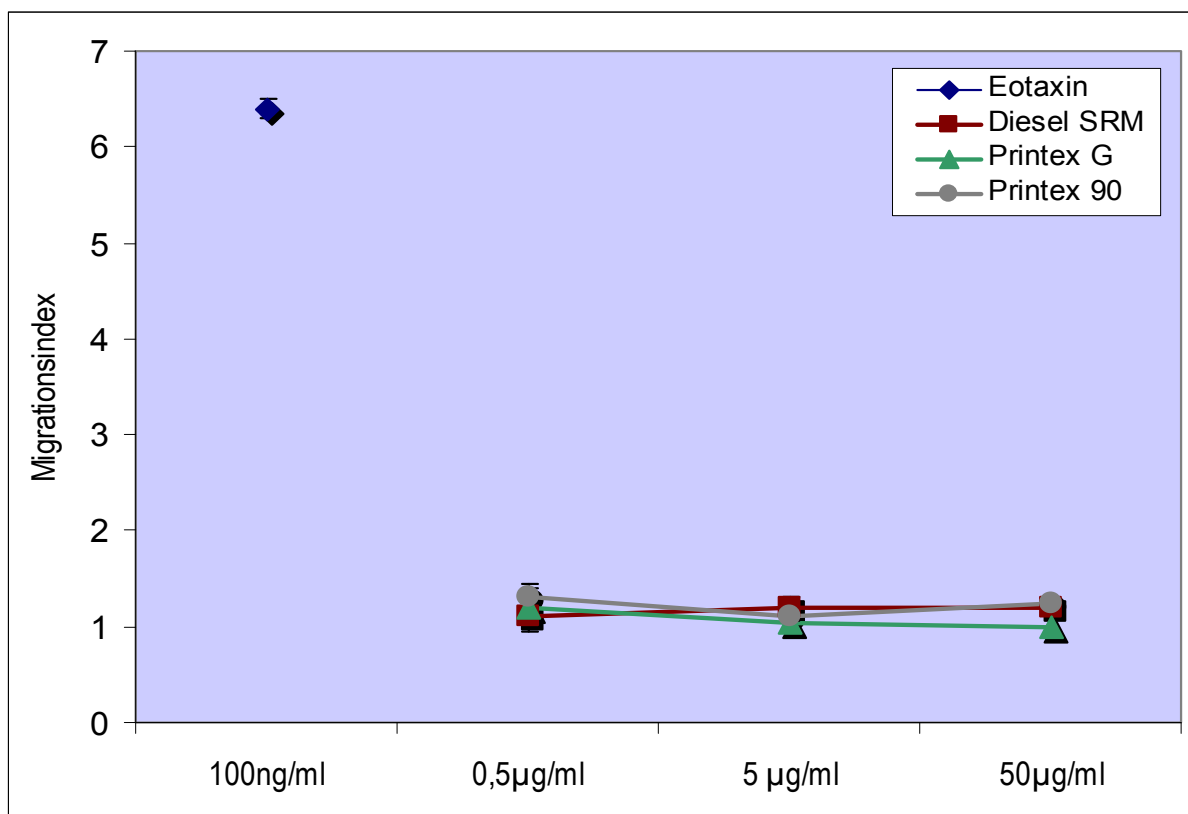


Abbildung 11: Diesel SRM 1650a, Printex G und Printex 90 induzieren keine Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten. Nur Eotaxin 100ng/ml weist als Positivprobe eine chemotaktische Aktivität auf Eosinophile auf. Inkubation: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=2.

5.1.4 Einfluss von DEP, Printex G und Printex 90 auf die Freisetzung von Granuloproteinen aus eosinophilen Granulozyten

Um den Effekt der eingesetzten Partikelarten auf die ECP-Freisetzung eosinophiler Granulozyten zu untersuchen, wurden die Zellen mit den verschiedenen Partikelgemischen stimuliert, deren Überstände abgenommen und auf den Gehalt von ECP analysiert. Hinzukommend wurde hinterfragt, ob eine 25minütige Vorstimulation mit GM-CSF, die durch Partikel induzierte ECP-Freisetzung der Eosinophilen noch steigern kann. Es konnte durch alle eingesetzten Partikeltypen eine signifikante Induktion der ECP-Freisetzung festgestellt werden. Die im Vergleich zur Mediumkontrolle stärkste Induktion der ECP-Ausschüttung konnte bei nicht-geprägten mit Printex G Partikeln stimulierten, eosinophilen Granulozyten beobachtet werden (s. Abb. 16), gefolgt von ungeprägten Eosinophilen, die mit Printex 90 Partikeln inkubiert wurden (s. Abb. 14). Die Induktion der ECP-Freisetzung konnte durch Vorstimulation mit GM-CSF bei den Konzentrationen Diesel SRM 1650a 0,5 µg/ml und Diesel SRM 1650a 5 µg/ml im Vergleich zu ungeprägten Eosinophilen verstärkt werden, die Erhöhung der ECP-Ausschüttung war allerdings als nicht signifikant anzusehen (s. Abb. 13). Zusammenfassend lässt sich also eine Induktion der ECP-Freisetzung durch Kohlenstoffpartikel an eosinophilen Granulozyten nachweisen, die sowohl bei nicht-vorstimulierten, als auch bei mit GM-CSF geprägten eosinophilen Granulozyten zu erkennen war. Ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-vorstimulierten und vorstimulierten Eosinophilen war nicht ersichtlich. Dies bedeutet, dass sowohl Dieselrußstandard SRM 1650a Partikel, als auch Printex G und Printex 90 Partikel dazu in der Lage sind, eosinophile Granulozyten zur ECP-Freisetzung zu aktivieren (s. Abb. 12 bis 17). Als Kontrolle wurden mit Medium inkubierte Eosinophile mitgeführt. Die Ergebnisse sind als ECP-Index angegeben, der sich aus dem Quotienten der ECP-Ausschüttung der stimulierten Zellen durch die ECP-Ausschüttung der mit Medium inkubierten Zellen errechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des einseitigen t-Tests berechnet.

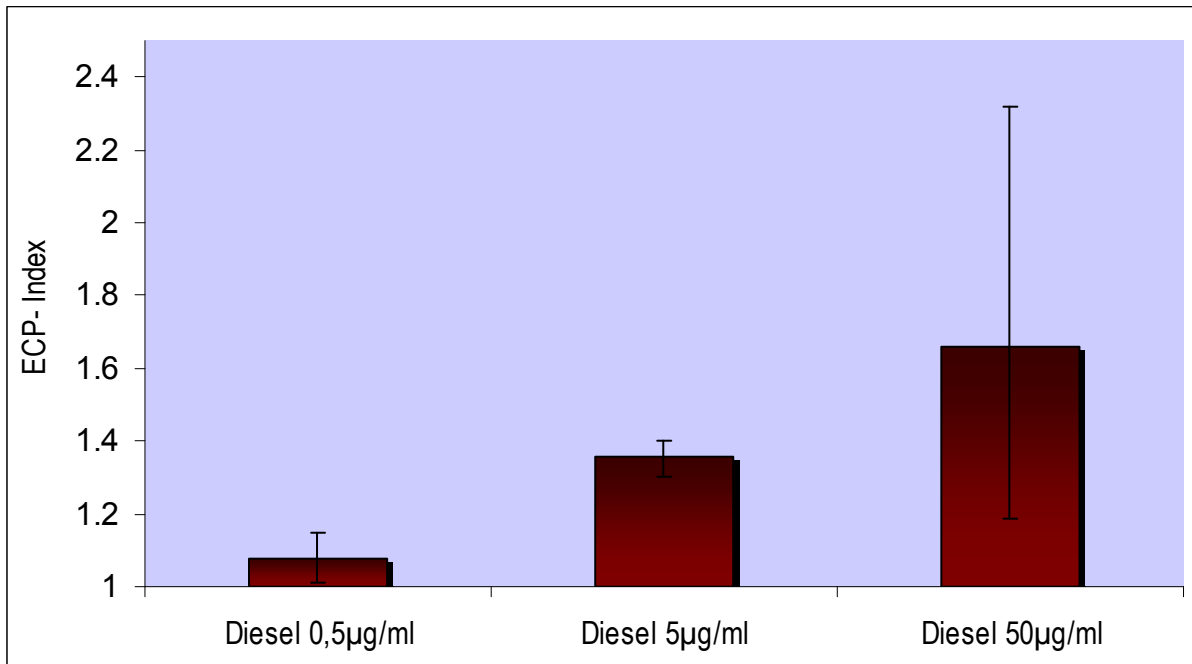


Abbildung 12: ECP-Freisetzung durch eosinophile Granulozyten nach Inkubation mit Diesel Standard SRM 1650a. Die ECP Freisetzung ist dosisabhängig und im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant erhöht. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C, n=3; Probanden: Atopiker;

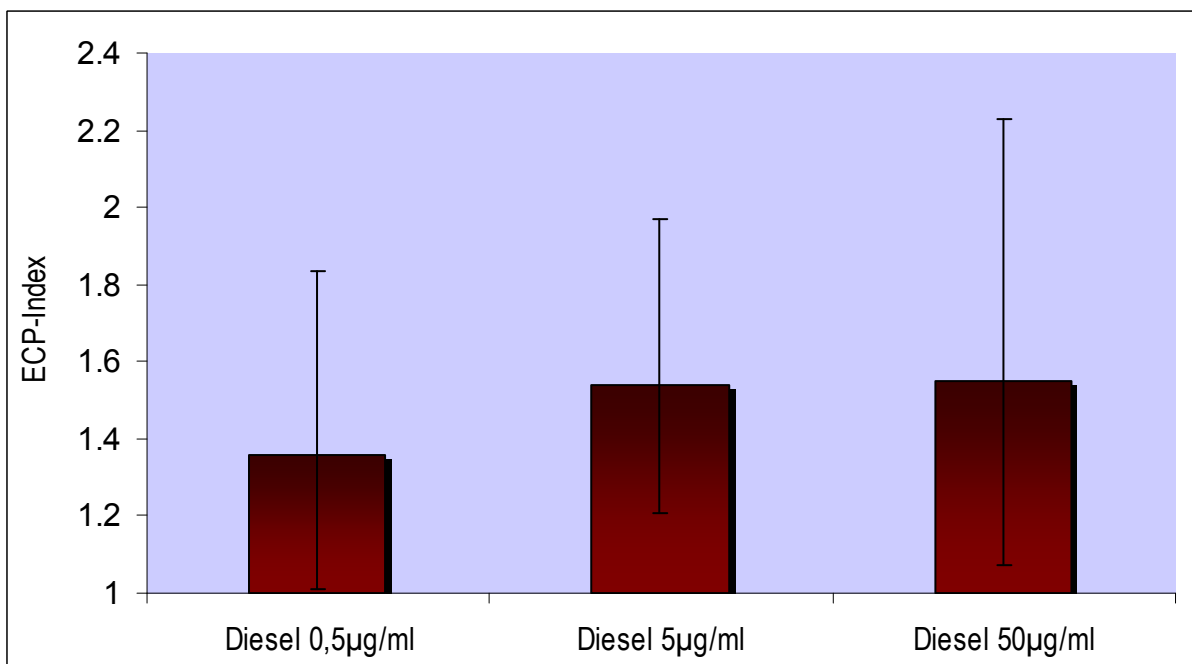


Abbildung 13: ECP-Freisetzung der GM-CSF vorstimulierten (25 min; 37°C) eosinophilen Granulozyten nach Stimulation mit Diesel Standard SRM 1650a. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C; n=4; Probanden: Atopiker; Im Vergleich zu mit Dieselpartikeln stimulierten, nicht geprierten Eosinophilen, war eine nicht signifikant stärkere Induktion der ECP-Freisetzung bei den Konzentrationen 0,5 µg/ml und 5µg/ml festzustellen (vgl. Abb. 12).

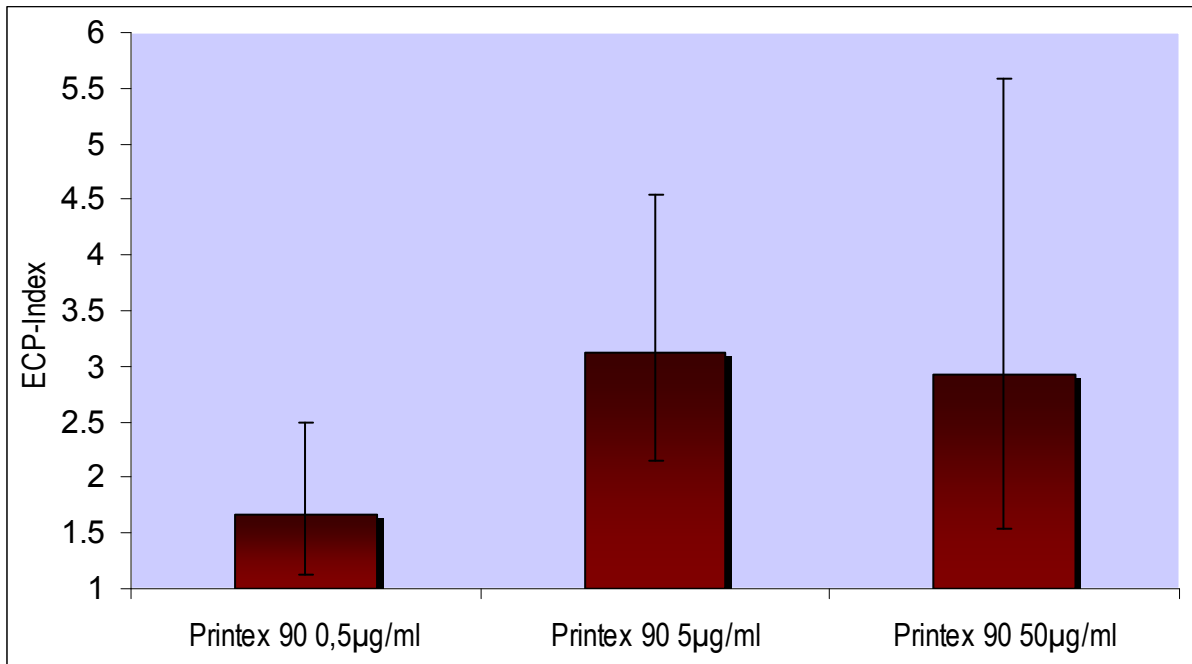


Abbildung 14: Nach 1,5h Stimulation mit Printex 90 Partikeln konnte eine signifikante Induktion der ECP-Freisetzung festgestellt werden. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C; n=3; Probanden: Atopiker;

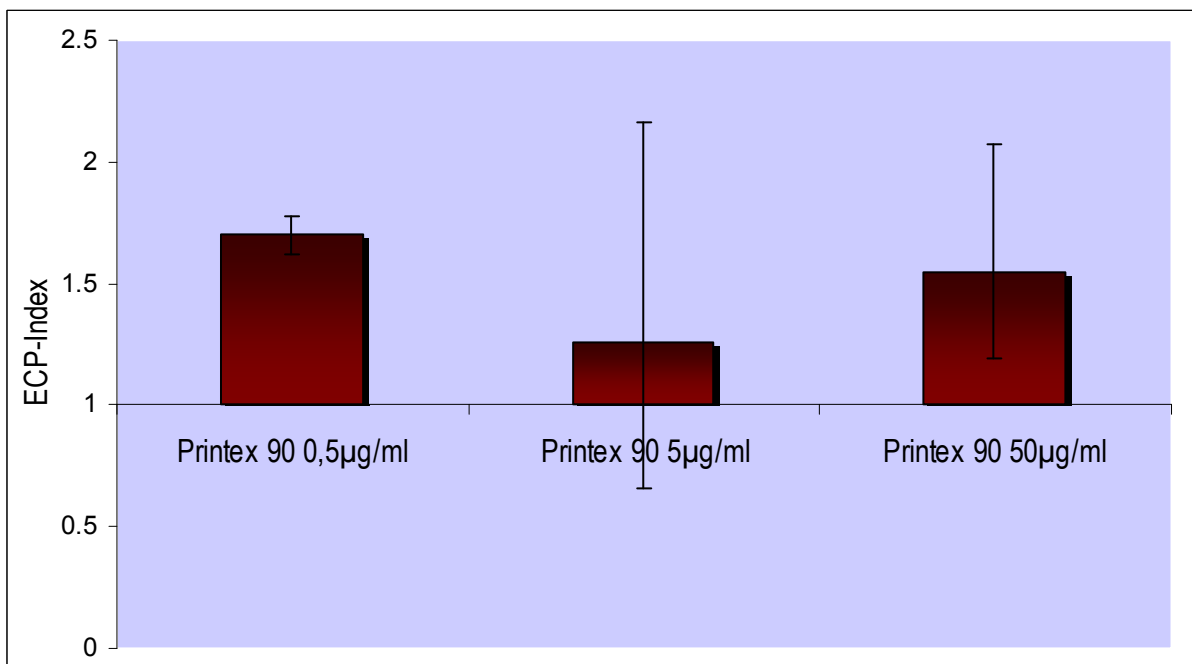


Abbildung 15: ECP-Freisetzung durch GM-CSF vorstimulierte (25 min; 37°C) eosinophile Granulozyten nach Stimulation mit Printex 90 Partikeln. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C; n=3; Probanden: Atopiker; Es konnte eine für Printex 90 0,5 µg/ml und 50 µg/ml signifikante Induktion der ECP-Freisetzung festgestellt werden. Im Vergleich zu mit Printex 90 Partikeln stimulierten, nicht gepimten Eosinophilen, war keine stärkere Induktion der ECP-Freisetzung festzustellen (vgl. Abb. 14).

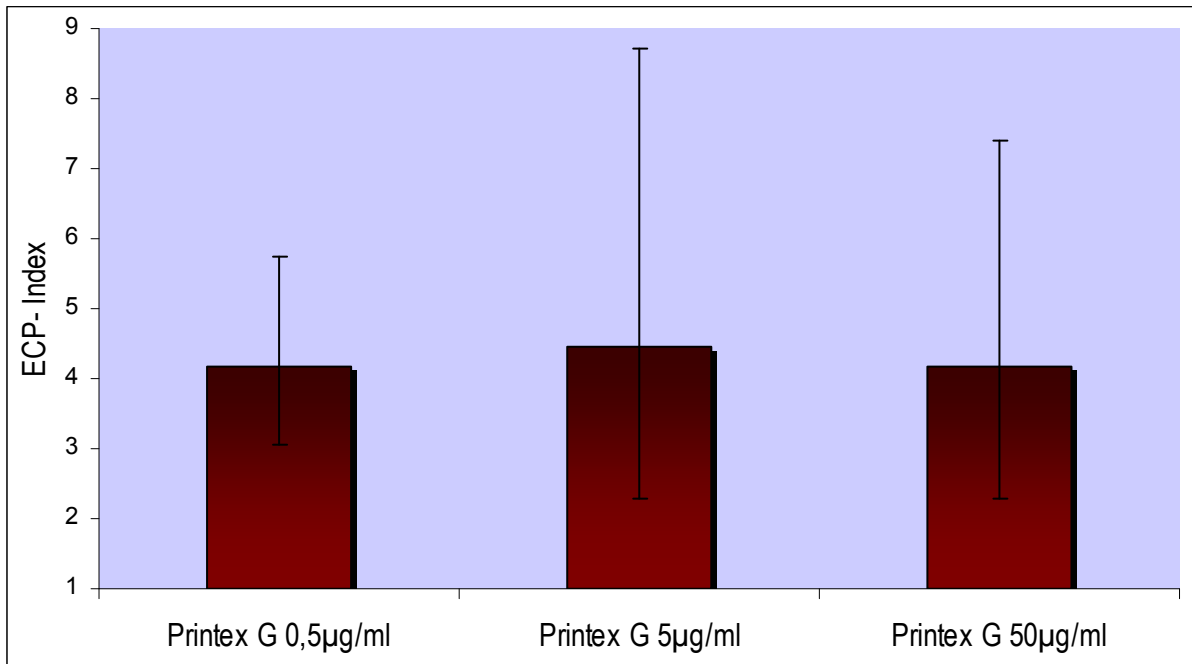


Abbildung 16: ECP-Freisetzung durch Printex G-stimulierte Eosinophile. Stimulation: 1×10^6 Zellen; 1,5h; 37°C ; $n=3$; Probanden: Atopiker;

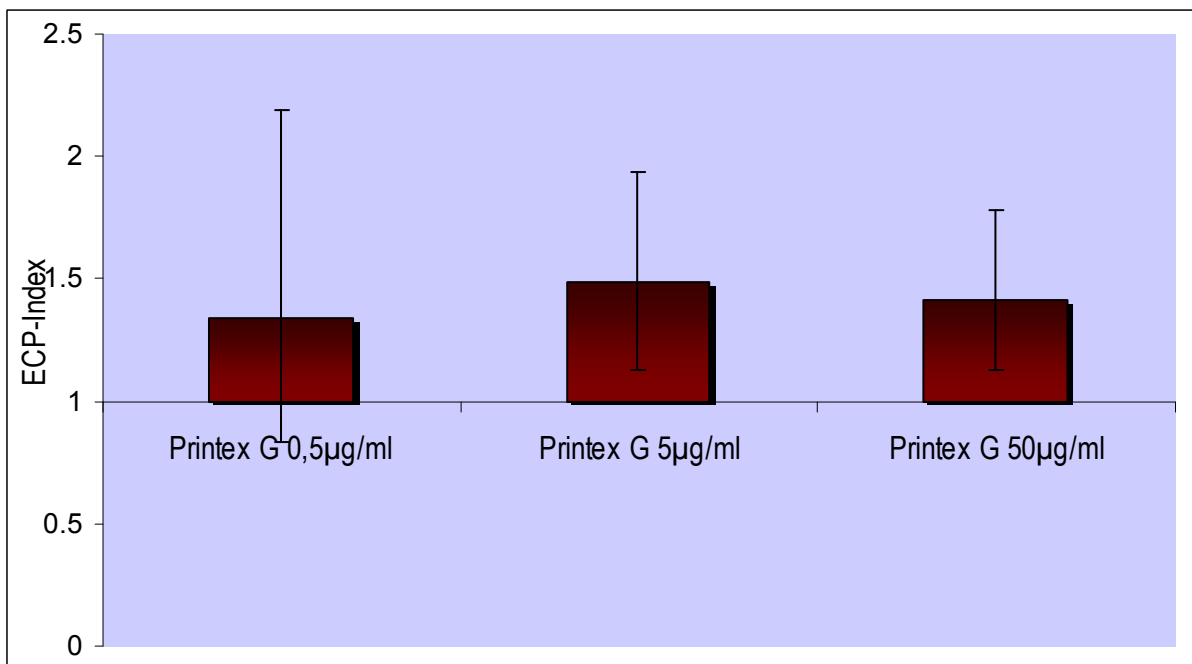


Abbildung 17: GM-CSF vorstimulierte (25 min; 37°C) eosinophile Granulozyten zeigten nach Stimulation mit Printex G Partikeln eine für Printex G 5 µg/ml und Printex G 50 µg/ml signifikante Induktion der ECP-Freisetzung. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C ; $n=3$; Probanden: Atopiker; Im Vergleich zu mit Printex G Partikeln stimulierten, nicht vorstimulierten Eosinophilen, war keine stärkere Induktion der ECP-Freisetzung festzustellen (vgl. Abb. 16).

5.1.5 Einfluss von Dieselrußpartikeln auf die CD-11b Aufregulierung von eosinophilen Granulozyten

Zum Nachweis einer spezifischen Aktivierung von eosinophilen Granulozyten durch Dieselruß Standard Partikel SRM 1650a wurde die extrazelluläre Expression von Aktivierungsmarkern untersucht. Die Expression von Integrinen, die bei der Adhäsion an das Gefäßendothel eine wesentliche Rolle spielen, wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Isolierte eosinophile Granulozyten wurden nach Stimulation mit Dieselrußpartikeln mit Fluoreszenz-markierten CD11b-Antikörpern und entsprechenden Isotypkontrollen markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Es fand sich bei mit Dieselruß Standard Partikeln stimulierten eosinophilen Granulozyten keine signifikante, biologisch relevante Aufregulierung des β_2 -Integrins CD11b (s. Abb. 18). Die Analyse wurde nicht mit Printex G oder Printex 90 Partikeln stimulierten eosinophilen Granulozyten durchgeführt, da keine hinreichende Aussicht auf ein biologisch relevantes positives Ergebnis bestand. Hinzukommend bestanden Zweifel, ob die Partikel, die zur Messung des CD11b- Integrins an den Eosinophilen mittels des Durchflusszytometers nicht zuvor von den Zellen wieder abgetrennt werden konnten, eventuell die Analyse verfälschen könnten oder das Durchflusszytometer verstopfen und so beschädigen könnten.

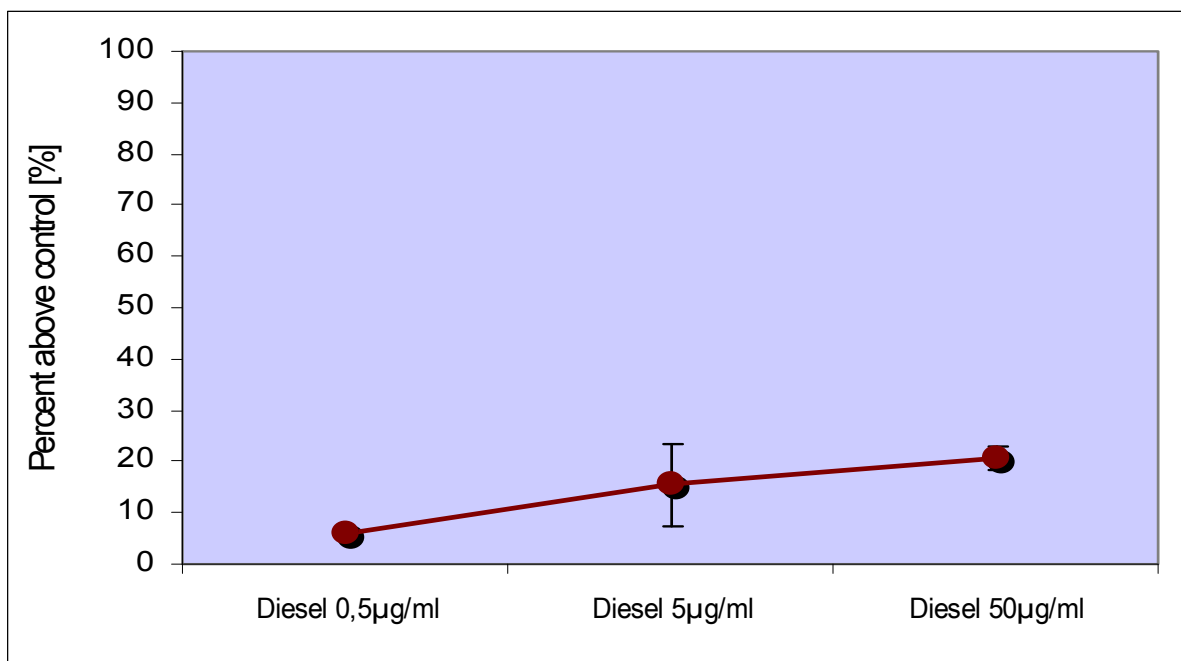


Abbildung 18: Es ist keine signifikante, biologisch relevante Aufregulierung von β_2 -Integrinen (CD11b) auf eosinophilen Granulozyten nach Stimulation mit Dieselruß Standard Partikeln SRM 1650a nachweisbar. Als Kontrolle wurden mit Medium inkubierte Eosinophile mitgeführt. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 2h; 37°C; n=2; Proband: Atopiker;

5.2 Wirkung von feinen und ultrafeinen Schadstoffpartikel auf humane primäre Keratinozyten

In vielen epidemiologischen und experimentellen wissenschaftlichen Studien wurde ein direkter Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Immissionen und Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis nachgewiesen (*Heinrich und Wichmann 2004*). Im Jahre 2000 wurde an Kindern, welche an Straßen mit hoher Verkehrsbelastung lebten, eine signifikante Assoziation zwischen der Ausprägung atopischer Erkrankungen, wie dem atopischen Ekzem, und Kfz-bedingter Luftverschmutzung festgestellt (*Krämer et al. 2000*). Diese Ergebnisse konnten durch eine aktuelle wissenschaftliche Studie bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der Nähe des Wohnortes zur nächsten Hauptstraße und der Ausprägung von Atopischem Ekzem, Asthma bronchiale allergicum und Rhinokonjunktivitis allergica, wobei Kinder, welche weniger als 50 Meter von einer verkehrsbelasteten Hauptstraße lebten, besonders stark betroffen waren (*Morgenstern et al. 2008*). Das atopische Ekzem ist eine häufige entzündliche Hauterkrankung (9-20% der deutschen Kinder betroffen!), das chronisch oder chronisch rezidivierend verläuft und mit starkem Juckreiz einhergeht. Im Rahmen des atopischen Ekzems ist die Barrierefunktion der Haut gestört, es kommt zu erhöhter Permeabilität, zu erhöhtem transepidermalen Wasserverlust und zu einer mikroskopisch nachweisbaren Entzündungsreaktion der Haut (*Ring 2004*). Es ist bekannt, dass Keratinozyten, die den Hauptbestandteil der Epidermis darstellen, maßgeblich in diese Entzündungsreaktion involviert sind (*Giustizieri et al. 2001*). Da es bereits epidemiologische Hinweise gibt, dass Rußpartikel den Verlauf eines bestehenden atopischen Ekzems verschlechtern können, sollte untersucht werden, ob mit Rußpartikeln inkubierte Keratinozyten eosinophile Granulozyten aktivieren können.

5.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Zur genaueren Charakterisierung der Interaktion zwischen Rußpartikeln und humanen primären Keratinozyten wurden, wie bei den eosinophilen Granulozyten, zunächst rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Keratinozyten mit den verschiedenen eingesetzten Partikelarten [1×10^6 Zellen/50 μg Partikel] für 48h koinkubiert. Im Vergleich zu Keratinozyten, die 48h in Medium gehalten wurden (s. Abb. 19), zeigt sich eine Aktivierung der mit den Partikeln inkubierten Keratinozyten (s. Abb. 20A, 20B und 20C). Die humanen primären

Keratinocyten, die mit den Kohlenstoffpartikeln aktiviert wurden, weisen im Vergleich zu nicht-stimulierten Keratinocyten eine wesentlich unregelmäßigere Zellkernoberfläche auf, es ist eine vermehrte Ausbildung von Spikes und Pseudopodien zu erkennen. Die verschiedenen Partikelsorten adhären an die Keratinocyten, teilweise werden die Partikel von den Keratinocyten absorbiert oder umschlossen. In einigen Aufnahmen ist eine Ausbildung von Zellblasen, sog. „Blebs“ der aktivierten Keratinocyten zu erkennen (s. Abb. 20B). Es konnte morphologisch kein Unterschied in der Aktivierung der Keratinocyten durch die unterschiedlichen Partikelsorten festgestellt werden.

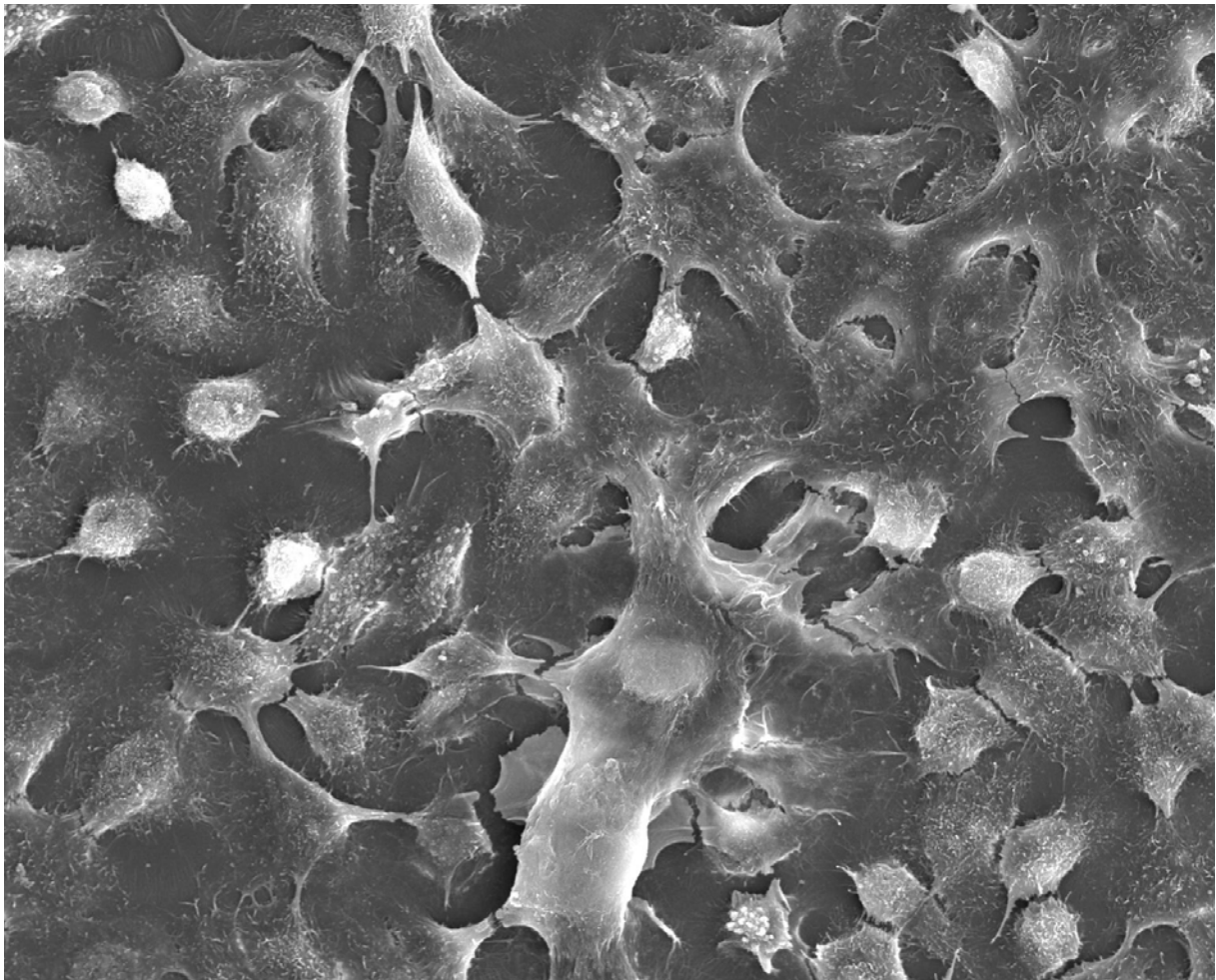
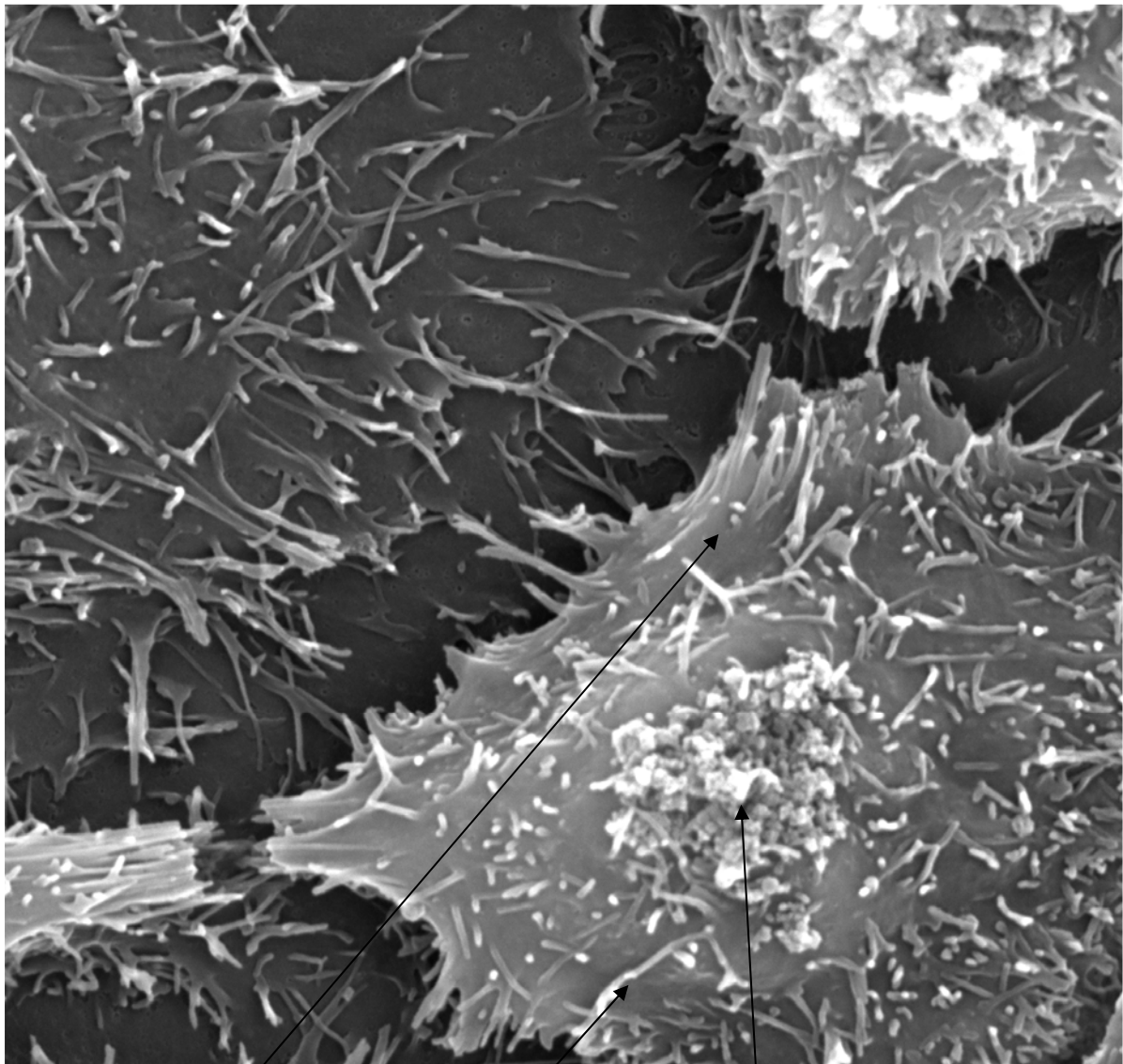


Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von nicht stimulierten, humanen primären Keratinocyten. Balkenlänge — = 10 μ m.



Keratinocyt

Spike

Partikelagglomerate

Abbildung 20A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von humanen primären Keratinozyten und Diesel Standard SRM 1650a Partikelagglomeraten nach 48h Inkubationszeit [1×10^6 Keratinozyten/50 μg ; 37°C; 5% CO_2]. Die Keratinozyten bilden als Zeichen der Aktivierung multiple Spikes aus. Die Ausbildung von Spikes ist bei naiven nicht-aktivierten Keratinozyten nicht in diesem Ausmaß zu beobachten (s. Abb. 19).

Balkenlänge  = 3 μm .

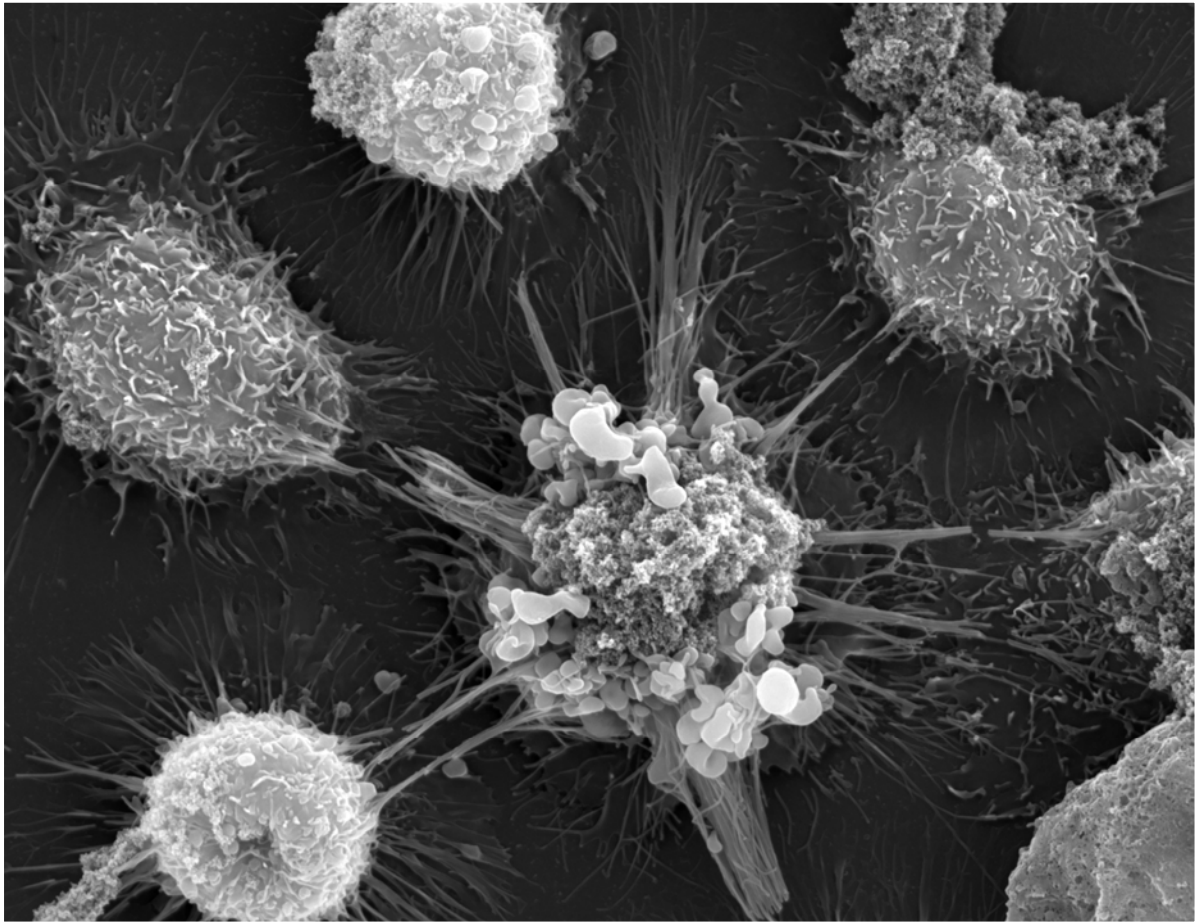


Abbildung 20B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von humanen primären Keratinozyten und Printex 90 Kohlenstoffpartikeln nach 48 h Inkubationszeit [1×10^6 Keratinozyten/50 μg ; 37°C ; 5 % CO_2]. Die Keratinozyten bilden als Zeichen der Zellaktivierung multiple Spikes und so genannte „Blebs“, d.h. Zellblasen aus. Dies ist bei naiven, nicht-aktivierten Keratinozyten nicht zu beobachten (s. Abb. 19). Balkenlänge $\text{—————} = 5\mu\text{m}$.

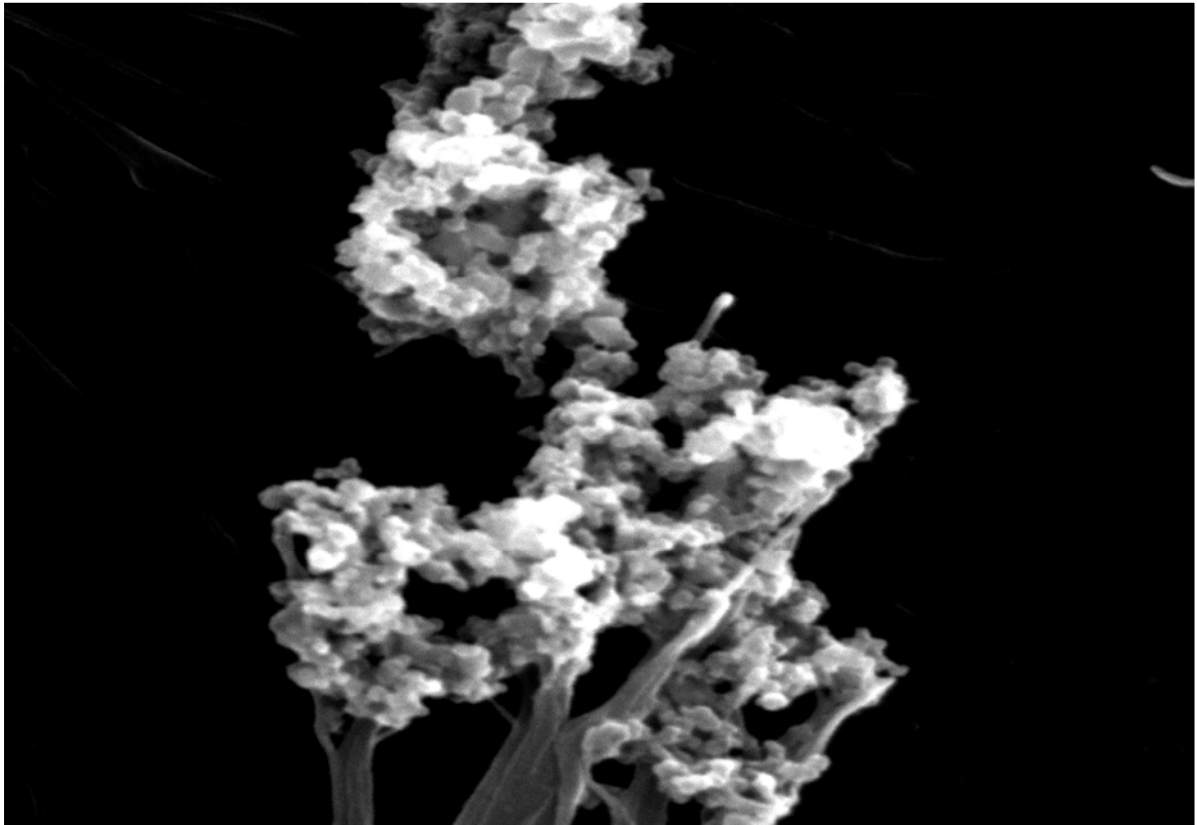


Abbildung 20C: : Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines humanen primären Keratinozyten und Printex G Kohlenstoffpartikeln nach 48 h Inkubationszeit [1×10^6 Keratinozyten/50 μg ; 37°C ; 5 % CO_2]. Die Ausläufer des Keratinozyten umschließen die Printex G Kohlenstoffpartikel, die Partikel adhäreren an den Keratinozyten. Balkenlänge $\text{—————} = 1\mu\text{m}$.

5.2.2 Freisetzung Eosinophilen-aktivierender Mediatoren durch Partikel-stimulierte Keratinozyten

Morphologische Veränderungen der, mit Kohlenstoffpartikeln stimulierten, humanen peripheren Keratinozyten gaben erste Hinweise, dass diese durch die Partikel zur Chemokin- oder Zytokinproduktion angeregt werden. Deshalb wurde nun untersucht, ob Keratinozyten durch Partikel zur Freisetzung Eosinophilen-aktivierender Mediatoren angeregt werden. Humane periphere Keratinozyten wurden für diesen Zweck mit den verschiedenen eingesetzten Partikelarten [0,5 µg/ml, 5 µg/ml und 50 µg/ml] für 48h inkubiert und anschließend deren Überstände mittels ELISA auf unterschiedliche Chemo- und Zytokine analysiert. Die Zellüberstände der Partikel-stimulierten Keratinozyten wurden auf die Mediatoren MIP-3 α , Eotaxin, RANTES, IL-18, TARC und GM-CSF untersucht. Für die Chemokine MIP-3 α , Eotaxin, RANTES, IL-18 und TARC konnte keine verstärkte Ausschüttung durch Inkubation mit Kohlenstoffpartikel gezeigt werden (Ergebnisse siehe Anhang). Allerdings wurde nachgewiesen, dass sowohl Keratinozyten, die mit Dieselruß Standard SRM 1650a inkubiert wurden, als auch Printex G oder Printex 90 Partikel-stimulierte Keratinozyten zur dosisabhängigen, signifikanten GM-CSF Freisetzung angeregt werden (s. Abb. 21 bis 23). Dieselrußpartikel induzierten in den primär humanen Keratinozyten die höchste GM-CSF-Freisetzung (s. Abb. 21), gefolgt von Printex G (s. Abb. 22) und Printex 90 (s. Abb. 23) Kohlenstoffpartikeln. Die Signifikanzwerte aller gezeigten Graphiken wurden mit Hilfe des einseitigen t-Tests berechnet.

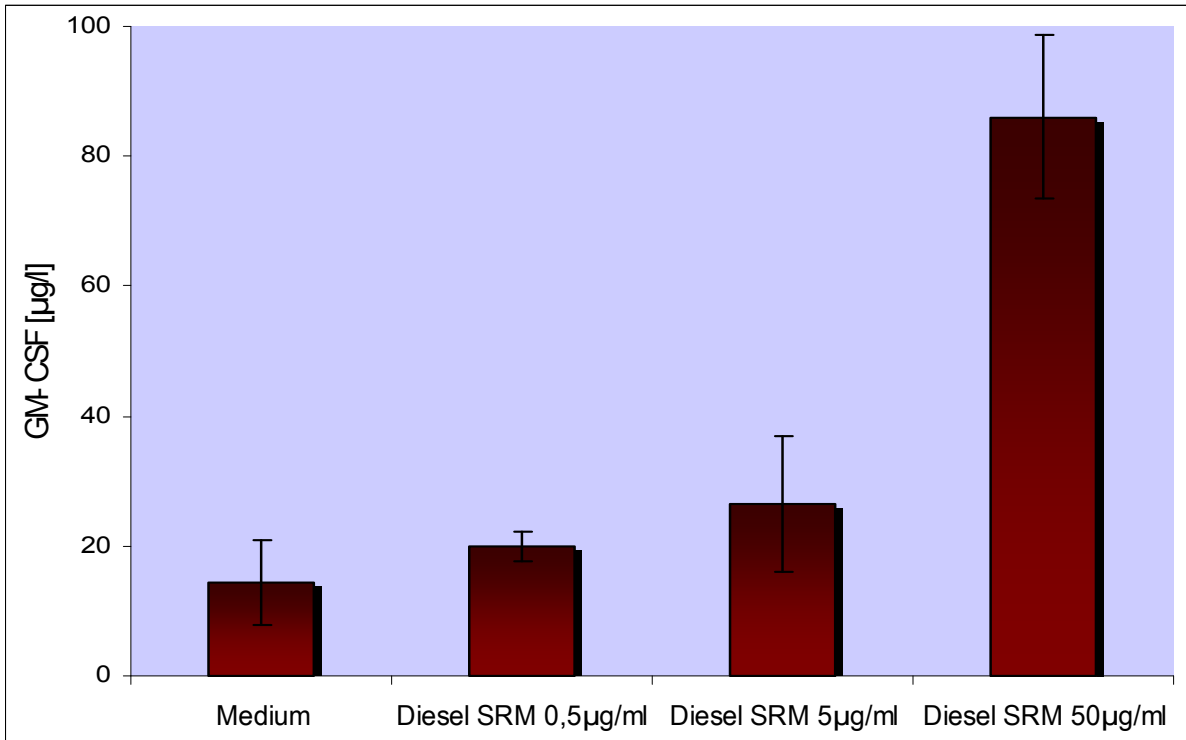


Abbildung 21: Diesel Standard SRM 1650a induziert eine signifikante, dosisabhängige GM-CSF- Freisetzung aus primär humanen Keratinozyten. Stimulation: 1×10^6 Zellen; 48h; 37°C; n=4;

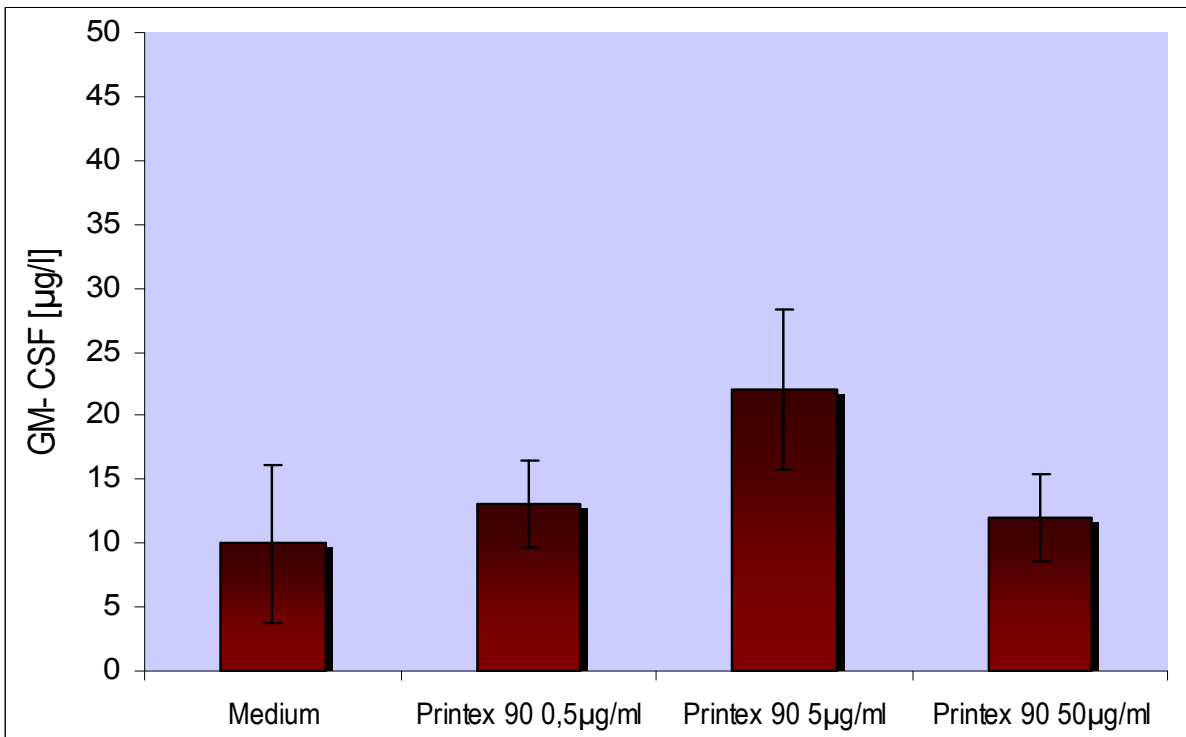


Abbildung 22: Printex 90 Partikel induzieren eine signifikante GM-CSF-Ausschüttung aus primär humanen Keratinozyten. Stimulation: 1×10^6 Zellen; 48h; 37°C; n=4;

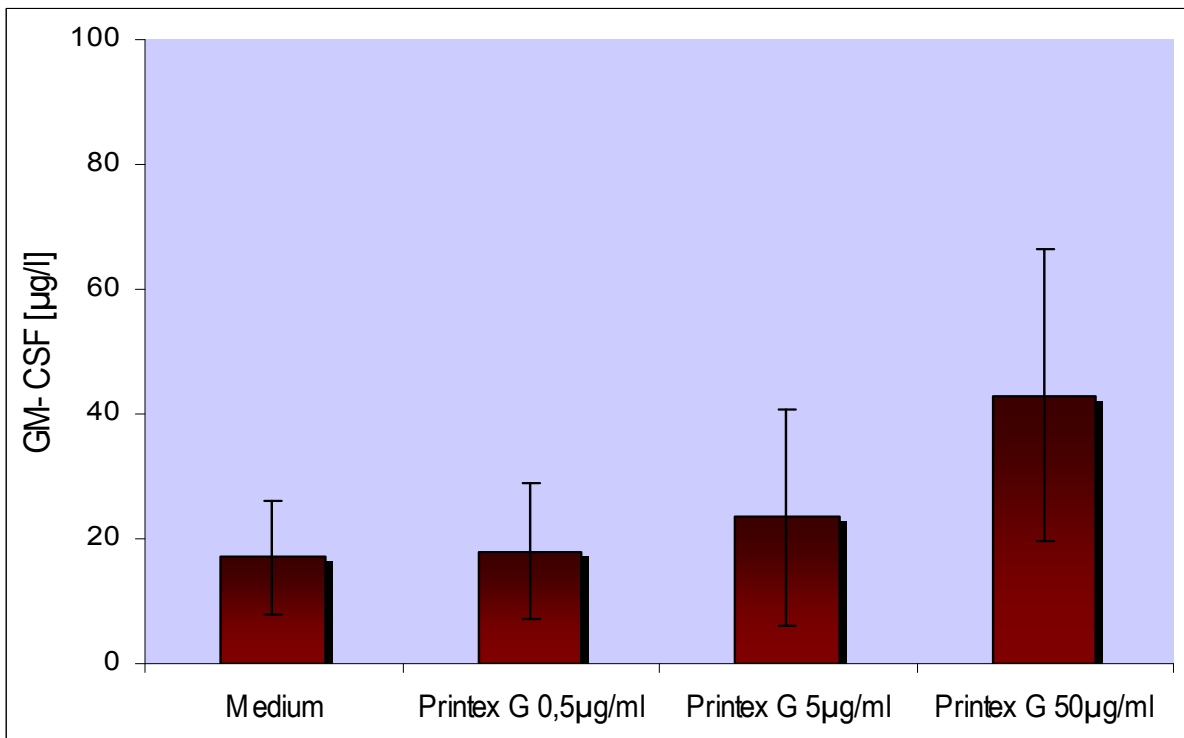


Abbildung 23: Printex G Partikel induzieren eine signifikante, dosisabhängige GM-CSF-Ausschüttung aus primär humanen Keratinozyten. Stimulation: 1×10^6 Zellen; 48h; 37°C; n=4;

5.3 Partikelinduzierter Crosstalk zwischen Keratinozyten und primären humanen eosinophilen Granulozyten

Zur Untersuchung des Crosstalk zwischen Keratinozyten und Eosinophilen wurden die primären humanen Keratinozyten (1×10^6 Zellen/ml) für 48h bei 37°C mit den verschiedenen Partikelsorten Diesel SRM 1650a, Printex 90 und Printex G (0,5µg/ml, 5µg/ml und 50µg/ml) inkubiert und anschließend die Überstände der stimulierten Keratinozyten abgenommen und filtriert. Daraufhin wurde untersucht, ob diese gewonnenen Überstände eine dosisabhängige stimulierende Wirkung auf eosinophile Granulozyten besitzen.

5.3.1 Vitalitätsstudien an mit Keratinozytenüberständen stimulierten Eosinophilen

Um zu überprüfen, ob mit Rußpartikeln stimulierte Keratinozyten Mediatoren ausschütten, die die Apoptose- oder Nekroserate von eosinophilen Granulozyten beeinflussen, wurden entsprechende Experimente mit Hilfe des Durchflusszytometers durchgeführt. Die Färbung der Eosinophilen erfolgte mittels eines Annexin V/ Propidiumiodid Kits, das sowohl apoptotische, als auch nekrotische Eosinophile detektieren kann. Es konnte keine veränderte Vitalitätsrate bei eosinophilen Granulozyten festgestellt werden, die mit Überständen von Partikel-stimulierten Keratinozyten inkubiert wurden. Im Vergleich zu mit Medium inkubierten Eosinophilen, war die Apoptose- und Nekroserate bei allen eosinophilen Granulozyten, die mit Keratinozytenüberständen stimuliert wurden, leicht verringert. Die Überstände von Printex 90 und Printex G stimulierten Keratinozyten zeigten ähnliche Eigenschaften ohne dosisabhängige, signifikante Apoptosehemmung durch die Partikelarten. Die stärkste Apoptosehemmung wurde durch GM-CSF (1µg/ml) induziert, welches als Positivprobe mitgeführt wurde. Es konnte also keine signifikante Apoptose- und/oder Nekrosehemmung in Eosinophilen durch Überstände von Partikel-stimulierten Keratinozyten nachgewiesen werden (s. Abb. 24).

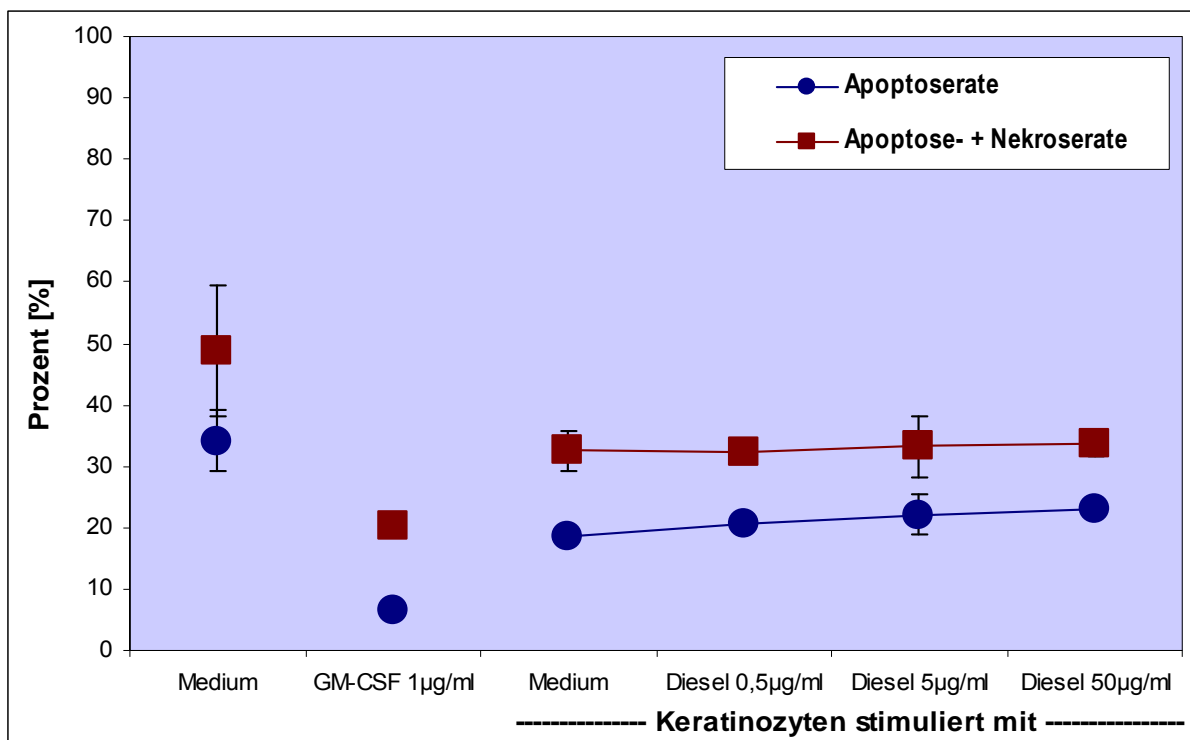


Abbildung 24: Überstände von Partikel-stimulierten Keratinozyten induzieren in eosinophilen Granulozyten keine Apoptose- oder Nekrosehemmung. Inkubation: 2×10^6 Zellen/ml = 200.00/Ansatz; 1,5h; 37°C;

5.3.2 Einfluss der Überstände von DEP, Printex G und Printex 90-stimulierten Keratinozyten auf die Chemotaxis Eosinophiler

Die oben gezeigten morphologischen Untersuchungen lieferten Hinweise, dass humane primäre Keratinozyten nach Inkubation mit den verschiedenen eingesetzten Partikelarten aktiviert werden und Mediatoren freisetzen, welche Eosinophile zur Chemotaxis anregen. Ob Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten Eosinophile zur Migration anregen, wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht. Die Ergebnisse sind als Migrationsindex angegeben, als Positivprobe wurde jeweils Eotaxin 100 ng/ml mitgeführt. Es konnte eine dosisabhängige Induktion der Migration von humanen eosinophilen Granulozyten auf Überstände, sowohl durch Diesel SRM 1650a Standard, als auch durch Printex 90 und Printex G Partikel-stimulierte Keratinozyten gezeigt werden (s. Abb. 25 bis 27). Die Induktion erwies sich für die Konzentrationen 5µg und 50µg bei Diesel und Printex 90 Partikeln signifikant. Printex G Partikel induzierten bei allen eingesetzten Partikelkonzentrationen eine signifikante Chemotaxis. Die Migration der eosinophilen Granulozyten war am stärksten auf die Überstände von Dieselrußpartikel-stimulierten Keratinozyten. Die schwächste Induktion der Eosinophilenchemotaxis konnte durch Überstände von Printex G-Partikel stimulierten Keratinozyten ausgelöst werden. Um zu überprüfen, ob der gezeigte Effekt nicht auf eine eventuelle LPS-Kontamination der Rußpartikel zurückzuführen ist, wurde bei jedem Experiment eine LPS-Kontrolle (LPS 100 ng/ml) mitgeführt. Die LPS-stimulierten Keratinozyten zeigten allerdings keine vergleichbar hohe Chemotaxisinduktion auf eosinophile Granulozyten, so dass die Ergebnisse nicht allein durch eine Kontamination der Partikel mit LPS zurückzuführen sind.

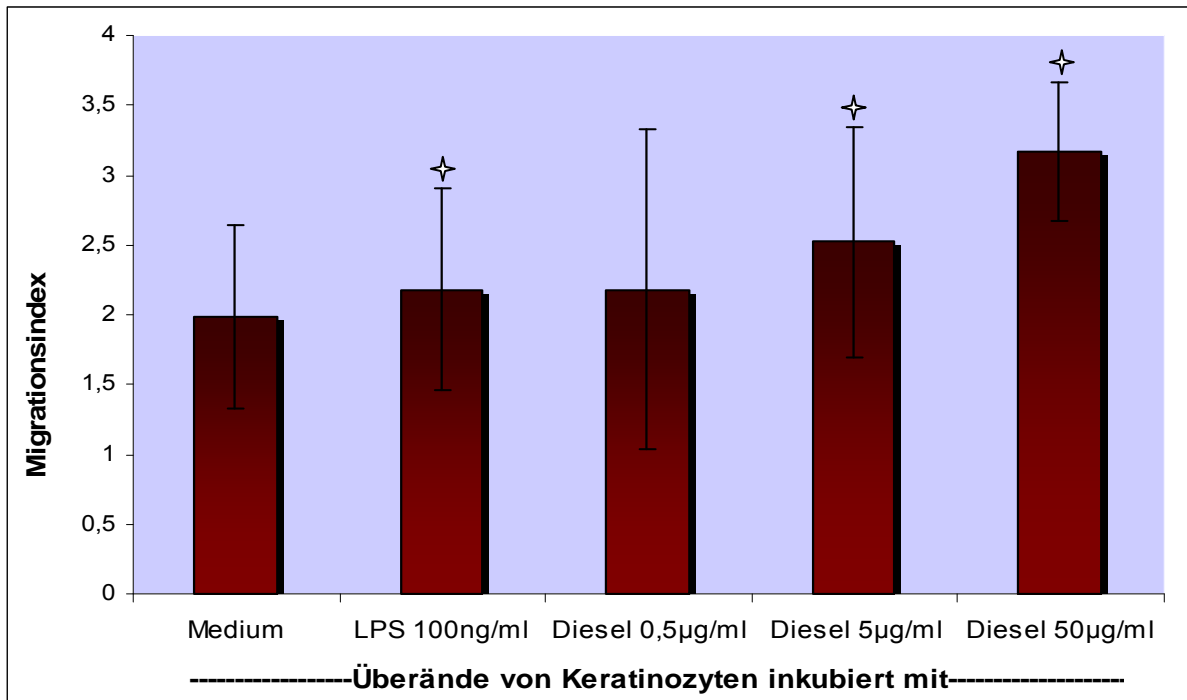


Abbildung 25: Überstände von Dieselpartikel-stimulierten Keratinozyten induzieren dosisabhängig Chemotaxis in humanen peripheren eosinophilen Granulozyten, die sich für die Konzentrationen 5µg und 50µg signifikant zeigt. (✦= signifikante Induktion der Chemotaxis). Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=4;

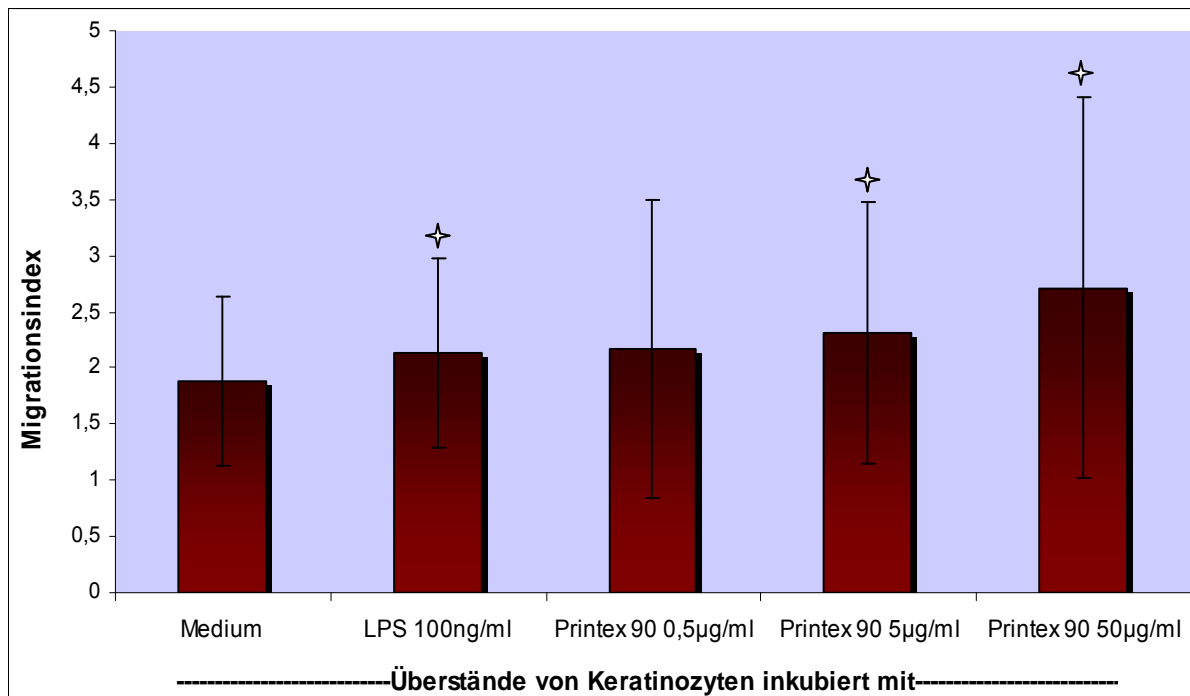


Abbildung 26: Überstände von Printex 90-Partikel stimulierten Keratinozyten führen zu einer dosisabhängigen Chemotaxisinduktion in eosinophilen Granulozyten, die sich für die Konzentrationen Printex 90 5µg und 50µg signifikant darstellt. (✦ = signifikante Induktion der Chemotaxis). Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=4;

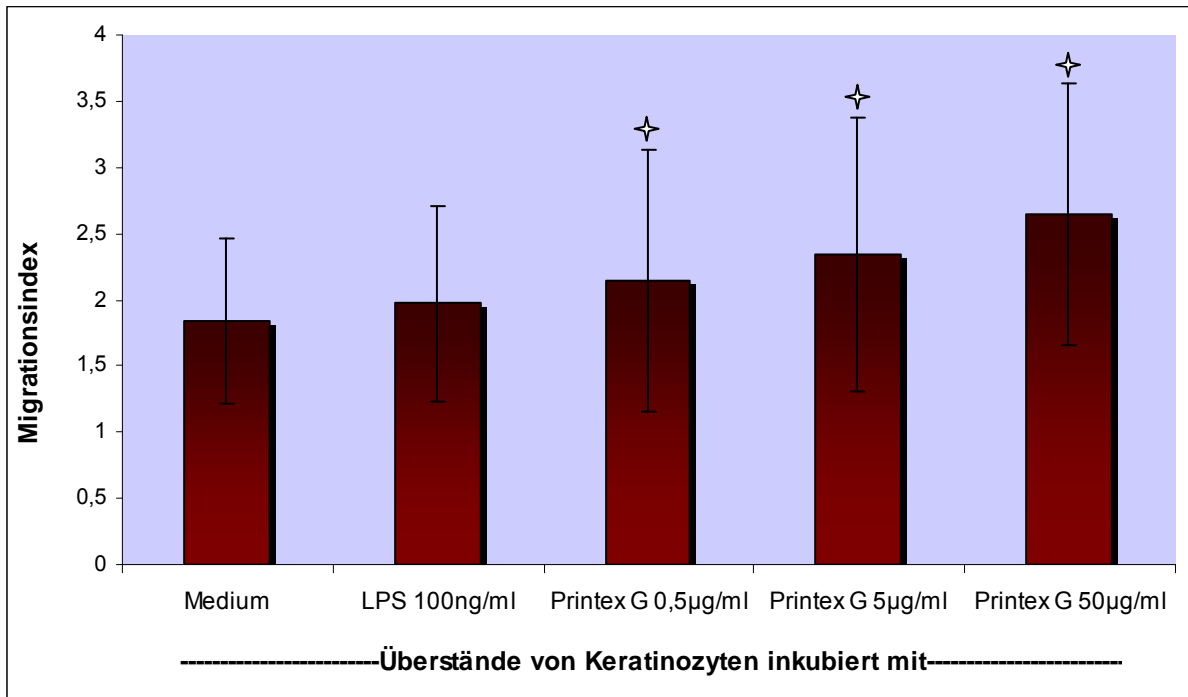


Abbildung 27: Überstände von Printex G-Partikel stimulierten Keratinozyten führen zu einer signifikanten, dosisabhängigen Chemotaxisinduktion in eosinophilen Granulozyten. (✦ = signifikante Induktion der Chemotaxis). Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=5;

5.3.3 Einfluss der Überstände von DEP, Printex G und Printex 90-stimulierten Keratinozyten auf die Freisetzung von Granulaproteinen aus eosinophilen Granulozyten

Es wurde im Folgenden untersucht, ob Überstände von Partikel-stimulierten Keratinozyten in der Lage sind, eosinophile Granulozyten zu aktivieren. Hierzu wurden Keratinozyten 48 h lang mit den verschiedenen Partikelarten Diesel Standard 1650a, Printex G und Printex 90 stimuliert und daraufhin die Überstände abgenommen. Anschließend wurden isolierte Eosinophile für 1,5 h mit den filtrierten Überständen stimuliert. Nach Stimulation wurde der ECP-Gehalt der einzelnen Ansätze bestimmt. Es zeigte sich, dass Partikel-stimulierte Keratinozyten Substanzen ausschütten, die Eosinophile zur ECP-Freisetzung anregen (s. Abb. 28 bis 30). Die ECP-Ausschüttung von eosinophilen Granulozyten, die mit Überständen von Kohlenstoffpartikel-stimulierten Keratinozyten inkubiert wurden, war signifikant höher als von Eosinophilen, die mit der Mediumkontrolle oder mit Medium-inkubierten Keratinozyten inkubiert wurden. LPS-stimulierte (LPS 100ng/ml) Keratinozyten induzierten bei Eosinophilen keine signifikante ECP-Ausschüttung (Ergebnisse siehe Anhang). Somit sind die dargestellten Ergebnisse nicht allein auf

eine LPS-Kontamination der Partikel zurückzuführen. Eine signifikante Aktivierung der Eosinophilen durch Partikel-stimulierte Keratinozytenüberstände zeigte sich für Diesel 1650a Standard und Printex 90 Partikel jeweils bei den niedrigeren Konzentrationen von 0,5 µg/ml und 5 µg/ml (s. Abb. 28 und 29). Bei Überständen von Printex G Partikel-stimulierten Keratinozyten konnte bei allen verwendeten Konzentrationen eine signifikante Induktion der ECP-Freisetzung festgestellt werden (s. Abb. 30). Die statistische Signifikanz wurde auf Grund der unterschiedlichen Individualwerte der jeweiligen quantitativen ECP-Ausschüttung der gewonnenen humanen Eosinophilen mit Hilfe des 10ner-Logarithmus des Quotienten „ECP-Wert Ansatz/ECP-Wert Mediumkontrolle“ und dem einseitigen T-Test berechnet (s. Kap. 4.13). Die höchste quantitative ECP-Ausschüttung zeigten Eosinophile, die mit Überständen von Printex 90 Partikel-stimulierten Keratinozyten inkubiert wurden (s. Abb. 29).

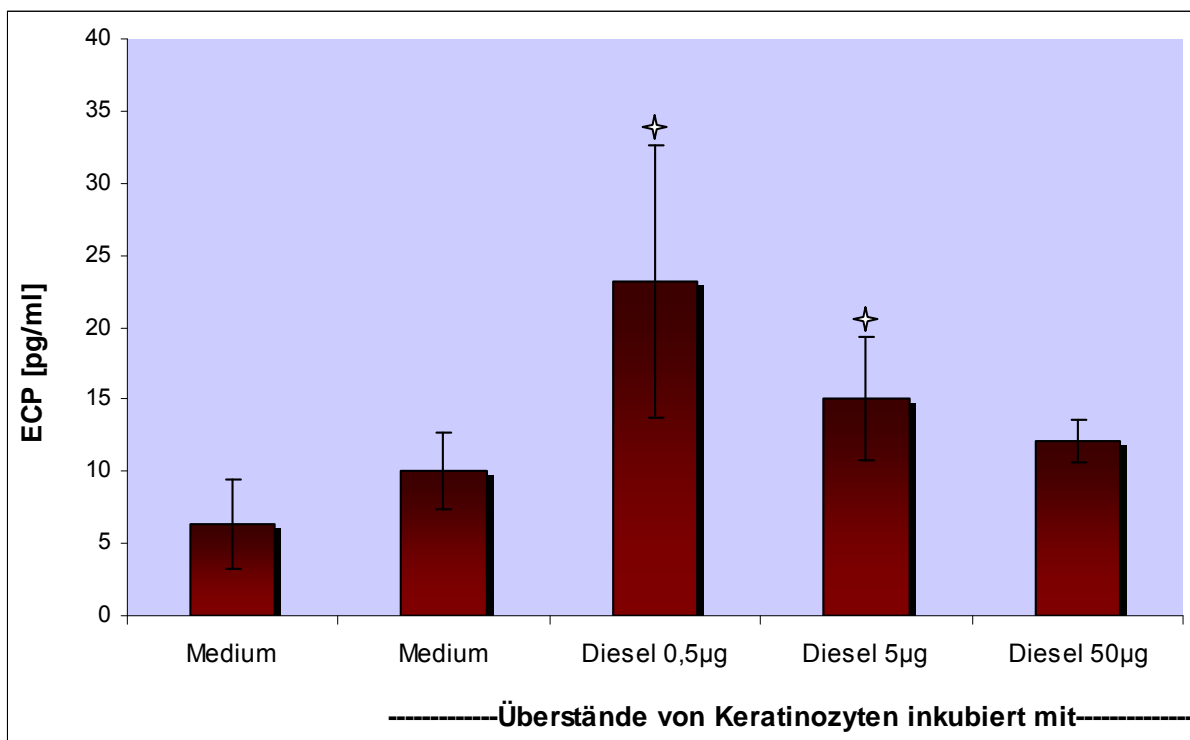


Abb. 28: Überstände von Diesel Standard SRM 1650a-stimulierten Keratinozyten führten zu einer signifikant erhöhten ECP-Freisetzung in eosinophilen Granulozyten für die eingesetzten Konzentrationen Diesel 0,5 µg und 5 µg. (✦ = signifikante Induktion der ECP-Freisetzung zu mit Medium-inkubierten Keratinozyten). Stimulation: 1×10^6 Eosinophile/ml; 1,5h; 37°C; n=3; Atopikereosinophile; Nicht-Atopiker-Keratinozyten;

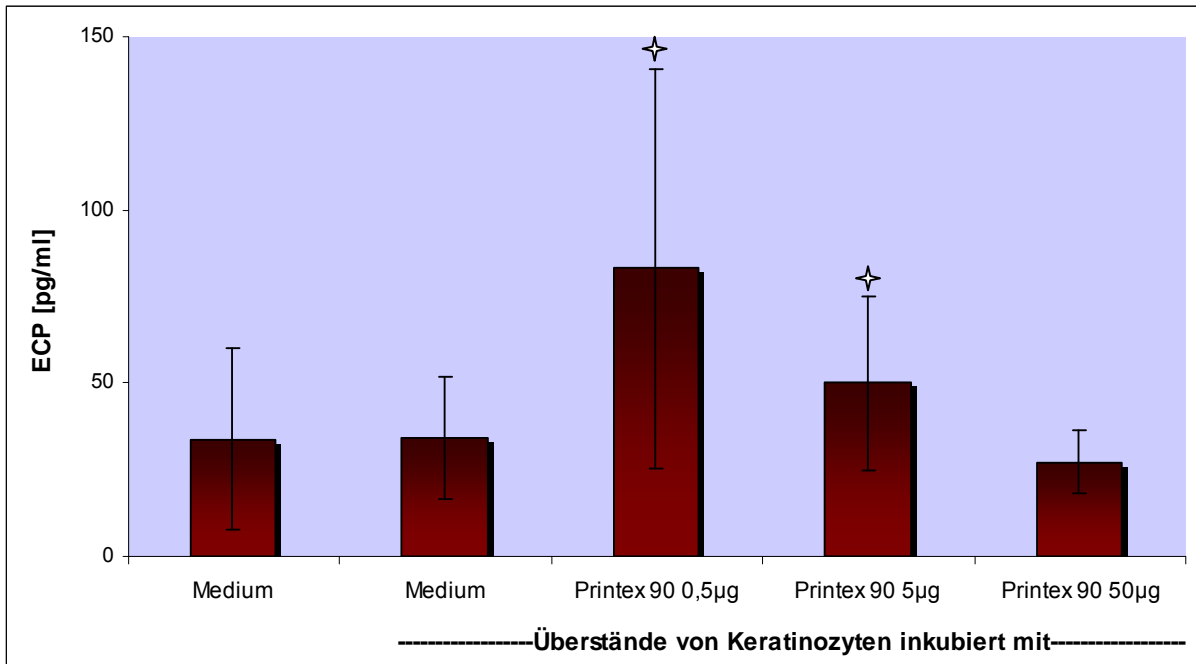


Abb. 29: Überstände von Printex 90 Partikel-stimulierten Keratinozyten führten zu einer signifikant erhöhten ECP-Freisetzung in eosinophilen Granulozyten für die eingesetzten Konzentrationen Printex 90 0,5 µg und 5 µg. (✦ = signifikante Induktion der ECP-Freisetzung zu mit Medium-inkubierten Keratinozyten). Stimulation: 1×10^6 Eosinophile/ml; 1,5h; 37°C; n=3; Atopikereosinophile; Nicht-Atopiker-Keratinozyten;

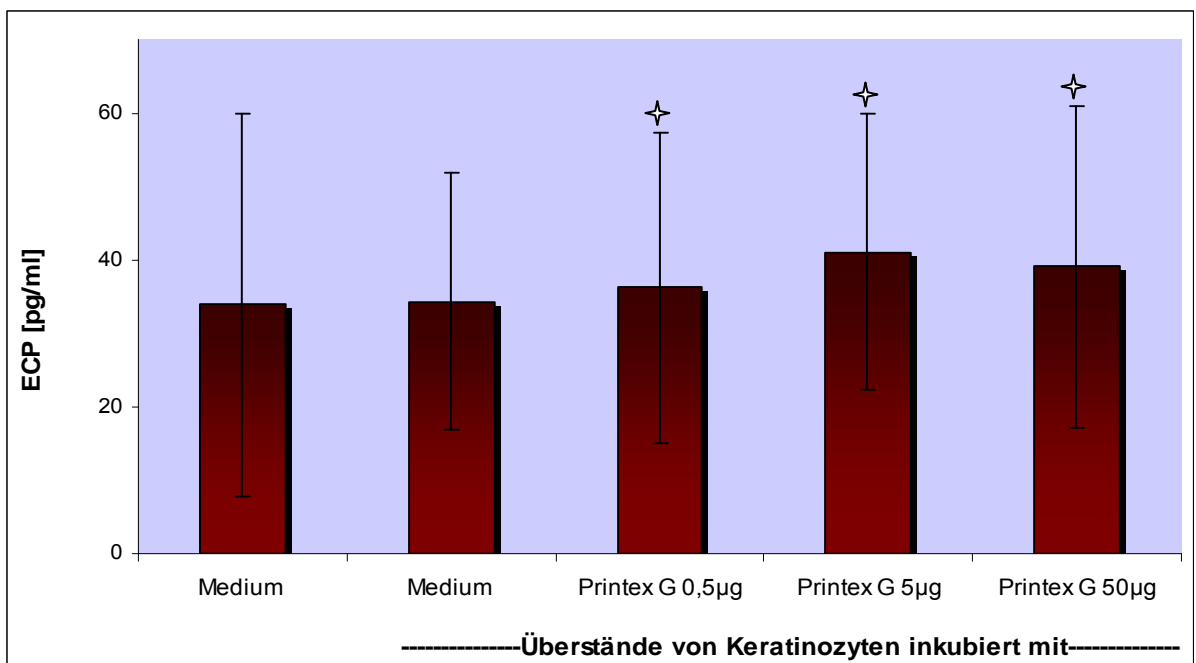


Abb. 30: Überstände von Printex G Partikel-stimulierten Keratinozyten führten zu einer signifikant erhöhten ECP-Freisetzung in eosinophilen Granulozyten für alle eingesetzten Partikelkonzentrationen (✦ = signifikante Induktion der ECP-Freisetzung zu mit Medium-inkubierten Keratinozyten). Stimulation: 1×10^6 Eosinophile/ml; 1,5h; 37°C; n=3; Atopikereosinophile; Nicht-Atopiker-Keratinozyten;

5.3.4 Einfluss der Überstände von DEP-stimulierten Keratinozyten auf die CD-11b Hochregulierung von eosinophilen Granulozyten

Weiterhin untersuchten wir, ob Diesel Standard SRM 1650a Partikel-stimulierte Keratinozyten dazu in der Lage sind, eosinophile Granulozyten zur Aufregulierung des CD11b-Oberflächenantigens anzuregen. Hierzu wurden Keratinozyten mit Dieselrußpartikeln in den unterschiedlichen Konzentrationen 0,5 µg, 5 µg und 50 µg für 48h inkubiert. Anschließend wurden Eosinophile für 1h mit den gewonnenen Überständen stimuliert, mit Fluoreszenz-markierten CD11b-Antikörpern und entsprechenden Isotypkontrollen markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Expression von Integrinen, zu denen das Oberflächenprotein CD11b zählt, spielt eine wesentliche Rolle bei der Adhäsion der Eosinophilen an das Gefäßendothel. Es fand sich bei Eosinophilen, die mit Überständen von Dieselruß Standard Partikel-stimulierten Keratinozyten inkubiert wurden, keine signifikante, biologisch relevante Aufregulierung des β_2 -Integrins CD11b (s. Abb. 33). Die Analyse wurde nicht mit Überständen von Printex G oder Printex 90 Partikel-stimulierten Keratinozyten durchgeführt, da sich bei den Experimenten mit Dieselpartikeln kein Hinweis auf ein biologisch relevantes positives Ergebnis zeigte.

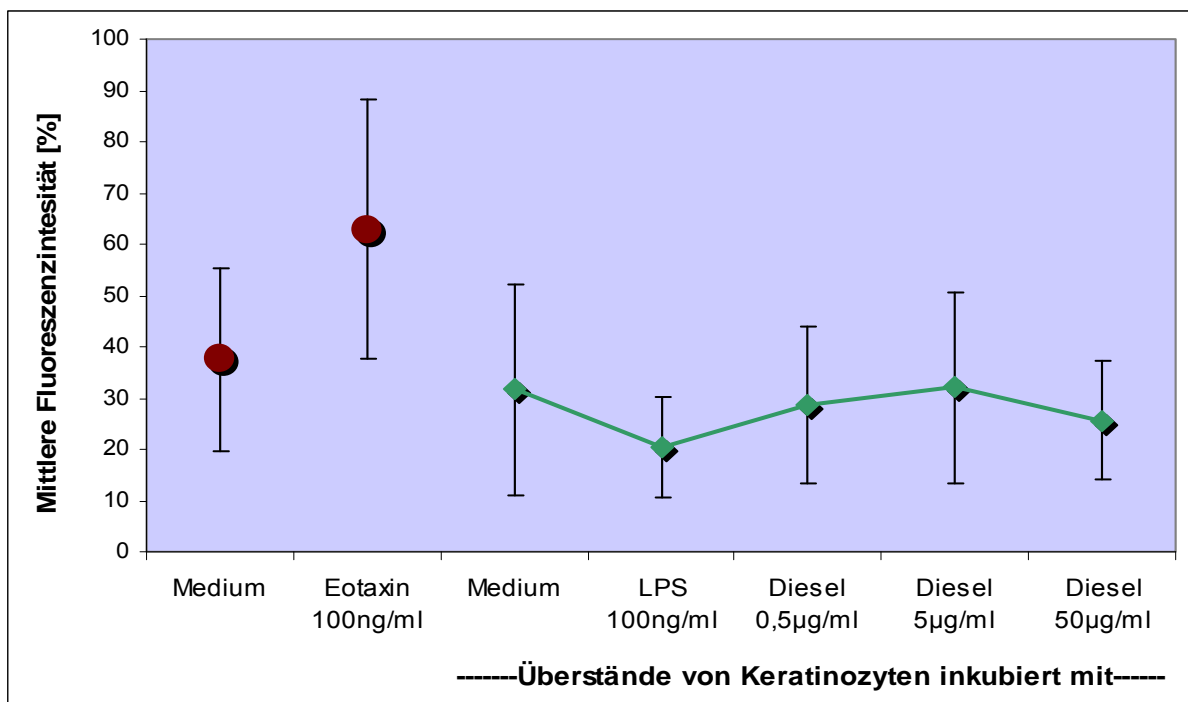


Abb. 31: Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten induzieren keine CD11b-Hochregulierung in Eosinophilen. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 2h; 37°C; n=5;

5.4 Unterschiede zwischen Zellen von atopischen und nicht-atopischen Probanden

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob ein Unterschied in der Aktivierung von Keratinozyten bzw. eosinophilen Granulozyten besteht, wenn diese von atopischen oder nicht-atopischen Probanden stammen. Es wurden hierzu Keratinozyten von Atopikern und Keratinozyten von gesunden Probanden verwendet, welche mit den verschiedenen Rußpartikelarten für 48h inkubiert wurden. Daraufhin wurden die gewonnenen Überstände auf Ihre chemotaktische Aktivität auf eosinophile Granulozyten von Atopikern und gesunden Probanden durchflusszytometrisch untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen von Atopikern und gesunden Probanden festgestellt werden. Tendenziell war die stärkste Migration bei Eosinophilen von Atopikern auf Überstände von Atopiker-Keratinozyten (Printex G 5µg/ml, 50µg/ml) zu erkennen, allerdings war diesbezüglich keine statistische Signifikanz zu errechnen. Nicht-Atopikereosinophile zeigen im Vergleich zu eosinophilen Granulozyten von Atopikern eine geringere chemotaktische Aktivität auf Überstände von Partikel-stimulierten Keratinozyten, diesbezüglich liegt aber ebenfalls keine statistische Signifikanz vor. Als Beispiel ist die Migration auf Überstände von Printex G-Partikel stimulierten Keratinozyten von Atopikern und gesunden Probanden dargestellt (s. Abb. 32). Auch bei Printex 90 Partikeln konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen von Atopikern und Nicht-Atopikern gesehen werden (Ergebnisse siehe Anhang).

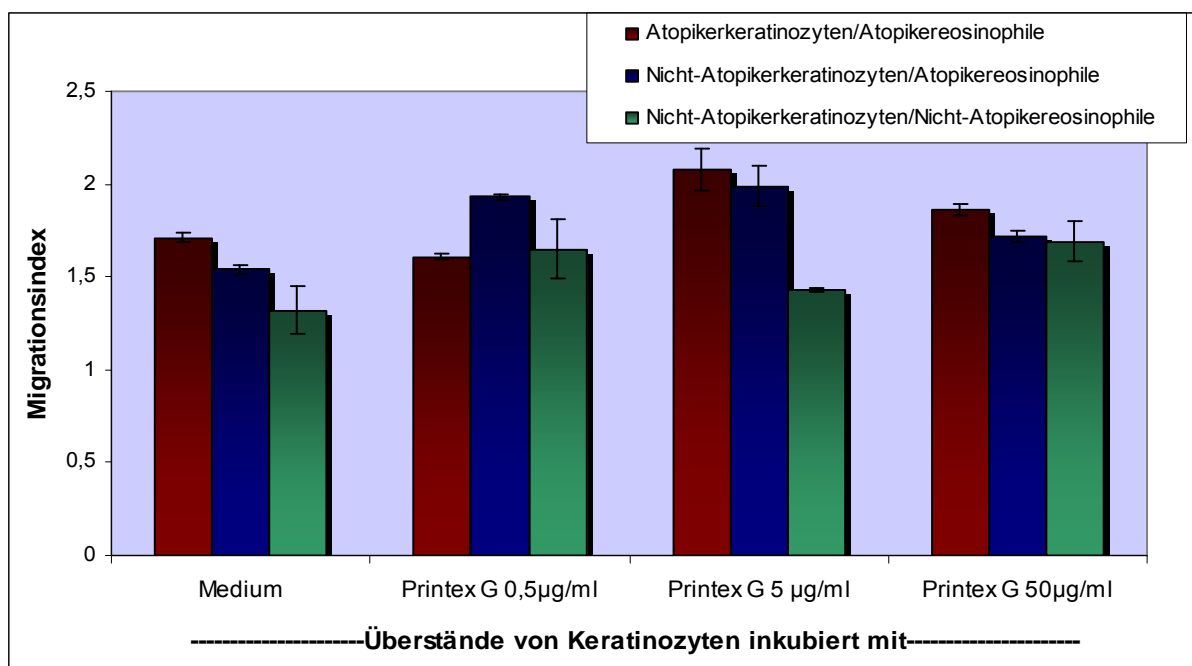


Abb. 32: Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Einsatz von Zellen atopischer oder nicht-atopischer Probanden bei der Aktivierung Eosinophiler durch Partikel-stimulierte Keratinozyten feststellbar. Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=3;

5.5 Untersuchungen zum auslösenden Agens der beobachteten Partikeleffekte

5.5.1 Vergleich der eingesetzten Partikel DEP, Printex G und Printex 90

Zum Vergleich der verschiedenen eingesetzten Partikel können mehrere durchgeführte Experimente herangezogen werden. Zum ersten betrachten wir die Migration von Eosinophilen auf Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten. Hier konnten Überstände Dieselpartikel-stimulierter Keratinozyten die stärkste Migration auslösen, gefolgt von Überständen von Printex 90 Partikel stimulierten Keratinozyten (s. Abbildung 33).

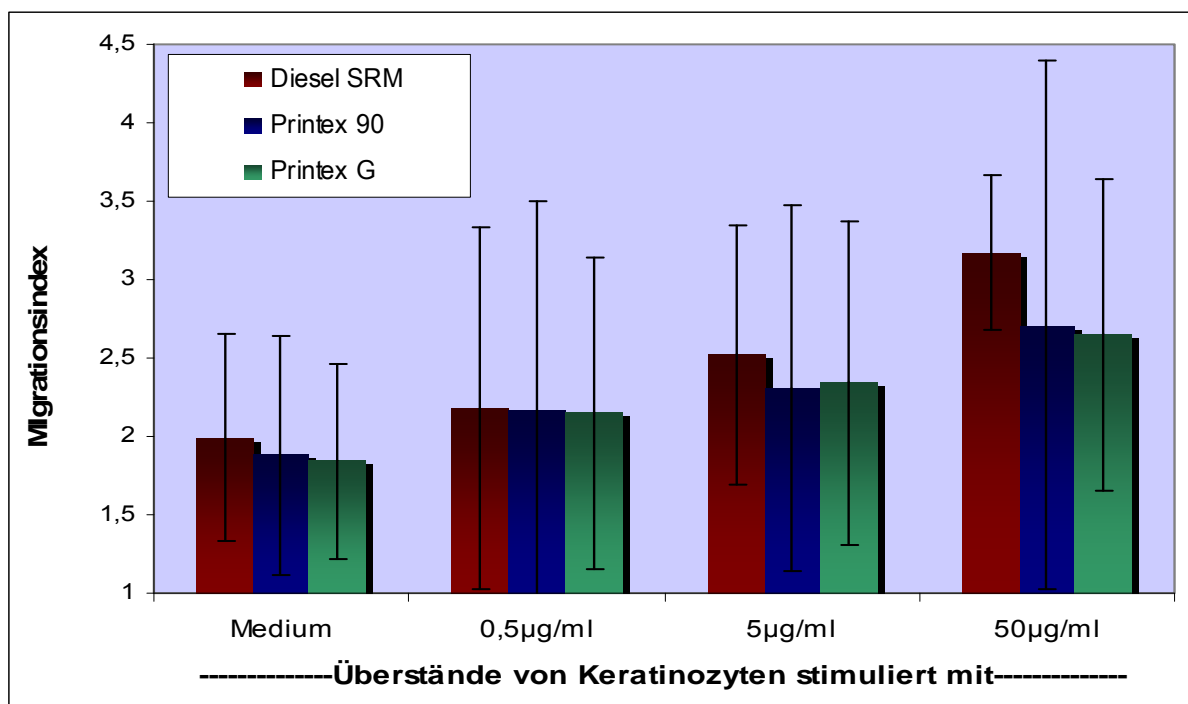


Abb. 33: Vergleich der Migration Eosinophiler auf Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten. Eingesetzte Partikelarten: Diesel Standard SRM 1650a n=4, Printex 90 n=4, Printex G n=5. Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h, 37°C;

Weiterhin können zum Vergleich der verschiedenen eingesetzten Partikelarten die Experimente herangezogen werden, in denen GM-CSF-geprimte und nicht vorstimulierte Eosinophile mit den unterschiedlichen Partikelarten direkt stimuliert wurden und anschließend die ECP-Ausschüttung der Eosinophilen gemessen wurde. Diesbezüglich sind differente Ergebnisse festzustellen. Bei nicht-vorstimulierten Eosinophilen induzierten Printex G Partikel die stärkste ECP-Ausschüttung, Dieselpartikel führten zur geringsten ECP-Freisetzung (s. Abb. 34). Eosinophile, die mit GM-CSF

vorstimuliert wurden, zeigen durch die verschiedenen Partikelarten, unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichung, eine ähnlich hohe ECP-Freisetzung. Ein signifikanter Unterschied ist nicht zu erkennen (s. Abb. 35).

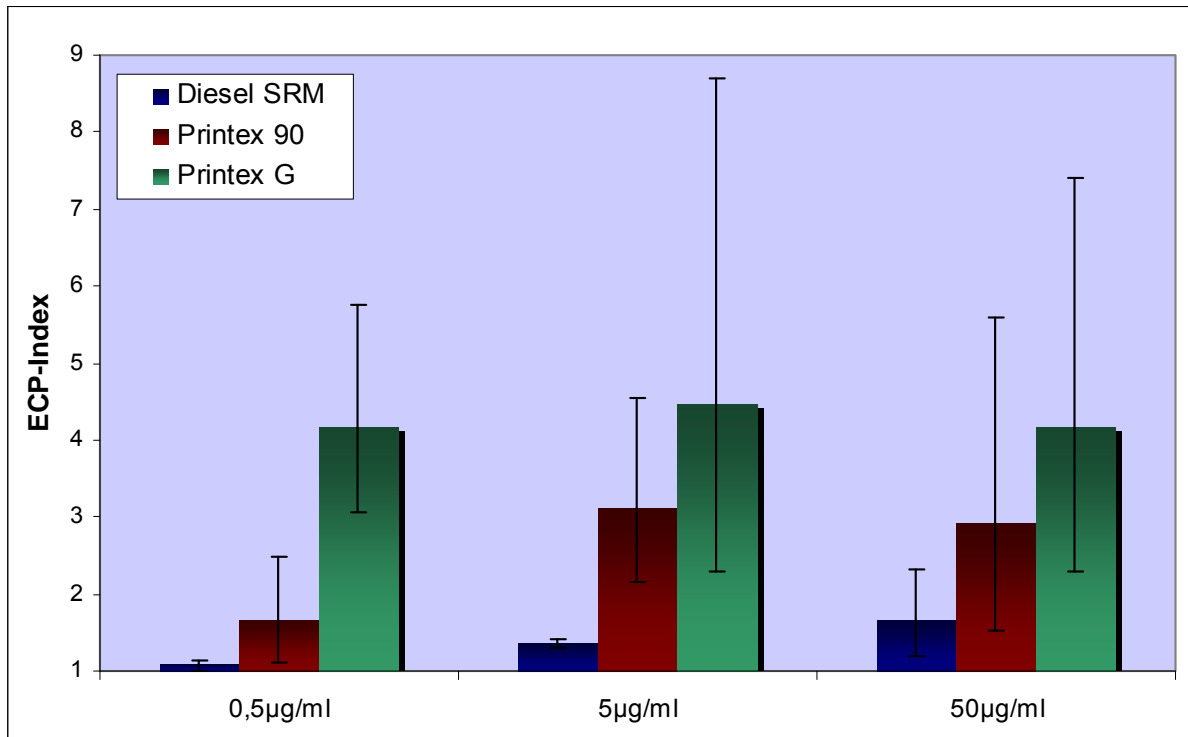


Abb. 34: ECP-Ausschüttung aus Partikel-stimulierten Eosinophilen. Eingesetzte Partikelarten: Diesel Standard SRM 1650a n=3, Printex 90 n=3 und Printex G n=3. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5; 37°C;

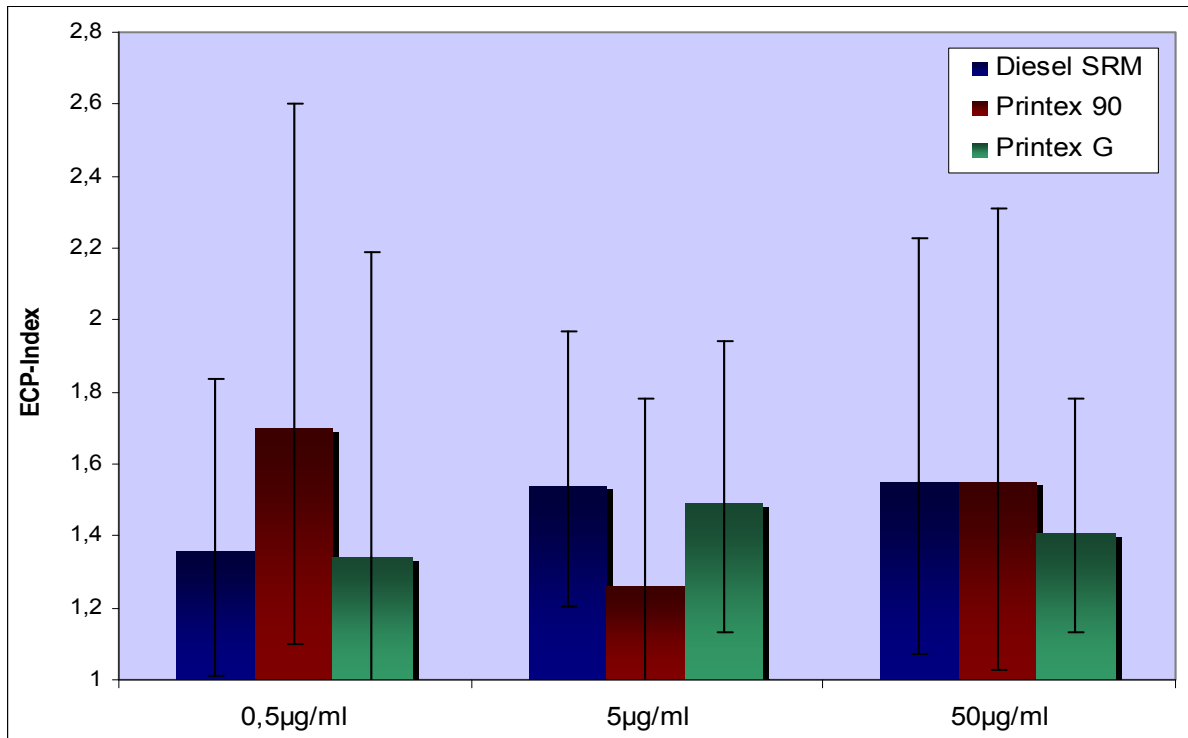


Abb. 35: ECP-Ausschüttung aus Partikel-stimulierten GM-CSF-geprinten [25min; 1µg/ml GM-CSF] Eosinophilen. Eingesetzte Partikelarten: Diesel Standard SRM 1650a n=4, Printex 90 n=3 und Printex G n=3. Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5; 37°C;

Im Folgenden wird die GM-CSF-Freisetzung Partikel-stimulierter Keratinozyten und die ECP-Ausschüttung von Eosinophilen, die mit Überständen von Partikel-stimulierten Keratinozyten inkubiert wurden unter diesem Gesichtspunkt verglichen werden. Bei der GM-CSF-Ausschüttung Partikel-stimulierter Keratinozyten, induzierten Dieselrußpartikel die höchste GM-CSF Ausschüttung. Die GM-CSF-Freisetzung durch Printex 90 und Printex G Partikel ist unter Berücksichtigung der Standardabweichung als etwa gleich hoch anzusehen (s. Abb. 36). Zudem ist die ECP-Freisetzung Eosinophiler, die mit Überständen Partikel-stimulierter Keratinozyten inkubiert wurden, bei Überständen Dieselpartikel-stimulierter Keratinozyten am größten. An zweiter Stelle stehen die Überstände von Printex 90 Partikel-stimulierten Keratinozyten (s. Abb. 37).

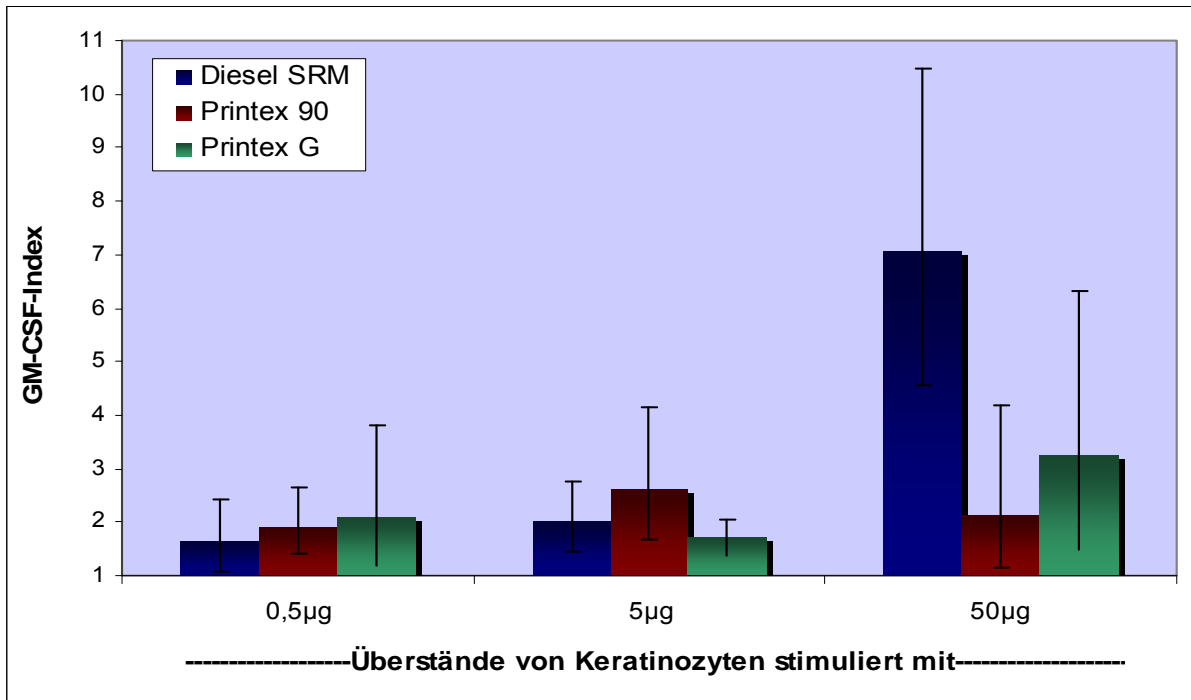


Abbildung 36: GM-CSF Ausschüttung Partikel-stimulierter Keratinozyten. Vergleich von Diesel Standard SRM 1650a n=4, Printex 90 n=4 und Printex G n=4. Stimulation 1×10^6 Zellen/ml; 48h; 37°C;

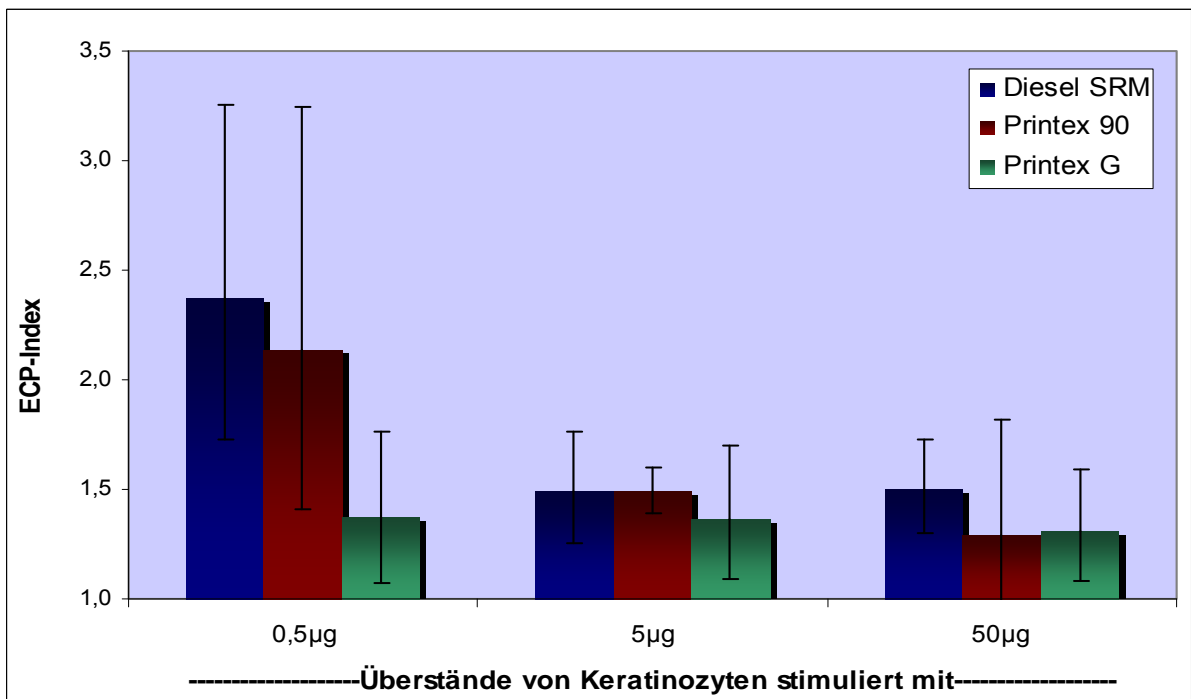


Abbildung 37: ECP-Ausschüttung von eosinophilen Granulozyten, die mit Überständen von Partikel-stimulierten Keratinozyten inkubiert wurden. Vergleich von Diesel Standard SRM 1650a n=3, Printex 90 n=3 und Printex G n=3. Stimulation 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C;

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der indirekten, über Keratinozyten vermittelten, Stimulation Eosinophiler, Diesel Standard Partikel den stärksten Effekt erzielten. Auch die GM-CSF Freisetzung ist durch Keratinozyten, die mit Dieselpartikeln stimuliert wurden, am höchsten. Printex 90 Partikel zeigten in der indirekten Stimulation einen leicht stärkeren Effekt als Printex G Partikel, dieser ist aber nicht als signifikant anzusehen. Bei der direkten Stimulation eosinophiler Granulozyten durch Partikel bewirkten Printex G Partikel bei ungeprimten Eosinophilen den stärksten Effekt, gefolgt von Printex 90 Partikeln. Allerdings fielen die Standardabweichungen dieser Versuche, auf Grund der starken individuellen Unterschiede der ECP-Ausschüttung von Eosinophilen verschiedener Blutspender, im Vergleich hoch aus. Deshalb ist die Vergleichbarkeit dieser Experimente bezüglich der Wirkung der unterschiedlichen Partikel (Abb. 34 und 35) kritisch zu bewerten.

5.5.2 Untersuchung Phenanthren- und Benz(a)pyren-stimulierter Keratinozyten

Im Weiteren wurde untersucht, ob Phenanthrene oder Benz(a)pyrene, welche zu den polyaromatische Kohlenwasserstoffen auf der Oberfläche der Dieselrußpartikel zählen, durch die Stimulation von Keratinozyten eosinophile Granulozyten zur Chemotaxis anregen können. Hierzu wurden Keratinozyten 48h lang mit Phenanthrenen und Benz(a)pyrenen in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM und 10 nM inkubiert. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie in etwa den Konzentrationen entsprechen, die auf der Oberfläche der standardisierten Dieselrußpartikel, in den jeweils eingesetzten Konzentrationen 0,5 µg, 5 µg und 50 µg, vorhanden sind. Es zeigte sich durch Überstände Phenanthren-stimulierter Keratinozyten keine signifikante Induktion der Eosinophilenmigration (s. Abb. 38). Bei der höchsten eingesetzten Phenanthrenkonzentration (10 nM) war eine diskrete Induktion der Eosinophilenchemotaxis erkennbar, diese ist allerdings im Vergleich zu mit Medium stimulierten Keratinozyten als nicht signifikant zu werten. Auch Überstände Benz(a)pyren-stimulierter Keratinozyten konnten keine chemotaktische Aktivität in eosinophilen Granulozyten induzieren (Ergebnisse siehe Anhang). Aufgrund dieser ersten negativen Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Dissertation keine weiteren Untersuchungen bezüglich der stimulierenden Aktivität der Stoffgruppen auf der Dieselrußpartikeloberfläche auf eosinophile Granulozyten durchgeführt.

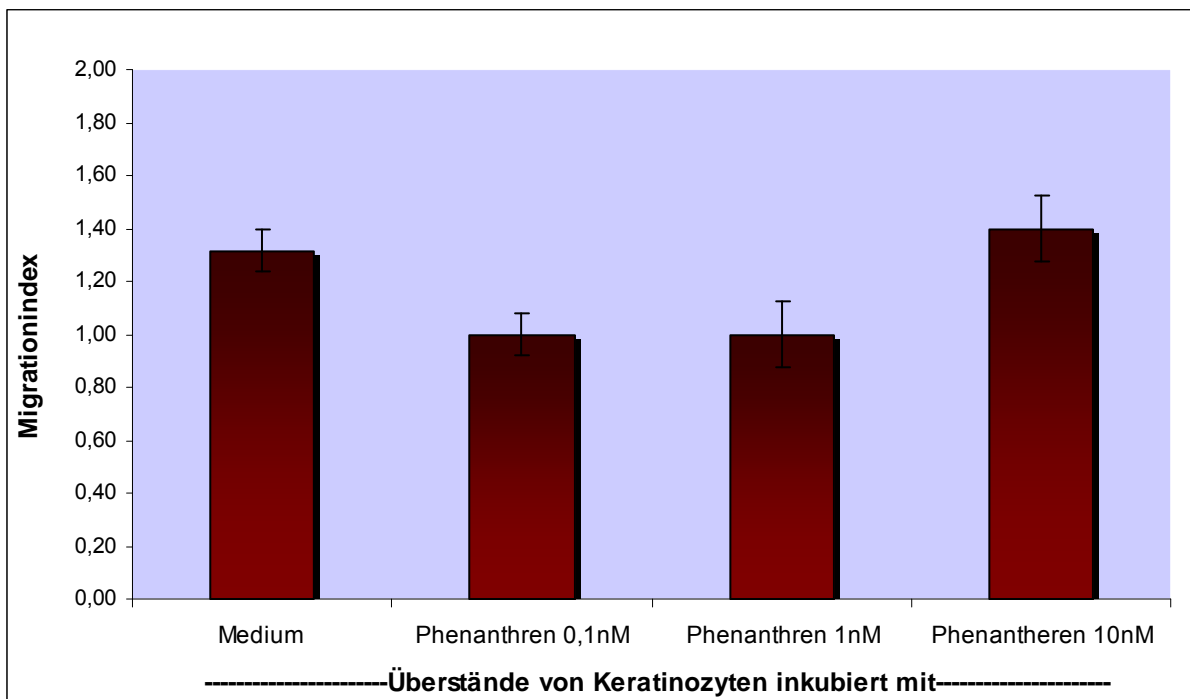


Abbildung 38: Überstände Phenanthren-stimulierter Keratinozyten können keine signifikante Chemotaxis in eosinophilen Granulozyten induzieren. Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=2;

6 Diskussion

6.1 Bedeutung der direkten Interaktion von Eosinophilen mit Schadstoffpartikeln

Gerade in jüngster Zeit häuften sich Berichte über erhöhte Feinstaubbelastung in den Städten. Neueste wissenschaftliche experimentelle und epidemiologische Untersuchungen belegen eine direkte Korrelation zwischen der steigenden Inzidenz sowohl chronischer Atemwegserkrankungen als auch kardiopulmonaler Erkrankungen und der erhöhten Luftverschmutzung mit Dieselrußpartikeln in industrialisierten Ländern (*Maier et al. 2008, Wichmann 2007, Yue et al. 2007*). Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren in mehreren Studien ein direkter Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Feinstaubimmissionen und Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, zu denen die Rhinokonjunktivitis allergica, das Asthma bronchiale allergicum und das atopische Ekzem zählen, aufgezeigt (*Morgenstern et al. 2008, Heinrich und Wichmann 2004, Krämer et al. 2000*). Da eosinophile Granulozyten wichtige Effektorzellen bei der Inflammation und Chronifizierung atopischer Erkrankungen sind (*Hogan 2007*), wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob eosinophile Granulozyten, als Effektorzellen atopischer Erkrankungen, mit feinen und ultrafeinen Schadstoffpartikeln direkt oder indirekt, über andere Zellsysteme vermittelt, interagieren. Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich zunächst mit der Fragestellung, ob Kohlenstoffpartikel eosinophile Granulozyten direkt zur Chemotaxis, Freisetzung von Mediatoren oder Aufregulierung von Adhäsionsproteinen aktivieren können. Im zweiten Teil wurde untersucht, ob andere Zellsysteme, wie Keratinozyten als wichtigste Zelle der oberflächigen Hausschicht und Barriere zur Umwelt, in die Interaktion mit eosinophilen Granulozyten und Schadstoffpartikeln eingebunden sind. Es zeigte sich, dass die untersuchten Kohlenstoffpartikel in den eingesetzten Konzentrationen 0,5µg/ml, 5µg/ml und 50µg/ml die Vitalität eosinophiler Granulozyten nicht beeinflussten und keine direkte chemotaktische Aktivität auf eosinophile Granulozyten hatten. Alle untersuchten Partikelarten (Diesel Standard SRM 1650a, Printex G und Printex 90) konnten eine vermehrte Freisetzung von eosinophilem cationischen Protein (ECP) bei eosinophilen Granulozyten induzieren. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Überstände von Partikel-stimulierten (0,5, 5, 50 µg/ml/10⁶Zellen, 48h) primären humanen Keratinozyten eosinophile Granulozyten zur Chemotaxis und ECP-Freisetzung anregten.

Zunächst wurden in morphologischen Studien eosinophile Granulozyten und die verschiedenen Schadstoffpartikel koinkubiert. Lichtmikroskopisch wurde festgestellt, dass eosinophile Granulozyten, unabhängig vom Sensibilisierungsstatus des Spenders, Lamellopodien nach Partikeln ausbilden (s.

Abb. 7A/B/C) und darüber hinaus Zellagglomerate um die Partikel bildeten. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten die, am Zytopräparat erhobenen, morphologischen Befunde und zeigten darüber hinaus an die Eosinophilen adhärenente Partikel. Die Partikel-inkubierten eosinophilen Granulozyten bilden Lamellopodien und Spikes aus (s. Abb. 9A/B/C). Wegen dieser morphologischen Befunde, bei denen nach Koinkubation mit Rußpartikeln Zeichen der Aktivierung eosinophiler Granulozyten beobachtet wurden, wurde in der Folge die in-vitro Interaktion von eosinophilen Granulozyten mit ultrafeinen und feinen Partikeln genauer untersucht.

Zunächst sollte ausgeschlossen werden, dass Partikel in den eingesetzten Konzentrationen (0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml) per se toxisch auf eosinophile Granulozyten wirken. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich kein signifikanter Einfluss der eingesetzten Partikelkonzentrationen auf die Vitalität eosinophiler Granulozyten. Somit sind die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse nicht auf toxische Effekte der Kohlenstoffpartikel oder der an den Partikeln anhaftenden Substanzen, wie z.B. Benz(a)pyrene oder polyaromatische Kohlenwasserstoffe, zurückzuführen (*Bond 1986, Dasenbrock 1996, Mastrangelo et al. 2003, Ono-Ogasawara et al. 2004*).

Es gibt viele bekannte Chemoattraktanzien für Eosinophile (*Hogan 2007, Powell 2001, Kaplan 2001, Plötz et al. 2004*). Zunächst war es von Interesse, ob Kohlenstoffpartikel oder deren aufgelagerte Substanzen, wie z.B. Benz(a)pyrene oder polyaromatische Kohlenwasserstoffe (*Bond 1986, Dasenbrock 1996, Mastrangelo et al., 2003*), als Chemoattraktanzien für eosinophile Granulozyten fungieren können. Die eingesetzten Partikelkonzentrationen selbst konnten in Migrationversuchen keine Chemotaxis von isolierten eosinophilen Granulozyten induzieren. Diese Ergebnisse bestätigen die bisher in diesem Forschungsbereich veröffentlichten Daten, da bislang in vitro keine chemotaktische Aktivität von feinen oder ultrafeinen Partikeln auf zur Migration fähige Zellen, nachgewiesen worden ist. Allerdings konnten Hirota et al. kürzlich aufzeigen, dass Dieselrußpartikel die Eotaxin-induzierte Migration eosinophiler Granulozyten deutlich steigern. Diese gesteigerte chemotaktische Aktivität konnte durch N-acetyl l-cystein blockiert werden und eine deutlich gesteigerte p38 MAP Kinase Aktivität durch die Koinkubation mit Dieselrußpartikeln gesehen werden (*Hirota et al. 2008*). Rußpartikel können also zwar nicht direkt chemotaktisch auf Eosinophile wirken, aber sie können die chemotaktische Aktivität auf andere Chemoattraktantien, wie Eotaxin, steigern.

Der Einfluss lokal gebildeter Mediatoren und Zytokine kann Eosinophile zur Freisetzung basischer Proteine veranlassen, die im Gewebe zu einer Entzündungsreaktion mit lokaler Gewebszerstörung führen können (*Kita et al. 1996*). Eines dieser Granulaproteine ist das eosinophilen kationische Protein ECP, welches bei Hypereosinophilie Syndrom (HES)-Patienten und bei Patienten mit Krankheiten des atopischen Formenkreises in erhöhten Konzentrationen im Serum und Gewebe nachgewiesen wurde (*Plötz et al. 1997, 2000, 2003, 2004, Jakobs et al. 1991, Czech et al. 1992, Kapp 1993*). Da die ECP-Freisetzung nach Stimulation isolierter eosinophiler Granulozyten im Gegensatz zu den in-vivo Messungen im Patientenserum hohen Schwankungen unterliegt, ist die Messung der ECP-Freisetzung bei in-vitro Experimenten als diffizil anzusehen. Dennoch konnte an isolierten humanen eosinophilen Granulozyten eine signifikante Induktion der ECP-Freisetzung durch die eingesetzten Partikelarten Diesel SRM, Printex 90 und Printex G in den Konzentrationen 0,5µg/ml, 5µg/ml und 50µg/ml gezeigt werden (s. Abb. 12, 14 und 16). Diese stellte sich bei nicht-vorstimulierten Dieselpartikel-stimulierten Eosinophilen dosisabhängig dar. Bei eosinophilen Granulozyten, die mit Printex 90 oder Printex G Partikeln stimuliert wurden, zeigte sich die stärkste ECP-Freisetzung bei der Konzentration 5µg/ml und fiel dann wieder ab (s. Abb. 14 und 16). Diese nicht streng dosisabhängige Induktion der ECP-Ausschüttung ist mit dem Phänomen zu erklären, dass Rußpartikel in der Lage sind chemische Verbindungen, wie Benz(a)pyrene, polyaromatische Kohlenwasserstoffe oder LPS an ihrer Oberfläche zu adsorbieren (*Maier et al. 2008, Cho et al. 2002*). Da die eingesetzten Partikelarten Printex G und Printex 90 in ihrer ursprünglichen Form unbeladene reine Kohlenstoffpartikel mit großer Partikeloberfläche darstellen, ist es möglich, dass durch die Partikel selbst, das freigesetzte ECP adsorbiert wurde und somit in den Überständen der eosinophilen Granulozyten nicht mehr messbar war. Dies ist eine Erklärung für das Abfallen der gemessenen ECP-Konzentration in den Überständen, der mit 50 µg/ml Printex G und Printex 90 Partikel-stimulierten Eosinophilen, da bei dieser Konzentration die Gesamtoberfläche und somit das Adsorptionspotential der Rußpartikel am höchsten ist. Weiterhin erscheint es nachvollziehbar, dass derselbe Effekt bei den eingesetzten Diesel Standard Partikeln weniger ins Gewicht fällt, da diese Partikel schon in definierter Menge mit verschiedenen polyaromatischen Kohlenwasserstoffen beladen wurden und somit eine dosisabhängige ECP-Ausschüttung beobachtet werden kann (s. Abb. 12).

Zudem wurde beschrieben, dass isolierte humane eosinophile Granulozyten, nach Vorstimulation mit dem Zytokin GM-CSF oder dem Lipidmediator PAF, eine erhöhte ECP-Freisetzung aufweisen (*Simon et al. 1999*). Deshalb wurden die Untersuchungen sowohl mit nicht-vorstimulierten naiven Eosinophilen, als auch mit GM-CSF geprägten eosinophilen Granulozyten durchgeführt. Es zeigte sich bei der ECP-

Freisetzung induziert durch Diesel Standard, Printex 90 oder Printex G Partikel, kein signifikanter Unterschied zwischen naiven eosinophilen Granulozyten und Granulozyten, die mit GM-CSF geprimt wurden (s. Abb. 13, 15 und 17). Dies liegt zum einen an den starken interindividuellen Unterschieden der ECP-Ausschüttung zwischen den verschiedenen Probanden, die als Eosinophilenspender dienten. Zum anderen kommt wahrscheinlich auch hier der Effekt zum tragen, dass Kohlenstoffpartikel in der Lage sind biologische aktive Substanzen, zu denen ECP oder GM-CSF zählen, auf der Partikeloberfläche zu binden (*Maier et al. 2008, Cho et al. 2002*).

Zum weiteren Nachweis einer spezifischen Aktivierung wurde die extrazelluläre Expression von Aktivierungsmarkern untersucht. Bekannt ist die Aufregulierung des Adhäsionsproteins CD11b durch Aktivierung verschiedener Mediatoren (*Powell et al. 1999, Plötz et al. 2004*). Die Expression des β_2 -Integrins, das bei der Adhäsion an Gefäßendothel eine wesentliche Rolle spielt, wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es fand sich eine geringe, aber nicht signifikante CD11b- Aufregulation (s. Abb. 18). Im Rahmen einer aktuellen Untersuchung über die Effekte von ultrafeinen Partikeln nach Inhalation konnte in asthmatischen Probanden nach Inhalation von $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ UFP eine verminderte Expression von CD11b auf Monozyten und Eosinophilen im peripheren Blut, sowie eine verminderte Expression von CD54 auf Granulozyten festgestellt werden (*Frampton et al. 2006*). Zusätzlich wurde festgestellt, dass nach Inhalation von UFP prozentual weniger CD4+-T-Zellen, Basophile und Eosinophile im peripheren Blut zu finden sind. Diese Ergebnisse zeigen eine Änderung des Adhäsionsmolekülmusters nach UFP-Inhalation im peripheren Blut in Zusammenhang mit einer erhöhten Retention von Leukozyten im Lungengefäßsystem (*Frampton et al. 2006*), was auf eine Aktivierung der Leukozyten inklusive Eosinophiler lokal im Lungengefäßsystem nach Partikelinhalation hindeutet.

Zusammenfassend konnte also eine Aktivierung eosinophiler Granulozyten durch die eingesetzten Partikelarten im Sinne einer Induktion der ECP-Freisetzung sowohl bei nicht-vorstimulierten, als auch bei GM-CSF-vorstimulierten eosinophilen Granulozyten festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Dieselrußpartikel als auch reine Kohlenstoffpartikel in-vitro in der Lage sind eosinophile Granulozyten zur ECP-Freisetzung zu aktivieren. Diese Tatsache kann in-vivo bei Aggravierung des Asthma bronchiale allergicum oder der allergischen Rhinitis durch vermehrte Feinstaubinhalation eine entscheidende Rolle spielen. Es ist bereits bekannt, dass im Mausmodell durch intratracheale Partikelinstallation eine Eosinophileninfiltration der Atemwege induziert werden kann (*Miyabara 1998*). *Allessandrini et al.* stellten kürzlich im Mausmodell fest, dass die Inhalation von ultrafeinen Partikeln 4

Tage bis 24h vor Allergenexposition mit Ovalbumin zu einem dosisabhängigen signifikantem Anstieg der Entzündungszellen in der Bronchiallavage mit vermehrtem Nachweis von IL-4, IL-5 und IL-13 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Partikelinhalation führt (*Alessandrini et al. 2006*). Auch im Rahmen einer in-vivo Exposition mit ultrafeinen Partikeln an Kindern war nachzuweisen, dass bei Kindern mit Asthma bronchiale allergicum die Inhalation von Feinstaubpartikeln PM_{2,5} mit einer erhöhten Prozentzahl von Eosinophilen und mit erhöhten Konzentrationen von Albumin, Urea und α 1-Antitrypsin in der Nasallavage korreliert waren (*Nikasinovic et al. 2006*). Bereits 1991/1992 fand sich in einer Studie an erwachsenen Asthmatikern in Erfurt eine signifikante Assoziation zwischen 5-Tages-Mittelwerten feiner und ultrafeiner Partikel und der Verschlechterung von Asthma und Lungenfunktion (*Peters et al. 1998*). Diese Daten konnten kürzlich im Rahmen einer epidemiologischen Untersuchung in München an Kindern bestätigt werden. Es zeigte sich bei Kindern, welche in unmittelbarer Nähe zu stark verkehrsbelasteten Straßen leben, eine deutliche Assoziation mit der verstärkten Entwicklung von Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis allergica und Atopischem Ekzem (*Morgenstern et al. 2008*). Nachdem beim Asthma bronchiale allergicum und bei der Rhinitis allergica vermehrt eosinophile Granulozyten in der Schleimhaut vorhanden sind, kann durch eine verstärkte Freisetzung von ECP eine Entzündungsreaktion mit lokaler Gewebszerstörung ausgelöst werden, die zu Aggravierung dieser Erkrankungen führt (*Kita et al. 1996*). Hirota et al. wiesen in einer aktuellen in-vitro Untersuchung nach, dass DEP-stimulierte eosinophile Granulozyten vermehrt die Zytokine IL-8 und MCP-1 durch die Aktivierung von NF-kappa B freisetzen und dass die Eotaxin-induzierte Migration in DEP-koinkubierten Eosinophilen deutlich erhöht ist (*Hirota et al. 2008*). Diese Untersuchungen und oben aufgeführte Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rußpartikel eine wichtige Rolle bei Induktion und Unterhaltung von Entzündungsprozessen bei Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, wie zum Beispiel dem Asthma bronchiale allergicum und der Rhinokonjunktivitis allergica, über die direkte Aktivierung eosinophiler Granulozyten spielen.

6.2 Bedeutung der indirekten Aktivierung von Eosinophilen durch Schadstoffpartikel

In vielen epidemiologischen und experimentellen wissenschaftlichen Studien wurde ein direkter Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Immissionen und kardiopulmonalen Erkrankungen, sowie Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis nachgewiesen (*Wichmann 2007, Heinrich und Wichmann 2004*). Im Jahre 2000 wurde z.B. an Kindern, welche an Straßen mit hoher Verkehrsbelastung lebten, eine signifikante Assoziation zwischen der Ausprägung atopischer Erkrankungen, wie dem atopischen Ekzem, und Kfz-bedingter Luftverschmutzung festgestellt (*Krämer et al. 2000*). Zusätzlich konnte in einer aktuellen epidemiologischen Untersuchung an insgesamt 5921 Kindern im Münchner Raum nachgewiesen werden, dass die Nähe des Wohnortes zu einer verkehrsbelasteten Hauptstraße mit dem Auftreten und der Ausprägung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis deutlich korreliert, wobei das stärkste Erkrankungsrisiko für Kinder bestand, welche weniger als 50 Meter von der Hauptverkehrsstraße wohnten (*Morgenstern et al. 2008*). Zusätzlich war die NO₂-Exposition der Kinder mit dem Auftreten oder der Exazerbation eines Atopischen Ekzems assoziiert (*Morgenstern et al. 2008*). Das atopische Ekzem ist eine häufige entzündliche Hauterkrankung (9-20% der deutschen Kinder betroffen!), das chronisch oder chronisch rezidivierend verläuft und mit starkem Juckreiz einhergeht. Im Rahmen des atopischen Ekzems ist die Barrierefunktion der Haut gestört, es kommt zu erhöhter Permeabilität, zu erhöhtem transepidermalen Wasserverlust und zu einer mikroskopisch nachweisbaren Entzündungsreaktion der Haut (*Ring 2004*). Es ist bekannt, dass Keratinozyten, die den Hauptbestandteil der Epidermis darstellen, maßgeblich in diese Entzündungsreaktion involviert sind (*Giustizieri et al. 2001*). Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion werden von epidermalen Keratinozyten Chemokine, wie z.B. Eotaxin und RANTES ausgeschüttet, die eosinophile Granulozyten zur Migration in die Epidermis aus dem peripheren Blut anregen (*Yamada et al. 1997*). Da es bereits deutlich epidemiologische Hinweise gibt, dass Rußpartikel den Verlauf eines bestehenden atopischen Ekzems verschlechtern können, sollte nun in dieser Arbeit aufgedeckt werden, ob mit Rußpartikeln inkubierte Keratinozyten eosinophile Granulozyten zur Chemotaxis und Degranulation anregen können.

Zunächst wurde untersucht, ob Keratinozyten, die 48 h mit den verschiedenen eingesetzten Partikelarten Diesel Standard, Printex G und Printex 90 inkubiert wurden, in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Zeichen einer Aktivierung zeigten. Es konnte festgestellt werden, dass die Partikel-stimulierten Keratinozyten im Gegensatz zu naiven, nicht-stimulierten Keratinozyten multiple Spikes und

„Blebs“, d.h. Zellblasen ausbildeten (s. Abb. 20A und 20B). Darüber hinaus war zu erkennen, dass Keratinozyten Ausläufer zu den Rußpartikeln bildeten, die die Partikel umschließen und die Partikel an die Zellen zu adhären schienen (s. Abb. 20C). Diese elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen auf eine Aktivierung der primären humanen Keratinozyten durch alle eingesetzten Partikelarten schließen.

Weiterhin ist bereits bekannt, dass humane epidermale Keratinozyten durch die Stimulation mit DEP zur erhöhten Freisetzung von IL-1 β und IL-8, die als proinflammatorische Zytokine in die Immunantwort miteingebunden sind und unter anderem als Wachstumsfaktor für Keratinozyten wirken, angeregt werden (*Ushio et al. 1999*). Deshalb und auf Grund der durchgeführten morphologischen Experimente wurde im Folgenden mittels ELISA untersucht, ob Keratinozyten durch die Stimulation mit Feinstaubpartikeln zur Freisetzung Eosinophilen-aktivierender Zyto- oder Chemokine angeregt werden. Für die Mediatoren MIP-3 α , Eotaxin, RANTES, IL-18 und TARC, die als chemotaktische Faktoren für eosinophile Granulozyten wirken (*Powell 2001, Kaplan 2001, Elsner 1999, Plötz et al. 2004*), konnte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit keine Induktion der Freisetzung durch Kohlenstoffpartikel gezeigt werden. TARC ist zusammen mit dem Zytokin MDC bei Probanden mit allergischem Asthma nach Allergeninhalation in stark erhöhter Konzentration in der Bronchiallavage nachweisbar und deutet auf ein TH-2 Zytokin Muster bei Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis hin (*Maier et al. 2008*).

Allerdings wurde eine signifikante, dosisabhängige Induktion der GM-CSF Ausschüttung durch Partikel-stimulierte Keratinozyten nachgewiesen, wobei die höchste Freisetzung durch Diesel Standard Partikel induziert wurde (s. Abb. 21). In neueren Studien konnte festgestellt werden, dass das Zytokin GM-CSF, welches bei Patienten mit atopischem Ekzem vermehrt in der Haut gebildet wird (*Pastore et al. 1997*), die Sensibilität eosinophiler Granulozyten auf chemotaktisch wirksame Mediatoren, wie zum Beispiel Eotaxin, erhöht (*Kaatz et al. 2004*). Muessel et al. konnten darüber hinaus in einer aktuellen experimentellen Studie die chemoattraktive Eigenschaft von GM-CSF auf eosinophile Granulozyten nachweisen (*Muessel et al. 2008*). Die GM-CSF induzierte Chemotaxis war nur teilweise von der Rho Kinase/ Rho-assoziierten Kinase abhängig und unabhängig von der RhoA Aktivierung (*Muessel et al. 2008*). Somit kann GM-CSF die entzündliche Reaktivität der Haut beeinflussen und eosinophile Granulozyten chemotaktisch aktivieren. Zudem wurde beschrieben, dass isolierte humane eosinophile Granulozyten, nach Vorstimulation mit dem Zytokin GM-CSF, eine erhöhte ECP-Freisetzung nach Stimulation mit Eosinophilen-aktivierenden Substanzen aufweisen (*Simon et al. 1999*). Somit konnte im Rahmen dieser Untersuchungen ein chemotaktisches Agens für eosinophile Granulozyten,

ausgeschüttet durch Partikel-stimulierte Keratinozyten gefunden werden. Es wurde eine dosisabhängige, signifikante Induktion der GM-CSF Freisetzung in Keratinozyten durch alle eingesetzten Rußpartikelarten aufgezeigt (s. Abb. 21-23), wobei sich diese am stärksten durch Diesel Standard SRM 1650a Partikel-stimulierte Keratinozyten darstellte.

Im weiteren Verlauf sollte überprüft werden, ob Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten die Apoptose- oder Nekroserate von eosinophilen Granulozyten beeinflussen. Die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus, über den zytotoxische Eosinophile ohne Auslösung einer Entzündungsreaktion eliminiert werden können (Plötz 2002). Der programmierte Zelltod Eosinophiler weist mit Kernkondensation, Zellschrumpfung und DNA-Fragmentierung typische apoptotische Merkmale auf (Simon 1997). Gewebseosinophilie bei atopischen Erkrankungen erklärt man sich teils auch durch eine Überproduktion von Zytokinen (IL-5), die den programmierten Zelltod Eosinophiler inhibieren (Simon et al. 1997). In den durchgeführten Experimenten konnte durch Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten kein Einfluss auf die Apoptose- oder Nekroserate eosinophiler Granulozyten festgestellt werden (s. Abb. 24). In der gängigen Literatur ist kürzlich durch ein Fusionsprotein aus GM-CSF und Bcl-XI eine deutliche Apoptosehemmung in Monozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen worden (Antignani und Youle 2007). Durch GM-CSF allein wurde ebenfalls in mehreren wissenschaftlichen Untersuchungen eine Apoptosehemmung in eosinophilen Granulozyten beschrieben (Munitz et al. 2006, Dziedziczko und Pałgan 2004). Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten enthalten nach den, in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen, nicht genügend GM-CSF oder andere Substanzen, welche über den Mechanismus der Apoptoseinhibition zur Aggravierung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis zu führen.

Keratinozyten stellen, als Hauptbestandteil der Epidermis, eine wichtige Funktion als Barriere zu Umweltschadstoffen dar. Bei Erkrankungen, wie dem atopischen Ekzem, ist diese Hautbarrierefunktion maßgeblich eingeschränkt, es besteht eine erhöhte Permeabilität der Epidermis, dadurch kommt es z.B. zu erhöhtem transepidermalen Wasserverlust (Ring 2004). Deshalb ist es vorstellbar, dass gerade bei atopisch vorgeschädigter Haut, es zu einem intensivierten Kontakt zwischen Feinstaubpartikeln und Keratinozyten der obersten Epidermisschicht kommt. Darüber hinaus ist bekannt, dass eosinophile Granulozyten vor allem in der frühen Phase der Ekzementstehung bei der atopischen Dermatitis eine wichtige Rolle spielen (Hogan 2007). Mit Freisetzung toxischer, proinflammatorischer Proteine können sie die Entzündungsreaktion verstärken und durch die Ausschüttung potenter Mediatoren weitere Entzündungszellen aktivieren und somit in die Entzündungskaskade einbeziehen (Hogan 2007, Horiuchi

und Weller 1997, Fredens et al. 1982, Peterson et al. 1988). Welche Faktoren für die Migration der Zellen letztendlich verantwortlich sind, ist derzeit nicht geklärt. Sicherlich spielen für Eosinophile chemotaktische Substanzen wie Eotaxin, TARC oder RANTES eine wichtige Rolle (Mattoli et al. 1997, Kaplan 2001). Auch für das Zytokin GM-CSF wurde kürzlich eine dosisabhängige Chemotaxisinduktion in eosinophilen Granulozyten nachgewiesen (Muessel et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Partikel-stimulierte Keratinozyten eosinophile Granulozyten zur Migration anregen. Es war eine dosisabhängige Migration auf Überstände von sowohl Diesel Standard Partikel-stimulierten Keratinozyten (s. Abb. 25) als auch Printex G und Printex 90 Partikel-stimulierten Keratinozyten (s. Abb. 26, 27) erkennbar. Der Induktion der Chemotaxis stellte sich, außer bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration 0,5 µg/ml für Diesel Standard und Printex 90 Partikel, signifikant dar (s. Abb. 25 und 26). Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass durch die Stimulation mit Feinstaubpartikeln humane Keratinozyten Substanzen freisetzen, die eosinophile Granulozyten zur Migration aktivieren. In den oben genannten Experimenten konnte GM-CSF als Chemoattraktanz identifiziert werden, das durch Partikel-stimulierte Keratinozyten dosisabhängig vermehrt ausgeschüttet wurde. Weiterhin ist bekannt, dass GM-CSF die Sensibilität eosinophiler Granulozyten auf chemotaktisch wirksame Mediatoren, wie zum Beispiel Eotaxin, erhöht (Kaatz et al. 2004) und darüber hinaus auch selbst als Chemoattraktans auf eosinophile Granulozyten wirkt (Muessel et al. 2008). Es ist anzunehmen, dass eosinophile Granulozyten durch GM-CSF, das dosisabhängig von Partikel-stimulierten Keratinozyten freigesetzt wird, zum einen für vorhandene chemotaktische Substanzen in Überständen Medium-stimulierter Keratinozyten (RANTES, Eotaxin, TARC), sensibilisiert werden und zum anderen eine direkte dosisabhängige verstärkte Chemotaxis auf GM-CSF in Überständen Partikel-stimulierter Keratinozyten aufweisen.

Bei allen durchgeführten chemotaktischen Experimenten wurde, um eine eventuelle LPS-Kontamination der Rußpartikel als Ursache der gefundenen Ergebnisse ausschließen zu können, eine LPS-Kontrolle mitgeführt. LPS ist ein Bestandteil der Umwelt (Jakobs 1997) und ist in einer Reihe von Staubextrakten nachgewiesen worden. In bereits publizierten Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass LPS an die Oberfläche von Rußpartikeln adsorbiert werden kann, und dass dieses an die Oberfläche gebundene LPS biologisch aktiv ist (Cho et al. 2002). Darüber hinaus ist bekannt, dass sowohl humane Keratinozyten (Pivarcsi et al. 2003), als auch eosinophile Granulozyten (Plötz et al. 2001) Toll-like Rezeptoren auf Ihrer Zelloberfläche besitzen, über die eine Aktivierung durch LPS erfolgen kann. Deshalb wurde in oben genannten chemotaktischen Untersuchungen und auch bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen, in Anlehnung an bereits anerkannte veröffentlichte Literatur, LPS in einer

Konzentration von 100ng/ml als Kontrolle stets mitgeführt (Yang et al. 1999). Die LPS-stimulierten Keratinozyten wiesen jedoch keine vergleichbar starke Chemotaxisinduktion von eosinophilen Granulozyten auf (s. Abb. 25-27). Somit sind die nachgewiesenen Eosinophilen-chemotaktischen Effekte, ausgelöst durch Feinstaub-stimulierte Keratinozyten, nicht auf eine Aktivierung durch Partikel-gebundenes LPS zurückzuführen. Im Rahmen einer aktuellen Arbeit wurde zudem gezeigt, dass Diesel Standard SRM 1650a Partikel keine signifikante LPS-Kontamination aufweisen, weil DEP-vorstimulierte und anschließend LPS-inkubierte (1µg/ml) Monozyten über den Toll-like Rezeptor 4 zu einer COX₂ Induktion führen, DEP-stimulierte Zellen allein diesen Effekt aber nicht zeigen (Maier et al. 2008).

Im Weiteren wurde untersucht, ob Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten eine erhöhte ECP-Freisetzung, als Zeichen der Aktivierung eosinophiler Granulozyten, in diesen induzieren können. Wie bereits im Kapitel 6.1 erwähnt, kann der Einfluss lokal gebildeter Mediatoren und Zytokine Eosinophile zur Freisetzung basischer Proteine veranlassen, die im Gewebe zu einer Entzündungsreaktion mit lokaler Gewebszerstörung führen können (Kita et al. 1996). Eines dieser Granulaproteine ist das eosinophilen kationische Protein ECP, welches im Serum und im Gewebe von Patienten mit atopischer Dermatitis in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen wurde (Plötz et al. 1997, 2000, 2003, 2004, Jakob et al. 1991, Czech et al. 1992, Kapp 1993). Es zeigte sich in den durchgeführten Experimenten, dass eosinophile Granulozyten, die mit Überständen von Partikel-stimulierten Keratinozyten inkubiert wurden, zur ECP-Freisetzung aktiviert werden. Die Induktion der ECP-Ausschüttung in eosinophilen Granulozyten durch Überstände Feinstaub-aktivierter Keratinozyten verhielt sich umgekehrt proportional zur eingesetzten Partikelkonzentration für Diesel Standard und Printex 90 Partikel (s. Abb. 28 und 29). Printex G Partikel-stimulierte Keratinozyten induzierten für alle eingesetzten Konzentrationen (0,5, 5, 50 µg/ml) eine etwa gleich hohe ECP-Ausschüttung (s. Abb. 30). Die Aktivierung zur ECP-Ausschüttung war im Vergleich zu mit Medium stimulierten Keratinozyten für alle Konzentrationen, außer für Printex 90 Partikel und Diesel Partikel in der Konzentration 50 µg/ml signifikant (s. Abb. 28 bis 30). Die nicht dosisabhängige Induktion der ECP-Ausschüttung bei oben genannten Ergebnissen liegt wohl zum einen daran, dass die ECP-Freisetzung nach Stimulation isolierter eosinophiler Granulozyten, im Gegensatz zu den in-vivo Messungen im Patientenserum, hohen Schwankungen unterliegt. Die Messung der ECP-Freisetzung ist bei in-vitro Experimenten als wesentlich komplexer anzusehen, hinzukommend unterliegt sie großen interindividuellen Unterschieden bei dem Einsatz peripherer eosinophiler Granulozyten verschiedener Spender. Darüber hinaus ist, wie bereits in Kapitel 6.1 erwähnt, bekannt, dass Rußpartikel in der Lage sind chemische Verbindungen, wie Benz(a)pyrene, polyaromatische Kohlenwasserstoffe oder LPS an ihre Oberfläche zu adsorbieren (Cho et al. 2002). Ein Hinweis auf die

Potenz des genannten Effektes liegt in der Tatsache, dass sich bei den eingesetzten Partikelarten Diesel Standard und Printex 90 eine zur eingesetzten Partikeldosis umgekehrt proportionale Induktion der ECP-Ausschüttung vorliegt. Je größer die eingesetzte Partikelkonzentration ist, desto größer ist die Partikeloberfläche, an die biologisch aktive Mediatoren binden können (z.B. ECP, GM-CSF) und so nicht mehr mit herkömmlichen Methoden im Überstand messbar sind. Allerdings ist davon auszugehen, dass die Messbarkeit von ECP in-vitro, bei großen interindividuellen Unterschieden der Sensibilität Eosinophiler verschiedener Probanden, hohen Schwankungen unterliegt und somit die Hauptursache der nicht-dosisabhängigen Induktion der ECP-Freisetzung darstellt. Wie auch in Kap. 6.1 beschrieben, ist bekannt, dass isolierte humane eosinophile Granulozyten, nach Vorstimulation mit dem Zytokin GM-CSF oder dem Lipidmediator PAF, eine erhöhte ECP-Freisetzung aufweisen (*Simon et al. 1999*). Da nachgewiesen werden konnte, dass Feinstaubpartikel-stimulierte Keratinozyten zur dosisabhängigen GM-CSF Freisetzung angeregt werden, spielt diese erhöhte GM-CSF Konzentration in den Überständen stimulierter Keratinozyten wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Es ist davon auszugehen, dass die eosinophilen Granulozyten zum einen direkt durch das GM-CSF zur ECP-Freisetzung angeregt werden (*Simon et al. 1999*), zum anderen durch GM-CSF sensibler auf andere Zytokine in Keratinozytenüberständen (z.B. PAF, C5a) reagieren und somit durch Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten eine erhöhte ECP-Freisetzung zeigen. In mehreren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass humane Keratinozyten zur Expression von C5a und PAF in der Lage sind (*Liu et al. 1994, Zwirner 1999*), welche beide potente Induktoren einer ECP-Freisetzung in eosinophilen Granulozyten darstellen (*Simon et al. 2000*). Im Rahmen weiterer Untersuchungen wäre zu klären, ob in Überständen Partikel-stimulierter Keratinozyten die Chemokine PAF und/oder C5a in erhöhter Konzentration nachzuweisen sind.

Des Weiteren wurde die extrazelluläre Expression von Aktivierungsmarkern untersucht. Bekannt ist, dass Eosinophile durch verschiedene Mediatoren zur Aufregulierung des Adhäsionsproteins CD11b angeregt werden können (*Powell et al. 1999, Plötz et al. 2004*). Frampton et al. zeigten nach Inhalation von ultrafeinen Partikeln durch Asthmatiker eine verminderte Expression von CD11b auf Monozyten und Eosinophilen im peripheren Blut, und eine verminderte Anzahl von CD4+-T-Zellen, Basophile und Eosinophile im peripheren Blut, was auf eine erhöhten Retention der Leukozyten im Lungengefäßsystem schließen lässt (*Frampton et al. 2006*). Die Expression von Integrinen, die bei der Adhäsion an Gefäßendothel eine wesentliche Rolle spielen, wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es fand sich durch Überstände Rußpartikel-stimulierter Keratinozyten keine Beeinflussung der Expression des Oberflächenproteins CD11b auf eosinophilen Granulozyten. Auch Keratinozyten,

die mit LPS inkubiert wurden, konnten in Eosinophilen keine signifikante Änderung der Expression des Oberflächenproteins CD11b bewirken.

Überblickend konnte festgestellt werden, dass mit Schadstoffpartikeln inkubierte humane Keratinozyten in der Lage sind (a) eosinophile Granulozyten zur Chemotaxis anzuregen und (b) eine erhöhte ECP-Ausschüttung in Eosinophilen zu induzieren. Die erste von uns bislang identifizierte Substanz, die durch Partikel-stimulierte Keratinozyten freigesetzt wird, ist GM-CSF. Diese dargelegten Ergebnisse bekräftigen vorangegangene epidemiologische Untersuchungen, bei denen ein Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Feinstaubimmissionen und Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis aufgezeigt werden konnten (*Krämer et al. 2000, Nikasinovic 2006, Morgenstern 2008*) und zeigen erste Pathomechanismen der indirekten Interaktion von Schadstoffpartikel mit eosinophilen Granulozyten über die größte Kontaktfläche des Menschen zur Umwelt, die Hautbarriere auf. Eine besondere Bedeutung der Ergebnisse liegt vor allem in der Tatsache, dass bei der atopischen Dermatitis, diese Hautbarriere schon vorgeschädigt ist (*Ring 2004*) und es somit zu einem intensiveren Kontakt feiner und ultrafeiner Partikel mit Keratinozyten der obersten Epidermis kommen kann.

6.3 Bedeutung des Einsatzes von Zellen atopischer oder nicht-atopischer Probanden in Bezug auf deren Interaktion mit Schadstoffpartikeln

In mehreren epidemiologischen Studien zeigte sich durch erhöhte Exposition gegenüber partikulären Luftschadstoffen in verkehrsbelasteten Gebieten eine Aggravierung und Exazerbation von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, zu denen das Asthma bronchiale allergicum, die Rhinokonjunktivitis allergica und das atopische Ekzem zählen (Krämer *et al.* 2000, Nikasinovic *et al.* 2006, Morgenstern *et al.* 2008). Weiterhin ist bekannt, dass humane Keratinozyten, isoliert von Patienten mit atopischem Ekzem, nach Stimulation mit z.B. IL-1 β eine signifikant höhere GM-CSF-Freisetzung zeigen, als Keratinozyten, die von gesunden Patienten isoliert wurden (Pastore *et al.* 1997, 2000).

Zur Vervollständigung zu den bisher beschriebenen Experimenten, bei denen jeweils eosinophile Granulozyten von Atopikern und Keratinozyten von Nicht-Atopikern verwendet wurden, wurde im Rahmen dieses Arbeitsabschnittes untersucht, ob ein Unterschied im Bezug auf die Aktivierung durch Schadstoffpartikel bei eosinophilen Granulozyten oder Keratinozyten, die von atopischen oder nicht-atopischen Probanden isoliert wurden, besteht. Es wurde exemplarisch die indirekte Interaktion von Feinstaubpartikeln und eosinophilen Granulozyten gewählt und exploriert, ob Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten von Atopikern eine stärkere Chemotaxis in eosinophilen Granulozyten induzieren können, als Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten von gesunden Probanden. Darüber hinaus wurde exploriert, ob Überstände Feinstaubpartikel-stimulierter Keratinozyten in eosinophilen Granulozyten von atopischen Spendern eine stärkere Chemotaxis induzieren können, als in Eosinophilen von nicht-atopischen Probanden.

Es konnten keine Unterschiede zwischen Zellen von Atopikern und Nicht-Atopikern im Bezug auf die Induktion der Migration von eosinophilen Granulozyten durch Überstände Rußpartikel-stimulierter Keratinozyten festgestellt werden. Diese Ergebnisse war bei allen eingesetzten Partikelarten auswertbar, als Beispiel ist der Vergleich von Printex G Partikel-stimulierten Keratinozyten dargestellt (s. Abb. 32).

Eine mögliche Erklärung, weshalb im Rahmen dieser Dissertation kein Unterschied zwischen dem Einsatz von Keratinozyten atopischer und nicht-atopischer Probanden festgestellt werden konnte, liegt in einem anderen Aktivierungsweg der Induktion der GM-CSF-Ausschüttung durch Feinstaubpartikel im

Vergleich zu IL-1 β (s.o.). Es ist diesbezüglich bereits bekannt, dass durch Aktivierung mit LPS, das bei den hier durchgeführten Experimenten nicht als Auslöser der gezeigten Effekte in Frage kommt, kein Unterschied der GM-CSF-Freisetzung im Vergleich von Keratinozyten atopischer und nicht-atopischer Probanden gefunden werden konnte (*Pastore et al. 1997*).

Da kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen von Atopikern oder gesunden Probanden bezüglich der Aktivierung durch Russpartikeln festgestellt wurde, ist davon auszugehen, dass Schadstoffpartikel auch bei Nicht-Allergikern zur Aktivierung von Entzündungszellen führen können. Diese Hypothese wird auch durch durchgeführte in vivo Studien bestätigt. Es war zum Beispiel in einer 2003 veröffentlichten Arbeit nach Dieselpartikelinhalation eine verstärkte Entzündungsreaktion im Lungengewebe mit messbarer erhöhter Neutrophilenzellzahl und IL-8-Freisetzung in der Bronchiallavage sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit Asthma bronchiale allergicum nachweisbar (*Holgate et al. 2003*). Zudem konnte nach Inhalation von ultrafeinen Partikeln durch gesunde Erwachsene eine Veränderung der Zellverteilung und der Expression von Adhäsionsmolekülen an Leukozyten im peripheren Blut nachgewiesen werden (*Frampton et al. 2006*).

6.4 Einfluss der organisch-chemischen Verbindungen auf der Dieselrußpartikeloberfläche

Dieselmotoren werden vielfach in der modernen Industrie zum Beispiel als Transportmittel oder zur Konstruktion verwendet. Ein Dieselmotor emittiert etwa 100mal mehr Rußpartikel als ein Benzinmotor. Mehr als 85% der emittierten Partikel haben einen aerodynamischen Durchmesser $<0,1 \mu\text{g}$ und gehören somit zu der ultrafeinen Fraktion (*Wichmann 2007, Peters et al. 1998*). Ultrafeine Partikel mit ihrer im Verhältnis zur Masse sehr großen Oberfläche sind ein ideales Vehikel für den Transport schädlicher Substanzen in das Körperinnere. Die Rußemissionen von Dieselmotoren wurden in den letzten Jahren durch Filter- und Katalysatoreinbau reduziert (*Kralisch 2007*). Diese Tatsache erschwert die Charakterisierung der Größenverteilung der emittierten Partikel und der chemischen Komponenten auf der Partikeloberfläche (*Wichman 2007*). Es ist bekannt, dass auf der Dieselrußpartikeloberfläche eine Vielzahl unterschiedlicher organisch-chemischer Substanzen, wie z.B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, halogenierte und nicht-halogenierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, Aldehyde, Ketone oder organische Säuren adsorbiert sind (*Risse et al. 1999, Ono-Ogasawara 2004, Schober et al. 2006, 2007*). Darüber hinaus ist schon längere Zeit bewiesen, dass einige dieser adsorbierten polyaromatischen Kohlenwasserstoffe kanzerogen auf den Menschen wirken können (*Hansen et al. 1993*). Weiterhin konnte in einer letztlich veröffentlichten Arbeit aufgezeigt werden, dass polyaromatische Kohlenwasserstoffe, die in vivo auf psoriasis vorgeschädigte Haut appliziert wurden, die IgE-Antikörper Konzentration im Probandenserum signifikant steigerten (*Mastrangelo et al. 2003*). Auch führte die Inhalation von aus Dieselrußpartikeln isolierten polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) zur Induktion der lokalen IgE-Produktion und Eosinophilendegranulation in der Nasenschleimhaut (*Mastrangelo et al. 2003, Terada et al. 1997*). In neuesten experimentellen wissenschaftlichen Arbeiten ließ sich eine direkte Aktivierung von Birkenpollen-stimulierten basophilen Granulozyten durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe nachweisen (*Schober et al. 2006, 2007*). Diese bereits durchgeführten Untersuchungen lassen darauf schließen, dass organisch-chemische Substanzen, welche auf der Partikeloberfläche von Dieselrußpartikeln adsorbiert sind, selbst immunmodulatorische Effekte im humanen Zellsystem auslösen.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen untersucht, ob reine Kohlenstoffpartikel, wie Printex und Printex 90 Partikel, die selben Effekte auf eosinophile Granulozyten direkt und indirekt, über Keratinozyten vermittelt, induzieren können, wie Dieselrußpartikel, die standardisiert mit einer Reihe von

unterschiedlichen polyaromatischen Kohlenwasserstoffen, wie z.B. Phenanthrenen, Benz(a)pyrenen und Fluoranthenen beladen sind.

Zunächst war nachzuweisen, dass Überstände Dieselrußpartikel-stimulierter Keratinozyten im Vergleich zu Keratinozyten, die mit reinen Kohlenstoffpartikeln stimuliert wurden, die stärkste Induktion der Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten verursachten (s. Abb. 33). Auch konnte durch Überstände Dieselpartikel-stimulierter Keratinozyten in eosinophilen Granulozyten die höchste ECP-Freisetzung im Vergleich zu den anderen eingesetzten Partikelarten induziert werden (s. Abb. 37). Darüber hinaus wurde durch Diesel Standard Partikel eine signifikant höhere GM-CSF-Ausschüttung bei der eingesetzten Konzentration 50µg/ml in humanen Keratinozyten ausgelöst (s. Abb. 36). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht nur der reine Kohlenstoffkern zur Aktivierung humaner Keratinozyten und somit zur indirekten Aktivierung eosinophiler Granulozyten in der Lage ist, sondern auch die der Dieselrußpartikeloberfläche aufgelagerten verschiedenen polyaromatischen Kohlenwasserstoffe einen adjuvanten Effekt bei der Zellaktivierung beisteuern.

Allerdings zeigte sich bei der direkten Stimulation eosinophiler Granulozyten durch Kohlenstoffpartikel, dass Diesel Standard Partikel nicht den stärksten Effekt bezüglich der ECP-Ausschüttung auslösten. Bei den nicht vorstimulierten Eosinophilen war die höchste Induktion der ECP-Freisetzung durch Printex G Partikel, gefolgt von Printex 90 Partikeln nachzuweisen (s. Abb. 34). GM-CSF-geprimte Eosinophile setzten nach Simulation mit den verschiedenen eingesetzten Partikelarten im Vergleich etwa die gleiche ECP-Menge frei, ein signifikanter Unterschied war hier nicht zu erkennen (s. Abb. 35). Diese Ergebnisse, die sich im Vergleich zu den oben aufgeführten Ergebnissen divergent darstellen, lassen sich mit der im Kapitel 6.1 und 6.2 schon erwähnten Tatsache erklären, dass die ECP-Freisetzung nach Stimulation isolierter eosinophiler Granulozyten in vitro hohen Schwankungen unterliegt. Die Messung der ECP-Freisetzung ist bei in-vitro Experimenten als wesentlich komplexer anzusehen, hinzukommend unterliegt sie großen interindividuellen Unterschieden infolge des Einsatzes peripherer eosinophiler Granulozyten verschiedener Spender.

In der Zusammenschau konnte man im Vergleich der verschiedenen Partikelarten eine Tendenz zur stärkeren Induktion der Chemotaxis und Degranulation eosinophiler Granulozyten durch Überstände Dieselpartikel-stimulierter Keratinozyten erkennen. Allerdings konnten auch reine Kohlenstoffpartikel, zu denen Printex G und Printex 90 Partikel zählen, direkt und indirekt, über Keratinozyten vermittelt, eosinophile Granulozyten zur Degranulation und Migration anregen. Diese Ergebnisse bestätigen einen

adjuvanten, immunmodulierenden Effekt der organisch-chemischen Substanzen, die der Partikeloberfläche anhaften und noch biologisch aktiv sind (Cho et al. 2002).

Als letzter Punkt dieser Dissertationsarbeit sollte exploriert werden, welche der adsorbierten organisch-chemischen Substanzen, eine wesentliche Rolle bei der direkten und indirekten Aktivierung von eosinophilen Granulozyten im in-vitro Modell spielen. Hierzu wurde die Migration von eosinophilen Granulozyten auf Überstände humaner Keratinozyten, die mit Benz(a)pyrenen oder Phenanthrenen stimuliert wurden, gemessen. Phenanthrene und Benz(a)pyrene wurden äquivalent zu den Konzentrationen eingesetzt, in denen diese auf der Partikeloberfläche der Diesel Standard Partikel vertreten sind (0,1 nM, 1 nM und 10 nM). Es konnte weder durch Überstände Benz(a)pyren-, noch durch Überstände Phenanthren-stimulierter humaner Keratinozyten eine signifikante Induktion der Chemotaxis nachgewiesen werden (s. Abb. 38). Diese Ergebnisse sind allerdings erste Ansätze zur Identifikation des auslösenden Agens auf der Dieselrußpartikeloberfläche, weitere Untersuchungen sind im Rahmen kommender experimenteller Studien notwendig.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ursachen, die in den letzten Jahren zu einem signifikanten Anstieg der Prävalenz von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis führen, sich komplex darstellen. Jedoch ist unbestreitbar, dass das vermehrte Auftreten atopischer Erkrankungen parallel mit einer rapiden Industrialisierung und Urbanisierung in vielen Teilen der Welt einhergeht (Riedl und Diaz-Sanchez 2005). Deshalb sind heutzutage die Menschen größeren aerogenen Schadstoffbelastungen ausgesetzt als zu jedem früheren Zeitpunkt in der Weltgeschichte. Besonders die inhalierbare Fraktion des Schwebstaubes, die feinen und ultrafeinen Partikel, kann in auch niedriger Konzentration zu gravierenden adversen Gesundheitseffekten, welche das Herzkreislaufsystem, die Lungenfunktion und Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis betreffen, führen (Heinrich und Wichmann 2004, Yue et al. 2006, Wichmann 2007). In vielen klinischen und epidemiologischen Studien wurde bereits eine Korrelation zwischen erhöhter Feinstaubbelastung der Umwelt und einer Exazerbation und Aggravierung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis aufgedeckt (Ring et al. 1999, Kimata 2004, Peters et al. 1998, Krämer et al. 2000, Morgenstern 2008). Diese Arbeit trägt ihren Teil dazu bei, die Mechanismen dieses Phänomens besser verstehen zu können und so neue Therapieansätze und prophylaktische Maßnahmen zur Vermeidung der Neuentstehung und Aggravierung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis finden zu können.

7 Zusammenfassung

Gerade in jüngster Zeit häufen sich Berichte über erhöhte Feinstaubbelastungen in den Städten. Es konnte durch viele wissenschaftliche Arbeiten ein erhöhtes Mortalitätsrisiko durch kardiopulmonale Erkrankungen nach Dieselrußexposition belegt werden (*Maier et al. 2008, Wichmann 2007, Yue et al. 2007*). Neuere epidemiologische Daten zeigen auf, dass die Exposition gegenüber partikulären Luftschadstoffen, insbesondere feinen und ultrafeinen Partikeln, mit Exazerbation und Aggravierung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis assoziiert ist (*Heinrich und Wichmann 2004, Ring et al. 1999, Kimata 2004*). Zudem wurde ein gehäuftes und verstärktes Auftreten von atopischen Ekzemen bei Kindern, die an Straßen mit erhöhter Verkehrsbelastung wohnen, beobachtet (*Krämer et al. 2000*). In einer aktuellen epidemiologischen Untersuchung an insgesamt 5921 Kindern im Münchner Raum konnte nachgewiesen werden, dass die Nähe des Wohnortes zu einer verkehrsbelasteten Hauptstraße mit dem Auftreten und der Ausprägung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis deutlich korreliert, wobei das stärkste Erkrankungsrisiko für Kinder bestand, welche weniger als 50 Meter von der Hauptverkehrsstraße wohnten (*Morgenstern et al. 2008*). Zusätzlich war die NO₂-Exposition der Kinder mit dem Auftreten oder der Exazerbation eines Atopischen Ekzems assoziiert (*Morgenstern et al. 2008*).

Weil eosinophile Granulozyten in den Pathomechanismus von zahlreichen entzündlichen Prozessen, z.B. Parasiteninfektionen, anderen Erkrankungen (z.B. Churg-Strauß-Syndrom, Hypereosinophiliesyndrom) und Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, zu denen das Asthma bronchiale allergicum, die Rhinokonjunktivitis allergica und das atopische Ekzem zählen, involviert sind, wurde im Rahmen dieser Dissertation deren Interaktion mit Rußpartikeln untersucht (*Plötz et al. 2001, Ring et al. 2001, Hogan 2007*).

Unter der Hypothese, dass humane eosinophile Granulozyten Targetzellen für feine und ultrafeine Partikel darstellen, wurde hier zum einen exploriert, ob Luftschadstoffpartikel und eosinophile Granulozyten direkt interagieren, zum anderen, ob Eosinophile durch Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten aktiviert werden können und die Keratinozyten somit in die immunologisch-entzündliche Reaktion eingebunden sind. Untersucht wurde die Chemotaxis, die Aufregulierung von Adhäsionsproteinen und die Freisetzung von Granulaproteinen aus Eosinophilen nach direkter Stimulation oder nach Inkubation mit Überständen Partikel-stimulierter Keratinozyten.

Es zeigte sich, dass die ausgewählten Kohlenstoffpartikelarten in den eingesetzten Konzentrationen (0,5, 5, 50 µg/ml/10⁶Zellen) die Vitalität eosinophiler Granulozyten nicht beeinflussten und nicht direkt chemotaktisch auf Eosinophile wirkten. Alle untersuchten Partikelarten (Diesel Standard SRM 1650a, Printex G und Printex 90) konnten in eosinophilen Granulozyten eine vermehrte Freisetzung von eosinophilem cationischen Protein (ECP) induzieren. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Überstände Partikel-stimulierter (0,5, 5, 50 µg/ml/10⁶Zellen, 48 h) primärer humaner Keratinozyten, über eine dosisabhängige signifikant erhöhte GM-CSF Freisetzung, eosinophile Granulozyten zur Chemotaxis und ECP-Freisetzung anregten.

Ultrafeine und feine Partikel können demnach in biologische Systeme der Haut eingreifen und proinflammatorische Entzündungsprozesse induzieren, indem Überstände Rußpartikel-aktivierter Keratinozyten eosinophile Granulozyten zur Chemotaxis und Degranulation anregen.

Die dargelegten Befunde sind von umweltmedizinischer Bedeutung, da die Zahl dieselbetriebener Fahrzeuge hoch ist und vermutlich weiter steigen wird. So waren 1998 in Europa von allen verkauften Autos circa 25% dieselbetrieben (*D'Amato 2000*). Die wichtigste Quelle für Dieselrußpartikel stellen weiterhin Straßenverkehrsfahrzeuge dar, jedoch spielen auch andere Dieselmotoren wie zum Beispiel Motoren in Lokomotiven, Marine-Fahrzeugen und der Schwermetallverarbeitung vor allem bei der beruflichen Partikelexposition eine große Rolle (*Wichman 2007*).

8 Literaturverzeichnis

- Aderem A und Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406 (6797): 782-7.
- Antignani A und Youle RJ (2007) The cytokine, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), can deliver Bcl-XL as an extracellular fusion protein to protect cells from apoptosis and retain differentiation induction. *J Biol Chem* 282: 11246-54.
- Alessandrini F, Schultz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H und Jakob T (2006). Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol*. 117:824-830.
- Baggiolini M, Dewald B und Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*. 55: 97-179.
- Bainton DF und Farquhar MG (1970) Segregation and packaging of granule enzymes in eosinophilic leukocytes. *J Cell Biol*. 45: 54-73.
- Baraniuk JN (1999) Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 99: 763-772.
- Bascom R, Bromberg PA, Costa DA, Devlin R, Dockery DW, Frampton MW, Lambert W, Samet JM, Speizer FE und Utell M (1996) Health effects of outdoor air pollution. *Am J Respir Crit Care Med*. 153: 3-50.
- Bastain TM, Gilliland FD, Li YF, Saxon A und Diaz-Sanchez D (2003) Intraindividual reproducibility of nasal allergic responses to diesel exhaust particles indicates a susceptible phenotype. *Clin Immunol*. 109: 130-136.
- Bayerischer Rundfunk (2005) Woher kommt der Staub?, online-ausgabe, www.br-online.de/umwelt-gesundheit/thema/feinstaub/feinstaub-entstehung.xml: 30.03.2005
- Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, MIST, Sagai M und Davies RJ (1998) Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol*. 102: 771-782.
- Behrendt H, Tomczok J, Sliwa-Tomczok W, Kasche A, Ebner von Eschenbach C, Becker WM und Ring J (1999) Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. *Int Arch Allergy Immunol*. 118: 414-418.
- Behrendt H und Becker WM (2001) Localization, release and bioavailability of pollen allergens: influence of environmental factors. *Curr Opin Immunol*. 13(6): 709-715.
- Behrendt H, Kasche A, Ebner von Eschenbach C, Risse U, Huss-Marp J und Ring J (2001) Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *Int Arch Allergy Immunol*. 124: 121-125.
- Bjerke T, Poulsen LK, Zionchek K, Nielsen LP, Kochan J und Jardieu P (1997) Expression of the high-affinity immunoglobulin E receptor alpha subunit in human blood eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 113: 302-304.
- Bond A., Sun JD, Mitchell CE et al. (1986): Biological fate of inhaled organic compounds associated with particulate matter. In: Duk Lee S, Schneider T, Grant LD, Verkerk PJ (eds.) *Aerosols: research, risk assesment and control strategies*. Lewis Publ., Chelsea, Mich., 479-592.
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P und Michel FB (1990) Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 323(15): 1033-1039.
- Boyce JA, Lam BK, Penrose JF, Friend DS, Parsons S, Owen WF und Austen KF (1996) Expression of LTC₄ Synthase during development of eosinophils in vitro from cord blood progenitors. *Blood*. 88: 4338-434.

- Bruijnzeel PLB, Rihs S und Betz S (1992) Der eosinophile Granulozyt und seine Bedeutung bei allergischen Erkrankungen. *Schweiz med Wschr* 122: 173-180.
- Bruijnzeel-Koomen CAFM, van Wichen DF, Spry CJF, Venge P und Bruijnzeel PLB (1988) Active participation of eosinophils in patch test reactions to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 118: 229-238.
- Brunekreef B, Dockery D und Krzyzanowski M (1995) Epidemiologic studies on short-term effects of low levels of major ambient air pollution components. *Environ Health Perspect*. 103 (Suppl 2): 3-13.
- Capron M, Capron A, Dessaint JP, Torpier G, Johansson SGO und Prin L (1981) Fc-receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J Immunol*. 126(6): 2087-2092.
- Chihara J, Plumas J, Guart V, Tavernier J, Prin L, Capron A und Capron M (1990) Characterization of a receptor for interleukin-5 on human eosinophils: variable expression and induction by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 172: 1347-1351.
- Cho DR, Shanbhag AS, Hong CY, Baran GR und Goldring SR (2002) The role of adsorbed endotoxin in particle-induced stimulation of cytokine release. *J Orthop Res*. 20(4): 704-13.
- Costa JJ, Matossian K, Resnick MB, Beil WJ, Wong DT, Gordon JR, Dvorak AM, Weller PF und Galli SJ (1993) Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J Clin Invest*. 91: 2673-2684.
- Coyle AJ, Wagner K, Bertrand C, Tsuyuki S, Bews J und Heusser C (1996) Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: Inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J Exp Med*. 183: 1303-1310.
- Czech W, Krutmann J, Budnik A, Schöpf E und Kapp A (1993) Induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in normal human eosinophils by inflammatory cytokine. *J Invest Dermatol*. 100: 417-423.
- Czech W, Barbisch M, Tenscher K, Schopf E, Schröder JM und Norgauer J (1997) Chemotactic 5-oxo-eicosatetraenoic acids induce oxygen radical production, Ca²⁺-mobilization, and actin reorganization in human eosinophils via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Invest Dermatol*. 108: 108-112.
- D'Amato G (2000) Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy*. 30: 628-636.
- Darsow U, Vieluf D und Ring J (1995) Atopy patch test with different vehicles and allergen concentrations – an approach to standardization. *J Allergy Clin Immunol*. 95: 677-684.
- Darsow U, Behrendt H und Ring J (1997) Gramineae pollen as a trigger factor of atopic eczema – evaluation of diagnostic measures using the atopy patch test. *Br J Dermat*. 137: 201-207.
- Darsow U, Vieluf D und Ring J for the APT study group (1999) Evaluating the relevance of aeroallergen sensitization in atopic eczema with atopy patch test: a randomized, double-blind multicenter study. *J Am Acad Dermatol*. 40: 187-193.
- Darsow U und Ring J (2001) Atopie-Patch-Test: Klinische Studien zu Methodik, Sensivität und Spezifität. *Allergo J*. 10: 201-209.
- Darsow U und Ring J (2002) Allergy diagnosis in atopic eczema with the atopy patch test. In: Leung D, Bieber T eds: *Atopic dermatitis*, Marcel Dekker New York, 437-451.
- Dasenbrock C, Peters L, Creutzenberg O und Heinrich U (1996) The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicology letters*. 110: 1-7.
- Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotna A und Springer MS (1996) Cloning, expression and characterization of human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med*. 183: 2349-2354.
- DeAndres B, Mueller AL, Blum A, Weinstock J, Verbeck S, Sandor M und Lynch RG (1997) FcγRII (CD32) is linked to apoptotic pathways in murine granulocyte precursors and mature eosinophils. *Blood*. 90: 1267-1274.

- Dewson G, Walsh GM und Wardlaw AJ (1999) Expression of Bcl-2 and its homologues in human eosinophils- Modulation by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20: 720-728.
- Diaz-Sanchez D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR und Saxon A. (1996) Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *J Allergy Clin Immunol.* 98: 114-123.
- Diaz-Sanchez D, Jyrala M, Ng D, Nel A und Saxon A. (2000) In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines RANTES, MIP-1 α , and MCP-3 in humans. *Clin Immunol.* 97: 140-145.
- Dziedziczko A und Paigan K. (2004) Eosinophil apoptosis and asthma. *Pol Merkur Lekarski* 17: 73-75.
- Di Luzio NR und Friedmann TJ (1973) Bacterial endotoxins in the environment. *Nature.* 244: 49-51.
- Dockery DW und Pope CA (1994) Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health.* 15: 107-132.
- Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldmann M, Tavernier J, Capron A und Capron M (1994) Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med.* 179: 703-708.
- Ehrlich P (1879) Beiträge zur Kenntnis der granulierenden Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch Anat Physiol.* 166-177.
- Elsner JS, Dichmann S, Dobos GJ und Kapp A (1996) Actin polymerisation in human eosinophils, unlike human neutrophils, depends on intracellular calcium mobilization. *J Cell Physiol.* 167: 548-555.
- Elsner JS, Höchstetter R, Spiekermann K und Kapp A (1996) Surface and mRNA expression of the CD52 antigen by human eosinophils, but not neutrophils. *Blood.* 88: 4684-4693.
- Elsner JS und Kapp A (1999) Regulation and modulation of eosinophil effector functions. *Allergy.* 54: 15-26.
- Folkerts G, Henricks PAJ, Slootweg PJ und Nijkamp FP (1988) Endotoxin-induced inflammation and injury of the guinea pig respiratory airways cause bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 137: 1441-1448.
- Forsman U, Uguccioni M, Loetscher P, Dahinden CA, Langen H, Thelen M und Baggiolini M (1997) Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med.* 185: 2171-2176.
- Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI und Young IG (1996) Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183: 195.
- Fredens K, Dahl R und Venge P (1982) The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *J Allergy Clin Immunol.* 70: 361-366.
- Fujisawa T, Fukuda S, Atsuta J, Ichimi R, Kamiya H und Sakurai M (1994) Interferon-gamma induces interleukin-3 release from peripheral blood eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 104: 41-43.
- Gaga M, Frew AJ, Varney VA und Kay AB (1991) Eosinophil activation and T lymphocyte infiltration in allergen-induced late phase skin reactions and classical delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 147: 816-822.
- Gehr P und Heyer J (2000) Particle-lung interaction. Marcel Dekker Verlag. New York.
- Gemsa D und Resch K (1991) Entzündung. In: „Immunologie“ Gemsa D, Kalden JR, Resch K (Hrsg.). Thieme Stuttgart -New York, 124-143.
- Gerrity TR, Lee PS, Hass FJ, Marinelli A, Werner P und Louneco RV (1979) Calculated deposition of inhaled particles in the airway generations of normal subjects. *J Appl Physiol.* 47: 867-873.
- Giutizieri ML, Mascia F, Frezzolini A et al. (2001) Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T-cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 107: 871-877.

- Gleich GJ und Adolphson CR (1986) The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol.* 39: 177-253.
- Gleich GJ (1990) The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 85: 422-436.
- Gleich GJ (2000) Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 105: 651-663.
- Gleich GJ und Adolphson CR (1986) The eosinophilic leukocytes: structure and function. *Adv Immunol.* 39: 177-253.
- Gleich GJ, Adolphson CR und Leiferman KM (1993) The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med.* 44: 85-101.
- Gleich GJ, Loegering DA und Maldonado JE (1976) Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. *J Clin Invest.* 57: 633-640.
- Grangette C, Gruart V, Quaiassi MA, Rizvi F, Delespesse G, Capron A und Capron M (1989) IgE receptor on human eosinophils (Fc ϵ R1) – comparison with B Cell CD23 and association with an adhesion molecule. *J Immunol.* 143: 3580-3588.
- Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, Klammer M, Kapp A, Ruzicka T, Schöpf E und Krutmann J (1998) Human eosinophils produce biologically active IL-12: Implications for control of T-cell responses. *J Immunol.* 161: 415-420.
- Grootendorst DC, Sont JC, Willems LN, Kluijn-Nelemans JC, van Krieken JH, Veselic-Charvat M und Sterk PJ (1997) Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy.* 27: 769-779.
- Grote M (1999) In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy: allergens at unexpected sites. *Int Arch Allergy Immunol.* 118: 1-6.
- Halmerbauer G, Frischer T und Koller DY (1997) Monitoring of disease activity by measurement of inflammatory markers in atopic dermatitis in childhood. *Allergy.* 52: 765-769.
- Hamelmann E und Gelfand EW (2001) IL-5-induced airway eosinophilia: the key to asthma? *Immunol Rev* 179: 182.
- Hanifin JM und Rajka G (1980) Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 92: 44-47.
- Hansel TT, Braun RK, De Vries IJ, Boer C, Rihs S und Walker C (1993) Eosinophils and cytokines. *Agent & Actions.* 43: 197-208.
- Hansen AM, Poulsen OM und Menne T (1993) Longitudinal study of excretion of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine from two psoriatic patients. *Acta Derm Venereol.* 73 (3): 188-90.
- Harrison RM, Shi JP, Xi S, Khan A, Mark D, Kinnersley R und Yin J (2000) Measurement of number, mass, and site distribution of particles in the atmosphere. *Phil Trans R Soc Lond A.* 358: 2567-2580.
- Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, Ponath PD und Mackay CR (1997) Chemokine receptor usage by human eosinophils. *J Clin Invest.* 99: 178-184.
- Heinrich J und Wichmann HE (2004) Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 4:341-8.
- Henocq E und Vargaftig BB (1988) Skin eosinophilia in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 81: 691-695.
- Hirota R, Akimaru K, Nakamura H (2008) In vitro toxicity evaluation of diesel exhaust particles on human eosinophilic cell. *Toxicol In Vitro.* 22: 988-994.
- Hoekstra FA und Bruinsma J (1975) Respiration and vitality of binucleat and trinucleat pollen. *Physiol Plant.* 34: 221-225.
- Hoffmann C (2000) Mit Eosinophilen assoziierte atopische Krankheitsbilder: Die Rolle des eosinophilen Granulozyten. Atopische Dermatitis In: *Der eosinophile Granulozyt : eine potente Effektorzelle atopischer und anderer dermatologischer Erkrankungen.* Dissertation an der Medizinischen Universität zu Lübeck, 29-33.
- Hogan S (2007) Recent Advantages in Eosinophil Biology. *Int Arch Allergy Immunol* 143 (suppl 1): 3-14.

- Holgate ST, Sandstrom T, Frew AJ, Stenfors N, Nordenhall C, Salvi S, Blomberg A, Helleday R und Soderberg M (2003) Health effects of acute exposure to air pollution. Part I: Healthy and asthmatic subjects exposed to diesel exhaust. *Resp Health Eff Inst.* 112: 1-30.
- Horiuchi T und Weller PF (1997) Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin 5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 17: 70-77.
- Horie S, Gleich GJ und Kita H (1996) Cytokines directly induce degranulation and superoxide production from human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 98: 371-381.
- Horn BR, Robun ED, Theodore J und van Kessel A (1975) Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N Engl J Med.* 292: 1152-1155.
- Hoshino M und Nakamura Y (1997) Relationship between activated eosinophils of the bronchial mucosa and serum eosinophil cationic protein in atopic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 112: 59-64.
- ICRP Publication 66 (1994) Human respiratory tract model for radiological protection. *Ann ICRP.* 24: 301-413.
- Ingley E und Young IG (1991) Characterization of a receptor for interleukin-5 on human eosinophils and the myeloid leukemia line HL-60. *Blood.* 78: 339-344.
- Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y und Kushibiki E. (1987) Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy.* 58: 265-270.
- Iwana T, Nagai H, Suda H, Tsurvoka N und Koda A (1992) Effect of murine recombinant interleukin-5 on the cell population in guinea pig airways. *Br J Pharmacol.* 105: 19-22.
- Jakob T, Traidl-Hoffmann C und Behrendt H (2002) Dendritic cells—the link between innate and adaptive immunity in allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2 (2): 93-5.
- Jakobs RR (1997) Endotoxins in the environment. *Int J Occup Environ Health.* 3: 3-5.
- Kaatz M, Berod L, Czech W, Idzko M, Lagadari M, Bauer A und Norgauer J (2004) Interleukin-5, interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prime actin-polymerization in human eosinophils: a study with hypodense and normodense eosinophils from patients with atopic dermatitis. *Int J Mol Med.* 14 (6): 1055-60.
- Kaplan AP (2001) Chemokines, Chemokine Rezeptor and Allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 124: 423-431.
- Kasche A (2002) Wechselwirkungen zwischen Birkenpollen und humanen polymorphnukleären Granulozyten von Atopikern und Normalpersonen: Bedeutung für die Initialphase der allergischen Entzündung. Dissertation an der Technischen Universität München.
- Kimata H (2004) Exposure to road traffic enhances allergic skin wheal responses and increases plasma neuropeptides and neurotrophins in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome. *Int J Hyg Environ Health.* 207 (1): 45-9.
- Kim JT, Schimming AW und Kita H (1999) Ligation of Fc gamma RII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils. *J Immunol* 162: 4253-4249.
- Kim CS, Hu SC, De Witt P und Gerrity TR (1996) Assessment of regional deposition of inhaled particles in human lungs by serial bolus delivery method. *J Appl Physiol.* 81: 2203-2213.
- Kim CS, Lewars GA und Sackner MA (1988) Measurement of total lung aerosol deposition as an index of lung abnormality. *J Appl Physiol.* 64: 1527-1536.
- Kishimoto S, Shimadzu W, Izumi T, Shimizu T, Fukuda T, Makino S, Sugiura T und Waku K (1996) Regulation by IL-5 of expression of functional platelet-activating factor receptors on human eosinophils. *J Immunol.* 157: 4126-4132.
- Kita H und Gleich GJ (1996) Chemokines active on eosinophils: Potential roles in allergic inflammation. *J Exp Med.* 183: 2421-2426.

- Kita H, Oshini T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS und Gleich GJ (1991). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med.* 174: 745-748.
- Kita H, Kancko M, Bartemes KR, Weiler DA, Schimming AW, Reed CE und Gleich GJ (1999) Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy? *J Immunol.* 162: 6901-6911.
- Kohlhäufel M (1998) Übersichtsbeiträge - Aerosolpartikel und Lunge: Grundlagen von Deposition und Clearance. *Umweltmed Forsch Prax, Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co.KG, Deutschland-86899 Landsberg*, 3 (2) 90-93.
- Kopp EB und Medzhitov R (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11 (1): 13-18.
- Krahlich D (2007) *Lobbyismus in Deutschland - Am Beispiel des Dieselpartikelfilters*, VDM Verlag Dr. Müller, Saarbrücken, ISBN 978-3-8364-2316-8
- Krämer U, Koch T, Ranft U, Ring J und Behrendt H (2000) Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology.* 11(1): 64-70.
- Kroegel C und Matthys H (1992) Mit dem Eosinophilen assoziierte Erkrankungen. *Arzneimitteltherapie.* 10: 140-151.
- Kroegel C und Matthys H (1993) Platelet activating factor-induced human eosinophil activation. Generation and release of cyclooxygenase metabolites in human blood eosinophils from asthmatics. *Immunology.* 78: 279-285.
- Kroegel C, Yukawa T, Dent G, Venge P, Chung KF und Barnes PJ (1989) Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet activating factor. *J Immunol.* 142: 3518-3526.
- Kroegel C, Luttmann W, Zeck-Kapp G, Matthys H, Kapp A und Virchow JC (1994) Zellbiologie und Funktion des eosinophilen Granulozyten im Rahmen der immunologischen Entzündung. *Immun Infekt.* 22: 104-113.
- Lacy P, Weller P und Moqbel R (2001) A report from the International Eosinophil Society: Eosinophils in a tug of war. *J Allergy Clin Immunol.* 108: 895-900.
- La Force C (1999) Use of nasal steroids in managing allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 103: 388-394.
- Leckie MJ, Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ und Barnes PJ (2000) Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* 356: 2144-2148.
- Leiferman KM (1991) A current perspective on the role of eosinophils in dermatologic diseases. *J Am Acad Dermatol.* 24: 1101- 1112.
- Leiferman KM, Ackerman SJ, Sampson HA, Haugen HS, Venengie PY und Gleich GJ (1985) Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 313: 282-285.
- Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DTW, Cruikshank WW, Korngeld H, Center DM und Weller PF (1996) Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants – IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol.* 156: 2566-2570.
- Lippmann M, Albert RE und Peterson HT (1971) The regional deposition of inhaled aerosols in man. In: Walton EH (ed) *Inhaled particles III*, Unwin, London, GB, 105-120.
- Liu BJ, Zheng MR, Zhang SZ und Dai FP (1994) **Effects of antipsoriatic drugs on biosynthesis of platelet activating factor by human keratinocytes.** *Chin Med J* 107: 326-31.
- Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG und Vadas MA (1988) Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med.* 167: 219-224.
- Lopez AF, Vadas MA, Woodcock JM, Milton SE, Lewis A, Elliott MJ, Gillis D, Ireland R, Olwell E und Park LS (1991) Interleukin-5, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J Biol Chem.* 266: 24741-24747.

- Luttmann W, Knoechel B, Foerster M, Matthys H, Virchow Jr. JC und Kroegel C (1996) Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability. *J Immunol.* 157: 1678-1683.
- Mackay CR (1996) Chemokine receptors and T cell chemotaxis. *J Exp Med.* 184(3): 799-802.
- Maier KL, Alessandrini F, Beck-Speier I, Hofer TP, Diabaté S, Bitterle E, Stöger T, Jakob T, Behrendt H, Horsch M, Beckers J, Ziensenis A, Hültner L, Frankenberger M, Krauss-Etschmann S, Schultz H (2008) Health effects of ambient particulate matter—biological mechanisms and inflammatory responses to in vitro and in vivo particle exposures. *Inhal Toxicol.* 20:319-37.
- Martin LD, Krunkosky TM, Dye JA, Fischer BM, Jiang NF, Rochelle LG et al. (1997) The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ Health Perspect.* 5: 1301-1307.
- Mattoli S, Stacey MA, Sun G, Bellini A und Marini M (1997) Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 299-301.
- Mauderly JL, Snipes MB, Barr EB, Belinsky SA, Bond JA, Brooks AL, Chang LY, Cheng YS, Gillett NA, Griffith WC, Henderson RF, Mitchell CE, Nikula KL und Thomassen DG (1994) Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats, part I, neoplastic and nonneoplastic lung lesions. Research Report Number 68, Cambridge, MA, USA: Health Effects Institute, Flagship Press.
- Mauderly JL (1996) Lung overload: The dilemma and opportunities for resolution. *Inhal Toxicol.* 8: 1-28.
- Melani C, Mattia GF, Silvani A, Care A, Rivoltini L, Parmiani G und Colombo MP (1993) Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood.* 81: 2744-2749.
- Mersch-Sundermann V und Haße A (1997) Kap. V Emissionen/Immisionen, 27 Straßenverkehr. In: „Grundlagen der Umweltmedizin, klinische Umweltmedizin, ökologische Medizin“, Mersch-Sundermann V, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 303.
- Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S und Di Rago L (1996) Role of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood.* 88: 3755-3764.
- Michel O, Duchateau J und Sergysels R (1989) Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J App Physiol.* 66: 1059-1064.
- Michel O, Ginanni R, Duchateau J, Vertongen F, Le Bon B und Sergysels R (1991) Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy.* 21: 441-448.
- Michel O, Ginanni R, Le Bon B, Content J, Duchateau J und Sergysels R (1992) Inflammatory response to acute inhalation of endotoxin in asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis.* 146: 352-357.
- Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Lim HB und Sagai M (1998) Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 102(5): 805-12.
- Monteiro RC, Hostoffer RW, Cooper MD, Bonner JR, Gartland GL und Kubagawa H (1993) Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J Clin Invest.* 92: 1681-1685.
- Morgenstern V, Zutavern A, Cyrus J, Brockow I, Koletzko S, Krämer U, Behrendt H, Herbarth O, von Berg A, Bauer CP, Wichmann HE, Heinrich J; GINI Study Group; LISA Study Group (2008) Atopic diseases, allergic sensitizations, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 177: 1331-7.
- Moqbel R, Levi-Schaffer F und Kay AB (1994) Cytokine generation by eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 94: 1183-1188.
- Moqbel R, Ying S, Barkans J, Newman TM, Kimmitt P, Wakelin M, Taborda-Barata L, Meng Q, Corrigan CJ und Durham SR (1995) Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of translated product. *J Immunol.* 155: 4939-4947.

- Morita E, Schröder JM und Christophers E (1990) Identification of a novel and highly potent eosinophil chemotactic lipid in human eosinophils treated with arachidonic acid. *J Immunol.* 144: 1893-1900.
- Mousli M, Hugli TE, Landry Y und Bronner C (1994) Peptidergic pathway in human skin and rat peritoneal mast cell activation. *Immunopharmacology.* 27: 1-11.
- Muessel MJ, Scott KS, Friedl P, Bradding P und Wardlaw AJ (2008). CCL11 and GM-CSF differentially use the Rho GTPase pathway to regulate motility of human eosinophils in a three-dimensional microenvironment. *J Immunol* 180: 8354-60.
- Munitz A, Bachelet I, Eliashar R, Moretta A, Moretta L und Levi-Schaffer F (2006) The inhibitory receptor IRp60 (CD300a) suppresses the effects of IL-5, GM-CSF, and eotaxin on human peripheral blood eosinophils. *Blood* 107: 1996-2003.
- Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Ikomori R et al. (1986) Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin. Immunol.* 77, 616-623.
- MURL (1998) Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes NRW, Richtlinie 1998.
- Muzio M, Poltarutti N, Bosisio D, Prahlanan MK und Mantovani A (2000). Toll like receptor family (TLT) and signalling pathway. *Eur Cytokine Netw.* 11 (3): 489-90.
- Naclerio R (1999) Clinical manifestations of the release of histamine and other inflammatory mediators. *J Allergy Clin Immunol.* 103: 382-385.
- Nakajima H, Gleich GJ und Kita H (1996) Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils. *J Immunol.* 156: 4859-4866.
- Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T und Saxon A. (1998) Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin. Immunol.* 102, 539-554.
- Nikasinovic L, Momas I und Just J (2004) A review of experimental studies on diesel exhaust particles and nasal epithelium alterations. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 7(2): 81-104.
- Nikasinovic L, Just J, Sahraoui F, Seta N, Grimfeld und Momas I (2006) Nasal inflammation and personal exposure to fine particles PM_{2,5} in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1382-88.
- Nishikawa K, Morii T, Ako H, Hamada K, Saito S und Narita N (1992) In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 90: 169-174.
- Ohno I, Lea R, Finotto S, Marshall J, Denburg J, Dolovich J, Gauldie J und Jordana M (1991) Granulocyte/macrophage colony-stimulation factor (GM-CSF) gene expression by eosinophils in nasal polyposis. *Am J Respir Cell Moll Biol.* 5: 505-510.
- Ohno I, Lea R, Flanders KC, Clark DA, Banwatt D, Dolovich J, Gauldie J und Jordana M (1992) Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor beta 1 gene (TGF beta 1). *J Clin Invest.* 89: 1662-1668.
- Oldhoff JM, Darsow U, Werfel T, Katzer K, Wulf A, Laifaoui J, Hijnen DJ, Plötz S, Knol EF, Kapp A, Bruijnzeel-Koomen CA, Ring J und de Bruin-Weller MS (2005) Anti-IL-5 recombinant humanized monoclonal antibody (mepolizumab) for the treatment of atopic dermatitis. *Allergy.* 60 (5): 693-6.
- Ono-Ogasawara M und Smith TJ (2004) Diesel exhaust particles in the work environment and their analysis. *Ind Health.* 42(4): 389-399.
- Pastore S, Fanales-Belasino E, Albanesi C, Chinni LM, Giannetti A und Girolomoni G (1997) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J Clin Invest.* 99 (12): 3009-17.

- Pastore S, Giustizieri ML, Mascia F, Giannetti A, Kaushansky K und Girolomoni G (2000) Dysregulated activation of activator protein 1 in keratinocytes of atopic dermatitis patients with enhanced expression of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor. *J Invest Dermatol.* 115 (6): 1134-43.
- Pauwels RA, Kips JC, Peleman RA und van der Straeten ME (1990) The effect of endotoxin inhalation on airway responsiveness and cellular influx in rats. *Am Rev Respir Dis.* 141: 540-545.
- Peters A, Schulz H, Kreyling WG und Wichmann HE (1998) Staub und Staubinhaltsstoffe/Feine und Ultrafeine Partikel. In: „Handbuch Umweltmedizin“ Wichmann, Schlipkötter, Fülgraff, Ecomed Medizin Verlag, München 14. Erg. Lfg. 10/98, 1-22.
- Peters A., Wichmann H E, Tuch T, Heinrich J und Heyder J (1997) Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 155: 1376-1383.
- Peterson CGB, Jöntvall H und Venge P (1988) Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. *Eur J Haematol.* 40: 415-423.
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Dolovich J und Hargreave FE (1997) Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol.* 99: 539-544.
- Pivarsci A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Szell M, Beer Z, Bata-Csorgoo Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozy A und Kemeny L (2003) Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol.* 15 (6): 721, 30.
- Plötz SG, Traidl-Hoffmann C, Feussner I, Kasche A, Feser A, Ring J, Jakob T und Behrendt H (2004) Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators. *J Allergy Clin Immunol.* 113(6): 1152-1160.
- Plötz SG (2002) Expression von TLR2 und TLR4 durch humane eosinophile Granulozyten. In: Endogene und exogene Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und die Bedeutung für hypereosinophile Erkrankungen. Habilitationsarbeit an der Technischen Universität München, 69.
- Plötz SG, Behrendt H, Lentschat A, Hamann L, Ring J, Rietschel ET, Flad HD und Ulmer A (2001) The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharid is CD 14 dependent. *Blood.* 97: 235-241.
- Plötz SG, Simon HU, Darsow U, Simon D, Vassina E, Yousefi S, Hein R, Smith T, Behrendt H und Ring J (2003) Use of an Anti-Interleukin-5 Antibody in the Hypereosinophilic Syndrome with Eosinophilic Dermatitis. *New Eng J Med.* 349: 2334-2339.
- Powell WS, Gravel S und Halwani F (1999) 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent stimulator of L-selectin shedding, surface expression of CD11b, actin polymerization, and calcium mobilization in human eosinophils. *Am J Resp Cell Molec Biol.* 20: 163-170.
- Powell WS, Ahmed S, Gravel S und Rokach J (2001) Eotaxin and Rantes enhance 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced eosinophil chemotaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 107: 272-278.
- Pye S, Watkiss P (2005) CAFÉ CBA: Baseline Analysis 2000 to 2020. AEAT/ED51014/Baseline Issue 2.
- Riedl M und Diaz-Sanchez D (2005) Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol.* 115 (2): 221-8.
- Rietschel ET und Brade H (1992) Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 267(2): 54-61.
- Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schoenbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S und Schumann RR (1996) Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol.* 216: 39-41.
- Ring J, Kunz B, Bieber T, Vieluf D und Przybilla B (1989) The “atopy patch test” with aeroallergens in atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 82: 195 (abstract).

- Ring J (1995) Pathomechanismen allergischer Reaktionen. IgE und Atopie. In: „Angewandte Allergologie“, Ring J. (Hrsg.), MMW Taschenbuch, München.
- Ring J, Darsow U und Behrendt H (2001) Atopic eczema and allergy. *Curr Allergy*. 1(1): 39-43.
- Ring J (2004) Kap. 5.5.3 Atopisches Ekzem. pp 215 In: Johannes Ring (Hrsg.) *Angewandte Allergologie*, Verlag Urban & Vogel Medien und Medizin, 3. Auflage.
- Ring J, Krämer H, Schäfer T, Abeck D, Vieluf D und Behrendt H (1999) Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany. In *Arch Allergy Immunol*. 118 (2-4): 403-7.
- Risse U, Friedrichs KH und Behrendt H (1999) Kap. 19 Partikuläre Luftinhaltsstoffe (Aerosole) pp 227-233. In: Mersch-Sundermann (Hrsg.) *Umweltmedizin*, Thieme-Verlag, 1. Auflage.
- Rosenthal S und Tager IB (1975) Prevalence of Gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. *Ann Intern Med*. 83: 355-357.
- Rossi AG, Haslett C, Hirani N, Greening AP, Rahman I, Metz CN, Bucala R und Donnelly SC (1998) Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest*. 101: 2869-2874.
- Rothenberg ME (1998) Eosinophilia. *New Engl J Med*. 338: 1592-1600.
- Sabroe I, Hartnell A, Jopling LA, Bel S, Ponath PD, Pease JE, Collins PD und Williams TJ (1999) Differential regulation of eosinophil chemokine signaling via CCR3 and non-CCR3 pathways. *J Immunol*. 162: 2946-2955.
- Sanderson CJ (1992) Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*. 79: 3101-3109.
- Sano H, Munoz NM, Sano A, Zhu X, Herrnreiter A, Choi J und Leff AR (1999) Upregulated surface expression of intracellularly sequestered Igepsilon receptors (FcepsilonRII/CD23) following activation in human peripheral blood eosinophils. *Proc Assoc Am Physicans*. 111: 82-91.
- Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newmann W, Luscinikas FW, Gimbrone MA, Jr., McIntyre BW et al. (1992) IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol*. 148: 1086-1092.
- Schober W, Lubitz S, Belloni B, Gebauer G, Lintelmann J, Matuschek G, Weichenmeier I, Eberlein-König B, Buters J, Behrendt H (2007) Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enhance allergic inflammation by acting on human basophils. *Inhal Toxicol*. 19 Suppl 1: 151-6.
- Schober W, Belloni B, Lubitz S, Eberlein-König B, Bohn P, Saritas Y, Lintelmann J, Matuschek G, Behrendt H, Buters J (2006) Organix extracts of urban aerosol ($\leq PM_{2.5}$) enhance rBet v 1-induced upregulation of CD63 in basophils from birch pollen-allergic individuals. *Toxicol Sci*. 90:377-84.
- Schwartz J (1994) Air Pollution and Daily Mortality: A Review and Metaanalysis. *Environmental Research Bd*. 64, 36-52.
- Schwenk U, Morita E, Engel R und Schröder JM (1992) Identification of 5-oxo-15-hydroxy 6,8,11,13-eicosatetraenoic acid (5-oxo-15-HETE) as a novel and potent human eosinophil chemotactic eicosanoid. *J Biol Chem*. 267: 12482-12488.
- Schwenk U und Schröder JM (1995) 5-Oxo-eicosanoids are potent eosinophil chemotactic factors. *J Biol Chem*. 270: 15029-15036.
- Seminario MC, Saini SS, MacGlashan DW Jr. und Bochner BS (1999) Intracellular expression and release of FcepsilonRIalpha by human eosinophils. *J Immunol*. 162: 6893-6900.
- Sihra BS, Kon OM, Grant JA und Kay AB (1997) Expression of high-affinity IgE receptors (Fcepsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol*. 99: 699-706.
- Simon HU (1997) Molecular mechanisms of defective eosinophil apoptosis in diseases associated with eosinophilia. *Int Arch Allergy Immunol*. 113: 206-208.

- Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C und Blaser K (1997) Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol.* 158: 3902-3908.
- Simon HU, Weber M, Becker E, Zilbermann J, Blaser K und Levi-Schaffner F (2000) Eosinophils maintain their capacity to signal and release eosinophil cationic protein (ECP) upon repetitive stimulation with the same agonist. *J Immunol.* 165: 4065-4075.
- Simon HU, Plötz SG, Dummer R und Blaser K (2001) Clinical and immunological features of patients with interleukin-5 producing T cell clones and eosinophilia. *Int Arch Allergy Immunol.* 124: 242-245.
- Spry CFJ (1988) *Eosinophils. A comprehensive review and guide to the scientific and medical literature.* Oxford University Press. Oxford-New York-Tokyo.
- SRU (2000) Rat von Sachverständigen für Umweltfragen, Umweltgutachten 2000.
- Sueddeutsche Zeitung (2005) „Es gibt keinen Grund, sich für Rot-Grün zu schämen“, SZ-Interview mit Joschka Fischer, Online-Ausgabe: 29.05.2005.
- Suzuki S und Kanoh T (1993) The adjuvancy activity of pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production in mice. *Jpn. J. Allergol.* 42: 963-968.
- Symon FA, Walsh GM, Watson SR und Wartlaw AJ (1994) Eosinophil adhesion of nasal polyp endothelium is P-selectin-dependent. *J Exp Med.* 180: 371-376.
- Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K und Sagai M (1997) Diesel Exhaust Particles Enhance Antigen-induced Airway Inflammation and Local Cytokine Expression in Mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 156, 36-42.
- Takano H, Ichinose T, Miyabara Y, Shibuya T, Lim HB, Yoshikawa T und Sagai M (1998) Inhalation of diesel exhaust enhances allergen-related eosinophil recruitment and airway hyperresponsiveness in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 150 (2): 328-37.
- Takafuji S, Bischoff SC, De Weck AL und Dahinden CA (1991) IL-3 and IL-5 prime normal human eosinophils to produce leukotriene C4 in response to soluble agonists. *J Immunol.* 147: 3855-3861.
- Teixeira MM, Al-Rashed S, Rossi AG und Hellewell PG (1997) Characterization of the prostanoid receptors mediating inhibition of PAF-induced aggregation of guinea-pig eosinophils. *Br J Pharmacol.* 121: 77-82.
- Teixeira MM, Wells TN, Lukacs NW, Proudfoot AE, Kunkel SL, Williams TJ und Hellewell PG (1997) Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. *J Clin Invest.* 100: 1657-1666.
- Terada N, Maesako K, Hirudima K, Hamano N, Houki G, Konno A, Ikeda T und Sai M (1997) Diesel exhaust particulates enhance eosinophil adhesion to nasal epithelial cells and cause degranulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 114 (2): 167-174.
- Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Jacob T, Huger M, Plötz S, Feussner I, Ring J und Behrendt H (2002) Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 109 (5): 831-8.
- Traidl-Hoffmann C, Mariani V, Hochrein H, Karg K, Wagner H, Ring J, Mueller MJ, Jacob T und Behrendt H (2005) Pollen-associated phytoprostanoids inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med.* 201 (4): 627-36.
- Ugucioni M, Mackay CA, Ochensberger B, Loetscher P, Rihs S, LaRosa GJ, Rao P, Ponath PD, Baggiolini M und Dahinden CA (1997) High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, mep-4, and other chemokines. *J Clin Invest.* 100: 1137-1143.
- Umweltbundesamt (2003) Entwicklung der Schadstoffemissionen des Straßenverkehrs In: Future Diesel, Abgasgesetzgebung Pkw, leichte Kfz und Lkw-Fortschreibung der Grenzwerte bei Dieselfahrzeugen. Berlin 3.7: 33-37.

- Ulmer AJ, Feist W, Heine H, Kirikae T, Kirikae F, Kusumoto S, Kusama T, Brade H, Schade U und Rietschel ET (1992) Modulation of endotoxin-induced monokine release in human monocytes by lipid a partial structures that inhibit binding of 125I-lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 60: 5145-5152.
- Ushio H, Nohara K und Fujimaki H (1999) Effect of environmental pollutants on the production of pro-inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes. *Tox Letters.* 105: 17-24.
- Van Cauwenberge P, Watelet JB, Verhoye C, Wang D und Bachert C (1999) The clinical expression of allergy in the nose. *Allergy.* 54: 93-102.
- Van der Bruggen T, Kok PT, Raaijmakers JA, Verhoeven AJ, Kessels RG, Lammers JW und Koen-Dermann L (1993) Cytokine priming of the respiratory burst in human eosinophils is Ca²⁺ independent and accompanied by induction of tyrosine kinase activity. *J Leukocyte Biol.* 53: 347-353.
- Van Riper G, Nicholson DW, Scheid MP, Fischer PA, Springer MS und Rosen H (1994) Induction, characterization and functional coupling of the high-affinity chemokine receptor for RANTES and macrophage inflammatory protein-1 α upon differentiation of an eosinophilic HL-69 cell line. *J Immunol.* 152: 4055-4061.
- Venge P und Hakansson L (1991) Current understanding of the role of the eosinophil granulocyte in Asthma. *Clin Exp Allergy.* 21 (3): 31-37.
- Venkataraman C, Negi G, Sardar SB und Rastogi R (2002) Size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol emissions from biofuel combustion. *Journal of Aerosol Science.* 33: 503-518.
- Walsh GM, Mermod JJ, Hartnell A, Kay AB und Wardlaw AJ (1991) Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1-stimulated human umbilical vascular endothelial cells is alpha 4 beta 1 (very late antigen-4) dependent. *J Immunol.* 146: 3419-3423.
- Warren HS, Kinnear BF, Phillips JH und Lanier LL (1995) Production of IL-5 by human NK-cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol.* 154: 5144-5152.
- Warringa RA, Schweizer RC, Maikoe T, Kuijper PH, Bruijnzeel PL und Koendermann L (1992) Modulation of eosinophil chemotaxis by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 631-636.
- Weller PF (1994) Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol.* 6: 85-91.
- Weller PF (1997) Human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 100: 283-287.
- Weerda H (1989) Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Enke Verlag, Stuttgart, 1.Auflage, 88ff.
- Wichmann HE (2007) Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol.* 19 Suppl 1:241-4.
- Wichmann HE, Heinrich J und Peters A (2002) Wirkungen von Feinstaub. Ecomed Verlag Landsberg.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ und Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 249: 1431-1433.
- Wright SD, Ramos SA, Hermanowski-Vosatka A, Rockwell P und Detmers PA (1993) Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J Exp Med.* 173: 1281-1286.
- Wright ED, Christodoulopoulos P, Small P, Fienkiel S und Hamid Q (1999) Th-2 type cytokine receptors in allergic rhinitis and in response to topical steroids. *Laryngoscope.* 109: 551-556.
- Yamada H, Matsukura M, Yodate T, Chihara J, Stingl G und Tezuka T (1997) Enhanced production of RANTES, an eosinophil chemoattractant factor, by cytokine-stimulated epidermal keratinocytes. *Int Arch Allergy Immunol.* 114 (1): 28-32.
- Yang HM, Barger MW, Castranova V, Ma JK, Yang JJ und Ma JY (1999) Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J Toxicol Environ Health A.* 58 (5): 261-278.

Yoshino S und Masaru S (1999) Induction of systemic Th1 and Th2 immune response by oral administration of soluble antigen and diesel exhaust particles. *Cellular Immunology*. 192: 72-78.

Yue W, Schneider A, Stölzel M, Rückerl R, Cyrys J, Pan X, Zareba W, Koenig W, Wichmann HE, Peters A (2007) Ambient source-specific particles are associated with prolonged repolarization and increased levels of inflammation in male coronary artery disease patients. *Mutat Res*. 621 (1-2): 50-60.

Zwirner J, Fayyazi A und Götze O (1999) Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells. *Mol Immunol* 36: 877-884.

9 Danksagung

Frau Professor Dr. med. H. Behrendt, Leiterin des Zentrums Allergie und Umwelt an der technischen Universität München, danke ich für die Überlassung dieses Themas und ihre zuverlässige, engagierte und konstruktive Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. med. Sabine Plötz möchte ich für die zeitintensive, vorbildliche Unterstützung während der Forschungsarbeiten und das über Jahre hinweg gezeigte Interesse am Entstehen der vorliegenden Arbeit danken.

Herrn Dr. W. Kreyling aus dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit München, Leiter des Projektfeldes „Gesundheitsrelevanz von Aerosolen“, danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Bereitstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rußpartikel.

Weiterhin möchte ich meinem dermatologischem Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Ring, für das gezeigte Interesse an dieser umweltmedizinischen Forschungsarbeit danken. Darüber hinaus ein besonderes Dankeschön an Frau PD Dr. med. C. Traidl-Hoffmann für die Möglichkeit und Hinführung zur eigenständigen Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen in ihrer Laborgruppe.

Für die Mithilfe bei der statistischen Auswertung danke ich herzlichst Frau PD Dr. med. U. Krämer.

Ein Dankeschön auch an die medizinisch-technischen Assistentinnen, besonders an Frau Johanna Grosch (Allergielabor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TUM) für die Mithilfe bei der Auswertung der ECP-Messwerte, an Frau Martha Grünefeld-Ruchholz und Frau Gabi Pleyl-Wisgickl (Zentrum Allergie und Umwelt) für die Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung während meiner Labortätigkeit, und an Frau Ingrid Weichenmeier und Frau Christine Weil für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Zellaufnahmen.

Ich danke meinem Freund, Matthias Beck, für die professionelle tatkräftige Hilfe bezüglich der Fertigstellung und Lösung technischer Probleme während des Schreibens dieser Dissertation.

Am Ende möchte ich hier meinen Eltern für die vielfältige Unterstützung während der gesamten Studienzeit und darüber hinaus ganz herzlich danken.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Vorname: Alexandra Barbara Alice
Name: Feser
Geburtsdatum/ort: 07. April 1978, Nürnberg, Deutschland
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch



Schulbildung

09/84- 07/88 Georg- Ledebour- Grundschule, Nürnberg
09/88- 06/97 Melanchthon- Gymnasium, Nürnberg
Latinum und Graecum

Studium

11/97- 04/04 Humanmedizinstudium an der Technischen Universität, München
20. 08. 1999 Physikum
29.08.2000 Erstes Staatsexamen
21.03.2003 Zweites Staatsexamen
22.04.2004 Drittes Staatsexamen

09/2002 Teilnahme an einer 14-tägigen Auslandsexkursion „ Internationale
Gesundheitssysteme“ im Rahmen des MBA-Postgraduierten-Studiums
„Betriebswirtschaft für Ärztinnen und Ärzte“ an der FH Neu-Ulm
03/00-08/01 Zusatzausbildung im Bereich Tropenmedizin an der Technischen Universität München

Berufliche Tätigkeit

09/97- 10/97 Pflegepraktikum an der Rehabilitationsfachklinik Herzogenaurach/Bayern
03/98- 04/98 Pflegepraktikum an der Rehabilitationsfachklinik Herzogenaurach/Bayern

03/00- 04/00 Famulatur an der Klinik für Dermatologie und Allergologie Davos
(Alexanderhausklinik) in Davos, Schweiz
09/00- 10/00 Famulatur in der Arztpraxis von Dr. med. Franz Vogel, Dermatologe und Allergologe in
Nürnberg
09/01- 10/01 Famulatur in Anästhesie, Gynäkologie und Innere Medizin am
“Hospital Generali y Clinico de Tenerife”, Canarische Inseln, Spanien
08/02-09/02 Famulatur in Dermatologie und Allergologie an der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie und Allergologie am Biederstein in München

04/03-08/03 Praktisches Jahr, erstes Tertial in Dermatologie an der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie und Allergologie am Biederstein in München
08/03-03/04 Praktisches Jahr, 2. Tertial Innere Medizin und 3. Tertial Chirurgie am „Kilimanjaro
Christian Medical Center“ in Moshi, Tanzania

07/04-jetzt Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin an der Universitätsklinik Erlangen,
Fachbereich Dermatologie

II Anhang

Ad 4.1 Verwendete Partikel

- Certificate of Analysis, SRM 1650a Diesel Particulate Matter, NIST, Gaithersburg, MD (07 November 2000).

- Sicherheitsdatenblatt Printex 90, Degussa, 01.02.2002, 1-8. Im Internet bei „Fa. Degussa“ abrufbar. <http://www.degussa.de/degussa/de/produkte/produktdatenbank/default.htm?action=details&page=3&pid=121747&mno=25> , zuletzt abgerufen am 11.07.2008

- Sicherheitsdatenblatt Printex G, Degussa, 01.02.2002, 1-8. Im Internet bei „Fa. Degussa“ abrufbar. <http://www.degussa.de/degussa/de/produkte/produktdatenbank/default.htm?action=details&page=4&pid=121758&mno=35> , zuletzt abgerufen am 11.07.2008

Ad 4.4 Isolierung und Anreicherung peripherer eosinophiler Granulozyten:

MACS-Puffer: Zu 500 ml Dulbecco- PBS, ohne Calcium und Magnesium (Firma Gibco), wurden 2 ml 5M EDTA (2 mM) und 0,5% BSA (2,5 g) hinzugegeben. Danach wurde das Gemisch steril filtriert und, für die Verwendung in der CS-Säule, im Ultraschallbad bei offenem Deckel 30 min entgast.

Standardmedium: Zu 500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin (Firma Gibco) wurden 5,6 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 5,6 ml Natrium Pyruvat und 0,5% BSA (2,5 g) hinzugegeben. Daraufhin wurde das Medium bei 0,2 µm Porengröße steril filtriert und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Ad 4.5 Kultivierung von primären humanen Keratinozyten:

KP₀ = Keratinozyten, welche frisch aus dem Vorhautmaterial von männlichen Säuglingen gewonnen wurden

KP₁= Keratinozyten, welche nach frischer Gewinnung aus Vorhautmaterial einmal bei -180°C eingefroren und für den Versuchsansatz wieder aufgetaut wurden

Isolierung von Keratinozyten aus Vorhäuten:

1. Biopsie-Transportmedium:

400 ml DMEM (Gibco 22320-022)
+ 100 ml FCS
+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco 15140-114)
Aliquotierung in 50 ml Falcon-Tubes a 10 ml.
Aufbewahrung bei -4°C.

2. Antibiotika-Antimycotica:

Lösung I: 500 ml MEM (Gibco 32360-026)
+ 15 ml Gentamycin (Gibco 15710-049)
+ 20 ml Antibiotic-Antimycoticsolution (Gibco 15240-062)
Lösung II: 250 ml Lösung I + 250 ml MEM
Lösung III: 250 ml MEM + 2, 5 ml Antibiotic-Antimycoticsolution
Aliquotierung in 15 ml Falcon-Tubes a 10 ml. Aufbewahrung bei -20°C.

3. Dispase:

Gebrauchslösung 2 U/ml (Gibco 17105-041) in DPBS
Aliquotierung in 15 ml Falcon-Tubes a 10 ml.
Aufbewahrung bei -20°C.

4. DPBS (w/o Ca and Mg) Waschlösung (Gibco 14190-094)

5. Trypsin-EDTA (Gibco 25300-054)

6. Primärkeratinozytenmedium: 500 ml K-SF (Gibco 17005-034)
 + 2,5 µg Supplement EGF (Gibco 37000-015)
 + Rinderhypophysenextrakt (Gibco 3700-015) ½ Röhrchen
 + 5 ml Penicillin/Streptomycin
 Sterilfiltration mittels Nalgen Filtrationseinheit 0,2 µm

7. Primärfibroblastenmedium = Biopsie-Transportmedium (siehe oben)

8. Keratinozytenmedium: Keratinocyte Basal Medium 2 (Firma promo cell Cat.No.C-20211)

Ad 4.9.1 Herstellung der Zytopräparate und Färbung nach Pappenheim:

Färbung nach Pappenheim:

- | | | |
|--|-----------|--------|
| a) May- Grünwald (Merck 1.01424.0500, Darmstadt) | Küvette 1 | 3 min |
| b) Aqua bidest. | Küvette 2 | 20 s |
| c) Aqua bidest. | Küvette 3 | 1 min |
| d) Giemsa (Merk 1.09204) (1:20 mit Weise'scher Pufferlösung) | Küvette 4 | 15 min |
| e) Objektträger gründlich mit Leitungswasser abspülen | | |
| f) Aqua bidest. | Küvette 2 | 30 s |
| g) Objektträger schrägstehend luftrocknen lassen | | |

Weise'sche Pufferlösung: Kalium-di-hydrogenphosphat 0,49g + di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H₂O
 1,14g + gereinigtes Wasser ad 100,00 g

Ad 4.10 Chemotaxisassay der Transwell-Kammersysteme

Chemotaktischer Index = Migrationsindex [MI] = migrierte Zellen des Ansatzes/ migrierte Zellen der
 Negativkontrolle

Ad 4.12 Detektion des Zelloberflächenantigens CD11b mittels durchflusszytometrischer Methoden

FACS-Puffer: 500ml Dulbecco-PBS, ohne Calcium und Magnesium (Firma Gibco), 25ml 469 FCS (5% fetal calve serum) und 100mg Natriumacid (0.02%)

Ad 5.1.2 Vitalitätsmessung an Partikel-exponierten eosinophilen Granulozyten

Abbildung 10:

Inkubation: 1x10 ⁶ Zellen/ml; 1,5h; 37°C; 5% CO ²				
Vitale Eosinophile [%], n=2				
Proband: Atopiker				
Medium	LPS 100ng/ml	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50 µg/ml
97,7	96,0	94,7	93,6	93,7
94,4	93,3	96,0	95,0	93,8

Inkubation: 16h; 37°C; 5% CO ² ;				
Vitale Eosinophile [%], n=2				
Proband: Atopiker				
Medium	LPS 100ng/ml	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
82,8	87,6	84,8	82,4	74,5
84,1	88,2	83,5	81,3	74,4

Ad 5.1.3 Einfluss von DEP, Printex G und Printex 90 auf die Migration von eosinophilen Granulozyten

Abbildung 11:

Inkubation: 1x10 ⁵ Zellen/well; 1,5h; 37°C;			
Migrationsindex: Migrierte Zellen Ansatz/Migrierte Zellen Mediumkontrolle			
Probanden: Atopiker; n=2			
	0,5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml
Diesel SRM	1,3	1,2	1,3
	0,9	1,2	1,1
Printex 90	1,1	1,2	1,2
	1,5	1	1,3
Printex G	1,3	0,8	0,9
	1,1	1,3	1,1
Eotaxin 100ng/ml	6,5		
	6,3		

Ad 5.1.4 Einfluss von DEP, Printex G und Printex 90 auf die Freisetzung von Granulaproteinen aus eosinophilen Granulozyten

ECP-Index= ECP-Ausschüttung der stimulierten Zellen/ECP-Ausschüttung Medium inkubierter Zellen

Abbildung: 12

Stimulation: 1x10 ⁶ Zellen/ml; 1,5h; 37°C;				
ECP-Ausschüttung in pg/ml ohne GM-CSF-Vorstimulation				
Probanden: Atopiker; n=3;				
	Medium	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
ED-24	11,9	12,6	16,9	28,6
ED-17	10,7	12,6	13,7	19,8
ED-4	118	118	150	122

ECP-Index:			
	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
Mittelwert	1,08	1,36	1,66
Standw.t-test oben	0,07	0,05	0,66
Standw.t-test unten	0,06	0,05	0,47

Abbildung 13:

Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C;				
Vorstimulation: 25min; 1 µg/ml GM-CSF				
ECP-Ausschüttung in pg/ml				
Probanden: Atopiker; n=4;				
	Medium	Diesel 0,5 µg/ml	Diesel 5 µg/ml	Diesel 50 µg/ml
ED-20	7,8	16,4	17,2	17,8
ED-5	257	312	358	379
ED-19	7,77	7,75	9,26	8,11
ED-18	9,21	9,35	9,42	9,53

ECP-Index:			
	Diesel 0,5 µg/ml	Diesel 5 µg/ml	Diesel 50 µg/ml
Mittelwert	1,36	1,54	1,55
Standardabw. T-Test oben	0,48	0,43	0,68
Standardabw. T-Test unten	0,35	0,34	0,48

Abbildung 14:

Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C;				
Vorstimulation: 25min; 1µg/ml GM- CSF				
ECP-Ausschüttung in pg/ml				
Probanden: Atopiker; n=3;				
	Medium	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
ED-19	7,77	12	6,32	9,14
ED-20	7,8	26,35	17,55	24,2
ED-32	146	135	159	146

ECP-Index			
	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
Mittelwert	1,7	1,26	1,55
Standardabw. T-Test oben	0,9	0,52	0,76

Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C;				
ECP-Ausschüttung in pg/ml ohne GM-CSF-Vorstimulation				
Probanden: Atopiker; n=3;				
	Medium	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
ED-24	11,90	16,80	19,91	15,81
ED-20	18,90	61,35	52,95	41,63
ED-32	14,50	14,71	101,02	124,03

ECP-Index:			
	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
Mittelwert	1,67	3,13	2,92
Standardabw. T-Test oben	0,82	1,42	2,66
Standardabw. T-Test unten	0,55	0,98	1,39

Abbildung 15:

Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C;				
Vorstimulation: 25min; 1µg/ml GM- CSF				
ECP-Ausschüttung in pg/ml				
Probanden: Atopiker; n=3;				
	Medium	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
ED-19	7,83	12	6,32	9,14
ED-20	7,84	26,35	17,55	24,2
ED-32	146	135	159	146

ECP-Index			
	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
Mittelwert	1,7	1,26	1,55
Standardabw. T-Test oben	0,9	0,52	0,76
Standardabw. T-Test unten	0,6	0,36	0,52

Abbildung 16:

Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C;				
ECP-Ausschüttung in pg/ml ohne GM-CSF-Vorstimulation				
Probanden: Atopiker; n=3;				
	Medium	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
ED-24	11,9	37,1	40,1	26,3
ED-20	18,9	60,6	37,2	53,6
ED-32	14,5	103	200	163

ECP-Index:			
	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
Mittelwert	4,17	4,47	4,17
Standardabw. T-Test oben	1,58	4,24	3,24
Standardabw. T-Test unten	1,12	2,18	1,88

Abbildung 17:

Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C;				
Vorstimulation: 25min; 1µg/ml GM- CSF				
ECP-Auschüttung in pg/ml				
Probanden: Atopiker; n=3;				
	Medium	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
ED-24	15,2	13,9	22,0	16,5
ED-20	7,8	24,3	17,7	16,3
ED-32	146	123	147	179

ECP-Index:			
	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
Mittelwert	1,34	1,49	1,41
Standardabw. T-Test oben	0,85	0,45	0,37
Standardabw. T-Test unten	0,51	0,36	0,28

Ad 5.1.5 Einfluss von Dieselrußpartikeln auf die CD11b-Aufregulierung von eosinophilen Granulozyten

Abbildung: 18

Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 2h; 37°C			
CD11b-Expression in Prozent über der Mediumkontrolle [%]			
N=2; Proband: Atopiker			
	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
Ansatz 1	6,3	23,3	22,8
Ansatz 2	5,3	7,5	18,4
Mittelwert	5,8	15,4	20,6
Standardabw.	0,5	7,9	2,2

Ad 5.2.2 Freisetzung Eosinophilen-aktivierender Mediatoren durch Partikel-stimulierte Keratinozyten

MIP-3 α Ausschüttung von stimulierten Keratinozyten; 1x10 ⁶ Zellen/ml; 48h; 37°C					
Ausschüttung in pg/ml; n=2					
Probanden: Nicht-Atopiker					
		50 μ g/ml	5 μ g/ml	0,5 μ g/ml	
Medium	8,61				
	9,63				
LPS 100ng/ml	8,34				
	10,75				
Diesel SRM		7,79	7,41	9,39	
		8,46	6,74	8,35	
Printex 90		4,64	11,39	9,79	
		6,86	6,89	10,67	
Printex G		7,09	12,79	10,78	
		4,87	8,59	7,78	

Eotaxin Ausschüttung von stimulierten Keratinozyten; 1x10 ⁶ Zellen/ml; 48h; 37°C					
Ausschüttung in pg/ml; n=2					
Probanden: Nicht-Atopiker					
		50 μ g/ml	5 μ g/ml	0,5 μ g/ml	
Medium	0,15				
	0,00				
LPS 100ng/ml	0,24				
	0,00				
Diesel SRM		0,00	0,16	1,79	
		0,00	0,00	1,52	
Printex 90		0,00	0,00	0,00	
		0,00	0,00	0,48	
Printex G		0,60	0,47	1,30	
		0,00	0,00	0,00	

RANTES Ausschüttung von stimulierten Keratinozyten; 1x10 ⁶ Zellen/ml; 48h; 37°C					
Ausschüttung in pg/ml; n=2					
Probanden: Nicht-Atopiker					
		50µg/ml	5µg/ml	0,5µg/ml	
Medium	0,00				
	0,00				
LPS 100ng/ml	0,00				
	0,00				
Diesel SRM		0,00	0,00	0,00	
		0,00	0,00	0,00	
Printex 90		0,00	14,68	0,00	
		0,00	4,67	0,00	
Printex G		0,00	8,59	0,00	
		0,00	0,00	0,00	

IL-18 Ausschüttung von stimulierten Keratinozyten; 1x10 ⁶ Zellen/ml; 48h; 37°C					
Ausschüttung in pg/ml; n=3					
Probanden: Nicht-Atopiker					
		50µg/ml	5µg/ml	0,5µg/ml	
Medium	0,00				
	32,38				
	37,32				
LPS 100ng/ml	0,00				
	0,00				
	0,00				
Diesel SRM		29,17	35,93	0,00	
		29,07	35,16	0,00	
		37,05	0,00	0,00	
Printex 90		0,00	0,00	0,00	
		0,00	0,00	0,00	
		0,00	0,00	0,00	
Printex G		0,00	0,00	0,00	
		0,00	0,00	0,00	
		0,00	0,00	0,00	

TARC Ausschüttung von stimulierten Keratinozyten; 1x10 ⁶ Zellen/ml; 48h; 37°C				
Ausschüttung in pg/ml; n=3				
Probanden: Nicht-Atopiker				
		50µg/ml	5µg/ml	0,5µg/ml
Medium	0,00			
	0,00			
	0,00			
LPS 100ng/ml	0,00			
	0,58			
	0,00			
Diesel SRM		0,00	0,39	4,16
		1,89	0,00	1,70
		0,00	0,00	0,49
Printex 90		4,59	15,45	5,26
		0,00	2,64	0,00
		0,86	3,11	0,00
Printex G		0,00	1,12	4,97
		0,00	0,00	1,96
		0,00	0,00	0,00

Abbildung 21-23:

GM-CSF Ausschüttung von stimulierten Keratinozyten				
Ausschüttung in pg/ml; Stimulation 1×10^6 Zellen/ml; 48h; 37°C				
N=4; Probanden: Nicht-Atopiker				
	Medium	Diesel SRM 0,5µg/ml	Diesel SRM 5µg/ml	Diesel SRM 50µg/ml
	21,07	23,55	34,29	90,67
	14,99	18,79	17,13	102,45
	3,92	17,08	15,08	67,89
	17,59	20,21	39,00	83,03
Mittelwert	14,39	19,91	26,37	86,01
Standardabw.	6,42	2,38	10,43	12,54

	Medium	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
	14,99	12,60	32,49	10,03
	4,08	11,35	19,37	16,76
	3,92	10,89	17,38	13,88
	17,59	19,34	17,77	8,17
Mittelwert	10,14	13,55	21,75	12,21
Standardabw.	6,21	3,40	6,25	3,34

	Medium	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
	21,07	36,55	49,52	82,98
	26,73	8,92	14,44	28,40
	1,95	10,78	2,50	24,23
	17,59	16,41	27,11	37,10
Mittelwert	16,84	18,16	23,39	43,18
Standardabw.	9,19	10,97	17,41	23,44

Ad 5.3.1 Vitalitätsstudien an mit Keratinozytenüberständen stimulierten Eosinophilen

Apoptose+/- Nekroserate [%] von Eosinophilen + Keratinozytenüberstände						
Inkubation: 2×10^6 /Zellen/ml = 200.000/Ansatz; 1,5h; 37°C; n=2						
Probanden: Eosinophile von Atopikern, Keratinozyten von Nicht-Atopikern						
Apoptoserate			Keratinozyten +			
	Medium	GM-CSF 1µg/ml	Medium	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
	40,18	6,34	19,41	20,8	18,11	23,05
	28,19	6,42	18,03	20,74	26,21	23,18
Mittelwert	34,19	6,38	18,72	20,77	22,16	23,12
Standardabw.	4,89	0,03	0,56	0,02	3,31	0,05
Apoptose- + Nekroserate			Keratinozyten +			
	Medium	GM-CSF 1µg/ml	Medium	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
	61,85	20,22	28,65	34,68	27,21	31,3
	35,91	20,21	36,58	30,11	39,41	36,16
Mittelwert	48,88	20,22	32,615	32,395	33,31	33,73
Standardabw.	10,59	0,00	3,24	1,87	4,98	1,98

Ad 5.3.2 Einfluss der Überstände von DEP, Printex G und Printex 90-stimulierten Keratinozyten auf die Chemotaxis Eosinophiler

Abbildung 25:

Migration auf Keratinozytenüberstände					
[Migrationsindex= Migration Ansatz/Migration Mediumkontrolle]					
Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=4					
Probanden: Keratinozyten: Nicht-Atopiker; Eosinophile: 3xAtopiker; 1xNicht-Atopiker					
	Keratinozyten +				
	Medium	LPS 100ng/ml	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
ED-14	3,18	3,58	4,38	4,12	3,97
ED-29	1,32	1,53	1,16	1,92	3,13
ED-36	2,01	1,87	1,65	2,16	3,20
ED-36	1,45	1,76	1,51	1,89	2,40
Mittelwert	1,99	2,18	2,18	2,52	3,17
Stabwn	0,66	0,73	1,15	0,83	0,50

Abbildung 26:

Migration auf Keratinozytenüberstände					
[Migrationsindex= Migration Ansatz/Migration Mediumkontrolle]					
Migration: 1x10 ⁵ Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=4					
Probanden: Keratinozyten: Nicht-Atopiker; Eosinophile: 3xAtopiker; 1xNicht-Atopiker					
	Medium	LPS 100ng/ml	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
ED-14	3,18	3,58	4,46	4,31	5,62
ED-39	1,57	1,66	1,56	1,67	1,65
ED-36	1,45	1,76	1,34	1,42	1,58
ED-29	1,32	1,53	1,32	1,78	1,96
Mittelwert	1,88	2,13	2,17	2,30	2,70
Stabwn	0,76	0,84	1,33	1,17	1,69

Abbildung 27:

Migration auf Keratinozytenüberstände					
[Migrationsindex= Migration Ansatz/Migration Mediumkontrolle]					
Migration: 1x10 ⁵ Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=5					
Probanden: Keratinozyten: Nicht-Atopiker; Eosinophile: 4xAtopiker; 1xNicht-Atopiker					
	Medium	LPS 100ng/ml	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
ED-29	1,32	1,53	1,66	1,43	2,69
ED-14	3,18	3,58	4,28	4,56	4,71
ED-36	1,45	1,76	1,29	1,66	2,26
ED-39	1,71	1,33	1,61	2,08	1,86
ED-39	1,54	1,66	1,93	1,99	1,72
Mittelwert	1,84	1,97	2,15	2,34	2,65
Stabwn	0,62	0,74	0,99	1,03	0,99

Ad 5.3.3 Einfluss der Überstände von DEP, Printex G und Printex 90-stimulierten Keratinozyten auf die Freisetzung von Granulaproteinen aus eosinophilen Granulozyten

Abbildung 28:

ECP-Werte von mit Keratinozytenüberständen stimulierten Eosinophilen [pg/ml]						
Stimulation: 1x10 ⁶ Zellen/ml; 1,5h; 37°C; n=3						
Probanden: Keratinozyten: Nicht-Atopiker; Eosinophile: Atopiker						
	Keratinozyten+					
	Medium	Medium	LPS 100ng/ml	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
ED-17	10,70	11,10	14,60	36,50	20,60	14,20
ED-6	6,30	13,20	13,60	23,21	16,00	12,16
ED-14	2,00	5,80	8,26	9,75	8,63	10,07
Mittelwert	6,33	10,03	12,15	23,15	15,08	12,14
Stabwn	3,08	2,70	2,41	9,46	4,27	1,46

Abbildung 29:

ECP-Werte von mit Keratinozytenüberständen stimulierten Eosinophilen [pg/ml]						
Stimulation: 1x10 ⁶ Zellen/ml; 1,5h; 37°C; n=3						
Probanden: Keratinozyten: Nicht-Atopiker; Eosinophile: Atopiker						
	Keratinozyten+					
	Medium	Medium	LPS 100ng/ml	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
ED-21	65,70	51,10	40,30	69,30	61,90	71,10
ED-20	33,85	45,90	43,00	28,40	50,40	36,90
ED-14	2,00	5,80	8,26	11,10	10,95	9,33
Mittelwert	33,85	34,27	30,52	36,27	41,08	39,11
Stabwn	26,01	17,53	13,66	21,13	18,90	21,88

Abbildung 30:

ECP-Werte von mit Keratinozytenüberständen stimulierten Eosinophilen [pg/ml]						
Stimulation: 1x10 ⁶ Zellen/ml; 1,5h; 37°C; n=3						
Probanden: Keratinozyten: Nicht-Atopiker; Eosinophile: Atopiker						
	Keratinozyten+					
	Medium	Medium	LPS 100ng/ml	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
ED-21	65,70	51,10	40,30	69,30	61,90	71,10
ED-20	33,85	45,90	43,00	28,40	50,40	36,90
ED-14	2,00	5,80	8,26	11,10	10,95	9,33
Mittelwert	33,85	34,27	30,52	36,27	41,08	39,11
Stabwn	26,01	17,53	13,66	21,13	18,90	21,88

**Ad 5.3.4 Einfluss der Überstände von DEP-stimulierten Keratinozyten auf die CD-11b
Hochregulierung von eosinophilen Granulozyten**

Abbildung 31:

CD-11b Expression von mit Keratinozytenüberständen stimulierten Eosinophilen							
Mittlere Fluoreszenzintensität [%]							
Stimulation: 1x10 ⁶ Zellen/ml=200.000 Zellen/Ansatz; 2h; 37°C							
n=5; Eosinophile: Atopiker; Keratinozyten: Nicht-Atopiker							
	Keratinozyten+						
	Medium	Eotaxin 100ng/ml	Medium	LPS 100ng/ml	Diesel 0,5µg/ml	Diesel 5µg/ml	Diesel 50µg/ml
	27,02	75,17	64,38	20,49	48,64	59,10	28,12
	67,83	94,19	46,64	39,43	45,66	49,96	47,51
	16,86	18,93	20,04	13,54	17,50	16,70	15,34
	29,59	71,43	13,04	15,72	11,20	15,74	18,42
	46,57	54,37	13,92	13,52	20,48	18,41	19,02
Mittelwert	37,57	62,82	31,60	20,54	28,70	31,98	25,68
Stabwn	17,89	25,33	20,45	9,78	15,39	18,66	11,72

Ad 5.4 Unterschiede zwischen Zellen von atopischen und nicht-atopischen Probanden

Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=3				
[Migrationsindex= Migration Ansatz/Migration Mediumkontrolle				
Migration auf Atopikerkeratinozytenüberstände/Atopikereosinophile				
	Keratinozyten+			
	Medium	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
	1,80	1,68	2,16	1,73
	1,70	1,44	1,93	1,95
	1,63	1,71	2,14	1,91
Mittelwert	1,71	1,61	2,08	1,86
Stabwn	0,07	0,12	0,10	0,10
Migration auf Nicht-Atopiker Keratinozytenüberstände/Atopikereosinophile				
	Medium	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
	1,57	1,91	2,12	1,68
	1,51	1,95	1,85	1,75
	1,54	1,93	1,99	1,72
Mittelwert	1,54	1,93	1,99	1,72
Stabwn	0,02	0,02	0,11	0,03
Migration auf Nicht-Atopiker Keratinozytenüberstände/Nicht-Atopiker Eosinophile				
	Medium	Printex G 0,5µg/ml	Printex G 5µg/ml	Printex G 50µg/ml
	1,32	1,66	1,43	1,73
	1,47	1,85	1,42	1,54
	1,16	1,45	1,45	1,79
Mittelwert	1,32	1,65	1,43	1,69
Stabwn	0,13	0,16	0,01	0,11

Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=3				
[Migrationsindex= Migration Ansatz/Migration Mediumkontrolle				
Migration auf Atopikerkeratinozytenüberstände/Atopikereosinophile				
	Keratinozyten +			
	Medium	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
	1,80	1,68	1,65	1,25
	1,70	1,74	1,80	1,10
	1,63	1,95	1,33	1,00
Mittelwert	1,71	1,79	1,59	1,12
Stabwn	0,07	0,12	0,20	0,10
Migration auf Nicht-Atopiker Keratinozytenüberstände/Atopikereosinophile				
	Medium	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
	1,57	1,56	1,67	1,65
	1,51	1,81	1,83	1,40
	1,54	1,69	1,75	1,53
Mittelwert	1,54	1,69	1,75	1,53
Stabwn	0,02	0,10	0,07	0,10
Migration auf Nicht-Atopiker Keratinozytenüberstände/Nicht-Atopiker Eosinophile				
	Medium	Printex 90 0,5µg/ml	Printex 90 5µg/ml	Printex 90 50µg/ml
	1,32	1,32	1,78	1,96
	1,47	1,44	2,36	2,12
	1,16	1,21	1,46	1,65
Mittelwert	1,32	1,32	1,87	1,91
Stabwn	0,11	0,08	0,32	0,17

Ad 5.5.1 Vergleich der eingesetzten Partikelarten DEP, Printex G und Printex 90

Abbildung 33:

Vergleich der Partikelarten bezüglich der Chemotaxis					
[Migrationsindex: Migration Ansatz/Migration Mediumkontrolle]					
Diesel SRM n=4; Printex 90 n=4; Printex G n=5;					
Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C;					
		Medium	0,5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml
Diesel SRM	Mittelwert	1,99	2,18	2,52	3,17
	Stabwn	0,66	1,15	0,83	0,50
Printex 90	Mittelwert	1,88	2,17	2,31	2,71
	Stabwn	0,76	1,33	1,17	1,69
Printex G	Mittelwert	1,84	2,15	2,34	2,65
	Stabwn	0,62	0,99	1,03	0,99

Abbildung 34:

ECP-Ausschüttung Eosinophiler ohne GM-CSF-Vorstimulation				
Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C				
[ECP-Index: ECP-Freisetzung Ansatz/ECP-Freisetzung Mediumkontrolle]				
Diesel SRM n=3; Printex 90 n=3; Printex G n=3;				
		0,5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml
Diesel SRM	Mittelwert	1,08	1,36	1,66
	Stabwn oben	0,07	0,05	0,66
	Stabwn unten	0,06	0,05	0,47
Printex 90	Mittelwert	1,67	3,13	2,92
	Stabwn oben	0,82	1,42	2,66
	Stabwn unten	0,55	0,98	1,39
Printex G	Mittelwert	4,17	4,47	4,17
	Stabwn oben	1,58	4,24	3,24
	Stabwn unten	1,12	2,18	1,88

Abbildung 35:

ECP-Ausschüttung Eosinophiler mit GM-CSF-Vorstimulation [1µg/ml; 25min]				
Stimulation: 1×10^6 Zellen/ml; 1,5h; 37°C				
[ECP-Index: ECP-Freisetzung Ansatz/ECP-Freisetzung Mediumkontrolle]				
Diesel SRM n=4; Printex 90 n=3; Printex G n=3;				
		0,5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml
Diesel SRM	Mittelwert	1,36	1,54	1,55
	Stabwn oben	0,48	0,43	0,68
	Stabwn unten	0,35	0,34	0,48
Printex 90	Mittelwert	1,70	1,26	1,55
	Stabwn oben	0,90	0,52	0,76
	Stabwn unten	0,60	0,36	0,52
Printex G	Mittelwert	1,34	1,49	1,41
	Stabwn oben	0,85	0,45	0,37
	Stabwn unten	0,51	0,36	0,28

Abbildung 36:

GM-CSF Ausschüttung Partikel-stimulierter Keratinozyten				
Stimulation: 1x10 ⁶ Zellen/ml; 48h; 37°C;				
[GM-CSF-Index: GM-CSF-Freisetzung Ansatz/GM-CSF-Freisetzung Mediumkontrolle]				
Diesel SRM n=4; Printex 90 n=4; Printex G n=4;				
		0,5µg	5µg	50µg
Diesel SRM	Mittelwert	1,63	2,00	7,08
	Standardabw. oben	0,80	0,75	3,39
	Standardabw. unten	0,55	0,55	2,51
Printex 90	Mittelwert	1,90	2,60	2,14
	Standardabw. oben	0,73	1,56	2,03
	Standardabw. unten	0,50	0,94	1,00
Printex G	Mittelwert	2,10	1,70	3,24
	Standardabw. oben	1,70	0,34	3,07
	Standardabw. unten	0,90	0,34	1,74

Abbildung 37:

ECP-Index= $\frac{\text{ECP-Freisetzung von Eosinophilen} + \text{Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten}}{\text{ECP-Freisetzung von Eosinophilen} + \text{Überstände Medium-inkubierter Keratinozyten}}$

ECP-Ausschüttung durch Überstände Partikel-stimulierter Keratinozyten				
Stimulation: 1x10 ⁶ Zellen/ml; 1,5h; 37°C				
[ECP-Index: ECP-Freisetzung Ansatz/ECP-Freisetzung Mediumkontrolle]				
Diesel SRM n=3; Printex 90 n=3; Printex G n=3;				
		0,5µg	5µg	50µg
Diesel SRM	Diesel SRM	2,37	1,49	1,50
	Standardabw. oben	0,88	0,28	0,23
	Standardabw. unten	0,64	0,23	0,20
Printex 90	Printex 90	2,14	1,49	1,29
	Standardabw. oben	1,10	0,11	0,53
	Standardabw. unten	0,73	0,10	0,37
Printex G	Printex G	1,37	1,36	1,31
	Standardabw. oben	0,39	0,34	0,28
	Standardabw. unten	0,30	0,27	0,23

Abbildung 38:

Migration: 1×10^5 Zellen/well; 1,5h; 37°C; n=2;				
Probanden: Atopikereosinophile; Nicht-Atopikerkeratinozyten				
	Keratinocyten +			
	Medium	Phenanthren 0,1nM	Phenanthren 1nM	Phenanthren 10nM
	1,41	0,90	0,85	1,55
	1,22	1,10	1,15	1,25
Mittelwert	1,32	1,00	1,00	1,40
Standardabw	0,08	0,08	0,12	0,12
	Medium	Benz(a)pyren 0,1nM	Benz(a)pyren 1nM	Benz(a)pyren 10nM
	1,41	1,00	1,00	1,05
	1,22	1,30	1,10	1,00
Mittelwert	1,32	1,15	1,05	1,03
Standardabw	0,08	0,12	0,04	0,02