

Effekte von Alveolarstaubpartikeln auf Entzündungsmarker in oberen und unteren Atemwegen

Harald Hessel

2003

Aus dem Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Nowak

Effekte von Alveolarstaubpartikeln auf Entzündungsmarker
in oberen und unteren Atemwegen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Harald Hessel
aus München
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Nowak

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.-W. Ziegler-Heitbrock
Prof. Dr. med. vet. F. Krombach

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2003

A. EINLEITUNG	8
B. MATERIAL UND METHODEN	11
1. Versuchsplan	11
2. Voruntersuchungen	12
2.1 Charakterisierung der Probanden – Fragebogen	13
2.2 Bestimmung der spezifischen IgE auf inhalative Allergene	13
2.3 Hyperreagibilitätstestung der tieferen Atemwege	14
2.4 Lungenfunktionsmessung	15
2.4.1 Lungenfunktionsprotokoll	15
2.4.2 Akzeptabilitätskriterien, Reproduzierbarkeitskriterien	16
3. Untersuchungskollektive	16
3.1 Untersuchungskollektiv der nicht chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden	16
3.2 Untersuchungskollektiv der Schweißer	17
4. Zeitverlauf der Zytokinexpression	19
5. Exposition gegenüber Schweißrauch-aerosole - Schweißverfahren	21
5.1 Kollektiv der nicht chronisch exponierten Probanden	21
5.2 Kollektiv der Schweißer	22
6. Alveolarstaubmessung	23
6.1 Personenbezogene Messung der Alveolarstaubkonzentration in der Atemluft	23
6.2 Filteranalyse – Quantitative Bestimmung der partikulären Schweißrauch- Zusammensetzung	24
7. Quantifizierung von Entzündungsparametern im peripheren Blut	24
8. Gewinnung von Zellsuspensionen der oberen und unteren Atemwege	25
8.1 Sputumgewinnung	25
8.1.1 Fraktionierte Sputuminduktion	25
8.1.2 Abbruchkriterien	26
8.2 Nasale Lavage	27
9. Aufbereitung von Sputum und NL	27
9.1 Zellisolierung	28
9.2 Aufreinigung der Zellsuspension	28
9.3 Asservieren der Zellen	28

10. Zytologische Bearbeitung	29
10.1 Volumenbestimmung der Zellsuspension	29
10.2 Zellzahlbestimmung, Zellpräparation, -fixierung, -färbung	29
10.3 Zelldifferenzierung	30
11. Molekulargenetische Methoden	34
11.1 Isolierung der Gesamt-RNA	34
11.1.1 Arbeitsbedingungen	34
11.1.2 Vorbehandlung von Geräten	34
11.1.3 Vorbehandlung von Lösungen	35
11.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen	35
11.1.5 Durchführung der Gesamt-RNA-Isolierung	36
11.2 RNA Konzentrationsbestimmung	38
11.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	38
11.2.2 Durchführung der RNA Konzentrationsbestimmung	39
11.3 RNA Qualitätskontrolle – Analytische TBE-Gelelektrophorese	39
11.3.1 Verwendete Puffer, Lösungen und Geräte	40
11.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA	41
11.4 Reverse Transkription	41
11.4.1 Verwendete Puffer und Lösungen	41
11.4.2 Durchführung der Reversen Transkription	43
11.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
11.5.1 Verwendete Oligonukleotidprimer, Puffer und Lösungen	46
11.5.2 PCR-Temperaturprofil	48
11.5.3 RT-PCR unter Verwendung eines externen Standard	49
11.5.4 Molekularbiologische Herstellung exogener interner Standards der Zytokine TNF- α und IL-8	51
11.5.4.1 Protokoll	53
11.5.4.1.1 Restriktionsverdau	53
11.5.4.1.2 PCR I	54
11.5.4.1.3 PCR II	55
11.5.4.1.4 Säulenchromatographische Reinigung der Standard-DNA	56
11.5.4.1.5 Spektralphotometrische Bestimmung der Standard-DNA Konzentration	57
11.5.5 Kompetitive PCR unter Verwendung interner Standards	57

11.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen	59
11.6.1 Konventionelle horizontale Agarosegelelektrophorese	60
11.6.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen	60
11.6.1.2 Durchführung der konventionellen Agarosegelelektrophorese	61
11.6.2 Trocken-Gelelektrophorese	62
11.6.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	62
11.6.2.2 Durchführung der Trocken-Gelelektrophorese	62
11.7 Quantifizierung der amplifizierten cDNA	63
12. Statistische Auswertung	63
C. ERGEBNISSE	64
1. Deskriptive Parameter der Fragebogenerfassung / Allergietestergebnisse	64
2. Bestimmung der Schweißrauchpartikel	68
2.1 Quantitative Bestimmung der Alveolarstaubkonzentration	68
2.2 Quantitative Bestimmung der partikulären Schweißrauchzusammensetzung	68
3. Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsproteine und vasokonstriktiver Proteine mittels ELISA im peripherem Blut	69
4. Untersuchung inflammatorischer Effekte an Sputumzellen	73
4.1 Bestimmung der Probenvolumina, der Gesamtzellzahl und der relativen Zellzahl	73
4.2 Vitalitätstestung	77
4.3 Zelldifferentialbestimmung	79
4.4 Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine mittels RT-PCR	85
5. Untersuchung inflammatorischer Effekte an Zellen der nasalen Lavage	91
5.1 Bestimmung der Probenvolumina, der Gesamtzellzahl und der relativen Zellzahl	91
5.2 Vitalitätstestung	93
5.3 Zelldifferentialbestimmung	94
5.4 Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine mittels RT-PCR	99
6. Korrelationsanalyse quantifizierter Zytokine aus Sputum und NL gegenüber expositionsrelevanten Alveolarstaub-Konzentrationen	105

D. DISKUSSION	109
1. Studiendesign	109
1.1 Ziel der Studie – Methode	109
1.2 Untersuchungskollektive	109
1.3 Untersuchungsmaterial und Reproduzierbarkeit – Sekrete des Sputums und der NL	109
1.4 Untersuchungsparameter	110
1.5 Studiendesign – Zusammenfassung	112
2. Schweißverfahren / Partikel - Exposition - Messung	112
2.1 Richtlinien, Grenzwerte	113
2.2 Partikel-induzierte adverse Effekte	113
2.3 Deposition / Disposition	114
2.4 Koexposition / additiver Effekt	114
2.5 Partikelmessung	115
2.6 Partikelquantifizierung	115
2.7 Kollektiv der nicht chronisch exponierten Probanden	116
2.8 Kollektiv der chronisch exponierten Schweißer	116
3. Methodenetablierung	117
3.1 Isolierung von Untersuchungsmaterial der oberen und unteren Atemwege	117
3.2 Proben-Aufarbeitung, RNA-Isolierung, reverse Transkription, RT-PCR	119
3.2.1 Aufarbeitung von Sputum und Sekreten der NL	119
3.2.2 RNA-Isolierung	120
3.2.3 Reverse Transkription	120
3.2.4 RT-PCR	121
3.3 Zelldifferenzialbestimmung	122
4. Deskriptive Analyse Schweißrauch-induzierter Veränderungen der Entzündungsparameter	124
4.1 Entzündungsparameter im peripherem Blut bei nicht chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden	125
4.2 Entzündungsparameter im peripherem Blut bei chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden	126
4.3 Proinflammatorische Effekte der oberen und unteren Atemwege bei nicht chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden	127

4.4 Proinflammatorische Effekte der oberen und unteren Atemwege bei chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden	129
5. Vergleichende Analyse zwischen den beiden Untersuchungskollektiven	133
5.1 Differentieller Wirkungsmechanismus – ein Modell	134
5.2 Berufsgruppen mit chronischer Alveolarstaubbelastung – eine Risikogruppe	135
 E. ZUSAMMENFASSUNG	 136
 F. ANHANG	 139
 G. LITERATURVERZEICHNIS	 143

ABKÜRZUNGEN

A ₂₆₀	Absorption bei λ 260 nm
amol	Attomol
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ak	autoklaviert
ATS	American Thoracic Society
bp	Basenpaar
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dl	Deziliter
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
h	Stunde
IU	international unit
IS	interner Standard
kb	Kilobase
konz.	konzentriert
kPa/s	Kilopascal pro Sekunde
kU/l	Kilo Units/Liter
λ	Wellenlänge
l	Liter
M	Mol
m	Meter
MAG	Metall-Aktivgas
Max.	Maximum
Min	Minute
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm

µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
N	Anzahl
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
ppm	parts per million
RT	Raumtemperatur
R _t	Atemwegswiderstand [kPa*s/l]
SDS	sodium dodecyl sulfate
s	Sekunde
sR _t	spezifischer Atemwegswiderstand [kPa*s/l]
Tab.	Tabelle
U	Umdrehungen
Verd.	Verdünnung
Vol	Volumen

A. EINLEITUNG

In den vergangenen Jahren konnte in einer Vielzahl epidemiologischer und experimenteller Studien der Zusammenhang zwischen inhalativen Expositionen gegenüber der Alveolarstaubfraktion der Atemluft unter umweltrelevanten Konzentrationen und adversen pulmonalen und kardiovaskulären Effekten demonstriert werden.

Bezieht man sich hierbei auf neuere Zeitreihenanalysen, so belegen diese im Falle einer Erhöhung des Jahresmittelwertes der Alveolarstaubbelastung (PM₁₀) um 10 µg/m³ eine Zunahme chronischer Bronchitiden bei Erwachsenen (+25%) und bei Kindern (+35%) sowie eine Zunahme der Hospitalisierungen wegen Atemwegserkrankungen (+1,5%) bzw. kardiovaskulären Erkrankungen (+0,9%) (Künzli et al., 1997; Pope und Dockery, 1999).

Nach aktuellen Erkenntnissen führen insbesondere Ultrafeinstäube (< 0,1 µm) nach Ablagerung im Alveolarbereich zu zelltoxischen und inflammatorischen Effekten (Wichmann und Peters, 2000; Oberdörster, 2001).

Demgegenüber konnte bei Schweißarbeiten eine bis zu zweihundertfach höhere Konzentration an Alveolarstaubpartikeln am Arbeitsplatz im Vergleich zur Umwelt gemessen werden (Zober et al., 1982).

Schweißrauch besteht überwiegend aus Aggregaten und Agglomeraten mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,2-0,4 µm, die aus <0,1 µm großen Primärpartikeln zusammengesetzt sind und somit bis in die Alveolen gelangen können. Vor allem beim Lichtbogenhandschweißen (sog. „E-Schweißen“) und beim MAG-Schweißen wird vermehrt Schweißrauch gebildet.

Untersuchungen zum Thema einer Alveolarstaub-induzierten entzündlichen Reaktion der Atemwege konzentrierten sich bisher überwiegend auf in vitro und tierexperimentelle Studien. Betrachtet man die Literatur, so erfolgten hinsichtlich der Aufklärung molekularbiologischer Wirkungsmechanismen einer Alveolarstaubpartikel-induzierten entzündlichen Reaktion nur wenige in vivo Studien am Menschen.

Bei einer Reihe von Studien konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, daß sogenannte proinflammatorische Zytokine in der frühen Phase entzündlicher Reaktionen involviert sind (Finkelstein et al., 1997; Monn und Becker, 1999; Takano et al., 2002).

Eine geeignete molekularbiologische Untersuchungsmethode für den Nachweis geringer mRNA-Konzentrationen wie die der Zytokine stellt hierbei die Methode der RT-PCR dar.

Ziel der vorliegenden in vivo Untersuchung war es, mit Hilfe von gering invasiven Methoden wie der nasalen Lavage (NL) und der Sputuminduktion, nach Exposition gegenüber Schweißrauchen, Zellmaterial der oberen und unteren Atemwege zu isolieren und aus diesem proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) mit Hilfe der RT-PCR zu quantifizieren.

Neben einer Vielzahl unterschiedlichster Wirkungsmechanismen spielen die chemotaktischen Eigenschaften proinflammatorischer Zytokine eine wichtige Rolle für eine spezifische Vervielfältigung immunkompetenter Zellen. In einer Reihe von Publikationen konnte analog hierzu ein eindeutiger Zusammenhang zwischen inhalativer Partikel-induzierter Exposition und einer Verschiebung des Zelldifferentialbildes in Sekreten der BAL, des Sputums und der NL belegt werden (Rudell et al., 1999; Nightingale et al., 2000; Nordenhall et al., 2000; Kodavanti et al., 1999). Um einen besseren Einblick in die komplexen Zusammenhänge Alveolarstaubpartikel-induzierter Effekte zu erzielen erfolgte, in Ergänzung zur Quantifizierung der proinflammatorischen Zytokine, der Nachweis einer entzündlichen Reaktion mit Hilfe der zell differentiellen Bestimmung des Sputums und der NL.

Aus diesem Grund erfolgte nach Etablierung der Untersuchungsmethode die Quantifizierung Alveolarstaub-induzierter entzündlicher Reaktionen der Atemwegsschleimhäute zunächst an 20 gesunden Probanden (Nicht-Schweißer).

Bislang wurden nur wenige Untersuchungen zur klinischen Bedeutung erhöhter Partikelbelastung bei chronisch exponierten Berufsgruppen durchgeführt (Frosig et al., 2001). Aus diesem Grund erfolgte eine Ausweitung dieser Studie unter Miteinbeziehung eines weiteren Kollektivs aus 20 gesunden Berufsschweißern.

Die Auswertungen der erzielten Ergebnisse sollen Hinweise darüber liefern, inwiefern die in der Literatur beschriebenen und kausal mit Alveolarstaubexposition in Zusammenhang gebrachten Krankheitsbilder mit entzündlichen Reaktionen des Atemtrakts einhergehen.

Parallel zu den beschriebenen adversen partikelinduzierten Atemwegseffekten steht die Erforschung der Zusammenhänge zwischen inhalativer partikulärer Belastung und assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen im Mittelpunkt der Partikelforschung. Trotz zunehmender Bemühungen auf diesem Gebiet konnte bislang noch keine Klärung der involvierten pathogenen Mechanismen erreicht werden. Dieser Tatsache Rechnung tragend erfolgte parallel zur primären Quantifizierung proinflammatorischer Parameter des Respirationstraktes, die Quantifizierung von Entzündungsparametern des peripheren Blutes.

B. MATERIAL UND METHODEN

Für die Durchführung dieser Studie wurde ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München erteilt.

1. Versuchsplan

Der Ablauf der Untersuchungen und der Laborarbeiten ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Gliederung des Untersuchungsablaufs und der Laborarbeiten

1. Untersuchungstag	<ul style="list-style-type: none"> - Ärztliche Anamnese, orientierende körperliche Untersuchung; - Bronchialer Provokationstest (Methacholin) mit vorheriger und anschließender Lungenfunktionsprüfung (Spirometrie, Ganzkörperplethysmographie, Fluß-Volumenkurve) zum Nachweis bzw. Ausschluß einer unspezifischen bronchialen Hyperreagibilität; - Test auf Sensibilisierung gegenüber inhalativen Allergenen; - Erhebung personenspezifischer Daten (Fragebogen);
2. Untersuchungstag	<ul style="list-style-type: none"> - Quantitative Alveolarstaubpartikelmessung (Durchmesser von < 4 µm) der Raumluft; - Blutentnahme zur Beurteilung spezifischer Entzündungsparameter im peripheren Blut ohne vorherige Belastung. Aufarbeitung und Separierung des gewonnenen Materials; - Gewinnung von bronchialen und nasalen Sekreten mittels Sputuminduktion und nasaler Lavage ohne vorherige Schweißrauchexposition (Negativ-Kontrolle). Die Sputumprovokation erfolgt unter regelmäßiger

	Überprüfung der Lungenfunktion; Aufarbeitung und Separierung des gewonnenen Materials;
3. Untersuchungstag	<ul style="list-style-type: none"> - Quantitative Alveolarstaubpartikelmessung (Durchmesser von < 4 μm) der Raumluft; - Blutentnahme zur Beurteilung spezifischer Entzündungsparameter im Serum nach Schweißrauchexposition. Aufarbeitung und Separierung des gewonnenen Materials; - Gewinnung von Sputum und Nasallavage für die Bestimmung entzündlicher Parameter der Atemwegsschleimhäute, 4 Stunden nach Schweißrauchexposition. Die Sputumprovokation erfolgt unter regelmäßiger Überprüfung der Lungenfunktion. Aufarbeitung und Separierung des gewonnenen Materials;
Labortag 1-6	<ul style="list-style-type: none"> - Bestimmung spezifischer Entzündungsparameter aus Blutserum und -plasma (ELISA); - Fixierung, Färbung und Zelldifferentialbestimmung der Sputum- und NL-Präparate; - Isolierung der Gesamt-RNA; - Reverse Transkription; - Quantifizierung zytokinspezifischer cDNA mit Hilfe der RT-PCR; - Gelelektrophorese; - Foto-Imaging; Computer-gestützte Quantifizierung;

2. Voruntersuchungen

Für einen sicheren und komplikationsfreien Ablauf der Untersuchungen erfolgte im Vorfeld eine genaue ärztliche Anamnese und orientierende körperliche Untersuchung der Probanden. Darüber hinaus wurde an jedem Probanden ein Test auf Sensibilisierung gegenüber inhalativen Allergenen sowie ein bronchialer Provokationstest (Methacholin) mit vorheriger und anschließender

Lungenfunktionsprüfung (Spirometrie, Ganzkörperplethysmographie, Flußvolumenkurve) zur Quantifizierung der unspezifischen Atemwegempfindlichkeit durchgeführt. Weiterhin erfolgte vor und während jeder Sputuminduktion (Inhalation einer hypertonen Kochsalzlösung) eine Überprüfung der Lungenfunktionen.

2.1 Charakterisierung der Probanden – Fragebogen

Für die Charakterisierung der Probanden wurde jeder der Studienteilnehmer gebeten einen Fragebogen zu beantworten (Anhang).

2.2 Bestimmung der spezifischen IgE auf inhalative Allergene

Eine Erfassung der Sensibilisierung der Probanden erfolgte mittels eines Inhalativen Allergie Tests SX1 ImmunoCAP (Pharmacia & Upjohn) (Liappis et al., 1987). SX1-Fluoroenzymimmunoassay (FEIA) ist ein in-vitro-Testsystem auf der Basis immunspezifischer Reaktionen zur Differential-Bestimmung von Inhalationsallergenspezifischen IgE-Antikörpern im menschlichen Serum. Folgende Allergene sind am SX1-ImmunoCAP gebunden: Phleum pratense, Secale cereale, Betula verrucosa, Artemisia vulgaris, Dermatophagoides pteronyssinus, Katzenepithelien, Hundepithelien und Cladosporium herbarum.

Testprinzip:

Eine ausgewogene Mischung der oben genannten Allergene, kovalent gebunden an die Trägersubstanz des ImmunoCAP, reagiert mit den spezifischen IgE-Molekülen in den Serumproben der Probanden. Nachdem die unspezifischen IgE abgewaschen wurden, wird Enzym-markiertes Anti-IgE hinzugefügt, um einen Komplex mit den spezifischen IgE zu bilden. Nach der Inkubation wird ungebundenes Enzym-Anti-IgE abgewaschen, und der gebundene Komplex anschließend mit einer Entwicklersubstanz inkubiert. Nachdem die Reaktion unterbrochen wurde, mißt man die Fluoreszenz in einem Fluorimeter (FluoroCount 96, Pharmacia & Upjohn). Die Fluoreszenz für die Probandenproben wird mit der einer Referenz verglichen.

2.3 Hyperreagibilitätstestung der tieferen Atemwege

Die Durchführung der Ganzkörperplethysmographie/Spirometrie erfolgte nach ATS Richtlinien (American Thoracic Society, 1995).

Eine Übersicht des Untersuchungsablaufes stellt sich wie folgt dar:

- Inhalation einer isotonen Kochsalzlösung mit 5 aufeinanderfolgenden Atemzügen;
- Kontrolle mittels Ganzkörperplethysmograph (MasterLab, Jaeger)/Spirometer (Flowscreen, Jaeger);
- Fraktionierte Inhalation einer 3,2 % Lösung Methacholin (Provokit™, Lindopharm) unter Verwendung eines Verneblers (Medic aid™, Jaeger; Vernebler-Leistung: 160 mg/min) – die entsprechende Dosierung erfolgte auf der Grundlage der in Tab.2 aufgelisteten Angaben; nach Applikation der jeweiligen Konzentration erfolgte eine Überprüfung der Lungenfunktionsparameter (FEV₁, R_t, sR_t) mittels Bodyplethysmograph/Spirometer;

Tab.2: Dosisberechnung für Vernebler Typ Medic Aid:

Dosis [mg]	1	2	3	4	5
Kumuliert	0,0171	0,0456	0,1063	0,2277	0,4706
Einzel	0,0171	0,0285	0,0607	0,1214	0,2429
Atemzüge	1 bei 0,2s	1 bei 0,334s	2 bei 0,3557s	4 bei 0,3557s	8 bei 0,3558s
Kumuliert	1	2	4	8	16
Einzel	1	1	2	4	8

Abbruchkriterien:

R_t ≥ 0,6 kPa/l/s und mindestens Verdopplung des Wertes bezogen auf NaCl oder sR_t ≥ 2,0 kPa/s und mindestens Verdopplung des Wertes bezogen auf NaCl → Broncholyse;

Der Grad der Atemwegsüberempfindlichkeit wurde wie folgt charakterisiert:

PD 100 (mg MCH) = Dosis MCH bei der sich sR_t verdoppelt

Voraussetzung: R_t ≥ 0,6 kPa/l/s oder sR_t ≥ 2,0 kPa/s.

PD 100 (mg MCH)			Grad der bronchialen Reagibilität
1	$\leq 0,05$	mg MCH	hochgradig
2	0,06-0,15	mg MCH	mittelgradig
3	0,16-0,30	mg MCH	geringgradig
4	$> 0,30$	mg MCH	keine

2.4 Lungenfunktionsmessung

Wie unter Abschnitt B.8.1.2 erwähnt, kann es in seltenen Fällen bei der Inhalation einer hypertonen Kochsalzlösung zu obstruktiven Lungenfunktionseinschränkungen kommen. Aus diesem Grund wurde vor Versuchsdurchführung sowie jeweils nach Inhalation der einzelnen Kochsalzfraktionen eine Überprüfung der Lungenfunktion mittels Spirometrie durchgeführt.

2.4.1 Lungenfunktionsprotokoll

- Überprüfung der Kalibrierung des Spirometers;
- Erklärung des Tests;
- Einführung und Demonstration des Testes für den Probanden;
- Gerade Körperhaltung;
- Vollständiges Einatmen;
- Positionierung des Mundstückes;
- Ausatmen mit maximaler Kraft;
- Durchführung der Messung;
- Überprüfung der Sitzposition des Probanden;
- Aufsetzen der Nasenklemme;
- Vollständiges Einatmen, das Einatmen sollte schnell, aber nicht forciert erfolgen;
- Mundstück in den Mund nehmen und die Lippen um das Mundstück schließen;
- Ausatmen mit maximaler Kraft, sobald die Lippen das Mundstück umschließen;
- Instruktionen ggf. wiederholen, intensiv zur Mitarbeit anfeuern.

2.4.2 Akzeptabilitätskriterien, Reproduzierbarkeitskriterien

Individuelle Spirogramme sind „akzeptabel“, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- das extrapolierte Volumen beträgt weniger als 5 % der FVC oder 0,15 l, je nachdem welcher Wert größer ist;
- die Zeit bis zum PEF beträgt weniger als 120 ms;
- die Expiration dauert 6 s und/oder ein Plateau im Volumen-Zeit-Diagramm wird erreicht;

3. Untersuchungskollektive

Die Untersuchung erfolgte an 20 nicht chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Büroangestellten, Wissenschaftlern und Studenten sowie an 20 Schweißern, die weder an Atemwegs- noch an anderweitigen chronischen Erkrankungen litten.

3.1 Untersuchungskollektiv der nicht chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden

Das Kollektiv der nicht chronisch exponierten Probanden setzte sich aus Männern und Frauen im Alter zwischen 21 und 56 Jahren zusammen (Tab.3).

Tab. 3: Untersuchungskollektiv der nicht chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden

Proband	Beruf	Geschlecht	Alter	Raucher
1	Student	m	24	Nein
2	Student	m	23	Nein
3	Student	m	24	Nein
4	Student	m	36	Nein

5	Student	w	22	Nein
6	Student	w	25	Nein
7	Büroangestellte	m	56	Nein
8	Student	m	23	Nein
9	Apothekerin	w	26	Nein
10	Student	m	28	Nein
11	MTA	w	25	Nein
12	Student	w	26	Nein
13	Student	m	32	Nein
14	Student	m	35	Nein
15	Biologin	w	28	Nein
16	Student	m	21	Nein
17	Student	w	28	Nein
18	Masseur	m	40	Nein
19	Biologe	m	38	Nein
20	Student	w	25	Nein

MTA: Medizinisch-Technische Assistentin

m: männlich

w: weiblich

3.2 Untersuchungskollektiv der Schweißer

Das Kollektiv der Schweißer setzte sich aus Männern im Alter zwischen 22 und 57 Jahren zusammen (Tab. 4).

Tab. 4: Untersuchungskollektiv der Schweißer

Proband	Beruf	Geschlecht	Alter	Raucher
1	Schweißer	m	32	Nein
2	Schweißer	m	34	Nein
3	Schweißer	m	37	Ja
4	Schweißer	m	34	Nein
5	Schweißer	m	48	Nein
6	Schweißer	m	22	Ja
7	Schweißer	m	31	Nein
8	Schweißer	m	30	Ja
9	Schlosser	m	29	Nein
10	Schweißer	m	52	Ja
11	Schweißer	m	57	Nein
12	Schweißer	m	46	Nein
13	Schweißer	m	41	Ja
14	Schweißer	m	54	Nein
15	Schlosser	m	43	Ja
16	Schlosser	m	45	Nein
17	Schlosser	m	54	Nein
18	Schweißer	m	28	Nein
19	Schweißer	m	24	Ja
20	Schweißer	m	22	Ja

m: männlich

w: weiblich

4. Zeitverlauf der Zytokinexpression

Die Untersuchungen erfolgten für jeden Probanden an zwei verschiedenen Tagen, nach Exposition gegenüber Schweißrauchen sowie als individueller Kontrollwert ohne vorherige Schweißrauchexposition.

Auf Grund der Erkenntnisse, daß induzierte Sputumprovokationen an sich Veränderungen des Sputums hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung bewirken können (Holz et al., 1998), wurde bei der Vergabe der Untersuchungstermine auf einen zeitlichen Abstand von mindestens 48 Stunden geachtet (in't Veen et al., 1996; Purokivi et al., 2000). Die Reihenfolge der Untersuchungstage mit und ohne Schweißrauchexposition wurde randomisiert.

Die Exposition gegenüber Schweißrauch erfolgte über einen Zeitraum von 45 Minuten. Unter Berücksichtigung von Latenzzeiten induzierter mRNA Zytokin-Expressionen (die Maxima der Untersuchungs-Zytokine stellen sich wie folgt dar: TNF- α : 2 Stunden, IL-1 β : 2 Stunden, IL-6: 3 Stunden und IL-8: 6 Stunden; Abb. 1), (Becker et al., 1991, Abel et al., 1992) sowie der Expositionszeit von 45 Minuten proportionalen Plateauphase der Maxima (Abb. 2) erfolgte die Gewinnung des Untersuchungsmaterials als Kompromiß für alle Untersuchungsparameter 4 Stunden nach Expositionsbeginn. Kontroll- und Expositionsuntersuchung wurden jeweils zur gleichen Uhrzeit durchgeführt (Abb. 3).

Abb. 1: Modell des zeitlichen Verlaufs der Zytokin-Expression nach inhalativer Stimulation gegenüber Alveolarstaubpartikeln

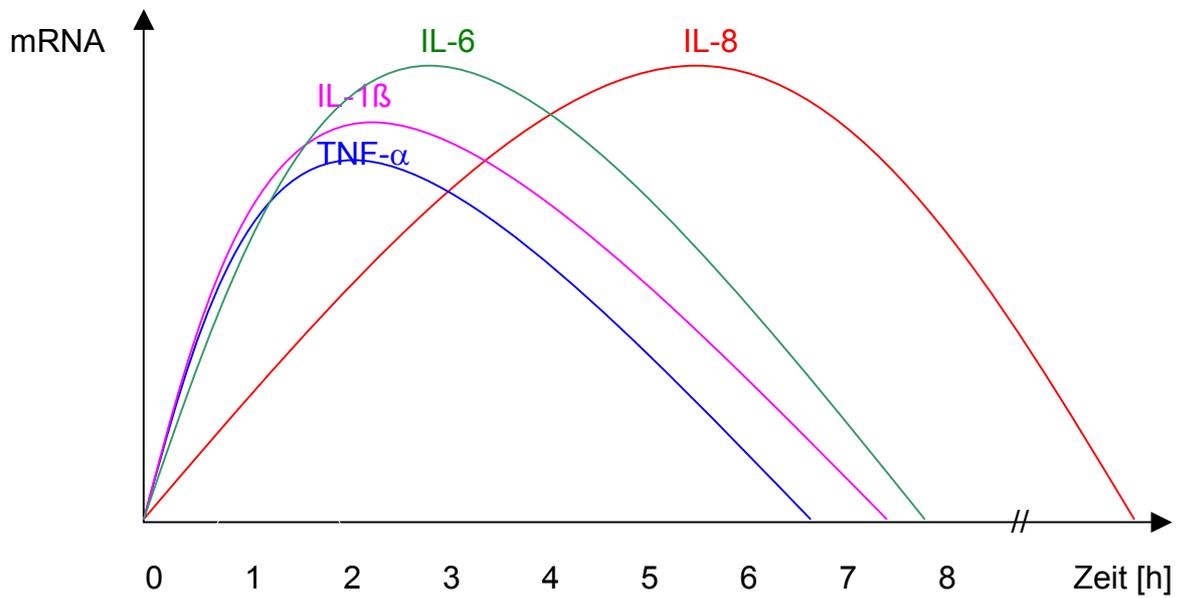


Abb. 2: Expressionsschema am Beispiel des Zytokins TNF-α nach 45 minütigen, kontinuierlichen Exposition gegenüber Schweißrauchen

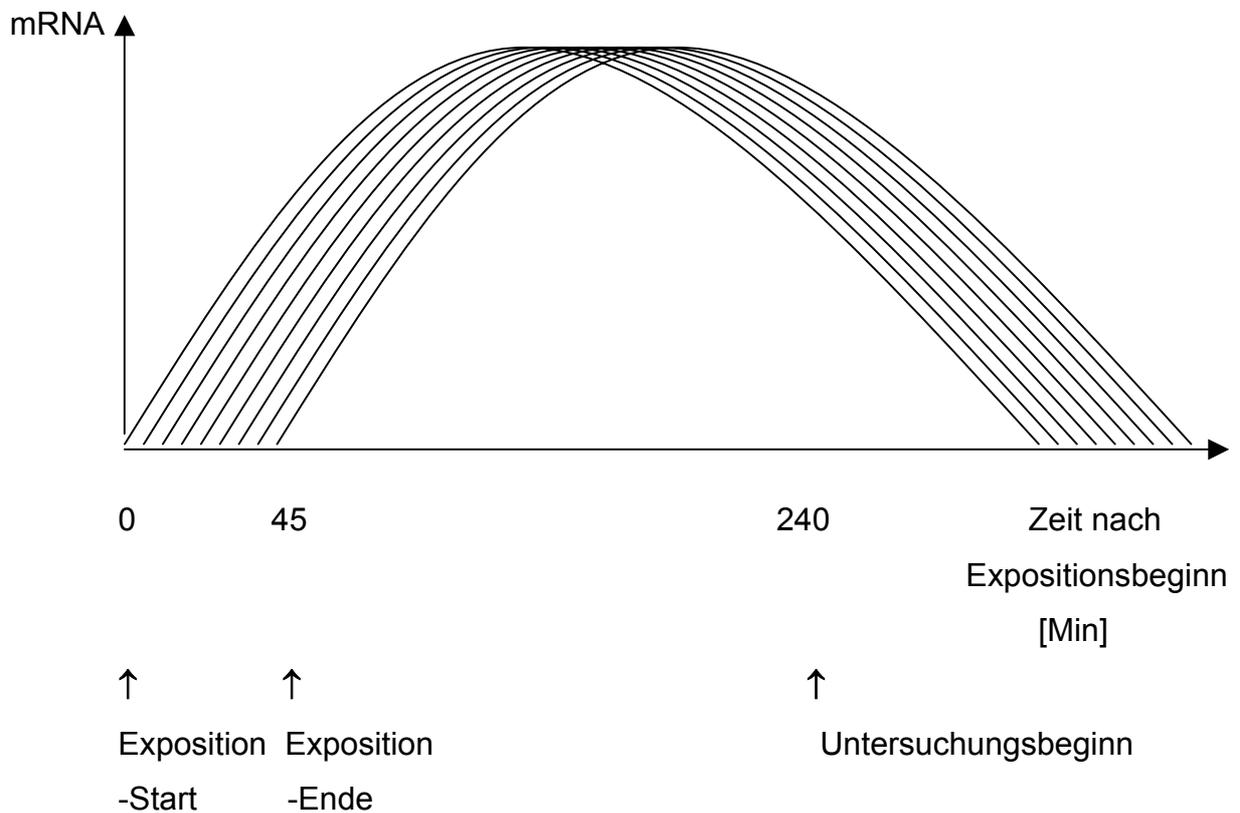
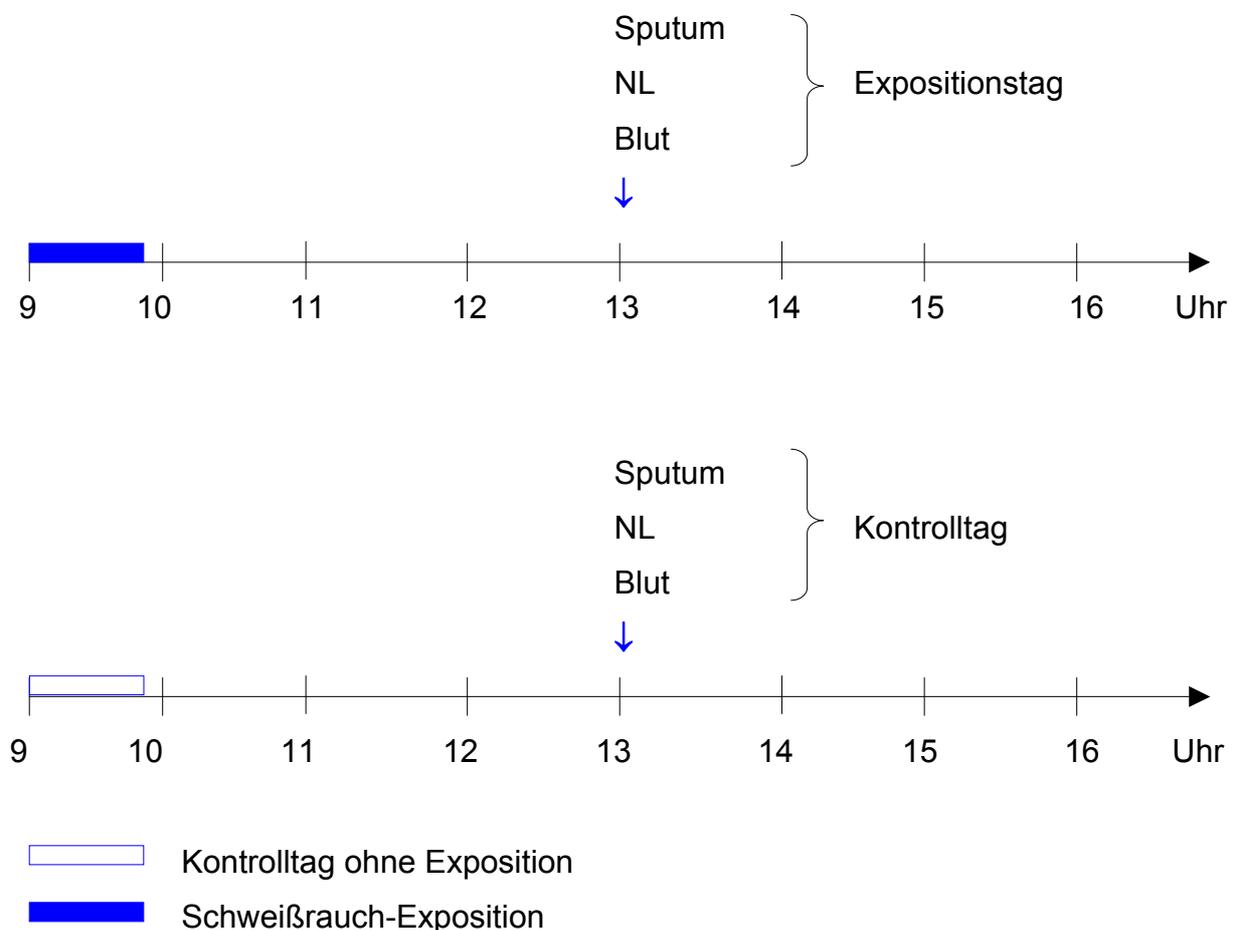


Abb. 3: Chronologische Abfolge der Untersuchungstage mit und ohne Schweißrauch-Exposition



5. Exposition - Schweißverfahren

5.1 Kollektiv der nicht chronisch exponierten Probanden

Die in dieser Studie an nicht chronisch exponierten Probanden durchgeführten Schweißrauch-Expositionen erfolgten unter standardisierten Bedingungen. Alle Expositionen wurden in einer Schweißkabine (6 qm Grundfläche; nach oben offen), über einen Zeitraum von 45 Minuten durchgeführt. An Schutzmaßnahmen wurden den Versuchsteilnehmern ein Arbeitskittel, ein Paar Lederhandschuhe, eine Lederschürze sowie ein Schutzschild zur Verfügung gestellt. Aufgabe der Probanden war es, als sogenannte „Bystander“ unter gleichen Bedingungen wie Schweißer selbst dem entstehenden Schweißrauch ausgesetzt zu sein. Für die Emission von

Schweißrauchpartikeln fand das Verfahren des Metall-Aktivgas-Schweißens (MAG) Anwendung. Das Schutzgasgemisch bestand aus 18 % Kohlendioxid (CO₂) und 82 % Argon (Ar). Bei dem verwendeten Schweiß-Material handelte es sich um unlegierte Stähle (S 235, S 355).

5.2 Kollektiv der Schweißer

Für das Kollektiv der Schweißer erfolgte eine Exposition gegenüber Schweißrauchpartikeln am jeweiligen Arbeitsplatz ebenfalls über einen Zeitraum von 45 Minuten.

Für die Exposition gegenüber Schweißrauchpartikeln wurde das Metall-Aktivgas-Schweißverfahren mit einem Schutzgasgemisch aus 18 % Kohlendioxid (CO₂) und 82 % Argon (Ar) sowie das E-Schweißverfahren mit zellulose- und rutilummantelten Elektroden angewandt. Bei dem verwendeten Schweiß-Material handelte es sich um unlegierte Stähle (S 235, S 355, ST 37) (Tab. 4).

Tab. 4: Untersuchungskollektiv der Schweißer – Schweißverfahren, -materialien und Expositionsbedingungen

Proband	Schweißverfahren	Elektroden	Schweißmaterial	Raum
1	MAG	-	Unlegierter Stahl: S235, S355	6 m ²
2	MAG	-	Unlegierter Stahl: S235, S355	6 m ²
3	MAG	-	Unlegierter Stahl: S235, S355	6 m ²
4	MAG	-	Unlegierter Stahl: ST37	> 10 m ²
5	MAG	-	Unlegierter Stahl: ST37	> 200m ²
6	MAG	-	Unlegierter Stahl: ST37	> 200m ²
7	E-Schweißen	Rutil	Unlegierter Stahl: ST37	50 m ²
8	MAG	-	Unlegierter Stahl: ST37	100 m ²
9	MAG	-	Unlegierter Stahl: ST37	100 m ²

10	E-Schweißen	Zellulose	Unlegierter Stahl: ST37	100 m ²
11	E-Schweißen	Zellulose	Unlegierter Stahl: ST37	100 m ²
12	MAG	-	Unlegierter Stahl: ST37	80 m ²
13	MAG	-	Unlegierter Stahl: ST37	40 m ²
14	E-Schweißen	Zellulose	Unlegierter Stahl: ST37	6 m ²
15	E-Schweißen	Rutil	Unlegierter Stahl: ST37	20 m ²
16	MAG, E-Schweißen	Rutil	Unlegierter Stahl: ST37	20 m ²
17	WIG, E-Schweißen	Rutil	Unlegierter Stahl: verschiedene	60 m ²
18	E-Schweißen	Rutil	Unlegierter Stahl: Güte 700	> 500 m ²
19	E-Schweißen	Rutil	Unlegierter Stahl: Güte 700	> 500 m ²
20	E-Schweißen	Rutil	Unlegierter Stahl: Güte 700	500 m ²

Rutil: Rutil ummantelt

Zellulose: Zellulose ummantelt

6. Alveolarstaubmessung

Eine Messung der Alveolarstaubkonzentration in der Atemluft erfolgte für Partikel mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser von $< 4 \mu\text{m}$, dies entspricht einem Abscheidegrad von 50 % (DFG, 2001), während der Exposition gegenüber Schweißrauchen unter Verwendung von personenbezogenen Meßgeräten.

6.1 Personenbezogene Messung der Alveolarstaubkonzentration in der Atemluft

Für eine quantitative, personenbezogene Bestimmung der alveolengängigen Alveolarstaubfraktion von $< 4 \mu\text{m}$ wurden Personalsampler (224 PCXR 7 KB, SKC;

S-2500, DEHA – Haan & Wittmer GmbH) mit Staubsammelköpfen (GSP, GSA Meßgerätbau Neuss) verwendet. Die Leistung der Pumpen wurde auf 2 l/Min eingestellt. Eine Kalibrierung der Personalsamplers erfolgte vor und nach jeder Messung. Für eine Abscheidung der Alveolarstaubpartikel wurden nicht hygroskopische Glasfaser Mikrofilter (MN 85/90 BF, Rückhaltevermögen 0,5 µm, Durchmesser 3,7 cm, Macherey-Nagel) verwendet. Die quantitative Bestimmung der gefilterten Partikel (< 4 µm) erfolgte gravimetrisch (Analysen-Waage AT201, Mettler, Ablesebereich 0,010 mg, Reproduzierbarkeit 0,015 mg).

6.2 Filteranalyse – Quantitative Bestimmung der partikulären Schweißrauch-Zusammensetzung

Entsprechend der in der Literatur (Akbar-Khanzadeh et al., 1993) beschriebenen molekularen Zusammensetzung korpuskularer Schweißrauchbestandteile wurde exemplarisch an zwei Staubfilterproben eine chemische Quantifizierung der partikulären Schweißrauchzusammensetzung mit Hilfe der ICP-Massenspektrometrie durchgeführt. Eine quantitative Analyse erfolgte für folgende Elemente und Verbindung: Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Fe₂O₃.

7. Quantifizierung von Entzündungsparametern im peripheren Blut

Für eine Bestimmung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ENA-78, sICAM-1 und des Vasokonstriktors Endothelin-1 wurde die Methode des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) angewandt.

Grundlage dieses immunologischen Nachweises sind Matrix- (z.B. Zellulose, Polystyrol) gebundene spezifische monoklonale Antikörper (AK) gegen das zu bestimmende Antigen. An die nach Inkubation mit der Probe gebildeten Immunkomplexe lagern sich in einem nachfolgenden Schritt zugefügte Enzym-markierte Anti-Antikörper an (Sandwichmethode). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht werden. Eine Konzentrationsbestimmung der

zu untersuchenden Proben erfolgt mittels eines Farb-Intensitätsvergleichs mit bekannten Konzentrationen einer Standardkurve.

Eine Quantifizierung wurde mit Hilfe nachstehender kommerzieller Kits nach Standardprotokollen durchgeführt:

- TNF- α ELISA-Kit (Quantikine HS TNF- α , R&D Systems)
- IL-1 β ELISA-Kit (Quantikine HS IL-1 β , R&D Systems)
- IL-6 ELISA-Kit (Quantikine HS IL-6, R&D Systems)
- IL-8 ELISA-Kit (Quantikine IL-8, R&D Systems)
- ENA-78 ELISA-Kit (Quantikine ENA-78, R&D Systems)
- sICAM-1 ELISA-Kit (Parameter sICAM-1, R&D Systems)
- Endothelin-1 ELISA-Kit (Parameter Endothelin-1, R&D Systems)

8. Gewinnung von Zellsuspensionen der oberen und unteren Atemwege

Eine Untersuchung der Effekte von Schweißrauchpartikeln auf die oberen und unteren Atemwege anhand der Bestimmung von Entzündungsparametern wurde an Zellen der nasalen und bronchialen Schleimhaut durchgeführt. Die Isolierung der Zellen erfolgte mittels der nasalen Lavage (NL, Zellsuspension der oberen Atemwege) und der Sputuminduktion (Zellsuspension der unteren Atemwege).

8.1 Sputumgewinnung

8.1.1 Fraktionierte Sputuminduktion

Für die Durchführung der Sputuminduktion wurde das Standardverfahren nach Pin et al. (1992) angewandt. Grundlage der Sputuminduktion ist eine Mobilisierung von Zellen und Sekreten der bronchialen Schleimhaut durch Einatmen hypertoner NaCl-Aerosole. Zu diesem Zweck inhalierten die Probanden über einen Zeitraum von jeweils 10 Minuten 3 %, 4% und 5% NaCl-Aerosole ein, die mit Hilfe eines Ultraschallverneblers (NE-U12, Omron, Tokyo, Japan; nominaler Ausstoß 3 ml/Min,

medianer Masse-Durchmesser 1-5 μm) erzeugt wurden. Im Anschluß an jede inhalierte NaCl-Fraktion, beginnend mit dem 3 % Aerosol, wurden die Probanden aufgefordert, Mund und Rachen gründlich mit Wasser zu spülen, 1 Schluck Wasser zu trinken und nach stoßartigem Ausatmen das Sputum in eine Petrischale (Sarstedt) abzuhusten.

Der temporäre Ablauf stellt sich wie folgt dar:

- Lungenfunktion: Ausgangswerte messen;
- 2 Hub eines β 2-Sympathomimetikums (Sultanol) verabreichen und 10 Minuten warten;
- Lungenfunktion: Messung;
- 10 Minuten Inhalation eines 3 bzw. 4 und 5 % NaCl-Aerosols;
- Lungenfunktionsüberprüfung;
- Nach Inhalation der jeweiligen NaCl-Fraktion Mund und Rachen mit Wasser spülen und 1 Schluck Wasser trinken (Entfernung abgeschilfterter, toter Epithelzellen aus Mund- und Rachenraum);
- Stoßartiges Ausatmen und mehrmaliges Abhusten des Sputum in eine Petrischale;
- Rasche Aufbereitung der Sputumsuspension, gegebenenfalls Zwischenlagerung bei + 4 ° C;

8.1.2 Abbruchkriterien

Die Isolierung bronchialer Schleimhautzellen basiert auf der Inhalation hypertoner NaCl-Aerosole, welche in seltenen Fällen mit obstruktiven Atemwegsproblemen einhergehen kann. Aus diesem Grund wurde vorbeugend vor und während der NaCl-Inhalation (alle 10 Minuten) eine Lungenfunktionsmessung mit einem Spirometer (Flowscreen, Jaeger) durchgeführt. Darüber hinaus wurde allen Probanden 10 Minuten vor Versuchsbeginn 2 Hub (200 μg) eines β 2-Sympathomimetikums (SultanolTM, Glaxo Smith Kline) als Dosieraerosol verabreicht. Bei einem Abfall des FEV₁ von mehr als 10 % gegenüber dem Wert nach Inhalation des β 2-Sympathomimetikums erfolgte keine weitere Steigerung der Salzkonzentration. Ein

Abfall von mehr als 20 % galt als absolutes Abbruchkriterium für eine weitere Sputuminduktion.

8.2 Nasale Lavage

Eine Isolierung von Zellen der nasalen Schleimhaut erfolgte modifiziert nach dem von Naclerio et al. (1983) beschriebenen Standardverfahren der nasalen Lavage (NL), welches sich wie folgt darstellt:

- Aufforderung an den sitzenden Probanden, den Kopf im 30 ° Winkel nach hinten zu neigen und die Luft anzuhalten;
- Überführung von 2 ml isotoner NaCl Lösung in den Bereich der mittleren Nasenmuschel (Concha nasalis media);
- Die in der Nase befindliche NaCl Lösung sollte circa 5 Sekunden verweilen und im Anschluß hieran über ein autoklaviertes Becherglas ausgeblasen werden;
- Wiederholung der vorhergehenden Schritte an der zweiten Nasenöffnung;
- Rasche Aufbereitung der NL-Suspension, gegebenenfalls Zwischenlagerung bei + 4 ° C;

9. Aufbereitung von Sputum und NL

Unter Berücksichtigung der für eine RNA-Isolierung erforderlichen Voraussetzungen erfolgten Modifikationen (Kühlung der Zellen auf + 4 °C und verkürzte Aufbereitungszeiten) der von Holz et al. (1998) beschriebenen Methode der Sputumaufarbeitung. Die Aufarbeitung der Sputum- und NL-Sekrete erfolgte mit dem gleichen modifizierten Verfahren.

RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig für eine spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. Um den Abbau der RNA durch im Probenmaterial enthaltene RNasen (endogene und exogene RNasen) zu verhindern, wurde direkt nach der Probennahme mit der Aufarbeitung des Sputums und der NL begonnen.

9.1 Zellisolierung

Für eine Isolierung der Zellen aus Sputum oder NL, einem mucösen Konglomerat aus Mucinen und Zellen der bronchialen bzw. nasalen Schleimhaut, ist es notwendig, Disulfid-Brücken der darin enthaltenen Proteoglycane (Kreutzig, 1997) aufzuspalten. Ein diesbezüglich geeignetes Agens stellt das Oxidationsmittel Dithiothreitol (Bestandteil von Sputolysin) dar (Hirsch et al., 1969; Ibelgauffs, 1990).

Zu diesen Zweck wird das Sputum bzw. die NL mit einem identischen Volumen 10 % Sputolysin (1 Teil Sputulysin + 9 Teile H₂O_{bidest.}) aufgenommen, in einen 50 ml Falkontube (Sarstedt) überführt und mit einer Kunststoff-Pasteurpipette (Sarstedt) während einer 10 minütigen Inkubation (+ 4 °C) mehrmals resuspendiert.

9.2 Aufreinigung der Zellsuspension

Eine Aufreinigung der Zellen erfolgte mittels zweier Waschschriffe mit einem zwanzigfachen Volumen eines 1 X PBS Puffer und anschließender Zentrifugation (Christ, HSS 4500 Rotor, Heraeus) für 10 Minuten bei 300 g;

Der Überstand wurde separiert und das Zellpellet mit 500 µl 1 X PBS (+ 4° C) aufgenommen, resuspendiert und in ein 1,5 ml Cryogefäß überführt;

Unter Berücksichtigung einer differenzierten Weiterverarbeitung der Sputum- bzw. NL-Zellen (RT-PCR, Zellzahlbestimmung und Zelldifferenzierung) wurden 50 µl der Zellsuspension in ein gesondertes ERG überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei + 4 °C gelagert.

9.3 Asservieren der Zellen

Im Anschluß hieran erfolgte eine erneute Zentrifugation (Christ, HSS 4500 Rotor, Heraeus) für 10 Minuten bei 300 g;

Der Überstand wurde verworfen und das im Cryogefäß verbliebene Zellpellet bei – 196 °C in flüssigen Stickstoff eingefroren (MVE Cryostem 6000, Minnesota Valley Engineering, Inc., USA).

10. Zytologische Bearbeitung

10.1 Volumenbestimmung der Zellsuspension

Für die Berechnung der Gesamtzellzahl ist die Bestimmung von Probenvolumina erforderlich. Zu diesem Zweck erfolgte eine Quantifizierung der Volumina der Zellsuspension mittels einer 1000 µl Eppendorfpipette.

10.2 Zellzahlbestimmung, Zellpräparation, -fixierung, -färbung

Bestimmung der Zellzahl:

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Zu diesem Zweck wurde 1 µl der resuspendierten und abgesonderten Zellsuspension mit 9 µl 1 X PBS und 10 µl Vitalfarbstoff 0,5 % Trypanblau (Biochrom KG) versetzt und nach einer 10 minütigen Inkubationszeit unter Berücksichtigung der Zellvitalität (lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop hyalin, tote bzw., nekrotische Zellen weisen eine dunkelblaue Färbung auf) ausgewertet (Gassen und Schrimpf, 1999). Das Auszählen der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Laborlux S™, Leitz).

Präparation:

Cytospinzentrifugation (Cytospin™, Shandon):

Auf Grund der geringen Gesamtzellzahl in Sputum und NL erfolgte im Hinblick auf eine effiziente Ausbeute eine Zelldifferenzierung an Cytospin-zentrifugierten Präparaten (Shandon, Cytospin™ 3). Zu diesem Zweck wurden 20.000 Zellen der Zellsuspension mit 200 µl 1 X PBS/BSA (10 ml/100mg) versetzt und bei 100 g für 5 Minuten punktuell auf einen Objektträger abzentrifugiert.

Fixierung und Färbung:

Nach einer Trockenzeit von mindestens 10 Minuten erfolgte eine Methanol/Aceton (1:1) Fixierung (RT) über 5 Minuten. Im Anschluß wurden die Präparate für mindestens 10 Minuten bei RT getrocknet. Eine Zwischenlagerung bis zur weiteren Verarbeitung ist in dieser Phase möglich.

Die Färbung der Zellpräparate erfolgte mittels einer kombinierten Giemsa/May-Grünwald-Färbung. Zu diesem Zweck wurden die Objektträger für 1,5 Minuten in einer 10 % Giemsa Lösung (20 ml Giemsa/180 ml Weisse Puffer, pH 7,2, Merck) inkubiert und für weitere 6 Minuten in einer unverdünnten May-Grünwald Lösung (Merck) gefärbt. Nach jedem der beiden Färbeschritte wurden die Objektträger in Weisse Puffer (Merck) abgespült und abschließend luftgetrocknet.

10.3 Zelldifferenzierung

Neben einer verstärkten, zellulären Genexpression/-translation inflammatorischer Parameter verändert sich auch mit zunehmenden Grad der Entzündungsreaktion die Zusammensetzung der Zelldifferentialbildes (Fahy et al., 1994). Für die Erfassung dieses inflammatorischen Effektes erfolgte für jeden Probanden, jeweils an einem Kontrolltag ohne vorherige Schweißrauchexposition und einem Untersuchungstag mit vorherige Schweißrauchexposition eine Zelldifferenzierung an isolierten Cytospin™ zentrifugierten Sputum- und NL-Zellen.

Die Auswertung der Präparate erfolgte nach Standardkriterien (Heckner und Freud, 2001) an mindestens 100 Zellen an einem Phasenkontrast-Mikroskop (Laborlux S™, Leitz). Zur Auswertung gelangten Epithelzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten (Abb. 4-8).

Abb. 4: Epithelzelle (→), isoliert aus Sputum, nach kombinierter Giemsa/May-Grünwald Färbung im Phasenkontrast

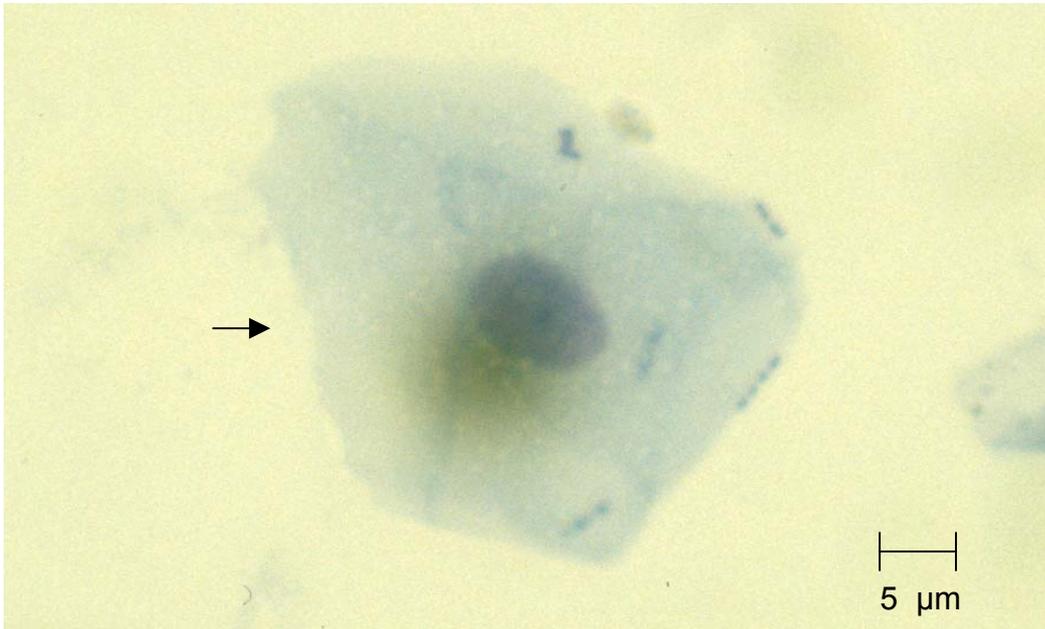


Abb. 5: Alveolarmakrophage (→), isoliert aus Sputum, nach kombinierter Giemsa/May-Grünwald Färbung im Phasenkontrast



Abb. 6: T-Lymphozyt (→), isoliert aus Sputum, nach kombinierter Giemsa/May-Grünwald Färbung im Phasenkontrast

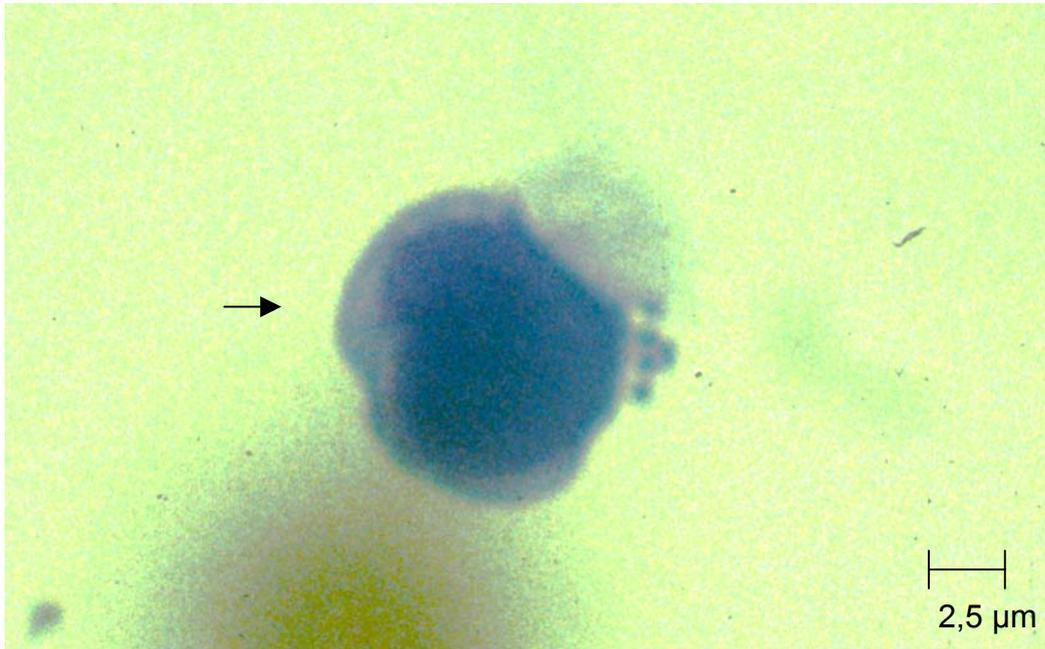
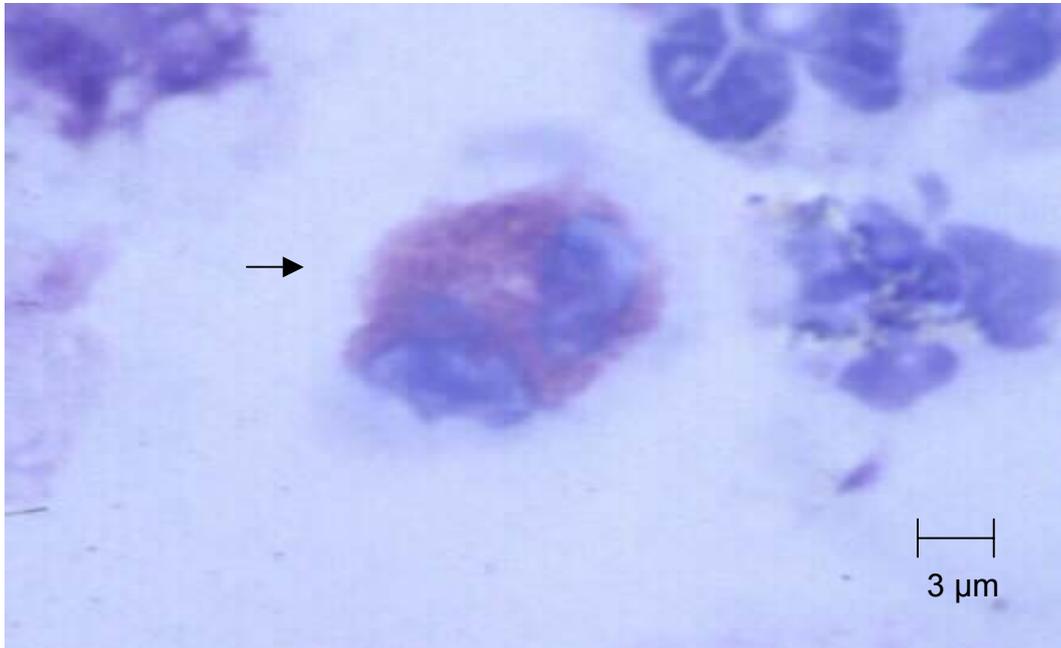


Abb. 7: Neutrophiler Granulozyt (→), isoliert aus Sputum, nach kombinierter Giemsa/May-Grünwald Färbung im Phasenkontrast



Abb. 8: Eosinophiler Granulozyt (→), isoliert aus Sputum, nach kombinierter Giemsa/May-Grünwald Färbung im Phasenkontrast



11. Molekulargenetische Methoden

11.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Chomcynski (1993) aus Zellen des Sputums und der NL. Die Aufarbeitung wurde standardisiert unter Verwendung eines Gesamt-RNA-Isolierungs-Kits (Invitrogen) durchgeführt.

11.1.1 Arbeitsbedingungen

Für eine Isolierung der RNA ist es außerordentlich wichtig, daß die tief gefrorenen Zellen zu keinem Zeitpunkt bis zur Homogenisierung im Lysepuffer auftauen, da sonst, bedingt durch das Platzen der Zellen während des Auftauvorgangs, die freiwerdende RNA durch RNasen geschädigt wird. Aus diesem Grund, wurde der Lysepuffer direkt auf das noch gefrorene Zellpellet gegeben.

Bei Isolierungen der RNA ist stets auf RNase freie Laborgeräte und Reagenzien zu achten. Daher sind besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNA zu treffen. Nach Möglichkeit sollten steriles RNase-freies Kunststoffmaterial und Lösungen gekauft werden, für die Verwendung von wieder verwertbaren Laborgeräten und selbst angesetzten Lösungen haben sich nachstehende Vorkehrungen gegen RNase-Kontaminationen bewährt.

11.1.2 Vorbehandlung von Geräten

Glas-, Metallgeräte, Magnetrührstäbe: 4 Stunden bei 180-200 °C inkubieren;

Elektrophoresesapparaturen:

CHCl₃ /Ethanol-Reinigung;

bzw.

10 Minuten Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Inkubation mit anschließender Spülung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser;

11.1.3 Vorbehandlung von Lösungen

Lösung mit 0,1 % DEPC versetzen und 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) rühren.

Quantitative Zersetzung von DEPC: Lösung 15 Minuten lang sieden;

11.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Tris-EDTA (TE)-Puffer:

10 mM Tris-HCl (Merck)	1,20 g/l
1 mM EDTA (Merck)	0,37 g/l

pH 7,5 mit HCl einstellen;

Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS) Puffer:

137 mM NaCl (Merck)	8,00 g/l
2,4 mM KCl (Merck)	0,18 g/l
10 mM Na ₂ HPO ₄ (Merck)	1,42 g/l
1,8 mM KH ₂ PO ₄	0,24 g/l

in 800 ml destilliertes Wasser lösen und auf pH 7,4 adjustieren, mit H₂O_{bidest.} auf 1000 ml auffüllen;

Ethanol, absolut, p.a. (Merck);

95 % Ethanol, p.a.;

70 % Ethanol, p.a.;

1xRNA Wasch-Lösung (Invitrogen):

500 mM NaCl	25 ml
95 % Ethanol	100 ml;

Isopropanol, p.a. (Merck);

10 x DNase Puffer (Invitrogen):

40 mM Tris, pH 8,6

6 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂;

RNase-freie DNase (Invitrogen)

2 U/μl;

10 x DNase Puffer (Invitrogen)

40 mM Tris, pH 8,0

6 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂;

Lysis Puffer:

TE-Puffer

150 μl

Binde-Puffer

450 μl;

Binde-Puffer (Invitrogen):

7 M Guanidine-HCl (RNase-Inhibitor (Gassen und Schrimpf, 1999))

2 % Triton X-100 (Protein-Solubilisator), (Ibelgaufts, 1990);

Super-Wasch-Lösung (Invitrogen):

5,25 M Guanidine-HCl, 1 % Triton X-100

20 ml

Isopropanol

10 ml;

11.1.5 Durchführung der Gesamt-RNA-Isolierung

1. Zellyse:

- Zellpellet (5×10^4 bis 5×10^6 Zellen) mit 600 μl Lysis Puffer inkubieren und mittels dreimaligen Aufziehen in eine sterile Spritze mit Kanüle (18 gauge) homogenisieren;

2. Nucleinsäure-Bindung:

- Die Entfernung verbliebener Zellfragmente erfolgt mittels Zentrifugation, 2000 x g, 3 Minuten, RT; der Überstand wird in ein neues ERG überführt;

- Zellysat mit 300 µl Isopropanol versetzen und 6-10 x durch kippen vermischen;
- Lösung in S.N.A.P. Total RNA Säule mit aufgesetztem Collection Tube überführen;
- Mittels Zentrifugation, 2000 x g, 1 Minute, RT erfolgt die Bindung der Nucleinsäuren (RNA, DNA) an das Säulengranulat die abzentrifugierte Suspension wird verworfen;
- Zugabe von 600 µl Super-Wasch-Lösung, Zentrifugation, RT, 2000 x g, 1 Minute;
- Zugabe von 600 µl 1xRNA Wasch-Lösung, Zentrifugation, RT; 2000 x g, 1 Minute;
- Zugabe von 600 µl 1xRNA Wasch-Lösung, Zentrifugation, RT, 2000 x g, 2 Minute; Collection Tube erneuern;

3. Nucleinsäure-Elution I:

- Auftragen von 135 µl RNase-freiem H₂O_{bidest.}, 5 Minuten Inkubation, RT; Zentrifugation, 2000 x g, 1 Minute, RT; im erhaltenen Eluat befindet sich die isolierte Nucleinsäure;

4. DNA Lyse:

- Zugabe von 15 µl DNase Puffer und 1 µl RNase-freie DNase, 37 °C; 10 Minuten inkubieren;
- Zugabe von 450 µl Binde-Puffer, mischen;
- Zugabe von 300 µl Isopropanol, mischen;
- Lösung in S.N.A.P. Total RNA Säule mit aufgesetzten Collection Tube überführen;
- Zugabe von 600 µl 1xRNA Wasch-Lösung; Zentrifugation, 2000 x g, RT; 1 Minute;
- Zugabe von 600 µl 1xRNA Wasch-Lösung; Zentrifugation, 2000 x g, RT, 2 Minute; Collection Tube erneuern;

5. Nucleinsäure-Elution II:

- Auftragen von 125 µl RNase-freies H₂O_{bidest.}, 5 Minuten Inkubation, RT; Zentrifugation, 2000 x g, 1 Minute, RT; die Gesamt-RNA befindet sich jetzt im Reaktionsgefäß;

6. RNA Fällung:

- Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 fachen Volumen absolute, unvergällten Ethanol zur RNA Lösung;

- Inkubation 1 Stunde bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (flüssiger Stickstoff) oder über Nacht bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Zentrifugation bei $16.100 \times g$ und $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 Minuten;
- Waschen des RNA-Pellet mit eiskaltem 70 % Ethanol, erneute Zentrifugation bei $16.100 \times g$ und $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 Minuten;
- Lösen des RNA-Pellet in $20\text{ }\mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$; Lagerung bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$;

Die Zentrifugation der Collection Tubes erfolgte mittels einer Heraeus Christ Zentrifuge (Typ: Christ, HSS 4500 Rotor, Heraeus), für die Fällung der RNA wurde eine Kühlzentrifuge der Firma Eppendorf (Typ: 5415 R, Standardrotor F45-24-11) verwendet.

11.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Um den RNA-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, können eine Reihe verschiedener, mehr oder weniger genauer und aufwendiger Verfahren angewendet werden.

Hinsichtlich der geringen Menge isolierter Gesamt-RNA aus Sputum und NL (10 bis 120 ng) konnte auf eine konventionelle spektralphotometrische Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration (reliabler Messbereich: A_{260} 0,1 - 1,0 OD, das entspricht einer Konzentration zwischen 5 - 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), (Lit.: Clark und Swika, 1977; Gassen und Schrimpf, 1999) nicht zurückgegriffen werden. Für eine rasche Grobabschätzung kleinster Mengen Gesamt-RNA aus Sputum und NL erwies sich ein kommerziell erhältliches Nucleinsäure-Nachweis-Testsystem (DNA DipStick Kit, Invitrogen) mit einer Nachweisgrenze von 0,1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ als das geeignetste. Grundlage dieses Testsystems ist die spezifische Bindung eines Teststreifen-Kopplungsagens an Nucleinsäuren, welches in einer anschließenden Entwickler-Reaktion farblich kenntlich gemacht wird.

11.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Kopplungs Lösung (Invitrogen);

Entwickler (Invitrogen);

Wasch Lösung (Invitrogen);

Teststreifen mit Trägersubstanz (DNA DipSticks, Invitrogen);

H₂O_{bidest.};

11.2.2 Durchführung der RNA Konzentrationsbestimmung

- Die Verwendung des DNA DipStick Kit erlaubt eine Nucleinsäurebestimmung im Bereich von 0,1 und 10 ng/μl. Zu diesem Zweck ist es erforderlich, 1 μl der zu testenden RNA, gegebenenfalls in einer dem Meßbereich Rechnung tragenden Verdünnung, auf die Teststreifen-Membran aufzutragen;
- 10 Minuten Trocknen der aufgetragenen RNA;
- Plazierung des Teststreifen in einer Kunststoffküvette mit 1 ml Waschlösung für 10 Sekunden;
- Im Anschluß erfolgt eine Inkubation des Teststreifens mit 1 ml Kopplungs Lösung für 3 Minuten;
- Abspülen des Teststreifens mit H₂O_{bidest.};
- Plazierung des Teststreifen in einer Kunststoffküvette mit 1 ml Waschlösung für 4 Minuten;
- Inkubation in 1 ml Entwickler Lösung für 2 Minuten;
- Abspülen des Teststreifens mit H₂O_{bidest.} für mindestens 20 Sekunden;
- Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgt durch Abgleich der Farbintensität der getesteten RNA mit Konzentrationsstandards auf einer Referenzkarte;

11.3 RNA Qualitätskontrolle – Analytische TBE-Gelelektrophorese

Eine gute und schnelle Methode, die Qualität der isolierten Gesamt-RNA optisch zu überprüfen, stellt die gelelektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel unter RNase-freien Bedingungen dar (Farrel, 1993). Bei einer intakten RNA-Probe sind 2 diskrete Banden repräsentativ für die 28S und 18S rRNA sichtbar. Der „Schmier“ zwischen den beiden Banden entspricht der mRNA. Fehlende ribosomale Banden

bzw. zusätzliche Banden unterhalb der 18S rRNA oder präferentielles „Schmier“ der Bande zum unteren Ende des Gels hin stellen ein Kennzeichen für einen RNA Verdau dar und sind somit ein Indiz einer fehlerhafte RNA Isolierung. Limitierender Faktor dieser Untersuchungsmethode stellt die einzusetzende Menge an Gesamt-RNA von 100 ng dar. Im Vergleich hierzu betrug die durchschnittliche Menge der isolierten Gesamt-RNA aus Sputum und NL zwischen 10 und 120 ng. Aus diesem Grund erfolgte eine Qualitätsüberprüfung der Gesamt-RNA lediglich exemplarisch im Sinne der Methodenetablierung.

11.3.1 Verwendete Puffer, Lösungen und Geräte

H₂O₂ p.a. (Riedel-de Haen) 0,3 %;

TBE-Laufpuffer (Life Technologies)

Tris 90 mM

EDTA, pH 8,0 0,2 mM

DEPC behandeltes H₂O₂;

Agarose 1,3 %

(Bio Whittaker, Schmelzpunkt ≤ 75 °C, Geliertemperatur < 35°C, Trenngrenze 2 % Agarose: 150 – 800 bp DNA);

Probenauftragspuffer (Sigma):

0,05 % Bromphenolblau

40 % Saccharose

0,1 M EDTA, pH 8,0

0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS);

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg Ethidiumbromid (Sigma) pro ml H₂O_{bidest.};

Gelkammer (MWG, Gelgröße: 14 cm x 11 cm: 100 ml Volumen);

11.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA

1. RNase Dekontamination der Gelapparatur: Spülen der Gelapparatur mit 0,3 % H₂O₂;
2. Matrix: 1,3 g Agarose mit 98,7 ml TBE-Laufpuffer und 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) ansetzen;
3. Gelgießen und nach Polymerisierung mit TBE-Puffer überschichten;
4. RNA Denaturierung: Die aufzutragende RNA-Menge 5 Minuten bei 65° C denaturieren und anschließend auf Eis lagern;
5. RNA-Auftrag: RNA mit 1/10 Volumen Laufpuffer versetzen und in Gelkammer übertragen;
6. Gelelektrophorese bei 80 Volt für 1,5-3 Stunden;
7. Gelanalyse auf einem UV-Transilluminator (MWG);

11.4 Reverse Transkription

Basierend auf dem Reaktionsprinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche DNA als Matrix benötigt, ist es erforderlich, mittels reverser Transkription eine Umschreibung der RNA in first-strand-komplementäre DNA (cDNA) vorzunehmen. Diesbezüglich wurde das Verfahren des Oligo(dT)-Priming angewandt. Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (cDNA Cycle Kit, Invitrogen).

11.4.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Oligo dT Primer (Invitrogen)	200 ng/µl;
RNase Inhibitor (Invitrogen)	10 units/µl;
AMV-RTase (Invitrogen) (Avian myeloblastosis virus Reverse Transcriptase);	10 units/µl
5xRT-Puffer (Reverse Transkriptase Puffer), (Invitrogen)	

500 mM Tris-HCl, pH 8,3

200 mM KCl

50 mM MgCl₂

Spermidine 2,5 mM ;

dNTPs (Invitrogen) 100 mM

25 mM dATP

25 mM dTTP

25 mM dCTP

25 mM dGTP;

Natrium-Pyrophosphat (Invitrogen) 80 mM;

EDTA (Ethyldiamintetraacetat), (Invitrogen) 500 mM;

Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol, pH 8,0
(25/24/1), (Invitrogen);

Ammonium Acetat (Invitrogen) 4 M;

10 x PCR Puffer (Invitrogen)

500 mM KCl

25 mM MgCl₂

100 mM Tris-HCl, pH 8,3

0,01 % Gelatine;

H₂O_{bidest.};

Ethanol, absolut, p.a. (Merck);

11.4.2 Durchführung der Reversen Transkription

Für die erfolgreiche Durchführung der reversen Transkription wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöste RNA im Bereich zwischen 0,01 und 1 μg verwendet. Die Pipetierschritte erfolgten auf Eis. Die thermischen Inkubationen der Reaktionsmische erfolgten in einem Thermocycler (MWG-Biotech, Primus 25/96).

Sekundärstruktur-Denaturierung:

- Für eine Aufhebung möglicher RNA-Sekundärstrukturen wurden in einem 0,5 ml ERG 1-8 μl RNA (0,01 bis 1 μg) mit 1 μl Oligo (dT)-Primer versetzt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 11,5 μl aufgefüllt und für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt;
- Im Anschluß hieran erfolgte eine Inkubation des Reaktionsgemisch bei RT für 2 Minuten;

Reverse Transkription:

- Der auf Eis zwischengelagerten und denaturierten RNA/Primer-Lösung wurden folgende Agenzien hinzugefügt:
 - 1 μl RNase Inhibitor
 - 4 μl 5 x RT-Puffer
 - 1 μl 100 mM dNTPs
 - 1 μl 80 mM Natrium-Pyrophosphat
 - 0,5 μl AMV Reverse Transkriptase;
- Die Reaktionslösung wurde für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 95 °C denaturiert;
- Bei RNA-Konzentrationen von weniger als 100 ng wurde dem Reaktionsansatz erneut 0,5 μl AMV Reverse Transkriptase hinzupipettiert werden;
- Im Anschluß hieran erfolgte eine weitere Inkubation bei 42 °C für 60 Minuten mit abschließender Denaturierung bei 95 °C für 3 Minuten;

Proteinfällung:

- Eine Abtrennung der in Lösung verbliebenen Proteine erfolgte mittels der Phenol/Chloroform-Extraktion. Hinsichtlich einer Optimierung der first strand cDNA Ausbeute wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion in Gel-Lock ERG (Eppendorf) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Reaktionsgemisch

zusammen mit 1 μl EDTA (pH 8,0) und 20 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol in das Gel-Lock ERG auf das am Gefäßboden befindliche Gel pipettiert und bei 12000-16000 x g für 5 Minuten zentrifugiert (Typ: 5415 R, Standardrotor F45-24-11, Eppendorf). Das darin enthaltene Gel trennte nach Zentrifugation die wäßrige (obere) von der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (untere) Phase. Die auf dem Gel gelegene wäßrige Phase mit der first strand cDNA konnte somit vollständig abpipettiert werden.

Ethanol-fällung:

- Überführung des abgenommenen Überstand in ein neues steriles 1,5 ml ERG;
- Zugabe von 22 μl 4 M Ammoniumacetat und 88 μl 100 % Ethanol;
- Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 Minuten;
- Zentrifugation bei 16100 x g für 30 Minuten, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$; Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen;
- Auf das Pellet 500 μl 70 % Ethanol geben;
- Zentrifugation bei 16100 g für 15 Minuten, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$; Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen;
- Das Pellet wurde mit 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgenommen und bis zur Zytokin-Quantifizierung mittels PCR bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert;

11.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR besteht darin, daß spezifische Oligonukleotidprimer an ihre homologen Bereiche in der denaturierten Matrizen-DNA binden, die dann enzymatisch in 5' \rightarrow 3' Richtung verlängert werden. Durch Auswahl der Primerbindungsstellen können die so synthetisierten DNA-Abschnitte genau eingegrenzt werden. Wird beispielsweise mit einem Primerpaar gearbeitet, das flankierend im 3' bzw. 5' Abschnitt des zu amplifizierenden Bereichs bindet, erfolgt die DNA-Synthese mindestens bis zur nächsten Primerbindungsstelle. Um eine Amplifizierung zu erreichen, muß dieser Prozeß mehrere Male hintereinander ablaufen können. Voraussetzung hierfür ist zum einen, daß neu gebildete DNA-Doppelstränge immer wieder denaturiert werden, damit die Matrizen-DNA für die im Überschuß vorhandenen Oligonukleotidprimer wieder zur Verfügung steht. Zum anderen muß

das synthetisierende Enzym diese wiederholten Denaturierungsschritte unbeschadet überstehen. Dieses anfängliche Problem wurde durch die Isolierung von DNA-Polymerasen aus thermostabilen Organismen (z.B. *Thermus aquaticus*, *Bacillus stearothermophilus*) gelöst.

Damit ist der gesamte Ablauf einer PCR in vier Schritte unterteilt, wobei jeder Schritt durch ein charakteristisches Temperaturprofil gekennzeichnet ist:

1. Denaturierung der Matrizen-DNA und DNA-Primer;
2. Bindung der Primer an homologe Abschnitte in der Matrizen-DNA;
3. DNA-Synthese ausgehend von den 3' Enden der DNA-Primer;
4. Denaturierung der neugebildeten DNA-Doppelstränge.

In der quantifizierenden PCR kann man unter bestimmten Bedingungen direkt anhand der Menge des PCR-Produktes auf die Menge an eingesetzter Matrizen-DNA schließen. Auf diese Weise kann beispielsweise die Transkriptionshäufigkeit eines bestimmten Gens ermittelt werden. Der erste Schritt einer solchen quantifizierenden PCR ist eine cDNA-Synthese unter Verwendung von sequenzspezifischen Primern (Reverse Transkription). Bei der anschließenden RT-PCR werden sequenzspezifische Primer verwendet, die aus der bekannten cDNA-Sequenz abgeleitet werden. Zur genauen Berechnung der eingesetzten Menge einer bestimmten cDNA-Spezies wird ein Amplifikations-Standard benötigt. Wenn ein solcher Standard in einem Parallelansatz amplifiziert wird, bezeichnet man ihn als externen Standard (two-cup RT-PCR). Erfolgt eine Amplifikation des Standards im gleichen Reaktionsansatz, bezeichnet man ihn als internen Standard (one-cup RT-PCR). Weiterhin kann man hinsichtlich der Amplifikation des internen Standards eine kompetitive von einer komparativen PCR unterscheiden. Erstere zeichnet sich dadurch aus, daß Standard-DNA und cDNA mit Hilfe des gleichen Primerpaares amplifiziert werden. Dadurch ermöglicht die kompetitive PCR, im Gegensatz zur komparativen PCR, eine homologe Amplifizierung der Untersuchungs-cDNA (Ziel DNA) und Standard-DNA über die exponentielle Phase hinaus bis in die Plateau-Phase der PCR (Gassen und Schimpf, 1999).

Eine erste Quantifizierung der zu untersuchenden proinflammatorischen Zytokine TNF- α - IL-1 β , IL-6 und IL-8 erfolgte in dieser Studie mittels der RT-PCR unter

Verwendung eines externen Standards (two-cup RT-PCR). Darüber hinaus fand für signifikant auffällige Zytokine (TNF- α und IL-8) eine genauere Konzentrationsbestimmung unter Verwendung der kompetitiven PCR statt.

11.5.1 Verwendete Oligonukleotidprimer, Puffer und Lösungen

Eine Amplifikation des „housekeeping“ Gens G3PDH erfolgte mittels kommerziell erworbener Primer (Clontech). Eine Oligonukleotidsynthese der Primer TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Tab. 5) wurden analog, respektive für IS-TNF- α und IS-IL-8 in Anlehnung, zur Primärliteratur in Auftrag gegeben (MWG). Alle im Auftrag synthetisierten Primer wiesen einen HPSF-Standard (highly purified salt free) auf.

Tab. 5: Verwendete Oligonukleotidprimer

Primer		Sequenz (5' → 3')	mRNA Bindungsstelle (Zytokine bzw. λ -ZipLox)	Primer [bp]	Amplifikat [bp]	Herkunft
G3PDH	up	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	Pos. 586-605	20	452	Clontech
	dn	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	Pos. 1037-1017	21		Clontech
TNF- α	up	5'-GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGC A 3'	Pos. 404-434	31	444	MWG
	dn	5'-GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC T-3'	Pos. 847-817	31		MWG
IL-1 β	up	5'-ATG GCA GAA GTA CCT AAG CTC GC-3'	Pos. 87-109	23	802	MWG
	dn	5'-ACA CAA ATT GCA TGG TGA AGT CAG TT-3'	Pos. 888-863	26		MWG
IL-6	up	5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3'	Pos. 34-56	23	628	MWG
	dn	5'-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3'	Pos. 661-640	22		MWG
IL-8	up	5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3'	Pos. 1-24	24	289	MWG
	dn	5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C-3'	Pos. 289-265	25		MWG
IS-TNF- α	up	5'-GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGC ATA CCA GCT TTC CCT ATA GTG-3'	Pos. 288-308	51	306	MWG

IS-TNF- α	dn	5'-GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC TGT TGC CCG TCT CAC TGG TGA- 3'	Pos. 593-573	51	306	MWG
IS-IL-8	up	5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT TAC CAG CTT TCC CTA TAG TG-3'	Pos. 288-308	44	306	MWG
	dn	5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT CGT TGC CCG TCT CAC TGG TGA-3'	Pos. 593-573	45		MWG

G3PDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, (Arcari et al., 1984; Ercolani et al., 1988);

TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor alpha, (Shirai et al., 1985);

IL-1 β : Interleukin beta, (Clark et al., 1987);

IL-6: Interleukin 6, (Krishnaswamy et al., 1993);

IL-8: Interleukin 8, (Naofumi et al., 1989; Krishnaswamy et al., 1993);

IS-TNF- α : Interner Standard Tumor-Nekrose-Faktor alpha;

IS-IL-8: Interner Standard Interleukin 8;

Pos.: Position;

Advantage cDNA Polymerase Mix (5 units/ μ l), (Clontech):

Klen Taq-1 DNA Polymerase (DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*)
proofreading DNA-Polymerase (Vent-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*)
TaqStartTM Antikörper;

10 X cDNA PCR Amplifikationspuffer (Clontech)

100 mM Tris-HCl, pH 8,4

500 mM KCl

15 mM MgCl₂;

Desoxynukleotidtriphosphate:

40 mM Desoxyadenosintriphosphat (dATP)

40 mM Desoxycytosintriphosphat (dCTP)

40 mM Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)

40 mM Desoxythymidintriphosphat (dTTP)

alle verwendeten Nukleotide (Sigma) wurden in H₂O_{bidest.}^{ak} gelöst;

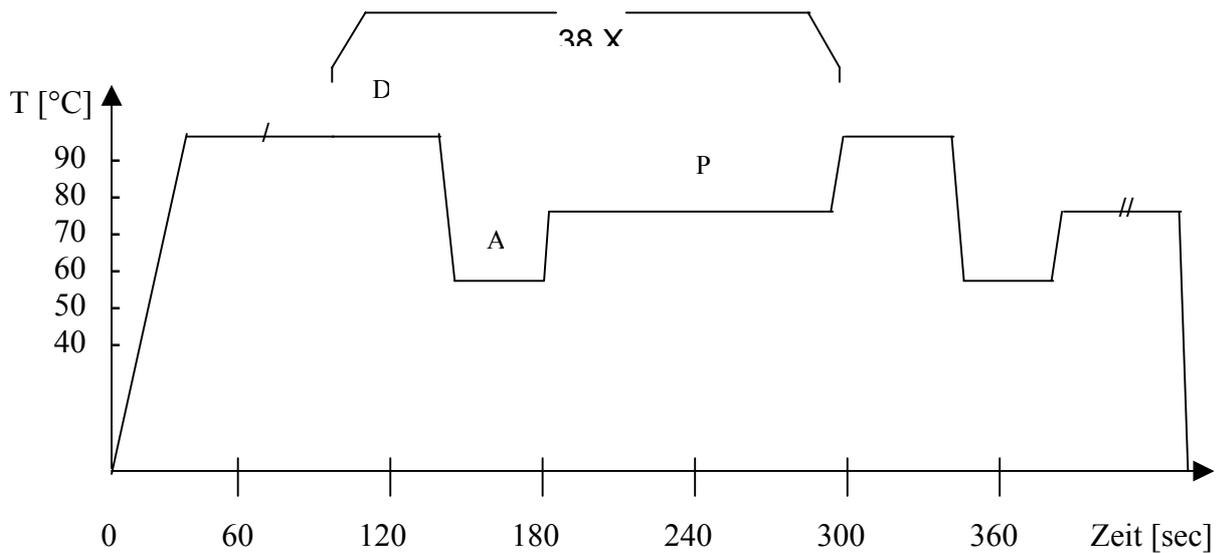
(aus den 40 mM Stammlösungen wurde ein Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) hergestellt, in denen jedes Nukleotid 10 mM konzentriert war);

G3PDH Positivkontrolle (Clontech)	50 amol/μl;
TNF-α Positivkontrolle (Clontech)	50 amol/μl;
IL-1β Positivkontrolle (Clontech)	50 amol/μl;
IL-6 Positivkontrolle (Clontech)	50 amol/μl;
IL-8 Positivkontrolle (Clontech)	50 amol/μl;
Restriktionsendonuclease Dde I (Life Technologies), (isoliert aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>);	500 U; 10 U/μl
Restriktionsendonuclease EcoR I (Life Technologies), (isoliert aus <i>Escherichia coli</i>);	5000 U; 10 U/μl
Restriktionsendonucleasen Reaktions Puffer 3 (Life Technologies)	
Tris-HCl, pH 7,2	500 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	1 M;
Bakteriophagen DNA λZIPLOX™, EcoR I Arms (Life Technologies);	0,25 μg/μl
Ammonium Acetat (Invitrogen)	4 M;
Ethanol, absolut, p.a. (Merck);	

11.5.2 PCR-Temperaturprofil

Für die Evaluierung der Methode wurden verschiedene Variationen bezüglich Annealingtemperatur und –zeit ausgetestet. Das hieraus resultierende und optimierte PCR-Temperaturprofil sowie die jeweiligen Inkubationszeiten stellen sich wie folgt dar (Abb. 9).

Abb. 9: Verwendetes PCR-Temperaturprofil



D: Denaturierung - 94° C, 45 sec;

A: Annealing - 60° C, 45 sec;

P: Polymerisation - 75° C, 120 sec;

/: einleitende Denaturierungszeit 105 sec;

//: terminale Polymerisationszeit 7 Minuten;

11.5.3 RT-PCR unter Verwendung eines externen Standard

Als Matrizen-DNA wurde die aus Sputum und NL isolierte und revers transkribierte cDNA verwendet. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurden bei jedem PCR-Ansatz unter gleichen Reaktionsbedingungen mit amplifiziert.

Reaktionsansatz (50 µl):

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
5'Primer	0,4 µl	0,4 µM
3'Primer	0,4 µl	0,4 µM
10 X Amplifikationspuffer	5 µl	
Tris-HCl		10 mM
KCl		50 mM

MgCl ₂		1,5 mM
Nukleotidgemisch	1 µl	
dATP		0,2 mM
dCTP		0,2 mM
dGTP		0,2 mM
dTTP		0,2 mM
H ₂ O _{bidest.} ^{ak}	40,8 µl	
Polymerase Mix	0,4 µl	2 U
cDNA	2 µl	

Für alle Ansätze wurden spezielle 0,5 ml PCR-Röhrchen (Eppendorf) verwendet. Auf Grund der Thermocycler Ausstattung mit beheizbarem Deckel (110° C) wurde auf eine Übersichtung des Reaktionsansatzes mit Mineralöl verzichtet.

Reaktionsbedingungen:

Alle Proben wurden innerhalb der exponentiellen Phase für 39 Zyklen in einem Primus 25/96™ Thermocycler (MWG) amplifiziert.

In der quantifizierenden PCR kann man unter bestimmten Voraussetzungen direkt anhand der Menge des PCR-Produktes auf die Menge an eingesetzter Matrizen-DNA schließen.

Unter Verwendung eines externen Standards ist es unbedingt notwendig zu gewährleisten, daß mit jedem Zyklus auch tatsächlich eine Verdopplung der DNA-Moleküle einhergeht. Nur in diesem sogenannten exponentiellen Bereich der PCR ist eine Quantifizierung der Matrizen-DNA möglich. Bei der Methoden-Evaluierung wurde für jedes der zu untersuchenden Zytokine diese Voraussetzung sichergestellt. Zu diesem Zweck wurde, während eine hochkonzentrierte Test-cDNA aus isolierten Sputumzellen amplifiziert wurde, in regelmäßigen Abständen 2,5 µl des Probeninhalts entnommen, quantifiziert und eine Verlaufskurve der PCR erstellt (Ergebnisse nicht gesondert aufgeführt).

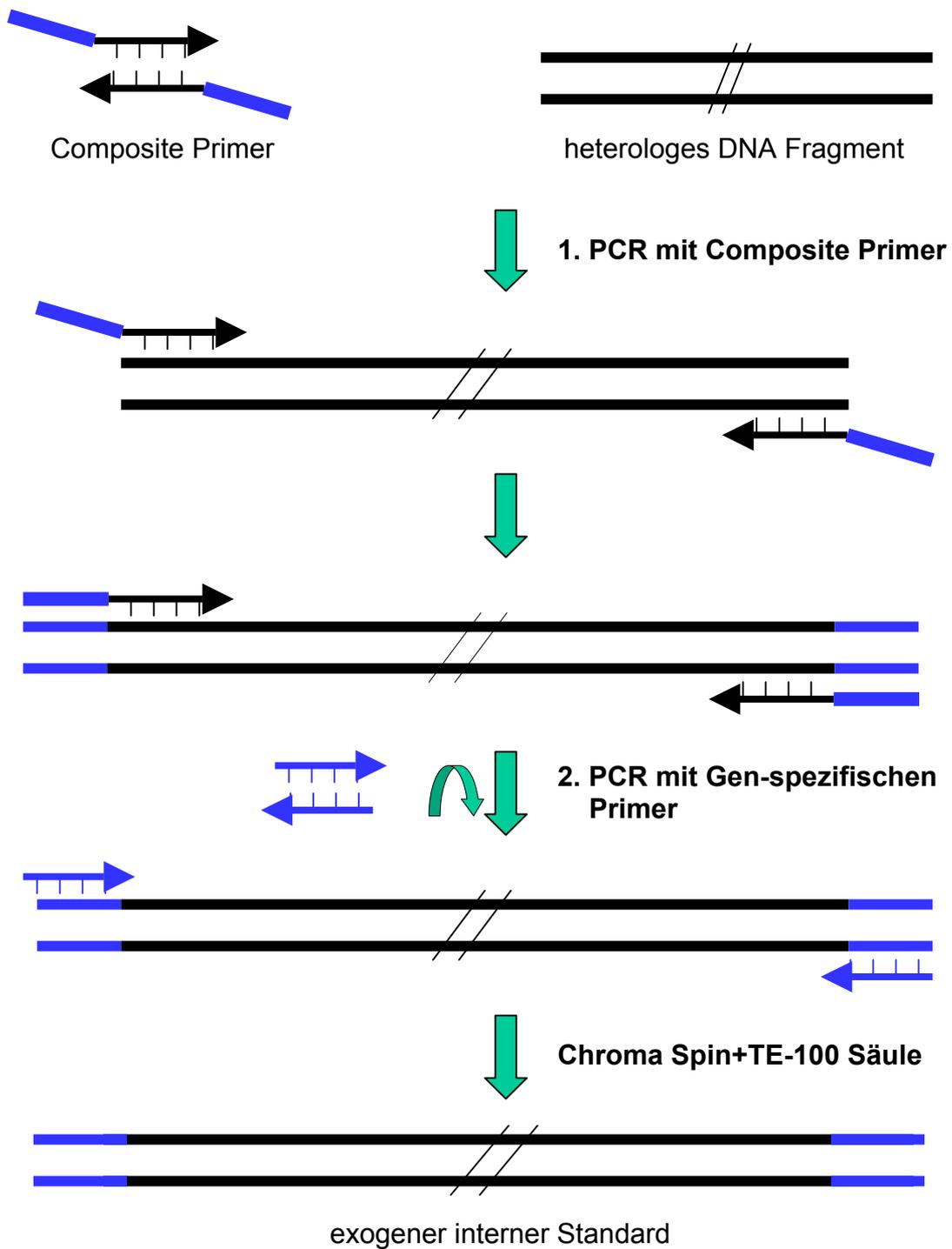
11.5.4 Molekularbiologische Herstellung exogener interner Standards der Zytokine TNF- α und IL-8

Als Standard-DNA für die kompetitive PCR ist es erforderlich, DNA Moleküle zu verwenden, welche mit der zu untersuchenden DNA größtmögliche Homologie und somit eine ähnliche Amplifikations-Kinetik aufweisen, sich jedoch auf Grund der Größe von dieser gut unterscheiden lassen. Wie unter Abschnitt 11.5 angesprochen, zeichnet sich die kompetitive PCR dadurch aus, daß Standard-DNA und cDNA mit Hilfe des gleichen Primerpaares amplifiziert werden. Aus diesen beiden Vorgaben, Homologie der Primersequenz und eine Abweichung der DNA-Fragmentlänge im Vergleich zur Untersuchungs-DNA, ergeben sich zwei Möglichkeiten bezüglich der Herstellung der Standard-DNA. Erstere basiert auf einer genetischen Veränderung einer homologen Untersuchungs-DNA mittels Insertion oder Deletion, während letztere den Einbau der zur Untersuchungs-DNA spezifischen Primersequenz in eine heterogene DNA mit Hilfe der PCR ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte für Quantifizierungen der Zytokine TNF- α und IL-8 mit Hilfe der kompetitiven PCR die molekulargenetische Herstellung der exogenen internen Standards IS-TNF- α und IS-IL-8 nach Variante zwei. Die Herstellung des exogenen internen Standards erfolgte über zwei aufeinander folgende PCR Amplifikationen der Bakteriophagen λ ZIPLOXTM DNA.

Für die erste PCR wurden jeweils zwei zusammengesetzte Primerpaare (IS-TNF- α ; IS-IL-8), („Composite Primer“) verwendet, wobei sich up-stream und down-stream Primer je aus zwei unterschiedlichen Sequenzabschnitten zusammensetzen. Während der erste Abschnitt komplementär zur heterogenen DNA des Bakteriophagen ist, entspricht der darauffolgende Abschnitt der komplementären Primersequenz der Untersuchungs-DNA. Ziel der ersten PCR (PCR I) ist es, mit der für den Bakteriophagen komplementären DNA Sequenz die für die zu quantifizierende Untersuchungs-DNA komplementäre Primersequenz an Position 5' und 3' des Amplifikats mit einzubauen. Ziel der zweiten PCR (PCR II) ist es, mit den zur Untersuchungs-DNA komplementären Primer sicherzustellen, daß die komplette Primersequenz der Untersuchungs-DNA in den exogenen internen Standard quantitativ inkorporiert wurde (Abb. 10).

Abb. 10: Graphische Darstellung der Gewinnung eines exogenen internen Standards



11.5.4.1 Protokoll

11.5.4.1.1 Restriktionsverdau

Für den Einsatz der heterogenen DNA als Matrize der PCR I wurde die Bakteriophagen DNA (4307 bp) auf die gewünschte Fragmentlänge (358 bp) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Dde I und EcoR I (Life Technologies) zugeschnitten. Diese Typ III- Enzyme (Klassifikation nach neuerer Literatur Typ IIS-Enzyme) weisen nicht-palindrome Erkennungssequenzen auf, die aus definierten Pentanukleotiden und unterschiedlich langen, nicht definierten Sequenzabschnitten bestehen (Zabeau und Roberts, 1979; Ibelgaufits, 1990).

Restriktionsendonukleasen-Schnittstellen des Bakteriophagen DNA λ ZIPLOXTM:

Dde I	620, 2116, 2525, 2733, 3273, 3695
EcoR I	263

Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen:

Dde I	5'-C↓TNA G-3'
	3'-G ANT↑C-5'
EcoR I	5'-G↓AATT C-3'
	3'- C TTAA↑G-5'

Das für die Herstellung des exogenen internen Standards angewandte Arbeitsprotokoll stellt sich wie folgt dar:

1. DNA Restriktionsansatz:

- 0,5 μ l (=0,25 μ g) Bakteriophagen DNA λ ZIPLOXTM
- 0,1 μ l (= 1 U) Dde I
- 0,1 μ l (=1 U) EcoR I
- 4 μ l 1 X Reaktions Puffer 3
- 35,3 μ l H₂O_{bidest.};

2. Inkubation bei 37° C für 1 Stunde;

3. Ethanolfällung:

- Zugabe von 1/10 Vol 4 M Ammoniumacetat und 2,5 X Vol 100 % Ethanol;
- Lagerung bei – 20 °C für 60 Minuten;
- Zentrifugation bei 16100 x g für 30 Minuten, +4 °C; Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen;
- Auf das Pellet 500 µl 70 % Ethanol geben;
- Zentrifugation bei 16100 g für 15 Minuten, +4 °C; Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen;
- Pellet in definiertem Vol H₂O_{bidest.} aufnehmen;

11.5.4.1.2 PCR I

Reaktionsansatz (50 µl):

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
5´Composite Primer	1 µl	20 µM
3´Composite Primer	1 µl	20 µM
10 X Amplifikationspuffer	5 µl	
Tris-HCl		10 mM
KCl		50 mM
MgCl ₂		1,5 mM
Nukleotidgemisch	1 µl	
dATP		0,2 mM
dCTP		0,2 mM
dGTP		0,2 mM
dTTP		0,2 mM
H ₂ O _{bidest.ak}	39,6 µl	
Polymerase Mix	0,4 µl	2 U
λ Restriktionsfragment	2 µl	2 ng

Reaktionsbedingungen:

Alle Proben wurden innerhalb der exponentiellen Phase für 20 Zyklen in einem Primus 25/96™ Thermocycler (MWG) amplifiziert.

Verwendetes PCR-Temperaturprofil:

- Denaturierung - 94° C, 45 sec;
- Annealing - 60° C, 45 sec;
- Polymerisation - 72° C, 90 sec;
- Einleitende Denaturierungszeit 105 sec;
- Terminale Polymerisationszeit 7 Minuten;

11.5.4.1.3 PCR II

Reaktionsansatz (100 µl):

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
5' Gen-spezifischer Primer	2 µl	20 µM
3' Gen-spezifischer Primer	2 µl	20 µM
10 X Amplifikationspuffer	10 µl	
Tris-HCl		10 mM
KCl		50 mM
MgCl ₂		1,5 mM
Nukleotidgemisch	2 µl	
dATP		0,2 mM
dCTP		0,2 mM
dGTP		0,2 mM
dTTP		0,2 mM
H ₂ O bidest. _{ak}	83,4 µl	
Polymerase Mix	0,6 µl	2 U
DNA (PCR I)	2 µl	10 ⁻² Verd. aus PCR I

Reaktionsbedingungen:

Alle Proben wurden innerhalb der exponentiellen Phase für 22 Zyklen in einem Primus 25/96™ Thermocycler (MWG) amplifiziert.

Verwendetes PCR-Temperaturprofil:

- Denaturierung - 94° C, 45 sec;
- Annealing - 60° C, 45 sec;
- Polymerisation - 72° C, 90 sec;
- Einleitende Denaturierungszeit 105 sec;
- Terminale Polymerisationszeit 7 Minuten;

11.5.4.1.4 Säulenchromatographische Reinigung der Standard-DNA

Für die Entfernung verbliebener Primer und Reaktionskomponenten der PCR II Reaktion wurde eine säulenchromatographische Reinigung (Chroma Spin™ +TE 100 Columns, Clontech) der Standardlösung durchgeführt.

Protokoll:

- Vermischen von Säulenpuffer und Gelmatrix;
- Säulenverschluß ober- und unterhalb der Säule entfernen;
- Aufsetzen der Säule in ein steriles 2 ml ERG;
- Zentrifugation (Christ, HSS 4500 Rotor, Heraeus) bei 700 x g für 5 Minuten, RT, dieser Schritt entfernt die Pufferlösung;
- Aufsetzen der Säule auf ein neues steriles 2 ml ERG;
- Auftragen der Standardlösung auf die Säulen-Gelmatrix;
- Zentrifugation (Christ, HSS 4500 Rotor, Heraeus) bei 700 x g für 5 Minuten, RT, die gereinigte Standard-DNA-Lösung befindet sich nun im ERG;

11.5.4.1.5 Spektralphotometrische Bestimmung der Standard-DNA Konzentration

Nukleinsäure-Lösungen können im Spektralphotometer hinsichtlich ihrer Konzentration untersucht werden (Clark und Swika, 1977). Dies geschieht durch Extinktionsbestimmung der Lösung bei 260 nm. Zur Überprüfung der Reinheit wird ein Absorptionsspektrum zwischen 220 nm und 320 nm aufgenommen. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit. Zwischen optischer Dichte (OD) und Konzentration bzw. Reinheitsgrad der DNA gilt folgende Zusammenhang:

- 1 OD = 50 µg DNA (für Oligonucleotide gilt 1 OD = 20 µg); für genaue Messungen sollte die OD₂₆₀ zwischen 0,1 und 1 liegen;
- reine DNA hat ein Verhältnis OD_{260/280} von 1,7-1,9 (Marmur 1961);

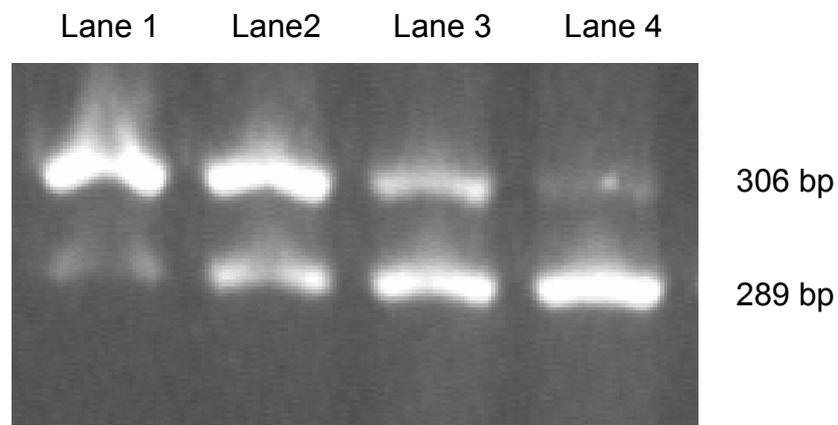
Analog hierzu erfolgte eine Bestimmung der synthetisierten Standards mit Hilfe eines Spektralphotometer (Gene Quant, Pharmacia).

11.5.5 Kompetitive PCR unter Verwendung interner Standards

Das Prinzip der kompetitiven PCR beruht auf dem Vergleich der zu analysierenden cDNA mit einem internen Standard-DNA-Molekül, das der Reaktion beigefügt wird. Während jeder PCR-Reaktion wird dabei als Referenz die interne Standard-DNA coamplifiziert. Für jedes Quantifizierungsexperiment werden in der Regel mehrere Reaktionsansätze amplifiziert, die jeweils die gleiche Menge Untersuchungs-cDNA enthalten, jedoch unterschiedliche Konzentrationen an Standard-DNA. Auf Grund ungleicher Konzentrationsverhältnisse zwischen der zu quantifizierenden cDNA und dem Standard beim Konkurrieren um die Bestandteile des PCR-Cocktails (PCR-Mastermix) kommt es zu unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen. Hieraus resultiert die Vorgehensweise, daß nur derjenige Reaktionsansatz mit annähernd gleichen Konzentrationen an Untersuchungs-cDNA und internem Standard, repräsentiert durch ähnlich stark fluoreszierende Gelbanden, für die quantitative Auswertung herangezogen wird (Abb. 11, Lane 3). Die Menge der Untersuchungs-cDNA dieses Reaktionsansatzes wird dann in Relation zur Menge der coamplifizierten Standard-DNA bestimmt.

Basierend auf den vorab mittels eines two-cup RT-PCR-Ansatzes grob determinierten Zytokinkonzentrationen erfolgte eine genauere Konzentrationsbestimmung unter Verwendung der kompetitiven PCR (one-cup RT-PCR). Diese Analysen beschränkten sich auf die aus der two-cup RT-PCR quantifizierten Zytokine mit signifikanten Unterschieden (TNF- α und IL-8). Als interne Standards dienten gentechnisch veränderte exogene DNA-Sequenzen (exogener interner Standard).

Abb. 11: Gelelektrophoretische Darstellung des mittels der kompetitiven PCR amplifizierten cDNA für IL-8 (289 bp) aus Sputum und des coamplifizierten exogenen internen Standards für IL-8 (306 bp). Dargestellt sind vier parallele PCR Ansätze (Lane 1-4) mit jeweils gleicher Menge an eingesetzter Matrizen-cDNA (untere Banden) sowie unterschiedlichen Konzentrationen des eingesetzten exogenen internen Standards 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 (obere Banden, von links nach rechts).



Als Matrizen-DNA wurde die aus Sputum und NL isolierte und revers transkribierte cDNA verwendet. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurden bei jedem PCR-Ansatz unter gleichen Reaktionsbedingungen mit amplifiziert.

Reaktionsansatz (50 μ l):

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
5'Primer	0,4 μ l	0,4 μ M

3'Primer	0,4 µl	0,4 µM
10 X Amplifikationspuffer	5 µl	
Tris-HCl		10 mM
KCl		50 mM
MgCl ₂		1,5 mM
Nukleotidgemisch	1 µl	
dATP		0,2 mM
dCTP		0,2 mM
dGTP		0,2 mM
dTTP		0,2 mM
H ₂ O _{bidest.} ^{ak}	38,8 µl	
Polymerase Mix	0,4 µl	2 U
cDNA	2 µl	
exogener, interner Standard	2 µl	Konzentration - Vorgabe two-cup RT-PCR

Reaktionsbedingungen:

Eine Quantifizierung der Proben erfolgte mit 2-4 Parallelansätzen unterschiedlicher Standardkonzentrationen. Alle Proben wurden für 39 Zyklen in einem Primus 25/96™ Thermocycler (MWG) amplifiziert. Als Verrechnungsgrundlage diente der jeweilige coamplifizierte exogene, interne Standard.

11.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen

Nukleinsäuren können in einem Agarosegel durch horizontale Gelelektrophorese ihrer Größe und Konformation nach aufgetrennt und nach anschließender Färbung mit einem interkalierenden Farbstoff (z.B. Ethidiumbromid) als fluoreszierende Banden im UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden.

Es existiert eine Vielzahl verschiedener Agarosen, die für verschiedene Fragestellungen (Trenngrenze, Weiterverarbeitung der aufgetrennten DNA) unterschiedlich gut geeignet sind. Grundsätzlich lassen sich die Trenngrenzen bei jeder Agarose zum einen über die Agarosekonzentration, zum anderen über den verwendeten Laufpuffer

(Borat- oder Acetatpuffer) beeinflussen. Hochprozentige Agarose (3 % - 4 %) trennt kleine DNA-Fragmente (100 bp-Bereich) optimal auf, während niedrig konzentrierte Agarose (0,75 %-1 %) besser große DNA-Moleküle auftrennt. Boratpuffer verbessern grundsätzlich die Auftrennung kleiner DNA-Fragmente, Acetatpuffer dagegen die großer DNA-Moleküle.

In der vorliegenden Arbeit wurden während der Phase der Methodenetablierung für die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA Fragmente konventionelle Gele mit 2 % Standard-Agarose (Bio Whittaker) verwendet. Für eine verbesserte standardisierte und schnellere Auftrennung der zu quantifizierenden DNA wurden für die Auswertung der Proben kommerzielle Trockengele (Invitrogen) verwendet.

11.6.1 Konventionelle horizontale Agarosegelelektrophorese

11.6.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen

100 bp DNA Leiter (Life Technologies) 1 µg/µl

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, 50 x konzentriert):

2 M Tris (Merck) 243,0 g/l

0,25 M Natriumacetat (Merck) 20,5 g/l

0,05 M EDTA (Merck) 18,6 g/l

pH 8,0 mit Essigsäure_{konz.} einstellen; vor Gebrauch im Verhältnis 1:50 verdünnen;

Probenauftragspuffer (Sigma):

0,05 % Bromphenolblau

40 % Saccharose

0,1 M EDTA, pH 8,0

0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

Ethidiumbromid-Stammlösung:

1 mg Ethidiumbromid (Sigma) pro ml H₂O_{bidest.}

Agarosegel:

Es wurde eine 2 % "high resolution"-Agarose (Bio Whittaker, Schmelzpunkt ≤ 75 °C, Geliertemperatur < 35 °C, Trenngrenze 2 % Agarose: 150 – 800 bp DNA) in einfach konzentriertem TAE-Puffer verwendet.

Apparaturen: Elektrophoresesysteme von Biometra

mittlere Gele (Gelgröße: 14 cm x 11 cm): 100 ml Volumen

große Gele (Gelgröße: 20 cm x 18 cm): 250 ml Volumen

11.6.1.2 Durchführung der konventionellen Agarosegelelektrophorese

- abgewogene Agarose mit entsprechendem Volumen einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer im Mikrowellenherd aufschmelzen;
- Kamm in die Apparatur einsetzen, Gelhalter abdichten, aufgeschmolzener Agarose bei ca. 50°C Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g/ml}$) zusetzen, diese in die Apparatur gießen und erstarren lassen;
- Geldicke: ca. 0,5 - 0,8 cm
Volumen der Geltaschen: 20 - 50 μl (abhängig von der verwendeten Kammgröße und Kammdicke);
- Durchführung der Elektrophorese in Laufpuffer (einfach konzentriertem TAE-Puffer, mit Ethidiumbromid 0,5 $\mu\text{g/ml}$) wahlweise mit Spannungs- oder Stromstärkenbegrenzung (Limits sind abhängig von Gelgröße, da eine Erwärmung des Elektrophoresepuffer stattfindet);
- elektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben für zwei bis sechs Stunden, bis sich der Farbmaler (Bromphenolblau) auf ca. 2/3 der Gellänge befindet;
- gefärbtes Agarosegel unter UV-Bestrahlung (366 nm) mit Video-Dokumentationssystem (Phoretix Grabber v3.00) dokumentieren.

11.6.2 Trocken-Gelelektrophorese

11.6.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

100 bp DNA Leiter (Life Technologies)
Probenauftragspuffer (Sigma):

1 µg/µl

0,05 % Bromphenolblau

40 % Saccharose

0,1 M EDTA, pH 8,0

0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

Agarosegel:

Für die Auswertung der amplifizierten cDNA Proben aus Sputum und NL wurden kommerzielle Trocken-Gelelektrophorese Kassetten (E-Gel™; Invitrogen) mit 2 % Agarose (Trenngrenze 100 bp bis 2 kb DNA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein komplettes, Flüssig-Puffer-freies Gelelektrophorese System, welches in einer UV-transparenten Gelkassette Agarose, Ethidiumbromid und Ionenaustauschmatrizes beinhaltet.

11.6.2.2 Durchführung der Trocken-Gelelektrophorese

- Leerlauf für 1-2 Minuten bei 60-70 V (oder 40-50 mA);
- Entfernen des Gelkams und Probenauftrag (5 µl Probe, 1 µl Auftragspuffer, 9 µl H₂O_{bidest.});
- elektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben für 15 bis 30 Minuten (abhängig von der Größe des aufzutrennenden DNA Fragmentes) bei 60-70 V (oder 40-50 mA), bis sich der Farbmarker (Bromphenolblau) auf ca. 2/3 der Gellänge befindet;
- gefärbtes Agarosegel unter UV-Bestrahlung (366 nm) mit Video-Dokumentationssystem (Phoretix Grabber v3.00) dokumentieren;

11.7 Quantifizierung der amplifizierten cDNA

Eine Quantifizierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Zytokin-cDNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung einer PC gestützten Auswerte-Software (Phoretix 1D Quantifier v4.01). Die Entfernung störender Hintergrundeffekte erfolgte auf der Basis einer Linienrand Subtraktion. Als Verrechnungsgrundlage diente die jeweils coamplifizierte Zytokin-Positivkontrolle als externer Standard beziehungsweise bei kompetitiv amplifizierten Proben der exogene interne Standard (IS-TNF- α , IS-IL-8).

12. Statistische Auswertung

Eine Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik-Software SPSS[®] 10.0 (SPSS GmbH Software, München). Der Vergleich der quantifizierten Entzündungsparameter vor und nach Exposition wurde mittels des nichtparametrischen Testverfahrens nach Wilcoxon durchgeführt. Analysen, inwiefern sich die beiden Untersuchungsgruppen hinsichtlich der analysierten Parameter nach Beanspruchung unterscheiden, erfolgten mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Für die Erfassung von möglichen Einflußfaktoren auf entzündliche Reaktionen wurden die Spearman Rangkorrelation (kontinuierliche Parameter) und der Mann-Whitney-U-Test (dichotome Parameter) durchgeführt. Die Testung von mehreren verbundenen Stichproben erfolgte mit Hilfe des Friedmann-Test (Zöfel, 1985;Sachs,1996).

C. ERGEBNISSE

1. Deskriptive Parameter der Fragebogenerfassung / Allergietestergebnisse

Eine Zusammenstellung der mittels Fragebogen erhobenen deskriptiven Parameter und der Allergietestergebnisse ist aus Tab. 4 ersichtlich.

Tab. 4: Charakterisierung des Untersuchungskollektivs und Allergie-Testergebnisse

Konfounder	Nicht-Schweißer	Schweißer
Alter [Jahre]		
Median	26	36
25/75er Perzentile	24/34	29/48
Min/Max	21/56	22/57
Schulabschluß		
N (Ha/Re/Ab/An)	(1/0/19/0)	(13/3/1/1)
Abgeschlossene Berufsausbildung (Ja/Nein)	(11/9)	(3/17)
Derzeitige Tätigkeit		
N (Stud/Bü/Med/Nat/Hw)	(13/1/2/3/0)	(0/0/0/0/20)
Derzeitige Tätigkeit [Jahre]		
Median	4	9
25/75er Perzentile	1/6	4/16
Min/Max	1/27	1/34
Arbeitsplatz		
N [$< 100 \text{ m}^2$ / $>100 \text{ m}^2$)	-	(6/13)
Schweißarbeiten/Tag [Stunden]		
Median	-	4,5

25/75er Perzentile Min/Max	-	3,0/5,0 0,5/8,0
Schweißverfahren N (MAG/E-Schweißen)	-	(14/6)
Metalle N (Stahl/Verschiedene)	-	(13/7)
Schutzkleidung am Arbeitsplatz (Ja/Nein)	-	(19/1)
Absauganlage am Arbeitsplatz verfügbar (Ja/Nein)	-	(12/8)
Entfernung zur Absauganlage [m] Median 25/75er Perzentile Min/Max	-	0,79 0,50/0,88 0,5/2,5
Freizeitaktivität – Sport (Ja/Nein)	(17/3)	(9/11)
Beschwerden der Atemwege am Arbeitsplatz N (Ja/Nein)	(0/20)	(7/13)
Wiederholter Husten in den letzten 12 Monaten N (Ja/Nein)	(0/20)	(9/11)
In den letzten 2 Jahren jeweils > 3 Monate Husten und Auswurf) N (Ja/Nein)	(0/20)	(5/15)
Husten am Arbeitsplatz N (Ja/Nein)	(0/20)	(5/15)

Raucher N (Ja/Nein)	(0/20)	(8/12)
Raucher seit [Jahre] Median 25/75er Perzentile Min/Max	-	13 8/23 5/32
In den letzten 2 Jahren jeweils > 3 Monate Husten und Auswurf) N (Ja/Nein)	(0/20)	(5/15)
Husten am Arbeitsplatz N (Ja/Nein)	(0/20)	(5/15)
Raucher seit [Jahre] Median 25/75er Perzentile Min/Max	-	13 8/23 5/32
Packyear Median 25/75er Perzentile Min/Max	-	7 4/17 1/20
ex-Raucher N (Ja/Nein)	(1/19)	(7/5)
ex-Raucher [Jahre] Median 25/75er Perzentile Min/Max	5 - -	10 5/25 3/42
ex-packyear Median 25/75er Perzentile Min/Max	3,6 - -	12 2/48 1/100

Geräusch im Brustkorb in den letzten 12 Monaten (Ja/Nein)	(0/20)	(4/16)
SX1 positiv (Ja/Nein)	(11/9)	(12/8)

(Ha/Re/Ab/An): (Hauptschulabschluß/Realschulabschluß/Abitur/anderer Schulabschluß)

(Stud/Bü/Med/Nat/Hw): (Student/Büroangestellter/medizinische Tätigkeit/
Naturwissenschaftler/Handwerker)

Min/Max: Minimum/Maximum

N: Anzahl

packyear: Zahl der Jahre * Zahl der Schachteln Zigaretten pro Tag

SX1: Allergie Testsystem

2. Bestimmung der Schweißrauchpartikel

2.1 Quantitative Bestimmung der Alveolarstaubkonzentration

Die Bestimmung der Alveolarstaubkonzentration erfolgte während der Schweißrauchexposition im Einatembereich der Probanden. Eine Zusammenfassung der Meßergebnisse kann aus Tab. 5 entnommen werden.

Die vergleichende Analyse alveolargängiger Partikel in der Atemluft erbrachte für Messungen während der Schweißarbeiten eine Überschreitung des allgemeinen Staubgrenzwertes (A-Staub-Fraktion) von $1,5 \text{ mg/m}^3$ um das 1,5 fache bei Nicht-Schweißern bzw. das 3,1 fache bei Schweißern.

Der Vergleich der gemessenen Partikelkonzentrationen zwischen den beiden Untersuchungskollektiven ergab keinen signifikanten Unterschied ($P_{\text{Mann-Whitney-U}} = 0,637$).

Tab. 5: Zusammenfassung der gemessenen Alveolarstaubkonzentration im Einatembereich der Probanden während der Schweißrauchexposition

Parameter	Nicht-Schweißer	Schweißer
Partikel < 4 μm [mg/m^3]		
Median	3,49	4,61
25/75er Perzentil	1,37-6,27	1,86-9,26
Minimum/Maximum	1,00-25,30	0,11-175,92

2.2 Quantitative Bestimmung der partikulären Schweißrauchzusammensetzung

Eine Übersicht der molekularen Zusammensetzung korpuskularer Schweißrauchbestandteile, welche exemplarisch aus 2 Staubmessfilter (MAG- und E-Schweißen) analysiert wurde, kann aus Tab. 6 entnommen werden. Beide

Partikelmessungen erfolgten unter gleichen Arbeitsbedingungen. In beiden Fällen diente unlegierter Stahl als Schweißmaterial.

Wie aus Tab. 6 ersichtlich konnte für Cu, Fe, Mn und Fe₂O₃ ein erhöhter Anteil während des MAG Schweißens gegenüber dem E-Schweißen ermittelt werden.

Tab. 6: Quantitative Bestimmung der partikulären Schweißrauchzusammensetzung

Parameter	Cd [mg/m ³]	Co [mg/m ³]	Cr [mg/m ³]	Cu [mg/m ³]	Fe [mg/m ³]	Mn [mg/m ³]	Fe ₂ O ₃ [mg/m ³]
MAG	0,000	0,001	0,010	0,148	2,393	0,265	3,423
E-Schweißen	0,000	0,001	0,013	0,012	0,894	0,159	1,279

3. Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsproteine und vasokonstriktiver Proteine mittels ELISA im peripherem Blut

Für die Bestimmung Schweißrauch-induzierter Veränderungen der analysierten Zytokine und des Vasokonstriktors Endothelin-1 im Blut wurde, getrennt nach Kollektiven, ein Vergleich der quantifizierten Parameter vor und nach Exposition durchgeführt. Wie aus Abb. 12 bzw. 13 und Tab. 7 ersichtlich konnte für den Parameter ENA-78 bei Schweißern ($P_{\text{Wilcoxon}} < 0,001$) sowie für Endothelin bei Nicht-Schweißern ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,006$) ein höchst signifikanter Anstieg bzw. Abfall dokumentiert werden. Alle anderen Parameter weisen keine eindeutigen Veränderungen auf.

Bei der Bestimmung der intraindividuellen Unterschieden zwischen dem Kollektiv der Nicht-Schweißer und dem der Schweißer konnte für das Kollektiv der Schweißer ein signifikant erhöhter Unterschied der Parameter ENA-78 (ENA-78; $P_{\text{Mann-Whitney-U}} <$

0,001) und sICAM-1 (sICAM-1; $P_{\text{Mann-Whitney-U}} = 0,044$) gegenüber dem der Nicht-Schweißern verzeichnet werden (Tab. 7).

Eine Zusammenfassung der mittels ELISA quantifizierten Ergebnisse der Zytokine, Adhäsionsproteine und vasokonstriktive Proteine ist in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Vergleich der mittels ELISA quantifizierten Untersuchungsparameter in Blutplasma und –serum

Parameter	N-S Leer	N-S Exp	S Leer	S Exp	Δ N-S [%]	Δ S [%]
TNF- α						
Med	1,86	1,78	2,22	1,75	-8	-9
25/75er	1,70/2,23	1,58/1,89	1,73/2,35	1,52/2,37	-22/17	-17/11
Min/Max	1,06/2,68	1,36/2,82	1,50/4,42	1,16/4,86	-37/29	-33/99
[pg/ml]	$P_W = 0,145$		$P_W = 0,523$		$P_M = 0,446$	
IL-1 β						
Med	0,11	0,007	0,25	0,36	1	5
25/75er	0,05/0,22	0,03/0,21	0,00/0,52	0,06/0,65	-86/183	-50/217
Min/Max	0,00/1,24	0,00/1,74	0,00/2,08	0,00/2,93	-100/5782	-100/9425
[pg/ml]	$P_W = 0,881$		$P_W = 0,246$		$P_M = 0,515$	
IL-6						
Med	0,70	0,82	0,91	0,87	7	4
25/75er	0,46/0,95	0,50/1,26	0,58/1,32	0,39/1,96	-20/47	-54/89
Min/Max	0,18/3,29	0,25/3,48	0,09/3,24	0,12/3,05	-59/275	-80/200
[pg/ml]	$P_W = 0,232$		$P_W = 0,573$		$P_M = 0,555$	

C. Ergebnisse

IL-8						
Med	2,54	2,03	1,52	1,14	-54	-13
25/75er	1,33/7,23	0,57/4,89	0,95/6,09	0,57/3,62	-94/50	-64/50
Min/Max	0,00/	0,00/	0,19/	0,19/	-100/	-97/
[pg/ml]	155,52	8,08	21,89	463,83	320	3961
	$P_W = 0,150$		$P_W = 0,420$		$P_M = 0,609$	
ENA-78						
Med	637,47	685,47	247,60	888,51	1	405
25/75er	543,65/	522,68/	104,06/	594,89/	-8/	102
Min/Max	1072,52	1191,87	520,80	1574,77	16	/922
[pg/ml]	425,94/	429,16/	33,16/	490,02/	-28/	43/
	3136,00	3105,20	1078,86	4000,00	44	2938
	$P_W = 0,391$		$P_W < 0,001$		$P_M < 0,001$	
sICAM-1						
Med	199,58	189,11	268,19	302,84	-2	14
25/75er	179,38/	155,06/	226,62/	284,40/	-10/	0/
Min/Max	221,90	207,35	292,06	366,46	2	45
[ng/ml]	143,54/	11,77/	184,66/	10,27/	-95/	-97/
	267,30	226,17	757,04	723,64	10	63
	$P_W = 0,059$		$P_W = 0,064$		$P_M = 0,044$	
Endothelin-1						
Med	2,15	1,81	2,05	2,03	-16	0,3
25/75er	1,77/2,34	1,46/2,11	1,47/2,34	1,49/2,25	-22/-7	-18/31
Min/Max	1,25/3,33	1,13/3,36	1,05/3,49	1,25/3,06	-42/25	-37/65
[pg/ml]	$P_W = 0,006$		$P_W = 0,929$		$P_M = 0,053$	

P_W : P_{Wilcoxon}

P_M : $P_{\text{Mann-Whitney-U}}$

Δ : Prozentuale Veränderung ((Exp – Leer)/Leer*100)

positiver Wert = Anstieg während Exp

negativer Wert = Abfall während Exp

25/75er: 25/75er Perzentile

Exp: Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition

Max: Maximum

Med: Median

Min: Minimum

Leer: Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition

N-S: Nicht-Schweißer

S: Schweißer

Die individuellen Veränderungen der Blutparameter mit statistisch signifikanten Veränderungen zwischen Kontroll- und Expositionstag sind in Abb. 12 und 13 dargestellt.

Abb. 12: ENA-78 ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

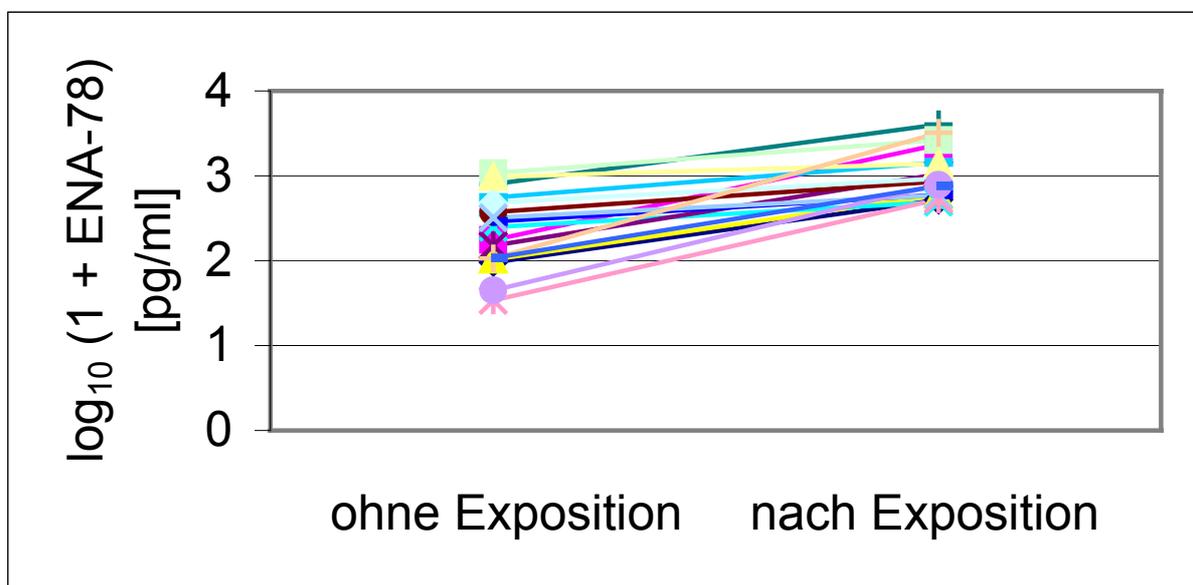
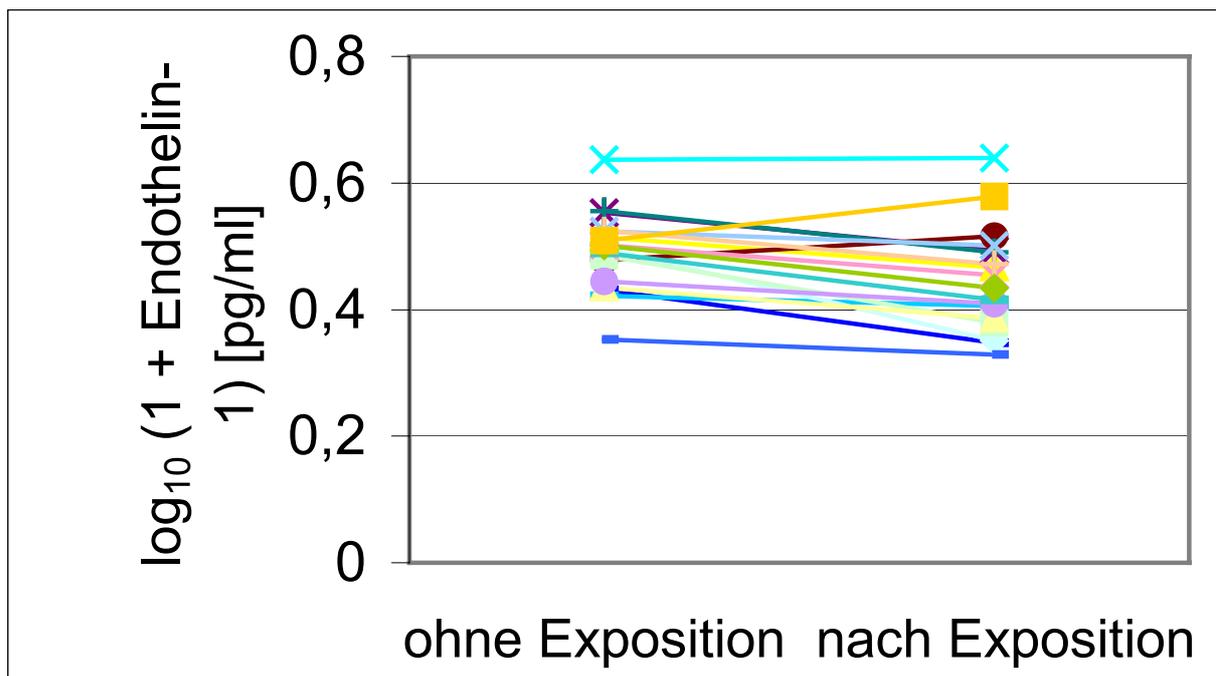


Abb. 13: Endothelin-1 ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern



4. Untersuchung inflammatorischer Effekte an Sputumzellen

4.1 Bestimmung der Probenvolumina, der Gesamtzellzahl und der relativen Zellzahl

Wie aus Tab. 8 zu ersehen konnte für das Kollektiv der Nicht-Schweißer für die Sputumfraktionen von 3 % ein signifikanter ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,044$), bzw. für die Sputumfraktion von 4 % ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,062$) und 5 % ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,052$) ein deutlicher Anstieg der Gesamtzellzahl nach Exposition verzeichnet werden. Bei der Analyse der relativen Zellzahl konnten keine entsprechenden signifikante Unterschiede detektiert werden. In dem Kollektiv der Nicht-Schweißer wies die Sputumfraktionen von 3 % einen signifikanter ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,040$) Anstieg der Probenvolumina auf.

Ein Vergleich zwischen Nicht-Schweißer und Schweißer ergab weder für die Probenvolumina noch für die relative Zellzahl, bei keiner der 3 Sputumfraktionen einen signifikanten Unterschied. Ein Vergleich zwischen den beiden Kollektiven,

bezogen auf die Gesamtzellzahl, erbrachte für die Fraktion 4 % signifikant erhöhte Werte ($P_{\text{Mann-Whitney-U}} = 0,017$) bei Nicht-Schweißern.

Tab. 8: Zusammenstellung der medianen Probenvolumina, der Gesamtzellzahl und der relativen Zellzahl, differenziert nach den drei Sputumfraktionen

Parameter	Sp-Fr	N-S Leer	N-S Exp	S Leer	S Exp	Δ N-S [%]	Δ S [%]
Vol [μ l] Med 25/75er Min/Max	3 %	358	559	644	658	5	8
		272/548	397/600	568/672	378/748	-2/112	-32/40
		40/990	247/841	310/1139	333/2000	-36/2003	-47/195
		$P_W = 0,040$		$P_W = 0,837$		$P_M = 0,194$	
	4 %	514	572	671	726	9	2
		367/568	518/609	591/736	620/821	-9/65	-12/36
		253/1277	279/703	500/1198	256/1800	-60/149	-53/207
		$P_W = 0,156$		$P_W = 0,411$		$P_M = 0,433$	
	5 %	535	558	1199	1117	8	-7
		310/588	369/631	1092/1265	1001/1188	-24/53	-26/5
		221/1249	234/847	331/1684	520/2000	-81/111	-57/256
		$P_W = 0,575$		$P_W = 0,247$		$P_M = 0,267$	
Ges ZZ [10^6] Median 25/75er Min/Max	3 %	3,1	4,4	3,7	4,4	92	21
		1,7/3,6	3,8/5,3	2,0/4,6	3,6/4,8	22/170	-32/104
		0,7/10,3	0,9/7,3	0,8/9,0	1,7/5,3	-74/456	-61/457
		$P_W = 0,044$		$P_W = 0,351$		$P_M = 0,144$	

	4 %	2,2	4,4	3,6	4,0	106	26
		0,8/4,9	2,6/5,7	2,3/4,9	0,7/6,0	-17/179	-70/52
		0,2/8,3	1,7/8,4	0,1/7,4	0,1/8,5	-60/4367	-100/13300
		$P_W = 0,062$		$P_W = 0,811$		$P_M = 0,017$	
	5 %	3,0	3,8	2,8	1,8	60	-32
		1,6/4,3	1,8/7,2	2,7/4,3	1,5/4,5	-37/277	-49/59
		0,1/8,1	0,9/9,3	1,6/4,8	1,4/8,2	-82/2483	-68/153
		$P_W = 0,052$		$P_W = 0,727$		$P_M = 0,065$	
rel ZZ [ZZx $10^3/\mu\text{l}$] Median	3 %	6,7	8,1	6,4	6,7	26	28
		3,3/12,0	6,2/12,3	3,6/7,8	4,5/10,6	-39/168	-21/139
		1,5/25,6	1,6/22,0	1,2/17,4	1,4/15,4	-98/589	-79/471
		$P_W = 0,279$		$P_W = 0,370$		$P_M = 0,871$	
25/75er Min/Max	4 %	4,8	8,0	5,5	5,0	33	2
		1,8/10,8	5,4/12,6	3,1/8,2	0,1/10,1	-72/75	-12/36
		1,4/32,7	2,6/19,8	0,1/12,1	0,1/13,7	-100/292	-53/207
		$P_W = 0,145$		$P_W = 0,913$		$P_M = 0,726$	
	5 %	5,3	8,1	2,5	3,1	43	-2
		2,1/11,8	4,2/11,5	2,3/3,0	1,6/4,0	-29/269	-34/62
		0,2/19,4	2,3/17,1	1,4/4,6	1,3/5,5	-81/3496	-46/95
		$P_W = 0,135$		$P_W = 0,552$		$P_M = 0,253$	

P_W : P_{Wilcoxon}

P_M : $P_{\text{Mann-Whitney-U}}$

Δ : Prozentuale Veränderung ($(\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100$)

positiver Wert = Anstieg während Exp

negativer Wert = Abfall während Exp

25/75er: 25/75er Perzentile

Exp:	Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition
Ges ZZ:	Gesamtzellzahl
Leer:	Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition
Max:	Maximum
Med:	Median
Min:	Minimum
N-S:	Nicht-Schweißer
rel ZZ:	relative Zellzahl
S:	Schweißer
Sp-Fr:	Sputumfraktion
Vol:	Volumen
ZZ:	Zellzahl

Ein Vergleich der 3 Sputumfraktionen differenziert nach Kollektiv und Belastung erfolgte mittels des nichtparametrischen Tests nach Friedman. Wie in Tab. 9 aufgeführt, korreliert bei Schweißern ohne ($P_{\text{Friedman-Test}} = 0,013$) und nach Exposition ($P_{\text{Friedman-Test}} = 0,002$) die relative Zellzahl negativ mit der zunehmenden Sputumfraktion. Eine positive Korrelation hingegen konnte bei Nicht-Schweißern ohne ($P_{\text{Friedman-Test}} = 0,022$) sowie bei Schweißern ohne ($P_{\text{Friedman-Test}} < 0,001$) und nach Exposition ($P_{\text{Friedman-Test}} < 0,001$) für das Probenvolumina im Vergleich zur ansteigenden Sputumfraktion verzeichnet werden.

Tab. 9: Vergleich der Gesamtzellzahl, der relativen Zellzahl und der Probenvolumina im Verlauf der Sputumfraktionen, differenziert nach Kollektiv und Belastung

Parameter	Nicht-Schweißer ohne Schweißrauch- exposition	Nicht-Schweißer nach Schweißrauch- exposition	Schweißer ohne Schweißrauch- exposition	Schweißer nach Schweißrauch- exposition
Gesamt- zellzahl ($P_{\text{Friedmann}}$)	0,761	1,000	0,125	0,116

Proben- volumina ($P_{\text{Friedmann}}$)	0,022	0,245	< 0,001	< 0,001
Relative Zellzahl ($P_{\text{Friedmann}}$)	0,522	0,819	0,013	0,002

Als Bezugsgrundlage dienten die in Tab. 8 dargestellten Werte und Einheiten.

4.2 Vitalitätstestung

Eine Bestimmung der Zellvitalität mittels, des Quotienten aus lebenden Zellen und der Gesamtzellzahl, erfolgte parallel zur Quantifizierung der Trypanblau-gefärbten Zellen. Zellen mit dunkelblauem Farbton wurden als absterbende oder bereits nekrotische Zellen klassifiziert, hyaline bis hellblaue Zellen wurden als lebende Zellen gewertet.

Für keine der 3 Sputumfraktionen konnte, weder bei Nicht-Schweißern noch bei Schweißern, eine signifikante Veränderung der Zellvitalität nachgewiesen werden (Tab. 10).

Eine Analyse der Vitalkapazität zwischen Nicht-Schweißern und Schweißern ergab für keine der 3 Sputumfraktionen einen signifikanten Unterschied (Tab. 10).

Mögliche Auswirkungen der Schweißrauchexposition auf die Zellvitalität innerhalb der 3 Sputumfraktionen wurden unter Anwendung des nichtparametrischen Tests nach Friedman untersucht. Eine signifikante Veränderung konnte weder bei Nicht-Schweizer vor ($P_{\text{Friedmann}} = 0,872$) bzw. nach Schweißrauchexposition ($P_{\text{Friedmann}} = 0,705$), noch bei Schweißern vor ($P_{\text{Friedmann}} = 0,054$) bzw. nach Exposition ($P_{\text{Friedmann}} = 0,819$) festgestellt werden.

Tab. 10: Deskriptive Parameter der Zellvitalität, differenziert nach den drei Sputumfraktionen

Parameter	Sp-Fr	N-S ohne Exposition	N-S nach Exposition	S ohne Exposition	S nach Exposition	Δ N-S [%]	Δ S [%]
ZV [%]							
Median		0,82	0,84	0,70	0,93	4	18
25/75er	3 %	0,74-0,94	0,70-0,94	0,58-0,94	0,55-0,99	-14/21	-29/61
Min/Max		0,04-1,00	0,27-1,00	0,38-1,00	0,45-1,00	-29/522	-50/151
		$P_W = 0,594$		$P_W = 0,553$		$P_M = 0,838$	
ZV [%]							
Median		0,88	0,90	0,93	0,89	5	-8
25/75er	4 %	0,56-0,94	0,83-0,95	0,79-1,00	0,78-0,93	-5/44	-18/17
Min/Max		0,08-1,00	0,10-1,00	0,75-1,00	0,50-1,00	-15/173	-50/18
		$P_W = 0,239$		$P_W = 0,463$		$P_M = 0,113$	
ZV [%]							
Median		0,82	0,88	0,82	0,73	5	13
25/75er	5 %	0,55-0,93	0,76-0,94	0,73-0,90	0,36-0,98	-21/20	1/43
Min/Max		0,00-0,97	0,22-0,98	0,40-0,91	0,11-1,00	-61/86	0/50
		$P_W = 0,552$		$P_W = 0,109$		$P_M = 0,396$	

P_W : P_{Wilcoxon}

P_M : $P_{\text{Mann-Whitney-U}}$

Δ : Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100)$
positiver Wert = Anstieg während Exp
negativer Wert = Abfall während Exp

25/75er: 25/75er Perzentile

nach Exposition: Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition

ohne Exposition: Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition

Max:	Maximum
Med:	Median
Min:	Minimum
N-S:	Nicht-Schweißer
S:	Schweißer
Sp-Fr:	Sputumfraktion
ZV:	Zellvitalität

4.3 Zelldifferentialbestimmung

Die statistische Auswertung spezifischer Zelltypen erfolgte, unter Berücksichtigung verschiedener Gesichtspunkte, auf der Grundlage unterschiedlicher Bezugsgrößen. Für eine Determinierung signifikanter Unterschiede vor und nach Exposition erfolgten Berechnungen der Makrophagen und neutrophile Granulozyten jeweils auf der Bezugsgrundlage der Summe dieser beiden Zelltypen sowie der Gesamtzellzahl. Epithelzellen, Lymphozyten, eosinophile - und basophile Granulozyten wurden in Korrelation zur Gesamtzellzahl dargestellt.

Die Auswertungen erbrachten bei Schweißern nach Schweißrauchexposition eine signifikante Verminderung der Makrophagen M/MN ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,014$), (Tab. 11; Abb. 14) und Epithelzellen Epi/GZZ ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,003$), (Tab. 11; Abb. 15) sowie ein signifikanten Anstieg der Neutrophilen Granulozyten., N/MN ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,014$), (Abb. 16), N/GZZ ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,001$), (Abb. 17).

Eine Darstellung intraindividuelle Unterschiede zwischen dem Kollektiv der Nicht-Schweißer und der Schweißer kann Tab. 11 entnommen werden. Für das Kollektiv der Schweißer konnte ein signifikant erhöhter Abfall der Makrophagen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ($P_{\text{Mann-Whitney-U}} = 0,005$) nach Schweißrauchexposition gegenüber dem der Nicht-Schweißern verzeichnet werden. Darüber hinaus konnte eine signifikant erhöhte Zunahme der Neutrophilen Granulozyten im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ($P_{\text{Mann-Whitney-U}} = 0,020$) nach Schweißrauchexposition seitens der Schweißer bestimmt werden.

Tab. 11: Auswertungsergebnisse der Zelldifferentialbestimmung von Sputumzellen

Parameter	N-S ohne Exposition [%]	N-S nach Exposition [%]	S ohne Exposition [%]	S nach Exposition [%]	Δ N-S [%]	Δ S [%]
M/MN						
Median	84,9	79,8	70,1	36,6	-9	-42
25/75er	63,5/90,5	51,7/96,7	64,3/85,7	29,6/70,8	-29/22	-61/10
Min/Max	39,0/97,0	10,7/100,0	50,0/100,0	5,0/90,0	-56/146	-94/39
	$P_W = 0,687$		$P_W = 0,014$		$P_M = 0,005$	
N/MN						
Median	15,2	20,2	15,2	20,2	33	46
25/75er	9,6/36,5	3,3/48,3	14,0/36,4	29,2/70,7	-91/123	-23/354
Min/Max	3,0/61,0	0,0/89,3	0,0/50,0	10,0/95,0	-100/1054	-66/550
	$P_W = 0,687$		$P_W = 0,014$		$P_M = 0,088$	
M/GZZ						
Median	28,6	17,9	12,4	24,9	-37	121
25/75er	9,3/66,3	2,6/45,4	6,3/41,5	18,1/35,0	-93/70	-40/598
Min/Max	0,0/85,9	0,3/69,0	0,4/48,1	2,9/72,5	-99/895	-90/839
	$P_W = 0,149$		$P_W = 0,231$		$P_M = 0,137$	
N/GZZ						
Median	6,6	5,4	4,6	40,1	-42	528
25/75er	1,7/12,2	0,4/14,1	1,5/15,8	12,5/59,3	-96/130	34/1737
Min/Max	0,0/43,6	0,0/33,0	0,0/47,1	2,5/93,1	-100/2237	-86/5959
	$P_W = 0,758$		$P_W = 0,001$		$P_M = 0,020$	

C. Ergebnisse

Epi/GZZ						
Median	55,8	77,9	83,6	14,3	16	-82
25/75er	15,7/84,0	41,5/95,6	41,5/90,5	5,4/67,8	-21/54	-92/-4,6
Min/Max	5,7/100,0	3,9/99,5	3,9/99,4	0,0/89,4	-21/54	-100/278
	$P_W = 0,210$		$P_W = 0,003$		$P_M = 0,099$	
Eo/GZZ						
Median	0,00	0,00	0,00	0,00	-100	-100
25/75er	0,0/0,1	0,0/0,1	0,0/0,0	0,0/0,0	-100/-100	-100/571
Min/Max	0,0/0,9	0,0/2,7	0,0/2,36	0,0/3,0	-100/-100	-100/571
	$P_W = 0,889$		$P_W = 1,000$		$P_M = 0,263$	
Ba/GZZ						
Median	0,00	0,00	0,00	0,00	-100	-95
25/75er	0,0/0,3	0,0/0,2	0,0/0,6	0,0/0,2	-100/-92	-100/-14
Min/Max	0,0/1,8	0,0/1,3	0,0/2,0	0,0/1,5	-100/-67	-100/112
	$P_W = 0,549$		$P_W = 0,374$		$P_M = 0,425$	
Ly/GZZ						
Median	0,00	0,00	0,00	0,00	-100	-100
25/75er	0,0/0,7	0,0/0,3	0,0/0,6	0,0/0,9	-100/98	-100/47
Min/Max	0,0/1,3	0,0/3,4	0,0/1,9	0,0/6,5	-100/139	-100/167
	$P_W = 0,721$		$P_W = 0,382$		$P_M = 0,899$	

P_W : P_{Wilcoxon}

P_M : $P_{\text{Mann-Whitney-U}}$

Δ : Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100)$

positiver Wert = Anstieg während Exp

negativer Wert = Abfall während Exp

25/75er: 25/75er Perzentile

Ba/GZZ: basophile Granulozyten/Gesamtzellzahl

Eo/GZZ: eosinophile Granulozyten/Gesamtzellzahl

Epi/GZZ:	Epithelzellen/Gesamtzellzahl
nach Exposition:	Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition
ohne Exposition:	Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition
Ly/GZZ:	Lymphozyten/Gesamtzellzahl
Max:	Maximum
Med:	Median
Min:	Minimum
M/GZZ:	Makrophagen/Gesamtzellzahl
M/MN:	Makrophagen/Anzahl der Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten
N/GZZ:	neutrophile Granulozyten/Gesamtzellzahl
N/MN:	neutrophile Granulozyten/Anzahl der Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten
N-S:	Nicht-Schweißer
S:	Schweißer

Die individuellen Veränderungen der zellulären Zusammensetzung des Sputums mit statistisch signifikanten Veränderungen zwischen Kontroll- und Expositionstag sind in Abb. 14-17 dargestellt.

Abb. 14: Anzahl der Makrophagen bezogen auf die Gesamtzahl der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

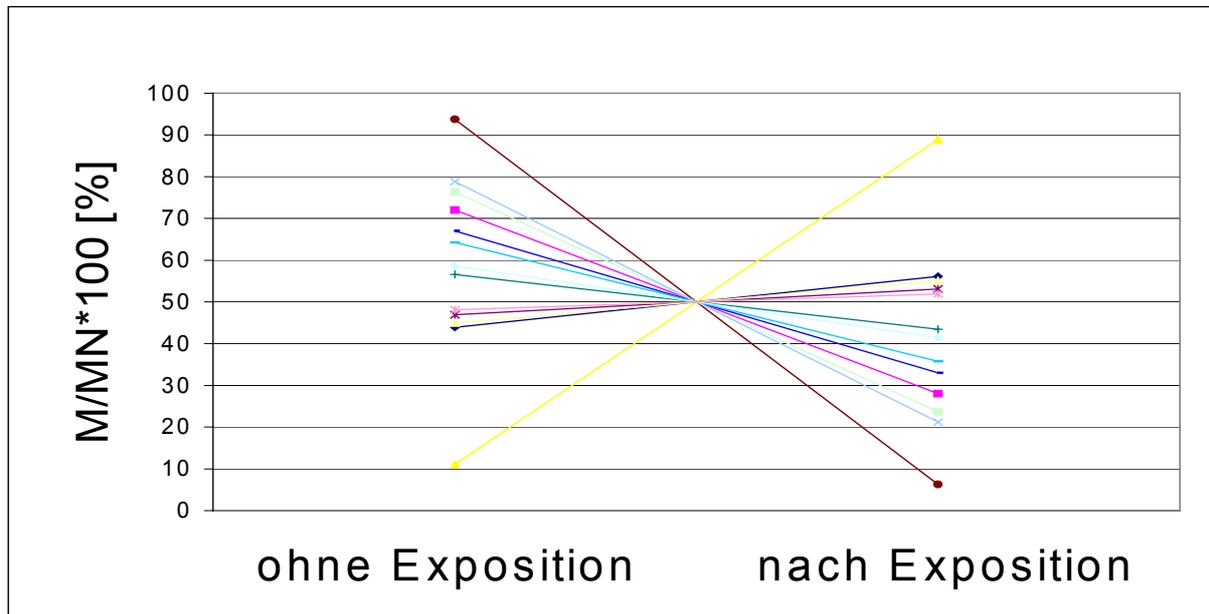


Abb. 15: Anzahl der Epithelzellen bezogen auf die Gesamtzahl ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

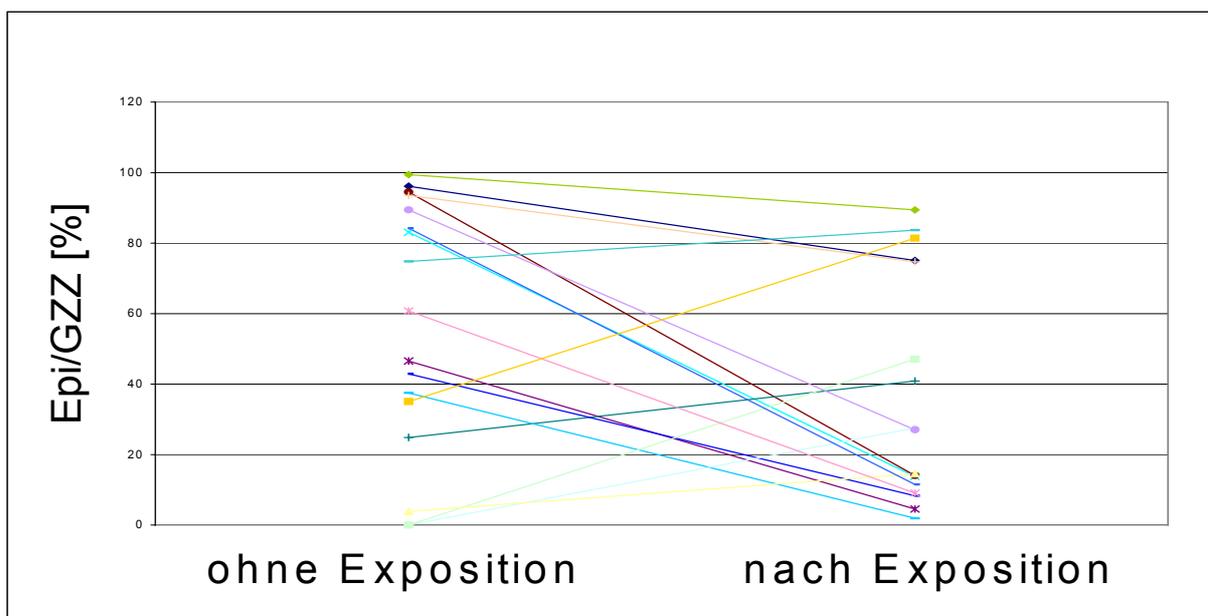


Abb. 16: Anzahl der neutrophilen Granulozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

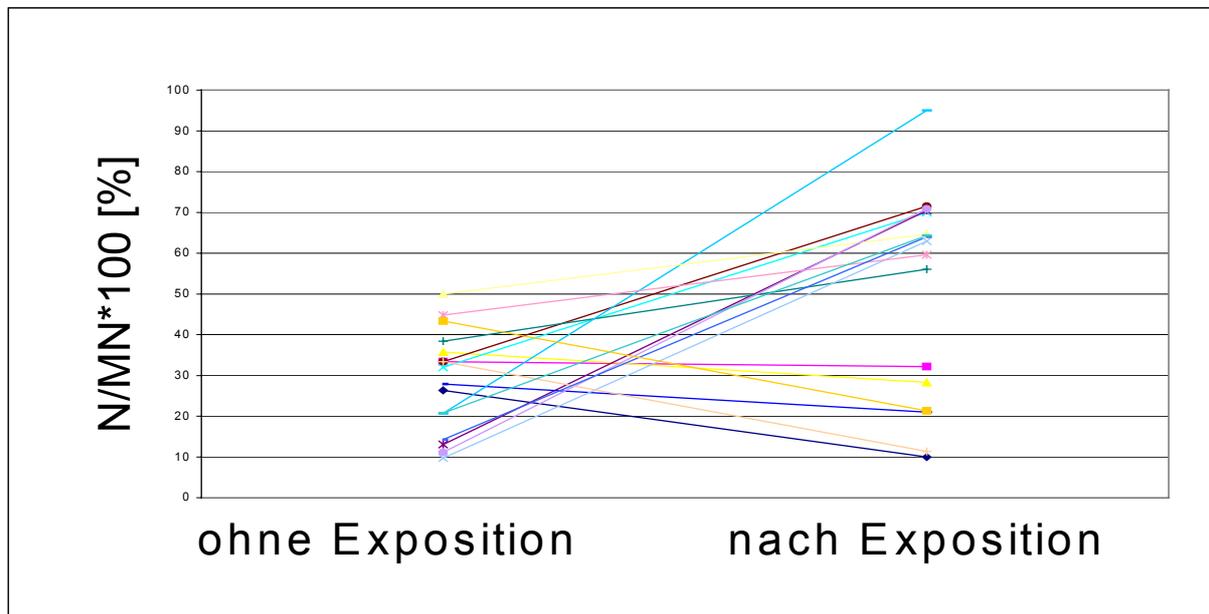
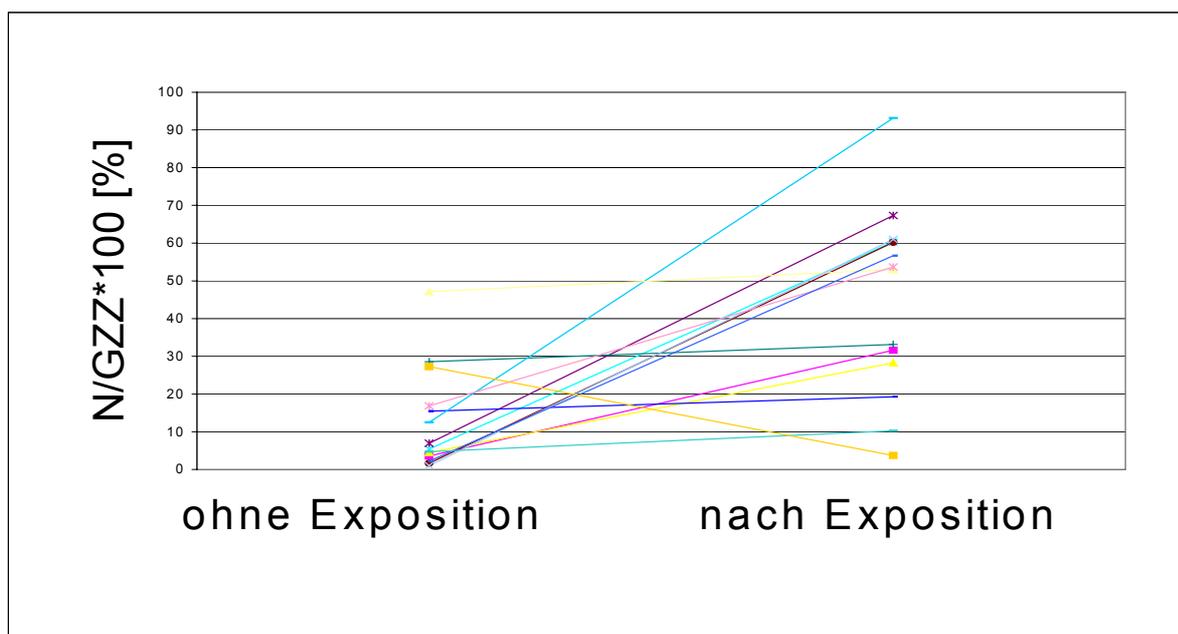


Abb. 17: Anzahl der neutrophilen Granulozyten bezogen auf die Gesamtzahl ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern



4.4 Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine mittels RT-PCR

Eine Quantifizierung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 erfolgte an Sputumzellen unter Verwendung der RT-PCR. Zu diesem Zweck wurden aus isolierten Sputumproben von 20 Nicht-Schweißern und 20 Schweißern, vor und nach Exposition (N=80), nach Isolierung der Gesamt-RNA und anschließender reverse Transkription, die hieraus resultierende cDNA mit Hilfe Zytokin-spezifischer Primer amplifiziert. Eine quantitative Auswertung der Amplifikate erfolgte im Anschluß an eine gelelektrophoretische Auftrennung unter Einbeziehung coamplifizierter externer sowie interner Standards. Als Bezugsgröße der quantifizierten Zytokine diente die probenspezifische Expressionsrate des endogenen Standards (GAPDH; „Normalisierung“). Eine Darstellung der Ergebnisse ist aus Tab. 12 ersichtlich.

Bei der Quantifizierung Schweißrauch-induzierter Veränderungen der untersuchten Entzündungsparameter in Sputumzellen konnte für die Zytokine TNF- α ($P_{\text{Wilcoxon}} < 0,001$) und IL-8 ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,012$) der Nachweis signifikant erhöhter Werte nach Exposition bei Schweißern erbracht werden (Tab. 12, Abb. 19, 25). Demgegenüber zeigte sich für das Kollektiv der Schweißer nach Exposition ein Abfall von IL-6 ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,052$) (Tab. 12 und Abb. 23).

Eine Darstellung intraindividuelle Unterschiede zwischen dem Kollektiv der Nicht-Schweißer und der Schweißer kann Tab. 12 entnommen werden.

Für das Kollektiv der Schweißer konnte eine signifikant erhöhte Zunahme von TNF- α ($P_{\text{Mann-Whitney-U}} = 0,009$) und IL-8 ($P_{\text{Mann-Whitney-U}} = 0,014$) nach Schweißrauchexposition gegenüber dem der Nicht-Schweißern verzeichnet werden. Darüber hinaus konnte ein signifikant erhöhter Abfall von IL-6 ($P_{\text{Mann-Whitney-U}} = 0,015$) nach Schweißrauchexposition seitens der Schweißer bestimmt werden.

Tab. 12: Ergebnisse der Zytokinquantifizierung (mRNA) aus isolierten Sputumzellen

Zytokine relative Gen- expression	N-S ohne Exposition	N-S nach Exposition	S ohne Exposition	S nach Exposition	Δ N-S [%]	Δ S [%]
<u>TNF-α</u>						
Median	0,855	0,671	0,592	1,462	1,0	159,1
25/75er Per	0,399/ 1,698	0,444/ 1,299	0,327/ 0,819	0,868/ 1,975	-69,6/ 121,0	39,4/ 264,7
Min/Max	0,157/ 4,522	0,248/ 5,897	0,205/ 1,553	0,322/ 4,485	-80,0/ 1306,1	-4,5/ 532,0
P	$P_W = 0,823$		$P_W = 0,001$		$P_M = 0,009$	
<u>IL-1β</u>						
Median	0,433	0,902	0,825	0,734	21,8	67,4
25/75er Per	0,284/ 1,281	0,381/ 1,082	0,273/ 1,397	0,734/ 3,388	-63,3/ 244,3	-57,9/ 426,1
Min/Max	0,023/ 8,354	0,149/ 1,395	0,001/ 4,899	0,056/ 6,222	-87,1/ 5630,4	-93,7/ 54251,1
P	$P_W = 0,940$		$P_W = 0,478$		$P_M = 0,871$	
<u>IL-6</u>						
Median	0,324	0,368	0,675	0,304	-35,5	-80,9
25/75er Per	0,226/ 0,765	0,166/ 0,492	0,500/ 1,299	0,046/ 0,820	-59,7/ 117,6	-91,5/ 16,0
Min/Max	0,079/ 1,224	0,115/ 2,073	0,282/ 2,456	0,032/ 1,751	-86,0/ 755,5	-96,6/ 171,7
P	$P_W = 0,550$		$P_W = 0,052$		$P_M = 0,015$	
<u>IL-8</u>						
Median	1,101	1,198	0,997	2,773	-53,3	151,7
25/75er Per	0,889/ 2,744	0,529/ 1,566	0,573/ 1,666	2,134/ 3,379	-75,6/ 61,8	50,8/ 407,8
Min/Max	0,33/ 12,79	0,21/ 18,06	0,39/ 17,95	1,18/ 8,37	-89,2/ 3219,3	-82,1/ 1903,2

P	$P_W = 0,102$	$P_W = 0,012$	$P_M = 0,014$
---	---------------	---------------	---------------

P_W : P_{Wilcoxon}

P_M : $P_{\text{Mann-Whitney-U}}$

Δ : Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100)$
positiver Wert = Anstieg während Exp
negativer Wert = Abfall während Exp

25/75er Per: 25/75er Perzentil

Min/Max: Minimum/Maximum

N-S: Nicht-Schweißer

S: Schweißer

ohne Exposition: Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition

nach Exposition: Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition

Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurde, unter besonderer Berücksichtigung individueller Veränderungen vor und nach Exposition gegenüber Schweißrauchen, die graphische Darstellung von Liniendiagrammen mit probandenspezifischen Datenpunkten gewählt (Abb. 18 - 25).

Abb. 18: TNF- α /GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern

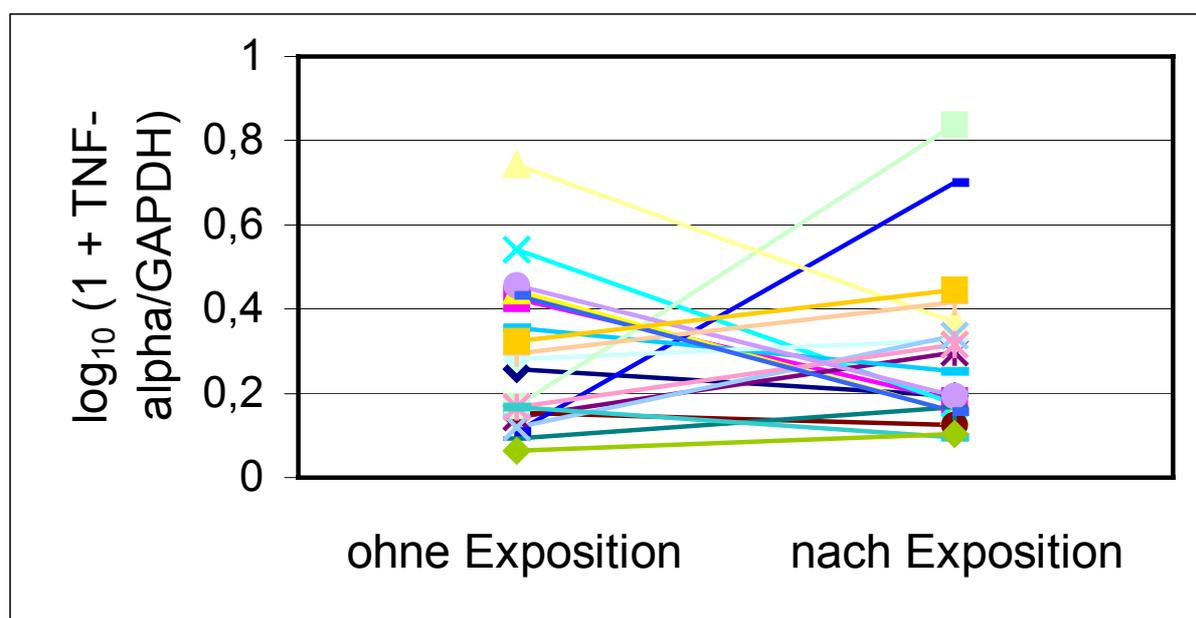


Abb. 19: TNF- α /GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

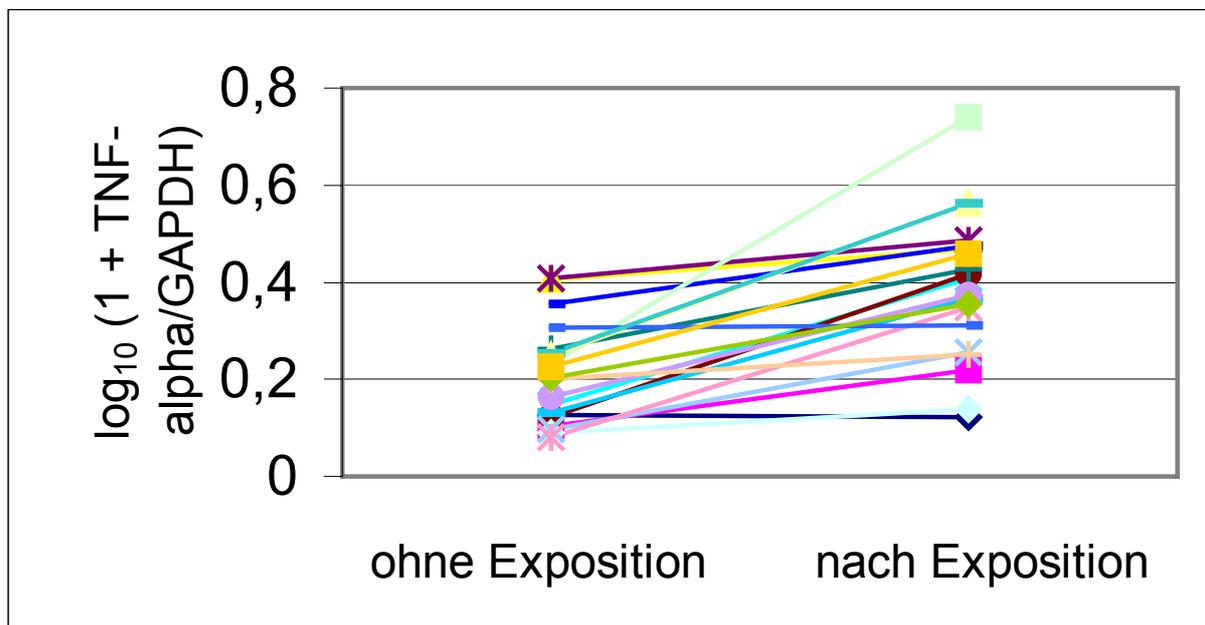


Abb. 20: IL-1 β /GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern

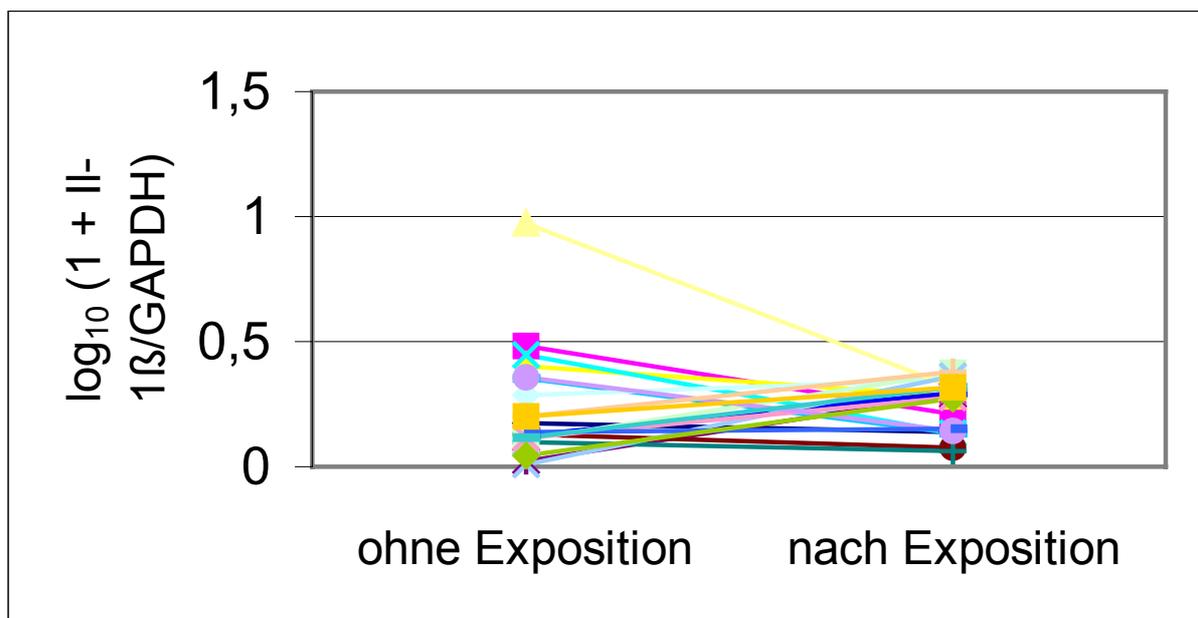


Abb. 21: IL-1 β /GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

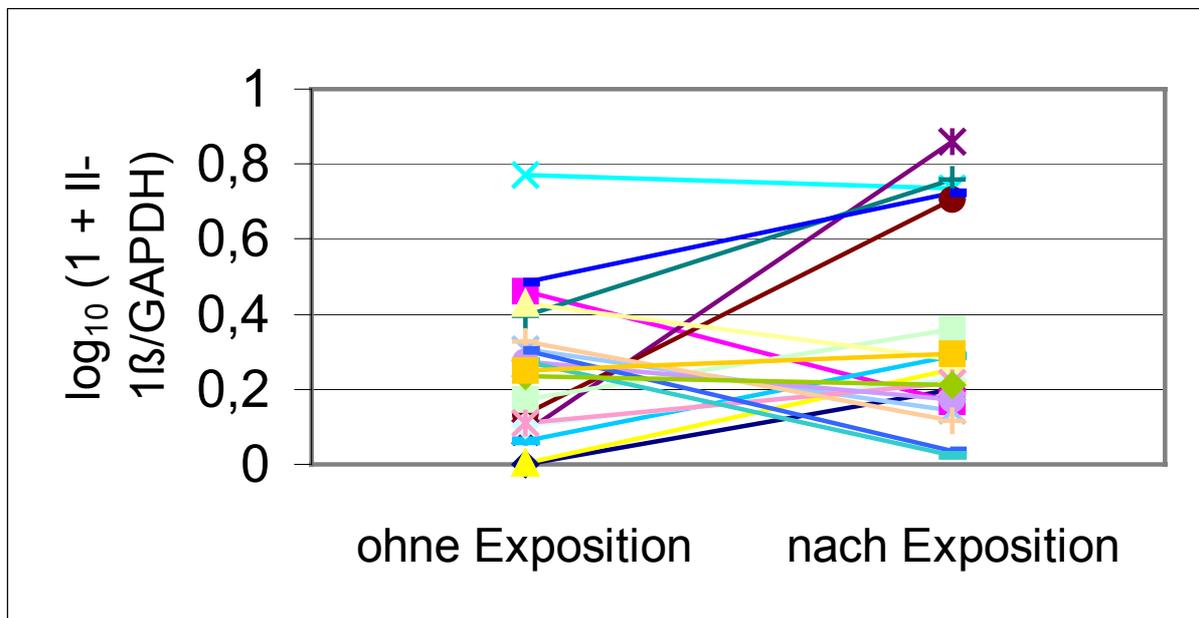


Abb. 22: IL-6//GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern

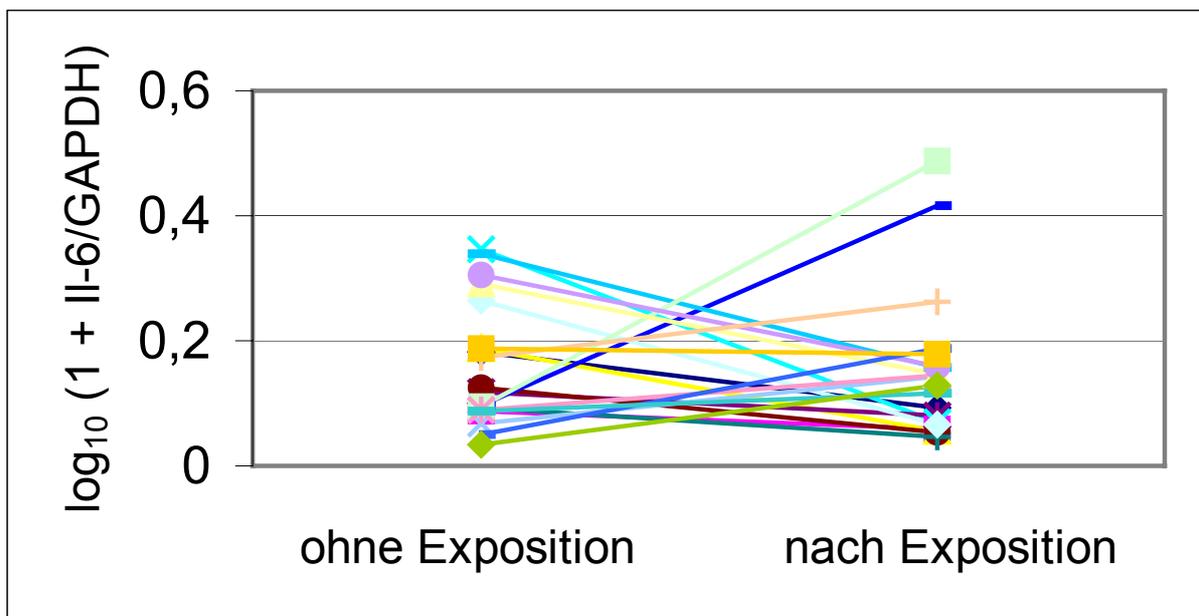


Abb. 23: IL-6/GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

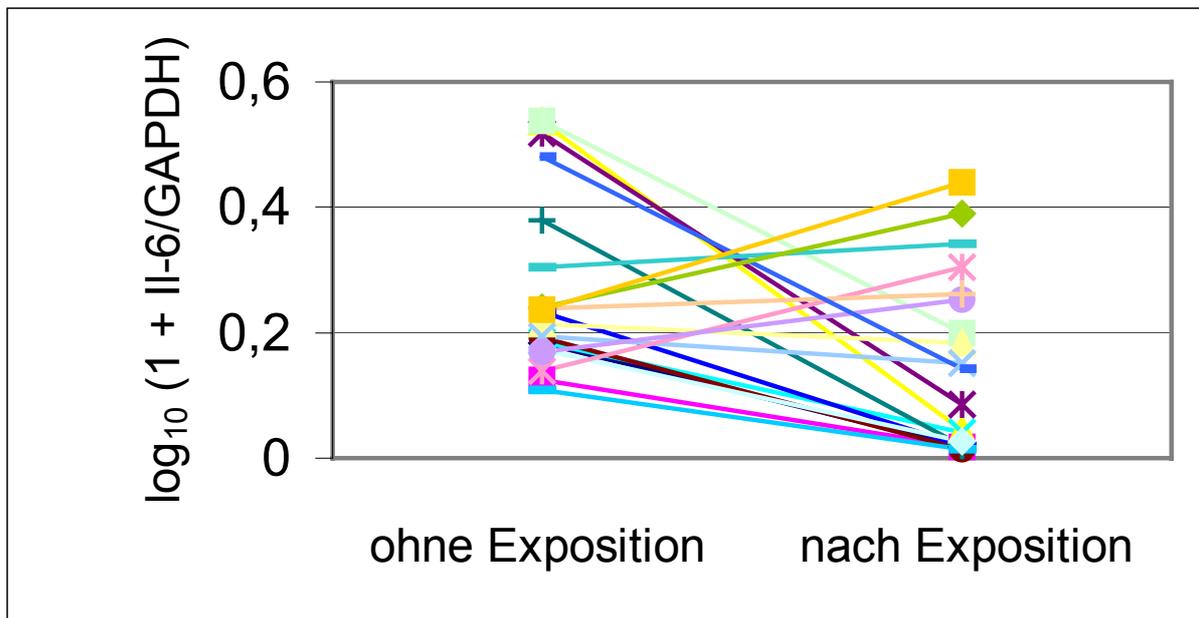


Abb. 24: IL-8/GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern

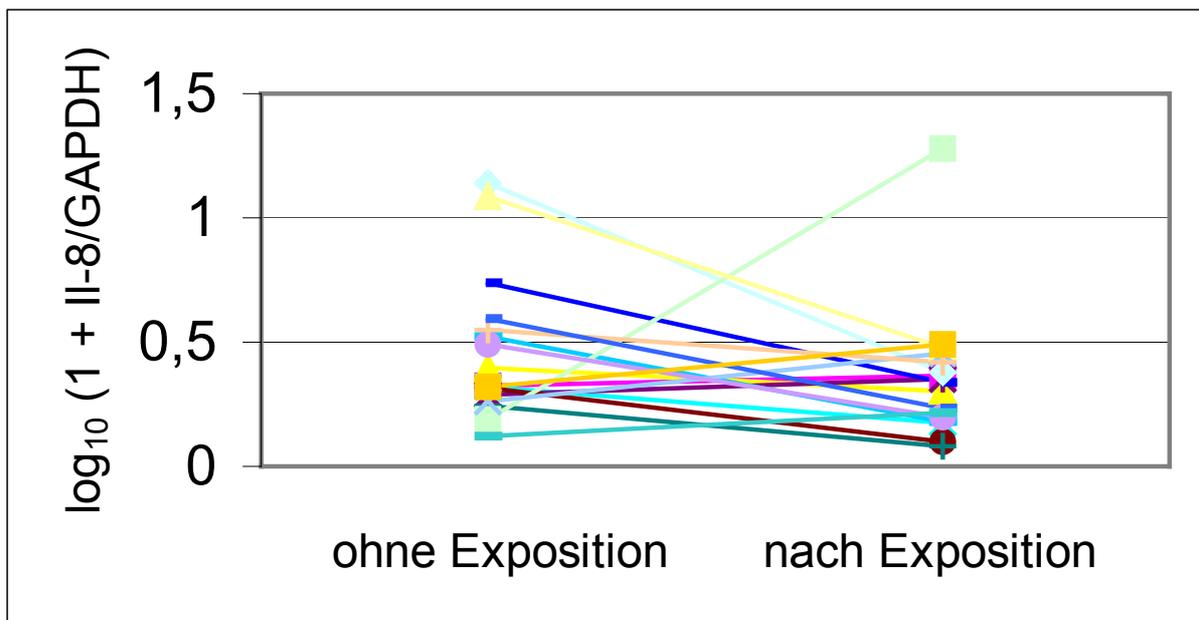
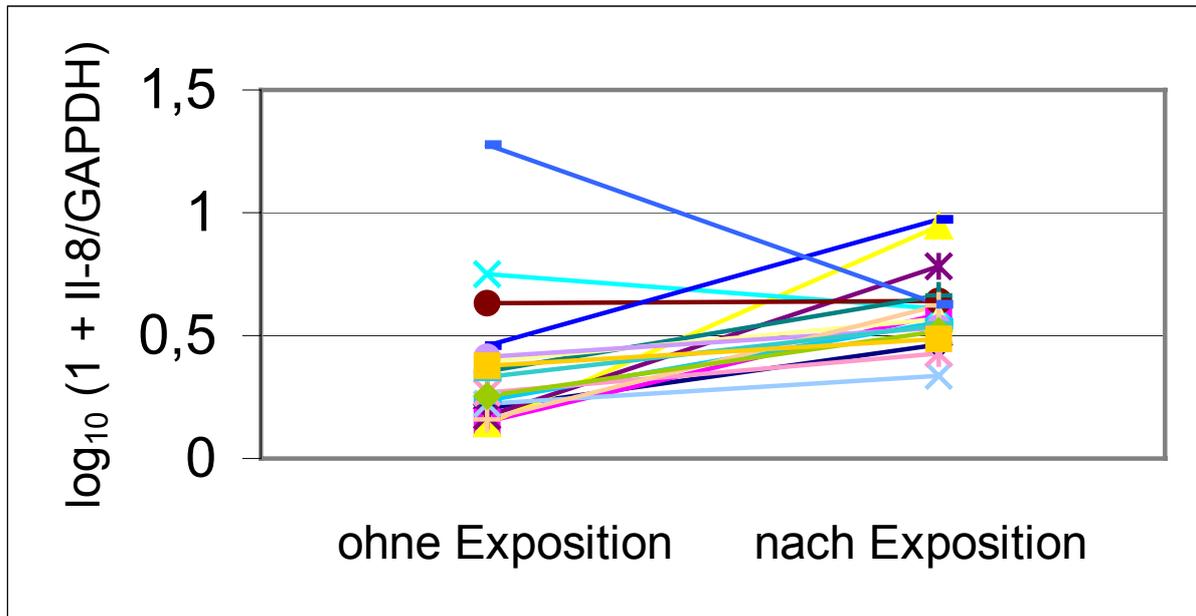


Abb. 25: IL-8/GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern



5. Untersuchung inflammatorischer Effekte an Zellen der nasalen Lavage

5.1 Bestimmung der Probenvolumina, der Gesamtzellzahl und der relativen Zellzahl

Eine Bestimmung der Probenvolumina und der Zellzahl erfolgte analog zu den Sputumproben. Eine Zusammenstellung der medianen Probenvolumina, der Gesamtzellzahl und der relativen Zellzahl in Proben der NL ist aus Tab. 13 zu ersehen.

Für das Kollektiv der Schweißer konnte nach Schweißrauchexposition eine signifikante Zunahme der Probenvolumina ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,030$) verzeichnet werden. Analog hierzu lies sich für das Kollektiv der Nicht-Schweißer eine deutliche Erhöhung der Probenvolumina nach Schweißrauchexposition bestimmen. Darüber hinaus weist das Kollektiv der Nicht-Schweißer einen signifikanten Anstieg der Gesamtzellzahl ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,044$) auf. Analyse der relativen Zellzahl erbrachten keine signifikanten Unterschiede.

Ein Vergleich der relativen Zellzahl zwischen Nicht-Schweißern und Schweißern erbrachte signifikant erhöhte Werte seitens der Nicht-Schweißer ($P_{\text{Mann-Whitney-U}} < 0,001$). Für die Parameter Volumen und Gesamtzellzahl konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Tab. 13: Zusammenstellung der medianen Volumina, der Gesamtzellzahl und der relativen Zellzahl in Proben der NL

Parameter	N-S ohne Exp	N-S nach Exp	S ohne Exp	S nach Exp	Δ N-S [%]	Δ S [%]
Vol [μl]						
Median	335	536	644	652	4	29
25/75er	281/531	362/559	410/647	554/858	-5/77	-9,6/142
Min/Max	227/640	239/630	306/862	520/200 0	-35/142	-37/265
	$P_W = 0,054$		$P_W = 0,030$		$P_M = 0,565$	
Ges ZZ [10^6]						
Median	3,1	4,4	3,7	4,4	27	392
25/75er	1,7/3,6	3,8/5,3	2,0/4,6	3,6/4,8	-35/437	-17/1576
Min/Max	0,7/10,3	0,9/7,3	0,8/9,0	1,7/5,3	-83/10790	-94/23700
	$P_W = 0,044$		$P_W = 0,351$		$P_M = 0,114$	
rel ZZ [ZZ x $10^3/\mu\text{l}$]						
Median	7,3	8,9	3,2	3,1	6	-385
25/75er	4,5/12,7	4,1/18,4	1,3/10,5	1,6/4,0	-67/339	-1169/-197
Min/Max	0,1/18,9	0,7/44,6	0,1/19,3	1,3/5,5	-83/61389	-2424/-104
	$P_W = 0,528$		$P_W = 0,058$		$P_M < 0,001$	

P_W :	P_{Wilcoxon}
P_M :	$P_{\text{Mann-Whitney-U}}$
Δ :	Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100)$ positiver Wert = Anstieg während Exp negativer Wert = Abfall während Exp
25/75er:	25/75er Perzentile
nach Exp:	Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition
Ges ZZ:	Gesamtzellzahl
ohne Exp:	Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition
Max:	Maximum
Med:	Median
Min:	Minimum
N-S:	Nicht-Schweißer
rel ZZ:	relative Zellzahl
S:	Schweißer
Vol:	Volumen
ZZ:	Zellzahl

5.2 Vitalitätstestung

Eine Bestimmung der Zellvitalität erfolgte parallel zur Zellzahlbestimmung an Trypanblau gefärbten Zellen der NL (Tab. 14).

Während für das Kollektiv der Nicht-Schweißer keine signifikante Veränderung festgestellt werden konnte ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,937$) stieg bei Schweißern der prozentuale Anteil lebender Zellen nach Exposition signifikant an ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,028$), (Tab. 14).

Ein Vergleich der ZV zwischen den beiden Untersuchungskollektiven ergab für das Kollektiv der Schweißer eine signifikant höhere ZV ($P_{\text{Mann-Whitney U-test}} = 0,045$) nach Schweißrauchexposition gegenüber der der Nicht-Schweißern (Tab. 14).

Tab. 14: Vergleichende Analyse der Zellvitalität von NL Zellen

Parameter	N-S ohne Exp	N-S nach Exp	S ohne Exp	S nach Exp	Δ N-S [%]	Δ S [%]
ZV [%]						
Median	0,78	0,91	0,50	0,95	-0,5	112,2
25/75er	0,68/0,88	0,69/0,98	0,40/0,78	0,65/0,99	-29,1/33,1	23,0/167,1
Min/Max	0,29/1,00	0,33/1,00	0,30/0,92	0,44/1,00	-53,8/250,0	-43,4/176,9
	$P_W = 0,937$		$P_W = 0,028$		$P_M = 0,045$	

P_W : P_{Wilcoxon}

P_M : $P_{\text{Mann-Whitney-U}}$

Δ : Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100)$

positiver Wert = Anstieg während Exp

negativer Wert = Abfall während Exp

25/75er: 25/75er Perzentile

ohne Exp: Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition

nach Exp: Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition

Max: Maximum

Med: Median

Min: Minimum

N-S: Nicht-Schweißer

S: Schweißer

ZV: Zellvitalität

5.3 Zelldifferentialbestimmung

Untersuchungen der Zellpopulationen an Cytospin™-zentrifugierten Präparaten der NL erfolgten jeweils an einem Kontrolltag ohne Exposition und einem Expositionstag. Analog der unter Kapitel C.4.3 dargelegten Ergebnisse für Sputumzellen stellen sich die Ergebnisse der Zelldifferenzierung an Zellen der NL wie folgt dar (Tab. 15).

Für das Kollektiv der Schweißer konnte hierbei eine signifikante Verringerung der Makrophagen (M/MN; $P_{\text{Wilcoxon}} = 0,047$) nach Schweißrauchexposition sowie ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten (N/MN; $P_{\text{Wilcoxon}} = 0,047$) nachgewiesen werden (Tab. 15; Abb. 26-27).

Die Ergebnisse intraindividuelle signifikanter Unterschiede zwischen dem Kollektiv der Nicht-Schweißer und der Schweißer können aus Tab. 15 entnommen werden. Für keines der untersuchten Kollektive konnte ein signifikanter Unterschied in der Zellpopulation bestimmt werden.

Tab. 15: Auswertungsergebnisse der Zelldifferentialbestimmung von NL Zellen

Parameter	N-S ohne Exposition [%]	N-S nach Exposition [%]	S ohne Exposition [%]	S nach Exposition [%]	Δ N-S [%]	Δ S [%]
M/MN						
Median	79,3	77,9	58,6	37,5	14	-22
25/75er	58,6/90,7	47,1/99,5	44,4/76,4	23,8/56,3	-44/38	-63/19
Min/Max	19,2/100,0	10,2/100,0	11,1/100,0	18,0/100,0	-88/253	-68/122
	$P_W = 0,647$		$P_W = 0,047$		$P_M = 0,347$	
N/MN						
Median	20,7	22,2	41,4	62,5	-4	24
25/75er	9,3/41,4	0,5/52,9	23,6/55,6	43,7/76,2	-89/363	-10/125
Min/Max	0,0/80,8	10,2/89,8	0,0/88,9	0,0/82,0	-100/203193	-61/202
	$P_W = 0,647$		$P_W = 0,047$		$P_M = 0,606$	

M/GZZ						
Median	18,5	21,1	18,4	19,1	-35	-5
25/75er	9,7/29,0	9,1/28,5	14,7/38,3	10,7/23,8	-54/102	-54/40
Min/Max	0,0/77,2	2,1/96,0	5,4/56,8	2,4/65,1	-89/392	-93/99
	$P_W = 0,647$		$P_W = 0,363$		$P_M = 0,525$	
N/GZZ						
Median	5,3	6,0	18,1	43,2	-37	-3
25/75er	1,5/16,3	0,1/21,6	7,9/43,4	8,0/68,0	-97/548	-67/410
Min/Max	0,0/79,2	0,0/75,2	0,0/87,1	0,0/79,0	-100/1456	-95/1029
	$P_W = 0,831$		$P_W = 0,221$		$P_M = 0,539$	
Epi/GZZ						
Median	73,9	59,4	43,9	24,9	-3	-42
25/75er	39,0/86,7	38,6/86,1	18,9/73,3	2,7/80,1	-51/22	-77/52
Min/Max	1,0/100,0	0,0/97,7	1,0/94,2	0,0/94,4	-100/8327	-100/332
	$P_W = 0,744$		$P_W = 0,510$		$P_M = 0,393$	
Eo/GZZ						
Median	0,0	0,0	0,2	0,0	17	-100
25/75er	0,0/0,0	0,0/0,1	0,0/0,8	0,0/0,8	-100/167	-100/27
Min/Max	0,0/2,3	0,0/0,8	0,0/4,0	0,0/1,8	-100/179	-100/305
	$P_W = 0,499$		$P_W = 0,374$		$P_M = 0,615$	
Ba/GZZ						
Median	0,0	0,0	0,0	0,0	-100	-49
25/75er	0,0/0,2	0,0/0,4	0,0/0,2	0,0/0,2	-100/78	-100/153
Min/Max	0,0/1,0	0,0/1,3	0,0/1,6	0,0/0,8	-100/510	-100/204
	$P_W = 0,285$		$P_W = 0,735$		$P_M = 0,631$	

Ly/GZZ						
Median	0,0	0,0	0,0	0,0	-100	-100
25/75er	0,0/0,4	0,0/0,2	0,0/0,3	0,0/0,9	-100/3	-100/98
Min/Max	0,0/2,0	0,0/1,3	0,0/1,7	0,0/1,3	-100/12	-100/167
	$P_W = 0,721$		$P_W = 0,333$		$P_M = 0,526$	

P_W : P_{Wilcoxon}

P_M : $P_{\text{Mann-Whitney-U}}$

Δ : Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100)$

positiver Wert = Anstieg während Exp

negativer Wert = Abfall während Exp 25/75er: 25/75er Perzentile

Ba/GZZ: basophile Granulozyten/Gesamtzellzahl

Eo/GZZ: eosinophile Granulozyten/Gesamtzellzahl

Epi/GZZ: Epithelzellen/Gesamtzellzahl

nach Exp: Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition

ohne Exp: Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition

Ly/GZZ: Lymphozyten/Gesamtzellzahl

Max: Maximum

Med: Median

Min: Minimum

M/GZZ: Makrophagen/Gesamtzellzahl

M/MN: Makrophagen/Anzahl der Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten

N/GZZ: neutrophile Granulozyten/Gesamtzellzahl

N/MN: neutrophile Granulozyten/Anzahl der Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten

N-S: Nicht-Schweißer

S: Schweißer

Die individuellen Veränderungen der Zelldifferentialbestimmung mit statistisch signifikanten Veränderungen zwischen Kontroll- und Expositionstag sind in Abb. 26 und 27 dargestellt.

Abb. 26: Anzahl der Makrophagen bezogen auf die Gesamtzahl der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

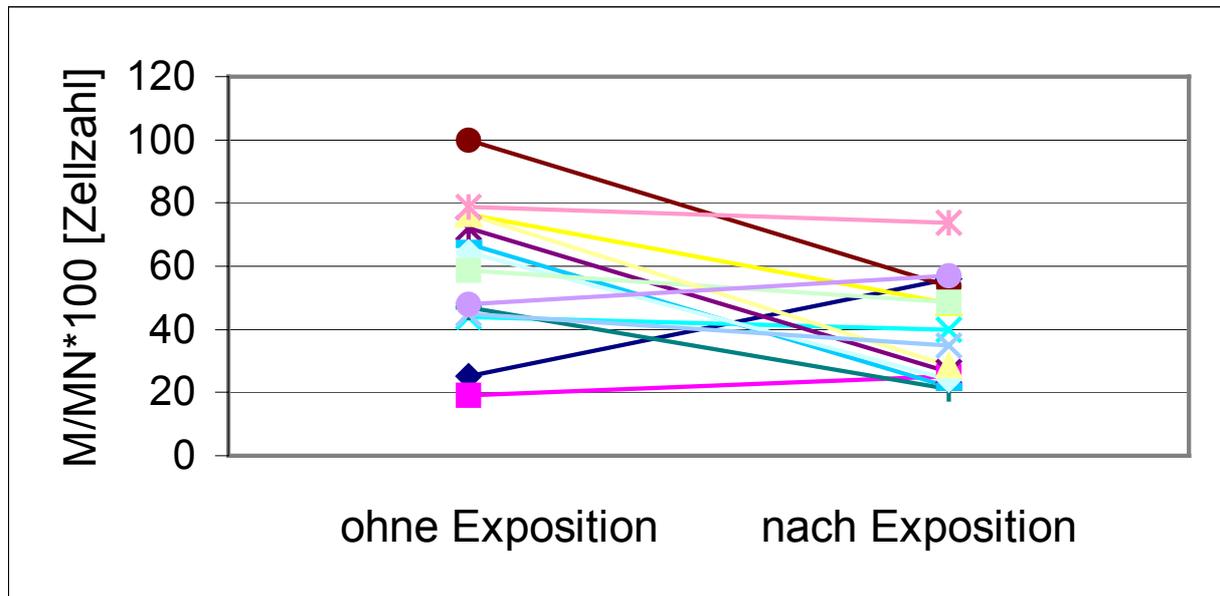
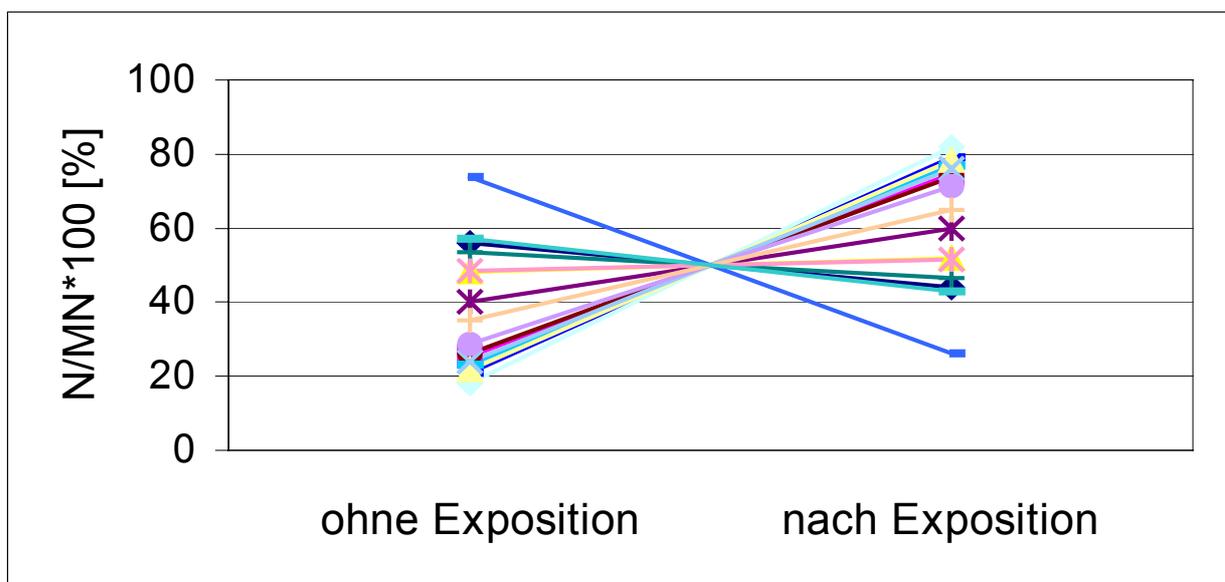


Abb. 27: Anzahl der neutrophilen Granulozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern



5.4 Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine mittels RT-PCR

Bei der Quantifizierung Schweißrauch-induzierter Veränderungen der untersuchten Entzündungsparameter in Zellen der NL konnte für das Zytokin IL-6 der Nachweis signifikant erniedrigter Werte nach Exposition bei Schweißern ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0,003$) erbracht werden (Tab. 16; Abb. 33).

Ein Vergleich der quantifizierten Zytokine zwischen den beiden Kollektiven zeigte für das Kollektiv der Schweißer einen signifikant erhöhten Abfall von IL-6 ($P_{\text{M}} = 0,003$) (Tab. 16).

Tab. 16: Ergebnisse der Zytokinquantifizierung (mRNA) aus isolierten NL-Zellen

Zytokine relative Expressions- rate	N-S ohne Exp	N-S nach Exp	S ohne Exp	S nach Exp	Δ N-S [%]	Δ S [%]
<u>TNF-α</u>						
Median	0,457	0,384	0,798	0,362	2,8	-55,7
25/75er	0,312/ 0,720	0,199/ 1,342	0,187/ 2,143	0,236/ 0,546	-67,7/ 350,5	-83,6/ 247,0
Min/Max	0,06/ 5,27	0,02/ 6,19	0,00/ 12,05	0,06/ 6,52	-96,4/ 2017,0	-96,4/ 3323,7
P	$P_{\text{W}} = 0,586$		$P_{\text{W}} = 0,076$		$P_{\text{M}} = 0,361$	
<u>IL-1β</u>						
Median	1,086	0,496	1,217	0,680	-25,1	-23,8
25/75er	0,544/ 1,515	0,254/ 1,128	0,199/ 3,001	0,549/ 0,916	-74,2/ 198,4	-79,0/ 280,5
Min/Max	0,08/ 18,17	0,03/ 8,50	0,09/ 14,93	0,21/ 7,22	-97,8/ 1376,0	-98,6/ 2169,6
P	$P_{\text{W}} = 0,586$		$P_{\text{W}} = 0,266$		$P_{\text{M}} = 0,986$	

<u>IL-6</u>						
Median	0,388	0,334	1,225	0,217	-14,0	-82,7
25/75er	0,215/ 0,517	0,113/ 0,730	0,597/ 4,016	0,172/ 0,431	-70,5/ 233,8	-94,4/ -58,8
Min/Max	0,05/ 1,34	0,06/ 35,26	0,54/ 14,14	0,12/ 5,50	-92,8/ 6850,9	-99,1/ 376,2
P	$P_W = 0,653$		$P_W = 0,003$		$P_M = 0,003$	
<u>IL-8</u>						
Median	0,574	0,181	0,833	0,100	-29,3	-82,2
25/75er	0,342/ 2,230	0,056/ 3,682	0,089/ 7,537	0,049/ 0,251	-95,6/ 649,9	-99,4/ 513,2
Min/Max	0,22/ 3,59	0,01/ 34,47	0,02/ 27,18	0,00/ 46,30	-98,6/ 1533,7	-99,8/ 6349,1
P	$P_W = 0,074$		$P_W = 0,074$		$P_M = 0,295$	

P_W : P_{Wilcoxon}

P_M : $P_{\text{Mann-Whitney-U}}$

Δ : Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100)$

positiver Wert = Anstieg während Exp

negativer Wert = Abfall während Exp

25/75er: 25/75er Perzentil

Min/Max: Minimum/Maximum

N-S: Nicht-Schweißer

nach Exp: Untersuchungstag nach Schweißrauchexposition

ohne Exp: Kontrolltag ohne Schweißrauchexposition

S: Schweißer

Für eine übersichtlichere Betrachtung der Ergebnisse wurde, unter besonderer Berücksichtigung individueller Veränderungen ohne und nach Exposition gegenüber Schweißrauchen, die graphische Darstellung von Liniendiagrammen mit probandenspezifischen Datenpunkten gewählt (Abb. 28 – 35).

Abb. 28: TNF- α /GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern

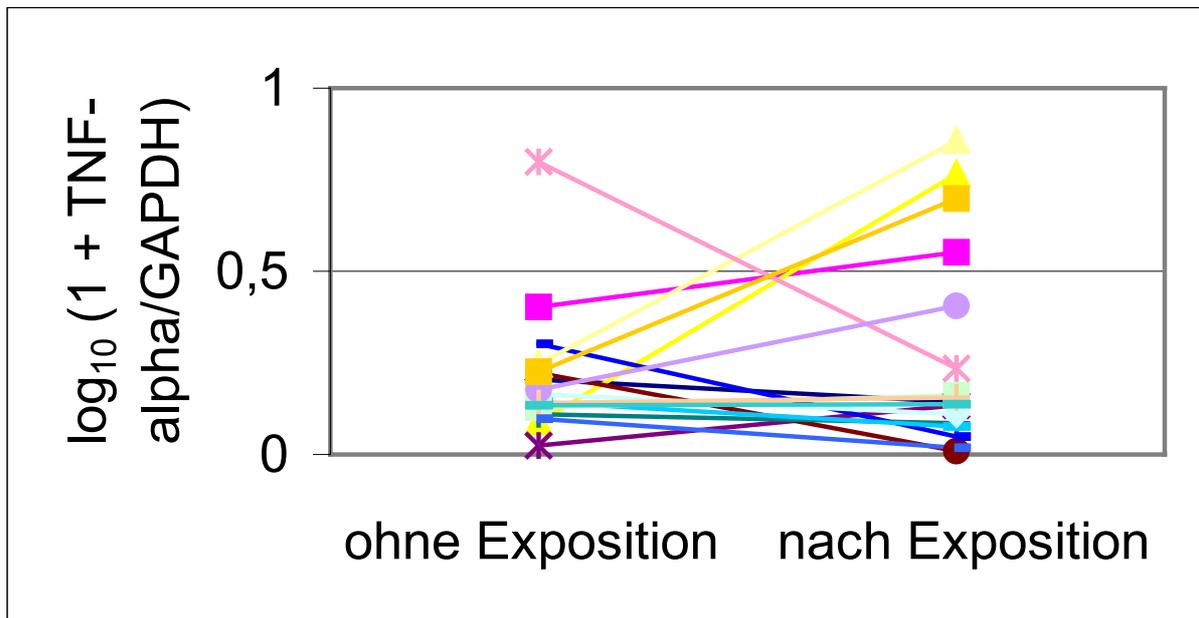


Abb. 29: TNF- α /GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

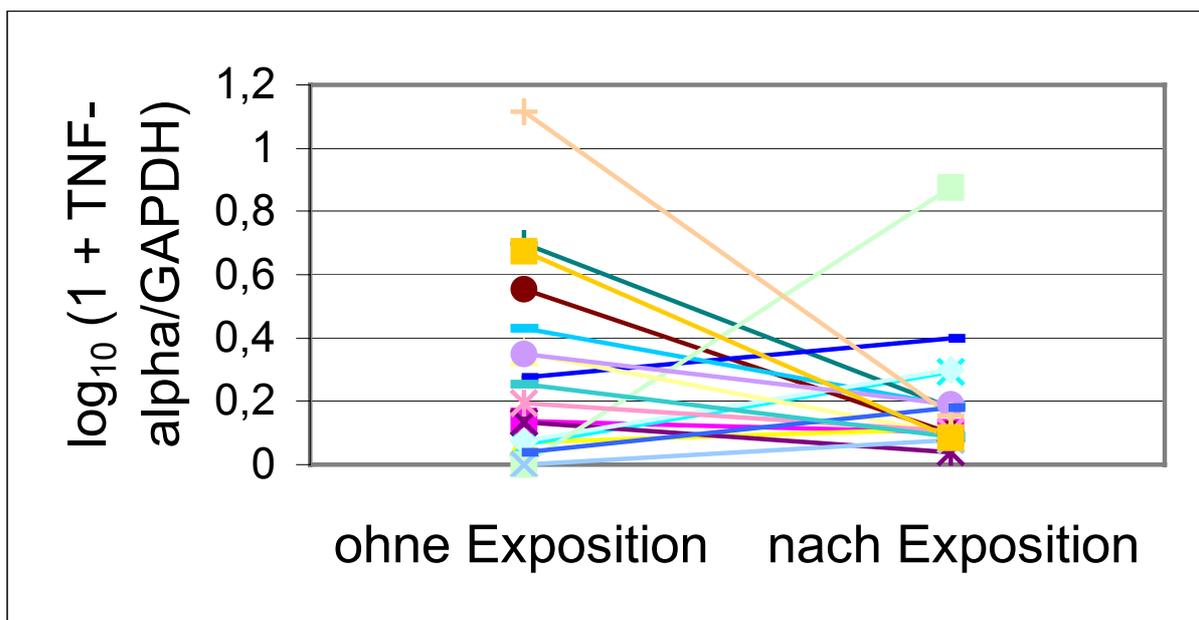


Abb. 30: IL-1 β /GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern

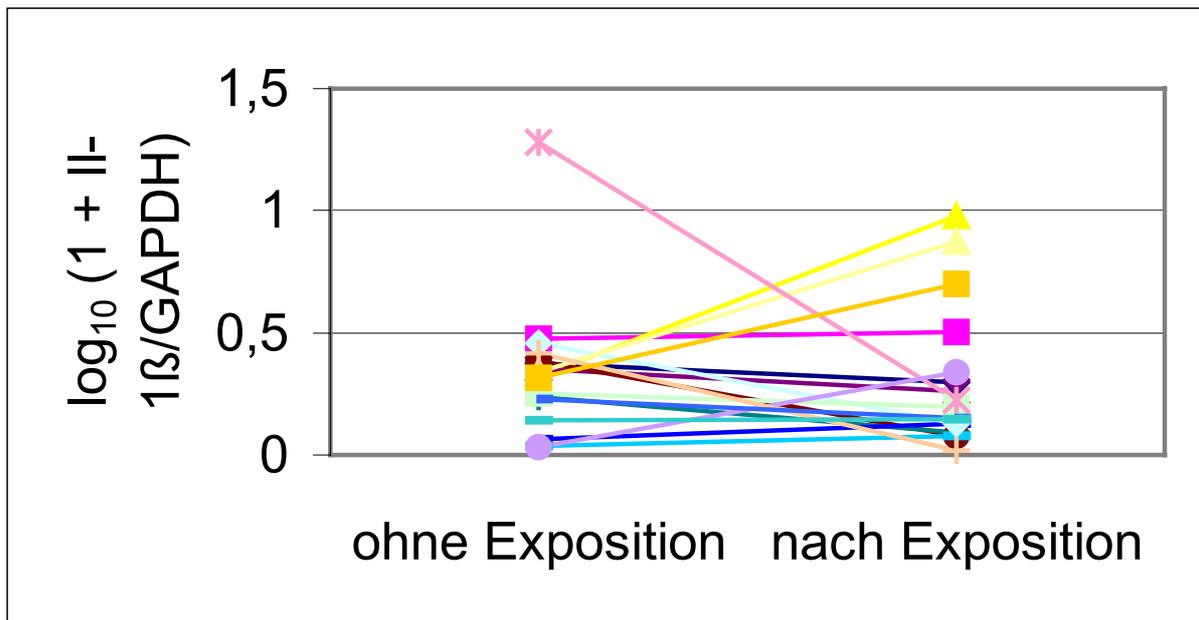


Abb. 31: IL-1 β /GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

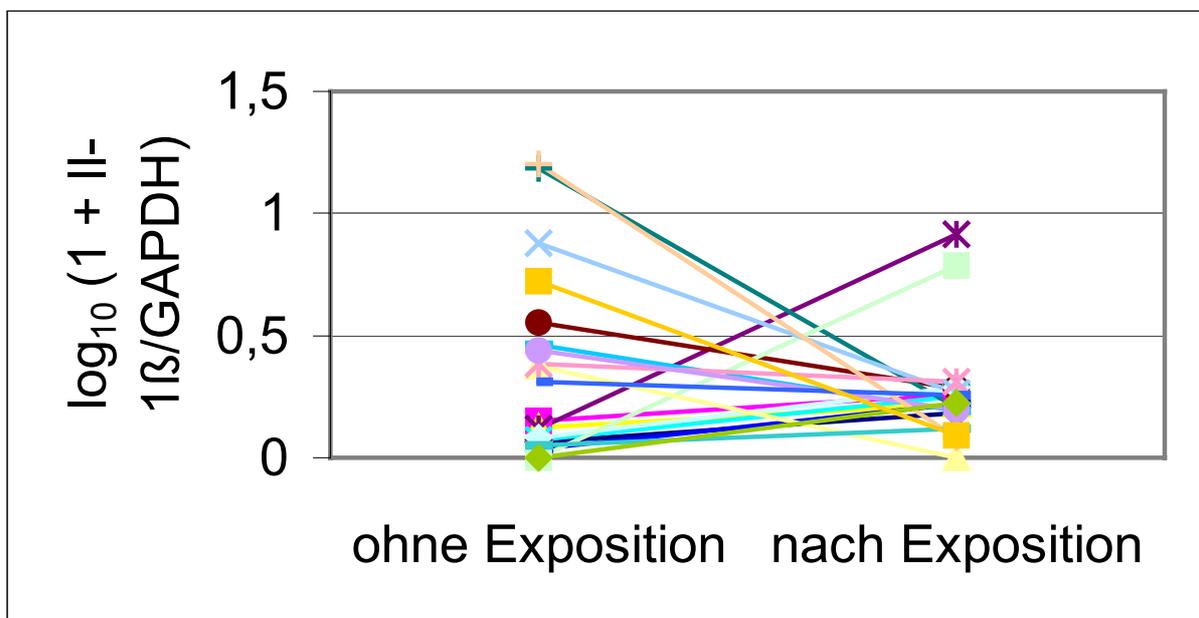


Abb. 32: IL-6/GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern

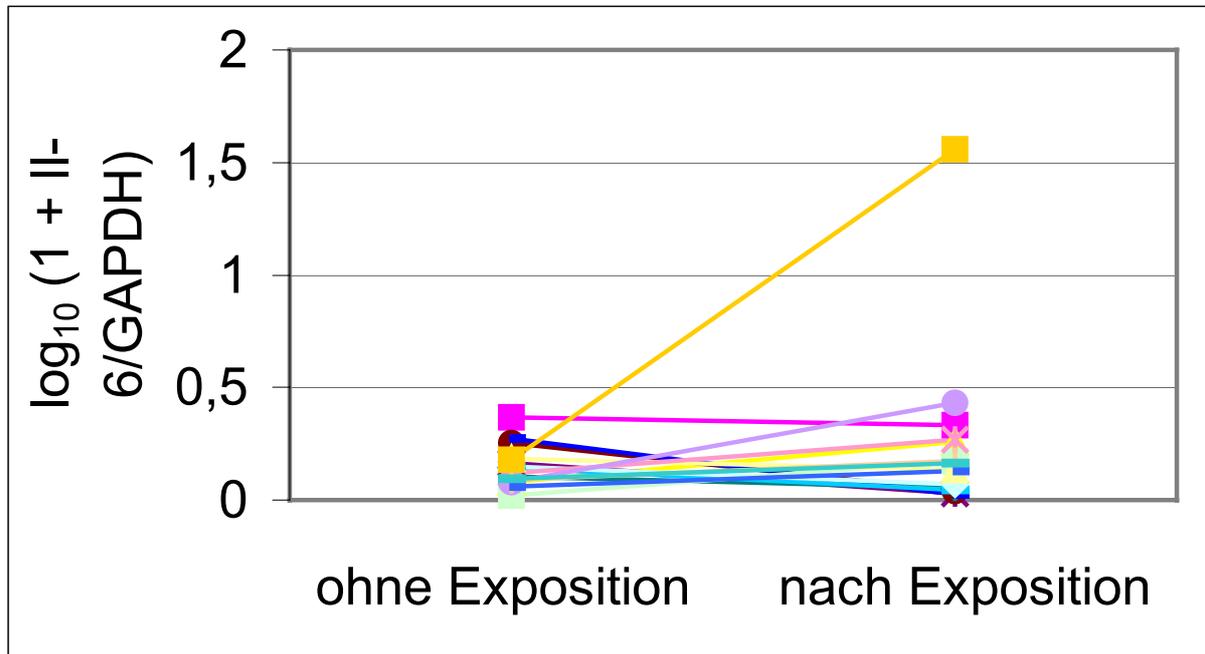


Abb. 33: IL-6/GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern

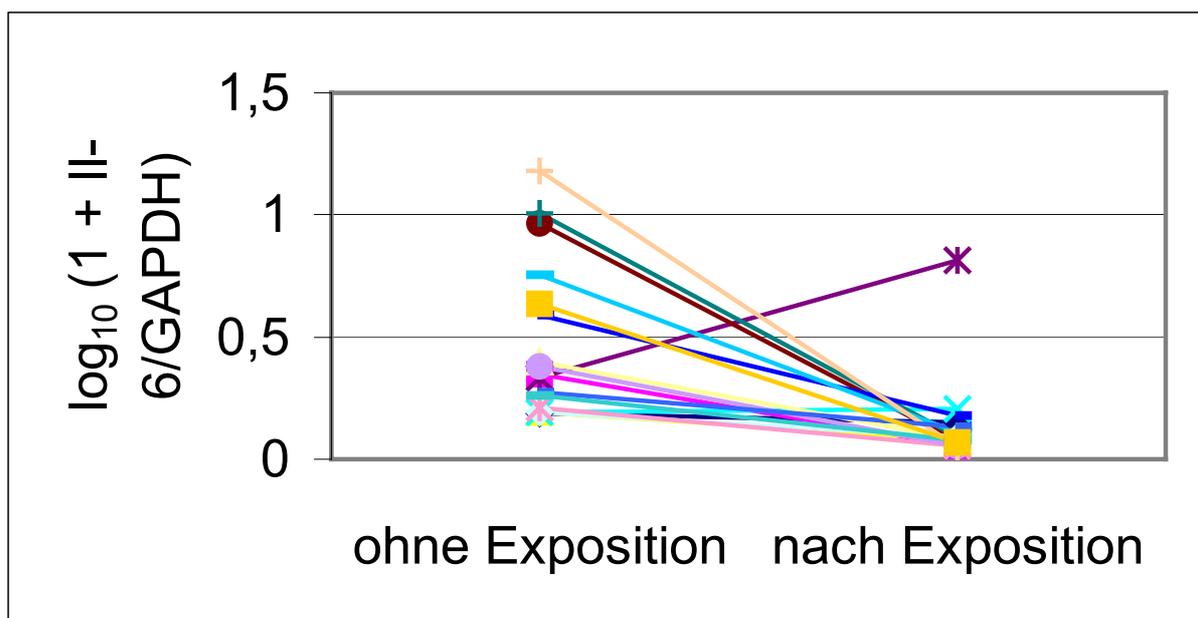


Abb. 34: IL-8/GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Nicht-Schweißern

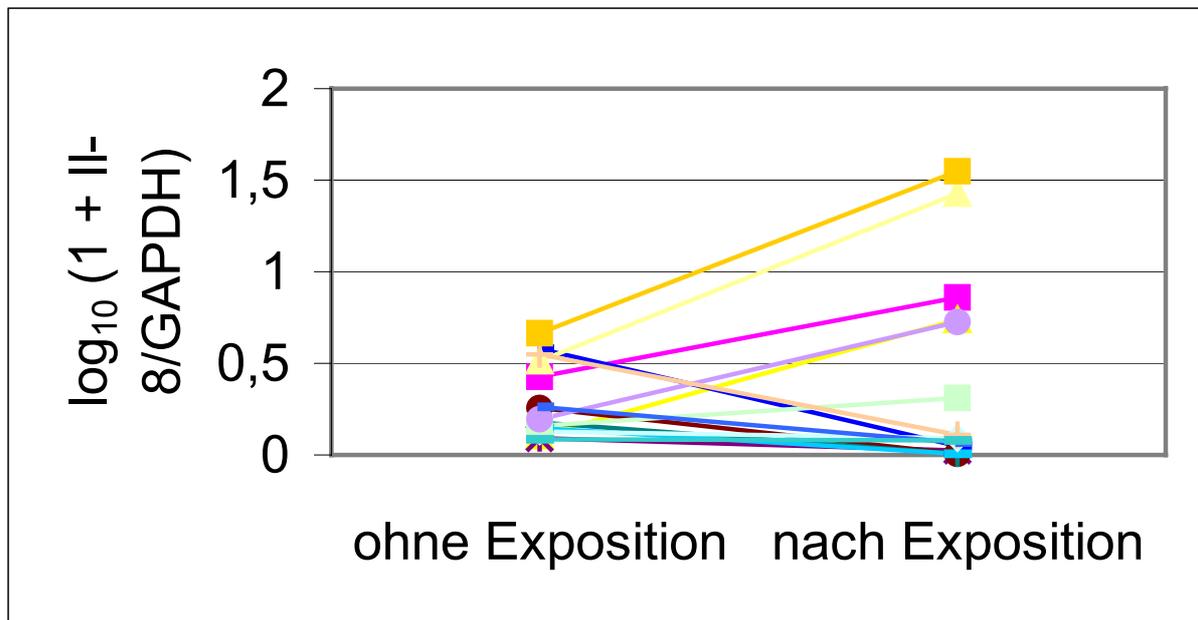
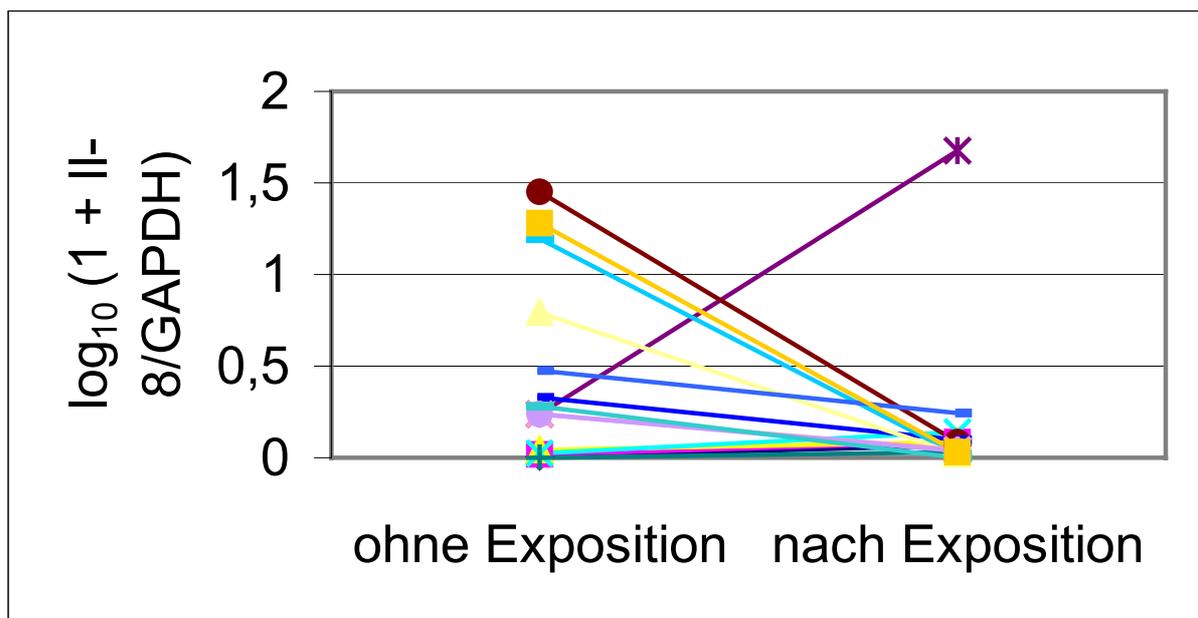


Abb. 35: IL-8/GAPDH mRNA-Expression ohne und nach Schweißrauchexposition bei Schweißern



6. Korrelationsanalyse quantifizierter Zytokine aus Sputum und NL gegenüber expositionsrelevanten Alveolarstaubkonzentrationen

Für die Bestimmung, inwiefern die während der Schweißrauchexposition gemessenen Alveolarstaubkonzentrationen $< 4 \mu\text{m}$ mit den in dieser Studie quantifizierten Zytokinen (TNF- α ; IL-1 β , IL-6, IL-8) in Sputum und nasaler Lavage korrelieren, erfolgte eine statistische Auswertung mit Hilfe der Rang-Korrelationsanalyse für metrische Variablen nach Spearman. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist aus Tab. 17-18 zu ersehen.

Tab. 17: Korrelationsanalyse zwischen den Zytokinen TNF- α ; IL-1 β , IL-6, IL-8 des Sputums und den gemessenen Alveolarstaubkonzentrationen

Kollektiv	Nicht-Schweißer				Schweißer			
Parameter	$\Delta\text{TNF-}\alpha$	$\Delta\text{IL-1}\beta$	$\Delta\text{IL-6}$	$\Delta\text{IL-8}$	$\Delta\text{TNF-}\alpha$	$\Delta\text{IL-1}\beta$	$\Delta\text{IL-6}$	$\Delta\text{IL-8}$
Alveolarstaub < 4 μm Spearman Korrelations- koeffizient	-0,180	-0,397	-0,256	-0,485	0,512	0,135	0,123	0,532
P_{SR}	0,446	0,083	0,277	0,057	0,036	0,606	0,639	0,041
N	20	20	20	17	17	17	17	15

P_{SR} : Bivariate Korrelations Analyse nach Spearman-Rho

Δ : Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer} \cdot 100)$

positiver Wert = Anstieg während Exp

negativer Wert = Abfall während Exp

Eine Gegenüberstellung der Untersuchungsparameter im Sputum erbrachte bei Schweißern eine signifikante Korrelation zwischen den Entzündungsparametern TNF- α ($r = 0,512$; $p = 0,036$) sowie IL-8 ($r = 0,532$; $p = 0,041$) und der Alveolarstaubkonzentration in der Atemluft (Abb. 36-37).

Abb. 36: Graphische Darstellung der quantifizierten TNF- α mRNA aus Sputumzellen und der gemessenen Alveolarstaubkonzentration bei Schweißern

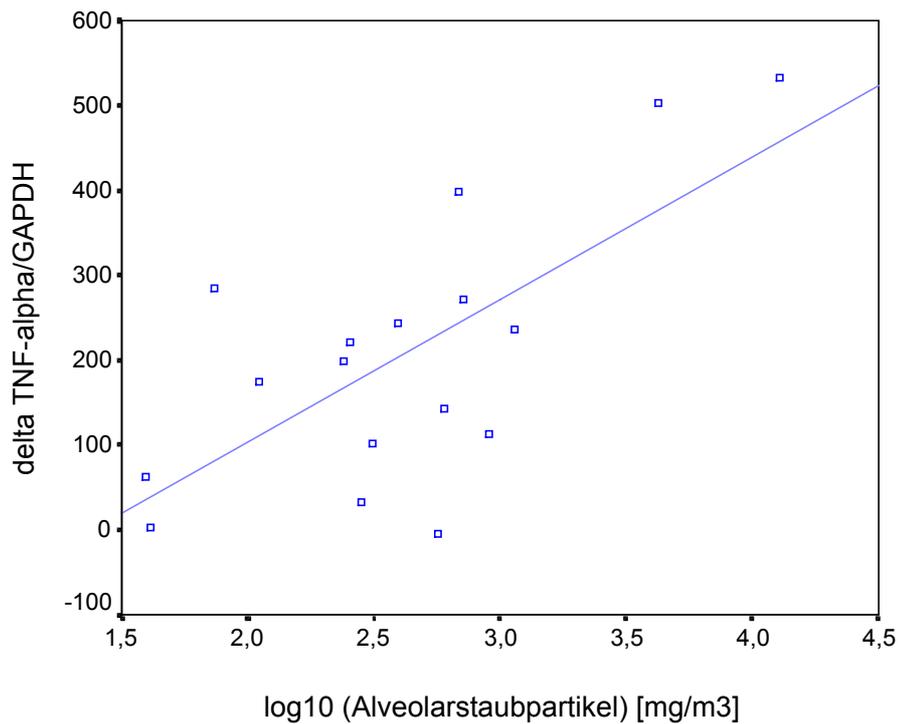
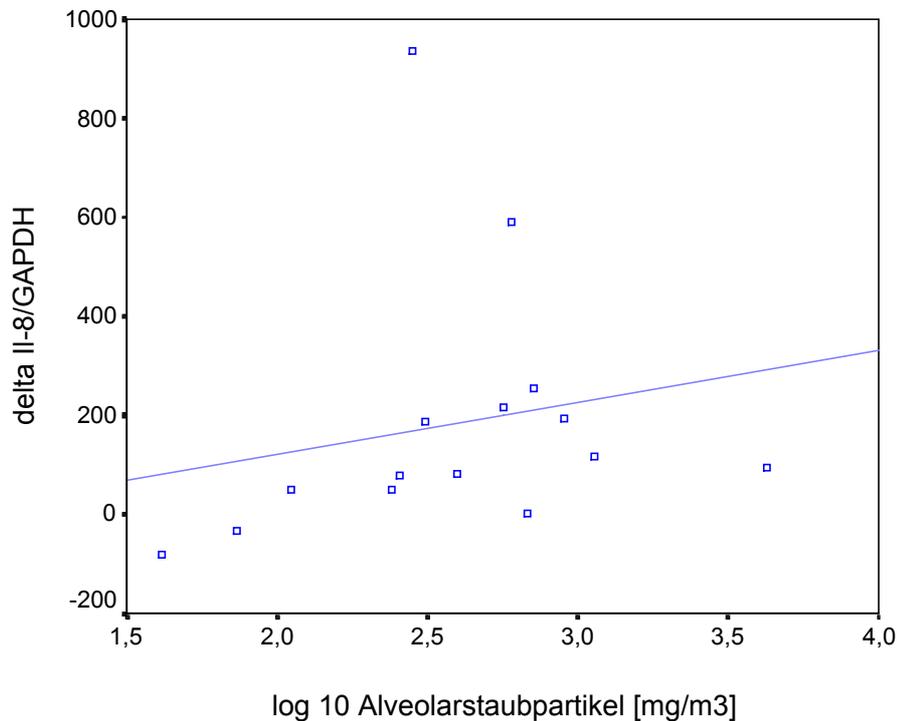


Abb. 37: Graphische Darstellung der quantifizierten IL-8 mRNA aus Sputumzellen und der gemessenen Alveolarstaubkonzentration bei Schweißern



Tab. 18: Korrelationsanalyse zwischen den Zytokinen TNF- α ; IL-1 β , IL-6, IL-8 der NL und den gemessenen Alveolarstaubkonzentrationen

Kollektiv	Nicht-Schweißer				Schweißer			
Parameter	Δ TNF- α	Δ IL-1 β	Δ IL-6	Δ IL-8	Δ TNF- α	Δ IL-1 β	Δ IL-6	Δ IL-8
Alveolarstaub								
< 4 μ m	-0,301	-0,284	0,051	-0,011	-0,222	-0,152	-0,310	-0,371
Korrelation								
P_{SR}	0,240	0,269	0,844	0,970	0,446	0,605	0,281	0,236
N	17	17	17	15	14	14	14	12

P_{SR} : Bivariate Korrelations Analyse nach Spearman-Rho

Δ : Prozentuale Veränderung ((Exp – Leer)/Leer*100)
positiver Wert = Anstieg während Exp

negativer Wert = Abfall während Exp

Zwischen den expositionsrelevanten Alveolarstaubkonzentrationen und den quantifizierten Zytokinen konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

D. DISKUSSION

1. Studiendesign

1.1 Ziel der Studie – Methode

Ziel dieser Studie war es, eine gering invasive Methode mit Hilfe der RT-PCR an Zellen des induziertem Sputums und der NL zu etablieren, welche es erlaubt, entzündliche Parameter der oberen und unteren Atemwege zu quantifizieren. Aufbauend hierauf sollte untersucht werden, inwiefern hohe Alveolarstaubpartikel-Konzentrationen entzündliche Reaktionen der Atemwegsschleimhäute bewirken.

1.2 Untersuchungskollektive

Aus diesem Grund erfolgte nach Etablierung der Untersuchungsmethode die Quantifizierung Alveolarstaub-induzierter entzündlicher Reaktionen der Atemwegsschleimhäute zunächst an 20 gesunden Probanden (Nicht-Schweißer).

Bislang wurden nur wenige Untersuchungen zur klinischen Bedeutung erhöhter Partikelbelastung bei chronisch exponierten Berufsgruppen durchgeführt (z.B. Frosig et al., 2001). Aus diesem Grund erfolgte eine Ausweitung dieser Studie unter Miteinbeziehung eines weiteren Kollektivs aus 20 gesunden Berufsschweißern.

1.3 Untersuchungsmaterial und Reproduzierbarkeit – Sekrete des Sputums und der NL

Untersuchungen mit Hilfe der Sputuminduktion gelten als sichere und gering invasive Methode für die Bestimmung entzündlicher Prozesse der unteren Atemwege.

Für eine Validierung, inwiefern die Methode der Sputuminduktion mit Hilfe der Inhalation einer hypertonen Kochsalzlösung eine Beanspruchung der bronchialen Schleimhäute bewirken kann, erfolgte in den letzten Jahren eine Reihe von Untersuchungen. So konnte in Arbeiten von Holz et al. (1998) und Nightingale et al. (1998) an gesunden unexponierten Probanden, 24 Stunden nach Sputuminduktion,

eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten bestimmt werden. Weiterführende Untersuchungen konnten diesen Effekt 48 Stunden nach Sputuminduktion jedoch nicht mehr nachweisen und belegen die Reproduzierbarkeit zelldifferentieller Auswertungen, Zytokinkonzentrationen und proinflammatorischer Proteine im Sputum unter Einhaltung einer 48 stündigen Latenzzeit (Pizzichini et al., 1996; Purokivi, 2000; Fahy, 2001). Unter Berücksichtigung dieser Untersuchungsergebnisse wurde zwischen den einzelnen Untersuchungstagen auf einen Abstand von mindestens 48 Stunden geachtet.

Recherchiert man bezüglich einer möglichen Beanspruchung der nasalen Schleimhäute durch die Methode der NL sowie deren Reproduzierbarkeit innerhalb kürzerer Abstände, lassen sich hierzu nur wenige, jedoch kontrovers geführte Arbeiten ausfindig machen. So konnte in Arbeiten von Diaz-Sanchez et al. (2000) keine unmittelbare Beanspruchung der nasalen Schleimhäute durch eine Provokation mit NaCl-Lösung nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnte in Arbeiten von Togias et al. (1990) und Baraniuk et al. (2002) der Nachweis von proinflammatorischen Effekten der nasalen Mucosa durch Exposition gegenüber NaCl-Lösung demonstriert werden. Klärend für die Diskrepanz dieser Untersuchungsergebnisse könnte die Tatsache sein, daß wie unter Abschnitt D.3.1 beschrieben, je nach Untersuchungsparameter, verschieden invasive Methoden der NL in den jeweiligen Studien Anwendung finden. Die Gewinnung nasaler Sekrete erfolgte in der hier vorliegenden Studie mit Modifikationen nach der von Naclerio et al. (1983) beschriebenen Methode. Studien von Frischer und Baraldi (2000) konnten unter Anwendung dieser Methode eine Reproduzierbarkeit bei einer Latenzzeit von mindestens 48 Stunden belegen. Unter Zugrundelegung dieser sowie der für die Sputuminduktion maßgeblichen Kriterien der Reproduzierbarkeit wurde bei der Durchführung der NL zwischen den einzelnen Untersuchungstagen auf einen Abstand von mindestens 48 Stunden geachtet.

1.4 Untersuchungsparameter

Bei einer Vielzahl von experimentellen in vitro und in vivo Studien konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, daß sogenannte proinflammatorische Zytokine in der frühen Phase entzündlicher Reaktionen involviert sind (Finkelstein et al., 1997;

Monn und Becker, 1999; Takano et al., 2002). Für die Erfassung von Schweißrauch-induzierten Entzündungsreaktion der oberen und unteren Atemwege wurde aus diesem Grund eine Quantifizierung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 an zellulären Sekreten des induziertem Sputums und der NL durchgeführt.

Für die Bestimmung einer induzierten entzündlichen Reaktion erfolgte die Quantifizierung der Untersuchungsparameter für jeden Probanden nach Schweißrauchexposition sowie als interne Kontrolle, ohne vorherige Schweißrauchexposition.

Unter Berücksichtigung von zirkadianen Rythmen (Zabel et al., 1993; Entzian et al., 1996; Lissoni et al., 1998) erfolgte der Zeitpunkt der Untersuchungen für alle Probanden einheitlich.

Wie aus unterschiedlichen Studien ersichtlich konnte für eine Generierung der in dieser Studie quantifizierten Zytokin-mRNA Latenzzeiten zwischen 2 bis 6 Stunden nach Exposition gegenüber alveolengängigen Partikel bestimmt werden (Abb. 1). Diesem Umstand Rechnung tragend erfolgte eine Quantifizierung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 gemittelt 4 Stunden nach Schweißrauchexposition.

Neben einer Vielzahl unterschiedlichster Wirkungsmechanismen spielen die chemotaktischen Eigenschaften proinflammatorischer Proteine eine wichtige Rolle für eine spezifische Vervielfältigung immunkompetenter Zellen. In einer Reihe von Publikationen konnte analog hierzu ein eindeutiger Zusammenhang zwischen inhalativer Partikel-induzierter Exposition und einer Verschiebung des Zelldifferentialbildes in Sekreten der BAL, des Sputums und der NL belegt werden (Rudell et al., 1999; Nightingale et al., 2000; Nordenhall et al., 2000; Kodavanti et al., 1999). Um einen besseren Einblick in die komplexen Zusammenhänge Alveolarpartikel-induzierter Effekte zu erzielen erfolgte, in Ergänzung zur Quantifizierung der proinflammatorischen Zytokine, der Nachweis einer entzündlichen Reaktion mit Hilfe der zelldifferentiellen Bestimmung in Sekreten des Sputums und der NL.

Parallel zu den beschriebenen Partikel-induzierten Atemwegseffekten steht die Erforschung der kausalen Zusammenhänge zwischen inhalativer partikulärer Belastung und assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen im Mittelpunkt der Partikelforschung. Trotz zunehmender Bemühungen auf diesem Gebiet konnte

bislang noch keine Klärung der involvierten pathogenetischen Mechanismen erreicht werden. Dieser Tatsache Rechnung tragend erfolgte parallel zur primären Quantifizierung proinflammatorischer Parameter des Respirationstraktes die Quantifizierung von Entzündungsparametern des peripheren Blutes. Die zur Testung ausgewählten Parameter stellen unter Berücksichtigung der Hypothese, daß Partikel-induzierte kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Veränderung von intravasalen Entzündungsparametern einhergehen können, eine sinnvolle Auswahl möglicher involvierter Faktoren dar.

1.5 Studiendesign – Zusammenfassung

Intention bei der Planung dieses Studiendesigns war es, einen konstitutiven und mechanistischen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Alveolarstaub-Exposition in Schweißrauchen und einer primär induzierten proinflammatorischen Zytokinexpression der Atemwegsschleimhäute (sozusagen als erste Instanz einer partikulären Beanspruchung) sowie darüber hinaus mögliche sekundär assoziierte kardiovaskuläre Effekte an gesunden Probanden zu bestimmen.

2. Schweißverfahren / Partikel – Exposition - Messung

Beim Schweißen, dessen Ursprünge bis ins 19. Jahrhundert zurückreichen und worunter das Vereinigen von Werkstoffen unter Anwendung von Wärme mit oder ohne Kraft verstanden wird, werden zwischenzeitlich viele verschiedene Techniken unterschieden. Eine besondere Rolle aus arbeitsmedizinischer Sicht spielt dabei das Verfahren des Lichtbogen- und Gasschweißens. Zum Lichtbogenschweißen gehören das Lichtbogenhandschweißen und das Schutzgasschweißen (z.B. Metallinertgas = MIG, Metallaktivgas = MAG, Wolframinertgas = WIG).

Die Belastung durch Schweißrauche in der Atemluft hängt von mehreren Faktoren ab, zu denen die Zeitdauer, Art des Werkstoffes bzw. Zusatzstoffes, das angewandten Schweißverfahren und die sicherheitstechnischen Vorkehrungen wie

Absauganlagen zählen. Im Hinblick hierauf erfolgte eine Standardisierung für die in dieser Studie durchgeführte Schweißrauchexposition.

2.1 Richtlinien, Grenzwerte

Schweißrauche bestehen überwiegend aus Aggregaten und Agglomeraten mit einem durchschnittlichen Partikel-Durchmesser von 0,2-0,4 μm , die aus $< 0,1 \mu\text{m}$ großen Primärpartikeln zusammengesetzt sind und somit bis in die periphersten Atemwege, die Alveolen, gelangen können. Vor allem beim Lichtbogenhandschweißen (sog. „E-Schweißen“) und beim MAG-Schweißen wird vermehrt Schweißrauch gebildet.

Als rechtsgültig gilt der allgemeine Staubgrenzwert von 6 mg/m^3 (TRGS 9000), für alveolengänge Staubpartikel beträgt der von der MAK-Kommission festgelegte Schwellenwert $1,5 \text{ mg/m}^3$. Zusätzlich wurde ein (nicht rechtsverbindlicher) MAK-Wert für einatembare Stäube von 4 mg/m^3 festgelegt. Vor allem beim Schweißen in beengten Räumen werden die allgemeinen Staubgrenzwerte deutlich überschritten. In verschiedenen Studien wurden hierbei Meßdaten von über 100 mg/m^3 Schweißrauchpartikel im Durchschnitt ermittelt (Spacilova, 1975; Zober, 1982).

2.2 Partikel-induzierte adverse Effekte

Umfangreiche umweltmedizinische Studien belegen eine prozentuale Zunahme der täglichen Sterblichkeit in Abhängigkeit vom Anstieg der täglichen Alveolarstaubbelastung (PM_{10}) um $10 \mu\text{g/m}^3$ (Künzli et al., 1997; Pope und Dockery, 1999).

Die hierzu gemessenen Alveolarstaubkonzentration PM_{10} , mit einem signifikanten Einfluß auf die Mortalität, beträgt etwa ein Zweihundertstel der bei Schweißarbeiten anfallenden Raumlufkonzentrationen.

Nach aktuellen Erkenntnissen führen insbesondere Alveolarstäube mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser von $<0,1 \mu\text{m}$ nach Ablagerung in Bronchien und Alveolarbereich zu zelltoxischen, inflammatorischen und proliferativen Effekten, wobei eine Korrelation zwischen Partikelanzahl und Partikeloberfläche besteht (Greim, 1998; BIA-Report, 1998, Oberdörster, 2001). Untersuchungen belegen darüber hinaus, daß Ultrafeinstaubpartikel weniger effizient als größere Partikel von

Makrophagen phagozytiert werden, und daß diese darüber hinaus schneller in das interstitielle Gewebe penetrieren und sogar in die periphere Blutlaufbahn gelangen können (Oberdörster, 2001).

Vergleicht man die unter umweltrelevanten Bedingungen vorkommenden Konzentrationen der Atemluft, welche wie berichtet mit einer Zunahme der Prävalenz und Inzidenz von Atemwegs- sowie Herz- und Kreislauferkrankungen vorrangig bei vorbelasteten Bevölkerungsgruppen einhergehen, so stellt sich die Frage, inwiefern eine im Vergleich zu Umweltbedingungen extrem erhöhte inhalative Belastung der Atemwege gegenüber Alveolarstaubpartikeln innerhalb eines gesunden Untersuchungskollektivs mit entzündlichen Reaktionen der Atemwege einhergeht.

2.3 Deposition / Disposition

Eine bedeutende Rolle für das Verständnis partikelassoziierter adverser respiratorischer Effekte spielt die Erkenntnis der räumlichen Verteilung inhalierter Partikel innerhalb des Respirationstraktes. Wie in einem Modell der International Commission on Radiological Protection (ICRP) (1994) bezüglich der Ablagerung von Partikeln unterschiedlicher Größe im menschlichen Atemtrakt belegt, weist das Kompartiment der Alveolen eine maximale partikuläre Ablagerung im Bereich der Alveolarstaubfraktion im Bereich zwischen 0,01 und 1 µm mit einem Maximum bei 0,2 µm auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der unter Umwelt-relevanten Bedingungen gemessenen Alveolarstaub-Verteilung (Oberdörster, 2001) sowie der in der Literatur beschriebenen Schweißrauchzusammensetzung (siehe oben).

2.4 Koexposition / additiver Effekt

Verschiedene neuere Untersuchungen diskutieren darüber hinaus einen additiven Effekt sogenannter Kofaktoren, welche parallel zur Partikelexposition eine kumulative entzündliche Reaktionen der respiratorischen Schleimhäute bewirken können. Untersuchungen von Oberdörster (2001) und Goldsmith et al. (2002) vermuten hierbei eine entscheidende Rolle verschiedener Schadstoffe wie die der Lipopolysaccharide (LPS) oder des Ozons. Demgegenüber konnte eine Adaption der

Reaktion der Atemwege gegenüber Ozon oder Cadmium belegt werden (Hackney et al. 1976). Derzeitige Bestrebungen zielen darauf ab, zu klären inwiefern hierbei eine Beladung der Partikeloberfläche mit unterschiedlichen Schadstoffen einen relevanten Beitrag zur Genese Partikel induzierter entzündlicher Atemwegsreaktionen beitragen kann oder ob es sich hierbei vielmehr - wie bisher in der Literatur beschrieben - um einen singulären Effekt der Partikel an sich handelt.

2.5 Partikelmessung

Für eine möglichst exakte Quantifizierung alveolengängiger Alveolarstaubpartikel während der Exposition gegenüber Schweißrauchen erfolgte eine Bestimmung mit Hilfe Personen-bezogener Meßgeräte. Hierbei ergeben sich eine Reihe technischer Probleme, wie die der atemwegsnahen Positionierung des Meßkopfes hinter dem Gesichtsschutzschild. Im Rahmen dieser Studie wurde hierbei auf eine größt mögliche Standardisierung geachtet.

2.6 Partikelquantifizierung

Aus technischen Gründen wurde als Maß für eine partikuläre inhalative Belastung die gemeinhin gebräuchliche Methode der gravimetrische Bestimmung von Partikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser von $< 4 \mu\text{m}$ verwendet.

Vergleicht man neuere Untersuchungen mittels der aufwendigeren Aerosol-Spektrometrie, so konnte zwischen Partikelmasse und Partikelanzahl keine Korrelation ermittelt werden. Insbesondere im Bereich $< 2,5 \mu\text{m}$ konnte eine zunehmende Divergenz beider Parameter verzeichnet werden (Peters et al., 1997; Wichmann und Peters, 2000), wenngleich der Anteil gravimetrisch bestimmter Partikel im Bereich zwischen $0,1 - 0,5 \mu\text{m}$ 82 % der Gesamtmasse einnimmt. Eine Bestimmung der partikulären Masse kann demnach lediglich als semi-quantitative Annäherung an die tatsächliche Anzahl der Partikel gewertet werden. Demgegenüber konnte in Untersuchungen von Oberdörster (2001) ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Partikelmasse und Partikeloberfläche gezeigt werden.

2.7 Kollektiv der nicht chronisch exponierten Probanden

Eine Exposition gegenüber Schweißrauchpartikeln erfolgte für das Kollektiv der Nicht-Schweißer unter standardisierten Bedingungen. Aus sicherheitstechnischen Gründen erfolgte eine Schweißrauchexposition der Probanden als sogenannte „Bystander“ in 1 m Entfernung zum Lichtbogen. Für die Erzeugung erhöhter Alveolarstaubpartikel-Konzentration in der Atemluft wurde während der 45 minütigen Schweißrauchexposition auf Absaugvorrichtungen in der Schweißerkabine verzichtet. Bei allen Probanden wurde einheitlich das MAG-Schweißverfahren angewandt.

Wie unter C.2.1 beschrieben, konnte ein mittlere Alveolarstaubkonzentration von $3,49 \text{ mg/m}^3$ in der Atemluft gemessen werden. Dieser Wert entspricht dem 2,3 fachen des in der MAK Liste festgesetzten Grenzwertes von $1,5 \text{ mg/m}^3$. Im Gegensatz hierzu konnte für einzelne Spitzenwerte das bis zu 16,9 fache des MAK-Grenzwertes erreicht werden.

2.8 Kollektiv der chronisch exponierten Schweißer

Auf Grund beruflicher Rahmenbedingungen, aus sicherheitstechnischen Vorgaben am Arbeitsplatz und innerbetrieblichen Kostengründen erfolgte eine Exposition gegenüber Schweißrauchen ausschließlich im Rahmen des routinemäßigen Arbeitsablaufes am jeweiligen Arbeitsplatz der Schweißer mit Hilfe des Elektroden- und MAK-Schweißverfahren. Die Exposition gegenüber Schweißrauchen erfolgte in einer Entfernung von 0,5 m zum Lichtbogen. Auf eine Inbetriebnahme vorhandener Absauganlagen wurde verzichtet.

Ein Vergleich der durchschnittlichen exponierten Alveolarstaubbelastung gegenüber dem derzeitig rechtsgültigen MAK-Grenzwert weist für das Kollektiv der Schweißer eine 3,1 fache Erhöhung auf. Vergleicht man demgegenüber den für dieses Kollektiv gemessenen Höchstwert von $175,9 \text{ mg/m}^3$, so konnte eine 117 fache Erhöhung festgestellt werden.

3. Methodenetablierung

3.1 Isolierung von Untersuchungsmaterial der oberen und unteren Atemwege

Atemwegsentzündungen gelten als ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von Asthma und anderen Atemwegserkrankungen (Pizzichini et al., 1996).

Neben einer Vielzahl verschiedenster Untersuchungsmethoden wie der Überprüfung von Atemwegsfunktionen (Pope et al., 1991; Pekkanen et al., 1997) oder der quantitativen Analyse von Exhalaten wie NO (Magnussen et al., 2000; Haahtela, 2002), gewinnt neben der zelldifferentiellen Bestimmung (Nightingale et al., 2000; Nordenhall et al., 2000), die biochemische und molekulargenetische Quantifizierung inflammatorischer Parameter in Sekreten der oberen und unteren Atemwege für die Bestimmung von Atemwegsentzündungen zunehmend an Bedeutung.

Für die Gewinnung von Sekreten der unteren Atemwege stellte bislang die bronchoalveoläre Lavage (BAL) das klassische Verfahren dar.

In den vergangenen Jahren konnte sich parallel hierzu für eine Vielzahl von Fragestellungen das Verfahren der Sputuminduktion als gering invasive Methode für die Gewinnung von bronchialen Sekreten etablieren (Vlachos-Mayer et al., 2000; Zeibecoglou und Siafakas, 2001). Vorteil dieses Untersuchungsverfahrens ist die geringfügige Beanspruchung der Patienten bzw. Probanden, welches losgelöst von klinischen und ambulanten Einrichtungen, d.h. auch in Feldversuchen mit geringem Aufwand, die Gewinnung von Zellen und Sekreten der unteren Atemwege erlaubt.

Grundlage einer induzierten Sputumgewinnung ist die Inhalation einer isotonen oder hypertonen Kochsalzlösung über einen definierten Zeitraum. Derzeit können, folgt man der aktuellen Literatur, vier grundlegende Varianten der inhalativen Sputuminduktion unterschieden werden. Hierbei kann zwischen der fraktionierten Inhalation mit zunehmender (Pin et al., 1992), bzw. gleichbleibender Konzentration hypertoner (in't Veen et al., 1996), respektive isotoner Kochsalzlösung (Cataldo et al., 2001) sowie einer kontinuierlichen Inhalation einer 4,5 % Kochsalzlösung über 20 Minuten (Fahy et al., 1994) unterschieden werden.

Vorrangige Aufgabe bei allen genannten Varianten der Sputuminduktion stellen die präventiven Maßnahmen zur Vermeidung einer Kochsalzaerosol-induzierten Obstruktion der Atemwege dar (Ryttila et al., 2000; Cataldo et al., 2001). Bei gesunden Untersuchungsprobanden stellen der Methacholin Provokationstest (Ausschluß von hyperreagiblen Probanden), die Inhalation eines Bronchodilators, sowie die regelmäßige Überwachung der Atemwegsfunktionen während der Kochsalzinhalation mit Hilfe eines Spirometers gebräuchliche präventive Maßnahmen dar. Zu den Maßnahmen welche das Risiko einer Atemwegsobstruktion bei vorbelasteten Patienten mit Atemwegserkrankungen (Asthma, chronische Bronchitis etc.) während einer Sputuminduktion minimieren, gehören die Verabreichung isotoner oder gering hypertoner Kochsalzaerosole über einen kurzen Zeitraum.

Generell kann davon ausgegangen werden, daß mit Zunahme der Kochsalzkonzentration sowie der Inhalationszeitdauer neben einer zunehmenden Effizienz, bronchiale Sekrete zu gewinnen, gleichzeitig das Risiko einer induzierten obstruktiven Komplikation steigt.

Neben dem Verfahren der Sputuminduktion auf der Basis einer isotonen Kochsalzlösung bei Risikogruppen wie Asthmatiker oder bei Kindern stellt analog hierzu bei gesunden erwachsenen Probanden das Verfahren der fraktionierten Sputuminduktion beginnend mit einer niedrigen Kochsalzlösung eine der sichersten und gleichzeitig effizientesten Methoden dar.

Unter Berücksichtigung vorgenannter Prämissen erfolgte die Gewinnung der unteren Atemwegssekrete einheitlich für alle Probanden mit Hilfe der fraktionierten Sputuminduktion mit aufsteigender Kochsalzkonzentration. Analog hierzu konnten die Untersuchungen in dieser Studie ohne Zwischenfällen mit ausreichendem Zellmaterial an insgesamt 40 Probanden erfolgreich durchgeführt werden. Lediglich bei drei der Probanden (2 Schweißler, 1 Nicht-Schweißler) erfolgte auf Grund einer tendenziellen Verschlechterung der Atemwegsfunktionen analog der unter B.8.1.2 genannten Abbruchkriterien eine vorgezogene Beendigung der Sputuminduktion.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse erweist sich die Methode der fraktionierten Sputuminduktion mit aufsteigenden Kochsalzkonzentrationen als geeignetes Instrumentarium für die Gewinnung von zellreichen Sekreten der unteren Atemwege bei gesunden Probanden. Recherchen der aktuellen Literatur zeigen darüber hinaus

zunehmende Bestrebungen, eine Standardisierung der Methode zu erreichen (Holz et al. 2000; Magnussen et al., 2000).

Ebenso wie die induzierte Sputumgewinnung zählt das Verfahren der nasalen Lavage (NL) zu den gering invasiven Methoden für die Gewinnung von Zellmaterial und Sekreten der oberen respiratorischen Schleimhaut (van Zuijlen et al., 2001).

In den vergangenen Jahren etablierten sich primär vier unterschiedliche Verfahren für die Gewinnung zellulärer Sekrete der oberen Atemwege. Neben dem von Melillo et al. (1998), Greiff et al. (1990) und Eichner (1979) beschriebenen Verfahren wurde für diese Studie die von Naclerio et al. (1983) beschriebene Methode angewandt. Hierbei erfolgt eine kurzfristige Inkubation der Nasenschleimhaut mit einer isotonen Kochsalzlösung, welche im Anschluß hieran einschließlich der mobilisierten nasalen Sekrete ausgeschneuzt wird. Vorteil dieser Methode ist neben dem Umstand der unkomplizierten und schnelle Durchführbarkeit die Ausbeute zellreicher Sekrete. Insgesamt konnte eine Probenentnahme für alle 40 Probanden jeweils mit und ohne vorherige Schweißrauchexposition erfolgreich durchgeführt werden.

3.2 Proben-Aufarbeitung, RNA-Isolierung, reverse Transkription, RT-PCR

3.2.1 Aufarbeitung von Sputum und Sekreten der NL

Die an die Sekretgewinnung anschließenden Aufarbeitungsschritte des Sputums und der NL erfolgten modifiziert in Anlehnung an die von In't Veen et al. (1996) beschriebene Methode. Intention der Modifikationen war es ein schonendes Verfahren zu etablieren, welches sowohl den Anforderungen der RNA-Isolierung als auch der Zelldifferenzierung gerecht wird. Eine grundlegende Schwierigkeit in der Aufarbeitung von Atemwegssekreten und einer anschließenden RNA-Isolierung besteht insbesondere darin, daß mit einer erheblichen Kontamination durch exogene und endogene RNasen zu rechnen ist. Während die Aufarbeitung für eine spätere Zelldifferenzierung separierte, muzinfreie Zellen erfordert, ist für die Isolierung einer intakten RNA eine RNase-freie bzw. -suprimierende Aufarbeitung erforderlich. Zu diesem Zweck erfolgte prinzipiell unter Einhaltung einer erniedrigten Umgebungstemperatur von +4°C eine Verkürzung der einzelnen

Aufarbeitungsschritte der muzinhaltigen Atemwegssekrete. Experimentelle Ansätze, unterschiedliche RNase-Inhibitoren zu Beginn der Aufarbeitung zuzusetzen (Versuchsansätze und Ergebnisse wurden nicht gesondert aufgeführt) erbrachten für eine quantitative Ausbeute der Gesamt-RNA keine sichtbare Verbesserung sowie für eine Zelldifferenzierung unbrauchbare nekrotische Zellen. Der in der Literatur angegebene Verarbeitungsspielraum (2 stündige Zwischenlagerung bei +4°C bis zur weiteren Verarbeitung) bei zell differentiellen Versuchsansätzen konnte aus gleichnamigen Gründen nicht toleriert werden.

3.2.2 RNA-Isolierung

Bei den in den Vorversuchen ausgetesteten modifizierten Verfahren nach Aviv und Leder (1972), Chomczynski und Sacchi (1987) und Chomczynski (1993), (Versuchsansätze und Ergebnisse wurden nicht gesondert aufgeführt) für eine Isolierung der RNA erwies sich die nach Chomczynski (1993) beschriebene Methode als die am geeignetste. Neben der einfachen Handhabung (Sambrook und Russell, 2001) ist einer der Vorteile dieser Methode der sehr hohe Anteil isolierter Gesamt-RNA (nukleäre und zytoplasmatische mRNA, rRNA, tRNA).

Auf der Grundlage einer Standardisierung des Verfahrens kann davon ausgegangen werden, daß die Isolierung der Gesamt-RNA bei allen Proben mit gleicher Effizienz erfolgte.

3.2.3 Reverse Transkription

Limitierender Faktor bei der nach Saiki et al. (1985) angewandten Methode der reversen Transkription stellt die einzusetzende Mindestmenge von 10 ng/µl an Gesamt-RNA dar. Bei einem durchschnittlichen Gehalt von 10-30 pg RNA/Zelle ist für eine erfolgreiche RNA-Isolierung mit anschließender reverse Transkription eine Mindestmenge von 1000 Zellen/Probe erforderlich. Bei der hier vorliegenden Studie konnte bei allen 160 Sputum- und NL-Proben ausreichend Zellmaterial gewonnen werden. Insgesamt erfolgte für 158 Proben eine erfolgreiche Isolierung der Gesamt-

RNA mit anschließender reversen Transkription. Der Verlust von 2 Proben kann auf technische Fehler zurückgeführt werden.

3.2.4 RT-PCR

Für eine quantitative Bestimmung exprimierter spezifischer Gentranskripte stellt das Verfahren der RT-PCR für eine Vielzahl von wissenschaftlichen Fragestellungen eine geeignete und sensitive Methode dar. Gegenüber konventionellen Verfahren, wie dem RNase protection assay (Hod, 1992; Saccomanno et al., 1992), dem cDNA array (Bucher, 1999), dem Northern-Blot und der In situ-Hybridisierung (Parker und Barnes, 1999) zeichnet sich die RT-PCR insbesondere durch ihre niedrige Nachweisgrenze spezifischer mRNA-Sequenzen aus. Vergleicht man die für eine Quantifizierung spezifischer Gentranskripte benötigte Menge an Gesamt-RNA, so liegt die Nachweisgrenze der RT-PCR gegenüber der Northern Blot Analyse bei ca. 6 pg Gesamt-RNA bis zu eintausendfach niedriger (Melton et al., 1984; Clontech Laboratories, 1991; Bustin, 2000).

Für eine Quantifizierung gering exprimierter Gentranskripte mit Hilfe der RT-PCR steht mittlerweile eine Vielzahl methodischer Varianten zur Verfügung, die sich in Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse sowie in deren Komplexität unterscheiden (Ferre, 1992; Bustin, 2000). Die Entscheidung, welche dieser Methoden für den jeweiligen Versuchsansatz am geeignetsten ist, variiert und muß den jeweiligen Umständen sowie Fragestellungen (Gen-Expressionsvergleich verschiedener Gewebe, Quantifizierung viraler Infektionen oder Medikamenten-resistenter Gene, Expositionsanalysen, Art und Menge des Untersuchungsmaterials etc.) angepaßt und von Fall zu Fall neu entschieden werden.

Neben der RT-PCR mit endogenem, externem Standard (Ferre, 1992; Gassen und Schimpf, 1999) und der komparativen PCR mit endogenem, internem Standard (Gassen und Schimpf, 1999) konnte sich zwischenzeitlich die kompetitive PCR mit heterologen Kompetitoren (sogenannten MIMICS) oder homologen Kompetitoren (Wang et al., 1989; Ferre, 1992; Siebert und Kellog, 1995; TaKaRa Biomedicals, 1999) zu einer quantitativen Nachweismethode mit hoher Reproduzierbarkeit der Messergebnisse etablieren.

Für die Anwendung der quantitativen PCR mit externen oder komparativen Standards ist es unbedingt notwendig zu gewährleisten, daß mit jedem Zyklus auch tatsächlich eine Verdoppelung der DNA-Moleküle einhergeht. Nur in diesem sogenannten linearen Bereich der PCR ist eine Quantifizierung der Matrizen-DNA möglich. Einer der Vorteile der kompetitiven PCR ist es, daß neben der hohen Meßgenauigkeit sowohl in der exponentialen Phase als auch in der sogenannten Plateauphase der PCR Amplifikation reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können (Siebert und Kellogg, 1995).

Aus diesen Gründen erfolgte in der vorliegenden Studie eine abschließende Quantifizierung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR. Hierbei mußte auf die Verwendung interner cRNA Standards auf Grund des limitierenden Untersuchungsmaterial zugunsten interner DNA Standards verzichtet werden.

Eine der grundlegenden Schwierigkeiten bei Versuchsdurchführungen mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR stellt die Herstellung der internen Standards dar. Ziel bei der Herstellung eines Kompetitors ist es, das verwendete Genfragment mit Zielsequenz-homologen Primern zu versehen sowie in Form und Größe an das Gentranskript anzugleichen. Hierfür eignen sich grundsätzlich zwei im Design verschiedene Standardtypen, der homologe und der heterologe kompetitive Standard. Während ersterer, mit nahezu homologer Nucleotidsequenz und hoher Amplifikationseffizienz dem Gentranskript sehr nahe kommt unterscheidet sich letzterer durch seine heterologe Kernsequenz mit dem Vorteil, daß eine Ausbildung von Heteroduplex Formationen suprimiert wird (TaKaRa Biomedicals, 1999, Siebert und Kellogg, 1995). Auf Grund solcher unkalkulierbaren, Nucleinsäure Interferenzen zwischen Ziel-DNA und homologen Kompetitor, erfolgte in der hier vorliegenden Studie die Anwendung eines heterologen kompetitiven Standards.

3.3 Zelldifferenzialbestimmung

Bei der Bestimmung zell-differenzieller Verschiebungen in Sekreten des Sputums und der NL wurden für die Auswertung der Ergebnisse zweierlei Bezugssysteme, die

Gesamtzellzahl sowie die Summe aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, herangezogen.

Basierend auf den erzielten Ergebnissen einer variablen Epithelzellzahl isolierter Sputum und NL Proben stellte sich die Frage, ob die Gesamtzellzahl als Bezugsgrundlage einer primär durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen geprägten Partikel-induzierten entzündlichen Reaktion gerecht wird.

Wie in Arbeiten von Fahy et al. (1984) und Holz et al. (1998) beschrieben, konnte eine zelldifferentielle Verschiebung mit einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten und einem Abfall der Makrophagen bei entzündlichen Reaktionen in Sekreten der NL und des Sputums nachgewiesen werden. Als Bezugsgrundlage diente hierbei die Gesamtzellzahl.

Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnten parallel hierzu eine durch Schweißrauch induzierte Verschiebung der Makrophagen zugunsten der neutrophilen Granulozyten auf der Bezugsgrundlage beider Zelltypen belegen. Ein entsprechender Anstieg im Bezug auf die Gesamtzellzahl konnte nicht belegt werden. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz stellt der Umstand dar, daß für die Gewinnung der Atemwegssekrete in den Studien unterschiedliche Verfahren der Sputum- und NL-Isolierung angewendet wurden. Gegenüber dem zur Diskussion angeführten Verfahren nach Pin et al. (1992), bei welchem ausschließlich sogenannte Zellkluster isoliert und aufgearbeitet werden, erfolgte für das in dieser Studie angewandte Verfahren eine Aufarbeitung der gesamten Zellsuspension.

Ziel bei der Aufarbeitung nach Pin et al. (1992) ist es Epithelzellen freie Zellsuspensionen für primär zellmorphologisch ausgerichtete Studien zu erhalten. Bezieht man sich auf aktuelle Untersuchungen der Zytokinexpression, so ist ersichtlich, daß neben einer Vielzahl von Zellen auch Epithelzellen für die Expression proinflammatorischer Zytokine verantwortlich sind.

Ziel dieser Studie war es, Veränderungen proinflammatorischer Zytokine nach Exposition gegenüber Schweißrauchen zu erfassen. Aus diesem Grund erfolgte eine Zellisolierung aus dem Gesamtvolumina isolierter Sputum- und NL-Sekrete und stellt somit eine sinnvolle Ausgangsbasis für die Quantifizierung von proinflammatorischen Zytokinen dar.

4. Deskriptive Analyse Schweißrauch-induzierter Veränderungen der Entzündungsparameter

In den vergangenen Jahren wuchs die Erkenntnis über eine Vielzahl von Zelltransmittern und deren Bedeutung in zahlreichen zellulären Mechanismen der Signaltransduktion. Mit der zunehmenden Erkenntnis über Ursprung und Ziel dieser Transmitter wuchs auch das Wissen über deren spezifische Funktionen. Mittlerweile gibt es eine Reihe von grundlegenden immunologischen und molekularbiologischen Wirkungsmechanismen wie die der Zytokin-vermittelten proinflammatorischen Reaktion.

Eine Anzahl von Zytokinen, welche auf Grund ihrer Immunreaktion beschleunigenden Wirkung auch als proinflammatorische Zytokine bezeichnet werden, besitzt die Fähigkeit, entzündliche Reaktionen entweder direkt, oder indirekt über eine sekundäre Zytokin- oder Adhäsionsmolekül-Stimulierung zu regulieren. Zu den wichtigsten Vertretern proinflammatorischer Zytokine, welche an einer frühen Reaktion der Immunantwort gegen fremde oder veränderte körpereigene Substanzen beteiligt sind, gehören unter anderem die in dieser Studie untersuchten Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8. Eine Quantifizierung der Expressionsrate der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 erfolgte in zellulären Sekreten der oberen und unteren Atemwege. Die Untersuchung erfolgte an zwei Kollektiven zu je 20 Personen ohne und nach vorheriger Exposition gegenüber Schweißrauchen.

Neben den oben angeführten proinflammatorischen Zytokinen existiert eine Vielzahl von Entzündungsparametern, welche möglicherweise bei dem in der Literatur beschriebenen Effekt einer erhöhten, Partikel-induzierten Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen könnten. Diesbezüglich erfolgte über die Untersuchungen Partikel-induzierter inflammatorischer Effekte der oberen und unteren Atemwege hinaus, die Analyse möglicher Partikel-induzierter systemischer Veränderungen anhand von 7 Entzündungsparametern im peripherem Blut.

Die Ergebnisse sollten Aufschluß über einen kausalen Zusammenhang zwischen inhalierten Alveolarpartikeln und proinflammatorischen Mechanismen liefern.

4.1 Entzündungsparameter im peripherem Blut bei nicht chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden

Für das Kollektiv der Nicht-Schweißer konnte ein Abfallen des Vasokonstriktors Endothelin-1 quantifiziert werden.

Wie in tierexperimentellen Studien von Oberdörster (2001) gezeigt werden konnte, kann es nach inhalativer Exposition gegenüber Alveolarstäuben über eine bronchopulmonale Deposition hinaus zu einer systemischen Infiltration und Deposition der Partikel in Organen wie der Leber kommen. Überlegungen, in welcher Form eine partikuläre systemische Belastung direkt oder indirekt mit einer erhöhten kardiovaskulären Veränderung einher gehen könnte, legen einen inflammatorischen und/oder koagulativen (Seaton et al., 1995) Wirkungsmechanismus nahe.

Endotheline gehören zu den vasoaktiven Peptiden, die vor allem im Endothel der Gefäßwände (aber auch in vielen anderen Organen) gebildet werden und zur Vasokonstriktion führen. Eine besondere Rolle spielen die Endotheline wahrscheinlich bei der Pathogenese der Hypertonie. Aktive Endotheline entstehen aus ihren Vorstufen unter Beteiligung des „endothelin converting enzyme“ (ECE) und wirken auf Endothelinrezeptoren (sogenannte ET-A- und ET-B-Rezeptoren).

Entsprechende Untersuchungen des peripheren Blutes mit Hilfe des enzyme-linked immuno sorbent assay erbrachten nach Schweißrauchexposition für das Kollektiv der Nicht-Schweißer einen signifikanten Abfall des Vasokonstriktors Endothelin-1 ($p_{\text{Wilcoxon}} = 0,006$). Für eine Beurteilung, inwiefern der in diesem Ausmaß beobachtete Effekt im Kontext zu einer systemischen Wechselwirkung steht, wäre im Hinblick auf weitere Versuchsansätze eine parallel einhergehende Blutdrucküberprüfung hilfreich. Erste Untersuchungen hierzu konnten jedoch nach Schweißrauchexposition weder für den Blutparameter Endothelin-1 noch für parallel durchgeführte Blutdruckmessungen signifikante Unterschiede ermitteln (Angerer et al., Publikation in Bearbeitung). Der in der Literatur beschriebene Effekt einer Streß-induzierten Endothelin-1 Expression (Yanagisawa et al., 1988; Rolinski et al., 1994) kann auf Grund der beobachteten Erniedrigung bei der Berücksichtigung weiterer Einflußfaktoren jedoch außer acht gelassen werden.

4.2 Entzündungsparameter im peripherem Blut bei chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden

Für das Kollektiv der Schweißer zeigte sich im Blutserum ein hoch signifikanter Anstieg des chemotaktischen Faktors ENA-78 sowie eine Anstieg des Adhäsionsmoleküls sICAM-1 nach Schweißrauchexposition.

Wie verschiedene andere Chemokine ist der Faktor ENA-78 (epithelial neutrophil activating peptide 78) ein chemotaktischer Botenstoff und Aktivator für neutrophile Granulozyten (Schall, 1994). Neben neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen kann ENA-78 von Endothelzellen, Epithelzellen, Muskelzellen und pulmonalen Fibroblasten durch LPS bzw. durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β exprimiert werden (Strieter et al., 1992; Schmouder et al., 1995).

Der Nachweis des Adhäsionsproteins ICAM-1 erfolgte mittels ELISA in Blutplasma. Neben der membrangebundenen Form, dem mICAM-1 existiert darüber hinaus eine durch proteolytische Spaltung erzeugte lösliche Form, das sICAM-1, welches in Serum oder beispielsweise der BAL nachgewiesen werden kann (Staunton et al., 1988; Rothlein et al., 1991; Shijubo et al., 1994). Adhäsionsproteine wie ICAM-1 repräsentieren transmembrane Glykoproteine, welche auf der Oberfläche vieler Zellen (z.B. Leukozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, dendritische Zellen, Fibroblasten), Zytokin vermittelte Signale zur Zellmigration aus den Gefäßen in das Gewebe weiterleiten und damit die Reaktionskette zur Entzündung weiterführen. In den vergangenen Jahren konnte eine erhöhte Konzentration von sICAM-1 im Serum mit entzündlichen Reaktionen und mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (Rothlein et al., 1991; Jander et al., 1993; Shijubo et al., 1994).

Eine zelluläre Expression von mICAM-1 kann durch die Zytokine TNF- α , IL-1 und IFN- γ (Interferon- γ) stimuliert werden. In Übereinstimmung hierzu läßt sich für das in dieser Studie quantifizierte IL-1 β im Blutserum ein entsprechender Anstieg nachweisen (Tab. 7). Vergleicht man darüber hinaus die zelluläre Zusammensetzung in Sekreten des Sputums, so läßt sich parallel zum Anstieg von sICAM eine Zunahme der Gesamtzellzahl in Sekreten des Sputums (Sputumfraktion 3% und 4%,

Tab. 8) nachweisen. Analog hierzu konnte in Publikationen von Roebuck (1999) Diaz-Sanchez et al. (2000) eine Zunahme der Gesamtzellzahl nach Exposition gegenüber Alveolarstäuben in Sekreten des Respirationstraktes demonstriert werden. Vergleicht man analog hierzu die in dieser Studie erfaßte zelluläre Zusammensetzung des Sputums, so konnte nach Exposition gegenüber Schweißrauchen ein signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten belegt werden (Tab. 11).

4.3 Proinflammatorische Effekte der oberen und unteren Atemwege bei nicht chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden

Für das Kollektiv der Nicht-Schweißer konnte weder im Sputum noch in der NL eine Schweißrauch-induzierte Veränderung der quantifizierten Zytokine nachgewiesen werden. Parallel hierzu erbrachten Auswertungen des Zelldifferentialbildes in Sputum und NL keine tendenziellen Veränderung in der zellulären Zusammensetzung der ausgewerteten Proben.

Bezieht man sich auf epidemiologische Umweltstudien, so kann ein Zusammenhang zwischen erhöhten umweltrelevanten Partikelkonzentrationen in der Atemluft und adversen gesundheitlichen Effekten, insbesondere bei älteren Menschen mit respiratorischen und kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnte unter bestimmten Arbeitsplatzbedingungen ein Vielfaches der beschriebenen umweltrelevanten partikulären Belastungen festgestellt werden, ohne daß eine klare Evidenz für adverse Effekte existiert.

Ziel dieses Studienabschnitts war es, ein Kollektiv aus gesunden Männern und Frauen auf entzündliche Reaktionen der oberen und unteren Atemwege nach erhöhter akuter Exposition gegenüber alveolengängigen Partikeln zu untersuchen. Die entsprechenden Ergebnisse sollten Hinweise über einen entsprechenden Partikel-induzierten pathogenen Mechanismus des Respirationstraktes erbringen. Die Tatsache, daß trotz erhöhter Alveolarstaub-Exposition kein Anstieg von Entzündungsmarkern in Sputum und NL bei 20 gesunden Probanden festgestellt werden konnte, wirft unter anderem die Frage einer Dosis/Wirkungsbeziehung auf.

Diesbezüglich existieren Überlegungen, bei welchen von der Wirksamkeit der Alveolarstäube im Niedrigdosisbereich berichtet wird. Bezieht man sich hierbei auf Daten von Schwartz und Marcus (1990), so belegen diese für niedrige ($<100 \mu\text{g}/\text{m}^3$), im Gegensatz zu hohen Partikelkonzentrationen, eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate. Betrachtet man im Kontext hierzu den Anteil der Ultrafeinstäube am Gesamtstaub, so nehmen diese einen geringen Anteil der Gesamtmasse, jedoch einen sehr hohen Anteil an der gesamten Partikelanzahl ein (Peters et al., 1997; Wichmann et al., 2000; Wichmann und Peters, 2000; Oberdörster, 2001). Darüber hinaus konnte in Arbeiten von Oberdörster (2001) sowie Willeke und Baron (1993) von einem kumulativen Effekt von Ultrafeinstaubpartikeln berichtet werden, bei welchem mit zunehmender Dichte eine erhöhte Aggregation zu größeren, gesundheitlich möglicherweise weniger relevanten Partikeln einhergeht.

Bei der Erforschung Partikel-induzierter adverser Gesundheitseffekte konzentrieren sich neuere Studien auf die Fraktion der Ultrafeinstäube ($< 0,1 \mu\text{m}$). Tendenziell zeichnet sich mittlerweile ein differenzierter Wirkungsmechanismus zwischen Alveolarstaub-Partikeln und Ultrafeinstaubpartikeln ab. So scheinen Alveolarstaub-Partikel primär einen unmittelbaren adversen Effekt auf den Respirationstrakt auszuüben, wohingegen für Ultrafeinstaubpartikel primär verzögerte (4-5 Tage) adverse Effekte auf das kardiovaskuläre System ausschlaggebend sind (Wichmann und Peters, 2000).

Interessant scheint in diesem Zusammenhang die Tatsache zu sein, daß sowohl die Partikeldeposition, als auch die Partikelverteilung bei der Induktion von inflammatorischen Effekten im Respirationstrakt eine Rolle zu spielen scheinen (Oberdörster, 2001). Entsprechend hierzu liegt für Partikel der alveolengängigen Fraktion ein tracheo-bronchiales Depositionsmaximum bei einem aerodynamischen Durchmesser von $0,002 \mu\text{m}$ sowie für das alveoläre Segment bei $0,2 \mu\text{m}$, bzw. für den Nasal-, Pharynx-, Larynx-Bereich bei $10 \mu\text{m}$ und $< 0,001 \mu\text{m}$ (International Commission on Radiological Protection, 1994). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß bei der Gewinnung von Sputum primär zelluläre Sekrete der bronchialen Schleimhaut gewonnen werden (Alexis et al., 2000).

Darüber hinaus wäre für weitere Studien auf diesem Gebiet, unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Erkenntnisse, die Untersuchungen der Partikelanzahl, der Partikelmasse sowie eine Bestimmung von Ultrafeinstäuben und Alveolarstäuben

eine interessanter Forschungsansatz in Zusammenhang mit der Entstehung entzündlicher Prozesse des Respirationstraktes (Wichmann und Peters, 2000; Oberdörster, 2001).

Für eine Klärung inwiefern eine chronisch Exposition gegenüber erhöhten Alveolarstaubkonzentrationen eine Sensibilisierung der Atemwege bewirken könnte, erfolgte in einem zweiten Studienabschnitt die Untersuchung eines chronisch gegenüber Alveolarstaubpartikeln exponierten Berufskollektivs aus 20 gesunden Schweißern.

4.4 Proinflammatorische Effekte der oberen und unteren Atemwege bei chronisch gegenüber Schweißrauch exponierten Probanden

Für das Kollektiv der Schweißer konnte bei der Quantifizierung von proinflammatorischen Parametern im Sputum vier Stunden nach Schweißrauchexposition ein signifikanter Anstieg der Zytokine TNF- α und IL-8 aufgezeigt werden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für das Zytokin IL-6 nach Belastung gegenüber Schweißrauchen eine deutlicher bzw. signifikanter Abfall in Zellen des Sputums und der NL. Weiterhin zeigte sich bei mikroskopischen Auswertungen des Zelldifferentialbildes vier Stunden nach Schweißrauchexposition sowohl im Sputum als auch in der NL ein signifikanter Abfall der Makrophagen (M/MN), gegenüber einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten (N/MN).

Regressionsanalysen erbrachten eine mittlere positive Korrelation zwischen TNF- α sowie IL-8 in Sputumzellen und der exponierten Alveolarstaubbelastung.

Bei der Betrachtung, inwiefern eine inhalative partikuläre Belastung entzündliche Reaktionen der Atemwegschleimhäute bewirken können, konnte mittlerweile vorrangig in in vitro und Tierexperimenten proinflammatorische Effekte belegt werden (Driscoll et al., 1995; Oberdörster, 1996; Goldsmith et al., 1998; Clarke et al., 1999; 2000; Driscoll et al. 2000; Fujii et al., 2001).

Entzündliche Reaktionen der Atemwege, welche zu einem Teil durch Zytokine über Membranrezeptoren vermittelt werden, regulieren zelluläre Prozesse wie die der Zellteilung und -differenzierung sowie der Zellsekretion.

Mittlerweile konnte für das Zytokin TNF- α eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Initiation entzündlicher Partikel-induzierter Prozesse des Respirationstraktes belegt werden (Driscoll et al., 1997). Einer der Reaktionswege, bei welchen inhalierte Partikel eine Rekrutierung und nachfolgende Aktivierung entzündlicher Zellen bewirken, verläuft unter anderem über die Aktivierung von Makrophagen, welche (wie auch andere Zelltypen) TNF- α freisetzen können. TNF- α weist ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten auf. Im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen gehört die Chemotaxis sowie die Verstärkung zytotoxischer und phagozytotischer Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten zu den wesentlichen Wirkungsfsaktoren von TNA- α .

TNA- α moduliert darüber hinaus eine zell- bzw. gewebspezifische Zytokinexpression (unter anderem IL-1, IL-6 und IL-8), welche in einem vielfältigen Wirkungsspektrum entzündlicher Prozesse eine Rolle spielen kann. Demgegenüber können Faktoren wie beispielsweise IL-6 oder transforming growth factor- β (TGF- β) unter bestimmten Umständen eine Inhibition von TNF- α bewirken, was einen Einblick in den komplexen Sachverhalt der Zytokinwechselwirkungen erlaubt.

Humanes TNF- α entspricht einem nicht glykosylierten Protein (17 kDA), welches Rezeptor-vermittelt seine Wirkung entfaltet. Bisher konnten zwei membranständige Formen und eine lösliche Form des TNA- α -Rezeptors (Familie der TNF-Rezeptor-Superfamilie) beschrieben werden. Unterschiedliche Aktivitätsmuster von TNA- α , wie unter anderem die Wachstumsinduktion bzw. die -Inhibition verschiedener Zelltypen in Verbindung mit anderen Rezeptor assoziierten Proteinen, werden aller Wahrscheinlichkeit nach über eine differentielle Rezeptor-Expression und/oder Regulation vermittelt.

IL-8 ist ein nicht glykosyliertes Protein (8kDa) welches von verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten oder Endothelzellen u.a. synthetisiert werden kann. Zu den vielfältigen Wirkungsmechanismen des proinflammatorischen Zytokins IL-8 gehören unter anderem die mitogene Wirkung auf Epithelzellen, die Expression von Adhäsionsmolekülen, die chemotaktische Wirkung auf wandernde Immunzellen sowie die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Bei der

Bestimmung des IL-8 Rezeptors (Familie der G-Protein vermittelten Rezeptoren) kann zwischen Typ-1 und Typ-2 Rezeptor unterschieden werden, welche unterschiedliche Affinitäten zu IL-8 bzw. zu IL-8-verwandten Faktoren (macrophage inflammatory protein (MIP-2), neutrophil-activating protein-2 (NAP-2)) aufweisen.

Wie für die Zytokine TNF- α und IL-8 beschrieben, zeichnen sich diese insbesondere durch ihre Fähigkeit, neutrophile Granulozyten chemotaktisch zu dem Ort der Entzündung zu lenken bzw. diese zu aktivieren, aus. Demgegenüber konnte in diesem Studienabschnitt ein signifikanter Anstieg der Zytokine TNF- α und IL-8 im Sputum nachgewiesen werden. Parallel hierzu konnte sowohl für das Sputum, aber auch für die NL nach Exposition gegenüber Schweißrauchen ein signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten für das Kollektiv der Schweißer ermittelt werden. Dieser Effekt eines Partikel induzierten Anstiegs neutrophiler Granulozyten konnte in mehreren Studien belegt werden (Diaz-Sanchez et al., 2000; Nordenhall et al., 2000; Harder, 2001).

Bezieht man sich darüber hinaus auf die parallel hierzu verzeichnete prozentuale Verringerung der Makrophagen nach Exposition, so wäre eine autogene Elimination der Partikel beladenen Makrophagen als Ursache denkbar (Finch et al., 1987; Holian et al., 1998). Demgegenüber konnte bei der Messung der Gesamt-Zellvitalität keine signifikante Veränderung verzeichnet werden, wenngleich für eine genauere Aussage eine differentielle Vitalitätsmessung speziell für Makrophagen erforderlich wäre. Darüber hinaus wäre für den verzeichneten Abfall der Alveolarmakrophagen auch eine zahlenmäßige Überrepräsentation der chemotaktisch mobilisierten neutrophilen Granulozyten eine mögliche Erklärung.

Wie unter C.3 beschrieben konnte für das im Blutserum quantifizierte Adhäsionsmolekül sICAM-1 ein Anstieg im Kollektiv der Schweißer ermittelt werden. Vergleicht man demgegenüber die für IL-8 zugeschriebene Funktion der Expression von Adhäsionsmolekülen, so zeichnet sich ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen den gemessenen Parametern IL-8 und sICAM ab (Bayram et al. 2001; Bachert et al., 2001).

Stellt man die Frage, inwiefern die in der Literatur beschriebenen adversen Effekte der Atemwege und des kardiovaskulären Systems nach Exposition gegenüber Umwelt- bzw. Arbeitsplatz-relevante Aerosolen tatsächlich auf eine partikuläre

Belastung reduzierbar sind, so lässt sich zum derzeitigen Zeitpunkt keine eindeutige Klärung herbeiführen. Während, in einer Vielzahl von Studien ein primär partikulärer Wirkungsmechanismus präferiert wird, konnte dem gegenüber in weiteren Studien ein Partikel assoziierter/additiver Effekt, bezogen auf verschiedene Metalle oder Ozon, angeführt werden (Carter et al., 1997; Antonini et al., 1998; Prahalad et al., 1999; Oberdörster, 2001). Denkbar wäre hierbei eine mit der partikulären Oberfläche korrelierende Zunahme absorbierter Noxen, welche umgekehrt proportional zur Partikelgröße respektive (und somit) proportional zur Partikelanzahl/Masse zunimmt (Wichmann und Peters, 2000; Oberdörster, 2001).

Eine Abklärung dieses Sachverhaltes war im Rahmen dieser Studie nicht zuletzt auf Grund der primären Zielsetzung und des enormen zusätzlichen technischen Aufwandes nicht geplant bzw. realisierbar gewesen. Für eine weitere Abklärung wären diesbezüglich jedoch weiterführende Untersuchungen an einem größeren Kollektiv (unter Einbeziehung der in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse) eine interessante Fortführung dieser Forschungsarbeit.

Vergleicht man die Ergebnisse, so kann für die zelluläre Sputumdispersion sowohl für die Zytokine TNF- α und IL-8, als auch für die neutrophilen Granulozyten eine signifikante Zunahme nach Schweißrauchexposition nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde bei der Untersuchung der NL lediglich eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten verzeichnet. Der Nachweis einer erhöhten Zytokinexpression in Sekreten der NL konnte nicht erbracht werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in einer unterschiedlichen Partikelgrößen-Deposition begründet sein. Vergleicht man die unterschiedliche partikuläre Deposition zwischen den einzelnen Kompartimenten des Respirationstraktes, so weisen die Kompartimente der Nase, des Pharynx und des Larynx eine maximale Staub-Deposition im Bereich zwischen 1 und $> 100 \mu\text{m}$ mit einem Maximum bei $10 \mu\text{m}$ auf. Demgegenüber liegt das bronchiale Depositionsmaximum bei $0,002 \mu\text{m}$ (ICRP, 1994). Untersuchungen belegen darüber hinaus eine von der Partikelgröße abhängige Phagozytose durch Makrophagen sowie eine Invasion des interstitiellen Gewebes (Ferin et al., 1991; Stearns et al., 1994). Analog hierzu wäre eine differentielle bzw. ein zeitlich unterschiedliches Auftreten einer Entzündungsreaktion zwischen den oberen und unteren Atemwegen denkbar.

Neben den aktivierenden Eigenschaften können für einer Vielzahl von Zytokinen auch inhibierende Eigenschaften zugeschrieben werden. Unter bestimmten Umständen wie z. B. nach LPS-Stimulierung können Zytokine wie TGF- β und IL-6 einer TNF- α Expression entgegen wirken (Bailly et al., 1990; Scheibenbogen und Andreesen, 1991). In Anbetracht derartiger Wechselwirkungen wäre eine ebensolche suprimierende Wechselwirkung von TNF- α auf eine Expression von IL-6 denkbar. So konnten Untersuchungen von Carty et al. (1991) belegen, daß im Gegensatz zu einer punktuellen TNF- α induzierten Erhöhung der IL-6 Expressionsrate in Fibroblastenkultur hinaus eine sukzessive tägliche TNF- α -Exposition eine stufenweise Verringerung der IL-6 Sekretion zur Folge hat.

5. Vergleichende Analyse zwischen den beiden Untersuchungskollektiven

Vorgabe dieser Untersuchung war es, unter umweltmedizinischen Aspekten Auswirkungen von erhöhten Alveolarstaubpartikeln auf die oberen und unteren Atemwege sowie sekundär auf das kardiovaskuläre System einer primär unbelasteten, gesunden Bevölkerungsgruppe zu untersuchen. Diesbezüglich erfolgte eine Auswahl an nichtrauchenden, gesunden Männern und Frauen ohne Atemwegserkrankungen oder –allergien.

Parallel hierzu waren unter arbeitsmedizinisch relevanten Gesichtspunkten die Auswirkungen einer erhöhten partikulären Exposition auf eine chronisch gegenüber Alveolarstaubpartikeln belastete Berufsgruppe wie die der Schweißer, von großem Interesse. Aus diesem Grund erfolgte eine Ausweitung dieser Studie unter Miteinbeziehung eines weiteren Kollektivs aus 20 gesunden Berufsschweißern. Auf der Grundlage einer vornehmlich männerdominierten Berufsgruppe aus Rauchern und Nicht-Rauchern erfolgte eine entsprechend repräsentative Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs aus 12 nichtrauchenden und 8 rauchenden Männern.

Eine Angleichung beider Untersuchungskollektive konnte nicht vollständig erreicht werden. Eine Gegenüberstellung der für die jeweiligen Untersuchungskollektive erzielten Ergebnissen ist somit nur bedingt aussagekräftig und kann lediglich als Ansatz für weitere Untersuchungen angesehen werden.

Bei der Betrachtung, inwiefern erhöhte inhalative Belastungen gegenüber Alveolarstaubpartikeln entzündliche Reaktionen der oberen und unteren Atemwege bewirken, konnte ausschließlich für das Kollektiv der Schweißer nach Exposition ein signifikanter Anstieg der Zytokine TNF- α und IL-8 sowie ein Abfall von IL-6 im Sputum verzeichnet werden. Eine Gegenüberstellung der prozentualen Veränderung des Zelldifferentialbildes zwischen den beiden Untersuchungskollektiven dokumentiert darüber hinaus einen signifikanten Abfall der Makrophagen (M/MN) respektive Anstieg der Neutrophilen Granulozyten (N/MN) in Sputum und NL der Schweißer.

5.1 Differentieller Wirkungsmechanismus – ein Modell

Bezieht man sich auf Untersuchungen von Alexis et al. (2000), so konnte, auf der Grundlage einer erhöhten bronchialen Exposition gegenüber Mikroorganismen und Alveolarstaubpartikeln, für Phagozyten der Bronchien gegenüber solchen aus den Alveolen eine höhere funktionale Aktivität belegt werden. Interessanter Weise zeigen Untersuchungen von Elias et al. (1987), Ferro et al., (1987) und Chanez et al., (1991) einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Makrophagen Migration in die Atemwegsmucosa und deren Phagozytosepotential.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, inwiefern chronisch gegenüber Partikeln oder Mikroorganismen exponierte Personen im Vergleich zu nicht-chronisch exponierten Personen unterschiedliche bronchiale Makrophagenpopulationen aufweisen. Denkbar wäre hierbei eine der inhalativen partikulären Belastung proportionale Regenerationsrate der respiratorischen Makrophagen, welche sich in einem prozentual erhöhten Anteil junger Makrophagen mit erhöhtem Phagozytosepotential bei chronisch gegenüber nicht chronisch belasteten Personengruppen widerspiegeln könnte. Parallel hierzu wäre eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, wie sie für diese Studie gezeigt werden konnte, denkbar.

Für die Evaluierung diese Sachverhaltes wären weitere Untersuchungen im Hinblick auf Alter/Verweildauer der Makrophagen in der respiratorischen Schleimhaut in Kombination mit einer Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-8 eine interessante Fortsetzung dieser Studie.

5.2 Berufsgruppen mit chronischer Alveolarstaubbelastung – eine Risikogruppe

In den vergangenen Jahren wurde in der Literatur über akute und chronische Atemwegserkrankungen bei Schweißern berichtet. Im Vordergrund der Betrachtung stehen dabei meist obstruktive Atemwegserkrankungen (Zober et al., 1981; Sferlazza und Beckett, 1991; Radenbach et al., 1994).

Vergleicht man die Literatur, so liegen neben Beschreibungen von Einzelfällen und Fallsammlungen meist Querschnittuntersuchungen vor, die eine Momentaufnahme des Gesundheitszustandes von Schweißern im Vergleich zu jenem von Kontrollpersonen darstellen. Durch das Querschnitt-Design könnte jedoch eine Unterschätzung der Gesundheitseffekte im Sinne eines healthy worker-Effekt eine Rolle spielen (Wieners et al., 2000).

Parallel hierzu konnte im Rahmen dieser Studie die Bereitschaft einer Alveolarstaub-induzierbaren entzündlichen Reaktion der unteren Atemwege bei chronisch gegenüber Alveolarstaub exponierten Personen wie Berufsschweißern aufgezeigt werden.

Eine Zuordnung von Berufsgruppen mit erhöhter Alveolarstaub-Exposition wie die der Schweißer im Sinne einer „Risikogruppe“ gegenüber alveolengängiger Partikel wäre analog hierzu denkbar (Frosig et al., 2001).

E. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war es den Nachweis entzündlicher Veränderungen in den oberen und unteren Atemwegen nach nicht-invasiv inhalativer Belastung gegenüber hohen Konzentrationen alveolengängiger Partikel zu erbringen. Zu diesem Zweck erfolgte eine quantitative Bestimmung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) mit Hilfe der RT-PCR sowie eine zelldifferentielle Bestimmung in Sputum und nasaler Lavage.

Für die Erforschung in welcher Form eine partikuläre Belastung darüber hinaus kardiovaskuläre Veränderungen bewirken kann, erfolgte eine Quantifizierung ausgewählter Entzündungsparameter des peripheren Blutes.

Die Untersuchungen erfolgten an zwei gesunden Untersuchungskollektiven von je 20 Personen (Nicht-chronisch gegenüber Partikeln exponiertes Kollektiv, sowie ein chronisch gegenüber Partikeln exponiertes Kollektiv) mit und ohne akute Exposition gegenüber Schweißrauch aerosolen.

Eine Auswertung der Ergebnisse sollte Aufschluß über adverse Partikel-induzierte respiratorische und kardiovaskulärer Wirkungsmechanismen erbringen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine modifizierte Aufarbeitung von zellulären Sekreten aus Sputum und der nasalen Lavage etabliert werden, welche sowohl eine Zelldifferentierung als auch eine Zytokin-Quantifizierung mit Hilfe der RT-PCR erlaubt.

Auf der Grundlage dieser Methode erfolgte eine Quantifizierung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 sowie eine Zelldifferentialbestimmung aus 160 Proben der nasalen Lavage und des Sputums. Darüber hinaus konnten die Entzündungsparameter TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ENA-78, sICAM und der Vasokonstriktor Endothelin-1 in 80 Proben des peripheren Blutes analysiert werden.

Für das Kollektiv der Nicht-Schweißer konnte weder in Sekreten des Sputums noch in denen der NL eine Schweißrauch-induzierte Veränderung der quantifizierten

Zytokine nachgewiesen werden. Parallel hierzu erbrachten Auswertungen des Zelldifferentialbildes in Sputum und NL keine auffälligen Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der ausgewerteten Proben.

Für den Vasokonstriktor Endothelin-1 konnte ein signifikanter Abfall im peripheren Blut quantifiziert werden.

Für das Kollektiv der Schweißer konnte bei der Quantifizierung von proinflammatorischen Parametern im Sputum vier Stunden nach Schweißrauchexposition ein signifikanter Anstieg der Zytokine TNF- α und IL-8 aufgezeigt werden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für das Zytokin IL-6 nach Belastung gegenüber Schweißrauchen eine deutlicher bzw. signifikanter Abfall in Zellen des Sputums und der NL. Weiterhin zeigte sich bei mikroskopischen Auswertungen des Zelldifferentialbildes vier Stunden nach Schweißrauchexposition sowohl im Sputum als auch in der NL ein signifikanter Abfall der Makrophagen (M/MN) gegenüber einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten (N/MN).

Regressionsanalysen erbrachten für das Kollektiv der Schweißer eine mittlere positive Korrelation zwischen Alveolarstaubbelastung und TNF- α sowie IL-8 in Sputumzellen. Dies spricht für eine Alveolarstaub-induzierte proinflammatorische Reaktion der unteren Atemwege.

Für das Kollektiv der Schweißer zeigte sich im Blutserum ein hoch signifikanter Anstieg des chemotaktischen Faktors ENA-78 sowie ein Anstieg des Adhäsionsmoleküls sICAM-1 nach Schweißrauchexposition.

Klärend für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse zwischen dem Kollektiv der nicht chronisch und dem der chronisch gegenüber Alveolarpartikel exponierten Probanden könnte der Umstand einer unterschiedlich zusammengesetzten Makrophagenpopulation der Atemwegsmucosa sein. Denkbar hierbei wäre eine chronisch Alveolarstaubpartikel induzierte, erhöhte Migrations- und Regenerationsrate der Alveolarmakrophagen.

Zusammenfassend zeichnet sich bei der Betrachtung der vorliegenden Untersuchungsergebnisse die Bereitschaft einer Alveolarstaub-induzierbaren entzündlichen Reaktion der unteren Atemwege bei chronisch gegenüber

Alveolarstaub exponierten Personen, wie die der Berufsschweißer ab. Im Gegensatz hierzu konnte solch ein Effekt bei nicht-chronisch gegenüber Alveolarstaub-exponierten gesunden Personen nicht nachgewiesen werden.

Eine Zuordnung von Berufsgruppen mit erhöhter Alveolarstaub-Exposition wie die der Schweißer im Sinne einer „Risikogruppe“ gegenüber alveolengängigen Partikeln wäre analog hierzu denkbar.

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse könnten einen Beitrag zur Aufklärung möglicher Wirkungsmechanismen liefern, welche mit den in der Literatur beschriebenen Partikel-induzierten adversen respiratorischen sowie kardiovaskulären Effekten in Zusammenhang stehen.

F. ANHANG

Die im Abschnitt „Material und Methoden“ genannten Bezugsquellen werden hier näher spezifiziert:

- Biochrom KG, Berlin, Deutschland;
- Bio-TEK Instruments, Neufahrn, Deutschland;
- Bio Whitaker, Verviers, Belgien;
- Braun, Melsungen, Deutschland;
- Calbiochem, Bad Soden, Deutschland;
- Clontech, Heidelberg, Deutschland;
- Dade Behring, Schwalbach, Deutschland;
- Eppendorf, Hamburg, Deutschland;
- GiBCo, Karlsruhe, Deutschland;
- Glaxo Smith Kline, München, Deutschland;
- GSA Messgerätbau, Neuss, Deutschland;
- Haan & Wittmer GmbH, Friolzheim, Deutschland;
- Heraeus, Hanau, Deutschland;
- Hitachi, Rodgau, Deutschland;
- Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland;
- Jaeger-Toennies, Hoechberg, Deutschland;
- Leitz, Wetzlar, Deutschland;
- Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland;
- Linde, Unterschleißheim, Deutschland;
- Lindopharm, Hilden, Deutschland;
- Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland;
- Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland;
- Merck (VWR), Neufahrn, Deutschland;
- Minnesota Valley Engineering Inc., Minnesota, USA;
- MWG, Ebersberg, Deutschland;
- Omron, Tokyo, Japan;
- Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden;
- Pharmacia&Upjohn, Dübendorf, Deutschland;
- Phoretix, Newcastle upon Tyne, Großbritannien;

- R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland;
- Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland;
- Roche, Mannheim, Deutschland;
- Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland;
- Shandon, München, Deutschland;
- Sigma, München, Deutschland;
- Sigma Amelung, Bielefeld, Deutschland;
- SPSS GmbH Software, München, Deutschland;
- Sysmex, Norderstedt, Deutschland;

Fragebogen – Exposition gegenüber Schweißrauch

Probanden-Nummer: □□□□

Gruppe: □

I. Beruf und Arbeitsplatz

1. Welchen Schulabschluß haben Sie?
 - () Hauptschulabschluß
 - () Realschulabschluß
 - () Abitur
 - () anderen Schulabschluß
2. Haben Sie eine abgeschlossene Berufsausbildung?
 - () nein
 - () ja, welche
3. Welche Tätigkeit üben Sie zur Zeit aus?

 Seit wann:
4. Falls Sie in anderen Berufen oder Firmen tätig waren, geben Sie bitte Art und Zeitraum der Beschäftigung an:

5. Wie groß ist der Raum/die Werkshalle, an dem/der sich Ihr jetziger Arbeitsplatz befindet?

6. Wieviele Stunden am Tag schweißen Sie durchschnittlich?
7. Welches Schweißverfahren wenden Sie an?
8. Welche Metalle schweißen Sie?
9. Welche Schutzkleidung tragen Sie am Arbeitsplatz?
10. Sind Absauganlagen installiert, wenn ja, wie weit von Ihrem Arbeitsplatz entfernt?

11. Welchen Freizeitaktivitäten gehen Sie nach?

II. Gesundheitsfragen

1. Hatten sie jemals Sie an Ihrem Arbeitsplatz Beschwerden an den Atemwegen (Nase, Lunge) oder an der Haut? () nein () ja

Falls ja,

welche Beschwerden?

.....

bei welchem Arbeitsvorgang?

2. Hatten Sie jemals in den letzten 12 Monaten wiederholt Husten? () nein () ja

3. Hatten Sie in den letzten 2 Jahren insgesamt jeweils mehr als 3 Monate pro Jahr

Husten und Auswurf? () nein () ja

4. Trat der Husten überwiegend am Arbeitsplatz auf? () nein () ja

5. Sind Sie Raucher? () nein () ja

Falls ja,

seit wann?.....

wieviele Zigaretten pro Tag durchschnittlich?

Falls Sie früher geraucht haben,

wieviele Jahre?

wieviele Zigaretten durchschnittlich?

6. Haben Sie in den letzten 12 Monaten ein pfeifendes oder brummendes

Geräusch in Ihrem Brustkorb gehört? () nein () ja

7. Sind Sie irgendwann in den letzten 12 Monaten durch einen Anfall von

Atemnot aufgewacht? () nein () ja

8. Haben Sie jemals einen Asthmaanfall erlitten? () nein () ja

Falls ja, wann?

9. Haben Sie allergischen Schnupfen, z. B. „Heuschnupfen“? () nein () ja

10. Hatten Sie in den letzten 2 Wochen eine Atemwegserkrankung? () nein () ja

11. Nehmen sie zur Zeit Medikamente ein? () nein () ja

Falls ja, Name/ Dosis:

G. LITERATURVERZEICHNIS

Abel, G., Czop, J.K.:

Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1 beta,
Int J Immunopharmacol 14, 1363-1373 (1992).

Aviv, H. und Leder, P. :

Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose,
Proc Natl Acad Sci, 69, 14,8-1412 (1972).

Alexis, N., Soukup, J., Ghio, A. und Becker, S. :

Sputum Phagocytes from Healthy Individuals Are Functional and Activated: A Flow Cytometric Comparison with Cells in Bronchoalveolar Lavage and Peripheral Blood,
Clinical Immunology, 97,21-.32 (2000).

American Thoracic Society:

Standardization of Spirometry, 1994 Update,
Am J Respir Crit Care Med 152, 1107-1136 (1995).

Antonini, J.M., Clarke, R.W., Krishana Murthy, G.G., Sreekanthan, P., Jenkins, N., Eagar, T.W. und Brain, J.D.:

Freshly generated stainless steel welding fume induces greater lung inflammation in rats as compared to aged fume,
Toxicol Lett, 98, 77-86 (1998).

Akbar-Khanzadeh, F.:

Short-term respiratory function changes in relation to workshift welding fume exposures,
Int Arch Occup Environ Health 64, 393-397 (1993).

Arcari, P., Martinelli, R. und Salvatore, F.:

The complete sequence of a full length cDNA for a human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: evidence for multiple mRNA species, *Nucleic Acids Res*, 12, 9179-9189 (1984).

Bachert, C., van Kempen, M.J., Hopken, K., Holtappels, G. und Wagenmann, M.:

Elevated levels of myeloperoxidase, pro-inflammatory cytokines and chemokines in naturally acquired upper respiratory tract infections, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 258, 406-412 (2001).

Bailly, S., Ferrua, B., Fay, M. und Gougerot-Pocidalo, M.A.:

Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP, *Cytokine*, 2, 205-210 (1990).

Baraniuk, J.N., Ali, M. und Naranch, K.:

Hypertonic saline nasal provocation and acoustic rhinometry, *Clin Exp Allergy*, 32, 543-550 (2002).

Bayram, H., Sapsford, R.J., Abdelaziz, M.M. und Khair, O.A.:

Effect of ozone and nitrogen dioxide on the release of proinflammatory mediators from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients in vitro, *J Allergy Clin Immunol*, 107, 287-294 (2001).

Becker, S., Quay, J., Soukup, J.:

Cytokine (Tumor Necrosis Factor, IL-6 and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages, *The American Association of Immunologists* 147, 4307-4312 (1991).

Belda, J., Parameswaran, K., Keith, P.K. und Hargreave, F.E.:

Repeatability and validity of cell and fluid-phase measurements in nasal fluid: a comparison of two methods of nasal lavage, *Clin Exp Allergy*, 31, 1111-1115 (2001).

Bucher, P.:

Regulatory elements and expression profiles,
Current Opinion in Structural Biology, 9, 400-407 (1999).

Bustin, S.A.:

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays,
Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193 (2000).

Carty, S.E., Buresh, C.M. und Norton, J.A.:

Decreased IL-6 secretion by fibroblasts following repeated doses of TNF alpha: post-transcriptional gene regulation,
J Surg Res, 51, 24-32 (1991).

Cataldo, D., Foidart, J. M., Lau, L., Bartsch, P., Djukanovic, R. und Louis, R. :

Induced sputum : comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma,
Chest, 120, 1815-1821 (2001).

Chomczynski, P. und Sacchi, N.:

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,
Anal. Biochem. 162, 156 - 159 (1987).

Chomczynski, P.:

A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples,
Bio Techniques, 15, 532-534 (1993).

Clark, J.M. und Swika, R.L.:

Experimental Biochemistry, zweite Auflage, Freeman and Company, San Francisco (1977).

Clark, B.D., Collins, K.L., Gandy, M.S., Webb, A.C. und Auron, P.E.:

Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene,

Nucleic Acids Research, 14, 7897-7914 (1987).

Clarke, R.W., Catalano, P.J., Koutrakis, P., Murthy, G.G., Sioutas, C., Paulauskis, J., Coull, B., Ferguson, S. und Godleski, J.J.:

Urban air particulate inhalation alters pulmonary function and induces pulmonary inflammation in a recent model of chronic bronchitis,

Inhal Toxicol, 11, 637-656 (1999).

Clontech Laboratories, Methods & Applications, Book 1 (1991).

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe:

MAK- und BAT-Werte-Liste,

Wiley-VCH, Mitteilung 35 (2001).

Diaz-Sanchez, D., Jyrada, M., Ng, D., Nel, A. und Saxon, A.:

In vitro nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines rantes, MIP-1 alpha, and MCP-3 in humans,

Clin Immunol, 97, 140-145 (2000).

Driscoll, K.E., Hassenbein, D.G., Carter, J.M., Kunkel, S.L., Quinlan, T.R. und Mossman, B.T.:

TNF α and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure,

Toxicology Letters, 82/83, 483-489 (1995).

Driscoll, K.E., Carter, J.M., Hassenbein, D.G. und Howard, B.:

Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment,

Environ Health Perspect, 105, 1159-1164 (1997).

Eichner, H.:

Eine neue Methode zur Gewinnung von Nasensekret und erste Untersuchungen zur Eiweißzusammensetzung des Nasensekretes mittels Diskelektrophorese,

Laryng Rhinol, 53, 269-275 (1979).

Entzian, P., Linnemann, K., Schlaak, M. und Zabel, P.:

Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines,

Am J Respir Crit Care Med, 153, 1080-1086 (1996).

Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M. und Alexander, M.:

Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene,

J Biol Chem, 263, 15335-15341 (1988).

Fahy, J.V., Liu, J., Wong, H. und Boushey, H.A.:

Analysis of cellular and biochemical constituents of induced sputum after allergen challenge: A method for studying allergic airway inflammation,

J Allergy Clin Immunol, 93, 1031-1039 (1994).

Fahy, J.F., Boushey, H.A., Lazarus, S.C., Mauger, E.A., Cherniack, R.M., Chinchilli, V.M., Craig, T.J., Drazen, J.M., Ford, J.G., Fish, J.E., Israel, E., Kraft, M., Lemanske, R.F., Martin, R.J., McLean, D., Peters, S.P., Sorkness, C., Scefler, S.J; NHLBI Asthma Clinical Research Network:

Safety and reproducibility of sputum induction in asthmatic subjects in a multicenter study,

Am J Respir Crit Care Med, 163, 1470-1475 (2001).

Farrell, Jr., R.E.:

RNA Methodologies, Academic Press, New York (1993).

Ferrin, J., Oberdörster, G., Soderholm, S.C. und Gelein, R.:

Pulmonary tissue access of ultrafine particles,

J. Aerosol Med, 4, 57-68 (1991).

Ferre, F.:

Quantitative or Semi-Quantitative PCR: Reality Versus Myth,
PCR Methods and Applications, 2, 1-9 (1992).

Fink, G.L., McNeill, K.L., Hayes, T.L. und Fisher, G.L.:

In vitro interactions between pulmonary macrophages and respirable particles,
Environ Res, 44, 241-253, (1987).

Finkelstein, J.N., Johnston, C., Barrett, T. und Oberdörster, G.:

Particulate-cell interaction and pulmonary cytokine expression,
Environ Health Perspect, 105, 1179-1182 (1997).

Frischer, T. und Baraldi, E.:

Upper Airway Sampling,
Am J Respir Crit Care Med, 162, 28-30 (2000).

Frosig, A., Bendixen, H. und Sherson, D.:

Pulmonary deposition of particles in welders: on-site measurements,
Arch Environ Health, 56, 513-521 (2001).

Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J.C., Vincent, R. und Van Edden, S.F.:

Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells,
Am J Respir Cell Mol Biol, 25, 265-271 (2001).

Gassen, H.G. und Schrimpf, G.:

Genetische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin (1999).

Goldsmith, C.A., Imrich, A., Danaee, H., Ning, Y.Y. und Kobzik, L.:

Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages,
J Toxicol Environ Health, 54, 529-549 (1998).

Goldsmith, C.A., Ning, Y., Qin, G., Imrich, A., Lawrence, J., Murthy, G.G., Catalano, P.J. und Kobzik, L.:

Combined air pollution particle and ozone exposure increases airway responsiveness in mice,

Inhal Toxicol, 14, 325-347 (2002).

Graham, D.E. und Koren, H.S.:

Biomarkers of inflammation in ozone exposed humans: comparison of the nasal and bronchoalveolar lavage,

Am. Rev. Respir. Dis., 142, 152-156 (1990).

Greiff, L., Pipkorn, U., Alkner, U. und Persson, C.G.:

The "nasal pool" device applies controlled concentration of solutes on human nasal airway mucosa and samples its surface exudations/secretions,

Clin Exp Allergy, 20, 253-259 (1990).

Haahtela, T.:

Assessing airway inflammation: from guessing to quantitative measurements,

Ann Med, 34, 74-76 (2002).

Hackney, J.D., Linn, W.S., Buckley, R.D. und Hislop, H.J.:

Studies in adaption to ambient oxidant air pollution: effects of ozone exposure in Los Angeles residents vs. new arrivals,

Environ Health Perspect, 18, 141-146 (1976).

Harder, S.D., Soukup, J.M., Ghio, A.J., Devlin, R.B. und Becker, S.:

Inhalation of PM_{2,5} does not modulate host defense or immune parameters in blood or lung of normal human subjects,

Environ Health Perspect, 109, 599-604 (2001).

Heckner, F. und Freud M.:

Praktikum der mikroskopischen Hämatologie, 10. Auflage, Urban&Fischer Verlag (2001).

Hirsch, S.R., Zastrow, J.E. und Kory, R.C.:

Sputum liquefying agents: a comparative in vitro evaluation,
J Lab Clin Med, 74, 346-353 (1969).

Hod, Y.:

A simplified ribonuclease protection assay,
Biotechniques, 13, 852-854 (1992).

Holian, A., Hamilton, R.F.Jr., Morandi, M.T., Brown, S.D. und Li, L.:

Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages,
Environ Health Perspect, 106, 127-132 (1998).

Holz, O., Richter K., Jörres, R.A., Speckin, P., Mücke, M. und Magnussen, H.:

Changes in sputum composition between two inductions performed on consecutive days,
Thorax, 53, 83-86 (1998).

Holz, O., Jörres, R.A., Koschyk, S., Speckin, P., Welker, L. und Magnussen, H.:

Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects,
Clinical and Experimental Allergy, 28, 284-292 (1998).

Ibelgaufts, H.:

Gentechnologie von A bis Z, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1990).

International Commission on Radiological Protection (ICRP):

Annals of the ICRP, Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. A Report of a Task Group of the ICRP,
Pergamon Press, Oxford, ICRP Publication 66 (1994).

In't Veen, J.C.C.M., de Gouw, H.W.F.M., Smits, H.H., Sont, J.K., Hiemstra, P.S., Sterk, P.J. und Bel, E.H.:

Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma,

Eur Respir J, 9, 2441-2447.

Jander, S., Heidenreich, F. und Stoll, G.:

Serum and CSF levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in inflammatory neurologic diseases,

Neurology, 43, 1809-1813 (1993).

Kodavanti, U.P., Jackson, M.C., Ledbetter, A.D., Richards, J.R., Gardner, S.Y., Watkinson, W.P., Campen, M.J. und Costa, D.L.:

Lung injury from intratracheal and inhalation exposures to residual oil fly ash in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension,

J Toxicol Environ Health, 57, 543-563 (1999).

Krishnaswamy, G., Liu, M.C., Su, S.N., Kumai, M., Xiao, H.Q., Marsh, D.G. und Huang, S.K.: Analysis of Cytokine Transcripts in the Bronchoalveolar Lavage Cells of Patients with Asthma,

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 9, 279-286 (1993).

Künzli, N., Kaiser, R., Rapp, R., Sommer, H., Wanner, H.-U., Seethaler, R. und Ackermann-Lieblich, U.:

Luftverschmutzung in der Schweiz – Quantifizierung gesundheitlicher Effekte unter Verwendung epidemiologischer Daten,

Schweiz Med Wochenschr, 127, 1361-1370 (1997).

Liappis, N. und Berdel, D.: Evaluation der RAST-Allergen-Superscheibe und der RAST-Allergen-Multischeibe in der In-vitro-Allergie-diagnostik in Serum von Kindern, Allergologie, 10(1), 17-19 (1987).

Lissoni, P., Rovelli, F., Brivio, O. und Fumagalli, L.:
Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm
of the pineal hormone melatonin in healthy humans,
Nat Immun, 16, 1-5 (1998).

Magnussen, H., Holz, O., Sterk, P.J., Hargreave, F.E.:
Noninvasive methods to measure airway inflammation: future considerations,
Eur Respir J, 16, 1175-1179 (2000).

Marmur, J.: A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from
microorganisms,
J. Mol. Biol., 3, 208-218 (1961).

Maslennikov, O.V., Sharov, I.G., Potekhina, I.P., Dushkina, N.G., Kryzhanovskaia,
N.A. Maslennikova, N.O., Bolgov, V.F., Pavlovskaja, E.E., Zheglova, L.V. und
Chalkina, S.N.:
Effect of ozone therapy on hemostatic changes in patients with vascular
atherosclerosis,
Klein Med, 75, 35-37 (1997).

Melillo, G., Balzano, G., Stefanelli, F., Iorio, C., DeAngelis, E. und Melillo, E.:
Ultrasonic nebulization of hypertonic solution: a new method for obtaining specimens
from nasal mucosa for morphologic and biochemical analysis in allergic rhinitis,
Allergy, 53, 794-797 (1998).

Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M.R.:
Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA hybridization probes from
plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter,
Nucleic Acids Research, 12, 7035-7056 (1984).

Monn, C. und Becker, S.:
Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes
exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air,
Toxicol Appl Pharmacol, 155, 245-252 (1999).

Naclerio, R.M., Meier, H.L., Kagey-Sobotka, A., Adkinson, N.F., Meyers, D.A., Norman, P.S. und Lichtenstein, L.M.:
Mediator Release After Nasal Airway Challenge with Allergen,
Am. Rev. Resp. Dis., 128, 597-602 (1983).

Naofumi, M., Masahiro, S. und Kouji, M.:
Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8,
Journal of Immunology, 143, 1366-1371 (1989).

Nightingale, J.A., Rogers, D.F. und Barnes, P.J.:
Effekt of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers,
Thorax, 53, 87-90 (1998).

Nightingale, J.A., Maggs, R., Cullinan, P., Donnelly, L.E., Rogers, D.F., Kinnersley, R., Fan Chung, K., Barnes, P.J., Ashmore, M. und Newman-Taylor, A.:
Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates,
Am J Respir Crit Care Med, 162, 161-166 (2000).

Nordenhall, C., Pourazar, J., Blomberg, A., Levin, J.O., Sandstrom, T. und Adeiroth, E.:
Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum,
Eur Respir J, 15, 1046-1051 (2000).

Oberdörster, G.:
Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles,
Inhal Toxicol, 8, 73-89 (1996).

Oberdörster, G.:
Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles,
Int Arch Occup Environ Health, 74, 1-8 (2001).

Parker, R.M. und Barnes, N.M.:

mRNA: detection by in situ and northern hybridization,
Methods in Molecular Biology, 106, 247-283 (1999).

Pekkanen, J., Timonen, K.L., Ruuskanen, J., Reponen, A. und Mirme, A.:

Effects of ultrafine and fine particles in urban air on peak expiratory flow among children with asthmatic symptoms,
Environ Res, 74, 24-33 (1997).

Peters, A., Wichmann, H.E., Tuch, T., Heinrich, J. und Heyder, J.:

Respiratory effects are associated with the number of ultra-fine particles,
Am. J. Respir. crit. Care Med., 155, 1376-1383 (1997).

Pin, I., Gibson, P.G., Kolendowicz, R., Girgis-Gabardo, A., Denburg, J.A., Hargreave, F.E. und Dolovich, J.:

Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma,
Thorax, 47, 25-29 (1992).

Pipkorn, U. und Karlsson, G.:

Methods for obtaining specimens from the nasal mucosa for morphological and biochemical analysis,
Eur Respir J, 1, 856-862 (1988)

Pizzichini, E., Pizzichini, M.M.M., Efthimiadis, A., Evans, S, Morris, M.M., Squillace, D., Gleich, G.J., Dolovich, J., und Hargreave, F.E.:

Indices of Airway Inflammation in Induced Sputum: Reproducibility and Validity of Cell and Fluid-Phase Measurements,
Am J Respir Crit Care Med, 154, 308-317 (1996).

Pope, C.A., Dockery, D.W., Spengler, J.D. und Raizenne, M.E.:

Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis,
Am Rev Respir Dis, 144, 668-674 (1991).

Pope C.A. und Dockery, D.W.:

Air pollution and health: Epidemiology of particle effects,
Academic Press, San Diego, 673-705 (1999).

Prahalad, A.K., Soukup, J.M., Inmon, J., Willis, R., Ghio, A.J., Becker, S. und
Gallagher, J.E.:

Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to
particulate elemental chemistry,
Toxicol Appl Pharmacol, 158, 81-91 (1999).

Purokivi, M., Randell, J., Hirvonen, M.-R. und Tukiainen, H.:

Reproducibility of measurements of exhaled NO, and cell count and cytokine
concentrations in induced sputum,
Eur Respir J, 16, 242-246 (2000).

Radenbach, D., Nowak, D., Jörres, R. und Magnusson, H. :

Schweißen und Atmungsorgane - Untersuchungsergebnisse bei 30
symptomatischen Schweißern,
Atemw-Lungenkrankh, 21, 105-111 (1995).

Roebuck, K.A. :

Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression :differential activation
and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review),
Int J Mol Med, 4, 223-230 (1999).

Rolinski, B., Geier, S.A., Sadri, I., Klauss, V., Bogner, J.R., Ehrenreich, H. und
Goebel, F.D.:

Endothelin-1 immunoreactivity in plasma is elevated in HIV-1 infected patients with
retinal microangiopathic syndrome,
Clin Investig, 72, 288-293 (1994).

Rothlein, R., Mainolfi, E.A., Czajkowski, M. und Marlin, S.D.:

A form of circulating ICAM-1 in human serum,
J Immunol, 147, 3788-3793 (1991).

Rudell, B., Blomberg, A., Helleday, R., Ledin, M.C., Lundback, B., Stjernberg, N., Horstedt, P. und Sandstrom, T.:

Bronchoalveolar inflammation after exposure to diesel exhaust: comparison between unfiltered and particle trap filtered exhaust,

Occup Environ Med, 56, 527-534 (1999).

Rytila, P.H., Lindquist, A.E. und Laitinen, L.A.:

Safety of sputum induction in chronic obstructive pulmonary disease,

Eur Respir J, 15, 1116-1119 (2000).

Sacomanno, C.F., Bordonaro, M., Chen, J.S. und Nordstrom, J.L.:

A faster ribonuclease protection assay,

Biotechniques, 13, 846-850 (1992).

Sachs, L.: Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden, Springer Verlag, Berlin (1996).

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N.:

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia,

Science, 230, 1350-1354 (1985).

Sambrook, J. und Russell, D.W.:

Molecular Cloning: A Laboratory Manual,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, third edition, New York (2001).

Schall, T.:

The Cytokine Handbook,

Academic Press, 2. Auflage, New York (1994).

Scheibenbogen, C. und Andreesen, R.:

Developmental regulation of the cytokine repertoire in human macrophages: IL-1, IL-6, TNF-alpha, and M-CSF,
J Leukoc Biol, 50, 35-42 (1991).

Schmouder, R.L., Streiter, R.M., Walz, A. und Kunkel, S.L.:

Epithelial-derived neutrophil-activating factor-78 production in human renal tubule epithelial cells and in renal allograft rejection,
Transplantation, 59, 118-124 (1995).

Schwartz, J. und Marcus, A.:

Mortality and air pollution in London: A time series analysis,
Am J Epidemiol, 131, 185-194 (1990).

Seaton, A., MacNee, W., Donaldson, K. und Godden, D.:

Particulate air pollution and acute health effects,
Lancet, 345, 176-178 (1995).

Seidel, H.J. und Bittighofer, P.M.:

Arbeits- und Betriebsmedizin,
Thieme-Verlag, Stuttgart (1997).

Sferlazza, S.J., Beckett, W.S.:

The respiratory health of welders,
Am Rev Resp Dis, 143, 1143-1148 (1991).

Shijubo, N., Imai, K., Shigehara, K., Honda, Y., Koba, H., Tsujisaki, M., Hinoda, Y., Yachi, A., Ohmichi, M. und Hiraga, Y.:

Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera and bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis,
Clin Exp Immunol, 95, 156-161 (1994).

Shirai, T., Yamaguchi, H., Ito, H., Todd, C.W. und Wallace, R.B.:
Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumour necrosis factor, Nature, 313, 803-806 (1985).

Siebert, P.D. und Kellogg, D.E.:
PCR MIMICs: competitive DNA fragments for use in quantitative PCR,
PCR2: a practical approach, IRL Press, 135-148 (1995).

Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L. und Springer, T.A.:
Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families,
Cell, 52, 925-933 (1988).

Stearns, R.C., Murthy, G.G.K., Skornik, W., Hatch, V., Katler, M. und Godleski, J.J.:
Detection of copper oxide particles in the lungs of hamsters by electron spectroscopic imaging,
ICEM, 13, 763-764 (1994).

Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Burdick, M.D., Lincoln, P.M. und Walz, A.:
The detection of a novel neutrophil-activating peptide (ENA-78) using a sensitive ELISA,
Immunol Invest, 21, 589-596 (1992).

Takano, H., Yanagisawa, R., Ichinose, T., Sadakane, K., Yoshino, S., Yoshikawa, T. und Morita, M.:
Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and intercellular adhesion molecule-1,
Am J Crit Care Med, 165, 1329-1335 (2002).

TaKaRa Biomedicals:
Competitive PCR Guide,
Review 8 (1999).

Togias, A., Lykens, K., Kagey-Sobotka, A., Eggleston, P.A., Proud, D., Lichtenstein, L.M. und Naclerio, R.M.:

Studies on the relationships between sensitivity to cold, dry air, hyperosmolal solutions, and histamine in the adult nose,

Am Rev Respir dis, 141, 1428-1433 (1990).

van Zuijlen, D.A., van de Graaf, E.A., van Bolhuis, E.M., Versluis, C., Knol, E.F. und van der Baan, S.:

Measuring plasma exudation in nasal lavage fluid and in induced sputum as a tool for studying respiratory tract inflammation,

J Immunol Methods, 256, 1-10 (2001).

Vlachos-Mayer, H., Leigh, R., Sharon, R.F., Hussack, P. und Hargreave, F.E.:

Success and safety of sputum induction in the clinical setting,

Eur Respir J, 16, 997-1000, 16 (2000).

Wang, A.M., Doyle, M.V. und Mark, D.F.:

Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaktion,

Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 9717-9721 (1989).

Weis, J.H., Tan, S.S., Martin, B.K. und Wittwer, C.T.:

Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR,

Trends in Genetics, 8, 263-264 (1992).

Wichmann, H.E., Spix, C., Tuch, T., Wölke, G., Peters, A., Heinrich, J., Kreyling, W.G. und Heyder, J.:

Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany, Part A: Role of particle number and particle mass,

HEI report (2000).

Wichmann, H.E. und Peters, A.:

Epidmiological evidence of the effects of ultrafine particle ecposure,

Phil. Trans. R. Soc. Lond. A, 358, 2751-2769 (2000).

Wieners, D., Latza, U. und Baur, X.:

Epidemiologische und klinische Untersuchungen akuter und chronischer obstruktiver Atemwegserkrankungen durch Schweißgase und -rauche,
Zbl Arbeitsmed, 50, 46-64 (2000).

Willeke, K. und Baron, P.A.:

Aerosol measurements: principles, techniques and applications,
New York, Van Nostrand Reinhold (1993).

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y.,
Yazaki, Y., Goto, K. und Masaki, T.:

A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells,
Nature, 344, 411-415 (1988).

Zabel, P., Linnemann, K. und Schlaak, M.:

Circadian rhythm in cytokines,
Immun Infekt, 21, 38-40 (1993).

Zeibecoglou, K. und Siafakas, N.M.:

Induced sputum in asthma,
Monaldi Arch Chest Dis, 56, 500-503 (2001).

Zober, A.:

Symptome und Befunde am bronchopulmonalen System bei Elektroschweißern,
I. Mitteilung: Zbl Bak Hyg, 173, 92-119 (1981).

Zober, A.:

Arbeitsmedizinische Untersuchungen zur inhalativen Belastung von Lichtbogen-
Schmelzschweißern,
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Unfallforschung, Dortmund, 1982.

Zöfel, P.:

Statistik in der Praxis, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 211 (1985).

Zschesche, W. und Schaller, K.H.:

Neue Erkenntnisse zur Berufspathologie der Schweißer,

„International conference on health hazards and biological effects of welding fumes“,

Arbeitsmedizin, Sozialmedizin, Präventivmedizin, 20, 139-142 (1985).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Arbeits- und Umweltmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. D. Nowak durchgeführt.

Ganz herzlich danke ich:

Herrn Prof. Dr. med. D. Nowak für die Bereitstellung des Themas, für die Arbeitsmöglichkeiten in seinen Labors, für seine geduldige Betreuung und engagierte Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. med. E. Scharrer für ihre arbeitsintensive Unterstützung bei Medizinrelevanten Aufgabenstellungen, der ärztlichen Betreuung der Versuchsteilnehmer sowie für ihre Motivation die für das Gelingen der Arbeit beitrugen.

Frau A. Kronseder für die labortechnische Unterstützung, Herrn Dr. R. Schierl für die qualitative chemische Analyse der Filterproben, Frau D. de la Motte für die Durchführung der bronchialen Provokationstests sowie Frau Dr. K. Radon für die fachkundige Unterstützung bei der statistischen Aufarbeitung.

Den Betriebsärzten Herrn Dr. med. A. Götzfried, Herrn Dr. med. K. Holert und all denen, die in der aufwendigen Phase der Probandenrekrutierung zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, Herrn Prof. Dr.-Ing. Prof. h.c. D. Böhme und Herrn A. Weiß für die Bereitstellung der Räumlichkeiten in der Schweißtechnischen Lehr- und Versuchsanstalt SLV München GmbH und der Einweisung in schweißtechnische Arbeitsabläufe sowie allen Verantwortlichen und Mitwirkenden in den schweißtechnischen Betrieben für ihre Unterstützung.

Dem Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU München, der Friedrich-Baur-Stiftung der Medizinischen Fakultät der LMU München und der Lieselotte und Dr. Karl Otto Winkler Stiftung für Arbeitsmedizin für die umfangreiche finanzielle Drittmittel-Förderung.

Lebenslauf

Name: Hessel
Vorname: Harald
geb.: 25.12.62 in München
Familienstand: ledig
1 Sohn, 7 Jahre

schulischer
Werdegang: 1969-77 Grund- und Hauptschule, München
1977-81 Realschule, Unterschleißheim
1981-84 Gymnasium, München
1984 Allgemeine Hochschulreife

1984-85 Wehrdienst in der Sportfördergruppe, Essen
1978-87 aktiv im Hochleistungs-Kanurennsport
u.a. Deutscher Meister 1987

Studium der
Biologie: 1987-93 Studium der Biologie
November 93 Diplom

beruflicher
Werdegang: Dezember 1993 - Dezember 1996,
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
GSF Neuherberg - Institut für Strahlenbiologie

Januar 1997 – April 2001
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der
LMU München

Oktober 1999 – April 2002 Promotion zum Dr. rer. biol. hum.

Seit Mai 2002
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Pathologisches Institut der LMU München