

Navorsingsbriewe

Die invloed van koolstofpartikels op die vernietiging van *Mycobacterium bovis* deur die alveolêre makrofaag

Ontvang 10 Oktober 1997; aanvaar 20 Oktober 1997

ABSTRACT

Influence of carbon particles on the killing of Mycobacterium bovis by the alveolar macrophage

Diagnostic bronchoscopies done on untreated indigenous African patients with tuberculosis revealed a majority of alveolar macrophages that were filled with carbon particles. The aim of this investigation was to determine whether intracellular carbon particles could inhibit the killing of *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) by the alveolar macrophage.

Alveolar macrophages were obtained by bronchoalveolar lavage from nine adult rabbits and cultured. In nine assays experimental cultures were exposed to *Mycobacterium bovis* and carbon particles, controls only to *Mycobacterium bovis* organisms. Killing of organisms was determined by viable colony forming unit (CFU) counts. The level of significance was determined by means of a statistical test for sample proportions and by using Student's *t*-test.

With regard to the average number of viable *Mycobacterium bovis* CFU's, counted in triplicate in nine assays, there is a significant difference between the experiments (4218) and the controls (1984) – $p < .05$.

It is concluded that excessive amounts of carbon particles significantly inhibit the killing of *Mycobacterium bovis* by the alveolar macrophage. This effect on the alveolar macrophages could be one of many factors which could contribute to the high occurrence of tuberculosis in Third World countries where indoor biofuels are used.

INLEIDING

Die afgelope dekade het die Westerse wêreld 'n merkbare bewustheid ontwikkel vir die hydrae van sigaretrook en passiewe rook tot respiratoriese siektes.^{1,2,3,4,5,6,7,8} Verskeie navorsers assosieer ook longsiektes met oormatige binnenshuise bio-brandstofrook, dog nêrens in die literatuur word oormatige binnenshuise rookkonsentrasie met die insidensie van pulmonêre tuberkulose en alveolêremakrofaag-disfunksie geassosieer nie.^{9,10,11,12} Tuberkulose is 'n groeiende gesondheidsprobleem in die wêreld. Die Wêreld Gesondheidsorganisasie (WGO) het in 1992 bepaal dat ongeveer 1 700 miljoen mense wêreldwyd geïnfecteer was. Dit betrek nagenoeg 'n derde van die wêreldbevolking. In 1990 alleen is meer as 8 miljoen nuwe gevalle aangemeld en ongeveer 3 miljoen mense het aan tuberkulose gesterf (waarvan 90% in Derdewêreldlande).^{13,14,15} Hierdie mense maak oorwegend van oop, binnenshuise vure van bio-brandstof gebruik vir kook en verhitting in tradisionele hutte sonder skoorstene. Daaglikse blootstelling aan binnenshuise rook is twintig maal groter in hierdie hutte as in wonings in ontwikkelde lande.^{16,17}

Diagnostiese brongoskopieë, uitgevoer op onbehandelde inheemse swart pasiënte met tuberkulose, het getoon dat die alveolêre makrofage beduidend met koolstofpartikels gevul is. Die afleiding is gemaak dat dit die gevolg was van oormatige inaseming van rook en die daaropvolgende fagositose van koolstof deur alveolêre makrofage. Die doel van hierdie studie was om vas te stel of koolstofpartikels intrasellulêr die vernietiging van *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) deur alveolêre makrofage inperk.

MATERIAAL EN METODEDES

In die huidige studie is drie inokulasiestimulasies op gesonde konyne uitgevoer voor die eksperimente 'n aanvang geneem het. Die konyne is 5 weke voor die eksperimente gevaksinêr deur 'n

inspuiting van 0,1 ml BCG-vaksien (Staatsvaksien Instituut, Pinelands), hersaamgestel in 0,6 ml hersamestellingsvloeistof (1×10^7 organismes). Hierdie proses is 3 en 2 weke voor die eksperimente herhaal. Hipersensitiwiteitstoets is volgens die metode van McMurray et al. na die finale inenting¹⁰ uitgevoer. Die proefdiere is versigtig gemonitor vir infeksie, gewigsverlies of siektetoestande. Slegs gesonde konyne, sensitief vir stimulasie, is in die "vernietiging"-studies aangewend.

Die vernietigingsessai is gebaseer op die afname in getal lewensvatbare miko-organismes gedurende inkubasie saam met fagosiete. In die metodes wat gewoonlik aangewend word, word die tempo van intrasellulêre vernietiging van mikobakterieë bepaal. Dit is direk afhanklik van die tempo van miko-organismingestie.¹⁸ Ingestie is geïnhibeer in alveolêre makrofage wat koolstofpartikels bevat. In hierdie ondersoek was dit belangrik om te bepaal watter persentasie van die totale *M. bovis*-organismes wat blootgestel is in die eksperimente vernietig is. Tydens evaluering van die resultate is die intrasellulêre vernietiging asook die ekstrasellulêre onopgeneemde *M. bovis*-organismes in aanmerking geneem. 'n Gewysigde metode, beskryf deur Leijh et al., is aangewend.¹⁸

Alveolêre makrofage is deur middel van spoeling by immuun volwasse konyne (*Oryctolagus cuniculus*) bekom en gekweek.¹⁹ Selle vir elk van die nege essays is van nege verskillende konyne bekom. Selle is teen 'n konsentrasie van 10×10^6 selle per ml in 'n volledige groei-medium, wat bestaan uit Eagle se minimum essensiële medium (MEM), Earle se sout en L-glutamien, saamgestel. Die medium het bykomstig 30% hittegeïnaktiveerde menslike serum en Novopen ($100 \mu\text{g/ml}$) bevat. Volumes van 0,2 ml van hierdie suspensie is oorgedra na elk van drie 15 ml-proefbuise. Houkoolstofpartikels is gesuspendeer in 'n steriele fosfaatbuffer (pH 7,2), gefiltreer deur no. 1 Whatmanfilterpapier en vier maal by $125 \times \text{g}$ gesentrifugeer. Supernatantpartikels (kleiner as $0,2 \mu\text{m}$) is by 'n digtheid van 95 Klett-eenhede gebruik. *Mycobacterium bovis*-organismes (Japannese stam 172 met 'n massa van 24 g voor vriesdroging) is in 'n steriele

fosfaatgebufferde soutoplossing (pH 7,2), teen 'n konsentrasie van $40 - 60 \times 10^6$ lewensvatbare organismes per ml hersaamgestel. *Mycobacterium bovis* en koolstofpartikels is vir 30 minute, voor byvoeging tot die selkulture, met 30% vars menslike serum geopsonifiseer. In elk van die nege aparte essays is volumes van 0,2 ml of 0,6 ml van die koolstofpartikelsuspensie by elk van drie eksperimentele kulture gevoeg. 'n Gelyke volume van 0,6 ml/groei-medium is by drie kontroles gevoeg. Kulture is met 5% CO₂ oorspoel en by 37 °C vir 18 uur geïnkubeer, sodat koolstofpartikelingestie kon plaasvind. Na 18 uur is 0,2 ml van die *M. bovis*-suspensie by al die kulture gevoeg en vir 2 uur geïnkubeer. Ingestie-indeks van die kontroles en eksperimente is bepaal nadat mikroskoop-skyfiepreparate van elke kultuur berei is. Die ingestie-indeks het die persentasie alveolêre makrofage wat *M. bovis*-organismes opgeneem het, aangedui. Driehonderd selle is morfologies vir elk van die eksperimente en kontroles ondersoek. Kulture is vir 'n verdere 40 uur geïnkubeer vir die vernietiging van *M. bovis*.

Na die 40 uur-inkubasiëperiode is kulture gesentrifugeer teen 400 x g vir 20 minute om sedimentasie van alveolêre makrofage asook *M. bovis* te bewerkstellig. Yskoue, gesteriliseerde gedistilleerde water (1 ml) is by die selsuspensies gevoeg en vir 30 minute by 4 °C gelaat vir lise van die makrofage. Kulture is hierna weer vir 20 minute teen 400 x g gesentrifugeer. Nadat die supernatant verwyder is, is daar 'n 0,2 ml bakteriële suspensie

agtergelaat.

10⁻⁴-verdunnings van die bakteriële suspensies is voorberei. Volumes van 10 µl van die verdunde suspensies is in triplikaat op glasplaatjies gepipetteer en vir ses weke geïnkubeer, sodat *M. bovis*-kolonievorming kon plaasvind.

STATISTIESE ANALISE

Die vlak van beduidendheid is bepaal deur vergelyking van resultate deur middel van 'n statistiese toets vir steekproefproorsies en deur te toets vir die verskil tussen die gemiddeldes met Student se t-verdeling.

RESULTATE

Tabel 1 illustreer dat oormatige koolstofpartikelkonsentrasie die ingestie van *M. bovis* in die eksperimente gehinbeer het. Dit mag 'n hydraende faktor verteenwoordig in die waargenome afname in vernietiging. Resultate illustreer dat in die laer (0,2 ml) koolstofpartikelkulture, slegs 14% van die alveolêre makrofage meer as 20 koolstofpartikels ingeneem het. In die hoër (0,6 ml) koolstofpartikelkulture was die syfer 68,67%. Hierdie verskil is statisties beduidend – $p < ,001$. Die persentasie makrofage wat gevolglik meer as twintig *M. bovis*-organismes ingeneem het, is betekenisvol kleiner in die 0,6 ml koolstofpartikelkulture (12%)

Koolstofpartikel-suspensie	*20+ Koolstof-partikels	**20+ <i>M. Bovis</i> -organismes		Ingestie-indeks	
		Eksperimente	Kontroles	Eksperimente	Kontroles
0,2 ml	14%	53%	65,67%	73,67%	81,67%
0,6 ml	68,67%	12%		55%	

* = Die gemiddelde persentasie alveolêre makrofage wat meer as 20 koolstofpartikels gefagositeer het.
 ** = Die gemiddelde persentasie alveolêre makrofage wat meer as 20 *M. bovis*-organismes gefagositeer het.

Essais	Kontroles	0,2 ml/ Koolstofpartikel-eksperimente	0,6 ml/ Koolstofpartikel-eksperimente
I	250	290	474
II	237	303	429
III	201	271	501
IV	190	253	468
V	232	230	542
VI	264	264	456
VII	187	270	498
VIII	204	236	450
IX	219	250	400
TOTALE KVE	1 984	2 367	4 218
GEMIDDELD	220,44	263,00	468,64
SA	27,10	23,80	42,00
			P<0,05

KVE = Kolonievormende eenhede

as in die 0,2 ml koolstofpartikelkulture (53% : $p < ,001$) asook die kontroles (65,67% : $p < ,001$). Wat *M. bovis*-ingestie betref, is daar 'n beduidende verskil tussen die 0,6 ml koolstofpartikelkulture en die kontroles (55% : 81,67% : $p < ,001$). Die verskil tussen die 0,2 ml koolstofpartikelkulture en die kontroles is egter nie statisties beduidend nie.

Tabel 2 toon 'n beduidende verskil in die gemiddelde getal lewensvatbare *M. bovis* kolonievormende eenhede, wat in die verdunde 0,6 ml-koolstofpartikelkulture sowel as kontroles getal is (469 : 220). Daar bestaan geen beduidende verskil tussen die verdunde 0,2 ml-koolstofpartikelkulture en die kontroles nie (263 : 220). Dit is aanduidend dat die vernietiging van *M. bovis*-organismes slegs benadeel word by oormatige inname van koolstofpartikels deur die alveolêre makrofaag.

BESPREKING

Die vernietiging van mikobakterië deur die alveolêre makrofaag berus op die algemene immuniteit van die gasheer, asook die aktivering van spesifieke seltipes vir antimikrobe-aktiwiteit.^{21,22} Immuniteit teen tuberkulose is uiters ingewikkeld en die kompleksiteit van alveolêremakrofaagfunksie in hierdie verband is nog onduidelik. T-selle (spesifiek vir mikobakterie-antigeen) kan alveolêremakrofaagaktiwiteit verhoog deur middel van sel tot sel kontak en/of deur die vrystelling van limfokiene soos makrofaag-aktiveringsfaktore (MAF).²³

Mikobakterië is sterk induseerders van sitokienproduksie [tumor nekrotiserende faktor (TNF) en interleukien I (IL-1)] deur die alveolêre makrofaag.^{24,25} Sitokienvrystelling tydens mikobakteriële infeksie is beduidend, aangesien 'n verhoogde produksie van TNF deur alveolêre makrofaag die intrasellulêre groei van mikobakterië in pulmonêre tuberkulose beperk.^{25,26,27,28} Verskeie mikobakteriese proteïene wat sitokienproduksie deur alveolêre makrofaag induseer, is reeds geïdentifiseer.²⁵

Lowrie et al. het in 'n studie op marmotte aangetoon dat daar 'n beduidende toename in die vernietiging van mikobakteriële organismes was wanneer marmotte konvensioneel teen die organisme ingeënt is.²⁹ Hierdie studie beklemtoon die belang daarvan om 'n immuunrespons uit te lok ten einde antimikrobe-aktiwiteit te optimaliseer.

Mikro-organismes kan op twee wyses binne die fagolisosoom van die alveolêre makrofaag vernietig word: 'n suurstofafhanklike proses van suurstoffluks waarby die vrylating van reaktiewe oksidant betrokke is, asook 'n suurstofonafhanklike proses, waarby slegs die aktiwiteit van lisosomale ensieme betrokke is.^{21,31,32,33,34,35,36} Alveolêre makrofaag bevat min of geen miëloperoksidas-ensiem (wat vir die produksie van die potente reaktiewe oksidant, hipochloorsuur, verantwoordelik is) nie.^{31,37} Hierdie oksidant word waarskynlik glad nie deur die alveolêre makrofaag gevorm nie. Alhoewel alveolêre makrofaag superoksied en waterstofperoksied-voorlopers tydens mikobakteriële vernietiging produseer, wil dit voorkom asof peroksiedonafhanklike meganismes (wat te make het met die aktiwiteit van ensieme met antimikrobe-aktiwiteit) betrokke is.²⁹

Groot hoeveelhede koolstofpartikels verminder die konsentrasie van superoksied, waterstofperoksied-oksidente, suurfosfatase en lisosomale ensieme in die alveolêre makrofaag.^{38,39} Hierdie ensieme bevat onderskeidelik antimikrobe en degraderende aktiwiteit.^{34,35,36} Negishi het bevestig dat alveolêre makrofaag wat swaar gelaai is met fyn koolstof, geen suurfosfatase-aktiwiteit vertoon het nie.⁴⁰ Hierdie makrofaag het tyd- en dosisafhanklik in die alveoli geakkumuleer. Die navorsers het voorgestel dat die akkumulering van partikelbelaaide makrofaag deur 'n afname of verlies van aktiwiteit, veroorsaak is.

Sarkar en Chatteray het bevind dat proteïene, by 'n pH van ± 5 , optimaal aan die oppervlak van koolstofpartikels adsorbeer.⁴¹ Vernietiging van mikobakterië binne fagolisosome van alveolêre makrofaag, vind by 'n pH van 4,5 - 5,5 plaas.⁴² Fagolisosome verskaf dus 'n gunstige omgewing vir adsorpsie van proteïene (ensieme) aan geïngesteerde koolstofpartikels. Daar word voorgestel dat adsorpsie van proteïene (ensieme) by 'n suur pH, waarskynlik die meganisme is waarop die inhibitiese effekte wat deur koolstofpartikels veroorsaak word, berus. Verdere ondersoek word onderneem om hierdie teorie te bevestig.

GEVOLGTREKKING

Groot konsentrasies koolstofpartikels, opgeneem deur alveolêre makrofaag, het 'n beduidende onderdrukkende effek op die vernietiging van *M. bovis* deur hierdie selle. Hierdie verswakte antimikrobe-effek van alveolêre makrofaag op mikobakterië, kan een van vele faktore wees wat mag bydra tot die hoë insidensie van tuberkulose in Derdewêreldlande, waar biobrandstof binnenshuis gebruik word.

E.M. ATTWOOD*, D.J.V. WEICH, M. VAN STADEN

Departement Interne Geneeskunde, Fakulteit Gesondheidswetenskappe, Posbus 339 (G73), Universiteit van die Oranje-Vrystaat, Bloemfontein, 9300

W.E. NEL, J.M.C. OOSTHUIZEN

Departement Geneeskundige Fisiologie, Fakulteit Gesondheidswetenskappe, Posbus 339 (G8), Universiteit van die Oranje-Vrystaat, Bloemfontein, 9300

BEDANKINGS

Ons bedank dr. M.J. de Kock, mev. E. Voster, mnr. J.S. de Wet, dr. F. Potgieter en prof. J.I. de Wet graag vir tegniese hulp.

LITERATUURVERWYSINGS

- Warren, P., Khalil, N. (1995). Huffing and puffing, *Lancet* [Suppl. 346] 8991 - 8992, S21.
- Reynolds, T. (1995). Smoking deaths soar in central and eastern Europe, *J. Natl. Cancer Inst.*, 87(18), 1348.
- Amos, A., Chollat-Traquet, C. (1995). Women and tobacco, *World Health*, 48 (spec.ed.), 22.
- Kaiser, J. (1995). Another look at secondhand smoke, *Science*, 270(5238), 903.
- Wang, X., Wypii, D., Gold, D.R., Speizer, F.E., Ware, J.H., Ferris, B.G. (jr.), Dockery, D.W. (1994). A longitudinal study of the effects of parental smoking on pulmonary function in children 6 - 18 years, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 149(6), 1420-1425.
- Geiser, M., Baumann, M., Cruz-Orive, L.M., Im Hof, V., Waber, U., Gehr, P. (1994). The effect of particle inhalation on macrophage number and phagocytic activity in the intra-pulmonary conducting airways of hamsters, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 10(6), 594-603.
- Hatnagay, W., Seemayer, N.H. (1994). Inhibition of phagocytosis of human macrophages by airborne particles, *Toxicol Lett.*, 72(1-3), 23-31.
- Ortega, E., Barriga, C., Rodrigues, A.B. (1994). Decline in the phagocytic function of alveolar macrophages from mice exposed to cigarette smoke, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 17(1), 77-84.
- Mishra, V.N., Malhotra, M., Gupta, S. (1990). Respiratory disorders in females of Delhi, *J. Indian Med. Assoc.*, 88(3), 77-80.
- Wu Williams, A.H., Dai, X.B., Blot, W. et al. (1990). Lung cancer among women in North East China, *Br. J. Cancer*, 62(6), 982-987.
- Samet, J.M., Utell, M.J. (1991). The environment and the lung. Chang-

* Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.

- ing perspectives, *JAMA*, 266(5), 670-675.
12. Koenig, J.O., Pierson, W.E. (1991). Air pollution and the respiratory system toxicity and pharmacologic interventions, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 29(3), 401-411.
 13. Raviglione, M.C., Nardin, J.P., Kochi, A. (1992). HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis and treatment, *Bulletin of WHO*, 70(4), 515-526.
 14. Kochi, A. 1991. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organisation, *Tubercle*, 72, 1-6.
 15. Sudré, P., Ten Dam, G., Kochi, A. (1992). Tuberculosis: a global overview of the situation today, *Bulletin of WHO*, 70(2), 149-159.
 16. Pandey, M.R., Boleij, J.S.M., Smith, K.R., Wafula, E.M. (1989). Indoor air pollution in developing countries and acute respiratory infection in children, *Lancet*, Feb. 25, 427-429.
 17. Pandey, M.R., Neupane, R.P., Gautam, A.G. (1987). Domestic smoke pollution and acute respiratory infection in Nepal. In *Fourth International Conference on Indoor Air Quality and Climate*. Institute for Water, Soil and Air Hygiene. Seifert, B., Esdom, H., Fischer, M., Ruden, H., Wegner, J. eds. (Berlin) vol. 4, pp. 25-29.
 18. Leijh, P.C.J., Van Furth, R., Van Zwet, T.L. (1986). In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Gallin, J.I., Goldstein, I.M., Snyderman, R. eds. (Raven Press Ltd., New York).
 19. Attwood, E.M. (1990). Influence of carbon particles on the phagocytosis and killing of BCG by alveolar macrophages of *Oryctolagus cuniculus*. Ph.D. Thesis. Faculty of Medicine, UOFS, Bloemfontein, Republic of South Africa.
 20. Daniel, W.W. (1987). *Biostatistics: The foundation for analysis in the health sciences*, 4th ed. (John Wiley and Sons, New York) pp. 209, 225.
 21. O'Brien, S., Andrew, P.W. (1991). Guinea pig alveolar macrophage killing of *Mycobacterium tuberculosis*, in vitro, does not require hydrogen peroxide or hydroxyl radical, *Microb. Pathog.*, 11(4), 229-236.
 22. O'Brien, S., Jaccett, P.S., Lowrie, D.B., Andrew, P.W. (1991). Guinea pig alveolar macrophages kill *Mycobacterium tuberculosis* in vitro but killing is independent of susceptibility to hydrogen peroxide or triggering of the respiratory burst, *Microb. Pathog.*, 10(3), 199-207.
 23. Chandrasekhar, S., Mukherjee, M.K. (1990). Intracellular tubercle bacilli alveolar macrophage lysosomal enzyme interaction in experimental tuberculosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 56(2), 185-201.
 24. Hirsch, C.S., Ellner, J.J., Russell, D.G., Rich, E.A. (1994). Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- α -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages, *J. Immunol.*, 152: 743.
 25. Wallis, R.S., Paranjape, R., Phillips, M. (1993). Identification by two-dimensional gel electrophoreses of a 58-kilodalton tumor necrosis factor inducing protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 6(2), 627-637.
 26. Bermudez, L.E., Kolonoski, P., Young, L.S. (1990). Natural killer cell activity and macrophage dependent inhibition of growth or killing of *Mycobacterium avium* complex in a mouse model, *J. Leukocyte Biol.*, 47, 135-141.
 27. Bermudez, L.E., Young, L.S., Gupta, S. (1990). 1,25-Dihydroxy vitamin D₃-dependent inhibition of growth or killing of *Mycobacterium avium* complex in human macrophages is mediated by TNF and GM-CSF, *Cell. Immunol.*, 127, 432-441.
 28. Denis, M. (1991). Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis, *J. Leukocyte Biol.*, 50, 495-501.
 29. Lowrie, D.B., Jaccett, P.S., Andrew, P.W. (1985). Activation of macrophages for antimycobacterial activity, *Immunol. Lett.*, 11, 195-203.
 30. McMurray, D.N., Kimball, M.S., Tetzlaff, C.L., Mintzer, C.L. (1986). Effects of protein deprivation and BCG vaccination on alveolar macrophage function in pulmonary tuberculosis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 133, 1081-1085.
 31. Henson, P.M., Johnston, R.B. (jr.). (1987). Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases and cationic proteins, *J. Clin. Invest.*, 79, 669-674.
 32. Sibille, Y., Reynolds, H.Y. (1990). Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defence and injury, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141, 471-501.
 33. Elsbach, P., Weiss, J. (1988). Phagocytic cells: Oxygen-independent anti-microbial systems. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Gallin, J.I., Goldstein, I.M., Snyderman, R. eds. (Raven Press Ltd, New York).
 34. Black, C.M., Beaman, B.L., Donovan, R.M., Goldstein, E. (1985). Intracellular acid phosphatase content and ability of different macrophage populations to kill *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.*, 47(2), 375-383.
 35. Ginsburg, I. (1988). The biochemistry of bacteriolysis: paradoxes, facts and myths. *Microb. Sci.*, 5(5), 137-142.
 36. Coonrad, J.D. (1989). Role of leucocytes in lung defences. *Respiration*, 55. (Suppl. 1), 9-13.
 37. Davis, W.B., Pacht, E.R., Spatafora, M., Martin, W.J. (II). (1988). Enhanced cytotoxic potential of alveolar macrophages from cigarette smokers. *J. Lab. Clin. Med.*, 111, 293-298.
 38. Attwood, E.M., Weich, D.J.V., Oosthuizen, J.M.C. (1996). Influence of carbon particles on superoxide and hydrogen peroxide radical release during the killing of *Mycobacterium bovis* by alveolar macrophages, *Tubercle. Lung Dis.*, 77(5), 462-467.
 39. Attwood, E.M., Weich, D.J.V., Oosthuizen, J.M.C. (1996). Influence of carbon particles on the concentration of acid phosphatase and lysosome enzymes within alveolar macrophages during the killing and degradation of *Mycobacterium bovis*, *Tubercle. Lung Dis.*, 77(4), 341-347.
 40. Negishi, T. (1994). Accumulation of alveolar macrophages induced by inhalation exposure of coal fly ash in golden hamster lungs, *Jikken Dobutsu*, 43(1), 61-78.
 41. Sarkar, D., Chattoray, D.K. (1992). Absolute reaction rate and kinetics of protein adsorption at solid-liquid interfaces, *Indian J. Biochem. Biophys.*, 29, 135-142.
 42. Kreyling, W.G., Godleski, J.J., Karija, S.T., Rose, R.M., Brain, J.D. (1990). In vitro dissolution of uniform cobalt oxide particles by human and canine alveolar macrophages, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2, 413-422.