

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Wirkung von Bariumsulfatnanopartikeln auf humane Lungenzellen in Kultur

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Silvia Stefanie Körner

geboren am 6. Juli 1991 in Ostfildern

Betreuerin: Prof. Dr. med. dent. Heidi Foth

Gutachter: 1. apl. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander W. Eckert
2. Prof. Dr. med. dent. David Sonntag (Universität Düsseldorf)

02.04.2019

24.06.2020

Für meine Familie

Referat

Nanopartikel erfreuen sich steigender Beliebtheit bei der Herstellung von Verbrauchsgütern. Durch den daraus resultierenden vermehrten Kontakt des Menschen mit diesen kleinsten Teilchen, ist die potentielle Gesundheitsgefährdung durch Nanopartikel in der Wissenschaft zum Forschungsgegenstand erhoben worden. Als Nanopartikel werden Partikel mit einem Durchmesser von 1-100 nm bezeichnet. Manche zeichnen sich durch ihre große reaktive Oberfläche aus und besitzen besondere chemische und katalytische Fähigkeiten im Vergleich zu größeren Partikeln desselben Stoffes. Verschiedene Studien zeigten, dass bestimmte Nanopartikel zytotoxisch wirken. Ziel dieser Arbeit war es die Wirkungsweise von Bariumsulfatnanopartikeln genauer zu untersuchen. Dabei wurden humane Lungen- und Bronchialzellen, sowie Tumorzellen der Zelllinie A549 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bariumsulfatnanopartikeln exponiert und für jeweils 24 und 72 Stunden inkubiert. Zur Untersuchung der Vitalität wurde der Neutralrottest und ein FACS-basierter Zytotoxizitätstest herangezogen. Ebenso wurde eine Apoptoseinduktion durch einen FACS-basierten Test untersucht. Die Ergebnisse des Neutralrottests zeigten einen Anstieg der Vitalität mit zunehmender Konzentration der Bariumsulfatnanopartikel, was auf einen systematischen Einfluss der Nanopartikel auf das Messverfahren hindeutete. Durch einen Zusatzversuch mit Quecksilber (II) konnte dieses Artefakt bestätigt werden. Die Ergebnisse des FACS-basierten Zytotoxizitätstests zeigten nach 24 und 72 Stunden eine signifikante Abnahme der Vitalität bei einer Maximalkonzentration von 1 mg/ml. Eine Apoptoseinduktion konnte sowohl nach 24 als auch bei 72 Stunden nicht festgestellt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass optische Messverfahren in Kombination mit Nanopartikeln kritisch zu betrachten sind, da die Partikel einen Einfluss auf das Testverfahren haben können. Außerdem wiesen die Ergebnisse der hier vorgestellten Analysen nur auf eine geringe Toxizität von Bariumsulfatnanopartikeln auf die untersuchten Zellen hin.

Körner, Silvia: Wirkung von Bariumsulfatnanopartikeln auf humane Lungenzellen in Kultur, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 49 Seiten, 2019

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation.....	1
1.2 Nanopartikel.....	2
1.2.1 Vorkommen und Eigenschaften.....	2
1.2.2 Bariumsulfat	4
1.3 Aufnahmewege von Nanopartikeln in den Körper.....	5
1.3.1 Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt.....	5
1.3.2 Aufnahme über die Haut.....	5
1.3.3 Aufnahme über das Lungen- und Bronchialsystem.....	6
1.4 Wechselwirkung des Lungen- und Bronchialsystems mit Nanopartikeln	6
1.4.1 Aufbau des Lungen- und Bronchialsystems.....	6
1.4.2 Verteilung von Partikeln im Atemtrakt	8
1.4.3 Reinigungsmechanismen	8
1.4.4 Toxizität von Nanopartikeln im Atemtrakt.....	9
1.5 Apoptose.....	9
2 Zielstellung	11
3 Material und Methodik	12
3.1 Geräte und Chemikalien.....	12
3.1.1 Geräte und Verbrauchsgüter	12
3.1.2 Chemikalien.....	13
3.2 Methoden.....	14
3.2.1 Zellkultur - Tumorzelllinie A549.....	14
3.2.2 Zellkultur – Normale humane Bronchialepithelzellen (NHBEZ)	14
3.2.3 Kultivieren und Passagieren der Zellkultur - A549	15
3.2.4 Kultivieren und Passagieren der Zellkulturen - NHBEZ.....	15

3.3	Herstellung der BaSO ₄ -Verdünnungsreihe und Pipettieren der Zellen.....	16
3.3.1	Herstellung der Verdünnungsreihe für die A549-Zelllinie	16
3.3.2	Durchführung für NHBEZ.....	17
3.4	Vitalitätstests.....	17
3.4.1	Neutralrottest.....	17
3.4.2	Vitalitätsmessung durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)	18
3.5	Apoptose-Messung mittels MUSE™	20
3.6	Statistische Auswertung.....	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Vitalitätstests.....	23
4.1.1	Ergebnisse der Neutralrottests	23
4.1.2	Phasenmikroskopische Darstellung.....	26
4.1.3	Ergebnisse der FACS-Messungen.....	30
4.2	Messung der Apoptose	31
5	Diskussion.....	33
5.1	Vitalitätstests.....	34
5.1.1	Eignung des Neutralrottests.....	34
5.1.2	FACS-Messungen mit der Tumorzelllinie A549.....	37
5.2	Apoptose.....	39
6	Zusammenfassung	41
7	Literaturverzeichnis	42
8	Thesen	49
	Selbstständigkeitserklärung.....	IV
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	V
	Tabellarischer Lebenslauf	VI
	Danksagung.....	VII

Abkürzungsverzeichnis

AECG	Airway Epithelial Cell Growth Medium
BaSO ₄	Bariumsulfat
CNT	Kohlenstoffnanoröhren
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNP	Dinitrophenol
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FKS	Fetales Kälberserum
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
Hg(II)	Quecksilber (II)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NHBEZ	Normale humane Bronchialepithelzellen
nm	Nanometer
PBS	Phosphat- Saline- Puffer
PLZ	Periphere Lungenzellen
PS	Phosphatidylserin
U/min	Umdrehungen pro Minute
UFP	Ultrafeinpartikel

1 Einleitung

1.1 Motivation

Nanopartikel, Verbände aus wenigen Atomen und Molekülen (Gazsó und Haslinger 2014), können aufgrund ihrer geringen Größe und der damit verbundenen hohen effektiven Oberfläche die Reaktivität, Festigkeit oder elektrischen Eigenschaften von Materialien verbessern (Borm et al., 2006) und haben deshalb in den vergangenen Jahren vermehrt an Bedeutung gewonnen. In der Medizin erhofft man sich mithilfe von Nanopartikeln neue, überlegene, diagnostische und therapeutische Maßnahmen zu entwickeln (Oberdörster, 2010).

In der Forschung wird unter anderem die Penetration von Medikamenten in das zentrale Nervensystem untersucht. Dabei könnten Medikamente mit Hilfe von Nanopartikeln über die Blut-Hirnschranke transportiert werden (Kreuter und Gelperina, 2008; Saraiva et al., 2016). Verbandsmaterialien, chirurgische Instrumente oder Implantate enthalten heutzutage aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften bereits Silber-Nanopartikel (Chen und Schluesener, 2008).

Nanopartikel können auch in Verbrauchsgütern enthalten sein, dazu gehört unter anderem Sonnenschutzcreme, die Titandioxid- und Zinkoxidnanopartikel beinhaltet (Smijts und Pavel, 2011). Diese streuen und absorbieren die kurzwellige UV-Strahlung, aber lassen langwelliges sichtbares Licht passieren, wodurch die Sonnencreme ihre Transparenz erhält (Borm et al., 2006). In Kosmetika werden Nanopartikel als nanodisperse Verkapselungs- und Trägersysteme, wie zum Beispiel Lipid-Nanopartikel oder Nanoemulsionen verwendet, damit der Wirkstoff tiefere Hautschichten erreichen kann (SRU, 2011). Doch trotz der positiven Eigenschaften von Nanopartikeln ist das Wissen um ihre möglichen negativen Wirkungen begrenzt. Sie weisen nicht nur andere physikalische und chemische Eigenschaften auf als das vergleichbare Material herkömmlicher Größe, sondern können sich auch im Verhalten und in ihrer Wirkung im lebenden Organismus und in der Umwelt unterscheiden (SRU-Sachverständigenrat für Umweltfragen, 2011).

Außerdem hat das Umweltbundesamt eine Empfehlung herausgegeben, die Wirkung von Nanopartikeln auf die Umwelt genauer zu untersuchen und die Nanomaterialien hinsichtlich ihrer Gefährdung zu bewerten (Schwirn und Völker, 2016).

In dieser Arbeit wird die Wirkung von nanoskaligem Bariumsulfat (BaSO_4), eines Nanomaterials mit vergleichsweise schlechter Datenlage, auf humane Lungen- und Bronchialzellen analysiert. Bariumsulfat findet Anwendung in Farben, als Farbpigment,

in Lacken, um die Witterungsbeständigkeit zu erhöhen, sowie in der Kosmetikindustrie, als Lichtschutzfaktor (Petrova et al., 2008). In diesen Bereichen können die BaSO₄-Nanopartikel in den direkten Kontakt mit dem Menschen gelangen. Eine weniger offensichtliche Exposition gegenüber dem Menschen und der Umwelt entsteht aufgrund des Lebenszyklus von mit BaSO₄-versetzten Produkten.

Am Ende ihres Lebenszyklus landen diese im Siedlungsabfall und im Anschluss häufig in Müllverbrennungsanlagen (Thomas et al., 2017). Dieser Kreislauf und der damit verbundene Kontakt des Menschen mit den Verbrennungsprodukten war Forschungsgegenstand des Nano-Emissions-Projektes (Thomas et al., 2017). In diesem Zusammenhang sollte auch die Toxizität von BaSO₄-Nanopartikeln untersucht werden.

1.2 Nanopartikel

Die Europäische Kommission hat am 18. Oktober 2011 eine Empfehlung zur Definition von Nanomaterialien für die Mitgliedsstaaten, EU-Agenturen und Wirtschaftsteilnehmer herausgegeben. Darin wird Nanomaterial als ein natürliches oder bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material definiert, dessen Partikel in ungebundenem Zustand zu einem Mindestanteil von 50% Außenmaße im Bereich von 1-100 nm aufweisen. Zusätzlich kann in besonderen Fällen die Schwelle von 50% für die Anzahlgrößenverteilung durch ein Intervall zwischen 1% und 50% ersetzt werden, wenn Umwelt-, Gesundheits-, Sicherheits- oder Wettbewerbserwägungen dies rechtfertigen. Des Weiteren werden auch Fullerene (kugelförmige Kohlenstoffkäfigmoleküle, die nur aus Fünf- und Sechsecken aufgebaut sind (Curl, 1997)), Graphenflocken (ultradünne zweidimensionale Schicht aus zu einem Bienenwabennmuster verbundenen Kohlenstoffatomen (Balasubramanian et al., 2011)) und einwandige Kohlenstoff-Nanoröhren (erhält man durch das Aufrollen einer Graphenlage entlang einer Flächenrichtung (Balasubramanian und Burghard, 2011)), die Nanopartikel mit Außenmaßen unter 1 nm enthalten, als Nanomaterialien betrachtet (POTOČNIK, 2011). Oberhalb von 100 nm werden Partikel als Ultrafeinpartikel (UFP) bezeichnet (Borm et al., 2006). Diese Definition wurde vom Joint Research Centre im Jahr 2014 und 2015 überprüft und bleibt weiterhin bestehen (Rauscher et al., 2015).

1.2.1 Vorkommen und Eigenschaften

Nanopartikel in der Atmosphäre werden in primäre oder sekundäre Partikel eingeteilt. Primärpartikel entstehen direkt in natürlichen Prozessen in der Umwelt, wie zum Beispiel bei Feuern, Vulkanausbrüchen oder Erosion. Primärpartikel können aber auch einen

anthropogenen Ursprung, wie den Verkehr oder die Industrie, haben. Sekundärpartikel entstehen hingegen nicht direkt, sondern aus der Nukleation von Gasen. Dies kann zum Beispiel bei heißen Verbrennungsgasen der Fall sein oder während metallischen Prozessen, wie dem Schweißen. Dementsprechend ist Ihre Größe mit 1-10 nm auch sehr gering (Borm et al., 2006)

In den letzten Jahrzehnten kam der Nanotechnologie und der industriellen Herstellung von Nanomaterialien immer mehr Bedeutung zu. Heutzutage finden sich industriell hergestellte Nanopartikel in einer Vielzahl von Konsumgütern (Gebel et al., 2014). Diese verschiedenen Ursprünge und der Kreislauf von Nanopartikeln sind in Abbildung 1 dargestellt.

Nanopartikel besitzen im Vergleich zu größeren Partikeln desselben Stoffs besondere Eigenschaften, welche speziell auf ihre geringen Abmessungen zurückzuführen sind. Je kleiner ein Teilchen ist, desto größer ist der Anteil der Atome, die sich an seiner Oberfläche befinden. Aufgrund der relativ zur Masse gesehen größeren Oberfläche und der damit erhöhten möglichen chemischen und katalytischen Reaktionsfähigkeit, sind manche nanoskalige Materialien deutlich reaktiver als Materialien der gleichen Dichte, die aber aus größeren Partikeln bestehen (Nanoscience and nanotechnologies, 2004). Bei einem Radius von 2,5 nm und einer Dichte von 5 g/cm^3 besitzt ein kugelförmiges Nanopartikel eine Oberfläche von $240 \text{ m}^2/\text{g}$. Umgerechnet bedeutet dies, dass sich 20% der Partikelatome an der Oberfläche befinden (Borm et al., 2006). Außerdem beginnen auf diesen Skalen Quanteneffekte zu dominieren. Dadurch werden die Reaktivität, Festigkeit und elektrische Eigenschaften der Nanopartikel beeinflusst (Nanoscience and nanotechnologies, 2004).

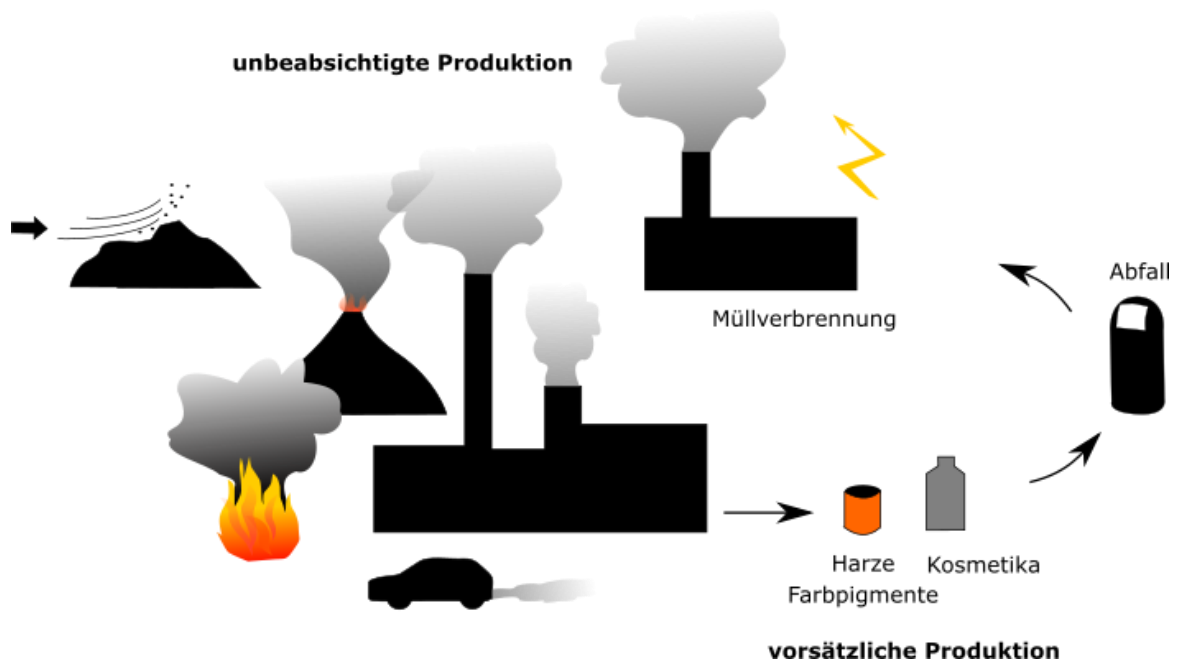


Abbildung 1: Entstehung und Kreislauf von Nanopartikeln (eigene Darstellung)

1.2.2 Bariumsulfat

Das Institut für Umwelttoxikologie in Halle war im Rahmen des Nanoemissionsprojektes involviert, die Toxizität von Bariumsulfatnanopartikeln zu untersuchen. Daher wurde auch in dieser Arbeit der Fokus auf die Wirkung von BaSO_4 -Nanopartikeln auf humane Lungen- und Bronchialzellen gelegt.

Der Name Barium stammt aus dem Griechischen und leitet sich von barys ab, das „schwer“ bedeutet. Diese Bezeichnung entstand aufgrund des hohen Atomgewichts von 233,43 g/mol (Hartwig, 2017). Durch Ausfällung mit Schwefelsäure entsteht aus verschiedenen Bariumsalzen Bariumsulfat. Die Löslichkeit von Bariumsulfat beträgt 2,2 mg/l Wasser, womit es als schwer löslich gilt (Hartwig, 2017). In der Natur kommt es in dem Mineral Baryt vor. Im medizinischen Bereich findet es Anwendung in Knochenzement, um dessen Eigenschaften zu verbessern (Gillani et al., 2010), als Röntgenkontrastmittel (Konduru et al., 2014) und bei Wurzelkanalbehandlungen, als Zusatz im Sealer (Nakamura et al., 2007; Tyagi et al., 2013). Außerdem wurde nachgewiesen, dass thermoplastischen Polyurethanen zugesetztes Bariumsulfat eine antimikrobielle Wirkung aufweist, die bei Kathetern im Krankenhaus genutzt werden könnte (Aninwene et al., 2013). In der Industrie wird Bariumsulfat in der Kosmetik, in der Farben- und Lackindustrie als Farbpigment und zur Erhöhung der Witterungsbeständigkeit in Lacken, sowie als Füllstoff in der Kunststoffindustrie eingesetzt (Petrova et al., 2008).

Die Toxizität von Barium ist abhängig von der Löslichkeit der Bariumverbindungen (Hartwig, 2017). Dabei ist schwer lösliches Bariumsulfat, als Röntgenkontrastmittel wenig toxisch (Hartwig, 2017), wohingegen leicht lösliches Bariumchlorid nach der CLP-Verordnung mit dem Gefahrenhinweis H301 (bedeutet: giftig beim Verschlucken), sowie H332 (bedeutet: gesundheitsschädlich beim Einatmen) gekennzeichnet werden muss (Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH)).

1.3 Aufnahmewege von Nanopartikeln in den Körper

In der Literatur werden verschiedene mögliche Aufnahmewege von Nanopartikeln in den lebenden Organismus beschrieben (Borm et al., 2006).

1.3.1 Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt

Eine Aufnahme der Partikel im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) ist durch die Nahrungsaufnahme möglich. Diese können im GI-Trakt von intestinalen Epithelzellen aufgenommen werden und dann weiter in die Blutbahn zu der Leber oder anderen Organen gelangen. Eine von Koeneman veröffentlichte Studie wies dabei die Transzytose als Transportform der Nanopartikel in die Epithelzellen nach (Koeneman et al., 2010).

1.3.2 Aufnahme über die Haut

Heutzutage sind in vielen Kosmetika und Sonnenschutzcremes Nanopartikel enthalten, die somit direkt auf die Haut appliziert werden. Dabei wurden die in Sonnenmilch enthaltenen Titandioxid- oder Zinkoxid-Nanopartikel in Studien hinsichtlich einer dermalen Absorption untersucht. Die Ergebnisse des Nanoderm-Projektes der EU zeigten, dass diese Partikel in den oberen Schichten der Hornschicht verblieben oder zur Hautoberfläche transportiert wurden (Dubbert et al., 2014). Sadrieh et al. konnten dies ebenfalls feststellen. Sie applizierten 22 Tage drei verschiedene Typen von Titandioxidnanopartikeln auf die Haut von Meerschweinchen und untersuchten danach die Epidermis. Dabei konnte keine signifikante Penetration der Partikel durch die intakte Epidermis nachgewiesen werden (Sadrieh et al., 2010). Auch Gamer et al. konnte keine Penetration von Zink- und Titandioxidnanopartikeln durch das Stratum corneum von Schweinehaut feststellen (Gamer et al., 2006). Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich metallische (Eisen)-Nanopartikel, die kleiner als 10 nm sind, die Haarfollikelöffnungen und die Lipidmatrix des Stratum corneum durchdringen können.

Eine vollständige Penetration der Epidermis konnte dabei jedoch auch nicht bewiesen werden (Baroli et al., 2007).

1.3.3 Aufnahme über das Lungen- und Bronchialsystem

Sowohl anthropogene als auch natürliche Partikel in der Luft können vom Menschen inhaliert werden. Dabei findet die Ablagerung der Partikel in der Lunge in Abhängigkeit von ihrer Größe und Geometrie durch unterschiedliche Mechanismen (Impaktion, Sedimentation, Diffusion) statt. Je nach Partikelgröße und ihrer Löslichkeit können sie in verschiedene Teile des Atemtrakts vordringen. Landsiedel et. al untersuchten im Rahmen einer 5-tägigen Inhalationsstudie die Toxizität von 14 unterschiedlichen Nanopartikeln auf Ratten. Dabei wurden die Nanopartikel in der Lunge, in alveolaren Makrophagen und in den drainierenden Lymphknoten gefunden. Lediglich Polyacrylat-beschichtete Siliziumdioxid-Nanopartikel, sowie Zinkoxid-Nanopartikel wurden in den extrapulmonalen Organen gefunden. Acht Nanopartikel zeigten keine Veränderungen in der Rattenlunge, vier Nanopartikel lösten konzentrationsabhängige Entzündungen in der Lunge aus, die teilweise reversibel waren (Landsiedel et al., 2014).

Bei Titandioxid-Nanopartikeln konnte nachgewiesen werden, dass sie in der Lage sind, nach Inhalation die Blut-Luft-Schranke zu überwinden und sich in sekundären Zielorganen anzureichern. Allerdings war dies nur bei etwa 2% der in der Lunge befindlichen Nanopartikel der Fall. Die Translokation von Nanopartikeln über die Blut-Luft-Schranke in extrapulmonale Organe ist wohl von den applizierten Materialien abhängig (Kreyling et al., 2010).

Diese Arbeit konzentriert sich hingegen ausschließlich auf die Effekte von Nanopartikeln auf das Lungen- und Bronchialsystem.

1.4 Wechselwirkung des Lungen- und Bronchialsystems mit Nanopartikeln

1.4.1 Aufbau des Lungen- und Bronchialsystems

Die Lunge besitzt unter anderem die Aufgabe den Körper des Menschen durch den Gasaustausch zwischen Blut und Luft mit Sauerstoff zu versorgen und zugleich Kohlendioxid abzugeben. Mit einer Kontaktfläche von bis zu 140 m² und einem eingeatmeten Luftvolumen von ca. 10 m³ – 15 m³ pro Tag bietet die Lunge eine große Angriffsoberfläche für Partikel und Gase aus unserer Umgebung (Lüllmann-Rauch, 2009). Dabei können diese in unterschiedlichen Bereichen im Atemtrakt deponiert

werden, wobei auch die Größe der eingeatmeten Substanzen hierfür eine Rolle spielt (Oberdörster et al., 2005).

Der Atemtrakt teilt sich zunächst in die luftleitenden Bereiche auf, zu denen die Mundhöhle, Nase, Pharynx, Larynx, Trachea und die Bronchien bis zu den Bronchioli terminales gehören. Danach beginnt der Bereich, in dem der Gasaustausch erfolgt. Dieser beginnt ab den Bronchioli respiratorii und erstreckt sich bis zu den Sacculi alveolares.

Zusätzlich werden anatomisch die oberen und die unteren Atemwege unterschieden. Die unteren Atemwege beginnen unterhalb der Glottis und sind im Bereich der luftleitenden Bereiche für den Transport und die Konditionierung der Atemluft (Erwärmung, Anfeuchtung, Partikelfiltration) zuständig. Ab den Bronchioli respiratorii beginnt dann der Gasaustausch.

Der Aufbau der Lunge zeichnet sich durch ein dichotomisch aufzweigendes Bronchialsystem aus. Dem Lungengewebe, das sich in Lappen, Segmente, Läppchen und Azini gliedert, liegt jeweils eine Struktur des sich weiter verzweigenden Bronchialbaums zugrunde (Hauptbronchien, Lappenbronchien, Segmentbronchien, Bronchioli, Bronchioli terminales). (Lüllmann-Rauch, 2009)

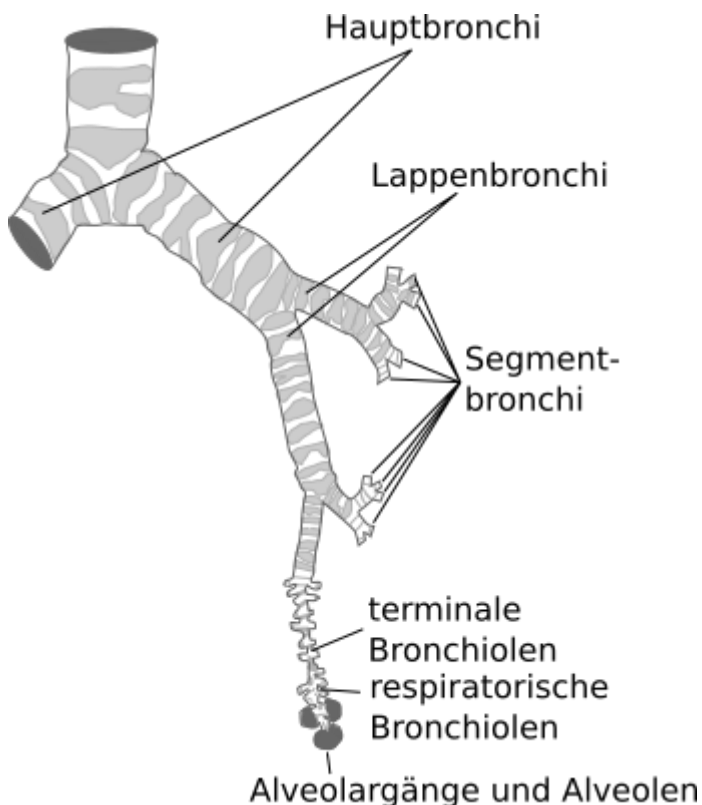


Abbildung 2: Aufbau Bronchialsystem, Darstellung c.f. Gosselink et al., 2005

1.4.2 Verteilung von Partikeln im Atemtrakt

Aufgrund der großen Kontaktfläche des Lungen- und Bronchialsystems können durch die Atemluft Partikel, aber auch toxische Substanzen in den Atemtrakt gelangen. Dabei ist nicht nur die Substanz selbst von Bedeutung, sondern auch die Größe der aufgenommenen Partikel. Die Ablagerung von Partikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser unter 500 nm erfolgt hauptsächlich diffusionsabhängig (Oberdörster et al., 2005).

Die Größe ist auch ein entscheidender Faktor, bis in welche Region des Atemtrakts die Partikel gelangen können. So hat 1994 die International Commission on Radiological Protection ein mathematisches Vorhersagemodell entwickelt, welches den möglichen Ablagerungsort im Respirationstrakt angibt (ICRP, 1994). Dabei zeigen 20 nm kleine Partikel die höchste Abscheideeffizienz im Alveolarbereich (Oberdörster et al., 2005). Partikel können sich je nach ihrer Größe in unterschiedlichen Regionen des Atemtrakts ablagern. Je kleiner die Partikel sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie bis in die Alveolen gelangen. Mit abnehmendem Durchmesser der Partikel unter 500 nm steigt die Ablagerungsrate in allen Regionen des Atemtrakts. Grund dafür ist die erhöhte Diffusionsmobilität kleinerer Partikel (Borm et al., 2006).

1.4.3 Reinigungsmechanismen

Der Respirationstrakt verfügt über verschiedene Abwehr- und Reinigungsmechanismen, um die inhalierten Partikel wieder zu entfernen (Lüllmann-Rauch et al. 2009). Diese sind unterschiedlich effizient hinsichtlich der zu eliminierenden Partikelgröße (Oberdörster et al., 2005). Die Schleimhaut der intrapulmonalen Luftwege verfügt über ein respiratorisches Epithel. Dieses besitzt Becherzellen, die zusammen mit serösen und mukösen Drüsen den viskosen Schleimteppich aus gequollenen Muzinen produzieren. Die kinzilien- und mikrovillitragende Flimmerzellen sind für den Transport des Schleimteppichs rachenwärts verantwortlich. Partikel, die schon in den oberen Luftwegen auf dem Schleim haften bleiben und nicht löslich sind, werden so innerhalb von 1-2 Tagen Richtung Rachen transportiert und anschließend verschluckt oder durch Husten ausgeworfen (Lüllmann-Rauch, 2009; Borm et al., 2006). Nicht-lösliche Partikel, die bis in die Alveolen gelangen und sich dort ablagern, werden durch die spezialisierten Abwehrzellen, den Alveolarmakrophagen aufgenommen. Danach werden sie entweder mithilfe des Schleimteppichs hinaustransportiert und verschluckt oder sie wandern ins Interstitium. Die nicht-löslichen Nanopartikel können auf diese Weise dort bis zu Jahren in der Lunge verbleiben (Borm et al., 2006). Ist die Menge der inhalierten unlöslichen Partikel zu groß, sodass sie nicht alle von den Alveolarmakrophagen aufgenommen

werden können, besteht auch die Möglichkeit der Interaktion mit den Epithelzellen (Borm et al., 2006).

Größere Partikel von über 10 µm werden schon in den oberen Atemwegen abgefangen. Partikel zwischen 5-8 µm gelangen bis in die Bronchien und Partikel kleiner als 5 µm gelangen bis in die Alveolen (Lüllmann-Rauch, 2009).

1.4.4 Toxizität von Nanopartikeln im Atemtrakt

Nanopartikel lassen sich gemäß ihrer Toxizität in drei verschiedene Gruppen einteilen (Gebel et al., 2014). Zum einen können Nanomaterialien Stoffe abgeben, beispielsweise toxische Ionen wie Silber- oder Zinkionen. Außerdem können Nanomaterialien sowohl chemisch als auch katalytisch reaktive Gruppen auf ihrer Oberfläche besitzen. Diese Mechanismen werden der chemischen Toxizität zugeordnet. Die nächste Gruppe umfasst fibröse Nanomaterialien, welche aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Asbest unter Verdacht stehen die Entstehung von Tumoren zu begünstigen. Nach ihrer Inhalation verursachen Asbestfasern Lungenkarzinome oder Mesotheliome. Neben den fibrösen Nanomaterialien wurden noch die granulären biobeständigen Stäube ohne wesentliche bekannte spezifische Toxizität beschrieben (GBS) (Pott und Roller, 2003). Diese besitzen keine spezifischen toxischen Substanzen oder bestimmte chemische Gruppen. Sie werden als biopersistent und kleinteilig beschrieben. Diese Nanomaterialien zeichnen sich durch eine hohe Produktion in der Industrie aus. Durch Inhalation der Partikel gelangen sie über die Bronchien bis in die Alveolen. Studien zeigten dabei, dass sie ein karzinogenes Potenzial aufweisen, wie durch Inhalations- und Instillationsstudien an Ratten bereits ermittelt wurde (Pott und Roller, 2003).

Zu dieser letzten Gruppe zählt auch das Nanomaterial Bariumsulfat, welches als schwer löslich gilt (Hartwig, 2017).

1.5 Apoptose

Die Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein aktiver physiologischer Mechanismus, bei der die Zelle selber das Programm für ihren eigenen Untergang und ihre Beseitigung aktiviert (Darzynkiewicz et al., 1997). Sie wurde 1972 erstmals beschrieben und unterscheidet sich deutlich von der Nekrose, die ein passives Ergebnis einer zellulären Zerstörung ist und stets eine Entzündung hervorruft (Kerr et al., 1972). Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Alterung und der Embryogenese (Ma und Yang, 2016). Der programmierte Zelltod kann aufgrund von verschiedenen Reizen ausgelöst werden. Dazu gehören das Fehlen von Wachstumsfaktoren, von

Hormonen oder von Überlebenssignalen. Auch die Bindung von Signalstoffen an Todesrezeptoren der Plasmamembran oder ein Anstieg von p53 aufgrund von DNA-Schäden kann die Apoptose auslösen (Lüllmann-Rauch, 2009). Der Körper benötigt diesen Mechanismus, um ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod sicher zu stellen und kann so gezielt entartete oder defekte Zellen aus dem Zellverband entfernen (Kerr et al., 1972). Die Apoptose besitzt dabei eine regulierende Rolle bei der Kontrolle der Größe von Zellpopulationen und -geweben (Kerr et al., 1972). Störungen der Induktion der Apoptose können zu malignen Erkrankungen führen. Dabei spielt die Unterdrückung der Apoptose während der Karzinogenese eine wichtige Rolle in der Entstehung und Entwicklung mancher Krebsarten (Kerr et al., 1972). Die Tumorzellen können durch bestimmte Mechanismen Resistenzen gegenüber der Apoptoseinduktion ausbilden. Ein pathologisch erhöhtes Auftreten von Apoptose in unterschiedlichen Geweben kann zu Immunschwäche und degenerativen Erkrankungen führen. Bei dem Krankheitsbild von AIDS oder Alzheimer spielt ein zu hohes Vorkommen von Apoptose eine wichtige Rolle. Apoptotische Zellen weisen spezifische morphologische Merkmale auf. Dazu zählen die Kondensierung und Präzipitation des Chromatins an der Kernhülle, ein abnehmendes Zellvolumen durch die Schrumpfung der Zelle, die Entstehung von Zellfragmenten und eine Blasenbildung der Plasmamembran (Lüllmann-Rauch, 2009; Darzynkiewicz et al., 1997).

Die Apoptose kann durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden (Elmore, 2007). Dabei wird unterschieden zwischen dem extrinsischen, dem intrinsischen und dem Perforin/Granzym- Weg (Elmore, 2007). Die ligandenabhängige Bindung an bestimmte Todesrezeptoren der Plasmamembran aktiviert den extrinsischen Weg (Elmore, 2007). Die Auslösung des intrinsischen Wegs geschieht durch mitochondriale Veränderungen der Zelle aufgrund verschiedener Stimuli (Toxine, Hypoxie, etc.) (Elmore, 2007). Der Perforin-Weg wird durch zytotoxische T-Zellen vermittelt (Elmore, 2007). Dabei stammt das Perforin aus den Zellgranula der T-Zellen und verursacht an der Membran der Zielzelle eine Pore. Diese Wege führen jeweils zu der Aktivierung spezifischer Caspasen, die zu der Familie der Proteasen gehören (Lüllmann-Rauch, 2009). Alle haben dabei gemeinsam, dass sie schließlich Caspase 3 aktivieren. Durch die Aktivierung der Caspase 3 beginnt eine gemeinsame Endstrecke, die letztlich zum Untergang der Zelle führt (Elmore, 2007). Diese besteht aus der Aktivierung der Endonuklease, die zum Abbau der chromosomalen DNA führt. Die Aktivierung der Protease führt zum Zerfall von Kern- und Zytoskelettproteinen. Diese zellulären Veränderungen sind elektronenmikroskopisch sichtbar in Form von oben genannten morphologischen Veränderungen. Der letzte Teil der Apoptose zeigt sich durch die Phagozytose der apoptotischen Körperchen, vermittelt durch die Präsentation

von Phosphatidylserin auf der Membranoberfläche (Rassow et al., 2012; Lüllmann-Rauch, 2009).

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es die Wirkungsweise von Bariumsulfatnanopartikeln näher zu untersuchen, sowie die Eignung gängiger Vitalitätstests für die Beurteilung der Zytotoxizität dieser Partikel. Eine Aufklärung hinsichtlich der Zytotoxizität hilft beim Einordnen einer möglichen Gefahr bei einer Exposition für den Menschen und die Umwelt. Die Untersuchung der Wirkungsweise beinhaltete auch herauszufinden, ob Bariumsulfatnanopartikel den programmierten Zelltod, die Apoptose, induzieren.

3 Material und Methodik

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte und Verbrauchsgüter

Gerätschaft	Hersteller
Brutschrank, BBD 6220	Heraeus- Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Sterilbank, HERA, safe	Heraeus- Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fuchs- Rosenthal- Zählkammer	GLW, Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe Deutschland
Mikroskop, Axiovert 25	Carl-Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
Digitalkamera & Frame Grabber	Nikon DS-Vi1, Japan
Kühlschrank	Kryosafe, Hans S. Schröder GmbH, Hamburg
Zentrifuge, Megafuge 1. OR;	Biofuge Fresco Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen, 25cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz
24- Well- Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
6- Well- Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer; 0,200 m; 0,0625 mm ² Tiefe	GLW; Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Muse Cell Analyzer	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ultraschall Homogenisator Sonopuls HD 3100	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
- Generator GM 3100	
- Ultraschallwandler UW 3100	

- Stufenhorn SH 70 G
- Mikrospritze MS 73, Ø 3 mm

Platten- Reader, Genios	Tecan Group Ltd. Männedorf, Schweiz
Heizschrank Biometra OV5	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Metallgestell zur Rotation	keine Angabe
Vortex- Genie 2	Scientific Industries, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Zellmedium für Tumorzelllinie A549: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)- low glucose D6046 1000 mg/L Glukose Natrium Bicarbonat L- Glutamin Pyridoxin (pH 7,4) →komplettiert mit: Fetales Kälberserum (FKS) (10%) und Streptomycin/ Penicillin (1%)	Promocell, Heidelberg Deutschland
Nanopartikel Bariumsulfat	Solvay Infra Bad Hönningen GmbH, Deutschland
Dinitrophenol (DNP)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Quecksilber(II)chlorid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Zellmedium für Primärzellen: Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECG)	Promocell, Heidelberg Deutschland
Phosphat- Saline- Puffer (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Trypsin-/EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS-Lösung) Biochrom AG, Berlin

Neutralrot- Assay: Sigma Aldrich, München, Deutschland

Stammlösung: 0,4g/100ml PBS

Gebrauchslösung:

Neutralrotstammlösung 1:50 verdünnt +
PBS

Roth, Karlsruhe

Extraktionslösung:

50% Ethanol, 49% H₂O, 1% Essigsäure

Muse Count & Viability Assay Kit

Merck Millipore, Darmstadt
Deutschland

Muse Annexin V & Dead Cell Kit

Merck Millipore, Darmstadt
Deutschland

Dispex AA4040

BASF, Ludwigshafen, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur - Tumorzelllinie A549

Die für diese Arbeit verwendete Tumorzelllinie A549 entstammt aus einem humanen Adenozellkarzinom der Lunge eines 58-jährigen männlichen Kaukasiers. Bei den Zellen handelt es sich um Alveolarepithelzellen des Typs II (Lieber et al., 1976).

3.2.2 Zellkultur – Normale humane Bronchialepithelzellen (NHBEZ)

Für den Neutralrottest wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich normale humane Bronchialepithelzellen verwendet. Diese wurden aus tumorfreien Gewebsabschnitten von Lungenteilresektionen von Patienten des Martha-Maria-Krankenhauses in Halle-Dörlau kultiviert. Für die Nutzung des Patientenmaterials zu Forschungszwecken liegt eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor (Nummer des Ethik-Votums: 2016-20).

Die Kulturen der NHBEZ bestehen zu über 95% aus Zellen, die epithelialen Charakter besitzen und nur sehr geringe Anteile von Fibroblasten aufweisen (Runge et al., 2001).

3.2.3 Kultivieren und Passagieren der Zellkultur - A549

Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ in einer 25 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Der Tumorzelllinie A549 wurde das Medium DMEM, welches durch die Zugabe von 10% fetalem Kälberserum und 1% Streptomycin/ Penicillin komplettiert wurde, hinzugefügt. Dieses Medium wurde dreimal in der Woche unter der sterilen Laminarbox ausgetauscht (Montag, Mittwoch, Freitag), indem das alte Medium abgesaugt und 7 ml frisches Medium hinzugegeben wurde. Um eventuelle Verunreinigungen durch Bakterien oder verändertes Wachstum zu erkennen sowie die Vitalität zu überprüfen, wurden die Zellen zuvor jedes Mal mikroskopisch untersucht. Bei einer Konfluenz von 60-80% wurden die Zellen in die nächste Passage überführt. Bei der vorliegenden Arbeit wurde mit Passagen von 33-36, sowie 11-16 gearbeitet. Dabei wurde zunächst das Medium vorsichtig abgesaugt, um die Zellen danach mit 4 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; pH 7,4) ca. 30 Sekunden unter leichtem Schwenken zu spülen. Das PBS wurde abgesaugt und durch 2 ml Trypsin/ EDTA ersetzt, um die enzymatische Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche auszulösen. Die Trypsinierung erfolgte im Brutschrank für eine Dauer von 5 Minuten. Danach wurde mikroskopisch überprüft, ob sich die Zellen vollständig von der Zellkulturflasche gelöst haben. War dies nicht der Fall, wurde das Ablösen durch leichtes Beklopfen des Bodens der Zellkulturflasche gefördert. Zum Beenden des Vorgangs der Trypsinierung wurde die doppelte Menge PBS im Verhältnis zu Trypsin hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Überschuss wurde vorsichtig und möglichst ohne Berührung des Zellpellets abgesaugt und das entstandene Zellpellet wurde je nach Größe mit einem 1-5 ml warmen Medium resuspendiert.

Zur Bestimmung der vorhandenen Zellzahl diente die Fuchs-Rosenthal Zählkammer. Aus der ermittelten Zellzahl wurde das benötigte Volumen des Mediums bestimmt und dementsprechend die benötigte Menge der Zellsuspension in das Medium gegeben und resuspendiert. Die Zellen wurden dann abhängig von den Versuchen entweder in 24-Well oder 6-Well-Platten mit benötigter Zellzahl ausgesät.

3.2.4 Kultivieren und Passagieren der Zellkulturen - NHBEZ

Die Methode zur Kultivierung von NHBEZ wurde am Institut für Umwelttoxikologie Halle im Wesentlichen nach der Publikation von Runge et al. 2001 etabliert und durchgeführt. Die Lungen- und Bronchiusresektate stammen von Tumorpatienten aus dem Martha-Maria-Krankenhaus in Halle-Dölau, bei denen eine Lungenteilresektion durchgeführt

wurde. Nach der Entnahme erfolgte unmittelbar danach die Überführung von pathologisch tumorfreien Gewebstücken in das sterile und kühle Transportmedium Leibovitz L-15. Das Gewebe wurde mehrmals mit 37°C warmen PBS gewaschen, bevor es unter sterilen Bedingungen mit Hilfe von Pinzette und Schere in mehrere ca. 0,2-0,5 cm² große Stücke aufgeteilt wurde. Dabei wurde zudem das Bronchialgewebe vom Lungengewebe getrennt. Anschließend wurden die Gewebstücke entsprechend ihrem Gewebe auf 22,1 mm² große Kulturschalen verteilt und mit einem AECG Medium bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Atmosphäre mit 5% CO₂ im sterilen Brutschrank kultiviert. Der Mediumwechsel wurde dreimal pro Woche durchgeführt. Nach 2-3 Wochen wuchsen die Zellen adhärent aus dem Gewebe aus und wurden bei einer Konfluenz von 80-90% subkultiviert. Die Gewebstücke wurden dann erneut zum Auswachsen der nächsten Generation (2. Generation) in Kulturschalen in AECG Medium überführt. Zur enzymatischen Ablösung und Passagierung des Zell-Monolayers wurde das Detach-Kit von Promocell (Heidelberg) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen Patienten und Generationen gearbeitet.

3.3 Herstellung der BaSO₄-Verdünnungsreihe und Pipettieren der Zellen

3.3.1 Herstellung der Verdünnungsreihe für die A549-Zelllinie

Für die Versuche dieser Arbeit wurde Bariumsulfat als Nanopartikel von Solvay zum Pipettieren der Zellen verwendet. Die Nanopartikel besaßen keine Ummantelung („coating“) und waren ca. 60 nm groß. Um die Zellen mit BaSO₄ auszusetzen, musste zuerst eine Stammlösung mit BaSO₄ hergestellt werden. Einer zuvor bestimmten Menge der BaSO₄-Partikel wurde DMEM Medium hinzugegeben im Verhältnis von 1 mg/1ml. Die Stammlösung wurde in einem verschlossenen Glasbehältnis mit einer Ultraschallsonde bei einer Bestrahlungsenergie von 15 kJ drei Minuten lang unter Wasserkühlung behandelt. Dieses Verfahren stellt sicher, dass die Zellen tatsächlich mit freien Nanopartikeln behandelt wurden. Das Protokoll wurde von Sarah Thomas im Rahmen ihrer Dissertation entwickelt (noch unveröffentlicht). Für das Pipettieren der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (0,001 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml), wurde eine Verdünnungsreihe nach Tabelle 1 hergestellt. Zur Herstellung wurde eine entsprechende Menge DMEM Medium in verschließbaren Glasröhren vorgelegt, in das die Partikelsuspension mit einer Eppendorfpipette hinzugefügt wurde. Diese Röhrchen wurden ebenfalls unter Kühlung mit der Ultraschallsonde bei 15 kJ jeweils drei Minuten pro Konzentration beschallt. Vor

dem Pipettieren der Zellen mit der entsprechenden Suspension wurden sie mikroskopisch betrachtet, um die Konfluenz und Zellvitalität zu beurteilen. Die Kulturen für die 24 h-Versuche wurden bei einer Konfluenz von ca. 80-85% mit BaSO₄ versetzt. Bei den Kulturen für die 72 h-Versuche geschah dies bei einer Konfluenz von ca. 60%. Bei der Versuchsdurchführung wurde darauf geachtet, dass die Platten nicht vollständig von Zellen bewachsen waren. Dabei wurde das alte Medium abgesaugt und durch Partikelsuspension mit frischem Medium ausgetauscht. Ein Mediumwechsel erfolgte nach dem Zugabe von BaSO₄ nicht mehr. Für den Neutralrotversuch wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Für die Versuchsdurchführung am FACS-Gerät wurden die Zellen in 6-Well-Platten benötigt.

Tabelle 1: Verdünnungsreihe Bariumsulfat

Konzentration in mg/ml	0,001	0,01	0,05	0,075	0,1	0,5	1
Verdünnungsfaktor	1:10000	1:1000	1:200	1:133,33	1:100	1:20	1:10
Stammlösung in µl	0,4	4	20	30	40	200	400
DMEM in µl	3999,6	3996	3980	3970	3360	3800	3600

3.3.2 Durchführung für NHBEZ

Die Herstellung der Stammlösung für NHBEZ wurde wie in 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Statt DMEM Medium wurde jedoch AECG Medium verwendet. Dem AECG Medium wurde zusätzlich noch eine 5%-ige Lösung des Tensids Dispex AA4040 in bidestilliertem Wasser im Verhältnis von 1 µl Tensid-Lösung pro 1ml Medium hinzugegeben.

3.4 Vitalitätstests

3.4.1 Neutralrottest

Der Neutralrottest dient zur Bestimmung der Vitalität von Zellen und beruht auf deren Anfärbung mit dem Reagens Neutralrot. Das Neutralrot wird von den Lysosomen vitaler Zellen aufgenommen und gespeichert. Tote Zellen können den Farbstoff nach den Waschvorgängen nicht halten und werden nicht angefärbt (Borenfreund und Puerner, 1985). Die Konzentration des aufgenommenen Neutralrots wird nach einer bestimmten Zeit mit dem Plattenphotometer vermessen und ist linear von der Anzahl der lebenden Zellen abhängig (Borenfreund et al., 1988).

Der Neutralrottest wurde in der vorliegenden Arbeit als 24 h- und 72 h- Testversuch durchgeführt. Die Zellen wurden dazu in 24-Well-Platten ausgesät und bei entsprechender Konfluenz mit BaSO₄ versetzt. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach Beendigung der Inkubationszeit mit dem BaSO₄ wurden die Zellen nochmals mikroskopisch betrachtet, um die Konfluenz und Vitalität zu beurteilen. Zur Durchführung des Vitalitätstests musste zuerst eine Gebrauchslösung hergestellt werden. Dazu wurde die Neutralrotstammlösung mit PBS im Verhältnis von 1:50 vermischt. Danach wurde der Überschuss des Mediums durch vorsichtiges Abkippen entfernt und die Zellen wurden pro Well mit 500 µl warmem PBS mit einer Temperatur von 37°C jeweils zweimal gespült. Nach Verwerfen des PBS erfolgte die Zugabe der Gebrauchslösung (250µl/Well) und die 30-minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand erneut vorsichtig abgekippt und die Zellen wurden nochmals mit je 500 µl PBS pro Well gespült. Nach Entfernen des PBS erfolgte die Zugabe von 500 µl Extraktionslösung (50% Ethanol, 49% H₂O, 1% Essigsäure) pro Well. Die Messung der Absorption erfolgte dann bei 560 nm im Plattenphotometer und mit Hilfe des Computerprogramms Magellan 3 (Tecan).

3.4.2 Vitalitätsmessung durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Eine weitere Bestimmung der Vitalität der Zellen in dieser Arbeit wurde mit einem FACS Gerät des Typs Muse der Firma Merck Millipore durchgeführt. Dazu wurde ein vorgefertigtes Testreagenz (Muse™ Count and Viability Kit) verwendet. Die Kit-Lösung enthält zwei verschiedene DNA-bindende Farbstoffe: Propidiumiodid und LDS 751. Diese Farbstoffe färben auf der Grundlage ihrer unterschiedlichen Permeabilität die Zellen an, wodurch sie in vitale und nicht-vitale Zellen unterschieden werden können. Propidiumiodid färbt nur den Zellkern von Zellen an, die ihre Membranintegrität verloren haben. Dadurch werden nekrotische und tote Zellen vom FACS Gerät erkannt. Der zweite Farbstoff LDS 751 ist ein membranpermeabler DNA-bindender Farbstoff, der sowohl den Kern der lebenden, als auch den der toten und nekrotischen Zellen anfärbt. Das FACS-Gerät kann anhand der zellulären Größeneigenschaften ebenfalls durch LDS 751 angefärbte Zellkerne von toten Zellen unterscheiden und rechnet sie daher dem Debris (Zellbruchstücke) zu. Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare angesogen. Das Gerät errechnet dann entsprechend dem Fluoreszenzsignal der aufgenommenen Zellen die Gesamtzellzahl pro Milliliter (Merck Millipore, 2013). Für die Durchführung der Messung am FACS mussten die Zellen in einer Suspension mit der Kit-Lösung vorliegen. Dazu wurde wie in Kapitel 2.2.3 verfahren, um die Zellen enzymatisch abzulösen. Hierfür

wurden die Zellen vor der Trypsinierung jedoch zweimal vorsichtig mit PBS gespült, um vor allem bei den hohen Konzentrationen lose BaSO₄-Partikel zu entfernen. Zudem wurde 1 ml Trypsin pro Well verwendet. Nach der Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet abhängig von der beimpften Konzentration an BaSO₄ (siehe Tabelle 2) in DMEM Medium resuspendiert. Vor und nach jeder Versuchsdurchführung wurde eine komplette Systemreinigung mit der Reinigungsflüssigkeit Cleaning Fluid von Muse™ durchgeführt. Die Count&Viability Lösung wurde in Eppendorf-Mikrogefäßen vorgelegt (siehe Tabelle 2). Dabei wurde bei der Kontrolle die doppelte Menge der Count&Viability Lösung verwendet, da diese zusätzlich für die Voreinstellungen am Gerät benötigt wurde. Die frisch gemischte Zellsuspension wurde zu dem vorgelegten Reagenz hinzugefügt und nochmals resuspendiert. Das Verdünnungsverhältnis betrug 1:10, welches in Vorversuchen aufgrund der vorhandenen Zellzahl in den 6-Well-Platten bestimmt wurde. Die anschließende Inkubationszeit des Reagenzes betrug 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Suspension unmittelbar vor jeder Messung nochmals resuspendiert. Vor Beginn der Messungen mussten am Gerät mithilfe der ersten Probe (Kontrolle) die Einstellungen für die weiteren Proben festgelegt werden. Auf dem Bedienungspaneel erschienen zwei Zellpopulationen, die in vitale und tote Zellen eingeteilt wurden. Bei der Justierung der Einstellungen sollten die Zellpopulationen möglichst zwischen 2 und 3 auf der y-Achse liegen (siehe Abbildung 2). Zwischen den toten und vitalen Zellen wurde nach Augenmaß etwa mittig eine Grenze festgelegt. Der Debris wurde durch die untere Linie markiert und dadurch von den Zellpopulationen getrennt. Anschließend wurden alle Proben vermessen. Das Gerät maß dabei die Fluoreszenzaktivität und gab Gesamtzellzahl, Anzahl der vitalen und toten Zellen, sowie eine graphische Darstellung der Messungen aus.

Tabelle 2: Mengenverhältnis zur Herstellung der Proben für Muse™ Count & Viability Assay

Konzentration BaSO₄ in mg/ml	Kontrolle	0,01	0,05	0,1	0,5	1
Muse Count&Viability Kit Lösung in µl	180	90	90	90	90	90
Zellsuspension in µl	20	10	10	10	10	10
DMEM in µl	500	500	500	500	300	200

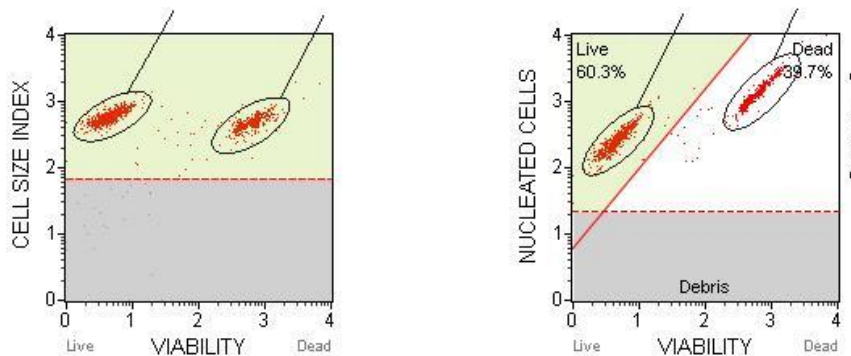


Abbildung 3: Justierung der Einstellungen am FACS-Gerät

3.5 Apoptose-Messung mittels MUSE™

Zur Messung einer möglich ausgelösten Apoptose diene ebenfalls das FACS Gerät des Typs Muse™ der Firma Merck Millipore. Für die Versuchsdurchführung wurde das vorgefertigte Testreagenz Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay verwendet. Apoptose initiiert bei Zellen intrazelluläre Prozesse, die zu charakteristischen physiologischen Veränderungen führen. Zu diesen Veränderungen gehören unter anderem die Präsentation der Membrankomponente Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche. PS ist normalerweise nur auf der Innenseite der Zellmembran vorhanden. In der verwendeten Assay-Lösung ist Annexin V enthalten. Annexin V ist ein Calcium-abhängiges phospholipidbindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin. Nach Induktion der Apoptose finden sich jedoch auch Moleküle von PS auf der äußeren Membranoberfläche, die von Annexin V aus dem Testreagenz gebunden werden. Das Gerät kann durch einen zusätzlichen Zellmarker (7-AAD), der die DNA anfärbt, jedoch nur bei gestörter Membranintegrität in die Zellen gelangt, folgende vier verschiedene Populationen unterscheiden (Merck Millipore, 2013).

- Nicht-apoptotische Zellen: Annexin V (-) und 7-AAD (-)
- Frühe apoptotische Zellen: Annexin V (+) und 7-AAD (-)
- Spätstadium apoptotische und tote Zellen: Annexin V (+) und 7-AAD (+)
- Meist nukleare Trümmer: Annexin V (-) und 7-AAD (+) (Merck Millipore 2013).

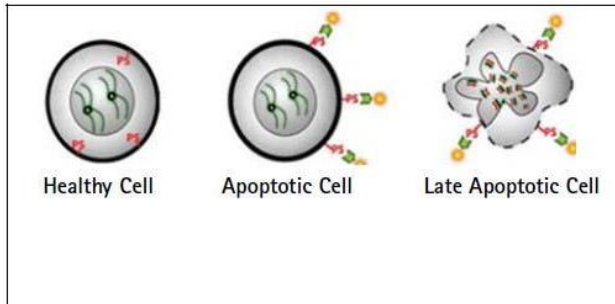


Abbildung 4: Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin (Muse™ Annexin V & Dead)

Vor und nach jeder Versuchsdurchführung wurde eine komplette Systemreinigung mit dem Instrument Cleaning Fluid von Muse™ durchgeführt. Zur Durchführung des Experiments mussten die Zellen in Suspension vorliegen. Dazu wurden die Zellen ebenfalls wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben vorbereitet. Die Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit- Lösung wurde in Eppendorf-Mikrogefäßen vorgelegt. Für die Kontrolle wurde für die Voreinstellungen am Gerät die doppelte Menge verwendet. Das Verdünnungsverhältnis zwischen Zellsuspension und dem Testreagenz betrug 1:5. Die frische Zellsuspension wurde der vorgegebenen Reagenzlösung hinzugegeben und nochmals resuspendiert (siehe Tabelle 3). Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte erneut die Justierung der Einstellungen am Gerät mithilfe der ersten Probe (Kontrolle) für alle weiteren Experimente (siehe Abbildung 3). Dazu wurden die Zellwolken auf dem Bedienungspaneel wieder möglichst zwischen 2 und 3 beim Index eingestellt und die Trennlinie zwischen Debris und den toten und vitalen Zellen unterhalb der Zellpopulationen angebracht. Unmittelbar vor jeder Messung wurde die Probe resuspendiert. Das FACS-Gerät zeigte nach der Probenmessung in einer graphischen Darstellung den prozentualen Anteil der vier Populationen und die Gesamtzellzahl der apoptotischen Zellen an. Als Positivkontrolle zur Auslösung der Apoptose diente bei dieser Versuchsdurchführung die Zugabe von 1 μMol DNP in Doppelbestimmung.

Tabelle 3: Mengenverhältnis zur Herstellung der Proben für Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay

Konzentration BaSO₄ in mg/ml	Kontrolle	0,01	0,05	0,1	0,5	1
Muse Annexin V & Dead Cell Lösung in µl	120	80	80	80	80	80
Zellsuspension in µl	30	20	20	20	20	20
DMEM in µl	500	500	500	500	300	200

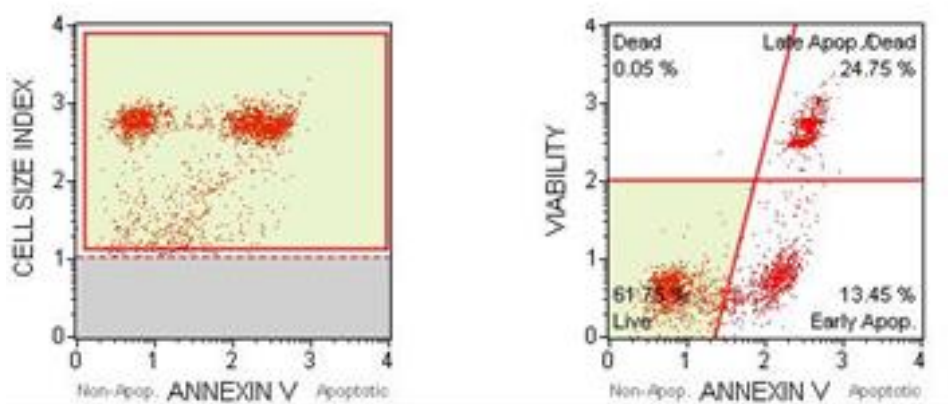


Abbildung 5: Justierung der Einstellungen am FACS für Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay (Merck Millipore 2013)

3.6 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte im Programm Microsoft Excel 2016 MSO, wobei die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt wurden. Die graphischen Darstellungen erfolgten teilweise mit Microsoft Excel und mit SigmaPlot 10.0 der „Systat Software, Inc. SigmaPlot for Windows“. Mit der Software Magellan 3 (Firma Tecan) wurde die vom Plattenphotometer gemessene Vitalität dargestellt.

Die Signifikanz der Messergebnisse wurde mit dem Programm SPSS ermittelt. Dabei wurde bei den Ergebnissen der Tumorzellen A549 eine Friedmann-ANOVA mit einem Bonferroni Test als post-hoc Test durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Primärzellen erfolgte durch das Programm InStat mittels eines Kruskal-Wallis-Tests mit einem post-hoc Test nach Dunn.

Wenn der ermittelte p-Wert unter 0,05 lag wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Vitalitätstests

4.1.1 Ergebnisse der Neutralrottests

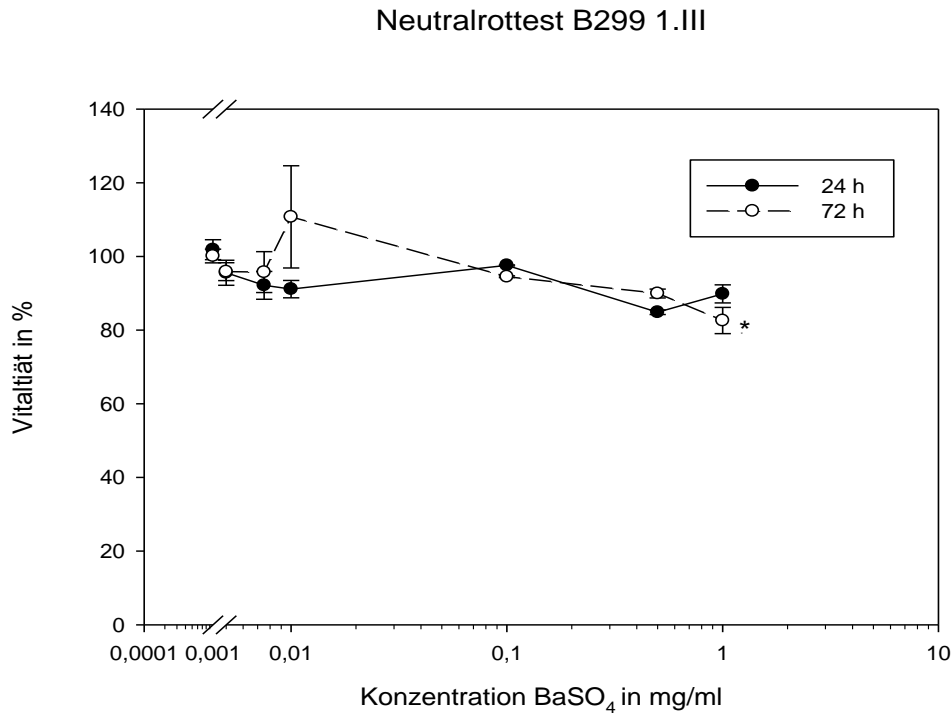


Abbildung 6: Vitalität von Bronchialepithelzellen B299 1.III 24 h und 72 h nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen BaSO₄
* $p < 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B299

Abbildung 6 stellt die durch den Neutralrottest ermittelte Vitalität in Prozent von Bronchialepithelzellen aus dem Gewebe des Patienten 299 nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit BaSO₄ relativ zu den unbehandelten Kontrollen dar. Bei 24-stündiger Inkubation ist über alle Konzentrationen hinweg eine leichte, aber nicht signifikante, Abnahme der Vitalität zu verzeichnen. Der Verlauf bei steigender BaSO₄-Konzentration zeigt die bei Experimenten mit Primärkulturen üblichen Schwankungen. Bei der Höchstkonzentration von 1 mg/ml beträgt die Vitalität noch 89,9%.

Bei 72 Stunden Inkubation ist bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml keine signifikante Toxizität zu verzeichnen. Der geringste Wert von 82,6% für die Vitalität wird bei der Maximalkonzentration (1 mg/ml) erreicht. Hier tritt eine signifikante Toxizität auf.

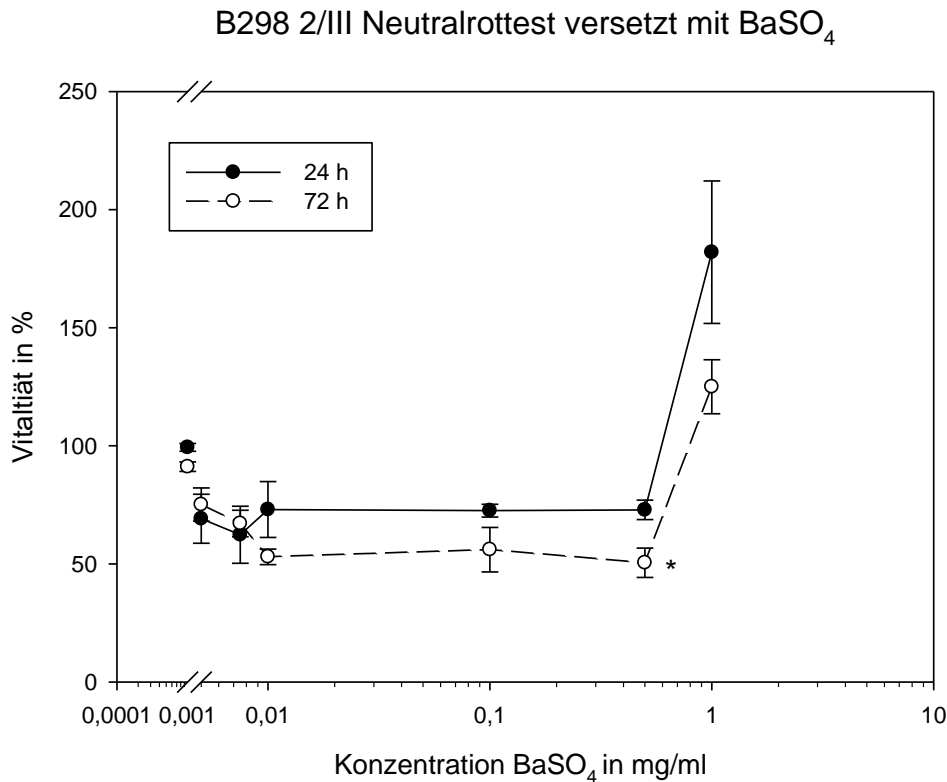


Abbildung 7: Vitalität von Bronchialepithelzellen B 298 2/III 24 h und 72 h nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen BaSO₄ * $p < 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B298

In Abbildung 7 wird der Vitalitätsverlauf nach Durchführung des Neutralrottests mit Bronchialepithelzellen dargestellt. Die Zellen stammen im Gegensatz zu Abbildung 6 von einem anderen Patienten und aus einer höheren Zellgeneration (B298/2/III). Der 24 Stunden-Graph zeigt ab 0,01 mg/ml bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml zwar einen Vitalitätsabfall, jedoch keine signifikante Toxizität. Danach ist bei der Maximalkonzentration ein sehr starker Vitalitätsanstieg auf 182% erkennbar. Die Standardabweichung ist hier mit über 30% vergleichsweise hoch, der Effekt ist nicht signifikant. Der 72 Stunden-Graph zeigt einen ähnlichen Verlauf. Der Vitalitätsverlust zwischen 0,001 und 0,1 mg/ml zwar etwas stärker ausgeprägt als beim 24 Stunden-Graph, signifikante Toxizität tritt jedoch erst bei 0,5 mg/ml auf. Auffallend ist beim 72 Stunden-Graph ebenfalls der starke Anstieg der Vitalität auf 125% bei der Maximalkonzentration. Insgesamt deuten die Ergebnisse der 24- und 72 h-Tests auf das Vorliegen eines technischen Problems hin.

L299 1.3 Neutralrottest versetzt mit BaSO₄

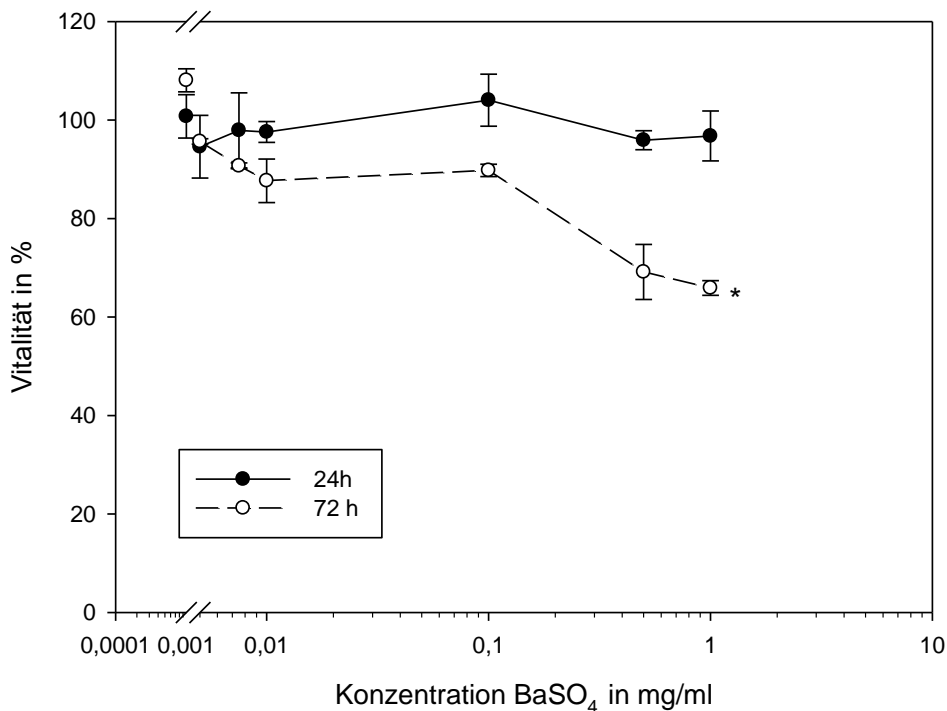


Abbildung 8: Vitalität von Lungenzellen L 299 I/3 24 h und 72 h nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen BaSO₄* p < 0,05 Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von L299

Abbildung 8 zeigt die Reaktion der Vitalität von peripheren Lungenzellen nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit BaSO₄. Der 24 Stunden-Graph zeigt keine signifikante Toxizität. Der 72 Stunden-Graph zeigt zwischen 0,001 und 0,5 mg/ml einen nicht signifikanten Vitalitätsabfall. Bei 1 mg/ml ist die Vitalität signifikant reduziert auf 66%.

Aufgrund der unterschiedlichen Testergebnisse mit teilweise starken Vitalitätsanstiegen bei steigenden Konzentrationen, die als Hinweis auf technische Probleme interpretiert wurden, wurde die Durchführung des Neutralrottests mit einer weiteren Zelllinie, der Tumorzelllinie A549, in Erwägung gezogen. Die verschiedenen Messdaten ließen die Frage aufkommen, ob es sich um primärzellspezifische Probleme handeln könnte.

Der Neutralrottest mit der Zelllinie A549 wurde ebenfalls in Dreifachbestimmung durchgeführt. Insgesamt erfolgten 3 Wiederholungen.

4.1.2 Phasenmikroskopische Darstellung

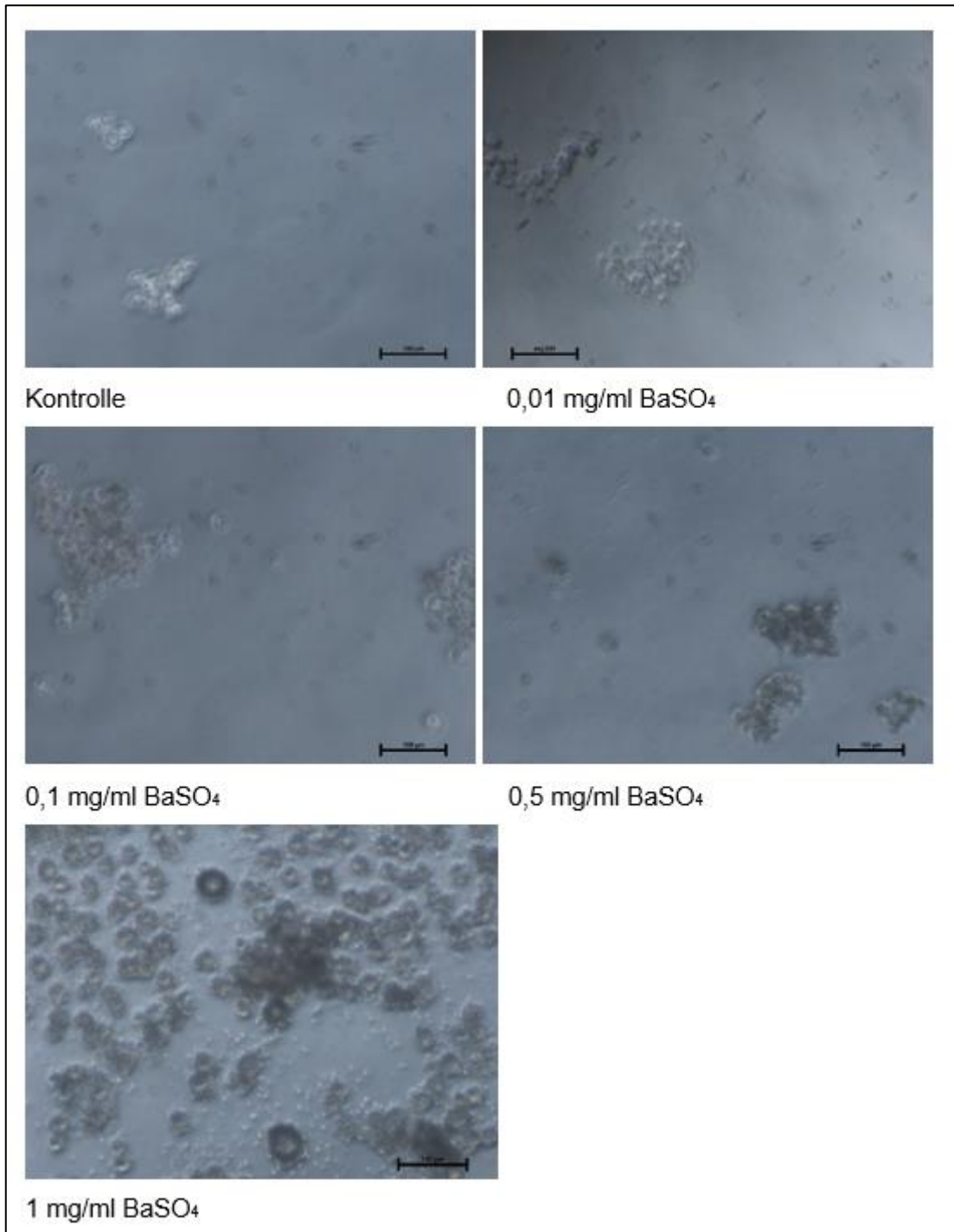


Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von A549 Zellen nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen BaSO₄. Der Maßstab entspricht 100 µm.

In den phasenkontrastmikroskopischen Darstellungen von Abbildung 9 wurden A549 Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen BaSO₄ in DMEM dargestellt. Die Abbildung der unbehandelten Kontrolle zeigt keine morphologischen Auffälligkeiten. Die Form der Zellen war unverändert epitheltypisch polygonal. Die Membranen der Zellen waren intakt. Bei steigenden Konzentrationen von BaSO₄ lassen sich bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml deutlich mehr Nanopartikel auf den Zellen erkennen. Bei 1 mg/ml sind die Zellen sogar so stark von den Partikeln bedeckt, dass die Zellmorphologie kaum erkennbar ist. Die Zellen wirken kugelig abgerundet.

Neutralrottest A549 versetzt mit BaSO₄

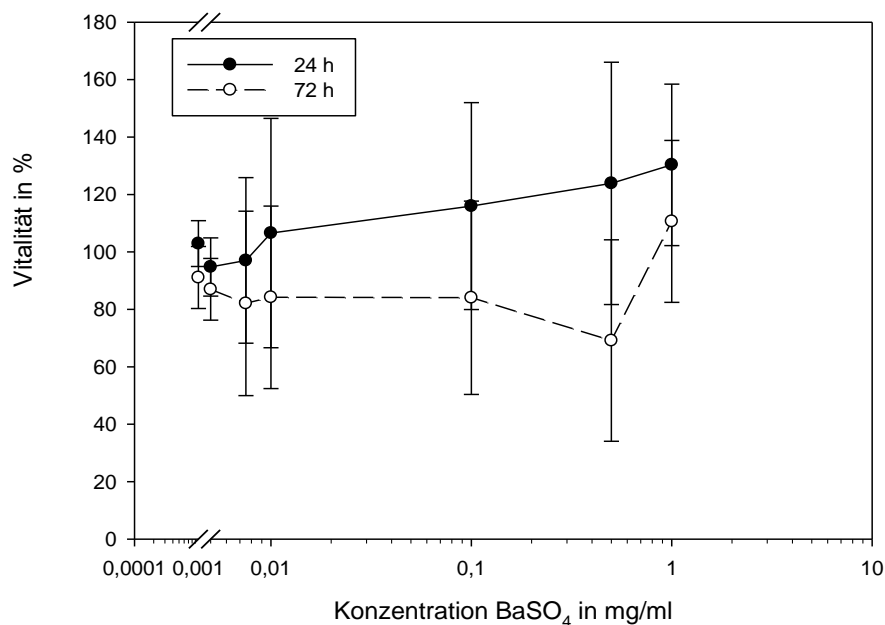


Abbildung 10: Vitalität von A549-Zellen 24 h und 72 h nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen BaSO₄

Abbildung 10 stellt die Messergebnisse der Vitalität in Prozent abhängig von der Konzentration von BaSO₄ in mg/ml dar. Dargestellt sind die Auswirkungen nach 24- und 72- stündiger Inkubation.

Der 24 Stunden-Graph zeigt bis zu einer Konzentration von 0,001 mg/ml zunächst einen leichten Abfall der Vitalität. Danach ist bis zur Maximalkonzentration von 1 mg/ml ein Anstieg der Vitalität auf 130% zu erkennen. Der 72 Stunden-Graph weist im Vergleich zum 24 Stunden-Test einen Trend nach unten auf und zeigt somit einen stärkeren Abfall

der Vitalität. Bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml ist der Vitalitätsabfall mit einem erreichten Wert von 69% am größten. Danach steigt der Graph jedoch stark an und erreicht bei einer Maximalkonzentration von 1 mg/ml einen Wert von 110%.

Besonders auffallend sind die erhöhten Vitalitätswerte bei steigender BaSO₄-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Diese Trends lassen auf einen Fehler im Messverfahren schließen. Um dieser Diskrepanz zu den zu erwartenden Werten auf den Grund zu gehen wurde ein erneuter Test mit einer Positivkontrolle durch Inkubation mit Quecksilber(II)-Ionen in Kombination mit der Exposition von Bariumsulfat durchgeführt. Bei der Durchführung dieses Versuches wurde eine 24-Well-Platte mit A549 ausgesät. 12 Wells der Platte wurden mit jeweils 80 µmol Quecksilber(II) beimpft. Die verbliebenen 12 Wells blieben in dieser Zeit unbehandelt. Bei einer Konfluenz von 80-90% und 23 Stunden nach Quecksilberzugabe wurden die Zellen nach Protokoll des Neutralrottests zuerst vom Medium befreit, dann zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde Neutralrot auf die Zellen hinzugegeben und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Protokoll wurde der Überschuss abgeschüttet und die Zellen nochmals mit PBS gewaschen. Die vermutete Toxizität von BaSO₄ sollte bei diesem Versuch keinen Einfluss zeigen. Aus diesem Grund wurde erst nach der Inkubation BaSO₄ gelöst in DMEM in den vorgegebenen Konzentrationen auf die Zellen der 24 Well zugegeben. Um nicht alle BaSO₄-Partikel mit dem Medium zu entfernen, wurden die Zellen für 60 Minuten in der BaSO₄-Suspension inkubiert. In dieser Zeit konnten die Partikel auf die Zellen absinken. Danach wurde das Medium durch Abschütten entfernt, die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und die Extraktionslösung hinzugegeben. Die Absorption der Proben in der 24-Well-Platte wurde dann im Plattenreader bei 560 nm vermessen. Das Pipettierschema ist in Abbildung 10 dargestellt. Der Versuch wurde mit zwei Wiederholungen durchgeführt und erfolgte in Dreifachbestimmung.

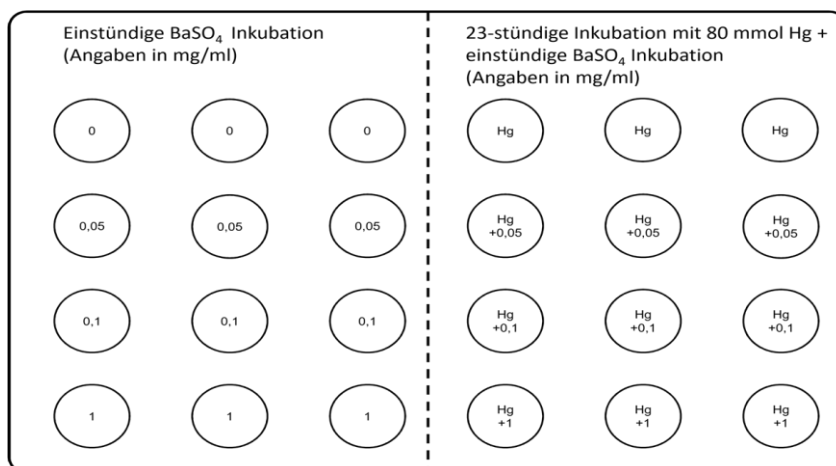


Abbildung 11: Pipettierschema 24 Well Platte mit BaSO₄ und Hg(II), eigene Darstellung

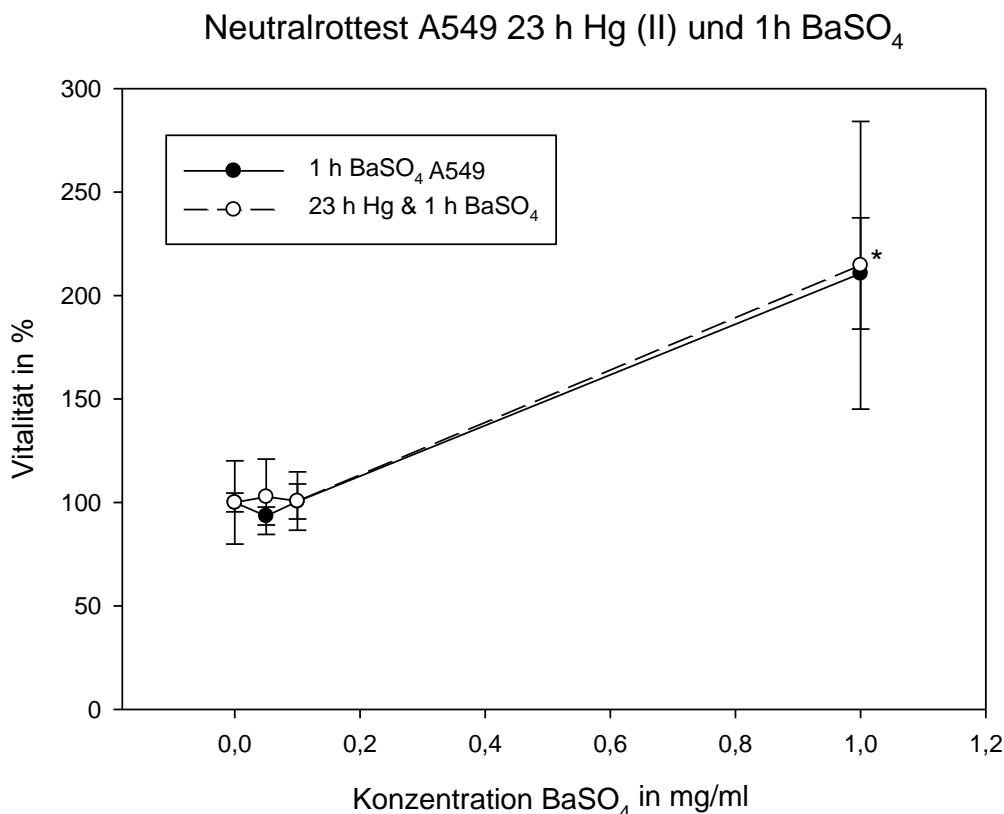


Abbildung 12: Vitalität von A549 Zellen 1 h nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen BaSO₄ und teilweise mit 23-stündiger Vorinkubation mit Hg(II)

In Abbildung 12 ist ein Graph mit und ohne Quecksilbervorinkubation dargestellt. Beide Graphen stellen die Ergebnisse einer einstündigen Inkubation mit BaSO₄ dar. Dabei wurden ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Bis zu einer Konzentration von 0,05 mg/ml ist bei beiden Graphen kein signifikanter Vitalitätsabfall zu erkennen. Bei der Maximalkonzentration von 1,0 mg/ml verzeichnet sich bei beiden Graphen ein starker Vitalitätsanstieg, im Experiment mit Hg(II) und BaSO₄ ist er signifikant.

Die Ergebnisse der Neutralrottests, sowie des Zusatzversuches mit Quecksilberinkubation, ließen die Vermutung aufkommen, dass die Nanopartikel einen Störfaktor beim Messen der Absorption im Plattenreader darstellen. Aus diesem Grund wurde ein anderes Testverfahren in Erwägung gezogen, bei dem die Vitalität der Zellen mit Hilfe eines FACS-Geräts gemessen wurde. Die Ergebnisse dieser Messungen werden im folgenden Kapitel beschrieben.

4.1.3 Ergebnisse der FACS-Messungen

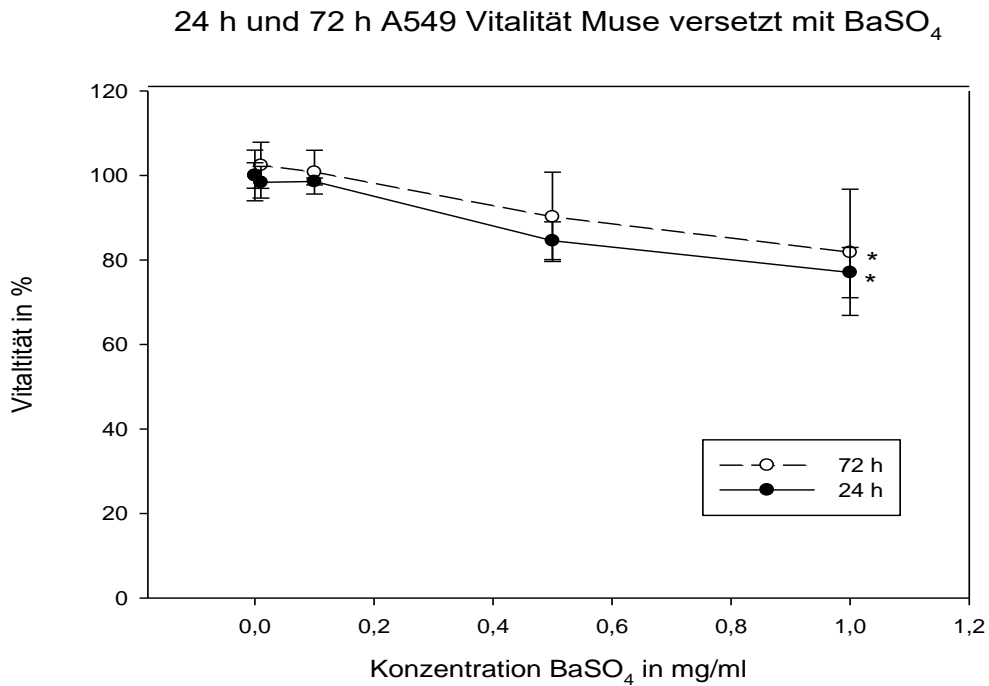


Abbildung 13: Vitalität von A549-Zellen 24 h und 72 h nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen BaSO₄ gemessen mit FACS. * $p < 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von A549

In Abbildung 13 ist die relative Vitalität von A549 Zellen nach Inkubation mit BaSO₄ Nanopartikeln für 24 h und 72 h dargestellt. Die Messung erfolgte mittels eines FACS-Geräts. Dabei wurden die DNA-bindenden Farbstoffe Propidiumiodid und LDS 751 bestimmt, um die Vitalität zu ermitteln. Der 24 h- Graph verzeichnet bei 1 mg/ml eine signifikant verminderte Vitalität von 77%. Bis dahin tritt keine signifikante Toxizität auf. Ab 0,1 mg/ml fallen beide Graphen bei zunehmender Konzentration mit sehr ähnlicher Steigung ab. Bei 72-stündiger Inkubation tritt ebenfalls nur in der höchsten Konzentration signifikante Toxizität auf, die Vitalität beträgt hier noch 82%. Werden die Ergebnisse der einzelnen Testtage bei diesen Versuchen genauer betrachtet, sind bei den Werten des 72 h-Versuches etwas höhere Standardabweichungen als beim 24 h-Versuch festzustellen. Der 72 h-Test zeigt bei einer Konzentration von 1 mg/ml eine Standardabweichung von 15%, die damit mehr als doppelt so hoch ist, wie beim 24 h-Versuch mit 6% Standardabweichung bei 1 mg/ml.

4.2 Messung der Apoptose

Um den Wirkmechanismus von BaSO₄ näher zu untersuchen, wurden A549 Zellen nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-Konzentrationen auf eine mögliche Induktion von Apoptose getestet. Die Messungen wurden mit Hilfe eines FACS-Geräts durchgeführt, wobei Annexin V und 7-AAD bestimmt wurden. Annexin V bindet sich an Phosphatidylserin, welches sich nur bei apoptotischen Zellen an der Außenseite der Membran befindet. Durch den zusätzlichen Zellmarker 7-AAD kann der Assay zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen differenzieren. Beim zeitlichen Verlauf der Apoptose kann zwischen einem frühen und späten Stadium unterschieden werden. Die in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten Ergebnisse der Apoptose umfassen dabei beide Stadien und werden als total apoptotische Population angegeben. Der Versuch erfolgte in Doppelbestimmung und mit drei Wiederholungen.

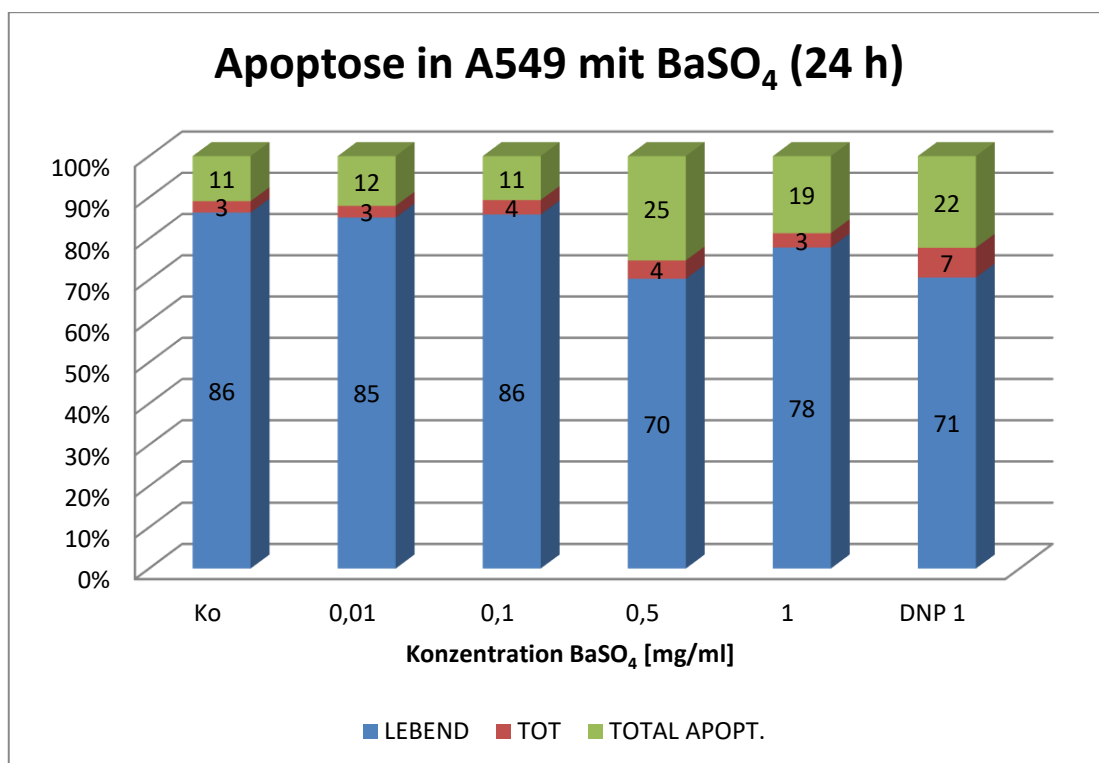


Abbildung 14: Vitale, tote und total apoptotische A549 Zellen 24 h nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen BaSO₄

In Abbildung 14 werden die Zellen in Lebendpopulationen, tote Populationen und in total apoptotische Populationen unterschieden. Bei der Versuchsdurchführung diente die Zugabe von 1 µMol DNP bei zwei Kontroll-Wellen als Positivkontrolle.

Die unbehandelte Kontrolle wies mit 11% bereits eine Zellpopulation mit total apoptotischen Zellen auf. Bei den ersten beiden Konzentrationen von BaSO₄ war kein relevanter Anstieg der apoptotischen Zellen zu erkennen. Die Konzentration von 0,5 mg/ml BaSO₄ wies mit 25% den höchsten Anteil total apoptotischer Zellen in der Versuchsreihe auf, der Effekt war jedoch auch hier nicht statistisch signifikant.

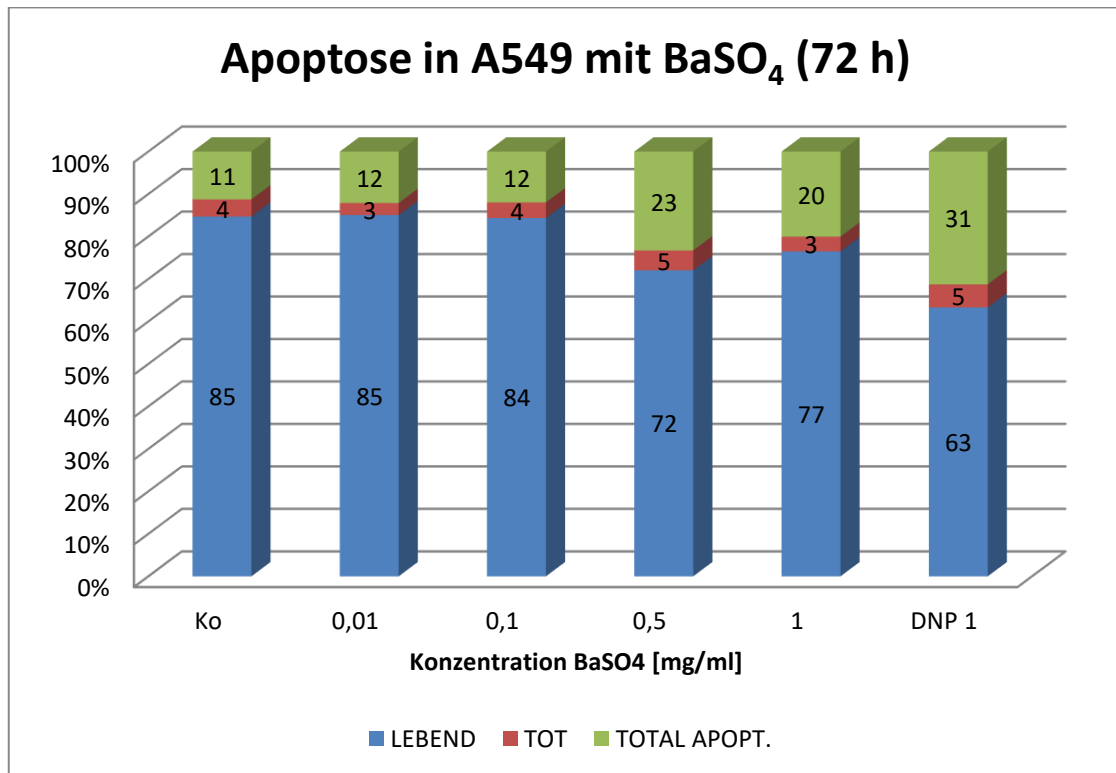


Abbildung 15: Vitale, tote und total apoptotische Zellen 72 h nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen BaSO₄

Abbildung 15 zeigt den 72 h- Versuch nach Zugabe von BaSO₄. Die unbehandelte Kontrolle deutet mit einer total apoptotischen Zellpopulation von 11% auf ein ähnliches Ergebnis im Wertebereich wie beim 24 h- Versuch hin. Der größte Anteil der total apoptotischen Zellpopulation findet sich ebenso wie beim 24 h- Versuch mit 23% bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml. Der Wert sinkt bei der Maximalkonzentration leicht bis auf 20% ab. Keiner der Effekte ist statistisch signifikant. Die Bewertung der Effekte wird jedoch durch die große Streuung der Ergebnisse vor allem bei den Konzentrationen 0,5 und 1 mg/ml und der Positivkontrolle erschwert. Insgesamt lässt sich ein ähnlicher Trend der total apoptotischen Zellpopulationen bei den 24 h- und 72 h- Versuchen erkennen.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wird der Effekt von Bariumsulfat-Nanopartikeln auf humane Lungenzellen an Kulturen untersucht. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus wird der Einfluss auf die Vitalität und die Apoptose analysiert. BaSO₄-Nanopartikel finden heutzutage in vielen Bereichen ihre Anwendung. Unter anderem werden sie als Füllstoffe in der Kunststoff-, der Farben- und Lackindustrie eingesetzt, um die Materialeigenschaften zu verbessern (Petrova et al., 2008; Konduru et al., 2014; Gillani et al., 2010). Aber auch in der Medizin nutzt man BaSO₄ unter anderem als Röntgenkontrastmittel (Konduru et al., 2014), als Zusatz im medizinischen Knochenersatz (Gillani et al., 2010) oder auch in Kathetern (Aninwene et al., 2013). Durch den weit verbreiteten Einsatz der Nanopartikel ist es unumgänglich ihr potentielles Risiko genauer zu untersuchen und abzuschätzen. Die aktuelle Datenlage zum Wirkungsmechanismus der BaSO₄-Nanopartikel ist derzeit noch nicht umfassend genug. Die Lunge stellt einen wichtigen Expositionspfad für BaSO₄-Nanopartikel dar (NanoCare Project Partners, 2006). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit in vitro Versuche mit NHBEZ, sowie mit der Tumorzelllinie A549 durchgeführt. Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten wurden hier zur Bestimmung der Zytotoxizität der Neutralrottest und ein FACS-basierter Test herangezogen.

5.1 Vitalitätstests

5.1.1 Eignung des Neutralrottests

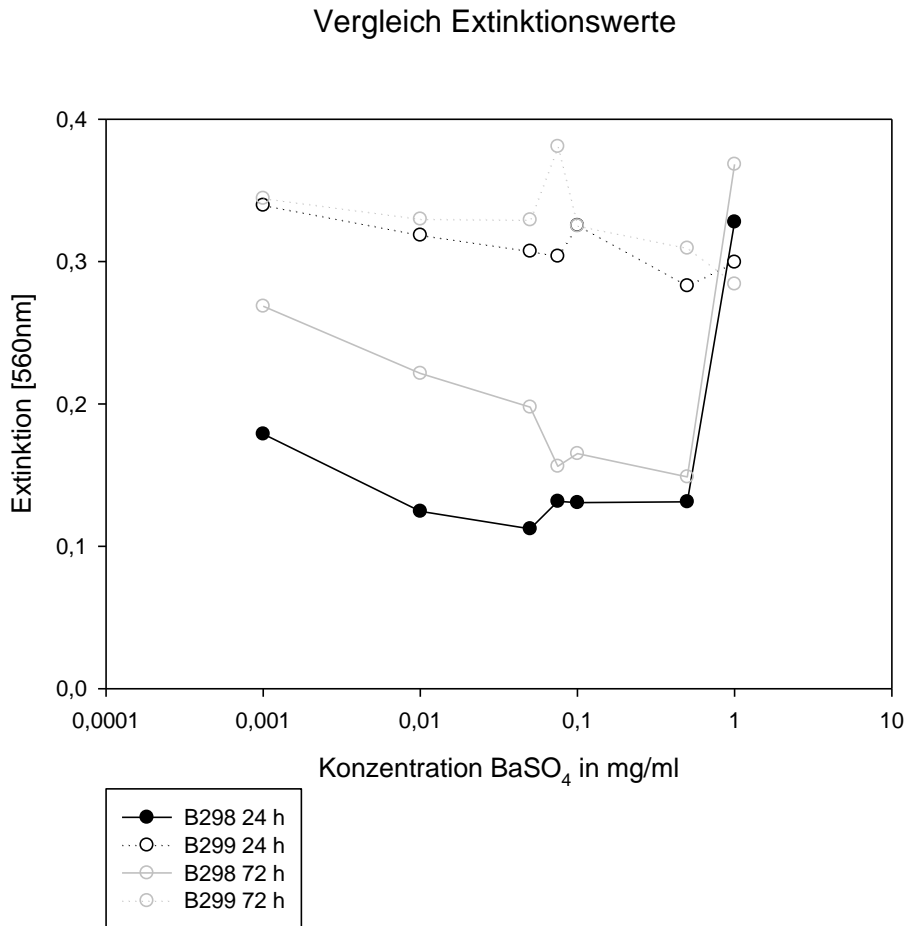


Abbildung 16: Vergleich der Extinktionswerte (560 nm) im Neutralrottest von Bronchialepithelzellen 24 h und 72 h nach Zugabe von BaSO₄

Die Vitalitätsverläufe bei den Zellen B298 zeigen im Neutralrottest zwar bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml eine erkennbare Abnahme, aber steigen bei der höchsten BaSO₄-Konzentration (1 mg/ml) wieder an. Dies würde bedeuten, dass die Nanopartikel bei geringen Konzentrationen zwar toxisch wirken, sich in höheren Konzentrationen aber positiv auf die Vitalität auswirken. Dieser Effekt ist bei B299 allerdings weder beim 24- noch beim 72 h-Versuch zu erkennen. Der Abschlussbericht des NanoEmissions-Projektes zeigt beim Resazurin-Assay an NHBEZ jedoch eine signifikante Abnahme der Vitalität. Die ermittelte Vitalität beim Resazurin-Test betrug nach 24 Stunden bei 1 mg/ml 56% und nach 72 Stunden nur noch 43% (Thomas et al., 2017). Der Resazurin Test ist ebenfalls ein nicht zytotoxischer Vitalitätstest, der im Gegensatz zum Neutralrottest auf der Reduktion von Resazurin über mitochondriale Dehydrogenasen in pink

fluoreszierendes Resorufin basiert. Die Fluoreszenz wird wie beim Neutralrottest mit einem Plattenphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm vermessen (O'Brien et al., 2000). Während beim Resazurin-Assay die mitochondrialen Dehydrogenasen eine wichtige Rolle spielen (O'Brien et al., 2000), ist beim Neutralrottest die Anreicherung des Farbstoffs in den Lysosomen von Bedeutung (Borenfreund und Puerner, 1985). Die wenig plausiblen Anstiege der aus den Rohdaten des Photometers ermittelten Vitalitätswerte und die Diskrepanzen zwischen den Zellen unterschiedlicher Patienten sind auffällig. Um die Herkunft dieser Diskrepanzen und der unerwarteten Anstiege in der Vitalität zu klären, werden im Folgenden zusätzlich die Rohdaten in Form der Extinktionswerte genauer betrachtet. Diese wurden mittels Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 560 nm ermittelt. Auffällig ist dabei zunächst, dass sich die Extinktionswerte der beiden Patienten, auch bei den Kontrollen, deutlich und teilweise sogar signifikant (B298 24 h vs. B299 72 h) unterscheiden (vgl. Abb. 15). Da der Neutralrottest auf der Aufnahme des Neutralrots in den Lysosomen vitaler Zellen basiert (Borenfreund und Puerner, 1985), könnte ein Grund für die Diskrepanz der Kontrollen sein, dass Patient B299 von vorneherein mehr Lysosomen aufweist als Patient B298, was zu einer höheren Akkumulation von Neutralrot in den Zellen und damit zu einer erhöhten Extinktion führt.

Deutliche interindividuelle Diskrepanzen der Patienten konnten auch Glahn et al., 2008 bei Versuchen mit NHBEZ feststellen. Die signifikanten Unterschiede zeigten sich dabei nach Kontakt mit Cadmium, Cobalt und/ oder Blei bei der Zytotoxizität, sowie auf der Ebene der RNA-Expression und der Transkriptionsfaktoren (Glahn et al., 2008).

Die Ergebnisse der peripheren Lungenzellen (PLZ) nach Exposition mit BaSO₄ zeigten nach 72 Stunden einen signifikanten Vitalitätsverlust bei 1 mg/ml. Die Ergebnisse des MTT-Tests im Rahmen des Nanoemissionsprojektes weisen ebenfalls nur nach 72-stündiger Inkubation einen signifikanten Abfall der Vitalität auf. Die Messungen zeigen dabei jedoch schon bei einer geringeren Konzentration von 0,1 mg/ml eine signifikante Reduktion der Vitalität (Thomas et al., 2017). Der MTT-Test ist ein Vitalitätstest, der darauf beruht, dass der gelbe membrangängige MTT-Farbstoff intrazellulär durch mitochondriale Dehydrogenasen zu dem blau-violetten Formazan reduziert wird. Dies geschieht nur bei vitalen Zellen. Das Formazan wird im UV/VIS-Spektrophotometer bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm quantifiziert (Gerlier, 1986). Hingegen wird beim Neutralrottest die Vitalität durch die Aufnahme des Neutralrots in die Lysosomen ermittelt. Die konzentrationsabhängigen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und dem Nanoemissionsprojekt können auf die verschiedenen Testverfahren zurückzuführen sein. Der direkte Vergleich zwischen dem MTT-Test und dem Neutralrottest mit 24 verschiedenen Nanopartikeln bestätigt diesen Verdacht und

konnte ebenfalls aufzeigen, dass der MTT-Test sensitiver war und zudem höhere Toxizitätswerte aufwies, als der Neutralrottest (Lanone et al., 2009).

Die Exposition von Tumorzellen der Zelllinie A549 mit BaSO₄ führte unerwartet zu ähnlichen Ergebnissen, wie bei den Primärzellen. Auch hier sinkt die Vitalität anfänglich bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml ab, steigt aber insbesondere beim 24 h-Test mit weiter steigender Konzentration deutlich an. Dies lässt darauf schließen, dass es sich nicht um ein primärzellspezifisches Problem, sondern um ein technisches Problem in Zusammenhang mit dem Messverfahren handeln muss. Während bei allen Versuchen die Vitalität bei einer geringen Zugabe von BaSO₄ Nanopartikeln sinkt, steigt oder variiert sie stark für höhere Konzentrationen. Dabei liegt der Schluss nahe, dass die Nanopartikel mit steigender Konzentration direkten Einfluss auf die Extinktionsmessung haben. Ein solches Messartefakt ist auch bei der Messung der Vitalität durch den MTT-Test von Bronchialzellen zu beobachten, die mit oxidierten Rußpartikeln oder Dieselpartikeln versetzt wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich hier auch eine erhöhte Vitalität. Die Partikel störten hierbei die Absorptionsmessungen oder reagierten mit Testkomponenten (Holder et al., 2012).

Ein anderer möglicher Ansatzpunkt könnte auch die lysosomale Aufnahme darstellen. Die Funktionalität des Neutralrottests basiert auf der Aufnahme des Neutralrots in den Lysosomen. Nur vitale Zellen können den Farbstoff aufnehmen und fixieren (Borenfreund und Puerner, 1985). In einer 2016 veröffentlichten Studie (Loza et al., 2016) konnte gezeigt werden, dass sich BaSO₄-Nanopartikel nach 24-stündiger Exposition in den Endolysosomen der NR8383 Zellen befanden. In der Literatur wurde bei einer Nanopartikelexposition mit Ferritin von einer erhöhten autophagischen Aktivierung berichtet, die zu einem erhöhten lysosomal vermittelten Abbau von Zellorganellen führt (Neun und Stern, 2011; Zabirnyk et al., 2007) und damit auch in der vorliegenden Arbeit zu einer höheren Aktivität der Lysosomen führen könnten. Aus diesen Gründen könnten die verschiedenen oben genannten Faktoren Einfluss auf das Messverfahren gehabt haben. Almutary und Sanderson 2016 berichten ebenfalls über einen nanopartikelabhängigen Einfluss auf die Messergebnisse unterschiedlicher Zytotoxizitätsassays. Dabei zeigten sich vom Testverfahren abhängige Diskrepanzen zwischen den unterschiedlich getesteten Nanopartikeln beim MTT-Test, sowie dem Kristallvioletttest. Während zum Beispiel bei den Kristallviolett-Messungen die Standardkurven durch Goldnanopartikel signifikant verschoben wurden, beeinflussten sie den MTT-Assay nicht. Beim Kristallviolett-Test handelt es sich um ein spektralphotometrisches Verfahren, das auf der Anfärbbarkeit von Zellen mit dem Farbstoff Kristallviolett beruht (Flick und Gifford, 1984). Einen Anstieg der Vitalität bei

der Durchführung des Neutralrottests nach 24-stündiger Inkubation der alveolaren Typ II Lungenepithel-Zelllinie mit Silikannanopartikeln beobachtete auch Alexander Kümper (Kümper, 2017). Er erklärt sich diesen Anstieg entweder mit einer Entstehung neuer Lysosomen oder mit einer erhöhten lysosomalen Aktivität durch partikelinduzierte Autophagie.

Auch Kroll et al. 2012 untersuchten die mögliche Partikelinterferenz bei verschiedenen Zytotoxizitätstests. Dabei wurden A549 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen 24 unterschiedlicher Nanopartikel beimpft. Beim MTT-Test konnten Partikelinterferenzen schon bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (entspricht in der vorliegenden Arbeit einer Konzentration von $19 \mu\text{g}/\text{ml}$) nachgewiesen werden. Niedrigere Konzentrationen zeigten nach der Anpassung des Assays keine verzerrten Lichtabsorptionen mehr, wenn die Nanopartikel nach 24-stündiger Inkubation bereits vor der Inkubation mit MTT aus dem Zellmonolayer gewaschen wurden.

Es stellt sich die Frage warum der potentielle optische Effekt bei den Primärzellen nicht unbedingt stetig ist. Ein möglicher Grund dafür könnte das Spülverfahren vor der Messung sein. Denn die Anzahl der nach der Spülung verbleibenden Nanopartikel war auch bei gleicher BaSO_4 -Konzentration trotz gleichem Spülprotokoll augenscheinlich nicht konstant.

Obwohl die Zellen vor der Messung aufwendig dreimal gespült wurden, ließen sich auch noch mit bloßem Auge Partikel auf den Zellen erkennen - vor allem bei hohen BaSO_4 -Konzentrationen. Dieser Effekt überlagert sich mit dem Einfluss der Nanopartikel auf die Vitalität und verschleiert somit eine potentielle Toxizität.

Diese Vermutung bestätigt sich durch den Zusatzversuch. Dieser zeigte, dass die Vitalität der Tumorzellen selbst bei Zugabe von erwiesenen toxischem Quecksilber(II) (Glahn et al., 2003) mit zunehmender Konzentration von BaSO_4 Nanopartikeln steigt. Dies deutet darauf hin, dass eine Vitalitätsmessung in mit Bariumsulfat beimpften Zellen mittels des Neutralrottests nicht zuverlässig möglich ist.

5.1.2 FACS-Messungen mit der Tumorzelllinie A549

Aufgrund der zumindest in hohen Testkonzentrationen artifiziell überlagerten Ergebnisse des Neutralrottests wurde die Vitalität mithilfe eines FACS-basierten Tests erneut gemessen. Dabei war sowohl bei den 24 h- als auch bei den 72 h- Versuchen bei steigender Konzentration von BaSO_4 eine Abnahme der Vitalität erkennbar. Eine Signifikanz zeigte sich dabei jedoch jeweils nur bei der Maximalkonzentration von $1 \text{ mg}/\text{ml}$. Trahorsch stellte bei Wolframcarbidnanopartikeln einen ähnlichen Trend fest

(Trahorsch, 2010). Sie führt dies darauf zurück, dass diese Partikel nicht nur toxisch, sondern auch proliferativ wirken können (Ding et al., 2009). Diese Eigenschaft wird BaSO₄ in der aktuellen Literatur noch nicht zugeschrieben, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit sind jedoch die bei den hohen Konzentrationen ungefähr doppelt so hohen Standardabweichungen des 72h-Tests im Vergleich zum 24 h-Test auffallend. Allerdings zeigten Vorversuche im Rahmen des NanoEmissions Projektes keinen Unterschied bei der Aufnahme von BaSO₄-Partikel nach 24 h und 72 h bei Primärzellkulturen (Thomas et al., 2017), weshalb bei den beiden Testreihen in dieser Arbeit grundsätzlich keine großen Unterschiede zu erwarten waren. Die gleichen Studienautoren stellten eine akute Toxizität bei NHBEZ und PLZ konzentrationsabhängig beim Versetzen der Zellen mit BaSO₄ Nanopartikeln mittels MTT und Resazurin Tests fest. Hier wiederum zeigt sich allerdings im Gegensatz zur vorher genannten Studie dennoch ein stärkerer Vitalitätsverlust nach 72- als nach 24-stündiger Inkubation.

Srivastava et al. konnten bei Titandioxid-Nanopartikeln ebenfalls eine Zytotoxizität nachweisen (Srivastava et al., 2013). Dabei wurden A549 Zellen unterschiedliche Konzentrationen der Titandioxidpartikel zugegeben und nach 6 h, nach 24 h und nach 48 h die Zytotoxizität mittels MTT und LDH Tests gemessen. Die Konzentrationen 10 µg/ml, 50 µg/ml sowie 100 µg/ml zeigten sowohl beim MTT als auch beim LDH Test eine signifikante Abnahme der Vitalität nach 24 h und 48 h.

Barillet et al. konnten bei ihrer durchgeführten in-vitro Studie feststellen, dass die Zytotoxizität von Nanopartikeln nicht nur von ihrer chemischen Zusammensetzung abhing, sondern dass die von Nanopartikeln induzierte Zellmortalität zelllinienabhängig war (Barillet et al., 2010). Dabei erkannten sie, dass zum Beispiel Leber- und Lungenzellen gegenüber Kohlenstoffnanoröhren (CNT) sensitiver waren, als renale Zellen. Lanone et al. stellten in ihrer Studie fest, dass A549 Zellen gegenüber unterschiedlichen Nanopartikeln des gleichen Durchmessers bei gleichen Versuchsbedingungen weniger sensitiv als THP-1 Zellen reagieren. Dieser zelllinienabhängige Unterschied konnte auch in dieser Arbeit beim Vergleich zwischen den Primär- und Tumorzellen ermittelt werden und könnte erklären, weshalb im Rahmen des Nanoemissionsprojektes die akute Toxizität schon bei geringeren Konzentrationen von BaSO₄ eine statistische Signifikanz aufwies, als in der vorliegenden Arbeit (Lanone et al., 2009).

Die durch den FACS-Test ermittelte geringe Zytotoxizität von BaSO₄-Nanopartikeln stimmt auch mit den Ergebnissen einer 90-tägigen in-vivo Inhalationsstudie an Ratten mit Ceroxid- und Bariumsulfatnanopartikeln überein. In dieser Studie wurden die

histologischen und inflammatorischen Effekte untersucht. Dabei zeigte sich, dass Bariumsulfat erst nach 90 Tagen sehr geringe entzündliche Zellinfiltrationen verursachte. Auch die BaSO₄-Clearance-Halbwertszeit war deutlich geringer als bei Ceroxidpartikeln. Dennoch konnten im histologischen Nachweis durch BaSO₄ deutlichere Veränderungen in der Nasenschleimhaut der Ratte als durch Ceroxid nachgewiesen werden. Darunter zählten Schleimhauthyperplasien und eosinophile Globuli im olfaktorischen und respiratorischen Epithel nach 28-tägiger Exposition (Schwotzer et al., 2017). Die in dieser Arbeit ermittelte geringe Zytotoxizität von BaSO₄-Nanopartikeln stimmt auch mit einer durchgeführten Studie an der humanen bronchialen Epithelzelllinie NCI-H292 überein. Die Autoren untersuchten in dieser Studie einen Zusammenhang zwischen dem oxidativen Potenzial verschiedener Nanopartikel und deren zellulären Reaktionen. BaSO₄-Nanopartikel zeigten dabei kein intrinsisches oxidatives Potenzial und wiesen auch keine zellulären Reaktionen auf, die durch die Messung der Zytotoxizität und der IL-8 Zytokinproduktion erforscht wurden (Delaval et al., 2017). Auch die Ergebnisse des NanoCare Projektes bestätigen die geringe Toxizität von Bariumsulfatnanopartikeln. Mit Hilfe des Vektor-Modells zeigten die Autoren des Projektes, dass BaSO₄ die geringsten Auswirkungen aller getesteten Nanomaterialien aufweist (NanoCare Project Partners, 2006).

5.2 Apoptose

Es wird über verschiedene Nanopartikel berichtet, dass sie in der Lage sind Apoptose auszulösen (Mittal und Pandey, 2014; Hussain et al., 2012; Bai et al., 2017; Shukla et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob auch Bariumsulfatnanopartikel bei Lungenzellkulturen eine Apoptose induzieren können. Eine mögliche Apoptoseinduktion wurde mittels eines FACS-Geräts gemessen.

Die Ergebnisse zeigten insgesamt zwar sowohl beim 24 h- Versuch, wie auch beim 72 h- Versuch bei höheren BaSO₄-Konzentrationen einen höheren Anteil total apoptotischer Zellpopulationen, ohne allerdings statistische Signifikanz aufzuweisen. Um einen Fehler im Testverfahren auszuschließen, wurde eine Positivkontrolle mit DNP begleitend mitgeführt.

Die fehlende Apoptoseinduktion von BaSO₄-Nanopartikeln konnte auch bei den Apoptosemessungen im Rahmen des NanoEmissions Projektes nachgewiesen werden. Hierbei wurden die Primärzellkulturen NHBEZ und PLZ ebenfalls mit den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von BaSO₄ beimpft. Auch hier konnte nach 24 Stunden und 72 Stunden keine Apoptose festgestellt werden (Thomas et al., 2017).

Bei Titandioxidnanopartikeln konnte hingegen schon nach 24 h und 48 h eine signifikante Apoptoseinduktion bei A549 Zellen gemessen werden. Die Signifikanz zeigte sich bei den Konzentrationen 10 µg/ml und 50 µg/ml nach 48 h (Srivastava et al., 2013). Die Autoren erklären sich diese Induktion mit dem ebenfalls ermittelten ROS-Anstieg, sowie dem signifikanten Anstieg der p53 Genexpression. Beide Faktoren stehen in einem kausalen Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion (Srivastava et al., 2013). Einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg von ROS und einer Apoptoseinduktion in RLE-Zellen konnte auch durch die 8-stündige Inkubation mit ultrafeinem Carbon Black gezeigt werden (Sydlik, 2006). Die Untersuchung zum Einfluss von Silikananopartikeln bei RLE-Zellen konnte keine Apoptose nachweisen. Im Zusammenhang dazu wurde auch die ROS-Entstehung untersucht, die ebenfalls keine statistische Signifikanz zeigte (Kümper, 2017).

Das NanoCare Projekt untersuchte bei zehn verschiedenen Zelllinien (unter anderem auch A549) eine ROS-Bildung nach einstündiger Inkubation mit BaSO₄-Nanopartikeln (verwendete Konzentrationen: 0,01 µg/cm²; 0,1 µg/cm²; 5 µg/cm²; 10 µg/cm²). Dabei konnte kein Effekt festgestellt werden (NanoCare Project Partners, 2006). Die Autoren des Nanoemissionsprojektes kamen bei der Zugabe von BaSO₄ bei NHBEZ und PLZ bis zur Maximalkonzentration von 1 mg/ml ebenfalls zu dem gleichen Schluss, dass keine ROS ausgelöst werden (Thomas et al., 2017). Die fehlende ROS-Induktion der BaSO₄-Partikel in der aktuellen Literatur bekräftigt die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, dass keine Apoptoseinduktion stattfand. In der Literatur wird für verschiedene Nanopartikel eine mögliche Apoptoseinduktion berichtet. BaSO₄-Nanopartikel zeigen in der vorliegenden Arbeit, sowie in der aktuellen Literatur jedoch keine Apoptoseinduktion. Dieser Mechanismus scheint stoffspezifisch zu sein und hängt damit wohl nicht vorrangig nur mit der Größe und der damit erhöhten Oberfläche der Nanopartikel zusammen.

6 Zusammenfassung

Nanopartikel kommen heutzutage in vielen Alltagsprodukten vor. Auch Bariumsulfatnanopartikel finden nicht nur in der Medizin, sondern auch in der Farben- und Lackindustrie eine breite Anwendung. Aufgrund ihrer geringen Größe und ihren reaktiven Eigenschaften ist es jedoch wichtig ihren Einfluss auf den Menschen und die Umwelt genau zu untersuchen, um eine potenzielle Gefahrenlage abzuschätzen.

Da ein möglicher Aufnahmeweg von Nanopartikeln in den Körper vor allem durch Inhalation erfolgt, wurden sowohl normale humane Bronchialepithelzellen, sowie Zellen der Tumorzelllinie A549 mit verschiedenen Konzentrationen von Bariumsulfatnanopartikeln für jeweils 24 und 72 Stunden exponiert. Die Toxizität wurde mittels des Neutralrottests und eines FACS-basierten Zytotoxizitätstest gemessen.

Die Ergebnisse des Neutralrottests zeigten dabei auffällige Anstiege der Vitalität, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, sogar deutlich höher waren. Die Vermutung, dass es sich zunächst um ein primärzellspezifisches Problem handeln könnte, konnte durch die Versuche mit den Tumorzellen nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde ein Zusatzversuch durchgeführt, bei dem die Tumorzellen für 23 Stunden mit 80 mmol Quecksilber (II) und im direkten Anschluss eine Stunde lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bariumsulfatnanopartikeln inkubiert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Nanopartikel den Neutralrottest direkt beeinflussen und sich dieser damit als ungeeignet für die Messung der Zytotoxizität nach dem Exponieren mit BaSO₄-Nanopartikeln herausstellte.

Die Ergebnisse des FACS-basierten Zytotoxizitätstests konnten hingegen eine signifikante Toxizität sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 72 Stunden nach dem Versetzen mit der Maximalkonzentration von 1 mg/ml BaSO₄-Nanopartikeln nachweisen. Eine Apoptoseinduktion durch die Nanopartikel konnte weder dosis- noch zeitabhängig festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln die aktuelle Literatur wider, die ebenfalls von nur einer sehr geringen Toxizität der Bariumsulfatnanopartikel berichtet. Eine Apoptoseinduktion konnte in anderen Studien bisher ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Auch wenn diese Arbeit keine hohe Toxizität für Bariumsulfatnanopartikel aufzeigen konnte, ist die weitere Erforschung zur potenziellen Toxizität von anderen Nanopartikeln notwendig. Bei zukünftigen Arbeiten muss die Eignung gängiger Zytotoxizitätstests genau geprüft werden, um eventuelle direkte Einflüsse der Nanopartikel auf die Messergebnisse zu erkennen und gegebenenfalls neue Testverfahren zu entwickeln oder die Testprotokolle dementsprechend anzupassen.

7 Literaturverzeichnis

Alexander Kümper (2017): Einfluss von kolloidalen Silikananopartikeln auf die EGFRabhängige Signaltransduktion.

Almutary, A.; Sanderson, B. J. S. (2016): The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. In: *International journal of toxicology* 35 (4), S. 454–462. DOI: 10.1177/1091581816648906.

Aninwene, George E.; Stout, David; Yang, Zifan; Webster, Thomas J. (2013): Nano-BaSO₄: a novel antimicrobial additive to pellethane. In: *International journal of nanomedicine* 8, S. 1197–1205. DOI: 10.2147/IJN.S40300.

Bai, Ding-Ping; Zhang, Xi-Feng; Zhang, Guo-Liang; Huang, Yi-Fan; Gurunathan, Sangiliyandi (2017): Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. In: *International journal of nanomedicine* 12, S. 6521–6535. DOI: 10.2147/IJN.S140071.

Balasubramanian, Kannan; Burghard, Marko (2011): Chemie des Graphens. In: *Chemie in unserer Zeit* 45 (4), S. 240–249. DOI: 10.1002/ciuz.201100550.

Barillet, Sabrina; Simon-Deckers, Angélique; Herlin-Boime, Nathalie; Mayne-L’Hermite, Martine; Reynaud, Cécile; Cassio, Doris et al. (2010): Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types. An in vitro study. In: *J Nanopart Res* 12 (1), S. 61–73. DOI: 10.1007/s11051-009-9694-y.

Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH), geändert mit 2015/830/EU: Bariumchlorid ROTI®METIC 99,999 % (5N), wasserfrei.

Baroli, Biancamaria; Ennas, Maria Grazia; Loffredo, Felice; Isola, Michela; Pinna, Raimondo; López-Quintela, M. Arturo (2007): Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (7), S. 1701–1712. DOI: 10.1038/sj.jid.5700733.

Borenfreund, E.; Babich, H.; Martin-Alguacil, N. (1988): Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2 (1), S. 1–6.

Borenfreund, E.; Puerner, J. A. (1985): Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. In: *Toxicology letters* 24 (2-3), S. 119–124.

- Borm, Paul J. A.; Robbins, David; Haubold, Stephan; Kuhlbusch, Thomas; Fissan, Heinz; Donaldson, Ken et al. (2006): The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. In: *Particle and fibre toxicology* 3, S. 11. DOI: 10.1186/1743-8977-3-11.
- Chen, X.; Schluesener, H. J. (2008): Nanosilver: a nanoparticle in medical application. In: *Toxicology letters* 176 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004.
- Curl, Robert F. (1997): Anbruch der Fullerenchemie. Hypothese und Experiment (Nobel-Vortrag). In: *Angew. Chem.* 109 (15), S. 1636–1647. DOI: 10.1002/ange.19971091504.
- Darzynkiewicz, Z.; Juan, G.; Li, X.; Gorczyca, W.; Murakami, T.; Traganos, F. (1997): Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). In: *Cytometry* 27 (1), S. 1–20.
- Delaval, Mathilde; Wohlleben, Wendel; Landsiedel, Robert; Baeza-Squiban, Armelle; Boland, Sonja (2017): Assessment of the oxidative potential of nanoparticles by the cytochrome c assay: assay improvement and development of a high-throughput method to predict the toxicity of nanoparticles. In: *Archives of Toxicology* 91 (1), S. 163–177. DOI: 10.1007/s00204-016-1701-3.
- Ding, M.; Kisin, E. R.; Zhao, J.; Bowman, L.; Lu, Y.; Jiang, B. et al. (2009): Size-dependent effects of tungsten carbide-cobalt particles on oxygen radical production and activation of cell signaling pathways in murine epidermal cells. In: *Toxicology and applied pharmacology* 241 (3), S. 260–268. DOI: 10.1016/j.taap.2009.09.004.
- Dr. Kathrin Schwirn; Dr. Doris Völker (2016): Nanomaterialien in der Umwelt.
- Elmore, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- Flick, D. A.; Gifford, G. E. (1984): Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. In: *Journal of immunological methods* 68 (1-2), S. 167–175.
- Gamer, A. O.; Leibold, E.; van Ravenzwaay, B. (2006): The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 20 (3), S. 301–307. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.08.008.
- Gazsó, André; Haslinger, Julia (Hg.) (2014): Nano Risiko Governance. Vienna: Springer Vienna.
- Gebel, Thomas; Foth, Heidi; Damm, Georg; Freyberger, Alexius; Kramer, Peter-Jürgen; Lilienblum, Werner et al. (2014): Manufactured nanomaterials: categorization and

approaches to hazard assessment. In: *Archives of Toxicology* 88 (12), S. 2191–2211. DOI: 10.1007/s00204-014-1383-7.

Gerlier D, Thomasset N. (1986): Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. In: *J Immun Methods*. 94: 57-63.

Gillani, Riaz; Ercan, Batur; Qiao, Alex; Webster, Thomas J. (2010): Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives. In: *International journal of nanomedicine* 5, S. 1–11.

Glahn, Felix; Schmidt-Heck, Wolfgang; Zellmer, Sebastian; Guthke, Reinhard; Wiese, Jan; Golka, Klaus et al. (2008): Cadmium, cobalt and lead cause stress response, cell cycle deregulation and increased steroid as well as xenobiotic metabolism in primary normal human bronchial epithelial cells which is coordinated by at least nine transcription factors. In: *Archives of Toxicology* 82 (8), S. 513–524. DOI: 10.1007/s00204-008-0331-9.

Hartwig, A., MAK-Kommission (2017): Bariumsulfat (alveolengängige Fraktion) [MAK Value Documentation in German language, 2017]. In: *The MAK Collection for Occupational Health and Safety*.

Holder, Amara L.; Goth-Goldstein, Regine; Lucas, Donald; Koshland, Catherine P. (2012): Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. In: *Chemical research in toxicology* 25 (9), S. 1885–1892. DOI: 10.1021/tx3001708.

Hubert Rauscher, Gert Roebben, Ana Boix Sanfeliu, Hendrik Emons, Neil Gibson, Robert Koeber, Thomas Linsinger, Kirsten Rasmussen, Juan Riego Sintes, Birgit Sokull-Klüttgen, Hermann Stamm (2015): Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term “nanomaterial”. Scientific-technical evaluation of options to clarify the definition and to facilitate its implementation.

Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection (1994). In: *Annals of the ICRP* 24 (1-3), S. 1–482.

Hussain, Salik; Al-Nsour, Faris; Rice, Annette B.; Marshburn, Jamie; Yingling, Brenda; Ji, Zhaoxia et al. (2012): Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes. In: *ACS nano* 6 (7), S. 5820–5829. DOI: 10.1021/nn302235u.

Janez POTOČNIK, Europäische Kommission (2011): EMPFEHLUNG DER KOMMISSION vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien. In: (2011a) *Amtsblatt der EU*, 2011/696/EU, L 275/38, S 3.

Joachim Rassow, Karin Hauser, Roland Netzker, Rainer Deutzmann (2012): Biochemie. 3. Aufl.: Thieme.

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *British journal of cancer* 26 (4), S. 239–257.

Koeneman, Brian A.; Zhang, Yang; Westerhoff, Paul; Chen, Yongsheng; Crittenden, John C.; Capco, David G. (2010): Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. In: *Cell biology and toxicology* 26 (3), S. 225–238. DOI: 10.1007/s10565-009-9132-z.

Konduru, Nagarjun; Keller, Jana; Ma-Hock, Lan; Gröters, Sibylle; Landsiedel, Robert; Donaghey, Thomas C. et al. (2014): Biokinetics and effects of barium sulfate nanoparticles. In: *Particle and fibre toxicology* 11, S. 55. DOI: 10.1186/s12989-014-0055-3.

Kreuter, Jörg; Gelperina, Svetlana (2008): Use of nanoparticles for cerebral cancer. In: *Tumori* 94 (2), S. 271–277.

Kroll, Alexandra; Pillukat, Mike Hendrik; Hahn, Daniela; Schnekenburger, Jürgen (2012): Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. In: *Archives of Toxicology* 86 (7), S. 1123–1136. DOI: 10.1007/s00204-012-0837-z.

Landsiedel, Robert; Ma-Hock, Lan; Hofmann, Thomas; Wiemann, Martin; Strauss, Volker; Treumann, Silke et al. (2014): Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. In: *Particle and fibre toxicology* 11, S. 16. DOI: 10.1186/1743-8977-11-16.

Lanone, Sophie; Rogerieux, Françoise; Geys, Jorina; Dupont, Aurélie; Maillot-Marechal, Emmanuelle; Boczkowski, Jorge et al. (2009): Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. In: *Particle and fibre toxicology* 6, S. 14. DOI: 10.1186/1743-8977-6-14.

Lieber, M.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W.; Todaro, G. (1976): A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. In: *International journal of cancer* 17 (1), S. 62–70.

Loza, Kateryna; Föhring, Isabell; Bünger, Jürgen; Westphal, Götz A.; Köller, Manfred; Epple, Matthias; Sengstock, Christina (2016): Barium sulfate micro- and nanoparticles as bioinert reference material in particle toxicology. In: *Nanotoxicology* 10 (10), S. 1492–1502. DOI: 10.1080/17435390.2016.1235740.

- Lüllmann-Rauch, R. (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 3. Aufl.: Thieme.
- Ma, Dan-Dan; Yang, Wan-Xi (2016): Engineered nanoparticles induce cell apoptosis: potential for cancer therapy. In: *Oncotarget* 7 (26), S. 40882–40903. DOI: 10.18632/oncotarget.8553.
- Marc Felix Johannes Glahn (2009): MRP-Transporter in humanen Lungenzellen – Bedeutung für Risiken durch toxische Metalle.
- Mittal, Sandeep; Pandey, Alok K. (2014): Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. In: *BioMed research international* 2014, S. 891934. DOI: 10.1155/2014/891934.
- Nakamura, Ayami; Wanibe, Harumasa; Iwama, Akihiro; Kitamura, Naritaka; Shibata, Naoki; Nakata, Kazuhiko et al. (2007): Mechanical Properties of Newly Developed Root Canal Sealers Containing Titanium Oxide. In: *KEM* 361-363, S. 845–848. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.361-363.845.
- NanoCare Project Partners (2006): NanoCare Health related Aspects of Nanomaterials Final Scientific Report.
- Nanoscience and nanotechnologies. Opportunities and uncertainties (2004). London: The Royal Society; Royal Academy of Engineering (RS policy document, 19/04).
- Neun, Barry W.; Stern, Stephan T. (2011): Monitoring lysosomal activity in nanoparticle-treated cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 697, S. 207–212. DOI: 10.1007/978-1-60327-198-1_22.
- O’Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F ((2000)): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In: *Eur J Biochem* 267, 5421-5426.
- Oberdörster, G. (2010): Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. In: *Journal of internal medicine* 267 (1), S. 89–105. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x.
- Oberdörster, Günter; Oberdörster, Eva; Oberdörster, Jan (2005): Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. In: *Environmental health perspectives* 113 (7), S. 823–839.
- Petrova, A.; Hintz, W.; Tomas, J. (2008): Untersuchungen zur Herstellung von nanoskaligem Bariumsulfat. In: *Chemie Ingenieur Technik* 80 (3), S. 359–363. DOI: 10.1002/cite.200700092.

Pott, F., & Roller, M. (2003): Untersuchungen zur Kanzerogenität granulärer Stäube an Ratten– Ergebnisse und Interpretationen. Kurzbericht über das Projekt F1843 der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.

Renate Lüllmann-Rauch (2009): Histologie. 3. Aufl.: Thieme.

Runge, Dorothee; Stock, Thomas; Lehmann, Thomas; Taege, Christiane; Bernauer, Ulrike; Beer Stolz, Donna et al. (2001): Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. In: *Archives of Toxicology* 75 (6), S. 335–345. DOI: 10.1007/s002040100248.

Sadrieh, Nakissa; Wokovich, Anna M.; Gopee, Neera V.; Zheng, Jiwen; Haines, Diana; Parmiter, David et al. (2010): Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 115 (1), S. 156–166. DOI: 10.1093/toxsci/kfq041.

Sarah Thomas, Berit Schumann, Dr. F. Glahn, Prof. Dr. H. Foth (Hg.) (2017): NanoEmission - Untersuchung des Emissionsverhaltens von Nanopartikeln bei der Abfallverbrennung, Schlussbericht Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Umwelttoxikologie. Institut für Umwelttoxikologie, Medizinische Fakultät Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Saraiva, Cláudia; Praça, Catarina; Ferreira, Raquel; Santos, Tiago; Ferreira, Lino; Bernardino, Liliana (2016): Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 235, S. 34–47. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.044.

Schwotzer, Daniela; Ernst, Heinrich; Schaudien, Dirk; Kock, Heiko; Pohlmann, Gerhard; Dasenbrock, Clemens; Creutzenberg, Otto (2017): Effects from a 90-day inhalation toxicity study with cerium oxide and barium sulfate nanoparticles in rats. In: *Particle and fibre toxicology* 14 (1), S. 23. DOI: 10.1186/s12989-017-0204-6.

Shukla, Ritesh K.; Kumar, Ashutosh; Gurbani, Deepak; Pandey, Alok K.; Singh, Shashi; Dhawan, Alok (2013): TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. In: *Nanotoxicology* 7 (1), S. 48–60. DOI: 10.3109/17435390.2011.629747.

Smijs, Threes G.; Pavel, Stanislav (2011): Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. In: *Nanotechnology, science and applications* 4, S. 95–112. DOI: 10.2147/NSA.S19419.

Srivastava, R. K.; Rahman, Q.; Kashyap, M. P.; Singh, A. K.; Jain, G.; Jahan, S. et al. (2013): Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. In: *Human & experimental toxicology* 32 (2), S. 153–166. DOI: 10.1177/0960327112462725.

SRU-Sachverständigenrat für Umweltfragen (Hg.) (2011): Vorsorgestrategien für Nanomaterialien Sondergutachten: Erich Schmidt Verlag.

Tyagi, Sanjeev; Tyagi, Parimala; Mishra, Priyesh (2013): Evolution of root canal sealers. An insight story. In: *Eur J Gen Dent* 2 (3), S. 199. DOI: 10.4103/2278-9626.115976.

Ulrich Sydlik (2006): Analyse der molekularen Mechanismen pathogener Effekte von ultrafeinen Partikeln: Induktion von Apoptose und Proliferation.

Ulrike Trahorsch (2010): In vitro Untersuchungen zur toxikologischen und immunmodulatorischen Wirkung nanoskaliger Wolframcarbidpartikel.

Umweltbundesamt- Dr. Wolfgang Dubbert, Dr. Kathrin Schwirn, Dr. Doris Völker, Petra Apel (2014): Datenblatt Einsatz von Nanomaterialien in Beschichtungen.

Wiley-VCH (Hg.) (2017): The MAK Collection for Occupational Health and Safety. 2 Bände (1).

Wolfgang G. Kreyling, Alexander Wenk, Manuela Semmler-Behnke (2010): Quantitative Biokinetik-Analyse radioaktiv markierter inhalierter Titandioxid Nanopartikel in einem Rattenmodell (Schriftenreihe Umwelt und Gesundheit).

Zabirnyk, Olga; Yezhelyev, Maksym; Seleverstov, Oleksandr (2007): Nanoparticles as a novel class of autophagy activators. In: *Autophagy* 3 (3), S. 278–281.

8 Thesen

1. Der Neutralrottest stellt sich als ungeeignet zur Bestimmung der Zytotoxizität von Bariumsulfatnanopartikeln dar
2. Signifikante Toxizität bei A549 Zellen nach 24-stündiger und nach 72-stündiger Inkubation mit Bariumsulfatnanopartikeln bei der Maximalkonzentration von 1 mg/ml
3. Keine dosis- oder zeitabhängige Apoptoseinduktion durch BaSO₄-Nanopartikel bei A549 Zellen

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel: „Wirkung von Bariumsulfatnanopartikeln auf humane Lungenzellen in Kultur“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit ist bisher weder im In - noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt worden.

Aichtal, den 07.04.2019

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich Silvia Körner, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe, und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

Aichtal, den 07.04.2019

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Körner, Silvia
Geburtsdatum- / Ort: 06.07.1991/ Ostfildern
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulische Ausbildung

1997–2001 Besuch der Grundschule Aichtal
2001–2010 Besuch des naturwissenschaftlichen Gymnasiums
Neckartenzlingen

Hochschul-Ausbildung

10/2010-11/2016: Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-
Universität Halle- Wittenberg

Berufliche Laufbahn

04/2017: Zahnärztin in der Praxis Dr. Landenberger/
Wernau
seit 01/2019: Zahnärztin in der Praxis Dr. Dr. Henßler, Dr. Laval/
Nürtingen

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Foth für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Umwelttoxikologie durchzuführen und ihre Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei Dr. Felix Glahn für seine konstruktive und wohlwollende Unterstützung, seinen wissenschaftlichen Rat und seine Motivation bedanken.

Allgemein danke ich dem gesamten Team der Umwelttoxikologie für die Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung im Umgang mit den Zellkulturen. Dabei möchte ich mich bei Frau Herrmann, Frau Röder, Frau Schumann, Frau Thomas und Herrn Wiese für die freundliche Unterstützung bedanken.

Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie für ihre grenzenlose Stärkung und Motivierung bedanken.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, meinem Bruder Stephan und insbesondere Marco für ihre Geduld und ihre liebevolle Unterstützung.