

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Toxikologische Bewertung von  
Bariumsulfat-Nanopartikeln und Filterstäuben**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.) für das Fachgebiet  
Umwelttoxikologie

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

von Sarah Thomas

geboren am 14. März 1985 in Halle (Saale)

Betreuerin: Frau Prof. Dr. Heidi Foth

Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Wätjen  
Herr Prof. Dr. T. Gebel, Dortmund

03.11.2020  
19.05.2021

## Referat

In der vorliegenden Arbeit werden die toxikologische Wirkung von thermisch unbehandelten und behandelten nanoskaligen Bariumsulfat sowie die Wirkung von verschiedenen Filterstäuben aus Verbrennungsprozessen auf humane Lungenzellen untersucht. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf einer möglicherweise veränderten Toxizität aufgrund des Durchlaufens einer thermischen Behandlung. Dieses Risiko erfordert einen erhöhten Forschungsaufwand, da der Großteil der Nanopartikel am Ende ihres Lebenszyklus den Prozess der Entsorgung mittels Verbrennung erreicht und eine Freisetzung in die Umwelt nicht auszuschließen ist. Aus diesem Grund wird das toxikologische Potential von thermisch unbehandeltem BaSO<sub>4</sub> mit geglühtem BaSO<sub>4</sub> und Filteraschen mit/ohne BaSO<sub>4</sub>-Zusatz aus Technikums- und Großverbrennungsanlagen verglichen. Der Effekt auf die metabolische Aktivität der humanen Lungenzellen wird mittels des Resazurin-Tests und die mögliche Schädigung der Zellmembran und damit eine Veränderung ihrer Integrität mit dem LDH-Test ermittelt. Zudem wird der Effekt auf den zellulären Glutathion-Gehalt mittels HPLC und die Induktion von Apoptose mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Ein möglicher Effekt auf inflammatorische Zytokine, die als Marker einer Entzündungsreaktion gelten, erfolgt über einen ELISA-Test. Es werden dabei 13 verschiedene Zytokine betrachtet. Die Charakterisierung der Partikelsuspensionen erfolgt mittels dynamischer Lichtstreuung. Die Freisetzung von Barium-Ionen und die Aufnahme der NP in die Zellen wird mittels ICP-MS bestimmt. Das unverbrannte BaSO<sub>4</sub> wird von Primärzellen aufgenommen und zeigt bei den Untersuchungen zytotoxisches Potential mit einem Verlust vitaler Zellen von 60 % und mehr. Eine Absenkung des GSH-Gehalts kann bei längeren Inkubationszeiten (72 h) ebenfalls beobachtet werden. Eine signifikante Beeinflussung der LDH-Aktivität, der Induktion von Apoptose oder der Induktion inflammatorischer Zytokine wurde nicht nachgewiesen. Eine rein thermische Behandlung des BaSO<sub>4</sub> ohne Verbrennungsvorgang bewirkte keine Veränderung des toxikologischen Profils. Die Untersuchungen mit unterschiedlichen Filteraschen zeigen toxikologische Unterschiede, die aber auf die grundsätzlichen Unterschiede in der Zusammensetzung und nicht aus den enthaltenen nanoskaligen BaSO<sub>4</sub> resultieren. Dem Effekt von Begleitelementen wie bspw. Schwermetallen scheint eine entscheidende Rolle beizuwohnen. Dies bestätigen auch die Versuche mit Filteraschen unterschiedlichster Herkunft, wie Schweißrauch, Asche aus der Molybdänoxid-Industrie, Perlitstaub oder Flugasche aus einer Verbrennungsanlage. Zwischen diesen Materialien zeigen sich deutliche Wirkunterschiede hinsichtlich ihres toxikologischen Potentials an der Zelllinie A549. Diskutiert werden zudem Effekte des BaSO<sub>4</sub> auf ökotoxikologische Modellorganismen wie Leuchtbakterien, Algen und Daphnien. Diese Organismen zeigen ebenso wie humane Zellen toxikologische Effekte bei einer Behandlung mit nanoskaligem BaSO<sub>4</sub>. Die dazugehörigen Ergebnisse sind dem BMBF geförderten Projekt ‚NanoEmission‘ zu entnehmen.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Referat</b> .....	
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Nanopartikel und Nanomaterialien .....	1
1.2 Nanopartikel und die Lunge.....	1
1.3 Nanopartikel und Verbrennung.....	3
1.4 Nano-Toxikologie und Endpunkte .....	5
1.5 Bariumsulfat.....	7
1.6 Exposition, Lebenszyklus und Ökotoxikologie .....	7
<b>2 Zielstellung</b> .....	<b>10</b>
<b>3 Material und Methodik</b> .....	<b>11</b>
3.1 Zellkultur .....	11
3.1.1 Kultivierung von humanen Primärzellen .....	11
3.1.2 Passagieren der Primärzellen .....	12
3.1.3 Kultivierung und Passagieren der Tumorzelllinie A549 .....	13
3.2 Sterilisation von Material und Lösungen .....	13
3.3 Testung auf Endotoxine .....	13
3.4 Nanoskaliges Bariumsulfat .....	14
3.5 Mikroskaliges Bariumsulfat.....	14
3.6 Filterstäube aus dem Technikum .....	14
3.7 Filterstäube aus dem Großversuch der Müllverbrennungsanlage (MVA) .....	15
3.8 Geglühtes BaSO <sub>4</sub> .....	16
3.9 Ascheproben aus verschiedenen Verbrennungen.....	16
3.10 Suspensionsherstellung .....	16
3.11 Suspensionscharakterisierung .....	17
3.12 Vitalitätstest .....	18
3.12.1 Resazurin-Test.....	18
3.12.2 MTT-Test .....	18

3.12.3	Laktatdehydrogenase-Test .....	19
3.13	BaSO <sub>4</sub> -Aufnahme in die Zellen .....	19
3.14	Bestimmung der Freisetzung von Ba <sup>2+</sup> -Ionen .....	20
3.15	Inflammatorische Zytokine .....	20
3.16	Glutathionbestimmung.....	21
3.17	Proteinbestimmung .....	21
3.18	Apoptosebestimmung .....	22
3.19	Statistik .....	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
4.1	Charakterisierung des BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube .....	24
4.1.1	BaSO <sub>4</sub> .....	24
4.1.2	Charakterisierung der Suspensionen .....	25
4.1.3	Filterstäube aus dem Technikum.....	25
4.1.4	Filterstäube aus dem Großversuch .....	26
4.1.5	Ascheproben aus verschiedenen thermischen Prozessen .....	27
4.2	Wirkung von nanoskaligem, unverbranntem BaSO <sub>4</sub> .....	27
4.2.1	Vitalität von Primärzellen .....	27
4.2.2	Glutathiongehalt von Primärzellen.....	31
4.2.3	Apoptose von Primärzellen .....	32
4.2.4	BaSO <sub>4</sub> -Aufnahme.....	33
4.2.5	Freisetzung von Ba <sup>2+</sup> -Ionen.....	35
4.3	Vergleich des unverbrannten nano-BaSO <sub>4</sub> mit geblühtem nano-BaSO <sub>4</sub> .....	36
4.3.1	Vitalität von Primärzellen .....	36
4.3.2	Glutathiongehalt von Primärzellen.....	37
4.3.3	Inflammatorische Zytokine .....	38
4.4	Wirkung der Stäube aus dem Technikum .....	40
4.4.1	Vitalität von Primärzellen .....	41
4.4.2	Glutathiongehalt von Primärzellen.....	42
4.4.3	Apoptose von Primärzellen .....	43
4.4.4	Inflammatorische Zytokine von Primärzellen.....	44

4.5	Wirkung der Stäube aus dem Großversuch.....	45
4.5.1	Vitalität von Primärzellen .....	45
4.5.2	Glutathiongehalt von Primärzellen.....	47
4.5.3	Apoptose von Primärzellen .....	48
4.5.4	Inflammatorische Zytokine von Primärzellen.....	48
4.6	Wirkung von vier verschiedenen Stäuben auf A549-Tumorzellen.....	49
4.6.1	Vitalität von Tumorzellen .....	50
4.6.2	Glutathiongehalt von Tumorzellen.....	50
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
	<b>Thesen .....</b>	<b>77</b>
	<b>Anlagen (Abbildungs- und Tabellenverzeichnis) .....</b>	<b>78</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>VII</b>
	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche .....</b>	<b>VIII</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>IX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A549	humane Lungentumorzelllinie
AECG	<i>Airway Epithelium Cell Growth Medium</i>
ALF	<i>alveolar lining fluid</i>
ALI	<i>air liquid interface</i> (Luft-Flüssig-Grenze)
ALP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BaSO <sub>4</sub>	Bariumsulfat
Ba/ Ba <sup>2+</sup>	Barium/ Bariumionen (zweiwertig)
BAL	<i>bronchoalveolar lavage</i>
BAT	biologischer Arbeitsplatz-Toleranzwert
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BEAS-2B	Zelllinie humaner Bronchialepithelzellen
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovin serum albumin</i> )
°C	Grad Celsius
CeO <sub>2</sub>	Cerdioxid
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
CO/ CO <sub>2</sub>	Kohlenmonoxid/ Kohlendioxid
Cu <sup>+</sup> /Cu <sup>2+</sup>	ein- /zweiwertiges Kupfer
d	Durchmesser
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNEL	<i>derived no effect level</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure/Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
ENP	technische/ <i>engineered</i> Nanopartikel; anthropogener Ursprung
FBS/ FCS	Fetales Kälberserum
Gew	Gewicht
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GHS	global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion (Glutathiondisulfid)
h	Stunde

H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatografie
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin
k.A.	keine Angabe(n)
kDa	Kilodalton
kGy	Kilogray
l	Liter
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis
M	Molar
MAK	maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MAPK	<i>Mitogen-activated protein-Kinase</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
mBrB	Monobrombiman
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
ML	Mittellappen
MLU	Martin-Luther-Universität
MVA	Müllverbrennungsanlage
MTT	Tetrazoliumsalz [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid]
N	Normal
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid-Lösung
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NfκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NG	Nachweisgrenze
NHBEZ	normale humane Bronchialepithelzellen
NM	Nanomaterial
NP	Nanopartikel
NR	Nichtraucher
NR8383	Zelllinie alveolarer Makrophagen der Ratte

Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom ( <i>Non Small Cell Lung Cancer</i> )
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OL	Oberlappen
pBALF	<i>pig bronchoalveolar lavage fluid</i>
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PLZ	periphere Lungenzellen
PM	<i>particulate matter</i>
PSP	<i>poorly soluble particles</i>
PY	Packungsjahr (entspricht 1 Packung Zigaretten pro Tag in 1 Jahr)
REM/EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SP-A	<i>Surfactant protein A</i>
Stad.	Stadium
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TG	Trockengewicht
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNS	<i>Trypsin-Neutralizing Solution</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UL	Unterblassen
Wdh.	Wiederholung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Vgl.	Vergleich
♂	männlich
♀	weiblich



# 1 Einleitung

## 1.1 Nanopartikel und Nanomaterialien

Gemäß der Definition der europäischen Kommission von 2011 handelt es sich bei Nanomaterialien (NM) um „*ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben*“ (Kommission, 2011). Nanomaterialien haben in den letzten Jahren in immer mehr Technik- und Lebensbereichen, wie Elektronik, Farben, Textilien, Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen, Landwirtschaft und Medizin, Verwendung gefunden. Im gesamten Lebenszyklus, beginnend bei der Herstellung, der Verwendung bis zur Entsorgung, dieser Materialien sind Emissionen, Immissionen und somit auch Expositionen des Menschen und der Umwelt gegenüber Nanomaterialien und damit nanoskaliger Partikel denkbar. „*Es wird befürchtet, dass synthetisch hergestellte Nanomaterialien für den Menschen nach inhalativer Aufnahme gesundheitsschädlich sein können, zumal sich feine und ultrafeine Partikel aus anthropogenen Verbrennungsprozessen bereits als bedeutsames Gesundheitsrisiko herausgestellt haben*“ (LANUV, 2009). Zudem ist zu erwarten, dass Nanopartikel (NP) in der Umwelt eine hohe Verweildauer besitzen und sich ubiquitär verteilen. Größe, Geometrie, Kristallstruktur und Oberflächeneigenschaften (z.B. Ladung, Oberflächenchemie) bestimmen dabei die potentiell toxikologischen Eigenschaften der NP (Umweltbundesamt, 2016). Bei der Verwendung von NP in Farben oder Beschichtungen kann es laut Experten jedoch nur zu einer Freisetzung von freien NP kommen, wenn sich das Matrixmaterial durch chemische oder thermische Prozesse abbaut (Göhler et al., 2013). Mechanische Behandlung, wie Abrieb oder der Alterungsprozess NP-haltigen Materials allein, zeigte keine Freisetzung von isolierten NP (Hsu und Chein, 2007).

Meist werden toxikologische Untersuchungen von nanoskaligen Partikeln auf Mensch und Umwelt als Einzelbetrachtung durchgeführt, da die Beurteilung sehr komplex ist. Die Eigenschaften der Nanomaterialien können nicht aus denen des Bulk-Materials abgeleitet werden. „*Nanopartikel zeigen eine höhere und einzigartige Toxizität im Vergleich zu ihrem korrespondierenden Bulk-Material*“ (Libralato et al., 2017). Umso bedeutender scheint die Erforschung möglicher Risiken und Chancen, die Nanomaterialien besitzen, zu sein. Ergeben sich aus der Kleinheit der Partikel neben den veränderten technologischen Eigenschaften auch andere biologische Wirkpotentiale? Um dies zu klären und um potentielle toxikologische Gefahren zu ermittelt bzw. auszuschließen, beschäftigen sich weltweit diverse Forschungsarbeiten mit dem Gebiet der Nanotechnologie.

## 1.2 Nanopartikel und die Lunge

Die Aufnahme von Nanopartikeln in einen Organismus kann theoretisch oral, dermal und/oder inhalativ erfolgen. Bei einer Fläche von 120 – 140 m<sup>2</sup> und einem täglichen Atemvolumen von

10.000 – 15.000 Litern Luft stellt die inhalative Aufnahme über die Lunge jedoch den Hauptaufnahmepfad für luftgetragene Partikel beim Menschen dar (DANA\_Lunge2018). Auch für andere Säuger, wie Ratten oder Mäuse, ist „*Inhalation immer noch die Hauptaufnahme-Route für Partikel*“ (Schwotzer et al., 2017). Sie hat damit die größte Bedeutung für entsprechende toxikologische Untersuchungen. In der Realität sind Organismen zumeist jedoch keinem einzelnen Nanopartikel gegenüber allein exponiert, sondern einem Gemisch verschiedenster Partikel, Aggregate und Agglomerate mit unterschiedlichen Größen, Formen und Oberflächeneigenschaften (Landsiedel et al., 2017). Die allgemeinen Eigenschaften der Partikel bedingen hierbei die Lokalisation im respiratorischen System. So unterscheidet der Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS) in seinen Technischen Regeln für Gefahrstoffe (TRGS) zwischen dem einatembaren Anteil – messtechnisch als einatembare Fraktion erfasst – dem E-Staub und dem alveolengängigen Anteil des einatembaren Anteils – messtechnisch als alveolengängige Fraktion erfasst – dem A-Staub. Staub ist gemäß der TRGS „*eine disperse Verteilung fester Stoffe in Luft, entstanden durch mechanische Prozesse oder durch Aufwirbelung.*“ (TRGS, 2006).

Die alveolengängige Fraktion enthält die Partikel ( $PM < 2,5 \mu m$ ). Diese erreichen die Gasaustauschregion der Lungenbläschen und sind potentiell in der Lage die Zellschranke zu überwinden und den Blutstrom zu erreichen (DANA\_Lunge2018). Je kleiner die Partikel werden ( $< 1 \mu m$ ), desto größer wird deren Bedeutung bezüglich ihrer Alveolengängigkeit.

Die menschliche Lunge ist mit dem *alveolar lining fluid* (ALF) ausgekleidet, welches die erste biologische Barriere für inhalierte Partikel darstellt. Dass das im ALF enthaltene Protein Surfactant protein A (SP-A) mit Nanopartikeln interagieren und damit die Eigenschaften der Partikel beeinflussen kann, wurde bereits in einer Studie gezeigt (Schulze et al., 2010). Es wurde die Interaktion unter anderem von  $BaSO_4$ -NP mit dem SP-A in präparierten *bronchoalveolar lining fluid* aus Schweinen (pBALF) untersucht. Die  $BaSO_4$ -NP zeigten dabei nur eine geringe Proteinadsorption. Die Tendenz zur Agglomeration in pBALF ist aber stärker ausgeprägt als beispielsweise in fötalem Kälberserum (FBS). Diese Eigenschaft des FBS könnte in *in-vitro*-Untersuchungen dennoch bedeutsam werden, da FBS in den Medien vieler Zellkulturen enthalten ist und möglicherweise eine Drittvariable (*Confounder*) darstellen könnte. Nicht nur körpereigene Proteine beeinflussen die Wirkung von Nanopartikeln. Auch die Interaktion von NP mit anderen natürlichen oder synthetischen Molekülen, die in der Umwelt vorkommen, kann deren Eigenschaften beeinflussen (Pulido-Reyes et al., 2017).

Generell werden in der Lunge verteilte Partikel, zu denen auch NP zählen, hauptsächlich durch den Prozess der Phagozytose von alveolaren Makrophagen und anschließend über die mukoziliäre Reinigung oder mittels des lymphatischen Systems eliminiert (Geiser und Kreyling, 2010; Yokel et al., 2014).

Die nachfolgende Darstellung verdeutlicht den Zusammenhang zwischen dem Transport und der Verteilung im respiratorischen System, bedingt durch die Struktur der Lunge, den Luftflussverhalten und den Eigenschaften der Partikel.

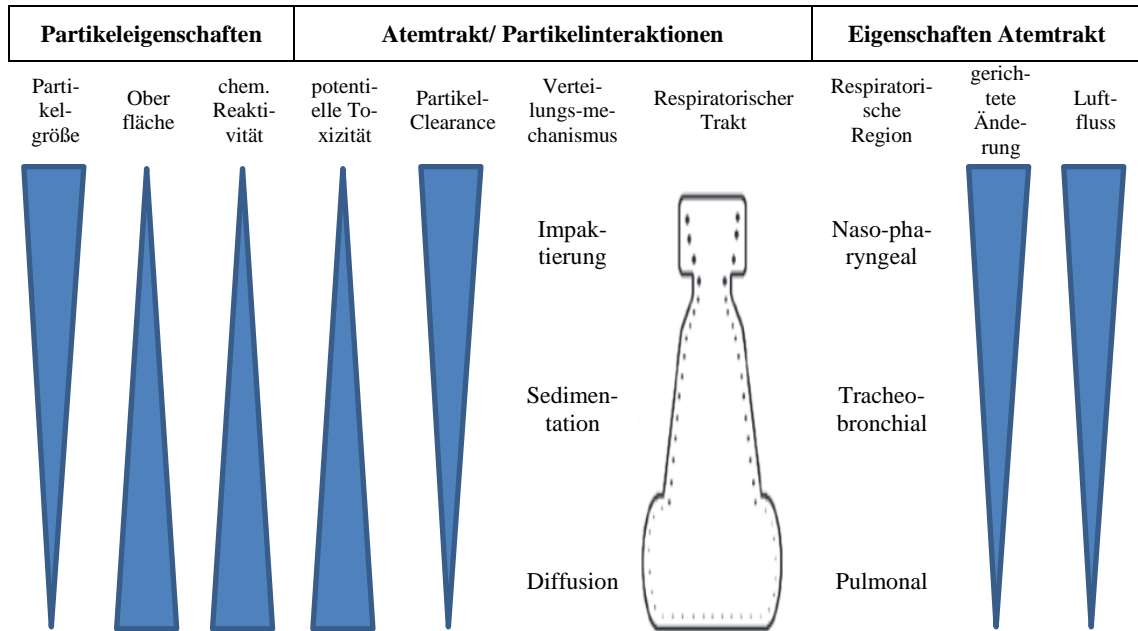


Abbildung 1: Partikelinteraktion mit der humanen Lunge (Bakand et al., 2012)

Nanopartikel (< 100 nm) verteilen sich dabei in der gesamten Lunge und gelangen schließlich in die alveolare Region. In dieser wird die Verteilung der Partikel durch Diffusionsprozesse bestimmt (Oberdörster et al., 2005; Geiser und Kreyling, 2010; Carvalho et al., 2011). Bei größeren Partikeln (~ 700 nm) muss der Depositionsprozess der Partikel ebenfalls berücksichtigt werden.

### 1.3 Nanopartikel und Verbrennung

Studien, welche sich mit der vergleichenden toxikologischen Untersuchung von technischen Nanomaterial vor und nach einer thermischen Behandlung, wie beispielsweise während der Abfallverbrennung, beschäftigen, gibt es bisher nicht. Mit zunehmender Verwendung von Nanomaterialien im Alltag und in Alltagsprodukten steigt nicht nur die Expositionswahrscheinlichkeit des Menschen und der Umwelt, sondern es kommt als Konsequenz auch zu einer Zunahme dieser Materialien im Hausmüll.

„Die Verbrennung von Hausmüll und anderen Siedlungsabfällen hat in Deutschland eine lange Tradition. Hierfür sind derzeit 68 Siedlungsabfallverbrennungsanlagen (MVA) mit einer Jahreskapazität von circa 19,6 Millionen Tonnen vorhanden.“ (UBA2017).

Die Leitlinien der Abfallwirtschaft (Vermeiden, wieder Verwenden, Verwerten, Beseitigen) lassen sich grundsätzlich auch auf Nanopartikel-haltige Abfälle anwenden. Die mittlerweile breite Nutzung von NM in der gesamten Bevölkerung, wie etwa durch Kosmetika, Verpackungen oder Textilien sowie die variablen Einsatzorte/Zusammensetzungen und die unterschiedlich langen

Lebensdauern der Produkte führen in der Abfallwirtschaft zu einer noch nicht vollständig zu überblickenden und u.U. sehr unterschiedlichen Verteilung der NP. Es ist denkbar, dass bei der Behandlung solcher Abfälle Sekundärreaktionen stattfinden, welche die Eigenschaften der NP grundlegend verändern (SRU, 2012).

Bisher beschäftigten sich jedoch nur wenige wissenschaftliche Studien mit dem Thema Verbrennung solcher Nanopartikel-haltigen Abfälle. Die durchgeführten Studien konzentrieren sich schwerpunktmäßig auf die Bestimmung von Partikelgrößenverteilungen und verschiedenen Methoden zur Abtrennung sowie dem Verbleib der Partikel (Buonanno et al., 2011; Cernuschi et al., 2012; Walser et al., 2012). Walser et al. beispielsweise untersuchten das Verhalten von CeO<sub>2</sub>-Nanopartikeln (80 nm) in der thermischen Abfallbehandlung einer Müllverbrennungsanlage (MVA). Trotz unterschiedlicher Dosiermethoden (Aufsprühen auf die Abfälle im Beschickungstrichter des Ofens oder Einbringung direkt über die Ammoniakdüsen über dem Ofen in das Rohgas) zeigte sich, dass der größte Teil des eingesetzten Ceroxids in den festen Verbrennungsrückständen wiedergefunden wurde. Die CeO<sub>2</sub>-Nanopartikel waren nach der thermischen Behandlung in ihrer kristallinen Struktur unverändert und in lockeren Agglomeraten auf der Oberfläche der Verbrennungsrückstände nachweisbar. Entsprechende Filtertechnik konnte die CeO<sub>2</sub>-Nanopartikel effektiv aus den Abgasen entfernen, so dass es zu keiner relevanten Emission dieser Partikel über das Abgas kommt (Walser et al., 2012). Die Studien umfassen aber keine toxikologische Untersuchung des verbrannten und unverbrannten Materials.

Studien zur Wirkung von Vulkanaschen, Diesel-Partikeln oder Partikeln aus der Verbrennung von Benzin-Motoren, die auch nanoskalige Partikel enthalten, zeigen das toxikologische Potential solcher anthropogenen Stoffe (Banerjee und Christian, 2017; Tomašek et al., 2018). Zudem beschäftigen sich toxikologische Studien mit der Wirkung von Feinstäuben aus Verbrennungsanlagen auf Lungenzellen (Diabaté et al., 2004). Die Temperatur während der Verbrennung sowie die allgemeinen Bedingungen haben einen signifikanten Einfluss auf das toxikologische Profil der entstehenden Partikel. So bewirkte eine 24-stündige Behandlung an Mausmakrophagen mit Partikeln aus zwei verschiedenen Öfen (einem mit Holzpellets betriebenen und einem konventionellen Holzofen) Zytotoxizität und die Induktion inflammatorischer Zytokine sowie eine dosisabhängige Gentoxizität. Die Partikel aus dem konventionellen Ofen besaßen dabei ein dreifach höheres Potenzial zur Induktion von Apoptose und DNA-Schäden. Diese Partikel wiesen auch einen mehr als doppelt so hohen Gehalt an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) auf (Tapanainen et al., 2011). Es ist bekannt, dass die nanoskalige Fraktion von Verbrennungspartikeln eine deutlich höhere Belastung mit PAK aufweist als die größeren Partikel. Dieser Punkt begründet wahrscheinlich die Unterschiede in den toxikologischen Potentialen (Vejerano et al., 2013).

#### 1.4 Nano-Toxikologie und Endpunkte

Die Durchführung vergleichender Toxizitätsstudien von thermisch unbehandelten und behandelten NP an humanen Zellkulturen ermöglicht zum einen eine leichtere Kontrolle und evtl. notwendige Anpassungen der Expositionsparameter im Vergleich zu *in-vivo*-Studien und zum anderen eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine potentielle Humantoxizität. Es ist bekannt, dass sich auch bei Nanopartikeln Speziesunterschiede in den toxikologischen Wirkungen und Empfindlichkeiten zeigen (Elder et al., 2005). Humane Primärzellen aus Lungengewebe (bronchiale Epithelzellen und periphere Alveolarzellen) stellen damit ein gutes Modell dar, um die biologische Wirkung, die mit der Nanoskaligkeit der Partikel verbunden ist, von den Wirkungen, die von chemischen Komponenten ausgelöst werden, unterscheiden zu können. Zur Untersuchung des Mechanismus möglicher Wirkungen wird jedoch zuerst die Freisetzung von Ionen aus den NP bestimmt, denn zusätzlich zu allgemeinen Eigenschaften, wie dem Agglomerationsverhalten der NP oder dem besonderen Oberflächen-zu-Massenverhältnis der NP, wird dem Löslichkeitsverhalten und damit der Freisetzung von Ionen eine immer größere Bedeutung bezüglich der Inhalationstoxikologie zugesprochen. Durch das Lösen von Ionen verändern sich Partikelgrößen, das wiederum führt zu verändertem Verhalten der Partikel (Pauluhn, 2014). Da, wie bereits beschrieben, aber auch möglicherweise anhaftende organische Kontaminanten (z.B. PAK) die Wirkung der Partikel beeinflussen können, werden diese Parameter ebenfalls bestimmt. Häufige toxikologische Endpunkte in *in-vitro*-Studien sind die Wirkung der Partikel auf die Vitalität der Zellen, wie etwa eine veränderte Integrität der Zellmembran oder metabolische Aktivitäten, die Entstehung von Entzündungsreaktionen, die Bildung von oxidativem Stress und damit verbundenen zellulären Antworten oder das Auslösen des programmierten Zelltods einer Zelle – der Apoptose.

Wie bereits einführend erwähnt, stellt die inhalative Aufnahme den wichtigsten Expositionspfad bei der NP-Toxikologie dar. Bei extremer Partikelbelastung in der Luft ist eine Lungenzelle (Epithelzellen Typ I und Typ II, alveoläre Makrophagen) ca. 6700 Partikeln pro Tag ausgesetzt. Dies bedeutet bei einer lebenslangen extremen Exposition (Lebenserwartung 80 Jahre)  $5,9 \times 10^7$  Partikel pro Lungenzelle (Paur et al., 2008). Toxikologische Studien decken meist einen wesentlich breiteren Dosisbereich ab und erfassen damit sowohl Effekte im Niedrigdosisbereich als auch Effekte in Konzentrationsbereichen, die eine Überladungssituation simulieren.

Im Speziellen sind Lungenepithelzellen, als Barriere zwischen der Atemluft und dem Organismus, ein Teil der unspezifischen Immunabwehr. So können sie Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Prostaglandine und Zytokine freisetzen. Bei einer chronischen Freisetzung kann dies jedoch zu negativen Effekten, wie z.B. der Schädigung des umliegenden Gewebes führen. Die Bildung von oxidativem Stress wird hierbei als einer der bedeutendsten Mechanismen betrachtet. Studien zu Feinstaub- und Diesel-Exposition bestätigen diese Theorie (Li et al., 2002; Riedl und Diaz-Sanchez, 2005).

Bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird in einem ersten Schritt eine anti-oxidative Antwort über den Nrf2-Signalweg induziert. Dabei werden Phase-II-Enzyme gebildet und der zelluläre Glutathiongehalt erhöht. Glutathion stellt eines der wichtigsten Antioxidantien im Körper dar. Es handelt sich um ein essentielles Tripeptid, welches vom Körper selbst synthetisiert werden kann und in seiner reduzierten Form eine freie Sulfhydryl-Gruppe besitzt, die durch Übertragung von Reduktionsäquivalenten die Zelle vor Oxidantien, Elektrophilen bzw. Xenobiotika und somit oxidativem Stress schützt (Rahman und MacNee, 1999; Grill et al., 2001). Glutathion ist das im Körper höchstkonzentrierte, niedermolekulare Thiol (intrazellulär zwischen 0,5 und 10mM).

Reicht diese erste Antwort nicht aus, so wird über MAPK- und NFκB-Signalwege eine Induktion von Zytokinen (bspw. TNF-α, IL-1β oder IL-6) und Chemokinen (bspw. IL-8 oder MCP-1) ausgelöst. Bronchialepithelzellen sind, neben weiteren Zellen, in der Lage körperfremde Stoffe zu erkennen und aktiv bei der Auslösung der spezifischen Immunantwort mitwirken zu können. Dies erfolgt u.a. durch die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch exogene bzw. endogene Reize (Panas, 2011).

Bei Zytokinen handelt es sich um extrazelluläre Signalproteine, die Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. Funktionell werden sie in proinflammatorische Zytokine, T-Zellen-gebildete Zytokine, chemotaktische Zytokine (Chemokine), anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren unterteilt (Chung, 2001). IL-8 und MCP-1 zählen beispielsweise zu den Chemokinen. Sie haben ein geringes Molekulargewicht (8 – 14 kDa) (Chung, 2001), wirken primär chemotaktisch und aktivieren neutrophile Granulozyten (besonders IL-8), Lymphozyten und Makrophagen (MCP-1) (Strieter, 2002).

Proinflammatorische Zytokine, welche anfänglich an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, sind beispielsweise IL-1α, IL-1β, IL-6 oder TNF-α. Für den Verlauf einer Entzündung ist die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und den Zytokininhibitoren ausschlaggebend. Zumal Zytokine auch weitere Reaktionen/Abläufe ändern und Folgereaktionen auslösen können. TNF-α stimuliert bei Freisetzung nämlich auch die Phagozytose in Makrophagen und induziert die Freisetzung von IL-6 und IL-1β (Panas, 2011).

Kommt es zu einer Überlastung der zellulären, protektiven Schutzmechanismen durch zu hohen oxidativen Stress, kann das mitochondriale Membranpotential (MMP) zusammenbrechen und der Zelltod (Apoptose und Nekrose) ausgelöst werden.

Unter Apoptose versteht man den physiologischen oder programmierten Zelltod. In der Regel sind dabei nur einzelne Zellen betroffen und diese reagieren auf körpereigene Signale (z.B. von benachbarten Zellen) oder auch auf Stress von außen. In der Anfangsphase des Prozesses schrumpfen Zellkern, Zytoplasma und Mitochondrien. Die Zellmembran bleibt jedoch unbeschädigt, so dass keine Entzündungsreaktion eintritt. Das biochemische Kennzeichen der Apoptose ist der enzymatische Abbau der zellulären DNA über Chromatin-Kondensation und Fragmentierung, die Ausbildung von Ausstülpungen der Zellmembran (*blebbing*) und schließlich das Verpacken

der Zelle in Vesikel (*apoptotic bodies*), welche dann von Makrophagen phagozytiert werden können. (DANA\_Apop2019). Der Prozess kann durch externe Faktoren oder intrazelluläre Signale ausgelöst werden (Fink und Cookson, 2006; Kroemer et al., 2009; Orrenius et al., 2011).

## 1.5 Bariumsulfat

Die toxikologischen Effekte von Nanopartikeln sind generell eng mit deren physikalischen Eigenschaften verbunden. So zeigen lösliche NP häufig eine höhere Toxizität als nicht lösliche NP. Dieser Effekt resultiert gewöhnlich aus der schlechteren Absorption der Partikel und der verminderten Freisetzung von Ionen nach oraler oder inhalativer Exposition (Park et al., 2009; He et al., 2010; Shi et al., 2013).

Als ein Nanomaterial mit einer sehr geringen Löslichkeit gilt das Bariumsalz der Schwefelsäure - Bariumsulfat. Zu den bedeutendsten Eigenschaften zählen seine hohe Dichte ( $4,5 \text{ g/cm}^3$ ), die chemische Inertheit und das Reflexionsvermögen elektromagnetischer Strahlung.  $\text{BaSO}_4$  gilt aufgrund seiner geringen Löslichkeit ( $2,2 \text{ mg/L}$ , bei  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ ) als PSP (*poorly soluble particle*) (Schwotzer et al., 2017). In Wasser, Säuren und Laugen ist Bariumsulfat damit fast unlöslich (einzige Ausnahme stellt heiße, konzentrierte Schwefelsäure dar). Aufgrund dieser Eigenschaften findet  $\text{BaSO}_4$  häufig Verwendung als Farbpigment bzw. zur Unterstützung der Witterungsbeständigkeit von Lacken. Es wird als Füllstoff in der Papier- und Kunststoffindustrie verwendet, da es das Glättverhalten von Papier und die Verarbeitbarkeit von Kunststoffen verbessert. Ebenso erhöht  $\text{BaSO}_4$  das Gewicht in Kunststoffen, was wiederum die Schalldämpfung verbessert. Bariumsulfat wird zudem als Kontrastmittel in medizinischen Implantaten wie beispielsweise Kathetern oder in Knochen-Zement verwendet (Petrova et al., 2008; Chem2010; Röm2010). Bei der Verwendung in medizinischen Produkten verbessert  $\text{BaSO}_4$  u.a. die antimikrobiellen Eigenschaften, die Zytokompatibilität in Bezug auf Osteoblasten und die Radioopakizität (Ricker et al., 2008; Aninwene et al., 2013).

In vielen toxikologischen Studien zu Nanopartikeln wird  $\text{BaSO}_4$  als Negativkontrolle eingesetzt, da es als chemisch inert sowie nicht-toxisch gilt (Schwotzer et al., 2017). Im Jahr 2011 wurden 23 verschiedene Nanomaterialien an zehn verschiedenen Zelllinien, unter anderem auch die Tumorzelllinie A549, bezüglich der Wirkung auf die Vitalität, metabolische Aktivität und die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), untersucht. In dieser zeigten  $37,5 \text{ nm}$  große  $\text{BaSO}_4$ -NP bis zu einer Konzentration von  $10 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  keinen Effekt auf die Vitalität und die metabolische Aktivität der Zellen. Auch führte  $\text{BaSO}_4$  zu keiner Bildung von ROS in den verwendeten Zelllinien. Lediglich in der Fibroblasten Zelllinie NIH-3T3 reduzierte sich die metabolische Aktivität nach der Behandlung mit Nano- $\text{BaSO}_4$  (Kroll et al., 2011).

## 1.6 Exposition, Lebenszyklus und Ökotoxikologie

Im Laufe ihres Lebenszyklus gelangen Nanopartikel über verschiedene Pfade in die Ökosysteme Luft, Boden und Wasser. Durch die steigenden Einsatzmöglichkeiten und Verwendung der NP

erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit der möglichen Exposition der Umwelt und des Menschen. Die Expositionspfade können sich dabei zwischen Mensch und Umwelt unterscheiden. Sie sind durch komplexe Verknüpfungen aber alle miteinander verbunden.

Luftgetragene Partikel sedimentieren beispielsweise auf Böden oder in Gewässern und können sich so in diesen Medien anreichern. Die speziellen Eigenschaften der Nanopartikel beeinflussen deren Übergang in Umweltkompartimente. Die Untersuchung der Bioverfügbarkeit, des Abbauverhaltens, der Reaktivität und Toxizität ist dementsprechend bedeutend (Libralato, 2014; Libralato et al., 2016). In einer Studie von Goswami et al. aus dem Jahr 2017 wird ersichtlich, dass sich die weltweite Produktion technischer NP von 2000 bis 2008 von 101 Millionen auf 10,3 Milliarden Euro Umsatz erhöht hat. Es wird davon ausgegangen, dass 9 bis 37 % der ENPs direkt in die Atmosphäre emittiert werden. Die restlichen 63 bis 91 % werden deponiert (Goswami et al., 2017). Vejerano et al. konnten in Verbrennungsversuchen im Labormaßstab zeigen, dass der überwiegende Anteil der untersuchten NP ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ; Ag, NiO und Cd-Quantum-Dots) fast vollständig in den festen Verbrennungsrückständen verblieb. Lediglich die untersuchten Fullerene wurden, zusammen mit den Staubpartikeln, freigesetzt (Vejerano et al., 2014).

Durch die Verbindung verschiedenster trophischer Ebenen über die Nahrungsketten und das ökologische Zusammenspiel aller Organismen, stellt ein Eintrag von NP nicht nur für den Menschen und andere Säugetiere ein mögliches Risiko dar, sondern auch für alle anderen Trophiestufen. Forscher haben für die meistverwendeten Nanomaterialien, wie beispielsweise  $\text{TiO}_2$  oder ZnO theoretische Konzentrationen berechnet, die in verschiedenen Umweltkompartimenten zu erwarten sind. So können in Oberflächengewässern Konzentration von wenigen Nanogramm bis zu Mikrogramm pro Liter erwartet werden (Maurer-Jones et al., 2013). Im Medium Wasser sind verschiedenste Organismen wie Bakterien, Algen oder Daphnien von einer möglichen, toxischen Wirkung der NP betroffen. Das Bakterium *Vibrio fischeri* ist ein gram-negatives, marines Bakterium, dessen Fähigkeit zur Lumineszenz das Ergebnis einer komplexen, biochemischen Reaktionskette ist. An dieser sind reduzierte Flavin-Mononukleotide, langkettige Fettsäurealdehyde und eine Luciferase beteiligt. NADH dient in der Reaktion als Co-Faktor. Die Biolumineszenz ist intrinsisch mit dem Metabolismus des Bakteriums verbunden (Hastings et al., 1987), weshalb sie als Marker für die Beeinflussung der metabolischen Aktivität des Bakteriums dient. *V. fischeri* kommen in allen Weltmeeren vor und leben anaerob. Das Bakterium geht häufig eine Symbiose mit Fischen oder Meerestieren, wie beispielsweise Tintenfischen, ein. Sie werden in der Toxikologie und im Schadstoffmonitoring zur Überprüfung von Wasserqualitäten eingesetzt, da sie sensitive Marker für die Akut-Toxizität verschiedener Belastungen und Kontaminanten darstellen (BG Bau 2020). Allgemein stellen Bakterien als Destruenten einen wichtigen Bestandteil im aquatischen System dar. Eine ebenso wichtige Rolle spielen Primärproduzenten und Primärkonsumenten. Darunter zählen Algen bzw. Daphnien. Beide Arten spielen in der Toxikologie eine



große Rolle, da sie einfach zu kultivieren sind und das toxikologische Potential von Stoffen mittels standardisierter und von der ‚*Organisation for Economic Co-operation and Development*‘ (OECD) genormter Tests bestimmt werden kann. Beide Spezies stellen hoch sensitive Testorganismen dar. *Chlamydomonas reinhardtii* ist eine im Süßwasser lebende einzellige Grünalge, die sowohl photo- als auch heterotroph leben kann. *Daphnia magna* ist eine Krebsgattung, die zu den *Branchiopoda* gehört. Sie leben überwiegend in stehenden Süßgewässern. Als Filtrierer eignen sie sich für ökotoxikologische Untersuchungen sehr gut. In dieser Arbeit sind die Daten der durchgeführten ökotoxikologischen Versuche nicht in den Methoden und Ergebnissen aufgeführt. Sie können dem Abschlussbericht des BMBF geförderten Projektes ‚Nano Emission - Untersuchung des Emissionsverhaltens von Nanopartikeln bei der Abfallverbrennung‘ entnommen werden (BMBF, Förderkennzeichen 03X3578 (Fraunhofer, 2017) & (Foth et al., 2017)). Die Ergebnisse sind jedoch Teil der Diskussion dieser Arbeit.

## 2 Zielstellung

Die Produktion und Verwendung nanoskaliger Materialien hat in den letzten Jahren eine immer größer werdende Bedeutung in allen Bereichen des täglichen, aber auch industriellen Lebens bekommen. Umfangreiche Studien beschäftigen sich mit der Untersuchung von toxikologischen Potentialen von Nanomaterialien und der damit verbundenen Wirkungsbeschreibung. Im Zuge ihrer Herstellung, Verwendung und Entsorgung durchlaufen Nanomaterialien, wie alle anderen Produkte auch, einen Lebenszyklus. Die meisten der toxikologischen Studien beschäftigen sich mit den Materialeigenschaften des in Anwendung befindlichen Materials und den Eigenschaften der reinen Nanopartikel auf Mensch, Tier und Umwelt. Der Verbleib der Nanomaterialien innerhalb ihres Lebenszyklus, speziell im Bereich der Entsorgung, ist bisher nur unzureichend untersucht. Vergleichende Studien zu anwendungsrelevanten Stadien der NM, welche sich bereits am Ende des Lebenszyklus befinden, sind bisher nicht vorhanden. Bekannt ist, dass sich ein Großteil der nanopartikelhaltigen Produkte nach ihrer Verwendung im normalen Siedlungsabfall wiederfindet. In der Bundesrepublik wird dieser Abfall zu großen Teilen einer thermischen Abfallverwertung zugeführt. Bei diesem Prozess besteht die Möglichkeit, dass die enthaltenen Nanomaterialien von den vorhandenen Reinigungssystemen/Filtern nicht ausreichend abgefangen werden und somit über das Abgas wieder in die Umwelt freigesetzt werden.

Ziel dieser Arbeit war die vergleichende toxikologische Untersuchung von nanoskaligem Bariumsulfat als reines Nanomaterial mit den Filterproben aus einer Technikumsanlage bzw. einer realen Müllverbrennungsanlage, in denen nanoskaliges BaSO<sub>4</sub> dem Abfallmaterial in definierter Menge zugesetzt wurde. Für den Menschen stellt die inhalative Exposition wohl den bedeutsamsten Aufnahmeweg dar, weshalb dieser in der vorliegenden Arbeit mittels der Untersuchung an humanen Primärzellen des Bronchus und der Lunge dargestellt wurde. Zusätzlich wurde die Wirkung des reinen BaSO<sub>4</sub> an drei Organismen unterschiedlicher trophischer Ebenen untersucht. Da die toxikologische Untersuchung von Nanomaterialien sehr komplex ist, muss sie bislang meistens als Einzelbeurteilung erfolgen, da die Eigenschaften des Einzelmateriale nicht aus denen des Bulkmaterials abgeleitet werden können. Es wurde der Einfluss der Partikel auf die Vitalität (metabolische Aktivität und Membranintegrität), die Veränderung des intrazellulären Glutathiongehaltes, die Induktion von Apoptose, die Aufnahme der Partikel in die Zelle bzw. den Modellorganismus, die Veränderung der Expression inflammatorischer Zytokine sowie die Freisetzung von Ionen aus dem Nanomaterial in das Kulturmedium untersucht.

Der direkte Vergleich der toxikologischen Eigenschaften des unverbrannten und des thermisch behandelten Nanomaterials stand dabei, aufgrund bisher fehlender Studien, im Mittelpunkt der Untersuchungen.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Zellkultur

Die humantoxikologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden einerseits mit primären humanen peripheren Lungenzellen (PLZ) bzw. normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und andererseits mit den Tumorzellen der Linie A549 durchgeführt.

Bei der Tumorzelllinie A549 handelt es sich um Zellen eines Lungenkarzinoms eines 58 Jahre alten Kaukasiers, die für die Durchführung toxikologischer Untersuchungen häufig verwendet werden. Es handelt sich um ein seit Jahrzehnten gut etabliertes Zellmodell. Morphologisch gesehen handelt es sich bei diesen Zellen um pulmonale Epithelzellen des Typs II (Giard et al., 1973). Die Methode zur Kultivierung und Anwendung normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBEZ) wurde bereits 2001/2002 im Institut für Umwelttoxikologie etabliert (Runge et al., 2001; Stock, 2002). Immunhistochemische Färbungen der kultivierten NHBEZ und PLZ zeigten zu über 95 % Epithelzellen (NHBEZ) bzw. 90-95 % epitheliale Charakteristika (PLZ) in den ausgewachsenen Kulturen (Lehmann et al., 2001; Torky et al., 2005).

Im Vergleich zu den permanenten Zelllinien, besitzen Primärkulturen eine begrenzte Lebensdauer. Die Verdopplungszeit der Zellen liegt bei ca. 22 h, wobei sich die Teilungsraten mit der Zeit verringern und die Zellen nach etwa 7 Generationen ihr Wachstum einstellen. Je nach Herkunft der primären Zellen können Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und des Stoffwechsels auftreten. Die Zellen behalten jedoch die meisten Eigenschaften und Charakteristika, durch die sie *in vivo* gekennzeichnet sind. Primärzellen stellen somit eine Zwischenstufe zwischen Tumorzelllinien und *in-vivo*-Versuchen dar (Schmitz, 2011).

##### 3.1.1 Kultivierung von humanen Primärzellen

Zur Gewinnung von humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und von Lungenzellen (PLZ) wurden humane Bronchusresektate und Lungengewebsresektate tumorfreier Regionen von Lungenteilresektionen verwendet. Die Patienten wurden, aufgrund klinischer Indikation, in das Martha-Maria-Krankenhaus Halle Dölau überwiesen und dort operiert. Jeder Patient weist individuelle Parameter wie Alter und Geschlecht, Beruf, Raucherstatus sowie die pathologische Diagnose auf. Keiner der Parameter war ein Ausschlusskriterium.

**Tabelle 1: Details zu Patientendaten**

ID	Alter / Geschlecht	Diagnose	Raucherstatus	Beruf
295	50 / ♂	Bronchialkarzinom ML	z.Z. NR vorher 70 PY	Anlagenmonteur, Schweißer
297	55 / ♂	Bronchialkarzinom rechter OL (NSCLC)	50 ±10 PY	Rohr-, Kanal- und Schachtsanierer
298	83 / ♂	NSCLC rechter UL	seit 10 Jahren NR vorher 50 PY	k.A.
299	72 / ♂	NSCLC rechter UL	seit 11 Monaten NR vorher 50 PY	Tischler

300	72 / ♂	NSCLC linke Lunge	40 PY	k.A.
301	64 / ♂	NSCLC rechter ML	30 – 35 PY	Industrieschuhmacher
302	56 / ♂	Pleuraempyem Stad. II	42 PY	k.A.
303	75 / ♀	NSCLC rechter ML	seit 1992 NR vorher 15 – 30 PY	k.A.
304	74 / ♂	NSCLC linker OL	seit 1997 NR vorher 30 – 35 PY	k.A.
305	58 / ♂	NSCLC linker UL	40 – 41 PY	k.A.
306	54 / ♂	Bronchialkarzinom, Lungenparenchymfistel Segment 6 rechter OL	ca. 80 PY	Walzwerk, Metall- dämpfe Gießerei
307	62 / ♀	NSCLC rechter OL	50 PY	Reinigungskraft

Der Gewebegewinn zum Anlegen der Kulturen erfolgte aus Resektaten, die nach Gesichtspunkten der Tumorchirurgie entfernt wurden (keine gezielte Gewebentnahme für Versuche). Die Zustimmung der Ethik-Kommission der MLU Halle-Wittenberg für die Nutzung der Proben zu Forschungszwecken liegt vor. Das Votum ist vom 16.08.2017 (Bearbeitungsnummer 2016-20).

Die Gewebestücke wurden nach der Entnahme mehrmals mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in kaltem Leibovitz L-15 Medium transportiert. Das Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen mechanisch, mittels Schere, Pinzette und Skalpell von ungewünschten Gewebe getrennt und gesäubert. Anschließend wurden die Gewebestücke von Bronchus und Lunge in ca. 10 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten und dreimal mit PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen. Die Gewebestücke wurden dann auf 60 mm Kulturschalen gesetzt. Anschließend wurde serumfreies AECG-Medium mit Supplement (0,4 % Rinderhypophysenextrakt; 0,5 ng/ml EGF; 5 µg/ml Insulin; 0,5 µg/ml Hydrocortison; 0,5 µg/ml Epinephrin; 6,7 ng/ml Triiodothyronin; 10 µg/ml Transferrin; 0,1 ng/ml Retinolsäure) zugegeben. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

Nach zwei bis drei Wochen wachsen die Zellen aus den Gewebestücken heraus und bilden einen *Monolayer* mit einer Konfluenz von ca. 80-90 %. Diese Zellen entsprechen der ersten Generation. Durch Versetzen der Gewebestücke auf neue Kulturschalen konnten weitere Generationen erhalten werden. Die subkonfluenten Zellkulturen können mittels Trypsin enzymatisch abgelöst und passagiert werden.

### 3.1.2 Passagieren der Primärzellen

Zum Passagieren der NHBEZ und PLZ wurde das *Detach-Kit* der Firma PromoCell verwendet. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90 % wurde der Mediumüberstand abgesaugt und die Zellen mit warmen HBSS gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl Trypsin/EDTA- Lösung pro cm<sup>2</sup>

Kulturfläche und Inkubation für 5 min bei 37 °C wurden die Zellen abgelöst. Die Zugabe von 100 µl Trypsin-Neutralisationslösung (TNS) pro cm<sup>2</sup> stoppt die Trypsinierung und die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert und pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem AECG-Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Für die Durchführung der Experimente wurden die Zellen in entsprechenden Zellzahlen ausgesät und bei einer Konfluenz von 40-50 % für die 72 h Versuche bzw. bei 60-70 % für die 24 h Versuche eingesetzt.

### **3.1.3 Kultivierung und Passagieren der Tumorzelllinie A549**

Die Tumorzellen A549 wurden in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von ca. 3.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80-90 % (aller 7 Tage) wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und subkultiviert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit warmen PBS gespült und die Tumorzellen mit 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA in PBS) 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Trypsinierung mit 5 ml warmen PBS, wurden die abgelösten Zellen in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 min bei 1000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in DMEM resuspendiert und die Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Tumorzellen wurden für die 24 h-Versuche im 70 %igen bzw. für die 72 h-Versuche im 50 %igen subkonfluenten Wachstumsstadium eingesetzt.

### **3.2 Sterilisation von Material und Lösungen**

Einmalartikel für die Zellpräparation und Zellkultur wurden steril verpackt gekauft. Hitzebeständige Glas- und Plastikmaterialien sowie alle Lösungen, wurden durch 25-minütiges Autoklavieren bei 120°C sterilisiert. Nicht hitzebeständige Lösungen wurden steril filtriert. Die eingesetzten Sterilfilter hatten eine Porenweite von 0,2 µm.

Die Nanomaterialien, Filterstäube, Ascheproben und das mikroskalige BaSO<sub>4</sub> wurden nach dem Aliquotieren in Pulverform mit mindestens 25 kGy gamma-sterilisiert.

### **3.3 Testung auf Endotoxine**

Die Testung auf Endotoxine erfolgte mit Hilfe des „Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantification Kit“ von ThermoScientific. Das Kit ist für die Bestimmung gram-negativer bakterieller Endotoxine geeignet. Diese Endotoxine katalysieren die Aktivierung eines Proenzym, welches im *Limulus Amebocyte Lysat* (LAL) enthalten ist. Dieses aktivierte Proenzym wiederum, ermöglicht die Abspaltung von p-Nitroanilin (pNA) aus dem farblosen Substrat (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA). Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 25 %iger Essigsäure kann die freigesetzte Menge

pNA photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden. Da die Aktivierung des Proenzym proportional zu der Endotoxinkonzentration in der Probe ist, kann die Konzentration über einen linearen Zusammenhang bestimmt werden. Die Messung der Kalibrierstufen sowie der Proben (nanoskaliges, mikroskaliges und geglähtes BaSO<sub>4</sub>) erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Gemäß des Testprotokolls wurden endotoxinfreie Materialien verwendet. Die Endotoxin-Standardlösung, das LAL und das Chromogene Substrat wurden mit endotoxinfreiem Wasser rekonstituiert. Die BaSO<sub>4</sub>-Suspensionen wurden in endotoxinfreiem H<sub>2</sub>O angesetzt und entsprechend verdünnt. Die Messung erfolgte in einem Photometer. Jede Probe wurde in eine Quarzküvette pipettiert und gegen den Blankwert vermessen. Nach Erstellen der Kalibriergeraden wurden die Endotoxinkonzentrationen bestimmt.

Alle vermessenen Proben waren endotoxinfrei. Auf eine grafische Darstellung im Ergebnisteil wird deshalb verzichtet.

### **3.4 Nanoskaliges Bariumsulfat**

Das nanoskalige BaSO<sub>4</sub> stammt von zwei verschiedenen Herstellern, Solvay und Huntsman. Das BaSO<sub>4</sub> von Solvay besitzt laut Herstellerangabe eine Primärpartikelgröße von 60 nm und ist ungecoatet. Die Partikel der Firma Huntsman haben gemäß den Angaben eine Primärpartikelgröße von 40 nm und besitzen ebenfalls kein *Coating*.

Zur Überprüfung der Herstellerangaben wurde die Partikelgröße mittels REM/EDX bestimmt.

### **3.5 Mikroskaliges Bariumsulfat**

Für die vergleichenden Untersuchungen der Filterproben des Technikums mit dem unverbrannten BaSO<sub>4</sub>, wurde neben dem nanoskaligen BaSO<sub>4</sub> auch chemisch identisches Material mit mikroskaligen Partikeln verwendet. Das Bariumsulfat stammt von der Firma Huntsman. Gemäß Herstellerangaben hat es eine Partikelgröße von 1,7 µm (d<sub>90</sub> bezogen auf die Partikelanzahl).

### **3.6 Filterstäube aus dem Technikum**

Aus der Kooperation mit der Technischen Hochschule Aachen stammen die Technikumsproben. Die Verbrennungsversuche wurden in einer Verbrennungskammer mit Wirbelfeuerung durchgeführt. Es wurden drei unterschiedliche Brennstoffe verwendet. Als Referenz dienten Holzpellets mit einem Quarzsandanteil von ca. 13 Gew% (das Produkt H33, Quarzwerke GmbH, mittlere Korngröße: ca. 260 µm). Die Basis für den BaSO<sub>4</sub>-haltigen Brennstoff waren ebenfalls Holzpellets mit 11,7 Gew% Quarzsand und 1,7 Gew% des nanoskaligen BaSO<sub>4</sub> bzw. des mikroskaligen BaSO<sub>4</sub>.

Die Bariumgehalte wurden mittels ICP-MS in den Brennstoffen ermittelt. Der Referenzbrennstoff enthielt 0,0063 Gew% Ba, der Nano-Brennstoff 0,194 Gew% Ba und der Mikro-Brennstoff 0,272 Gew% Ba. Die Verbrennungstemperaturen betragen jeweils 900-1000 °C. Nach Erreichen

eines stabilen Betriebs der Anlage wurde diese auf den Betrieb mit dem Musterbrennstoff umgestellt. Etwa eine Stunde nach dem Wechsel wurden die ersten Messungen begonnen. Die Probenahme erfolgte mittels eines 7-stufigen Kaskadenimpaktors (OH-610-C) zur Abscheidung unterschiedlicher Partikelgrößen zwischen 10 µm und 100 nm im Rohgas.

Für die toxikologischen Untersuchungen wurden die Filteraschen der Impaktorstufe 7 und des Endfilters (Partikel <200 nm) verwendet.

### 3.7 Filterstäube aus dem Großversuch der Müllverbrennungsanlage (MVA)

Für die Verbrennungsversuche in der MVA Weisweiler wurde mittels Dispergierer eine wässrige BaSO<sub>4</sub>-Suspension mit 35 % BaSO<sub>4</sub> und 0,7 % Tensid (ECODIS P30) hergestellt. Hierfür wurde destilliertes Wasser zuerst mit der entsprechenden Menge Tensid versetzt (Abbildung 2; A). Anschließend wurde das pulverförmige BaSO<sub>4</sub> mittels eines elektrischen Rührers grob eingearbeitet (Abbildung 2; B), bevor die Suspension mit dem Dispergierer für 5 min bei ca. 40.000 U/min homogenisiert wurde (Abbildung 2; C). Von dieser Suspension wurden viertelstündlich 40 L auf ca. 4 Tonnen Müll über einen Zeitraum von 12 Stunden zu dosiert, so dass sich ein theoretischer Massenanteil von 0,28 % Barium im System ergab (Abbildung 2; D).



**Abbildung 2: Herstellung der 35 %igen BaSO<sub>4</sub>-Suspension;** praktische Arbeiten: Sarah Thomas, Kollegen der RWTH Aachen und MVA, Fotos: F. Glahn

Die Probenahme erfolgte direkt nach der Verbrennungskammer im Rohgas an der Messstelle R1, auf einer Höhe von 17,75 m vor der in der Anlage verbauten Filtertechnik. Die Proben wurden mittels des 7-stufigen Kaskadenimpaktors gezogen, der auch bei den Technikumsproben zum Einsatz kam. Die Temperatur an der Messstelle betrug 220 °C, bei einem Druck von

-4,5 mbar und einer Gasgeschwindigkeit von 4,2 m/sek. Die Zusammensetzung des Abgases wurde mit folgenden Parametern bestimmt: CO<sub>2</sub> (12,6 %), N<sub>2</sub> (63,8 %), O<sub>2</sub> (8,2 %), CO (0,0001 %) und H<sub>2</sub>O (15,36 %). Für die toxikologischen Untersuchungen wurden die Filteraschen der Impaktorstufe 7 und des Endfilters (Partikel < 200 nm) verwendet.

### **3.8 Geglühtes BaSO<sub>4</sub>**

Für die direkte Gegenüberstellung von unverbrannten BaSO<sub>4</sub> mit identischen Nanopartikeln, die über eine bestimmte Zeitspanne thermisch behandelt wurden, wurde das BaSO<sub>4</sub> von Huntsman über 5 h bei 900 °C gegläht. Der Massenverlust betrug 0,45 %. Das Forschungsinstitut Fraunhofer UMSICHT untersuchte das geglähte Material mittels Röntgenbeugung. Es konnte keine Veränderung durch die thermische Behandlung beobachtet werden. Zudem war die Kristallstruktur beider Materialien unverändert (Fraunhofer, 2017).

### **3.9 Ascheproben aus verschiedenen Verbrennungen**

Durch die Firma Herding Filbertechnik wurden zudem Ascheproben aus verschiedenen Verbrennungen oder Prozessen zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um vier Proben mit den Bezeichnungen Flugasche, Schweißrauch, Molybdänoxid und Perlitstaub.

Beim Schweißrauch handelt es sich um die beim Schweißen entstehenden, gesammelten Stäube, deren Absaugen aus Gründen des Arbeits- und Gesundheitsschutzes erforderlich ist. Der Perlitstaub sowie das Molybdänoxid entstammen der herstellenden Industrie dieser Materialien. Die Flugasche ist ein Filterrückstand aus der klassischen Verbrennung. Detaillierte Informationen zu den Bedingungen der Gewinnung, wie z.B. Art des Filters, Temperatur etc. lagen nicht vor.

Die Charakterisierung dieser Proben erfolgte mittels mikroskopischer Aufnahmen mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop LEO1525 und mittels Röntgen-Pulverdiffraktion durch Herrn Prof. Dr. H. Pöllmann im Institut für Geowissenschaften und Geographie der MLU Halle-Wittenberg. Die Charakterisierung der Partikelsuspensionen in Zellkulturmedium erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung am Malvern Zetasizer NanoZS, gemäß der Durchführung nach 3.11.

### **3.10 Suspensionsherstellung**

Da sowohl die Inkubation der Primär- und Tumorzellen, als auch der Algen, Daphnien und Leuchtbakterien über eine Partikelsuspension erfolgte, musste zu Beginn der Arbeiten das Bariumsulfat und die Filterstäube in den einzelnen Medien suspendiert werden. Verschiedene Studien beschäftigen sich mit den Schwierigkeiten und Besonderheiten der Nanosuspensionsherstellung sowie den Einflüssen des Mediums auf die Toxizität (Schulze et al., 2008; Meissner et al., 2009; Taurozzi et al., 2011; Cohen et al., 2013; Sabuncu et al., 2012; Haniu et al., 2013; Prasad et al., 2013; Prasad et al., 2014; Wu et al., 2014).



Aufgrund dessen wurden verschiedene Aufarbeitungsmethoden (24 h Rühren, Behandlung im Ultraschallbad bzw. mittels einer Ultraschallsonde) miteinander verglichen. Durch mikroskopische Aufnahmen und die Partikelgrößenmessung mittels dynamischer Lichtstreuung wurde die Aufarbeitung mit einer Ultraschallsonde als Standardarbeitsanweisung etabliert. Die Stocklösungen wurden in sterilen Glasreagenzröhrchen für drei Minuten einer Behandlung mittels Ultraschallsonde unterzogen. Zur Anwendung kam eine SONOPLUS von Bandelin (HD3100) mit Beschallungsbecher (BB 2G), welche eine Energie von ca. 5kJ in die Lösung eintrug. Anschließend wurden die entsprechenden Verdünnungen hergestellt und ebenfalls mit Ultraschall behandelt. Während der Behandlung wurden die Lösungen mittels Eiswasser gekühlt. Aufgrund von Studien über den Einfluss von Medienzusammensetzungen auf die Wirkung von Titandioxid-Nanopartikeln (Prasad et al., 2013) wurden die Suspensionen auch in anderen Medien als dem für die Kultivierung von Primärzellen verwendeten AECG-Medium hergestellt und hinsichtlich ihrer Größenverteilung charakterisiert. Alle Stocklösungen, mit Ausnahme der Technikums- und Großversuchsproben, hatten eine Konzentration von 10 mg/ml. Die Suspensionen der Verbrennungsversuche wurden aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Massen mit 1 mg/ml angesetzt.

### **3.11 Suspensionscharakterisierung**

Die exakte Charakterisierung der Suspensionen erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung an einem Zetasizer (Nano Series, Nano-Sizer/Nano-ZS von Malvern) im Institut für Pharmakologische Technologie und Biopharmazie der MLU. Die Stocklösungen hatten eine Konzentration von 10 mg/ml und wurden für die Messung entsprechend verdünnt, so dass die Linsenöffnung des Gerätes im Optimum zwischen 5 und 7 lag. Die Messungen erfolgten jeweils in Dreifachbestimmung bei einem Messwinkel von 173 ° (*Backscatter*). Die Bestimmung der Messzeit erfolgte automatisch. Die Methode wurde mit folgenden Daten erstellt: Brechungsindex des Bariumsulfats ist 1,64; die Absorption beträgt 0,1; die Messtemperatur beträgt 25 °C mit einer Einstellungszeit von 120 Sekunden; die Viskosität des Lösemittels beträgt 0,89 mPa\*s und der Brechungsindex 1,33. Gemessen wurde in einer Küvette des Typs DTS0012.

Zusätzlich wurden die Suspensionen im akkreditierten Labor der Firma Eurofins speziell auf ihren Bariumgehalt und auf verschiedene andere Metalle (Arsen, Blei, Cadmium, Kupfer, Chrom, Eisen, Nickel, Zink und Quecksilber) untersucht.

Die Suspensionen der Technikums- und Großversuchsproben wurden ebenfalls bei Eurofins auf ihren Gehalt an Dioxinen und PAKs untersucht. Es wurden 17 verschiedene Dioxine (2,3,7,8-TetraCDD; 1,2,3,7,8-Penta-CDD; 1,2,3,4,7,8-HexaCDD; 1,2,3,6,7,8-HexaCDD; 1,2,3,7,8,9-HexaCDD; 1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD; OctaCDD; 2,3,7,8-TetraCDF; 1,2,3,7,8-PentaCDF; 2,3,4,7,8-PentaCDF; 1,2,3,4,7,8-HexaCDF; 1,2,3,6,7,8-HexaCDF; 1,2,3,7,8,9-HexaCDF; 2,3,4,6,7,8-HexaCDF; 1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF; 1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF und OctaCDF) und 16 PAKs (Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren,

Benz(a)anthracen, Chrysen, Benzo(b/j)fluoranthen, Benzo(k)fluoranthen, Benzo(a)pyren, Dibenz(a,h)anthracen, Indeno(1,2,3-cd)pyren und Benzo(ghi)perylene) gemessen.

### **3.12 Vitalitätstest**

Zu Beginn der toxikologischen Untersuchungen des Bariumsulfats, der Filteraschen und der eingesetzten Tenside erfolgte die Bestimmung der generellen zytotoxischen Wirkung, d.h. die Auswirkung auf die Vitalität der Zellen. Die Bestimmung der Zytotoxizität stand am Anfang weiterer Untersuchungen um den subtoxischen Konzentrationsbereich der Partikel zu bestimmen. Es kamen drei unterschiedliche Testsysteme zum Einsatz.

#### **3.12.1 Resazurin-Test**

Bei dem Resazurin-Test handelt es sich um einen schnellen und sensitiven Vitalitätstest, der mit dem ungiftigen Reagenz Resazurin arbeitet. Das oxidierte, blaue, nichtfluoreszierende Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) wird durch mitochondriale Enzyme zu dem pinken, fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert. Bei länger andauernder Reaktion bildet sich das farblose, nicht-fluoreszierende Hydroresorufin.

Die Umsetzung des Resazurins und somit die Stärke des Fluoreszenzsignals sind direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

Der Resazurin-Test wurde in einer 24-Well-Platte durchgeführt. Nach Behandlung der Zellen mit dem Nanomaterial über 24 bzw. 72 h wurde der Mediumüberstand entfernt und die Zellen dreimal mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Dem Waschen folgten eine 30- bzw. 60-minütige Inkubation mit der 10 %igen Resazurininlösung bei 37 °C. Die Fluoreszenz wurde sowohl nach 30 Minuten als auch nach 60 Minuten im Platten-Reader bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen.

#### **3.12.2 MTT-Test**

Der MTT-Test ist ebenfalls, wie der Resazurin-Test ein Zytotoxizitätstest zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen. Die Bestimmung der Toxizität mittels MTT beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Umsetzung wird anschließend photometrisch über eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. Der genaue zelluläre Mechanismus hinter der Reduktion des MTT zu Formazan ist nach wie vor nicht vollständig geklärt (Riss et al., 2013). Wahrscheinlich handelt es sich um NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen oder ähnliche, reduzierende Moleküle, welche Elektronen auf das MTT-Molekül übertragen können (Marshall et al., 1995).

Die Durchführung des MTT-Test erfolgt analog dem Resazurin-Protokoll. Nach dem Waschen der Zellen mit warmen PBS werden die Zellen mit der MTT-Gebrauchslösung für 30 min bei

37 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen erneut gewaschen und mit einem Gemisch aus Ameisensäure und Isopropanol (5:95) lysiert. Die Messung erfolgt in einer Glasküvette im Photometer gegen einen Blankwert. In dieser Arbeit diente der MTT-Test der Bestimmung der Zytotoxizität des für die Suspensionsherstellung nötigen Tensids.

### 3.12.3 Laktatdehydrogenase-Test

Der Laktatdehydrogenase-Test ist ein Vitalitätstest, der die Membranintegrität bestimmt. Der LDH-Test ist ein sehr häufig angewendeter *in vitro* Zytotoxizitätstest, dessen Prinzip auf der Bestimmung der Enzymaktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) im Zytoplasma basiert, welches aus zerstörten oder beschädigten Zellen freigesetzt wird und somit im Überstand (im Zellkulturmedium) nachweisbar ist. Die Laktatdehydrogenase ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das sehr schnell in das Zellkulturmedium abgegeben wird, wenn die Zellmembran zerstört ist. Die Freisetzung und Aktivität des LDH wird mittels eines enzymatischen Tests bestimmt, bei dem der Verbrauch von NADH bei der Reaktion von Pyruvat zu Laktat katalysiert durch LDH über eine Absorptionsmessung erfolgt. Zugrunde liegt die enzymatische Reduktion von Pyruvat zu Laktat in der Anwesenheit von NADH und LDH.

Der Verbrauch des NADH wird über eine kinetische Absorptionsmessung mittels *Platten-Reader* bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Die Anwesenheit von LDH äußert sich in einer Abnahme der Extinktion. Die Differenz der Extinktion zwischen der ersten und letzten Messung wird ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

Zur Durchführung des LDH-Tests werden 25 µl des Zellüberstandes der behandelten Zellen in ein Well einer 96-Well-Platte überführt. Anschließend werden nacheinander, ohne Zeitverzug und luftblasenfrei, pro Well 125 µl einer 0,4 mM NADH-Lösung und 125 µl einer 2mM Na-Pyruvatlösung zugesetzt. Die Platte wird in den *Platten-Reader* überführt und die Messung über zwölf Zyklen (ein Zyklus entspricht 90 sek) durchgeführt.

### 3.13 BaSO<sub>4</sub>-Aufnahme in die Zellen

Die quantitative Bestimmung der Aufnahme des BaSO<sub>4</sub> in die Zelle erfolgte mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS). Die Zellen wurden in 6 cm-Schalen ausgesät und über 24 h bzw. 72 h mit den Partikeln inkubiert. Nach mehrmaligen und sorgfältigen Waschen der Zellen mit warmen PBS wurden die Zellen mittels des Detach-Kits geerntet. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und dem Institut für Biologie/ Mikrobiologie zur Messung durch Herrn Dr. M. Herzberg übergeben. Die Proben wurden in Salpetersäure und mit Mikrowelle aufgeschlossen, entsprechend der erwarteten BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen verdünnt und anschließend vermessen.

Zusätzlich wurde die subzelluläre Lokalisation der Partikel mittels hochauflösender Sekundärionen-Massenspektrometrie (NanoSIMS) in Kooperation mit Herrn Prof. D. Schaumlöffel (CNRS,

Pau, Frankreich) bestimmt. Die Fixierung und Einbettung der Zellen wurde in Frankreich durchgeführt, weshalb auf eine Beschreibung der einzelnen Schritte in dieser Arbeit verzichtet wird.

### 3.14 Bestimmung der Freisetzung von Ba<sup>2+</sup>-Ionen

Auch die Freisetzung von Barium-Ionen in das Zellkulturmedium wurde mittels ICP-MS quantifiziert. Die Suspensionen wurden mit einer Konzentration von 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml BaSO<sub>4</sub> in AECG-Medium angesetzt und für 72 h bei 37 °C zellfrei inkubiert. Nach der Inkubation wurden 5 ml der NP-Suspension mittels Pipette in ein Zentrifugationsröhrchen von Sartorius mit Filtereinheit (3 kDa) überführt. Die Zentrifugation erfolgte für 60 min bei 4000 U/min und 20 °C. Die Messung der freigesetzten Ba<sup>2+</sup>-Ionen erfolgte im Filtrat. Eine Mediumkontrolle wurde über alle Schritte mitgeführt und ebenfalls vermessen.

### 3.15 Inflammatorische Zytokine

Die Untersuchung einer möglichen Modulation von inflammatorischen Zytokinen durch Bariumsulfat-Nanopartikel in Primärkulturen von humanen Lungenzellen war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Die Analysen wurden mittels *bead*-basiertem Multiplex-ELISA am Durchflusszytometer in der FACS-Core-Facility der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität durchgeführt. Mit dem verwendeten Test, *LEGENDplex™ Human Inflammation Panel (13-plex)*, können die 13 inflammatorischen Zytokine IL-1β, IFN-α, IFN-γ, TNF-α, MCP-1 (CCL2), IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, und IL-33 parallel nachgewiesen werden. Die Zytokine wurden aus den Überständen des Zellkulturmediums behandelter Zellen bestimmt. Hierfür wurden die Ansätze des Resazurin-Tests verwendet. Zu Beginn des Experimentes wurden alle Lösungen auf Raumtemperatur gebracht und die Proben aufgetaut. Der lyophilisierte Standard-Cocktail wurde mit 250 µl *AssayBuffer* versetzt, gut gemixt und für 10 min stehen gelassen. Aus diesem wurden die Verdünnungen für die Kalibriergeraden erstellt. Die *Pre-Mixed Beads* wurden vor Verwendung für 2 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 30 sek gevortext. Der Waschpuffer wurde 1:20 mit bidest. H<sub>2</sub>O verdünnt. Vor Vermessung der Proben wurden diese sorgfältig gemixt und 5 min bei 9000 U/min zentrifugiert.

Die dem Test-Kit beigelegte Filterplatte wurde mit 100 µl Waschpuffer pro Well benetzt und für 1 min stehengelassen. Nach dem Entfernen des Waschpuffers durch das Anlegen eines Vakuums, wurden pro Well 25 µl *AssayBuffer* und gemäß eines Beimpfungsschemas 25 µl der Standards bzw. Proben und 25 µl der *Pre-Mixed Beads* zu pipettiert. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für 2 h, 500 rpm und im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Flüssigkeiten mittels Vakuum entfernt und die Platte zweimal mit 200 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach Zusatz von 25 µl *Detection-Antibodies* wurde die Platte eine weitere Stunde unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Direkt im Anschluss wurden pro Well 25 µl SA-PE dazu gegeben. Die Platte wurde weitere 30 min bei 500 rpm inkubiert.

Die Flüssigkeit wurde mittels Vakuum abgezogen und die Platte erneut zweimal gewaschen. Für die Messung wurden 150 µl Waschpuffer pro Well zugegeben, die Platte eine Minute geschüttelt und anschließend am LSR II Fortessa von BD vermessen.

Mit Ausnahme des Interleukin-33 (IL-33) lag die Nachweisgrenze aller Zytokine bei 2,4 pg/ml. Für IL-33 lag sie bei 12,2 pg/ml.

### **3.16 Glutathionbestimmung**

Die Bestimmung des Glutathions erfolgte in dieser Arbeit als Gesamt-Glutathion, d.h. erst nach erfolgter Reduktion des oxidiert vorliegenden GSH (GSSG) mit 1,4- Dithiothreit, wurde die spezifische Derivatisierung mit Monobrombiman, modifiziert nach Newton et al., eingeleitet (Newton et al., 1981) und das GSH mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatografie (HPLC) quantifiziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 6 cm-Schalen. Nach einer Inkubation der Zellen mit den Partikeln über 24 bzw. 72 h, wurden sie vorsichtig mit warmen PBS gewaschen und durch Trypsinierung geerntet. Das durch Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C weggefroren. Nach dem Auftauen wurde das Pellet in 0,1 N HCl lysiert und für 3 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 13.000 U/min für 20 min und bei 4 °C zentrifugiert. Aus dem Zellüberstand erfolgte einerseits die Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (siehe Punkt 3.17.) und andererseits die Bestimmung des GSH.

Für die Bestimmung des GSH wurden 120 µl des Überstands mit 180 µl CHES und 30 µl DTT versetzt und kurz gevortext. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank, erfolgte die Zugabe von 10 µl Monobrombiman (mBrB) zu jeder Probe. Nach dem gründlichen Mischen der Proben, wurden diese für 15 min bei Raumtemperatur (lichtgeschützt) inkubiert. Die Reaktion wird mit 250 µl 5 %iger Essigsäure abgestoppt. Vor der Messung wurden die Proben gevortext und kurz zentrifugiert.

Als stationäre Phase dient eine RP-18-Säule von Chromolith (RP-18 100-4,6mm) mit einer RP-C18 *endcapped* Vorsäule, ebenfalls von Chromolith. Die mobile Phase bestand aus zwei unterschiedlichen Eluenten (Phase A: 2 % Methanol/ 98 % H<sub>2</sub>O/ 0.25 % Essigsäure (100 %) (pH 4.3) und Phase B: 90 % Methanol/ 10 % H<sub>2</sub>O/ 0.25 % Essigsäure (100 %) (pH 3.9)). Die Flussrate betrug 3 ml/min. Für jede Probe wurde ein Volumen von 30 µl in die HPLC injiziert. Die Detektion erfolgte an einem Fluoreszenz-Detektor mit den Wellenlängen  $\lambda_{ex}$  380 nm und  $\lambda_{em}$  480 nm.

### **3.17 Proteinbestimmung**

Für die Vergleichbarkeit der Glutathionwerte wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt und als Bezugsgröße (µg/mg Protein) verwendet. Die Bestimmung erfolgte mittels Bicinchoninsäure-Tests. Diese Methode, zur quantitativen Proteinbestimmung, stellt eine Kombination der Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem dar. Sie beruht auf der Reduktion

von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , wobei die  $\text{Cu}^+$ -Ionen mit BCA einen Farbkomplex bilden, der einen empfindlichen kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm ermöglicht. Hierfür wurden 10  $\mu\text{l}$  des Zellüberstandes der in 0,1 N HCl lysierten Zellen, mit 200  $\mu\text{l}$  einer Kupfer(II)-Lösung und Bicinchoninsäure (BCA) für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm photometrisch vermessen. Als Kalibrierung diente eine Verdünnungsreihe von Serumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg/ml BSA.

### **3.18 Apoptosebestimmung**

Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mittels Durchflusszytometrie am MUSE. Das Testprotokoll beruht auf dem Anfärben der Zellen mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen, dem fluoreszenzmarkiertem Annexin V und 7-AAD (7-Aminoactinomycin), welches die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Annexin V ist ein Calcium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, welches mit dem auf der Oberfläche präsentierten Phosphatidylserin apoptotischer Zellen bindet. Tote Zellen verlieren zudem ihre Zellmembranintegrität, so dass 7-AAD in die Zelle eindringen kann und dort mit der DNA interkaliert und diese anfärbt. Auf diese Weise können vier verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden. Lebende und vitale Zellen zeigen eine negative Färbung für beide Stoffe. Apoptotische Zellen sind positiv auf Annexin V. Spät apoptotische Zellen sind positiv auf beide Stoffe. Zellen, die eine andere Art des Zelltods durchlaufen haben, sind nur positiv auf 7-AAD.

Die Zellen wurden in 6 cm-Schalen ausgesät und bei entsprechender Konfluenz für 24 bzw. 72 h mit  $\text{BaSO}_4$  inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit warmen HBSS gewaschen. Die Trypsinierung erfolgte für exakt 5 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit TNS gestoppt und die abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 U/min bei 20 °C zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in warmen PBS resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurden nun 50  $\mu\text{l}$  in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, in welchem jeweils 5  $\mu\text{l}$  FBS vorgelegt waren. Anschließend wurden 50  $\mu\text{l}$  der Reagenzlösung zugesetzt, die Proben gut gemischt und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem entsprechenden Geräteprogramm und separater Einstellung bzw. Optimierung der Parameter. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte Proben, die nach dem Ernten in AECG-Medium resuspendiert wurden und dann für 30 min bei 55 °C inkubiert wurden.

### **3.19 Statistik**

Die Auswahl der geeigneten, statistischen Tests erfolgte nach Beratung durch das Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik (IMEBI) der Medizinischen Fakultät.

Die toxikologischen Experimente an Primärzellen wurden mit der Software GraphPad InStat ausgewertet. Die Dosisgruppen innerhalb eines Experimentes wurden mittels Kruskal-Wallis Test statistisch verglichen. Als Post-hoc-Test wurde der Test nach Dunn verwendet.

Für die toxikologischen Untersuchungen an der Tumorzelllinie A549 erfolgte die Auswertung mittels Friedman-ANOVA mit geeignetem post-hoc Test (Wilcoxon *signed-rank* Test/Bonferroni-Korrektur) mit dem Statistik-Programm SPSS. Die Daten dieser Experimente sind nicht unabhängig voneinander erhoben worden und als gepaart anzusehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube

Die Charakterisierung des nanoskaligen und mikroskaligen BaSO<sub>4</sub>, der Technikums- und Großversuchs-Filterproben sowie der vier Filterstäube der Firma Herding, erfolgte durch mikroskopische Aufnahmen, REM/EDX-Bestimmung und die Vermessung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS).

#### 4.1.1 BaSO<sub>4</sub>

Das pulverförmige Material wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl „Lehr- und Forschungsgebiet Technologie der Energierohstoffe (TEER) der Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH) Aachen“ und dem Lehrstuhl für „Feststoff- und Grenzflächenverfahrenstechnik (LFG)“ der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU) charakterisiert. Das NM von Solvay hat laut Hersteller eine Partikelgröße von 60 nm, gemessen wurde eine REM d<sub>50</sub> von ebenfalls 60 nm und eine Oberfläche („Area“ bestimmt mittels des Brunauer-Emmett-Teller-Verfahrens durch das LFG) von 43,4 m<sup>2</sup>/g. Das NM von Huntsman hat laut Hersteller eine Partikelgröße von 40 nm, gemessen wurde eine REM d<sub>50</sub> von 60 nm und eine Oberfläche von 31,5 m<sup>2</sup>/g. Das Mikro-Material von Huntsman hat laut Hersteller eine Partikelgröße (d<sub>90</sub>) von 1,7 µm, gemessen wurde eine REM d<sub>50</sub> von 1,8 µm. Die Oberfläche wurde nicht bestimmt.

Die Analyse mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) zeigte, dass das Bariumsulfat neben den Haupt-Elementen Barium, Schwefel und Sauerstoff auch kleinste Spuren von Strontium und Natrium enthält.

Die Bilder der REM-Aufnahmen zeigen für beide NP gleichmäßige Partikel, die in Agglomeraten vorlagen.

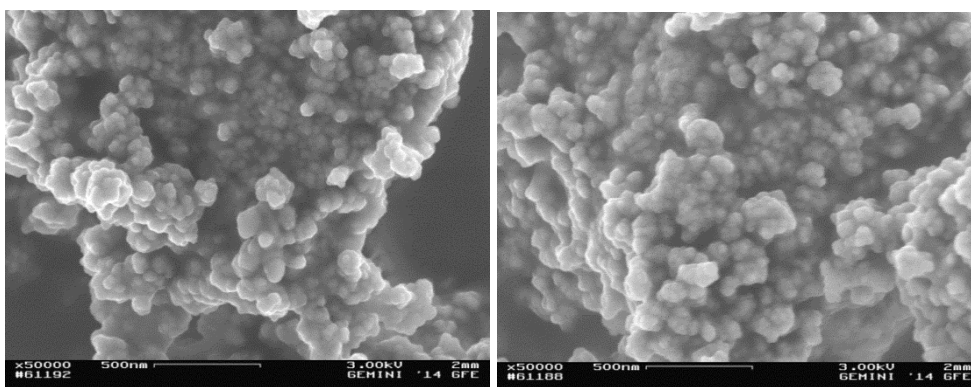


Abbildung 3: nanoskaliges BaSO<sub>4</sub> in der REM-Aufnahme Solvay (links) und Huntsman (rechts)

Zusätzlich wurde das Schmelzverhalten des nanoskaligen und mikroskaligen BaSO<sub>4</sub> untersucht. Es zeigte sich, dass der Sinterbeginn des Nano-BaSO<sub>4</sub> bei 532 °C liegt. Das Mikro-BaSO<sub>4</sub> beginnt bei 628 °C zu sintern (Baran und Quicker, 2017).



#### 4.1.2 Charakterisierung der Suspensionen

Im Zuge der Etablierung einer Standardarbeitsanweisung (SOP) zur Herstellung einer stabilen, nanoskaligen Suspension konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aufarbeitungsmethode als auch die Zusammensetzung des Mediums einen entscheidenden Einfluss auf die Partikelgröße hat. Die mikroskopische Betrachtung der Suspensionen zeigte, dass die gleichmäßigste Partikelverteilung durch die Verwendung einer Ultraschall-Lanze oder des Ultraschall-Bads zur Aufarbeitung erreicht werden konnte. Sehr inhomogen war die Suspension nach 24 stündigem Rühren.

Die Charakterisierung der Suspensionen mittels dynamischer Lichtstreuung, welche den hydrodynamischen Radius der NP in Suspension ermittelt, bestätigte die gleichmäßige und stabile Partikelgrößenverteilung bei der Aufarbeitung der Suspension mittels Ultraschall-Lanze.

Zusätzlich wurde deutlich, dass sich eine stabilere Partikelgrößenverteilung in den Medien zeigte, welche Kälberserum (FBS) enthielten (bspw. DMEM).

Zur Vermeidung der Notwendigkeit dem Medium andere Vermittler, wie bspw. chemische Tenside, zusetzen zu müssen, wurde die Kultivierbarkeit der Primärzellen in DMEM untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass sich unter diesen Bedingungen die Zellen nicht mehr wie üblich entwickelten. Es trat ein stark vermehrtes Wachstum von Fibroblasten auf.

Eine Kultivierung der Primärzellen in DMEM war somit nicht möglich. Um dennoch eine stabile und homogene Suspension zu erhalten, deren Partikel eine Größenordnung von ca. 100 nm hatten, wurde dem AECG-Medium ein Tensid zugesetzt. So konnte eine stabile, nanoskalige Suspension hergestellt werden. Nach Untersuchung der Zytotoxizität des Tensids Dispex AA4040 der Firma BASF mittels MTT-Test wurden dem AECG-Medium 0,005 % Tensid zugesetzt (Vitalitätsverlust in NHBEZ ca. 10 %). Die Partikelgrößenbestimmung mittels DLS erfolgte in Dreifachmessung.

**Tabelle 2: Bestimmung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials**

Eigenschaften	Solvay	Huntsman
d [nm] AECG/0,005% Dispex	94 ± 11	107 ± 5
d [nm] H <sub>2</sub> O	84 ± 15	93 ± 7
Zeta- Potential [mV] AECG/0,005% Dispex	-23,2	-25,4

Die für die Durchführung des Großversuchs hergestellte 35 %ige BaSO<sub>4</sub>-Suspension wurde zur vollständigen Charakterisierung ebenfalls mittels DLS vermessen. Es ergab sich eine stabile und homogene Partikelgrößenverteilung von 93 ± 11 nm.

#### 4.1.3 Filterstäube aus dem Technikum

Für die toxikologischen Untersuchungen wurden die Partikel von Filterstufe 7 des Impaktors und vom Endfilter miteinander vereinigt, was die Partikelfraktion kleiner 210 nm aus dem Rauchgas umfasste. In Summe ergab sich eine Menge von 7,3 mg Filterstaub des Referenztages; 13,76 mg des nanohaltigen Filtermaterials und 13,38 mg der Kampagne mit dem mikroskaligen BaSO<sub>4</sub>.

Aus den Filterstäuben wurde eine entsprechende Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt.

Die Suspensionen wurden mittels DLS hinsichtlich der Partikelgröße charakterisiert. Die ange-setzte Stocklösung des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> hatte eine Partikelgröße von 118 ± 13 nm, das Re-ferenzmaterial hatte eine Größe von 1320 ± 450 nm, das Material der nanodosierte Kampagne hatte mit einem Anteil von ca. 67 % Partikel mit 1147 ± 116 nm und mit einem Anteil von ca. 33 % kleinere Partikel mit 170 ± 17 nm. Das Mikromaterial enthielt zu 90 % Partikel mit einer Größe von 758 ± 38 nm und zu 10 % Partikel mit ca. 200 nm. Diese Partikelgrößenverteilung entspricht den realen Größenverteilungen nach Verbrennung im Technikum und anschließender Suspension in flüssigem Medium. Sie stellen damit reale Szenarien einer möglichen Frei-setzung in ökologischen Systemen dar (Baran und Quicker, 2017; Fraunhofer, 2017).

Zusätzlich wurden die Suspensionen hinsichtlich ihres Gehalts an Barium (berechnet als Bari-umsulfat), weiteren Metallen (Arsen, Blei, Cadmium, Chrom, Eisen, Kupfer, Nickel, Quecksilber und Zink) sowie etwaiger polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs) und Dioxinen untersucht.

Die Stocklösung des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> enthielt 1,02 mg/ml BaSO<sub>4</sub>. Ein Gehalt von 0,0033 mg/ml Zink wurde ebenfalls gemessen. Zink konnte in vergleichbaren Größenordnungen auch in den anderen drei Suspensionen gemessen werden. Die BaSO<sub>4</sub>-Gehalte lagen um Größen-ordnungen von 20-100fach unter dem Gehalt der Suspension des unverbrannten Nanomaterials. Das Referenzmaterial enthielt 0,0026 mg/ml BaSO<sub>4</sub>, das Nanofiltermaterial 0,013 mg/ml und das Mikrofiltermaterial 0,047 mg/ml BaSO<sub>4</sub>. Zusätzlich konnte in den verbrannten Materialien noch geringe Mengen an Chrom detektiert werde (Referenz 0,032 mg/ml, Nano 0,0043 mg/ml und Mikro 0,0015 mg/ml). Alle gemessenen Dioxine waren unterhalb der methodischen Bestimmungsgrenze und auch das in einer Probe in Spuren nachgewiesene PCB Acenaphthen war innerhalb der Messunsicherheit der Bestimmungsgrenze.

#### **4.1.4 Filterstäube aus dem Großversuch**

Analog zu den Proben der Technikumsversuche wurden auch für diese toxikologischen Unters-uchungen die auf dem Filter haftenden Partikel der Impaktorstufe 7 und des Endfilters vereinigt und eine Stocklösung mit einer Partikelkonzentration von 1 mg/ml hergestellt. Für die Suspensi-onen standen 7,96 mg des Filtermaterials des Referenztages und 7,98 mg des Messtages mit hin-zudosiertem nanoskaligem BaSO<sub>4</sub> zur Verfügung. Die Suspensionen der Filterrückstände aus dem Experiment mit Nanomaterialzugabe zeigten eine Partikelgrößenverteilung von 428 ± 110 nm und die Suspension der Partikel des Referenztages mit Größen von 68 ± 6 nm, 170 ± 10 nm und 550 ± 82 nm.

Die Bestimmung des BaSO<sub>4</sub>-Gehaltes ergab für die Suspension des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> einen Gehalt von 0,95 mg/ml BaSO<sub>4</sub> und 0,002 mg/ml Zink. Die Suspension des Filtermaterials des Referenzversuchs enthielt 0,007 mg/ml Blei, 0,001 mg/ml Cadmium, 0,0038 mg/ml Kupfer und

0,029 mg/ml Zink. Der Gehalt an BaSO<sub>4</sub> lag unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Suspension der Filterproben des Nano-Versuchstages enthielt 0,0026 mg/ml BaSO<sub>4</sub>; 0,005 mg/ml Blei; 0,0023 mg/ml Cadmium; 0,0045 mg/ml Kupfer und 0,023 mg/ml Zink.

Alle gemessenen Dioxine waren unterhalb der methodischen Bestimmungsgrenze. In den Suspensionen konnten Spuren von Fluoren und Pyren nachgewiesen werden. Beide Stoffe konnten auch in einer Blindprobe des AECG-Mediums gemessen werden und liegen in der Messunsicherheit der Bestimmungsgrenze.

#### **4.1.5 Ascheproben aus verschiedenen thermischen Prozessen**

Die Ascheproben stammen aus vier unterschiedlichen Verbrennungsszenarien bzw. sind die Filterstäube aus speziellen Industriezweigen mit individuellem Charakter, die durch die Firma Herding Filtertechnik zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich um thermisch behandeltes Molybdänoxid, um Flugasche, Perlitstaub und Schweißrauch.

Die Partikelsuspensionen in DMEM hatten Partikelgrößen von 314 ± 11 nm für Molybdänoxid, 111 ± 24 nm und 502 ± 24 nm für Perlitstaub, 125 ± 13 nm und 515 ± 111 nm für Schweißrauch sowie 134 ± 12 nm und 759 ± 114 nm für Flugasche.

Die Asche des Molybdänoxids besteht aus verschiedenen Oxiden des Molybdäns, aus Aluminiumoxid und Siliziumoxid sowie aus Kaliumchlorid.

Der Perlitstaub ist ein Gemisch aus Siliziumdioxid (Quarz), Anorthit (CaAl<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) und Dickit (Aluminiumsilikate). Der Schweißrauch besteht aus reinem Eisenoxid. Die Flugasche ist ein Mix aus verschiedenen mineralischen Bestandteilen, wie Calciumsulfat, Quarz, Eisenoxid, anderen Calciumverbindungen, Titandioxid und wasserhaltigen Sulfaten (Ettringite).

#### **4.2 Wirkung von nanoskaligem, unverbranntem BaSO<sub>4</sub>**

Zu Beginn der toxikologischen Untersuchungen erfolgte die Bestimmung der Vitalität der NHBEZ und PLZ nach Inkubation mit den Nanomaterialien von Solvay und Huntsman. Die Behandlungszeiten waren 24 h bzw. 72 h. Ein Vitalitätsverlust bis 20 % wurde als subtoxischer Konzentrationsbereich definiert. Die Versuche zur Bestimmung des Glutathiongehaltes, der Induktion von Apoptose sowie die Modulation inflammatorischer Zytokine wurden in diesem Konzentrationsbereich bzw. leicht darüber (d.h. im leicht toxischen Bereich) durchgeführt.

##### **4.2.1 Vitalität von Primärzellen**

###### **a) Resazurin**

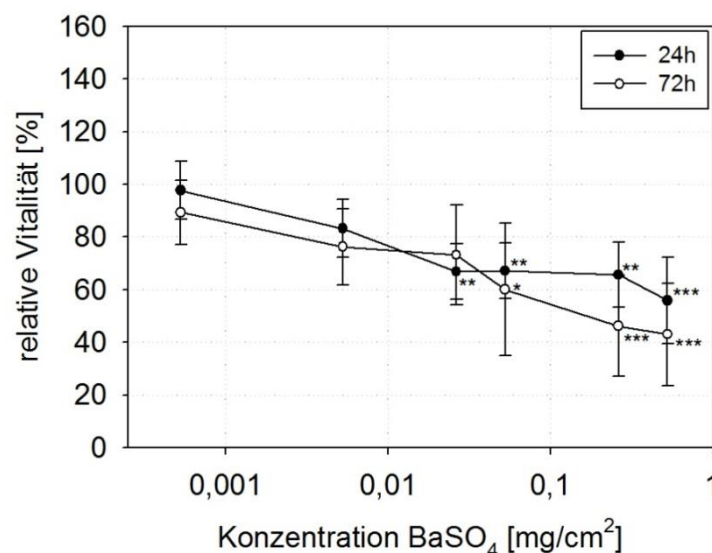
Im Resazurin-Assay zeigte sich ein dosis- und zeitabhängiger Vitalitätsverlust der NHBEZ und PLZ durch die Behandlung mit nanoskaligem BaSO<sub>4</sub> der Firma Solvay. Die NHBEZ zeigten ab einer BaSO<sub>4</sub>-Konzentration von 0,0263 mg/cm<sup>2</sup> eine signifikante Abnahme der Vitalität unter 80 % bei 24-stündiger Behandlung. Bei einer Inkubation von 72 h sank die Vitalität ebenfalls

unter 80 %. Der Verlust bei dieser Konzentration ist als nicht signifikant bewertet. Bei der höchsten Konzentration von 0,526 mg/cm<sup>2</sup> BaSO<sub>4</sub> lag die Vitalität nach 24 Stunden noch bei 56 %, während nach 72-stündiger Behandlung die Vitalität nur noch 43 % betrug (siehe Abbildung 4). Die PLZ zeigten sich bei einer Behandlungszeit von 24 Stunden unempfindlicher im Resazurin-Assay. So konnte bis zur höchsten Konzentration kein signifikanter Vitalitätsverlust gemessen werden. Nach einer 72-stündigen Inkubation der PLZ mit BaSO<sub>4</sub> sank die Vitalität ab einer Konzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> unter 80 % und bis auf 33 % Vitalität bei der höchsten BaSO<sub>4</sub>-Konzentration (Abbildung 5).

Das BaSO<sub>4</sub> von Huntsman bewirkte ebenfalls eine dosis- und zeitabhängige Abnahme der Vitalität. Bei einer 72-stündigen Behandlung der NHBEZ (Abbildung 6) konnte ein signifikanter Vitalitätsverlust ab einer BaSO<sub>4</sub>-Konzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> gemessen werden. Bei der höchsten Konzentration von 0,526 mg/cm<sup>2</sup> lag die Vitalität der NHBEZ nach 24 Stunden noch bei 80 % und sank somit nicht unterhalb des subtoxischen Bereichs. Bei einer längeren Behandlungsdauer von 72 Stunden sank die Vitalität bei dieser Konzentration auf 28 %.

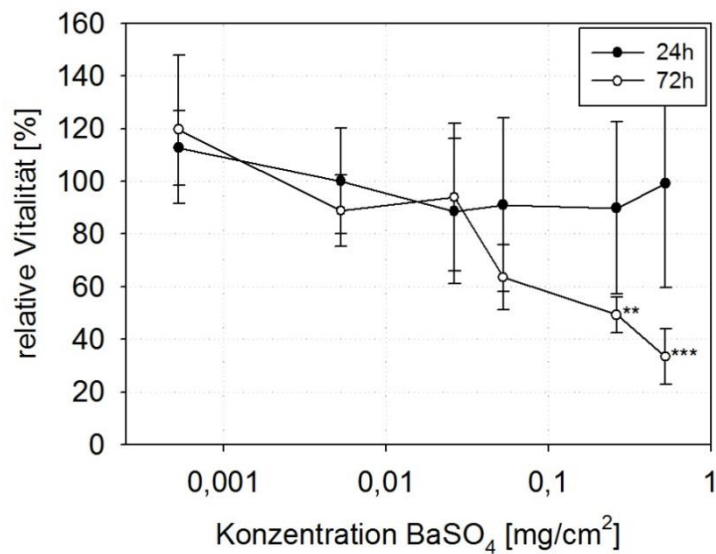
Der Effekt des BaSO<sub>4</sub> auf die PLZ (Abbildung 7) war für die beiden Behandlungszeiten weitgehend identisch. Nach 24 h kam es ab einer Konzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität auf 66 % (69 % Vitalität bei 72-stündiger Behandlung). Bei der längeren Behandlung bewirkten bereits 0,0263 mg/cm<sup>2</sup> einen signifikanten Vitalitätsverlust (78 % Vitalität). Für die höchste BaSO<sub>4</sub>-Konzentration waren nach 24 Stunden noch 61 % der PLZ vital bzw. 51 % nach 72 Stunden.

#### BaSO<sub>4</sub> von Solvay



**Abbildung 4: Relative Vitalität von NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen der Firma Solvay ermittelt durch den Resazurin-Test.**

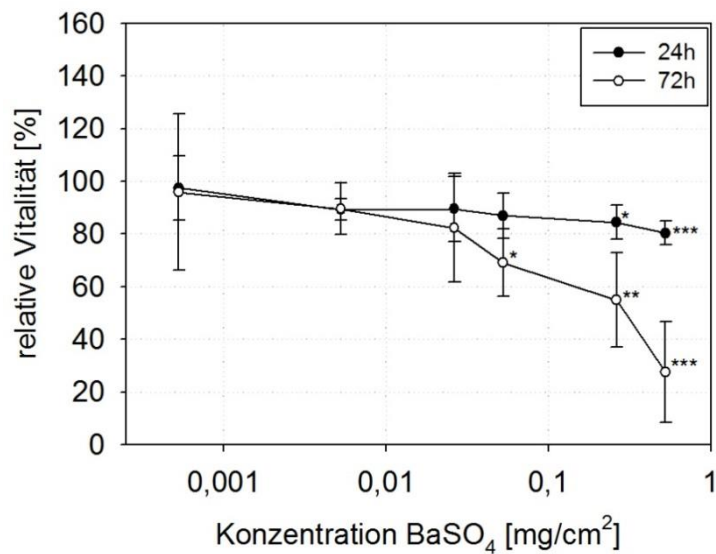
Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert ± SD (n = 3, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526; 0,0263; 0,0526; 0,263 und 0,526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)



**Abbildung 5: Relative Vitalität von PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen der Firma Solvay ermittelt durch den Resazurin-Test.**

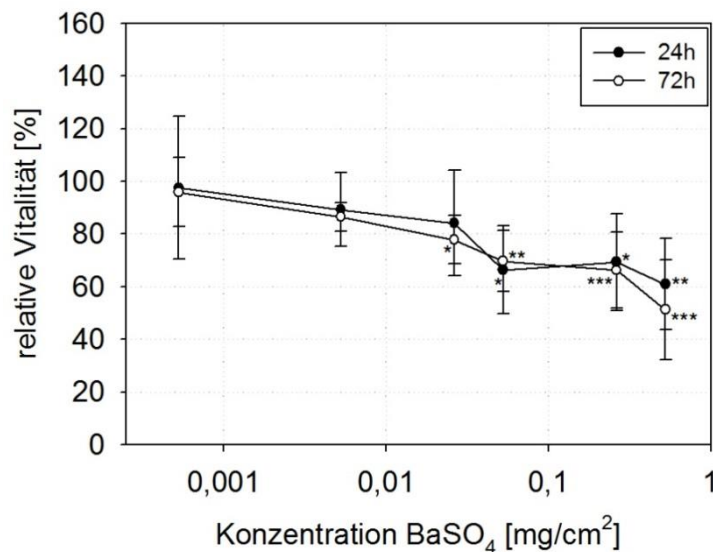
Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526; 0,0263; 0,0526; 0,263 und 0,526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### BaSO<sub>4</sub> von Huntsman



**Abbildung 6: Relative Vitalität von NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen der Firma Huntsman ermittelt durch den Resazurin-Test.**

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526; 0,0263; 0,0526; 0,263 und 0,526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)



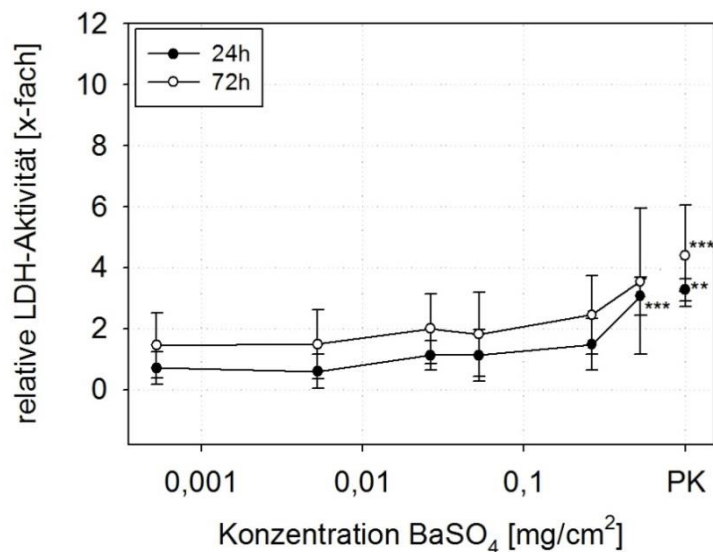
**Abbildung 7: Relative Vitalität von PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen der Firma Huntsman ermittelt durch den Resazurin-Test.**

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526; 0,0263; 0,0526; 0,263 und 0,526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### b) LDH

Ein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität im Medium und somit eine Schädigung der Zellmembran konnte im LDH-Test nur bei einer BaSO<sub>4</sub>-Konzentration von 0,526 mg/cm<sup>2</sup> des Solvay-Materials an den NHBEZ nach 24-stündiger Inkubation (Abbildung 8) und an den PLZ nach 72-stündiger Behandlung gemessen werden. So stieg die LDH-Aktivität in den NHBEZ nach 24 h auf das 3,06-fache und nach 72 h in den PLZ auf das 1,96-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Das BaSO<sub>4</sub> der Firma Huntsman bewirkte für beide Behandlungszeiträume bis zur höchsten Konzentration keine signifikant erhöhte LDH-Aktivität, d.h. Freisetzung von LDH in NHBEZ und PLZ, weshalb auf eine grafische Darstellung verzichtet wird. Die mitgeführte Positivkontrolle (PK; 0,01 % TritonX) führte in jedem Testansatz zu einer signifikanten LDH-Aktivität.



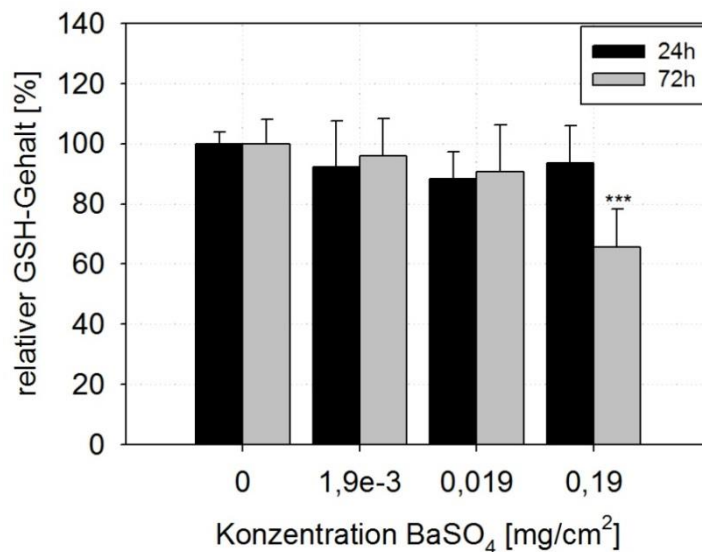
**Abbildung 8: Relative LDH-Aktivität im Medium von NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen von Solvay ermittelt durch den LDH-Test.**

Die Darstellung der LDH-Aktivität erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (rel. LDH-Aktivität ist 1) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526; 0,0263; 0,0526; 0,263 und 0,526 mg/cm<sup>2</sup>. Als Positivkontrolle diente eine 30-minütige Inkubation mit 0,01 % TritonX. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.2.2 Glutathiongehalt von Primärzellen

Der intrazelluläre Glutathiongehalt der Primärzellen wurde nach saurer Lyse der Zellen und der Reaktion mit Monobrombiman mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestimmt. Die Behandlung der Primärzellen mit nanoskaligem BaSO<sub>4</sub> von Solvay führte nur bei einer 72-stündigen Behandlung mit einer Konzentration von 0,19 mg/cm<sup>2</sup> BaSO<sub>4</sub> zu einer signifikanten Abnahme des zellulären Glutathiongehaltes der NHBEZ (auf 74 %) und PLZ (auf 66 %; Abbildung 9).

Über eine Behandlungszeit von 24 h bewirkte das Material von Solvay keine Veränderung des GSH-Gehaltes, ebenso wie das BaSO<sub>4</sub> von Huntsman, welches bei 24- und 72-stündiger Inkubation keinen Effekt auf den GSH-Gehalt in den NHBEZ und PLZ zeigte.



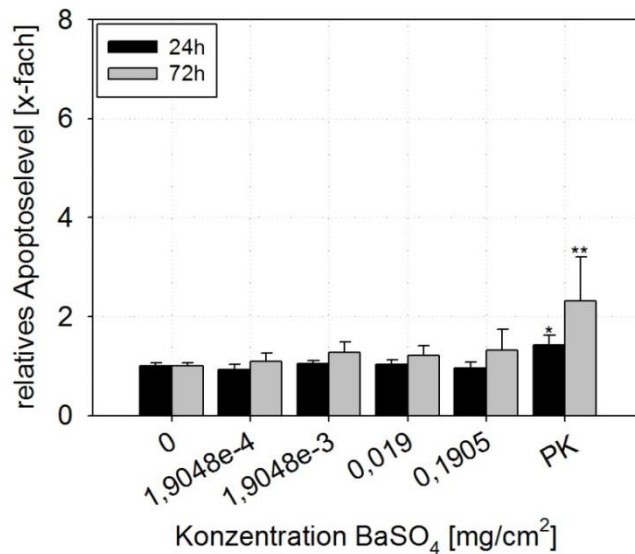
**Abbildung 9: Relativer Glutathiongehalt von PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen von Solvay ermittelt durch HPLC.**

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % rel. GSH-Gehalt) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,0019; 0,019 und 0,19 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.2.3 Apoptose von Primärzellen

Die Behandlung der NHBEZ und PLZ über 24 h bzw. 72 h mit nanoskaligem BaSO<sub>4</sub> der Firmen Solvay und Huntsman führte für beide Nanomaterialien zu keiner Induktion von Apoptose. Eine 30-minütige Behandlung der Zellen bei 55 °C löste Apoptose bei ca. 50 % und mehr der Zellen aus und belegt damit, dass die Primärzellen sensitiv auf apoptotische Stressoren reagieren und diese Behandlung als Positivkontrolle geeignet ist. Der Gehalt an apoptotischen Zellen wird als Apoptose-Level dargestellt, d.h. die für die Kontrollgruppe gemessene Anzahl apoptotischer Zellen entspricht einem Level von 1. Für die verwendeten Partikelkonzentrationen wurde das Verhältnis von apoptotischen Zellen der inkubierten Zellen zu der unbehandelten Kontrolle gebildet, so dass bei einer Induktion von Apoptose das Apoptose-Level ansteigt.





**Abbildung 10: Relatives Apoptose-Level von NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen von Solvay ermittelt durch Durchflusszytometrie am MUSE.**

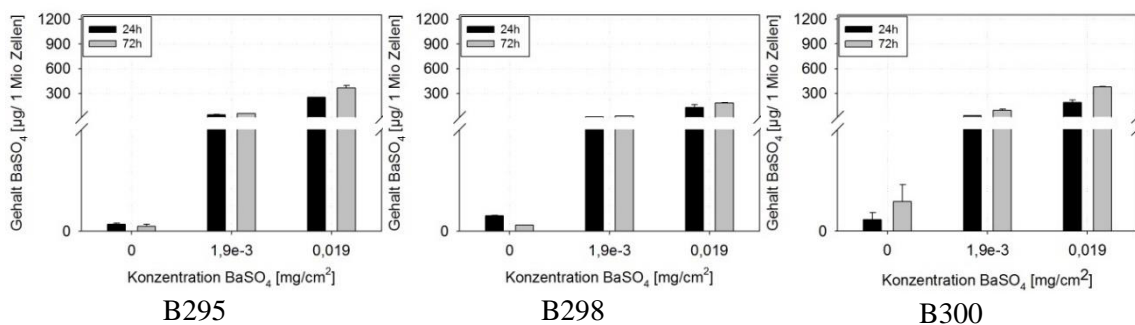
Die Darstellung des Apoptoselevels erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (rel. Apoptoselevel ist 1) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,00019; 0,0019; 0,019 und 0,19 mg/cm<sup>2</sup>. Als Positivkontrolle (PK) diente eine 30-minütige Behandlung der Zellen bei 55 °C. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.2.4 BaSO<sub>4</sub>-Aufnahme

##### a) Quantifizierung

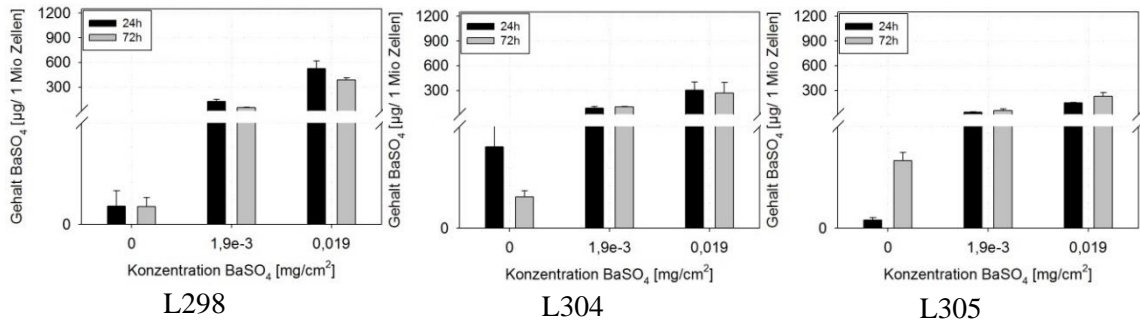
Die mittels ICP-MS quantifizierte Aufnahme der Partikel in die Zellen zeigt eine dosisabhängige Zunahme der aufgenommenen Partikelmenge. Eine eindeutige Zeitabhängigkeit konnte hingegen nicht festgestellt werden. Die Aufnahme ist bei beiden Zellmodellen (NHBEZ und PLZ) vergleichbar.

#### BaSO<sub>4</sub> von Solvay



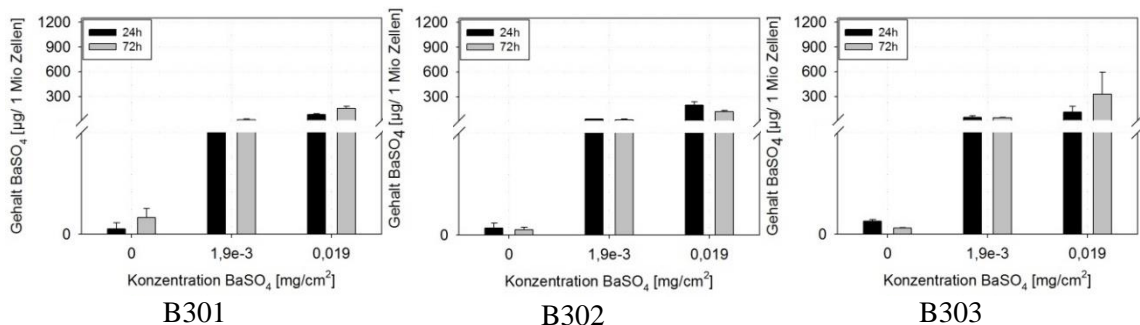
**Abbildung 11: Aufnahme der BaSO<sub>4</sub>-NP in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen von Solvay gemessen mit ICP-MS.**

Die Darstellung des BaSO<sub>4</sub>-Gehaltes erfolgt absolut als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,0019 und 0,019 mg/cm<sup>2</sup>.

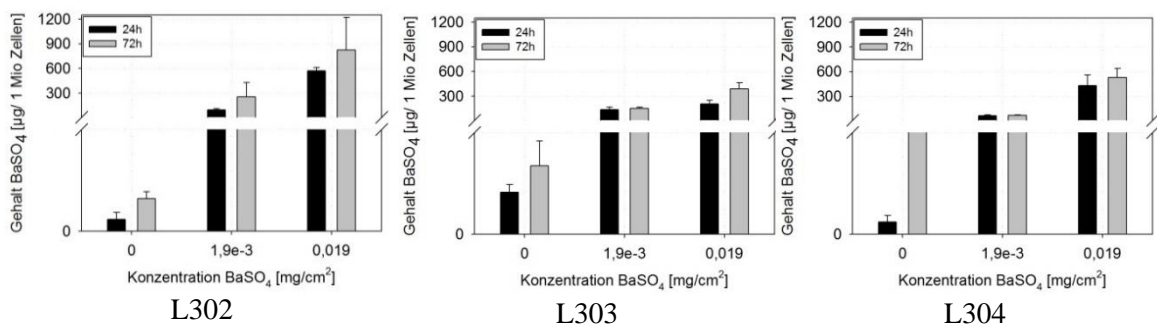


**Abbildung 12: Aufnahme der BaSO<sub>4</sub>-NP in PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen von Solvay gemessen mit ICP-MS.**  
Die Darstellung des BaSO<sub>4</sub>-Gehaltes erfolgt absolut als Mittelwert ± SD (n = 1, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,0019 und 0,019 mg/cm<sup>2</sup>.

### BaSO<sub>4</sub> von Huntsman



**Abbildung 13: Aufnahme der BaSO<sub>4</sub>-NP in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen von Huntsman gemessen mit ICP-MS.**  
Die Darstellung des BaSO<sub>4</sub>-Gehalts erfolgt als absoluter Wert als Mittelwert ± SD (n = 1, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,0019 und 0,019 mg/cm<sup>2</sup>.

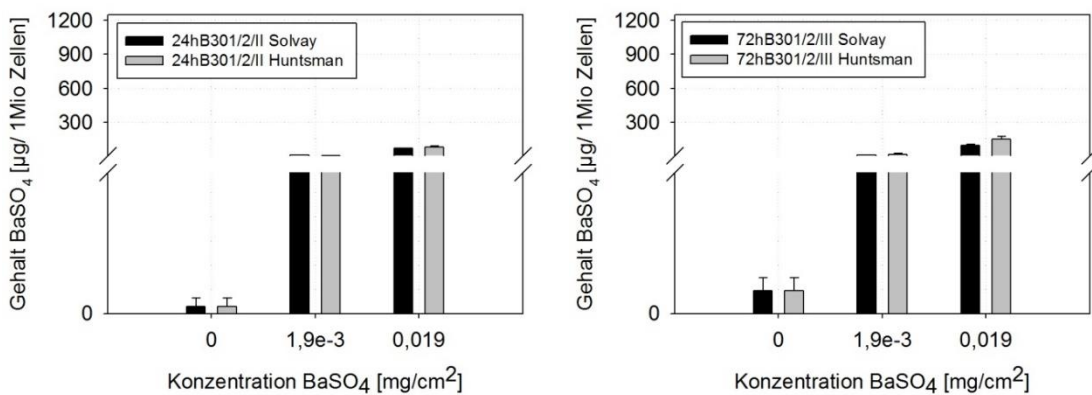


**Abbildung 14: Aufnahme der BaSO<sub>4</sub>-NP in PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen von Huntsman gemessen mit ICP-MS.**  
Die Darstellung des BaSO<sub>4</sub>-Gehalts erfolgt als absoluter Wert als Mittelwert ± SD (n = 1, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,0019 und 0,019 mg/cm<sup>2</sup>.

Die in den NHBEZ quantifizierte Menge Barium (berechnet als BaSO<sub>4</sub>) lag bei einer 24-stündigen Exposition von 0,019 mg/cm<sup>2</sup> bei ~ 162 µg BaSO<sub>4</sub>/1Mio Zellen und bei 72 Stunden bei ~ 254 µg/1Mio Zellen.

Die Gehalte in den PLZ waren etwas höher. Bei derselben BaSO<sub>4</sub>-Konzentration von 0,019 mg/cm<sup>2</sup> lag der Gehalt nach 24-stündiger Behandlung bei 364 µg/1Mio Zellen bzw. bei ~ 436 µg/1Mio Zellen nach 72 Stunden.

In einer direkten Gegenüberstellung beider Materialien (Abbildung 15) an den NHBEZ eines Patienten (B301) konnte gezeigt werden, dass sich die Materialien von Solvay und Huntsman im Hinblick auf die aufgenommene Partikelmenge in die Zellen nicht unterscheiden.

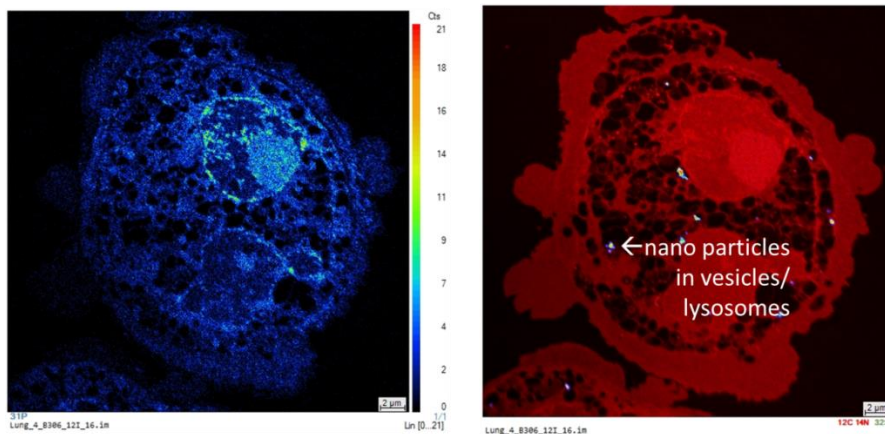


**Abbildung 15:** Aufnahme der BaSO<sub>4</sub>-NP in die NHBEZ des Patienten B301 nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen von Solvay & Huntsman gemessen mit ICP-MS.

Die Darstellung des BaSO<sub>4</sub>-Gehaltes erfolgt absolut als Mittelwert ± SD (n = 1, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,0019 und 0,019 mg/cm<sup>2</sup>.

#### b) Lokalisation der Partikel

Die aufgenommenen NP sind vorwiegend in den Lysosomen der NHBEZ zu finden. Eine Aufnahme der Partikel in den Zellkern wurde nicht beobachtet. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte durch die Fachkollegen in Frankreich.

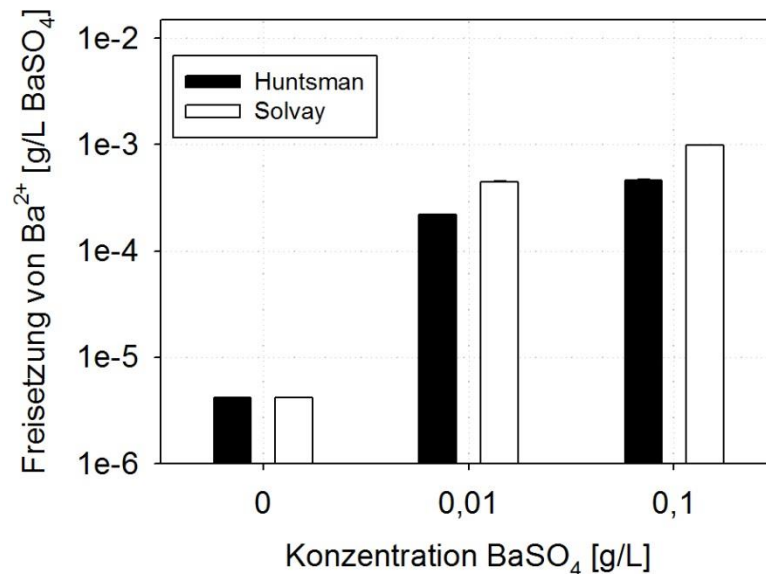


**Abbildung 16:** Lokalisation der BaSO<sub>4</sub>-NP in NHBEZ bei einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/ml. (links: 31P, rechts: Overlay N(red) + S(bright spots); Aufnahmen von AG Prof. D. Schaumlöffel

#### 4.2.5 Freisetzung von Ba<sup>2+</sup>-Ionen

Die Bestimmung freigesetzter Ba<sup>2+</sup>-Ionen erfolgte nach einer 72-stündigen, zellfreien Inkubation der Partikel in AECG-Medium. Nach der Behandlungszeit wurde die Suspension vollständig in ein Zentrifugationsröhrchen mit Filtereinheit überführt und abzentrifugiert. Durch die Filtereinheit wurden alle BaSO<sub>4</sub>-NP größer 3kDa abgetrennt und nur die Bariumionen in das Filtrat überführt. Anschließend wurde das Filtrat mittels ICP-MS analysiert. Es konnte eine dosisabhängige Freisetzung von Bariumionen in das Medium während der Inkubationsdauer gezeigt werden. Bei

einer Ausgangskonzentration von 0,01 mg/ml BaSO<sub>4</sub> wurden 2,18 x 10<sup>-4</sup> g/L für das Huntsman-Material und 4,43 x 10<sup>-4</sup> g/L für das Solvay-Material gemessen. Die Werte für die 0,1 mg/ml eingesetzte Konzentration lagen bei 4,63 x 10<sup>-4</sup> (Huntsman) bzw. 9,86 x 10<sup>-4</sup> g/L BaSO<sub>4</sub>.



**Abbildung 17: Relative Ba<sup>2+</sup>-Ionenfreisetzung nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen ermittelt durch ICP-MS.**

Die Darstellung der freigesetzten Ionen erfolgt absolut [g/L] als Mittelwert ± SD (n = 1, N = 2). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,01 und 0,1 g/L.

### 4.3 Vergleich des unverbrannten nano-BaSO<sub>4</sub> mit geblühtem nano-BaSO<sub>4</sub>

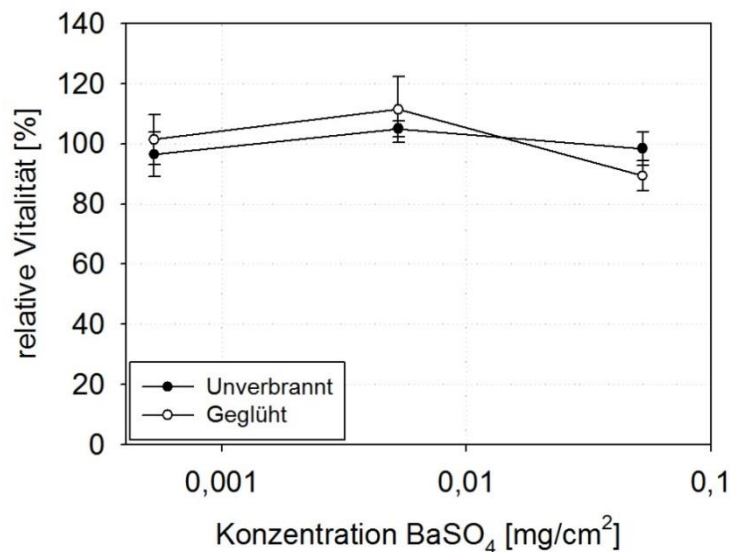
Die vergleichenden Untersuchungen des unverbrannten und geblühten BaSO<sub>4</sub> erfolgten in direkter Gegenüberstellung ausschließlich an NHBEZ.

#### 4.3.1 Vitalität von Primärzellen

##### a) Resazurin

Die zytotoxischen Untersuchungen zeigten keinen signifikanten Vitalitätsverlust der NHBEZ nach der Inkubation mit den beiden Nanomaterialien.

Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> lag die Vitalität der NHBEZ beispielsweise noch bei rund 100 % nach 24 Stunden und bei 98 % nach 72 Stunden Inkubation. Beide Materialien zeigten einen vergleichbaren Effekt auf die Vitalität. Es wurden die 72 Stunden Versuche graphisch dargestellt.



**Abbildung 18: Relative Vitalität von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen (unverbrannt vs. geglüht) ermittelt durch den Resazurin-Test.**

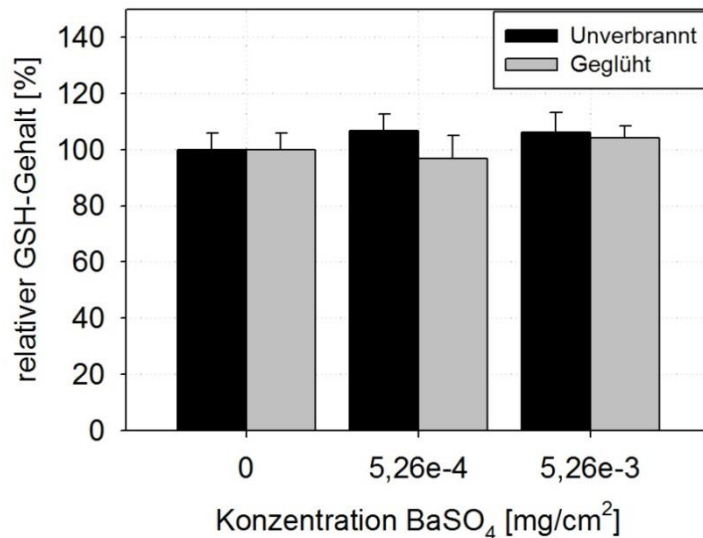
Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 2, N = 3). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### b) LDH

Die Inkubation der NHBEZ mit den beiden Nanomaterialien über 24 und 72 Stunden bewirkte in den NHBEZ von zwei unabhängigen Patienten (B306 und B307) keine Freisetzung von Laktatdehydrogenase bis zur höchsten verwendeten Partikelkonzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>. Es konnte keine Aktivität in den Überständen gemessen werden. Die im Versuchsansatz mitgeführte Positivkontrolle bewirkte eine signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität in den NHBEZ (p < 0,01). Auf eine grafische Darstellung der Ergebnisse wird aufgrund des ausbleibenden Effekts verzichtet.

#### 4.3.2 Glutathiongehalt von Primärzellen

Das unverbrannte sowie das geglühte Nano-BaSO<sub>4</sub> bewirkten für die beiden getesteten Partikelkonzentrationen keine Veränderung des intrazellulären Glutathiongehaltes in NHBEZ bei einer 24- bzw. 72-stündigen Behandlung. Die Gehalte der 72-stündigen Inkubation sind Abbildung 19 zu entnehmen.



**Abbildung 19: Relativer Glutathiongehalt von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen (unverbrannt vs. geglüht) ermittelt durch HPLC.**

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % rel. GSH-Gehalt) als Mittelwert ± SD (n = 2, N = 2). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526 und 0,00526 mg/cm<sup>2</sup>. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.3.3 Inflammatorische Zytokine

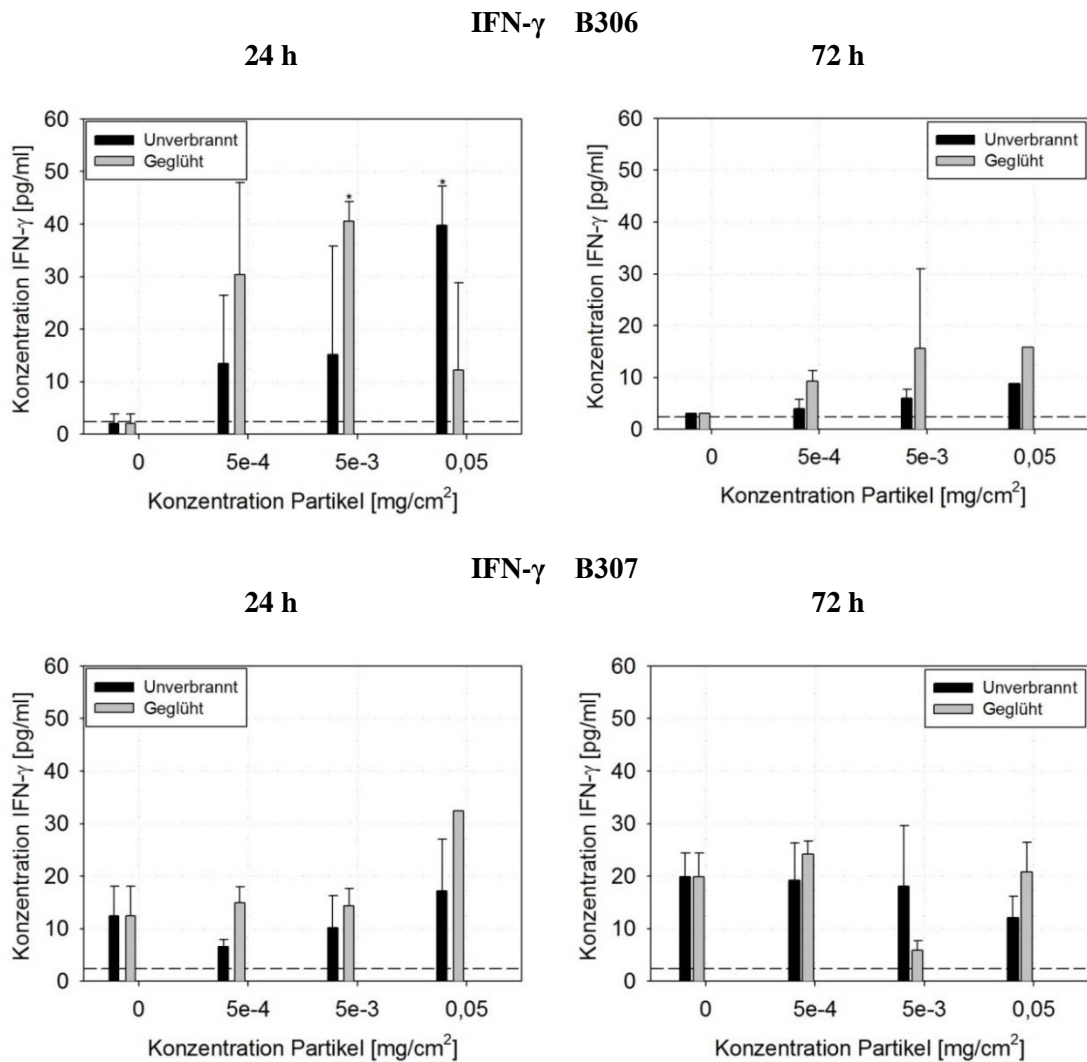
Die Auswirkungen des geglühten sowie des unverbrannten Nano-BaSO<sub>4</sub> auf 13 inflammatorische Zytokine wurden in den NHBEZ von zwei unabhängigen Patienten untersucht. Von den 13 getesteten Zytokinen konnten nur 8 in allen Proben oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden. Für die inflammatorischen Zytokine IFN- $\alpha$ , IL-33, IL-10, IL-12p70 und IL-17A konnten keine aussagekräftigen Gehalte oberhalb der methodischen Nachweisgrenze gemessen werden. Die Werte lagen meistens unterhalb dieser. Eine Aussage zu eventuellen Effekten auf diese fünf Zytokine kann somit nicht getroffen werden.

Für das IFN- $\gamma$  (Abbildung 20) sowie für IL-8 (Abbildung 21) konnte eine Zunahme des Gehaltes mit steigender Nanopartikel-Konzentration gemessen werden. Diese Zunahme ist jedoch nicht von der Inkubationsdauer abhängig und für die NHBEZ der beiden Patienten nicht identisch.

So stieg der IFN- $\gamma$ -Gehalt bei Behandlung des Patienten B306 mit 0,05 mg/cm<sup>2</sup> unverbranntem BaSO<sub>4</sub> über 24 h auf das 19-fache (39,8 pg/ml), wohingegen der IFN- $\gamma$ -Gehalt bei identischen Inkubationsbedingungen in den NHBEZ des Patienten B307 nur auf das 1,4-fache (17,2 pg/ml) stieg. Das geglühte BaSO<sub>4</sub> erhöhte bei einer Konzentration von 0,005 mg/cm<sup>2</sup> BaSO<sub>4</sub> und einer 24-stündigen Behandlung den IFN- $\gamma$ -Gehalt auf das 20-fache (40,6 pg/ml). 0,05 mg/cm<sup>2</sup> BaSO<sub>4</sub> erhöhten bei Patient B307 den IFN- $\gamma$ -Gehalt nur auf das 2,6-fache (32,4 pg/ml).

Eine Behandlung über 72 h führte bei B306 lediglich zu einer 2,9-fachen Erhöhung (unverbranntes BaSO<sub>4</sub>) bzw. 5,3-fache Erhöhung (geglühtes BaSO<sub>4</sub>). Bei Patient B307 hatte die 72-stündige Behandlung sogar eine Abnahme des IFN- $\gamma$ -Gehalts bei steigender Konzentration des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> zur Folge (nur noch 61 % des Gehaltes der Kontrolle) bzw. zeigte das geglühte

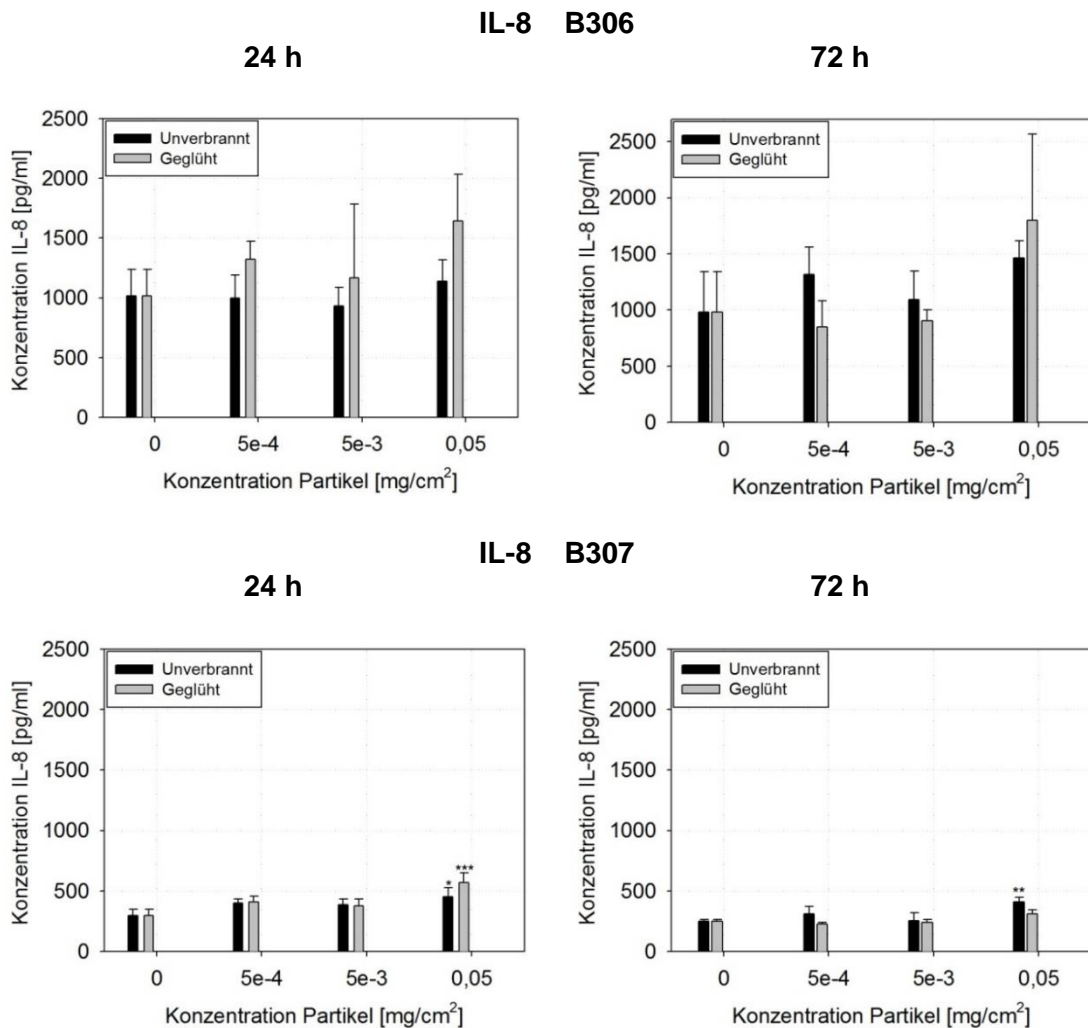
BaSO<sub>4</sub> keinen Einfluss auf das Zytokin. Die Abnahme konnte mit keinem p-Wert kleiner 5 % gesichert werden.



**Abbildung 20: Konzentration des Zytokins IFN- $\gamma$  in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und des geglühten BaSO<sub>4</sub> ermittelt durch FACS-Analyse.**

Die Darstellung der Konzentration erfolgt in pg/ml als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1; N = 2). Die Partikelkonzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>. Die methodische Nachweisgrenze ist als Referenzlinie angegeben. (\*p < 0,05 Signifikanz zur Kontrolle)

Das unverbrannte BaSO<sub>4</sub> erhöhte den IL-8-Gehalt der NHBEZ um das 1,1-fache (B306) bzw. um das 1,5-fache (B307) bei einer 24-stündigen Behandlung. Eine verlängerte Behandlung über einen Zeitraum von 72 h erhöhte den IL-8-Gehalt um das 1,5-fache (B306) bzw. das 1,6-fache (B307). Das geglühte BaSO<sub>4</sub> erhöhte den Gehalt von IL-8 ebenfalls in den NHBEZ beider Patienten. Nach 24 h um das 1,6-fache (B306) bzw. 1,9-fache (B307) und nach 72 h um das 1,8-fache (B306) bzw. das 1,3-fache (B307).



**Abbildung 21: Konzentration des Zytokins IL-8 in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und des geglühten BaSO<sub>4</sub> ermittelt durch FACS-Analyse.**

Die Darstellung der Konzentration erfolgt in pg/ml als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1; N = 2). Die Partikelkonzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>. Die methodische Nachweisgrenze ist als Referenzlinie angegeben. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

Die inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 und TNF- $\alpha$  waren in den NHBEZ des Patienten B306 generell höher exprimiert als in den NHBEZ des Patienten B307. Für alle vier Zytokine konnte in den NHBEZ beider Patienten keine dosis- oder zeitabhängige Veränderung durch die Behandlung mit den Nanopartikeln nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die Nanopartikel keinen Effekt auf den Gehalt von IL-18 oder IL-23. Auf eine grafische Darstellung dieser Zytokin-Gehalte wird deshalb verzichtet. Es konnte kein Unterschied zwischen dem unverbrannten und dem geglühten BaSO<sub>4</sub> festgestellt werden.

#### 4.4 Wirkung der Stäube aus dem Technikum

Die toxikologischen Untersuchungen mit den Proben des Technikums erfolgten an den NHBEZ eines Patienten (B306). Es wurden die Effekte des Materials des Referenzversuches (Referenz = reine Holzpellets), des Nano- und Mikroversuchs (Nano = Pellets mit nanoskaligem BaSO<sub>4</sub>; Mikro = Pellets mit mikroskaligem BaSO<sub>4</sub>) und des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> untersucht.

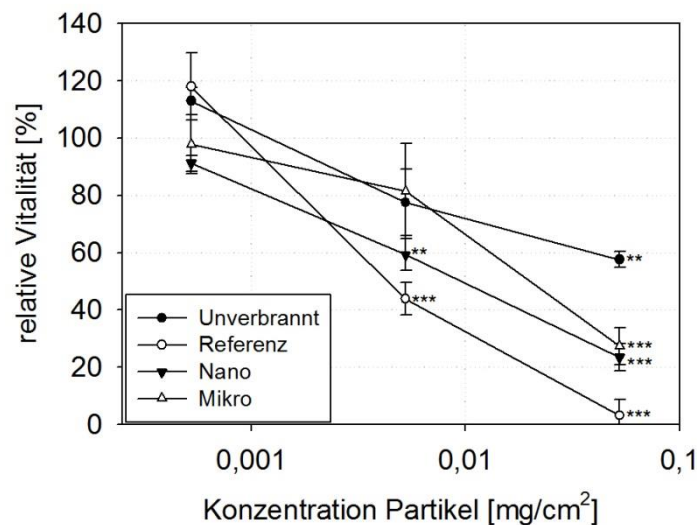


Anzumerken ist, dass die Suspension des Referenzmaterials eine sehr starke Azidität aufwies (mit pH-Papier wurde ein pH von 2 ermittelt). Diese wurde zur realistischen Darstellung der Filterproben vor der Zellinkubation nicht neutralisiert.

#### 4.4.1 Vitalität von Primärzellen

##### a) Resazurin

Im 24-Stunden-Resazurin-Assay konnte für das mikroskalige BaSO<sub>4</sub> keine Beeinflussung der Vitalität der NHBEZ festgestellt werden. Das nanoskalige BaSO<sub>4</sub> (unverbrannt), das Referenzmaterial sowie das Nanomaterial bewirkten eine Abnahme vitaler Zellen mit steigender Partikelkonzentration. Signifikant waren dabei die 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> des Referenz- (1 % vitale Zellen) und des Nanomaterials (68 % vitale Zellen). Bei einer 72-stündigen Behandlung (Abbildung 22) bewirkten alle vier Materialien einen Verlust vitaler NHBEZ. Eine Partikelkonzentration von 0,00526 mg/cm<sup>2</sup> führte zu einem Vitalitätsverlust von über 20 % (signifikant für Nano und Referenz). Die höhere Konzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> senkte die Vitalität der Zellen signifikant auf 57 % (unverbranntes BaSO<sub>4</sub>), 3 % (Referenz), 23 % (Nano) und 27 % (Mikro).

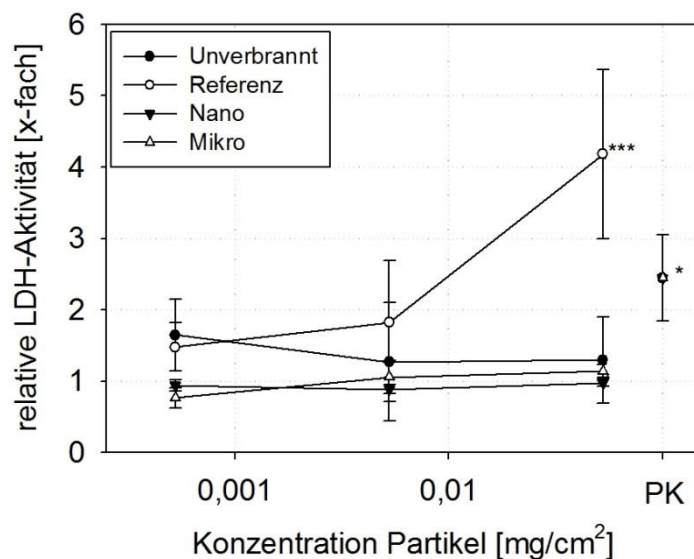


**Abbildung 22: Relative Vitalität von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- (reine Holzpellets), Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch den Resazurin-Test.**

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1, N = 3). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

##### b) LDH

Im LDH-Assay konnte für die Materialien Unverbrannt, Nano und Mikro für beide Behandlungszeiträume keine Freisetzung von LDH gemessen werden. Das Referenzmaterial unterschied sich bei 24-stündiger Behandlung (Abbildung 23) von den übrigen drei Materialien (signifikante Zunahme der LDH-Aktivität bei 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> auf das 4,2-fache). Dieser Unterschied konnte bei längerer Behandlung nicht bestätigt werden.

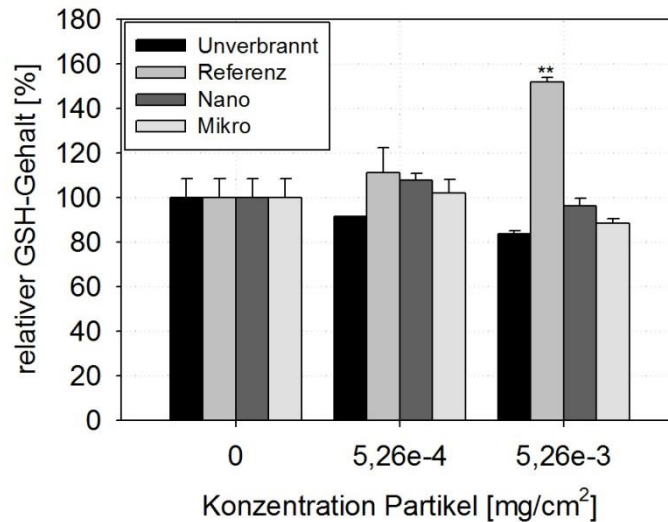


**Abbildung 23: Relative LDH-Aktivität von NHBEZ nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- (reine Holzpellets), Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch den LDH-Test.**

Die Darstellung der LDH-Aktivität erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (rel. LDH-Gehalt ist 1) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1, N = 3). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>. Positivkontrolle war 0,01 % TritonX. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.4.2 Glutathiongehalt von Primärzellen

Die NHBEZ zeigten durch die Behandlung mit den verschiedenen Materialien keine dosis- oder zeitabhängige Veränderung des zellulären Glutathiongehaltes bis zur höchsten getesteten Konzentration von 0,00526 mg/cm<sup>2</sup>. Nur für das Referenzmaterial konnte für diese Konzentration, bei einer Behandlungszeit von 24 Stunden, eine signifikante Erhöhung des GSH-Gehaltes auf 152 % gemessen werden (Abbildung 24). Nach 72 Stunden Inkubation konnte diese Erhöhung nicht gezeigt werden.

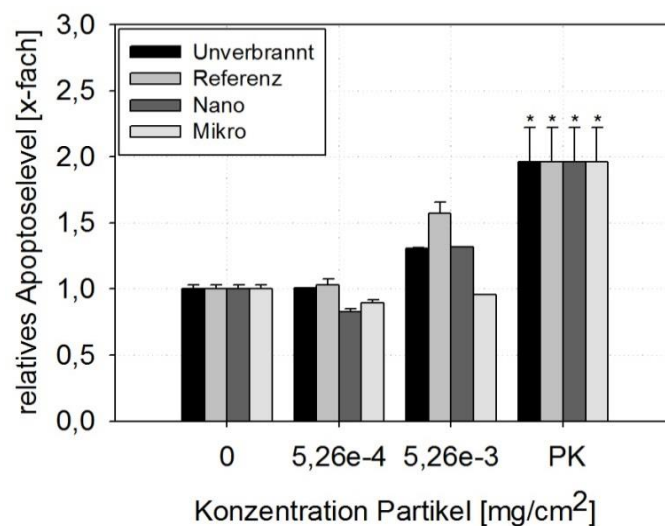


**Abbildung 24: Relativer Glutathiongehalt von NHBEZ nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- (reine Holzpellets), Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch HPLC.**

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % rel. GSH-Gehalt) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1, N = 2). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.4.3 Apoptose von Primärzellen

Die Inkubation der NHBEZ mit den Partikeln des Technikumsversuchs führte weder bei einer 24-stündigen noch bei einer 72-stündigen Behandlung zu einer statistisch signifikanten Induktion von Apoptose.



**Abbildung 25: Relative Apoptose-Level von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- (reine Holzpellets), Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch Durchflusszytometrie am MUSE.**

Die Darstellung des Apoptoselevels erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (rel. Apoptoselevel ist 1) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1, N = 2). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526 und 0,00526 mg/cm<sup>2</sup>. Als Positivkontrolle diente eine 30-minütige Behandlung der Zellen bei 55 °C. (\* p < 0,05 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.4.4 Inflammatorische Zytokine von Primärzellen

Wie auch bei den vergleichenden Versuchen von unverbranntem und geglühtem nanoskaligem BaSO<sub>4</sub> konnten die Zytokine IL-10, IL-12p70, IL-17A und IL-33 in den Versuchen mit den Filterstäuben des Technikums nicht oberhalb der methodischen Nachweisgrenze ermittelt werden.

Die Zytokine IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-18 und TNF- $\alpha$  waren nachweisbar, wurden jedoch durch die Inkubation mit den verschiedenen Partikeln nicht beeinflusst.

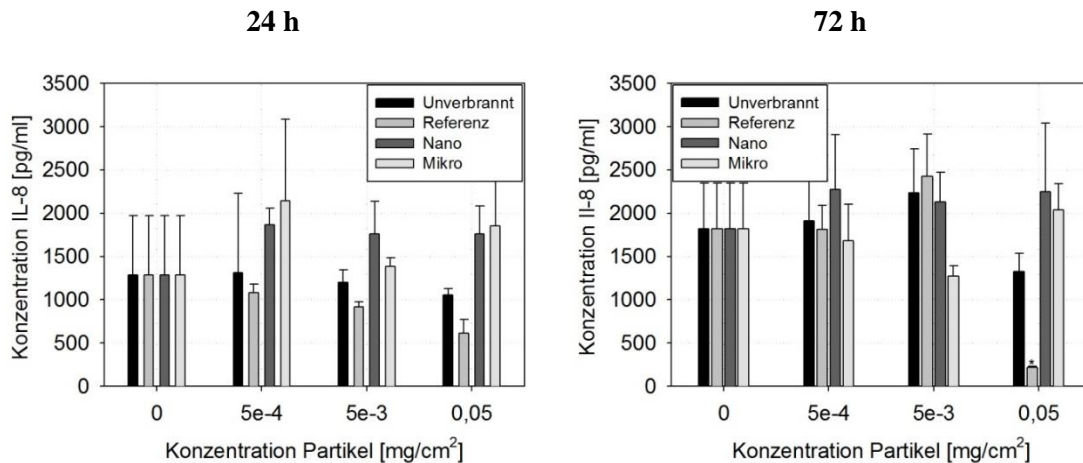
IL-6 zeigte bei der vergleichenden Untersuchung der getesteten Materialien nach 72-stündiger Inkubation und einer Konzentration von 0,00526 mg/cm<sup>2</sup> einen signifikanten Unterschied im Gehalt der NHBEZ zwischen der Behandlung mit unverbranntem BaSO<sub>4</sub>, welches IL-6 auf 325 pg/ml erhöhte (das 2,1-fache), im Vergleich zu dem Referenzmaterial (die reinen Holzpellets), welches den IL-6-Gehalt auf 72 pg/ml reprimierte und dem mikroskaligen BaSO<sub>4</sub>, welches den IL-6-Gehalt auf 61 pg/ml reprimierte.

Das Zytokin IL-1 $\beta$  war bei einer 72-stündigen Inkubation mit 0,000526 mg/cm<sup>2</sup> des Nanomaterials signifikant um das 3,2-fache erhöht (31,5 pg/ml) im Vergleich zur Kontrolle. Ein signifikanter Materialunterschied zeigte sich bei dieser Konzentration zwischen dem Nanomaterial und dem mikroskaligen BaSO<sub>4</sub>, welches nur 11,3 pg/ml IL-6 enthielt.

MCP-1 wurde durch das Referenzmaterial (0,0526 mg/cm<sup>2</sup>) nach 24-stündiger Behandlung signifikant um 40 % des Kontrollgehaltes abgesenkt. Nur bei einer Konzentration von 0,000526 mg/cm<sup>2</sup> unterschieden sich die MCP-1-Gehalte in den NHBEZ signifikant nach der Behandlung mit dem unverbrannten BaSO<sub>4</sub> (leichte Erhöhung um das 1,2-fache), dem nanoskaligen BaSO<sub>4</sub> (Absenkung von 3 %) und dem mikroskaligen BaSO<sub>4</sub> (Absenkung um 26 %).

IL-8 (Abbildung 26) wurde durch eine 72-stündige Behandlung mit dem Referenzmaterial signifikant um 87,8 % im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt (Gehalt von 221 pg/ml). Dieser Effekt unterschied sich zusätzlich materialspezifisch zu dem Nanomaterial (Gehalt 1,2-fach erhöht) und dem mikroskaligen BaSO<sub>4</sub> (2035 pg/ml = 1,1-fache der Kontrolle).

## IL-8



**Abbildung 26: Konzentration des Zytokins IL-8 in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz-, Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch FACS-Analyse.**

Die Darstellung der Konzentration erfolgt in pg/ml als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 1$ ,  $N = 2$ ). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>. Die methodische Nachweisgrenze ist als Referenzlinie angegeben. (\*  $p < 0,05$  Signifikanz zur Kontrolle)

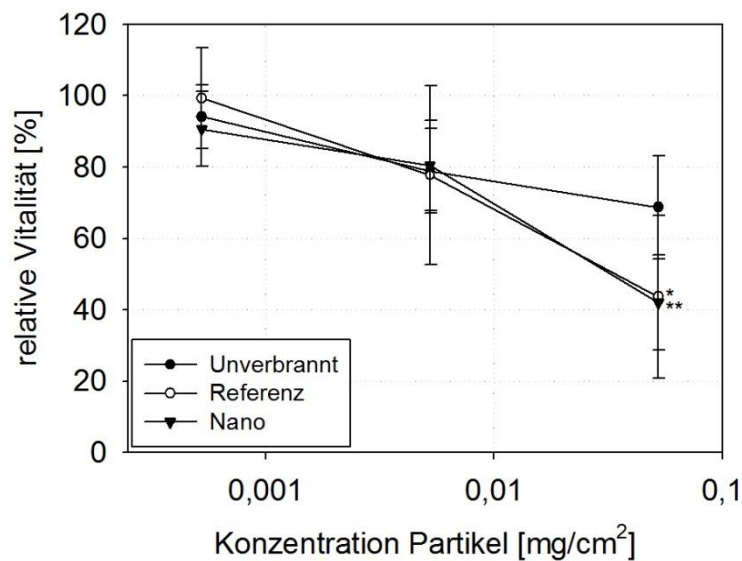
### 4.5 Wirkung der Stäube aus dem Großversuch

Die Untersuchung der Filterproben des Großversuchs in der MVA Weisweiler erfolgte an den NHBEZ von zwei unabhängigen Patienten B304 und B305. Der Umfang der toxikologischen Untersuchungen entsprach mit der Bestimmung der Vitalität, der LDH-Aktivität, des GSH-Gehaltes, der Induktion von Apoptose und inflammatorischer Zytokine, denen des Technikumsversuchs.

#### 4.5.1 Vitalität von Primärzellen

##### a) Resazurin

Die Filterstäube des Großversuchs zeigten im Resazurin-Assay keine signifikanten, materialspezifischen Unterschiede. Das Referenzmaterial, welches am Tag vor der Zugabe des BaSO<sub>4</sub> aus der Abluft der MVA gesammelt wurde, bewirkte im 24 h-Versuch keine Verringerung der Vitalität bis zu einer Partikelkonzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>. Das unverbrannte BaSO<sub>4</sub> sowie das Nanomaterial bewirkten einen Vitalitätsverlust von 25 % bei dieser Konzentration, welcher aber nicht signifikant war. Bei der längeren Behandlung über 72 h (Abbildung 27) sank der Anteil vitaler Zellen bereits ab einer Partikelkonzentration von 0,00526 mg/cm<sup>2</sup> unter 80 % für alle drei Materialien. Bei der höheren Konzentration waren bei dem unverbrannten BaSO<sub>4</sub> noch 69 % der Zellen vital. Das Referenz- und Nanomaterial führte zu einer Abnahme der Zellvitalität auf ca. 43 %, die statistisch signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war.

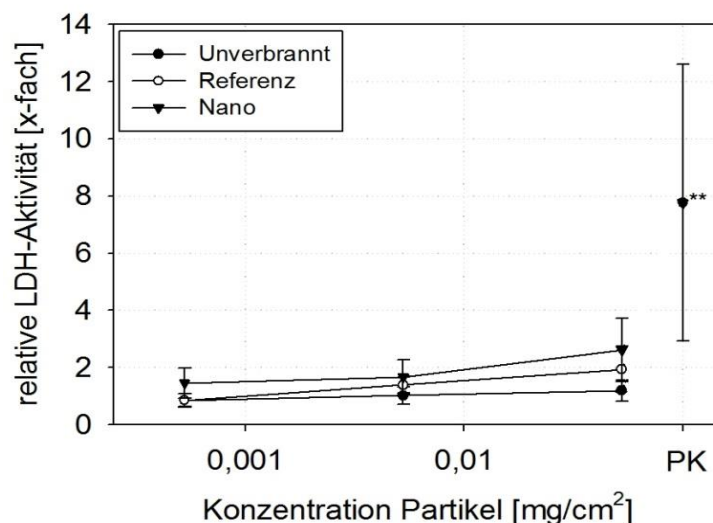


**Abbildung 27: Relative Vitalität von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- und Nanoversuchs ermittelt durch den Resazurin-Test.**

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 2, N = 3). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### b) LDH

Die drei Materialien des Großversuchs bewirkten bei einer 24-stündigen bzw. 72-stündigen Inkubation der NHBEZ keine Freisetzung von LDH für die getesteten Konzentrationen. Die Funktionalität des Tests wurde durch eine mitgeführte Positivkontrolle bestätigt.

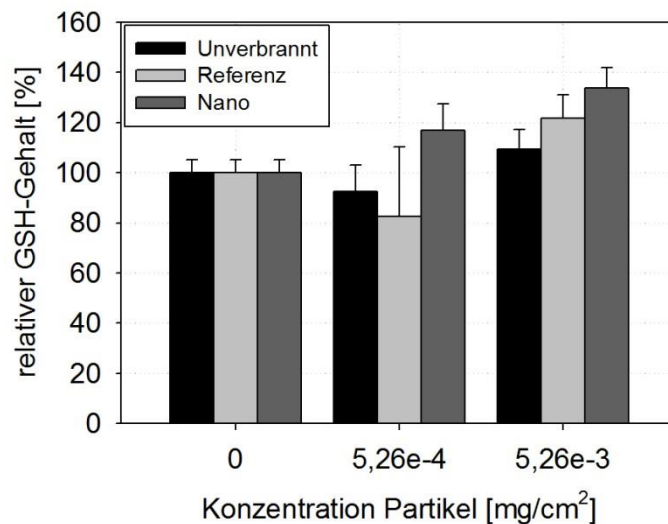


**Abbildung 28: Relative LDH-Aktivität von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- und Nanoversuchs ermittelt durch den LDH-Test.**

Die Darstellung der LDH-Aktivität erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (rel. LDH-Aktivität ist 1) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 2, N = 3). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>. Positivkontrolle war 0,01 % TritonX. (\*\*p < 0,01 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.5.2 Glutathiongehalt von Primärzellen

Die Bestimmung des Glutathiongehaltes der NHBEZ mittels HPLC zeigte für die drei Materialien Unverbrannt, Nano und Referenz keine Veränderung der GSH-Gehalte für die beiden Behandlungszeiträume (Abbildung 29 für 72 h).

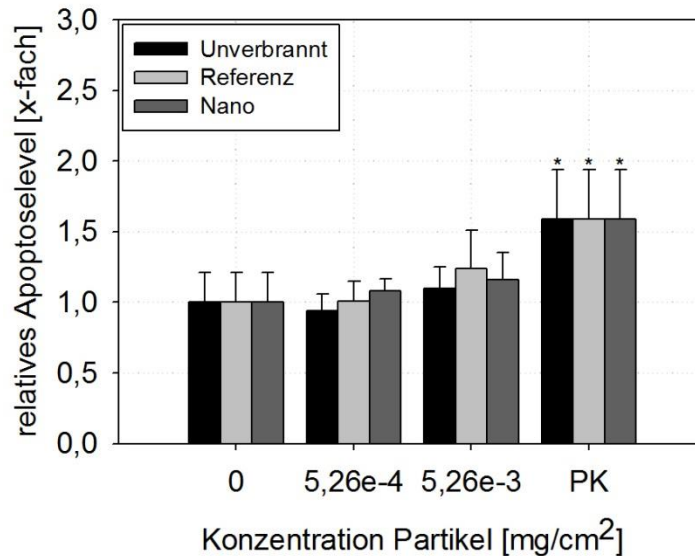


**Abbildung 29: Relativer Glutathiongehalt von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- und Nanoversuchs ermittelt durch HPLC.**

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % rel. GSH-Gehalt) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 2, N = 2). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

### 4.5.3 Apoptose von Primärzellen

Die Filterproben des Großversuches führten zu keiner Induktion von Apoptose nach 24- bzw. 72-stündiger Behandlung (Abbildung 30) der NHBEZ.



**Abbildung 30: Relative Apoptose-Level von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen ermittelt durch Durchflusszytometrie am MUSE.**

Die Darstellung des Apoptoselevels erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (rel. Apoptoselevel ist 1) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 2, N = 2). Die BaSO<sub>4</sub>-Konzentrationen waren 0,000526 und 0,00526 mg/cm<sup>2</sup>. Als Positivkontrolle diente eine 30-minütige Behandlung der Zellen bei 55 °C. (\* p < 0,05 Signifikanz zur Kontrolle)

### 4.5.4 Inflammatorische Zytokine von Primärzellen

In den NHBEZ der Patienten B304 und B305 waren 8 der 13 untersuchten inflammatorischen Zytokine oberhalb der methodischen Nachweisgrenze messbar.

Keine Aussage zu eventuellen Effekten kann für die Zytokine IFN- $\alpha$ , IL-33, IL-10, IL-12p70 und IL-17A gemacht werden, da die gemessenen Werte unterhalb der NG lagen.

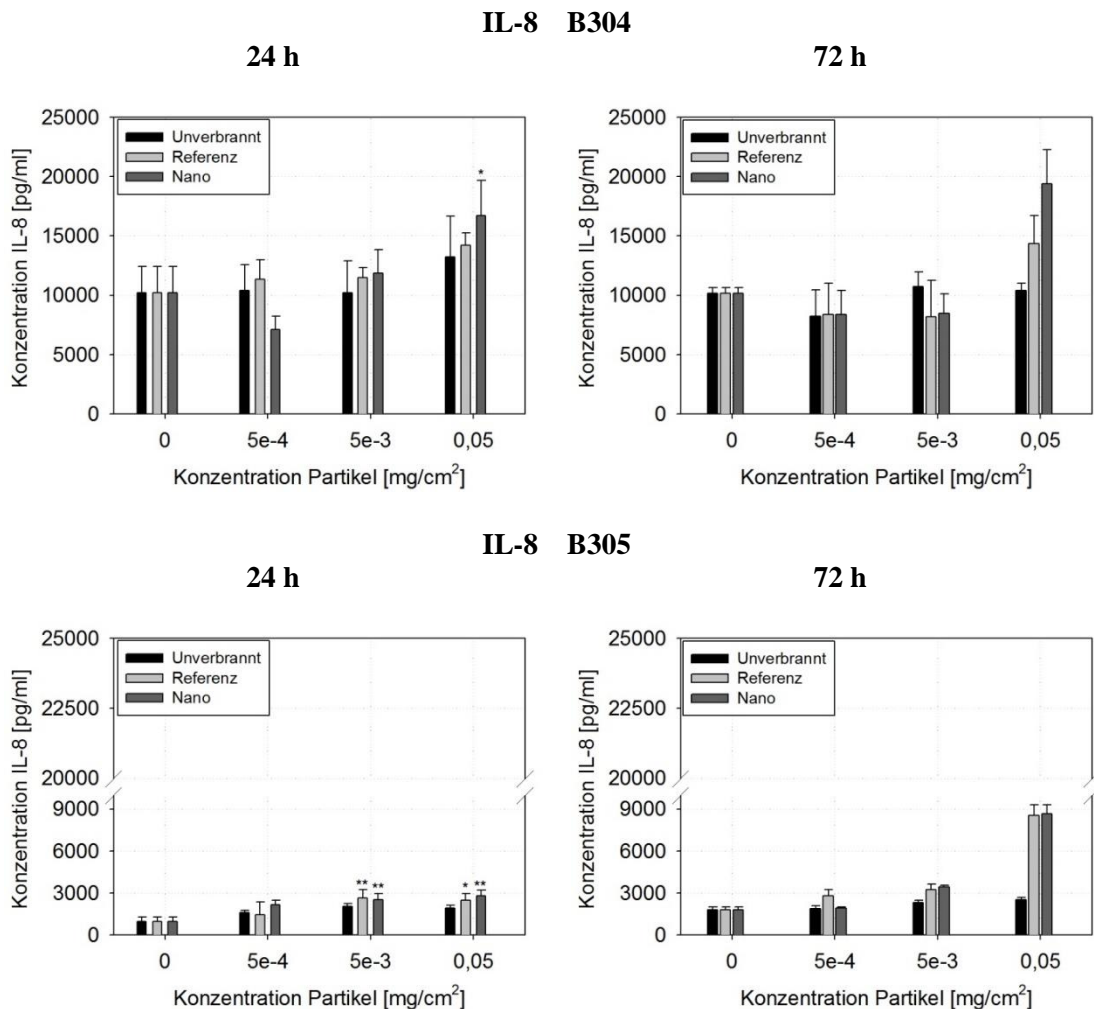
Für die inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-23 und TNF- $\alpha$  konnte kein dosis- oder zeitabhängiger Effekt in den NHBEZ beobachtet werden. Für IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 und MCP-1 konnten Effekte durch die Partikel gemessen werden. Diese waren jedoch, bezüglich der Behandlungszeiten untereinander bzw. zwischen den Patienten, nicht reproduzierbar, so dass keine Aussage über die Wirkung der Partikel auf diese Zytokine getroffen werden kann.

Für das inflammatorische Zytokin IL-8 (Abbildung 31) konnte eine dosisabhängige Zunahme des Gehalts bei beiden Patienten über beide Behandlungszeiträume beobachtet werden. Wobei sich auch hier patientenabhängige Unterschiede beobachten ließen. Bei einer 24-stündigen Behandlung erhöhte das unverbrannte BaSO<sub>4</sub> den IL-8-Gehalt um das 1,3-fache (B304) bzw. um das 2-fache (B305). Das Material des Referenztages erhöhte IL-8 um das 1,4-fache (B304) und 2,5-fache (B305). Das Material des Nanotages erhöhte IL-8 um das 1,6-fache (B304) bzw. das 2,9-



fache (B305). Diese Erhöhung durch das Nanomaterial bei einer Partikelkonzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> in den NHBEZ war signifikant.

Nach 72 Stunden Behandlung erhöhte sich der IL-8-Gehalt der NHBEZ des Patienten 305 bei einer Konzentration von 0,0526 mg/cm<sup>2</sup> um das 1,4-fache (unverbranntes BaSO<sub>4</sub>), um das 4,7-fache (Referenz) und um das 4,8-fache (Nanotag). Der Patient 304 zeigte ebenfalls eine Erhöhung des IL-8-Gehaltes, allerdings war die relative Erhöhung geringer als bei B305.



**Abbildung 31: Konzentration des Zytokins IL-8 in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> und der Filterstäube des Großversuchs des Referenz- und Nanobrennstoffes ermittelt durch FACS-Analyse.**

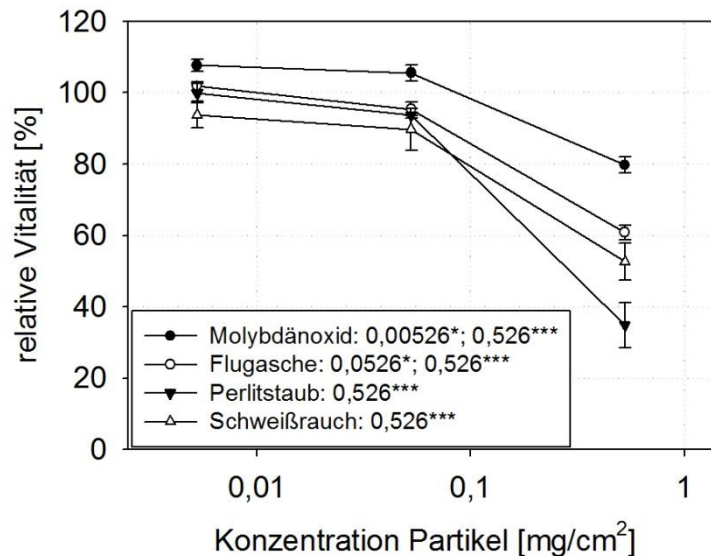
Die Darstellung der Konzentration erfolgt in pg/ml als Mittelwert  $\pm$  SD (n=1; N=2). Die Partikelkonzentrationen waren 0,000526; 0,00526 und 0,0526 mg/cm<sup>2</sup>. Die methodische Nachweisgrenze ist als Referenzlinie angegeben. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

#### 4.6 Wirkung von vier verschiedenen Stäuben auf A549-Tumorzellen

Die Untersuchungen mit den vier Filterstäuben erfolgten an Zellen der Tumorzelllinie A549. Die Versuche wurden so gestaltet, dass die Materialien direkt mit einander verglichen werden konnten.

#### 4.6.1 Vitalität von Tumorzellen

Die vier getesteten Stäube bewirkten eine dosis- und zeitabhängige Abnahme der Zellvitalität. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 0,526 mg/cm<sup>2</sup> senkte das Molybdänoxid die Vitalität auf 81,1 % (bei 24 h) und 79,8 % (72 h). Die Flugasche senkte die Vitalität auf 72,6 % (24 h) und 60,9 % (72 h). Der Perlitstaub senkte die Vitalität auf 67,2 % (24 h) und 34,8 % (72 h). Der Schweißrauch bewirkte einen Vitalitätsverlust auf 72,1 % (24 h) und 52,65 % (72 h). Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden die Signifikanzen separat in den Diagrammen dargestellt.

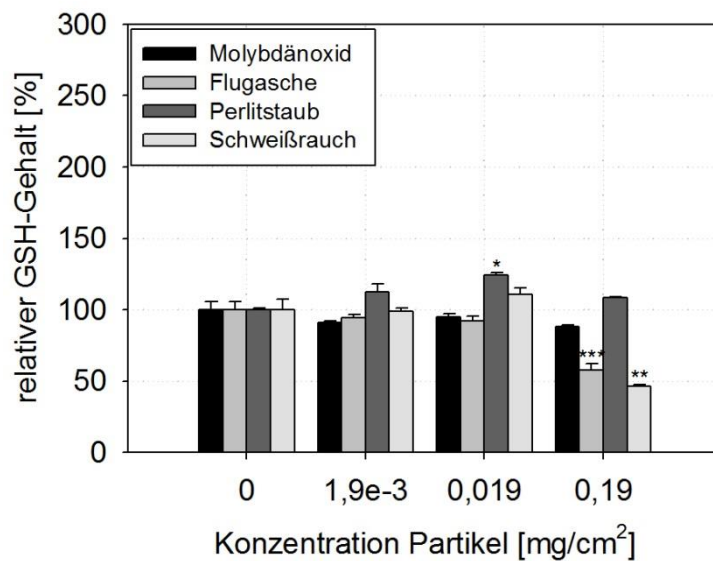


**Abbildung 32: Relative Vitalität von A549 nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen der vier Filterstäube ermittelt durch den Resazurin-Test.**

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1, N = 3). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,00526; 0,0526 und 0,526 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

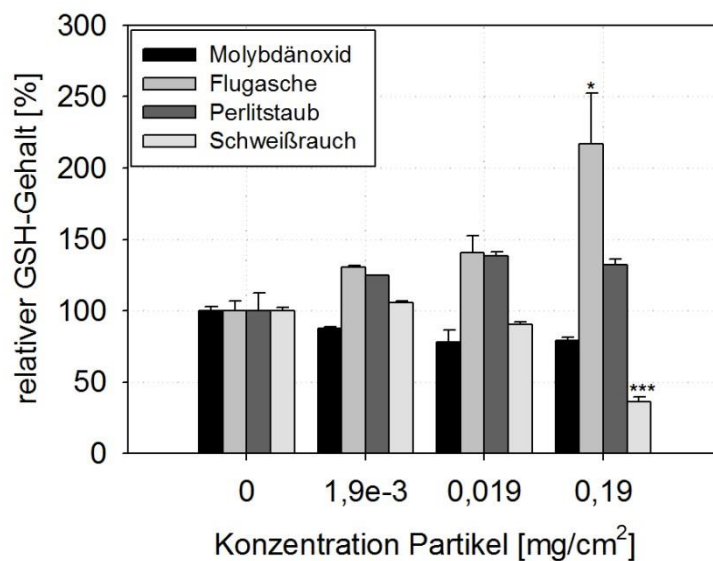
#### 4.6.2 Glutathiongehalt von Tumorzellen

Eine Behandlung der A549 Zellen mit den Stäuben bewirkte für den Perlitstaub bei einer Konzentration von 0,019 mg/cm<sup>2</sup> und einer 24-stündigen Behandlung einen signifikanten Anstieg des zellulären Glutathiongehaltes auf 124 %. Die Flugasche und der Schweißrauch hingegen senkten bei einer Konzentration von 0,19 mg/cm<sup>2</sup> den GSH-Gehalt signifikant auf 57,7 % bzw. 46,2 %. Der Effekt des Schweißrauches war auch bei einer 72-stündigen Inkubation zu beobachten. Der GSH-Gehalt wurde auf 36,3 % abgesenkt. Die Verlängerung der Inkubationszeit führte in den A549 Zellen bei Behandlung mit der Flugasche jedoch zu einem entgegengesetzten Effekt - einem Anstieg des GSH-Gehaltes auf 216,9 %.



**Abbildung 33: Relativer Glutathiongehalt von A549 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen der vier Filterstäube ermittelt durch HPLC.**

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % rel. GSH-Gehalt) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 2, N = 2). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,0019; 0,019 und 0,19 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)



**Abbildung 34: Relativer Glutathiongehalt von A549 nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen der vier Filterstäube ermittelt durch HPLC.**

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % rel. GSH-Gehalt) als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 1, N = 2). Die Partikel-Konzentrationen waren 0,0019; 0,019 und 0,19 mg/cm<sup>2</sup>; (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 Signifikanz zur Kontrolle)

## 5 Diskussion

Der Verbleib der Nanopartikel im Prozess der Abfallverbrennung wurde im BMBF geförderten Projekt ‚NanoEmission - Untersuchung des Emmissionsverhaltens von Nanopartikeln (NP) in der Abfallverbrennung‘ mit nanoskaligem Bariumsulfat untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Großteil der eingebrachten Nanopartikel in den festen Verbrennungsrückständen zu finden ist. Lediglich ein geringer Prozentsatz wird mit den Abgasen weitergetragen, aber nahezu vollständig (Abscheideleistung > 99,97 %) durch die eingesetzten Filtermaterialien abgetrennt (Baran und Quicker, 2017). Eine Studie aus dem Jahre 2008 zu Lebenszyklusmodellierungen kam für Silber-NP, Titandioxid-NP und Kohlenstoff-Nanoröhren zu dem Ergebnis, dass 0,1 – 1 % der NM nicht über den Filter einer MVA zurück gehalten werden und mit den Abgasen in die Umwelt getragen werden (Müller und Nowack, 2008).

Die Überführung der Nanopartikel in die festen Verbrennungsrückstände sowie in die Flug- und Filteraschen kann aus toxikologischer Sicht zu einer Verlagerung der Probleme in die nachfolgenden Schritte der Entsorgung, Deponierung oder Weiterverwendung führen. Ob eine thermische Behandlung dabei die toxikologischen Eigenschaften der NP verändert, stand im Fokus der eigenen Arbeit. Zudem wurde die Toxizität weiterer Aschen und Verbrennungsrückstände auf humane Lungenzellen untersucht.

Als Flugasche werden generell alle Feinstäube bezeichnet, die in Rückhalteeinrichtungen von Verbrennungsanlagen nach der Brennkammer und vor der Zugabe von Sorptionsmaterial gesammelt werden (Chandler et al., 1997). Zu berücksichtigen ist, dass ihre Zusammensetzung und ihre Partikelgrößenverteilung dabei vom Brenngut, der Art der Verbrennung, den Betriebsbedingungen und dem Filtermaterial abhängig ist (Buha et al., 2014). Und diese wiederum beeinflussen die toxikologischen Eigenschaften. Eine Studie von Diabaté et al. untersuchte u.a. die toxikologischen Effekte von Feinstaub aus Hausmüllverbrennungsanlagen (bezeichnet als Flugasche MAF02) an der Lungen-Tumorzelllinie A549 und an BEAS-2B-Lungen-Epithelzellen. Die Exposition der Zellen mit Flugasche für 24 Stunden (0,001 – 0,4 mg/ml) verringerte die Vitalität der Zellen mit steigender Konzentration (LD<sub>50</sub> 0,455 mg/cm<sup>2</sup> für A549), verbunden mit einer Änderung der Integrität der Zellmembran, so dass LDH verstärkt ins Medium freigesetzt wurde. Die verwendeten Zellen setzten zudem das Chemokin IL-8 frei. Die ebenfalls behandelten Makrophagen der Zelllinie NR8383 setzten nach der Behandlung mit der Flugasche das Zytokin TNF- $\alpha$  frei; eine Freisetzung von IL-8 wurde in den Makrophagen nicht bestimmt (Diabaté et al., 2004). In der eigenen Arbeit wurde die Wirkung von vier Filterstäuben an der Lungenzelllinie A549 untersucht. Dabei bewirkte die Flugasche, ebenso wie die drei anderen Filterstäube, eine dosis- und zeitabhängige Abnahme vitaler A549-Zellen. Ein Vitalitätsverlust von 50 % und damit eine LD<sub>50</sub> analog der Studie von Diabaté et al. konnte jedoch nur für den Perlitstaub nach 72-stündiger Behandlung bestimmt werden (0,288 mg/cm<sup>2</sup>). Für das Molybdänoxid, die Flugasche und den Schweißrauch bewirkte die 72-stündige Inkubation bis zur höchsten getesteten Konzentration von

0,52 mg/cm<sup>2</sup> keinen Vitalitätsverlust von mindestens 50 %. Der von Diabaté et al. ermittelte LD<sub>50</sub>-Wert für die Flugasche MAF02 konnte für die in dieser Arbeit verwendete Flugasche, nicht bestätigt werden. Als Hintergrund dieser Beobachtung werden die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Flugaschen betrachtet. Die MAF02-Asche bestand überwiegend aus Chloriden und Sulfaten von Erdalkalimetallen. Die Flugasche von Herding bestand auch aus verschiedenen Calciumverbindungen, aber ebenso aus Silizium-, Titan- und Eisen-Verbindungen. Diese Unterschiede sowie Anteile toxischer Schwermetalle, könnten die Stärke des zytotoxischen Potentials auf die A549-Zellen und damit den nicht reproduzierten LD<sub>50</sub>-Wert bedingen.

Die vier untersuchten Filterstäube zeigten im direkten Vergleich weitere signifikante Unterschiede untereinander. So wurde der zelluläre GSH-Gehalt, welcher in direkter Verbindung mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies steht, durch die Exposition mit den Filterstäuben in unterschiedlichen Richtungen beeinflusst. Hierbei ist die These, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, verbunden mit einer Regulierung zellulärer Antioxidantien, wie beispielsweise GSH, einen der bedeutendsten Mechanismen der NP-Toxikologie darstellt, zu berücksichtigen (Donaldson und Tran, 2002; Oberdörster et al., 2005; Li et al., 2008; Manke et al., 2013; Driessen et al., 2015).

Für den Schweißrauch und die Flugasche waren die Effekte auf den GSH-Gehalt signifikant. So bewirkte eine 24-stündige als auch eine 72-stündige Behandlung der A549-Zellen mit Schweißrauch eine signifikante Abnahme des intrazellulären GSH-Gehaltes. Die Charakterisierung des Schweißrauchs ergab, dass es sich bei dieser Probe um reines Eisenoxid handelt, welches in Suspension in DMEM, Partikel von ca. 125 nm und 515 nm aufwies. Die Toxizität von Eisenoxid-Nanopartikeln als auch von größeren Eisenoxid-Partikeln beruht, gemäß verschiedener Studien, vor allem auf der Induktion von oxidativem Stress und den damit verbundenen zellulären Folgereaktionen, wie etwa einem Glutathion-Mangel oder der Freisetzung inflammatorischer Zytokine (SRU, 2012). Eine Freisetzung inflammatorischer Zytokine wurde in dieser Arbeit für die Wirkung der Filteraschen nicht gesondert untersucht. Da die Senkung des GSH-Gehaltes jedoch sowohl in der eigenen Arbeit als auch in anderen, unabhängigen Studien nach der Exposition mit Eisenoxid-Partikeln beobachtet wurde, wird ein hohes oxidatives Stresslevel in den A549 daher als die Hauptursache für die Abnahme des GSH nach der Behandlung mit den Schweißrauch-Partikeln angenommen. Die Inkubation der A549 mit Flugasche führte nach 24 Stunden ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme des GSH-Gehaltes. Nach einer verlängerten Behandlung über 72 Stunden hingegen kam es zu einer signifikanten Erhöhung des GSH-Gehalts. Dieses Ergebnis bestätigt Frau Fritsch-Decker in ihrer Studie an murinen Makrophagen. Dort führte die Flugasche zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit zur Entstehung von oxidativem Stress in den Zellen. Dies führte einerseits zu einer Erhöhung des zellulären GSH-Gehaltes (Fritsch-Decker,

2008), welcher als anti-oxidativer Schutzmechanismus der Zelle eine zentrale Rolle in der Abwehr von ROS spielt, und andererseits zur Freisetzung von IL-8 und TNF- $\alpha$  (Vergleich auch (Diabaté et al., 2004)), was auf eine Entzündungsreaktion in den Zellen hindeutet.

Unterschiedliche toxikologische Wirkungen der Filteraschen resultieren zusammenfassend aus den verschiedenen qualitativen und quantitativen Zusammensetzungen der Proben. So besteht das Molybdänoxid qualitativ aus verschiedenen Oxiden des Molybdäns, enthält aber ebenso Aluminiumoxid, Siliziumoxid und Kaliumchlorid und zeigte in Suspension Partikel von ca. 314 nm. Die untersuchte Flugasche hingegen ist qualitativ eine Mischung aus Calciumsulfat, Quarz, Eisenoxid, weiteren Calciumverbindungen, Titandioxid und wasserhaltigen Sulfaten. Die Partikel zeigten in Suspension Größen von 125 nm und von 759 nm – sie waren damit kleiner als auch größer als die Partikel des Molybdänoxid-Staubs. Auch der Perlitstaub zeigte in Suspension Partikelgrößen von 111 nm und 502 nm und setzte sich qualitativ aus Quarz und Aluminiumverbindungen zusammen. Der Schweißrauch hatte ähnliche Partikelgrößen wie der Perlitstaub (125 nm und 515 nm) -besteht aber aus reinem Eisenoxid. Begründet auf den unterschiedlichen Potenzialen der Metalle und ihrer Oxide bezüglich ihrer Induktion von ROS, könnten die Unterschiede in der toxikologischen Wirkung primär aus diesen resultieren. Inwiefern die Partikelgrößen die Unterschiede in den toxikologischen Potentialen bedingen, müsste in direkt vergleichenden Studien mit Aschen gleicher Zusammensetzung aber anderer Partikelgrößen weiter untersucht werden. Da keine entsprechenden Ascheproben zur Verfügung standen, konnte dieser Aspekt in der eigenen Arbeit nicht näher betrachtet werden.

Wissenschaftliche Studien, die sich direkt mit der vergleichenden Untersuchung toxikologischer Eigenschaften von thermisch unbehandelten und behandelten Nanopartikeln auf Mensch und Umwelt beschäftigen, gibt es momentan nicht. Mit diesem Vergleich beschäftigte sich die vorliegende Arbeit anhand des Materials Bariumsulfat.

Nano-Bariumsulfat findet heutzutage, aufgrund seiner mechanischen, optischen und chemischen Eigenschaften, Anwendung als Füller in Oberflächenbeschichtungen, in Farben und Lacken, in der Kosmetikindustrie oder in der Medizin (Petrova et al., 2008). Es eignete sich im Falle der vorliegenden Arbeit und dem damit verbundenen Projekt ‚NanoEmission‘ besonders gut als Modellschubstanz aufgrund seiner Quantifizierbarkeit in den Teilströmen der Abfallverbrennung einer realen Müllverbrennungsanlage als auch einer Technikumsanlage. Die Hintergrundbelastung ist im Vergleich zu Titan oder Zink, deren Oxide ebenfalls wie BaSO<sub>4</sub> zu den *poorly soluble particles* (schwer lösliche Partikel - PSP) gehören (Konduru et al., 2014), relativ gering, und es kam somit zu keiner Konkurrenz, d.h. Überlagerung mit bereits regulär im Müll enthaltenen NM und Elementen.

Bariumsulfat selbst ist gemäß GHS nicht als Gefahrstoff eingestuft. Als anorganische Verbindung mit einer geringen Wasserlöslichkeit (3,1 mg/L bei 25 °C und pH 9) erfüllt BaSO<sub>4</sub>, gemäß der

Verordnung Nr. 1907/2006 (REACH) Artikel 14 (4), während seines Lebenszyklus nicht die Kriterien zur Einstufung als ‚gefährlich‘. Bariumsulfat gilt als stabile Verbindung, deren Biokonzentration und Bioakkumulation als vernachlässigbar gering eingestuft wird. In Süßwasser wurde eine PNEC (*predicted no effect concentration* - die vorausgesagte Konzentration eines Stoffes, bis zu der sich keine Auswirkungen auf die Umwelt zeigen) für aquatische Organismen von 115 µg/L und für terrestrische Organismen ein PNEC im Boden von 207,7 mg/kg Boden TG festgelegt (ECHA 2020). Für inhalativ aufgenommenes Bariumsulfat wurde ein DNEL-Wert (systemisch) von 10 mg/m<sup>3</sup> angegeben (DGUV 2018). Für alveolengängiges BaSO<sub>4</sub> wurde zudem ein MAK-Wert von 0,3 mg/m<sup>3</sup> festgelegt. Für einatembares BaSO<sub>4</sub> beträgt der MAK 4 mg/m<sup>3</sup>. BaSO<sub>4</sub> wird bezüglich einer Gefährdung während der Schwangerschaft in die Gruppe C eingestuft, d.h. „Eine fruchtschädigende Wirkung braucht bei Einhaltung des MAK- und BAT-Wertes nicht befürchtet zu werden.“ (DFG, 2020). Landsiedel et al. ermittelten in ihrer Studie für Ratten einen NOAEC von ≥ 50 mg/m<sup>3</sup> für BaSO<sub>4</sub> (Landsiedel et al., 2014). Zum Vergleich wurde für CeO<sub>2</sub>, welches in dieselbe Kategorie wie BaSO<sub>4</sub> - den PSP - fällt, ein NOAEC von ≤ 0,5 mg/m<sup>3</sup> ermittelt (Keller et al., 2014).

In einem ersten Schritt der eigenen Untersuchungen wurde die Wirkung des reinen, thermisch unbehandelten BaSO<sub>4</sub>-Nanomaterials auf humane primäre Lungenzellen untersucht. Dabei wurden die Endpunkte Vitalität, Apoptose, intrazellulärer Glutathiongehalt sowie inflammatorische Zytokine in NHBEZ und PLZ betrachtet. Bezüglich der Vitalität wurde einerseits der Verlust metabolischer Aktivität und andererseits die Veränderung der Integrität der Zellmembran gemessen. Die Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehaltes ermöglicht einen Rückschluss auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. GSH stellt das bedeutendste Antioxidans der humanen Zelle dar. Unter der Einwirkung von ROS kommt es in einer ersten Reaktion zu einer Erniedrigung der reduzierten Form des GSH und damit zu erhöhten GSSG-Gehalten (oxidierte Form des GSH). In Folge dieses veränderten Verhältnisses kann die Zelle, im Zuge einer Zellantwort, die Synthese des GSH erhöhen wie Nel et al. in ihrem Review, welcher die Ergebnisse verschiedener Studien über das toxikologische Potential von NP zeigt, darlegen (Nel et al., 2006).

In der eigenen Arbeit wurde die Wirkung des BaSO<sub>4</sub> neben den Experimenten an humanen Lungenzellen, auch auf die Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, auf den Wasserfloh *Daphnia magna* und auf Leuchtbakterien *Vibrio fischeri* untersucht. Diese Modellorganismen stellen robuste Systeme zur Untersuchung ökotoxikologischer Potentiale dar.

In vielen der bereits durchgeführten Studien über die Wirkung von Nanomaterialien wird BaSO<sub>4</sub> als Referenzmaterial eingesetzt. Eine Studie von Loza et al. publizierte, dass sich BaSO<sub>4</sub> als inertes Material sehr gut für Untersuchungen zur Unterscheidung von Partikeleffekten und chemischen Eigenschaften eignet (Loza et al., 2016).

In den eigenen Untersuchungen an NHBEZ und PLZ wurde die Aufnahme der BaSO<sub>4</sub>-NP in die Lungenzellen mittels ICP-MS Analyse und NanoSIMS bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen nanoskaliges BaSO<sub>4</sub> dosisabhängig aufgenommen haben. Dass BaSO<sub>4</sub> Partikel auch von anderen Zelltypen aufgenommen werden, konnten Sokolova et al. in ihrer Studie an primären, phagozytierenden Knochenmarkzellen der Maus zeigen. Sowohl dendritische Zellen als auch Makrophagen nahmen Partikel in den Größen 40 nm, 420 nm und 1 µm dosis- und zeitabhängig auf, wobei die Makrophagen eine höhere Partikelkonzentration aufwiesen als die dendritischen Zellen. Die Partikel waren in den Phagosomen und Heterophagosomen lokalisiert, was die NP-Aufnahme via Phagozytose bestätigt (Vergleich Studien (Geiser und Kreyling, 2010; Yokel et al., 2014)). Die nanoskaligen Partikel konnten zudem im Zytosol nachgewiesen werden, was auch die NanoSIMS-Aufnahmen der NHBEZ bestätigen. Eine Aufnahme der Partikel in den Zellkern konnte sowohl in der eigenen Arbeit als auch in anderen Studien nicht beobachtet werden (Sokolova et al., 2018).

Weitere Studien betrachteten die Aufnahme von NP in die Zelle mittels mikroskopischer Methoden ebenfalls. So zeigte die Arbeit von Dorn das Aluminiumoxid-, Titandioxid-, Eisenoxid-, Zinkoxid- und Ceroxid-NP von Lungenzellen endosomal aufgenommen werden und sich zusätzlich direkt an der Zelloberfläche anlagern (Dorn, 2015). Für Eisenoxid-Nanopartikel konnte in humanen intestinalen Epithelzellen (Caco-2) ein analoger Mechanismus beschrieben werden. Die Aufnahme der Partikel erfolgte jedoch nicht gleichmäßig und war abhängig von den Oberflächeneigenschaften der NP. Eine Protein-Beschichtung (mit FBS) der NP reduzierte beispielsweise die Aufnahme der NP in die Zellen (Lichtenstein et al., 2014).

Zusätzlich zu dem Effekt des Oberflächen-Coatings konnte in der Arbeit von Dorn der Einfluss einer Zellform-Veränderung bezüglich der Aufnahme der NP in die Zelle gezeigt werden. Die Dehnung der Zellen simulierte unter *in vitro* Bedingungen die Zellformveränderung während des physiologischen Atemvorgangs. Die gedehnten Lungen-Epithelzellen (primäre Typ-II-Pneumozyten aus der Rattenlunge (männliche Sprague Dawley Ratte)) nahmen dabei weniger CeO<sub>2</sub>-NP auf als ungedehnte Zellen (Dorn, 2015).

Bei der Übertragung toxikologischer *in-vitro*-Daten auf den Gesamtorganismus ist somit bezüglich der Toxikokinetik und einer Partikelbeladung der Zelle, der Einfluss des in der Lunge vorhandenen *Surfactant* (bestehend aus Phospholipiden und Proteinen) sowie die Bewegung der Zellen durch den Atemvorgang von Bedeutung. Aus älteren Studien ist zudem bekannt, dass alveoläre Zellen des Typ II (ATII) bei Dehnung eine erhöhte Sekretion von *Surfactant* haben (Wirtz und Dobbs, 1990). Inwieweit sich der *Surfactant* wiederum verstärkend oder vermindern auf die Aufnahme und die Toxikologie der NP auswirkt ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten und nicht abschließend geklärt (Mousseau und Berret, 2018; Zhao et al., 2019). Sicher ist, dass NP und *Surfactant* miteinander agieren und NP als Verbindungen zwischen *Surfactant*-Vesikeln fun-



gieren können. Diese ‚Sticker‘-Funktion ist besonders ausgeprägt, wenn sich die Oberflächenladungen stark unterscheiden. Eingeatmete Nanopartikel könnten so die Grenzflächen- und Gesamteigenschaften des Lungen-Surfactants beeinflussen und die Lungenphysiologie stören (Mousseau und Berret, 2018).

Dass die Oberflächenbeschichtung der Partikel einen entscheidenden Einfluss auf das toxikologische Potential von NP haben kann, zeigt eine Studie von Romera et al. Dort zeigten mit Lipid beschichtete *Carbon-Nanotubes* (CNTs) beispielsweise eine verminderte Lebertoxizität im Vergleich zu unbeschichteten CNTs (Romero et al., 2011).

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde dem Kulturmedium ein Tensid zugesetzt um die NP stabil zu dispergieren. Die Verwendung eines Proteins, wie z.B. fetales Kälberserum (FBS), war aufgrund eines veränderten Wachstums der NHBEZ und PLZ - es förderte ein verstärktes Wachstum von Fibroblasten in den Kulturen, die nicht Gegenstand der Arbeit sein sollten - nicht praktikabel. Ohne diesen Zusatz lagen die BaSO<sub>4</sub>-NP in größeren Aggregaten und Agglomeraten mit Dimensionen >1 µm vor, die zudem nicht gleichbleibend homogen waren. Die Behandlung der Zellen und der Modell-Organismen für die ökotoxikologischen Tests erfolgte somit mit einer NP-Suspension mit Tensidzusatz. Dies ist bei einem Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien, die eine Inkubation beispielweise an der *Air-Liquid*-Grenze (ALI) als NP-Aerosol durchführen zu berücksichtigen, da die Ergebnisse belegen, dass die Art der Exposition einen Einfluss auf die Toxizität haben kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mittels Aerosol an der ALI bereits bei geringeren Dosen zu einer Freisetzung von Zytokinen in A549-Zellen führte als bei einer Behandlung in Submers-Kultur (NP-Suspension) (Loret et al., 2016).

Die verwendete Konzentration des Tensids zeigte keinen toxikologischen Effekt auf die Primärzellen, Algen oder Leuchtbakterien. Die Daphnien hingegen zeigten bereits durch die Verwendung des Tensids einen Verlust der Schwimffähigkeit von 70 % im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Tensidzusatz im Medium. Dieser Effekt wurde bei der NP-Exposition der Daphnien einberechnet, um den Partikel-Effekt differenzieren zu können (Foth et al., 2017). Inwiefern die beobachteten Effekte auch bei Untersuchungen mit BaSO<sub>4</sub>-Suspension ohne Tensid reproduzierbar wären, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Da die toxikologischen Eigenschaften der NP eng mit deren physikalischen und chemischen Eigenschaften verbunden sind, wurden die Partikel und die Suspensionen hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung, ihrer Oberflächenladung und ihrer Löslichkeit untersucht. Die beiden getesteten, nanoskaligen Bariumsulfate der Firmen Solvay und Huntsman zeigten in der rasterelektronischen Betrachtung eine Primärpartikelgröße von 60 nm. Beide Materialien besitzen kein Oberflächen-Coating und zeigen in Suspension mit AECG-Medium eine Partikelgröße von 94 bzw. 107 nm, ein Zeta-Potential von -23 bzw. -25 mV sowie eine spezifische Oberfläche von 43,4 bzw. 31,25 m<sup>2</sup>/g.

Die beiden Materialien sind demnach bezüglich ihrer strukturellen Eigenschaften sowie ihrer Partikelgröße und Stabilität in Suspensionen miteinander vergleichbar.

In den Zytotoxizitäts-Studien dieser Arbeit bewirkten beide Nano-Materialien bei einer 24-stündigen Behandlung im Resazurin-Test keine signifikante Abnahme vitaler Zellen bis zu einer Konzentration von  $0,0263 \text{ mg/cm}^2$ . Erst bei höherer NP-Konzentration bewirkten beide Materialien einen dosis- und zeitabhängigen Vitalitätsverlust. Im direkten statistischen Vergleich zeigten sich, trotz Unterschieden bei den hohen  $\text{BaSO}_4$ -Konzentrationen (z.B. Anstieg der LDH-Aktivität in NHBEZ und PLZ bei dem Material von Solvay bei  $0,526 \text{ mg/cm}^2$  sowie eine Abnahme des Glutathion-Gehaltes bei  $0,19 \text{ mg/cm}^2 \text{ BaSO}_4$ ), keine signifikanten Unterschiede in der toxikologischen Wirkung, bezogen auf gleiche Dosisgruppen, beider NP. Beide Nanomaterialien induzierten bis zu einer Konzentration von  $0,19 \text{ mg/cm}^2$  keine Apoptose in den NHBEZ und PLZ. Auch die Aufnahme der Partikel in die Zellen ist im direkten Vergleich an den NHBEZ eines Patienten für beide Materialien vergleichbar (Abbildung 15). Ähnliche Ergebnisse zeigten Schremmer et al. an alveolaren Makrophagen der Ratte (NR8383). Eine 16-stündige Behandlung mit  $0,032 - 0,160 \text{ mg/cm}^2 \text{ BaSO}_4$ -NP bewirkte keine Zytotoxizität, keine Freisetzung von Zytokinen und keine Migration der NR8383-Zellen (Schremmer et al., 2016). Die Studie verweist auf eine weitere Untersuchung bei der für  $\text{BaSO}_4$  ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert (Konzentration die zu 50 % Vitalitätsverlust führte) von  $0,456 \text{ mg/cm}^2$  für die NR8383 ermittelt wurde (Westphal et al., 2015). Dieser  $\text{IC}_{50}$ -Wert konnte in der vorliegenden Arbeit an den NHBEZ und PLZ nicht ermittelt werden, denn nach 24-stündiger Inkubation konnte sogar bis zur höchsten, getesteten Konzentration von  $0,526 \text{ mg/cm}^2$  kein Vitalitätsverlust von 50 % verzeichnet werden.

Eine Behandlung humaner Bronchialepithelzellen (NCI-H292) mit  $0,0025 - 0,04 \text{ mg/cm}^2 \text{ BaSO}_4$ -NP-Suspension (Partikelgröße in PBS-Suspension  $\sim 3817 \pm 1227,1 \text{ nm}$ , Oberflächenladung  $-16,4 \text{ mV}$ , Primärpartikelgröße  $32 \text{ nm}$ , Oberfläche  $39 \text{ m}^2/\text{g}$ ) über 24 Stunden bewirkte ebenfalls keinen Vitalitätsverlust (bestimmt mittels WST-1-Test), keine Freisetzung von IL-8 oder eine Modulation von m-RNA (für IL-8) sowie keine Veränderung in der m-RNA Expression von Superoxiddismutase (SOD2) und Hämoxxygenase (HO-1) (Delaval et al., 2017). Wie an den Charakterisierungsdaten zu erkennen, lagen die  $\text{BaSO}_4$ -Partikel in dieser Studie von Delaval als Agglomerate, mit Dimensionen um die  $4 \mu\text{m}$  vor und waren somit um ein Vielfaches größer als die Partikel der eigenen Studien. Es zeigten sich vergleichbare toxikologische Effekte wie bei den Experimenten mit nanoskaligem  $\text{BaSO}_4$  ( $\sim 100 \text{ nm}$ ) an den NHBEZ und PLZ, was auf eine vergleichbare Oberflächendosis hindeutet.

Übersichtsstudien postulieren mittlerweile, dass es keine nanospezifischen Wirkmechanismen gibt oder dass sich die Biokinetik der NP nicht grundlegend von größeren Partikeln unterscheidet (Gebel et al., 2014).

Allgemein bekannt ist, dass die Größe von Agglomeraten von der Partikel-Konzentration abhängig ist (Konduru et al., 2014) und dass die gleichen Partikel mit unterschiedlichen Größen in

wissenschaftlichen Studien auch Unterschiede in deren Wirkungsgrad zeigen können (Landsiedel et al., 2010; Johnston et al., 2013). Für BaSO<sub>4</sub> konnte gezeigt werden, dass sowohl die Partikelgröße als auch die Expositionsart die Eliminationskinetik und damit die *Clearance* der Partikel aus der Lunge beeinflusst (Cember et al., 1955; Cember et al., 1956; Konduru et al., 2014). Dies gilt gleichermaßen auch für andere Nanopartikel (Osier und Oberdörster, 1997; Baisch et al., 2014), so dass aus subjektiver Sicht toxikologische Untersuchungen eines NM immer mit einem identischen makroskaligen Material verglichen werden sollten.

Mikroskaliges BaSO<sub>4</sub> zeigte an der Tumorzelllinie A549 bis zu einer Konzentration von 0,25 mg/ml keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen. Es wurden jedoch Hinweise auf erhöhte Exkretion von IL-8 bei dieser Konzentration gefunden. Zudem war der GSH-Gehalt signifikant erniedrigt (Monteiller et al., 2007). Dieser Effekt der GSH-Abnahme konnte auch in der eigenen Arbeit in den PLZ bei einer BaSO<sub>4</sub>-Konzentration von 0,19 mg/cm<sup>2</sup> (entspricht 1 mg/ml) beobachtet werden (Abbildung 9). Die Studie von Monteiller et al. konnte einen klaren, signifikanten Zusammenhang zwischen dem GSH-Gehalt und der Partikeloberfläche herausarbeiten. Die Nanopartikel zeigten dabei, aufgrund ihres Oberfläche-zu-Massenverhältnis, welches größer ist als das mikroskaliger Partikel, größere Effekte als das Mikromaterial (Monteiller et al., 2007). Auch hinsichtlich anderer toxikologischer Endpunkte sind Unterschiede zwischen nano- und mikroskaligen Partikeln bezüglich deren Schwere bekannt. So zeigten verschiedene NP wie TiO<sub>2</sub>, Talkum oder Carbon Black eine 2- bis 2,5-fach höhere Potenz für kanzerogenes Potential als die mikroskaligen Partikel (Gebel, 2012).

Bezüglich der *Clearance* ist es zudem von entscheidender Bedeutung, ob es sich um PSP oder um lösliche Partikel handelt oder ob sich Löslichkeiten unter *in vivo* Bedingungen u. U. wider Erwarten anders verhalten als in Simulationsflüssigkeiten.

Vergleichend zu den Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten bewirkten Inhalationsstudien mit 50 mg/m<sup>3</sup> BaSO<sub>4</sub> über 5 Tage an Ratten keine signifikante pulmonale oder systemische Antwort (Landsiedel et al., 2010). Auch eine verlängerte inhalative Exposition über 4 bzw. 13 Wochen mit dieser Partikelkonzentration bewirkte weder einen Einfluss auf das Körpergewicht noch morphologische Veränderungen in der Lunge oder extrapulmonaler Organe (Konduru et al., 2014). 28 Tage nach intratrachealer Instillation hatte sich das Barium vorwiegend in den Knochen angereichert (29 %). 16 % der applizierten Partikel befanden sich nach dieser Zeit noch in der Lunge. Ein großer Anteil (30 %) wurde über den Kot ausgeschieden wohingegen lediglich 4 % über den Urin den Körper exkretiert haben.

Hervorzuheben ist die, im Vergleich zu anderen NP, speziell zu anderen PSP, sehr kurze Halbwertszeit des BaSO<sub>4</sub> von 9,6 Tagen (Konduru et al., 2014).

Diese Beobachtung machten auch Molina et al. in ihrer zweijährigen Inhalationsstudie an weiblichen Wistar Han Ratten. Sie ermittelten eine stetige Akkumulation von Bariumsulfat in der Lunge bis zur Expositionsdauer von einem Jahr. In dem folgenden Jahr kam es trotz andauernder

Exposition zu einem Gleichgewicht zwischen Einlagerung und *Clearance* des Bariumgehaltes (Molina et al., 2019). Die in der Studie von Konduru et al. ermittelte Halbwertszeit verlängerte sich in der zweijährigen Studie. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Lungen-*Clearance* mit steigender Barium-Beladung verlangsamte. Aus Sicht der Autoren könnte die Beeinträchtigung der Reinigungsmechanismen wie der mukoziliären Reinigung und der NP-Lösung in den Phagolysosomen der Grund hierfür sein. Auch nach einer Expositionsdauer von zwei Jahren bzw. einer einmaligen intratrachealen Instillation mit steigenden BaSO<sub>4</sub>-NP Konzentrationen zeigten sich die höchsten Bariumgehalte in der Lunge, den Lymphknoten (tracheobronchial und mediastinal), in den Knochen und im Knochenmark. Die vergleichende Studie mit BaSO<sub>4</sub>-NP und löslichem BaCl<sub>2</sub> konnte jedoch klären, dass die Verteilung des BaSO<sub>4</sub> von der Lunge in die Knochen über Lösungsvorgänge erfolgen muss (dies konnte die Studie von Konduru et al. 2014 nicht klären) und die Lösung in den Phagolysosomen alveolarer Makrophagen erfolgt. Lediglich in den tracheobronchialen Lymphknoten, speziell in den Endosomen phagozytierender Zellen, konnte ein kleiner Teil intakter BaSO<sub>4</sub>-NP nachgewiesen werden. Der Transport wird via lymphatischer Zirkulation postuliert. Ebenso erfordert der Mechanismus, wie das Barium aus den Phagolysosomen in das Blut und in extrapulmonale Organe transportiert wird, gemäß der Autoren, noch weitere Untersuchungen (Molina et al., 2019).

Eine intratracheale Instillation von BaSO<sub>4</sub> bewirkte, in der Studie von Konduru et al., 24 Stunden nach der Exposition eine akute, dosisabhängige Entzündungsreaktion in der Bronchoalveolar Lavage (BAL). Die Neutrophilen-Anzahl war erhöht, die Myeloperoxidase sowie LDH waren ebenfalls erhöht. Auch die inhalative Exposition der Ratten über 13 Wochen bedingte eine leichte Entzündungsreaktion, die mit erhöhter  $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT) und alkalischer Phosphatase (ALP) einherging. Auch eine Erhöhung der Neutrophilen konnte beobachtet werden. Diese war bei der IT-Instillation jedoch wesentlich ausgeprägter. Das Chemokin MCP-1 wurde durch die inhalative Exposition ebenfalls induziert. Dieser Effekt war zeitabhängig, d.h. der Gehalt an MCP-1 war nach 13 Wochen höher als nach 4 Wochen. Auch in der hier vorliegenden Arbeit zeigten die NHBEZ einen veränderten MCP-1 Gehalt nach 24 stündiger und 72 stündiger Exposition mit nanoskaligem BaSO<sub>4</sub>.

Alle erhöhten Parameter der *in-vivo*-Studie, nach 4-wöchiger Behandlung der Tiere, hatten nach einer 35-tägigen Post-Expositions-Phase wieder Normalniveau erreicht. Dies konnte für die 13-wöchige Exposition nicht beobachtet werden (Konduru et al., 2014). Die von Schwotzer et al. durchgeführte Inhalationsstudie mit nanoskaligem BaSO<sub>4</sub> über einen Zeitraum von 90 Tagen konnte die schnelle Elimination von BaSO<sub>4</sub>-NP im Vergleich zu anderen PSP, deren Halbwertszeiten in der Regel bei ca. 70 Tagen liegen, ebenfalls bestätigen (Schwotzer et al., 2017). Auch in dieser Studie zeigten sich keine signifikanten Änderungen beim Körpergewicht oder der Nahrungsaufnahme der Versuchstiere. Ebenso wie bei der Studie von Konduru et al. konnte ein signifikanter Anstieg von Neutrophilen in der BAL beobachtet werden. Neutrophile stellen einen

hoch sensiblen Marker für inflammatorische Reaktionen dar. Nach Beendigung der Exposition normalisierte sich die Anzahl an Neutrophilen aber wieder, ebenso wie die signifikante Erhöhung des Proliferationsmarkers Ki67. Die in der Studie ebenfalls bestimmten Marker für Apoptose (gespaltene Caspase-3) und für Genotoxizität ( $\gamma$ H2AX und 8-OHdG) wurden durch die Behandlung mit BaSO<sub>4</sub> nicht beeinflusst. Das Ergebnis des negativen Apoptosemarkers deckt sich mit den eigenen Forschungsergebnissen an den NHBEZ und PLZ, die ebenfalls keine Induktion von Apoptose nach der Exposition mit dem BaSO<sub>4</sub> zeigten.

Die Behandlung der Ratten mit BaSO<sub>4</sub> führte zu einer verstärkten Anreicherung von partikelbeladenen Makrophagen im Lungengewebe und den assoziierten Lymphknoten. Unter histopathologischen Gesichtspunkten verursachte das BaSO<sub>4</sub> deutliche Veränderungen in der Rattennase. So zeigte sich eine Hyperplasie der Mucus-Zellen. Eosinophile Leukozyten konnten im olfaktorischen und respiratorischen Epithel nachgewiesen werden. Diese Effekte waren bereits nach 28 Tagen Exposition messbar und auch Post-Exposition persistent. Eine chronische Inhalationsstudie über ein Jahr an Ratten mit einer BaSO<sub>4</sub>-Konzentration von 50 mg/m<sup>3</sup> führte zu einer Akkumulation von Barium in der Lunge - verbunden mit einer deutlichen Entzündung, mit leichter Fibrose und interstitieller Lipoproteinose. Es waren jedoch keine prä-neoplastischen oder neoplastischen Veränderungen erkennbar (Ernst et al., 2017).

Eine Studie von Cordelli et al. erforschte das mögliche gentoxische Potential von nanoskaligen BaSO<sub>4</sub> nach einer 3- und 6-monatigen *Hole-Body*-Exposition an Ratten. Eine BaSO<sub>4</sub>-Konzentration von 50 mg/m<sup>3</sup> zeigte hierbei keinen Hinweis auf eine Genotoxizität. Die Untersuchung bezüglich DNA-Strang-Brüchen an Leukozyten im *Comet-Assay* als auch mögliche Genmutationen und Chromosomenaberrationen in Erythrozyten zeigten keine Auffälligkeiten (Cordelli et al., 2017). Ergänzend zu diesen Ergebnissen, steht eine chronische Exposition gegenüber hohen Dosen mikroskaligem BaSO<sub>4</sub>, gemäß älterer Untersuchungen, im Verdacht bei Grubenarbeitern eine Pneumokoniose mit anschließender, möglicher Fibrose auszulösen (Levi-Valensi et al., 1966; Doig, 1976; Dosios und Karydas, 2003).

Ist die Abhängigkeit der Partikelgröße auf die Toxizität noch nicht abschließend geklärt, so ist es bezüglich anderer Eigenschaften, wie beispielweise dem Verhalten bei thermischer Behandlung, wiederum von entscheidender Bedeutung welche Größe die Partikel haben (Naito et al., 2018). Für das Schmelzverhalten von NP bei thermischer Behandlung kann dies zwei unterschiedliche Auswirkungen haben. So kann es zum Beispiel zu einer Verringerung der Schmelztemperatur des NM im Vergleich zum mikroskaligen Material kommen. 4 nm Goldpartikel zeigten eine Schmelztemperatur, die ca. 400 °C unter der von mikroskaligen Partikeln lag (Buffat und Borel, 1976; Nanda, 2009). Lang et al. konnten den Effekt der erniedrigten Phasenübergangstemperatur ebenfalls an nanoskaligen CeO<sub>2</sub> nachweisen. So kam es bei der thermischen Behandlung von feinerstäubten CeO<sub>2</sub>-NP, bei Temperaturen zwischen 1450 bis 1750 °C, zu einer Verringerung

der Partikelgröße und einer Erhöhung der Partikel-Anzahl. Dieses Ergebnis wird auf „eine intensive Verdampfung oder Sublimation der Ceroxidpartikel und eine Rekondensation in kühleren Zonen der Flamme“ zurückgeführt. Mikroskaliges CeO<sub>2</sub> besitzt unterdessen einen Schmelzpunkt von über 2000 °C (Lang et al., 2015). Auch für das in dieser Arbeit verwendete BaSO<sub>4</sub> konnte dieser Effekt beobachtet werden. So begann das nanoskalige BaSO<sub>4</sub> bereits bei einer Temperatur von 532 °C zu schrumpfen, wohingegen das mikroskalige Material erst auf 650 °C erhitzt werden musste (Baran und Quicker, 2017).

Unter bestimmten Voraussetzungen kann aber auch eine Erhöhung der Schmelztemperatur auftreten. An Blei-NP, welche in einer Aluminiummatrix eingebettet waren, konnte dieser Effekt beobachtet werden, da das Schmelzverhalten von eingeschlossenen NP von der Grenzflächenstruktur zwischen den NP und der Matrix in der sie eingebettet sind, beeinflusst wird. In diesem Fall herrschte eine epitaxische Verbindung zwischen den NP und der Al-Matrix vor, die die erhöhte Schmelztemperatur bedingt (Sheng et al., 1996; Lu und Jin, 2001).

Für das Verhalten von NP bei thermischer Behandlung sind zusammenfassend demnach verschiedene Punkte zu beachten:

Sind die NP in einer Matrix eingebettet und wenn ja, um welches Matrixmaterial handelt es sich? Welche Schmelz- und Siedepunkte haben die Nanomaterialien im Vergleich zu dem mikroskaligen Pendant? Welche Redoxreaktionen des NM müssen beachtet werden?

Für das in dieser Studie verwendete BaSO<sub>4</sub> konnte nach einer thermischen Behandlung über mehrere Stunden bei 900 °C (geglühtes BaSO<sub>4</sub>) keine Veränderung der Kristallstruktur oder der Partikelgröße beobachtet werden (Fraunhofer, 2017).

Die direkten toxikologischen Untersuchungen zwischen dem unverbrannten und geprühten BaSO<sub>4</sub> an NHBEZ zeigten, dass in Bezug auf die metabolische Aktivität, die Integrität der Zellmembran, der Beeinflussung des zellulären Glutathiongehaltes und der Induktion von Apoptose zwischen den Materialien bei den getesteten Konzentrationen (0,000526; 0,0526 und 0,526 mg/cm<sup>2</sup>) kein Unterschied festgestellt werden konnte. Keiner der vier genannten Endpunkte zeigte eine signifikante Beeinflussung nach der Inkubation. Ebenso konnte kein materialspezifischer Unterschied bei den gemessenen inflammatorischen Zytokinen festgestellt werden. Eine derartige thermische Behandlung des nanoskaligen Bariumsulfats zeigte demnach kein verändertes toxikologisches Potential in Bezug auf die untersuchten Endpunkte. Ob sich andere NP analog dieser Untersuchung verhalten, sollte Gegenstand weiterer Studien werden.

Dass auch die Partikelanzahl für das Verhalten von NP in der Verbrennung relevant ist, zeigte die Studie von Vejerano et al. in einer Labor-Brennkammer (Vejerano et al., 2014). So erhöhte sich der Anteil von NP im Rohgas je geringer der ursprüngliche Anteil im Brenngut war. Grund hierfür ist, dass höher konzentrierte NP eher zu Agglomeration neigen und dann in den festen Verbrennungsrückständen verbleiben. Im Umkehrschluss könnte dies unter Umständen bedeuten, dass

ein höherer Eintrag von Nanopartikeln in den Siedlungsabfall gleichzeitig eine verringerte Anzahl an freien NP bedeutet. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Morphologie oder Partikelgröße der verwendeten NP durch die Verbrennung nicht veränderte. Dies konnte die Studie zum Verhalten von  $\text{CeO}_2$  in einer Schweizer Müllverbrennungsanlage bestätigen. Auch in dieser zeigten sich keine physikalischen oder chemischen Veränderungen der NP unter realistischen Bedingungen, wie Temperaturen bis zu  $1200\text{ }^\circ\text{C}$  und wechselnden oxidativen/reduktiven Bedingungen in der Anlage (Walser et al., 2012).

Der Großteil der verbrannten NP konnte in den festen Verbrennungsrückständen wiedergefunden werden. Dies bestätigten sowohl die genannten Studien als auch das Gesamtprojekt ‚NanoEmission‘ (Fraunhofer, 2017). Da ein Austrag der NP über den Abgasstrom in die Filter aber ebenfalls detektiert wurde und dieser Weg die wahrscheinlichste Möglichkeit eines direkten Kontakts zwischen NP und der Umwelt, respektive Mensch und Tier, darstellt, wurden die nanoskaligen Anteile der Filterrückstände aus dem Verbrennungsversuch im Technikumsmaßstab als auch aus der Verbrennung in der Großanlage (MVA) in dieser Arbeit ebenfalls an NHBEZ auf ihr toxikologisches Potential im direkten Vergleich untersucht.

Mit den Filterproben aus der RWTH Aachen (Technikum) standen vier Materialien zur Verfügung, die unter spezifischen und reproduzierbaren Bedingungen gewonnen wurden. Die Verbrennung des Modellbrennstoffs Holzpellets erfolgte in einer Wirbelfeuerung bei kontrollierter Temperaturführung.

Die Materialien (Referenzmaterial (Verbrennung ohne  $\text{BaSO}_4$ -Zusatz), verbranntes Nanomaterial (kurz: Nanomaterial) und verbranntes Mikromaterial (kurz: Mikromaterial)) sowie unverbranntes Nano- $\text{BaSO}_4$  wurden, bezüglich ihres zytotoxischen Potentials, an den normalen humanen Lungenzellen eines Patienten im direkten Vergleich getestet. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Referenzmaterials, bei dem es sich um die Abgas-Partikel reiner, verbrannter Holzpellets ohne  $\text{BaSO}_4$ -Zugabe handelt, bei einer 24-stündigen Behandlung im Vergleich zu den drei anderen Materialien. Das Referenzmaterial senkte die Zellvitalität auf beinahe 0 %, führte zu erhöhter LDH-Aktivität und einem Anstieg des GSH-Gehaltes. Bei dieser Behandlungszeit und der höchsten verwendeten Konzentration ( $0,0526\text{ mg/cm}^2$ ) konnte ebenfalls ein Unterschied bezüglich der Auswirkung auf die Zellvitalität zwischen dem Nano- und Mikromaterial beobachtet werden. Das Nanomaterial senkte die Vitalität dosisabhängig auf 67,6 % bei einer Partikelkonzentration von  $0,0526\text{ mg/cm}^2$  wohingegen das Mikromaterial keinen Effekt auf die Vitalität verursachte. Die Unterschiede zwischen dem Nano- und Mikro-Material konnten nach einer verlängerten Behandlungszeit von 72 Stunden nicht beobachtet werden. Auch unterschied sich das Referenzmaterial nur noch in dessen Wirkung auf die Zellvitalität der NHBEZ von den anderen drei Materialien, indem es die Vitalität auf 3 % bei einer Konzentration von  $0,0526\text{ mg/cm}^2$  abgesenkte. Der Vitalitätsverlust des unverbrannten  $\text{BaSO}_4$  lag bei 57,5 %, der des Nanomaterials bei

23,5 % und der des Mikromaterials bei 27,4 %. Die Unterschiede bei der LDH-Aktivität und dem GSH-Gehalt konnten bei der dreitägigen Behandlung nicht beobachtet werden.

Alle vier Materialien hatten keinen Effekt auf die Induktion von Apoptose in den Zellen. Die Effekte der Materialien auf die Gehalte von inflammatorischen Zytokinen unterscheiden sich innerhalb der untersuchten Zytokine schon erheblich, so dass eine Aussage zu einem generellen Unterschied bezüglich der Induktion inflammatorischer Zytokine zwischen den Materialien in dieser Studie nicht möglich ist und durch weiterführende Untersuchungen verifiziert werden müsste. Die erfassten Zytokine, die einen, durch die Inkubation mit den Partikeln, veränderten Gehalt aufwiesen waren IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und MCP-1. Dies deutet zumindest allgemein auf eine Entzündungsreaktion nach Inkubation mit den Filterproben des Technikums, analog der zu Beginn diskutierten Wirkung von Flugaschen, hin.

Da eine thermische Behandlung der NP (unverbrannt vs. gegläht) ebenso wie eine Verbrennung des BaSO<sub>4</sub> im Technikum, zu keinem veränderten toxikologischen Potential führte, scheint eine Betrachtung der begleitenden Verbrennungsprodukte wie Schwermetalle, azide Verbindungen u.a. eine größere Bedeutung bei den Wirkunterschieden der Technikumsproben beizuwohnen. So resultiert der Unterschied des Referenzmaterials wahrscheinlich auf stark sauer reagierenden, an den Partikeln anhaftenden, Begleitstoffen aus der Verbrennung. Der pH-Wert der aus diesen Filterproben hergestellten Suspension war sehr niedrig (pH 2), was wohl letztendlich die Zytotoxizität bedingte.

Die unter realen Bedingungen in der MVA Weisweiler gewonnenen Filterproben des Großversuchs wurden, analog der Technikumsproben, vergleichend an NHBEZ getestet.

Für die fünf untersuchten, toxikologischen Endpunkte (Vitalität über metabolische Aktivität und Schädigung der Zellmembran; intrazellulärer Glutathiongehalt, die Induktion von Apoptose und inflammatorischen Zytokinen) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Materialien. Dennoch ist anzumerken, dass ein Rückschluss auf die toxikologische Wirkung der BaSO<sub>4</sub>-Partikel in den Großversuchsproben nach der Verbrennung im direkten Vergleich mit den Wirkungen des unverbrannten BaSO<sub>4</sub> nur eingeschränkt möglich ist. Die Barium-Gehalte der Versuchsproben waren im Vergleich zu der BaSO<sub>4</sub>-Probe (unverbranntes Material) um ein Vielfaches geringer. Die Filterstäube enthielten zudem verschiedene andere Elemente, wie Blei, Zink, Cadmium oder Kupfer, die aus dem Brenngut und der Anlage selbst stammen können und in den reinen BaSO<sub>4</sub>-Partikeln nicht enthalten waren. Gerade in einer MVA sind die Bedingungen nicht konstant und gleichmäßig. Kleinere Partikel lagern sich verstärkt in den komplexen Anlagenteilen ab. Sie werden erst im weiteren Betriebsverlauf ausgetragen und diese Austragung erfolgt nicht homogen, so dass es zu unterschiedlich zusammengesetzten Aschen kommen kann, deren toxikologisches Potential sich schon allein deshalb unterscheiden kann.



Um einen ganzheitlichen Überblick über die toxikologische Wirkung von nanoskaligem BaSO<sub>4</sub> zu erhalten, wurden die eigenen Untersuchungen an den primären Lungenzellen durch Versuche an Algen, Daphnien und Leuchtbakterien ergänzt. Alle Ergebnisse und dazugehörige Methoden sind dem Bericht des BMBF geförderten Projekt ‚Nano Emission‘ zu entnehmen (Foth et al., 2017). Diese Modellorganismen stellen wichtige Marker im Sinne der ökotoxikologischen Betrachtung von Nanopartikeln dar. Sie decken dabei verschiedene trophische Ebenen ab und haben besondere Bedeutung im Umwelt-Kreislauf, wie etwa bei der Nährstoffsynthese und -wiedergewinnung oder der Kompostierung. Sie haben somit eine hohe Bedeutung bei der Bewertung einer möglichen Verlagerung der Nanothematik in Bereiche wie Deponierung oder, im Sinne der Nachhaltigkeit, einer Weiterverwendung, die sich, wie bereits zu Beginn der Diskussion erörtert, durch die Überführung der Nanopartikel in die festen Verbrennungsrückstände bzw. in die Flug- und Filteraschen aus toxikologischer Sicht ergeben kann.

Das Bakterium *Vibrio fischeri* stellt einen weit verbreiteten Modellorganismus für ökotoxikologische Betrachtungen dar. Es eignet sich sehr gut um eine mögliche Toxizität auf andere *in-vitro*-Systeme vorauszusagen (Kahru, 2006). Die Verringerung der Lumineszenz korreliert dabei direkt mit einer Hemmung der metabolischen Aktivität und ist damit ein Marker für die Toxizität eines Stoffes (Bulich, 1982).

Die Leuchtbakterien reagierten trotz kurzfristiger Exposition von nur 30 Minuten, im Vergleich der drei Testorganismen, am empfindlichsten auf die Inkubation mit den BaSO<sub>4</sub>-NP. Bereits eine Konzentration von 0,00526 mg/cm<sup>2</sup> führte zu einer signifikanten Verringerung der Leuchtintensität. Dass nanoskaliges BaSO<sub>4</sub> einen Effekt auf das Wachstum anderer Bakterien hat, konnte an mit BaSO<sub>4</sub> versetzten, medizinischen, thermoplastischen Polyurethan-Kunststoff (Pellethan) gezeigt werden. Dabei hatte dieses Pellethan *in vitro* antimikrobielle Eigenschaften auf *Staphylococcus aureus* und *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula (Aninwene et al., 2013). Den bereits für die Wirkung auf humane Zellkulturen diskutierten Wirkunterschied von nanoskaligen und mikroskaligen Partikeln des gleichen Materials konnte eine Studie von Mortimer et al. auch an Leuchtbakterien beobachten. So zeigte sich für nanoskaliges CuO ein EC<sub>50</sub> von 68,1 ± 4,3 mg/l wohingegen das mikroskalige CuO eine EC<sub>50</sub> von 3894 ± 1871 mg/L hatte. Dieser Unterschied der toxikologischen Wirkung auf die Biolumineszenz der Leuchtbakterien konnte für das Material ZnO jedoch nicht beobachtet werden (Mortimer et al., 2008). Schlussfolgernd ist es nach wie vor notwendig Einzelfallbetrachtungen für einzelne Partikel durchzuführen. Eine Untersuchung des Wirkunterschieds von mikroskaligem BaSO<sub>4</sub> im Vergleich zu dem nanoskaligen BaSO<sub>4</sub> auf die Leuchtbakterien wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Es könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

Ebenso wie bei den primären, humanen Lungenzellen konnte eine Partikelaufnahme in die Algen gezeigt werden. Bis zu einer BaSO<sub>4</sub>-Konzentration von 2 mg/ml konnte jedoch keine Beeinflussung

sung im Wachstum beobachtet werden. Wohingegen der GSH-Gehalt durch die Inkubation anstieg (Foth et al., 2017). Im Vergleich dazu zeigte Titandioxid beispielsweise schon bei einer ca. 14-fach niedrigeren Konzentration von 0,14 – 0,15 mg/ml bei *Chlamydomonas reinhardtii* eine 50 %ige Hemmung des Wachstums (Joonas et al., 2019). So dass auch für *Chlamydomonas reinhardtii* ein anderer Wirkmechanismus des BaSO<sub>4</sub> im Gegensatz zu TiO<sub>2</sub> vermutet wird, trotz Einstufung beider NM als *poorly soluble particles*. Die postulierte Vermutung konnte in der aufgeführten Arbeit nicht abschließend belegt werden, so dass auch eine andere spezifische Oberfläche der Materialien oder unterschiedliche Löslichkeiten den Wirkunterschied bedingt haben könnten. Für mikroskaliges Bariumsulfat wird ein EC<sub>50</sub> von 32 mg/l für Krustentiere wie den Wasserfloh *Daphnia magna* angegeben (Khangarot und Ray, 1989). Die Exposition der Daphnien mit nanoskaligem BaSO<sub>4</sub> verringerte die Schwimmfähigkeit (Foth et al., 2017). Dieser Verlust der Schwimmfähigkeit war jedoch nicht signifikant. Auch der GSH-Gehalt sank mit steigender Partikelkonzentration. Da die methodische Bestimmungsgrenze jedoch unterhalb der GSH-Konzentration in den Daphnien lag, mussten die Ansätze der Dreifachbestimmung für die HPLC-Messung vereinigt werden, so dass die Absenkung des GSH statistisch nicht abgesichert werden konnte. Titandioxid zeigte im Akut-Test eine leichte Toxizität in *Daphnia magna*. Dabei konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen nano- oder mikroskaligem TiO<sub>2</sub> gezeigt werden. Bei der chronischen Studie über 21 Tage wurde eine EC<sub>50</sub> von 0,661 mg/ml ermittelt (Wiench et al., 2009).

Dass die Oberflächenbeschichtung der NP nicht nur in Bezug auf die Humantoxikologie eine bedeutende Rolle spielen kann, konnten Baumann et al. ebenso in ihrer Studie an *Daphnia magna* zeigen. Sie untersuchten die Wirkung von Eisenoxid-NP und beobachteten eine veränderte Toxizität in Abhängigkeit des Oberflächen-*Coatings*. Der Effekt war dabei, nach Aussage der Forscher, weniger auf die veränderte Stabilität der Partikel als vielmehr auf die mögliche Freisetzung von Eisen-Ionen zurückzuführen, die dann wiederum die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativen Stress in den Daphnien bewirkten (Baumann et al., 2014).

Auch die allgemeinen Eigenschaften wie qualitative und quantitative Zusammensetzung der Medien haben nach Abschluss wissenschaftlicher Studien einen bedeutenden Einfluss auf das Verhalten von Nanopartikeln in der Umwelt. So zeigten sich größere Agglomerate und Aggregate der NP auch in den eigenen Untersuchungen bei Abwesenheit von Medienzusätzen wie fötalem Kälberserum (FBS) oder Tensiden. Oder es zeigten sich veränderte Löslichkeiten *in vivo* als aus standardisierten Lösungsversuchen ermittelte Daten postulierten (Molina et al., 2019). Wie auch bei Studien an Zellkulturen oder *in-vivo*-Versuchen zeigte sich eine Beeinflussung der NP-Toxikologie in Gegenwart von Biomolekülen und organischen Verbindungen auch an Modellsystemen zur Ermittlung ökotoxikologischer Potentiale wie bspw. *Daphnia magna* (Nasser und Lynch, 2016; Nasser et al., 2020).

Eine Beurteilung toxikologischer Potentiale von NP für Mensch und Umwelt muss demnach eine Betrachtung des reinen NP, der lebenszyklus-bedingten Veränderungen sowie die Eigenschaften des umgebenden Mediums zusammenfassend betrachten.

## 6 Zusammenfassung

Eine Kernfrage der Arbeit war der direkte Vergleich der toxikologischen Wirkprofile von Bariumsulfat-Nanopartikeln vor und nach dem Durchlaufen einer thermischen Behandlung. Es konnte an humanen Lungenzellen gezeigt werden, dass eine rein thermische Behandlung ohne Verbrennungsprozess keine Veränderung im Wirkungsprofil des BaSO<sub>4</sub> bedingte. Die NP bewirkten einen dosis- und zeitabhängigen Verlust der Vitalität humaner Lungenzellen. Sie veränderten jedoch nicht die Aktivität von Laktatdehydrogenase und die damit verbundene Membranintegrität. Zudem wurde keine Apoptose der humanen Zellen induziert. Der dem Vitalitätsverlust zugrundeliegende Mechanismus scheint dabei weniger auf der Bildung von oxidativem Stress, verbunden mit einer Beeinflussung des intrazellulären Glutathion-Gehaltes zu beruhen.

Inwiefern freigesetzte Barium-Ionen die toxikologische Wirkung *in vitro* und an den ökotoxikologischen Modellorganismen bedingen, sollte zukünftig in einem direkten Vergleich mit einer löslichen Bariumverbindung untersucht werden. Dieser Mechanismus scheint, auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus *in-vivo*-Versuchen und der dort ermittelten kurzen Halbwertszeit von BaSO<sub>4</sub>, von besonderer Bedeutung zu sein.

Analog dem Vergleich zwischen geglühtem BaSO<sub>4</sub> und reinem BaSO<sub>4</sub> konnte zwischen verbrannten nano- und mikroskaligen Partikeln kein signifikanter Unterschied an den humanen Lungenzellen beobachtet werden. Lediglich für die Technikumsprobe des Referenztages konnte ein Wirkunterschied bezüglich der Zytotoxizität, der LDH-Aktivierung sowie der Veränderung des zellulären GSH-Gehaltes beschrieben werden. Dieser Effekt ist jedoch im Wesentlichen auf die stark azid reagierenden, an den Partikeln anhaftende Begleitstoffe aus der Verbrennung der Holzpellets zurück zu führen.

Beim Vergleich der Zytotoxizitäten von Partikeln bis zu 200 nm Größe aus dem Rauchgas der MVA Weisweiler mit und ohne Zugabe von Bariumsulfat-NP zeigte sich ebenfalls kein Wirkunterschied.

Unterschiedliche toxikologische Potentiale zeigten sich hingegen bei den Untersuchungen mit Filteraschen, die sich sowohl in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung als auch in ihrer Partikelgrößenverteilung unterschieden.

Im Gesamt-Projekt 'NanoEmission', zu dem diese Arbeit als Teilprojekt zählt, konnte gezeigt werden, dass moderne Filtermaterialien in einer Verbrennungsanlage NP fast vollständig abtrennen. Der Großteil der NP verbleibt dabei generell in den festen Verbrennungsrückständen.

Da eine thermische Behandlung für das in dieser Arbeit untersuchte BaSO<sub>4</sub> keine veränderte Toxizität bewirkte und die unverbrannten BaSO<sub>4</sub>-NP in den Untersuchungen an Algen, Daphnien und Leuchtbakterien toxikologische Wirkungen zeigten, sollten die NP und Rückstände im Hinblick auf eine mögliche Deponierung oder Weiterverwendung in den Fokus weiterer Untersuchungen rücken.

## Literaturverzeichnis

- Aninwene GE 2nd, Stout D, Yang Z, Webster TJ (2013) Nano-BaSO<sub>4</sub>: a novel antimicrobial additive to pellethane. *Int J Nanomedicine* 8:1197-1205.
- Baisch BL, Corson NM, Wade-Mercer P, Gelein R, Kennell AJ, Oberdörster G, Elder A (2014) Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. *Part Fibre Toxicol* 11:5.
- Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F (2012) Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 24(2):125-135.
- Banerjee T, Christian RA (2017) On-field and laboratory measurement of nanoparticle emission in the wake of gasoline vehicle. *Atmos Pollut Res* 8:1179-1192.
- Baran P, Quicker P (2017) Verbleib und Verhalten von Nanopartikeln bei der Abfallverbrennung. *Österr Wasser- und Abfallw* 69:51-65.
- Baumann J, Köser J, Arndt D, Filser J (2014) The coating makes the difference: acute effects of iron oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. *Sci Total Environ* 484:176-184.
- BG Bau (2020) <https://www.bgbau.de/themen/sicherheit-und-gesundheit/gefahrstoffe/sicherheitsdatenblatt/leuchtbakterientest>, Abrufdatum 14.01.2020.
- Buffat P, Borel JP (1976) Size effect on the melting temperature of gold particles. *Phys Rev A* 13:2287-2298.
- Buha J, Mueller N, Nowack B, Ulrich A, Losert S, Wang J (2014) Physical and chemical characterization of fly ashes from swiss waste incineration plants and determination of the ash fraction in the nanometer range. *Environ Sci Technol* 48(9):4765-4773.
- Bulich AA (1982) A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. *Process Biochem* 17:45-47.
- Buonanno G, Stabile L, Avino P, Belluso E (2011) Chemical, dimensional and morphological ultrafine particle characterization from a waste-to-energy plant. *Waste Manag* 31(11):2253-2262.
- Carvalho T, Peters J, Williams R (2011) Influence of particle size on regional lung deposition—What evidence is there? *Int J Pharm* 406(1):1-10.
- Cember H, Hatch TF, Watson JA, Grucci T (1955) Pulmonary effects from radioactive barium sulfate dust. *AMA Arch Ind Health* 12(6):628-634.
- Cember H, Hatch TF, Watson JA, Grucci T, Bell P (1956) The elimination of radioactive barium sulfate particles from the lung. *AMA Arch Ind Health* 13(2):170-176.
- Cernuschi S, Giugliano M, Ozgen S, Consonni S (2012) Number concentration and chemical composition of ultrafine and nanoparticles from WTE (waste to energy) plants. *Sci Total Environ* 420:319-326.
- Chandler AJ, Eighmy TT, Hjelmar O, Kosson DS, Sawell SE, Vehlow J, van der Sloot HA, Hartlén J: *Municipal Solid Waste Incinerator Residues*. Elsevier Science, Volume 67, 1st Edition, 1997, p. 441.
- Chem (2010) <http://www.chemie.de/lexikon/Bariumsulfat.html#Verwendung>, Abrufdatum 05.06.2017.
- Chung KF (2001) Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 34:50-59.

- Cohen J, Deloid G, Pyrgiotakis G, Demokritou P (2013) Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry. *Nanotoxicology* 7(4):417-431.
- Cordelli E, Keller J, Eleuteri P, Villani P, Ma-Hock L, Schulz M, Landsiedel R, Pacchierotti F (2017) No genotoxicity in rat blood cells upon 3- or 6-month inhalation exposure to CeO<sub>2</sub> or BaSO<sub>4</sub> nanomaterials. *Mutagenesis* 32(1):13-22.
- DANA\_Apop (2019) <https://nanopartikel.info/glossar/12-apoptose>, Abrufdatum 26.01.2019.
- DANA\_Lunge (2018) <https://www.nanopartikel.info/nanoinfo/koerperbarrieren/2390-nanopartikel-und-die-lunge>, Abrufdatum 25.08.2018.
- Delaval M, Wohlleben W, Landsiedel R, Baeza-Squiban A, Boland S (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. *Arch Toxicol* 91(1):163-177.
- DFG (2020) [https://series.publisso.de/sites/default/files/documents/series/mak/lmbv/Vol2020/Iss1/Doc001/mbwl\\_2020\\_deu.pdf](https://series.publisso.de/sites/default/files/documents/series/mak/lmbv/Vol2020/Iss1/Doc001/mbwl_2020_deu.pdf), MAK- und BAT-Werte Liste, Abrufdatum 01.01.2020.
- DGUV (2018) <https://dnel-de.itrust.de/>, Abrufdatum 29.12.2018.
- Diabaté S, Günther R, Völkel K, Thiele D, Wottrich R. 2004. Gesundheitseffekte durch inhalierbare Feinstäube aus technischen Verbrennungsanlagen: In vitro Untersuchungen zur Wirkung feiner und ultrafeiner Partikel auf kultivierte Lungenzellen [Forschungsbericht FZKA-BWPLUS]. Karlsruhe: Forschungszentrum Karlsruhe.
- Doig AT (1976) Baritosis: a benign pneumoconiosis. *Thorax* 31(1):30-39.
- Donaldson K, Tran CL (2002) Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol* 14(1):5-27.
- Dorn M. 2015. Nachweis und Quantifizierung von Nanopartikeln [Dissertation]. Leipzig: Universität.
- Dosios T, Karydas AG (2003) Baritosis of the mediastinal lymph nodes. *Ann Thorac Surg* 76(1):297.
- Driessen M, Mues S, Vennemann A, Hellack B, Bannuscher A, Vimalakanthan V, Riebeling C, Ossig R, Wiemann M, Schnekenburger J, Kuhlbusch TAJ, Renard B, Luch A, Haase A (2015) Proteomic analysis of protein carbonylation: A useful tool to unravel nanoparticle toxicity mechanisms. *Part Fibre Toxicol* 12:36.
- ECHA (2020) <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15235/1>, Abrufdatum 01.01.2020.
- Elder A, Gelein R, Finkelstein JN, Driscoll KE, Harkema J, Oberdörster G (2005) Effects of subchronically inhaled carbon black in three species. I. Retention kinetics, lung inflammation, and histopathology. *Toxicol Sci* 88(2):614-629.
- Ernst H, Rittinghausen S, Schaudien D, Groeters S, Ma-Hock L, Keller J, Apel P, Landsiedel R (2017) Long-term inhalation study with CeO<sub>2</sub> - and BaSO<sub>4</sub> -nanomaterials – Histopathology of the lung. *Toxicol Lett* 28:54.
- Fink SL, Cookson BT (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* 8(11):1812-1825.
- Foth H, Thomas S, Schumann B, Glahn F. 2017. NanoEmission - Untersuchung des Emissionsverhaltens von Nanopartikeln bei der Abfallverbrennung [Schlussbericht Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. BMBF Forschungsvorhaben. Projektzeitraum: 1. Mai 2013 bis 30. April 2016, kostenneutral verlängert bis 31. Juli 2016]. Halle: Universität (nicht publiziert).

- Fraunhofer UMSICHT, TEER, LFG FAU, Herding, Junker, FilTEq, MVA, MLU. 2017. Projekt NanoEmission – Untersuchung des Emissionsverhaltens von Nanopartikeln bei der Abfallverbrennung - Schlussbericht NanoEmission [Forschungsprojekt FKZ 03X3578]. Bonn: Bundesministerium für Bildung und Forschung.
- Fritsch-Decker S. 2008. Partikelexpositionen von Zellkulturen: Untersuchungen zur Rolle von Lipidmediatoren bei der inflammatorischen Antwort [Dissertation]. Karlsruhe: Universität.
- Gebel T (2012) Small difference in carcinogenic potency between GBP nanomaterials and GBP micromaterials. *Arch Toxicol* 86(7):995-1007.
- Gebel T, Foth H, Damm G, Freyberger A, Kramer PJ, Lilienblum W, Röhl C, Schupp T, Weiss C, Wollin KM, Hengstler JG (2014) Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment. *Arch Toxicol* 88(12):2191-2211.
- Geiser M, Kreyling WG (2010) Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 7:12.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Nat Cancer Inst* 51(5):1417-1423.
- Göhler D, Nogowski A, Fiala P, Stintz M (2013) Nanoparticle release from nanocomposites due to mechanical treatment at two stages of the life-cycle. *J Phys: Conf Ser* 429:012045.
- Goswami L, Kim KH, Deep A, Das P, Bhattacharya SS, Kumar S, Adelodun AA (2017) Engineered nano particles: Nature, behavior, and effect on the environment. *J Environ Manage* 196:297-315.
- Grill D, Tausz M, De Kok L: Significance of Glutathione in Plant Adaptation to the Environment. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2001, pp. 101-122.
- Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Maruyama K, Usui Y, Aoki K, Takanashi S, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Shimizu M, Kato H (2013) Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. *Toxicol In Vitro* 27(6):1679-1685.
- Hastings JW, Makemson J, Dunlap PV (1987) How are growth and luminescence regulated independently in light organ symbionts. *Symbiosis* 4:3-24.
- He X, Zhang H, Ma Y, Bai W, Zhang Z, Lu K, Ding Y, Zhao Y, Chai Z (2010) Lung deposition and extrapulmonary translocation of nano-ceria after intratracheal instillation. *Nanotechnology* 21(28):285103.
- Hsu LY, Chein HM (2007) Evaluation of nanoparticle emission for TiO<sub>2</sub> nanopowder coating materials. *J Nanopart Res* 9:157-163.
- Johnston H, Pojana G, Zuin S, Jacobsen NR, Møller P, Loft S, Semmler-Behnke M, McGuinness C, Balharry D, Marcomini A, Wallin H, Kreyling W, Donaldson K, Tran L, Stone V (2013) Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: potential solutions to current and future challenges. *Crit Rev Toxicol* 43(1):1-20.
- Joonas E, Aruoja V, Olli K, Kahru A (2019) Environmental safety data on CuO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles for multiple algal species in natural water: Filling the data gaps for risk assessment. *Sci Total Environ* 647:973-980.
- Kahru A (2006) Ecotoxicological tests in non-ecotoxicological research: Contribution to 3Rs. Use of luminescent photobacteria for evaluating the toxicity of 47 MEIC reference chemicals. *ALTEX* 23:302-308.
- Keller J, Wohlleben W, Ma-Hock L, Strauss V, Gröters S, Küttler K, Wiench K, Herden C, Oberdörster G, van Ravenzwaay B, Landsiedel R (2014) Time course of lung retention and toxicity of inhaled particles: short-term exposure to nano-Ceria. *Arch Toxicol* 88(11):2033-2059.

- Khargarot BS, Ray PK (1989) Investigation of correlation between physiochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol Environ Saf* 18(2):109-120.
- Kommission Europäische (2011) [https://ec.europa.eu/research/industrial\\_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011_en.pdf), Abrufdatum 05.06.2017.
- Konduru N, Keller J, Ma-Hock L, Gröters S, Landsiedel R, Donaghey TC, Brain JD, Wohlleben W, Molina RM (2014) Biokinetics and effects of barium sulfate nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 11:55.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009) Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16(1):3-11.
- Kroll A, Dierker C, Rommel C, Hahn D, Wohlleben W, Schulze-Isfort C, Göbbert C, Voetz M, Hardinghaus F, Schnekenburger J (2011) Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part Fibre Toxicol* 8:9.
- Landsiedel R, Ma-Hock L, Hofmann T, Wiemann M, Strauss V, Treumann S, Wohlleben W, Gröters S, Wiench K, van Ravenzwaay B (2014) Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 11:16.
- Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, Hahn D, Schnekenburger J, Wiench K, Wohlleben W (2010) Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Adv Mater* 22(24):2601-2627.
- Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, Sauer UG (2017) Safety assessment of nanomaterials using an advanced decision-making framework, the DF4nanoGrouping. *J Nanopart Res* 19(5):171.
- Lang IM, Hauser M, Baumann W, Mätzing H, Paur HR, Seifert H: Freisetzung von Nanopartikeln bei der Abfallverbrennung. In: Thome-Kozmiesky KJ, Beckmann M (Hrsg): *Energie aus Abfall*, Band 12, TK Verlag Karl Thome-Kozmiesky, Neuruppin, 2015, S. 347-370.
- LANUV (2009) <https://www.lanuv.nrw.de/umwelt/umweltmedizin/wirkungen-von-luftschadstoffen/>, Abrufdatum 05.06.2017.
- Lehmann T, Köhler C, Weidauer E, Taege C, Foth H (2001) Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology* 167(1):59-72.
- Lévi-Valensi P, Drif M, Dat A, Hadjadj G (1966) A propos de 57 observations de barytose pulmonaire. (Résultats d'une enquête systématique dans une usine de baryte) [Apropos of 57 cases of pulmonary baritosis. (Results of a systematic investigation in a baryta factory)]. *J Fr Med Chir Thorac* 20(4):443-455.
- Li N, Kim S, Wang M, Froines J, Sioutas C, Nel A (2002) Use of a stratified oxidative stress model to study the biological effects of ambient concentrated and diesel exhaust particulate matter. *Inhal Toxicol* 14(5):459-486.
- Li N, Xia T, Nel AE (2008) The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med* 44(9):1689-1699.
- Libralato G (2014) The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Mar Environ Res* 101:38-43.
- Libralato G, Costa Devoti A, Zanella M, Sabbioni E, Mičetić I, Manodori L, Pigozzo A, Mamenti S, Volpi Ghirardini A (2015) Phytotoxicity of ionic, micro- and nano-sized iron in three plant species. *Ecotoxicol Environ Saf* 123:81-88.



- Libralato G, Galdiero E, Falanga A, Carotenuto R, de Alteriis E, Guida M (2017) Toxicity effects of functionalized quantum dots, gold and polystyrene nanoparticles on target aquatic biological models: A Review. *Molecules* 22(9):1439.
- Lichtenstein D, Bertin A, Fiedler D, Horzowski S, Palavinskas R, Niemann B, Thünemann A, Lampen A. 2014. Uptake of iron oxide nanoparticles as a function of their coating in human intestinal model [poster presentation]. Halle: 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e. V. (DGPT).
- Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Aguerre-Chariol O, Bressot C, le Bihan O, Amodeo T, Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G (2016) Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part Fibre Toxicol* 13:58.
- Loza K, Föhring I, Bünger J, Westphal GA, Köller M, Epple M, Sengstock C (2016) Barium sulfate micro- and nanoparticles as bioinert reference material in particle toxicology. *Nanotoxicology* 10:1492-1502.
- Lu K, Jin Z (2001) Melting and superheating of low-dimensional materials. *Current Opinion in Solid State and Materials. Science* 5:39-44.
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y (2013) Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int* 2013:942916.
- Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ (1995) A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 5(2):69-84.
- Maurer-Jones MA, Gunsolus IL, Murphy CJ, Haynes CL (2013) Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal Chem* 85(6):3036-3049.
- Meissner T, Potthoff A, Richter V (2009) Physico-chemical characterization in the light of toxicological effects. *Inhal Toxicol* 21(1):35-39.
- Molina RM, Konduru NV, Queiroz PM, Figueroa B, Fu D, Ma-Hock L, Groeters S, Schaudien D, Brain JD (2019) Fate of barium sulfate nanoparticles deposited in the lungs of rats. *Sci Rep* 9:8163.
- Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K (2007) The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med* 64(9):609-615.
- Mortimer M, Kasemets K, Heinlaan M, Kurvet I, Kahru A (2008) High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 22(5):1412-1417.
- Mousseau F, Berret JF (2018) The role of surface charge in the interaction of nanoparticles with model pulmonary surfactants. *Soft Matter* 14:1-11.
- Müller NC, Nowack B (2008) Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol* 42(12):4447-4453.
- Naito M, Yokoyama T, Hosokawa K, Nogi K: *Nanoparticle Technology Handbook*. Third Edition Elsevier B.V., 2018, Chapter 6 - Evaluation Methods for Properties of Nanostructured Body, pp. 301-363.
- Nanda K (2009) Size-dependent melting of nanoparticles: Hundred years of thermodynamic model. *Pramana* 72:617-628.
- Nasser F, Constantinou J, Lynch I (2020) Nanomaterials in the environment acquire an "Eco-Corona" impacting their toxicity to *Daphnia Magna* - a call for updating toxicity testing policies. *Proteomics* 20(9):e1800412.
- Nasser F, Lynch I (2016) Secreted protein eco-corona mediates uptake and impacts of polystyrene nanoparticles on *Daphnia magna*. *J Proteomics* 137:45-51.

- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761):622-627.
- Newton GL, Dorian R, Fahey RC (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 114(2):383-387.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7):823-839.
- Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B (2011) Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol Sci* 119(1):3-19.
- Osier M, Oberdörster G (1997) Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol* 40(2):220-227.
- Panas A. 2011. Toxizität und pro-inflammatorisches Potential verschiedener Metalloxid Nanopartikel in Lungenzellen [Dissertation]. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Park EJ, Park YK, Park K (2009) Acute toxicity and tissue distribution of cerium oxide nanoparticles by a single oral administration in rats. *Toxicol Res* 25(2):79-84.
- Pauluhn J (2014) Derivation of occupational exposure levels (OELs) of low-toxicity isometric biopersistent particles: How can the kinetic lung overload paradigm be used for improved inhalation toxicity study design and OEL-derivation? *Part Fibre Toxicol* 11:72.
- Paur HR, Mülhopt S, Weiss C, Diabaté S (2008) In vitro exposure systems and bioassays for the assessment of toxicity of nanoparticles to the human lung. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3:319-329.
- Petrova A, Hintz W, Tomas J (2008) Untersuchungen zur Herstellung von Nanoskaligem Bariumsulfat. *Chemie Ingenieur Technik* 80:359-363.
- Prasad RY, Simmons SO, Killius MG, Zucker RM, Kligerman AD, Blackman CF, Fry RC, Demarini DM (2014) Cellular interactions and biological responses to titanium dioxide nanoparticles in HepG2 and BEAS-2B cells: role of cell culture media. *Environ Mol Mutagen* 55(4):336-342.
- Prasad RY, Wallace K, Daniel KM, Tennant AH, Zucker RM, Strickland J, Dreher K, Kligerman AD, Blackman CF, Demarini DM (2013) Effect of treatment media on the agglomeration of titanium dioxide nanoparticles: impact on genotoxicity, cellular interaction, and cell cycle. *ACS Nano* 7(3):1929-1942.
- Pulido-Reyes G, Leganes F, Fernández-Piñas F, Rosal R (2017) Bio-nano interface and environment: A critical review. *Environ Toxicol Chem* 36(12):3181-3193.
- Rahman I, MacNee W (1999) Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 277(6):1067-1088.
- Ricker A, Liu-Snyder P, Webster TJ (2008) The influence of nano MgO and BaSO<sub>4</sub> particle size additives on properties of PMMA bone cement. *Int J Nanomedicine* 3:125-132.
- Riedl M, Diaz-Sanchez D (2005) Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol* 115(2):221-228.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L: Cell Viability Assays. 2013 May 1 [updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Caaveiro JMM, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M et al. (ed): *Assay Guidance Manual* [Internet], Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013, S. 296.

- Romero G, Estrela-Lopis I, Castro Hartmann P, Rojas E, Llarena I, Sanz D, Donath E, Moya S (2011) Stepwise surface tailoring of carbon nanotubes with polyelectrolyte brushes and lipid layers to control their intracellular distribution and in vitro toxicity. *Soft Matter* 7:6883-6890.
- Röm (2010) Römpp Online <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-02-00258>, Abrufdatum 05.06.2017.
- Runge D, Stock T, Lehmann T, Taege C, Bernauer U, Stolz DB, Hofmann HS, Foth H (2001) Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. *Arch Toxicol* 75:335-345.
- Sabuncu AC, Grubbs J, Qian S, Abdel-Fattah TM, Stacey MW, Beskok A (2012) Probing nanoparticle interactions in cell culture media. *Colloids Surf B Biointerfaces* 95:96-102.
- Schmitz S: *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011, S. 72-75.
- Schremmer I, Brik A, Weber DG, Rosenkranz N, Rostek A, Loza K, Brüning T, Johnen G, Epple M, Bünger J, Westphal GA (2016) Kinetics of chemotaxis, cytokine, and chemokine release of NR8383 macrophages after exposure to inflammatory and inert granular insoluble particles. *Toxicol Lett* 263:68-75.
- Schulze C, Kroll A, Lehr CM, Schaefer U, Becker K, Schnekenburger J, Isfort C, Landsiedel R, Wohlleben W (2008) Not ready to use - Overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* 2:51-61.
- Schulze C, Schaefer U, Ruge C, Wohlleben W, Lehr CM (2010) Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A. *Eur J Pharm Biopharm* 77:376-383.
- Schwotzer D, Ernst H, Schaudien D, Kock H, Pohlmann G, Dasenbrock C, Creutzenberg O (2017) Effects from a 90-day inhalation toxicity study with cerium oxide and barium sulfate nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol* 14:23.
- Sheng H, Ren G, Peng LM, Hu Z (1996) Superheating and melting-point depression of Pb nanoparticles embedded in Al matrices. *Phil Mag Lett* 73(4):179-186.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 10:15.
- Sokolova V, Loza K, Knuschke T, Heinen-Weiler J, Jastrow H, Hasenberg M, Buer J, Westendorf AM, Gunzer M, Epple M (2018) A systematic electron microscopic study on the uptake of barium sulphate nano-, submicro-, microparticles by bone marrow-derived phagocytosing cells. *Acta Biomater* 80:352-363.
- SRU Sachverständigenrat für Umweltfragen: *Vorsorgestrategien für Nanomaterialien – Sondergutachten*. Erich Schmidt Verlag, Berlin, 2012, S. 87-93 und S. 120-122.
- Stock TWB. 2002. *Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen und ihre toxikologische Anwendungsprüfung [Dissertation]*. Halle: Universität.
- Strieter RM (2002) Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(4):688-689.
- Tapanainen M, Jalava P, Mäki-Paakkanen J, Hakulinen P, Happonen M, Lamberg H, Ruusunen J, Tissari J, Nuutinen K, Yli-Pirilä P, Hillamo R, Salonen R (2011) In vitro immunotoxic activities of particles emitted from two different small-scale wood combustion appliances. *Atmos Environ* 45:7546-7554.
- Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR (2011) Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment - issues and recommendations. *Nanotoxicology* 5(4):711-729.

- Tomašek I, Horwell CJ, Bisig C, Damby DE, Comte P, Czerwinski J, Petri-Fink A, Clift MJD, Drasler B, Rothen-Rutishauser B (2018) Respiratory hazard assessment of combined exposure to complete gasoline exhaust and respirable volcanic ash in a multicellular human lung model at the air-liquid interface. *Environ Pollut* 238:977-987.
- Torky A, Stehfest E, Viehweger K, Taege C, Foth H (2005) Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture. *Toxicology* 207:437-450.
- TRGS (2006) <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRGS/TRGS-900.html>, Abrufdatum 31.12.2019.
- UBA (2017) <http://www.umweltbundesamt.de/themen/abfall-ressourcen/entsorgung/thermische-behandlung#textpart-2>, Abrufdatum 29.12.2018.
- Umweltbundesamt (2016) [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/nanomaterialien\\_in\\_ded\\_umwelt.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/nanomaterialien_in_ded_umwelt.pdf), Abrufdatum 29.12.2018.
- Vejerano EP, Holder AL, Marr LC (2013) Emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans from incineration of nanomaterials. *Environ Sci Technol* 47(9):4866-4874.
- Vejerano EP, Leon EC, Holder AL, Marr LC (2014) Characterization of particle emissions and fate of nanomaterials during incineration. *Environ Sci Nano* 1(2):133-143.
- Walser T, Limbach L, Brogioli R, Erismann E, Flamigni L, Hattendorf B, Juchli M, Krumeich F, Ludwig C, Prikopsky K, Saner D, Sigg A, Hellweg S, Günther D, Stark WJ (2012) Persistence of engineered nanoparticles in a municipal solid-waste incineration plant. *Nature Nanotech* 7:520-524.
- Westphal GA, Schremmer I, Rostek A, Loza K, Rosenkranz N, Brüning T, Epple M, Bünger J (2015) Particle-induced cell migration assay (PICMA): A new in vitro assay for inflammatory particle effects based on permanent cell lines. *Toxicol In Vitro* 29(5):997-1005.
- Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, Radke K, Salinas E, Zok S, Landsiedel R (2009) Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO<sub>2</sub> and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76(10):1356-1365.
- Wirtz HR, Dobbs LG (1990) Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science* 250(4985):1266-1269.
- Wu W, Ichihara G, Suzuki Y, Izuoka K, Oikawa-Tada S, Chang J, Sakai K, Miyazawa K, Porter D, Castranova V, Kawaguchi M, Ichihara S (2014) Dispersion method for safety research on manufactured nanomaterials. *Ind Health* 52(1):54-65.
- Yokel RA, Hussain S, Garantziotis S, Demokritou P, Castranova V, Cassee FR (2014) The Yin: An adverse health perspective of nanocerium: uptake, distribution, accumulation, and mechanisms of its toxicity. *Environ Sci Nano* 1(5):406-428.
- Zhao Q, Li Y, Chai X, Zhang L, Xu L, Huang J, Ning P, Tian S (2019) Interaction of nano carbon particles and anthracene with pulmonary surfactant: The potential hazards of inhaled nanoparticles. *Chemosphere* 215:746-752.

## **Thesen**

BaSO<sub>4</sub>-NP beeinflussen die Vitalität, den Glutathiongehalt, die Bildung inflammatorischer Zytokine und andere toxikologische Endpunkte in humanen Lungenzellen.

Eine thermische Behandlung von BaSO<sub>4</sub>-NP verändert diese toxikologischen Eigenschaften nicht.

BaSO<sub>4</sub>-NP sind nicht wasserunlöslich und werden von Lungenzellen aufgenommen.

Mit Hilfe moderner Filtermaterialien in Müllverbrennungsanlagen werden NP fast vollständig aus dem Abgasstrom abgetrennt, so dass durch diesen Prozess keine vermehrte Freisetzung von NP in die Umwelt zu erwarten ist.

Die spezifischen toxikologischen Eigenschaften von Filteraschen resultieren aus deren quantitativer Zusammensetzung und weniger aus der Partikelgröße.

## Anlagen (Abbildungs- und Tabellenverzeichnis)

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Partikelinteraktion mit der humanen Lunge (Bakand et al., 2012) .....	3
Abbildung 2:	Herstellung der 35 %igen BaSO <sub>4</sub> -Suspension; praktische Arbeiten: Sarah Thomas, Kollegen der RWTH Aachen und MVA, Fotos: F. Glahn .....	15
Abbildung 3:	nanoskaliges BaSO <sub>4</sub> in der REM-Aufnahme Solvay (links) und Huntsman (rechts).....	24
Abbildung 4:	Relative Vitalität von NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen der Firma Solvay ermittelt durch den Resazurin-Test.....	28
Abbildung 5:	Relative Vitalität von PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen der Firma Solvay ermittelt durch den Resazurin-Test.....	29
Abbildung 6:	Relative Vitalität von NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen der Firma Huntsman ermittelt durch den Resazurin-Test. ....	29
Abbildung 7:	Relative Vitalität von PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen der Firma Huntsman ermittelt durch den Resazurin-Test. ....	30
Abbildung 8:	Relative LDH-Aktivität im Medium von NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen von Solvay ermittelt durch den LDH-Test.....	31
Abbildung 9:	Relativer Glutathiongehalt von PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen von Solvay ermittelt durch HPLC.....	32
Abbildung 10:	Relatives Apoptose-Level von NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen von Solvay ermittelt durch Durchflusszytometrie am MUSE. ....	33
Abbildung 11:	Aufnahme der BaSO <sub>4</sub> -NP in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen von Solvay gemessen mit ICP-MS. ....	33
Abbildung 12:	Aufnahme der BaSO <sub>4</sub> -NP in PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen von Solvay gemessen mit ICP-MS.....	34
Abbildung 13:	Aufnahme der BaSO <sub>4</sub> -NP in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen von Huntsman gemessen mit ICP-MS.....	34
Abbildung 14:	Aufnahme der BaSO <sub>4</sub> -NP in PLZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen von Huntsman gemessen mit ICP-MS.....	34
Abbildung 15:	Aufnahme der BaSO <sub>4</sub> -NP in die NHBEZ des Patienten B301 nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen von Solvay & Huntsman gemessen mit ICP-MS. ....	35

Abbildung 16:	Lokalisation der BaSO <sub>4</sub> -NP in NHBEZ bei einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/ml. (links: 31P, rechts: Overlay N(red) + S(bright spots); Aufnahmen von AG Prof. D. Schaumlöffel.....	35
Abbildung 17:	Relative Ba <sup>2+</sup> -Ionenfreisetzung nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen ermittelt durch ICP-MS.....	36
Abbildung 18:	Relative Vitalität von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen (unverbrannt vs. geglüht) ermittelt durch den Resazurin-Test.....	37
Abbildung 19:	Relativer Glutathiongehalt von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen (unverbrannt vs. geglüht) ermittelt durch HPLC.....	38
Abbildung 20:	Konzentration des Zytokins IFN- $\gamma$ in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und des geglühten BaSO <sub>4</sub> ermittelt durch FACS-Analyse. ....	39
Abbildung 21:	Konzentration des Zytokins IL-8 in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und des geglühten BaSO <sub>4</sub> ermittelt durch FACS-Analyse. ....	40
Abbildung 22:	Relative Vitalität von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- (reine Holzpellets), Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch den Resazurin-Test. ....	41
Abbildung 23:	Relative LDH-Aktivität von NHBEZ nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- (reine Holzpellets), Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch den LDH-Test. ....	42
Abbildung 24:	Relativer Glutathiongehalt von NHBEZ nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- (reine Holzpellets), Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch HPLC. ....	43
Abbildung 25:	Relative Apoptose-Level von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- (reine Holzpellets), Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch Durchflusszytometrie am MUSE.....	43
Abbildung 26:	Konzentration des Zytokins IL-8 in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz-, Nano- und Mikrobrennstoffes ermittelt durch FACS-Analyse. ....	45
Abbildung 27:	Relative Vitalität von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- und Nanoversuchs ermittelt durch den Resazurin-Test. ....	46
Abbildung 28:	Relative LDH-Aktivität von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- und Nanoversuchs ermittelt durch den LDH-Test. ....	46
Abbildung 29:	Relativer Glutathiongehalt von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Referenz- und Nanoversuchs ermittelt durch HPLC.....	47

Abbildung 30: Relative Apoptose-Level von NHBEZ nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO <sub>4</sub> -Konzentrationen ermittelt durch Durchflusszytometrie am MUSE.....	48
Abbildung 31: Konzentration des Zytokins IL-8 in NHBEZ nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen des unverbrannten BaSO <sub>4</sub> und der Filterstäube des Großversuchs des Referenz- und Nanobrennstoffes ermittelt durch FACS-Analyse.....	49
Abbildung 32: Relative Vitalität von A549 nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen der vier Filterstäube ermittelt durch den Resazurin-Test.....	50
Abbildung 33: Relativer Glutathiongehalt von A549 nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen der vier Filterstäube ermittelt durch HPLC.....	51
Abbildung 34: Relativer Glutathiongehalt von A549 nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikel-Konzentrationen der vier Filterstäube ermittelt durch HPLC.....	51

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Details zu Patientendaten.....	11
Tabelle 2: Bestimmung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials.....	25



## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten, es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), 17.10.2020

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, dass keine früheren Promotionsverfahren oder abgelehnte Promotionsgesuche an anderen Universitäten vorliegen.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Halle (Saale), 17.10.2020

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und ehemaligen Chefin Frau Prof. Dr. Heidi Foth. Ich danke ihr für die ausgezeichnete Betreuung, die Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit und für die vielen Freiheiten, die ich bei der Gestaltung des Themas hatte.

Auch möchte ich Dr. Felix Glahn meinen Dank aussprechen, der mich auf meinem Weg der Dissertation und in den gesamten 6 Jahren als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Umwelttoxikologie mit Rat, produktiven Gesprächen und stetiger Unterstützung begleitet hat.

Des Weiteren möchte ich Berit Schumann, Jan Wiese, Tina Röder und Sabine Herrmann Danke sagen. Ihr habt meine Arbeit durch eure Unterstützung und die tollen Gespräche im Institut stark geprägt. Ihr seid zu mehr als Kollegen geworden.

Allen Kollegen und Partnern des Forschungsprojektes ‚NanoEmission‘ danke ich für die gute und produktive Zusammenarbeit, seit der Formulierung des Projektantrages, über die Unterstützung bei Messungen und Auswertungen während der Experimente, bis hin zum finalen Bericht.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Geduld, ihre Unterstützung und den bis zum Schluss anhaltenden Zuspruch zur Erstellung dieser Dissertation.

Halle, 17.10.2020

Sarah Thomas