

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Toxikologische Bewertung von Bariumsulfat-Nanopartikeln an verschiedenen
Zellkulturmodellen der humanen Lunge**

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 Berit Schumann

geboren am 05. Dezember 1985 in Magdeburg

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

Gutachter/in: PD Dr. med. Marcus Krüger

Prof. Dr. rer. nat. Brunhilde Blömeke, Trier

02.02.2021

17.11.2021

Referat

In der vorliegenden Arbeit wird die toxikologische Wirkung von Bariumsulfat-Nanopartikeln ($\text{BaSO}_4\text{-NP}$) an einer Zelllinie der humanen Lunge (BEAS-2B), an primären Zellkulturen des humanen Bronchus und der peripheren Lunge (NHBEZ und PLZ) und Miniorgankulturen des humanen Bronchus und der peripheren Lunge (B-/ L-MOC) untersucht. Weiterhin wird das *in-vitro*-Modell der Miniorgankulturen charakterisiert und auf seine Eignung als Langzeitkulturmodell geprüft. Die Aufnahme der $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ in die Zellkulturmodelle wird mittels ICP-MS bestimmt und der Einfluss auf die Vitalität mittels zweier verschiedener Tests zur metabolischen Vitalität der Zellkulturmodelle, dem Resazurin-Test und dem MTT-Test, untersucht. Eine mögliche Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit auch eine potentielle Entstehung von oxidativem Stress in den Zellkulturen wird mit Hilfe des DCF-Tests bestimmt. Mit dem H2AX-Test wird zusätzlich das genotoxische Potential von $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ untersucht. Um die pro-inflammatorische Wirkung von $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ zu prüfen, wird die Expression von Interleukin-8 (IL-8) in den primären Zellkulturen durch semi-quantitative *Real-time*-PCR bestimmt. Die Charakterisierung der Miniorgankulturen erfolgt über einen Zeitraum von bis zu drei Monaten mit Hilfe des Resazurin-Tests und immunohistochemischer Färbungen wie der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE), der Färbung des Zytokeratins 7 (CK7) und 8/18 (CK8/18), Desmins, *smooth muscle actin* (SMA), Vimentins, E-Cadherins sowie der Mucine MUC1 und MUC5AC. $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ werden in die Zellen aufgenommen und zeigen in den verschiedenen Zellkulturmodellen keine bzw. eine moderate Toxizität. Die B-/ L-MOC sind dabei am unempfindlichsten. Bei den primären Zellkulturen tritt eine maximale Abnahme der Vitalität auf 54 % nach 72 h Inkubation mit der höchsten Konzentration ($0,526 \text{ mg/cm}^2$) auf. Eine leichte Induktion von ROS kann für die höheren Konzentrationen in den primären Zellkulturen gezeigt werden, jedoch nicht in der Zelllinie BEAS-2B. In keiner der verwendeten Zellkulturen kann ein genotoxisches Potential durch $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ nachgewiesen werden. Eine dosisabhängige Induktion von IL-8 auf das bis zu 2,5-fache kann in den primären Zellkulturen festgestellt werden. Insgesamt kann gezeigt werden, dass $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ moderate Auswirkungen auf die verschiedenen Zellkulturmodelle haben, die jedoch unterschiedlich empfindlich sind. Die Miniorgankulturen zeigen über einen Zeitraum von bis zu drei Monaten eine stabile metabolische Aktivität. In Zusammenhang mit den immunohistochemischen Färbungen ist jedoch eine deutliche zelluläre Veränderung nach etwa vier Wochen zu beobachten, sodass eine weitere Verwendung der MOC darüber hinaus nicht empfohlen ist.

Schumann, Berit: Toxikologische Bewertung von Bariumsulfat-Nanopartikeln an verschiedenen Zellkulturmodellen der humanen Lunge, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss, 75 Seiten, 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Partikel und Fasern	1
1.2 Nanopartikel	3
1.2.1 Nanopartikel und die Lunge	4
1.2.2 Biologische Wirkung von Nanopartikeln und Nanotoxikologie	6
1.2.3 Bariumsulfat	9
1.2.4 Lebenszyklus und Nanopartikel in der Umwelt	11
1.3 3D-Zellkulturmodelle	12
2 Zielstellung	15
3 Material und Methodik	16
3.1 Material	16
3.1.1 Chemikalien	16
3.1.2 Bariumsulfat-Nanopartikel	17
3.1.3 Kulturmedien und Lösungen	18
3.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
3.1.5 Biologisches Material	20
3.2 Methoden	22
3.2.1 Kultivierung des biologischen Materials	22
3.2.2 Herstellung der BaSO ₄ -NP-Suspension	24
3.2.3 Vitalitätstests	24
3.2.4 Aufnahme von Bariumsulfat-Nanopartikeln	26
3.2.5 DCF-Test (ROS-Test)	26
3.2.6 H2AX-Test (Genotoxizitätstest)	27
3.2.7 Molekularbiologische Methoden	28

3.2.8 Immunhistochemische Färbungen	33
3.3 Auswertung und Statistik	33
4 Ergebnisse	35
4.1 Einfluss von BaSO ₄ -Nanopartikeln auf die Vitalität.....	35
4.2 Aufnahme von BaSO ₄ -Nanopartikeln.....	38
4.3 Einfluss von BaSO ₄ -Nanopartikeln auf die Bildung reaktiver Sauer-stoffspezies	40
4.4 Einfluss von BaSO ₄ -Nanopartikeln auf γ -H2AX.....	42
4.5 Einfluss von BaSO ₄ -Nanopartikeln auf IL-8 (mRNA)	44
4.6 Weitere Charakterisierung von Miniorgankulturen humaner Lunge	45
4.6.1 Vitalität Langzeitversuch	45
4.6.2 Immunhistochemische Charakterisierung.....	46
5 Diskussion	53
5.1 Allgemeine Nanotoxikologie und Bariumsulfat-Nanopartikel	53
5.2. Wirkung von Bariumsulfat-Nanopartikel auf verwendete Zellkulturmodelle	54
5.3 Vergleichende <i>in-vivo</i> -Daten zu Bariumsulfat-Nanopartikeln.....	59
5.4 Charakterisierung der Miniorgankulturen humaner Lunge.....	63
6 Zusammenfassung.....	66
7 Literaturverzeichnis	67
8 Thesen	75
Selbstständigkeitserklärung.....	IX
Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	X
Danksagung.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
AECG	Medium (<i>airway epithelium cell growth</i>)
ALI	Luft-Wasser-Grenzschicht (<i>air-liquid-interface</i>)
AU	Absorptionseinheiten (<i>absorption units</i>)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BEAS-2B	normale humane Bronchialepithelzelllinie
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
B-MOC	Miniorgankultur aus Bronchialgewebe
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CK	Zytokeratin (<i>cytokeratin</i>)
CNT	Kohlenstoffnanoröhren (<i>carbon nanotubes</i>)
c_t	Schwellenwertzyklus (<i>threshold cycle</i>)
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DEPC-H ₂ O	Diethyldicarbonat-Wasser (nukleasefreies Wasser)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP-Mix	Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix
EC20	mittlere effektive Konzentration (20 %)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure/Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
FU	Fluoreszenzeinheiten (<i>fluorescence units</i>)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GBP	granuläre biobeständige Nanopartikel

	<i>(granular biodurable nanoparticles)</i>
HBSS	<i>hepes balanced salt solution</i>
H2AX	Histon 2AX
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat
HE	Hämatoxylin-Eosin-(Färbung)
HO-1	Hämoxygenase-1
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma <i>(inductively coupled plasma mass spectrometry)</i>
IL	Interleukin
L-MOC	Miniorgankultur aus Lungengewebe
MAK	maximale Arbeitsplatzkonzentration
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MOC	Miniorgankultur (<i>mini organ culture</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, Tetrazoliumsalz
MUC	Mucin
NanoSIMS	hochauflösende Sekundärionen-Massenspektrometrie <i>(nanoscale secondary ion mass spectrometry)</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells</i>
NHBEZ	normale humane Bronchialepithelzellen
NM	Nanomaterial
NP	Nanopartikel
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PM	Feinstaub (<i>particulate matter</i>)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCLS	<i>precision-cut lung slices</i>
PLZ	periphere Lungenzellen
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reaktive oxygen species</i>)
PSP	schwer lösliche Partikel (<i>poorly soluble particles</i>)
RT-PCR	<i>Real-time-PCR</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SMA	Aktin der glatten Muskulatur (<i>smooth muscle actin</i>)
SOD2	Superoxiddismutase 2
SP	Tensidproteine (<i>surfactant protein</i>)
Temp.	Temperatur
TNS	Trypsin-Inhibitor-Lösung (<i>trypsin inhibitor solution</i>)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Chemikalien und Hersteller.....	16
Tabelle 2:	Charakteristika der beiden BaSO ₄ -Nanomaterialien	17
Tabelle 3:	Verwendete Geräte bzw. Verbrauchsmaterialien und Hersteller	18
Tabelle 4:	Erfassung der Patientendaten des verwendeten Resektionsmaterials.....	20
Tabelle 5:	Pipettierschema des <i>Random Primer Annealings</i>	29
Tabelle 6:	Pipettierschema der Reverse-Transkriptase-PCR.....	30
Tabelle 7:	Verdünnungsreihe des Probenpools zur relativen Quantifizierung der <i>Real-time-PCR</i>	30
Tabelle 8:	Pipettierschema der semi-quantitativen <i>Real-time-PCR</i>	31
Tabelle 9:	Temperaturschema der semi-quantitativen <i>Real-time-PCR</i>	31
Tabelle 10:	Primer-Sequenzen mit entsprechenden Annealing- und Messtemperaturen.....	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mögliche Transportwege von Partikeln unterschiedlicher Größe in der Lunge.	5
Abbildung 2:	Kultivierungsschema von Primärzellen und Miniorgankulturen.....	24
Abbildung 3:	Relative Vitalität von NHBEZ (A) und PLZ (B) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Solvay) ermittelt durch den MTT-Test.	35
Abbildung 4:	Relative Vitalität von NHBEZ (A) und PLZ (B) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den MTT-Test.	36
Abbildung 5:	Absorption verschiedener BaSO ₄ -NP-Konzentrationen [Fa. Solvay(A), Fa. Huntsman (B)] bei 560 nm.	36
Abbildung 6:	Relative Vitalität von BEAS-2B nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den MTT-Test (A) und den Resazurin-Test (B).....	37
Abbildung 7:	Relative Vitalität von B-MOC (A) und L-MOC (B) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den Resazurin-Test.	38
Abbildung 8:	Gehalt an Barium nach 24- und 72-stündiger Inkubation von B-MOC (A) und L-MOC (B) mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch ICP-MS.	39
Abbildung 9:	Gehalt an Barium nach 24- und 72-stündiger Inkubation von BEAS-2B bei 37°C (A) und nach 3-stündiger Inkubation von BEAS-2B bei 37°C bzw. 4-8°C (B) mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch ICP-MS.	40
Abbildung 10:	Relative Entstehung von ROS in NHBEZ (A) und PLZ (B) nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Solvay) ermittelt durch den DCF-Test.	41
Abbildung 11:	Relative Entstehung von ROS in NHBEZ (A) und PLZ (B) nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den DCF-Test.....	41
Abbildung 12:	Relative Entstehung von ROS in BEAS-2B nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den DCF-Test.	42
Abbildung 13:	Relative Expression von H2AX in NHBEZ nach 24- (A) und 72-stündiger (B) Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch Durchflusszytometrie	43
Abbildung 14:	Relative Expression von H2AX in PLZ nach 24- (A) und 72-stündiger (B) Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch Durchflusszytometrie.....	43

Abbildung 15: Relative Expression von H2AX in BEAS-2B nach 24- (A) und 72-stündiger (B) Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch Durchflusszytometrie.....	44
Abbildung 16: Relative Expression von IL-8 in NHBEZ (A) und PLZ (B) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO ₄ -NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch RT-PCR.....	45
Abbildung 17: Vitalität (Fluoreszenz) von Miniorgankulturen humaner Lunge/Bronchus (L-MOC/B-MOC) in Kultur bis zu 84 Tagen ermittelt durch den Resazurin-Test. 46	
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-Übersichtsfärbung L-MOC (ID 315)....	47
Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen L-MOC (ID 315).....	48
Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-Übersichtsfärbung L-MOC (ID 317)....	49
Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen L-MOC (ID 317).....	50
Abbildung 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-Übersichtsfärbung B-MOC (ID 317). ..	51
Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen B-MOC (ID 317).....	52

1 Einleitung

1.1 Partikel und Fasern

Nach der „*Global Burden of Disease Study*“ aus dem Jahr 2015 starben 4,2 Millionen Menschen durch Exposition gegenüber Feinstaub (auch: *particulate matter*, PM); 2,9 Millionen Menschen durch Verschmutzung der Haushaltsluft; 0,4 Millionen Menschen durch berufsbedingte Exposition gegenüber PM und 0,2 Millionen Menschen durch Asbest-Exposition (Forouzanfar et al., 2016). Partikel und Fasern können demnach die menschliche Gesundheit, abhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung, Größe und Form, beeinflussen. Dabei finden komplexe Interaktionen auf verschiedenen Stufen zwischen der Aufnahme und den Antworten der Zielorgane in Organismen statt (Riediker et al., 2019).

Während die Luftverschmutzung mit Partikeln einen großen Anteil zur globalen Krankheitslast beiträgt, finden Partikel zunehmend auch Verwendung im medizinischen Bereich. Je mehr Wissen zu den Eigenschaften von Partikeln bzw. Fasern seit den letzten Jahrzehnten erlangt wird, desto besser können die Reaktionen, die sie in Menschen und Tieren hervorrufen, eingeschätzt werden. Konzepte, die der Wissenschaft helfen die Risiken zu bewerten, sind z.B. der Verbleib der Partikel und Fasern im Körper, die Exposition, Dosimetrie, Dosimetrien und die „fünf Bs“: Bioverfügbarkeit, Biopersistenz, Bioprozessierung, Biomodifizierung und biologische Ausscheidung (Riediker et al., 2019).

Die Partikel- (und Faser-) Toxikologie fokussiert sich auf das Verständnis und die Beschreibung der Beziehung zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Stoffen, sowie der Exposition des Menschen und der Induktion von adversen Effekten. Das Ziel ist es dabei die biopathologischen Mechanismen zu identifizieren. In der Vergangenheit der Partikeltoxikologie spielten primär Quarz (kristallines Siliziumdioxid), Kohle und Asbest eine besondere Rolle (Donaldson und Seaton, 2012). Diese Daten sind nützlich um die Metriken, also die für die Beschreibung der Dosis biologisch relevanten Bezugsgrößen, wie z.B. Partikeldurchmesser, Partikelanzahl, Partikeloberfläche oder Partikelmasse, zu identifizieren. Für das Vorhersagen negativer Effekte aktueller Anwendungsszenarien sind diese Bezugsgrößen von großer Bedeutung. Die derzeitige Herausforderung liegt vor allem in der Anwendung von technisch hergestellten Nanomaterialien mit nanoskaligen Strukturen zwischen 1 – 100 nm (Hunt et al., 2013).

Das Paradigma für Faserpathogenität rührt aus dem Verständnis wie Asbest Lungentumore inklusive Mesotheliome im Menschen auslöst. Dieses beinhaltet Aspekte wie die „frustrierte Phagozytose“, bei der Makrophagen nicht in der Lage sind die Fasern vollständig zu umhüllen. Es kommt deshalb zu einer fortwährenden Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und in Folge weiterer zellulärer Prozesse auch zu inflammatorischen Reaktionen (Donaldson et al., 2010).

Die vielen beschriebenen Fälle von Quarzexpositionen (kristallines Siliziumdioxid) haben gezeigt, dass diese Substanz irreversible Lungenschäden verursacht, auch bekannt als Silikose (Quarzstaublunge) bei Bergarbeitern. Anders als beim Asbest, bei dem ein Kontakt möglichst verhindert werden soll, kommen im 21. Jahrhundert weiterhin Expositionen mit Quarz vor – und deshalb auch Silikosen. Als Auslöser für die Toxizität gilt dabei die Partikellöslichkeit und das damit verbundene Lösen der Kieselsäure aus der Quarzoberfläche (Riediker et al., 2019). Die physikalischen Eigenschaften von Partikeln und Fasern spielen eine Hauptrolle bei der mechanischen Irritation der Lunge und der damit verbundenen Inflammation (Entzündung). Obwohl die Inflammation in erster Linie eine Schutzfunktion des Körpers darstellt, kann eine lange und exzessive Entzündungsreaktion zu Fibrosen und Ödemen, sowie zur Bildung und Progression von Tumoren führen. Die drei historischen Fallbeispiele standen alle im Zusammenhang mit einer Exposition von Partikeln und Fasern am Arbeitsplatz. (Riediker et al., 2019). In den späten 1990er Jahren veränderte sich der wissenschaftliche Fokus von den arbeitsplatzassoziierten Partikelexpositionen zur Exposition in der Umwelt. In epidemiologischen Studien zeigte sich, dass PM in der Umgebungsluft mit einer verfrühten Mortalität und der Verschlechterung einiger Krankheiten in Zusammenhang steht. Neben bekannten Lungenerkrankungen wie *Asthma bronchiale* und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) wurde auch von negativen Auswirkungen auf kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs durch PM in der Umwelt berichtet (Schlesinger et al., 2006). Die Lunge und das kardiovaskuläre System sind als Zielorgane gut untersucht. In jüngerer Zeit wurde gezeigt, dass auch das Zentralnervensystem und die Reproduktion durch inhalierte Partikel beeinflusst werden können (Heusinkveld et al., 2016; Hougaard et al., 2015). Es gibt einige allgemein anerkannte partikelinduzierte Gefahren. Das Inhalieren von Partikeln kann z.B. oxidativen Stress auslösen, welcher wiederum zu genotoxischen Effekten und reversibler bzw. irreversibler Inflammation führen kann (Møller et al., 2013).

1.2 Nanopartikel

Die Europäische Kommission empfiehlt seit 2011: *„Nanomaterial ist 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“*, als Definition von Nanomaterialien anzuwenden (Potočnik und Europäische Kommission, 2011). *„In besonderen Fällen kann der Schwellenwert von 50 % für die Anzahlgrößenverteilung durch einen Schwellenwert zwischen 1 % und 50 % ersetzt werden, wenn Umwelt-, Gesundheits-, Sicherheits- oder Wettbewerbsabwägungen dies rechtfertigen“* (Potočnik und Europäische Kommission, 2011). Nanopartikel (NP) entstehen als Primärpartikel direkt während natürlicher Prozesse (Feuer, Vulkanausbrüche und Erosion) oder können auch anthropogenen Ursprungs sein (Verkehr und industrielle Herstellung). Sekundärpartikel werden in der Atmosphäre durch Gas-Partikel-Umwandlung und anschließender Nukleation gebildet. Dies kann z.B. bei heißen Verbrennungsgasen der Fall sein oder während der Verarbeitung von Metallen, wie dem Schweißen. Die Größe dieser Partikel ist mit 1 – 10 nm sehr gering (Borm et al., 2006). NP besitzen im Vergleich zu größeren Partikeln desselben Stoffes, auch Bulk-Material genannt, besondere Eigenschaften, die auf ihre geringen Abmessungen zurückzuführen sind. Je kleiner ein Teilchen ist, desto größer ist der Anteil der Atome, die sich an seiner Oberfläche befinden. Aufgrund des großen Masse-Oberfläche-Verhältnisses kann sich die chemische und katalytische Reaktionsfähigkeit verändern bzw. erhöhen (Nanoscience and nanotechnologies, 2004).

Das wachsende Feld der Nanotechnologie hat viele Branchen des industriellen Bereichs mit ihren neuen Anwendungen in den Bereichen Biotechnologie, Elektronik, Medizin/Pharmazie, Kosmetik, Materialwissenschaften, Luft- und Raumfahrttechnik und Biosensoren verändert. Eine Vielzahl von Verbraucherprodukten mit hergestellten Nanomaterialien (NM) ist mittlerweile kommerziell relevant geworden. Ihre neuartigen physikalisch-chemischen, thermischen und elektrischen Eigenschaften führen zu neuen Anwendungen in Kleidung, Medizin und Kosmetik, erhöhen dadurch jedoch auch die Wahrscheinlichkeit für den Kontakt von Mensch und Umwelt mit diesen NM (Nel et al., 2006; Manke et al., 2013). Die weit verbreitete Verwendung von NM, wie z.B. Kohlenstoffnanoröhren (CNT) und metallbasierten NP wirft Bedenken zur unbeabsichtigten Exposition beim Menschen und den daraus möglicherweise resultierenden gesundheitsschädlichen Auswirkungen auf. Eine große Vielfalt der physikochemischen Parameter von NM wie Größe, Form, Struktur und elementare Bestandteile machen die Untersuchung ihrer toxischen Effekte komplex und herausfordernd. Einige der Paradigmen für NP-vermittelte Toxizität umfassen oxidativen Stress, Inflammation, genetische Schädigung und die Hemmung von Zellteilung und Zelltod (Ju-Nam und Lead, 2008; Manke et al., 2013).

NM können anhand ihrer Wirkungsweise in die drei Kategorien; chemische Toxizität (u.a. Freisetzung von Ionen und chemisch-funktionelle Gruppen), faserig biopersistent (keine chemische Toxizität, Tumorinduktion) und granulär biopersistent (keine chemische Toxizität, Inflammation und Tumorinduktion); eingeteilt werden. Die Gefährdungsbeurteilung von NM kann infolgedessen besser strukturiert werden. (Gebel et al., 2014).

1.2.1 Nanopartikel und die Lunge

Die Aufnahme von NP in den Organismus erfolgt hauptsächlich inhalativ, jedoch ist auch eine orale und dermale Absorption der Partikel möglich. Die Lunge eines erwachsenen Menschen besitzt eine Oberfläche von 120 m^2 - 140 m^2 . Sie setzt sich aus einer Abfolge miteinander verbundener Luftwege zusammen. Dazu zählen die Luftröhre, gefolgt von den Bronchien, Bronchiolen bis hin zu den Alveolen (Lungenbläschen). Die Alveolen, der Ort des Gasaustausches von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, werden durch Epithelzellen geformt, die auf ihrer Innenseite direkten Kontakt mit den Endothelzellen der Blutgefäße haben. Diese alveolare Grenzschicht trennt den Luftraum innerhalb der Lunge vom Blut in den Kapillargefäßen ab und wird auch Blut-Luft-Schranke genannt (Gehr et al., 2006). Die Atemluft enthält zwischen 1.000 - 10.000 Mikroben/Keime sowie zwischen 10 – 50 μg Fein- und Ultrafeinstaub pro m^3 . Ein Erwachsener atmet demnach mit 10.000 - 15.000 l Atemluft täglich mehr als 10.000 Mikroben und 10 Milliarden Partikel ein. Zu den Reinigungsmechanismen (*Clearance*) des Körpers gehören zum einen die alveolaren Makrophagen (Fresszellen) und zum anderen die sogenannte mukoziliäre Reinigung der oberen Atemwege durch die Zilien (Flimmerhärchen). Eingeatmete Partikel lagern sich in Abhängigkeit von ihrer Größe in den verschiedenen Regionen der Lunge ab. Kleinstpartikel können bis in die Alveolen gelangen. Dort werden die Partikel von den Makrophagen aufgenommen und über die Bronchiolen und Bronchien nach oben in Richtung Rachen abtransportiert. Größere Partikel werden durch die mukoziliäre Reinigung direkt in Richtung Rachen befördert. Der Schleim mit den Fremdsubstanzen wird daraufhin durch Schlucken, Abhusten oder Ausspucken aus der Lunge entfernt (DaNa, 2020b).

Darüber hinaus beeinflusst die Größe der PM den Übertritt in den Blutkreislauf. In der Feinstaub-Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird zwischen inhalierbaren, thorax- und alveolen-gängigen Stäuben unterschieden. Nach dieser Definition gelangt die einatembare Staubfraktion in die oberen Atemwege wie Mund, Nase und Rachen ($\text{PM}_{10} < 10 \mu\text{m}$). Die thorax-gängige Staubfraktion hingegen gelangt bereits bis in die Bronchien und Bronchiolen ($\text{PM}_{2.5} < 2.5 \mu\text{m}$). Die alveolen-gängige Fraktion enthält die kleinsten Partikel ($\text{PM}_1 < 1 \mu\text{m}$). Diese erreichen die Gasaustauschregion der Alveolen und sind demnach potenziell in der Lage, die Blut-

Luft-Schranke zu überwinden. NP werden aufgrund ihrer Größe der Kategorie der alveolen-gängigen Fraktion zugeordnet (DaNa, 2020b; Krug und Wick, 2011).

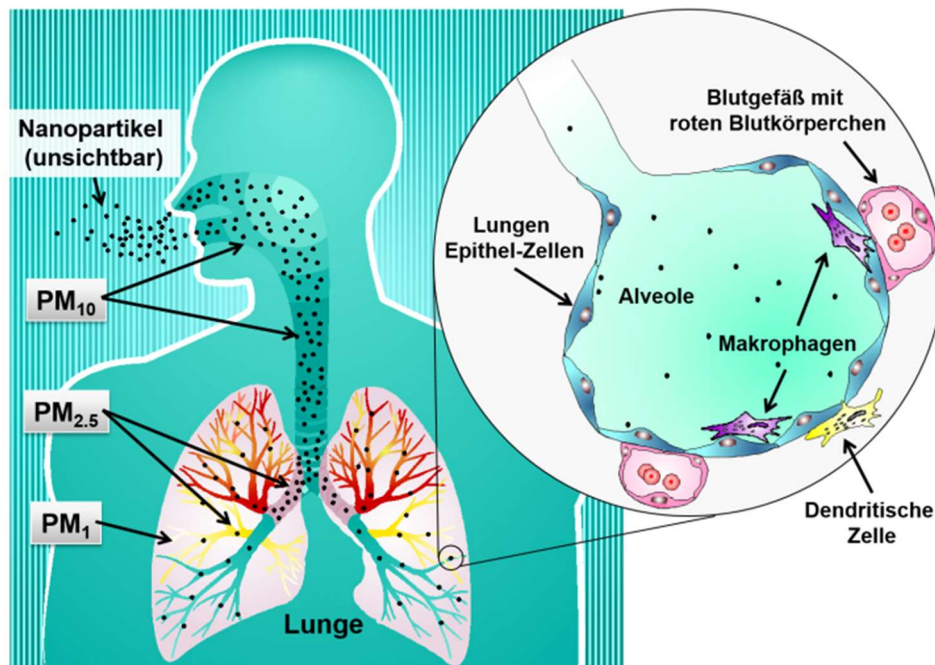


Abbildung 1: Mögliche Transportwege von Partikeln unterschiedlicher Größe in der Lunge.

PM: Feinstaub (*particulate matter*), PM₁₀ < 10 µm, PM_{2.5} < 2.5 µm, PM₁ < 1 µm, (DaNa, 2020b; Krug und Wick, 2011).

Die erste biologische Barriere, auf die inhalierte Partikel stoßen, ist das *Surfactant* auf der Auskleidungsflüssigkeit der Alveolen (*alveolar lining fluid*, ALF). Dies ist eine dünne Flüssigkeitsschicht, die das respiratorische Epithel zur Luftseite hin bedeckt. Das *Surfactant* besteht zu ca. 90 % aus Lipiden (hauptsächlich Phospholipiden) und 10 % Proteinen (sogenannte Tensidproteine, SP). In Bezug auf die Wechselwirkung zwischen *Surfactant* und inhalierten Partikeln wird vier *Surfactant*-Proteinen eine Schlüsselrolle zugeschrieben. SP-B und -C sind sehr lipophil und verbessern die Oberflächenaktivität von Tensidphospholipiden. Die hydrophileren Proteine SP-A und -D gehören zu den Kollektinen, die durch Erkennung und Bindung das Entfernen infektiöser Partikel aus der Lunge erleichtern. SP-A ist das bekannteste der vier Tensidproteine und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr der Lunge. Um weitere biologische Reaktionen zu verstehen und vorherzusagen, ist es von großer Bedeutung mögliche Partikelinteraktionen mit diesem Protein zu verstehen (Schulze et al., 2011).

1.2.2 Biologische Wirkung von Nanopartikeln und Nanotoxikologie

Neben vielen *in-vivo*-Studien, wurde die Toxizität von NP bisher auch in *in-vitro*-Studien mit humanen Zellen aus diversen Organen durchgeführt. Dennoch sind die adversen Effekte der NP weiterhin nicht komplett verstanden. Die durch NP verursachten Wirkungen können z.B. auf die direkte Zerstörung von Zellmembranen und Organellen oder die Bindung an Biomakromoleküle und der damit verbundenen Veränderung ihrer Struktur und Funktion zurückgeführt werden. Als Endpunkt für die Zytotoxizität wurde meist der Einfluss auf die Anzahl lebender Zellen und die metabolische Aktivität, z.B. mittels des MTT-Tests, untersucht. Das Ausmaß der Zytotoxizität wird dabei von vielen Faktoren wie z.B. Art der NP, physikochemische Eigenschaften der NP und Art des Untersuchungsmodells beeinflusst (Liu und Tang, 2020). Es ist schon lange bekannt, dass sich bei Nanopartikeln Speziesunterschiede in den toxikologischen Wirkungen und Empfindlichkeiten zeigen, was für die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus *in-vivo*-Studien auf die Humantoxizität entscheidend ist (Elder et al., 2005). Zusätzlich zu den Eigenschaften, wie Agglomerationsverhalten der NP oder dem besonderen Oberflächen-zu-Massen-Verhältnis der NP, wird dem Löslichkeitsverhalten und damit der Freisetzung von Ionen aus NP eine immer größere Bedeutung in der Partikeltoxikologie zugeschrieben (Pauluhn, 2014).

Eng verbunden mit den toxikologischen Mechanismen ist die Aufnahme und Verteilung der NP in die Zellen. Um Auswirkungen der Anwendung von NP zu verstehen, ist es deshalb wichtig Aufnahmemechanismen zu erforschen. Die Zellmembran besteht aus einer Doppelschicht, welche überwiegend aus Phospholipiden besteht und selektiv den Ein- und Austritt von Substanzen in Zellen steuert und die Stabilität der intrazellulären Umgebung aufrechterhält. NP gelangen normalerweise durch Endozytose in die Zelle. Phagozytose, Makrozytose, Clathrin-abhängige Endozytose und Caveolin-abhängige Endozytose stellen dabei die vier Hauptwege der zellulären Aufnahme von NP dar. Nachdem die NP die Zellmembran passiert haben, werden diese typischerweise durch die Vesikel/ frühen Endosomen in den Zellen eingeschlossen und befinden sich in den frühen oder späten Lysosomen, wenn die Vesikel reifen. Über die Zeit können NP auch wieder über Exozytose aus der Zelle transportiert werden. Dieser Prozess ist jedoch energieabhängig, abhängig von den Partikeleigenschaften und meist nicht vollständig (Liu und Tang, 2020).

Die meisten bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten zur biologischen Wirkung von NP legen dar, dass die Entstehung von ROS und der daraus resultierende oxidative Stress häufig bei NP-vermittelter Toxizität beobachtet werden können. Die physikalisch-chemische Charakterisierung von NP, einschließlich ihrer Partikelgröße, Oberflächenladung und chemischen Zusammensetzung, ist ein Schlüsselindikator für die nachfolgende ROS-Bildung und die NP-induzierten Schäden. Viele dieser intrinsischen NP-Eigenschaften können eine ROS-Entstehung

katalysieren. Die NP-vermittelte ROS-Entstehung kann eine Reihe von pathologischen Ereignissen wie Genotoxizität, Entzündungen, Fibrosen und Karzinogenese hervorrufen. Beispielsweise löst CNT-induzierter oxidativer Stress die Signalwege aus, die zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen und fibrotischen Zytokinen führen (Manke et al., 2013; Li et al., 2010). Zudem kann für einige NP gezeigt werden, dass sie Entzündungszellen wie Makrophagen und Neutrophile aktivieren. Welche wiederum eine erhöhte Produktion an ROS induzieren. Andere NP wie Titandioxid (TiO_2), Zinkoxid (ZnO), Ceroxid (CeO_2) und Silber-NP lagern sich auf der Zelloberfläche an oder im Inneren subzellulärer Organellen ab und induzieren oxidative Stresssignalkaskaden, die schließlich zum oxidativen Stress in der Zelle führen (Buzea et al., 2007). Der Mechanismus für die ROS-Entstehung ist für jedes NP unterschiedlich und die genauen zugrundeliegenden zellulären Mechanismen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Viele metallbasierte NP lösen eine Toxizität, vermittelt durch freie Radikale aus der Fenton-Reaktion bzw. Fenton-ähnlicher Reaktionen, aus. Wohingegen bei der CNT-vermittelten ROS-Erzeugung Mitochondrien-schäden eine ursächliche Rolle spielen (Huang et al., 2010b; Manke et al., 2013). Die ROS-Entstehung ist nicht in jedem Fall die Voraussetzung für eine NP-vermittelte Toxizität. Einige NP besitzen durchaus eine direkte toxische Wirkung. Dennoch ist die ROS-Entstehung ein bedeutendes Ereignis während eines NP-induzierten Schadens, das es gründlich zu untersuchen gilt, um eine NP-induzierte Toxizität vorherzusagen (Manke et al., 2013).

ROS sind Signalmoleküle innerhalb der Zellkommunikation bzw. Homöostase und sind reaktive Spezies des molekularen Sauerstoffs. Sie bilden einen Pool an Oxidationsmitteln einschließlich des Superoxidans ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikals (OH^{\cdot}), Wasserstoffperoxids (H_2O_2), Singulett-Sauerstoffs ($^1\text{O}_2$) und der Hypochlorsäure (HOCl). ROS werden intrinsisch oder extrinsisch innerhalb der Zelle generiert. Aus molekularem Sauerstoff entsteht durch Ein-Elektronen-Reduktion, katalysiert mittels der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) das primäre ROS $\text{O}_2^{\cdot-}$. Eine weitere Reduktion des Sauerstoffs, durch Dismutation und metallkatalysierte Fenton-Reaktion, kann entweder zur Bildung von H_2O_2 oder OH^{\cdot} führen (Thannickal und Fanburg, 2000). Des Weiteren stellen die mitochondriale Atmung, Entzündungsreaktionen, Mikrosomen und Peroxisomen endogene Quellen von ROS dar. Hergestellte NM und Umweltschadstoffe wirken als exogene ROS-Induktoren. Auch physiologisch werden ROS in geringen Mengen als Reaktion auf verschiedene Reize produziert. Freie Radikale treten zudem als essentielle Nebenprodukte der mitochondrialen Atmung und Reaktionen vom Fenton-Typ, katalysiert durch Übergangsmetalle, auf (Thannickal und Fanburg, 2000). Entzündungs-Phagozyten wie z.B. Neutrophile und Makrophagen induzieren ROS als Abwehrmechanismus gegen Umweltschadstoffe, Tumorzellen und Mikroben. Eine Vielzahl von NP, einschließlich Metalloxid-NP, induzieren ROS als einen der Hauptmechanismen für deren

Zytotoxizität. Weiterhin beeinflussen NP intrazelluläre Calciumkonzentrationen, aktivieren Transkriptionsfaktoren und modulieren die Zytokinproduktion durch Erzeugung freier Radikale (Huang et al., 2010a; Li et al., 2010).

Ein Überfluss an ROS kann potenziell zu schädlichen biologischen Reaktionen und anschließendem oxidativem Stress führen. Dieser geht aus einem Ungleichgewicht zwischen der Entstehung von ROS und der Fähigkeit des biologischen Systems, die reaktiven Zwischenprodukte leicht zu entgiften oder die resultierenden Schäden zu reparieren, hervor. Um überschüssige ROS zu entfernen, können Zellen enzymatische und nichtenzymatische Antioxidationsysteme aktivieren (Manke et al., 2013). Zellen und Gewebe reagieren auf eine zunehmende oxidative Belastung bei NP-Exposition über antioxidative Enzymsysteme. Unter den Bedingungen eines leichten oxidativen Stresses, findet eine Aktivierung der antioxidativen Enzyme der Phase II über die Induktion des Transkriptionsfaktor Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) statt. Bei mittlerem oxidativen Stress induzieren redox-sensitive MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) und NF- κ B- (*nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*) Kaskaden eine proinflammatorische Reaktion. Starker oxidativer Stress führt zu mitochondrialen Membranschädigungen und Funktionsstörungen der Elektronenkette, die im Zelltod resultieren können. Schlüsselfaktoren, wie die Erschöpfung von Antioxidantien oder die erhöhte Produktion begünstigen die prooxidativen Wirkungen von technischen NM. Eine Störung des normalen Redoxzustands trägt zur Produktion von Peroxid und freien Radikalen bei (Huang et al., 2010a). Aufgrund der chemischen Reaktivität kann es dabei zu DNA-Schäden, Lipidperoxidation und Aktivierung von Signalwegen, die mit dem Verlust von Zellenwachstum, Fibrose und Karzinogenese verbunden sind, kommen (Buzea et al., 2007).

Die Entzündung ist ein Abwehrmechanismus des Körpers, an dem mehrere Immunregulierungsmechanismen beteiligt sind und denen eine Infiltration von Phagozyten-zellen folgt. Mehrere Studien mit ein- und mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren haben die Induktion von Entzündungen in verschiedenen Zellen gezeigt, z.B. auch in Alveolar- und Bronchialepithelzellen (Khanna et al., 2015). Entzündungen können eine direkte Toxizität verursachen und den Zelltod durch Induktion von ROS und Komplementproteinen fördern. Zudem kann eine rezeptor-induzierte Apoptose oder Nekrose induziert werden (Wallach et al., 2014). Außerdem führt oxidativer Stress zur Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren durch die Hauptkaskaden der NF- κ B-, MAPK- und Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3-K) Wege. Dies deutet auf die wechselseitige Verbindung von oxidativem Stress und Entzündung hin. Sowohl *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Studien zeigen, dass NP-induzierte Lungenschäden und Lungenfibrosen zur ROS-vermittelten Aktivierung von NF- κ B und der Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren wie z.B. TNF- α (*tumor necrosis factor α*), IL-2 (Interleukin-2), IL-6 und IL-8 führen (Khanna et al., 2015). Die Induktion des Chemokins IL-8 wurde in der humanen Lungenzelllinie BEAS-2B

durch TiO₂-NP auch über den p38 MAPK-Signalweg und/oder den extrazellulären Signal (ERK) -Weg vermittelt (Park et al., 2008).

Verschiedene Nanomaterialien werden so entwickelt, dass sie einzigartige Eigenschaften haben. Diese Eigenschaften beeinflussen auch ihre mögliche Interaktion mit der DNA. Es hat sich gezeigt hat, dass z.B. kationisch funktionalisierte Kohlenstoff-Nanoröhren DNA kondensieren können (Singh et al., 2005) und dass 1,4 nm kleine Gold-Nanopartikel (nicht größer oder kleiner) an die große Furche der DNA binden können (Pan et al., 2007). Jedoch ist bei den meisten Nanomaterialien bisher unbekannt, ob sie direkt mit der DNA interagieren oder ob indirekte Effekte wie z.B. die Entzündungs-vermittelte Bildung von ROS oder Freisetzung von toxischen Ionen ursächlich für die Genotoxizität sind (Oesch und Landsiedel, 2012; Gebel et al., 2014). Es werden prinzipiell die Mechanismen der direkten Wechselwirkung von Nanopartikeln mit der DNA oder den Chromosomen, der indirekten primären Genotoxizität oder sekundären Genotoxizität (z.B. durch Entzündung-Zellen erzeugte ROS *in-vivo*) unterschieden. Dabei umfasst die indirekte primäre Genotoxizität die Interaktion der NP mit der mitotischen Spindel oder deren Komponenten, die Störung von Funktionen der Zellzyklus-Kontrollpunkte, durch Zellkomponenten (Mitochondrien) erzeugte ROS und die Inhibierung der antioxidativen Abwehr (Gebel et al., 2014). *In-vitro*-Studien zur Genotoxizität von NM erweisen sich häufig als nicht schlüssig infolge methodischer Probleme. Die in positiven *in-vitro*-Studien berichteten Effekte stehen aufgrund hoher Dosen teilweise in Zusammenhang mit einer Zytotoxizität als Störfaktor und sind im Allgemeinen nicht stark ausgeprägt oder falsch positiv. NP sind zudem meist nur in geringen Mengen in den Zellen zu finden und noch seltener in Zellkernen. *In-vivo*-Studien geben Hinweise auf Lungengentoxizität über den Inhalationsweg der NP. Dieser Effekt steht sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer sekundären Entzündung und ROS-Bildung (Gebel et al., 2014). Für weitere Forschungen wird es wichtig sein die unterschiedlichen Strukturen der Nanomaterialien und die Mechanismen der DNA-Interaktion zu erkennen. Damit ist es möglich eine optimale Auswahl der Tests und Testbedingungen zu treffen und die Ergebnisse der Genotoxizitätstests auf das Risiko für den Menschen zu extrapolieren. (Oesch und Landsiedel, 2012).

1.2.3 Bariumsulfat

Bariumsulfat (BaSO₄) ist das Bariumsalz der Schwefelsäure. Es ist natürlich im Mineral Baryt enthalten. BaSO₄ hat eine hohe Dichte von 4,5 g/cm³ und ist in Wasser, Säuren (außer in heißer konzentrierter Schwefelsäure) und Laugen schwerlöslich. Die Löslichkeit in Wasser beträgt 2,2 mg/l Wasser (Hartwig und MAK-Kommision, 2017; DaNa, 2020a). BaSO₄-Partikel werden inhalativ und oral aufgenommen. Eine dermale Aufnahme ist nicht bekannt. Des Weiteren sind

BaSO₄-Partikel chemisch inert. Sie sind schwerlösliche Stäube, die wie andere granuläre biobeständige Stäube (GBS) allgemeine Partikeleffekte zeigen. Die Partikel können wie andere inhalierte schwerlösliche Stäube in der Lunge und den Lymphknoten akkumulieren und eine Beeinträchtigung der *Clearance*-Funktion in der Lunge verursachen. Aufgrund der Kategorisierung als GBS-Staub, ist eine partikelbedingte Tumorentstehung bei einer Überlastung der Lungen-*Clearance* zu erwarten. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine chronische und hohe Exposition gegenüber Bariumsulfat-Staub zur Barytose, eine nicht-fibrotische Pneumokoniose, beim Menschen führt. BaSO₄ ist nicht reproduktionstoxisch und nicht sensibilisierend. Als maximale Arbeitsplatz-Konzentration (MAK-Wert) gilt der allgemeine Staubgrenzwert von $0,3 \text{ mg/m}^3 \times \text{Materialdichte}$ für die alveolen-gängige Fraktion. Für die einatembare Fraktion wird der MAK-Wert von 4 mg/m^3 angegeben (Hartwig und MAK-Kommission, 2017). Weitere Kategorisierungen für BaSO₄-NP sind *granular biodurable nanoparticles* (granuläre biobeständige NP, GBP) ohne bekannte spezifische Toxizität und *poorly soluble particles* (schwer lösliche Partikel, PSP) (Gebel et al., 2014).

Als Füllstoff findet natürliches BaSO₄ sowohl in der Kunststoffindustrie als auch in der Lack- und Farbenindustrie Verwendung (Füllstoffspat). In Kunststoffen verbessert Bariumsulfat die Verarbeitbarkeit und erhöht das Gewicht und damit die schalldämmende Wirkung. Die chemische Inertheit und hohe Temperaturstabilität wird in Kupplungsbelägen oder Bremsbelägen ausgenutzt. In der Lack- und Farbenindustrie dient BaSO₄ neben der Volumengebung vor allem zur Verbesserung der Verarbeitungseigenschaften. Auch in der Textilindustrie findet Bariumsulfat Anwendung. Aufgrund seines hohen Absorptionskoeffizienten für Gamma- und Röntgenstrahlung eignet es sich in Verbindung mit Beton (Barytbeton, Barytzement) auch als Abschirmmaterial für Atomenergieanlagen. Auch in zahlreichen Röntgenkontrastmitteln ist Bariumsulfat (Röntgenbaryt) enthalten (DaNa, 2020a). Etwa 70 % des synthetischen Bariumsulfats (Blanc fixe/Permanentweiß) wird für Anstrichstoffe verwendet. Wichtige Anwendungen sind dabei Grundierungen und Füller bei Automobillackierung, Industrielacken, Bauten-, Holz- sowie Druckfarben. Durch den Zusatz von Blanc fixe werden Kunstdruckpapiere und Fotopapiere (Barytpapiere) außerordentlich gut glättbar. Die Fähigkeit des BaSO₄ Röntgenstrahlung zu absorbieren (Radioopazität), wird auch für medizinische Geräte wie Katheter oder Drainageröhrchen und bei Spielzeug, das von Kindern verschluckt werden kann, ausgenutzt (DaNa, 2020a). Bei der Verwendung von BaSO₄-NP in medizinischen Produkten konnte gezeigt werden, dass u.a. die antimikrobiellen Eigenschaften, die Zytokompatibilität in Bezug auf Osteoblasten und die Radioopazität verbessert werden (Aninwene et al., 2013; Ricker et al., 20). In der Kosmetikindustrie wird BaSO₄ z.B. als Lichtschutzfaktor eingesetzt (Petrova et al., 2008).

1.2.4 Lebenszyklus und Nanopartikel in der Umwelt

Das Gefährdungspotenzial eines Stoffes lässt sich nicht allein durch seine Nanoskaligkeit beschreiben. Die potenziell schädigende Wirkung eines NM wird neben seiner chemischen Zusammensetzung auch von Eigenschaften wie seiner Größe, Geometrie, Kristallstruktur und Oberflächeneigenschaften (z.B. Ladung) bestimmt. Zusätzlich können die Umgebungsparameter (z.B. pH-Wert, Salzgehalt) die Eigenschaften von NM verändern und so deren Mobilität, Bioverfügbarkeit und toxische Wirkung in der Umwelt beeinflussen. Der Großteil der auf dem Markt zur Verfügung stehenden NM ist anorganischer Natur und kann daher biologisch nicht abgebaut werden. Es ist davon auszugehen, dass sie in der Umwelt persistieren werden. Um eine Exposition von NM in der Umwelt abschätzen zu können, werden Informationen über das Vorkommen in den verschiedenen Produkten und Anwendungen beziehungsweise über die Freisetzung über den gesamten Lebenszyklus (Herstellung, Gebrauch, Transport, Recycling, Abfallbeseitigung) benötigt (UBA, 2016). Angesichts des Lebenszyklus eines Produktes kann die toxikologisch relevante Wirkung über die Lebensdauer eines NM, aufgrund der Freisetzung toxischer Komponenten aus dem Produkt, hinaus reichen (Gebel et al., 2014). Konkrete Daten zur Verwendung sowie zur qualitativen und quantitativen Freisetzung stehen derzeit jedoch nur unzureichend zur Verfügung. Die Freisetzung von NP in die Umwelt wurde z.B. für die Verwitterung, mechanische Beanspruchung von verschiedenen Beschichtungen und das Waschen von Textilien untersucht. Denkbar ist auch eine Freisetzung von NP aus Sonnenschutzmitteln in Badegewässer (Shandilya et al., 2015; Geranio et al., 2009; UBA, 2016).

Untersuchungen mit Hilfe von Modellkläranlagen zeigen, dass die bisher betrachteten NM zu ca. 90 % im Klärschlamm gebunden werden. Nur ein geringer Anteil (< 10 %) gelangt in das Oberflächengewässer (Wang et al., 2012). Wird der Klärschlamm landwirtschaftlich genutzt, ist eine Exposition des Ackerbodens mit NP möglich. Untersuchungen zum Verhalten von NP (z.B. CeO₂, TiO₂, BaSO₄) in Müllverbrennungsanlagen haben gezeigt, dass diese überwiegend in den Feststoffrückständen wie Schlacke und Flugasche abgeschieden werden und eine Freisetzung über das gereinigte Rauchgas vernachlässigbar ist (Walser et al., 2012; Fraunhofer UMSICHT et al., 2017).

Bisher gibt es nur unzureichend qualitative und quantitative Daten zur Freisetzung von Nanomaterialien in die Umwelt, die eine Aussage über den gesamten Lebenszyklus erlauben. Der biologische Abbau spielt bei den anorganischen NP meist eine untergeordnete Rolle. Das Verhalten in der Umwelt wird hingegen von Prozessen wie (Hetero-) Agglomeration, Aggregation, Sedimentation, Adsorption von Stoffen, Anhaftung an Oberflächen und Transformation oder Auflösung bestimmt. NM sedimentieren in Abhängigkeit ihrer Dichte und Agglomeration über die Zeit aus der Luft oder aus aquatischen Systemen auf den Boden bzw. in

das Sediment. Die Datenlage zum Verhalten und Verbleib von NM in der Umwelt und zur Aufnahme bzw. Toxizität in Umweltorganismen hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert, ist jedoch immer noch nicht ausreichend um ein umfassendes Bild über NM in der Umwelt zu erhalten (UBA, 2016).

1.3 3D-Zellkulturmodelle

Permanente Zelllinien zeichnen sich durch ein konstantes Wachstumsverhalten und eine stabile Morphologie über viele Passagen aus. Sie sind leicht verfügbar und liefern reproduzierbare Ergebnisse. Jedoch besitzen permanente Tumorzelllinien nur noch wenige ursprüngliche *in-vivo*-Charakteristika (Schmitz, 2009). Alfaro-Moreno et al. (2008) entwickelten z.B. als Weiterentwicklung zur Monokultur ein 3D-Tetrakultursystem aus der Lungentumorzelllinie A549, Makrophagen-ähnlichen Zellen (THP-1), einer humanen Mastzelllinie (HMC-1) und den endothelialen Zellen EA.hy 926, um die pulmonale Kommunikation nach der Gabe von Feinstaub (*urban* PM10) zu untersuchen (Alfaro-Moreno et al., 2008). Klein et al. entwickelten dieses System methodisch weiter und exponierten es mit einem nanoskaligen Siliziumoxid-Rhodamin-Aerosol (Klein et al., 2013). Die Co-Kultur wird dabei so angelegt, dass sie der *in-vivo*-Histologie der alveolären Barriere ähnelt. Die endothelialen Zellen (EA.hy 926) werden an der basolateralen Seite eines Membran-Inserts kultiviert. Die Lungenepithelzellen (A549) werden zusammen mit den beiden Zelllinien des angeborenen Immunsystems (THP-1, HMC-1) auf der apikalen Seite des *air-liquid-interface* (ALI) ausgesät. Die Tetrakultur wurde zusätzlich über das „Vitrocell-Expositions-System“ mit einem Nanopartikel-Aerosol unter ALI-Bedingungen exponiert. Dabei wird angenommen, dass unter diesen Bedingungen Surfactant gebildet wird (Klein et al., 2013). Weiterhin konnte die Induzierbarkeit, auch im Vergleich zur submersen Kultivierung (höhere Induktion), von ROS und IL-8 mittels 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochlorid (AAPH) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse erwecken den Eindruck, dass die submerse Exposition zu einer Überbewertung der bisher beobachteten Ergebnisse führt (Klein et al., 2013).

Miniorgankulturen (MOC) aus gesundem humanem Lungen- und Bronchialgewebe sind ca. 8 mm³ große Gewebestücke. Al-Batran und Kolleg:innen gehen davon aus, dass bronchiale Miniorgankulturen aus oligozellulärem Stroma des Bindegewebes bestehen und von einer mehrreihigen respiratorischen Epithelschicht umgeben sind, die sich während der Kultivierung bildet (Al-Batran et al., 1999). Ist die Epithelialisierung abgeschlossen, stellen Miniorgankulturen ein dem respiratorischen Epithel sehr nahes Modell dar. In einer weiteren Studie konnte eine Vielzahl an sekretorischen, zilienträgenden und basalen Zellen nachgewiesen werden (Bals et al., 1998). Derzeit liegen nur wenige Untersuchungen, z.B. über Expressionsmuster toxikologisch relevanter Proteine, zu humanen Miniorgankulturen der Lunge vor. Sie könnten jedoch aufgrund

ihrer Ähnlichkeit zur *in-vivo*-Situation ein nützliches Modell als Alternative zu *in-vivo*-Versuchen mit Tieren darstellen, auch für chronische und wiederholte Expositionsversuche. Des Weiteren sind Miniorgankulturen leicht zu kultivieren, jedoch ist die Verfügbarkeit von humanem Gewebe limitiert. Wissenschaftliche Arbeiten mit MOC der nasalen Schleimhaut zeigten, dass diese sich für Untersuchungen zu kumulativ genotoxischen und apoptotischen Effekten durch Fremdstoffe in Zielzellen von Karzinogenen eignen. Dabei wurden die MOC an Tag 7, 9 und 11 mit Natriumdichromat (1 mM, für 1 h) im Vergleich zu einer einmaligen Gabe an Tag 11 inkubiert. Die kumulativ beimpften MOC zeigten eine höhere Induktion von DNA-Schäden (Comet-Assay) und eine größere Apoptoserate (Annexin-V-Assay) (Buehrlen et al., 2007). Es können zudem stabile Gehalte des Cytochrom P450 2A6 über den gesamten Kultivierungszeitraum (11 Tage) nachgewiesen werden (Kleinsasser et al., 2009). Zinkoxid-NP induzierten eine Zyto- und Genotoxizität in humanen nasalen MOC. Für TiO₂-NP konnte dies nicht gezeigt werden (Hackenberg et al., 2017). Ein sehr ähnliches Modell stellen die *precision-cut lung slices* (PCLS) dar. Bei diesem *ex-vivo*-Modell werden ausgewählte Lungensegmente über einen Katheter mit 1,5 %iger Agarose gefüllt. Nach abgeschlossener Polymerisation, werden mit einem Microtom 1 cm x 250 µm große Scheiben geschnitten. PCLS enthalten alle relevanten Zelltypen des respiratorischen Traktes. Sie werden u.a. für pharmakologische Tests und Forschung zum Fremdstoffmetabolismus, frühen allergischen Antworten und Calcium-Signalwegen verwendet (Lauenstein et al., 2014). Lauenstein und Kolleg:innen zeigten, dass verschiedene Mechanismen der Immuntoxizität (direkte Toxizität und immun-vermittelt) in den PCLS stattfinden und durch verschiedene industrielle Chemikalien induziert werden können. Häufiger als humane PCLS werden PCLS z.B. von Ratten verwendet. Nach 24-stündiger Exposition mit verschiedenen NP konnte das PCLS-System frühe Ereignisse einer NM-Toxizität darstellen, wie die Verringerung der mitochondrialen Aktivität, Zytokininduktion und histopathologische Veränderungen (Sauer et al., 2014).

In Bezug auf die Exposition gegenüber NM wird die Inhalation als Hauptaufnahmeweg anerkannt – insbesondere im beruflichen Kontext, aber auch für Verbraucher. Die biologische Relevanz von Kurzzeit-Ratteninhalationsstudien und zusätzliche intratracheale *in-vivo* Instillationsstudien zur toxikologischen Bewertung von NM wird häufiger in Frage gestellt. Obwohl die Anzahl der Tiere und die Expositionsdauer bei diesen beiden *in-vivo*-Methoden im Vergleich zu Studien zur akuten Inhalationstoxizität verringert sind, erfordern auch diese weiterhin die Verwendung und Tötung von Tieren. Eine Ersatzmethode zur Bestimmung der kurzfristigen Inhalationstoxizität von NM ist derzeit noch nicht entwickelt worden. NM wurden bei einer Vielzahl von verschiedener Zellkultursystemen eingesetzt, die aus einem oder mehreren Zelltypen – pulmonalen oder anderen Ursprungs – bestehen, wobei menschliche oder tierische Primärzellen oder Zelllinien und verschiedene Endpunktnachweismethoden verwendet wurden. Die Zellen wurden dabei in

Suspension oder ALI kultiviert. Die in solchen *in-vitro*-Testmethoden generierten Ergebnisse waren nicht konsistent und es bedarf der Entwicklung standardisierte *in-vitro*-Testmethoden, um frühe zelluläre Effekte bei NM-Exposition darstellen zu können. Folglich ist die Relevanz von *in-vitro*-Testergebnissen für die Vorhersage von NM-Effekten *in-vivo* umstritten, nicht zuletzt, weil Zellkultursystemen die strukturelle Identität des Lungengewebes fehlt (Klein et al., 2013; Bérubé et al., 2009; Sauer et al., 2014; Landsiedel et al., 2012; Kroll et al., 2011). Die Datenlage zu Studien mit NM an humanen MOC oder ähnlichen Modellen ist sehr schwach.

2 Zielstellung

Die menschliche Gesundheit wird von Partikeln und Fasern, abhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung, Größe und Form, beeinflusst. Der heutige Forschungsschwerpunkt liegt vor allem auf den Auswirkungen von nanoskaligen Strukturen zwischen 1 - 100 nm durch den verstärkten Einsatz von technisch hergestellten Nanomaterialien (NM) u.a. auch Bariumsulfat-Nanopartikeln (BaSO₄-NP). Dabei ist es wichtig die Beziehung von der Exposition gegenüber NM und deren Fähigkeiten adverse Effekte im Organismus auszulösen zu verstehen. Das Ziel der Partikeltoxikologie ist es auch die bisher noch nicht vollständig verstandenen biopathologischen Mechanismen zu identifizieren. Mögliche Auswirkungen NP-vermittelter Toxizität umfassen oxidativen Stress, Entzündung, genetische Schädigung und die Hemmung der Zellteilung und Zelltod. Es gibt Studien, die davon ausgehen, dass es keine nanospezifischen Wirkmechanismen gibt. Bekannt ist jedoch, dass NP aufgrund ihres größeren Oberfläche-zu-Masse-Verhältnis eine stärkere Effektausprägung im Vergleich zu den jeweiligen Mikropartikeln in verschiedenen toxikologischen Endpunkten bewirken können. Der inhalativen Aufnahme wird in der aktuellen Forschung die größte Bedeutung beigemessen. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit die toxikologische Wirkung von BaSO₄-NP, als Vertreter für granuläre biobeständige NP (GBP), auf verschiedene Zellkulturmodelle der humanen Lunge, wie die Zelllinie BEAS-2B, die primären Zellkulturen des Bronchus (NHBEZ) und der peripheren Lunge (PLZ) sowie Miniorgankulturen des Bronchus und der peripheren Lunge (B-/ L-MOC) untersucht. Allgemein fehlt es nach wie vor an gut charakterisierten und prädiktiven *in-vitro*-Alternativen zu Tierversuchen im Bereich der Nanotoxikologie. Darüber hinaus ist die Übertragbarkeit von *in-vitro*-Daten auf *in-vivo*-Daten im Allgemeinen und auf den Menschen im Besonderen bisher nicht vollständig geklärt. Um zukünftig möglicherweise bessere Voraussagen zu toxikologischen Wirkungen von Stoffen auf den Menschen treffen zu können, wird in dieser Arbeit das humane 3D-*in-vitro*-Modell der Miniorgankulturen charakterisiert und auf seine Eignung als Langzeitkulturmodell geprüft. Die Charakterisierung der Miniorgankulturen erfolgt über einen Zeitraum von bis zu drei Monaten. Dabei wird die metabolische Vitalität bestimmt und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Zur umfassenden Bewertung der toxikologischen Wirkung von BaSO₄-NP auf die Zellkulturmodelle der humanen Lunge wird die Aufnahme der NP in die Zellkulturmodelle ermittelt und der Einfluss der NP auf die Vitalität untersucht. Weiterhin wird eine mögliche Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit auch eine potenzielle Entstehung oxidativen Stresses in den Zellkulturen bestimmt. Zusätzlich wird das genotoxische Potential und die pro-inflammatorische Wirkung von BaSO₄-NP auf die humanen Lungenzellkulturen untersucht.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Hersteller.

Name	Konzentration/Zusätze	Hersteller
2-Propanol		Sigma-Aldrich
2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA)		Sigma-Aldrich
2',7'-Dichloro-fluorescein-Diacetat (H ₂ DCF-DA)		Sigma-Aldrich
AECG-Medium (<i>airway epithelial cell growth</i>)	+ Supplement	PromoCell
Ameisensäure		Roth
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)		Sigma-Aldrich
Diethyldicarbonat (DEPC)		AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)		Merck
Ethanol	70 %	Walter GmbH
HBSS (<i>hepes balanced salt solution</i>)		PromoCell
Kupfersulfat-Lösung		Sigma-Aldrich
L-15-Medium (Leibovitz's L-15)		PromoCell
Maleinsäurediethylester (Diethylmaleat, DEM)		Sigma-Aldrich
Menadion		Sigma
MTT (Tetrazoliumsalz)		AppliChem
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)		Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	2 N	Roth
Penicillin/Streptomycin	10.000 Units/ml	Biochrom AG
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)		Biochrom AG
Resazurin-Salz		Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	1 N	Roth
TNS (<i>trypsin inhibitor solution</i>)	0,05 % + BSA 0,1 %	PromoCell
Trypsin/EDTA, Primärzellen	0,025 %/0,01 %	PromoCell
Trypsin/EDTA, Aufnahme Experimente	0,05 %/0,2 %	Biochrom AG

H2AX-Test Reagenzien (*H2AX Activation Dual Detection Kit, Luminex*)

Test-Puffer; Fixierungspuffer; Permeabilisierungspuffer; Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139), Alexa Fluor®555; Anti-H2AX, PECy5

RNA-Isolierungs-Reagenzien (*High Pure RNA Isolation Kit*, Roche)

Lyse-/Bindungspuffer, DNase I, DNase Inkubationspuffer, Waschpuffer I und II, Eluationspuffer

c-DNA-Synthese Reagenzien (NIPPON Genetics Europe)

Random-Primer, *Fast Gene® Scriptase Basic* (Reverse Transkriptase), *Fast Gene® Scriptase Basic* 10-fach Puffer, dNTP-Mix, RNase Inhibitor

Real-time-PCR Reagenzien

Sybr-Green I (Cambrex, Rockland, USA), Magnesium (Promega), PCR-Mastermix (Thermo Fischer), Primer (Biomers; Invitrogen)

3.1.2 Bariumsulfat-Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit kamen Bariumsulfat-Nanopartikel (BaSO₄-NP) zweier verschiedener Hersteller zum Einsatz. Die Vorversuche erfolgten mit den Partikeln des Herstellers Solvay (Brüssel, Belgien). Der Hersteller stellte zu Beginn des Projektes die Produktion von BaSO₄-NP ein. Bereits durchgeführte Versuche wurden mit dem neuen Material der Firma Huntsman (Salt Lake City, USA) wiederholt und die Materialien verglichen. Alle Nanomaterialien und Partikelproben wurden vor der Suspensionsherstellung mittels Gammastrahlung sterilisiert.

Tabelle 2: Charakteristika der beiden BaSO₄-Nanomaterialien.

Eigenschaften	Solvay	Huntsman
Partikelgröße laut Hersteller [nm]	60	40
REM d ₅₀ [nm]	60* ¹	60* ¹
Area [m ² /g] - BET	43,4* ¹	31,5* ¹
d [nm] AECG/0,005% Dispex	94 ± 11	107 ± 5
Zeta- Potential [mV] AECG/0,005% Dispex	-23,2	-25,4

*¹ Bestimmt durch Projektpartner (BMBF-Projekt NanoEmission); REM: Rasterelektronenmikroskop, BET: Brunauer-Emmett-Teller-Verfahren, AECG: *airway epithelium cell growth* (Medium), (Thomas, 2020; Fraunhofer UMSICHT et al., 2017)

3.1.3 Kulturmedien und Lösungen

Zellkulturmedium

AECG-Medium + Supplement + 1 % Penicillin/Streptomycin; pH 7,4

Sterilisieren von Materialien und Lösungen

Hitzebeständige Glas-, Plastikmaterialien und Lösungen wurden durch 25-minütiges Autoklavieren bei 120°C sterilisiert. Nicht hitzebeständige Lösungen wurden sterilfiltriert. Die eingesetzten Sterilfilter (0,2 µm oder 0,45 µm Porenweite) richteten sich nach der Viskosität der Lösungen.

DEPC-H₂O

Ein Liter bidestilliertes Wasser wurde mit 1 ml Diethyldicarbonat (DEPC) versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

3.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Geräte bzw. Verbrauchsmaterialien und Hersteller.

Name	Hersteller
Abdecktuch, Foliodrape	Hartmann
Abzug (Radionuklidabzug)	Köttermann
Ansaughilfe (accu-jet pro),	Schütt Labortechnik
Autoklav (Varioclave)	H+P-Labortechnik
Brutschrank (Heracell)	Heraeus Instruments
Combitips (Combitips plus; 10 ml; 12,5 ml; 25 ml)	Eppendorf
Eisbereiter (KBS KF85)	Migel
Falcon- Röhren (15 ml, 50 ml)	Greiner bzw. TPP
Fuchs-Rosenthal-Kammer (Tiefe 0,200mm; 0,0625 mm ²)	GLW
Handschuhe (Latex, Sempercare)	Sempermed
Handschuhe (Nitril, Nitra-TEX, MicroTouch)	Ansen
Hybridisierungsöfen	Biometra OV5
Kryoröhrchen (Cryovial)	Simport
Kühlschrank	Liebherr
Mehrkanal-Pipette	VWR International
Mikroskop (Eclipse TS100)	Nikon

Name	Hersteller
Mikroskop (BX 50)	Olympus
Mikroskopkamera (Progres GRYPHAX Arktur)	Jenoptik
Mullkompressen (steril)	Fuhrmann
Mullkompressen (ES-Kompressen)	Hartmann
Multipipette (Multipipette plus)	Eppendorf
MUSE® Cell Analyzer	Luminex, vorher Merck Millipore
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte
PCR-Thermocycler (Mastercycler Gradient)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Thermocycler (<i>real time</i> , Rotor-Gene Q)	Qiagen
pH-Meter (pH 330)	WTW
Photometer (DU 730, Life Science UV/VIS-Spektrophotometer)	Beckman Coulter
Pipetten (2,5- 1000 µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl und 1000 µl)	Eppendorf bzw. Greiner
Platten-Reader (GENios)	Tecan
Pumpe (KNF, Laboport)	Schütt Labortechnik
Reinstwasser-Anlage	Werner Barnstead
Serologische Pipetten	Greiner
Skalpell (Einmal-Skalpell)	Servopax
Sterilbank (Hera-safe)	Heraeus Instruments
Sterilfiltration (Filter Sartolab- P; 0,2- 0,45 µm)	Sartorius
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Liebherr
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Heraeus- Instruments
Ultraschallsonde (Sonoplus HD3100 mit Beschallungsbecher),	Bandelin
Vortex (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries
Waage (fein, Mettler AE 240)	Schmieder
Waage (BL150)	Sartorius
Zentrifugen (2-16KL), Sigma; (CS-15R Centrifuge)	Beckmann Coulter
Zentrifuge (Biofuge Fresco)	Heraeus Instruments
Wasserbad	GFL
Zellkultur-Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	TPP
Zellkultur-Platten (6-Well, 24-Well, 96-Well)	TPP
Zellkulturschalen (60 mm ²)	TPP

3.1.5 Biologisches Material

a) BEAS-2B

Die Zellen der Zelllinie BEAS-2B (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt) sind normale humane Bronchialepithelzellen. Die Zellen entstammen aus gesunden, tumorfreien Individuen und wurden mittels eines Adenovirus 12-SV40 Hybridvirus immortalisiert (Reddel et al., 1989).

b) Primäre Zellkulturmodelle

Normale humane Bronchialepithelzellen (NHBEZ), periphere Lungenzellen (PLZ) und die Miniorgankulturen (MOC) aus Bronchus und Lunge (B-/ L-MOC) wurden aus humanem Lungengewebe gewonnen, welches aus tumorfreien Bereichen von Lungenteilresektionen stammte. Zumeist handelte es sich dabei um Patient:innen, die operativ einer Tumorresektion unterzogen wurden. Es fand keine gezielte Gewebsentnahme für die durchgeführten Versuche statt. Das Resektionsmaterial wurde dem Institut für Umwelttoxikologie durch Herrn PD Dr. med. Krüger, Klinik für Thoraxchirurgie des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dölau zur Verfügung gestellt. Mittels Patientenfragebögen wurden Diagnose, Alter, Geschlecht, berufliche Exposition, Tabakkonsum und andere Besonderheiten erfasst. Für die Nutzung des Patientenmaterials zu Forschungszwecken lag eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor. Das Votum wurde am 16.08.2017 erteilt (Bearbeitungsnummer 2016-20). Kulturen der primären Bronchialzellen und der primären Lungenzellen bestehen zu $\geq 95\%$ aus Zellen mit epithelalem Charakter (Lehmann, 2001). Die Miniorgankulturen sind ca. 8 mm^3 große Gewebestücke. Es ist davon auszugehen, dass bronchiale Miniorgankulturen aus oligozellulären Stroma des Bindegewebes bestehen und von einer mehrreihigen respiratorischen Epithelschicht umgeben sind (Al-Batran et al., 1999).

Tabelle 4: Erfassung der Patientendaten des verwendeten Resektionsmaterials.

ID	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Raucherstatus	Arbeitsumfeld
297	55 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), rechter OL	seit 40 Jahren Raucher ca. 40 PY	kein Risiko
298	83 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), rechter UL	seit 10 Jahren NR, vorher 50 PY	kein Risiko
299	72 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), linker UL	seit einem Jahr NR, vorher 50 Jahre Raucher, 50 PY	kein Risiko
300	73 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), linker OL	ehemals Raucher, 40 PY	kein Risiko

ID	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Raucherstatus	Arbeitsumfeld
301	65 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), rechter ML	Seit einem Monat NR, vorher 51 Jahre Raucher, ca. 30 – 35 PY	Industrieschuh- macher (LM, fl. Chemikalien)
302	56 ♂	Pleuraemphysem, chron. Atelektase rechter UL	seit 42 Jahren Raucher, 42 PY	k.A.
303	76 ♀	Bronchialkarzinom (NSCLC), rechter ML	24 Jahre NR, ca. 30 PY	kein Risiko
304	74 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), linker OL	Seit 20 Jahren NR, vorher ca. 35 PY	kein Risiko
305	58 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), linker UL	seit 40 Jahren Raucher, ca. 40 - 60 PY	kein Risiko
306	54 ♂	Bronchialkarzinom	seit 40 Jahren Raucher, ca. 80 PY	Walzwerk, Metall-Gießerei
307	62 ♀	Bronchialkarzinom (NSCLC), rechter OL	seit einem Jahr NR, vorher 50 Jahre Raucherin, 50 PY	Reinigungskraft (fl. Chemikalien)
313	65 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), linker OL	seit elf Jahren NR, vorher 40 PY	kein Asbest
315	77 ♂	Bipulmonale Metastasen (Sarkom), linker OL	seit 44 Jahren NR, vorher 16 Jahre Raucher, 24 PY	private Asbest- exposition
316	66 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), linker OL	seit 50 Jahren Raucher, ca. 50 PY	Mechaniker (LM, Abgase)
317	68 ♂	Pulmonale Metastase (Prostatakarzinom), linker OL	seit 20 Jahren NR, vorher 10 Jahre Raucher, 5 PY	Schlosser
318	68 ♂	Pulmonale Metastase (Rektumkarzinom), linker OL	vor 55 Jahren ca. 5 Jahre gelegentlich geraucht, 1-2 Zig/d	kein Risiko
319	70 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), rechter OL	seit zwei Wochen NR, 20 PY	u.a. Fliesenleger
320	76 ♂	Bifokales Bronchialkarzinom (NSCLC), linker OL	seit 40 Jahren NR, vorher 40 PY	Druckerei, kein Asbest

♀: Weiblich, ♂: Männlich, chron.: chronisch, fl.: flüssig, k.A.: keine Angabe, LM: Lösungsmittel, NR: Nichtraucher, NSCLC: nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (Non Small Cell Lung Cancer), OL/ML/UL: Oberlappen/Mittellappen/Unterlappen, PY: Packyear (ein PY entspricht 20 Zig/d über einen Zeitraum von einem Jahr), Zig/d: gerauchte Zigaretten pro Tag.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung des biologischen Materials

a) BEAS-2B

Die adhärenzte Zelllinie BEAS-2B wächst einschichtig (*Monolayer*) in Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen u.ä. und wurde mit dem Zellkulturmedium AECG (*airway epithelial cell growth*, PromoCell) überschichtet und als submerse Zellkultur geführt.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Arbeiten fanden unter einer Sicherheitswerkbank statt. Alle zur Kultivierung nötigen Lösungen und Arbeitsgeräte waren steril und die Lösungen zudem auf 37 °C vorgewärmt.

Erreichten die Zellen nach ca. sieben Tagen eine Konfluenz von 80 – 90 % (100 % entsprechen einem geschlossenen Zellrasen) wurden sie passagiert. Dafür wurde das „*Detach Kit*“ von PromoCell verwendet. Nach dem Spülen der Zellen mit ca. 100 µl HBSS/cm² Zellkulturfläche erfolgte die Zugabe von 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung/cm² Zellkulturfläche bei 37 °C. Nach ca. zehn Minuten hatten sich die Zellen abgelöst und die Trypsinierung wurde mit 100 µl TNS/cm² Zellkulturfläche abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1.000 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in AECG-Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer. Es konnten nun neue Zellkulturflaschen zur Erhaltung der Zelllinie oder Zellkulturschalen und -platten für weiterführende Experimente ausgesät werden. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

Nachfolgende Experimente dieser Arbeit wurden überwiegend im subkonfluenten Bereich bis ca. 90 % Konfluenz durchgeführt. Innerhalb eines Experimentes wurden die verschiedenen Konzentrationen von BaSO₄-NP jeweils als Zwei- bis Sechsfach-bestimmung (n = 2 - 6) analysiert und das Experiment zumeist mit mindestens einer weiteren Passage (N ≥ 1) wiederholt.

b) Primärzellkultur

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde am Institut für Umwelttoxikologie eine Explantkultur primärer Zellen aus humanem Lungengewebe entwickelt. Die folgend beschriebene Methode richtet sich im Wesentlichen nach der Publikation von Runge und Kolleg:innen (Runge et al., 2001).

Unmittelbar nach der Operation wurde tumorfreies Gewebe in das kühle, sterile Transportmedium Leibovitz L-15 überführt und zeitnah für die Kultivierung vorbereitet. Das Gewebematerial wurde mit 37 °C warmen PBS (enthält 1 % Penicillin/Streptomycin) gewaschen und in ca. 8 mm³ große

Stücke geschnitten. Lungen- und Bronchialgewebe wurde dabei getrennt. Danach wurden die Gewebestücke in Zellkulturschalen mit AECG-Medium überschichtet und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Auch bei den Primärzellkulturen wurde mit sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank gearbeitet und alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Das Kulturmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

Nach zwei bis drei Wochen wuchsen die adhärennten Zellen als *Monolayer* aus dem Gewebe aus und wurden bei einer Konfluenz von ca. 70 % subkultiviert. Die Gewebestücke wurden dafür in neue Zellkulturschalen umgesetzt. Es konnte so eine weitere Generation NHBEZ und PLZ auswachsen. Für die Passagierung der ausgewachsenen Primärzellen wurde analog zu der Zelllinie BEAS-2B das „*Detach Kit*“ von Promocell verwendet. Die Trypsinierung erfolgte dabei für ca. fünf bis sieben Minuten. Zur Erhaltung der jeweiligen Generation Primärzellen wurden die NHBEZ und PLZ als submerse Zellkultur in Zellkulturflaschen bzw. für weiterführende Experimente in Zellkulturschalen und -platten ausgesät. Der Wechsel des Mediums fand auch hier, bis zur weiteren Subkultivierung bei einer 80 – 90 %igen Konfluenz, dreimal wöchentlich statt.

Die Experimente mit Primärzellen wurden überwiegend im subkonfluenten Bereich durchgeführt. Ebenso sind die verschiedenen Konzentrationen innerhalb eines Experimentes jeweils als Zwei- bis Sechsfachbestimmung (n = 2 - 6) ermittelt worden. Ein Experiment wurde zumeist mit mindestens einer weiteren Passage oder mit einem anderen Patientenmaterial (N ≥ 1) wiederholt.

c) Miniorgankulturen

Die Miniorgankulturen (MOC) sind etwa 8 mm³ große Gewebestücke, die analog dem Gewebe vorbereitet wurden, aus denen die Primärzellen auswachsen (siehe 3.2.1. b) Primärzellkultur). Nach dem Schneiden wurden die MOCs aus Lungen- und Bronchialgewebe jedoch in 6-Well-Zellkulturplatten mit Agarose-Beschichtung kultiviert, um das Auswachsen von Zellen zu verhindern (Al-Batran et al., 1999). Die Agarose wurde 1,5 %ig in AECG-Medium (ohne Supplement) hergestellt. Zuerst wurden die Miniorgankulturen mit 2 ml AECG-Medium überschichtet. Am nächsten Tag (Tag 1) wurde das Medium gewechselt und 1 ml Kulturmedium hinzugefügt. An Tag 4 wurden *dry-wet*-Bedingungen hergestellt und nur noch 400 µl AECG-Medium eingesetzt. Danach findet der Mediumwechsel mit 400 µl alle zwei bis drei Tage statt.

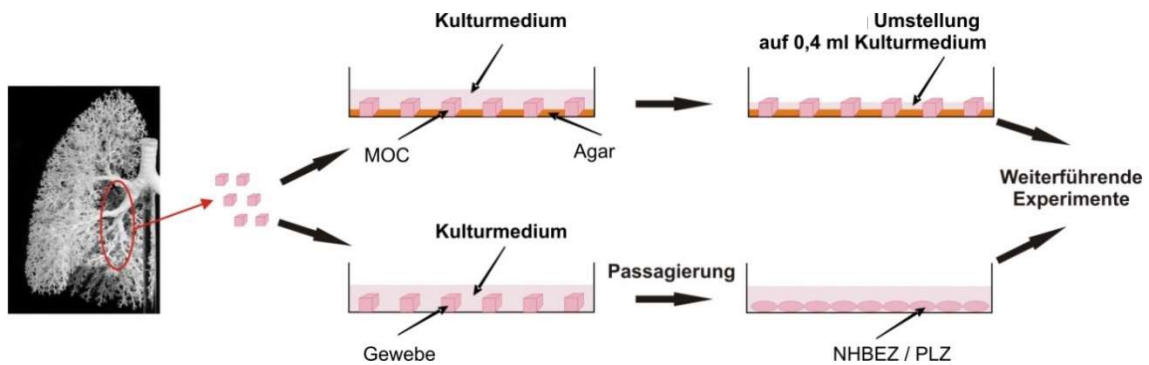


Abbildung 2: Kultivierungsschema von Primärzellen und Miniorgankulturen.

3.2.2 Herstellung der BaSO₄-NP-Suspension

Für die Herstellung der BaSO₄-NP-Suspension wurde zunächst eine Stammlösung von BaSO₄-NP in AECG-Medium + 0,005% Dispex AA4040 (Tensid) von 10 mg/ml erstellt und drei Minuten in der Ultraschallsonde mit Beschallungsbecher behandelt (Energieeintrag von ca. 15 kJ). Für die jeweils gewünschte BaSO₄-NP-Konzentration wurde die Stammlösung entsprechend in AECG-Medium/0,005 %Dispex verdünnt und erneut drei Minuten mit der Ultraschallsonde behandelt. Das Protokoll folgt den Vorarbeiten von Frau Sarah Thomas am Institut für Umwelttoxikologie. Es konnte gezeigt werden, dass diese Aufarbeitung zu reproduzierbaren Nanopartikelgrößenverteilungen führt (Thomas, 2020).

3.2.3 Vitalitätstests

Aussagen über die Vitalität von Zellkultursystemen und die Zytotoxizität einzelner Substanzen sind für deren Bewertung und das Arbeiten mit Zellkulturen von großer Wichtigkeit.

Weiterführende Experimente, wie zum Beispiel Genexpressions-Analysen, wurden in der vorliegenden Arbeit bei subtoxischen Konzentrationen durchgeführt. Der effektive Vitalitätsverlust sollte dabei nicht mehr als 20 % (EC20) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle betragen. Es wurden zwei verschiedene Vitalitätstests, zum einen der MTT-Test und zum anderen der Resazurin-Test, durchgeführt.

a) MTT-Test

Mit dem MTT-Test wird die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid] wird von Dehydrogenasen in lebenden Zellen zu dem unlöslichen blau-violetten Formazan reduziert. Die Intensität des Farbstoffs kann spektrometrisch bestimmt werden und verhält sich proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen (Gerlier und Thomasset, 1986).

Der MTT-Test erfolgte in einer 24-Well-Zellkulturplatte. Nach Ablauf der 24- bzw. 72-stündigen Inkubation mit BaSO₄-NP wurde das Medium aus den Kavitäten entfernt und die Zellen einmal mit 37 °C warmen PBS gespült. Es schloss sich ein 30-minütiger Inkubationsschritt mit dem MTT-Farbstoff (0,7 mg/ml PBS) bei 37 °C und ein weiteres Spülen mit warmen PBS an. Zur photometrischen Bestimmung wurden die Zellen mit einem Isopropanol/Ameisensäure-Gemisch (19:1) lysiert und resuspendiert. Die Bestimmung der Absorption der Lysate erfolgt am UV/VIS-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 560 nm.

b) Resazurin-Test

Der Resazurin-Test ist ein schneller und sensitiver Vitalitätstest. Der Farbstoff wirkt dabei nicht zytotoxisch. Das oxidierte blaue Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) wird durch mitochondriale Enzyme zu dem pink-fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert. Dieser wiederum reagiert weiter zu dem farblosen nicht fluoreszierenden Hydroresorufin. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Reduktion von Resazurin und der Anzahl lebender Zellen (O'Brien et al., 2000).

Der Resazurin-Test mit BaSO₄-NP und der Zelllinie BEAS-2B erfolgte, wie auch der MTT-Test, in 24-Well-Zellkulturplatten. Nach der vorgesehenen Inkubation von 24 bzw. 72 h wurden die Zellen dreimal mit 37 °C warmen PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 500 µl einer Resazurin-PBS-Arbeitslösung (44 µM) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde im Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

Für die Ermittlung der Vitalität der Miniorgankulturen über einen dreimonatigen Zeitraum wurde jeweils dreimal ein B-MOC bzw. vier Mal ein L-MOC aus der 6-Well-Zellkulturplatte mit Agarose-Beschichtung in eine Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte umgesetzt und 500 µl sterile Resazurin-AECG-Arbeitslösung (44 µM) zugegeben. Nach einer Stunde wurden aus jeder Kavität jeweils 50 µl entnommen und in eine 96-Well-Kulturplatte pipettiert. Die Fluoreszenz wurde, wie auch bei den 24-Well-Zellkulturplatten, im Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Nach

Abschluss der Messung wurden die MOCs mit sterilem PBS gewaschen und zurück in die 6-Well-Zellkulturplatte gesetzt.

Die Bestimmung der Vitalität der MOCs nach Inkubation mit BaSO₄-NP über 24 bzw. 72 h erfolgte analog. Nur wurde im Anschluss an den letzten Waschschrift mit PBS zusätzlich das Feuchtgewicht der MOCs ermittelt und die Proben für die Metallelement-Analyse mittels ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) vorbereitet.

3.2.4 Aufnahme von Bariumsulfat-Nanopartikeln

Für die Experimente zur Aufnahme der BaSO₄-Nanopartikel in die Zellen wurde die Zelllinie BEAS-2B in 6-cm-Zellkultur-Schalen kultiviert und mit den Partikeln 24 bzw. 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gespült und mit 2 ml Trypsin/EDTA geerntet. Die Trypsinierung wurde mit 4 ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension bei 1.000 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung einer jeden Schale erfolgte mittels der Fuchs-Rosenthal-Kammer. Abschließend wurde die Zellsuspension erneut bei 1.000 U/min fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Kultivierung und Probenvorbereitung der Miniorgankulturen erfolgte leicht abweichend (siehe auch 3.2.3 Vitalitätstests, b) Resazurin-Test). Die Bestimmung des Barium-Gehaltes der Zellen erfolgte mittels ICP-MS in Kooperation mit Herrn Dr. Martin Herzberg am Institut für Biologie/Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

3.2.5 DCF-Test (ROS-Test)

Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kann mit Hilfe dieses Fluoreszenz-Tests nachgewiesen werden. Dabei fungiert das 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) als Fluoreszenz-Sonde. Das unpolare H₂DCF-DA wird von den Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert. Der Farbstoff liegt nun in seiner polaren, reduzierten und nicht fluoreszierenden Form vor. Durch die ROS wird H₂DCF-DA zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert und kann fluorimetrisch bestimmt werden (Halliwell und Gutteridge, 2015). Die Versuchsdurchführung beruhte hauptsächlich auf der Publikation (Schmid et al., 2007) und den Vorarbeiten zweier Diplomarbeiten am Institut für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Kerwien, 2010; Schumann, 2012).

Für den ROS-Test wurden die Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten konfluent kultiviert. Für die Vorinkubation mit H₂DCF-DA wurde das Zellkulturmedium entfernt. Anschließend wurde

100 µl H₂DCF-DA-Gebrauchslösung (25 µM in AECG-Medium ohne Supplement) auf die Zellen gegeben und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die H₂DCF-DA-Lösung entfernt und je 100 µl der einzelnen BaSO₄-NP-Konzentrationen als Sechsfach-Bestimmung in die Kavitäten pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium auf Eis entfernt und die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen. Die Messung erfolgte nach Zugabe von 100 µl PBS. Bei einer Wellenlänge von 485 nm wurde die Fluoreszenz im Platten-Photometer angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen. Als Blindwert fungierten unbehandelte Zellen, die nicht mit H₂DCF-DA inkubiert wurden.

3.3.6 H2AX-Test (Genotoxizitätstest)

H2AX gehört zur Familie der H2A Histone und ist Teil der Signalkaskade von DNA-Schäden. Mit steigendem Ausmaß an DNA-Schäden steigt auch der Gehalt an phosphoryliertem H2AX - auch als γH2AX bezeichnet (Tanaka et al., 2007). Auf Grund des experimentellen Nachweises von γH2AX kann eine Genotoxizität von Substanzen gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde H2AX und γH2AX mittels des Durchflusszytometers *MUSE® Cell Analyzer* von Luminex (früher Merck Millipore) und zugehörigem Kit "*H2AX Activation Dual Detection*" bestimmt. Das Kit enthält zwei direkt konjugierte fluoreszierende Antikörper. Ein Antikörper dient zum Nachweis des am Serin 139 phosphorylierten H2AX Histons und der Zweite zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an H2AX. So kann die Phosphorylierung von H2AX relativ zur Expression des gesamten Histons in jeder möglichen Zellpopulation bestimmt werden.

Die Zelllinie BEAS-2B wurde für den Genotoxizitätstest in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert und die Primärzellen in 6-cm-Zellkulturschalen. Die Kontrollen und jeweiligen Konzentrationen wurden als Doppelbestimmungen geführt. Auch hier erfolgte die Inkubation der Nanopartikel über 24 bzw. 72 h.

Die Zellen der einzelnen Wells/Schalen wurden mittels des "*Detach Kit*" von PromoCell (siehe 3.2.1 Kultivierung des biologischen Materials) geerntete, in ca. 1 ml Testpuffer (je nach Größe des Zellpellets) resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Der Test wurde mit je 100.000 Zellen in einem neuen 1,5 ml-Reagenzgefäß fortgeführt. In diesem wurden die Zellen mit einem äquivalenten Volumen Fixierungspuffer zum vorliegenden Suspensionsvolumen für fünf Minuten auf Eis fixiert und anschließend für fünf Minuten bei 2.000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden 100 µl Fixierungspuffer hinzugefügt und die Zellen erneut fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederholt für fünf Minuten bei 2.000 U/min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Färbung erfolgte gleichzeitig mit je

2,5 µl eines jeden Antiköpers in 45 µl Testpuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 100 µl Testpuffer hinzugefügt und für fünf Minuten bei 2.000 U/min zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 200 µl Testpuffer gemischt und die Proben im *MUSE® Cell Analyzer* vermessen. Die Grundeinstellung und das Festlegen der Subpopulationen eines jeden Experimentes erfolgte mit Hilfe einer unbehandelten Kontrolle (Negativkontrolle).

3.2.7 Molekularbiologische Methoden

a) RNA-Isolierung

Die Isolierung der für weiterführende Genexpressionsanalysen nötigen RNA erfolgte mit Hilfe des "*High Pure RNA Isolation Kits*" der Firma Roche über Kieselgel-Säulen. Alle für die RNA-Isolierung verwendeten Verbrauchsmaterialien waren nukleasefrei.

Die NHBEZ wurden für die RNA-Isolierung in 6-cm-Schalen kultiviert. Für das Ernten der Zellen nach der 24- bzw. 72-stündigen Partikelinkubation wurde das "*Detach Kit*" von Promocell verwendet. Nach dem Spülen der Zellen mit 2 ml HBSS erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C. Nach ca. fünf Minuten hatten sich die Zellen abgelöst und die Trypsinierung wurde mit 2 ml TNS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1.000 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 200 µl PBS resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 400 µl Lyse-/Bindungspuffer hinzugefügt und diese 15 Sekunden gevortext. Das Lysat wurde in das "*High Pure*" Filterröhrchen überführt und 15 Sekunden bei 9.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss konnte danach aus dem Auffangröhrchen entfernt werden. Der DNA Verdau erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur durch Zugabe von 100 µl DNase I/Inkubationspuffer-Gemisch direkt auf das Glasfiltervlies. Es schlossen sich zwei kurze Waschschrte an. Jeweils 500 µl Waschpuffer I bzw. II wurden in das Filterröhrchen pipettiert, 15 Sekunden bei 9.000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss entfernt. Im dritten Waschschrte wurden 200 µl Waschpuffer II dem Filterröhrchen hinzugefügt und für zwei Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Für die Eluation wurde das Filterröhrchen ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit 30 µl Eluationspuffer eine Minute bei 9.000 U/min zentrifugiert. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgt bei -80 °C.

b) RNA-Quantifizierung mittels UV-Spektrometrie

Die isolierte RNA wurde 1:50 mit 3 mM Na₂HPO₄-Puffer (pH 8,5) in DEPC-H₂O verdünnt und die Absorption dieser Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt

(Wilfinger et al., 1997). Des Weiteren wurden die Wellenlängen bei 230 nm und 280 nm gemessen. Für die Quantifizierung des RNA-Gehaltes wird angenommen, dass eine Absorption von OD = 1 einem Gehalt von 40 ng/μl entspricht (Bustin, 2004). Über die Berechnung der Verhältnisse von A260/A280 bzw. A260/A230 lassen sich Aussagen zur Reinheit der RNA treffen. Das Verhältnis bei A260/A280 sollte bei ca. 2,0 liegen. Kleinere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Proteinen und Phenol. Das Verhältnis A260/A230 sollte größer als 2,0 sein, da kleinere Werte auf eine Verunreinigung mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln hinweisen (Wilfinger et al., 1997; Bustin, 2004).

c) c-DNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA aus isolierter RNA wurden 1 μg RNA verwendet. Alle Reaktionen wurden auf Eis angesetzt. Der erste Inkubationsschritt (*Annealing der Random Primer*) erfolgt bei 42 °C für fünf Minuten und anschließenden 25 °C für zehn Minuten. Für jede Probe wurde folgendes Pipettierschema angewendet.

Tabelle 5: Pipettierschema des *Random Primer Annealings*.

Reagenz	Volumen
RNA (1 μg)	x μl
<i>Random Primer</i> (100 μM)	1 μl
DEPC- H ₂ O	ad 12 μl

Es wurde zusätzlich zu den Proben ein Blindwert mitgeführt (11 μl DEPC-H₂O) um Kontaminationen der verwendeten Reagenzien mit RNA erkennen zu können. Anschließend wurde zu jeder Probe 8 μl des folgenden *Mastermix* zugegeben und die Reverse-Transkriptase-PCR konnte erfolgen.

Tabelle 6: Pipettierschema der Reverse-Transkriptase-PCR.

Reagenz	Volumen
DEPC-H ₂ O	2,5 µl
10-fach Puffer (<i>FastGene® Scriptase Basic</i>)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
<i>Scriptase Basic</i> (Reverse Transkriptase, 200 Units/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl

Im *Thermocycler* wurden die Ansätze für eine Stunde bei 42 °C und anschließend fünf Minuten bei 90 °C inkubiert. Die cDNA ist kühl-schrankfähig. Bei Aufbewahrung der cDNA über einen längeren Zeitraum erfolgte die Lagerung jedoch bei -20 °C.

d) Real-time-PCR

Zur relativen Quantifizierung des untersuchten Gens Interleukin-8 (IL-8) wurde eine semi-quantitative Real-time-PCR mit Sybr-Green-I-Detektion durchgeführt (Morrison et al., 1998; Kubista et al., 2006). Der ungebundene Fluoreszenzfarbstoff besitzt in Lösung eine sehr geringe Fluoreszenz. Während der Polymerisation (Elongation) interkalieren große Mengen des Farbstoffs in die DNA und die Fluoreszenz steigt (Bustin, 2000).

Auch bei dieser PCR fanden alle Pipettierschritte auf Eis statt. Aus den cDNA-Proben (20 µl), die aus 1 µg RNA umgeschrieben wurden, wurden jeweils 8 µl entnommen und in einen gemeinsamen Probenpool zusammengefasst – ausgenommen der Blindwert. Der verbleibende Rest der jeweiligen Proben und der Blindwert wurde 1:4 mit DEPC-H₂O verdünnt. Für den Probenpool (Standard 1) wurde eine Kopienzahl von 1×10^6 festgelegt und daraus die folgende Verdünnungsreihe erstellt.

Tabelle 7: Verdünnungsreihe des Probenpools zur relativen Quantifizierung der Real-time-PCR.

Standard	Kopienzahl	Verdünnung
I	1×10^6 Kopien	unverdünnt
II	5×10^5 Kopien	1:1
III	1×10^5 Kopien	1:10
IV	5×10^4 Kopien	1:20
V	1×10^4 Kopien	1:100

In jeden Reaktionsansatz der semi-quantitative *Real-time*-PCR wurden 22,5 µl des folgenden *Mastermix* sowie 2,5 µl Probe (verdünnte cDNA bzw. der entsprechende Standard) pipettiert.

Tabelle 8: Pipettierschema der semi-quantitativen *Real-time*-PCR.

Reagenz	Volumen	Gesamtvolumen
DEPC-H ₂ O	6,5 µl	
MgCl ₂ -Lösung (25 mM)	1,0 µl	
Sybr-Green I (1:3000 Verdünnung)	1,0 µl	
Primer-Mix (10 µM jedes Primers)	1,5 µl	
PCR-Mastermix 2 -fach (u.a. <i>taq</i> -Polymerase)	12,5 µl	= 22,5 µl
Probe (verdünnte cDNA, Standard bzw. NTC)	2,5 µl	= 25,0 µl

Es wurden zusätzlich zu den Proben zwei Kontrollen (*no-template-control*, NTC) mitgeführt (2,5 µl DEPC-H₂O + *Mastermix*) um die Hintergrundfluoreszenz bestimmen zu können.

Alle Proben wurden als Doppelbestimmung pipettiert. Die semi-quantitative *Real-time*-PCR wurde für zwei Minuten bei 95 °C initialisiert. Anschließend wurde folgendes Programm für 40 Zyklen (*house-keeping*-Gen) bzw. 45 Zyklen (IL-8) wiederholt und ein abschließender Elongationsschritt für vier Minuten bei 72 °C angeschlossen.

Tabelle 9: Temperaturschema der semi-quantitativen *Real-time*-PCR.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	30 s
<i>Annealing</i>	Temperatur siehe Tabelle 10	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Fluoreszenzmessung	Temperatur siehe Tabelle 10	10 s

Die Fluoreszenz von Sybr-Green-I wird bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 585 nm gemessen. Nach Ablauf des Programms wurde der Schmelzpunkt (T_m) des jeweiligen PCR-Produktes durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur und parallele Fluoreszenz-Messung bestimmt. Wird T_m erreicht, denaturiert die DNA und die Fluoreszenz nimmt stark ab (Bustin, 2000). Der ermittelte Schmelzpunkt sollte mit dem des sequenzierten

PCR-Produktes übereinstimmen. Zur Quantifizierung wurde der Schwellenwertzyklus (*threshold cycle*, c_t) verwendet. Der c_t -Wert gibt die Anzahl an Zyklen an, bei der sich das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Probe zum ersten Mal signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt (Gibson et al., 1996). Die c_t -Werte der Standardverdünnungen wurden gegen den entsprechenden Logarithmus der festgelegten Kopienzahl aufgetragen und ergaben so eine Eichgerade. Mit dieser Standardkurve konnten die virtuellen Kopienzahlen der restlichen Proben semiquantitativ bestimmt werden. Um Messfehler und Streuungen zu minimieren, wurden die untersuchten Gene immer auf ein geeignetes internes Standard-Gen normalisiert. Dabei handelt es sich hier um das *house-keeping*-Gen Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), deren Expression nicht von experimenteller Behandlung beeinflusst werden sollte (Bustin, 2000). Die Änderung der Expression wurde im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle ermittelt. Wobei die unbehandelte Kontrolle und die jeweiligen Partikel-Konzentrationen zwei- oder dreifach bestimmt wurden ($n = 2 - 3$).

e) Primer

Die verwendeten *Primer* für die semi-quantitative *Real-time*-PCR wurden folgenden Publikationen entnommen: GAPDH (Corbett Research, 2003) und IL-8 (DangLi et al., 2012). Für beide *Primer* wurden die PCR-Bedingungen vor der Durchführung der *Real-time*-PCR optimiert und die Spezifität mittels Gelelektrophorese und Produkt-Sequenzierung (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Deutschland) überprüft.

Tabelle 10: Primer-Sequenzen mit entsprechenden Annealing- und Messtemperaturen.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Produktgröße [bp]	Annealing-Temp. [°C]	Messtemp. [°C]
GAPDH	F: GAAGATGGTGATGGGATTC	226	60	82
	R: GAAGGTGAAGGTCGGAGT			
IL-8	F: ACTCCAAACCTTTCCACCCC	213	58	81
	R: TTCTCCACAACCCTCTGCAC			

f) Proteinbestimmung (BCA-Methode)

Mit dieser Methode können Proteine photometrisch quantifiziert werden. Kupfer(II)-Ionen (Cu^{2+}) werden von Proteinen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert (Cu^+). Diese komplexieren mit der 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) zu einem violetten Farbstoff. Die Absorption dieser Komplexverbindung kann mit einem Photometer gemessen werden und der

Proteingehalt mittels einer Eichreihe semiquantitativ bestimmt werden (Smith et al., 1985). Der vollständige Aufschluss von Gewebe ist bei der Proteinbestimmung von großer Bedeutung. Die Zerkleinerung des Gewebes (ein MOC, ca. 10 mg) erfolgte von Hand in 200 µl 0,1 N HCl mit Hilfe eines für 1,5 ml-Reaktionsgefäße passenden Pistills. 10 µl dieser Gewebe-Suspension wurden mit 200 µl BCA-Lösung/4 %iger Kupfersulfat-Lösung (49/1) 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit einer parallel erstellten Standardprotein-Eichreihe mit Rinderserumalbumin (*bovin serum albumin*, BSA).

3.2.8 Immunhistochemische Färbungen

Neben der Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Übersichtsfärbung wurde, angelehnt an die Charakterisierung der NHBEZ und PLZ, in den Schnitten fixierter MOC zweier Patienten Zytokeratin 7 (CK7), 8/18 (CK8/18) als Epithelmarker ebenso wie Desmin (glatte Muskulatur, mesenchymaler Marker), *smooth muscle actin* (SMA, u.a. Gefäße, Bindegewebe, Fibroblasten), Vimentin (mesodermale Zellen), E-Cadherin (Zell-Zell-Kontakte) und die Mucine MUC1 bzw. MUC5AC immunhistochemisch über einen Zeitraum von einem Monat bzw. drei Monaten angefärbt (Lehmann, 2001). Die MOC wurden nach entsprechender Kultivierungszeit in 4 %igem Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffinblöcke zum Schneiden eingebettet. Die Durchführung der Einbettung und immunhistochemischen Färbung erfolgte durch Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie und die Auswertung gemeinsam mit Herrn Peter Kaatzsch am Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

3.3 Auswertung und Statistik

Eine erste Auswertung der (fluoreszenz-)photometrischen Rohdaten erfolgte direkt mit Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation). Die PCR-Daten wie ct-Werte und die Quantifizierung der Kopienzahlen wurden zunächst mit der Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen) ermittelt und anschließend mit Microsoft Excel 2010 ausgewertet. Die Rohdaten des MUSE® *Cell Analyzer* wurden direkt am Gerät mit integrierter Software (Microsoft Corporation) ausgewertet und auf Microsoft Excel 2010 übertragen. Die graphische Darstellung aller Ergebnisse erfolgte mit Sigma Plot 10.0 (Systat Software, Inc.) als Mittelwerte \pm Standardabweichung (*standard deviation*, SD). Für die statistische Auswertung der Ergebnisse der genetisch-identischen Zelllinie BEAS-2B wurde eine Friedman-ANOVA mit dem Bonferroni-*Post-hoc*-Test durch das Programm SPSS Statistics 25 (IBM) durchgeführt. Die Daten der Experimente an Primärzellen (zwischen

unterschiedlichen Patienten) sind ungepaart und nicht-gaußverteilt. Es wurde hier das Programm InStat 3.05 (GraphPad Software, Inc.) verwendet und ein Kruskal-Wallis-Test mit einem anschließenden *Post-hoc*-Test nach Dunn durchgeführt. Eine Ausnahme bei den Primärzellen bildet die Auswertung der Daten eines Patienten mit verschiedenen Substanzen. Diese Daten sind verbundene (abhängige) Stichproben wurden mittels Friedman-ANOVA mit nachfolgendem *Post-hoc*-Test nach Bonferroni analysiert. Die p-Werte werden explorativ interpretiert. In Anlehnung an die Publikationen von Amrhein et al. (2019) und Wasserstein et al. (2019) und um den aktuellen Entwicklungen in der epidemiologischen Statistik Rechnung zu tragen wurde auf die Verwendung des Begriffs signifikant verzichtet (Wasserstein et al., 2019; Amrhein et al., 2019).

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von BaSO₄-Nanopartikeln auf die Vitalität

Der Einfluss von Bariumsulfat-Nanopartikeln zweier unterschiedlicher Hersteller (Solvay und Huntsman) auf die Vitalität der in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurde gleich zu Beginn der toxikologischen Experimente untersucht. Als subtoxisch werden im Folgenden Konzentrationen bezeichnet, die keinen Vitalitätsverlust unter 80 % relative Vitalität über die Behandlungszeiträume 24 und 72 Stunden bewirken. Für weiterführende Experimente, wie z.B. die Untersuchung der Modulation von IL-8, wurde angestrebt Konzentrationen nur im subtoxischen bzw. leicht toxischen Bereich zu verwenden.

Bei den Primärzellen des Bronchus (NHBEZ) und der peripheren Lunge (PLZ) zeigt sich durch BaSO₄-NP ein dosis- und zeitabhängiger Effekt auf die Vitalität. Im MTT-Test mit den NP der Firma Solvay (Abbildung 3) sinkt die Vitalität der NHBEZ nach 24 h mit höchster Konzentration (0,526 mg/cm²) auf 62 % (± 17 %, p < 0,001) und nach 72 h auf 27 % (± 5 %, p < 0,001). Etwas unempfindlicher zeigen sich die PLZ mit einer Vitalitätsabnahme nach 24 h und höchster Konzentration auf 75 % (± 14 %, p < 0,001) und auf 41 % (± 8 %, p < 0,001).

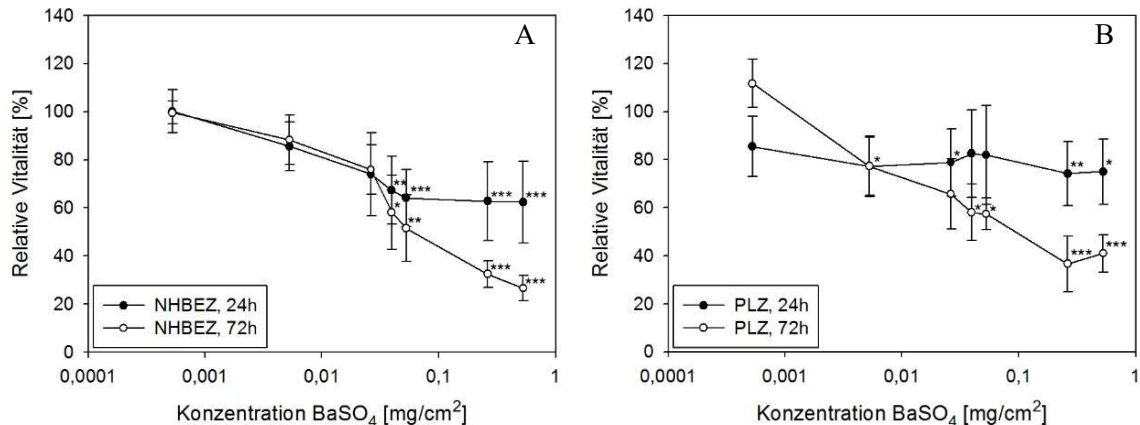


Abbildung 3: Relative Vitalität von NHBEZ (A) und PLZ (B) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Solvay) ermittelt durch den MTT-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert ± SD (n = 3, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,000526; 0,00526; 0,0263; 0,0395; 0,0526; 0,263 und 0,526 mg/cm².

Die Partikel der Firma Huntsman (Abbildung 4) führen im MTT-Test mit NHBEZ bei höchster Konzentration (0,526 mg/cm²) zu einer Abnahme der Vitalität auf 64 % (± 4 %, p < 0,001) nach 24 h Inkubation und auf 54 % (± 15 %, p < 0,001) nach 72 h Inkubation. Die Vitalität der PLZ sinkt nach 24 h auf 73 % (± 6 %, p < 0,01) und nach 72 h auf 44 % (± 8 %, p < 0,01).

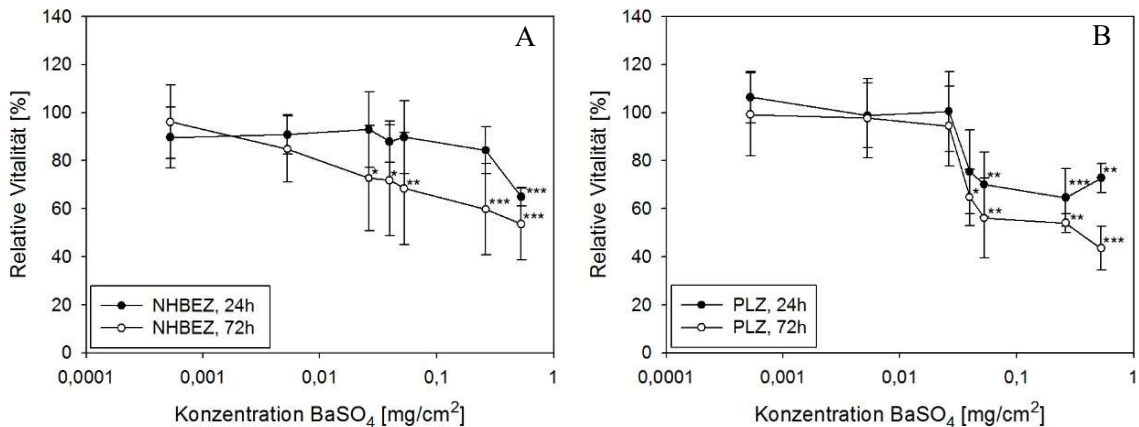


Abbildung 4: Relative Vitalität von NHBEZ (A) und PLZ (B) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den MTT-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert ± SD (n = 3, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,000526; 0,00526; 0,0263; 0,0395; 0,0526; 0,263 und 0,526 mg/cm².

Weder zwischen den zwei verschiedenen Primärzellen noch zwischen den zwei verschiedenen Materialien kann ein deutlicher Unterschied des Effektes festgestellt werden.

Als auffällig zeigt sich bei den PLZ, dass die höchste Konzentration (0,526 mg/cm²) manchmal eine höhere Vitalität als die zweithöchste Konzentration (0,263 mg/cm²) zu haben scheint. Um mögliche Einflüsse der Partikel auf die Absorptionsmessung zu untersuchen wurden die reinen Partikelkonzentrationen im Spektrometer vermessen. Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Anstieg der Absorption (Abbildung 5) auf 1,02 AU (± 0,03; Solvay) und 0,66 (± 0,003; Huntsman).

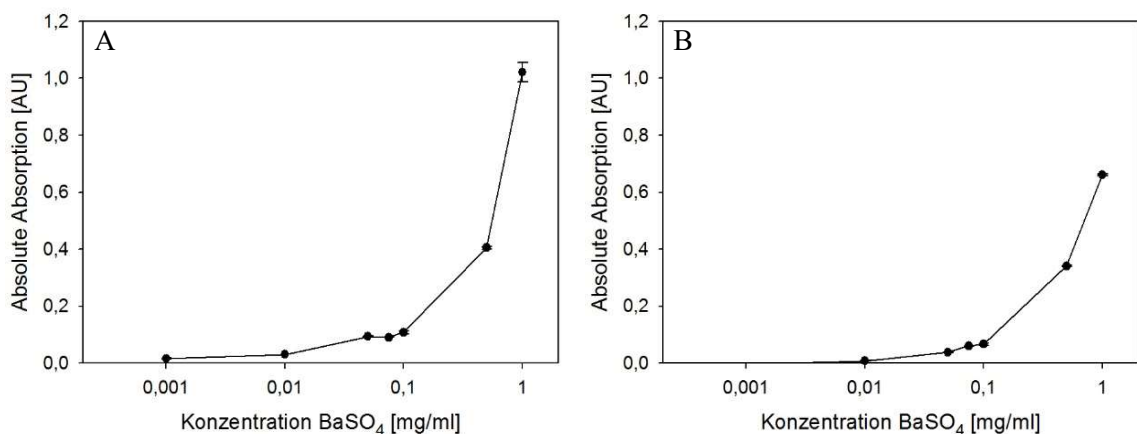


Abbildung 5: Absorption verschiedener BaSO₄-NP-Konzentrationen [Fa. Solvay(A), Fa. Huntsman (B)] bei 560 nm.

Die Darstellung erfolgt absolut als Mittelwert ± SD (n = 3, N = 1). Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,001; 0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,5 und 1 mg/ml.

Aufgrund des möglichen Einflusses der Partikel auf Absorptions-basierte Vitalitätstests wurde bei der Zelllinie BEAS-2B neben dem MTT-Test ein zweiter Fluoreszenz-basierter Vitalitätstest, der Resazurin-Test, eingeführt. Auch in diesem Fall wurden Versuche durchgeführt, inwieweit die reinen Partikel eine Störgröße bei der Fluoreszenzmessung darstellen. Es konnte dabei kein Einfluss auf die Messung festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt).

Im MTT-Test mit BaSO₄-NP (Huntsman) ist nach 24 h kein deutlicher Effekt auf die Vitalität der BEAS-2B (Abbildung 6) erkennbar. Die Vitalität beträgt bei der höchsten Konzentration (0,526 mg/cm²) 89 % (± 8 %, p > 0,05). Nach 72 h sinkt die Vitalität auf 72 % (± 14 %, p < 0,001). Der Resazurin-Test zeigt eine Vitalitätsabnahme bei höchster Konzentration (0,526 mg/cm²) und 24 h Inkubation auf 80 % (± 8 %, p < 0,01) und nach 72 h Inkubation auf 67 % (± 10 %, p < 0,001). Es scheint zwischen beiden Vitalitäts-Tests kein wesentlicher Unterschied in der Effektausprägung vorzuliegen und die Partikel durch die Waschschritte während des Experimentes ausreichend entfernt zu werden. Im Vergleich zu den primären Zellen erscheinen die BEAS-2B unempfindlicher gegenüber BaSO₄-NP.

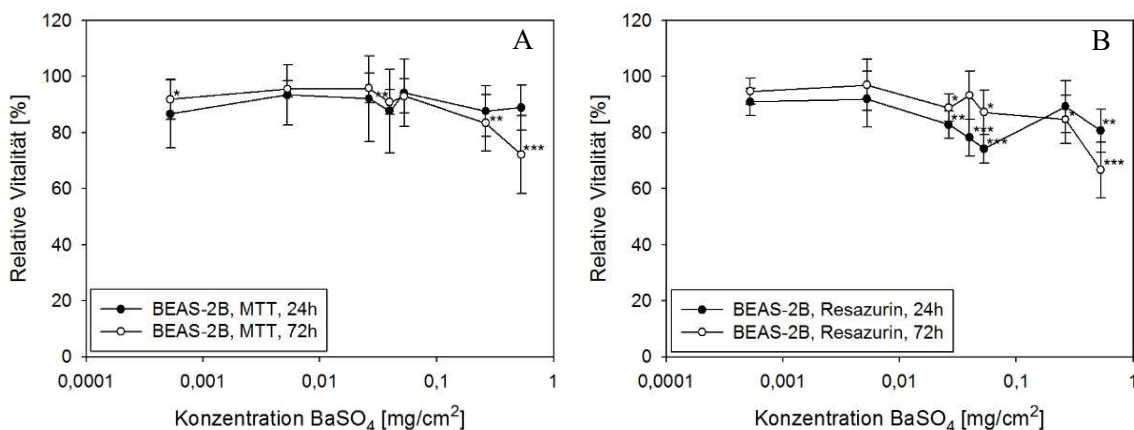


Abbildung 6: Relative Vitalität von BEAS-2B nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den MTT-Test (A) und den Resazurin-Test (B).

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert ± SD (n = 3, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,000526; 0,00526; 0,0263; 0,0395; 0,0526; 0,263 und 0,526 mg/cm².

Auch die Miniorgankulturen des Bronchus (B-MOC) und der Lunge (L-MOC) wurden mit der BaSO₄-NP-Suspension (Huntsman) inkubiert (Abbildung 7). Nach 24 h und 72 h ist keine Abnahme der Vitalität bei der höchsten Konzentration (0,0417 mg/cm²) erkennbar. Die höchste Konzentration entspricht in diesem Fall den mittleren Konzentrationen der Zellkulturversuche.

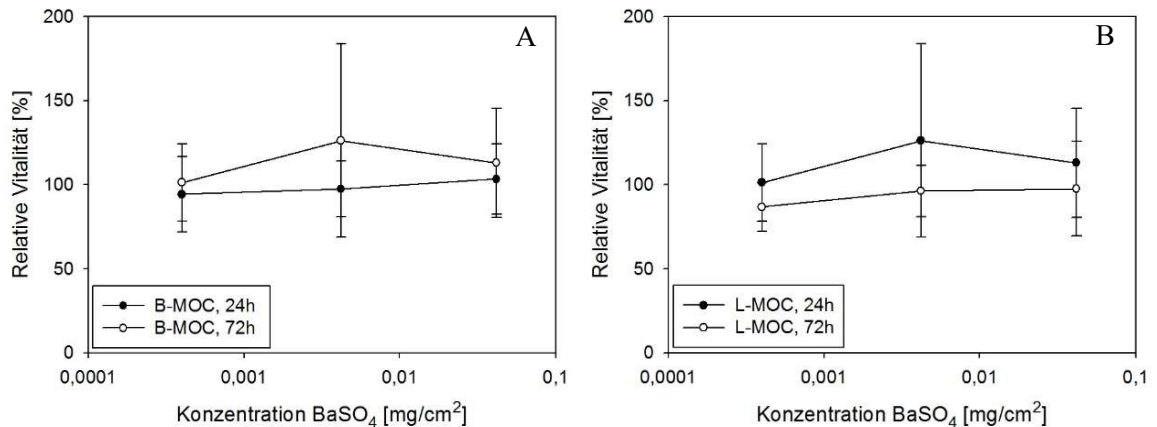


Abbildung 7: Relative Vitalität von B-MOC (A) und L-MOC (B) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den Resazurin-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert \pm SD (n = 3, N = 2); p-Wert zur Kontrolle: alle > 0,05. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0004; 0,0042 und 0,0417 mg/cm².

4.2 Aufnahme von BaSO₄-Nanopartikeln

Mit Hilfe der Metallelement-Analyse durch ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) wurde der Gehalt von Barium (Ba) in den Miniorgankulturen bzw. Zellen nach Inkubation mit BaSO₄-NP bestimmt. Das sollte darüber Aufschluss geben, ob und wieviel BaSO₄ in die Zellen aufgenommen wird.

In den Miniorgankulturen (B- und L-MOC) zeigt sich ein dosis- und zeitabhängiger Anstieg des Ba-Gehaltes nach 24 h und 72 h (Abbildung 8). Wobei die L-MOC höhere Werte aufweisen. Nach 72 h Inkubation mit höchster Konzentration (0,0417 mg/cm²) enthalten die L-MOC einen Ba-Gehalt von 1501 μ g/g MOC (Feuchtgewicht) (\pm 984, p < 0,01) und die B-MOC ein Ba-Gehalt von 341 μ g/g MOC (Feuchtgewicht) (\pm 47, p < 0,01).

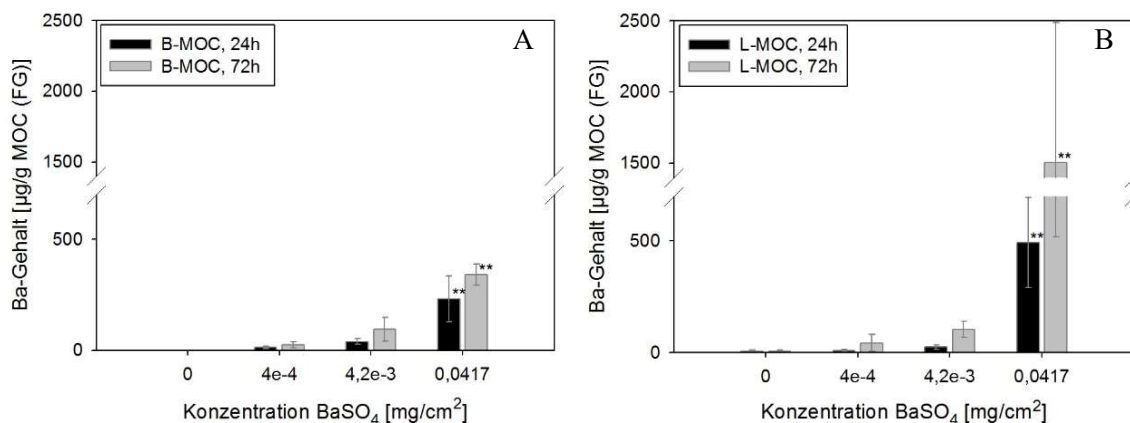


Abbildung 8: Gehalt an Barium nach 24- und 72-stündiger Inkubation von B-MOC (A) und L-MOC (B) mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch ICP-MS.

Die Darstellung des Gehaltes erfolgt relativ als µg/g MOC (Feuchtwicht); Mittelwert ± SD (n = 2, N = 2); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0004; 0,0042 und 0,0417 mg/cm².

In der Zelllinie BEAS-2B zeigt sich ein dosisabhängiger, jedoch kein zeitabhängiger Anstieg des gemessenen Ba-Gehaltes (Abbildung 9). Nach 24 h Inkubation mit der höchsten Konzentration (0,019 mg/cm²) weisen die BEAS-2B einen Ba-Gehalt von 75 µg/10⁶ Zellen (± 19, p < 0,001) und nach 72 h einen Ba-Gehalt von 52 µg/10⁶ Zellen (± 10, p < 0,01) auf.

Im Laufe der experimentellen Arbeit wurde immer wieder deutlich, dass die Nanopartikel nach einiger Zeit auf die Zellen absinken und sich nur schwer durch mehrmaliges Waschen wieder abspülen ließen. Um zu unterscheiden, ob die BaSO₄-NP wirklich durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden oder viele lediglich außen an den Zellen haften bleiben, ohne abgespült zu werden, erfolgte ein zweites Experiment. Die Zellen wurden mit bekannten Konzentrationen für 3 h exponiert. Ein Teil davon wurde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und ein Teil bei Kühlschranktemperatur 4 – 8 °C. Bei der niedrigen Temperatur ist die Fluidität der Zellmembran verändert und zelluläre Prozesse sind eingeschränkt, sodass die Endozytose unterbunden wird. Nach 3 h Inkubation (Abbildung 9) weisen die Zellen der Brutschrankinkubation mit höchster Konzentration (0,019 mg/cm²) einen höheren Ba-Gehalt von 59 µg/10⁶ Zellen (± 9 µg/10⁶ Zellen) als die Zellen der Kühlschrankinkubation: 42 µg/10⁶ Zellen (± 1 µg/10⁶ Zellen). Die Nanopartikel scheinen in diesem Experiment zumindest zum Teil durch Endozytose aufgenommen zu werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der BaSO₄-NP auch außen an den Zellen haften bleibt.

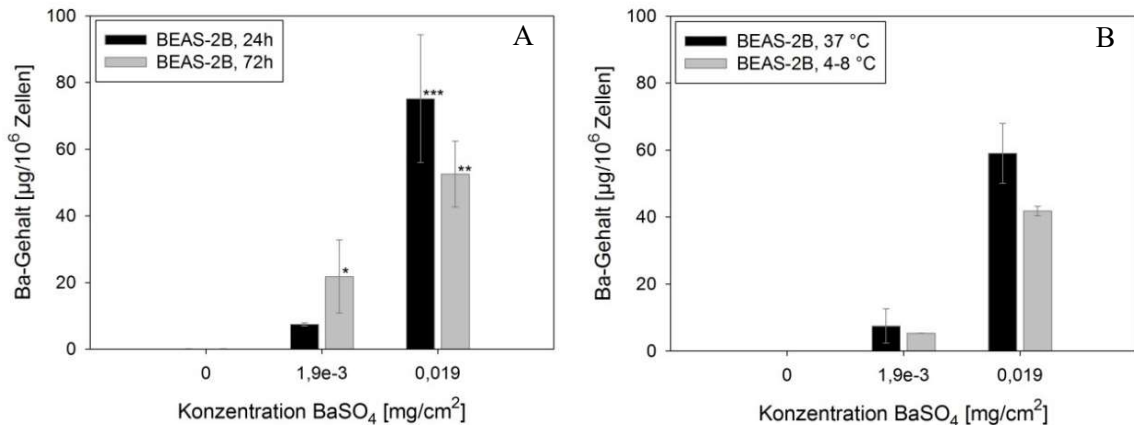


Abbildung 9: Gehalt an Barium nach 24- und 72-stündiger Inkubation von BEAS-2B bei 37°C (A) und nach 3-stündiger Inkubation von BEAS-2B bei 37°C bzw. 4-8°C (B) mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch ICP-MS.

Die Darstellung des Gehaltes erfolgt relativ als µg/10⁶ Zellen; Mittelwert ± SD (n = 2; N = 2 (A), N = 1 (B)); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0019 und 0,019 mg/cm².

4.3 Einfluss von BaSO₄-Nanopartikeln auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Der Einfluss von BaSO₄-NP auf den oxidativen Stress, respektive die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wurde mittels des DCF-Tests untersucht. Der Inkubationszeitraum ist dabei, auf Grund der Kurzlebigkeit von ROS, mit einer Stunde deutlich kürzer als die Inkubation in vorangegangenen Experimenten. Die Funktionalität eines jeden Tests wurde mit einer Positivkontrolle festgestellt: 5 mM Maleinsäurediethylester für Primärzellen und 100 µM Menadion für die BEAS-2B Zelllinie. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle entstanden dabei das Zwei- bis Dreifache an ROS (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

Nach einstündiger Inkubation mit den BaSO₄-NP der Fa. Solvay (Abbildung 10) entsteht in den NHBEZ bei höchster Konzentration (0,2985 mg/cm²) das bis zu 1,7-fache (± 0,8; p < 0,05) an ROS im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und in den PLZ das bis zu 1,5-fache (± 0,3; p < 0,01) an ROS.

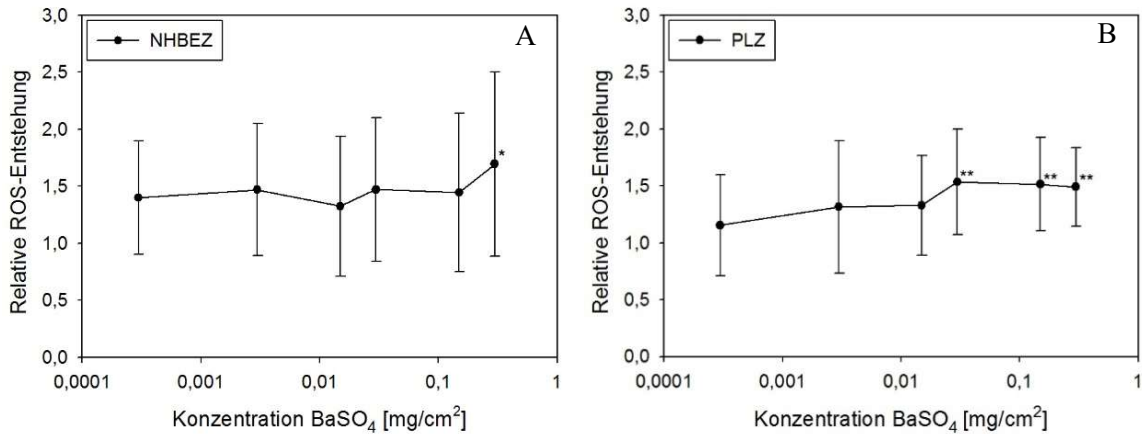


Abbildung 10: Relative Entstehung von ROS in NHBEZ (A) und PLZ (B) nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Solvay) ermittelt durch den DCF-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (ROS-Entstehung = 1) als Mittelwert \pm SD (n = 6, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0003; 0,0030; 0,0149; 0,0299; 0,1493 und 0,2985 mg/cm².

Das gleiche Experiment mit den BaSO₄-NP der Fa. Huntsman (Abbildung 11) zeigt eine bis zu 1,6-fache (\pm 0,8; p < 0,05) Entstehung an ROS in den NHBEZ bei höchster Konzentration (0,2985 mg/cm²), sowie die bis zu 1,6-fache (\pm 0,5; p < 0,01) Entstehung an ROS in den PLZ. Zusammenfassend kann auch in diesem Fall festgestellt werden, dass zwischen den Materialien der beiden Hersteller und zwischen den verschiedenen Primärzellen kein Unterschied im Effekt zu sehen ist.

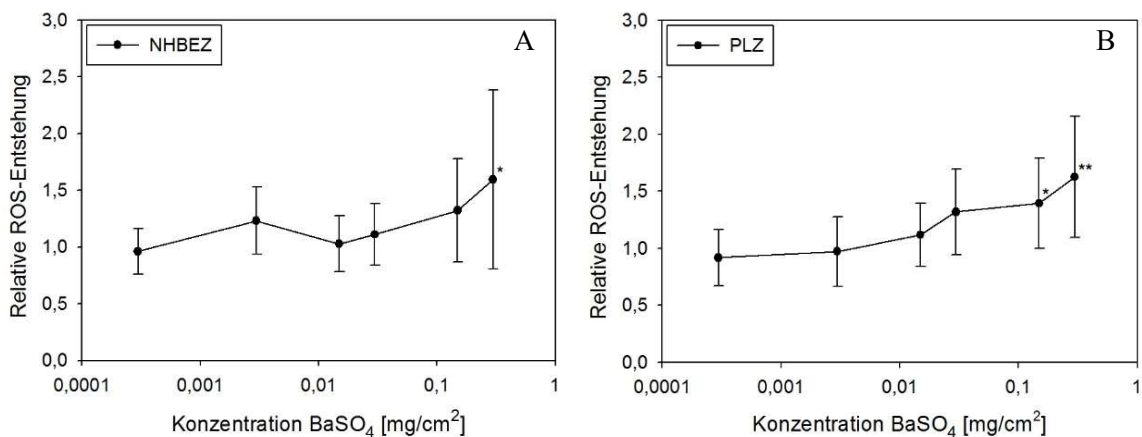


Abbildung 11: Relative Entstehung von ROS in NHBEZ (A) und PLZ (B) nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den DCF-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (ROS-Entstehung = 1) als Mittelwert \pm SD (n = 6, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0003; 0,0030; 0,0149; 0,0299; 0,1493 und 0,2985 mg/cm².

In der Zelllinie BEAS-2B kann keine Induktion der ROS durch BaSO₄-NP der Fa. Huntsman nachgewiesen werden (Abbildung 12).

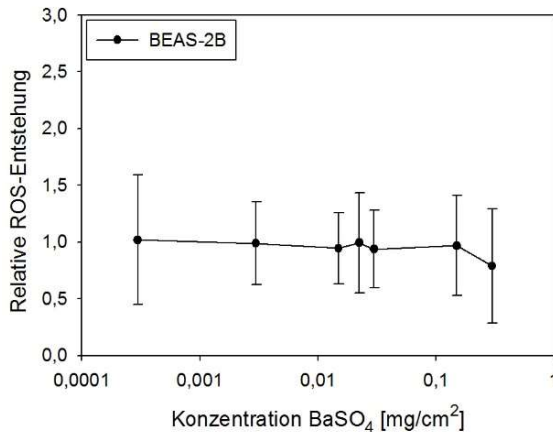


Abbildung 12: Relative Entstehung von ROS in BEAS-2B nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch den DCF-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgt relativ im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (ROS-Entstehung = 1) als Mittelwert \pm SD (n = 6, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0003; 0,0030; 0,0149; 0,0224; 0,0299; 0,1493 und 0,2985 mg/cm².

4.4 Einfluss von BaSO₄-Nanopartikeln auf γ -H2AX

Um eine mögliche Genotoxizität von BaSO₄-NP nachzuweisen, wurden die Primärzellen und die Zelllinie BEAS-2B nach einer 24- und 72-stündigen Inkubation auf γ H2AX untersucht. Das verwendete Kit enthält zwei direkt konjugierte fluoreszierende Antikörper. Ein Antikörper dient zum Nachweis des phosphorylierten H2AX Histons (γ H2AX, Nachweis eines DNA-Schadens) und der Zweite zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an H2AX. Die Phosphorylierung von H2AX kann so relativ zur Expression des gesamten Histons bestimmt werden. H2AX und γ H2AX wurden mittels des Durchflusszytometers *MUSE® Cell Analyzer* von Luminex bestimmt. Zellen, bei denen keiner der beiden Antikörper bindet, wurden von der Software als *non-expressing* ausgegeben („kein H2AX“ in den Graphen).

In den NHBEZ und PLZ zeigt sich kein Anstieg von γ H2AX nach 24 und 72 h (Abbildung 13, Abbildung 14). Es steigt jedoch in beiden Primärzellen der Anteil an Zellen, in denen kein H2AX angefärbt wird („*non-expressing*“) – besonders deutlich in den NHBEZ bei höchster Konzentration (0,19 mg/cm²) nach 24 h auf 27 % (\pm 19; p > 0,05) und nach 72 h auf 15 % (\pm 19; p < 0,01). In einer Messreihe in der ausschließlich Partikel vermessen wurden, tritt dieses Phänomen auch auf (Daten hier nicht gezeigt). Es ist davon auszugehen, dass nicht ausreichend abgespülte und internalisierte Partikel nicht angefärbt werden, jedoch als größere Partikel unter den „*non-expressing*“ Zellen erfasst werden.

Die Funktionalität der Tests wurde mit einer Positivkontrolle überprüft. Für die Primärzellen wurde entweder 20 μ M Etoposid (4 h Inkubation) oder 500 mM H₂O₂ (20 min Einwirkzeit und

25 min Nachinkubation). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stieg der Anteil an γ H2AX durchschnittlich auf 20 – 50 % (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

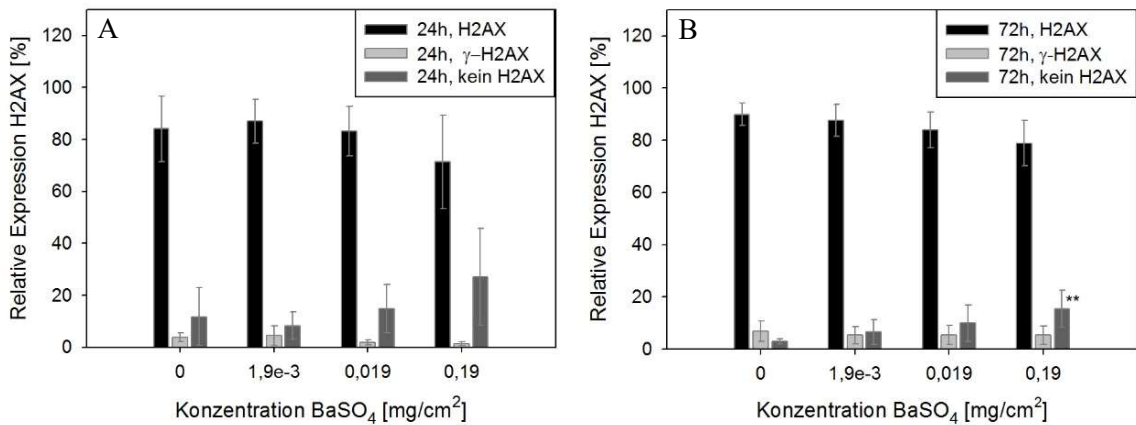


Abbildung 13: Relative Expression von H2AX in NHBEZ nach 24- (A) und 72-stündiger (B) Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch Durchflusszytometrie.

Die Darstellung der Expression erfolgt prozentual zum Gesamt-H2AX-Gehalt der jeweiligen Konzentration als Mittelwert \pm SD (n = 2, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Es wird die Expression von nicht phosphoryliertem H2AX (H2AX), phosphoryliertem H2AX (γ -H2AX) und eine Zellpopulation ohne färbbares H2AX („non-expressing“, kein H2AX) dargestellt. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0019; 0,019 und 0,19 mg/cm².

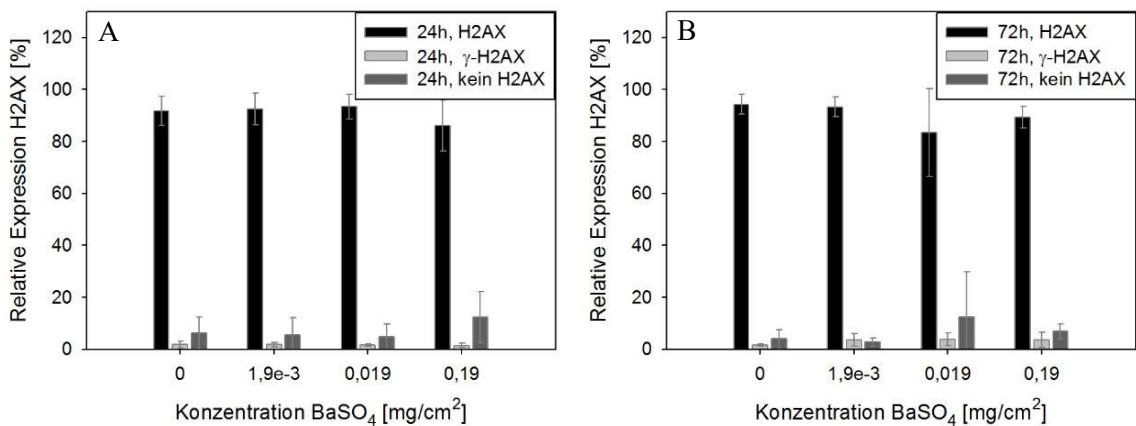


Abbildung 14: Relative Expression von H2AX in PLZ nach 24- (A) und 72-stündiger (B) Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch Durchflusszytometrie.

Die Darstellung der Expression erfolgt prozentual zum Gesamt-H2AX-Gehalt der jeweiligen Konzentration als Mittelwert \pm SD (n = 2, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: alle > 0,05. Es wird die Expression von nicht phosphoryliertem H2AX (H2AX), phosphoryliertem H2AX (γ -H2AX) und eine Zellpopulation ohne färbbares H2AX („non-expressing“, kein H2AX) dargestellt. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0019; 0,019 und 0,19 mg/cm².

Ebenso wie in den Primärzellen zeigt sich kein Anstieg von γ H2AX nach 24 und 72 h in den BEAS-2B (Abbildung 15). Es steigt jedoch auch hier der Anteil der „non-expressing“ Zellen – bei höchster Konzentration (0,313 mg/cm²) nach 24 h auf 50 % (\pm 11; p > 0,05) und nach 72 h auf 44 % (\pm 14; p > 0,05).

Als Positivkontrolle bei den BEAS-2B wurde 500 mM H₂O₂ (20 min Einwirkzeit und 25 min Nachinkubation) verwendet. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stieg der Anteil an γ H2AX auf 56 % (± 20 ; $p > 0,05$).

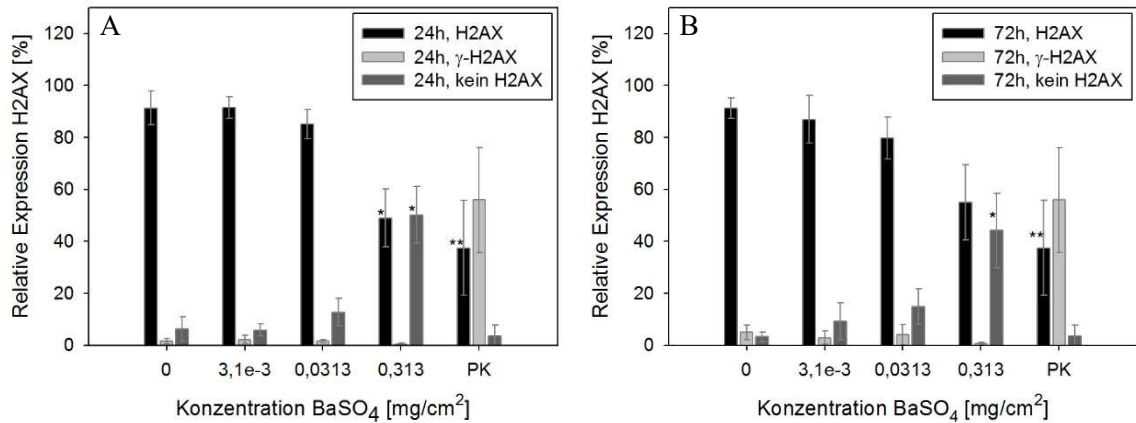


Abbildung 15: Relative Expression von H2AX in BEAS-2B nach 24- (A) und 72-stündiger (B) Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch Durchflusszytometrie.

Die Darstellung der Expression erfolgt prozentual zum Gesamt-H2AX-Gehalt der jeweiligen Konzentration als Mittelwert \pm SD ($n = 2$, $N = 3$); p -Wert zur Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Es wird die Expression von nicht phosphoryliertem H2AX (H2AX), phosphoryliertem H2AX (γ -H2AX) und eine Zellpopulation ohne färbbares H2AX („*non-expressing*“, kein H2AX) dargestellt. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0031; 0,0313 und 0,313 mg/cm². Die Positivkontrolle (PK) ist 500 mM H₂O₂ (20 min Einwirkzeit und 25 min Nachinkubation).

4.5 Einfluss von BaSO₄-Nanopartikeln auf IL-8 (mRNA)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Interleukin-8 (IL-8) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit BaSO₄-NP in den primären Zellen des Bronchus und der Lunge untersucht. Die Quantifizierung der untersuchten Gene erfolgte mit einer semi-quantitativen *Real-time*-PCR. Die Expression der Gene wurde zur Minimierung von Messfehlern und der Streuung auf das interne Standard-Gen (*house-keeping*-Gen) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. GAPDH wurde unter den Bedingungen des Experiments nachweisbar stabil exprimiert (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

Sowohl in den NHBEZ, als auch in den PLZ lässt sich eine dosisabhängige Induktion von IL-8 beobachten – jedoch keine zeitabhängige Induktion. Bei höchster Konzentration (0,019 mg/cm²) steigt die Expression von IL-8 in NHBEZ nach 24 h auf 254 % (± 153 ; $p < 0,05$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle mit 100 % und nach 72 h auf 167 % (± 32 ; $p < 0,01$). In den PLZ findet eine Induktion von IL-8 bei höchster Konzentration (0,019 mg/cm²) nach 24 h auf 226 % (± 116 ; $p < 0,05$) und nach 72 h auf 195 % (± 78 ; $p < 0,01$) statt. Es lassen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den Primärzellen feststellen.

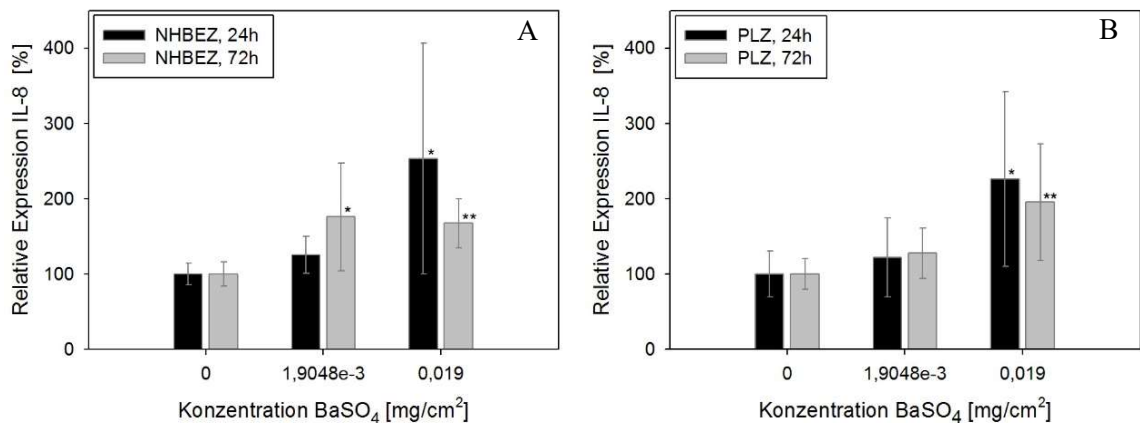


Abbildung 16: Relative Expression von IL-8 in NHBEZ (A) und PLZ (B) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen BaSO₄-NP-Konzentrationen (Fa. Huntsman) ermittelt durch RT-PCR.

Die Darstellung der Vitalität erfolgt prozentual im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (100 % Vitalität) als Mittelwert \pm SD (n = 2 bzw. 3, N = 3); p-Wert zur Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Die Expression von IL-8 wurde zusätzlich auf das *house-keeping*-Gen GAPDH normalisiert. Folgende BaSO₄-Konzentrationen wurden aufgetragen 0,0019 und 0,019 mg/cm².

4.6 Weitere Charakterisierung von Miniorgankulturen humaner Lunge

4.6.1 Vitalität Langzeitversuch

Da zwischen der Anzahl lebender Zellen und der Reduktion des Vitalitätsfarbstoffes Resazurin ein direkter Zusammenhang besteht (O'Brien et al., 2000), wurde der Resazurin-Test verwendet um die Vitalität der Miniorgankulturen des Bronchus und der Lunge eines Patienten (B- und L-MOC 317) über drei Monate (84 Tage) zu verfolgen. Bis zum Ende des Experimentes ist keine Abnahme der Vitalität zu erkennen (Abbildung 17). Zwischen Tag 28 – 63 scheint die Vitalität sogar zu steigen. Die MOC werden von Hand geschnitten und können deshalb leicht in ihrer Größe variieren – besonders B-MOC sind oft kleiner als L-MOC. Die Größenunterschiede wurden versucht durch eine Proteinbestimmung am Ende des Experimentes und die Normalisierung der Fluoreszenz auf den jeweiligen Proteingehalt anzugleichen. Trotz der Normalisierung zeigen die L-MOC eine höhere Vitalität als die B-MOC (Abbildung 17, B)

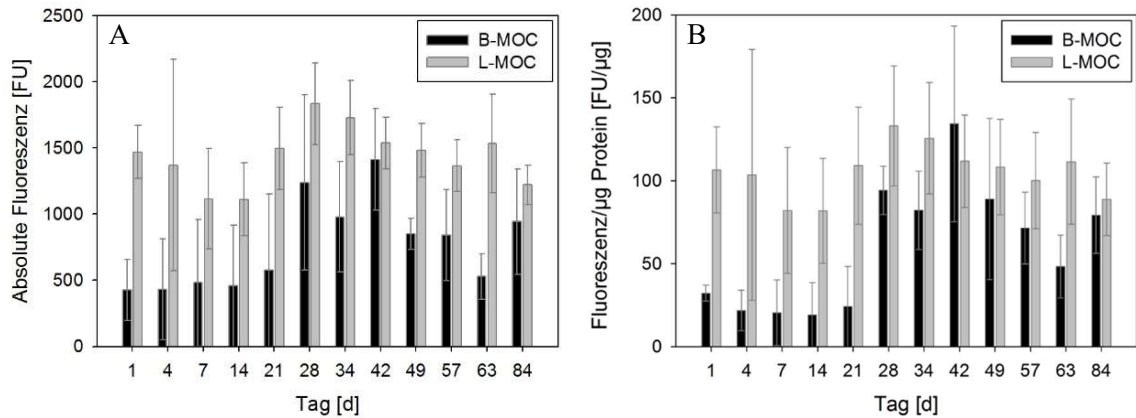


Abbildung 17: Vitalität (Fluoreszenz) von Miniorgankulturen humaner Lunge/Bronchus (L-MOC/B-MOC) in Kultur bis zu 84 Tagen ermittelt durch den Resazurin-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgt als absolute Fluoreszenz (A) und als relative Fluoreszenz bezogen auf den Proteingehalt der Miniorgankulturen (B); Mittelwert \pm SD (n = 2 (B-MOC), n = 4 (L-MOC); N = 1); p-Wert zu Tag 1: alle > 0,05.

4.6.2 Immunhistochemische Charakterisierung

Neben der Übersichtsfärbung (Hämatoxylin-Eosin, HE) wurde in den Schnitten der fixierten MOC Zytokeratin 7 (CK7), 8/18 (CK8/18) als Epithelmarker sowie Desmin (glatte Muskulatur, mesenchymaler Marker), *smooth muscle actin* (SMA, u.a. Gefäße, Bindegewebe, Fibroblasten), Vimentin (mesodermale Zellen), E-Cadherin (Zell-Zell-Kontakte) und die Mucine MUC1 bzw. MUC5AC angefärbt

Die L-MOC des ersten Patienten (ID 315) wurden über vier Wochen kultiviert und an den Tagen 0, 1, 4, 7, 14, 21 und 28 immunhistochemisch charakterisiert. In der HE-Übersichtsfärbung zeigt sich zu Beginn der Kultivierung ein vitales Lungenparenchym mit Alveolen, respiratorischem Epithel und teilweise vorhandene Zilien (Abbildung 18, A). Das Bindegewebe ist kollagenfaservermehrt und zeigt eine leichte Fibrose. Zahlreich vorhandene Lymphozyten und neutrophile Granulozyten deuten auf eine Entzündung, vermutlich als Begleiterscheinung der pulmonalen Metastase, hin. Zusätzlich sind Gefäße und eine Anthrakose (Ansammlung von Rußpartikeln, Stäube o.ä.) in den Schnitten zu erkennen. Ab dem Tag 14 bildet sich anstatt eines respiratorischen Epithels vermehrt ein Plattenepithel aus – besonders in Hohlräumen und um den MOC herum (Abbildung 18, B). Dies ist vermutlich eine metaplastische Anpassung an die *in-vitro*-Kultivierung. Ab dem Tag 21 deutet sich eine beginnende Avitalität der Zellen an, da diese z.B. weniger Zellkerne enthalten und sich das respiratorische Epithel verändert darstellt. Bis zum Tag 28 sind jedoch weiterhin vitale Zellen erkennbar.

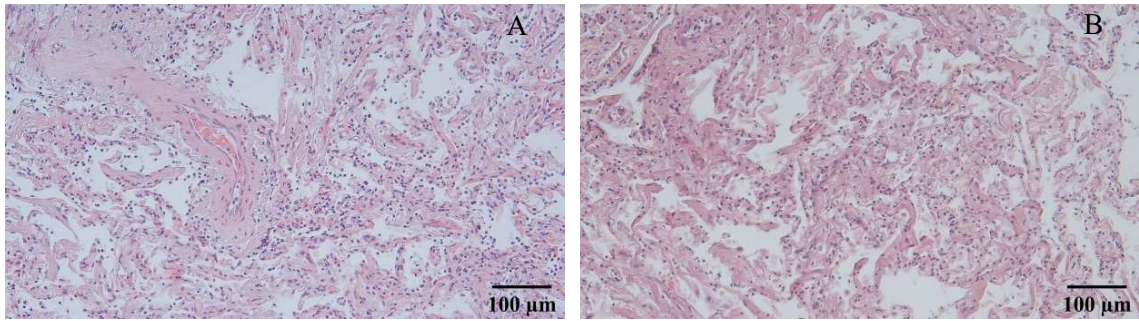


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-Übersichtsfärbung L-MOC (ID 315).
Vergrößerung: 200-fach; Tag 1 (A), Tag 14 (B).

Die CK7-Färbung zeigt, dass die Alveolen zu Beginn mit einem einschichtigen Epithel ausgekleidet sind und bis zum Ende der Beobachtungszeit vitale Zellen vorhanden sind. Das metaplastische Plattenepithel wird dabei ebenfalls angefärbt (Abbildung 19; A, B). Angefärbtes CK8/18 zeigt die respiratorischen Alveolarepithelien, die mit zunehmender Kultivierungszeit abnehmen und an Tag 28 nur noch vereinzelt vorkommen (Abbildung 19; C, D). E-Cadherin wird moderat bei den Alveolarepithelien und stark im Plattenepithel angefärbt (Abbildung 19; E, F). Die Umwandlung zeigt sich hier schon deutlicher ab Tag 7. MUC1 wird bis zu Tag 14 stark in den alveolaren Epithelien und bis zu Ende der Kultivierung in diesen weiterhin moderat angefärbt (Abbildung 19; G). MUC5AC ist in allen Schnitten negativ. SMA kann bis Tag 28 in den Gefäßen angefärbt werden (Abbildung 19; H), sowie auch Desmin bis zum letzten Tag gefäßassoziiert positiv gefärbt ist. Vimentin wird sehr universell in vielen Gewebestrukturen u.a. Epithelien und Bindegewebe angefärbt. Die zu Anfang starke Färbung nimmt über die Zeit der Kultivierung jedoch ab.

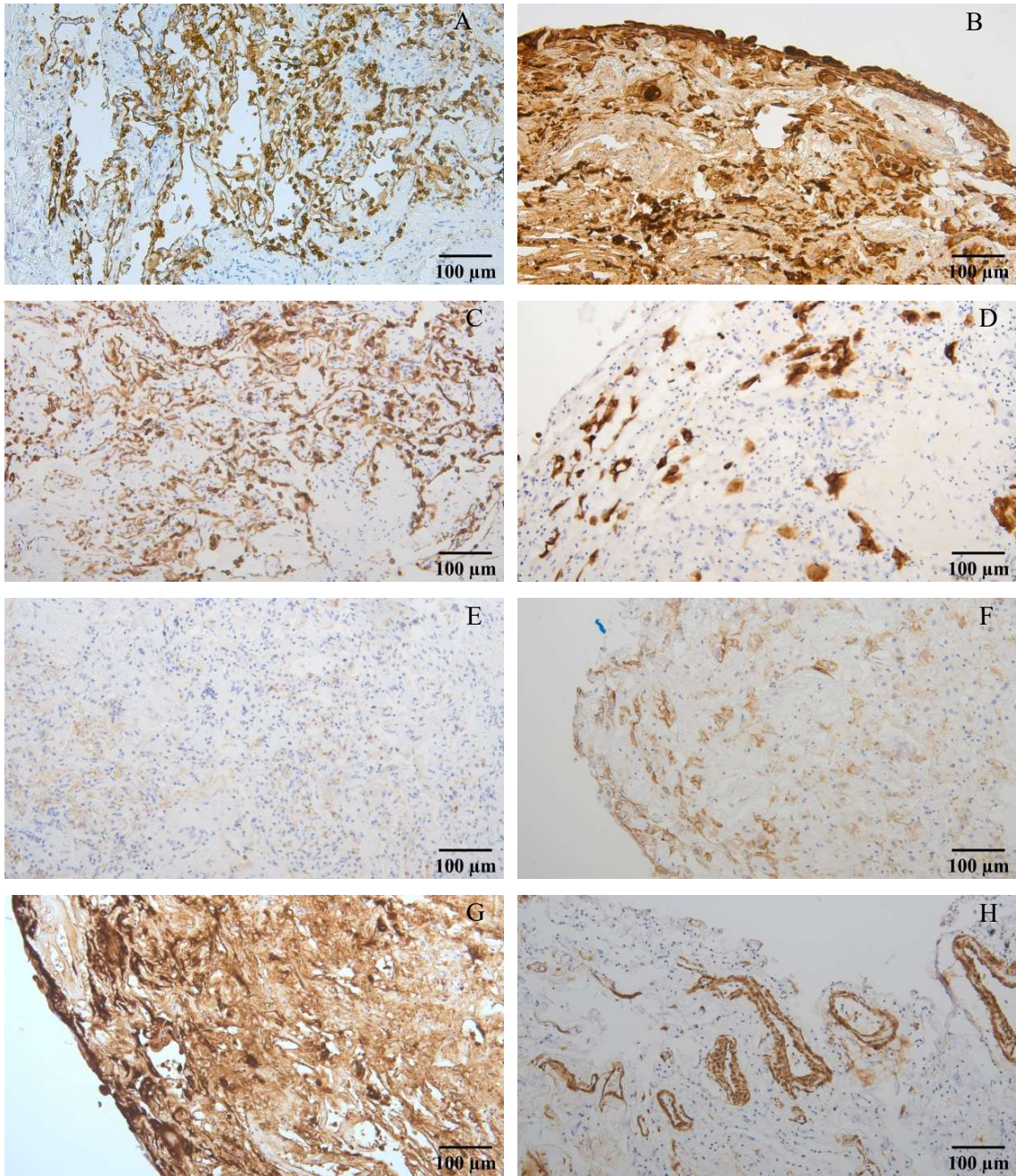


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen L-MOC (ID 315).
 Vergrößerung: 200-fach; Färbungen: CK7 Tag1 (A), CK7 Tag 28 (B), CK8/18 Tag 1 (C), CK8/18 Tag 28 (D), E-Cadherin Tag 1 (E), E-Cadherin Tag 28 (F), MUC1 Tag 28 (G), SMA Tag 14 (H).

Die L-MOC des zweiten Patienten (ID 317) wurden über drei Monate kultiviert und den Tagen 0, 1, 4, 7, 14, 21, 28, 34, 42, 49, 57, 63, 70, 77 und 84 immunhistochemisch charakterisiert. In der HE-Färbung der L-MOC sind zu Beginn der Kultivierung, ebenso wie bei Patient ID 315, ein vitales Lungenparenchym mit Alveolen, kollagenfaservermehrtes Bindegewebe, eine leichte Fibrose, Anthrakose und eine leichte Entzündung zu sehen (Abbildung 20, A). Die metaplastische Veränderung des Epithels zum Plattenepithel hin beginnt am Tag 21 und die ersten Zeichen für eine beginnende Avitalität zeigen sich ab Tag 28. Ab Tag 42 sind deutlich weniger vitale Zellen zu sehen, die Alveolen erscheinen vermehrt epithelbefreit und ab Tag 49 füllen sie sich mit Plattenepithel. Große Bereiche sind ab Tag 63 abgestorben, jedoch nicht nekrotisch. Die Struktur der Alveolen bleibt erhalten. Es ist jedoch von einem Funktionsverlust auszugehen. Bis zum letzten Tag der Beobachtung sind Zellen mit Restvitalität, vor allem Lymphozyten und Plattenepithelzellen, in der HE-Färbung zu erkennen (Abbildung 20, B).

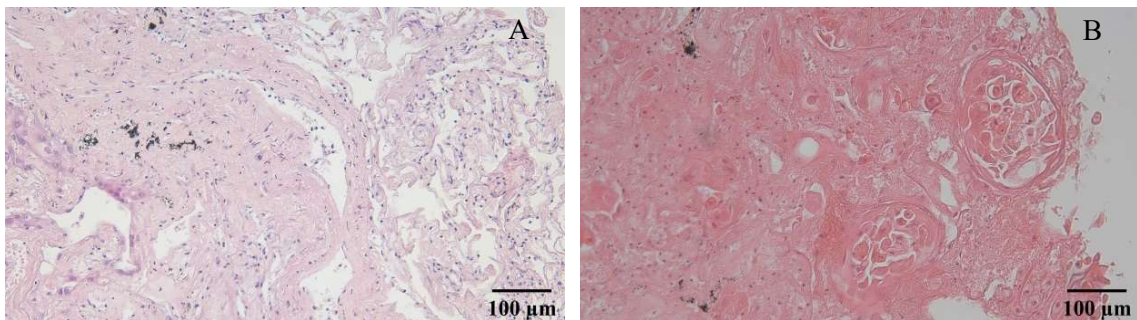


Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-Übersichtsfärbung L-MOC (ID 317).
Vergrößerung: 200-fach; Tag 21 (A), Tag 84 (B).

Mit Hilfe der CK7-Färbung lässt sich die metaplastische Veränderung neben der Färbung des normalen Epithels gut nachvollziehen. Sie zeigt sich hier bereits etwas eher ab Tag 14. Ab Tag 42 ist fast ausschließlich Plattenepithel, zum Teil in Nestern, zu sehen (Abbildung 21; A, B, C). Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Färbungen des CK8/18 (Abbildung 21, D), E-Cadherins und MUC1 (Abbildung 21, E). An Tag 7 liegen nur einige wenige Zellen, die MUC5AC positiv gefärbt sind, vor. SMA (Abbildung 21, F) ist in den Gefäßen bis zum Tag 42 deutlich gefärbt. Danach wird die Färbung über den Tag 63 immer schwächer, bis sie sich schließlich an Tag 84 kaum noch darstellen lässt. Die Wandungen der Gefäße sind am Ende der Beobachtungszeit geschädigt und diffus dargestellt. Es zeigt sich ein ähnliches Bild bei der Färbung des gefäßassoziierten Desmins. Vimentin wird nicht im Plattenepithel angefärbt. Die zu Anfang starke Färbung nimmt deshalb über die Zeit der Kultivierung ab.

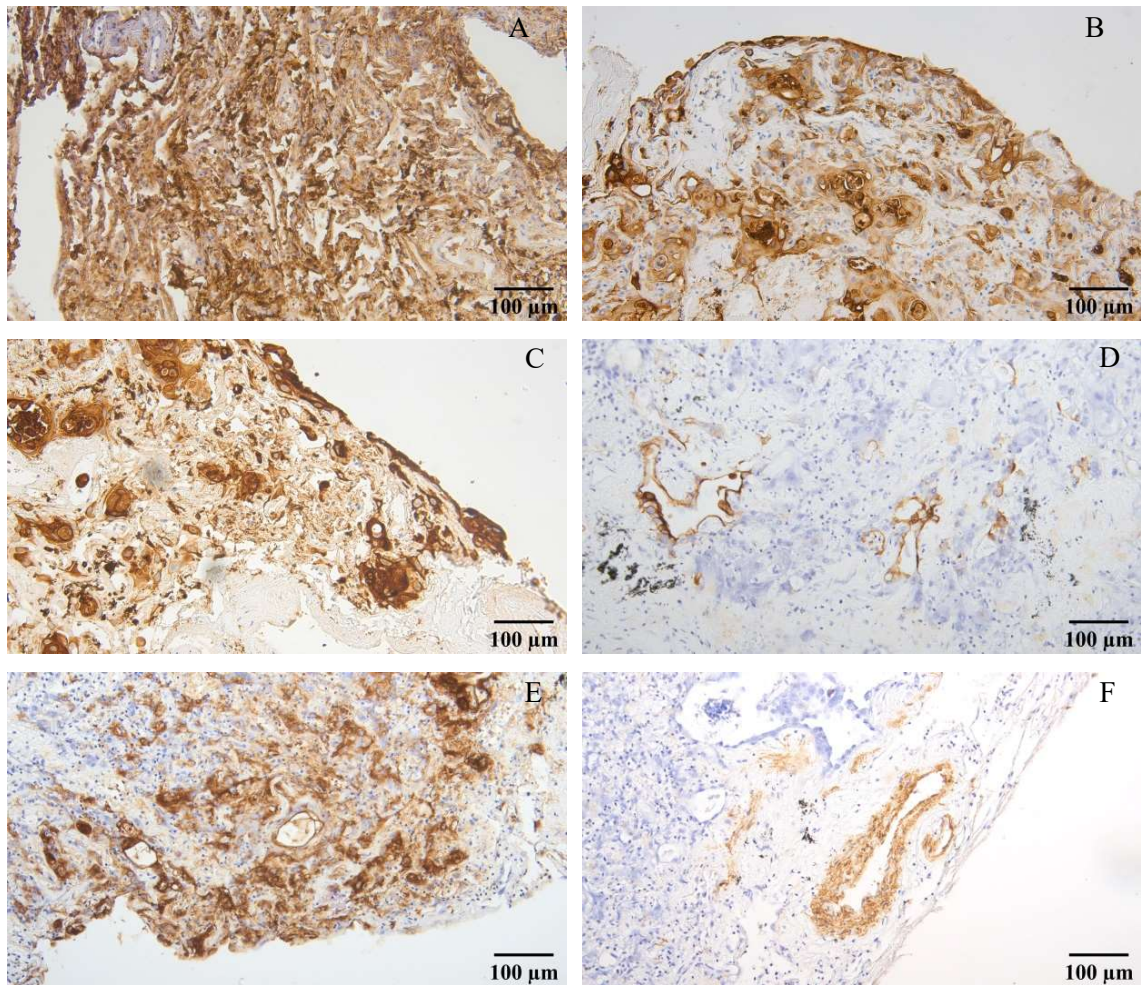


Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen L-MOC (ID 317).
 Vergrößerung: 200-fach; Färbungen: CK7 Tag 14 (A), CK7 Tag 21 (B), CK7 Tag 42 (C), CK8/18 Tag 21 (D), MUC1 Tag 21 (E), SMA Tag 21 (F).

Auch die B-MOC des zweiten Patienten (ID317) wurden über drei Monate kultiviert und an den Tagen 1, 7, 14, 21, 28, 34, 42, 49, 57, 63, 70, 77 und 84 immunhistochemisch charakterisiert. Über die HE-Färbung (Abbildung 22, A-D) können zum Kultivierungsbeginn vitale Drüsen bzw. Drüsenendstücke, Knorpelanteile, Kollagen und Bronchus-Wandanteile dargestellt werden, jedoch wenig respiratorisches Epithel. Bereits eher als bei den L-MOC zeigt sich an Tag 7 das metaplastische Plattenepithel, welches an Tag 14 sogar in Drüsen einbricht. Ab Tag 34 beginnen die ersten Zellen avitaler zu werden und an Tag 49 treten erste Nekrosen auf. Diese sind u.a. anhand einer mangelnden Kernfärbbarkeit, eosinophilen und homogenen Färbbarkeit sowie durch den Verlust von Zellgrenzen festzustellen. Zwischen Tag 57 und 84 sind weiterhin Bereiche mit Restvitalität, z.B. dem Plattenepithel oder Knorpel, zu sehen. Jedoch sind viele avitale Zellen, deutliche Nekrosen, und mit Plattenepithel gefüllte Drüsen, erkennbar.

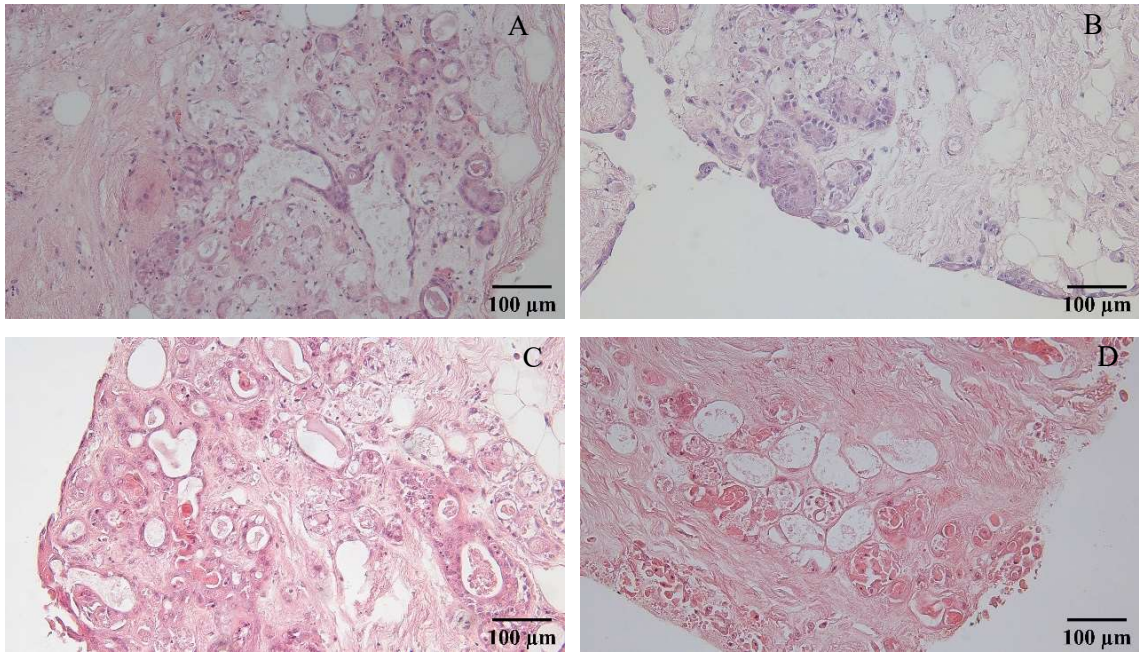


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-Übersichtsfärbung B-MOC (ID 317).
Vergrößerung: 200-fach; Tag 7 (A), Tag 21 (B), Tag 34 (C), Tag 84 (D).

CK7 kann im Bronchus, im Drüsengewebe und im metaplastischen Epithel spezifisch angefärbt werden. Dabei zeigt sich, dass die MOC ab Tag 21 zum Teil von einem Plattenepithelrand umgeben sind (Epithelialisierung), dass die Drüsen mit Plattenepithel gefüllt sind und am Ende der Kultivierung das metaplastische Epithel überwiegt (Abbildung 23; A, B). Unterstützend zeigen dies die Färbungen des E-Cadherins und MUC1. CK8/18 wird nicht im metaplastischen Epithel angefärbt. Die positive Färbung des Drüsengewebes und Bronchialepithels nimmt ab Tag 14 ab und ist bis Tag 84 nur noch sehr schwach erkennbar (Abbildung 23; C, D). An Tag 7 liegen ein paar wenige Zellen, genau wie bei den L-MOC, die MUC5AC positiv gefärbt sind, vor. Die SMA- und Desmin-Färbung lässt erkennen, dass der Bronchus deutlich gefäßärmer als das periphere Lungengewebe ist. Zudem wird das SMA der myoepithelialen Basalzellschicht der Drüsen und der Wandung des Bronchus angefärbt, die ab Tag 21 bis zum Ende der Kultivierung abnimmt. Vimentin wird im Drüsengewebe, in einzelnen Epithelien und in einigen Chondrozyten im Knorpel (Abbildung 23, F) positiv angefärbt. Im Plattenepithel wird es, wie bei den L-MOC auch, nicht angefärbt und die zu Anfang starke Färbung nimmt deshalb über die Zeit mit abnehmender Vitalität der ursprünglichen Strukturen ab.

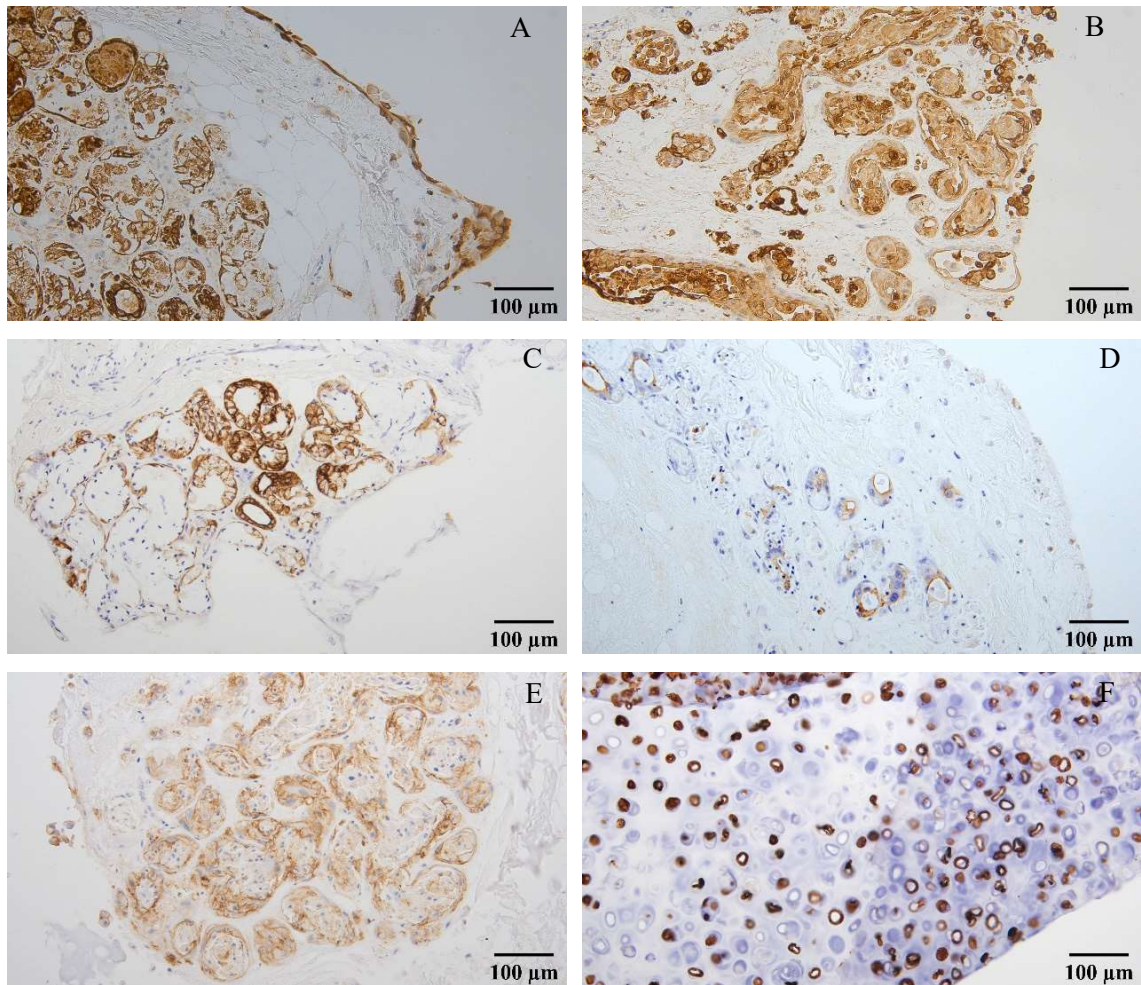


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen B-MOC (ID 317).
 Vergrößerung: 200-fach; Färbungen: CK7 Tag 21 (A), CK7 Tag 63 (B), CK8/18 Tag 1 (C), CK8/18 Tag 84 (D), MUC1 Tag 84 (E), Vimentin Tag 14 (F).

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Nanotoxikologie und Bariumsulfat-Nanopartikel

Bariumsulfat-Nanopartikel (BaSO_4 -NP) finden aktuell eine breite Anwendung in Bereichen der Farb- und Lackindustrie, Kosmetikindustrie und in der Medizin (Petrova et al., 2008). In toxikologischen Studien zu Nanopartikeln werden BaSO_4 -NP oft als Negativkontrolle eingesetzt, da es als chemisch inert und nicht-toxisch gilt (Schwotzer et al., 2017; Delaval et al., 2017). Als granulär biobeständigen NP (GBP) bzw. *poorly soluble particles* (PSP) kategorisierte NP wie z.B. BaSO_4 oder TiO_2 besitzen keine chemische Toxizität – ausgelöst durch Substanzen, die von den Partikeln freigesetzt werden oder durch funktionelle Gruppen an der Oberfläche der Partikel. GBP-Materialien können dennoch eingeatmet werden und erreichen die Bronchien und Alveolen. Die Partikel können in der Lunge und in den Lymphknoten akkumulieren und die *Clearance*-Funktion der Lunge beeinträchtigen. Dieses Expositionsszenario kann somit eine Gesundheitsgefährdung darstellen und möglicherweise bei einer Überlastung der Lungen-*Clearance* zu Entzündungen und Karzinogenese in der Lunge führen (Gebel et al., 2014; Hartwig und MAK-Kommission, 2017). Mithilfe von unterschiedlich empfindlichen und komplexen Zellkulturmodellen der humanen Lunge soll in der vorliegenden Arbeit die toxikologische Wirkung von BaSO_4 -NP bewertet werden und die Verwendung als chemisch inerte Negativkontrolle geprüft werden. Aus bisherigen Forschungen zur Partikeltoxikologie ist bekannt, dass die Inhalation von Partikeln z.B. oxidativen Stress auslösen kann, welcher wiederum zu genotoxischen Effekten und reversibler bzw. irreversibler Inflammation führen kann (Møller et al., 2013). Aufgrund dessen wurden zur toxikologischen Bewertung der BaSO_4 -NP neben dem Einfluss auf die Vitalität, auch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Genotoxizität und die pro-inflammatorische Wirkung untersucht.

Toxikologische Eigenschaften von NP sind eng mit den jeweiligen physikalischen und chemischen Eigenschaften verbunden. Deshalb wurden die in der Arbeit verwendeten Partikel und deren Suspensionen im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes „NanoEmission - Untersuchung des Emissionsverhaltens von Nanopartikeln in der Abfallverbrennung“ bezüglich der Partikelgrößenverteilung, Oberflächenladung und Löslichkeit untersucht. Die Primärpartikelgrößen beider BaSO_4 -NP (Fa. Solvay und Fa. Huntsman) wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) bestimmt und zeigten dabei jeweils eine Größe von $d_{50} = 60$ nm. Beide Materialien besitzen kein Oberflächen-*Coating* (Beschichtung). In den Suspensionen mit AECG-Medium wurde 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^2/g gemessen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen NP hinsichtlich ihrer strukturellen

Eigenschaften, Partikelgröße und Stabilität in Suspensionen miteinander vergleichbar sind (Thomas, 2020; Fraunhofer UMSICHT et al., 2017). Für die *Clearance* der Lunge ist es von entscheidender Bedeutung, ob es sich um GBP/PSP oder um lösliche Partikel handelt. Es wurde deshalb auch die Freisetzung von Ba⁺-Ionen in zellfreiem Medium untersucht. Dabei konnte für die BaSO₄-NP nur eine geringe dosisabhängige Freisetzung von Ba⁺-Ionen gezeigt werden (Thomas, 2020).

5.2. Wirkung von Bariumsulfat-Nanopartikel auf verwendete Zellkulturmodelle

In dieser Arbeit werden für die toxikologische Bewertung der BaSO₄-NP eine normale humane Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B), zwei primäre humane Explantkulturen (normale humane Bronchialepithelzellen, NHBEZ; periphere Lungenzellen, PLZ) und 3-D-Miniorgankulturen aus Bronchus und Lunge (B-/ L-MOC) eingesetzt. Die NHBEZ werden aus humanem Bronchus und die PLZ aus peripherem Lungengewebe gewonnen. Bronchien haben u.a. mit der mukoziliäre Reinigung mehr *Clearance*-Funktionen und kommen eher mit größeren Partikeln in Kontakt, wobei die periphere Lunge mit den Alveolen mit kleineren Partikeln in Berührung kommt und keine mukoziliäre Reinigung mehr aufweist (DaNa, 2020a). Möglicherweise können aufgrund dessen auch unterschiedliche Empfindlichkeiten in den zwei primären Zellkulturen gegenüber Nanopartikeln entstehen. NHBEZ, PLZ und die MOC wurden aus unterschiedlichen Individuen gewonnen. Diese sind meist über 60 Jahre alt und weisen ganz unterschiedliche Ausgangssituationen beispielsweise hinsichtlich genetischer Faktoren, beruflicher Expositionen und Tabakkonsum auf und damit auch eine unterschiedliche Adaptionsfähigkeit an exogene Stressoren. Aufgrund von interindividuellen Unterschieden zwischen den Patienten kann es zu höheren Schwankungen in den Experimenten kommen. Jedoch kann Interindividualität auch als große Stärke im Vergleich zu der Arbeit mit Zelllinien gewertet werden. Die normale humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B wurde ausgewählt, um eine Verknüpfung zwischen den erhaltenen Daten der primären Zellkulturmodelle und den Daten der Literatur herzustellen, in denen hauptsächlich (Tumor-) Zelllinien verwendet werden.

Der Einfluss von BaSO₄-NP auf die Vitalität der verschiedenen *in-vitro* Zellkulturmodelle wurde mit Hilfe von metabolischen Vitalitätstests (MTT-Test und Resazurin-Test) bestimmt. In einem ersten Versuch wurde die Toxizität der beiden BaSO₄-NP verschiedener Hersteller auf NHBEZ und PLZ mit Hilfe des MTT-Tests nach 24- und 72-stündiger Inkubation ermittelt und verglichen. Ab einer Konzentration von 0,0395 mg/cm² sinkt bei allen Versuchen die Vitalität dosis- und zeitabhängig auf ca. 80 % bzw. unter 80 %. Zwischen den zwei verschiedenen Primärzell-Arten und auch zwischen den zwei verschiedenen Materialien kann kein deutlicher Unterschied des Effektes auf die Vitalität festgestellt werden. Der Hersteller Solvay stellte zu Beginn des Projektes

die Produktion von BaSO₄-NP, sodass alle weiteren Versuche mit dem Material der Fa. Huntsman durchgeführt wurden.

Der für die Vitalitätsbestimmung verwendete MTT-Test basiert auf einer Absorptionsmessung. Ziel des nächsten Versuches sollte sein, den möglichen Einfluss der BaSO₄-NP auf die Absorptionsmesswerte zu untersuchen. Zunächst einmal ist bei den Partikelsuspensionen der BaSO₄-NP ein deutlicher Anstieg der Absorption, besonders ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml, zu verzeichnen. Bei Ermittlung der Toxizität durch BaSO₄-NP wurde deshalb bei der BEAS-2B-Zelllinie zusätzlich der Resazurin-Test eingeführt. Es wird dabei die metabolische Aktivität über eine Fluoreszenzmessung bestimmt. Zwischen den beiden Vitalitäts-Tests scheint kein wesentlicher Unterschied in der Effektausprägung vorzuliegen. Es ist davon auszugehen, dass die Partikel durch die Waschschriffe während des Experimentes ausreichend entfernt werden und keinen Einfluss auf die Absorptionsmessung haben. In einer Studie mit 23 technischen NM wurde u.a. auch der Einfluss dieser auf die MTT-Absorption untersucht. Dabei beeinflussen alle untersuchten Nanopartikel, auch BaSO₄, die Absorption. Dieser Einfluss hebt sich jedoch bei der geringeren Konzentration (10 µg/cm²) nach dem Waschen der Zellen bei fast allen Materialien bis auf Industrieruß-NP auf (Kroll et al., 2011). Almutary und Sanderson (2016) haben in einer weiteren Studie acht verschiedene Nanopartikel und ihren Einfluss als Störgrößen auf den MTT-Test untersucht. Drei der verwendeten NP beeinflussen die optische Dichte des MTT-Tests, z.B. Industrieruß-NP (Almutary und Sanderson, 2016). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Vorversuche und eine sorgfältige Auswahl der *in-vitro*-Vitalitätstest individuell je nach verwendeten NP erforderlich sind, um Fehler bei der Ermittlung von NP-Toxizität zu vermeiden.

Im Vergleich zu den primären Zellen NHBEZ und PLZ sind die BEAS-2B unempfindlicher gegenüber den BaSO₄-NP. Während nach der 24-stündigen Inkubation kein dosisabhängiger Verlust der Vitalität zu verzeichnen ist, sinkt die Vitalität nach 72-stündiger Inkubation erst bei der höchsten Konzentration von 0,526 mg/cm² unter 80 %.

Die Exposition der B-MOC und L-MOC mit der BaSO₄-NP-Suspension (Huntsman) zeigt, dass nach 24 h und 72 h die Vitalität bei der höchsten Konzentration (0,0417 mg/cm²) nicht abnimmt. Die höchste Konzentration entspricht dabei den mittleren Konzentrationen der Zellkulturversuche, bei denen erste Effekte auf die Vitalität zu erkennen sind. Somit sind auch die Miniorgankulturen in diesem Endpunkt unempfindlicher gegenüber den NHBEZ und PLZ.

Zelllinien sind in der Regel robuste Zellmodelle mit einer leichten Kultivierbarkeit und reproduktiven Ergebnissen (Schmitz, 2009). Es überrascht deshalb nicht, dass die BEAS-2B unempfindlicher gegenüber den primären Zellkulturen sind. Die 3D-Miniorgankulturen sind unter den verwendeten Zellkulturmodellen die Modelle mit der höchsten Komplexität. Sie enthalten eine Vielzahl an sekretorischen, zilienträgenden und basalen Zellen (Bals et al., 1998). Jedoch

besitzen sie im Vergleich zu den 2D-Kulturen eine deutlich kleinere Oberfläche für die Exposition mit den NP. Es ist somit auch nachvollziehbar, dass die MOC in den Toxizitätsexperimenten am unempfindlichsten sind.

Kroll und Kolleg:innen (2011) untersuchten, wie bereits beschrieben, 23 technische NM-Suspensionen u.a. an der Lungentumorzelllinie A549. BaSO₄-NP haben dabei bis zur verwendeten höchsten Konzentration von 10 µg/cm² keinen Effekt auf die durch den MTT-Test ermittelte Vitalität (Kroll et al., 2011). 10 µg/cm² liegen in der vorliegenden Arbeit zwischen der zweit- und drittniedrigsten verwendeten Konzentration, bei denen ebenfalls keine Effekte auf die Vitalität erkennbar sind. BaSO₄-NP-Suspensionen induzierten keine Zytotoxizität in der humanen Lungentumorzelllinie H292 bei Konzentrationen von bis zu 40 µg/cm² (Delaval et al., 2017). In dieser Studie wurden BaSO₄-NP aufgrund ihres geringen Entzündungspotentials ausgesucht und als Negativ-Kontrolle verwendet. Die Primärpartikelgröße des verwendeten BaSO₄ lag dabei im Nanometerbereich bei 32 nm. In der Suspension mit Medium agglomerieren die Partikel jedoch auf eine Größe von 3817 ± 1227,1 nm und sind damit deutlich größer als in der vorliegenden Arbeit (Delaval et al., 2017). In einer weiteren Studie zeigte mikroskaliges BaSO₄ keinen Effekt auf die Vitalität von A549 bis zu einer Konzentration von 0,25 mg/ml (Monteiller et al., 2007). Es gibt einige Übersichtsstudien, die davon ausgehen, dass es keine nanospezifischen Wirkmechanismen gibt oder dass sich die Biokinetik der NP nicht grundlegend von größeren Partikeln unterscheidet (Gebel et al., 2014). Jedoch können Nanopartikel aufgrund ihres größeren Oberfläche-zu-Masse-Verhältnis eine stärkere Effektausprägung im Vergleich zu den jeweiligen Mikropartikeln in verschiedenen toxikologischen Endpunkten bewirken (Gebel, 2012; Monteiller et al., 2007). Vergleichende Daten der Wirkung von BaSO₄-NP auf die Vitalität primärer Zellkulturmodelle sind nicht verfügbar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten NHBEZ und PLZ erscheinen bei ähnlichen Konzentrationen etwas empfindlicher zu sein, während die Daten der BEAS-2B und MOC vergleichbar mit den Daten der Literatur sind.

Der Gehalt an Barium und damit die Aufnahme von BaSO₄-NP in die Zellen bzw. Miniorgankulturen wurde in dieser Arbeit durch ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) bestimmt. In den Miniorgankulturen (B- und L-MOC) zeigt sich ein dosis- und zeitabhängiger Anstieg des Barium-Gehaltes nach 24 h und 72 h. Nach 72 h Inkubation mit höchster Konzentration (0,0417 mg/cm²) enthalten die L-MOC den höchsten Barium-Gehalt von 1501 µg/g MOC (Feuchtgewicht) (± 984, p < 0,01). Die Zelllinie BEAS-2B zeigt einen dosisabhängigen, jedoch keinen zeitabhängigen Anstieg des Barium-Gehaltes. Nach 24 h Inkubation mit der höchsten Konzentration (0,019 mg/cm²) weisen die BEAS-2B den höchsten Barium-Gehalt von 75 µg/10⁶ Zellen (± 19, p < 0,001) auf. Um zu untersuchen, ob die BaSO₄-

NP durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden oder viele lediglich außen an den Zellen haften bleiben, erfolgte ein weiteres Experiment. Nach 3 h Inkubation weisen die im Brutschrank inkubierten Zellen (Endozytose möglich) einen höheren Barium-Gehalt als die im Kühlschrank inkubierten Zellen (Endozytose unterdrückt) auf. Die NP scheinen von den Zellen zum Teil durch Endozytose aufgenommen zu werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein weiterer Teil der BaSO₄-NP, trotz gründlichen Waschens, außen an den Zellen haften bleibt.

Untersuchungen zur Aufnahme von BaSO₄-NP mittels ICP-MS in die Primärzellen PLZ und NHBEZ zeigten eine dosisabhängige Aufnahme der Partikel. Eine eindeutige zeitabhängige Aufnahme konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Die Daten der beiden Zellmodelle waren vergleichbar. Dass BaSO₄-NP nicht ausschließlich außen an den Zellen haften, sondern auch subzellulär lokalisiert werden können, zeigten zusätzliche NanoSIMS-Versuche (*nanoscale secondary ion mass spectrometry*). Die NP wurden in das Zytoplasma, jedoch nicht in den Zellkern, der NHBEZ aufgenommen (Thomas, 2020).

Weder in den BEAS-2B noch in den primären Lungenzellen NHBEZ und PLZ ist ein eindeutiger zeitabhängiger Effekt gefunden worden. Dies könnte zum einen an der möglichen, teilweisen Anlagerung der Partikel außen an die Zellmembran liegen. Dieser Effekt ist womöglich eher konzentrationsabhängig als zeitabhängig. Zum anderen ist nach 72 h eine Exozytose der NP denkbar. Eine Exozytose von CeO₂-NP aus A549 Lungentumorzellen wird in der Arbeit von Dorn (2015) beschrieben. Nach einer Expositionszeit von 72 h verringerte sich der intrazelluläre CeO₂-Gehalt und es scheint ein Austausch mit den CeO₂-NP im Kulturmedium zu geben. Auch die extrazelluläre Assoziation von Partikeln in Abhängigkeit ihrer Proteinkorona wird in dieser Arbeit in Betracht gezogen. In Anwesenheit einer Proteinkorona nahm ein hoher Prozentsatz von Zellen die Partikel vollständig auf bzw. zeigten weniger Partikel an der Zelloberfläche. Die Ab- oder Anwesenheit einer Proteinkorona wurde experimentell durch einen FKS-Gehalt von 0 % bzw. 10 % eingestellt. Der Aufnahmemechanismus von CeO₂-NP wurde mit Hilfe von Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich, dass CeO₂-Nanopartikel durch Caveolae- bzw. Clathrin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose aufgenommen werden (Dorn, 2015). Zusätzlich konnte der Einfluss einer Zellformveränderung auf die Aufnahme der NP in die Zelle festgestellt werden. Eine Dehnung primärer Typ-II-Pneumozyten aus der Rattenlunge Zellen simulierte unter *in-vitro* Bedingungen die Zellformveränderung während des physiologischen Atemvorgangs. Die gedehnten Lungen-Epithelzellen nahmen dabei weniger CeO₂-NP auf als ungedehnte Zellen (Dorn, 2015).

Der Einfluss von BaSO₄-NP auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des DCF-Tests an der Zelllinie BEAS-2B und den primären Lungenzellen NHBEZ bzw. PLZ untersucht. Nach einstündiger Exposition mit der höchsten Konzentration

(0,2985 mg/cm²) entsteht in den NHBEZ das bis zu 1,7-fache ($\pm 0,8$; $p < 0,05$) an ROS im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zwischen den Nanomaterialien der beiden Hersteller und zwischen den verschiedenen Primärzellen ist kein Unterschied im Effekt zu sehen. In der Zelllinie BEAS-2B kann keine Induktion der ROS durch BaSO₄-NP der Fa. Huntsman nachgewiesen werden.

In der Lungenzelllinie NCI-H292 wurde das intrinsische oxidative Potential verschiedener NP, u.a. BaSO₄, CeO₂, und TiO₂, mittels des Cytochrom-c-Oxidationstests untersucht. Alle drei aufgeführten NP zeigten kein oxidatives Potential. Weiterhin wurde die Induktion der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase-2 (SOD2) und Hämoxigenase-1 (HO-1) untersucht. TiO₂-NP induzierten bei 10 µg/cm² die Expression von SOD2 (zweifache Induktion) und HO-1 (fünffache Induktion). Durch CeO₂- und BaSO₄-NP kam es zu einer leichten und nicht signifikanten Zunahme der mRNA-Expression der SOD2 (Delaval et al., 2017). Trotz geringer Datenlage zu BaSO₄-NP in Zusammenhang mit oxidativem Stress ist anhand der dargestellten und eigenen Ergebnisse davon auszugehen, dass diese NP nur ein geringes oxidatives Potential besitzen. Im Gegensatz zu TiO₂-NP von denen bekannt ist, dass sie ROS induzieren und oxidativen Stress auslösen (Manke et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine durch BaSO₄-induzierte Genotoxizität – untersucht mit dem H2AX-Test – bei den primären Zellen NHBEZ, PLZ und der Zelllinie BEAS-2B nach 24 bzw. 72 h (Konzentrationen 0,0019 – 0,19 mg/cm²) gezeigt werden. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch eine Studie von Haase und Kolleg:innen (2017). In dieser wurde mittels des alkalischen *Comet-Assays* die Genotoxizität 16 verschiedener NP-Aerosole an einem humanen bronchialen 3D-Modell untersucht. Für BaSO₄ NM-220 konnte bei einer Inkubation von 60 h und einer Konzentration von 50 µg/cm² keine genotoxischen Effekte gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde z.B. bei Zinkoxid NM-110 eine dosisabhängige Genotoxizität (10 – 25 µg/cm²) festgestellt (Haase et al., 2017).

Um die pro-inflammatorische Wirkung von BaSO₄-NP zu untersuchen, wurde in der eigenen Arbeit die Expression von Interleukin-8 (IL-8) nach 24- und 72-stündiger Inkubation mit BaSO₄-NP in den primären Zellen des Bronchus und der Lunge ermittelt. Sowohl in den NHBEZ als auch in den PLZ zeigt sich eine dosisabhängige Induktion von IL-8, jedoch keine zeitabhängige Induktion. Bei höchster Konzentration (0,019 mg/cm²) steigt die Expression von IL-8 in NHBEZ nach 24 h auf das 2,54-fache ($\pm 1,53$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und nach 72 h auf das 1,67-fache ($\pm 0,32$) an. Es lassen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den untersuchten Primärzellen feststellen.

Mittels *bead*-basiertem Multiplex-ELISA am Durchflusszytometer untersuchte Thomas (2020) u.a. die Freisetzung von IL-8 in NHBEZ. Es zeigte sich ein max. 1,5-facher Anstieg an IL-8 im Medium nach 24-stündiger Inkubation mit 0,0526 mg/cm² BaSO₄-NP und ein max. 1,6-facher Anstieg der IL-8-Freisetzung nach 72 h. Auch hier konnte kein eindeutiger zeitabhängiger Effekt nachgewiesen werden. Deutlichere Ergebnisse zeigten sich bei dem untersuchten Zytokin IFN- γ . Dabei kam es zu einer bis zu 40-fach erhöhten Freisetzung des Zytokins im Vergleich zur Kontrolle (Thomas, 2020). In der Lungenzelllinie NCI-H292 ließ sich nach 24-stündiger Exposition mit BaSO₄-NP eine leichte, nicht signifikante und nicht dosisabhängige Zunahme der mRNA-Expression von IL-8 (max. 2-fache Erhöhung bei 2,5 μ g/cm²) beobachten. Des Weiteren bewirken TiO₂-NP eine bis zu 4-fach erhöhte, signifikante und dosisabhängige Expression des IL-8. Eine IL-8-Freisetzung konnte mit Hilfe eines ELISA-Tests nicht nachgewiesen werden (Delaval et al., 2017). Mikroskaliges BaSO₄ zeigte an der Lungentumorzelllinie A549 bis zu einer Konzentration von 0,25 mg/ml keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen und keinen Einfluss auf die Expression oder Freisetzung von IL-8. Insgesamt zeigten die, in der Studie von Monteiller et al. (2007) verwendeten, Nanopartikel (u.a. TiO₂) deutlichere Effekte als das Mikromaterial. Die Autor:innen erklären diesen Effekt anhand des größeren Oberfläche-zu-Massen-Verhältnisses der NP (Monteiller et al., 2007). Im Vergleich zu den Tumorzelllinien wird durch BaSO₄-NP eine stärkere Induktion pro-inflammatorischer Zytokine in den primären Zellkulturen NHBEZ und PLZ ausgelöst.

Insgesamt kann beobachtet werden, dass BaSO₄-NP, trotz zum Teil sehr hochgewählter und damit nicht umweltrelevanter Konzentrationen, keine bis hin zu moderaten Auswirkungen auf die verschiedenen verwendeten Zellkulturmodelle hinsichtlich des Einflusses auf die Vitalität, Bildung von ROS und genotoxischem Potential besitzen. Die Zellkulturmodelle sind jedoch unterschiedlich empfindlich. BaSO₄-NP bewirken bei allen untersuchten Endpunkten die stärksten Effekte in den NHBEZ und PLZ und damit auch stärkere Effekte als in oft verwendeten Tumorzelllinien der Lunge. Besonders die pro-inflammatorischen Wirkung ist dabei hervorzuheben, da diese schon bei moderaten Konzentrationen zu deutlichen Effekten führt. BaSO₄-NP eignen somit nicht ausnahmslos als Negativkontrolle für Nanopartikel in Zellkulturversuchen.

5.3 Vergleichende *in-vivo*-Daten zu Bariumsulfat-Nanopartikeln

BaSO₄-NP induzierte keine behandlungsbedingten Effekte im *in-vivo*-Kurzzeit-Inhalationsversuch über fünf Tage in Ratten bis zu einer Aerosolkonzentration von 50 mg/m³.

Nur in den Gewebshomogenaten der gespülten Lunge wurde ein vorübergehender Anstieg von IL-1 α beobachtet, der aber als nicht biologisch relevant bewertet wird. Der NOAEC (*no observed adverse effect concentration*) für BaSO₄-NP wurde in dieser Studie auf 50 mg/m³ festgelegt (Landsiedel et al., 2014).

In einer weiterführenden Inhalationsstudie an Ratten konnte auch nach vier Wochen keine Lungentoxizität bis zu 35 Tagen nach Exposition mit 50 mg/m³ BaSO₄-NP festgestellt werden. Die Parameter der bronchoalveolären Lavage (BAL) waren 35 Tage nach Exposition mit den Kontrollwerten vergleichbar. Außerdem zeigten die histopathologischen Untersuchungen keine morphologischen Veränderungen in der Lunge und in den extrapulmonalen Organen; z. B. Gehirn, Herz, Leber, Milz und Nieren (Konduru et al., 2014). Eine erweiterte 13-wöchige inhalative Exposition löste eine leichte Entzündungsreaktion in der Rattenlunge aus. Daten einer ebenfalls durchgeführten intratrachealen Instillation zeigten eine mäßige, dosisabhängige Entzündungsreaktion auf BaSO₄-NP nach 24 Stunden. Die Lungenbelastung am Tag nach der vier- bzw. 13-wöchigen Inhalationsexposition lag bei $0,84 \pm 0,18$ bzw. $1,73 \pm 0,85$ mg BaSO₄/Lunge. Innerhalb von 34 Tagen verringert sich die Lungenbelastung der vierwöchigen Exposition um 95 %. Bei der einmalig instillierten Dosis von 5 mg/kg (1,4 mg BaSO₄-Lungenlast) ist die Reaktion der Neutrophilen höher als 24 Stunden nach der letzten Inhalationsexposition. Der Unterschied der Reaktion der Neutrophilen kann auf die Unterschiede in der Dosisrate, Partikelverteilung, Partikel-Clearance, Agglomerat-Oberflächeneigenschaften und Geschlechterverteilung zwischen den beiden Applikationsformen zurückgeführt werden. Instillierte BaSO₄-NP werden mit einer Halbwertszeit von 9,6 Tagen aus der Lunge abtransportiert. Barium hatte sich dabei nach 28 Tagen vorwiegend in den Knochen angereichert (29 %). 16 % der applizierten Partikel waren nach dieser Zeit noch in der Lunge vorzufinden. Ein Anteil von 30 % wurde über den Kot ausgeschieden (Konduru et al., 2014). BaSO₄-NP zeigten eine geringere Toxizität und Biopersistenz in der Lunge im Vergleich zu anderen schwerlöslichen NP wie CeO₂ und TiO₂ (Konduru et al., 2014).

Molina et al. (2019) führten über zwei Jahre eine weitere Studie zum Verbleib von BaSO₄-NP in Rattenlungen durch. Bariumsulfat akkumulierte stetig in der Lunge von Wistar Han Ratten bis zur Expositionsdauer von einem Jahr. Im zweiten Jahr kam es trotz weiterer Exposition zu einem Gleichgewicht zwischen der Einlagerung und Clearance des applizierten Bariums. Die Halbwertszeit verlängerte sich in dieser zweijährigen Studie im Vergleich zu den Ergebnissen von Konduru et al. (Molina et al., 2019; Konduru et al., 2014). Mit steigender Barium-Beladung verlangsamte sich die Lungen-Clearance. Vermutlich ist die Beeinträchtigung der Reinigungsmechanismen wie die mukoziliären Reinigung und die Lösung der NP in den Phagolysosomen dafür verantwortlich. Auch nach einer Expositionsdauer von zwei Jahren bzw. einer einmaligen intratrachealen Instillation mit steigenden BaSO₄-NP Konzentrationen zeigten

sich die höchsten Bariumgehalte in der Lunge, den tracheobronchialen und mediastinalen Lymphknoten, den Knochen und im Knochenmark. Die Verteilung des BaSO₄ von der Lunge in die Knochen geschieht über Lösungsvorgänge, dies konnte ein vergleichender Versuch mit BaSO₄-NP und löslichem BaCl₂ klären. Dabei erfolgt die Lösung der Partikel in den Phagolysosomen alveolarer Makrophagen. Ein geringer Teil intakter BaSO₄-NP konnte in den tracheobronchialen Lymphknoten, speziell in den Endosomen phagozytierender Zellen, nachgewiesen werden (Molina et al., 2019).

In einer *in-vivo* Inhalationsstudie von Schwotzer et al. (2017) mit BaSO₄-NP über 90 Tage konnte eine schnellere Elimination von BaSO₄-NP im Vergleich zu anderen PSP, deren Halbwertszeiten meist bei ca. 70 Tagen liegen, bestätigt werden (Schwotzer et al., 2017). Es zeigten sich zudem keine signifikanten Veränderungen des Körpergewichtes oder der Nahrungsaufnahme der Ratten. Als sensibler Marker für inflammatorische Reaktionen konnte ein signifikanter Anstieg von Neutrophilen in der BAL beobachtet werden. Dieser normalisierte sich nach Beendigung der Exposition. Weitere bestimmte Marker für Apoptose (gespaltene Caspase-3) und Genotoxizität (γ H2AX und 8-OHdG) wurden durch die Behandlung mit BaSO₄-NP nicht beeinflusst (Schwotzer et al., 2017). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte *in-vitro* keine Induktion des γ H2AX festgestellt werden.

Sokolova et al. (2018) untersuchten die Aufnahme von BaSO₄-Partikeln in primären, phagozytierenden Knochenmarkszellen der Maus. Sowohl dendritische Zellen als auch Makrophagen nahmen Partikel der Größen 40 nm, 420 nm und 1 μ m dosis- und zeitabhängig auf. Die Makrophagen wiesen eine höhere Partikelkonzentration als die dendritischen Zellen auf. Weiterhin konnten die Partikel in den Phagosomen und Heterophagosomen lokalisiert werden (Sokolova et al., 2018). NP wurden außerdem im Zytosol nachgewiesen, jedoch nicht im Zellkern. Dies konnten auch die NanoSIMS-Aufnahmen mit den NHBEZ in der Arbeit von Thomas (2020) zeigen (Sokolova et al., 2018; Thomas, 2020).

Konduru et al. (2017) untersuchten in einer kombinierten *in-vitro/in-vivo* Studie den Einfluss der Proteinkorona auf die Interaktion zwischen NP und Lungenzellen. Die Anteile von neun Proteinen variierten in den gebildeten Koronen für die untersuchten vier NP (2x CeO₂, BaSO₄ und ZnO) signifikant. Die Menge an Albumin, Transferrin und α -1-Antitrypsin waren in den Koronen von BaSO₄ und ZnO größer als die der beiden CeO₂-NP. Die Aufnahme von BaSO₄ in die alveolaren Makrophagen war dabei geringer als die bei den CeO₂-NP. Es wurde gezeigt, dass verschiedene NP Proteine aus der Lungenflüssigkeit variabel adsorbieren. Die Menge an Albumin in der NP-Korona variierte ebenso wie die NP-Aufnahme durch die alveolaren Makrophagen. Das Ausmaß, inwieweit die Proteinkorona eine kritische Determinante für den Verbleib und die biologische Wirkung von NP ist, muss noch ermittelt werden. (Konduru et al., 2017).

Auch Mousseau und Berret (2018) gehen davon aus, dass für die Übertragung der Daten der NP-Aufnahme aus *in-vitro*-Daten auf den Gesamtorganismus der Einfluss des in der Lunge vorkommenden *Surfactants* (bestehend aus Phospholipiden und Proteinen) sowie die Bewegung der Zellen durch den Atemvorgang von Bedeutung zu sein scheint. Ob der *Surfactant* die Aufnahme und die Toxikologie der NP verringert oder erhöht ist noch nicht abschließend geklärt (Mousseau und Berret, 2018). Bisher wurde herausgefunden, dass NP und *Surfactant* miteinander reagieren und NP als Verbindungen zwischen *Surfactant*-Vesikeln fungieren können. Besonders ausgeprägt ist diese *Sticker*-Funktion, wenn sich die Oberflächenladungen stark unterscheiden. Grenzflächen- und Gesamteigenschaften des Lungen-*Surfactants* können durch eingeatmete NP beeinflusst werden und so die Lungenphysiologie stören (Mousseau und Berret, 2018).

Als Teil einer 90-Tage-Inhalationsstudie mit CeO₂ NM-212 und BaSO₄ NM-220 an Ratten wurde die Expression von 391 Genen in Alveolarepithelzellen Typ II (AEII-Zellen) nach einem Tag, 28 und 90 Tagen Exposition analysiert. Insgesamt wurden 34 Gene reguliert, von denen die meisten mit Entzündungsmediatoren zusammenhängen. Deutliche Veränderungen der Genexpression wurden für Ccl2, Ccl7, Ccl17, Ccl22, Ccl3, Ccl4, IL-1 α , IL-1 β und IL-1 γ (Entzündung), Lpo und Nox1 (oxidativer Stress) und Mmp12 (Entzündung/Lungenkarzinom) gemessen. Gene, die mit Genotoxizität und Apoptose in Verbindung stehen, zeigten keine ausgeprägte Regulation. Die Effekte von BaSO₄-NP sind gering, zeigen jedoch eine Überlappung mit dem Genmuster der CeO₂-NP (Schwotzer et al., 2018).

Im Rahmen einer zweijährigen kombinierten *in-vivo*-Studie zur chronischen Toxizität und Karzinogenität, wurde die systemische (Blutzellen-) Genotoxizität von zwei Nanomaterialien, CeO₂ NM-212 und BaSO₄ NM-220, nach einer drei- oder sechsmonatigen *Hole-Body*-Exposition in Ratten untersucht. DNA-Effekte wurden in den Leukozyten mit Hilfe des alkalischen *Comet-Assays* analysiert. Hierbei wurden Genmutationen und Chromosomenaberrationen in Erythrozyten unter Verwendung des *Pig-a*-Genmutations-Tests und des Mikronukleus-Tests gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine subchronische Inhalationsexposition gegenüber verschiedenen niedrigen CeO₂-NP-Dosen (0,1 - 3 mg/m³) und einer hohen Dosis von BaSO₄-NP (50 mg/m³) keine Genotoxizität des hämatopoetischen Systems der Ratte auf DNA-, Gen- oder chromosomaler Ebene induziert (Cordelli et al., 2017). Wie bereits erwähnt wurde auch in einer weiteren *in-vivo*-Studie über 90 Tage an Ratten keine Induktion von Genotoxizität festgestellt (Schwotzer et al., 2017; Schwotzer et al., 2018).

BaSO₄-NP zeigen in *in-vivo*-Studien keine bzw. nur leichte behandlungsbedingte Effekte, keine Lungentoxizität und eine geringe Biopersistenz. Ähnlich wie in den *in-vitro*-Versuchen konnten keine Genotoxizität, jedoch leichte Entzündungseffekte festgestellt werden. Neben der *Clearance* aus der Lunge findet auch eine Einlagerung der BaSO₄-NP z.B. in Lymphknoten und Knochen

der Tiere statt. Im Vergleich zu anderen NP, wie z.B. TiO_2 und CeO_2 , scheinen BaSO_4 -NP als Negativkontrolle geeignet zu sein - jedoch auch nicht ohne leichte Effekte auszulösen. Im Vergleich bilden die ermittelten *in-vitro*-Effekte von BaSO_4 -NP aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit die Effekte aus den *in-vivo*-Daten gut ab. Das kann für zukünftige Bewertungen, auch anderer NP, nützlich sein. Die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus *in-vitro*-Versuchen auf die Situation in Tieren bzw. im Menschen sollte weiterhin untersucht werden. Eine große Herausforderung bei *in-vitro*-Tests mit NP im Allgemeinen ist dabei die Berücksichtigung der Relevanz der verwendeten Partikelkonzentrationen. *In-vivo*-Dosen können nicht direkt in *in-vitro*-Konzentrationen umgewandelt werden. In Inhalationsstudien an Tieren führt die Überladung (*Overload*) zu einer Überschreitung der Makrophagen-*Clearance*-Kapazität (Oberdörster, 1995). Für TiO_2 -NP wurde der Überladungseffekt in Ratten bei 10 mg/m^3 festgestellt (Hext et al., 2005).

5.4 Charakterisierung der Miniorgankulturen humaner Lunge

Eine weitere Zielstellung der eigenen Arbeit war es, humane Miniorgankulturen der Lunge und des Bronchus (L-MOC, B-MOC) über einen längeren Zeitraum zu kultivieren bzw. zu charakterisieren und sie hinsichtlich einer Eignung als alternatives Modell zu Versuchen mit Tieren oder Monozellkulturen zu prüfen. Es zeigt sich bis zum Ende des Experimentes, nach drei Monaten (84 Tage), keine Abnahme der metabolischen Vitalität der MOC. Es kann sogar ein leichter Anstieg der Vitalität zwischen Tag 28 – 63 beobachtet werden. Größenunterschiede, die durch das Schneiden per Hand entstehen, wurden versucht durch eine Normalisierung der Fluoreszenz auf den jeweiligen Proteingehalt anzugleichen. Die L-MOC zeigen eine höhere Vitalität als die B-MOC. Zusätzlich zu den Vitalitätstests erfolgte eine immunhistochemische Charakterisierung der B-/ L-MOC über einen Zeitraum von einem Monat bzw. drei Monaten. Die Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Übersichtsfärbung zeigt, dass die Zellen bis zu 21 – 28 Tagen uneingeschränkt vital sind. Ab Tag 7 – 14 bildet sich vermehrt ein Plattenepithel, anstatt eines respiratorischen Epithels, an den Rändern der MOC und in Hohlräumen aus. Es ist zu vermuten, dass dies eine metaplastische Anpassung an die *in-vitro*-Kultivierung ist. Eine Metaplasie des respiratorischen Epithels in ein Plattenepithel, aufgrund eines äußeren Stressors, ist z.B. als Folge eines chronischen Tabakkonsums bekannt (Lüllmann-Rauch, 2009). Über die Kultivierungszeit nimmt der Anteil an Plattenepithel zu. Damit ist womöglich der Anstieg der metabolischen Vitalität zwischen Tag 28 und 63 zu erklären. Besonders ab Tag 42 stellen sich die ursprünglichen Strukturen der MOC zunehmend avitaler dar und ab Tag 63 sind bereits große Bereiche abgestorben. Ab diesem Zeitpunkt kommt es zu einer leichten Abnahme der metabolischen Vitalität. Eine Restvitalität geht vermutlich vor allem von den Lymphozyten und Zellen des

Plattenepithels aus. Die Färbung des Zytokeratins 7 (CK7) und 8/18 (CK8/18), Desmins, *smooth muscle actin* (SMA), Vimentins, E-Cadherins (Zell-Zell-Kontakte) und des Mucins MUC1 unterstützen die vorangegangenen Annahmen. MUC5AC ist im Gegensatz zu MUC1 nicht membranständig (Lüllmann-Rauch, 2009). Dies konnte nur in sehr wenigen Schnitten nachgewiesen werden. Womöglich wird es als sekretorisches Protein besser im Überstand der MOC nachzuweisen sein.

Bals und Kolleg:innen (1998) verfolgten die Entwicklung sekretorischer Zellen und die Zellproliferation humaner Bronchialepithelzellen über wenige Stunden, über eine bis drei Wochen bis maximal 54 Tagen. 24 h nach Explantation waren die B-MOC vollständig von einem Epithel bedeckt. Die Gewebsanalyse zu verschiedenen Zeitpunkten zeigte die Entwicklung eines differenzierten Epithels, beginnend mit einer Schicht von flachen Zellen (nach max. 12 h), welches sich nach 48 h in ein pseudostratifiziertes Epithel verwandelte. Nach sieben Tagen ist das Epithel auf der gesamten Oberfläche der B-MOC ähnlich und besteht aus sekretorischen, zilierten und basalen Zellen. An Tag 14 waren $24,4 \pm 5,3$ % der Epithelzellen ziliert, $15,5 \pm 6,5$ % sekretorisch und der Rest bestand aus Basal- oder Zwischenzellen. Nach drei Wochen begann sich das Epithel abzuflachen und nach 54 Tage wurden die Kulturen mit einem flachen Epithel bedeckt, bestehend aus Zellen, die nur vereinzelt Zilien oder sekretorische Granula ausweisen. An allen untersuchten Zeitpunkten wurden interzelluläre Verbindungen an der apikalen Membran der Epithelzellen nachgewiesen, bestehend aus *tight* und *adhering junctions*. Zu Beginn der Kulturperiode konnten verschiedene Zelltypen im Bindegewebsstroma der MOC. Hauptsächlich wurden Fibroblasten, Endothelzellen und inflammatorische Zellen nachgewiesen. Nach einer Woche in Kultur waren Zellen im Stroma sehr selten und bestanden hauptsächlich aus Fibroblasten. Die Zellproliferation von epithelialen Zellen ließ sich bis zum Tag 54 nachweisen. Zusammenfassend weißt das gebildete Epithel viele Ähnlichkeiten mit einem respiratorischen Epithel auf und in dem *in-vitro*-Modell konnten Prozesse wie Zellproliferation, -differenzierung und -migration gezeigt werden (Bals et al., 1998). Dass in der vorliegenden Arbeit eher ein Plattenepithel beobachtet wird anstatt eines respiratorischen Epithels, liegt womöglich an der Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien. In zuvor beschriebener Studie kommt das *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) in Kombination mit einem Serum (*fetal bovine serum*, FBS) zum Einsatz, während für die eigenen Arbeiten das AECG-Medium ohne FBS-Zusatz verwendet wird. Das AECG-Medium ist ein für primäre Explant-Zellkulturen der humanen Lunge spezialisiertes Medium und diskriminiert u.a. das Wachstum von in Zellkulturen unerwünschter Fibroblasten. Das DMEM in Kombination mit FBS ist ein universelles Medium für viele verschiedene Zelltypen und damit eventuell das geeignetere Medium (Schmitz, 2009). Eine zusätzliche Rolle könnten die Kulturbedingungen hinsichtlich submerser und *air-liquid-interface* (ALI) - Kultur spielen. In den eigenen Arbeiten wurden die MOC ALI kultiviert,

während in der beschriebenen Studie etwas höhere Mengen an Medium verwendet wurden und von einer submersen Kultivierung auszugehen ist (Bals et al., 1998).

Für zukünftige Experimente mit B-/ L-MOC ist eine Überschreitung der Kultivierung über vier Wochen aus den in dieser Arbeit dargelegten Gründen nicht zu empfehlen. Dies stellt jedoch bereits eine deutliche Erweiterung der Kultivierungszeit von Zellkulturen dar und lässt die toxikologische Bewertung von Substanzen nach längerer und wiederholter Exposition zu. Es ist zudem ratsam weitere Untersuchungen, z.B. zu Expressionsmustern toxikologisch relevanter Proteine, durchzuführen, um das Kulturmodell der Miniorgankulturen abschließend zu charakterisieren.

6 Zusammenfassung

Technisch hergestellte Nanomaterialien (NM), wie Bariumsulfat-Nanopartikeln (BaSO₄-NP), finden eine breite und zunehmende Anwendung in verschiedenen Bereichen von Industrie, Kosmetik und Medizin. NM gelangen während ihres Lebenszyklus auch in die Umwelt und verbleiben dort. Zudem können Menschen in direkten Kontakt mit NM über verbrauchernahe und medizinische Produkte kommen. Dabei ist die orale, dermale und inhalative Aufnahme der NM denkbar. Der inhalativen Aufnahme wird in der aktuellen Forschung jedoch die größte Bedeutung beigemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde die toxikologische Wirkung von BaSO₄-NP auf verschiedene Zellkulturmodelle der humanen Lunge, wie die Zelllinie BEAS-2B, die primären Zellkulturen des Bronchus (NHBEZ) und der peripheren Lunge (PLZ) und Miniorgankulturen des Bronchus und der peripheren Lunge (B-/ L-MOC) untersucht. Nach wie vor fehlt es an gut charakterisierten und prädiktiven *in-vitro*-Alternativen zu Tierversuchen. Aufgrund dessen fand zudem eine Charakterisierung und Prüfung des *in-vitro*-Modells der Miniorgankulturen auf seine Eignung als Langzeitkulturmodell statt. BaSO₄-NP (Primärpartikel 40 – 60 nm, Partikelgröße in Suspension ~ 100 nm) werden in die untersuchten Zelltypen bzw. Miniorgankulturen aufgenommen und zeigen in den verschiedenen Zellkulturmodellen keine bzw. eine moderate Toxizität. Die B-/ L-MOC zeigen sich bei den metabolischen Vitalitätstests (Resazurin-Test und MTT-Test) nach Inkubation mit BaSO₄-NP am unempfindlichsten und bei den primären Zellkulturen tritt eine maximale Abnahme der Vitalität auf 54 % nach 72 h Inkubation mit der höchsten Konzentration (0,526 mg/cm²) auf. Die BaSO₄-NP zweier verschiedener Hersteller (Fa. Solvay und Fa. Huntsman) zeigen keine unterschiedlichen Effekte auf die Vitalität der primären Zellkulturen. Eine leichte Induktion von ROS kann für die höheren Konzentrationen in den primären Zellkulturen mit Hilfe des DCF-Tests gezeigt werden, jedoch nicht in der Zelllinie BEAS-2B. In keiner der verwendeten Zellkulturen kann mittels des H2AX-Tests ein genotoxisches Potential durch BaSO₄-NP nachgewiesen werden. Eine dosisabhängige Induktion von IL-8 auf das bis zu 2,5-fache zeigen die primären Zellkulturen mit Hilfe der *Real-time*-PCR. Insgesamt kann beobachtet werden, dass BaSO₄-NP moderate Auswirkungen auf die verschiedenen Zellkulturmodelle besitzt, die jedoch unterschiedlich empfindlich sind. Die MOC zeigen über die drei Monate eine stabile metabolische Aktivität. In Zusammenhang mit den immunhistochemischen Färbungen, wie die Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE), die Färbung des Zytokeratins 7 (CK7) und 8/18 (CK8/18), Desmins, *smooth muscle actin* (SMA), Vimentins, E-Cadherins sowie der Mucine MUC1 und MUC5AC, ist jedoch eine deutliche zelluläre Veränderung nach etwa vier Wochen zu beobachten, sodass eine weitere Verwendung der MOC darüber hinaus nicht zu empfehlen ist. Zudem kann es ratsam sein, weitere Untersuchungen, z.B. zu Expressionsmustern toxikologisch relevanter Proteine, durchzuführen.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Batran SE, Astner ST, Supthut M, Gamarra F, Brueckner K, Welsch U, Knuechel R, Huber RM (1999) Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:200–208
- Alfaro-Moreno E, Nawrot TS, Vanaudenaerde BM, Hoylaerts MF, Vanoirbeek JA, Nemery B, Hoet PHM (2008) Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10. *Eur Respir J* 32:1184–1194
- Almutary A, Sanderson BJS (2016) The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. *Int J Toxicol* 35:454–462
- Amrhein V, Greenland S, McShane B (2019) Scientists rise up against statistical significance. *Nature* 567:305–307
- Aninwene GE, Stout D, Yang Z, Webster TJ (2013) Nano-BaSO₄: a novel antimicrobial additive to pellethane. *Int J Nanomedicine* 8:1197–1205
- Bals R, Gamarra F, Kaps A, Grundler S, Huber RM, Welsch U (1998) Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. *Cell Tissue Res* 293:573–577
- BéruBé K, Aufderheide M, Breheny D, Clothier R, Combes R, Duffin R, Forbes B, Gaça M, Gray A, Hall I, Kelly M, Lethem M et al (2009) In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Altern Lab Anim* 37:89–141
- Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D et al (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* 3:11
- Buehrlen M, Harréus UA, Gamarra F, Hagen R, Kleinsasser NH (2007) Cumulative genotoxic and apoptotic effects of xenobiotics in a mini organ culture model of human nasal mucosa as detected by the alkaline single cell microgel electrophoresis assay and the annexin V-affinity assay. *Toxicol Lett* 169:152–161
- Bustin, S. A. (Hrsg) (2004) A - Z of quantitative PCR. Internat. Univ. Line: La Jolla, Calif, pp. 189-191.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169–193
- Buzea C, Pacheco II, Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2:MR17-71
- Corbett Research (Hrsg) (2003) Rotor-Gene 2000 Real-Time Amplification Operator's Manual Version 4.6. Mortlake, NSW, Australien

- 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 CeO₂ or BaSO₄ nanomaterials. *MUTAGE* 32:13–22
- DangLi R, HeKong W, JiQin L, MingHua Z, WenCheng Z (2012) ROS-induced ZNF580 expression: a key role for H₂O₂/NF-κB signaling pathway in vascular endothelial inflammation. *Mol Cell Biochem* 359:183–191
- DaNa (2020a): Informationen zu Nanomaterialien und Nano-Sicherheitsforschung. Nanopartikel und die Lunge. Online verfügbar unter <https://www.nanopartikel.info/nanoinfo/koerperbarrieren/2390-nanopartikel-und-die-lunge#literatur>, Abrufdatum 30.11.2020.
- DaNa (2020b): Informationen zu Nanomaterialien und Nano-Sicherheitsforschung. Bariumsulfat. Online verfügbar unter <https://www.nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/bariumsulfat/materialinfo-bariumsulfat>, Abrufdatum 30.11.2020.
- 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. *Archives of Toxicology* 91:163–177
- Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA (2010) Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol* 7:5
- Donaldson K, Seaton A (2012) A short history of the toxicology of inhaled particles. *Part Fibre Toxicol* 9:13
- Dorn M (2015) Nachweis und Quantifizierung von Nanopartikeln. Dissertation. Universität Leipzig
- 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* 88:614–629
- Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Anderson HR, Bhutta ZA, Biryukov S, Brauer M, Burnett R, Cercy K, Charlson FJ, Cohen AJ, Dandona L et al (2016) Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388:1659–1724
- 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
- Gebel T (2012) Small difference in carcinogenic potency between GBP nanomaterials and GBP micromaterials. *Archives of Toxicology* 86:995–1007

- Gebel T, Foth H, Damm G, Freyberger A, Kramer P-J, Lilienblum W, Röhl C, Schupp T, Weiss C, Wollin K-M, Hengstler JG (2014) Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment. *Archives of Toxicology* 88:2191–2211
- Gehr P, Blank F, Rothen-Rutishauser BM (2006) Fate of inhaled particles after interaction with the lung surface. *Paediatr Respir Rev* 7 Suppl 1:S73-5
- Geranio L, Heuberger M, Nowack B (2009) The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environ Sci Technol* 43:8113–8118
- Gerlier D, Thomasset N (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods* 94:57–63
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995–1001
- Haase A, Dommershausen N, Schulz M, Landsiedel R, Reichardt P, Krause B-C, Tentschert J, Luch A (2017) Genotoxicity testing of different surface-functionalized SiO₂, ZrO₂ and silver nanomaterials in 3D human bronchial models. *Archives of Toxicology* 91:3991–4007
- Hackenberg S, Scherzed A, Zapp A, Radeloff K, Ginzkey C, Gehrke T, Ickrath P, Kleinsasser N (2017) Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in nasal mucosa cells are antagonized by titanium dioxide nanoparticles. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 816-817:32–37
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press: Oxford, United Kingdom, pp. 317
- Hartwig A, MAK-Kommission (2017) Bariumsulfat (alveolengängige Fraktion) [MAK Value Documentation in German language, 2017] The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 66–73
- Heusinkveld HJ, Wahle T, Campbell A, Westerink RHS, Tran L, Johnston H, Stone V, Cassee FR, Schins RPF (2016) Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology* 56:94–106
- Hext PM, Tomenson JA, Thompson P (2005) Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology. *Ann Occup Hyg* 49:461–472
- Hougaard KS, Campagnolo L, Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Valentino S, Park MVDZ, Jong WH de, Wolterink G, Piersma AH, Ross BL, Hutchison GR et al (2015) A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reprod Toxicol* 56:118–140
- Huang C-C, Aronstam RS, Chen D-R, Huang Y-W (2010a) Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24:45–55

- Huang Y-W, Wu C-H, Aronstam RS (2010b) Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. *Materials (Basel)* 3:4842–4859
- Hunt G, Lynch I, Cassee F, Handy RD, Fernandes TF, Berges M, Kuhlbusch TAJ, Dusinska M, Riediker M (2013) Towards a Consensus View on Understanding Nanomaterials Hazards and Managing Exposure: Knowledge Gaps and Recommendations. *Materials (Basel)* 6:1090–1117
- Ju-Nam Y, Lead JR (2008) Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ* 400:396–414
- Kerwien S (2010) Adaptive Antwort von Lungenzellen auf Stressoren. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Khanna P, Ong C, Bay BH, Baeg GH (2015) Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials (Basel)* 5:1163–1180
- Klein SG, Serchi T, Hoffmann L, Blömeke B, Gutleb AC (2013) An improved 3D tetra-culture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Part Fibre Toxicol* 10:31
- Kleinsasser NH, Harréus UA, Gamarra F, Driemel O, Hagen R, Buehrlen M (2009) Cytochrome P4502A6 stability in a mini organ culture model of human nasal mucosa for genotoxicology studies as detected by flow cytometry. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266:385–389
- 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
- Konduru NV, Molina RM, Swami A, Damiani F, Pyrgiotakis G, Lin P, Andreozzi P, Donaghey TC, Demokritou P, Krol S, Kreyling W, Brain JD (2017) Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells. *Part Fibre Toxicol* 14:351
- 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
- Krug HF, Wick P (2011) Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:1260–1278
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95–125
- Landsiedel R, Ma-Hock L, Haussmann H-J, van Ravenzwaay B, Kayser M, Wiench K (2012) Inhalation studies for the safety assessment of nanomaterials: status quo and the way forward. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 4:399–413

- 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
- Lauenstein L, Switalla S, Prenzler F, Seehase S, Pfennig O, Förster C, Fieguth H, Braun A, Sewald K (2014) Assessment of immunotoxicity induced by chemicals in human precision-cut lung slices (PCLS). *Toxicol In Vitro* 28:588–599
- Lehmann T (2001) Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology* 167:59–72
- Li JJ'e, Muralikrishnan S, Ng C-T, Yung L-YL, Bay B-H (2010) Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med (Maywood)* 235:1025–1033
- Liu N, Tang M (2020) Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles. *J Appl Toxicol* 40:16–36
- Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. Thieme: Stuttgart, S. 106, 370
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y (2013) Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int* 2013:942916
- 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
- Møller P, Danielsen PH, Jantzen K, Roursgaard M, Loft S (2013) Oxidatively damaged DNA in animals exposed to particles. *Crit Rev Toxicol* 43:96–118
- 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* 64:609–615
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24:954–8, 960, 962
- Mousseau F, Berret J-F (2018) The role of surface charge in the interaction of nanoparticles with model pulmonary surfactants. *Soft Matter* 14:5764–5774
- Nanoscience and nanotechnologies (2004) Opportunities and uncertainties. The Royal Society & The Royal Academy of Engineering: London, pp. 1-116
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311:622–627
- Oberdörster G (1995) Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul Toxicol Pharmacol* 21:123–135

- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267:5421–5426
- Oesch F, Landsiedel R (2012) Genotoxicity investigations on nanomaterials. *Archives of Toxicology* 86:985–994
- Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnen-Dechent W (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3:1941–1949
- Park E-J, Yi J, Chung K-H, Ryu D-Y, Choi J, Park K (2008) Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 180:222–229
- 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
- Petrova A, Hintz W, Tomas J (2008) Untersuchungen zur Herstellung von nanoskaligem Bariumsulfat. *Chemie Ingenieur Technik* 80:359–363
- Potočnik J, Europäische Kommission (2011) Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien Text von Bedeutung für den EWR. *Amtsblatt der EU* 2011/696/EU, L 275/38:1–3
- Reddel RR, Yang K, Rhim JS, Brash D, Robert ST, Lechner John F., Gerwin, Brenda I., Harris, Curtis C., Amstad Paul (1989) Immortalized human bronchial epithelial mesothelial cell lines.
- Ricker A, Liu-Snyder P, Webster TJ (20) The influence of nano MgO and BaSO₄ particle size additives on properties of PMMA bone cement. *Int J Nanomedicine* 3:125–132
- Riediker M, Zink D, Kreyling W, Oberdörster G, Elder A, Graham U, Lynch I, Duschl A, Ichihara G, Ichihara S, Kobayashi T, Hisanaga N et al (2019) Particle toxicology and health - where are we? *Part Fibre Toxicol* 16:19
- Runge DM, Stock TW, Lehmann T, Taege C, Bernauer U, Beer Stolz D, Hofmann S, Foth H (2001) Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. *Archives of Toxicology* 75:335–345
- Sauer UG, Vogel S, Aumann A, Hess A, Kolle SN, Ma-Hock L, Wohlleben W, Dammann M, Strauss V, Treumann S, Gröters S, Wiench K et al (2014) Applicability of rat precision-cut lung slices in evaluating nanomaterial cytotoxicity, apoptosis, oxidative stress, and inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 276:1–20
- Schlesinger RB, Kunzli N, Hidy GM, Gotschi T, Jerrett M (2006) The health relevance of ambient particulate matter characteristics: coherence of toxicological and epidemiological inferences. *Inhal Toxicol* 18:95–125

- Schmid M, Zimmermann S, Krug HF, Sures B (2007) Influence of platinum, palladium and rhodium as compared with cadmium, nickel and chromium on cell viability and oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Environ Int* 33:385–390
- Schmitz S (2009) *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg, S. 78, 108
- Schulze C, Schaefer UF, Ruge CA, Wohlleben W, Lehr C-M (2011) Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A. *Eur J Pharm Biopharm* 77:376–383
- Schumann B (2012) *Oxidativer Stress durch Tabakrauchkondensat in verschiedenen Zellkulturmodellen*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 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
- Schwotzer D, Niehof M, Schaudien D, Kock H, Hansen T, Dasenbrock C, Creutzenberg O (2018) Cerium oxide and barium sulfate nanoparticle inhalation affects gene expression in alveolar epithelial cells type II. *J Nanobiotechnology* 16:16
- Shandilya N, Le Bihan O, Bressot C, Morgeneyer M (2015) Emission of titanium dioxide nanoparticles from building materials to the environment by wear and weather. *Environ Sci Technol* 49:2163–2170
- Singh R, Pantarotto D, McCarthy D, Chaloin O, Hoebeke J, Partidos CD, Briand J-P, Prato M, Bianco A, Kostarelos K (2005) Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. *J Am Chem Soc* 127:4388–4396
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76–85
- 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
- Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP, Dai W, Darzynkiewicz Z (2007) Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A* 71:648–661
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005-28
- Thomas S (2020) *Toxikologische Bewertung von Bariumsulfat-Nanopartikeln und Filterstäuben*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- UBA (2016): Nanomaterialien in der Umwelt - Aktueller Stand der Wissenschaft und Regulierungen zur Chemikaliensicherheit. Empfehlungen des Umweltbundesamtes. Hg. v. Umweltbundesamt. Online verfügbar unter <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/>, S. 6-10, Abrufdatum 30.11.2020.
- Wallach D, Kang T-B, Kovalenko A (2014) Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 14:51–59
- Walser T, Limbach LK, Brogioli R, Erismann E, Flamigni L, Hattendorf B, Juchli M, Krumeich F, Ludwig C, Prikopsky K, Rossier M, Saner D et al (2012) Persistence of engineered nanoparticles in a municipal solid-waste incineration plant. *Nat Nanotechnol* 7:520–524
- Wang Y, Westerhoff P, Hristovski KD (2012) Fate and biological effects of silver, titanium dioxide, and C60 (fullerene) nanomaterials during simulated wastewater treatment processes. *J Hazard Mater* 201-202:16–22
- Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA (2019) Moving to a World Beyond “ $p < 0.05$ ”. *The American Statistician* 73:1–19
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22:474-6, 478-81

8 Thesen

- (1) Bariumsulfat-Nanopartikel ($\text{BaSO}_4\text{-NP}$) werden in die untersuchten Zellkulturen bzw. Miniorgankulturen der humanen Lunge aufgenommen und zeigen in den unterschiedlich sensitiven Zellkulturmodellen keine bzw. eine moderate Toxizität.
- (2) In primären humanen Lungenzellen kann eine leichte Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ nachgewiesen werden.
- (3) $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ zeigen kein genotoxisches Potential in primären humanen Lungenzellen.
- (4) Das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-8 (IL-8) wird in primären humanen Lungenzellen durch $\text{BaSO}_4\text{-NP}$ dosisabhängig induziert.
- (5) Die metabolische Aktivität der Miniorgankulturen (MOC) der humanen Lunge nimmt über einen Untersuchungszeitraum von drei Monaten nicht ab.
- (6) Immunhistochemische Charakterisierungen der MOC zeigen eine deutliche zelluläre Veränderung nach etwa vier Wochen.

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.

Berit Schumann

Halle (Saale), 15.02.2021

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

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

Berit Schumann

Halle (Saale), 15.02.2021

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidi Foth, die mir die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Umwelttoxikologie gab und mich sowohl bei der Erstellung dieser Arbeit, aber auch im Sinne der wissenschaftlichen Weiterbildung, immer unterstützt und gefördert hat.

Herr Dr. Felix Glahn stand mir stets mit wissenschaftlichem und technischem Rat zur Seite. Herzlichen Dank dafür! Auch bei allen weiteren aktuellen und ehemaligen Kolleg:innen des Instituts für Umwelttoxikologie Sarah Thomas, Jan Wiese, Tina Röder, Sabine Herrmann, Oliver Krings und Diana Schneider möchte ich mich herzlich für die Unterstützung im Labor und in allen anderen Lebenslagen bedanken.

Herrn PD Dr. Marcus Krüger und Kolleg:innen (Klinik für Thoraxchirurgie des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dörlau); Frau Prof. Dr. Claudia Wickenhauser, Herrn Peter Kaatzsch und Kolleg:innen (Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), Herrn Dr. Martin Herzberg (Institut für Biologie/Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und allen weiteren Projektpartnern möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Laufe dieser Promotion danken.

Meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunden danke ich für die fortwährende moralische Unterstützung, Motivation und Ablenkung in den richtigen Momenten.