

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin

**Direkte und indirekte Genotoxizität alveolengängiger Bentonitpartikel  
in Abhängigkeit ihrer Varietäten *in vitro***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Dipl.-Umweltwiss. Dipl.-Ing. Stefan Geh  
aus Witten  
2005

Dekan: Prof. Dr. K.H. Jöckel

1. Gutachter: Prof. Dr. Dipl.-Chem. A.W. Rettenmeier

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. J. Thomale

3. Gutachter: Prof. Dr. G. Alink, Wageningen / NL

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 2006

---

## Publikationen, die Teile dieser Arbeit enthalten:

### 1.) Originalarbeiten in begutachteten Zeitschriften

Geh, S., Yücel, R., Duffin, R., Albrecht, C., Borm, P.J., Armbruster, L., Raulf-Heimsoth, M., Brüning, T., Hoffmann, E., Rettenmeier, A.W., Dopp, E. (2006): Cellular uptake and cytotoxic potential of respirable bentonite particles with different quartz contents and chemical modifications in human lung fibroblasts. *Arch. Toxicol.* 80, 98-106.

Geh, S., Shi, T., Shokouhi, B., Schins, R.P., Armbruster, L., Rettenmeier, A.W., Dopp, E. (2006): Genotoxic potential of respirable bentonite particles with different quartz contents and chemical modifications in human lung fibroblasts. *Inhal. Toxicol.* 18, 405-412.

Geh, S., Bhattacharaya, K., Rebmann, V., Grosse-Wilde, H., Rettenmeier, A.W., Dopp, E.: Cytokine expression in human lung cells and macrophages after exposure to respirable bentonite particles *in vitro*. Manuscript in preparation

### 2.) Buchbeiträge

Geh, S., Höhr, D., Shi, T., Armbruster, L., Borm, P.J.A., Rettenmeier, A.W., Dopp, E. (2004): Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial von alveolengängigen Bentonitpartikeln mit unterschiedlichen Quarzgehalten und Oberflächenbehandlungen. In: Baumgartner, E., Storck, J. (Hrsg.): Arbeitsmedizinische Aspekte der Metallbearbeitung – Gesundheitsschutz bei Einsatz neuer Technologien. Dokumentationsband der DGAUM; S. 448-450.

### 3.) Übersichtsartikel

Dopp, E., Geh, S., Bhattacharaya, K.: Genotoxic potential of respiratory particles in dependence upon size and surface. Review. Manuscript in preparation.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1	<b>Bentonitstaub als Beispiel luftgetragener Staubpartikel.....</b>	<b>7</b>
1.1.1	Mineralogische Charakteristika .....	7
1.1.2	Verwendungen und Möglichkeiten der Exposition.....	9
1.2	<b>Gesundheitliche Auswirkungen alveolengängiger Partikel, insbesondere von Bentonitstaub .....</b>	<b>11</b>
1.3	<b>Bekannte In-vivo- und In-vitro-Wirkungen von Bentoniten .....</b>	<b>13</b>
1.3.1	<i>In vivo</i> .....	13
1.3.2	<i>In vitro</i> .....	13
1.4	<b>Wirkungsweise von Partikeln auf zellulärer und molekularer Ebene.....</b>	<b>14</b>
1.4.1	Freisetzung von Entzündungsmediatoren .....	16
1.4.2	Oxidanzien als Mediatoren der Partikeleffekte .....	18
1.4.3	Apoptoseinduktion.....	21
1.5	<b>Zielstellung .....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
2.1	<b>Zellkultur .....</b>	<b>24</b>
2.1.1	Zelllinien .....	24
2.1.2	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen .....	26
2.2	<b>Bentonitproben .....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Korngrößenseparation .....	28
2.2.2	Applikation der Bentonitpartikel .....	28
2.3	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>29</b>
2.3.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM) und energiedispersive Röntgenanalyse (EDX) .....	29
2.3.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	30
2.3.3	Fluoreszenzmikroskopie .....	32
2.4	<b>Ermittlung der Zytotoxizität .....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Zellzahlbestimmung mit dem Coulter-Counter .....	33
2.4.2	Zellzahlbestimmung mit dem Hämozytometer.....	34
2.4.3	AlamarBlue-Test .....	34
2.4.4	Hämolyse-Assay .....	36
2.5	<b>Ermittlung der direkten Genotoxizität.....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Mikroerntest.....	37
2.5.2	Kinetochnachweis .....	38
2.6	<b>Ermittlung der indirekten Genotoxizität .....</b>	<b>40</b>

---

2.6.1	ROS-Nachweis.....	40
2.6.1.1	Azelluläre Messung von OH-Radikalen durch Elektronenspinresonanz .....	40
2.6.1.2	Einsatz von Eisenkomplexbildnern .....	41
2.6.2	Zytokinnachweis.....	42
2.6.2.1	Pyrogentest.....	42
<b>2.7</b>	<b>Detektierung der Apoptose.....</b>	<b>43</b>
2.7.1	Molekularbiologische Analysen.....	43
2.7.1.1	DNA-Isolierung.....	43
2.7.1.2	Gelelektrophorese.....	45
2.7.2	Durchflusszytometrische Analysen (FACS).....	45
<b>2.8</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Physikochemische Charakterisierung der Stäube .....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Größenverteilung der Partikel .....	49
3.1.2	Elementarzusammensetzung .....	50
3.1.3	Mineralische Zusammensetzung .....	52
<b>3.2</b>	<b>Nachweis pyrogen wirksamer Inhaltstoffe .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3</b>	<b>Zelluläre Aufnahme von Partikeln in IMR90-Zellen .....</b>	<b>54</b>
3.3.1	Lokalisation der Partikel.....	54
3.3.2	Partikelselektion .....	55
3.3.3	Einfluss der Partikelmodifikation .....	56
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zur Zytotoxizität.....</b>	<b>56</b>
3.4.1	Zytotoxizität in IMR90-Zellen .....	56
3.4.2	Zytotoxizitätsbestimmung anhand der Atmungsaktivität in IMR90-Zellen .....	57
3.4.3	Hämolytische Aktivität.....	58
<b>3.5</b>	<b>Untersuchungen zur direkten Genotoxizität.....</b>	<b>60</b>
3.5.1	Mikrokerninduktion in IMR90-Zellen .....	60
3.5.1.1	Einfluss der chemischen Modifikation.....	60
3.5.1.2	Einfluss des Quarzgehaltes .....	61
3.5.2	Nachweis aneugener und klastogener Effekte .....	62
<b>3.6</b>	<b>Nachweis indirekter genotoxische Effekte.....</b>	<b>64</b>
3.6.1	Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS).....	64
3.6.1.1	Azellulärer Nachweis von OH-Radikalen.....	64
3.6.1.2	Wirkung von Eisenkomplexbildnern.....	66
3.6.2	Bestimmung von Entzündungsmarkern.....	67
<b>3.7</b>	<b>Apoptosenachweis .....</b>	<b>69</b>
3.7.1	Ermittlung der Apoptose durch DNA-Isolierung.....	69

---

3.7.2	Messung der Apoptose durch Fluoreszenzmarkierung .....	70
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
4.1	<b>Der Einfluss der chemischen Zusammensetzung der Bentonitpartikel auf die zyto- und genotoxischen Effekte .....</b>	<b>73</b>
4.1.1	Zytotoxizität .....	73
4.1.2	Genotoxizität und die Rolle der ROS .....	75
4.2	<b>In-vitro-Abschätzung einer inflammatorischen Wirkung von Bentonitpartikeln.....</b>	<b>78</b>
4.3	<b>Die Bedeutung der Apoptose im Schädigungsverlauf partikelexponierter Lungenzellen .....</b>	<b>79</b>
4.4	<b>Beurteilung des Schädigungspotenzials alveolengängiger Bentonite im Hinblick auf bekannte In-vivo- und epidemiologische Daten .....</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>100</b>

# 1 Einleitung

Das Bewusstsein über Gefahren vieler luftgetragener Schadstoffe für die menschliche Gesundheit ist in den letzten Jahren gestiegen. Trotz der Verbesserung der allgemeinen lufthygienischen Verhältnisse [Umweltbundesamt, 2003] bleibt es weiterhin eine Aufgabe der präventiven Medizin und der Umweltwissenschaften, Gefährdungspotenziale partikelförmiger inhalierbarer Substanzen, die sowohl als Umwelttoxene oder am Arbeitsplatz auftreten können, zu erkennen und abzuwenden. Feine (Partikelgröße  $<7 \mu\text{m}$ ) und ultrafeine Partikel (Partikelgröße  $<0,1 \mu\text{m}$ ) schwerlöslicher nicht inerte Stäube nehmen dabei eine zentrale Stellung ein.

Seit der Einstufung von Quarz als Humankarzinogen durch mehrere internationale und nationale Gremien [IARC, 1997; DFG, 1999] hat sich der Blick verstärkt auch auf alveolengängige quarzhaltige Stäube gerichtet. Zu diesen zählen u. a. Tonerdemineralien wie Bentonite, die kristalline Kieselsäure in unterschiedlichen Anteilen enthalten und durch unterschiedliche chemische Verfahren modifiziert werden. Aufgrund ihrer besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften kommen sie in sehr vielfältiger Weise zur Anwendung (z. B. in der Bauindustrie oder in der Landwirtschaft).

## 1.1 Bentonitstaub als Beispiel luftgetragener Staubpartikel

### 1.1.1 Mineralogische Charakteristika

Bentonit ist ein Tongestein, das durch die Verwitterung vulkanischer Asche und Tuffite entstanden ist. Der Name leitet sich vom ersten Fund um 1890 in der Nähe von Fort Benton, Wyoming (USA) ab. Hauptbestandteil und maßgebend für die petrophysikalischen Eigenschaften ist das Tonmineral Montmorillonit, benannt nach einer Lagerstätte bei Montmorillon in Südfrankreich. Montmorillonit gehört wegen seines dreischichtigen Aufbaus zur Gruppe der Smektite (Dreischichttonminerale), innerhalb derer es der häufigste Vertreter ist.

#### Mineralische Zusammensetzung

Bei Bentonitstäuben handelt es sich im Vergleich zu vielen anderen Aerosolen nicht um eine stofflich homogene Matrix aus gleichförmigen Partikeln oder Fasern, sondern um ein heterogenes zusammengesetztes mineralisches Staubgemisch. Neben dem Hauptbestandteil Montmorillonit enthält Bentonit eine Reihe weiterer Begleitminerale. Die genaue mineralische Zusammensetzung variiert je nach Lagerstätte. Im Allgemeinen ergibt sich die Zusammensetzung in etwa wie folgt [nach Pohl, 1992]:

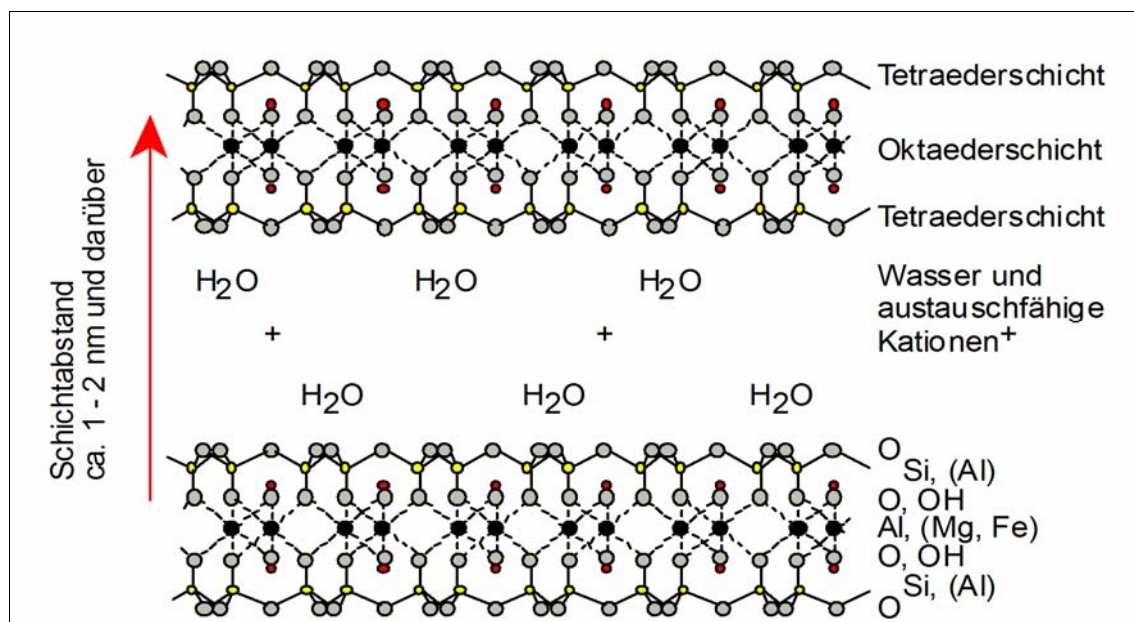
- Montmorillonit 60 - 90 %
- kristalline Kieselsäure (Quarz, Cristobalit, Tridymit) bis zu 20 %
- Kaolin
- Glimmer
- Kalzit
- Dolomit
- Feldspat

### Chemische Zusammensetzung

Aufgrund der Entstehung aus verwittertem magmatischen Gestein ist der Hauptbestandteil des Bentonits, Montmorillonit, ein Aluminiumhydroxysilikat und damit ein Verwitterungsprodukt der Kieselsäure bzw. deren Salze. Wichtige elementare Bestandteile sind  $\text{SiO}_2$  (>50 %),  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (>20 %),  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , CaO und MgO.

### Kristalline Struktur des Hauptbestandteils Montmorillonit

Der dreischichtige Aufbau des Montmorillonitkristalls wird durch die Anordnung einer oktaedrischen Aluminiumoxidschicht zwischen zwei tetraedrischen Siliziumdioxidschichten bestimmt (Abb. 1). Diese Schichtstruktur bildet das Grundgerüst des Aluminiumhydroxysilikats. Aus der mehrfachen Schichtung solcher Aluminiumhydroxysilikat-Elementarlamellen ergibt sich der Montmorillonitkristall mit typischer Blätterstruktur. Zwischen den Lamellen befinden sich austauschfähige Kationen (z. B. Kalzium).



**Abb. 1:** Montmorillonit-Schichtgitter in idealisierter Darstellung [Quelle: Römpp Chemielexikon, 1996].

In Anwesenheit von Wasser oder anderen Flüssigkeiten quellen die Kristalle auf, indem sich z. B.  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle zwischen die einzelnen Schichtpakete reversibel einlagern. Der Schichtabstand kann dabei um ein Mehrfaches anwachsen und die dazwi-



schen liegenden Bindekräfte werden herabgesetzt, so dass der Kristall kein starres Gefüge ist (Abb. 1).

### Natürliche Vorkommen

Bentonitlagerstätten sind mittlerweile weltweit bekannt. In Deutschland befinden sich bedeutsame Abbaugelände in Bayern (Moosburg, Landshut, Tannhausen), im Westerwald und in Schleswig-Holstein.

### Physikalisch-chemische Eigenschaften

Dreischichttonminerale wie Montmorillonit besitzen aufgrund ihrer kristallinen Struktur sehr vielfältig technisch nutzbare Eigenschaften. Sie zeichnen sich vor allem durch eine große Oberfläche, die Einlagerung austauschfähiger Kationen und durch die interkristalline Quellfähigkeit aus. Dieses hat eine hohe Adsorptionsfähigkeit, Ionenaustauschkapazität, Thixotropie und Quellbarkeit zur Folge.

### Chemische Modifikationen industriell verwendeter Bentonite

Um die genannten Eigenschaften gezielt zu modulieren, werden Bentonite durch verschiedene chemische Verfahren behandelt. Die drei Hauptmodifikationen stellen die alkalische, die saure und die organische Aktivierung dar.

Bei der alkalischen Aktivierung werden Kalziumionen der Zwischenschichten durch Natriumionen ausgetauscht, um Plastizität, Viskosität und Thixotropie zu erhöhen. Die saure Aktivierung bewirkt einen Austausch von Alkaliionen durch Wasserstoffionen. Zusätzlich werden hierbei Aluminium-, Eisen- und Magnesiumionen aus dem Kristallgitter gelöst. Die organische Aktivierung beruht im Wesentlichen auf einer Belegung der Schichtsilikate mit polaren langkettigen organischen Molekülen, die zu einer Hydrophobierung der Bentonitpartikel beitragen und dadurch organophile Eigenschaften erzeugen.

## **1.1.2 Verwendungen und Möglichkeiten der Exposition**

Durch die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften ergeben sich für Bentonite sehr vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in den unterschiedlichsten Industriezweigen und Arbeitsbereichen. Die jeweiligen Anwendungen werden von der chemischen Modifizierung des Rohmaterials bestimmt. In Tab. 1 ist exemplarisch das Anwendungsspektrum häufig verwendeter Bentonite dargestellt.

Darüber hinaus dient Bentonit in der Medizin auch als Adsorbens bei akuten Vergiftungen [Dasta, 1978; Meredith und Vale, 1987]. Aus dem sehr vielfältigen Anwendungsspektrum ergibt sich eine relativ hohe Verbreitung von Bentoniten in vielen Ar-

beitsbereichen und Produkten des täglichen Lebens als Pulver oder in suspendierter Form. Die Weltproduktion von Bentonit lag 1993 bei ca. 8 Mio. t. Davon wurden 575.000 t allein in Deutschland gewonnen [Lorenz und Gwosdz, 1997], das damit nach den USA und Russland das drittgrößte Produzentenland ist. Bentonit ist somit ein bedeutsamer Roh- und Arbeitsstoff. Zu Einwirkungen von Bentonitstäuben auf die menschliche Lunge kann es nicht nur im Herstellungs- und Verarbeitungsprozess kommen, sondern auch beim Endverbraucher.

**Tab. 1:** Verwendungen von Bentoniten [Quellen: Lorenz und Gwosdz, 1997 und Info der Süd-Chemie AG].

Industriezweig	sauer aktiviert	unbehandelt	alkalisch aktiviert	organisch aktiviert
Nahrungsmittel	Raffination, Entfärbung, Reinigung und Stabilisierung pflanzlicher und tierischer Öle			
Getränke, Zucker, Brauereien	Enttrübung von Saft, Most, Wein; Reinigung von Zuckersirup; Bierstabilisierung			
Papier	Oberflächenveredelung, Retentionsmittel, Altpapieraufbereitung			
Pharmazie und Kosmetik		Rohstoff für Heilerden, Medikamente; Grundstoff für Salben, Kosmetika		
Reinigungsmittel		Seifenherstellung, Waschmittelzusatz, Polier- und Pflegemittel		
Landwirtschaft, Tierhaltung		Bodenverbesserer, Kompostierung, Futterpelletierung, Katzenstreu		
Chemie	Katalysatoren, Träger für Pestizide, Füllstoff, Trockenmittel, Adsorptionsmittel, Flussmittel			Verdickungs-, Stabilisierungsmittel für Farben, Lacke, Kitte, Klebstoffe
Umweltschutz, Baubereich	Ölbindemittel, Regenerierung organischer Reinigungsmittel, Feuerlöschpulver, Flockungsmittel zur Abwasserreinigung, Adsorptionsmittel, Abluftreinigung, Dichtungsmittel (Deponien, Untergrundabdichtungen), Bohrspülungen			
Mineralöl	Raffination, Entfärbung, Reinigung von Mineralölen, -fetten, -wachsen, Katalysator			Schmierfettzusatz
Metallurgie		Erzpelletierung, Formsande		Binder für wasserfreie Formsande

## 1.2 Gesundheitliche Auswirkungen alveolengängiger Partikel, insbesondere von Bentonitstaub

### Generelle Wirkungen

Pathophysiologisch lassen sich die Wirkungen lungengängiger Stäube wie folgt einteilen [nach Griefahn, 1996]:

- toxisch (Entzündungsreaktionen z. B. chronische Bronchitis, Pneumonien)
- chemisch-irritativ (Schleimhautreizungen und Reflexbronchokonstriktion)
- allergisierend (z. B. exogen-allergische Alveolitis)
- fibrogen (z. B. Silikose)
- mutagen/kanzerogen (maligne Entartungen: Bronchialkarzinom)
- depotbildend (benigne Veränderung, ohne erkennbare Wirkung)

Die Gesundheitsgefährdung wird dabei von der Staubkonzentration, Korngröße, chemisch-mineralogischen Zusammensetzung und Expositionsdauer bestimmt. Hinzu kommen weitere individuelle Faktoren, die das Verhältnis von Deposition und Clearance bestimmen. Das sind z. B. Alter, Geschlecht, Atemzugvolumen und -geschwindigkeit, vorbestehende Erkrankungen, Nasen- bzw. Mundatmung und Rauchverhalten [Brockmann, 2000]. Die Nasenschleimhaut (Abscheidung grober, extrathorakaler Partikel der Größe 25 - 200 µm) und das Tracheobronchialsystem (Abtransport von Tracheobronchial-Staubpartikeln der Größe 7 - 25 µm) stellen wichtige physiologische Schutzmechanismen dar. Folglich steigt mit der Abnahme des Durchmessers der Partikel das Gefährdungspotential. Staubpartikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von unter 7 µm sind alveolengängig, d. h. sie dringen zu den Lungenalveolen vor und können dort zu Schäden am Lungenparenchym und an den Alveolar-makrophagen führen [DFG, 1997]. Definitionsgemäß spricht man hier auch von Feinstäuben.

Eine Übersicht und Bewertung epidemiologischer Studien zum Zusammenhang zwischen silikoseinduzierender Staubexposition und Lungenkrebs [IARC, 1997] zeigt eine enge Korrelation dieser beiden Faktoren. Umstritten ist allerdings das Lungenkrebsrisiko bei der Exposition gegenüber quarzhaltigen Mischstäuben, wie z. B. bei Steinkohlenstäuben. Ferner besteht nach wie vor Unklarheit darüber, ob das Bronchialkarzinom auch ohne Anzeichen einer vorhergehenden Silikose ausgelöst werden kann.

### Wirkungen von Bentoniten

Die ersten Beschreibungen von Lungenveränderungen durch Bentonite nach über 35-jähriger Staubexposition bei Arbeitern aus einem Bleicherdebetrieb stammen von Middleton aus dem Jahr 1940 [zitiert bei Bassermann, 1966]. Im weiteren Verlauf

wurden Pneumokoniosefälle von Arbeitern nach langjähriger Exposition gegenüber Bentonit oder Fuller's earth (Kalzium-Bentonit) mit dem Charakter einer leichten nicht progressiven retikulären Fibrose beschrieben [Campbell und Gloyne, 1942; Tønning, 1949; Gattner, 1955; Sakula, 1961, Bassermann, 1966, Phibbs et al., 1971; Gibbs und Pooley, 1994]. Allgemein kennzeichnend war vor allem eine verstreute Knötchenbildung im Lungengewebe. Subpleurale Noduli wurden in den meisten Fällen nicht beobachtet. Komplikationen mit Tuberkulose zeigten sich nur in den Beschreibungen von Phibbs et al. [1971], welche die Anzeichen einer Fibrose am ausgeprägtesten vorfanden. Die subjektiven Beschwerdebilder wurden bei Gattner und Bassermann als eher gering eingestuft. Bei Tønning finden sich erste Hinweise, die auf einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Fibrose und dem frei verfügbaren Quarzanteil hindeuten. Kennzeichnend war bei allen Beschreibungen, dass bei der Exposition gegenüber Bentonitstaub mit relativ geringem Quarzgehalt sich klinische Merkmale erst nach über 3 Jahrzehnten einstellten.

Relativ zahlreich traten in Italien während der 40er und 50er Jahre des letzten Jahrhunderts bentonitbedingte Lungenerkrankungen auf [Vigliani, 1954; Guardascione, 1955]. Unter den dort beschriebenen Pneumokoniosefällen befanden sich etwa  $\frac{1}{4}$  schwere Fibrosen, die z. T. mit Tumoren einhergingen und/oder einen tödlichen Ausgang nahmen. Schon nach weniger als drei Jahren Exposition zeigten sich bei einigen Betroffenen erste pathologische Befunde. Für die besondere Schwere der Krankheitsverläufe wurde neben den schlechten Arbeitsverhältnissen der ungewöhnlich hohe Quarzanteil der dort verarbeiteten Bentonite verantwortlich gemacht. Der Anteil der frei verfügbaren kristallinen Kieselsäure betrug bis zu 30 %.

Aus der Verwendung der Bentonite im pharmazeutischen Bereich als Adsorbens lässt sich keine oder nur eine geringe orale Toxizität ableiten. Erst nach der Aufnahme von großen Mengen Bentonit oder tonmineralhaltigem Material wurden Muskelschwäche und Hypokaliämie beobachtet [Severance et al., 1988]. Die Inkorporation großer Mengen von Tonmineralien, die meist im Zusammenhang mit psychischen Essstörungen steht (Geophagie), verursacht darüber hinaus auch Eisenmangel [Mengel et al., 1964]. Die klinischen Merkmale solcher Geophagien wurden bereits 1835 von Cragin als „Cachexia Africana“ beschrieben [zitiert bei Mengel et al., 1964].

## 1.3 Bekannte In-vivo- und In-vitro-Wirkungen von Bentoniten

### 1.3.1 *In vivo*

Im Lungengewebe und im Peritoneum von Ratten fanden sich nach intratrachealer Applikation von Kalzium-Bentonit (Quarzanteil 1 - 3 %) zahlreiche Granulome [Gärtner und Herzog, 1961]. Die Knötchen bestanden aus einer aufgelockerten Ansammlung von Makrophagen und wiesen keine Nekrosen oder Übergänge in zentrale Verschwie-lungen auf. Vor allem im Lungen- und Lymphknotengewebe wurden entzündliche Re-aktionen nachgewiesen. Eine Vermehrung kollagener Fasern im Sinne einer kollage-nen Metaplasie wurde nicht beobachtet.

Je nach dem Verhältnis zwischen Quarz- und Montmorillonitanteil zeigten Bentonite auch in Rattenlungen eine Fibrosierungsreaktion oder eine vergleichbare Speicherre-aktion [Timár et al., 1966a und b]. Ab einem Quarzanteil von etwa 65 % ließen sich Fibrosierungsreaktionen histologisch sichern. Die Speicherreaktion wurde auch hier von granulomatösen Kennzeichen begleitet. Eine inhibitorische Wirkung auf die Fibro-sierungsreaktion des Quarzes wurde aber nicht allein vom Montmorillonitanteil ab-hängig gemacht, sondern auch von den weiteren Begleitmineralien des Bentonits [Ti-már et al., 1966b].

In einer weiteren In-vivo-Studie der gleichen Arbeitsgruppe [Adamis et al., 1986] wur-de nach einmaliger intratrachealer Applikation von 60 mg alveolengängigem Bentonit pro Ratte ein Effekt auf den Lipidmetabolismus ähnlich wie bei Kohlenstaub gefunden, der jedoch geringer war als der von Quarz (DQ-12).

Schon bei relativ niedrigen Quarzgehalten von 1 - 2 % zeigten Bentonite in weiteren Tierversuchen die Ausbildung einer Fibrose Grad I und Grad II nach Belt und King [Mikhailova-Docheva et al., 1986].

Zur Kanzerogenität von Bentoniten liegen bisher noch keine In-vivo-Untersuchungen vor.

### 1.3.2 *In vitro*

In-vitro-Untersuchungen zur Genotoxizität von Bentoniten liegen bislang nicht vor, allerdings wurden in einer ganzen Reihe von Studien zytotoxische Effekte von Bento-niten im Vergleich zu Quarz und anderen Tonerdemineralien *in vitro* beurteilt.

Auf vielfältige Weise untersuchte die Arbeitsgruppe von Timár und Adamis die Zytoto-xizität von Bentonitstäuben an peritonealen Rattenmakrophagen [Timár et al., 1966a; Adamis und Timár, 1976, 1978; Adamis et al., 1986]. Meist wurden die Effekte von Bentonit-, Quarz- und Kohlenstäuben bzw. deren Mischungen miteinander verglichen.

Als Parameter für die Zellschädigung wurden die Hemmung der 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid(TTC)-Reduktion sowie die extra- und intrazellulären Laktat-Dehydrogenase(LDH)-Aktivität herangezogen. Bentonitstäube zeigten in diesen Untersuchungen z. T. widersprüchliche Effekte, die je nach Untersuchungsmethode stärker oder schwächer als die von Quarzpartikeln ausfielen. Als der ausschlaggebende Faktor für das zytotoxische Verhalten von Bentonitstäuben wird die Kationenaustausch- und Bindungskapazität des Aluminiumhydroxysilikats angesehen [Adamis und Timár, 1976].

Murphy und Mitarbeiter [1993] untersuchten die Zytotoxizität verschiedener Aluminiumsilikate an primären murinen und humanen Neuronal- und Neuroblastomzellen sowie an humanen Umbilicalzellen. Nach 24-stündiger Exposition wurde anhand der Fettsäuremessung, Bestimmung der LDH-Aktivität und der Trypanblau-Vitalitätsbestimmung ein dosisabhängiger Effekt beobachtet, der in der Reihenfolge Montmorillonit > Bentonit, Kaolinit > Erionit abnahm.

Die hämolytische Aktivität von Bentonitpartikeln wurde im Vergleich zu verschiedenen Tonerdemineralien und Quarzsand an humanen Erythrozyten [Mányai et al., 1969] getestet. Auch hier zeigte reiner Kalzium-Montmorillonit die stärksten Wirkungen, gefolgt von Illit, Bentonit und Kaolin. Die schwächsten hämolytischen Effekte wurden beim Quarzsand festgestellt.

#### **1.4 Wirkungsweise von Partikeln auf zellulärer und molekularer Ebene**

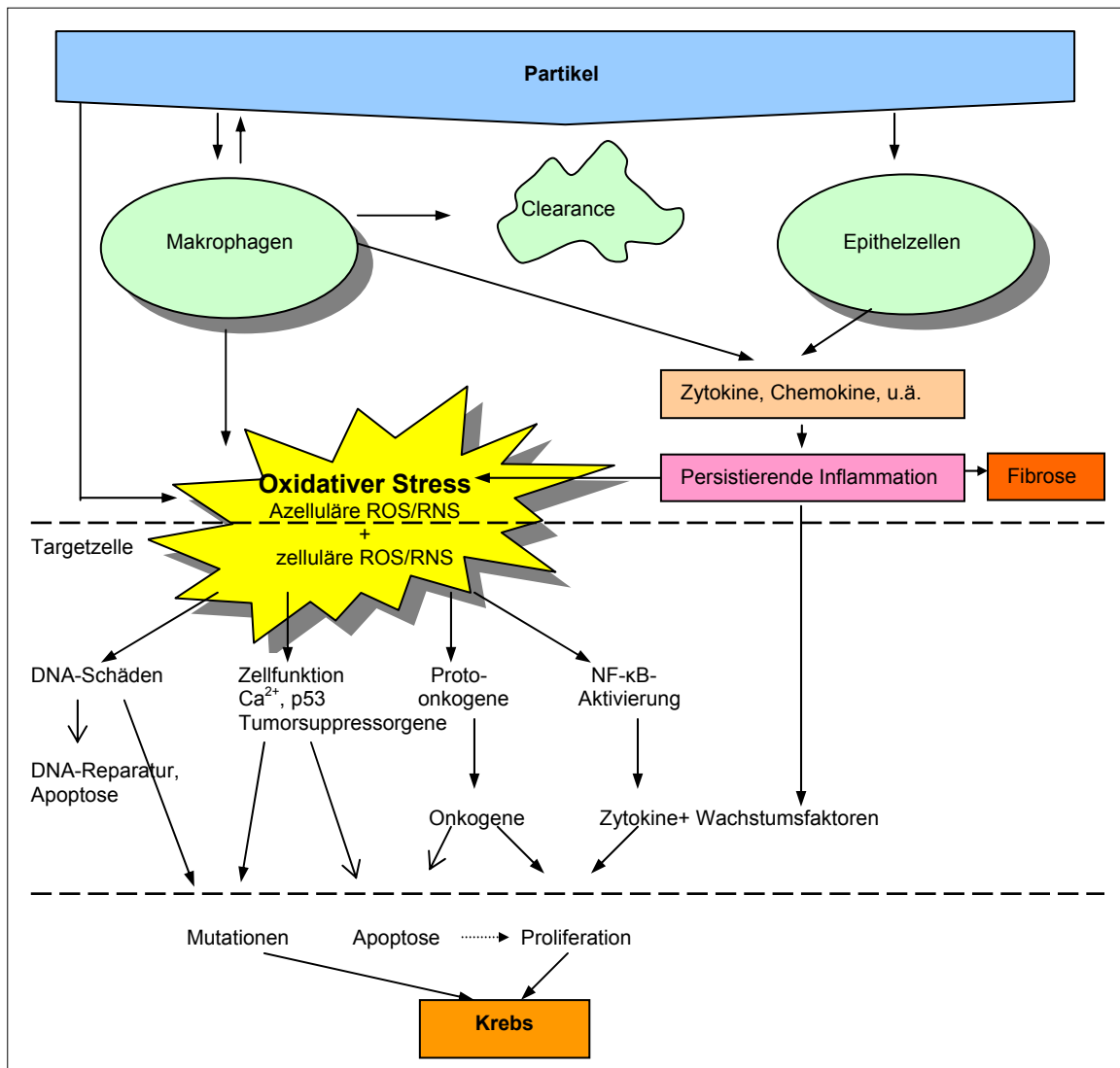
Bei der Interaktion von Partikeln und Gewebe wird eine Vielzahl von körpereigenen Abwehrmechanismen aktiviert. Eine wichtige Rolle spielt dabei die mukoziliäre „Clearance“. Hierbei werden die Partikel über die Tracheobronchial-Zilien direkt oder nach vorheriger Aufnahme (Partikel <5 µm) in die Alveolarmakrophagen nach oben befördert und abgehustet oder verschluckt. Ein Teil der von den Alveolarmakrophagen phagozytierten Partikel gelangt in das Interstitium und wird dort in einem weiteren Reinigungsmechanismus deponiert und von Proteinen umhüllt (Halbwertszeit ca. ein Jahr). Die alveoläre „Clearance“ ist allerdings bei ultrafeinen Partikeln wesentlich weniger effektiv [Oberdörster et al., 1994].

Bei fibrogenem Staub wie z. B. Quarz oder Asbest versagt nach entsprechender Exposition dieser Schutzmechanismus. Der im Interstitium gespeicherte Staub wirkt auf die Makrophagen zytotoxisch und wird durch deren Absterben erneut freigesetzt. Dies führt zur Stimulierung der Phagozytose durch weitere Makrophagen, was zunächst durch ihre exzessive Vermehrung mit einer lokalen Entzündungsreaktion verbunden

ist. Die mehrfache Wiederholung von Zerfall und Neubildung der Makrophagen bewirkt eine Bindegewebsproliferation und schließlich die Fibrosierung der Lunge. Für die fibroseinduzierende Wirkung von Partikeln sind zwei Parameter von entscheidender Bedeutung, zum einen die Größe der wirksamen Oberfläche und zum anderen die biologische Aktivität (Radikalbildung). Mehrere Studien belegen, dass die Oberflächenmodifikation von Quarzstaubpartikeln die biologische Aktivität gegenüber der Reinsubstanz vermindern können [Strübel, 1989; Fubini et al., 1995; Höhr et al., 2002; Schins et al., 2002; Albrecht et al., 2002].

Bei der Aktivierung der Alveolarmakrophagen kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, Proteasen, Wachstumsfaktoren und bioaktiven Lipiden. Zusätzlich werden reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS) gebildet, die als oxidative Stressoren auf das zelluläre System wirken. Als Folge können durch DNA-Schäden, Mutationen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Aktivierung von Protoonkogenen und persistierenden Entzündungen Tumore induziert werden, was an Ratten verabreichten Quarzstäuben evident ist (Abb. 2) [IARC, 1997; Donaldson und Borm, 1998; Shi et al., 1998; Voitowitz, 1999; DFG, 1999]. Bei der direkten Genotoxizität geht man von Wirkungen aus, die unmittelbar am Genom ablesbar sind, während die indirekte Genotoxizität über die Freisetzung von Zytokinen und ROS ermittelt wird.

Zur Genotoxizität von Quarzpartikeln liegt eine Reihe von Untersuchungen sowohl an murinen als auch an humanen Alveolarmakrophagen, Lungenfibroblasten und Lungenepithelzellen vor [IARC, 1997]. In den in dieser Monographie aufgeführten Einzelstudien wurde durch die Anwendung verschiedener zytogenetischer Methoden und der Einzelzellgelelektrophorese („comet-assay“) die direkte genotoxische Wirkung *in vitro* und *in vivo* untersucht. In der Mehrzahl der dort beschriebenen Untersuchungen konnten Mikrokernbildungen, Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidenaustausche sowie Zellkernfragmentierungen auf die Quarzeinwirkung zurückgeführt werden. Sehr wenig ist bislang die DNA-schädigende Wirkung von Tonmineralien untersucht worden. Im Vergleich zu Quarz fanden Gao und Mitarbeiter eine abgeschwächte Genotoxizität des Aluminiumhydrosilikats Kaolin beim Einsatz des In-vivo-Comet-Assays an Rattenalveolarmakrophagen [Gao et al., 2000].



**Abb. 2:** Mögliche Mechanismen der Pathogenese nach Einwirkung alveolengängiger nicht inerten, schwerlöslicher Partikel auf das respiratorische System bis zur Krebsinduktion [Teile der Abbildung entnommen aus Weitowitz, 1999, und Albrecht et al., 2004].

### 1.4.1 Freisetzung von Entzündungsmediatoren

Zytokine bilden als Entzündungsmediatoren eine Gruppe von signalgebenden Molekülen, die an der Steuerung von Entzündungsprozessen beteiligt sind und eine wichtige Funktion bei der Regulierung der zellulären Stressantwort durch exogene Noxen haben. Derartige Botenstoffe (Mediatoren) kommen an verschiedenen Stellen des bronchoalveolären Systems bei der Inhalation von Stäuben zur Geltung. Schon bei dem Kontakt von Partikeln mit dem „Surfactant“ (phospholipidreicher, den Alveolarraum auskleidender Flüssigkeitsfilm) wird ein Komplexsystem von Eiweißstoffen zur Stimulierung der Alveolarmakrophagen freigesetzt [Brockmann, 2000].

Neben den Epithelzellen sind vor allem die Alveolarmakrophagen an der Ausschüttung von Zytokinen beteiligt. In vielen In-vivo- aber auch einigen In-vitro-Studien konn-



ten der proinflammatorisch wirkende Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der „Insulin-like growth“-Faktor-1 (IGF-1), der „Transforming growth“-Faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), die Makrophagen-inflammatorischen Proteine- (MIP-)1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 und das Interleukin-1 (IL-1) sowohl in tierischen als auch in menschlichen Makrophagen nachgewiesen werden (siehe Übersicht Tab. 2).

**Tab. 2:** Häufige durch Partikeleinwirkung freigesetzte Zytokine in Lungenzellen (ausgewählte Literatur).

Zytokin	Zelltyp	Ref.
TNF- $\alpha$	Alveolarmakrophagen, human, Ratte und Hamster	<sup>1</sup> Lassalle et al., 1990; <sup>1</sup> Gosset et al., 1991; <sup>1,2</sup> Driscoll et al., 1995 u. 1997; <sup>2,3</sup> Seiler et al., 2001
TNF- $\alpha$	Epithelzellen, human	Calcabrini et al., 2004
IGF-1	Alveolarmakrophagen, human und Ratte	<sup>2</sup> Chen et al., 1994; <sup>1</sup> Olbrück et al., 1998
TGF- $\beta$	Alveolarmakrophagen, human	Mariani et al., 1996; Olbrück et al., 1998
MIP-1/2	Alveolarmakrophagen, human und Ratte	Driscoll et al., 1997; Tao und Kobzik, 2002 (nur in Rattenzellen)
MIP-2	Epithelzellen Typ II, Ratte	Driscoll et al., 1996
IL-1 $\beta$	Alveolarmakrophagen, human und Ratte	<sup>1</sup> Lassalle et al., 1990; <sup>1</sup> Gosset et al., 1991; <sup>1</sup> Cohen et al., 1999; <sup>2</sup> Yang et al., 1999
IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8,	Epithelzellen Typ II, human	Schins et al., 2000; Fujii et al., 2001; Hetland et al., 2004
IL-8	neutrophile Granulozyten, Ratte	Ning et al., 2003
GM-CSF	Epithelzellen, human	Fujii et al., 2001

Untersuchungen an <sup>1</sup>Human-, <sup>2</sup>Ratten-, <sup>3</sup>Hamsterzellen

An menschlichen Lungenepithelzellen Typ II wurde vorwiegend die Freisetzung proinflammatorisch wirkender Interleukine, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 gezeigt [Schins et al., 2000; Fujii et al., 2001; Hetland et al., 2004]. Einige Studien belegen, dass auch TNF- $\alpha$  von diesem Zelltyp durch das Einwirken von Feinstäuben aus städtischer Umgebungsluft (PM 2,5) sezerniert werden kann [Calcabrini et al., 2004]. Auch Lungenepithelzellen von Ratten konnten MIP-2 nach der Exposition gegenüber  $\alpha$ -Quarzpartikeln freisetzen [Driscoll et al., 1996].

Die anhaltende Belastung der Lunge durch Partikel kann durch die permanente Freisetzung der beschriebenen Entzündungsmediatoren zu einer chronischen Entzündung führen. Dieses zieht eine weitere Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nach sich, was schließlich über eine zelluläre Exzessproliferation zur Tumorbildung führen kann (vgl. Abb. 2).

Auf molekularer Ebene spielt für die Regulation bzw. Überregulation von Zytokinen die Aktivierung des Nuklear-Faktors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) eine wesentliche Rolle. NF- $\kappa$ B ist ein proinflammatorisch wirkender Transkriptionsfaktor, der über ROS und  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden kann [Donaldson und Tran, 2002]. Die Ausschüttung von Zytokinen wirkt sich auch auf Membranrezeptoren aus, wie z. B. dem „Epidermal growth“-Faktor-Rezeptor (EGF-R), der über die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-(MAP-)Kinasen weitere inflammatorisch und präkanzerogen wirkende Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, Aktivator-Protein-1 (AP-1)) regulieren kann [Knaapen et al., 2004]. Solche Membranrezeptoren können auch von gelösten Metallionen und ROS aktiviert werden.

#### 1.4.2 Oxidanzien als Mediatoren der Partikeleffekte

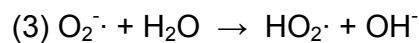
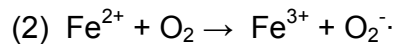
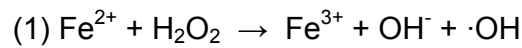
Eine Schlüsselfunktion bei der Tumorgenese durch schwerlösliche und nicht inerte Stäube wie z. B. Quarzpartikel hat der oxidative Stress. Überwiegend stellen reaktive Sauerstoff- aber auch reaktive Stickstoffverbindungen freie Radikale dar, die auf vielfältige Weise zur Zellschädigung bis hin zur malignen Entartung beitragen können. Als schädigende Oxidanzien sind von Bedeutung:

- Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ )
- Peroxide ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ )
- atomarer Sauerstoff ( $\text{O}^-$ )
- Ozon ( $\text{O}_3$ )
- Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^-$ )

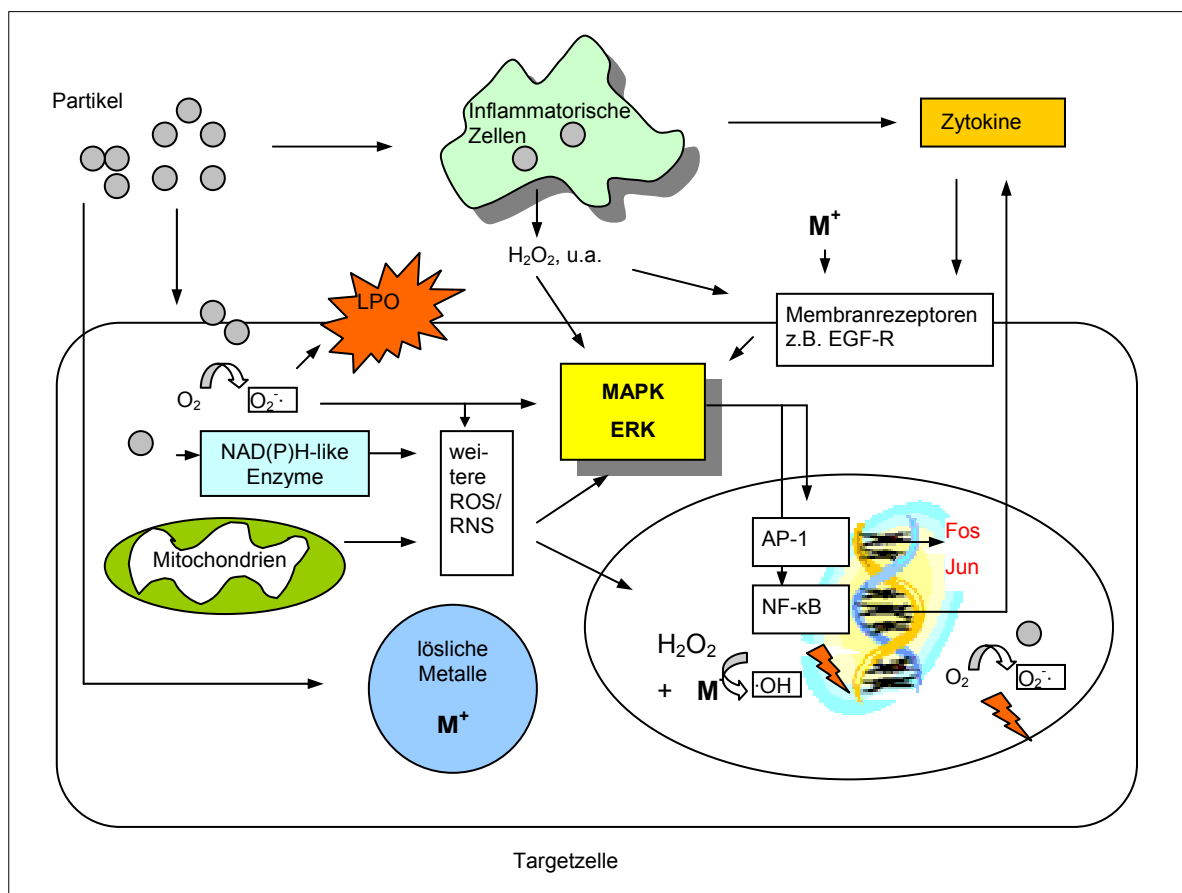
Diese können nach ihren Entstehungsorten in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zum einen sind das die von zellulären Mechanismen und zum anderen die vom Partikel selbst ausgehenden ROS bzw. RNS.

Für die azelluläre, aber auch die intrazelluläre partikelgenerierte Radikalbildung spielt die bereits erwähnte Oberflächenwirkung der Partikel eine wichtige Rolle. Diese wird durch die an der Oberfläche anhaftenden Radikale und reaktiven Verbindungen und durch die Größe der Oberflächen bestimmt. Wilson und Mitarbeiter [2002] konnten am Beispiel von Rußpartikeln zeigen, dass ultrafeine Stäube aufgrund ihrer größeren Oberfläche mehr Radikale generieren als feine Stäube desselben Materials. Weitere Studien belegen, dass frisch gebrochener Quarzstaub mehr oberflächengebundene reaktive Gruppen besitzt und auch mehr Radikale in wässrigen Lösungen bilden kann als ältere Proben [Fubini et al., 1995]. Siliziumoxid- und Siliziumhydroxid-Radikale ( $\text{SiO}^-$ ,  $\text{SiOH}^-$ , etc.) werden hier als solche oberflächenaktiven Gruppen beschrieben. Analog können Rußpartikel oder Kohlenstaubpartikel Radikale in Form kohlenstoffzentrierter Verbindungen freisetzen [Huang et al., 1999]. Ebenso wurden im Feststoff-

anteil von Zigarettenrauch Semichinon-Radikale nachgewiesen [Dellinger et al., 2001]. Ein weiterer grundlegender Entstehungsmechanismus für die exogene, d. h. die von Partikeln direkt ausgehende Radikalbildung ist die Herauslösung verschiedener löslicher, an der Partikeloberfläche adsorbierter Verbindungen, die über die extra- und intrazelluläre Matrix katalysiert werden. Von besonderer Bedeutung sind hier Übergangsmetalle wie Eisen. Die häufigsten Reaktionsverläufe sind hierbei durch die Fenton- (Gleichung 1) und Haber-Weiss-Reaktion (Gleichung 2 u. 3) beschrieben:



Aber auch organische Verbindungen können aus luftgetragenen Umweltstaubpartikeln (PM 2,5) herausgelöst werden und auf ähnliche Weise reaktive Sauerstoffverbindungen generieren [Squadrito et al., 2001]. Da solche löslichen Verbindungen in das Zytoplasma hinein diffundieren und auf die intrazellulären Kompartimente einwirken können, sind Partikel in der Lage, indirekt zu wirken, ohne dabei selber aufgenommen zu werden [Knaapen et al., 2004] (Abb. 3).



**Abb. 3:** Partikelgeneriertes Wirkungsschema reaktiver Sauerstoff-/Stickstoffspezies im Zusammenspiel mit molekularen Mechanismen; LPO= Lipidperoxidation [Modifizierte Darstellung nach Knaapen et al., 2004].

Eine wichtige Quelle für die endogene intrazelluläre Freisetzung von ROS/RNS in der Lunge sind neben vaskulären Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten die inflammatorisch wirksamen Zellen. Insbesondere Makrophagen, aber auch neutrophile Granulozyten können zur vermehrten Bildung von Radikalen beitragen und bewirken den sogenannten „oxidative burst“ (sprunghaft angestiegener Ausstoß von ROS durch eine erhöhte Partikelaufnahme der Zellen). Diese endogen-intrazelluläre Radikalbildung durch Zell-Partikel-Interaktion basiert hauptsächlich auf zwei mechanistischen Hypothesen. Erstens wird die mitochondriale Atmungskette dafür verantwortlich gemacht und zweitens soll ein NAD(P)H-Oxidase-ähnliches System eine funktionale Bedeutung dabei haben [Shukla et al., 2000; Voelkel et al., 2003]. Gemessen an der Lipidperoxidation wurden im Vergleich zu Asbestfasern deutlich weniger ROS in Granulozyten von Kaolin- und Quarzpartikeln intrazellulär gebildet [Velichkovskii und Fishman, 2000].

Die Freisetzung der ROS/RNS kann neben der primären Lungenparenchym- und DNA-Schädigung (z. B. durch Lipidperoxidation) zur Aktivierung von Signalkaskaden einschließlich der MAP-Kinasen und der Extrazellulär-Signal-regulierten Kinasen (ERK's) führen (Abb. 3). Diese können die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B aktivieren [Fubini und Hubbard, 2003; Knaapen et al., 2004]. Aufgrund ihrer zentralen Position sind die ERK's häufig an transformierenden Prozessen (Tumorbildung, Zelltransformation) beteiligt. Die oxidative Aktivierung von AP-1 durch MAP-Kinasen bewirkt ihrerseits eine weitere Aktivierung der Protoonkogene aus der Fos- und Jun-Familie *c-fos* und *junB* ebenso wie *fra-1* und *c-myc* [Timblin et al., 2002], welche durch Auslösung einer überschießenden Proliferation zum Tumorwachstum führen können. Freie Radikale können genotoxische Wirkungen induzieren, indem sie mannigfaltig mit der DNA interagieren. Durch Einzel- und Doppelstrangbrüche können Mikrokernformationen, Schwesterchromatidenaustausche und Chromosomenaberrationen entstehen. Auch strukturelle Basenveränderungen, wie Basenpaarmutationen und DNA-Adduktbildung, können als Folge des oxidativen Stresses auftreten. Wenn sich derartige Schäden durch die Überforderung der zellulären Reparaturmechanismen manifestieren, können diese zu Mutationen oder Apoptosen führen. Durch ROS ausgelöste Translokation, Insertion und Deletion können zudem Protoonkogene zu Onkogenen transformiert werden. Neben der radikalvermittelten Schädigung kann es aber auch im Fall faserförmiger Stäube zu einer direkten Partikel-DNA-Interaktion kommen.

Eines der potentesten genotoxischen Radikale ist das OH-Radikal. Dieses ist befähigt Strangbrüche und andere DNA-Läsionen hervorzurufen. Besonders häufig vorgefunden und untersucht ist die Bildung von 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG). Am Bei-

spiel von Dieselrußpartikeln konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg von 8-OHdG mit einer erhöhten In-vivo- und In-vitro-Mutationsrate in Ratten verbunden war [Ichinose et al., 1997; Sato et al., 2000].

Insbesondere bei feinpartikulären Luftschadstoffen (PM 10; PM 2,5) spielt die Anhaftung weiterer toxischer oder kanzerogener Substanzen eine wichtige Rolle. Diese können den oxidativen Stress und die Entzündungsreaktionen verstärken und zur DNA-Adduktbildung führen. Häufig sind diese Verbindungen Vertreter der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), wie z. B. Benzo[a]pyren, aber auch Endotoxine können dazu zählen.

Als körpereigene Antwort zum Schutz vor oxidativem Stress kommt es zur Expression antioxidativ wirkender Enzyme, wie z. B. der Mangan-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) oder der Glutathion-Peroxidase [Fubini und Hubbard, 2003], die als Radikalfänger wirken. Durch die Gabe von Eisenkomplexbildnern in asbestexponierten humanen Lungenepithelzellen Typ II konnte dementsprechend eine Hemmung der 8-OHdG-Bildung beobachtet werden [Chao et al., 1996].

In weiteren Untersuchungen finden sich auch Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Bildung von ROS und der Induktion von Apoptose in quarzstaubexponierten Alveolarmakrophagen und humanen Endothelzellen [Santarelli et al., 2004].

### 1.4.3 Apoptoseinduktion

Neben den bisher beschriebenen Schutzmechanismen stellt die Apoptose eine weitere sehr wichtige Schutzfunktion dar. Im Gegensatz zum unkontrollierten Zelltod, der Nekrose, verläuft die Apoptose durch spezielle Enzyme und Proteine zellgesteuert (z. B. Bcl-2-Proteine). Bei allen Wachstumsprozessen, die einer ständigen Erneuerung unterliegen, hat die Apoptose eine Schlüsselfunktion, denn die Apoptose kontrolliert das Gleichgewicht zwischen normalen und irreparabel geschädigten Zellen. Apoptose und Mitose halten sich in einem gesunden Organismus durch den Ausgleich zwischen Zelltod und Proliferation die Waage. Wird die Apoptose inhibiert, kann durch eine überschießende Proliferation maligne entarteter Zellen Krebs entstehen.

Biochemische und morphologische Merkmale der Apoptose sind die Verschiebung des Redoxpotenzials der Mitochondrien, Aktivierung von Caspasen, Kondensation des Chromatins, Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen sowie Veränderungen der Plasmamembran durch Translokation der Phosphatidylserin-Regionen [Linz, 2001]. Zudem ist für die Apoptoseinduktion die gleichzeitige Aktivierung von Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc* und weitere) kennzeichnend. Beispielsweise wurde die Hochregulierung von p53, einem wichtigen apopto-

seauslösenden Tumorsuppressorgen, in ruß- und quarzpartikelexponierten bronchoalveolären Lavage (BAL)-Zellen der Ratte beobachtet [Swafford et al., 1995; Seiler et al., 2001]. Die unregelmäßige Expression des zum Onkogen transformierten Protoonkogens *c-myc* kann ebenfalls mit der Auslösung der Apoptose einhergehen [Mossman und Churg, 1998]. Damit werden proliferierende Zellen, die maligne entarten können, sofort eliminiert. Aufgrund dieser eng verknüpften Regulationsmechanismen kann die Apoptose auch zur Abschätzung der Fähigkeit zur Tumorentstehung bestimmter Kanzerogene herangezogen werden [Schulte-Hermann et al., 1993]. In diesem Kontext kann aber auch unter bestimmten Bedingungen die Apoptose selbst als ein Initiator der Kanzerogenese angesehen werden [Manning und Patierno, 1996]. Hierbei wird zunächst davon ausgegangen, dass der Apoptosemechanismus nicht auf alle Zellen einheitlich wirkt und ein DNA-Schaden auf „sub-letalem“ Niveau erhalten bleibt. Befinden sich derartige Zellen in der Umgebung vieler apoptotischer Zellen (z. B. durch Partikeleinwirkung), so kann dies die neoplastische Proliferation dieser „sub-letal“ geschädigten präkanzerogenen Zellen bewirken [Albrecht et al., 2004].

## 1.5 Zielstellung

Die weit verbreitete Verwendung von Bentoniten macht es besonders vor dem Hintergrund der gegenwärtigen Diskussion um die kanzerogene Wirkung quarzhaltiger Stäube erforderlich, ihre gesundheitsgefährdende Wirkung mit Hinblick auf das genotoxische Potential aufzuklären. In der Literatur sind verschiedene Fälle von Bentonitstaub-assoziierten Pneumokoniosen beschrieben. Offen ist, ob alveolengängige Bentonitstäube neben einer fibrogenen Wirkung auch genotoxische bzw. kanzerogene Eigenschaften besitzen. Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung dieser Frage beitragen, insbesondere inwieweit der Quarzanteil und die chemische Modifikation hierbei eine Rolle spielen. Mit verschiedenen In-vitro-Methoden sollen hierzu Effekte von Bentonitpartikeln auf zellulärer und genomischer Ebene untersucht werden. Ebenso soll auf die Bedeutung indirekter genotoxischer Effekte eingegangen werden.

Im Mittelpunkt stehen Untersuchungen zur Klärung folgender Fragen:

- a) Wie hoch ist die zelluläre Partikelaufnahme?
- b) Entsteht ein direkter Schaden an der DNA?
- c) In welcher Form tritt dieser Schaden auf?
- d) Welche möglichen Wirkmechanismen spielen eine Rolle?

Insbesondere durch:

- 
- Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS),
  - Freisetzung von Zytokinen und
  - Apoptoseinduktion

Als In-vitro-Testsysteme sollen in erster Linie humane Lungenfibroblasten (IMR90) und makrophagenähnliche Zellen (MonoMac6, THP1) Anwendung finden.

Damit soll diese Arbeit einen Beitrag zur Einstufung des Gefährdungspotentials inhalierbarer schwerlöslicher nicht inerter Staubpartikel liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

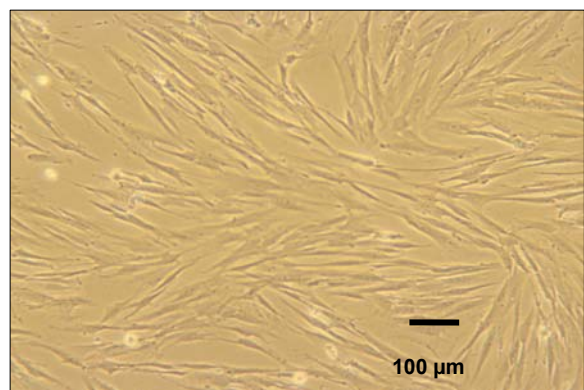
#### 2.1.1 Zelllinien

##### Humane Lungenfibroblasten IMR90

Bei der IMR90-Zelllinie handelt es sich um adhärenz wachsende diploide Zellen, die von einem 16 Wochen alten weiblichen Fötus im Jahr 1977 isoliert wurden (Abb. 4). Diese Zellen haben eine begrenzte Lebensdauer von 58 Zellzyklen und wurden von der American Type and Culture Collection ATCC, USA bezogen (Nr.: CCL-136). Ihre Generationszeit beträgt etwa 36 bis 48 Stunden. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> Polystyrol-Zellkulturflaschen mit modifiziertem MEM-Medium folgender Zusammensetzung (wenn nicht gesondert angegeben, wurden Zusätze und Basalmedien der Fa. CC-Pro, Neustadt, bei allen Kulturmedien verwendet):

- 86,9 % MEM + Earls' Salt
- 10 % Fötale Kälberserum (FKS) (Fa. Gibco)
- 1 % L-Glutamin
- 1 % Natrium-Pyruvat
- 0,1 % Nicht essentielle Aminosäuren (NAA)
- 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung mit 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

In Abhängigkeit vom Zellzyklus wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche im Verhältnis 1:4 passagiert. Dabei wurde zunächst das verbrauchte Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS („Phosphate buffered saline“, kalzium- und magnesiumfrei) gespült. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurden sie mit 5 ml 0,25 %igem Trypsin



**Abb. 4:** Adhärenz wachsende IMR90-Zellen (100-fache Vergrößerung).

in EDTA-Lösung für ca. 30 Sekunden benetzt und anschließend für 5 - 8 Minuten (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) nachinkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde optisch durch leichtes Klopfen oder mikroskopisch kontrolliert. Danach wurden die Zellen in frischem vorge-wärmtem Kulturmedium resuspendiert und in neue Kulturflaschen umgesetzt.

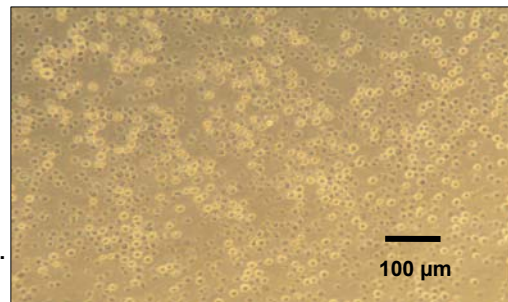


### Makrophagenähnliche Zellen

#### *MonoMac6:*

Die humane monozytäre makrophagenähnliche Suspensionszelllinie MonoMac6 (MM6) wurde 1985 aus dem Blut eines 64 Jahre alten, männlichen Patienten mit monozytärer Leukämie isoliert. MonoMac6-Zellen teilen sich unbegrenzt weiter und besitzen einen Zellzyklus von ca. 60 Stunden. Diese Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben. Die Zusammensetzung des Kulturmediums ergab sich wie folgt:

- 74,5% RPMI 1640, HEPES gepuffert
- 20 % FKS, hitzeinaktiviert (Fa. Gibco)
- 1 % NAA
- 2 % L-Glutamin
- 1% Na-Pyruvat
- 1% Insulin (Fa. Sigma)
- 0,5 % Penicillin/Streptomycin-Lösung, s.o.

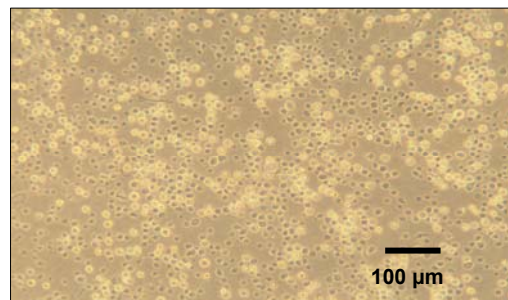


**Abb. 5:** Makrophagenähnliche in Suspension wachsende MM6-Zellen (100-fache Vergrößerung)

#### *THP1:*

Die humane monozytäre Suspensionszelllinie THP1 hat ebenfalls makrophagenähnliche Eigenschaften und wurde 1980 aus dem Blut eines ein Jahr alten Jungen mit monozytärer Leukämie isoliert. Die Generationszeit dieser Zelllinie beträgt etwa 26 Stunden und wurde von Frau Dr. Rebmann, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in modifiziertem RPMI 1640-Medium (CC-Pro), das folgendermaßen zusammengesetzt war:

- 77% RPMI 1640, HEPES gepuffert
- 20 % FKS, hitzeinaktiviert (Fa. Gibco)
- 1 % L-Glutamin
- 1% Na-Pyruvat
- 0,3 µl 2-Mercaptoethanol (Fa. Sigma)
- 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung, s.o.



**Abb. 6:** Makrophagenähnliche in Suspension wachsende THP1-Zellen (100-fache Vergrößerung)

Die Kultivierung der in Suspension wachsenden MonoMac6- und THP1-Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in 24-Well-Platten (Fa. Greiner). Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 0,3 - 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingesät und zwei- bis dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:1 nach Austausch des Kulturmediums umgesetzt.

## 2.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

### Kryokonservierung

Ziel der Kryokonservierung von Zellen ist, die Vermehrung und die Stoffwechselaktivität der Zellen vollständig, aber gleichzeitig reversibel zu unterbinden, um die Zelllinien für einen längeren Zeitraum unbeschadet lagern zu können. Damit die Bildung schädigender Eiskristalle verhindert wird, muss der Einfrierprozess abgestuft erfolgen und dem Einfriermedium Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt werden.

Zur Durchführung wurden zunächst die Zellen in der beschriebenen Weise durch Trypsingabe vom Flaschenboden abgelöst und ausgezählt. Danach erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 1.000 U/min. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Zellpellet in gekühltem (ca. 1 °C) Kulturmedium mit 10 %igem DMSO- und 20 %igem FKS-Zusatz resuspendiert, so dass sich eine Zelldichte von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ergab. Anschließend wurden 1,5 - 1,8 ml der Zellsuspension in vorgekühlte Kryogefäße pipettiert. Es folgte der Einfrierprozess für 1 - 2 Stunden bei -20 °C und nachfolgend bei -80 °C für ca. 24 Stunden. Zur endgültigen Langzeitlagerung wurden die Gefäße danach in Flüssigstickstoff (-196 °C) überführt.

### Rekultivierung

Die zu rekultivierenden Zellen wurden zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und zügig in 8 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt, um die zytotoxische Wirkung des angetauten DMSO möglichst gering zu halten. Nach anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 1.000 U/min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf entsprechenden Kulturflaschen mit einer Dichte von  $2 - 5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> verteilt. Bei Suspensionszellen betrug die Einsaat  $0,3 - 0,5 \times 10^6$  Zellen/Well. Zur Entfernung von Zellfragmenten und wachstumshemmenden Abbauprodukten erfolgte nach ca. 15 - 20 Stunden ein erster Mediumwechsel.

## 2.2 Bentonitproben

Die verwendeten Bentonitproben wurden von der Süd-Chemie AG, Moosburg, zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um gereinigtes Rohmaterial und chemisch modifiziertes Material mit unterschiedlichen Quarzgehalten (Abb. 7).



**Abb. 7:** Bentonite aus verschiedenen Behandlungsprozessen.

Die Auswahl der Bentonite erfolgte so, dass zumeist jeder Modifizierung eine Probe mit relativ hohem und mit relativ niedrigem Quarzgehalt gegenübergestellt wurde. Tab. 3 gibt die stofflichen Daten der eingesetzten Bentonite wieder. Die pH-Werte wurden in einer Bentonitsuspension in physiologischer Kochsalzlösung (0,5 mg/ml) gemessen.

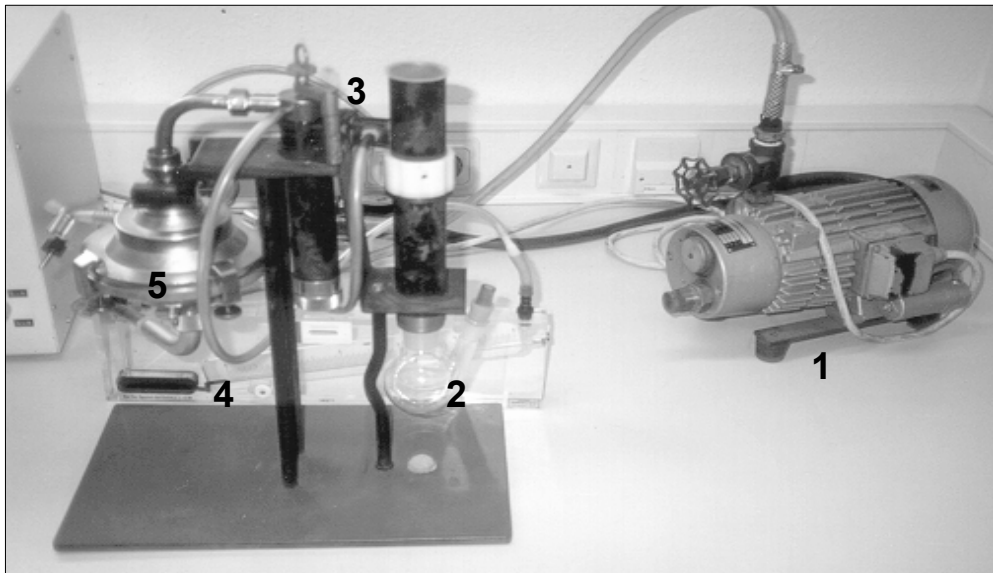
**Tab. 3:** In den Experimenten verwendete Bentonitstäube.

Lfd.Nr.	Bentonitprobe*	Behandlung	$\alpha$ -Quarz [%]	$\Sigma$ Üb.-Metalle [%]**	pH-Wert
1	EXM 0015	organisch: Distearyl-dimethylammoniumchlorid	1-2 (Cristobalit)	1,75	6,9
2	EXM 1403	alkalisch: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3 - 5 %)	0,5	2,39	10,4
3	EXM 1400	alkalisch: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5 %)	5 - 6	3,9	10,1
4	EXM 1401	alkalisch: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3 %)	5 - 6	3,79	9,1
5	EXM 1405	sauer: HCl	1	0,79	7,9
6	EXM 1402	sauer: HCl	4 - 5	2,06	4,6
7	EXM 1404	unbehandelt	1	1,22	8,3
8	EXM 1408	unbehandelt	5 - 6	4,01	8,4
Vergleichs-material	Quarzstaub (DQ-12)	-	ca. 95	k. A.	7,4
Vergleichs-material	Gips (CaSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	-	0	k. A.	7,5

\*Die Probenbezeichnungen sind interne Firmennummern der Süd-Chemie AG; \*\*hauptsächlich Eisen; k. A.= keine Angabe

### 2.2.1 Korngrößenseparation

Da alveolengängige Partikel die höchste pathogene Relevanz besitzen, wurden größere Staubpartikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von größer als 10  $\mu\text{m}$  abgetrennt. Die Separation erfolgte nach dem Fliehkraftprinzip mit einem Zyklonabscheider (TBF 50) bei der Deutschen Montan Technologie GmbH (DMT), Essen (Abb. 8).



**Abb. 8:** Räumliche Anordnung der Hauptkomponenten zur gravimetrischen Abscheidung von Partikeln: 1) Vakuumpumpe, 2) Einfüllkolben, 3) Vor- und Hauptzyklon, 4) Druckanzeige, 5) Sammelbehälter mit Feinfilter.

### 2.2.2 Applikation der Bentonitpartikel

Zur Applikation der Bentonite wurde eine definierte Menge des aus dem Zyklon gewonnenen Materials in physiologischer Kochsalzlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml suspendiert. Um eine Homogenisierung und Keimabtötung der Stäube zu erreichen, wurden die Suspensionen mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier S-250 D, USA) für eine Minute mit 100 Watt (50 % der Ausgangsleistung) beschallt. Auf eine herkömmliche Heißluftsterilisation der Stäube wurde verzichtet, da sich in Vorversuchen nach zweistündiger Sterilisation bei 110 °C eine Verschiebung der pH-Werte zum neutralen Bereich einstellte. So konnte eine Verfälschung des Ausgangsmaterials durch interkristalline Umformungsprozesse vermieden werden.

Vor Versuchsbeginn erfolgte bei allen Zellkulturen ein Mediumwechsel. Danach wurden die Staubsuspensionen intensiv durchmischt (Vortex; Heidolph, Kehlheim). In unmittelbarem Anschluss wurde daraus ein aliquoter Teil entsprechend der jeweiligen Zielkonzentration dem neuen Medium zugesetzt. Um eine homogene Verteilung der

Staubpartikel auf den Zellkulturen zu gewährleisten, erfolgte nach Durchmischen des partikelhaltigen Mediums ein Schwenken der Kulturgefäße.

## 2.3 Mikroskopie

### 2.3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM) und energiedispersive Röntgenanalyse (EDX)

#### Prinzip

Das Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie beruht auf der Abtastung einer vorbehandelten Probe mit einem gebündelten Primärelektronenstrahl im Vakuum. Der dabei entstehende Sekundärelektronenstrahl wird von seitlichen Detektoren eingefangen und erzeugt über ein Verstärkersystem ein charakteristisches Signal von der Stelle des auftreffenden Elektronenstrahls. Auf einem Monitor werden so entstandene Signale zu einem vergrößerten Bild der gerasterten Probe zusammengefasst. Aufgrund der hohen Tiefenschärfe lassen sich durch die Rasterelektronenmikroskopie feine Oberflächenstrukturen besonders gut plastisch darstellen und bis zu  $10^6$ -fache Vergrößerungen realisieren. Die REM wurde daher zur Charakterisierung der Bentonitpartikel eingesetzt.

Um lokale elektrostatische Aufladungen in den Objekten zu vermeiden, müssen diese nach vorheriger strukturerhaltender Trocknung mit einer leitenden Schicht bedampft werden.

#### Röntgenanalyse

Zur Durchführung der Elementaranalyse war das Rasterelektronenmikroskop mit einer Einrichtung zur energiedispersiven Röntgen(mikro)analyse (EDX) verbunden. Die Analyse basiert auf der Erfassung der charakteristischen Röntgenstrahlung, die nach Elektronenbestrahlung von dem zu untersuchenden Objekt emittiert wird. Jedes chemische Element emittiert dabei Röntgenstrahlung mit spezifischer Energie. Somit lassen sich anhand der gewonnenen Röntgenspektren Aussagen über die stoffliche Zusammensetzung der Proben machen.

#### Durchführung

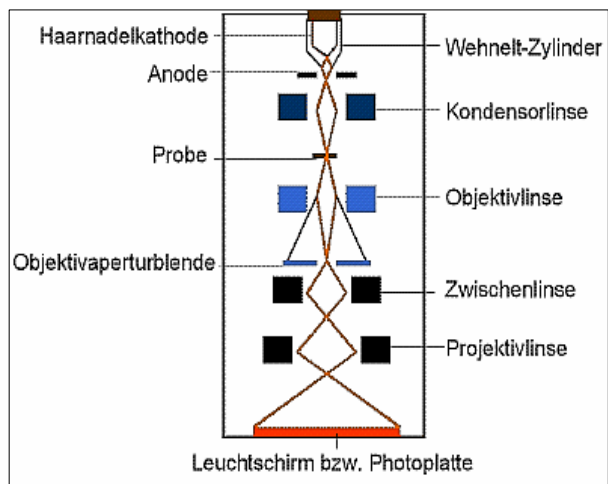
Zur Durchführung wurden Bentonitsuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml hergestellt und auf beschriebene Weise beschallt (s. 2.2.2). 0,5 ml (200 µg Bentonit) wurden auf einen vorher mit Kohlenstoff bedampften Polycarbonatfilter (0,2 µm Porenweite) aufgebracht. Nach der Trocknung wurden die Filter erneut bei  $0,5 - 1,0 \times 10^{-4}$  mbar mit Kohlenstoff bedampft. Anschlie-

ßend wurde ein etwa 1 cm<sup>2</sup> großes Stück auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem Rasterelektronenmikroskop (SEM 515, Philips, Niederlande) bei max. 10.000-facher Vergrößerung untersucht.

### 2.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

#### Prinzip

Im Gegensatz zur REM wird bei der Transmissionselektronenmikroskopie das Präparat von Elektronen durchstrahlt. Das Prinzip ist mit dem der optischen Durchlichtmikroskopie vergleichbar. Da sich hoch beschleunigte Elektronen im Vakuum ähnlich wie Lichtwellen verhalten, wird anstelle der Lichtquelle ein Kathodenstrahler eingesetzt. Magnetische, aber auch elektrische Felder bündeln als elektrische Linsen



**Abb. 9:** Strahlengang in einem Transmissionselektronenmikroskop.

die Elektronen nach Durchdringung des Präparates, die dann auf einen Leuchtschirm oder einer Photoplatte auftreffen, so dass das Objekt stark vergrößert abgebildet wird (Abb. 9).

Aufgrund der geforderten minimalen Schichtdicken der Präparate ist es bei biologischen Objekten notwendig, die Präparate nach vorhergehender Entwässerung und Kontrastierung einzubetten. Die Einbettung geschah in Epon 812 (Glycidether); alle Chemikalien stammten von der Fa. Serva, Heidelberg.

#### Vorbereitung

Zunächst wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen in 3,5 mm-Petrischalen ausgesät und 48 Stunden bis zu einer Konfluenz von ca. 85 % inkubiert. Danach erfolgte die Applikation der Bentonitstäube in beschriebener Weise mit einer Konzentration von 10 µg/cm<sup>2</sup>. Nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden wurden die staubbehandelten Zellen dreimal mit 2,5 ml Kulturmedium gewaschen.

#### Fixierung

Zur Fixierung wurden den Monolayerkulturen 2,5 % Glutaraldehyd mit 0,5 % Tanninsäure in Cacodylatpuffer (0,1 M; pH 7,2) zugegeben und für eine Stunde bei +4 °C

aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen für 2 x 15 Minuten in Cacodylatpuffer gewaschen.

#### Kontrastierung und Trocknung

Um die Präparate zu kontrastieren, wurden die Petrischalen mit 2 %igem Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer gefüllt und eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte das Waschen der Monolayer für 2 x 5 Minuten mit dem Cacodylatpuffer. Zur Entwässerung wurden die Petrischalen zweimal mit 50 %igem Ethanol gefüllt und für jeweils 5 Minuten stehen gelassen. Nachfolgend wiederholte sich dieses mit 70 %igem Ethanol. Zur weiteren Stückkontrastierung wurden 1,5 % Uranylacetat und 1,5 % Phosphorwolframsäure in 70 %igem Ethanol auf die Zellen aufgebracht. Diese wurden über Nacht im Dunkeln bei +4 °C aufbewahrt.

Schrittweise wurde am folgenden Tag den Zellen das verbleibende Wasser entzogen. Dazu wurde für jeweils 2 x 5 Minuten 70, 80, und 96 %iger Ethanol in die Petrischalen gegeben. Abschließend wurde der Vorgang für jeweils 10 Minuten mit 100 %igem Ethanol dreimal wiederholt.

#### Einbettung

Nach der Entwässerung erfolgte die Überschichtung der Monolayer mit einer 1:1 Epon/Ethanol-Mischung. Nach 30 Minuten Einwirkung bei Raumtemperatur wurde die Mischung durch eine Epon/Ethanol-Mischung im Verhältnis 2:1 ersetzt und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. In einem nächsten Adaptationsschritt folgte mit Epon pur die zweimalige Wiederholung dieses Vorgangs. Die gefüllten Kulturgefäße wurden über Nacht stehen gelassen.

Am folgenden Tag wurde das Epon vom Vortag gegen neues ausgetauscht und eine Stunde bis zur Polymerisation abgestellt. Die Polymerisation erfolgte zunächst bei 40 °C über 24 Stunden und dann für weitere 24 Stunden bei 60 °C.

#### Ultradünnschnitte

Nach der Einbettung und Abkühlung der Präparate erfolgte das Herauslösen der ausgehärteten Eponblöcke aus den Petrischalen durch Hammerschlag. Die Herstellung der Ultradünnschnitte wurde mit einem Mikrotom (Leica, Wetzlar) in einer Schichtdicke von ca. 50 nm durchgeführt. Anschließend wurden die Ultradünnschnitte auf ein goldbedampftes Gitternetz (Maschenweite 150 µm) aufgebracht. Um die Elektronenbeugung an den abzubildenden Konturen zu verstärken, folgte die weitere Kontrastierung der Schnitte mit 5 %igem Uranylacetat und 5 %igem Bleicitrat.

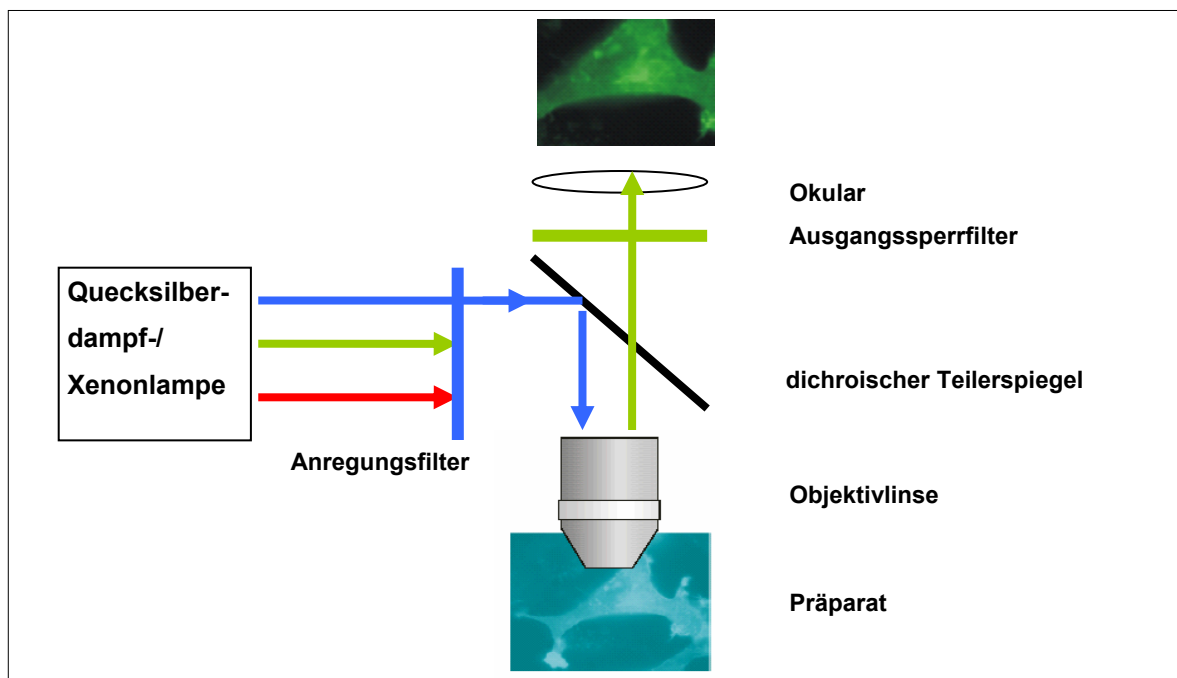
### Auswertung

Zur Auswertung diente ein TEM (STEM CM12, Philips, Niederlande) in Kombination mit energiedispersiver Röntgenmikroanalyse und einem digitalen Bildverarbeitungssystem (SIS, Münster) bei 15.000-facher Vergrößerung. Die partikuläre Aufnahme in den Zellen wurde durch das Auszählen von 20 Sektoren mit einer Größe von je  $8.000 \mu\text{m}^2$  ermittelt und in Partikel/ $\mu\text{m}^2$  angegeben.

### 2.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

#### Prinzip

Die Fluoreszenzmikroskopie basiert auf dem Prinzip der Auflichtmikroskopie. Hierbei wird das fluoreszenzgefärbte Präparat mit einer den Absorptionsbanden des Fluorochroms, d. h. der Anregungswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs, entsprechenden Wellenlänge angestrahlt und durch das emittierte (sichtbare) Licht vergrößert dargestellt (Abb. 10).



**Abb. 10:** Funktionsprinzip eines Fluoreszenzmikroskops.

Als Strahlungsquelle dienen Xenon- oder Quecksilberdampflampen. Durch einen austauschbaren Anregungsfilter wird nur der entsprechende Wellenlängenbereich durchgelassen. Ein dichroischer Teilerspiegel, der im Winkel von  $45^\circ$  angebracht ist, hat die Aufgabe, das so gefilterte kürzerwellige Licht auf das Präparat zu reflektieren und das vom Präparat emittierte längerwellige Licht zum Betrachter durchzulassen. Zwischen Teilerspiegel und Präparat werden das ankommende und das vom Präparat emittierte Licht durch eine Objektivlinse geleitet. Das emittierte, den Teilerspiegel passierende



Licht durchläuft einen Sperrfilter, der nur die gewünschte Emissionswellenlänge durchlässt. Durch ein Okular erscheint dann das Fluoreszenzbild und kann entweder beobachtet oder mit einer Photoeinrichtung aufgezeichnet werden.

### Verwendetes Mikroskop

Bei dem zur Auswertung der Präparate verwendeten Mikroskop handelte es sich um ein DM-L, Leica, Wetzlar, mit einer 50 W-Quecksilberdampfampe, das an eine Leica WILD MPS-52 Photokamera mit zugehörigem Belichtungsautomaten gekoppelt war. Die verwendeten Fluoreszenzfilter sind in Tab. 4 dargestellt.

**Tab. 4:** Wellenlängen verwendeter Fluoreszenzfilter für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (Leica DM-L).

<b>Fil- ter- Nr.</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Anregungs- wellenlänge [nm]</b>	<b>Farbe des An- regungslichtes</b>	<b>Emissions- wellenlänge [nm]</b>	<b>Farbe des Emissions- lichtes</b>
2	Bisbenzimid (Höchst 33258), DAPI	355 - 365	ultraviolett	465	blau
3	FITC	465 - 495	blau	525	grün
4	Phycoerythrin, Rhodamin	545 - 565	grün	580	rot

## **2.4 Ermittlung der Zytotoxizität**

Eine Voraussetzung für genotoxikologische Studien ist, dass die verwendeten Zellsysteme eine möglichst hohe Vitalität aufweisen. Deshalb wurden in dieser Arbeit verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um die Konzentrationen der Stäube zu ermitteln, bei denen die Vitalfunktionen der Zellen noch weitgehend erhalten bleiben.

### **2.4.1 Zellzahlbestimmung mit dem Coulter-Counter**

#### Prinzip

Das von Coulter 1953 entwickelte und nach ihm benannte Zählgerät basiert auf dem Prinzip einer durchflusszytometrisch gemessenen Änderung des elektrischen Widerstandes einer Suspension. Dabei passieren die suspendierten Teilchen eine dünne Kapillare, an deren Öffnung zwei Elektroden angebracht sind. Kommt es zum Durchtritt eines Teilchens oder einer Zelle, verringert sich der elektrische Widerstand zwischen den Elektroden, welcher als Stromimpuls gemessen und gezählt wird. Die Anzahl der Impulse entspricht dann der Anzahl der Zellen.

### Durchführung

24 - 48 Stunden vor Versuchsbeginn erfolgte die Einsaat der Zellen in 6-Well-Platten. Bei einer Konfluenz zwischen 60 und 80 % wurden die Bentonitstäube in den Konzentrationsbereichen von 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  den Zellen appliziert (s. 2.2.2). Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen in beschriebener Weise abtrypsiniert (s. 2.1.1), in 0,6 ml PBS aufgenommen und gründlich durchmischt. Als Durchflusszytometer wurde ein Coulter-Counter Z2, Beckman-Coulter, USA, verwendet. Zur Geräteeinstellung dienten folgende Parameter: Verdünnung: 1:20, Partikelgrößen: 15 - 30  $\mu\text{m}$ , Probenvolumen: 500  $\mu\text{l}$ . Zu Beginn jeder Messreihe wurde die Messsonde für eine Minute mit Isoton in einem programmgesteuerten Reinigungszyklus gespült. Danach wurden 500  $\mu\text{l}$  der Probe mit 9,5 ml Isoton vermischt und dem Gerät zugeführt. Die Zählung erfolgte in 2 automatischen Messungen, bei denen der Mittelwert als Zellzahl/ml wiedergegeben wurde. Die Anzahl überlebender Zellen wurde als Prozentsatz gegenüber der unbehandelten Probe berechnet. Jede Zählung wurde in einem zweiten unabhängigen Versuchsansatz wiederholt.

### **2.4.2 Zellzahlbestimmung mit dem Hämozytometer**

Zur visuellen Kontrolle der Ergebnisse des Coulter-Counters wurde eine Zellzahlbestimmung mit dem Hämozytometer (Neubauer-Kammer) durchgeführt. Zunächst wurde auf eine gereinigte Zählkammer ein Deckgläschen aufgebracht, so dass die Newtonschen Ringe in Erscheinung traten. Anschließend wurden beide Zählfelder des Hämozytometers mit jeweils einem Tropfen (ca. 15  $\mu\text{l}$ ) Zellsuspension gefüllt. Die Auswertung erfolgte mit einem Phasenkontrastmikroskop (Labovert FS, Leitz, Wetzlar) durch die Auszählung morphologisch intakter Zellen und anschließende Mittelwertbildung aller 8 großen Quadrate beider Zählfelder. Auch hier wurde die Anzahl überlebender Zellen als Prozentsatz gegenüber der unbehandelten Probe berechnet.

### **2.4.3 AlamarBlue-Test**

#### Prinzip

Dieses Assay basiert auf der Umsetzung des AlamarBlue vom oxidierten Zustand in den reduzierten Zustand aufgrund der Atmungsaktivität (Elektronentransport) der Mitochondrien. Diese kann als Farbänderung sowohl mit der UV-Spektrometrie als auch mit der Fluoreszenzspektrometrie gemessen werden. Ist durch eine zytotoxische Einwirkung die Umsetzung gehemmt, fällt der Farbumschlag deutlich geringer aus und

repräsentiert somit die verminderte Vitalität der Zellen. Die Vitalität wird dabei als Prozentsatz gegenüber einer unbehandelten Probe angegeben.

### Probenvorbereitung

Die Kultivierung und Exposition der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben in 6-Well-Platten. 4 Stunden vor dem Ende der Expositionszeit wurde die fertige AlamarBlue-Lösung zu 10 % in das Kulturmedium der wachsenden Zellen gegeben und durchmischt. Nach der Inkubation wurde 1 ml des Mediumgemisches partikelfrei abpipettiert und in eine saubere Messküvette aus Glas überführt. Die Messung erfolgte im direkten Anschluss mit dem UV-Spektrometer sowie mit dem Fluoreszenzspektrometer.

### Messung mittels UV-Spektrometrie

Bei der UV-Spektroskopie wird die Absorption von zwei Wellenlängen gemessen. Die eine ist charakteristisch für das oxidierte AlamarBlue und die andere für das reduzierte AlamarBlue. Anhand der Differenz dieser beiden Absorptionswerte lässt sich dann die Verminderung bzw. Erhöhung gegenüber einer Vergleichsprobe berechnen und dies kann als Maß für die Vitalität der Zellen herangezogen werden.

Die Absorption der zu untersuchenden Proben wurde jeweils mit zwei Wellenlängenspaaren an einem Unicam UV2, England, gemessen.

Wellenlängen für den reduzierten Zustand: 540 und 570 nm

Wellenlängen für den oxidierten Zustand: 600 und 630 nm

Zur Berechnung der Vitalität diene folgende Formel:

$$V = \frac{A_{540,570} - (A_{600,630} \times A_{0540,570} / A_{0600,630})}{A_{pos540,570} - (A_{pos600,630} \times A_{0540,570} / A_{0600,630})} \times 100$$

V: Vitalitätsrate in %

A: Absorptionswert der staubexponierten Probe bei angegebenen Wellenlängen

Apos: Absorptionswert der Positivkontrolle bei angegebenen Wellenlängen

A0: Absorptionswert des Kulturmediums der unbehandelten Zellen ohne AlamarBlue bei angegebenen Wellenlängen

### Messung mittels Fluoreszenzspektrometrie

Die Eigenschaft der Fluoreszenz wird auch beim AlamarBlue-Test genutzt. Hierbei ist die Fluoreszenz des verbrauchten (reduzierten) AlamarBlue am größten. Tritt eine Zellschädigung auf, wird weniger umgesetzt und es erniedrigt sich die Fluoreszenz des reduzierten AlamarBlue, was dann als Prozentzahl gegenüber einer unbelasteten

Vergleichsprobe angegeben werden kann. Die Fluoreszenz des oxidierten (unverbrauchten) AlamarBlue ist bei gleicher Wellenlänge sehr gering, so dass bei Zellschädigung oder Zellwachstum nur die Änderung der Fluoreszenz des reduzierten AlamarBlue im Kulturmedium zur Abschätzung der Vitalität repräsentativ ist. Mit einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm wurden die Messungen an einem Hitachi F-3000, Japan, durchgeführt. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$V = \frac{F_{590}}{F_{pos590}} \times 100$$

V: Vitalitätsrate in %

F: Fluoreszenzwert der staubexponierten Probe

F<sub>pos</sub>: Fluoreszenzwert der Positivkontrolle

#### 2.4.4 Hämolyse-Assay

Im Rahmen der Zytotoxizitätsmessungen wurde auch ein Hämolyse-Assay an humanen Erythrozyten zur Untersuchung des membranschädigenden Einflusses von Bentoniten durchgeführt. Dabei wird das zytolytische Potenzial bestimmter Stoffe anhand der Menge freigesetzten Hämoglobins durch die Lyse roter Blutkörperchen ermittelt.

Zur Durchführung wurden 1,25; 2,5; 5; 10; 20 mg von jedem Staub abgewogen, in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, durchmischt und für 10 Minuten beschallt. In der Zwischenzeit wurden 10 ml venöses Vollblut eines gesunden Spenders mit EDTA versetzt und bei 2.500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abtrennung des Plasmas wurden die Erythrozyten in derselben Menge physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieses wurde zweimal wiederholt. Nachfolgend wurden 4 x 1 ml Erythrozytensuspension in sterile 1,5 ml Polypropylen-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) gegeben. Diese wurden 5 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden 4 x 100 µl der konzentrierten Erythrozyten zusammen mit 3,6 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und auf Eis abgestellt.

Zur dreifachen Replikation der Messwerte wurden die homogenisierten Staubsuspensionen auf jeweils drei Reaktionsgefäße gleichmäßig verteilt. Zusätzlich dienten 300 µl physiologische Kochsalzlösung als Negativkontrolle sowie 300 µl 0,1% TritonX-100 als Positivkontrolle. Jedem Gefäß wurden 150 µl der vorbereiteten Erythrozytensuspension zugegeben. Es folgte die Durchmischung der Proben auf einem Schüttler für 10 Minuten bei Raumtemperatur und die anschließende Zentrifugation bei 2.000

U/min für 5 Minuten. Jeweils 100 µl des Überstandes wurden nachfolgend auf eine 96-Well-Platte verteilt.

Die Auswertung erfolgte durch ein UV-Spektrometer mit automatischem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 540 nm. Ausgehend von der optischen Dichte als Maß für die UV-Absorption diente die folgende Formel zur Berechnung der prozentualen Hämolyse:

$$H = (y-c)/m$$

H: Hämolyse in Prozent

y: optische Dichte

c: Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrolle

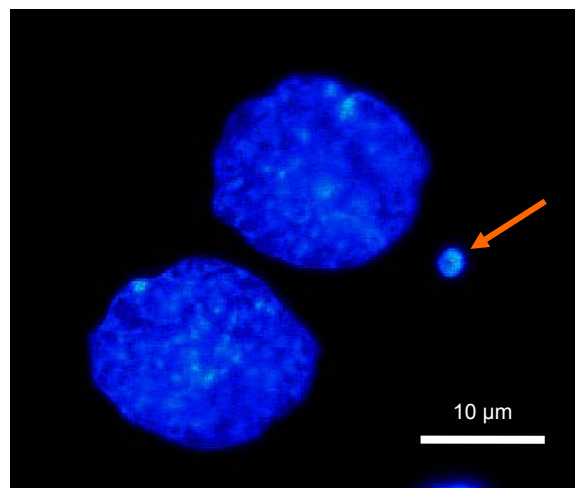
m: (Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrolle - Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrolle)/100

## 2.5 Ermittlung der direkten Genotoxizität

### 2.5.1 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest geht auf die Arbeiten von Boller und Schmid zu Beginn der 70er Jahre zurück, in denen Mikrokernformationen erstmalig als Indikator für chromosomale Veränderungen in Säugerzellen dienten [Boller und Schmid, 1970]. Mikrokerne sind chromatinhaltige rundliche Strukturen im Zytoplasma von Zellen, die während der Mitose gebildet werden und sich in unmittelbarer Nähe zum Hauptkern befinden (Abb. 11). Ihre Größe beträgt maximal  $\frac{1}{3}$  des Hauptkerns. Die Ultrastruktur der Mikrokerne entspricht der des normalen Kerns, wie z. B. die sie umhüllende Doppelmembran mit Nucleoporen.

Die Mikrokerninduktion gilt als allgemeiner Indikator chromosomaler Instabilität und wird zur Abschätzung des genotoxischen Potenzials von Agenzien *in vivo* und *in vitro* herangezogen. Für die Entstehung von Mikrokernen ist eine vorherige Zellteilung Voraussetzung. Deshalb setzt man dem Kulturmedium Cytochalasin B zu, was bewirkt, dass sich zwar der Zellkern noch teilt, aber eine komplette Zellteilung inhibiert wird [Fenech



**Abb. 11:** Mikrokernformation in binucleärer IMR90-Zelle.

et al., 2003]. Auf diese Weise entstehen binucleäre Zellen, die dann zur Auszählung der Mikrokerne herangezogen werden. Die beiden Tochterzellkerne sollten dabei dieselbe Größe und Färbecharakteristik haben. Sie dürfen miteinander verbunden sein, sofern die nucleoplasmatische Brücke kleiner als  $\frac{1}{4}$  des Kerndurchmessers ist. Die Auswertung kann nach entsprechender Anfärbung der Präparate z. B. durch DNA-Färbung (Bisbenzimid, DAPI) oder durch Giemsa-Färbung fluoreszenz- oder durchlichtmikroskopisch erfolgen.

### Durchführung

Zunächst wurden Quadriperm-Platten mit sterilen Objektträgern ( $a = 24 \text{ cm}^2$ ) bestückt. Danach erfolgte die Einsaat von ca.  $2 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$ . Die Zellen wurden bis zu einer 60 - 80 %igen Konfluenz 24 bis 48 Stunden inkubiert. Vor der Applikation der Stäube erfolgte ein Austausch des Kulturmediums durch das gleiche Medium mit einem Cytochalasin B-Anteil von  $3 \mu\text{g/ml}$ . Im unmittelbaren Anschluss wurden die Stäube (inkl. der Vergleichsmaterialien) auf die bewachsenen Objektträger in den Konzentrationen 1, 5, 10,  $15 \mu\text{g/cm}^2$  aufgebracht (s. 2.2.2), die dann für 36, 48 und 72 Stunden inkubiert wurden. Frisches Kulturmedium mit Cytochalasin B diente als Negativkontrolle. Die Versuchsansätze wurden durch einmalige Wiederholung dupliziert.

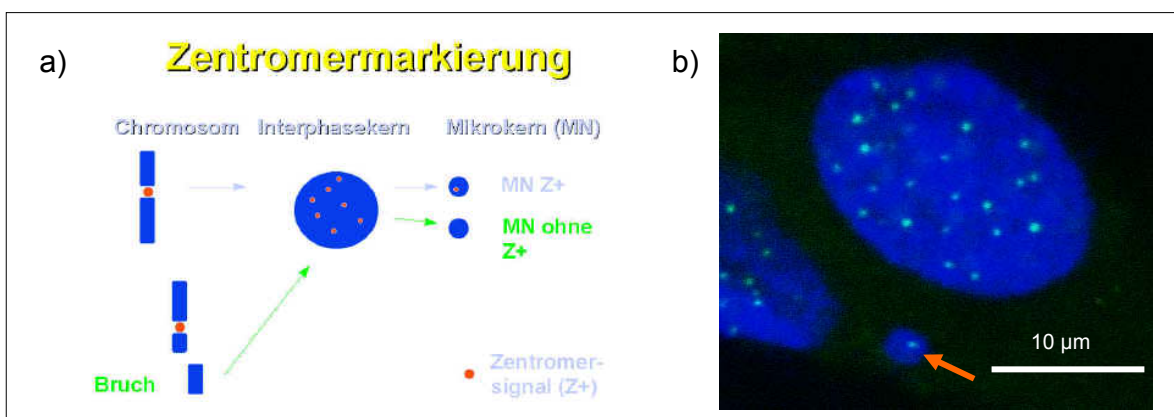
Nach Beendigung des Experimentes wurden die Präparate in PBS gewaschen und für mindestens 30 Minuten in Methanol bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  fixiert. Der Waschvorgang wurde nach der Fixierung wiederholt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Bisbenzimid (Höchst 33258;  $5 \mu\text{g/ml}$ , Sigma, Taufkirchen) für eine Minute. Dazu wurden vorher  $500 \mu\text{g}$  Bisbenzimid abgewogen und in 1 ml Ethanol gelöst. Um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden, wurden die Deckgläschen am Rand mit VALAP (Mischung 1:1:1 aus weißer Vaseline, Wollwachs, Paraffin; Merck, Darmstadt) versiegelt. Die so präparierten Objektträger wurden bei  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  im Dunkeln bis zur Auswertung aufbewahrt.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (s. 2.3.3). Dabei wurden von jeder Probe Mikrokerne von jeweils 1.000 doppelkernigen Zellen auf zwei verschiedenen Objektträgern ausgezählt. Die Mikrokerne wurden aus der Berechnung des arithmetischen Mittelwertes als Mikrokernrate auf 1.000 binucleäre Zellen angegeben.

## **2.5.2 Kinetochornachweis**

Der Kinetochornachweis erlaubt es, Aussagen über die Art einer genomischen Schädigung zu machen. Basierend auf einer Weiterentwicklung des Mikrokerntests lassen sich mit dieser Methode klastogene (chromosomenzerstörende) Effekte von aneugen (chromosomenausschleusende) Effekten unterscheiden. Dabei macht man sich

zunutze, dass die Zentromerregion immer in ganzen Chromosomen enthalten ist, während Chromosomenbruchstücke keine Zentromerregion aufweisen. Durch spezielle Antikörper (aus dem Serum von CREST-Syndrom-Patienten) ist es möglich, die im Zentromer befindlichen Kinetochore in normalen Kernen und in Mikrokernen sichtbar zu machen. Ist ein Mikrokern kinetochorpositiv, so ist das ein hinreichendes Merkmal dafür, dass es sich um eine aneugene Schädigung handelt. Lassen sich kinetochornegative Mikrokerne nachweisen, liegt eine klastogene Schädigung vor (Abb. 12). Anhand des prozentualen Anteils kinetochorpositiver oder kinetochornegativer Mikrokerne kann im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle eine Substanz als Aneugen oder Klastogen eingestuft werden.



**Abb. 12:** a) Prinzip des Kinetochornachweises b) Mikrokern mit positivem Kinetochorsignal (FITC) in einer IMR90-Zelle.

### Durchführung

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

1. Antikörper: Anti-Kinetochor Antikörper („positive control serum centromere“), (Antinuclear Antibody Test; Antibodies Incorporated, Davis, CA 95617, USA)
2. Antikörper: Anti-human IgG, FITC-Konjugat, Gamma-Ketten-spezifisch (Sigma, Taufkirchen), Verdünnung 1:20 in PBS + 0,5 % Tween 20, pH 7,4

Die Vorbereitung und Durchführung der Experimente erfolgte analog zum Mikrokern-test bei einer Konzentration der Stäube von  $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  und 72 Stunden Inkubationszeit. Nach der Fixierung wurden die Objektträger 5 Minuten in PBS mit 0,1 % Tween 20 (AppliChem, Darmstadt) gewaschen. Überschüssiges PBS wurde danach mit einem Papiertuch abgesaugt und jeweils ein Tropfen des ersten Antikörpers aufgebracht. Um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden die Präparate mit einem 18 mm-Deckgläschen verschlossen und in eine mit feuchten Papiertüchern ausgekleidete Petrischale gelegt. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ .

Anschließend wurden die Präparate in PBS mit 0,5 % Tween 20 zweimal für jeweils 5 Minuten gewaschen, worauf das Auftragen von  $20 \mu\text{l}$  des zweiten Antikörpers und ein

Eindeckeln der Objektträger wie zuvor folgte. Die Inkubation fand ebenso in befeuchteter Petrischale bei 37 °C für weitere 30 Minuten statt. Vor der Bisbenzimidfärbung (s. 2.5.1) wurden die Präparate erneut mit PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Zur Auswertung diente ein Fluoreszenzmikroskop (s. 2.3.3) bei 1.000-facher Vergrößerung. Es wurden von zwei Präparaten einer Probe jeweils mindestens 100 Mikrokerne auf kinetochorpositive Regionen überprüft.

## 2.6 Ermittlung der indirekten Genotoxizität

### 2.6.1 ROS-Nachweis

#### 2.6.1.1 Azelluläre Messung von OH-Radikalen durch Elektronenspinresonanz

Da freie Radikale instabile und kurzlebige Verbindungen sind, ist ihr Nachweis in der Zelle auf direktem Wege oft nicht oder nur unter sehr erschwerten Bedingungen möglich. Eine erprobte Methode, um Radikale azellulär zu analysieren, stellt die Elektronenspinresonanzmessung (ESR) im Ausgangsmaterial dar [Schins et al., 2002]. Als aussagekräftiger Messparameter wurde bei der Untersuchung der Bentonite das OH-Radikal gewählt.

Die Methode der ESR basiert auf der Messung der paramagnetischen Eigenschaften von Atomen/Molekülen im Magnetfeld. Dabei wird die Absorption der Energie eines äußeren magnetischen Feldes infolge der Spinresonanz der Elektronen gemessen. Daraus ergeben sich stoffspezifische Resonanzlinien, die für kleinere Radikale leicht interpretierbar sind und in einem Spektrum dargestellt werden können. Für OH-Radikale typisch ist ein Peakverhältnis der Resonanzlinie von 1:2:2:1.

Bei der hier eingesetzten ESR erfolgte die Messung der OH-Radikale über die Anbindung an 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-n-oxid (DMPO) zu DMPO-OH jeweils mit und ohne Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als semiquantitative Messung. Wasserstoffperoxid sollte hierbei die zelluläre Umgebung nachbilden, da es als Nebenprodukt der Atmungskette in den Zellen in niedrigen Konzentrationen vorhanden ist.

#### Durchführung

Zunächst erfolgte die Einwaage von jeweils 8 mg (20 mg bei Messung ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Probenmaterial in 1,5 ml Reaktionsgefäße. Diesen wurde jeweils 100 µl Aqua bidest (AAS-geprüft) zugegeben. Anschließend wurden die Proben durchmischt und 5 Minuten in einem Ultraschallbad beschallt. Als Negativkontrolle (Leerwert) kamen anstelle der Staubsuspensionen 100 µl Aqua bidest zum Einsatz. Zur Messung erfolgte die Zugabe von 200 µl einer 50 mM DMPO-Lösung (100 µl, 200 mM bei Messung ohne



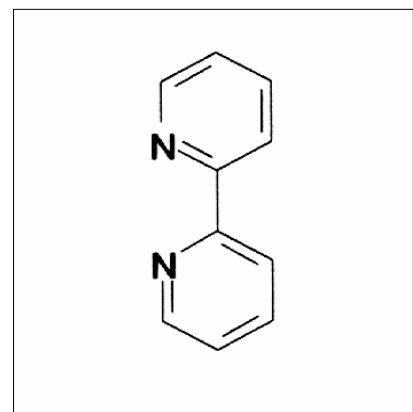
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und 100 µl einer 500 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Die Reagenzien lagen als Gebrauchslösung in PBS vor. Nach jeder Zugabe wurden die Proben durchmischt und anschließend in einem Wasserbad für 15 Minuten (3 Stunden bei Messung ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bei 37 °C im Schüttelbetrieb inkubiert. Über einen 0,2 µm-Feinfilter wurden die Suspensionen in eine 50 µl-Messkapillare transferiert und im direkten Anschluss dem ESR-Spektrometer (Miniscope MS 100, Magnettech, Berlin) zugeführt. Als Messparameter dienten folgende Einstellungen: Magnetfeld 3.360 G, Schleifenbreite 100 G, Scanzeit 30 Sekunden (Anzahl der „Scans“: 3), Modulationsumfang 1.975 G, Empfangungsverstärkungsfaktor 1.000.

Die Quantifizierung der Messsignale geschah durch Auswertung und Addition der Fläche aller vier Resonanzpeaks einer Resonanzlinie zu einer gemeinsamen Amplitude. Als Ausgabewert wurde immer der Mittelwert von drei Einzelmessungen einer Probe verwendet. Dabei wurden als Maßeinheit willkürliche ESR-Units angegeben.

### 2.6.1.2 Einsatz von Eisenkomplexbildnern

Die genomischen Effekte, die auf intrazellulär gebildete Radikale zurückführbar sind, wurden anhand der Wirkung von Eisenkomplexbildnern untersucht. Da Eisenkomplexbildner als Chelatoren wirken, können sie Eisen oder andere Übergangsmetalle komplexieren und sie an einer katalytischen Reaktion zur Radikalbildung (s. 1.4.2) hindern. Die Überprüfung einer verminderten Mikrokernbildung oder anderen genomischen Effekten nach Eisenchelatorzugabe kann daher als ein indirektes Verfahren zum unspezifischen Nachweis der Präsenz intrazellulär gebildeter ROS angesehen werden.

2,2'-Dipyridyl (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>) mit einem Molekulargewicht von 156,2 g/mol wirkt als ein solcher Eisenchelator. Die Strukturformel ist in Abb. 13 wiedergegeben. Bei der Komplexierung bindet das Metall- bzw. Eisenion an der Position 2,2' der beiden Stickstoffatome und verringert somit deren katalytische Wirkung in Hinblick auf die Entstehung freier Radikale. 2,2'-Dipyridyl wird durch die Dimerisation von Pyridin in Gegenwart von Oxidationsmitteln synthetisiert. Das hier verwendete 2,2'-Dipyridyl wurde von Frau Priv.-Doz. Dr. Rauen



**Abb. 13:** Strukturformel von 2,2'-Dipyridyl.

(Universitätsklinikum Essen, Institut für Physiologische Chemie) zur Verfügung gestellt. Der Versuchsansatz erfolgte gemäß dem Protokoll für den Mikrokerntest ohne Cytochalasin B. Die Stäube wurden hierbei in einer Konzentration von 1 und 15 µg/cm<sup>2</sup>

bei einer Expositionsdauer von 72 Stunden appliziert. Als Vergleichsstäube dienten Gips- und Quarzpartikel (DQ-12). Um einen Vergleich zwischen staubexponierten und eisenchelatorbehandelten plus staubexponierten Kulturen durchzuführen, wurde eine Testreihe ohne und eine Testreihe mit 2,2'-Dipyridyl-Zusatz im Kulturmedium angesetzt (100 µM). Dazu wurden 50 µl einer 10 mM Stammlösung in jeweils 5 ml Kulturmedium der vorgesehenen Testreihe gegeben. Die beiden Testserien wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte gemäß Abschnitt 2.5.1.

### **2.6.2 Zytokinnachweis**

Die Freisetzung von Entzündungsmarkern wurde anhand des Nachweises der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mit dem ELISA („Enzyme linked immuno sorbent assay“) überprüft. Auf dieselbe Weise wurde darüber hinaus auch die Freisetzung der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 getestet.

Aus der in Suspension wachsenden Kultur der makrophagenähnlichen MM6- und THP1-Zellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen auf jedes Well einer 24-Well-Platte mit jeweils 750 µl Kulturmedium verteilt. Die Applikation der Stäube erfolgte in den Konzentrationen 1, 10, 25 und 50 µg/cm<sup>2</sup> (THP1-Zellen) und 0,1, 1, 10, 50, 100 und 200 µg/cm<sup>2</sup> (MM6-Zellen) für 24 Stunden und bei MM6-Zellen zusätzlich für 72 Stunden. Danach wurden die Überstände zell- und partikelfrei abgehoben.

Die Analyse erfolgte entsprechend der jeweiligen Zytokine mittels eines 96-Platten „Sandwich“-ELISA (BD optEIA, BD Biosciences, Heidelberg). Dazu wurden jeweils 100 µl der Proben auf die Platte aufgegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde mit jeweils 100 µl Detektionslösung zugegeben, worauf die Zugabe eines Tetramethylbenzidin(TMB)-gepufferten Substratreagens folgte. Vor jeder Zugabe wurden die Wells gründlich gespült. Die Auswertung erfolgte nach Kalibrierung mit einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.

#### **2.6.2.1 Pyrogentest**

Durch die Bestimmung des proinflammatorisch wirkenden IL-6 nach der PyroCheck-Vollblutmethode [Hartung und Wendel, 1995] erfolgte die Testung der Bentonitproben auf Kontamination durch Endotoxine und andere pyrogen wirksame Substanzen.

Vollblut eines gesunden Spenders wurde unmittelbar nach der Abnahme mit Zellkulturmedium (RPMI 1640, Biochrom, Berlin) im Verhältnis 1:5 verdünnt. Um eine Gerin-

nung durch Rekalzifizierung auszuschließen, wurde dem Vollblut Heparin (Endkonzentration: 2 IE/ml; Hoffmann LaRoche, Grenzach-Whylen) zugegeben.

Zur Überführung der Pyrogene in die wässrige Phase wurden die Bentonitproben in sterilem, pyrogenfreiem Aqua bidest. (Sigma, Taufkirchen) in einer Konzentration von 5 mg/ml suspendiert. 100 µl der abzentrifugierten Überstände (2.000 g, 8 min) wurden mit 900 µl des vorbereiteten Vollblutes versetzt.

Durch die Zugabe von jeweils 100 µl Endotoxinstandard aus *Escherichia coli* in 900 µl des aufbereiteten Vollblutes wurden drei verschiedene Positivkontrollen in gleicher Weise hergestellt. Die Endotoxinstandards lagen in folgenden Konzentrationen vor: 0,02, 0,16 und 20,83 EU/ml. Als Negativkontrollen wurden 100 µl HBSS („Hank's balanced salt solution“) und 100 µl Aqua bidest., welches zur Suspension der Bentonite diente, ebenfalls mit jeweils 900 µl Vollblut versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben in offenen Reaktionsgefäßen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h. Nach Zentrifugation (3.000 g, 1 min) wurden die zellfreien Überstände bis zur IL-6-Messung bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung des freigesetzten IL-6 erfolgte mit einem kommerziellen ELISA (s. 2.6.2).

## 2.7 Detektierung der Apoptose

### 2.7.1 Molekularbiologische Analysen

Durch die gelelektrophoretische Auftrennung apoptosetypischer DNA-Fragmente (Multimere von ca. 180 Basenpaaren, s. 1.4.3) kann eine Apoptosebestimmung anhand der charakteristischen DNA-Leiter erfolgen. Die Vorteile dieser Methode sind schnelle Durchführbarkeit, geringer Geräteaufwand, Unabhängigkeit von Geräteparametern, zeitliche Entkopplung von Probenaufarbeitung und Analyse. Als nachteilig erweist sich jedoch die nicht quantitative Bestimmung.

#### 2.7.1.1 DNA-Isolierung

Um ausreichende DNA-Konzentrationen zu gewährleisten, erfolgte die Einsaat von  $1 \times 10^6$  IMR90-Zellen zwei Tage vor Versuchsbeginn in 125 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen. Danach wurden die Bentonitstäube wie zuvor in einer Konzentration von 20 µg/cm<sup>2</sup> appliziert. Als Positivkontrolle diente 1 µg/ml Mitomycin C (Medac, Hamburg).

Nach der Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, wie gewohnt trypsiniert und für 6 Minuten bei 1.200 U/min abzentrifugiert. Zur Isolierung der DNA kam ein kommerzielles DNA-Kit QIAamp (Qiagen, Hilden) zum Einsatz. Dazu wurde das gewonnene Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert und in 1,5 ml Reakti-

onsgefäße überführt. Anschließend wurden den Gefäßen 20 µl Protease und 200 µl Pufferlösung, bestehend aus chaotropischen Salzen, zugegeben. Um eine vollständige Lyse der Zellmembran zu gewährleisten, wurden die Gefäße pulsweise für 15 Sekunden durchmischt (Vortex) und 10 Minuten im Schüttelbetrieb bei 56 °C inkubiert. Zur Ausfällung der DNA schloss sich die Zugabe von 200 µl 100 %igem Ethanol an. Nach erneutem Durchmischen (pulsweise für 15 Sekunden) wurden die Proben in eine Filtersäule überführt und durch Zentrifugation für eine Minute bei 8.000 U/min von den lysierten Zellresten getrennt. Dieser Schritt wurde mit einer chaotropischen und einer natriumazidhaltigen Pufferlösung zweimal wiederholt. Der letzte Zentrifugierschritt wurde bei 14.000 U/min für drei Minuten durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde das die lysierten Zellreste enthaltende Filtrat verworfen. Es folgte ein weiteres Abzentrifugieren für eine Minute bei 14.000 U/min ohne vorherige Pufferzugabe. Im Anschluss an die Zugabe von 200 µl Elutionspuffer fand eine einminütige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Die Zentrifugation bei 8.000 U/min für eine Minute beendete die Elution der DNA. Das Filtrat mit der isolierten aufgereinigten DNA wurde dabei in neuen 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt.

Zur Kontrolle der Ausbeute wurde eine Konzentrationsbestimmung durch die Messung der optischen Dichte mittels UV-Spektrometrie durchgeführt. Dabei wurde die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Aus dem Verhältnis dieser beiden Absorptionswerte erhielt man zusätzliche Angaben über die Reinheit der gewonnenen DNA. Der Messung lag ein Verdünnungsverhältnis von 1:10 zugrunde. Dazu wurden 5 µl aus dem zuvor gewonnenen Eluat entnommen und mit 45 µl Aqua bidest. in einer sterilen Einwegküvette verdünnt. Zur Kalibrierung dienten 50 µl Aqua bidest.. Die Angabe der DNA-Konzentration erfolgte in µg/ml und basiert auf der folgenden Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

OD<sub>260</sub>: optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm

V : Verdünnungsfaktor

F : Multiplikationsfaktor

Um die DNA weiter aufzukonzentrieren, schloss sich eine nachgeschaltete Natriumacetat-Ethanol-fällung an. Eine Verringerung der Menge des Elutionspuffers führt zwar generell auch zu einer Konzentrationserhöhung, jedoch ist dann die eingesetzte Menge zu gering, um genügend DNA aus dem Filter auszuwaschen. Die Effekte würden sich also gegenseitig aufheben.

Zur Ausfällung wurden 100 µl Eluat 10 µl Natriumacetat (3 M) und 250 µl Ethanol (100 %) zugesetzt. Nach dem Durchmischen folgte eine 30-minütige Inkubation bei -20 °C. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei +4 °C mit 15.000 U/min (max. Drehzahl) für 20 Minuten an. Um die DNA-Konzentration um den Faktor 5 zu erhöhen, wurde nach Entfernen des Überstandes das Pellet in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen. Die konzentrierte DNA wurde bei -20 °C zwischengelagert.

### **2.7.1.2 Gelelektrophorese**

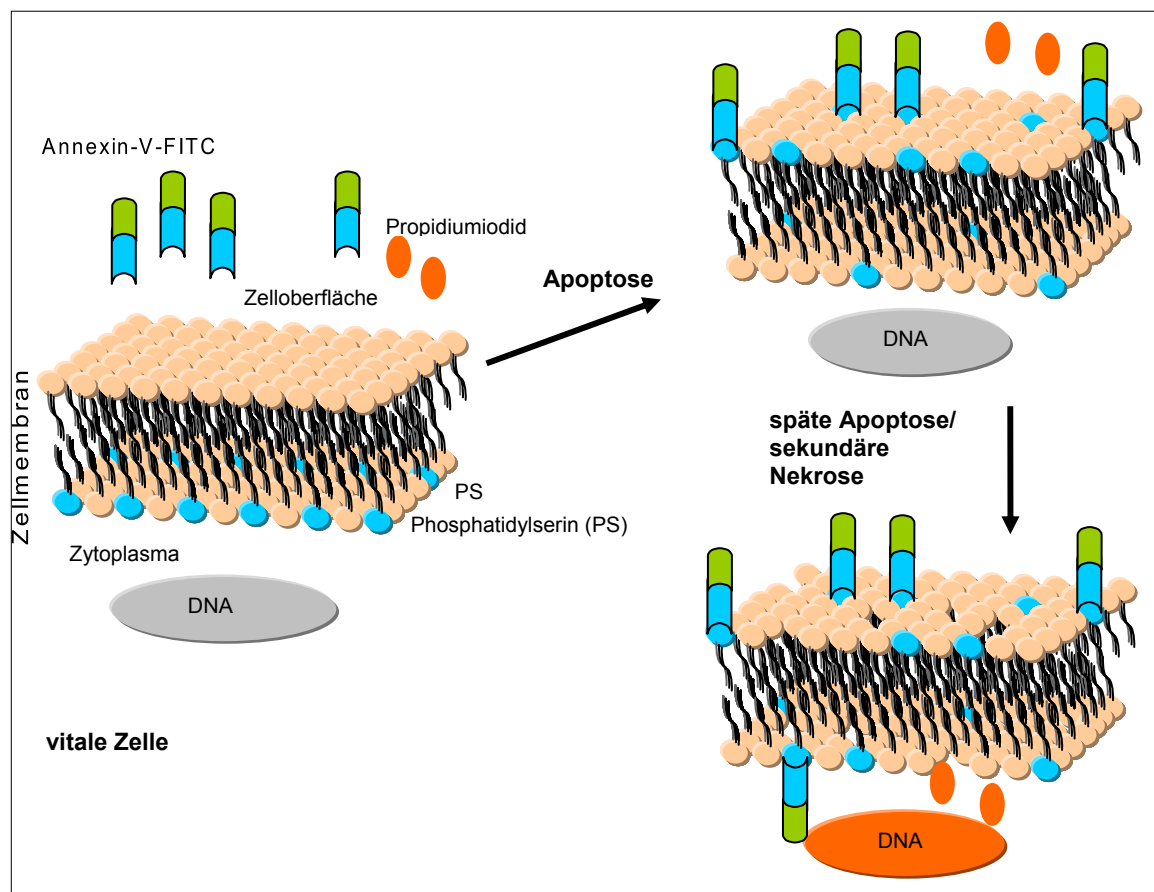
Die Auftrennung der DNA zum Nachweis der apoptotischen Fragmente erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurden 2 mg LE-Agarose (Cambrex, USA) mit 100 ml 50 %iger Trisborat EDTA-Pufferlösung (TBE) versetzt, ca. eine Minute im Mikrowellenherd bis zum Siedepunkt erhitzt und durch Schwenken des Glasgefäßes gelöst. Das Erhitzen und Schwenken wurde so lange wiederholt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde das Gel blasenfrei in die vorgesehene Form gegossen. Nach dem Erkalten wurde das verfestigte Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer getaucht, so dass es mit Puffer noch minimal überdeckt war. 8 µg DNA und 4 µl Ladepuffer wurden mit Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 25 µl durchmischt und in die Taschen gefüllt. Das Volumen der einzusetzenden DNA-Lösung errechnete sich aus der jeweiligen zuvor ermittelten DNA-Konzentration. Zusätzlich wurde eine Tasche mit 3 µl eines Längstandards (Gen Ruler 100 Bp DNA Ladder Plus, Fermentas, USA) an Stelle der DNA versehen. Danach erfolgte das Anlegen einer Gleichspannung von 100 Volt für 45 Minuten. Nach Beendigung des Durchlaufs wurde das Gel für 10 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Um eine stärkere Abgrenzung der Banden voneinander zu erreichen, wurde das Gel für 12 Minuten in Aqua dest. gewaschen. In einer UV-Kammer mit Photokamera erfolgte schließlich die Sichtbarmachung und Ablichtung der Bandenmuster.

### **2.7.2 Durchflusszytometrische Analysen (FACS)**

Die Durchflusszytometrie mittels FACS (Fluoreszenzaktivierter Zellsorter) bietet bei der Beurteilung apoptotischer Prozesse die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung und der Unterscheidung verschiedener apoptotischer Stadien. Voraussetzung ist die Ankopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes an die in Suspension vorliegenden Zellen.

Die hier angewandte Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC/Propidiumiodid (PI) stellt dazu eine etablierte Methode dar, bei der eine Unterscheidung zwischen früh-apoptotischen, spätapoptotischen/sekundärnekrotischen und nekrotischen Zellen

möglich ist [Vermees et al., 1995]. Der Apoptosenachweis beruht auf einer Translokation des Phosphatidylserins, einem wichtigen Phospholipid, von der Innenseite der Zellmembran auf ihre Außenseite (vgl. 1.4.3). Annexin-V, welches normalerweise bei der Exo- und Endozytose in eukaryotischen Zellen eine Rolle spielt, bindet mit hoher Affinität in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Phosphatidylserin und markiert durch das FITC-Konjugat die Apoptose. Wenn die Zellmembran noch intakt ist, gelangt nur der grün fluoreszierende FITC-Farbstoff an die Zelle. Dieses ist ein prägendes Kriterium für die frühe Apoptose (Abb. 14). Im späteren Verlauf der Apoptose wird die Zellmembran permeabel, und es gelangt Propidiumiodid in das Innere der Zellen, welches spezifisch an die DNA bindet. Somit erhalten spätapoptotische bzw. sekundärnekrotische Zellen eine Doppelfärbung (Abb. 14). Mit fortschreitendem Verlust der Membranintegrität gelangt auch Annexin-V in die Zelle und bindet an der inneren Plasmamembran.

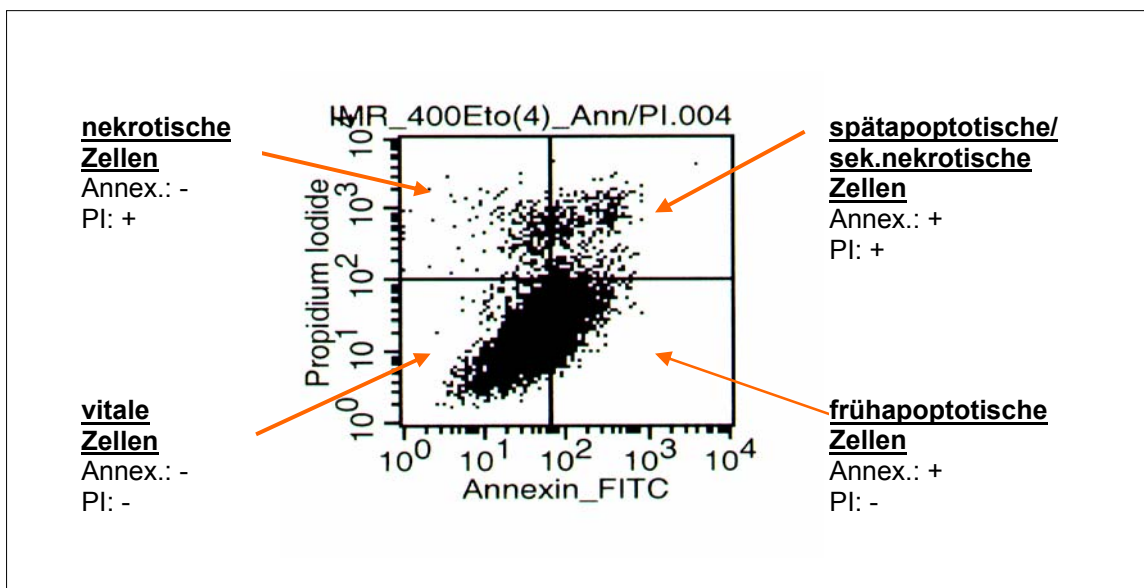


**Abb. 14:** Schema der Apoptosedetektion durch Annexin-V/PI-Färbung.

Bei der nekrotischen Zelle bindet das FITC-markierte Annexin-V nur an der Membranınnenseite. Da sich kein Phosphatidylserin auf der Außenseite befindet, ist das FITC-Signal deutlich abgeschwächt gegenüber dem roten Propidiumiodid-Signal, das von der PI-gefärbten DNA ausgeht.

In einem zweidimensionalen „Dot-Plot“ lassen sich bei der FACS-Analyse die vier unterschiedlichen Zellpopulationen darstellen (Abb. 15). Bei der FACS-Analyse handelt es sich um eine Einzelzellanalyse, bei der die Zellen den Strahlengang eines Lasers separat durchlaufen. Das emittierte Licht wird durch verschiedene Bandfilter in die fluorochromtypischen Wellenlängenbereiche aufgespaltet und durch Detektoren in elektrische Impulse umgewandelt. Durch die Summation dieser Impulse erhält man eine Dot-Plot-Darstellung oder ein Histogramm. Durch das Setzen von „Gates“ können bestimmte Bereiche aus der Gesamtdarstellung herausgefiltert werden und gesondert analysiert werden, wie beispielsweise die Abtrennung der Zellen von Staubpartikeln und Zelltrümmern. Jedem Wellenlängenbereich/Fluorochrom ist ein bestimmter Kanal zugeordnet, der von einer Achse des Koordinatensystems im „Dot-Plot“ repräsentiert wird (Abb. 15; x-Achse: FITC; y-Achse: PI).

Mittels Verstärkung, Schwellwertfestlegung und Kompensation der Kanäle können die jeweiligen Populationen differenziert und ausgewertet werden.



**Abb. 15:** „Dot-Plot“ einer durchflusszytometrischen Messung an Annexin-V-FITC/PI-gefärbten IMR90-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 400  $\mu\text{M}$  Etoposid.

### Durchführung

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden  $6 \times 10^5$  IMR90-Zellen in  $25 \text{ cm}^2$  Kulturflaschen eingesät, so dass am Versuchsende die geforderte Zellzahl von etwa  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  Zellen zur Verfügung stand. Nach dem Anwachsen und Ausbreiten der Zellen erfolgte die Applikation der Bentonitpartikel mit einer Konzentration von  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  in beschriebener Weise. Als Positivkontrollen wurden  $500 \mu\text{M}$  Etoposid (Sigma, Taufkirchen) und  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  Mitomycin C (Medac, Hamburg) verwendet. Die Inkubationszeit

betrug 72 h. Im Fall des Etoposids wurde für 24 Stunden inkubiert. Der Versuchansatz wurde zweimal wiederholt.

Um auch apoptotische Zellen zu erfassen, die sich bereits abgelöst hatten, wurde nach erfolgter Exposition das Kulturmedium gesammelt. Das Ablösen der Zellen geschah durch Trypsinbehandlung wie beschrieben. Dabei wurde die Einwirkzeit des Trypsins so kurz wie möglich gehalten, um die phospholipidreiche Membranstruktur möglichst unverändert zu erhalten. Zum erneuten Waschen wurden die abtrypsinieren Zellen mit dem gesammelten Kulturmedium 6 Minuten bei 1.200 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Vor der Färbung wurde das Zellpellet mit 100 µl eisgekühltem Bindungspuffer (Verdünnung 1:10; Immunotech, Frankreich) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Danach wurden 5 µl Propidiumiodid-Lösung (250 µg/ml; Immunotech, Frankreich) und 6 µl Annexin-V-FITC (fertige Gebrauchslösung; Immunotech, Frankreich) zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung folgte eine 30-minütige Inkubation bei +4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die gefärbten Zellen in 750 ml eisgekühltem Bindungspuffer aufgenommen und maximal eine Stunde vor Messbeginn auf Eis gelagert.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung diente ein FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Dabei wurde eine Durchflussmenge von 10.000 Zellen berücksichtigt. Die Steuerung des FACS und die Auswertung erfolgte über die „CELL-Quest“-Software (Becton Dickinson, Heidelberg) des angeschlossenen Computers.

## 2.8 Statistik

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse des Mikrokerntests, der Kinetochoranalyse und der Durchflusszytometrie wurde der zweiseitige Student t-Test angewendet. Dieser Test ist zu wählen, wenn zwei nicht verbundene Gruppen normalverteilter Daten miteinander verglichen werden und eine kleinere Anzahl von Stichproben vorliegt. Im Vergleich zu anderen Testmethoden wird hierbei die Schwankungsbreite der Einzeldaten berücksichtigt. Die zweiseitige Fragestellung besagt, dass bei der Ermittlung der Wahrscheinlichkeit (p) für die Gleichheit von Vergleichs- und Sollwert (Nullhypothese) immer deren Ungleichheit (Alternativhypothese) vorliegt. Vor jeder Testung erfolgte eine Überprüfung der Varianzgleichheit. Alle Berechnungen wurden mit SPSS 11.0 für Windows durchgeführt.

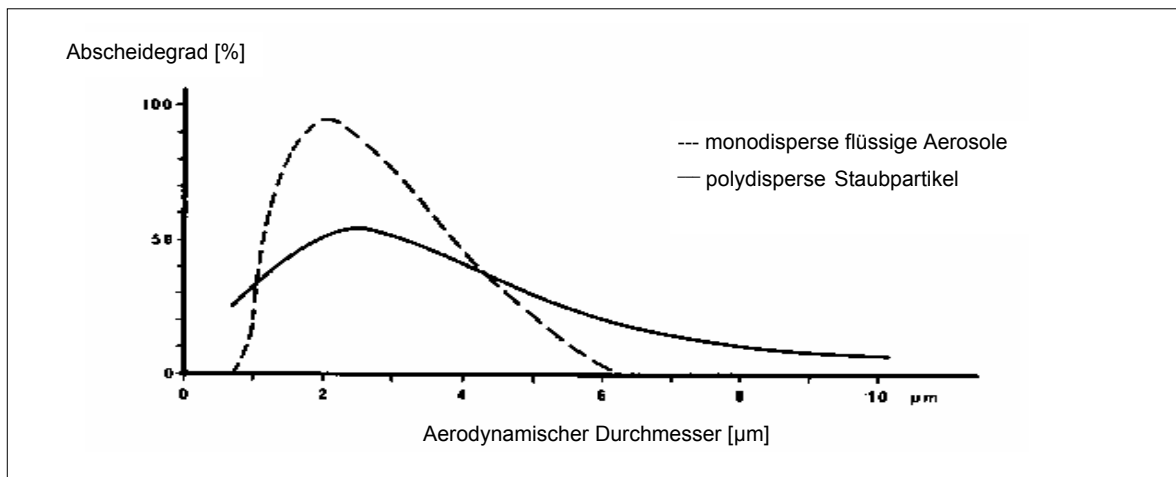


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Physikochemische Charakterisierung der Stäube

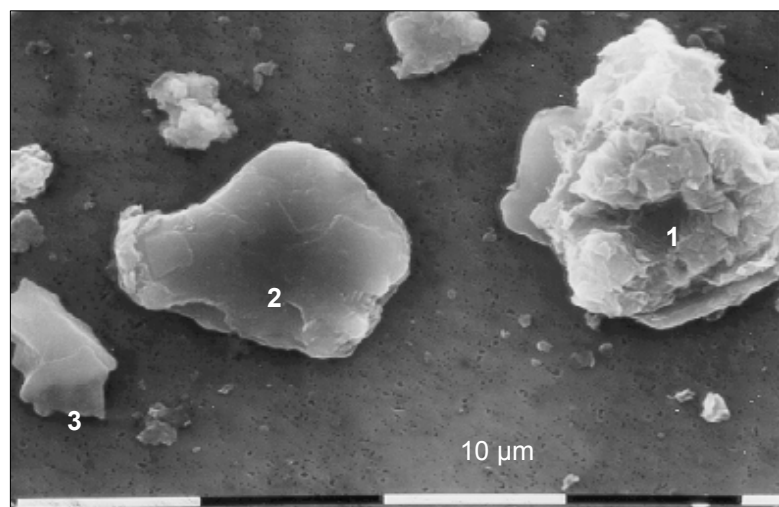
##### 3.1.1 Größenverteilung der Partikel

Die maximale Abscheidung des Zyklons TBF 50 lag bei Partikeln mit einem Durchmesser von etwa 2,5  $\mu\text{m}$ . Aus dem Verlauf der Trennungskennlinie (Abb. 16) ergibt sich, dass über 90 % der separierten Partikel einen Durchmesser unter 10  $\mu\text{m}$  haben und etwa 50 % kleiner als 2,5  $\mu\text{m}$  sind. Im Unterdruck zeigten die Stäube ein sehr unterschiedliches Trennungsverhalten, das von pappig bis gut fließend reichte.



**Abb. 16:** Abscheidefunktion der eingesetzten Trenneinrichtung (TBF 50) für Feinstaub, gemessen mit mono- und polydispersen Aerosolen [Quelle: Armbruster et al., 1983].

Die rasterelektronenmikroskopisch gewonnene Abschätzung der Partikelgeometrie repräsentiert die oben stehende Größenverteilung (Abb. 17). Eine feste Größenverteilung unter den kristallinen Einzelbestandteilen konnte nicht beobachtet werden. Der Ultrafeinstaubanteil lag



**Abb. 17:** Partikelgröße und typische kristalline Zusammensetzung des verwendeten Bentonits am Beispiel der Probe 1408: <sup>1</sup>Montmorillonit, <sup>2</sup>Glimmer, <sup>3</sup>Quarz; REM, 2.620-fache Vergrößerung.

weit unter 1 %.

### 3.1.2 Elementarzusammensetzung

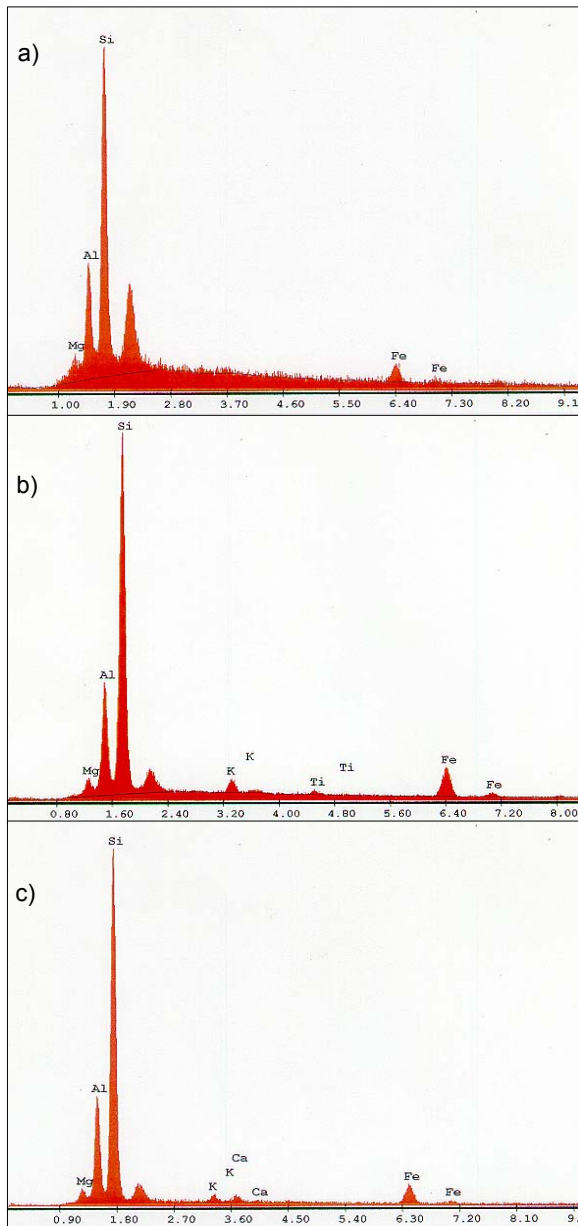
Eine auf der EDX-Analyse basierende umfassende Spurenanalyse unter Berücksichtigung aller kristallinen Bestandteile der jeweiligen Bentonitproben wurde von der Firma Süd-Chemie AG, Moosburg, durchgeführt (Tab. 5).

**Tab. 5:** Elementarzusammensetzung der verwendeten Bentonite

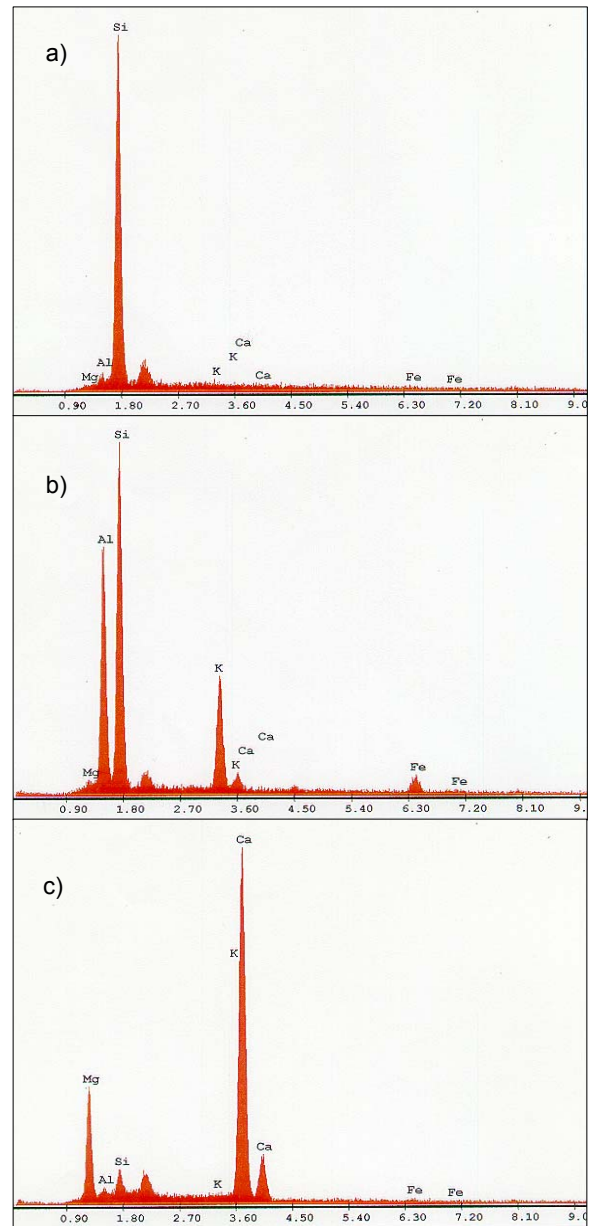
Element		0015	1400	1401	1402	1403	1404	1408
As	mg/kg	1	14	12	8	7	11	3
Pb	mg/kg	13	20	20	3	30	50	20
Cr	mg/kg	2	40	35	25	5	20	40
Cd	mg/kg	<1	0,1	0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,1
Ni	mg/kg	3	31	27	9	5	14	31
Zn	mg/kg	60	65	69	18	59	38	76
Cu	mg/kg	3	24	19	3	6	3	16
Hg	mg/kg	<1	0,2	0,2	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Mn	mg/kg	67	541	329	73	77	344	198
Ba	mg/kg	80	250	203	158	435	96	209
Sn	mg/kg	11	2	3	3	<1	5	6
Co	mg/kg	1	11	9	4	4	1	9
Mo	mg/kg	1	<1	<1	1	3	1	<1
Sb	mg/kg	<1	1	1	1	1	3	2
Tl	mg/kg	<1	<1	<1	<1	<1	3	<1
Se	mg/kg	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
V	mg/kg	2	37	34	33	24	9	36
Bi	mg/kg	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Ga	mg/kg	20	20	23	19	13	16	26
In	mg/kg	2	6	6	6	4	3	7
Li	mg/kg	18	65	73	48	125	500	57
La	mg/kg	24	37	40	8	35	24	41
Sc	mg/kg	3	11	12	9	4	3	13
Zr	mg/kg	150	93	121	175	169	83	124
Be	mg/kg	1	3	3	1	4	4	3
Y	mg/kg	13	35	33	6	17	25	31
S	mg/kg	270	96	83	761	183	29	63
Al	%	6,4	8,2	9,1	6,6	8,4	7,9	9,6
Fe	%	1,7	3,7	3,6	1,8	2,2	1,1	3,8
Ca	%	0,50	4,5	2,8	0,28	1,4	1,8	1,8
Mg	%	0,8	2,3	2,4	0,88	3,2	3,2	2,5
Na	%	0,4	1,9	1,5	0,17	3,6	0,22	0,20
K	%	0,10	1,2	1,0	0,88	0,29	0,75	1,1
Ti	%	0,39	0,17	0,17	0,21	0,17	0,06	0,17

Eine Elementaranalyse einzelner kristalliner Bestandteile wurde repräsentativ für die modifizierten Bentonite bei den Proben 1400 (alkalisch) und 1402 (sauer) sowie für den unbehandelten Bentonit bei der Probe 1408 mittels EDX durchgeführt. Dieses erfolgte durch eine Einzelpartikelanalyse von willkürlich gestreuten Partikeln unter dem REM. Dadurch war es möglich, einzelne Partikel mit übereinstimmender Morpho-

logie einem bestimmten Mineral zuzuordnen und die Reinheit der Staubproben zu überprüfen (Abb. 18 und Abb. 19).



**Abb. 18:** EDX-Spektren eines Montmorillonitpartikels von: a) 1400, b) 1402, c) 1408; Charakteristisch ist der hohe Aluminium- und Siliziumanteil. (Größeneinteilung der x-Achse in keV)



**Abb. 19:** EDX-Spektren von Partikeln der Bentonitprobe 1408: a) Quarz, b) Glimmer, c) Dolomit. (Größeneinteilung der x-Achse in keV)

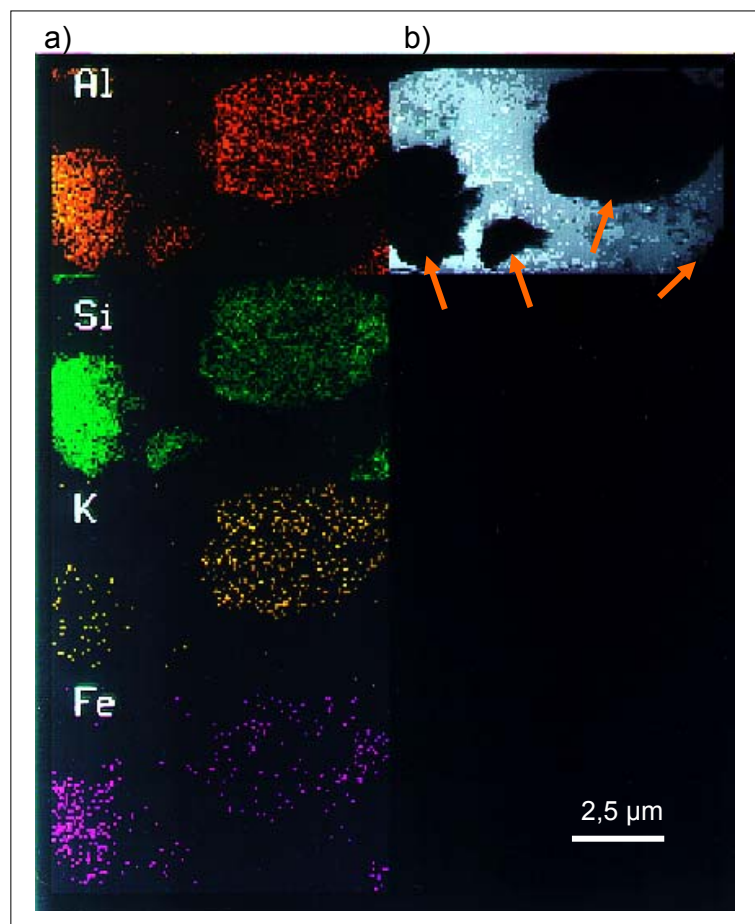
Der Peak bei 2,2 keV (in allen Abbildungen rechts neben Silizium) erklärt sich durch die Goldbedampfung der Präparate. Die Peakflächen repräsentieren den prozentualen Massenanteil der Elemente eines Partikels. Nach Einzelanalyse mehrerer Montmorillonitkristalle ( $n = 10$ ) wurde durch die Mittelwertbildung der jeweiligen Peakflächen die elementare Zusammensetzung des Kristalls bestimmt. Von den drei unter-

suchten Bentoniten ergab sich für den Hauptbestandteil Montmorillonit die in Tab. 6 dargestellte Verteilung.

**Tab. 6:** Elementarzusammensetzung des Montmorillonits von drei Bentoniten  $\pm$  SD; für 1402 lag nur eine Messung vor.

Element	1400	1402	1408
Si	56,2 $\pm$ 4,4 %	59,7 %	57,4 $\pm$ 8,1 %
Al	22,6 $\pm$ 2,4 %	17,9 %	24,9 $\pm$ 1,7 %
Fe	5,1 $\pm$ 1,2 %	14,3 %	4,8 $\pm$ 1,6 %
Mg	8,1 $\pm$ 5,5 %	4,2 %	7,5 $\pm$ 1,7 %
K	6,5 $\pm$ 7,6 %	2,8 %	0,7 $\pm$ 1,3 %
Ti	-	1,1 %	-

Alle untersuchten Partikel wiesen die für Bentonitbestandteile typischen Röntgenspektren auf. Kontaminationen durch andere Bestandteile konnten nicht nachgewiesen werden. Auffällig viel Eisen wies der Montmorillonit in Probe 1402 auf. Die Montmorillonitpartikel einer Bentonitart hatten oft unterschiedliche Kalium- und Magnesiumanteile. Abb. 20 zeigt die Verteilung der Elemente in einem Montmorillonitpartikel. Inter- und intralaminares Kalium und Eisen waren gleichmäßig innerhalb eines Partikels verteilt.



**Abb. 20:** Elementverteilung innerhalb des Montmorillonitpartikels (Probe 1408): a) Lokalisation der Metallionen, b) Lage der Partikel (Pfeile).

### 3.1.3 Mineralische Zusammensetzung

Ausgehend von der EDX-Analyse konnte für die aus dem Abbaugbiet Moosburg ausgewählten Bentonite folgende Verteilung der Begleitminerale stichprobenartig bestätigt werden (Tab. 7).

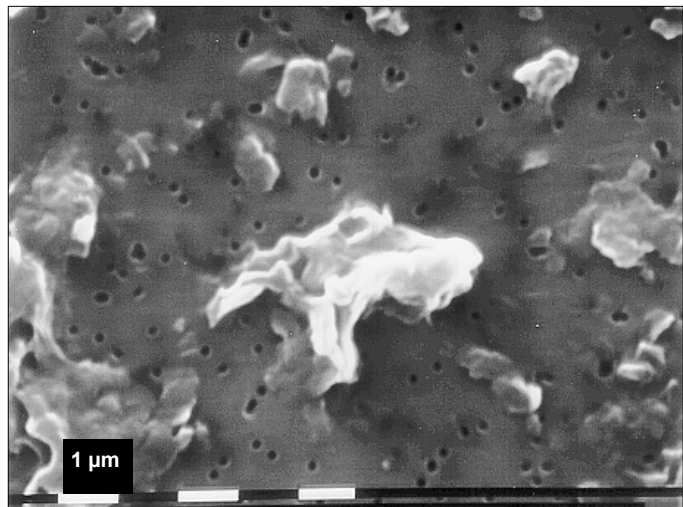
**Tab. 7:** Mineralische Bestandteile der Bentonite in % (nach Angaben der Süd-Chemie AG).

Probe	Quarz	Kaolin	Glimmer	Calcit	Dolomit	Feldspat	Cristobalit
0015	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1 - 2
1400	5 - 6	1	3 - 4	1	-	-	-
1401	4 - 5	1 - 2	2 - 3	2	1	-	-
1402	4 - 5	0,5	3 - 4	-	-	-	-
1403	0,5	-	-	1	-	1 - 2	-
1404	1	-	-	1	-	-	-
1405	1	-	-	4 - 5	-	-	-
1408	5 - 6	6 - 7	3 - 4	1	1	-	0,5

Die untersuchten Bentonite enthielten zwar hohe Anteile an elementarem Silizium, der fibroseauslösende kristalline Quarzanteil lag jedoch nur im Bereich von 0,5 - 6 %.

Neben dem Quarzanteil war auch der Kaolinanteil relativ ungleichmäßig in den Proben verteilt. Die Morphologie der kristallinen Bestandteile war deutlich voneinander zu unterscheiden. Beispiels-

weise weist Montmorillonit eine typische Blätterstruktur auf, während Quarz glatte quaderförmige und Glimmer eher glatte rundliche Kristalle bildet (Abb. 17). Bei alkalisch behandelten Bentoniten konnte häufig beim Montmorillonit eine Aufweitung der Schichtstruktur beobachtet werden (Abb. 21).

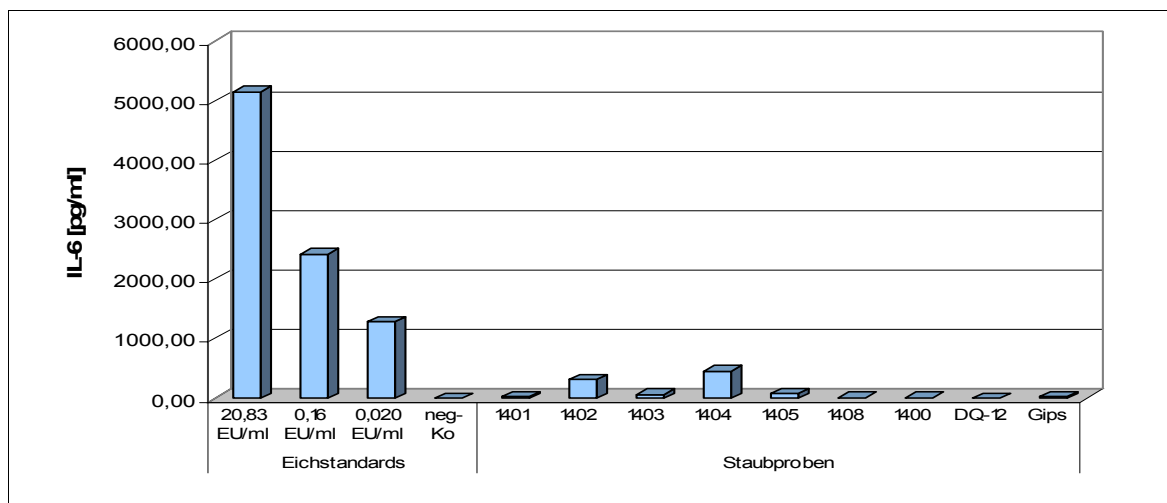
**Abb. 21:** Montmorillonitkristall nach alkalischer Behandlung, Probe 1400; REM, 10.400-fache Vergrößerung.

### 3.2 Nachweis pyrogen wirksamer Inhaltstoffe

Pyrogen wirksame (fiebrerzeugende) Inhaltsstoffe können biogenen Ursprungs sein, wie z. B. Endotoxine, und beeinflussen die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Um derartige Effekte bei der Beurteilung der Genotoxizität von Tonmineralen zu berücksichtigen, wurde der Pyrogenstatus der vorliegenden Partikel über die Messung des freigesetzten IL-6 im Vollblut ermittelt.

Wie aus Abb. 22 ersichtlich ist, war die durch ELISA ermittelte Menge an IL-6 in allen Proben sehr gering. Alle Werte lagen unterhalb des niedrigsten Eichstandards, was

einer Nachweisgrenze von 0,02 Endotoxin-Units/ml entspricht. Somit war der in den Staubproben enthaltene Anteil pyrogen wirksamer Substanzen vernachlässigbar. Mit nennenswerten Endotoxinbelastungen, die zu einer Verfälschung der indirekten und direkten Genotoxizitätstests führen können, ist daher nicht zu rechnen. Die vorgefundenen Effekte gehen ausschließlich auf die mineralischen Komponenten des Untersuchungsmaterials zurück.



**Abb. 22:** Endotoxinnachweis durch Bestimmung der IL-6-Freisetzung von Bentonitüberständen im Vollblut.

### 3.3 Zelluläre Aufnahme von Partikeln in IMR90-Zellen

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme wurden die humanen Lungenfibroblasten gegenüber alkalischem (1400) und unbehandeltem (1408) Bentonit in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  für 24 Stunden exponiert. Der Quarzgehalt dieser Bentonite lag einheitlich bei 5 - 6 %.

#### 3.3.1 Lokalisation der Partikel

Die in die Zellen eingedrungenen Partikel waren ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 23). Der Zellkern oder andere Kompartimente, wie z. B. das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder die Mitochondrien wurden nicht durchdrungen. Häufiges Kennzeichen der aufgenommenen Montmorillonitpartikel war die Ausbildung einer partikel-

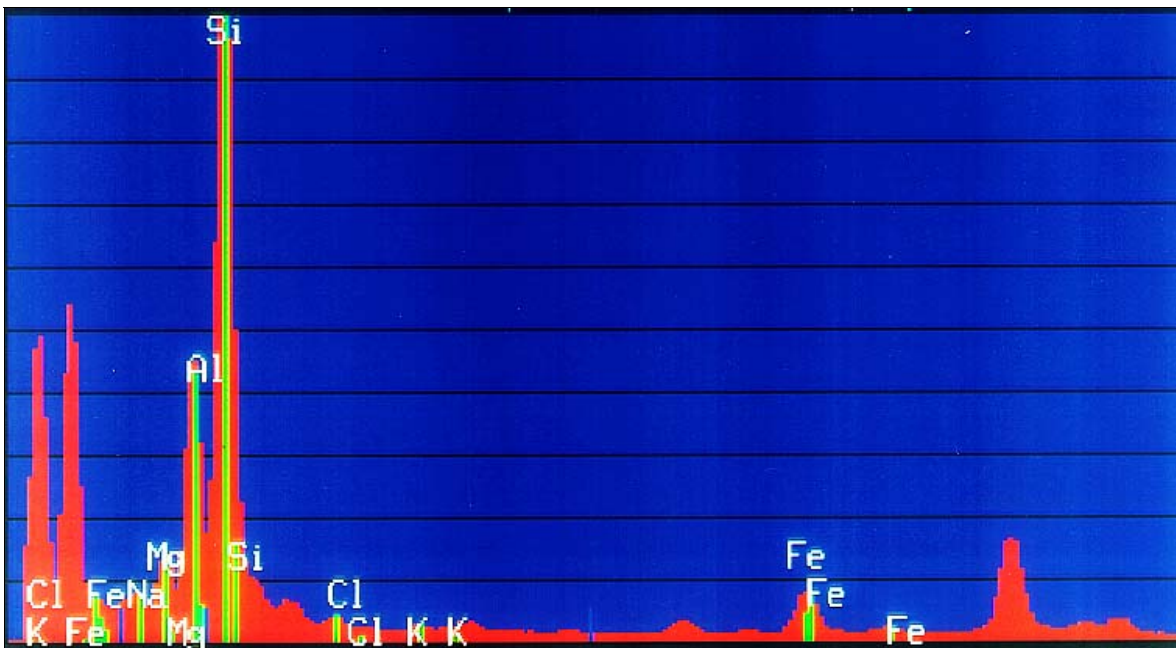


**Abb. 23:** In IMR90-Zelle eingeschlossener Montmorillonitpartikel mit typischer geschichteter Struktur (Pfeil); a) Mitochondrien, b) Ausläufer des ER; TEM, 15.000-fache Vergrößerung.

umschließenden Verkapselung (Abb. 23).

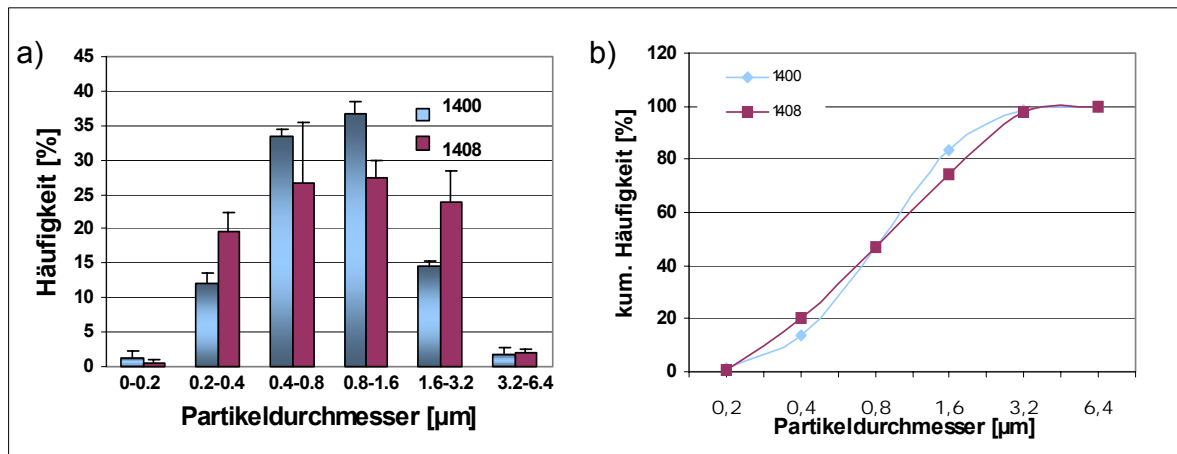
### 3.3.2 Partikelselektion

Die Untersuchung der bentonitbehandelten Fibroblasten durch TEM/EDX ergab, dass nur das aluminium- und siliziumhaltige Tonmineral Montmorillonit von den Zellen aufgenommen wurde. Nebenbestandteile wie z. B. der kristalline Quarz und andere Minerale gelangten nicht in die Zellen. Alle intrazellulären Montmorillonitpartikel wiesen das in Abb. 24 gezeigte Röntgenspektrum auf.



**Abb. 24:** EDX-Spektrum von Montmorillonit (Probe 1400) zur Analyse eines intrazellulären Bentonitpartikels.

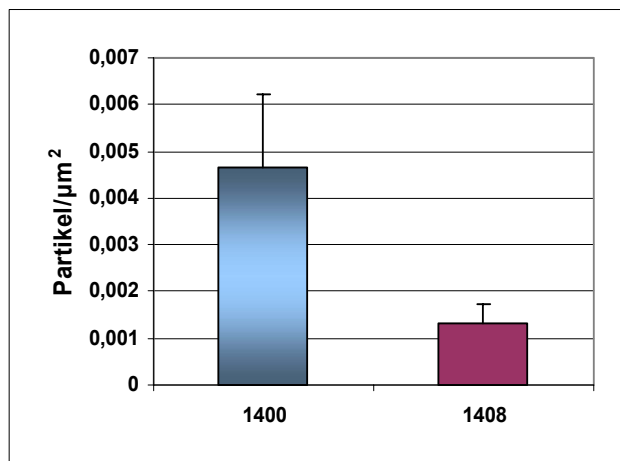
Etwa 95 % der aufgenommenen Bentonitpartikel hatten einem Durchmesser von 0,2 - 3,2  $\mu\text{m}$ . Die Häufigkeiten verschiedener Größenfraktionen sind in Abb. 25 dargestellt. Partikel mit einem Durchmesser von 0,4 - 1,6  $\mu\text{m}$  wurden bevorzugt aufgenommen. Der lineare Anstieg in diesem Bereich zeigt in der kumulierten Häufigkeitsverteilung (Abb. 25 b), dass Partikeldurchmesser von 0,4 - 1,6  $\mu\text{m}$  in den Zellen gleichmäßig gestreut waren. Dieser Bereich war von Partikeln der unbehandelten Bentonitprobe etwas breiter gestreut. Im Vergleich zur alkalisch behandelten Probe war die Aufnahme im Hinblick auf die Partikelgröße hier weniger selektiv.



**Abb. 25:** Häufigkeitsverteilung der Partikelgrößen aufgenommener Bentonite: a) einzelne Häufigkeiten, b) kumulierte Häufigkeit.

### 3.3.3 Einfluss der Partikelmodifikation

Aus der Gegenüberstellung zweier Bentonitarten wird ersichtlich, dass der alkalisch behandelte Bentonit um das 3,5-Fache stärker von den Zellen aufgenommen wurde als der unbehandelte. Die Auszählung der Sektorfelder im TEM ergab hier einen Wert von  $4,6 \times 10^{-3}$  Partikel/ $\mu\text{m}^2$ . Demgegenüber ergab sich bei den mit nativem Bentonit behandelten Zellen ein Wert von  $1,3 \times 10^{-3}$  Partikel/ $\mu\text{m}^2$  (Abb. 26).



**Abb. 26:** Zelluläre Aufnahme eines alkalisch behandelten (1400) und eines unbehandelten (1408) Bentonits.

## 3.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität

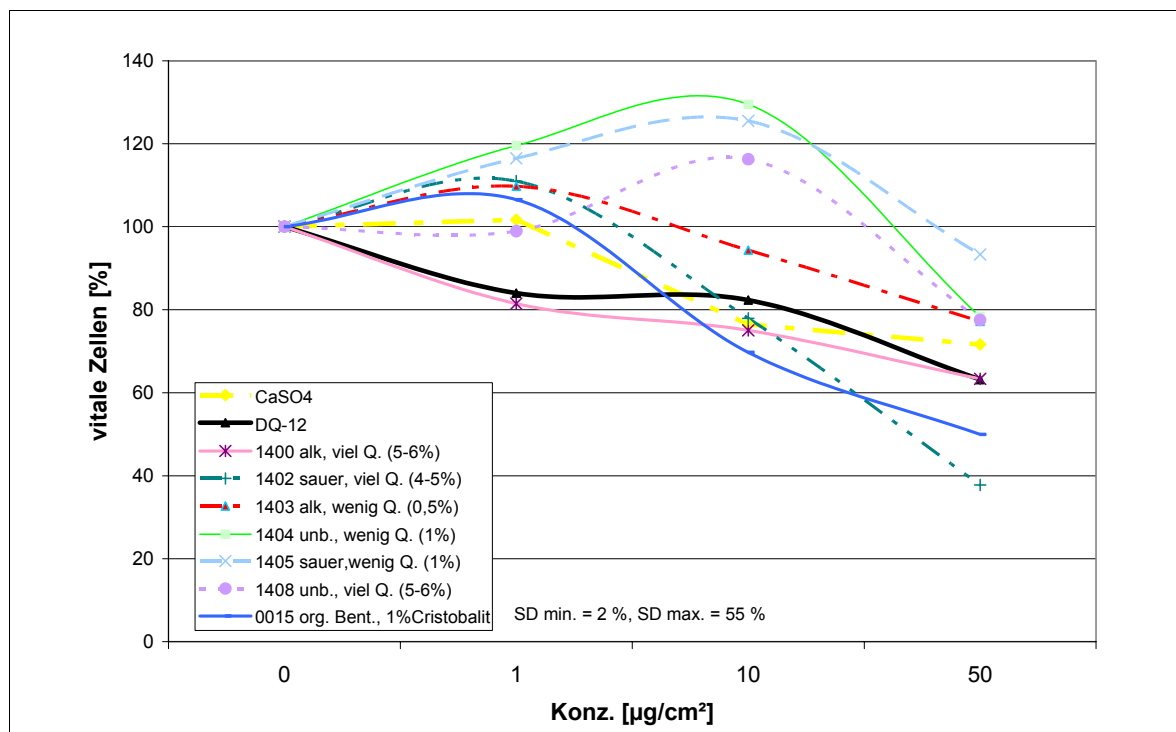
### 3.4.1 Zytotoxizität in IMR90-Zellen

Das zytotoxische Verhalten der einzelnen Bentonitproben wies anhand der Zellzahlbestimmung mit dem Coulter-Counter nach der Exposition ( $1 - 50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  für 24 Stunden) sehr unterschiedliche Ergebnisse auf (Abb. 27). Rohbentonite und Bentonite mit geringem Quarzanteil zeigten in der höchsten auswertbaren Konzentrationsstufe ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) höhere Vitalitätsraten als das Kontrollmaterial Gips. Sie erwiesen sich damit als schwach zytotoxisch. Bei der Probe 1405 lag die Vitalitätsrate in der höchsten Konzentrationsstufe immer noch bei 93 %. Auffällig war auch, dass die Applikation einiger dieser Bentonite in niedrigen Konzentrationsbereichen ( $1$  und  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) so-



gar zur erhöhten Proliferation der Zellen führte. Modifizierte Bentonite mit höherem Quarzanteil lagen in der Endkonzentration unterhalb der Vitalitätsrate von Gips, wobei zwei Proben auch unterhalb der Vitalitätsrate von DQ-12-behandelten Zellen lagen. Mit Vitalitätsraten von z. T. unter 50 % hatten sie auf das hier eingesetzte In-vitro-Testsystem eine vergleichsweise starke zytotoxische Wirkung. Etwa genauso toxisch wie DQ-12 bei  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  war die Probe 1400, die bei den anderen Konzentrationen aber auch unterhalb der Vitalitätsrate von DQ-12 lag.

Die Konzentrationsstufe von  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  erwies sich als unspezifisch zu hoch und nicht mehr auswertbar. Durch die Überfrachtung der Zellen mit Partikeln war eine Trennung zwischen Zellen und Agglomeraten von Partikeln nicht mehr möglich. (Einzeldaten sind in Tab. A 1, Anhang, dargestellt).

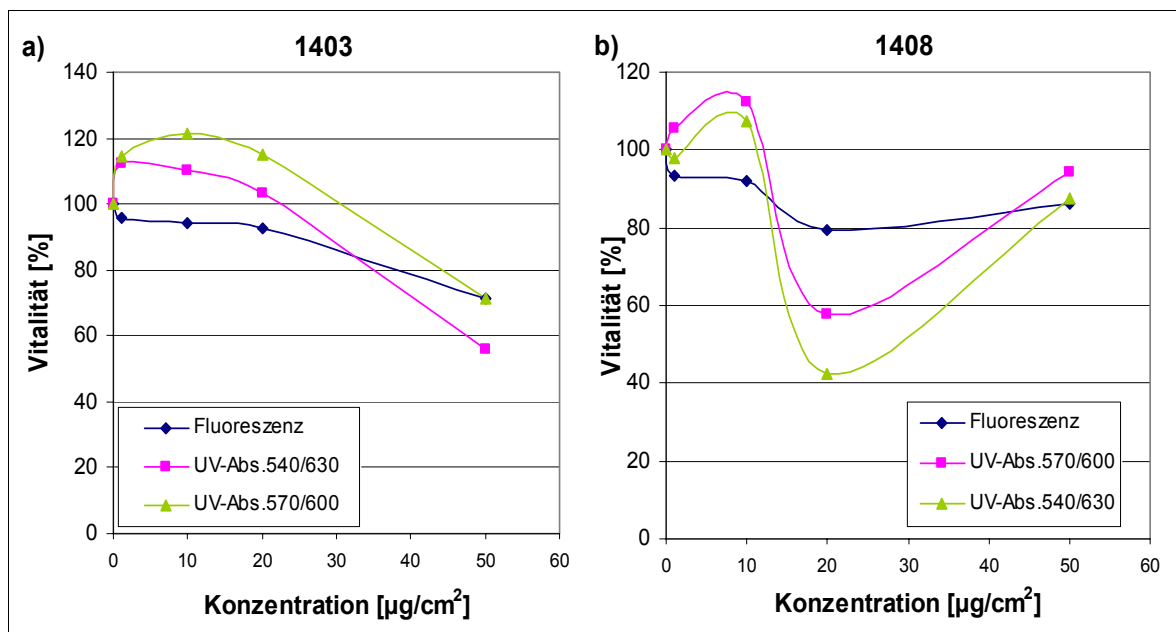


**Abb. 27:** Zytotoxizitätsbestimmung an IMR90-Zellen mittels Coulter-Counter nach 24-stündiger Exposition gegenüber verschiedenen Bentonitarten.

### 3.4.2 Zytotoxizitätsbestimmung anhand der Atmungsaktivität in IMR90-Zellen

Zur ergänzenden Überprüfung der zytotoxischen Effekte von Bentoniten anhand der Vitalfunktion von Zellen, der Zellatmung, wurde der auf einer Redox-Reaktion basierende AlamarBlue-Test durchgeführt. Aufgrund der abnehmenden mitochondrialen Atmungsaktivität stellte sich auch hier ein konzentrationsabhängiger Vitalitätsverlust der Zellen in dem zuvor verwendeten Konzentrationsbereich ein. Die fluoreszenz- und photospektrometrisch ermittelten Vitalitätskurven zeigten untereinander eine gute

Übereinstimmung. Im Vergleich zu den durch Zellzahlbestimmung mit dem Coulter-Counter ermittelten Kurvenverläufen ergaben sich z. T. jedoch größere Unterschiede, so dass die hier gewonnenen Ergebnisse nicht in direktem Zusammenhang mit den zuvor ermittelten Ergebnissen standen und weniger eindeutig waren. Beispielhaft sind in Abb. 28 die fluoreszenz- und photospektrometrisch ermittelten Vitalitätsraten zweier mit unterschiedlichen Bentoniten behandelter IMR90-Kulturen dargestellt. Auch hier zeigten die mit den Bentonitarten 1403 und 1408 behandelten Kulturen eine Zellproliferation durch die Zunahme des Redoxpotenzials bei niedrigen Konzentrationen von etwa  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Die weiteren Messergebnisse sind im Anhang Tab. A 2 dargestellt.



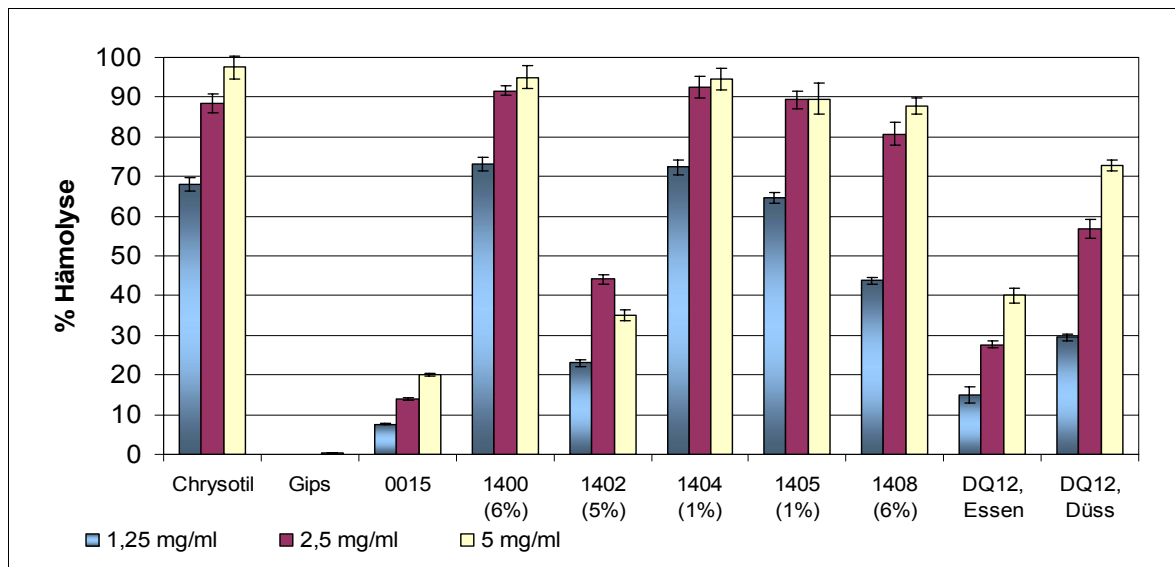
**Abb. 28:** Im AlamarBlue-Test ermittelte Vitalitätsverläufe von IMR90-Zellen bei verschiedenen Bentonitkonzentrationen ( $1 - 50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ): a) Probe 1403, b) Probe 1408. Vergleich verschiedener Messmethoden: Fluoreszenzspektrometrie und UV-Spektrometrie bei verschiedenen Wellenlängen; Expositionszeit: 24 Stunden.

### 3.4.3 Hämolytische Aktivität

Mit dem Hämolyse-Assay sollte das zytolytische Potenzial und damit die membran-schädigenden Wirkungen von Bentoniten untersucht werden. Aus Abb. 29 ergibt sich, dass die meisten Bentonite unabhängig vom Quarzgehalt und der Modifikation eine hohe hämolytische Aktivität aufwiesen.  $\frac{2}{3}$  aller Proben zeigten in den 2,5 und 5 mg/ml konzentrierten Bentonitsuspensionen eine 80 - 95 %ige Lyse der roten Blutkörperchen. Bei den Konzentrationen von 10 und 20 mg/ml ergab sich kein weiterer Anstieg (Tab. 8). Bei der niedrigsten Konzentration von 1,25 mg/ml betrug die maximale Hämolyse 73% (Abb. 29).

Im Vergleich dazu wurden von Gips- und Quarzstaub wesentlich weniger Erythrozyten lysiert; die maximale Hämolyse durch Gips betrug bei einer Konzentration von 20 mg/ml 12% und bei 5 mg/ml nur noch 0,5 %. Bei Quarzpartikeln aus zwei unterschiedlichen Chargen lagen die Hämolysewerte konzentrationsabhängig zwischen 15% und 74 %.

Ein ähnlich hohes membranschädigendes Potenzial wie Bentonit zeigte nur der Faserstaub Chrysotil aus der Gruppe der Serpentinaste. Bei 5 mg/ml erreichte Chrysotil durch eine fast vollständige Hämolyse von 98 % den Maximalwert aller getesteten Stäube.



**Abb. 29:** Hämolytisches Potential von Bentoniten in Erythrozyten (Konzentrationsbereich von 1,25 - 5 mg/ml, max. Quarzgehalt (%) in Klammern).

**Tab. 8:** Berechnete Werte der Hämolyse von Bentoniten in % über alle getesteten Konzentrationsbereiche; n.a.: nicht analysiert, ± SD

Hämolyse in % Staubprobe	Konzentration in mg/ml				
	1,25	2,5	5	10	20
Chrysotil	68,0 ± 1,7	88,5 ± 2,4	97,4 ± 2,8	85,2 ± 4,3	86,3 ± 1,5
CaSO <sub>4</sub>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0	5,3 ± 0,1	12,3 ± 0,1
0015	7,6 ± 0,1	14,0 ± 0,3	20,1 ± 0,2	23,7 ± 0,8	50,0 ± 0,2
1400	73,1 ± 1,6	91,5 ± 1,2	95,0 ± 2,9	81,7 ± 3,2	83,5 ± 3,0
1402	23,0 ± 0,8	44,0 ± 1,0	35,0 ± 1,2	5,4 ± 0,0	42,8 ± 0,5
1404	64,6 ± 1,8	92,5 ± 2,7	94,5 ± 2,6	82,0 ± 3,1	76,6 ± 3,9
1405	72,3 ± 1,3	89,3 ± 2,2	89,4 ± 3,9	78,6 ± 2,5	76,4 ± 2,5
1408	43,8 ± 0,8	80,7 ± 2,9	87,7 ± 2,0	73,9 ± 1,7	72,0 ± 2,1
DQ12, Essen	15,0 ± 1,9	27,6 ± 0,9	39,9 ± 1,8	74,0 ± 0,8	74,7 ± 2,6
DQ12, Düss.	29,5 ± 0,9	56,7 ± 2,3	72,7 ± 1,4	n.a.	n.a.
Neg. Kontr.	0,0 ± 0,0				
Pos. Kontr.	99,9 ± 9,8				

Wie aus diesen Daten ersichtlich wurde, ist der Zellschädigungsmechanismus von Bentoniten in erster Linie auf primäre zytolytische Effekte zurückzuführen, was sich in einer starken Auflösungserscheinung der Zellmembran äußerte.

### **3.5 Untersuchungen zur direkten Genotoxizität**

#### **3.5.1 Mikrokerninduktion in IMR90-Zellen**

Die Anzahl induzierter Mikrokerne, als Indikator der genotoxischen Wirkung, war in den bentonitstaubbehandelten (Konzentrationen: 1 - 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  für 36 - 72 Stunden) Lungenfibroblasten verhältnismäßig gering. Nur in wenigen Fällen konnte ein signifikanter Anstieg (meist nach 48 und 72 Stunden) beobachtet werden. Die höchsten Mikrokernraten (Signifikanz:  $p < 0,001$ ) wiesen quarzpartikelbehandelte Zellen auf. Maximal wurde hier die Bildung von  $22,0 \pm 2,8$  Mikrokernen nach 48 Stunden in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ermittelt.

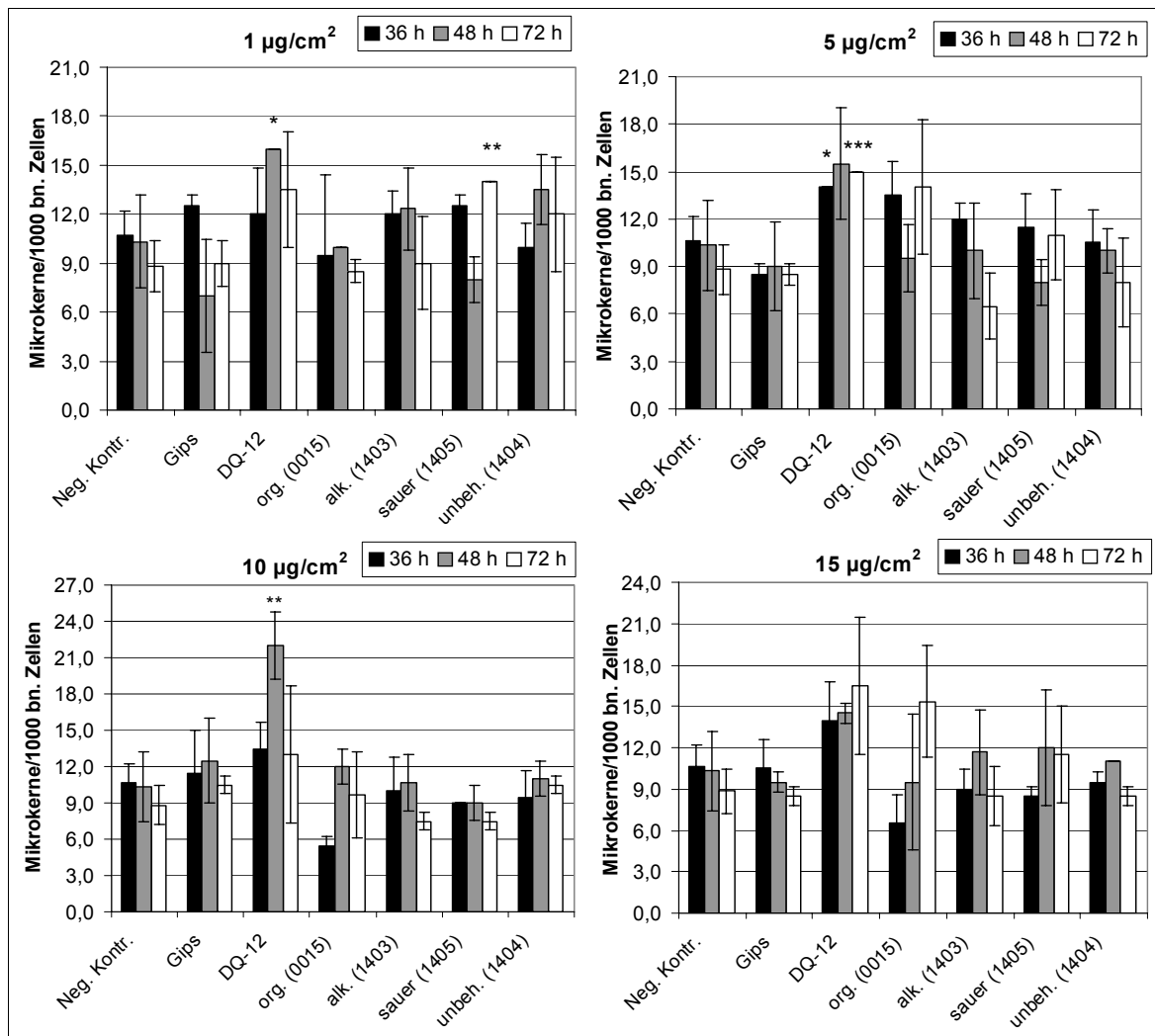
Da Gips weder Eisenionen hat noch faserförmig ist, eignete es sich gut als zusätzliche Negativkontrolle. Gipspartikel zeigten in keinem der Konzentrations- und Zeitbereiche Effekte.

Die Spontanrate der in IMR90-Zellen gebildeten Mikrokerne lag zwischen  $10,7 \pm 1,5$  (36 Std.) und  $8,8 \pm 1,6$  (72 Std.) Mikrokernen. Zur Kontrolle einer intakten Zellteilung wurde Cytochalasin B eingesetzt (s. 2.5.1). Der prozentuale Anteil der daraus entstandenen binucleären Zellkerne stieg von 25 % nach 36 Stunden auf 31 % nach 72 Stunden Inkubation in der unbehandelten Kontrolle. Allgemein zeichnete sich nach 72 Stunden Inkubation ein leichter Rückgang der Mikrokernbildung ab (Abb. 30, Abb. 31), da vermutlich durch nekrotische Prozesse mehr geschädigte doppelkernige mikrokernbehaftete Zellen abstarben als neue hinzukamen. Eine umfassende Darstellung aller Einzeldaten findet sich im Anhang (Tab. A 3) wieder.

##### **3.5.1.1 Einfluss der chemischen Modifikation**

Aus der Gegenüberstellung der Mikrokernraten von IMR90-Zellen, die mit unterschiedlich modifizierten Bentoniten behandelt worden waren, ergaben sich in den meisten Fällen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 30). Nur bei der Applikation des sauer aktivierten Bentonits 1405 zeigte sich im niedrigsten Konzentrationsbereich nach 48-stündiger Exposition ein signifikanter Anstieg der Mikrokernrate um das 1,4-fache. Bei allen anderen Bentonitkonzentrationen lagen (mit Ausnahme des nicht signifikanten Anstiegs bei Probe 0015) die Mikrokernraten innerhalb der Schwankungs-

breite der Negativkontrolle (unbehandelte Zellen). Die hier verwendeten Bentonite hatten einheitlich einen niedrigen Quarzgehalt von 0,5 - 1 %.

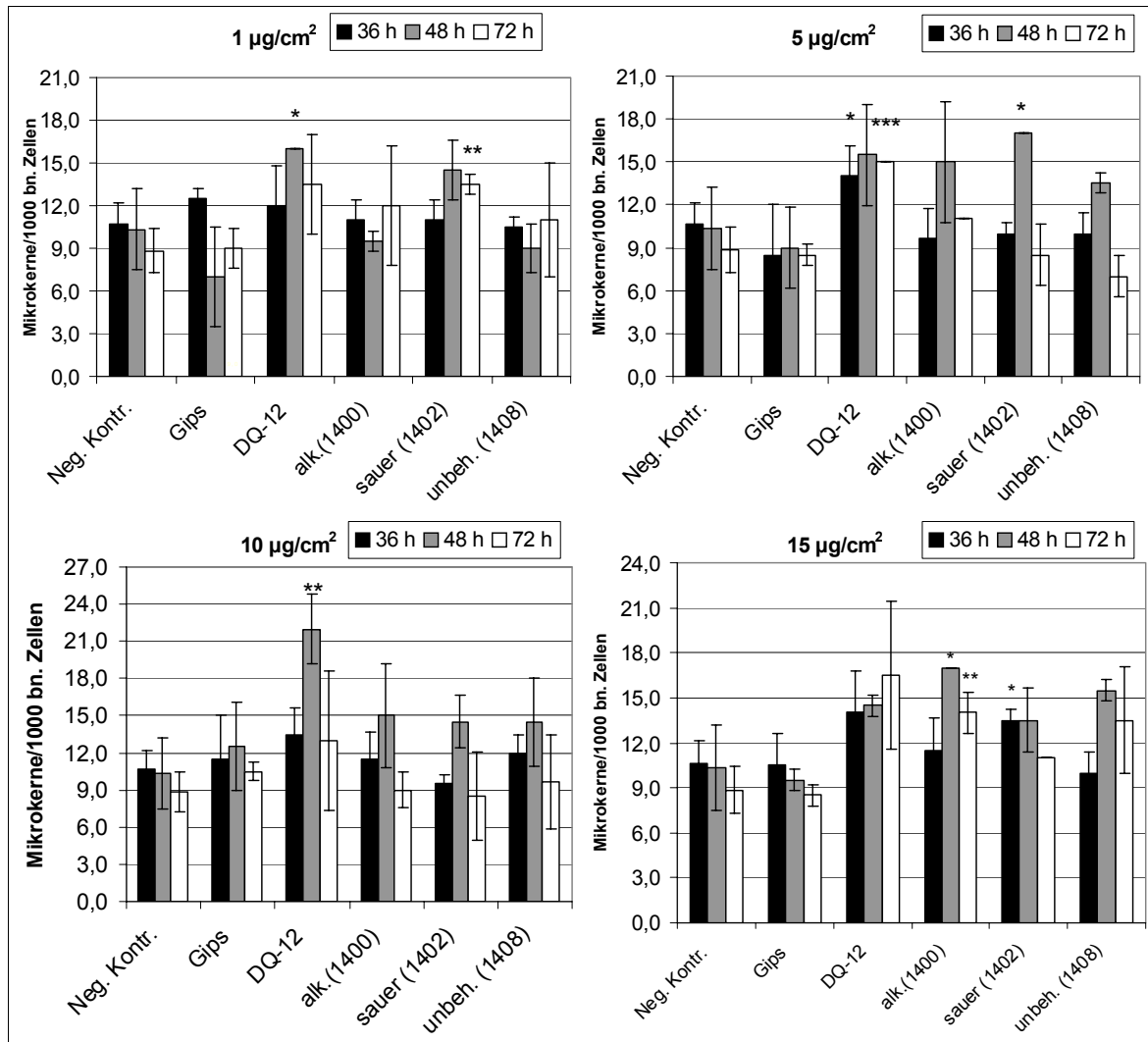


**Abb. 30:** Konzentrations- und zeitabhängige Mikrokernelinduktion in IMR90-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlich modifizierten Bentoniten mit niedrigem Quarzgehalt. Die Konzentrationen variierten von 1 - 15 µg/cm<sup>2</sup>. Die Expositionszeiten lagen zwischen 36 h und 72 h; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

### 3.5.1.2 Einfluss des Quarzgehaltes

In der Gruppe der Fibroblasten, die gegenüber Bentoniten mit höherem Quarzgehalt exponiert waren, ließ sich ein schwach signifikanter ( $p < 0,05$ ) bis signifikanter ( $p < 0,01$ ) Anstieg der Mikrokerne häufiger beobachten als bei den Fibroblasten, die mit schwach quarzhaltigen ( $\leq 1\%$ ) Bentoniten behandelt waren. Dieser Anstieg trat vor allem im Konzentrationsbereich von 15 µg/cm<sup>2</sup> auf (Abb. 31). Maximal wurden 17 Mikrokerne gezählt, die sich nach 48-stündiger Exposition in den mit modifizierten Bentoniten behandelten Zellen fanden (1400 bei 15 µg/cm<sup>2</sup>; 1402 bei 5 µg/cm<sup>2</sup>) (Abb. 31). Wie dieses Beispiel zeigt, war der Anstieg der Mikrokernelbildung nicht immer konzentrationsabhängig. Bei dem nicht aktivierten Bentonit 1408 zeigte sich in den Zellen

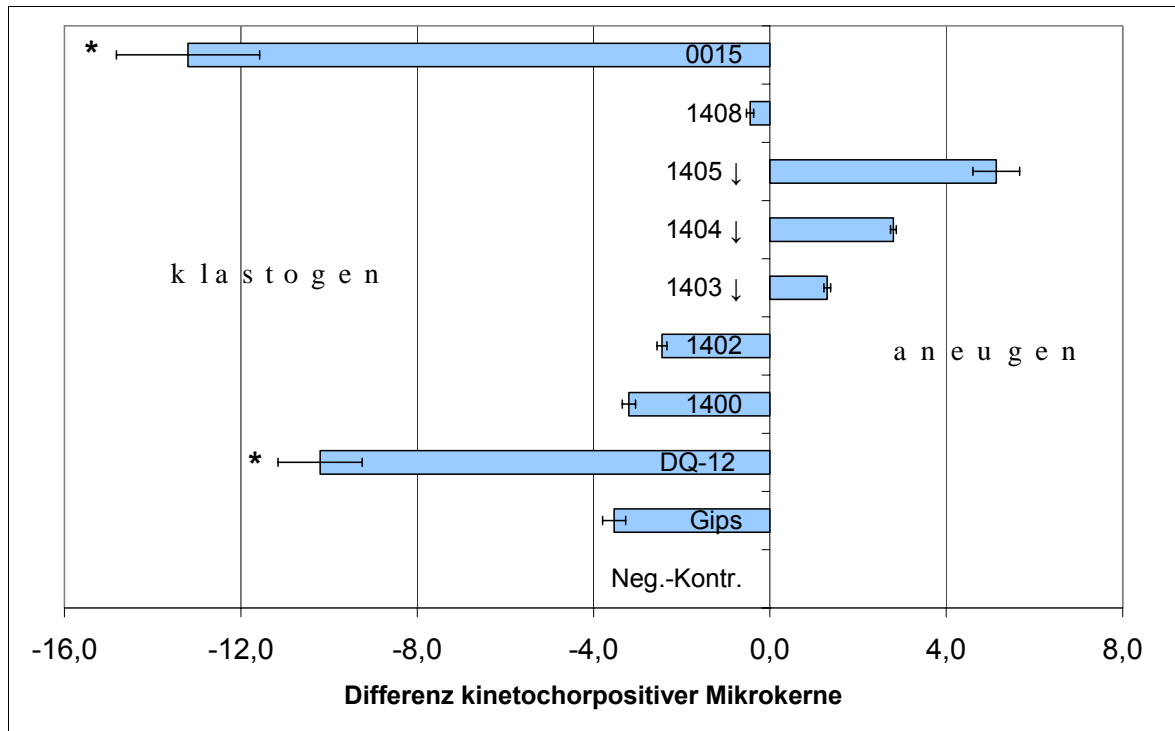
zwar auch ein leichter Mikrokernanstieg, jedoch war dieser in keinem Konzentrations- und Zeitbereich signifikant. Es war auffällig, dass die mit modifizierten Bentoniten behandelten Zellen erst dann höhere Mikrokernraten gegenüber den mit Rohbentonit behandelten Zellen aufwiesen, wenn der Quarzgehalt in den Bentoniten stieg.



**Abb. 31:** Konzentrations- und zeitabhängige Mikrokerninduktion in IMR90-Zellen nach Behandlung mit Bentoniten, die höhere Quarzgehalte (4 - 6 %) aufwiesen. Die Konzentrationen variierten von 1 - 15 µg/cm<sup>2</sup>. Die Expositionszeiten lagen zwischen 36 h und 72 h; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

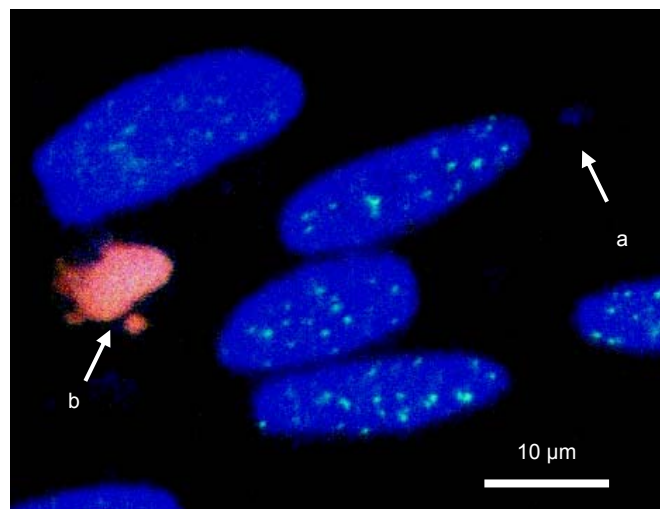
### 3.5.2 Nachweis aneugener und klastogener Effekte

Es konnten in den IMR90-Zellen nach Partikelexposition (15 µg/cm<sup>2</sup> für 72 Stunden) sowohl klastogene als auch aneugene Effekte nachgewiesen werden. Die Differenzierung erfolgte durch den Vergleich der Anzahl FITC-markierter (kinetochorpositiver) Mikrokerne gegenüber der Negativkontrollzahl. Dabei zeigte sich in Folge der Applikation von Bentoniten mit niedrigem Quarzgehalt eine Häufung aneugener Effekte (Abb. 32). Diese Effekte waren jedoch nicht signifikant.



**Abb. 32:** Verteilung klastogener und aneugener Effekte von Bentonitstäuben in IMR90-Zellen als Differenz der kinetochorpositiven Mikrokerne zur unbehandelten Kontrolle; ↓Quarzgehalt ≤1%, \*p < 0,05.

Mit steigendem Quarzgehalt ergab sich eine Verschiebung von aneugen zu klastogenen Effekte, was durch die Zunahme kinetochornegativer Mikrokerne deutlich wurde (Abb. 33). Besonders auffällig wurde dies am Beispiel des Quarzstaubes, dessen Signalverteilung mit 10 % weniger kinetochorpositiven Mikrokerneln gegenüber der unbehandelten Kontrolle ein schwaches Signifikanzniveau erreichte ( $p < 0,05$ ). Vergleichbar gering war die Anzahl kinetochorpositiver Mikrokerne in den mit Probe 0015 behandelten Fibroblasten (Abb. 32). Hier wurde der Maximalwert der kinetochornegativen Mikrokerne mit 54 % ermittelt. Da dieser Bentonit jedoch anstelle des sonst vorhandenen  $\alpha$ -Quarzes 1 - 2 % Cristobalit enthielt, ist dieser Effekt nicht direkt mit dem von anderen Bentoniten vergleichbar.



**Abb. 33:** Kinetochornegativer Mikrokern (a), neben Bentonitpartikel (b) (Probe 1402) in humanen Lungenfibroblasten; Laserscanmikroskopische Abbildung, 1.200-fache Vergrößerung

Die Anzahl kinetochorpositiver Mikrokerne betrug in den unbehandelten Zellen etwa 59 % und stieg im Fall der Behandlung mit Bentonit 1405 auf maximal 64 % an. Die weiteren Verteilungen in den staubbehandelten Zellen sind in Tab. 9 dargestellt.

**Tab. 9:** Prozentsatz kinetochorpositiver ( $K^+$ ) und kinetochornegativer ( $K^-$ ) Mikrokerne in bentonit-behandelten IMR90-Zellen.

Substanz	Gezählte Mikrokerne	$K^+$ [%]	$K^-$ [%]	$\pm SD$ [%]	Diff: $K^+_{Kontr.} - K^+_{Probe}$
unbeh.Kontr.	500	59,2	40,8	$\pm 5,2$	0,0
CaSO <sub>4</sub>	300	55,7	44,3	$\pm 4,2$	-3,5
DQ-12	300	49,0	51,0	$\pm 4,6$	-10,2
1400	300	56,0	44,0	$\pm 2,6$	-3,2
1402	400	56,8	43,3	$\pm 2,6$	-2,4
1403	200	60,5	39,5	$\pm 3,5$	1,3
1404	200	62,0	38,0	$\pm 1,4$	2,8
1405	300	64,3	35,7	$\pm 6,7$	5,1
1408	400	58,8	41,3	$\pm 10,6$	-0,4
0015	200	46,0	54,0	$\pm 5,7$	-13,2

Im Allgemeinen hatte die Modifizierung keinen Einfluss auf die Art chromosomaler Veränderungen. Eine Ausnahme scheint lediglich bei der organischen Modifizierung (Probe 0015) möglich, die in den Zellen eher Chromosomenbrüche verursachte. Tendenzielle, aber nicht signifikante Auswirkungen der alkalischen und sauren Behandlung der Bentonite ließen sich auch hier nur in Verbindung mit einem hohen Quarzgehalt beobachten. Das äußerte sich darin, dass die klastogenen Effekte der stärkerquarzhaltigen Bentonite ausgeprägter vorlagen, wenn diese aktiviert waren.

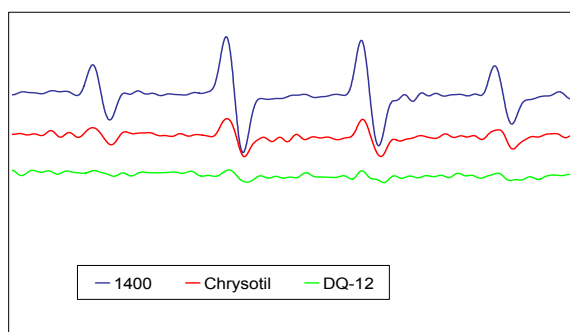
### 3.6 Nachweis indirekter genotoxische Effekte

#### 3.6.1 Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS)

##### 3.6.1.1 Azellulärer Nachweis von OH-Radikalen

Durch die Elektronenspinresonanzmessung von DMPO-OH konnte die Entstehung von OH-Radikalen mit und ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid in wässrigen Bentonitsuspensionen nachgewiesen werden (Abb. 34).

Die Freisetzung von OH-Radikalen war oft bei Bentoniten mit einem hohen Gehalt an löslichen Übergangsmetallen er-

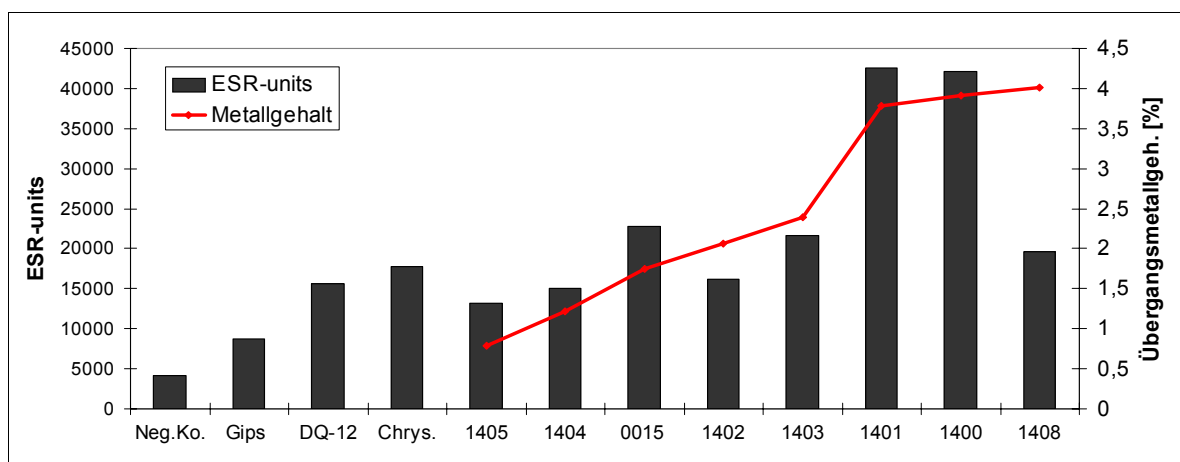


**Abb. 34:** Charakteristische Resonanzlinien von OH-Radikalen, freigesetzt durch Bentonit, Quarz (DQ-12) und Chrysotil; ESR-Messung ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

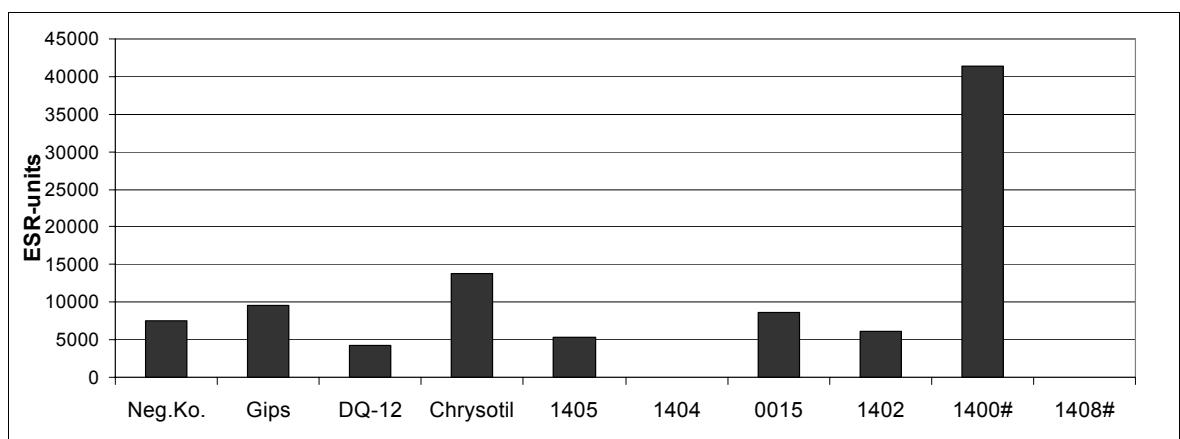


höht (Abb. 35, Abb. 36). Diese Metalle (hier hauptsächlich Eisen) können aus den Schichtsilikaten herausgelöst werden und über die in 1.4.2 beschriebenen Reaktionsgleichungen zur katalytischen Radikalbildung beitragen.

Die meisten Radikale wurden unter Zugabe von  $H_2O_2$  gebildet. Im Vergleich zu Quarz und Chrysotil wurden von drei Bentonitarten (1401, 1400, 0015) deutlich mehr OH-Radikale gebildet. Von allen getesteten Staubproben zeigte Gips bei  $H_2O_2$ -Gabe die niedrigste Radikalbildung. Die Proben mit hohen Eisen-/Metallgehalten wiesen teilweise auch erhöhte Quarzgehalte auf (1401, 1400), so dass in einigen Fällen eine starke Radikalbildung an einen erhöhten Quarzgehalt gekoppelt war (Abb. 35). Die Gesamtdarstellung aller Daten ist im Anhang, Tab. A 4, wiedergegeben.



**Abb. 35:** ESR-Messung der DMPO-OH-Bildung verschiedener Bentonit-, Faser- und Partikelproben unter  $H_2O_2$ -Zufuhr (Doppelbestimmung bei 1400 und Gips: SD <8 %).



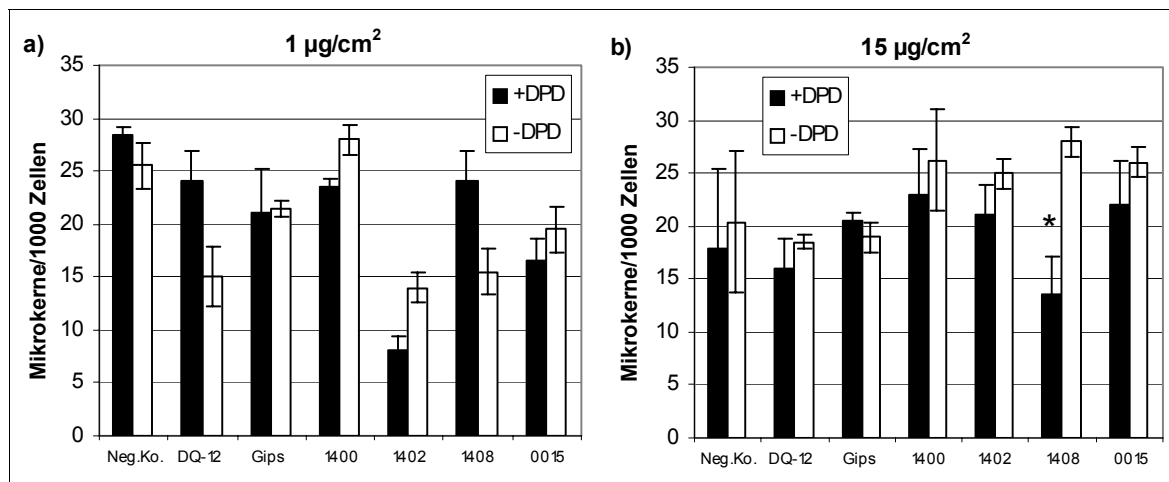
**Abb. 36:** ESR-Messung der DMPO-OH Bildung verschiedener Bentonit-, Faser- und Partikelproben ohne  $H_2O_2$ -Gabe (einfache Messung), #hoher Metallgehalt.

Bei der Messung ohne  $H_2O_2$ -Gabe (Abb. 36) wurden von der Bentonitprobe 1400, Chrysotil und Gips Radikale in Größenordnungen oberhalb des Negativkontrollwertes freigesetzt. Im Gegensatz zu den beiden Vergleichsstäuben bewegte sich die bento-

nitinduzierte Radikalbildung auf fast unverändert hohem Niveau gegenüber der ersten Messung. Die anderen der hier getesteten Proben, darunter auch Quarz, lagen unterhalb der Kontrolle (Abb. 36. Tab. A 4)

### 3.6.1.2 Wirkung von Eisenkomplexbildnern

Zur Untersuchung des Einflusses von Eisenkomplexbildnern wurden die Zellen mit Bentoniten exponiert, die zuvor relativ hohe Mikrokernraten erzeugten. Nach 72-stündiger Expositionsdauer konnte sowohl bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  als auch bei  $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  eine Inhibierung der Mikrokernbildung nach Gabe von  $100 \mu\text{M}$  2,2'-Dipyridyl in den Lungenfibroblasten beobachtet werden. Bei der niedrigen Konzentration zeigten sich bei 3 von 4 bentonitbehandelten Kulturen verminderte Mikrokernraten gegenüber den Kulturen ohne Eisenchelatzusatz (Abb. 37). Allerdings war die Mikrokernbildung sehr gering. Vielfach lag diese sogar unterhalb der von gipsbehandelten Zellen und der Kontrolle. Durchschnittlich ging die Mikrokernbildung bei bentonitstaubexponierten Zellen in dem Konzentrationsbereich von  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  um 6,5 % zurück.



**Abb. 37:** Hemmung der Mikrokernbildung partikelbehandelter IMR90-Zellen nach Eisenchelatorgabe bei Bentonitkonzentrationen von a) 1 und b)  $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  nach 72-stündiger Expositionsdauer; \* $p < 0,05$ .

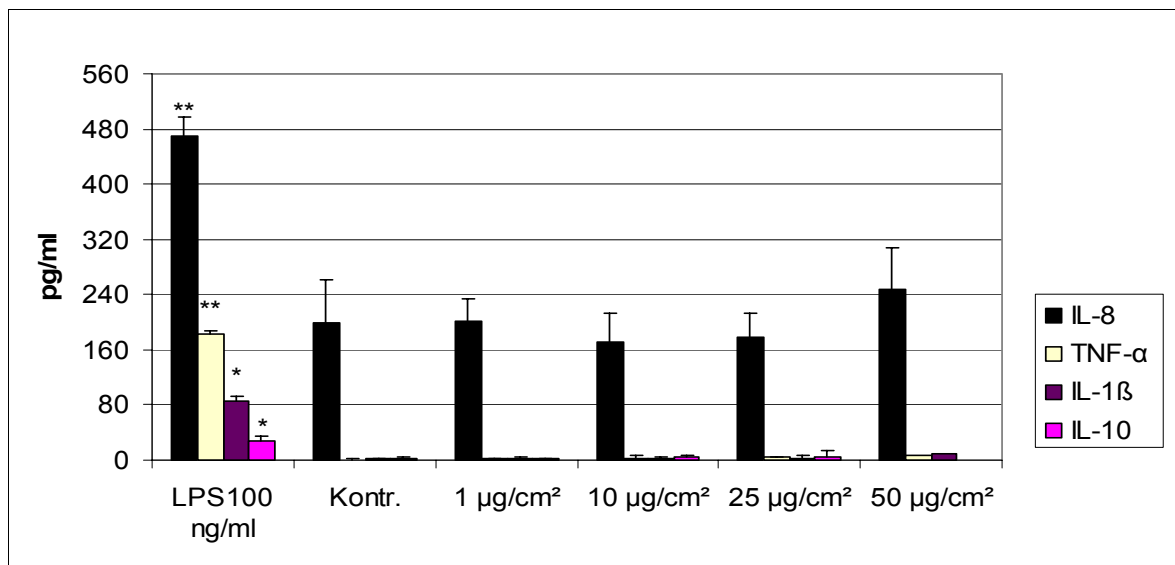
Bei einer Bentonitkonzentration von  $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  lagen die Mikrokernwerte in den nicht dipyridylbehandelten bentonitexponierten Zellen oberhalb der Kontrolle und der des Vergleichsmaterials. Die höchsten Mikrokernraten gingen von den stark eisen-/quarzhaltigen Proben 1400 und 1408 aus. Bei allen bentonitbehandelten Kulturen konnte nach Eisenchelatorgabe ein Rückgang der Mikrokernbildung ermittelt werden, der im Fall von rohbentonitbehandelten (1408) Fibroblasten ein schwaches Signifikanzniveau erreichte ( $p < 0,05$ ). Hier lag die Mikrokernrate sogar deutlich unterhalb

der Kontrolle (Abb. 37). Signifikante Unterschiede hinsichtlich der chemischen Modifikation waren nicht erkennbar. Der Rückgang der Mikrokernwerte lag durchschnittlich bei 24,5 %. Im Vergleich zur Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  machte sich hier die inhibitorische Wirkung deutlich stärker bemerkbar.

Da diffundierende Übergangsmetallionen wie Eisen bei der Auslösung ROS-bedingter genomischer Schäden eine zentrale Rolle spielen, deuten die nach Eisenkomplexierung vorgefundenen Mikrokernreduktionen auch auf die Präsenz intrazellulärer Radikale bei bentonitinduzierten Schäden hin.

### 3.6.2 Bestimmung von Entzündungsmarkern

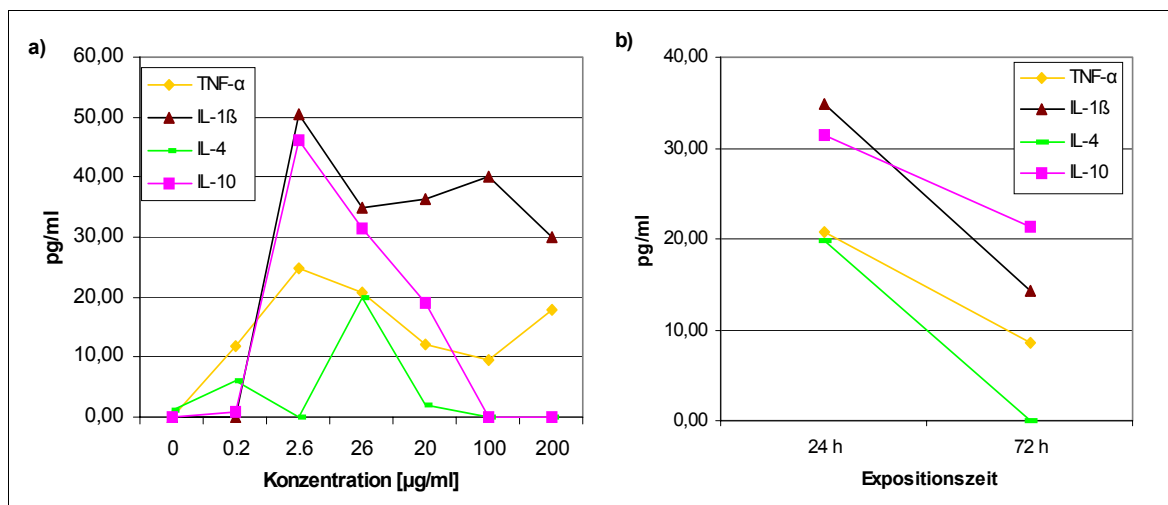
Da Makrophagen als primäre Targetzellen einen wesentlichen Anteil an der partikelbedingten Immunantwort haben, wurde die Zytokinfreisetzung von makrophagenähnlichen THP1- und MM6-Zellen als ein weiterer Parameter zur Untersuchung der indirekten Genotoxizität bestimmt. Die zeit- und konzentrationsabhängige Messung von  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TGF-1}\beta$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-8}$  und  $\text{IL-10}$  ergab in beiden Zelllinien nur einen sehr geringen Anstieg im Bereich weniger  $\text{pg}/\text{ml}$ , der im Fall der MM6-Zellen etwas höher lag als in den THP1-Zellen. Der Vergleich zu den Kontrollen zeigt, dass die Zytokinfreisetzung bei allen Bentonit- und Quarzproben in den THP1-Zellen nicht relevant war. Beispielhaft sind hier die Werte der Probe 1400 dargestellt (Abb. 38). Die Daten weiterer Proben befinden sich in Tab. A 5 des Anhangs.



**Abb. 38:** Zytokinfreisetzung durch Bentonit 1400 in THP1-Zellen in Konzentrationsbereichen von 1 -  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

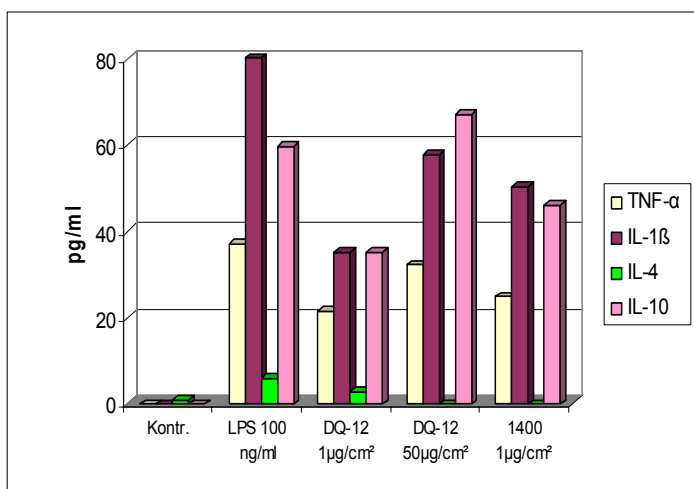
In den MM6-Zellen zeigte die getestete Bentonitprobe 1400 die stärksten Effekte in einem Konzentrationsbereich von 1 und  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  nach 24-stündiger Expositionsdauer.

er (Abb. 39; Gesamtdaten in Tab. A 6, Anhang). Jedoch lagen die freigesetzten Mengen nur im zweistelligen Pikogrammbereich und sind damit als sehr gering einzustufen.



**Abb. 39:** Zytokinfreisetzung durch Bentonit 1400 in MM6-Zellen a) in Abhängigkeit von der Konzentration nach 24 Std. Exposition, b) in Abhängigkeit von der Expositionsdauer bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Bei den quarzpartikelbehandelten Zellen ergaben sich die höchsten Werte im Konzentrationsbereich von  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , die etwa um das 1,1 - 1,5-Fache höher lagen als die von bentonitstaubexponierten Zellen (Abb. 40). Die proinflammatorisch wirkenden Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurden ebenso wie das antiinflammatorisch wirkende IL-10 stärker freigesetzt. Je-



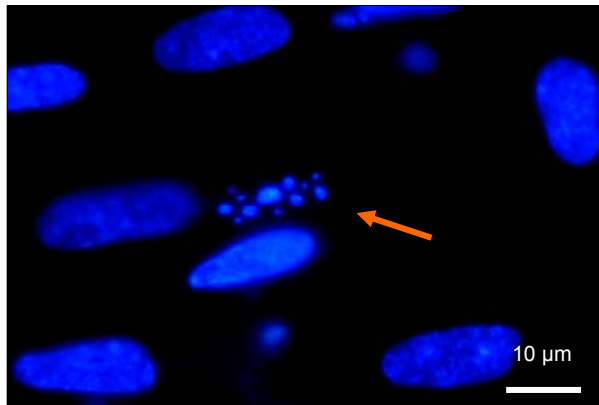
**Abb. 40:** Zytokinfreisetzung in MM6-Zellen durch Bentonitprobe 1400 im Vergleich zu Quarzpartikeln.

doch zeigte das ebenfalls antiinflammatorisch wirkende IL-4 in beiden staubbehandelten Makrophagenkulturen die niedrigsten Werte. Keine Aussage lieferte die Bestimmung von TGF-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ , da sich die Messwerte einschließlich der Kontrollen kaum voneinander unterschieden. Abschließend ist festzuhalten, dass sich die hier ermittelten Werte auf zu niedrigem Niveau bewegen, um daraus einen entscheidenden Hinweis für ein Entzündungsgeschehen durch Bentonitpartikel abzuleiten.

### 3.7 Apoptosenachweis

Morphologische Veränderungen, die auf eine Apoptose hindeuten, waren stellenweise durch die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung in den bentonit-behandelten Zellen auffällig. Deutliches Anzeichen war hier die Kondensation des Chromatins (Abb. 41).

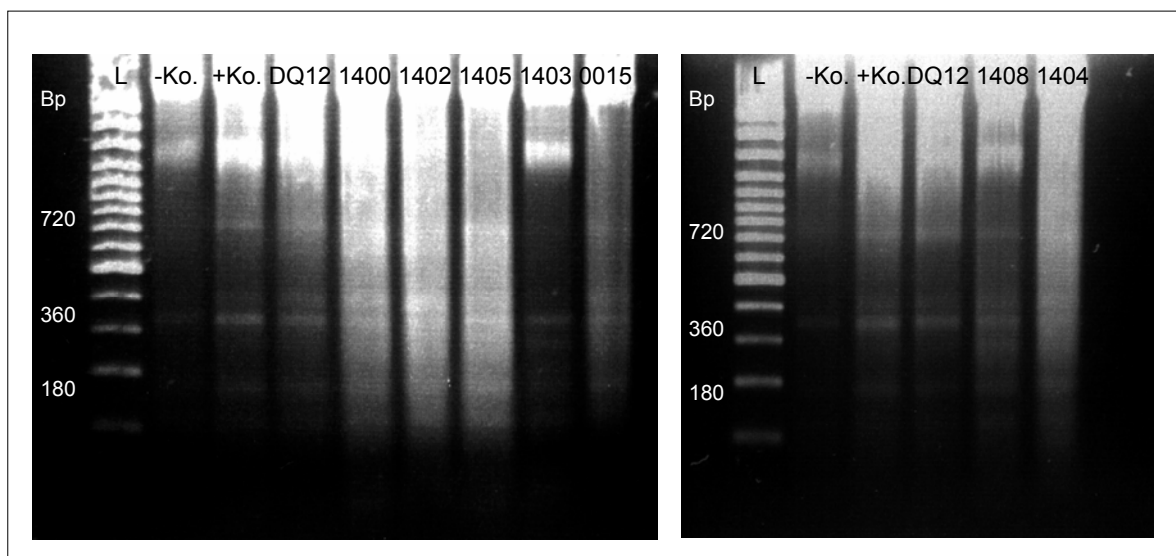
Die hierzu eingesetzten Bentonite lagen in allen Modifikationen mit verschiedenen Quarzanteilen vor.



**Abb. 41:** Apoptotische IMR90-Zelle (Pfeil) nach Bentonitstaubbehandlung  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Probe 1408, 72 Std.).

#### 3.7.1 Ermittlung der Apoptose durch DNA-Isolierung

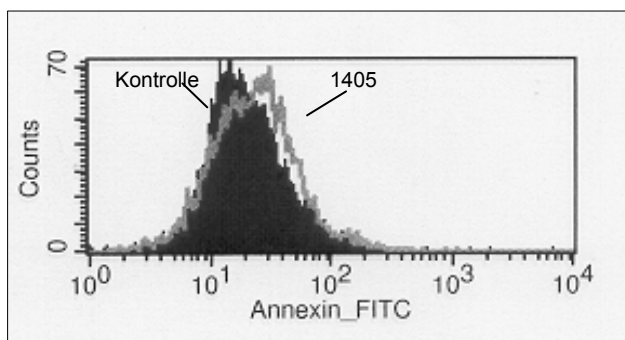
Nach 72-stündiger Expositionsdauer zeigten einige der mit  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Bentonit behandelten Fibroblastenkulturen eine charakteristische DNA-Fragmentierung (Abb. 42). Die Bandenmuster waren von unterschiedlich starker Ausprägung. Eine Abhängigkeit vom Quarzgehalt und der chemischen Modifikation war aber nicht erkennbar. Im Vergleich zu Bentoniten zeigte Quarzstaub relativ schwache Banden. Die bei 360 Bp schwach sichtbare Bande der Negativkontrolle kann auf sehr vereinzelt und spontan auftretende Apoptosen hindeuten, aber auch durch nicht abgebaute RNA hervorgerufen sein [Dopp et al., 1995].



**Abb. 42:** Agarose-Gelelektrophorese der DNA bentonit- und quarzstaubexponierter ( $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) IMR90-Zellen nach 72-stündiger Inkubationsdauer; L= Längenmaßstab, -Ko.= Negativkontrolle, +Ko= Positivkontrolle (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Mitomycin C).

### 3.7.2 Messung der Apoptose durch Fluoreszenzmarkierung

Zur Quantifizierung und weiteren Differenzierung der Apoptose wurde eine FACS-Analyse mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung durchgeführt (Abb. 43).



**Abb. 43:** Histogramm einer Annexin-V-gefärbten Zellpopulation nach Bentonitbehandlung im Vergleich zur Kontrolle.

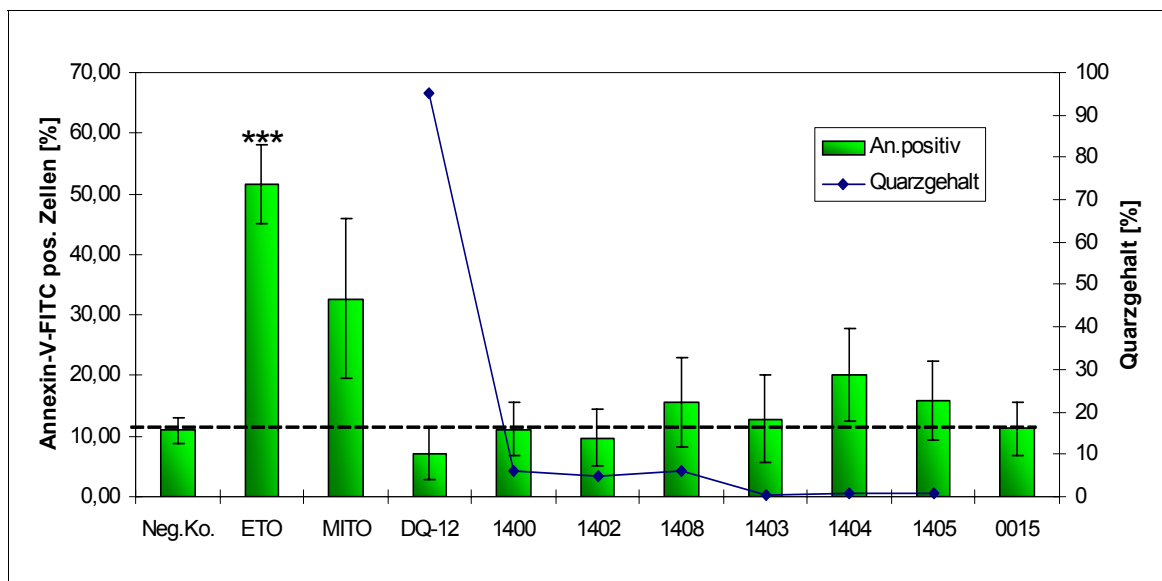
Die apoptotischen, aber auch nekrotischen Effekte innerhalb der auswertbaren Zellen eines „Gates“, waren nach 72-stündiger Expositionsdauer mit 20 µg/cm<sup>2</sup> Staubpartikel relativ gering. Insgesamt betrachtet zeigten 20 - 30 % der Zellen Schädigungsmerkmale. Darunter war der Anteil frühapoptotischer Zellen mit

10 - 20 % am größten. Eine Gegenüberstellung der prozentualen Verteilung frühapoptotischer, spätapoptotischer/sekundärnekrotischer und nekrotischer Zellen findet sich in Tab. 10.

**Tab. 10:** Prozentuale Verteilung frühapoptotischer, spätapoptotischer/sekundärnekrotischer, nekrotischer und vitaler IMR90-Zellen nach 72-stündiger Bentonitexposition; Kontrollsubstanzen: ETO= 500 µM Etoposid, MITO= 1 µg/ml Mitomycin C, DEX= 100 µM Dexamethason.

	Neg.K.	ETO	MITO	DEX	DQ12	1400	1402	1408	1403	1404	1405	0015
Frühapopt. [%]	10,9	51,5	32,6	42,3	7,1	11,1	9,7	15,6	12,8	20,2	15,9	11,2
± SD	± 2,1	± 6,4	± 13,2	± 13,8	± 4,2	± 4,3	± 4,7	± 7,3	± 7,2	± 7,7	± 6,4	± 4,4
Spätap/Sek.nekr. [%]	3,2	17,7	10,6	5,2	4,1	4,8	3,4	3,0	0,8	2,9	2,9	11,3
± SD	± 1,7	± 1,2	± 0,7	± 2,9	± 1,4	± 4,1	± 2,7	± 3,5	± 1,2	± 2,9	± 3,7	± 1,5
Nekrose [%]	3,2	1,5	2,2	1,7	4,8	6,4	10,1	2,3	0,7	0,6	8,8	9,4
± SD	± 3,0	± 0,2	± 2,2	± 0,7	± 2,8	± 8,1	± 10,7	± 3,4	± 1,3	± 0,5	± 11,7	± 0,8
Vitale Z. [%]	61,9	29,2	25,5	50,6	57,5	77,5	76,6	78,8	84,4	72,4	71,8	67,9
± SD	± 40,7	± 7,4	± 30,6	± 16,0	± 42,8	± 10,3	± 10,8	± 8,3	± 3,3	± 2,7	± 7,9	± 6,7

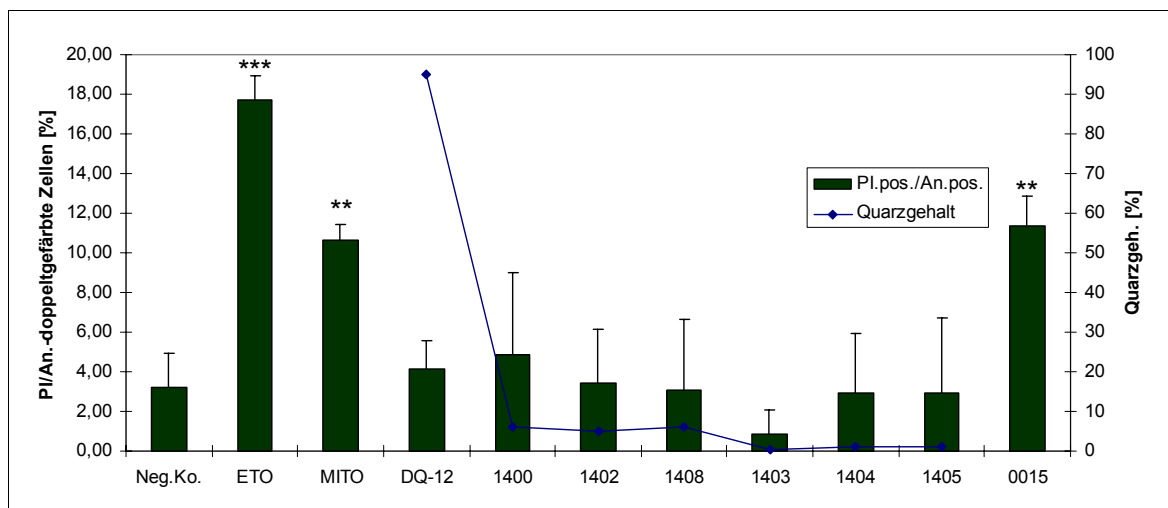
Im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen induzierten die Bentonitpartikel nur einen geringen nicht signifikanten Anstieg frühapoptotischer Zellen (Abb. 44).



**Abb. 44:** Prozentualer Anteil Annexin-V-positiver IMR90-Zellen nach 72-stündiger Bentonitexposition ( $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) in Gegenüberstellung zum Quarzgehalt der Bentonite; \*\*\* $p < 0,001$ .

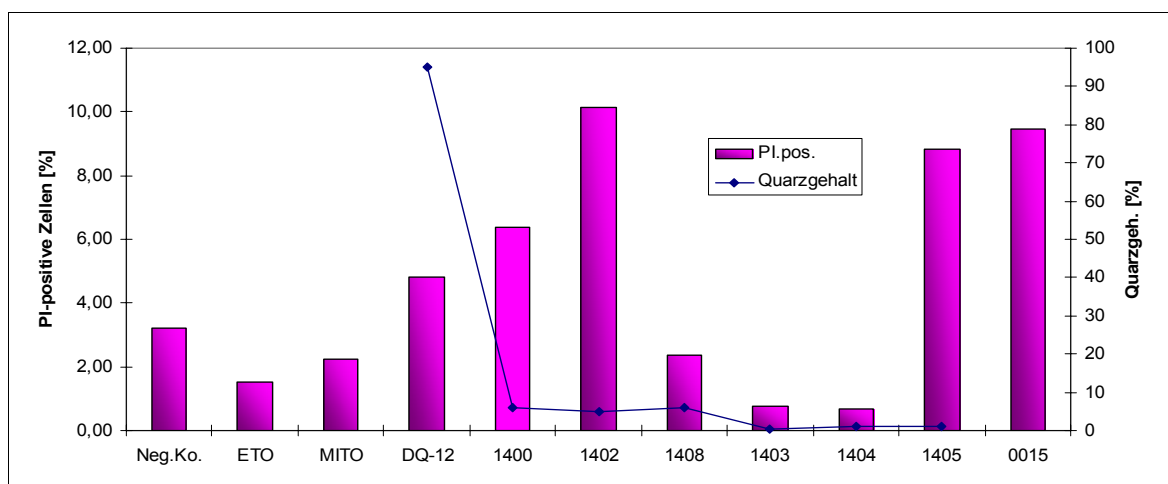
Hinsichtlich des Quarzgehaltes und der chemischen Modifikation ließ sich kein Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion beobachten. Auffällig war auch, dass Quarzpartikel die niedrigste prozentuale Rate frühapoptotischer Zellen erzeugten. Nach Bentonitbehandlung konnte maximal eine Verdoppelung der Anzahl frühapoptotischer Zellen gegenüber der Negativkontrolle ermittelt werden. Die in dieser Kultur applizierten Partikel stammten von einem Rohbentonit mit wenig Quarz (Probe 1404). Dagegen war die fünffach erhöhte Anzahl frühapoptotischer Zellen der etoposidexponierten Positivkontrolle hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Die apoptoseauslösende Wirkung von Mitomycin C, als zweiter Kontrollsubstanz, zeigte sich in den IMR90-Zellen weniger deutlich. Der Anteil frühapoptotischer Zellen war hier im effektivsten Konzentrations- und Zeitbereich nicht signifikant erhöht (Abb. 44).

Der Anteil spätapoptotischer/sek.nekrotischer und nekrotischer IMR90-Zellen an der Gesamtzellzahl reichte in beiden Fällen von ca. 1 bis 11 % (Tab. 10). Da jedoch der Basisanteil der Spätapoptose/sek. Nekrose und Nekrose in IMR90-Zellen relativ niedrig war (3,2 %), fielen die Anstiege stärker aus als in den frühapoptotischen Zellen. Im Fall der organisch modifizierten Probe (0015) stieg die Anzahl mit PI/Annexin-V-FITC doppeltgefärbter Zellen signifikant um das 3,5-Fache und erreichte damit ein Maximum an bentonitinduzierten Spätapoptosen (Abb. 45). Im Gegensatz zur frühen Apoptose konnte in Mitomycin C-behandelten Zellen ebenfalls ein signifikanter Anstieg spätapoptotischer/sek.nekrotischer Zellen festgestellt werden.



**Abb. 45:** Prozentualer Anteil PI/Annexin-V-positiver IMR90-Zellen nach 72-stündiger Bentonitexposition ( $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) in Gegenüberstellung zum Quarzgehalt der Bentonite; \*\*\* $p < 0,001$  \*\* $p < 0,01$ .

Relativ häufig konnte eine Zunahme nekrotischer Zellen beobachtet werden. Der Anstieg betrug hier etwa das 2 - 3,5-Fache der Kontrollzellzahl (Abb. 46). Hier scheint der Quarzanteil eine größere Rolle zu spielen, da von den niederquarzhaltigen Bentoniten (ausgenommen Probe 1405) weniger nekrotische Zellen induziert wurden. Ebenso auffällig war, dass Rohbentonite wie 1408 und 1404 wenig Nekrosen auslösten. In Bezug auf den Einfluss der Modifikation und des Quarzgehaltes zeichneten sich Parallelen zur direkten Zytotoxizitätsbestimmung ab (vgl. 3.4.1). Quarzstaubexponierte Kulturen wiesen eine ca. zweifache Zunahme nekrotischer Zellen auf.



**Abb. 46:** Prozentualer Anteil PI-positiver/Annexin-V-negativer IMR90-Zellen nach 72-stündiger Bentonitexposition ( $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) in Gegenüberstellung zum Quarzgehalt der Bentonite (SD siehe Tab. 10).

Obwohl der Anteil frühapoptotischer Zellen größer war als der von nekrotischen, traten nekrotische Effekte häufiger und sprunghafter auf.



## 4 Diskussion

Im Gegensatz zu reinem Quarzstaub weiß man im Hinblick auf die Geno- und Zytotoxizität weit verbreiteter quarzhaltiger Tonerdemineralien wie Bentonite relativ wenig über deren Wirkung auf Lungenzellen.

Die vorliegenden Daten belegen, dass Bentonite in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der kristallinen Varietät genomische Schäden in humanen Lungenfibroblasten induzieren können. Im Vergleich zu Quarzstaub (DQ-12) induzierten Bentonite jedoch in signifikant geringerem Maße Mikrokerne. Auch die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Zytotoxizität und das divergierende Schädigungsmuster im Hinblick auf klastogene/aneugene Effekte verdeutlichen, dass die biologischen Effekte von Bentonitstäuben sehr stark von den mineralogischen Eigenschaften abhängig sind.

Der Einfluss der Sauerstoffradikale wurde hierbei durch die Elektronenspinresonanzmessung und durch die Reduktion der Mikrokernbildung nach Zugabe eines Eisenchelators als ein möglicher Wirkmechanismus aufgezeigt. Darüber hinaus gab die Untersuchung der Apoptose weiteren Aufschluss über den Wirkmechanismus einer bentonitinduzierten Zellschädigung.

### 4.1 Der Einfluss der chemischen Zusammensetzung der Bentonitpartikel auf die zyto- und genotoxischen Effekte

#### 4.1.1 Zytotoxizität

Die anhand der Zellzahlbestimmung ermittelte Zytotoxizität der verschiedenen Bentonite variierte in den IMR90-Zellen sehr stark. Die Zytotoxizität von Bentonitstäuben war am stärksten, wenn die Bentonite a) einen höheren Quarzanteil ( $\geq 4\%$ ) hatten und b) modifiziert waren. In diesen Fällen waren die Bentonitpartikel sogar toxischer als Quarzpartikel. Die relativ hohe Zytotoxizität der organisch aktivierten Probe 0015 kann darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei dem Anteil der kristallinen Kieselsäure nicht um  $\alpha$ -Quarz handelte, sondern um Cristobalit. Daher sind die Werte nicht ganz mit denen der anderen  $\alpha$ -quarzhaltigen Proben vergleichbar.

Tendenziell werden die erzielten Resultate, die eine verminderte Toxizität bei Rohbentoniten (1404, 1408) gegenüber reinem Quarz in Lungenfibroblasten zeigen, durch die Untersuchungen von Timár et al. [1966a] an Peritonealmakrophagen von Ratten bestätigt. Gemessen an der LDH-Aktivität wurde die Toxizität von reinem Quarzstaub mit einer 40 %igen Montmorillonitbeimischung um das Mengenäquivalent von 1/10 redu-

ziert. Bei einem 80 %igen Montmorillonitanteil betrug dieser Wert sogar nur 1/20. Der dort verwendete Montmorillonit wurde nicht gesondert modifiziert.

Im Gegensatz dazu lag anhand der Ermittlung der TTC-Reduktion die Toxizität von unbehandeltem Bentonit um das fünffache Mengenäquivalent höher als die Toxizität von DQ-12 [Adamis und Timár, 1976]. In diesem Fall reichten schon 30 µg Bentonit, um die TTC-Reduktion in den Zellen genauso zu hemmen wie 150 µg Quarz. Auch die Ergebnisse von Murphy et al. [1993] unterstreichen die starke zytotoxische Wirkung von Montmorillonit und Bentonit, die dort allerdings nicht im Vergleich zu Quarz getestet wurde.

Die unterschiedlichen Ergebnisse können einerseits auf verschiedene Messmethoden und andererseits auf die Herkunft und spezifische mineralische und elementare Zusammensetzung der Bentonite zurückgeführt werden. Im Vergleich zu der beschriebenen TTC-Reduktion [Timár et al., 1966b] zeigte der ebenfalls auf einer mitochondrialen Umsetzung basierende AlamarBlue-Test keine verwertbaren Ergebnisse, da die Unterschiede der Effekte zwischen den einzelnen Bentonitproben nicht aussagekräftig waren. Dies kann darin begründet sein, dass die Empfindlichkeit der eingesetzten Spektrometer zu gering war, um auch feine Unterschiede zwischen den bentonitinduzierten Wirkungen detektieren zu können.

Gemeinsames Merkmal der sowohl durch den AlamarBlue-Test als auch durch die Zellzählung ermittelten Dosis-Wirkungs-Beziehung war eine Proliferation von Zellen in niedrigen Konzentrationsbereichen bis 10 µg/cm<sup>2</sup> Bentonit. Eine mögliche Erklärung scheint die Freisetzung von fibroseinduzierenden Wachstumsfaktoren zu liefern, die auch von den Lungenfibroblasten selbst gebildet werden könnten. Seiler et al. [2001] berichtete über eine Proliferation von BAL-Zellen bis auf das 30-Fache der Kontrollzellzahl nach 90-tägiger In-vivo-Quarzstaubexposition von Ratten.

Wie die Beispiele der Proben 1403, 1405 und 1408 zeigen, scheinen die Modifizierung oder der Quarzgehalt allein nicht auszureichen, um die Vitalität der behandelten Fibroblasten relevant (stärker als die Kontrollmaterialien) zu schwächen. Die chemische Modifizierung scheint hier aufgrund der gesteigerten Oberflächenaktivität die Rolle eines Promotors zu spielen, der die latent vorhandene zytotoxische Wirkung im Zusammenspiel mit Quarz deutlich verstärkt.

Der Vergleich mit den Daten zur zellulären Aufnahme verdeutlicht, dass der Aktivierung aufgrund ihrer begünstigenden Wirkung auf die Partikelaufnahme eine Schlüsselrolle im Schädigungsverlauf zukommt. Obwohl das Eindringen von Quarzpartikeln in die Zellen nicht beobachtet werden konnte, ist die Zelle durch die Beladung mit Montmorillonitpartikeln in einem gewissen Maß vorgeschädigt. Daher können die Zel-

len gegenüber radikalvermittelten toxischen Einflüssen, die von der Quarzoberfläche über die wässrige Umgebung auf die Zelle einwirken [Schins et al., 2002], empfindlicher reagieren. Insbesondere der „oxidative burst“ kann hierbei zu einer weiteren Zellschädigung beitragen [Knaapen et al., 2004].

Die alkalische oder saure Aktivierung erhöht die Kationenaustauschkapazität und Adsorptionsfähigkeit durch den interkristallinen Ionenaustausch. Dadurch erhöht sich auch die Oberflächenreaktivität gegenüber der Zellmembran. Durch die Anwendung des Hämolysetests konnte eindeutig demonstriert werden, dass der Mechanismus der Zellschädigung vor allem auf dem hohen zytolytischen bzw. membranschädigenden Potenzial dieser Tonerdemineralien basiert. Im Vergleich zu Quarz war das hämolytische Potenzial der Bentonitpartikel etwa doppelt so hoch. Dieses ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Zytotoxizität der Bentonite in Lungenfibroblasten stärker sein kann als die von Quarzpartikeln. Diese Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Befunden von Mányai et al. [1969], die ebenfalls bei Kalzium-Montmorillonit und Bentonit starke hämolytische Wirkungen im Vergleich zu Quarz diagnostizierten.

Hypothesen zum Schädigungsmechanismus von Tonerdemineralien basieren vor allem auf der hohen Ionen- und Wasserstoffbindungskapazität dieser Minerale [Woodworth et al., 1982; Davies et al., 1984; Oscarson et al., 1986]. Woodworth et al. [1982] beschreiben, dass ein Austausch negativer Ladungen des Montmorillonits durch positive Ladungen des Liposomens der Zellmembran zu einer Lyse des Liposomens und damit zur Zerstörung der Zellmembran führen kann.

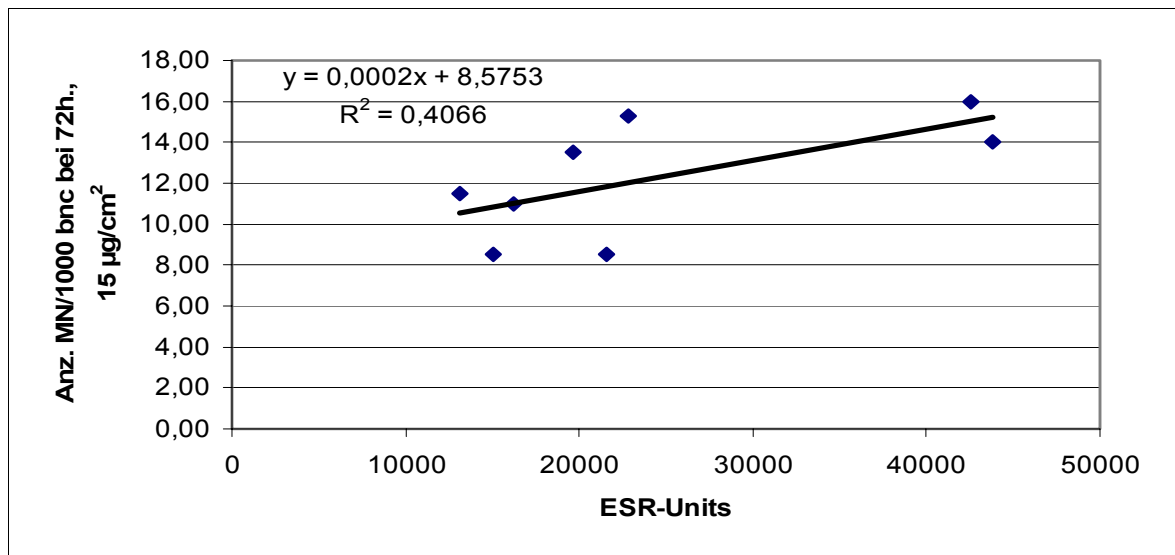
#### **4.1.2 Genotoxizität und die Rolle der ROS**

Die vorliegenden Daten zeigen, dass inhalierbare Bentonite mit einem Quarzgehalt von mehr als 4 % in der Lage sind, nach 48 h und 72 h Exposition im Fall der sauren und alkalischen Aktivierung einen signifikanten Anstieg ( $p < 0,01$ ) der Mikrokernraten zu bewirken. Ähnlich wie bei der primären zelltoxischen Wirkung zeigt sich, dass die Modifikation nur in Verbindung mit einem hohen Quarzgehalt eine Rolle spielt. Durch die Modifikation ohne weitere Co-Faktoren bewirkten Bentonite keinen nennenswerten genomischen Schaden in Lungenzellen. Die Ergebnisse der zellulären Aufnahme veranschaulichen, dass modifizierter Bentonit besser in die Zellen eindringen konnte als unbehandelter. Daher ist eine Verstärkung der genotoxischen Effekte der quarzhaltigen Bentonite aufgrund der gesteigerten Partikelaufnahme möglich. Höhr et al. [2002] fanden heraus, dass in Rattenmakrophagen die Phagozytose von verschiedenen mit Polyvinylpyridin-N-Oxid (PVNO) und mit Aluminiumlaktat beschichteten Quarzpartikeln ebenfalls deutlich gegenüber dem nativem Partikel gesteigert wurde, während in

Lungenepithelzellen (A549) die zelluläre Aufnahme bei unbehandelten Quarzpartikeln höher war. Zwar sind die Zelllinien und Modifizierungen nicht mit den hier eingesetzten vergleichbar, jedoch kann in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen gezeigt werden, dass eine Modifizierung von Partikeln die zelluläre Aufnahme erheblich beeinflussen und damit auch die zellulären Effekte verändern kann.

Obwohl der Quarz nicht in den Lungenfibroblasten nachgewiesen werden konnte, können an der Oberfläche der Quarzpartikel generierte Sauerstoffradikale wie Peroxide, Hydroxylradikale, und Singlett Sauerstoff (z. B.  $\text{Si}^+-\text{O}_2^-$ ,  $\text{SiOH}\cdot$ ,  $\text{SiO}\cdot$ ) aus der wässrigen Umgebung der Zelle oxidativen Stress auf die zellulären Bestandteile inkl. DNA ausüben [Schins et al., 2002; Fubini und Hubbard, 2003]. Zudem kann der „oxidative burst“ aufgrund der gesteigerten Partikelbeladung der Zellen den durch Quarz ausgelösten oxidativen Stress verstärken. Die relativ hohen Mikrokernraten der mit den Proben 1400 und 1402 behandelten Kulturen liefern einen Beleg für diese These. Auffällig war, dass ein höherer Quarzgehalt auch häufig mit einem höheren Metall- und Eisengehalt der untersuchten Bentonitproben verbunden war. Insbesondere der Gehalt an löslichen Übergangsmetallen ist ein wesentlicher Faktor bei der oxidativ bedingten genomischen Schädigung durch Staubpartikel [Wilson et al., 2002; Knaapen et al., 2004]. Diese können über die Fenton- oder die Haber-Weiss-Reaktion zur Bildung von ROS führen. Wie gezeigt wurde, stand die Bildung von OH-Radikalen in enger Beziehung zum Metall-/Eisengehalt der Bentonite. Die verminderte OH-Radikalbildung bei der stark eisenhaltigen Probe 1408 lässt sich wahrscheinlich auf eine geringere Verfügbarkeit an Eisenionen zurückführen. Da bei diesem Bentonit eine chemische Modifizierung nicht vorlag, ist die Austauschkapazität von interkristallinen Ionen nicht in dem Maße gegeben wie bei den modifizierten Varietäten. Relativ wenig OH-Radikale wurden auch bei DQ-12 gemessen. Dieses kann auf das Alter der Probe und die damit verbundenen Oberflächenkontaminationen und -aciditätsänderungen zurückgeführt werden [Strübel, 1989]. Dadurch kann frisch gebrochener Quarz mehr Radikale generieren als älteres Material [Fubini et al., 1995]. Somit erklärt die geringere Radikalbildung bei gleicher Menge des Ausgangsmaterials auch die Tatsache, dass DQ-12 trotz des 20-fach höheren Quarzgehaltes gegenüber Bentonit nur eine maximal 1,3-fach erhöhte Mikrokernrate induzierte.

Eine Gegenüberstellung der von Bentoniten gebildeten OH-Radikale im Vergleich zu den induzierten Mikrokernen zeigt eine positive Korrelation dieser beiden Parameter (Abb. 47).



**Abb. 47:** Zusammenhang zwischen der Bildung von OH-Radikalen in Bentoniten (ESR-Units) und der Induktion von Mikrokernen (Konzentration: 15 µg/cm<sup>2</sup>, Expositionszeit: 72 Stunden)

Frei verfügbares lösliches Eisen kann durch die Doppelmembran des Zellkerns diffundieren und dort über die beschriebenen Reaktionsgleichungen zu einer oxidativen DNA-Schädigung führen [Knaapen et al., 2004]. Dadurch wird plausibel, dass Bentonite Mikrokerne induzierten, ohne dass die Partikel in direkter Wechselwirkung mit dem Zellkern stehen, wie das z. B. bei Asbestfasern der Fall ist (Bentonitpartikel befanden sich nur im Zytoplasma).

Durch die Zugabe des als Eisenchelator wirkenden 2,2'-Dipyridyls konnten die Mikrokernraten in allen Proben übereinstimmend bei einer Konzentration von 15 µg/cm<sup>2</sup> gesenkt werden, was einen weiteren Anhaltspunkt für die Präsenz eisengenerierter ROS liefert. Da sich der Anstieg der Mikrokernbildung ohne Eisenchelator nur auf geringem Signifikanzniveau bewegte, konnte die Reduktion der Mikrokernbildung durch Gabe eines Eisenchelators ebenfalls kein hohes Signifikanzniveau erreichen. Nur wenn die Mikrokernrate deutlich unter den Kontrollwert abfiel (Probe 1408), konnte eine schwache Signifikanz festgestellt werden.

Ein weiteres Indiz für die zentrale Bedeutung des oxidativen Stresses ist das klastogene Schädigungsmuster [Kamp et al., 1992], welches von Bentoniten mit hohem Quarz- und Eisengehalten ausging. Besonders bei 95 %igem Quarzstaub zeigte sich die klastogene Wirkung am stärksten.

Relativ intensiv wurde in den letzten Jahren die Genotoxizität von reinem Quarzstaub untersucht [z. B. Nagalakshmi et al., 1995; Liu et al., 1996; Cakmak et al., 2004]. Nagalakshmi et al. [1995] beschrieben in humanen embryonalen Lungenzellen (HEL299) einen signifikanten 5 - 6-fachen Anstieg der Mikrokernrate nach 24-stündiger Quarzstaubbehandlung (Min-U-Sil) mit 320 µg/cm<sup>2</sup>. Auch Liu et al. [1996] wiesen in

Hamsterlungenfibroblasten einen signifikanten 4-fachen Mikrokernanstieg nach 24-stündiger Inkubation mit  $160 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Quarz (Min-U-Sil) nach. Im Vergleich dazu zeigte sich in Vorversuchen bei bentonitexponierten V79-Zellen in einer Konzentration von  $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  maximal ein zweifacher Mikrokernanstieg gegenüber der Spontanrate. Die Daten hierzu sind im Anhang dargestellt (Abb. A 1). Aufgrund der großen Konzentrationsunterschiede sind die Literaturdaten bei 10 - 20-fach höheren Konzentrationen nicht direkt mit den hier ermittelten Ergebnissen vergleichbar. Bentonite reagierten zytotoxisch in einer Konzentration ab  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Da die bentonitinduzierten genotoxischen Wirkungen bei höheren Konzentrationen von zytotoxischen Effekten überlagert und eliminiert wurden, erweisen sich die Bentonitpartikel im Vergleich zu Quarz als wesentlich weniger genotoxisch. Das trifft vor allem auf modifizierte Bentonite mit höheren Quarzgehalten zu.

In einer weiteren Studie wurde die genotoxische Wirkung von Kaolin, einem dem Bentonit strukturverwandten zweischichtigen Aluminiumsilikat, anhand von Alveolar-makrophagen der Ratte mit dem In-vivo-Comet-Assay im Vergleich zu Quarz untersucht [Gao et al., 2000]. Auch hier fielen die genotoxischen Effekte des Tonminerals 5 und 7 Tage nach Instillation deutlich schwächer aus als die der Quarzpartikel.

Wie der Vergleich zu den V79-Zellen zeigt, ist die genetische Instabilität in den tierischen Zellen höher als in den menschlichen [Dopp und Schiffmann, 1998]. Daher waren tierische Zellen oder auch permanente Zelllinien weniger gut als In-vitro-Testsystem für die hier eingesetzten Versuchsreihen geeignet. Obwohl Lungenfibroblasten keine primären Targetzellen für Staubpartikel sind, stellten die humanen nicht transformierten IMR90-Zellen aufgrund ihrer höheren genetischen Stabilität die geeignetere Zelllinie für den etablierten und aussagekräftigen Mikrokernstest dar.

## **4.2 In-vitro-Abschätzung einer inflammatorischen Wirkung von Bentonitpartikeln**

Wenngleich auch von Quarzpartikeln teilweise etwas größere Mengen an Zytokinen freigesetzt wurden als von Bentonitpartikeln, konnte sowohl in makrophagenähnlichen THP1- als auch in MM6-Monokulturen keine Freisetzung von Zytokinen in relevanter Dosis durch die hier getesteten Stäube beobachtet werden. Die von der LPS-Positivkontrolle freigesetzten Mengen zeigten besonders am Beispiel der THP1-Zellen, dass diese Zelllinie grundsätzlich in der Lage ist, relevante Zytokine in signifikanten Mengen freizusetzen.

Besonders TNF- $\alpha$  und IL-1 wurden in der Literatur häufig als typische Entzündungsmarker von Quarz und quarzhaltigen Kohlenstäuben in humanen und tierischen Al-

veolarmakrophagen *in vitro* und *in vivo* beschrieben [Lassalle et al., 1990; Gosset et al., 1991; Driscoll et al., 1995 u. 1997; Seiler et al., 2001]. Gosset et al. [1991] konnten z. B. bei 100 µg/ml quarzhaltigem Kohlenstaub die Freisetzung signifikanter Mengen an TNF-α und IL-1β (3 - 4-stelliger pg/ml-Bereich) in primären Humanalveolarmakrophagen nachweisen. Im Vergleich dazu bewirkte Bentonit 1400 bei einer Konzentration von 266 µg/ml (100 µg/cm<sup>2</sup>) eine Freisetzung von 40 pg/ml IL-1β und 10 pg/ml TNF-α in den hier getesteten MM6-Zellen, während sich bei der effektivsten DQ-12-Konzentration von 133 µg/ml 1,5- bzw. 3-fach höherer Werte bei diesen Zytokinen und dieser Zelllinie einstellten. Dieser Vergleich macht deutlich, dass in primären Humanalveolarmakrophagen *in vivo* weitere Faktoren bei einer relevanten Freisetzung von Zytokinen beteiligt sind. Wottrich et al. [2004] stellten in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen fest, dass bei ultrafeinen Quarz- und Hämatitpartikeln die Freisetzung in THP1- und MM6-Monokulturen äußerst gering war. Erst in Cokultur mit Lungenepithelzellen (A549) wurden signifikante Mengen an IL-8 und IL-6 freigesetzt [Wottrich et al., 2004].

Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass die Entzündungseffekte der Bentonite in den hier untersuchten In-vitro-Monokulturen zu gering waren, um in Erscheinung zu treten. Aufgrund einer wechselseitigen Stimulation verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine unterschiedlicher Zelltypen [Olbrück et al., 1998] sind jedoch unter tatsächlichen In-vivo-Verhältnissen relevante Entzündungsreaktionen denkbar. Inwieweit Bentonite über die Freisetzung von Entzündungsmarkern einen indirekten genotoxischen Effekt haben, kann deshalb nur durch weitere immunotoxikologische Studien geklärt werden.

### **4.3 Die Bedeutung der Apoptose im Schädigungsverlauf partikel-exponierter Lungenzellen**

Die Apoptose ist gekennzeichnet durch eine Reihe morphologischer, molekularer und biochemischer Merkmale wie z. B. dem Schrumpfen der Zelle, der Translokation des Phosphatidylserins, der Kondensation des Chromatins, der Aktivierung von Caspasen und Tumorsuppressorgenen [Linz, 2001]. Um Fehlinterpretationen sicher auszuschließen, reicht der Nachweis eines einzelnen Apoptosekriteriums nicht aus. Daher wurde die Apoptose in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich durchflusszytometrisch anhand der Translokation des Phosphatidylserins und molekularbiologisch durch die Fragmentierung der DNA untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse der gelelektrophoretischen Untersuchung und das fluoreszenzmikroskopische Erscheinungsbild staub-exponierter Zellen dokumentieren zwar in einigen Fällen Anzeichen einer Apoptose,

jedoch zeigte die quantitative Auswertung mittels FACS-Analyse keinen signifikanten Anstieg frühapoptotischer Zellen. Im Fall der Auswertung spätapoptotischer/sek.nekrotischer Zellen war nur bei einer Probe ein signifikanter Anstieg feststellbar. Ein Zusammenhang zum Quarzgehalt oder zur chemischen Modifikation war mit Ausnahme des organischen Bentonits nicht erkennbar. Die geringe Apoptoseinduktion des Quarzes ist wahrscheinlich auch hier auf das Alter der Probe zurückzuführen, was mit einer verminderten Oberflächenradikalbildung einhergeht.

In der rein nekrotischen Zellpopulation war ein etwa 2 - 3,5-facher Anstieg am häufigsten zu beobachten. Obwohl dieser aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen nicht statistisch signifikant war, standen die Effekte hinsichtlich der mineralogischen Eigenschaften in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Zytotoxizitätstests durch Zellzahlbestimmung. Bei der Betrachtung der relativ niedrigen prozentualen Anteile in allen drei Fällen ist zu bemerken, dass die Anzahl der tatsächlich geschädigten Zellen höher lag. Aufgrund der zytolytischen Bentonitwirkung war ein großer Teil der Zellen nur als Trümmer vorhanden und durch die FACS-Analyse nicht mehr auswertbar.

Indizien gibt es sowohl für eine nekrotische als auch für eine apoptotische Schädigung in Alveolarmakrophagen und Epithelzellen aus In-vitro-Studien mit luftgetragenen Umweltstaubpartikeln (PM 10; PM 2,5) [Holian et al., 1998; Obot et al., 2004]. Ein Weg zur Apoptoseauslösung wird hierbei über die Aktivierung der Caspase-9 als Folge der Reduktion des Membranpotenzials der Mitochondrien beschrieben [Upadhyay et al., 2003]. Des Weiteren wurden Apoptosen auch beim Einwirken metallischer Stäube bzw. von Metalloxidstäuben wie z. B. Blei-Chromatpartikel oder ultrafeinem TiO<sub>2</sub> auf Lungenepithelzellen und Fibroblasten nachgewiesen [Singh et al., 1999; Rahman et al., 2002]. Im Vergleich zur Apoptoseinduktion von TiO<sub>2</sub>-Partikeln in Hamsterfibroblasten (SHE) fiel die Apoptose in den humanen Fibroblasten deutlich schwächer aus. Auch das Tonmineral Kaolin wurde in murinen Alveolarmakrophagen *in vitro* auf seine apoptoseinduzierende Wirkung untersucht. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten war auch dort der Effekt gering. Erst bei sehr hohen Verabreichungen (400 µg/ml) konnte durch die TUNEL-Färbung („TdT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling“) Apoptose auf signifikantem Niveau nachgewiesen werden. Allerdings lagen hier die Effekte deutlich unter denen von Quarzpartikeln [Gao et al., 2001].

Im Hinblick auf die relativ niedrigen genotoxischen Effekte scheint der quarz- und eisengenerierte oxidative Stress zwar zu genomischen Veränderungen zu führen; diese reichen jedoch nicht aus, um Apoptosen signifikant auszulösen. Eine Reparatur der



geschädigten DNA durch eine Basenpaarexzision oder eine Nukleotidexzision ist wahrscheinlich. Die hier ermittelten Ergebnisse lassen vermuten, dass das genomische Schadenspotenzial zu gering ist, um weitere Mechanismen auszulösen, die an der Tumorgenese beteiligt sind. Ein solcher Mechanismus kann z. B. die Aktivierung der Protoonkogene *c-jun* und *c-fos* sein [Mossman und Churg, 1998]. Es ist anzunehmen, dass nekrotische Effekte einen weitaus größeren Anteil am Schädigungsverlauf bentonitpartikelexponierter Lungenzellen haben als apoptotische.

#### **4.4 Beurteilung des Schädigungspotenzials alveolengängiger Bentonite im Hinblick auf bekannte In-vivo- und epidemiologische Daten**

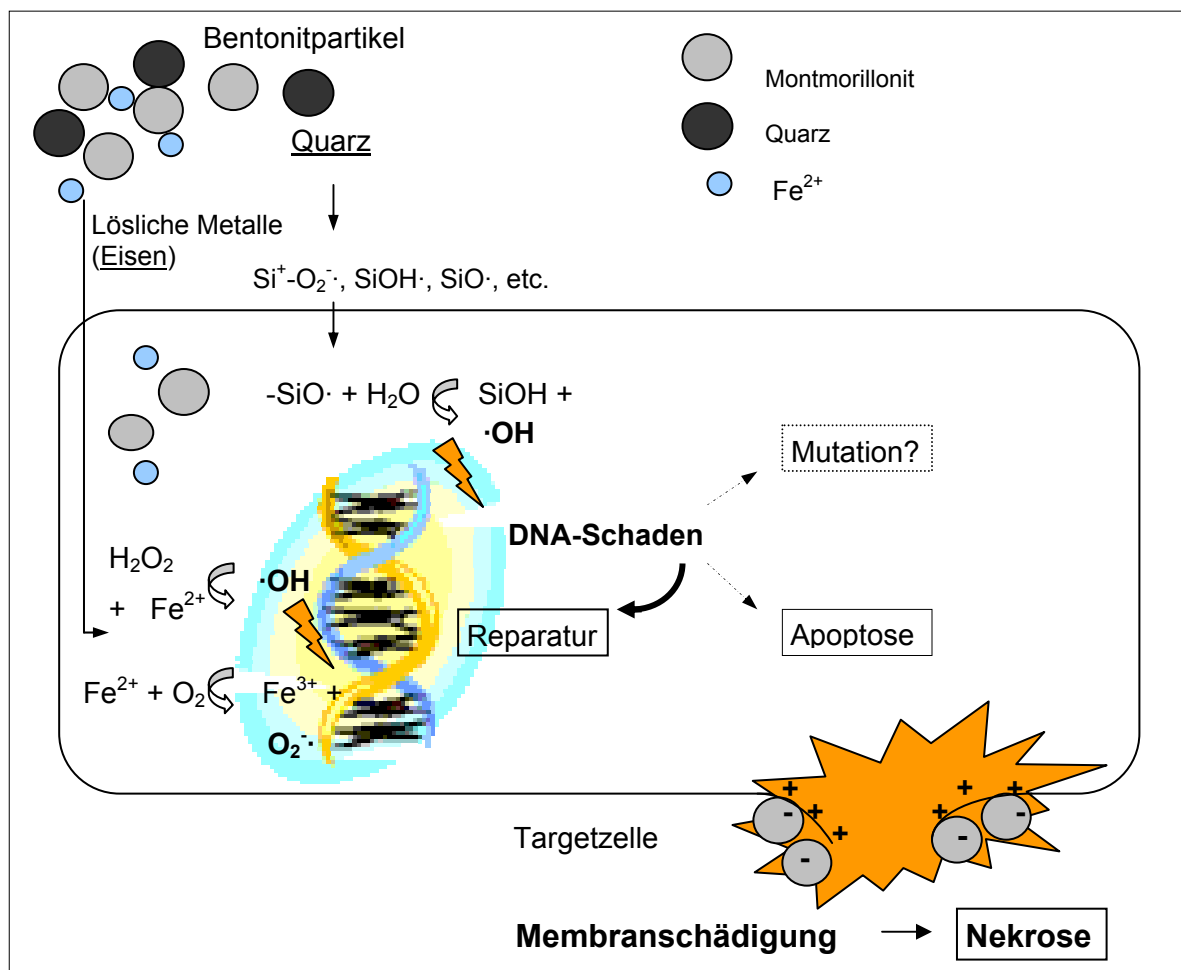
Bisherige In-vivo-Untersuchungen zeigten, dass die Wirkung von Bentonitstäuben auf das pulmonale System von Ratten stark von der mineralischen Zusammensetzung und der Herkunft der Bentonite abhängt. In den meisten Studien war die Wirkung bei niedrigen Quarzgehalten eher vom Typ einer benignen Speicherreaktion geprägt, ohne zu einer Proliferation kollagenen Gewebes zu führen [Gärtner und Herzog, 1961; Timár et al., 1966a und b; Adamis et al., 1986]. Erst bei Quarzgehalten, die weit über den hier verwendeten lagen, ließen sich Fibrosierungsreaktionen histologisch sichern. Kanzerogene Effekte wurden nicht beobachtet. Beim Menschen konnten Fibrosen mit tumorösem Ausgang nur bei überdurchschnittlich hohem Quarzgehalt (30 %) in Verbindung mit einer Exposition unter sehr schlechten arbeitshygienischen Verhältnissen festgestellt werden [Vigliani, 1954; Guardascione, 1955]. Bentonite mit Quarzgehalten, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, zeigten in weiteren epidemiologischen Studien keine kanzerogenen Wirkungen [Tonning, 1949; Gattner, 1954; Sakula, 1960; Bassermann, 1966; Gibbs und Pooley, 1994].

Auf der Grundlage der hier getesteten Bentonite konnte ein relativ geringes genotoxisches Potenzial in Abhängigkeit vom Quarz- und Metallgehalt in menschlichen Lungenfibroblasten ermittelt werden. In Anbetracht der bereits bekannten Daten ist es fraglich, ob dieses Potenzial ausreicht, einen manifesten genomischen Schaden zu erzeugen, der zu einer signifikanten Bildungsrate von Tumoren führt. Selbst bei Bentoniten mit weitaus höheren Quarzbeimischungen (65 %) konnten Tumore im Tierversuch bisher nicht beobachtet werden [Timár et al., 1966b]. Die dort eingesetzten Bentonite waren allerdings nicht chemisch aktiviert. Jedoch auch bei schwererem Fibrosierungsgrad zeigten sehr reaktive Bentonite in den Untersuchungen von Mikhailova-Docheva et al. [1986] keine tumorösen Anzeichen bei Ratten.

Wie auch am Beispiel der eigenen Untersuchungen zur Apoptose gezeigt werden konnte, scheint das genomische Schadenspotenzial zu gering zu sein, um weitere an der Tumorgenese beteiligte Mechanismen auszulösen. Eine Reintegration ausgeschleuster DNA oder die Beseitigung des Schadens durch genetische Reparaturmechanismen ist anzunehmen.

Die in makrophagenähnlichen Zellen ermittelte Ausschüttung von Zytokinen war bei den hier verwendeten Bentonitproben zu gering, um daraus eine entzündungsfördernde Wirkung abzuleiten. Anhaltspunkte für eine entzündungsvermittelte indirekte Genotoxizität waren somit nicht erkennbar.

Die biologische Wirkung von Bentoniten liegt in erster Linie in einer direkten zytotoxischen Wirkung, die sich in Übereinstimmung mit der vorliegenden Literatur in einer starken membranschädigenden Wirkung äußert. Diese tritt schon bei relativ geringen Konzentrationen ein, die zum Teil geringer als die von reinem Quarz sind, und führt in Lungenfibroblasten zu einem überwiegend nekrotischen Absterben von Zellen. Eine zusammenfassende Darstellung der hier untersuchten zyto- und genotoxischen Wirkung von Bentoniten gibt Abb. 48 wieder.



**Abb. 48:** Hypothese zum Wirkmechanismus der bentonitinduzierten Zell- und DNA-Schädigung

Bezogen auf die in begrenzter Zahl existierenden epidemiologischen und In-vivo-Daten ist das ermittelte genotoxische Potenzial der Bentonite als sehr gering einzustufen. Inwieweit es jedoch ausreicht, um mutagene bzw. kanzerogene Wirkungen im komplexen System des menschlichen Atemtraktes zu induzieren, kann letztlich nur durch weitere In-vivo-Studien und epidemiologische Auswertungen mit hinreichender Sicherheit geklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, direkte und indirekte genotoxische Wirkungen alveolengängiger Bentonitpartikel mit Quarzgehalten bis zu 6 % und verschiedenen Modifikationen (alkalisch, sauer, organisch) in kultivierten humanen Lungenfibroblasten (IMR90) zu ermitteln. Dabei wurden auch die zelluläre Partikelaufnahme und das zytotoxische Potenzial untersucht. Bei allen Bentonitproben wurde Pyrogenfreiheit nachgewiesen, wodurch eine Beeinflussung durch andere biologisch aktive Substanzen ausgeschlossen werden konnte. Bei Untersuchungen mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigte sich, dass alkalisch modifizierte Partikel besser aufgenommen werden als unbehandelte und Zellkompartimente wie der Zellkern unberührt bleiben. Zellzahlbestimmungen ergaben, dass modifizierte Bentonite mit höheren Quarzgehalten eine stärkere zytotoxische Wirkung besitzen als Rohbentonite oder Bentonite mit Quarzgehalten  $<4$  %. Diese Wirkung ist vor allem auf membranschädigende Effekte zurückzuführen. Die Bildung von Mikrokernen als Indikator für die genotoxische Wirkung war nur in wenigen Fällen erhöht ( $p < 0,05$ ) und trat häufiger bei modifizierten Bentoniten mit höheren Quarz- und Metallgehalten nach 48- und 72-stündiger Inkubation auf. Bentonite mit höheren Quarz-/Metallgehalten neigten eher zu klastogenen Effekten, was auf eine oxidative Schädigung hindeutet. Die Bildung azellulär gemessener reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) stand in Relation zum Metallgehalt und zur Bildung von Mikrokernen. Darüber hinaus ergeben sich durch den Rückgang der Mikrokernbildung nach Eisenchelatorzugabe Hinweise auf die Präsenz intrazellulärer eisen generierter ROS. Diese Zusammenhänge verdeutlichen, dass ROS im Wirkungsmechanismus der Bentonite eine Schlüsselfunktion einnehmen. Die Freisetzung von Zytokinen war in den makrophagenähnlichen THP1- und MonoMac6-Zellen sehr gering, so dass sich daraus allein keine nennenswerte inflammatorische Wirkung ableiten lässt. Der genomische Schaden reichte nicht aus, um Apoptose in signifikanter Weise auszulösen. Hier traten nekrotische Effekte deutlicher hervor.

Es bleibt festzuhalten, dass Bentonite mit höheren Quarzgehalten ( $\geq 4$  %) in Abhängigkeit vom Metallgehalt (vorwiegend Eisen) einen geringfügigen genomischen Schaden in IMR90-Zellen auslösen können. Die chemische Modifikation scheint erst im Zusammenwirken mit einem hohen Quarzgehalt einen maßgeblichen Einfluss auf die zellulären Effekte zu haben. Ob die vorgefundenen Indizien auch zur Auslösung mutagener bzw. kanzerogener Prozesse beitragen können, bleibt in nachfolgenden Studien zu klären.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adamis, Z., Timar, M. (1976): Effects of various mineral dusts on macrophages in vitro. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 37, 301-307.
2. Adamis, Z. Timar, M. (1978): Studies on the effect of quartz, bentonite and coal dust mixtures on macrophages in vitro. *Br. J. Exp. Pathol.* 59, 411-415.
3. Adamis, Z., Timar, M., Kofler, L., Tatrai, E., Ungvary G. (1986): Biological effects of the respirable dusts from ore mines. *Environ. Res.* 41, 319-326.
4. Albrecht, C., Borm, P.J., Adolf, B., Timblin, C.R., Mossman, B.T. (2002): In vitro and in vivo activation of extracellular signal-regulated kinases by coal dusts and quartz silica. *Toxicol Appl Pharmacol.* 184, 37-45.
5. Albrecht, C., Borm, P.J., Unfried, K. (2004): Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutat Res.* 553, 23-35.
6. Armbruster, L. loos, E., Neulinger, G., Richwien, H.J. (1983): Aufnahme von Staub in den Atemtrakt, dessen Ablagerung in der Lunge und die Problematik der Messung des einatembaren Gesamtstaubes und des lungengängigen Feinstaubes - Teil IV: Technische Möglichkeiten zur Erfassung der biologisch wichtigen Staubfraktionen. *In: Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau.* Bd. 14, S. 127-135. Essen: Verlag Glückauf.
7. Bassermann, F.J. (1966): Die Bentonitstaublunge. *Zentralbl. Arbeitsmed.* 16, 327-328.
8. Boller, K., Schmid, W. (1970): Chemische Mutagenese beim Säuger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als In-vitro-Testsystem. Hämatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. *Humangenetik.* 11, 35-54.
9. Brockmann, M. (2002): Reaktionsmuster von Lunge und Pleura auf Fasern und Stäube - Ein Beitrag der Pathologie zum Thema kumulativer Wirkungen. *In: HVBG (Hrsg.): Fasern und Stäube – Strategische Herausforderung für Vorsorge und Rehabilitation.* Falkensteiner Tage 2000, S. 29-41. Sankt Augustin: HVBG.
10. Cakmak, G.D., Schins, R.P., Shi, T., Fenoglio, I., Fubini, B., Borm, P.J. (2004): In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 207, 105-113.
11. Calcabrini, A., Meschini, S., Marra, M., Falzano, L., Colone, M., De Berardis, B., Paletti, L., Arancia, G., Fiorentini, C. (2004): Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environ. Res.* 95, 82-91.
12. Campbell, A.H., Gloyne, S. (1942): A case of pneumoconiosis due to inhalation of fuller's earth. *J. Pathol. Bacteriol.* 54, 75-80.
13. Chao, C.C., Park, S.H., Aust, A.E. (1996): Participation of nitric oxide and iron in the oxidation of DNA in asbestos-treated human lung epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 326, 152-157.

14. Chen, F., Deng, H.Y., Ding, G.F., Houng, D.W., Deng, Y.L., Long, Z.Z. (1994): Excessive production of insulin-like growth factor-I by silicotic rat alveolar macrophages. *APMIS*. 102, 581-588.
15. Cohen, C., Fireman, E., Ganor, E., Man, A., Ribak, J., Lerman, Y. (1999): Accelerated silicosis with mixed-dust pneumoconiosis in a hard-metal grinder. *J. Occup. Environ. Med.* 41, 480-485.
16. Dasta, J.F. (1978): Paraquat poisoning: a review. *Am. J. Hosp. Pharm.* 35, 1368-1372.
17. Davies, R., Griffiths, D.M., Johnson, N.F., Preece, A.W., Livingston, D.C. (1984): The cytotoxicity of kaolin towards macrophages in vitro. *Br. J. Exp. Pathol.* 65, 453-466.
18. Dellinger, B., Pryor, W.A., Cueto, R., Squadrito, G.L., Hegde, V., Deutsch, W.A. (2001): Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1371-1377.
19. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (1997): Aerosole - Stäube, Rauche und Nebel. In: Greim, H. (Ed.): *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe: toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. 24. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH.
20. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (1999): Siliciumdioxid, kristallin, Quarz-, Cristobalit-, Tridymidstaub (alveolengängiger Anteil). In: Greim, H. (Ed.): *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe: toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. 29. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH.
21. Donaldson, K., Borm, P.J. (1998): The quartz hazard: a variable entity. *Ann. Occup. Hyg.* 42, 287-294.
22. Donaldson, K., Tran, CL. (2002): Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal. Toxicol.* 14, 5-27.
23. Dopp, E., Nebe, B., Hahnel, C., Papp, T., Alonso, B., Simko, M., Schiffmann, D. (1995): Mineral fibers induce apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Pathobiology.* 63, 213-221.
24. Dopp, E., Schiffmann, D. (1998): Analysis of chromosomal alterations induced by asbestos and ceramic fibers. *Toxicol Lett.* 96-97, 155-162.
25. Driscoll, K.E., Hassenbein, D.G., Carter, J.M., Kunkel, S.L., Quinlan, T.R., Mossman, B.T. (1995): TNF alpha and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure. *Toxicol. Lett.* 82-83, 483-489.
26. Driscoll, K.E., Howard, B.W., Carter, J.M., Asquith, T., Johnston, C., Detilleux, P., Kunkel, S.L., Isfort, R.J. (1996): Alpha-quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells: effects of in vivo and in vitro particle exposure. *Am. J. Pathol.* 149, 1627-1637.
27. Driscoll, K.E., Carter, J.M., Hassenbein, D.G., Howard, B. (1997): Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ. Health. Perspect.* 105 Suppl. 5, 1159-1164.

28. Falbe, J., Regitz, M. (Hrsg.) (1996): Römpp Chemie Lexikon. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
29. Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003): HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534, 65-75.
30. Fubini, B., Bolis, V., Cavenago, A., Volante, M. (1995): Physicochemical properties of crystalline silica dusts and their possible implication in various biological responses. *Scand J Work Environ Health.* 21 Suppl. 2, 9-14.
31. Fubini, B., Hubbard, A. (2003): Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free. Radic. Biol. Med.* 34, 1507-1516.
32. Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J.C., Vincent, R., Van Eeden, S.F. (2001): Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 25, 265-271.
33. Gao, N., Keane, M.J., Ong, T., Wallace, W.E. (2000): Effects of simulated pulmonary surfactant on the cytotoxicity and DNA-damaging activity of respirable quartz and kaolin. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 60, 153-67.
34. Gao, N., Keane, M.J., Ong, T., Ye, J., Miller, W.E., Wallace, W.E. (2001): Effects of phospholipid surfactant on apoptosis induction by respirable quartz and kaolin in NR8383 rat pulmonary macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175, 217-25.
35. Gärtner, H., Herzog, H. (1961): Untersuchungen über die arbeitsmedizinische Bedeutung von Bentonit und Kaolin. *Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.* 18, 524-537.
36. Gattner, H. (1955): Die Bleicherde-Lunge. *Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.* 13, 508-516.
37. Gibbs, A.R., Pooley, F.D. (1994): Fuller's earth (montmorillonite) pneumoconiosis. *Occup. Environ. Med.* 51, 644-646.
38. Gosset, P., Lassalle, P., Vanhee, D., Wallaert, B., Aerts, C., Voisin, C., Tonnel, A.B. (1991): Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed in vitro to coal mine dust. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 5, 431-436.
39. Griefahn, B. (1996): *Arbeitsmedizin*. 3. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
40. Guardascione, V. (1955): Silikose durch Bentonit. *Med. Lav.* 46, 480.
41. Hartung, T., Wendel, A. (1995): Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. *ALTEX.* 12, 70-75.
42. Hetland, R.B., Cassee, F.R., Refsnes, M., Schwarze, P.E., Lag, M., Boere, A.J., Dybing, E. (2004): Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicol. In Vitro* 18, 203-12.

43. Höhr, D., Schins, R.P.F., Borm P.J. (2002): Uptake of native and surface-modified quartz in epithelial cells and macrophages. *Ann. Occup. Hyg.* 46 Suppl. 1, 39-42.
44. Holian, A., Hamilton, R.F. Jr., Morandi, M.T., Brown, S.D., Li, L. (1998): Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ. Health. Perspect.* 106, 127-132.
45. Huang, X., Zalma, R., Pezerat, H. (1999): Chemical reactivity of the carbon-centered free radicals and iron in coals: role of the bioavailable Fe<sub>2</sub>O in coal workers pneumoconiosis. *Free Rad. Res.* 30, 439-451.
46. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans (1997): Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. Vol. 68. Lyon: IARC.
47. Ichinose, T., Yajima, Y., Nagashima, M., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Sagai, M. (1997): Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 18, 185-192.
48. Kamp, D.W., Graceffa, P., Pryor, W.A., Weitzman, S.A. (1992): The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free. Radic. Biol. Med.* 12, 293-315.
49. Knaapen, A.M., Borm, P.J., Albrecht, C., Schins, R.P. (2004): Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int. J. Cancer.* 109, 799-809.
50. Lassalle, P., Gosset, P., Aerts, C., Fournier, E., Lafitte, J.J., Degreef, J.M., Walleert, B., Tonnel, A.B., Voisin, C. (1990) : Abnormal secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha by alveolar macrophages in coal worker's pneumoconiosis: comparison between simple pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. *Exp. Lung. Res.* 16, 73-80.
51. Linz, M.M.K. (2001): Qualitative und quantitative Charakterisierung des Zelltodes in Säugerzelllinien - Induktion und Kinetik von Apoptose. Osnabrück: Der Andere Verlag.
52. Liu, X., Keane, M.J., Zhong, B.Z., Ong, T.M., Wallace, W.E. (1996): Micronucleus formation in V79 cells treated with respirable silica dispersed in medium and in simulated pulmonary surfactant. *Mutat. Res.* 361, 89-94.
53. Lorenz, W., Gwosdz, W. (1997): Bewertungskriterien für Industriemineralien, Steine und Erden – Teil 2: Tone. *Geol. Jb. Heft 2*, 65-89.
54. Manning, F.C., Patierno, S.R. (1996): Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer. Invest.* 14, 455-465.
55. Manyai, S., Kabai, J., Kis, J., Suveges, E., Timar M. (1969): The in vitro hemolytic effect of various clay minerals. *Med. Lav.* 60, 331-342.
56. Mariani, T.J., Roby, J.D., Mecham, R.P., Parks, W.C., Crouch E., Pierce, R.A. (1996): Localisation of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor-beta as a mediator of fibrosis. *Am. J. Pathol.* 148, 151-164.
57. Mengel, C.E., Carter, W.A., Horton, E.S. (1964): Geophagia with iron deficiency and hypokalemia - Cachexia africana. *Arch. Intern. Med.* 114, 470-474.



58. Meredith, T.J., Vale, J.A. (1987): Treatment of paraquat poisoning in man: methods to prevent absorption. *Hum. Toxicol.* 6, 49-55.
59. Mikhailova-Docheva, L., Buralkov, T., Kolev, K. (1986): Hygienic evaluation of the occupational risk in working with Bulgarian bentonite raw material. *Probl. Khig.* 11, 106-113.
60. Mossman, B.T., Churg, A. (1998): Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1666-1680.
61. Murphy, E.J., Roberts, E., Horrocks, L.A. (1993): Aluminum silicate toxicity in cell cultures. *Neuroscience.* 55, 597-605.
62. Nagalakshmi, R., Nath, J., Ong, T., Whong, W.Z. (1995): Silica-induced micronuclei and chromosomal aberrations in Chinese hamster lung (V79) and human lung (Hel 299) cells. *Mutat. Res.* 335, 27-33.
63. Ning, Y., Tao, F., Qin, G., Imrich, A., Goldsmith, C.A., Yang, Z., Kobzik, L. (2004): Particle-epithelial interaction: effect of priming and bystander neutrophils on interleukin-8 release. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 30, 744-750.
64. Oberdörster, G., Ferin, J., Lehnert, B.E. (1994): Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health. Perspect.* 102 Suppl. 5, 173-179.
65. Obot, C.J., Morandi, M.T., Hamilton, R.F., Holian, A. (2004): A comparison of murine and human alveolar macrophage responses to urban particulate matter. *Inhal. Toxicol.* 16, 69-76.
66. Olbrück, H., Seemayer, N.H., Voss, B., Wilhelm, M. (1998): Supernatants from quartz dust treated human macrophages stimulate cell proliferation of different human lung cells as well as collagen-synthesis of human diploid lung fibroblasts in vitro. *Toxicol Lett.* 96-97, 85-95.
67. Oscarson, D.W., Van Scoyoc, G.E., Ahlrichs, J.L. (1986) : Lysis of erythrocytes by silicate minerals *Clays. Clay. Min.* 34, 74-80.
68. Phibbs, B.P., Sundin, R.E., Mitchell, R.S. (1971): Silicosis in Wyoming bentonite workers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 103, 1-17.
69. Pohl, W. (1992): W. & W.E. Petrascheck's Lagerstättenlehre - Eine Einführung in die Wissenschaft von den mineralischen Bodenschätzen. 4. Aufl. Stuttgart: Schweizerbart.
70. Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D.G., Schiffmann, D. (2002): Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ. Health. Perspect.* 110, 797-800.
71. Sakula, A. (1961): Pneumoconiosis due to fuller's earth. *Thorax* 16, 176-179.
72. Santarelli, L., Recchioni, R., Moroni, F., Marcheselli, F., Governa, M. (2004): Crystalline silica induces apoptosis in human endothelial cells in vitro. *Cell. Biol. Toxicol.* 20, 97-108.

73. Sato, H., Sone, H., Sagai, M., Suzuki, K.T., Aoki, Y. (2000): Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 21, 653-661.
74. Schins, R.P., Duffin, R., Höhr, D., Knaapen, A.M., Shi, T., Weishaupt, C., Stone, V., Donaldson, K., Borm, P.J. (2002): Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1166-1173.
75. Schins, R.P., McAlinden, A., MacNee, W., Jimenez, L.A., Ross, J.A., Guy, K., Faux, S.P., Donaldson, K. (2000): Persistent depletion of I kappa B alpha and interleukin-8 expression in human pulmonary epithelial cells exposed to quartz particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167, 107-117.
76. Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Kraupp-Grasl, B., Oberhammer, F., Wagner, A., Jirtle, R. (1993): Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci. *Environ. Health. Perspect.* 101 Suppl 5, 87-90.
77. Seiler, F., Rehn, B., Rehn, S., Bruch, J. (2001): Quartz exposure of the rat lung leads to a linear dose response in inflammation but not in oxidative DNA damage and mutagenicity. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 24, 492-498.
78. Severance, H.W., Holt, T.H., Patrone, N.A., Chapman, L. (1988): Profound muscle weakness and hypokalemia due to clay ingestion. *South. Med. J.* 81, 272-274.
79. Shi, X., Castranova, B., Halliwell, V. (1998): Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. *J. Toxicol. Environ Health* 1, 181-197.
80. Shukla, A., Timblin, C., Berube, K., Gordon, T., McKinney, W., Driscoll, K., Vacek, P., Mossman, B.T. (2000): Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 23, 182-187.
81. Singh, J., Pritchard, D.E., Carlisle, D.L., Mclean, J.A., Montaser, A., Orenstein, J.M., Patierno, S.R. (1999): Internalization of carcinogenic lead chromate particles by cultured normal human lung epithelial cells: formation of intracellular lead-inclusion bodies and induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161, 240-248.
82. Squadrito, G.L., Cueto, R., Dellinger, B., Pryor, W.A. (2001): Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free. Radic. Biol. Med.* 31, 1132-1138.
83. Strübel, G. (1989): Untersuchungen zur Beeinflussung der Zytotoxizität des Quarzes durch die Mineralparagenese grubenechter Stäube. In: *Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau*. Bd. 17, S. 105-110. Essen: Verlag Glückauf.
84. Swafford, D.S., Nikula, K.J., Mitchell, C.E., Belinsky, S.A. (1995): Low frequency of alterations in p53, k-ras, and mdm2 in rat lung neoplasms induced by diesel exhaust or carbon black. *Carcinogenesis*. 16, 1215-1221.
85. Tao, F., Kobzik, L. (2002): Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 26, 499-505.

86. Timar, M., Kendrey, G., Adamis, Z., Juasz, Z. (1966a): Die Wirkung von Montmorillonit und Quarzstaubgemischen auf das Lungengewebe und die Makrophagen. *International Congress on Occupational Health II/2*, S. 711-714.
87. Timar, M., Kendrey, G., Juasz, Z. (1966b): Experimental observations concerning the effects of mineral dust to pulmonary tissue. *Med. Lav.* 57, 1-9.
88. Timblin, C.R., Shukla, A., Berlinger, I., Berube, K.A., Churg, A., Mossman, B.T. (2002): Ultrafine airborne particles cause increase in protooncogene expression and proliferation in alveolar epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 179, 98 -104.
89. Tønning, H.O. (1949): Pneumoconiosis from fuller's earth. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 31, 41-45.
90. Umweltbundesamt (2003): PM10 - Jahresmittelwerte 1985 - 2003 in Deutschland. [http://www.umweltbundesamt.de/immissionsdaten/Pm1985-2003kl20V9\\_a.pdf](http://www.umweltbundesamt.de/immissionsdaten/Pm1985-2003kl20V9_a.pdf)
91. Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A., Kamp DW. (2003): Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* 29 180-187.
92. Velichkovskii, B.T., Fishman, B.B. (2000): Catalytic properties of dust as criteria of its occupational hazards. *Gig. Sanit.* 3, 25-28.
93. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* 184, 39-51.
94. Vigliani, E.C. (1954): Neurer Ergebnisse der Silikoseforschung in Italien. *Staublungenerkrankungen* 2, 283-292.
95. Voelkel, K., Krug, H.F., Diabate, S. (2003): Formation of reactive oxygen species in rat epithelial cells upon stimulation with fly ash. *J. Biosci.* 28, 51-55.
96. Wilson, M.R., Lightbody, J.H., Donaldson, K., Sales, J., Stone, V. (2002): Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 172-179.
97. Woitowitz, H.J. (1999): Kanzerogenität des alveolengängigen Anteils von Quarzstaub – Eine Standortbestimmung aus der Sicht der Arbeitsmedizin. *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* 34, 524-532
98. Woodworth, C.D., Mossman, B.T., Craighead, J.E. (1982): Comparative effects of fibrous and nonfibrous minerals on cells and liposomes. *Environ. Res.* 27, 190-205.
99. Wottrich, R., Diabate, S., Krug, H.F. (2004): Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 207, 353-361.
100. Yang, H.M., Barger, M.W., Castranova, V., Ma, J.K., Yang J.J., Ma, J.Y. (1999): Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 58, 261-278.

## 7 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AP	Aktivator-Protein
ATCC	American Type and Culture Collection
Aqua dest.	Aqua destilata
Aqua bidest.	Aqua bidestilata
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bp	Basenpaare
CREST	Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, ösophageale Motilitätsstörung (engl.: esophageal), Sklerodaktylie u. Teleangiektasien
DAPI	4,6-Diamin-2-Phenylindol
DEX	Dexamethason
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-n-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPD	2,2'-Dipyridyl
DQ-12	Dörentruper Quarz - 12. Mahlung
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EDX	Energiedispersive Röntgenanalyse
EGF-R	Epidermal growth-Faktor-Rezeptor
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ERK	Extrazellulär-Signal-regulierte Kinasen
ESR	Elektronenspinresonanz
ETO	Etoposid
EU	Endotoxin-Units
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2ethanesulfonic acid
HBSS	Hanks balanced salt solution
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth-Faktor
IMR90	humane Lungenfibroblasten Zelllinie

---

K <sup>+</sup> /K <sup>-</sup>	kinetochorpositiv/-negativ
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEM	Minimal essential medium
min	Minute
MIP	Makrophagen-inflammatorisches Protein
MITO	Mitomycin C
Mn-SOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
MM6	MonoMac6, permanente makrophahenähnliche Zelllinie
NAA	Not essential amino acids
NF	Nuklear-Faktor
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNS	reaktive Stickstoffverbindungen
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
TBE	Trisborat EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF	Transforming growth-Faktor
THP1	permanente makrophahenähnliche Zelllinie
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TUNEL	TdT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling
UV	Ultraviolett

**Tab A 1:** Zytotoxizität in % vitaler Zellen durch Zellzählung (Coulter-Counter); Expositionsdauer =24 h, Mittelwerte  $\pm$  SD, - nicht auswertbar

Staubprobe	Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]			
	1	10	50	100
CaSO <sub>4</sub>	101 $\pm$ 38	76 $\pm$ 40	71 $\pm$ 55	106 $\pm$ 54
DQ-12	84 $\pm$ 22	82 $\pm$ 27	63 $\pm$ 25	45 $\pm$ 0
0015	106 $\pm$ 60	69 $\pm$ 12	49 $\pm$ 2	-
1400	81 $\pm$ 22	75 $\pm$ 19	63 $\pm$ 28	100 $\pm$ 35
1402	110 $\pm$ 54	77 $\pm$ 26	37 $\pm$ 21	80 $\pm$ 32
1403	109 $\pm$ 54	94 $\pm$ 21	77 $\pm$ 34	-
1404	119 $\pm$ 30	129 $\pm$ 34	78 $\pm$ 12	-
1405	116 $\pm$ 7	125 $\pm$ 20	93 $\pm$ 55	-
1408	98 $\pm$ 2	116 $\pm$ 21	77 $\pm$ 24	-

**Tab A 2:** Ermittlung der Zytotoxizität mittels AlamarBlue-Test; berechnete Werte der Vitalität in %

Probe	Messmethode	24 Stunden Exposition				48 Stunden Exposition			
		Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]			
		1	10	20	50	1	10	20	50
CaSO <sub>4</sub>	Fluoreszenz	97	73	92	101	125	97	94	108
	UV-Abs.570/600	92	92	92	58	70	77	69	75
	UV-Abs.540/630	134	92	97	100	28	46	29	42
DQ-12	Fluoreszenz	89	95	103	116	106	109	95	84
	UV-Abs.570/600	87	90	108	119	23	23	24	21
	UV-Abs.540/630	96	97	104	103	16	31	46	06
0015	Fluoreszenz	95	91	84	89	74	83	73	64
	UV-Abs.570/600	99	103	99	87	60	48	37	8
	UV-Abs.540/630	105	100	98	90	0	0	0	0
1400	Fluoreszenz	93	99	98	94	89	75	89	75
	UV-Abs.570/600	115	61	101	90	68	46	44	27
	UV-Abs.540/630	119	91	101	90	22	0	0	0
1402	Fluoreszenz	95	103	86	90	79	85	84	82
	UV-Abs.570/600	101	126	112	106	63	62	72	50
	UV-Abs.540/630	104	114	107	102	10	8	33	0
1403	Fluoreszenz	96	94	93	71	80	77	67	51
	UV-Abs.570/600	115	122	115	72	68	35	31	5
	UV-Abs.540/630	112	110	103	56	22	0	0	0
1404	Fluoreszenz	89	109	95	88	76	65	71	62
	UV-Abs.570/600	87	133	106	108	58	33	16	25
	UV-Abs.540/630	88	113	103	102	0	0	0	0
1405	Fluoreszenz	86	86	88	92	87	75	83	68
	UV-Abs.570/600	106	110	126	110	69	54	49	37
	UV-Abs.540/630	102	109	118	102	18	0	0	0
1408	Fluoreszenz	93	92	79	86	68	78	80	72
	UV-Abs.570/600	106	112	58	94	62	71	72	32
	UV-Abs.540/630	98	108	42	88	6	28	20	0

**Tab A 3:** Mikrokerntest in IMR90-Zellen, Mittelwerte  $\pm$  SD (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001)

Probe	Mikrokerne 36 h $\pm$ SD			
	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Neg. Kontr.	10.7 $\pm$ 1.5	10.7 $\pm$ 1.5	10.7 $\pm$ 1.5	10,7 $\pm$ 1,5
CaSO <sub>4</sub>	12.5 $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 0.7	11.5 $\pm$ 3.5	10,5 $\pm$ 2,1
DQ-12	12.0 $\pm$ 2.8	14.0* $\pm$ 0.0	13.5 $\pm$ 2.1	14,0 $\pm$ 2,8
0015	9.5 $\pm$ 4.9	13.5 $\pm$ 2.1	5.5 $\pm$ 0.7	6,5 $\pm$ 2,1
1403	12.0 $\pm$ 1.4	12.0 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 2.8	9,0 $\pm$ 1,4
1405	12.5 $\pm$ 0.7	11.5 $\pm$ 2.1	9.0 $\pm$ 0.0	8,5 $\pm$ 0,7
1404	10.0 $\pm$ 1.4	10.5 $\pm$ 2.1	9.5 $\pm$ 2.1	9,5 $\pm$ 0,7
1400	11.0 $\pm$ 1.4	9.7 $\pm$ 1.2	11.5 $\pm$ 2.1	11,5 $\pm$ 2,1
1402	11.0 $\pm$ 1.4	10.0 $\pm$ 1.7	9.5 $\pm$ 0.7	13,5* $\pm$ 0,7
1408	10.5 $\pm$ 0.7	10.0 $\pm$ 1.4	12.0 $\pm$ 1.4	10,0 $\pm$ 1,4
Probe	Mikrokerne 48 h $\pm$ SD			
	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Neg. Kontr.	10.3 $\pm$ 2.9	10.3 $\pm$ 2.9	10.3 $\pm$ 2.9	10,3 $\pm$ 2,9
CaSO <sub>4</sub>	7.0 $\pm$ 3.5	9.0 $\pm$ 2.8	12.5 $\pm$ 3.5	9,5 $\pm$ 0,7
DQ-12	16.0* $\pm$ 0.0	15.5 $\pm$ 3.5	22.0** $\pm$ 2.8	14,5 $\pm$ 0,7
0015	10.0 $\pm$ 0.0	9.5 $\pm$ 2.1	12.0 $\pm$ 1.4	9,5 $\pm$ 4,9
1403	12.3 $\pm$ 2.5	10.0 $\pm$ 3.0	10.7 $\pm$ 2.3	11,7 $\pm$ 3,1
1405	8.0 $\pm$ 1.4	8.0 $\pm$ 1.4	9.0 $\pm$ 1.4	12,0 $\pm$ 4,2
1404	13.5 $\pm$ 2.1	10.0 $\pm$ 1.4	11.0 $\pm$ 1.4	11,0 $\pm$ 0,0
1400	9.5 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 4.2	15.0 $\pm$ 4.2	17,0* $\pm$ 0,0
1402	14.5 $\pm$ 2.1	17.0* $\pm$ 0.0	14.5 $\pm$ 2.1	13,5 $\pm$ 2,1
1408	9.0 $\pm$ 1.7	13.5 $\pm$ 0.7	14.5 $\pm$ 3.5	15,5 $\pm$ 0,7
Probe	Mikrokerne 72 h $\pm$ SD			
	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Neg. Kontr.	8.8 $\pm$ 1.6	8.8 $\pm$ 1.6	8.8 $\pm$ 1.6	8,8 $\pm$ 1,6
CaSO <sub>4</sub>	9.0 $\pm$ 1.4	8.5 $\pm$ 0.7	10.5 $\pm$ 0.7	8,5 $\pm$ 0,7
DQ-12	13.5 $\pm$ 3.5	15.0*** $\pm$ 0.0	13.0 $\pm$ 5.7	16,5 $\pm$ 4,9
0015	8.5 $\pm$ 0.7	14.0 $\pm$ 4.2	9.7 $\pm$ 3.5	15,3 $\pm$ 4,0
1403	9.0 $\pm$ 2.8	6.5 $\pm$ 2.1	7.5 $\pm$ 0.7	8,5 $\pm$ 2,1
1405	14.0** $\pm$ 0.0	11.0 $\pm$ 2.8	7.5 $\pm$ 0.7	11,5 $\pm$ 3,5
1404	12.0 $\pm$ 3.5	8.0 $\pm$ 2.8	10.5 $\pm$ 0.7	8,5 $\pm$ 0,7
1400	12.0 $\pm$ 4.2	11.0 $\pm$ 0.0	9.0 $\pm$ 1.4	14,0** $\pm$ 1,4
1402	13.5** $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 2.1	8.5 $\pm$ 3.5	11,0 $\pm$ 0,0
1408	11.0 $\pm$ 4.0	7.0 $\pm$ 1.4	9.7 $\pm$ 3.8	13,5 $\pm$ 3,5
Krokydololith	8,3 $\pm$ 3,2	11,3 $\pm$ 3,2	18,3 $\pm$ 6,0	12,5 $\pm$ 0,7
Chrysotil	14,0 $\pm$ 1,4	11,5 $\pm$ 0,7	18,0 $\pm$ 7,1	15,0 $\pm$ 1,4
DQ-12Düss.	8,0	7,0	9,0	12,0

**Tab A 4:** Messung von OH-Radikalen durch ESR mit/ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zusatz in wässrigen Staubsuspensionen.

Staubprobe	ESR-Units*	
	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0015	8562	22830
1400 (Mw)	41348	43788,5
1402	6136	16196
1404	0	15081
1405	5357	13133
1408	0	19635
1401	n.a.	42537
1403	n.a.	21611
242	n.a.	25243
CaSO <sub>4</sub> (Mw)	9604	8750,5
DQ-12 Ess.	4298	15633
DQ-12 Düss.	n.a.	20863
Chrysotil	13776	17720
Krokydolit	n.a.	27026
Anatas	n.a.	15605
Anatas+V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	n.a.	30805
Kontrolle	7473	4149

\*Berechnete Werte nach Summation aller 4 Peakflächen der Resonanzlinien einer Probe;  
n.a.: nicht analysiert, Doppelbestimmung im Fall 1400 und Gips: SD zwischen 5,7 und 7,8 %

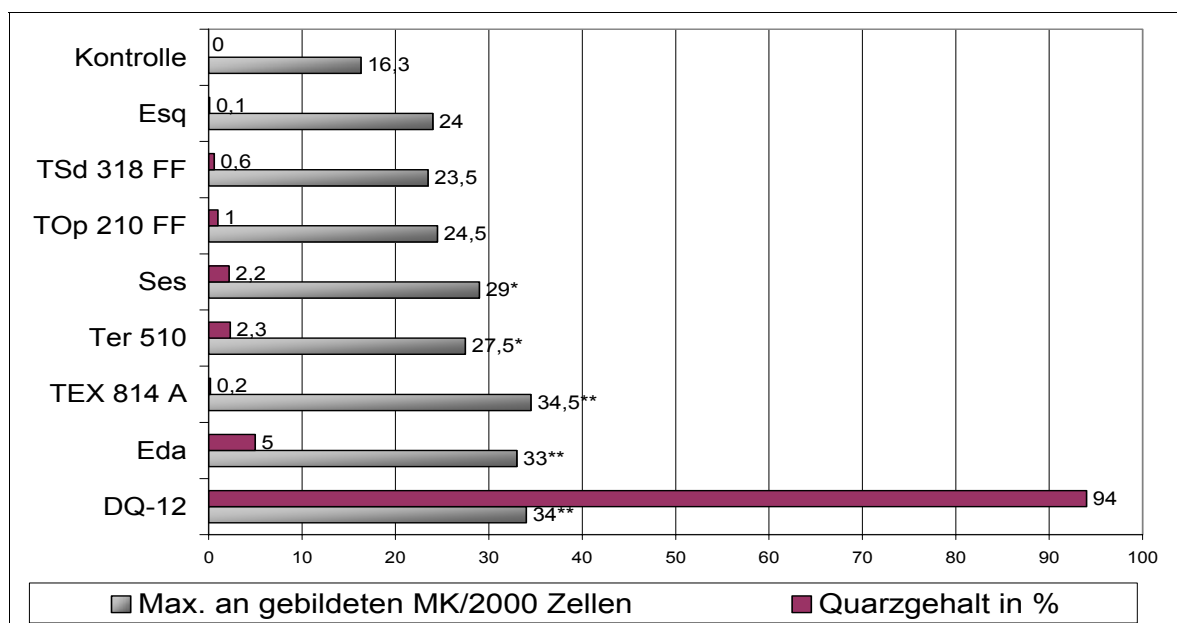
**Tab A 5:** Zytokinfreisetzung durch Bentonit- und Quarzpartikel in THP1-Makrophagen bei Konzentrationen von 1 bis 50 µg/cm<sup>2</sup> (Mittelwerte ± SD).

Konz. [µg/cm <sup>2</sup> ]	Probe	TNF-α [pg/ml]	IFN-γ [pg/ml]	IL1-β [pg/ml]	IL-4 [pg/ml]	IL-8 [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]
	Kontr.	0,9 ± 1,3	1,1	1,6 ± 0,7	0	199,3 ± 62,5	2,2 ± 2,9
	LPS 100 ng/ml	182,8 ± 5,2	79,5	84,9 ± 7,7	0,4	470,8 ± 25,6	26,9 ± 7,3
1	0015	2,5 ± 2,8	1,1	3,2 ± 2,9	0	168,1 ± 32,7	2,9 ± 1,0
	1400	1,8 ± 1,5	1,9	2,6 ± 0,9	0	201,9 ± 30,7	1,2 ± 1,7
	1402	0,3 ± 0,4	0,9	2,1 ± 1,7	0,6	183,2 ± 35,3	1,6 ± 2,3
	1403	0,9 ± 0,4	0,7	2,5 ± 2,6	0	136,9 ± 18,3	0,9 ± 1,3
	1404	0,2 ± 0,3	3,0	2,9 ± 0,1	0	161,0 ± 47,2	1,4 ± 2,0
	1405	1,2 ± 1,3	1,2	1,5 ± 0,4	0	163,0 ± 39,0	0,4 ± 0,6
	1408	0,1 ± 0,1	0,7	1,2 ± 0,8	0	155,9 ± 79,4	2,2 ± 3,2
	DQ-12	0,9 ± 0,6	3,3	2,9 ± 0,6	0	208,5 ± 81,5	0,2 ± 0,3
10	0015	8,9 ± 10,0	3,5	3,9 ± 0,5	0	243,7 ± 112,2	4,0 ± 0,7
	1400	3,3 ± 3,3	1,5	3,2 ± 2,3	0	172,3 ± 41,2	3,8 ± 3,8
	1402	0,7 ± 0,0	2,8	2,2 ± 0,8	0	149,2 ± 53,7	1,4 ± 2,0
	1403	2,4 ± 2,2	1,7	2,2 ± 0,6	0	111,7 ± 53,3	0,7 ± 0,4
	1404	4,5 ± 1,5	2,3	5,3 ± 4,2	0	174,2 ± 48,8	6,6 ± 8,6
	1405	1,1 ± 1,2	1,5	2,8 ± 1,7	3,3	166,0 ± 7,3	1,6 ± 2,3
	1408	1,0 ± 0,3	1,5	2,4 ± 1,3	0	132,4 ± 17,5	4,6 ± 3,9
	DQ-12	0,5 ± 0,8	3,1	3,4 ± 0,4	0,6	163,9 ± 19,5	1,4 ± 2,0
25	0015	3,0	4,1	4,1	-	194,4 ± 95,5	0
	1400	3,4 ± 0,5	1,2	3,2 ± 2,8	3,3	179,0 ± 34,5	5,7 ± 8,0
	1402	2,3 ± 0,2	1,4	2,5 ± 1,5	1,3	125,8 ± 50,2	9,7 ± 12,9
	1403	2,1 ± 0,8	1,3	2,6 ± 1,8	0	47,4 ± 18,8	0
	1404	5,2 ± 0,1	2,9	8,0 ± 7,2	0	168,7 ± 30,6	9,5 ± 8,5
	1405	2,5 ± 0,2	1,4	2,3 ± 1,1	0	137,2 ± 12,3	1,4 ± 1,1
	1408	1,3 ± 0,7	2,2	2,1 ± 0,1	4,3	70,6 ± 30,1	0,4 ± 0,6
	DQ-12	3,3 ± 1,9	2,9	3,8 ± 1,2	0	204,7 ± 1,1	2,8 ± 0,0
50	1400	6,9		8,3		246,6	0



**Tab A 6:** Zytokinfreisetzung durch Bentonit- und Quarzpartikel in makrophagenähnlichen Mono-Mac6-Zellen in verschiedenen Konzentrations- und Zeitbereichen (einfacher Versuchsansatz, aufgrund der zu niedrigen Werte war eine Wiederholung nicht sinnvoll).

Expos. [h]	Probe	Konz. [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	TNF- $\alpha$ [pg/ml]	IFN- $\gamma$ [pg/ml]	IL1- $\beta$ [pg/ml]	IL-4 [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]	TGF- $\beta$ 1 [pg/ml]	IL-8 [pg/ml]
24	1400	0,1	11,9	0,9	0,0	6,1	0,8		
		1	24,9	0,0	50,4	0,0	46,1	453,2	427,0
		10	20,7	23,6	34,8	19,9	31,5	365,5	408,0
		20	12,0	0,0	36,3	1,9	18,9	400,3	401,8
		100	9,6	0,0	40,1	0,0	0,0	347,4	190,7
		200	17,8	3,6	30,0	0,0	0,0	159,5	120,2
72	1400	1	4,7	0,0	15,0	3,3	27,0	539,6	391,6
		10	8,5	6,2	14,2	0,0	21,3	499,2	401,1
		20	11,7	28,1	16,5	0,0	22,4	454,6	403,9
		50	6,7	3,0	17,8	0,0	7,2	359,9	380,6
		100	5,5	0,0	24,4	0,0	0,3	127,7	294,7
24	DQ-12	1	21,5	0,0	35,1	2,9	35,2	449,1	426,4
		50	32,2	0,0	57,8	0,0	67,1	469,9	395,9
72	DQ-12	1	9,3	0,0	16,1	0,0	20,8	562,3	420,9
		10	9,5	0,0	19,5	2,3	27,8	646,0	401,4
		20	15,3	0,0	14,0	31,2	27,3	436,5	347,0
		50	10,4	0,0	16,3	0,0	28,5	534,0	403,4
24	LPS	50 ng/ml	33,0	0,0	88,0	0,0	67,1	430,9	406,5
		100 ng/ml	37,0	4,1	80,4	6,0	59,6	422,6	433,5
72	LPS	0,1 ng/ml	11,3	0,6	25,7	0,0	55,5	652,6	360,6
		1 ng/ml	16,7	0,0	34,4	0,0	92,6	543,7	373,4
		10 ng/ml	18,7	0,0	49,4	0,0	114,2	534,0	37,3
		100 ng/ml	10,2	0,0	59,3	7,1	119,9	436,5	307,7
24	Kontr.	0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	-	204,0
72	Kontr.	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	220,0



**Abb. A 1:** Mikrokernbildung in V79-Zellen, Maximalwerte in den Konzentrationsbereichen von 4 bis  $32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

## 8 Danksagung

**Herrn Prof. Dr. A.W. Rettenmeier** möchte ich für die Unterstützung des Projekts und für die Bereitstellung von Ressourcen am Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin des Universitätsklinikums Essen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin **Frau Priv.-Doz. Dr. E. Dopp** für ihr engagiertes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für die Beantragung der finanziellen Mittel und für die Herstellung zahlreicher Kooperationen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Besonders herzlich möchte ich mich auch für ihr aufmerksames Korrekturlesen dieser Arbeit und zahlreicher Manuskripte bedanken sowie für viele Impulse, die mich zu neuen Sichtweisen geleitet und damit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich auch **Frau G. Zimmer** die mir bei der Bewältigung der Tücken der Zellkultur zur Seite gestanden und mir in vielen Gesprächen neuen Mut und Selbstvertrauen gegeben hat. Ebenso möchte ich **Frau U. Zimmermann** danken für ihre große Hilfsbereitschaft bei allen weiteren laborpraktischen Arbeiten. Des Weiteren gilt mein Dank **Frau B. Shokouhi, M.Sc.**, die ebenfalls zur praktischen Durchführung dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die Vermittlung weiterer methodischer Grundlagen, möchte ich mich auch bei **Frau Dr. A.-M. Florea** bedanken. An dieser Stelle möchte ich auch **Herrn Prof. Dr. N.H. Seemayer** Dank sagen, der stets mit fundiertem Fachwissen als guter Diskussionspartner zur Verfügung stand.

Für die Beschaffung und die Mithilfe bei der Präparation der Bentonitproben bin ich **Herrn Dr. L. Armbruster** dankbar, der besonders in physikalisch-technischen Fragen immer ein guter Ansprechpartner war.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des IUF in Düsseldorf. Besonders erwähnt seien hier **Frau Dr. D. Höhr** für die Einführung in die Elektronenmikroskopie, **Herr Dr. T. Shi** für die Unterstützung bei der ROS-Bestimmung und **Herr Dr. R. Duffin** für die Mithilfe bei der Ermittlung der Hämolyseaktivität.

Für die maßgebliche Unterstützung bei der Endotoxinbestimmung möchte ich ebenso **Frau Priv.-Doz. Dr. M. Raulf-Heimsoth**, BGFA Bochum, danken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. G. Iliakis**, **Herrn Prof. Dr. W.-U. Müller**, **Frau T. Mußfeldt**, Institut für Medizinische Strahlenbiologie, und **Herrn Dipl.-Biol. R. Yücel**, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), für die Unterstützung bei durchflusszytometrischen Bestimmungen. Für die Zurverfügungstellung der Materialien für die DNA-Isolierung bin ich **Herrn Dr. K.H. Worm**, Institut für Pathologie, Abt. Molekularbiologie, dankbar. **Frau Dr. V. Rebmann** und **Frau A. Dolar**, Institut für Immunologie, danke ich für die Bereitstellung des ELISA bei den Zytokinmessungen. Ebenso bedanke ich mich auch bei **Herrn N. Lehmann**, Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie, für die Mithilfe bei der statistischen Auswertung der Daten, bei **Frau Priv.-Doz. Dr. U. Rauen**, Institut für Physiologische Chemie, für die Bereitstellung des Eisenchelators sowie bei **Herrn Dr. A. Skyschally**, Institut für Pathophysiologie, für die Zurverfügungstellung der Ultraschalleinrichtung.

**Herrn Dipl.-Biol. E. Hoffmann**, Universität Rostock, Institut für Tierphysiologie, danke ich für die Durchführung der Vorversuche mit V79-Zellen.

Ich danke auch **Frau Dipl.-Chem. H. Griethe** und **Herrn Dr. N. Schall**, Süd-Chemie AG, Moosburg, für die gute Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Hygiene und Arbeitsmedizin, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe, für ein sehr angenehmes und freundliches Arbeitsklima bedanken.

Ebenso danke ich auch allen Freunden, Bekannten, und Verwandten, die mir während dieser Zeit nahe gestanden und mich unterstützt haben.

## 9 Lebenslauf

### Allgemeines

Name: Stefan Geh, wohnhaft in Witten  
Geboren: 27.04.1967 in Witten, Ennepe-Ruhr-Kreis  
Familienst.: ledig

### Schulbildung und Wehrdienst

1973- 1983 Grund- und Realschule in Witten  
1986- 1987 Fachoberschule, Abschluss: Fachhochschulreife  
1987- 1988 Grundwehrdienst

### Berufsausbildung, Berufstätigkeit

1983- 1986 Ausbildung zum Fernmeldehandwerker bei der Deutschen Bundespost  
1989- 1993 Studium zum Dipl.-Ing. Elektrotechnik an der FH Dieburg  
1994- 1995 Betriebstechniker bei der Telekom

### Auslandsaufenthalte

09/93-12/93 Neuseeland, Abschluss: Cambridge First Certificate in English

### Studium der Umweltwissenschaften

1996-1997 Studium Umwelttechnik an der Universität Magdeburg, Abschluss:  
Zertifikat  
1997- 2000 Studium Umweltsicherung an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluss:  
Diplom-Umweltwissenschaftler  
Studienschwerpunkte: Umwelthygiene, Ökologie, Umwelttoxikologie,  
Umweltmikrobiologie

Thema der Diplomarbeit: „Nachweis von Schimmelpilzbefall auf verschiedenen Materialien durch mikrobielle flüchtige organische Verbindungen (MVOC)“ bei Prof. Fiedler am Institut für Allgemeine, Krankenhaus- und Umwelthygiene der FSU Jena

### Tätigkeiten während und nach dem Studium

01/99- 08/01 HiWi-Stelle am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena

09/01-12/02 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Arbeits-, Sozial- und Umwelttmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg: Mitarbeit am Projekt: „Evaluations and predictions of dermal absorption of toxic chemicals (EDETUX)“

Seit 15.12.02 Doktorandenstelle am Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin des Universitätsklinikums Essen