Philipps Universität Marburg

Förderkennzeichen 03X0093B - Abschlussbericht

CarbonBlack

Prädiktion humantoxikologischer Wirkungen synthetischer Carbon Black Nanopartikel (CBNP)

Teilprojekt 5: Toxikologische Wirkungen von CBNP auf Typ II Pneumozyten und Clara Zellen

Auftraggeber:
Projektträger Jülich
Forschungszentrum Jülich GmbH
Projektbetreuer: Dr. Hans-Jörg Clar
Wilhelm-Johnen-Straße
52425 Jülich

Ausführende Stelle:
Philipps-Universität Marburg, Labor für Zellbiologie der Lunge, Abteilung für Pneumologie, Fachbereich Medizin
Baldingerstraße
35043 Marburg
Germany

Projektleitung:
Prof. Dr. Bernd Müller
Tel: +49 (0) 6421-586-4969
Fax: +49 (0) 6421-586-4976
Email: bmueller@staff.uni-marburg.de

Datum: 18. Dezember 2015

Dieser Bericht besteht aus 30 Seiten

Dr. Nicole Schreiber

Marburg, 18. Dezember 2015

INHALT **SEITE**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **3**

KURZDARSTELLUNG

1 ECKDATEN ZUM PROJEKT **4**

1.1 AUFGABENSTELLUNG 4
1.2 VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DES VORHABENS 5
1.3 PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS 6
1.4 WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHER STAND ZU BEGINN DES VORHABENS 6
1.5 KOOPERATIONEN 7
1.6 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN 9

EINGEHENDE DARSTELLUNG

2 PROJEKTDURCHFÜHRUNG **10**

2.1 BETEILIGTE WISSENSCHAFTLER 10
2.2 RICHTLINIEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DES PROJEKTS 10
2.3 MAßGESCHNEIDERTE CBNP UND REFERENZSUBSTANZEN 11

3 OPTIMIERUNG DER PARTIKELRETENTIONSZEIT **12**

4 TOXIZITÄTSVERGLEICH OBERFLÄCHENFUNKTINOALISIERTER CBNP NACH AKUTER EXPOSITION **13**

5 PILOTSTUDIE ZUR SUBCHRONISCHEN CBNP EXPOSITION **20**

6 LITERATURVERZEICHNIS **25**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AR	Acetylenruß
AP	Arbeitsprojekt
BaP	Benzo[a]pyren
BET	Analyseverfahren nach Brunauer, Emmett und Teller
BSA	Bovine serum albumin
CBNP	Carbon Black Nanopartikel
CK	Cholinkinase
CTP	Cholinphosphatcytidylyltransferase
d	Tag
DQ12	Quarz, Referenzpartikel
g	Gramm
GLP	Gute Laborpraxis
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
h	Stunde
H. E.	Hämatoxylin Eosin Färbung
H_2O	destilliertes Wasser
IHC-P	Immunhistochemie (Paraffin)
IL	Interleukin
KAT	Katalase
NA	9-Nitroanthracen
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
PAKs	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAS-Reaktion	Perjodsäure Schiff-Reagenz Reaktion
Pr90	Printex®90
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	radikale Sauerstoffspezies
SEM	Standard error of the mean
SOD	Superoxiddismutase
SP	Surfactantprotein

TG	Thermogravimetrie
TiO_2	Titandioxid
TP	Teilprojekt
µg/µl	Mikrogramm/Mikroliter

KURZDARSTELLUNG

1 ECKDATEN ZUM PROJEKT

1.1 AUFGABENSTELLUNG

Kohlenstoff-Nanopartikel in Form von industriellem Carbon Black (Ruß) werden weltweit im Maßstab von etwa 6 bis 7 Megatonnen pro Jahr hergestellt. Der auf Westeuropa entfallende Anteil liegt bei ca. 1,25 Megatonnen pro Jahr. Die Anwendungsfelder von industriell hergestelltem Ruß liegen für mehr als 90 % in der Verstärkung von Elastomeren und zu knapp 10 % in der Verwendung in Druckfarben, Farben und Lacken und als Pigment in Kunststoffen. Ein geringer Anteil des industriell produzierten Carbon Black findet Anwendung als Toner für die Elektrophotographie (Fotokopie) sowie in Batterien. Bei der Herstellung von Elastomeren nimmt die Reifenindustrie etwa 60 % der produzierten Ruße auf, während ca. 30 % in andere technische Gummiartikel fließen. Sie gehören somit zu den am weitesten verbreiteten, in unserer Lebenswelt vorkommenden Nanopartikel. Aufgrund der industriellen Herstellungs- und Modifikationsprozesse können Carbon Black Nanopartikel (CBNP) einen hohen Gehalt an oberflächenständigen sauren oder basischen Oberflächen-Oxiden aufweisen oder kondensierte Polyaromate adsorbieren. Die kanzerogene Wirkung einiger Polyaromaten ist bekannt, bei einer Reihe anderer besteht der Verdacht auf Mutagenität bzw. Kanzerogenität. Die WHO-International Agency for Research on Cancer stufte CBNP als potenziell karzinogen (Gruppe 2B) für den Menschen ein. Dabei ist unklar, in wie weit das Gefährdungspotenzial von Carbon Black selbst ausgeht oder auf eine der genannten Oberflächenfunktionen beschränkt ist.

Die systematische Analyse des Einflusses von CBNP, den Oberflächenfunktionen sowie von CBNP-Modifikationen auf deren pulmonal-toxikologische Wirkung hat somit klare Implikationen für die industrielle Herstellung, den Umgang und die Verwendung von synthetischen CBNP.

Durch gezielte Auswahl toxikologisch unbedenklicher Modifikationen ließe sich ein potenzielles Gesundheitsrisiko vermindern, ohne die technischen Anwendungsbereiche einzuschränken, und damit die gesellschaftliche Akzeptanz der Verwendung von CBNP erhöhen. Das Verbundvorhaben hatte zum Ziel, valide Kriterien zur Abschätzung der toxischen Wirkungen von CBNP im Vergleich zu Referenzmaterialien bei pulmonaler Exposition zu erarbeiten. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, inwieweit das Gefährdungspotenzial mit definierten Materialeigenschaften korreliert. Bisher ist unklar, ob das Gefährdungspotential in erster Linie durch die Partikelgröße und -geometrie oder durch die Oberflächenchemie determiniert wird.
In Teilprojekt 1 dieses Verbundvorhabens wurden in ihren Materialeigenschaften spezifisch modifizierte CBNP analog zu industriellen Herstellungsverfahren hergestellt und mit unterschiedlichen Methoden detailliert charakterisiert. Im Carbon Black Verbundvorhaben wurden *in vitro* und *ex vivo* Testmodelle aus verschiedenen Lungenregionen und Spezies sowie unterschiedlicher Komplexität getestet und verglichen. Abschließend sollte in einer *in vivo* Inhalationsstudie die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo* Situation überprüft werden.
Das hier beschriebene Teilprojekt fokussierte darauf, das toxische Potential definierter, chemisch funktionalisierter CBNP auf den terminalen Respirationstrakt, insbesondere auf Typ II Pneumozyten und Clara Zellen zu analysieren.

1.2 VORAUSSETZUNG FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DES VORHABENS

Unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Müller wurden in den vergangenen Jahrzehnten im Labor für Zellbiologie der Lunge (Philipps-Universität Marburg, Abteilung für Pneumologie) grundlegende Mechanismen des Lungen-Surfactant und Antioxidantiensystems anhand verschiedener *in vivo* Experimente analysiert.
Im Fokus der Untersuchungen standen die stoffwechselaktiven, für den Gasaustausch essentiellen Typ II Pneumozyten. Durch die gezielte Vorschädigung (NO_2-Inhalation bzw. Asthma bronchiale-Modell) von Ratten- und Mauslungen und der anschließenden Isolation von Typ II Pneumozyten gelang es pathophysiologische Veränderungen im Typ II Pneumozyten-Metabolismus anhand biochemischer (Phospholipidkonzentration etc.), molekularbiologischer (Western Blot, PCR etc.) und histologischer Untersuchungen (PAS-Reaktion, IHC-P etc.) aufzudecken (Müller et al., 1992,1993, 1998, 2003; Hochscheid et al., 2002, 2005, 2014; Vogt et al., 2007).

1.3 PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS

Das Projekt wurde in enger Vernetzung mit den Verbundpartnern (siehe 1.5) bearbeitet. Ein Schema des mehrstufigen Prüfverfahrens ist in den Abb. 1 und 2 dargestellt.

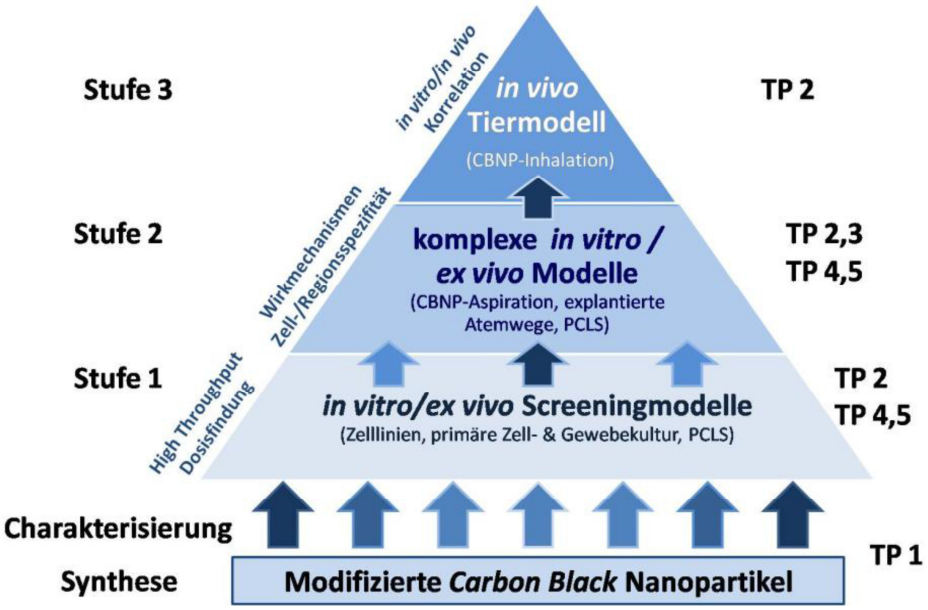

Abb. 1: Schema des mehrstufigen Prüfverfahrens mit zugeordneten Teilprojekten (TP)

Auf dem Kick-Off Meeting wurde von allen Projektpartnern die Notwendigkeit erkannt, zunächst Versuche zur Suspendierung von CBNP in unterschiedlichen Medien/ Pufferlösungen durchzuführen und ein Standardprotokoll zu erarbeiten. Diese Experimente waren im ursprünglichen Arbeitsplan nicht vorgesehen. Dadurch hat sich der Beginn der übrigen *in vitro* bzw. *in vivo* Arbeiten um ca. 2 Monate verzögert.

1.4 WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHER STAND ZU BEGINN DES VORHABENS

Die Maus ist ein sehr beliebter Modellorganismus in der medizinischen Grundlagenforschung. Allein zwei Drittel der bisherigen *in vivo* Versuche zur Risikobewertung von CBNP wurden an Mäusen durchgeführt. Trotz Abweichungen der anatomischen Struktur, unterschiedlichen Clearance Effizienz und Unterschieden bei der Regulation des Immunsystems sind Versuche an Tieren unumgänglich. Das Mausmodell bietet eine Reihe von Vorteilen. Dazu gehören die Möglichkeit physiologische Parameter wie die Lungenfunktion per Head-out Bodyplethysmographie zu testen und eine große Anzahl von Antikörpern und bestehenden Untersuchungs-Kits nutzen zu können.

Bedingt durch unterschiedliche Partikeldeposition, Clearance-Mechanismen der Lunge und der enormen Reaktivität der CBNP sind *in vivo* Untersuchung derzeit noch unverzichtbar.
Der terminale Lungenbereich ist der Ort des Gasaustausches, dieser wird durch eine besonders dünne Blut-Luft-Gewebeschranke und eine sehr große Oberfläche gewährleistet. Typ II Pneumozyten sind ca. 10 µm kleine, kuboidale Zellen, deren Hauptaufgaben die Produktion und Speicherung von pulmonärem Surfactant (engl. surface active agent), sowie das Recycling von Surfactantkomponenten sind und deren Anteil ca. 5 % der Alveolaroberfläche ausmacht (Mason & Williams, 1977; Wright & Hawgood, 1989; Dobbs & Johnson, 2007). Surfactant ist ein ca. 0,1 bis 0,9 µm dünner osmophiler Film der die Alveolen umhüllt und sich vorrangig aus Lipiden (Dipalmitoylphosphatidiylcholin, Phosphatidylglycerol etc.) und Proteinen (Plasmaproteine; Surfactantproteine A, B, C und D) im Verhältnis 10:1 zusammensetzt (Possmayer, 1988; Weaver & Whitsett, 1991; Griese, 1999; Van Golde et al. 1994; Bastacky et al., 1995).
Nach der Synthese wird die Substanz in den Vesikeln der Typ II Pneumozyten gespeichert und nach Bedarf sezerniert. Synthese sowie Exozytose werden u. a. über die Dehnung der Lunge bei der Atmung stimuliert (Rooney, 1998; Edwards, 2001). Durch die grenzflächenaktive Substanz wird die Oberflächenspannung während der Atmung reduziert und so ein Kollaps der kleineren Alveolen verhindert (Weibel et al., 2007; Kirsch et al., 2011). Kommt es zu einer Schädigung der nicht teilungsfähigen und nur bedingt reparaturfähigen Typ I Zellen, so können diese durch teilungsfähige Typ II Pneumozyten ersetzt werden (Mason & Williams, 1977). Alveoläre Zellen, zu denen auch die bis im Ductus alveolares vorkommenden Clara Zellen zählen, produzieren außerdem Effektormoleküle wie verschiedene Zytokine und Chemokine.
Kommt es zu CBNP-bedingten strukturellen und funktionellen Veränderungen im Alveolarbereich, so spiegelt sich dies vor allem in Typ II Pneumozyten bzw. Clara Zellen wieder.
Der Abschnitt zum wissenschaftlich-technischen Stand zu Beginn des Vorhabens wurde aus der Dissertation: „Wirkung von Carbon Black Nanopartikeln (CBNP) auf die Funktion von Typ II Pneumozyten“ entnommen (Schreiber, 2015).

1.5 KOOPERATIONEN

Namen und Anschriften der beteiligten Verbundpartner, sowie eine Skizze der Teilprojektvernetzung (Abb. 2):

Prof. Dr. Heinz Fehrenbach (Sprecher, Teilprojekt 4)
Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Bereich Experimentelle Pneumologie Tel.: +49-(0)4537-188-729
Parkallee 1 Fax: +49-(0)4537-188-4906
D - 23845 Borstel E-Mail: hfehrenbach@fz-borstel.de

Prof. Dr.-Ing. Henning Bockhorn (Teilprojekt 1)
Karlsruher Institut für Technologie Campus Süd
Engler-Bunte-Institut Bereich Tel.: +49-(0)721-608-2570
Verbrennungstechnik Fax: +49-(0)721-608-7770
Kaiserstrasse 12 E-Mail: Henning.Bockhorn@kit.edu
D - 76131 Karlsruhe

Dr. Tanja Hansen (Teilprojekt 2)
Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
(Fraunhofer ITEM) Tel.: +49-(0)511-5350-226
Nikolai-Fuchs-Straße 1 Fax: +49-(0)511-5350-155
D - 30625 Hannover E-Mail: tanja.hansen@item.fraunhofer.de

Prof. Dr. Peter König (Teilprojekt 3)
Universität zu Lübeck
Institut für Anatomie Tel.: +49-(0)451/500-4022
Ratzeburger Allee 160 Fax: +49-(0)451/500-4034
D - 23538 Lübeck E-Mail: koenig@anat.uni-luebeck.de

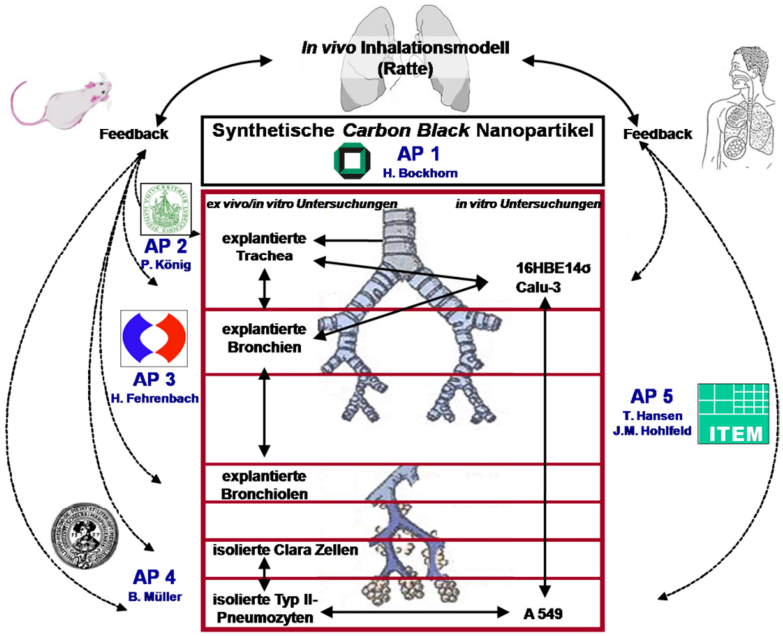

Abb. 2: Vernetzung der einzelnen Arbeitsprojekte (AP)

1.6 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Im Gesamtprojekt wurden die toxischen Effekte von unmodifizierten CBNP denen von mit PAK gecoateten CBNP gegenübergestellt. Basis hierfür waren chemisch und physikalisch eingehend charakterisierte Partikel, die standardisiert suspendiert und anschließend an die Teilprojekte verschickt wurden. Dies erlaubt es die Ergebnisse, die in den einzelnen Teilprojekten gewonnen wurden untereinander zu vergleichen und eine abschließende Gesamtbewertung vorzunehmen.

Dabei zeigte sich, dass die Veränderung der Oberfläche der CBNP die Wirkung der Partikel auf einzelne Zelltypen deutlich verändern kann. So fanden sich im Zytotoxizitätsscreening in Zellkulturversuchen keine starken Unterschiede in der Toxizität der verschiedenen Partikel. Einzelne Endpunkte wie TEER und ROS-Produktion erlaubten aber eine Differenzierung zwischen den CBNP Modifikationen, wobei der Acetylenruß die stärkste Wirkung zeigte. Dieses Ergebnis korreliert gut mit den in der explantierten murinen Trachea gewonnenen Daten – hier erwies sich der Acetylenruß ebenfalls als der toxischste Partikel, wobei die gesteigerte Toxizität vermutlich auf eine Induktion von Cytochrom P450 Oxidoreduktasen in Zellen des Trachealepithels zurückzuführen war. Der Acetylenruß induzierte in diesem Modell auch als einziger CBNP pro-inflammatorische Mediatoren.

Obwohl die Exposition mit PAK-gekoateten CBNP in der murinen Trachea zu einem gesteigerten Zelluntergang führte und dies auch die mukoziliäre Clearance *ex vivo* beeinträchtigte, waren keine Epitheldefekte nachweisbar. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Atemwegsepithel den Zelluntergang kompensieren kann und toxische Effekte nach Kurzzeitexposition gering sind. Dies zeigte sich auch in der durchgeführten *in vivo* Studie. Im Inhalationstest an Ratten nach OECD-412 zeigte bis auf den Acetylenruß keiner der Partikel Hinweise auf toxische Effekte. Auch die Exposition mittels oropharyngealer Aspiration von Mäusen führte nicht zu einem nennenswerten toxischen Effekt.

Die Ergebnisse dieses Projekts legen nahe, dass die toxischen Effekte von CBNP durch Coating mit PAK verstärkt werden können, wenn Zellen durch Expression von Cytochrom P450 Oxidoreduktasen sensibel gegenüber PAK sind. Zellkulturmodelle, die diese Eigenschaft nicht besitzen, werden diese toxischen Effekte nicht detektieren. Daraus muss geschlussfolgert werden, dass die Validität eines Testsystems steigt, je näher es der *in vivo* Situation entspricht und eine valide Aussage über die Toxizität eines Nanopartikels alleine aufgrund von einzelnen Zellkulturmodellen nicht erreicht werden kann.

Die Ergebnisse legen auch nahe, dass die akute Toxizität von ungecoateten CBNP und PAK-gecoateten CBNP gering ist und von der Lunge kompensiert werden kann.

Allerdings kann aufgrund dieser Ergebnisse keine Aussage über die toxischen Effekte einer Langzeitexposition gemacht werden. Hier ist vorstellbar, dass die Regenerationsfähigkeit des Atemwegsepithels überschritten wird.
Da Patienten mit Atemwegserkrankungen bereits Epitheldefekte und eine geringere Regenerationsfähigkeit des Epithels aufweisen, könnten sie bereits auf eine einmalige Exposition deutlich sensitiver reagieren als gesunde Probanden.

EINGEHENDE DARSTELLUNG

2 PROJEKTDURCHFÜHRUNG

2.1 BETEILIGTE WISSENSCHAFTLER

Prof. Dr. Bernd Müller
Dr. Nicole Schreiber

2.2 RICHTLINIEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DES PROJEKTES

Tierschutz: Alle Versuche erfolgten im Rahmen der Maßgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes (Bundesarbeitsblatt, 18.05.2006).

Gute Laborpraxis (GLP): Die Durchführung der Experimente erfolgte nach GLP-Kriterien. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die Stabilität und Vergleichbarkeit der CBNP-Suspensionen gelegt. Aus diesem Grund wurden Suspensionsreste direkt nach Abschluss der oropharyngealen Aspiration etc. sofort an das Fraunhofer ITEM Hannover zurück versandt um dort erneut gemessen werden zu können. Alle verwendeten Suspensionen zeigten keinen Qualitätsverlust nach dem Transport und gewährleisteten so gleiche Suspensionsqualitäten an den einzelnen Standorten. Außerdem wurden Vorschläge des jährlich tagenden, externen Beirates (DECHEMA, Frankfurt) aufgenommen und wenn möglich umgesetzt.

2.3 MAßGESCHNEIDERTE CBNP UND REFERENZSUBSTANZEN

Tab. 1: Partikeleigenschaften in Suspension

	Parikeldurch-messer/ Standard-abweichung (REM) [nm]	**Massen-abnahme bis 1000°C (TG) [%]**	**Ober-fläche (BET) [m²/g]**	**z-average (0,5 g BSA/l) [nm]**	**Zeta-potential (0,5 g BSA/l) [mV]**
Printex®90	16,53 ± 0,42/ 0,30 ± 0,04	0,5 ± 0,4	302 ± 16	155 ± 1	-34 ± 5
Acetylenruß	14,16 ± 0,09/ 0,14 ± 0,01	19,0 ± 0,7	115 ± 3	174 ± 5	-36 ± 3
Extrahierter Acetylenruß	14,16 ± 0,09/ 0,14 ± 0,01	4,8 ± 0,5	223 ± 11	166 ± 2	-33 ± 2
Pr90 gecoated mit 9-Nitroanthracen	16,53 ± 0,42/ 0,30 ± 0,04	14,6 ± 0,1	91	176 ± 5	-38 ± 4
Pr90 gecoated mit Benzo[a]pyren	16,53 ± 0,42/ 0,30 ± 0,04	16,1 ± 0,5	91 ± 2	172 ± 7	-37 ± 3

BET - Analyseverfahren nach Brunauer, Emmett und Teller, BSA - Bovine serum albumin, Pr90 - Printex®90, REM - Rasterelektronenmikroskop, TG - Thermogravimetrie

3 OPTIMIERUNG DER PARTIKELRETENTIONSZEIT

Die toxikologische *in vivo* Analyse kohlenstoffbasierter NP erfordert eine umfangreiche Prüfung bestehender Testprotokolle auf Anwendbarkeit. Grund für den eingeschränkten Methodentransfer sind abweichende chemische und physikalische Eigenschaften von CBNP gegenüber nicht-nanoskaligen Materialien gleicher Zusammensetzung und damit verbundene, mögliche Störungen durch Partikeladsorption bzw. Proteininaktivierung in Abhängigkeit von der Materialzusammensetzung, der Inkubationszeit und der verwendeten Dosis (Holder et al., 2012). Die Vielzahl bestehender *in vivo* und *in vitro* Toxizitätstests und die variierenden Applizierungsmethoden erschweren den Vergleich der Ergebnisse mit Resultaten anderer Studien. Dies wurde innerhalb des Verbundprojektes durch den Einsatz eines gemeinsamen, inflammatorisch wirkenden DQ12-Referenzpartikels umgangen (Clouter et al. 2001; Creutzenberg et al. 2008; Roursgaard et al. 2011).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Gestaltung der Versuche war die Festlegung der CBNP-Dosis vor Beginn der Studie. Mehrfach konnte der negative Effekt verschiedener Partikeldosen und Expositionszeiträume auf die Lungenhomöostase *in vivo* nachgewiesen werden (Renwick et al., 2004; Stoeger et al., 2006). Versuche mit geringen, realitätsnahen Konzentrationen untermauern das toxische Potential von CBNP (Brain et al., 1976; Rao et al., 2003; De Vooght et al., 2009; Lakatos et al., 2006). In Anlehnung an die Arbeiten mit geringen Applizierungsdosen wurde für die Vorversuche eine Konzentration von 5 µg CBNP pro Maus festgelegt.

Nach Betrachtung aller Ergebnisse zeigten sich bildgebende Analyseverfahren, wie die mikroskopischen Begutachtungen der Lungen als nur geringfügig störanfällig, da Interaktionen zwischen CBNP und den Färbemitteln bzw. Nachweisreagenzien nur eine untergeordnete Rolle spielen. Somit dienten sie als wichtige Grundlage für die Interpretation der biochemisch und molekularbiologisch ermittelten Resultate. Akute Effekte konnten bereits nach 3-tägiger Partikelretentionszeit erfasst werden. Gegenüber der 24-stündigen Retentionszeit bietet sie den Vorteil, eine Lungenfunktionsprüfung als weiteren aussagekräftigen Parameter in das Prüfverfahren aufzunehmen. Für die Begutachtung oberflächenfunktionalisierter CBNP wurde die Partikeldosis für die NP und den Referenzpartikel in Abstimmung mit den anderen Arbeitsgruppen des Verbundprojektes zur besseren Vergleichbarkeit aller Ergebnisse von 5 auf 7 µg CBNP pro Maus angehoben.

Die Abschnitte zur eingehenden Darstellung (3 - 5) wurden aus der Dissertation: „Wirkung von Carbon Black Nanopartikeln (CBNP) auf die Funktion von Typ II Pneumozyten“ entnommen (Schreiber, 2015).

4 TOXIZITÄTSVERGLEICH OBERFLÄCHENFUNKTIONALISIERTER CBNP NACH AKUTER EXPOSITION

Hauptziel des Verbundprojektes war es, den Effekt definierter CBNP-Oberflächenfunktionalisierungen auf alle Abschnitte des Respirationstraktes anhand geringer Dosen durch eine Kombination aus *in vivo-in vitro*-Kurzzeitversuchen zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung des toxischen Potentials im terminalen Abschnitt des Respirationstrakts.

Im Vergleich zu Produkten anderer Industriezweige sind nanotechnologische Materialien ein relativ neues Forschungsgebiet hinsichtlich ihrer Gefahreneinstufung. Bisherige Studien über kohlenstoffbasierte NP beschäftigten sich vorrangig mit der Prüfung verschiedener Expositionsdosen, Partikelretentionszeiten und dem Vergleich verschiedener Partikelformen (SWCNTs, MWCNTs etc.) und deren Oberflächenstruktur. Versuche mit funktionalisierten kohlenstoffbasierten Nanomaterialien sind noch selten. Saber und Kollegen untersuchten z. B. das inflammatorische und genotoxische Potential von Printex®90 und oberflächenbeschichteten bzw. nicht-modifizierten TiO_2-Partikeln 24 h nach intratrachealer Instillation. Die verwendete Dosis betrug 54 µg pro Maus. Das als Referenzpartikel eingesetzte Printex®90 und nicht-beschichtetes TiO_2 riefen die stärkste inflammatorische Reaktion hervor. Allerdings konnte nach Applikation der modifizierten TiO_2-Partikel DNA-Schädigungen beobachtet werden, während unbeschichtetes TiO_2 keine Effekte im Comet Assay zeigte (2012). CBNP werden bereits während des industriellen Herstellungsprozesses auf verschiedenste Weise chemisch funktionalisiert. Neben der gezielten Veränderung der Oberfläche besteht außerdem die Möglichkeit einer ungewünschten Interaktion von CBNP mit Schadstoffen der Luft (IARC, Vol. 93, 2010; Schwartz et al., 1996; Rouse et al., 2008).

Um die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen abschließend vergleichen zu können, wurden die Partikelsuspensionen zentral am Fraunhofer ITEM Hannover hergestellt und vor und nach CBNP-Aspiration auf ihre Stabilität geprüft. Während der Herstellung der Suspensionen war es z. T. nötig, BSA als stabilisierenden Agens dem *Aqua bidestillata* zuzugeben. Dies kann gleichzeitig die Funktionalisierung der Partikeloberfläche überdecken bzw. dauerhaft verändern. Aus diesem Grund wurde die $H_2O_{70µl}^{-BSA}$-Kontrolle um eine $H_2O_{70µl}^{+BSA}$, sowie eine physiologischere $NaCl_{70µl}^{-BSA}$-Negativkontrolle ergänzt. Zu den *in vivo* getesteten CBNP gehörten 9-Nitroanthracen ($NA\text{-}Pr90_{7µg}^{+BSA}$) bzw. Benzo[a]pyren funktionalisiertes Printex®90 ($BaP\text{-}Pr90_{7µg}^{+BSA}$) und Acetylenruß mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen ($PAK\text{-}AR_{7µg}^{+BSA}$).

Zusätzlich erfolgte eine Oberflächenadjustierung durch den Einsatz von PAK-$AR_{15µg}^{+BSA}$, was in etwa der Oberfläche von $Pr90_{7µg}^{+BSA}$ entspricht. Die Auswahl der chemischen Funktionalisierungen wurde durch das Karlsruher Institut für Technologie auf Grund ihrer Umweltrelevanz vorgenommen. Polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAKs) sind ubiquitär in der Außenluft und entstehen z. B. bei Produktionsprozessen in der Reifen- bzw. Aluminiumindustrie und bei der Verbrennung organischer Substanzen. Die dadurch stark variierende Zusammensetzung bedeutet zugleich unterschiedliche toxische Potentiale (IARC, Vol. 92, 2010; Lee, 2010).

Für die bessere Interpretation der Versuchsergebnisse war es außerdem notwendig die Wirkung des Suspensionsmittels BSA näher zu untersuchen. Printex®90 konnte sowohl mit als auch ohne BSA ($Pr90^{+BSA}$, $Pr90^{-BSA}$) stabil suspendiert werden. Dies ermöglichte den direkten Vergleich. Studien anderer Arbeitsgruppen belegen die Wichtigkeit der Suspensionszusammensetzung. Dutta und Kollegen zeigten durch einen *in vitro* Versuch mit RAW 264,7-Zellen und SWCNTs (10 nm) und Quarz (50 bis 1000 nm) unterschiedliche Proteinbindungsprofile der getesteten Partikel. Des Weiteren konnten durch die Verwendung Pluronic F127-umhüllter SWCNTs Inhibitionen der Albuminadsorption und anti-inflammatorischen Wirkung festgestellt werden (2007).

Die Prüfung der Lungenfunktion per nicht-invasiver Head-out Bodyplethysmographie (Abb. 3) war ein wichtiger Vorteil gegenüber den Vorversuchen, bei der aus zeitlichen Gründen auf die Messung verzichtet werden musste.

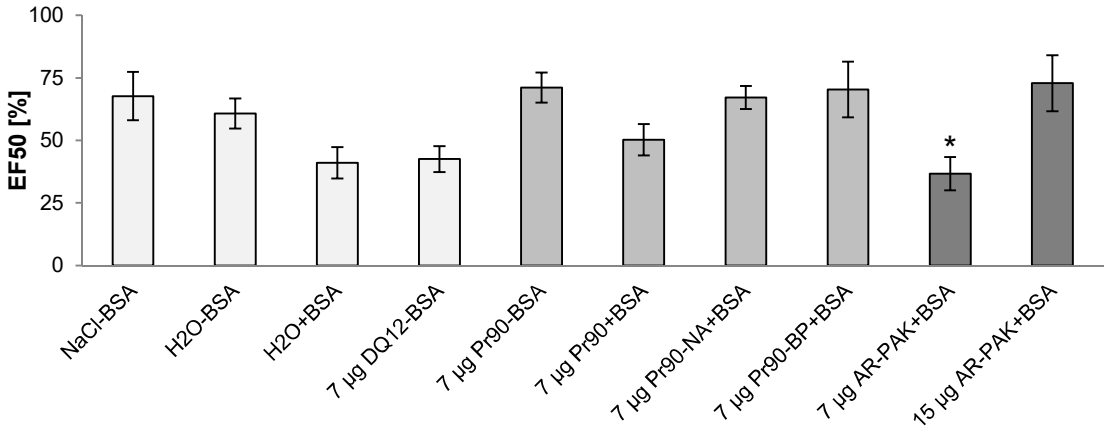

Abb. 3: Head-out Bodyplethysmographie 2 d nach Probenaspiration (n = 6 - 20). Exspiratorischer Atemfluss bei 50 % Tidalvolumen (EF50 [%]). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: *Signifikante Veränderung vs. $NaCl_{70µl}^{-BSA}$ ($p < 0,05$)

Beim Vergleich aller Versuchstiergruppen konnte eine deutliche Einschränkung der Funktion nach PAK-$AR_{7µg}^{+BSA}$-Aspiration beobachtet werden. Allerdings wurde diese auch durch die $H_2O_{70µl}^{-BSA}$-Kontrolle marginal herabgesetzt. Parallel zeigte die Behandlung mit PAK-$AR_{15µg}^{+BSA}$ keine Verschlechterung der Lungenfunktion gegenüber der $NaCl_{70µl}^{-BSA}$-Negativkontrolle. Eine bessere Lungenfunktion durch eine möglicherweise verstärkte NP-Agglomeration bei höherer Rußkonzentration ist unwahrscheinlich. Lim und Mitarbeitern beobachteten in einer nose-only Inhalationsstudie mit drei verschiedenen Printex®90-Suspensionen unterschiedlicher Agglomeratsstadien keine Veränderungen der Lungenfunktion (2012).

Nach Einsatz oberflächenfunktionalisierter bzw. nicht-funktionalisierter CBNP bzw. bei der Adjustierung der Partikeloberfläche konnten keine massiven Veränderungen der Lungenhistologie nach H. E. und Picrosirius Rot Färbung beobachtet werden (Abb. 4). Hinzu kommen keine Veränderungen der Mukussekretion in den Zellen der Bronchiolen. Diese Resultate sprechen für ein geringes toxisches Potential aller getesteten CBNP.

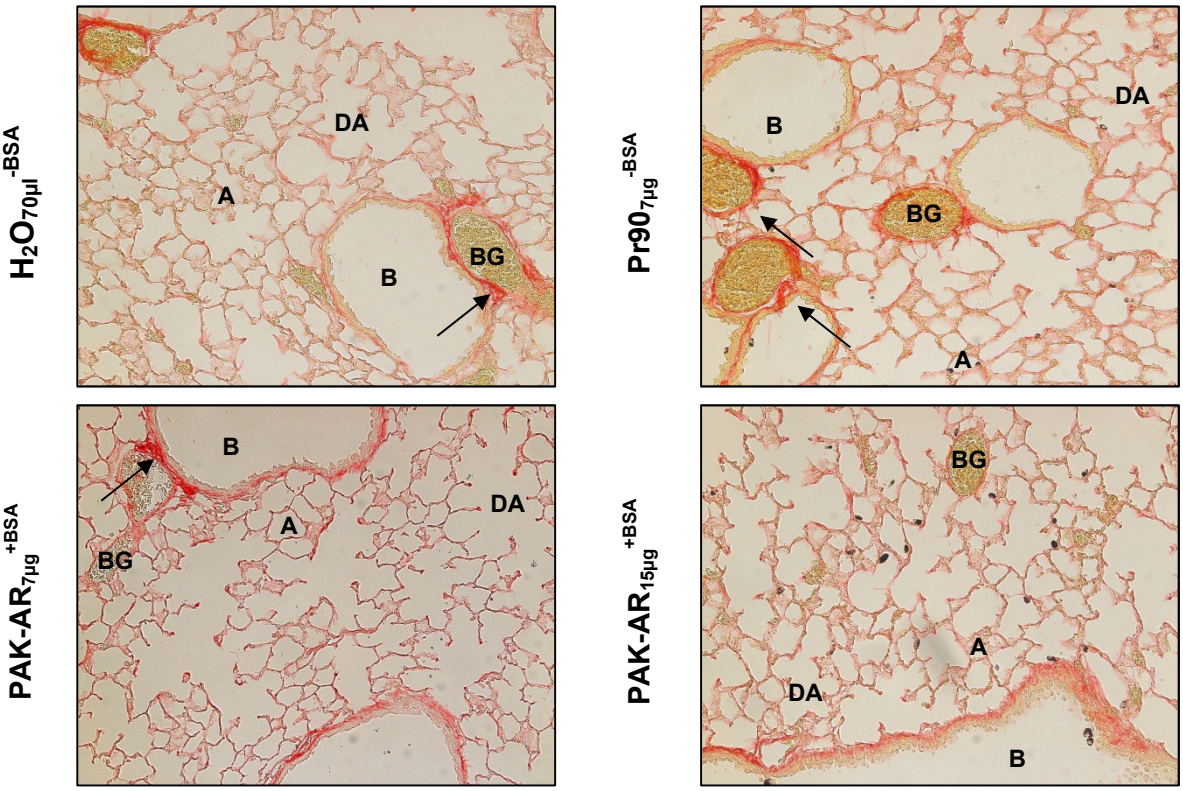

Abb. 4: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen Picrosirius Rot gefärbter Lungenschnitte 3 d nach Probenaspiration. Versuchstiergruppen: $H_2O_{70µl}^{-BSA}$, $Pr90_{7µg}^{-BSA}$, PAK-$AR_{7µg}^{+BSA}$ und PAK-$AR_{15µg}^{+BSA}$ (n = 2 - 3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Markierung kollagener Strukturen durch schwarze Pfeile; Vergrößerung: x200

Die Aspiration der Partikel induzierte lediglich intensive Inkorporationen durch Makrophagen. Die Produktion dieser Zellen wird u. a. über das Zytokin IL-4 reguliert. Immunhistochemisch konnte bei keiner Versuchsgruppe eine massiv verstärkte IL-4-Synthese beobachtet werden. Dies bestätigt eine nur sehr geringfügige, partikelbedingte Entzündung der Lunge. Oxidativer Stress in der Lunge wurde ebenfalls immunhistochemisch getestet. Eingesetzt wurden u. a. die mitochondriale Superoxiddismutase (SOD2) und die Glutathionperoxidase 3 (GPX3). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen CBNP bzw. zwischen den NP und dem Referenzpartikel und den Negativkontrollen. In allen Geweben wurden positiv markierte Bronchialepithelzellen, Alveolarsepten und Makrophagen beobachtet, ein Schutzmechanismus, begründet durch eine allgemein erhöhte Anfälligkeit für oxidativen Stress in der Lunge (Kinnula und Crapo, 2003). Die Zytospinpräparate der einzelnen CBNP-Variationen zeigten eine Verringerung des Makrophagenanteils nach $Pr90_{7\mu g}^{-BSA}$-Aspiration, sowie einen verminderten Einstrom von Lymphozyten durch $Pr90_{7\mu g}^{+BSA}$ und BaP-$Pr90_{7\mu g}^{+BSA}$-Behandlung (Tab. 2).

Roursgaard und Kollegen beobachteten 24 h nach intratrachealer Instillation von 5, 50 und 500 µg DQ12 eine dosisabhängige Infiltration Neutrophiler Granulozyten in der BAL und eine massive Reduktion des Makrophagenanteils beim Einsatz von 5 µg DQ12. Beim Erhöhen der Konzentration auf 50 bzw. 500 µg DQ12 wurde dies aber nicht bestätigt. Das Komplexe Zusammenspiel zwischen Infiltration und Abwanderung während der akuten Phase wurde als ein möglicher Grund für die wechselnden Resultate genannt (Roursaard et al., 2010, 2011). Die BAL-Zytospinpräparate partikelbehandelter Tiere zeigten gleichzeitig eine intensive Inkorporation von CBNP-Agglomeraten und Referenzpartikeln durch Makrophagen. Diese gehören zur nicht spezifischen Abwehr und sie sind in der Lage, Zytokine frei zu setzen und mit anderen Zellen über Oberflächenrezeptoren zu interagieren (Sibille und Reynolds, 1990). Barlow und Kollegen beobachteten sogar eine CBNP induzierte Makrophagenmigration in Richtung eines Typ II Epithelzell-Überstandes (L-2). Diese war im Vergleich zur Negativkontrolle bzw. den TiO_2-NP und den größeren TiO_2- und CB-Partikeln sogar verstärkt (2005).

Tab. 2: Zelldifferenzierung der BAL

	Gesamt-zellzahl	**Makro-phagen**	**Neutro-phile**	**Lympho-zyten**	**Eosino-phile**
$NaCl_{70µl}^{-BSA}$	52,8 ± 4,9	51,5 ± 4,7	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0
$H_2O_{70µl}^{-BSA}$	46,4 ± 3,5	44,7 ± 3,6	1,4 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
$H_2O_{70µl}^{+BSA}$	56,7 ± 7,2	55,9 ± 7,3	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
$DQ12_{7µg}^{-BSA}$	52,9 ± 6,7	51,0 ± 6,4	1,1 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1
$Pr90_{7µg}^{-BSA}$	**39,4 ± 2,8***	**37,7 ± 2,7***	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2
$Pr90_{7µg}^{+BSA}$	59,4 ± 7,8	58,8 ± 7,6	0,4 ± 0,2	**0,1 ± 0,0***	0,2 ± 0,1
$NA\text{-}Pr90_{7µg}^{+BSA}$	51,4 ± 5,7	51,1 ± 5,8	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
$BaP\text{-}Pr90_{7µg}^{+BSA}$	53,2 ± 4,7	52,6 ± 4,7	0,3 ± 0,1	**0,1 ± 0,0***	0,1 ± 0,0
$PAK\text{-}AR_{7µg}^{+BSA}$	70,6 ± 7,0	68,4 ± 6,9	1,9 ± 0,9	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1
$PAK\text{-}AR_{15µg}^{+BSA}$	49,5 ± 5,9	47,2 ± 5,6	1,7 ± 0,8	0,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl bzw. Zelldifferenzierung der BAL-Zytospinpräparate erfolgte unter dem Mikroskop durch auszählen 5 repräsentativer Gesichtsfelder (Mittelwerte ± SEM). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: *Signifikant reduziert vs. $NaCl_{70µl}^{-BSA}$ ($p < 0,05$); n = 6 - 20

Protein-, Phospholipid- und LDH-Konzentrationen und die antioxidative Kapazität (Trolox-Äquivalent) der BAL blieben auch nach Behandlung mit verschiedenen CBNP bzw. durch DQ12 unbeeinflusst. Problematisch bei der Bestimmung der oben genannten Parameter ist die Störanfälligkeit der Nachweisverfahren durch die Partikel selbst. Lungensurfactant setzt sich aus einer Vielzahl von Proteinen und Lipiden zusammen, welche nach Kontakt mit inhalierten NP an deren Oberfläche binden und gleichzeitig die chemische Funktionalisierung außer Kraft setzen bzw. verändern können (Dutta et al., 2007).
Das Problem der intensiven Proteinbindung verhinderte außerdem die Aktivitätsbestimmung der SOD2 und GPX3 per Western Blot. Bereits während der Aufreinigung der Typ II Pneumozyten wurden CBNP-Agglomerate in der Proteinfraktion gefunden. Trotz der Freisetzung der gebundenen Proteine während der Elektrophorese erlaubten die stark schwankenden Ergebnisse keine abschließende Interpretation. Ähnlich verhielt es sich mit der zunächst geplanten Bestimmung des BAL-Zytokinprofils.

Die Anzahl isolierter Typ II Pneumozyten stieg durch die mit PAKs versehenen Acetylenruß-NP massiv gegenüber der $NaCl_{70µl}^{-BSA}$-Negativkontrolle an. Gleichzeitig zeigte die Messung des Proteinanteils eine Abnahme durch den Referenzpartikel und eine Zunahme durch die Aspiration von $NA\text{-}Pr90_{7µg}^{+BSA}$ (Tab. 3).

Tab. 3: Zellausbeute und Gesamtproteingehalt

	Isolierte Typ II Pneumozyten	**Proteinkonzentration pro 1 Million Zellen [µg/ml]**
$NaCl_{70µl}^{-BSA}$	$4{,}8 \times 10^6 \pm 4{,}8 \times 10^5$	573,7 ± 75,8
$H_2O_{70µl}^{-BSA}$	$6{,}4 \times 10^6 \pm 4{,}6 \times 10^5$	482,9 ± 42,8
$H_2O_{70µl}^{+BSA}$	$6{,}4 \times 10^6 \pm 7{,}1 \times 10^5$	532,0 ± 46,1
$DQ12_{7µg}^{-BSA}$	$7{,}4 \times 10^6 \pm 1{,}0 \times 10^6$	**375,1 ± 43,6***
$Pr90_{7µg}^{-BSA}$	$5{,}3 \times 10^6 \pm 5{,}0 \times 10^5$	671,4 ± 73,5
$Pr90_{7µg}^{+BSA}$	$4{,}2 \times 10^6 \pm 4{,}5 \times 10^5$	726,9 ± 60,5
$NA\text{-}Pr90_{7µg}^{+BSA}$	$4{,}4 \times 10^6 \pm 3{,}1 \times 10^5$	**925,9 ± 102,5***
$BaP\text{-}Pr90_{7µg}^{+BSA}$	$6{,}6 \times 10^6 \pm 8{,}1 \times 10^5$	591,4 ± 46,3
$PAK\text{-}AR_{7µg}^{+BSA}$	**$7{,}8 \times 10^6 \pm 4{,}8 \times 10^5$***	478,6 ± 34,5
$PAK\text{-}AR_{15µg}^{+BSA}$	**$6{,}7 \times 10^6 \pm 7{,}0 \times 10^5$***	798,2 ± 113,9

Mittelwerte ± SEM; Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: *Signifikante Veränderung vs. $NaCl_{70µl}^{-BSA}$ ($p < 0{,}05$); n = 6 - 20

Parallel wurde in der Immunhistologie nach $H_2O_{70µl}^{+BSA}$, $DQ12_{7µg}^{-BSA}$ und $PAK\text{-}AR_{7µg}^{+BSA}$-Aspiration eine leicht verstärkte Proliferation des Bronchialepithels, sowie eine massivere Proliferation in den Alveolarsepten nach $Pr90_{7µg}^{+BSA}$ und $PAK\text{-}AR_{15µg}^{+BSA}$-Behandlung gefunden. Sydlik und Mitarbeiter untersuchten den Zusammenhang zwischen Apoptose und Proliferation mit Hilfe von Lungenepithelzellen der Ratte (RLE-6TN) und Printex®90 und Quarz genauer. Beide Mechanismen wurden durch Printex®90 unabhängig voneinander induziert (2006).

Bei der Analyse verschiedener Typ II Pneumozyten mRNA-Expressionen antioxidativ wirksamer Enzyme (SOD1, SOD2, SOD3, GR, GPX3, GPX4 und KAT), der Surfactantproteine (SP-A und SP-D) und der Schlüsselenzyme der Surfactantsynthese (CKα, CKβ und CTPα) zeigte sich nach CBNP-Aspiration immer wieder vereinzelt reduzierte Expressionen. Diese Absenkung könnte auf eine inadäquate mRNA-Synthese nach 3-tägiger Partikelretentionszeit hinweisen.

Störungen der Surfactantprotein mRNA-Expression weisen auf Interaktionen von CBNP und den opsonierend wirkenden Proteinen SP-A und SP-D hin. Beide Proteine sind Teil des angeborenen Immunsystems und binden potentielle gesundheitsschädigende Substanzen und fördern so die Partikelaufnahme durch phagozytierende Zellen (Wright, 1997; Mason et al., 1998; Silveyra & Floros, 2012). Kendall und Kollegen verglichen die Bindung von Surfactantkomponenten gegenüber drei verschiedenen CBNP. Nach Analyse der mRNA-Expression von IL-6 und dessen Rezeptors zeigte sich lediglich eine verstärkte Expression des IL-6-Rezeptors nach $Pr90_{7\mu g}^{-BSA}$ und NA-$Pr90_{7\mu g}^{+BSA}$-Aspiration. Allerdings konnte nach $NaCl_{70\mu l}^{-BSA}$-Behandlung eine ähnliche Tendenz beobachtet werden.

Der Vergleich der Ergebnisse chemisch funktionalisierter CBNP zeigten keine massiven Veränderungen der Lungenstruktur und eine nur geringfügige Beeinträchtigungen der Lungenhomöostase, welche sich vor allem durch eine mehr oder weniger stark veränderte mRNA-Expression antioxidativer Enzyme, Surfactantproteine und Enzyme der Surfactantsynthese in Typ II Pneumozyten äußerte. Die Ergebnisse sprechen für einen effektiven Clearancemechanismus der Lunge, welcher das toxische Potential aller getesteten CBNP limitierte.

Die Modifikation des Suspendierungsmittels, sowie die Adjustierung der Gesamtpartikel-oberfläche zeigten ebenfalls moderate Effekte. Insbesondere BSA als Stabilisator für CBNP-Suspensionen sollte durch eine physiologischere Substanz im Langzeitversuch ausgetauscht werden. Denkbar ist hier die Verwendung zellfreier BAL oder isoliertes natürliches Surfactant. Außerdem muss die Protein- und Lipidaffinität der NP-Oberfläche, sowie der mögliche Austausch chemischer Funktionalisierungen in biologischen Fluiden genauer erfasst werden.

Die Zusammenstellung der Ergebnisse des Toxizitätsvergleiches oberflächenmodifizierter CBNP wurde beim Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A angenommen (Schreiber et al., DOI:10.1080/15287394.2015.1124819; In press).

5 PILOTSTUDIE ZUR SUBCHRONISCHEN CBNP EXPOSITION

Die Pilotstudie mit nicht-funktionalisierten CBNP sollte helfen einen ersten Eindruck über die Wirkung nach Langzeitexposition zu bekommen. Während der Versuche wurden den BALB/c-Mäusen über drei Monate, in den Wochen 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 und 12, je $Pr90_{7\mu g}^{-BSA}$, $DQ12_{7\mu g}^{-BSA}$ bzw. $H_2O_{70\mu l}^{-BSA}$ oropharyngeal appliziert. Am Ende der Experimente erfolgten zunächst die Prüfung der Lungenfunktion und die Entnahme der Lungen zur histologischen Begutachtung.

Die Ergebnisse zeigten eine wesentliche Einschränkung der Lungenfunktion (Abb. 5) nach mehrfacher $Pr90^{-BSA}$-Aspiration gegenüber der einmaligen Exposition im Kurzzeitexperiment. Gleichzeitig konnte jedoch keine Verschlechterung gegenüber der Mehrfachaspiration von H_2O^{-BSA} beobachtet werden. Die mehrfache Behandlung mit dem Referenzpartikel konnte die Lungenfunktion nicht signifikant herabsetzen, während die einfache Probenaspiration die Lungenfunktion im Vergleich zur H_2O^{-BSA}-Kontrolle stark minderte.

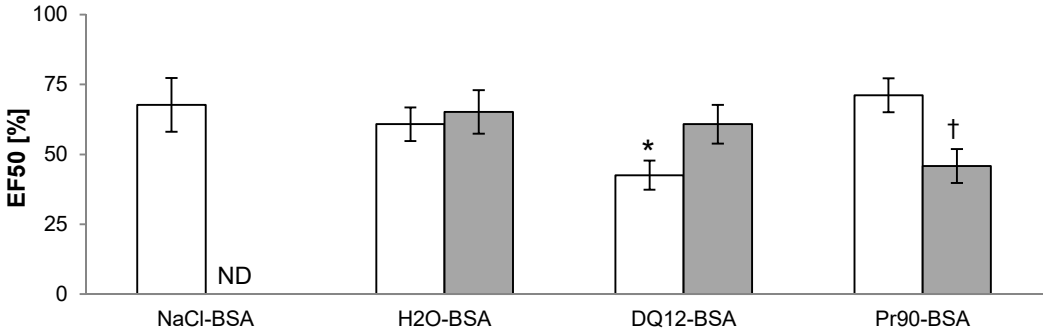

Abb. 5: Head-out Bodyplethysmographie (n = 5 - 19) nach einmaliger Aspiration und 2-tägiger Retentionszeit (weiße Balken) und 13 Wochen nach der ersten Probenaspiration (graue Balken). Exspiratorischer Atemfluss bei 50 % Tidalvolumen (EF50 [%]). Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: *Signifikante Veränderung vs. $H_2O_{70\mu l}^{-BSA}$ ($p < 0,05$); †Signifikante Veränderung vs. $Pr90_{7\mu g}^{-BSA}$ des Kurzzeitexperiments ($p < 0,05$); ND - nicht durchgeführt

Der Vergleich der Picrosirius Rot gefärbten Lungenschnitte machte außerdem deutlich, dass mehrfache CBNP- bzw. Quarz-Aspirationen die Einlagerung von Kollagen um Bronchiolen und Blutgefäße erhöht. Eine Stimulation der Zellproliferation und Kollagenproduktion ohne Zellschädigung konnte auch in einem Zellkulturversuch mit Lungenfibroblasten und SWCNTs beobachtet werden (Wang et al., 2010).

Außerdem konnten durch H. E. bzw. Picrosirius Rot gefärbte Lungenpräparate deformierte Alveolarsepten durch DQ12^{-BSA}-Mehrfachaspiration nachgewiesen werden. Printex®90 und H_2O^{-BSA} riefen keine Veränderungen der alveolaren Strukturen hervor.
Interessanterweise zeigte sich aber nach mehrfacher CBNP-Behandlung eine schlechtere Lungenfunktion trotz geringfügigerer morphologischer Veränderungen. Eine gesteigerte Mucussekretion der Bronchialepithelzellen wurde weder durch die mehrfache Aspiration der Negativkontrolle noch durch die CBNP oder den Referenzpartikel ausgelöst.
Alle Versuchstiergruppen zeigten während der Langzeitexposition eine gesteigerte SOD2- und GPX3-Expression in den Zellen der Alveolarsepten und im Bronchialepithel (Abb. 6). Im Vergleich zum Kurzzeitexperiment konnte sogar eine gesteigerte Expression der beiden antioxidativ wirkenden Enzyme verzeichnet werden. Dies deutet darauf hin, dass der oxidative Stress im subchronischen Experiment zugenommen hat.
Eine Ursache für den vermehrten oxidativen Stress könnte die Mehrfachaspiration der Suspensionen sein. Andererseits zeigten Aam und Fonum anhand verschiedener CBNP-Konzentrationen (Regal 250R, 35 nm, BET 60 m^2/g) eine dosisabhängige ROS-Freisetzung durch isolierte Alveolarmakrophagen (2007).
Im Kurzzeitexperiment wurde auf die Bestimmung der IgE-Konzentration auf Grund der geringen CBNP-Konzentration und der starken Pufferwirkung des Blutes verzichtet. Die Ergebnisse des Langzeitexperimentes zeigten ebenfalls keine massiven Veränderungen nach Partikelaspiration. Höchstwahrscheinlich waren auch hier die eingesetzten Konzentrationen zu gering um die IgE-Konzentration im Blut messbar zu erhöhen.
Dennoch ist es für zukünftige Versuche wichtig den Aspekt der CBNP-Verteilung bzw. Deposition in Sekundärorganen (Leber, Nieren, Herz, Milz, Gehirn etc.) durch mikroskopische Untersuchungen näher zu beleuchten.
Bei genauerer Betrachtung der BAL-Zytospinpräparate (Abb. 7) konnte festgestellt werden, dass der Anteil an Neutrophilen Granulozyten sank und die Anzahl der Makrophagen durch die mehrfache Aspiration nicht-funktionalisierter CBNP im Vergleich zum Akutexperiment stieg. Außerdem konnte eine deutlich verstärkte Vakuolenbildung im Zytoplasma der Alveolarmakrophagen nach Partikelaufnahme verzeichnet werden.

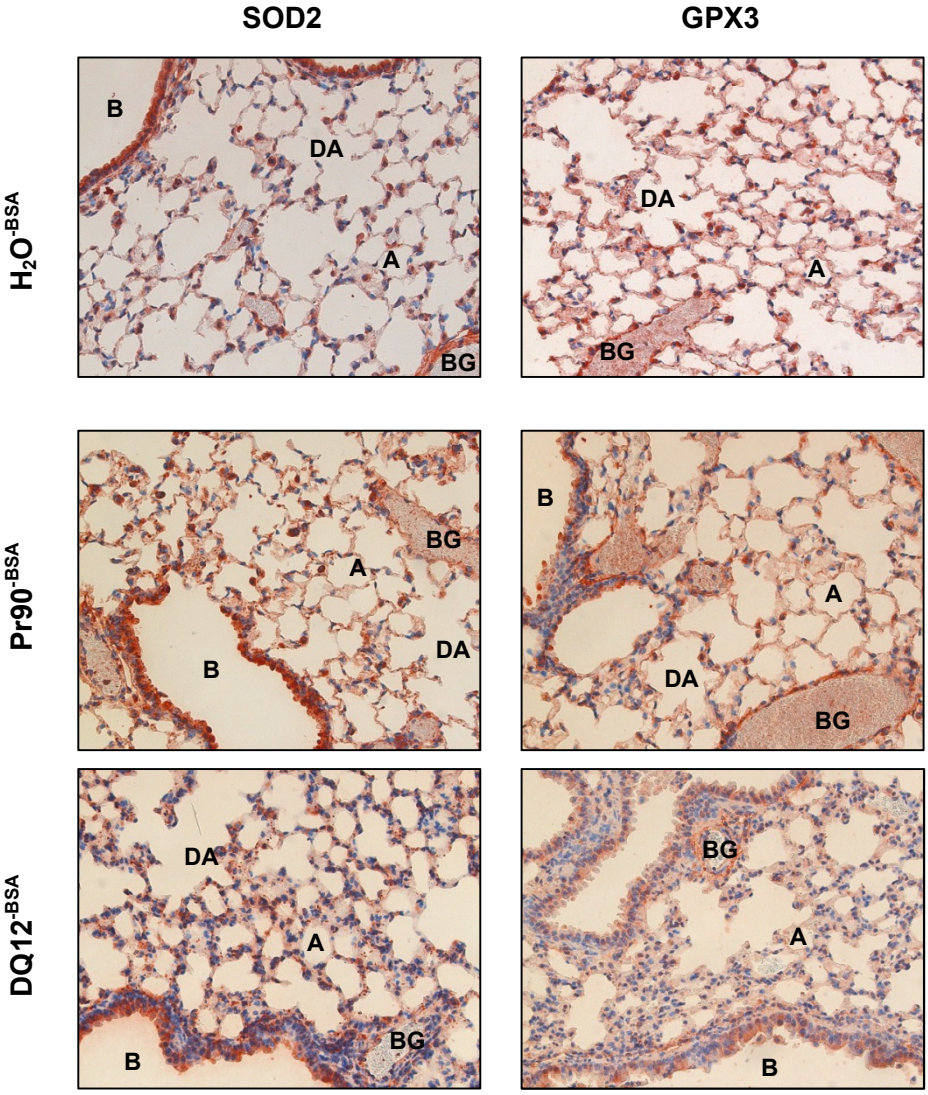

Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis der SOD2 (links) und GPX3 (rechts) nach 13-wöchiger Verweildauer in der Lunge (braun-rot). Versuchstiergruppen: H_2O^{-BSA}, $Pr90^{-BSA}$ und $DQ12^{-BSA}$ (n = 2 - 3); Abkürzungen: A - Alveole, B - Bronchiolus, BG - Blutgefäß, DA - Ductus alveolaris; Vergrößerung: x200

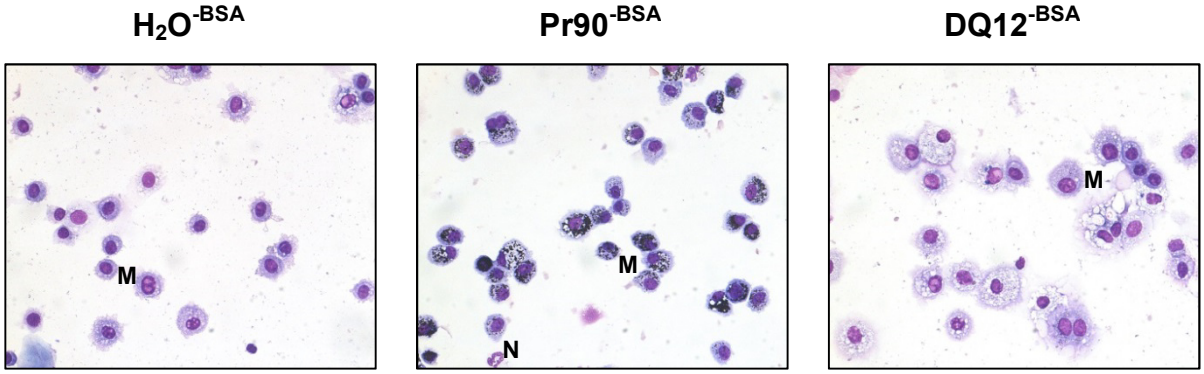

Abb. 7: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der BAL-Zytospinpräparate 13 Wochen nach der ersten Probenaspiration. Versuchstiergruppen: H_2O^{-BSA}, $Pr90^{-BSA}$ und $DQ12^{-BSA}$ (n = 8 - 9); Abkürzungen: M - Makrophage, E - Eosiner Granulozyt, N - Neutrophiler Granulozyt; May-Grünwald-Giemsa-Färbung; Vergrößerung: x400

Die mehrfache $Pr90^{-BSA}$-Aspiration führte zusätzlich zu einer Erhöhung des BAL-Phospholipidgehalts gegenüber der H_2O^{-BSA}-Negativkontrolle und einer Verringerung des Gesamtproteinanteils im Vergleich zur Einfachapplikation im Akutexperiment. Die LDH-Konzentration blieb wie im Kurzzeitversuch unverändert.
Der erhöhte Anteil an Phospholipiden kann durch eine verschlechterte Lungenfunktion begründet sein. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die Dehnung von Alveolarzellen direkten Einfluss auf die Surfactantfreisetzung ausübt (Edwards, 2001).
Wie im Kurzzeitexperiment kam es bei den ausgewählten Versuchsgruppen auch im Langzeitexperiment zu keiner massiven Veränderung der Zellzahl nach Typ II Pneumozyten-Isolation. Lediglich der Anteil an Proteinen in den Zellen wurde gegenüber den Kurzzeitversuch durch die H_2O^{-BSA}-Kontrolle und $DQ12^{-BSA}$-Exposition erhöht (Tab. 4).

Tab. 4: Zellzahl und Gesamtproteingehalt

	Isolierte Typ II Pneumozyten	**Proteinkonzentration pro 1 Million Zellen [µg/ml]**
H_2O^{-BSA}	$7{,}5 \times 10^6 \pm 8{,}8 \times 10^5$	**713,6 ± 124,3**†
$Pr90^{-BSA}$	$7{,}8 \times 10^6 \pm 7{,}6 \times 10^5$	635,2 ± 82,0
$DQ12^{-BSA}$	$7{,}0 \times 10^6 \pm 4{,}5 \times 10^5$	**755,8 ± 101,3**†

Mittelwerte ± SEM; Kruskal-Wallis & Mann-Whitney Test: *Signifikante Veränderung vs. H_2O^{-BSA} ($p < 0{,}05$); †Signifikante Veränderung vs. gleicher Exposition im Kurzzeitexperiment ($p < 0{,}05$); n = 8 - 9

Anders als beim immunhistochemischen SOD2- und GPX3-Nachweis konnten keine veränderten mRNA-Expressionen antioxidativer Enzyme in den Typ II Pneumozyten nachgewiesen werden. Dies spricht für keine Verstärkung des oxidativen Stresses. Interessanterweise kam es jedoch zu reduzierten SP-D mRNA-Expressionen im Vergleich zur H_2O^{-BSA}-Mehrfachaspiration und zu verringerten Expressionen von Enzymen der Surfactantsynthese gegenüber der Einfachexposition bzw. H_2O^{-BSA}-Mehrfachaspiration, während die BAL-Phospholipidkonzentration gegenüber der Mehrfachapplikation von H_2O^{-BSA} erhöht wurde. Ähnliche Resultate konnte durch den Mehrfacheinsatz von $DQ12^{-BSA}$ beobachtet werden. Diese widersprüchlichen Ergebnisse können laut derzeitigem Kenntnisstand nicht abschließend erklärt werden.

Die CBNP und der Referenzpartikel zeigten außerdem im Vergleich zur Einfachexposition eine geringere mRNA-Expression des IL-6-R bzw. von IL-6, diese Ergebnisse deutet auf eine vorangegangene intensive Makrophagendifferenzierung und Aktivierung bzw. Rekrutierung von Leukozyten hin (Akdis et al., 2011).

Insgesamt spiegelt der subchronische Versuchsaufbau die Aufnahme von Partikeln im Alltag besser wieder als das Kurzzeitexperiment. Die Verschlechterung einzelner Parameter, wie z. B. die Variierung des Phospholipidgehaltes in der BAL oder beginnende morphologische Veränderungen belegen die Wichtigkeit dieser und weiterer Untersuchungen, da das Gesundheitsrisiko nur durch wiederholte Partikelaufnahme genau abgeschätzt werden kann.

Die Resultate der Pilotstudie wurden 2013 im Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A veröffentlicht (Schreiber et al.).

6 LITERATURVERZEICHNIS

Aam, B. B., Fonnum, F. 2007. Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 81:441-446.

Akdis, M., Burgler, S., Crameri, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C. A. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 27:701-721.

Barlow, P. G., Clouter-Baker, A., Donaldson, K., Maccallum, J., Stone, V. 2005. Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part. Fibre. Toxicol.* 2:11.

Bastacky, J., Lee, C. Y., Goerke, J., Koushafar, H., Yager, D., Kenaga, L., Speed, T. P., Chen, Y., Clements, J. A. 1995. Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *J. Appl. Physiol*. 79:1615-1628.

Brain, J. D., Knudson, D. E., Sorokin, S. P., Davis, M. A. 1976. Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ. Res.* 11:13-33.

Clouter, A., Brown, D., Höhr, D., Borm, P., Donaldson, K. 2001. Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz: particle surface correlates. *Toxicol. Sci.* 63:90-98.

Creutzenberg, O., Hansen, T., Ernst, H., Muhle, H., Oberdörster, G., Hamilton, R. 2008.Toxicity of a quartz with occluded surfaces in a 90-day intratracheal instillation study in rats. *Inhal. Toxicol.* 20:995-1008.

De Vooght, V., Vanoirbeek, J. A., Haenen, S., Verbeken, E., Nemery, B., Hoet, P. H. 2009. Oropharyngeal aspiration: an alternative route for challenging in a mouse model of chemical-induced asthma. *Toxicology.* 259:84-89.

Dobbs, L. G., & Johnson, M. D. 2007. Alveolar epithelial transport in the adult lung. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 159:283-300.

Dutta, D., Sundaram, S. K., Teeguarden, J. G., Riley, B. J., Fifield, L. S., Jacobs, J. M., Addleman, S. R., Kaysen, G. A., Moudgil, B. M., Weber, T. J. 2007. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol. Sci.* 100:303-315.

Edwards, Y. S. 2001. Stretch stimulation: Its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 129:245-260.

Griese M. 1999. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur. Respir. J.* 13:1455-1476.

Hochscheid, R., Heinrichs, S., Kranz, S., Garn, H., Müller, B. 2002. Differences in mRNA expression, protein content, and enzyme activity of superoxide dismutases in type II pneumocytes of acute and chronic lung injury. *Free Radic. Res.* 36:759-767.

Hochscheid, R., Schreiber, N., Kotte, E., Weber, P., Cassel, W., Yang, H., Zhang, Y., Pöschl, U., Müller, B. 2014. Nitration of protein without allergenic potential triggers modulation of antioxidant response in type II pneumocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 77:679-695.

Hochscheid, R., Schuchmann, U., Kotte, E., Kranz, S., Heinrichs, S., Müller, B. 2005. NO2 induced acute and chronic lung injury cause imbalance of glutathione metabolism in type II pneumocytes. *Med. Sci. Monit.* 11:BR273-BR279.

Holder, A. L., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., Koshland, C. P. 2012. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem. Res. Toxicol.* 25:1885-1892.

IARC. 2010. *International Agency for Research on Cancer*, 2014. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/index.php> (11. August 2014).

IARC. 2010. *International Agency for Research on Cancer*, 2014. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/> (11. August 2014).

Kinnula, V. L., Crapo, J. D. 2003. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:1600-1619.

Kirsch, J., May, C., Lorke, D., Winkelmann, A., Schwab, W., Herrmann, G., Funk, R. 2011. Taschenlehrbuch Anatomie, *Thieme, Stuttgart,* 297-308.

Lakatos, H. F., Burgess, H. A., Thatcher, T. H., Redonnet, M. R., Hernady, E., Williams, J. P., Sime, P. J. 2006. Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. *Exp. Lung Res.* 32:181-199.

Lee, B.-K. 2010. Sources, Distribution and Toxicity of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) in Particulate Matter, Air Pollution, *Vanda Villanyi (Ed.)*, ISBN: 978-953-307-143-5.

Lim, C. H., Kang, M., Han, J. H., Yang, J. S. 2012. Effect of Agglomeration on the Toxicity of Nano-sized Carbon Black in Sprague-Dawley Rats. *Environ. Health Toxicol.* 27:e2012015.

Mason, R. J., Greene, K., Voelker, D. R. 1998. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am. J. Physiol.* 275:L1-13.

Mason, R. J., Williams, M. C. 1977. Type II alveolar cell: defender of the alveolus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115:81-91.

Müller, B., Barth, P., Von Wichert, P. 1992. Structural and functional impairment of surfactant protein A after exposure to nitrogen dioxide in rats. *Am J. Physiol.* 263:L177-L184.
Müller, B., Garn, H., Hochscheid, R. 2003. Impaired recycling of surfactant-like liposomes in type II pneumocytes from injured lungs. *Thorax* 58:127-134.

Müller, B., Seifart, C., Von Wichert, P., Barth, P. J. 1998. Adaptation of rat type II pneumocytes to NO2: effects of NO2 application mode on phosphatidylcholine metabolism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18:712-720.

Müller, B. & Von Wichert, P. 1993. Effect of nitrogen dioxide inhalation on surfactant phosphatidylcholine synthesis in rat alveolar type II cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1170: 38-43.

Possmayer, F. 1988. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Respir.* 138:990–998.

Rao, G. V., Tinkle, S., Weissman, D. N., Antonini, J. M., Kashon, M. L., Salmen, R., Battelli, L. A., Willard, P. A., Hoover, M. D., Hubbs, A. F. 2003. Efficacy of a technique for exposing the mouse lung to particles aspirated from the pharynx. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 66:1441-1452.

Renwick, L. C., Brown, D., Clouter, A., Donaldson, K. 2004. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup. Environ. Med.* 61:442-447.

Rooney, S. A. 1998. Regulation of surfactant secretion. Edited by Rooney, S. A., Austin, Texas; RG Landes Company, *Lung surfactant: cellular and molecular processing*. 139-163.

Roursgaard, M., Jensen, K. A., Poulsen, S. S., Jensen, N. E., Poulsen, L. K., Hammer, M., Nielsen, G. D., Larsen, S. T. 2011. Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice. *Scientific World Journal.*11:801-825.

Roursgaard, M., Poulsen, S. S., Poulsen, L. K., Hammer, M., Jensen, K. A., Utsunomiya, S., Ewing, R. C., Balic-Zunic, T., Nielsen, G. D., Larsen, S. T. 2010. Time-response relationship of nano and micro particle induced lung inflammation. Quartz as reference compound. *Hum. Exp. Toxicol.* 29:915-933.

Rouse, R. L., Murphy, G., Boudreaux, M. J., Paulsen, D. B., Penn, A. L. 2008. Soot nanoparticles promote biotransformation, oxidative stress, and inflammation in murine lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39:198-207.

Saber, A. T., Jensen, K. A., Jacobsen, N. R., Birkedal, R., Mikkelsen, L., Møller, P., Loft, S., Wallin, H., Vogel, U. 2012. Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology.* 6:453-471.

Schreiber, N. 2015. *Wirkung von Carbon Black Nanopartikeln (CBNP) auf die Funktion von Typ II Pneumozyten.* <http://doi.org/10.17192/z2015.0160> (Philipps-Universität Marburg, 4. Dezember 2015).

Schreiber, N., Ströbele, M., Hochscheid, R., Kotte, E., Weber, P., Bockhorn, H., Müller, B. Modifications of carbon black nanoparticle surfaces modulate type II pneumocyte homoeostasis. *J. Toxicol. Environ. Health A.* In press (DOI:10.1080/15287394.2015. 1124819).

Schreiber, N., Ströbele, M., Kopf, J., Hochscheid, R., Kotte, E., Weber, P., Hansen, T., Bockhorn, H., Müller, B. 2013. Lung alterations following single or multiple low-dose carbon black nanoparticle aspirations in mice. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 76:1317-1332.

Schwartz, J., Dockery, D. W., Neas, L. M. 1996. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J. Air Waste Manag. Assoc.* 46:927-939.

Silveyra, P. & Floros, J. 2012. Air pollution and epigenetics: effects on SP-A and innate host defence in the lung. *Swiss Med. Wkly.* 142:w13579.

Stoeger, T., Reinhard, C., Takenaka, S., Schroeppel, A., Karg, E., Ritter, B., Heyder, J., Schulz, H. 2006. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ. Health Perspect.* 114:328-333.

Sydlik, U., Bierhals, K., Soufi, M., Abel, J., Schins, R. P., Unfried, K. 2006. Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291:L725-733.

Van Golde L. M. G., Batenburg, J. J., Robertson, B. 1994. The pulmonary surfactant system. *News in Physiol. Sciences* 9:13–20. *Respiratory Research* Vol 2 No 1 Fehrenbach

Vogt, S., Sattler, A., Sirat, A. S., Müller, B., Seifart, C., Maisch, B., Moosdorf, R. G. 2007. Different profile of antioxidative capacity results in pulmonary dysfunction and amplified Inflammatory response After CABG surgery. *J. Surg. Res.* 139:136-142.

Wang, L., Mercer, R. R., Rojanasakul, Y., Qiu, A., Lu, Y., Scabilloni, J. F., Wu, N., Castranova, V. 2010. Direct fibrogenic effects of dispersed single-walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 73:410-422.

Weaver, T. E., Whitsett, J. A. 1991. Function and regulation of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem. J.* 273:249-264.

Wright, J. R., 1997. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol.* Rev. 77:931-962.

Wright, J. R., Hawgood, S. 1989. Pulmonary surfactant metabolism. *Clin. Chest. Med.* 10:83-93.

Weibel, E. R., Hsia, C. C., Ochs, M. 2007. How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. *J. Appl. Physiol.*, 102:459-467.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication)
doi: 10.1080/15287394.2013.853634; PMID: 24283474	Publication

3. title
Lung Alterations Following Single or Multiple Low-Dose Carbon Black Nanoparticle Aspirations in Mice

4. author(s) (family name, first name(s))	5. end of project
Schreiber, Nicole[1]; Ströbele, Michael[2]; Kopf, Johannes[3]; Hochscheid, Renate[1]; Kotte, Elke[1]; Weber, Petra[1]; Hansen, Tanja[3]; Bockhorn, Henning[2]; Müller, Bernd[1]	December 2013
	6. publication date November 2013
	7. form of publication learned journal, online
8. performing organization(s) (name, address) [1]Philipps-Universität Marburg, Labor für Zellbiologie der Lunge, Abteilung für Pneumologie, Fachbereich Medizin, Baldingerstrasse, D - 35043 Marburg [2]Karlsruher Institut für Technologie Campus Süd, Engler-Bunte-Institut Bereich Verbrennungstechnik, Kaiserstrasse 12, D - 76131 Karlsruhe [3]Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (Fraunhofer ITEM), Nikolai-Fuchs-Straße 1, D - 30625 Hannover	9. originator's report no. -
	10. reference no. 03X0093B
	11. no. of pages 16
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 56
	14. no. of tables 2
	15. no. of figures 7

16. supplementary notes
-

17. presented at (title, place, date)
-

18. abstract
Carbon black nanoparticle (CBNP) applications in high doses have been shown to be harmful to the lung. It is postulated that even small, environmentally relevant concentrations induce changes on lung homeostasis. The present study determined the impact of low-dose single and multiple CBNP (Printex 90) applications on mouse alveolar cell metabolism, especially inflammatory and oxidative stress parameters. Nanoparticles were administered to mice by a single or 8 oropharyngeal aspirations at wk 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, and 12 using 7 µg Printex 90, 7 µg DQ12 quartz (positive control), with water vehicle and saline as negative controls. After 2 d or 3 mo lung function was analyzed. Further lung histology, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) parameters, and mRNA expression of cytokines and antioxidants enzymes in type II pneumocytes were measured on d 3 or after 3 mo. Single low-dose Printex 90 application induced no marked alterations in lung functions or BALF phospholipid levels but significant decrease in superoxide dismutase 2 and numerically elevated glutathione peroxidase 3 mRNA expression levels in type II pneumocytes. Multiple CBNP applications produced reduced lung function, collagen accumulation, elevated phospholipid levels in BALF, and a massive infiltration of macrophages. Type II pneumocyte mRNA expression of antioxidative enzymes remained unchanged throughout the subchronic experiment, but showed a significant decrease in interleukin (IL)-6Rα mRNA expression. This study demonstrates that an environmentally relevant CBNP concentration induced an acute inflammatory response, an effect that is exacerbated throughout the subchronic duration.

19. keywords
Printex®90, terminal respiratory tract, acute inflammation, type II pneumocytes, oxidative stress

20. publisher	21. price
Taylor & Francis, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK	invoice open

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN DOI: 10.17192/z2015.0160	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Inaugural-Dissertation
3. Titel Wirkung von Carbon Black Nanopartikeln (CBNP) auf die Funktion von Typ II Pneumozyten	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Schreiber, Nicole	5. Abschlussdatum Dezember 2013
	6. Veröffentlichungsdatum 24. März 2015
	7. Form der Publikation Inaugural-Dissertation
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Philipps-Universität Marburg Fachbereich Medizin Abteilung für Pneumologie Labor für Zellbiologie der Lunge Baldingerstrasse D - 35043 Marburg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution ohne interne Berichtsnummer
	10. Förderkennzeichen 03X0093B
	11. Seitenzahl 162
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 208
	14. Tabellen 25
	15. Abbildungen 25
16. Zusätzliche Angaben -	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Titel: Wirkung von Carbon Black Nanopartikeln (CBNP) auf die Funktion von Typ II Pneumozyten; Inaugural-Dissertation des Doktorgrades der gesamten Naturwissenschaften dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt am 27. November 2014.	

18. Kurzfassung

Nachhaltige Schädigungen der Lungen durch den Eintrag von Schadstoffen über die Außenluft sind unumstritten. In den letzten Jahrzehnten konnte der Eintrag größerer Schadstoffmengen in die Umwelt in Industrieländern wie Deutschland enorm verringert werden. Dennoch kommt es immer wieder zu Überschreitungen gesetzlich vorgeschriebener Höchstwerte für Feinstaub in Ballungsgebieten. Gegenwärtig verhindern komplizierte Analysemethoden eine flächendeckende Prüfung der Zusammensetzung der feinsten Partikelfraktion. Die verstärkte Einsatzmenge funktionalisierter CBNP in zahlreichen Bereichen des Alltags steigert zusätzlich das Risiko einer ungewünschten Freisetzung in die Umgebung und erhöht so gleichzeitig die Gefahr Lungenerkrankungen hervorzurufen bzw. diese zu begünstigen. Um zur toxikologischen Risikobewertung von CBNP beizutragen wurden in der vorliegenden Studie nicht-funktionalisierte ($Pr90_{7µg}^{-BSA}$, $Pr90_{7µg}^{+BSA}$), oberflächen-funktionalisierte (NA-$Pr90_{7µg}^{+BSA}$, BaP-$Pr90_{7µg}^{+BSA}$, PAK-$AR_{7µg}^{+BSA}$) und oberflächen-adjustierte CBNP (PAK-$AR_{15µg}^{+BSA}$) hinsichtlich ihrer Toxizität auf den terminalen Bereich der Lungen im BALB/c-Mausmodell geprüft und mit den Ergebnissen eines Referenzpartikels ($DQ12_{7µg}^{-BSA}$) und mehrerer Negativkontrollen ($NaCl_{70µl}^{-BSA}$, $H_2O_{70µl}^{-BSA}$, $H_2O_{70µl}^{+BSA}$) verglichen. Die Verabreichung aller Suspensionen erfolgte per oropharyngealer Aspiration. Die Bestimmung der Lungenfunktion folgte nach 2-tägiger Partikelretentionszeit durch nicht-invasive Head-out Bodyplethysmographie. An Tag drei wurden die Lungen für histologische Untersuchungen bzw. für die Isolation der stoffwechselaktiven Typ II Pneumozyten entnommen. Parallel zur Zellisolierung erfolgte die Gewinnung der BAL. Anhand eines Vorversuches wurde zunächst die optimale Partikelretentionszeit von drei Tagen ermittelt. Während des Einsatzes verschiedener CBNP im Kurzzeitexperiment konnten anschließend keine massiven strukturellen Veränderungen bzw. funktionellen Einschränkungen des terminalen Respirationstraktes durch die Oberflächen-funktionalisierungen beobachtet werden. Dies spricht für einen effektiven, reibungslosen Clearancemechanismus durch Makrophagen im Alveolarbereich. Dennoch gab es erste Hinweise auf Störung der Lungenhomöostase. Insbesondere die mRNA-Expression verschiedener Antioxidantien, sowie die Expression der Surfactantproteine und Schlüsselenzymen der Surfactantsynthese zeigten vereinzelte Abweichungen gegenüber den Kontrollen. Die Ergebnisse der Mehrfachapplikation nicht-funktionalisierter CBNP während der Pilotstudie zur Langzeitexposition weisen auf eine eingeschränktere Clearance hin. Gegenüber den Kurzzeitversuchen zeigten sich beispielsweise vermehrte Kollageneinlagerungen entlang der Bronchiolen und Blutgefäße sowie erhöhter Protein- und Phospholipid-konzentrationen in der BAL nach mehrfacher $Pr90_{7µg}^{-BSA}$ Aspiration gegenüber der $H_2O_{70µl}^{-BSA}$ Negativkontrolle. Immer wiederkehrende Berichte über gesundheitsgefährdende Verunreinigungen der Luft und der stets wachsende Markt für kohlenstoffbasierte NP fordern weitere toxikologische Begutachtungen und eine Weiterentwicklung der bestehenden Mess- und Analysemethoden für Umweltproben. Weitere Tests mit mehrfachen oropharyngealen Aspirationen geringer Dosen oberflächenfunktionalisierter CBNP sind nötig um Langzeiteffekte besser beurteilen zu können. Dabei muss neben strukturellen und funktionellen Veränderungen der Lunge auch die Translokation der chemisch funktionalisierten CBNP in andere Organe geprüft und damit verbundene Effekte in die toxikologische Bewertung einbezogen werden. Die zunehmende Anzahl von Lungenerkrankungen in der Bevölkerung macht es außerdem nötig vorgeschädigte Lungen in die Untersuchungen einzubeziehen. Eine weitere Herausforderung künftiger Studien wird es sein, die genauen Interaktionen zwischen den chemisch funktionalisierten Partikeloberflächen und biologischen Fluiden zu bestimmen und so grundlegende Wirkmechanismen *in vivo* aufzudecken.

19. Schlagwörter

Carbon Black Nanopartikel, CBNP, Typ II Pneumozyten, Terminaler Respirationstrakt, Partikeltoxizität

20. Verlag	21. Preis
Publikationsserver der Philipps-Universität Marburg	-

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication)
doi: 10.1080/15287394.2015.1124819	Publication

3. title
Modifications of carbon black nanoparticle surfaces modulate type II pneumocyte homoeostasis

4. author(s) (family name, first name(s))	5. end of project
Schreiber, Nicole[1]; Ströbele, Michael[2]; Hochscheid, Renate[1]; Kotte, Elke[1]; Weber, Petra[1]; Bockhorn, Henning[2]; Müller, Bernd[1]	December 2013
	6. publication date in press
	7. form of publication learned journal, online
8. performing organization(s) (name, address) [1]Philipps-Universität Marburg, Labor für Zellbiologie der Lunge, Abteilung für Pneumologie, Fachbereich Medizin, Baldingerstrasse, D - 35043 Marburg [2]Karlsruher Institut für Technologie Campus Süd, Engler-Bunte-Institut Bereich Verbrennungstechnik, Kaiserstrasse 12, D - 76131 Karlsruhe	9. originator's report no. -
	10. reference no. 03X0093B
	11. no. of pages in press
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 45
	14. no. of tables 5
	15. no. of figures 1

16. supplementary notes
-

17. presented at (title, place, date)
-

18. abstract
Inhalation uptake of carbon black nanoparticles (CBNP) bears the risk of morphological and functional lung impairment attributed to the highly reactive particle surface area. Chemical particle surface modifications might affect particle-cell-interactions, however thus far these alterations have not been determined. This is the first in vivo study comparing particle induced, acute lung injury using Printex®90 (Pr90, 7 µg), Printex®90 covered by benzo[a]pyrene or 9-nitroanthracene (BaP-Pr90, NA-Pr90, 7 µg, 15 % BaP or NA by weight) and acetylene carbon black (CB) with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH-AB, 7 µg, 20 % PAH by weight). All particles were suspended in distilled water with bovine serum albumin (BSA). In addition, the influence of suspension media was tested using Printex®90 suspended without BSA ($Pr90^{-BSA}$, 7 µg). Quartz (DQ12, 7 µg), 70 µl saline (NaCl) as well as distilled water with or without BSA ($H2O^{+/-BSA}$) were used as reference and controls. We hypothesize CBNP surface modifications trigger responses in lungs. After oropharyngeal particle aspiration lung functions were measured 2 days post exposure, followed by lung preparation for histological or bronchoalveolar lavage fluid (BALF) examinations and type II pneumocyte isolation on day 3. Head-out body plethysmography revealed reduced flow rates induced by PAH-AB. Examinations of BALF demonstrated reduced influx of macrophages after exposure to $Pr90^{-BSA}$ and decreased lymphocyte levels after $Pr90^{+BSA}$ or BaP-Pr90 treatment. Further, CBNP induced changes of mRNA expressions (surfactant proteins etc.) in type II pneumocytes. These findings indicate that CBNP surface area and media modulate interactions between NP and lung cells in short-term experiment.

19. keywords
carbon black nanoparticle, nanoparticle surface modification, type II pneumocyte metabolism, terminal respiratory tract, oxidative stress, inflammation

20. publisher	21. price
Taylor & Francis, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK	invoice open