



Medizinische Fakultät
der
Universität Rostock

Aus dem Institut für Pathologie
und der Abteilung
Medizinische Biologie/Elektronenmikroskopisches Zentrum (EMZ)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Probenmaterial von asbestbelasteten Patienten sowie zellbiologische Untersuchungen an asbest- und partikelexponierten Zellkulturen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Susanne Tautz
aus Rathenow

Rostock
Oktober 2008

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. L. Jonas (Universität Rostock)
 2. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. agr. habil. E. Dopp (Universitätsklinikum Essen)
-
1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ludwig Jonas
 2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. agr. habil. Elke Dopp
 3. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Marek Lommatzsch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 2009

Meinen Eltern

*„Zwei Dinge sollen Kinder von ihren Eltern bekommen:
Wurzeln und Flügel.“*

Johann Wolfgang von Goethe

Abkürzungsverzeichnis

3T3	embryonale Mäusefibroblasten
8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
ACM	Araldite casting resin M
Aqua bidest.	Aqua bidestilata
Aqua dest.	Aqua destilata
ATCC	American Type and Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Au	Gold
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
cm ²	Quadratzentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DEP	Diesel Exhaust Particles (engl.) = Dieselabgaspartikel
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	DeoxyriboNucleic Acid (engl.) = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EDX	Energy Dispersive X-ray Analysis (engl.) = Energiedispersiv Röntgenmikroanalyse
EELS	Electron Energy Loss Spectroscopy (engl.) = Elektronenenergieverlustspektroskopie
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter (engl.) = Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FEV	Forcieres Exspiratorisches Volumen
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin
IL-1β	Interleukin-1β
IGF-1	Insulin-like growth factor (engl.) = Wachstumsfaktor
keV	Kiloelektronenvolt
LDH	Laktatdehydrogenase
LML	Lungenmittellappen
LUL	Lungenunterlappen
m ³	Kubikmeter
Mg	Magnesium
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mtDNA	Mitochondriale DNA
nm	Nanometer
Na	Natrium

NADPH	Nicotinsäure-Amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF-κB	Nuklearer Faktor κB
O	Sauerstoff
O ₂	Sauerstoffmolekül
O ₂ ⁻	Hyperoxid-Anionen
OH ⁻	Hydroxyion
OH [.]	Hydroxylradikal
ONOO [.]	Peroxynitrit
P	Phosphor
P53	Tumorsuppressorprotein 53
p53	Tumorsuppressorgen 53
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
Pb	Blei
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet derived growth factor (engl.) = Wachstumsfaktor
pH	potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PM	Particulate Matter
PS	Phosphatidylserin
RB	Retinoblastomgen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	RiboNucleic Acid (engl.) = Ribonukleinsäure
RNS	Reactive Nitrogen Species (eng.) = Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reactive Oxygen Species (engl.) = Reaktive Sauerstoffspezies
S	Schwefel
Si	Silizium
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Ti	Titan
TiO ₂	Titandioxid
TNF-α	Tumornekrose Faktor α
ufCB	ultrafeines Carbon black
x g	Umdrehungen beim Zentrifugieren (Erdbeschleunigung)

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	9
1.1 Asbest.....	9
1.1.1 Allgemeines.....	9
1.1.2 Zusammensetzung.....	9
1.1.3 Vorkommen.....	10
1.1.4 Exposition.....	11
1.1.5 Asbestassoziierte Erkrankungen	11
1.1.6 Formale Pathogenese.....	12
1.1.7 Mechanismen der Faserwirkung.....	14
1.2 Partikel: Toner und Kohlenruß.....	21
1.2.1 Allgemeines zu Feinstäuben.....	21
1.2.2 Toner	23
1.2.2.1 Zusammensetzung	23
1.2.2.2 Vorkommen und Exposition.....	23
1.2.2.3 Gesundheitliche Auswirkungen	25
1.2.3 Kohlenruß (Carbon black).....	27
1.2.3.1 Vorkommen und Exposition.....	27
1.2.3.2 Gesundheitliche Auswirkungen	29
1.2.3.3 Zelluläre Wirkung von Carbon black.....	30
2 ZIEL DER ARBEIT.....	34
3 MATERIAL UND METHODEN	35
3.1 Patientenmaterial.....	35
3.2 Zellkultur	35
3.2.1 Zelllinie	35
3.2.2 Kultivierung von Zellen.....	37
3.2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	38
3.3 Faser- und Partikelproben.....	39
3.3.1 Asbest	39
3.3.2 Partikel	40
3.4 Mikroskopie.....	42
3.4.1 Lichtmikroskopie	42
3.4.2 Elektronenmikroskopie	43
3.4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM) und energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX)	43
3.4.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Elementanalyse (EELS).....	45

3.5 Ermittlung der Zytotoxizität mit Trypan Blau-Färbung.....	46
3.6 Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen	48
3.7 Apoptosemessung mittels FACS-Analyse.....	49
3.8 Statistische Auswertung.....	54
4 ERGEBNISSE.....	55
4.1 Patientenmaterial.....	55
4.1.1 Analyse des Ersten Falls.....	55
4.1.2 Analyse des Zweiten Falls	64
4.1.3 Analyse des Dritten Falls	68
4.2 Zellkulturversuche.....	71
4.2.1 Größenverteilung und Elementanalyse der Faser- und Partikelproben für die Zellkulturversuche	71
4.2.1.1 Asbest.....	71
4.2.1.2 Partikel.....	73
4.3 Zelluläre Aufnahme von Fasern und Partikeln (REM, TEM).....	74
4.3.1 Aufnahme von Fasern.....	74
4.3.2 Aufnahme von Partikeln.....	77
4.4 Zytotoxizität	78
4.4.1 Krokydolith	79
4.4.2 Titandioxid	79
4.4.3 Toner	80
4.4.4 Carbon black	81
4.5 Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen	82
4.6 Induktion von Apoptose durch Fasern und Partikel.....	84
5 DISKUSSION	87
5.1 Auswirkungen der Inhalation von Fasern und Partikeln auf exponierte Arbeitnehmer	87
5.2 Vergleich der unterschiedlichen zellulären Wirkung von Fasern und Partikeln	90
5.2.1 Vergleich der Zytotoxizität durch die verschiedenen Fasern und Partikel	91
5.3 Auswirkungen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf Zellen und Gewebe	93
5.4 Induktion der Apoptose	98
6 ZUSAMMENFASSUNG	103
7 THESEN	104

8 LITERATURVERZEICHNIS.....	105
ANHANG.....	113
DANKSAGUNG	127
LEBENSLAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
ERKLÄRUNG	131

1 Einleitung

1.1 Asbest

1.1.1 Allgemeines

Asbest ist ein natürlicher Rohstoff, der sich besonders durch eine enorme Dehnungsfestigkeit, Hitzestabilität und Säurefestigkeit auszeichnet. Der Begriff leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet sinngemäß „unauslöschlich“. Bereits vor 4000 Jahren machten sich die Einwohner Finnlands die Eigenschaften des Asbests zu Nutze [Schmolz, 1989]. Durch das Hinzufügen von Asbest zu dem Material Ton konnten bruch- und feuerfeste Gefäße hergestellt werden. Darüber hinaus war es als Luxusartikel nur der wohlhabenden Gesellschaft vorbehalten und wurde zu Textilien verarbeitet.

Mit Beginn der Industrialisierung wurde Asbest zu einem vielseitig eingesetzten Rohstoff, der vor allem in der Isolier- und Feuerschutzmittelindustrie Verwendung fand [Konietzko und Teschler, 1992].

1.1.2 Zusammensetzung

Asbest ist der Überbegriff einer Gruppe von Silikaten mit charakteristischer feinfaseriger Struktur. Innerhalb der Asbestfamilie wird unterschieden zwischen den Serpentinen mit dem Hauptvertreter Chrysotil (auch als „Weißasbest“ bezeichnet) und den Amphibolen mit den bekanntesten Vertretern Krokydolith (auch „Blauasbest“ genannt), Amosit und Anthophyllit sowie Tremolit und Aktinolith. Die Serpentine und die Amphibole unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Form und Zusammensetzung.

Chrysotil, schematisch dargestellt in **Abb. 1**, ist gekennzeichnet durch dünne, gewellte Faserelemente, die sich vorrangig in Längsrichtung spalten [Konietzko und

Teschler, 1992]. Das Grundgerüst des Chrysotils ist Sauerstoff und findet sich auch bei den Amphibolen, jedoch ist der Hauptbestandteil der Serpentine Magnesium. Dabei ergibt sich folgende Formel: $3\text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

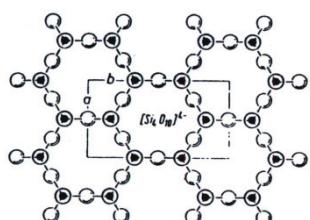


Abb. 1:
Grundstruktur von Chrysotil [Friemann, 1992].

Charakteristisch für die Amphibole, speziell für das Krokydolith, ist die Speerform. Das Krokydolith, dessen Aufbau in **Abb. 2** schematisch dargestellt ist, kann che-

misch eindeutig vom Chrysotil unterschieden werden. Es enthält neben dem Siliziumdioxid Natrium und Eisen, wodurch folgende Formel entsteht:

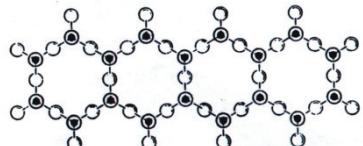


Abb. 2:
Grundstruktur von Krokydolith [Friemann, 1992].

Darüber hinaus kann das Krokydolith, im Gegensatz zu Chrysotil, nach der Phagozytose durch die Makrophagen nicht abgebaut werden.

Häufig sind die reinen Asbestfasern kontaminiert mit anderen Asbestarten oder Stäuben, wie z.B. Eisenoxid, Quarz oder Kalk [Friemann, 1992]. Eine typische Eigenschaft der Asbestfasern ist die leichte Zerfaserung und Spaltung in Längsrichtung, wodurch feinste Faserstäube entstehen. Diese Eigenschaft ist sehr viel stärker bei den Asbestfasern ausgeprägt als bei künstlich hergestellten Mineralfasern, so dass Beschäftigte in der asbestverarbeitenden Industrie einer sehr hohen Faserstaubkonzentration ausgesetzt waren und noch immer sind.

1.1.3 Vorkommen

Die Asbesterze werden unter Tage abgebaut. Die Abbaugebiete des Rohstoffs befinden sich heute noch u.a. in Russland, Südafrika, Australien und Kanada. Am häufigsten gewonnen und weiterverarbeitet wird das Chrysotil. Das hauptsächlich in Südafrika gewonnene, jedoch auch biologisch stärker kanzerogene Krokydolith, wird heute kaum noch abgebaut und weiterverarbeitet [Konietzko und Teschler, 1992].

In vielen EU-Ländern ist die Asbestproduktion und –verarbeitung bereits verboten, darunter in Österreich seit 1990, in den Niederlanden seit 1991, in Finnland und Italien seit 1992, in Deutschland und Frankreich sowie in Polen seit 1997. Allerdings wird in einigen Ländern noch immer Asbest abgebaut, z.B. in Kanada, Russland, Indien und den USA [<http://www.asbestopfer.ch/>].

1.1.4 Exposition

Unter Zugabe von Asbest war man in der Lage, die Werkstoffeigenschaften eines Produktes erheblich zu verbessern, u.a. die Brandfestigkeit, die Wärme- oder Hitzeverträglichkeit, die Zugfestigkeit (fester als Stahldrähte gleichen Querschnittes) und die Chemikalienbeständigkeit. Der Einsatz erfolgte vor allem in den Bereichen der industriellen Herstellung und Bearbeitung von Asbestzementprodukten (Fassadenisolierung, Dachziegel, Lüftungsanlagen, Fußbodenbeläge, asbesthaltige Spachtelmasse im Fliesenbetrieb), in der Textilienherstellung (die gute Verspinnbarkeit wurde genutzt zur Herstellung von Schnüren, Seilen, Dichtungen, Handschuhen und Anzügen) und in der Automobilindustrie zur Herstellung von Brems- und Kupplungsbelägen [Konietzko und Teschler, 1992]. Noch heute sind Arbeiter stark exponiert, wenn sie in Sanierungsbetrieben tätig sind. Vor allem nach den Sanierungsarbeiten werden erhöhte Konzentrationen von Asbeststaub in der Luft gemessen [Friemann, 1992]. Um die Expositionen gegenüber Asbest so gering wie möglich zu halten, werden von den Betrieben Schutzausrüstungen zur Verfügung gestellt, u.a. Schutzmasken, Schutzanzüge, Augenschutz, Schutzhelme sowie Schutzhandschuhe. Darüber hinaus haben Betriebe die Auflage, in einer asbestbelasteten Umgebung für eine entsprechende Frischluftzufuhr und getrennte Abluft mit entsprechender Reinigung der Luft von den Faserstäuben zu sorgen. Problematisch sind allerdings sehr hohe Konzentrationen von Faserstäuben nach den Sanierungsarbeiten mit über 15.000 Fasern/m³. Folglich muss die Faserstaubkonzentration der Luft genau bestimmt werden, bevor nach einer Asbestsanierung in Betrieben oder Büroräumen der alltägliche Arbeitsablauf wieder aufgenommen werden kann

[www.abbruch-dienst.de/Asbestinfo/asbestinfo.html].

1.1.5 Asbestassoziierte Erkrankungen

Ab 1900 erfolgten erste Untersuchungen asbestinduzierter Erkrankungen. Seit 1930 wurden erstmals Fälle in Deutschland untersucht [Konietzko und Teschler, 1992], bei denen eine fibrosierende Wirkung von Asbest erkannt wurde. Seit 1937 gilt die Asbestose (asbestinduzierte Lungenfibrose) bei entsprechendem Nachweis als Berufskrankheit [Friemann, 1992]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde der Verdacht geäußert, dass eine Exposition gegenüber Asbest zu Lungenkrebs führen kann [Schmolz, 1989]. In Retrospektivstudien von Doll et al. (1955) zeigte sich bereits

1955 ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Asbestexposition und der Erkrankung an Bronchialkarzinomen. Eine Assoziation mit dem Mesotheliom wurde dann 1960 von Wagner et al. (1960) beschrieben. Somit ist das Bronchialkarzinom eine der häufigsten mit Asbestexposition assoziierten Erkrankungen, bei der überwiegend das Platten- und Adenokarzinom gefunden wird [Gillissen et al., 2006]. Es besteht eine jahrzehntelange Latenzzeit (im Durchschnitt ca. 25 Jahre [Schmolz, 1989]) zwischen Exposition und asbestinduzierter Fibrose und Tumoren. In Abhängigkeit von der Stärke eines evtl. bestehenden Zigarettenkonsums, aber auch genetischer Disposition, steigt das Risiko, ein Bronchialkarzinom zu entwickeln proportional zur Zeit und zur Menge der Asbeststaubexposition. Das jedoch sehr häufig mit Asbestexposition einhergehende Pleuramesotheliom steht jedoch nicht in Zusammenhang mit der Expositionsdauer oder dem Zigarettenkonsum. Die Entstehung eines Mesothelioms wurde bereits nach einer Expositionsdauer von ein bis zwei Jahren [Gillissen et al., 2006] bei einer hohen Faserkonzentration ($2000 \text{ Fasern}/\text{m}^3$) diagnostiziert [Schmolz, 1989]. Aufgrund der langen Latenzzeiten zwischen Asbestexposition und möglichen Lungenerkrankungen ist noch heute die berufliche Anamnese genau zu erheben und bei entsprechender Exposition sind Folgeuntersuchungen einzuleiten [Friemann, 1992].

1.1.6 Formale Pathogenese

Bei der Pathogenese der Lungenasbestose spielen die Alveolarmakrophagen eine entscheidende Rolle. Die Makrophagen nehmen die Fasern durch Phagozytose auf. Dabei kann deren Membran beschädigt werden, wodurch die Zelle abstirbt. Darüber hinaus setzen die Makrophagen Entzündungsmediatoren (z.B. Zytokine) frei, wodurch Entzündungszellen gebildet und Fibroblasten aktiviert werden. Durch die anhaltende Faserpersistenz wird der Entzündungsprozess kontinuierlich aufrecht erhalten. Auch Jahrzehnte nach einer Asbestexposition können die Fasern im Lungengewebe nachgewiesen werden. Chrysotil unterliegt im Laufe dieses Zeitraumes einer Strukturveränderung, da das Magnesium von der Oberfläche abgelöst wird. Die Reste werden wiederum von den Makrophagen aufgenommen. Während des Entzündungsprozesses synthetisieren Fibroblasten Kollagen. Dies führt über Jahrzehnte zur Bildung von Narben und Fibrosen. Dabei kommt es zu einer Vermehrung von kollagenem Bindegewebe der Lunge im gesamten Lungenparenchym einschließlich der

viszeralen Pleura. Diese „generalisierte“, durch Asbest verursachte Fibrose der Lunge wird auch als Asbestose bezeichnet. Sie führt zu einem Verlust der Elastizität und der Vitalkapazität der Lunge. Unabhängig davon kann die chronische Entzündung zu einer Entstehung von Tumoren führen, so dass es auch nach Beendigung der Exposition zu einer Progredienz der Erkrankung kommen kann [Konietzko und Teschler, 1992].

Länge-zu-Durchmesser-Verhältnis der Fasern

Von entscheidender Bedeutung für die Ablagerungen von Fasern in der Lunge ist das kritische Verhältnis von Faserdurchmesser zu Faserlänge. Dieses liegt bei 1:3 [DFG, 2007]. Besonders Fasern mit einer Länge von 4-6 µm (bei Nasenatmung) bzw. 7-9 µm (bei Mundatmung) werden in den Bronchien abgelagert. Die in die Alveolen gelangten Fasern weisen hingegen eine Größe von 2-3 µm (bei Nasenatmung) bzw. 3-4 µm (bei Mundatmung) auf. **Abb. 3** stellt die möglichen Ablagerungslokalisierungen

eines Aerosols in der Atemluft dar. Die Eindringtiefe in das bronchiale System korreliert jedoch auch mit dem Durchmesser. Ein kanzerogenes Potential besteht vor allem bei Fasern mit einem Durchmesser von weniger als 0,25 µm und einer Länge von ca. 8 µm [Schmolz, 1989].

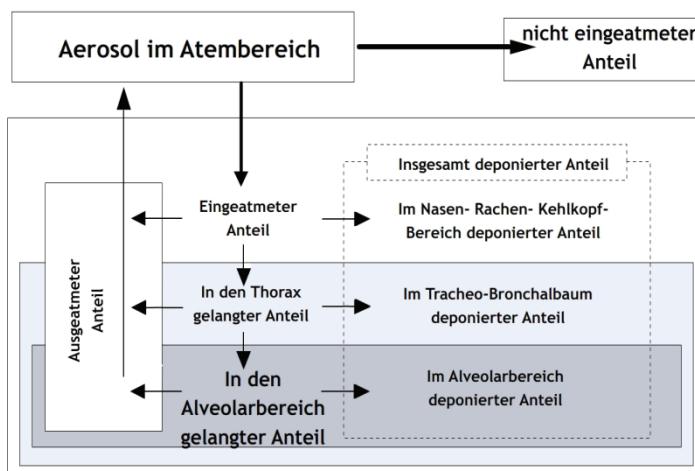


Abb. 3:

Beziehungen zwischen den arbeitsmedizinisch-toxikologisch definierten Anteilen des „Aerosols im Atembereich“ und deren Deposition. Der Übergang des eingeatmeten Anteils des im Atembereich enthaltenen Aerosols in den Thorax und den Alveolarbereich mit Alveolen, zilienfreien Bronchiolen und Ductus alveolares wird durch Pfeile symbolisiert. Nach rechts weisende Pfeile kennzeichnen den Übergang zu den in den Atmungsorganen deponierten Anteilen, nach links zeigende Pfeile bezeichnen den von dort ausgeatmeten Anteil [DFG, 2007].

Die Länge der Fasern wird insbesondere in tieferen Lungenabschnitten relevant, wobei von einer erhöhten Kanzerogenität besonders bei sehr dünnen und langen Fasern auszugehen ist. Dabei sollten auch kürzere Fasern nicht unterschätzt werden, denn speziell die kleinen Fasern (unter 5 µm Länge) gelangen durch Transportprozesse in die Lymphknoten [Dodson et al., 2003].

Auf dem Weg in die tieferen Lungenabschnitte können sich die Fasern entlang der Atemstromachse ausrichten und Bronchuswände perforieren. Bei hohem Atemzugvolumen und niedriger Atemstromstärke gelangen mehr Fasern in die alveolären Bereiche der Lunge. Besteht bereits eine Atemwegsobstruktion, werden die Fasern vor allem in den zentralen Atemwegen abgelagert [Konietzko und Teschler, 1992].

Clearance

Bei der Fasereliminierung kommt einerseits die mukoziliäre Clearance zum Einsatz, wobei bis zu zwei Drittel der Fasern oralwärts transportiert werden können. Andererseits nehmen die Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung der Fasern ein. Die Zellen versuchen, die bis in die Alveolen gelangten Fasern zu phagozytieren. Bei Kontakt des Makrophagen mit der Faserwickelt er sich um deren Ende bis sie komplett phagozytiert ist. Erreicht der Makrophage die Faser ausgehend von der Mitte, breitet er sein Zytoplasma aus, bis sie komplett umhüllt ist [McLemore et al., 1979].

Kleinere Fasern werden über die mukoziliäre Clearance abtransportiert oder gelangen über das Lymphsystem in die regionalen Lymphknoten. Dringen jedoch sehr lange Fasern in die tiefen Lungenabschnitte ein, verfangen sich diese bei der Exspiration in den Alveolen. Durch den Versuch der Alveolarmakrophagen, diese aufzunehmen, werden bei kleinem Durchmesser der Makrophagen und zunehmender Faserlänge die Zellen durchspießt. Die Enden der Fasern ragen aus den Makrophagen heraus [McLemore et al., 1980] und die Zellen sterben ab. Sind die Fasern klein, werden sie zwar von den Zellen aufgenommen, können aber nicht abgebaut werden. Sie bleiben in den Zellen liegen und werden dort in einen Proteinmantel (eisenbindendes Protein) eingehüllt [Konietzko und Teschler, 1992; Friemann, 1992]. Allerdings ist die Tendenz zur Bildung von Asbestkörperchen durch Chrysotil sehr viel geringer als die bei Krokydolith [Hoffmeyer et al., 2007]. Dabei scheinen die umhüllten Fasern weniger toxisch zu sein als ähnliche Mengen „nackter“ Fasern [McLemore et al., 1980].

1.1.7 Mechanismen der Faserwirkung

Die Wirkungen von Asbest können in zwei unterschiedliche (zytotoxische und genotoxische) Effekte unterteilt werden. Durch die längere Beständigkeit, vor allem bei

Blauasbest, wird eine Fibrosierung hervorgerufen. Dabei wird verstärkt Bindegewebe gebildet und das ursprüngliche Gewebe verliert seine Funktion. Am häufigsten entsteht dieses Narbengewebe in der Lunge durch Inspiration der Fasern. Darüber hinaus besteht ein hohes Risiko der Karzinomentwicklung [Schmolz, 1989].

Zytotoxische und genotoxische Effekte

Schon früh wurden die zytotoxischen Auswirkungen sowohl für Krokydolith als auch für Chrysotil nach der Phagozytose durch humane Fibroblasten nachgewiesen [Chang et al., 1983]. In Abhängigkeit von der Zellart kam es zu einer Wachstums-hemmung, am häufigsten wurde eine Apoptose hervorgerufen. Sie ist die aktive Form des zellulären Suizids, bei dem typischerweise einzelne Zellen betroffen sind. Dabei kommt es zu einer Veränderung der zellulären Struktur, bei der sich Ausstülpungen, so genannte Blasen (Blebs), in der zytoplasmatischen Membran bilden. In späteren Stadien der Apoptose schrumpfen die Zellen und in dem Zellkern wird die DNA fragmentiert. Es bilden sich Halbmonde und Mikronuklei. Im Vergleich dazu ist die Zellnekrose eine Form des Zelltodes, die durch schädliche Substanzen oder Verletzungen hervorgerufen wird. Chrysotil bewirkt eine stärkere Induktion der Apoptose als Krokydolith, jedoch erst nach längerer Einwirkzeit und bei höheren Konzentrationen. Diese ist wahrscheinlich bedingt durch die unterschiedliche chemische Struktur [Dopp et al., 1995]. Außerdem konnte von Hong et al. (1997) beobachtet werden, dass sich die Fasern nach der Phagozytose überwiegend in der Nähe des Zellkerns anhäufen und sich mit bis zu zehn Kernen pro Zelle bei steigender Asbestkonzentration multinukleäre Riesenzellen bildeten [Hong et al., 1997]. Dabei konnten vermehrt Fasern in der Nähe des mitotischen Apparates ermittelt werden. Die Anzahl der Mikronuklei nahm in Abhängigkeit von Dosis und Expositionszeit zu. Bei sehr hohen Asbestkonzentrationen verstärkten sich die zytotoxischen Effekte [Poser et al., 2004]. Nach der Phagozytose reichert sich Asbest bevorzugt in der perinukleären Region an und wurde von Dopp et al. (1995) in der Nähe des mitotischen Apparates (Spindelapparat) der Zelle gefunden [Dopp et al., 1995]. Der mitotische Apparat spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und sorgt unter normalen Umständen für die gleichmäßige Verteilung der Chromosomen. Trotz der fehlenden direkten Interaktion des Asbests mit dem mitotischen Apparat wurden von Dopp et al. (1995) Einflüsse auf die Zellteilung beobachtet, bei der es zu einer ungleichmäßigen Verteilung der

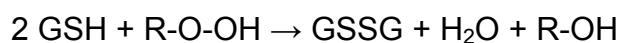
Chromosomen bzw. zu Aneuploidie kam, sowie zu Chromosomenbrüchen und zu einer vermehrten Mikronukleusbildung. Diese Effekte zeigten sich vor allem nach der Exposition gegenüber Krokydolith.

Neben den beschriebenen Auswirkungen des Asbests auf die Zelle wurde von Panduri et al. (2005) eine (durch Asbest induzierte) mitochondriale Dysfunktion in alveolären Epithelzellen beobachtet [Panduri et al., 2005].

Reaktive Sauerstoffspezies

Die Auswirkungen der Asbestfasern können nicht nur auf direktem, mechanischem Weg erfolgen.

Bedingt durch die Phagozytose der Fasern kann es durch die Produktion von freien Radikalen (ROS = reactive oxygen species, RNS = reactive nitrogen species) zu indirekten genotoxischen Effekten kommen. Beispiele für ROS sind Hyperoxid-Anionen O_2^- und Hydroxylradikale OH $^-$, für RNS Stickstoffmonoxid NO $^-$ und Peroxynitrit ONOO $^-$. Mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von 10^{-9} bis zu 7 Sekunden [Sies, 1993] sind die ROS/RNS sehr kurzlebig [Halliwell et al., 1999]. Sie besitzen ungepaarte Valenzelektronen und sind sehr reaktiv. Durch ihre Fähigkeit zur Oxidation können sie leicht mit den Strukturen der Zellen reagieren, z.B. Proteinen, Lipiden sowie Enzymen, aber auch mit der zellulären DNA. Dadurch sind sie in der Lage, zelluläre Schädigungen und Mutationen herbeizuführen [Sies, 1993]. Auch ohne exogene Einflüsse werden vor allem die ROS gebildet. Sie entstehen überwiegend während metabolischer Stoffwechselprozesse und werden aber auch von den Entzündungszellen, vor allem Makrophagen, zur Immunabwehr benutzt. Allerdings verfügen die Zellen auch über antioxidative Mechanismen, z.B. Glutathion (GSH) oder Laktatdehydrogenase (LDH), wodurch die überschüssigen ROS und RNS wieder abgebaut werden können [Gossau und Rensing, 2002]. Die antioxidativen Enzyme werden durch ROS oxidiert und schließlich durch enzymatische Prozesse wieder reduziert. Am Beispiel von GSH ergibt sich folgende Formel:



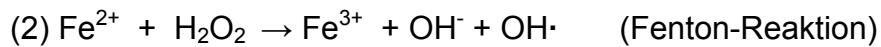
Das GSSG (Glutathiondisulfid) stellt hierbei die oxidierte Form des GSH dar. Da die Asbestfasern nicht abbaubar sind, kann es zu einer persistierenden, signifikanten Produktion [Bhattacharya et al., 2007; Quinlan et al., 1994] vor allem von Hydroxyl-

radikalen und Hyperoxid-Anionen kommen [Okada, 2007]. Die stärkste ROS-Bildung geht von den Plasmamembranen der phagozytierenden Zellen (Alveolarmakrophagen, Neutrophile) sowie vom Endoplasmatischen Retikulum und den Peroxisomen aus [Thannickal et al., 2000]. Folglich werden durch die Überproduktion von ROS in der Zelle die antioxidativen Mechanismen ausgeschöpft und ein oxidativer Stress ausgelöst [Gossau und Rensing, 2002].

Relevanz von Eisen

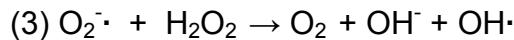
Obwohl die Phagozytose der Asbestfasern eine große Rolle bei der Produktion von ROS spielt, ist jedoch auch die chemische Zusammensetzung der einzelnen Faserarten von Bedeutung. Dabei ist der Bestandteil an Eisen ausschlaggebend [Rahman et al., 2000]. Vor allem Krokydolith enthält hohe Eisenanteile (bis zu 36 %), welche in der chemischen Struktur gebunden sind. Dagegen macht der Eisenanteil im Chrysotil nur 1 % aus [Marczynski, 1999]. Obwohl Eisen nicht in der chemischen Struktur des Chrysotil verankert ist, wird es zu einem geringen Anteil als Verunreinigung in Form des dreiwertigen Eisens durch die Siliziumhydroxylgruppen („Si-OH“) gebunden [Ghio et al., 1998].

Nachdem insbesondere das Krokydolith, z.B. durch Einatmung, in den Organismus eingedrungen ist und von den Zellen phagozytiert wurde, kann das Eisen aus der Faser beispielsweise durch zelluläre Chelatoren wie Zitrat mobilisiert werden. Die Freisetzung des Eisens aus dem Krokydolith kann in der Zelle zu einer zytotoxischen „Eisenüberladung“ führen [Gardi et al., 1997]. Da in biologischen Systemen gleichzeitig Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) metabolisiert bzw. produziert werden, katalysiert die Anwesenheit von Eisen Reaktionen, die an der Bildung freier Radikale beteiligt sind [Ghio et al., 1998]. Das Eisen (Fe^{3+}) reagiert dabei mit dem Hyperoxid-Anion (O_2^-) und wird zu einem zweiwertigen Ion (Fe^{2+}) reduziert. In der zweiten, so genannten Fenton-Reaktion, entstehen durch die Reaktion mit H_2O_2 Hydroxyionen und –radikale. Gleichzeitig wird das Fe^{2+} zu einem dreiwertigen Ion oxidiert, welches wiederum mit O_2^- reagieren kann [Gossau und Rensing, 2002].



Einleitung

Diese Reaktion lässt sich auch als Haber-Weiss-Reaktion zusammenfassen:



In der folgenden **Abb. 4** wird ein Überblick über die nachfolgenden Reaktionen in der Lunge nach der Ablagerung von Asbestfasern dargestellt.

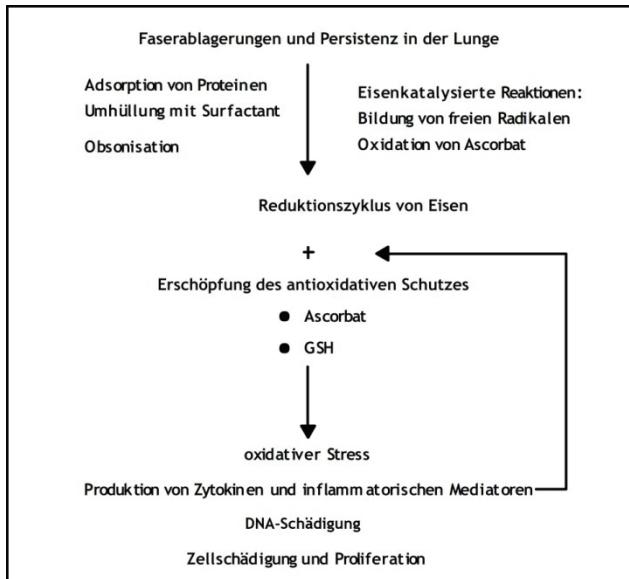


Abb. 4:
Rolle der Oberflächenreaktivität der Asbestfasern hinsichtlich der Bildung freier Radikale [nach Kane, 2003].

Folgen für die nukleäre und mitochondriale DNA

Der oxidative Stress kann auch zu einem Austausch von Schwesterchromatiden [Xu et al., 2002], Chromosomenaberration und DNA-Strangbrüchen [Rahman et al., 2000] sowie zu einer Modifikation der Basen in der DNA führen. Die DNA zeichnet sich durch eine gute chemische Reaktionsfähigkeit aus. Insbesondere die durch Asbestfasern gebildeten OH[·] Radikale reagieren sehr schnell mit dem Guanin, wodurch das 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) entsteht [Halliwell et al., 1999]. Die dauerhafte Produktion von ROS bewirkt eine permanente Bildung von 8-OHdG. Dieses paart sich bei der Replikation der DNA fälschlicherweise mit Adenosin anstatt mit Cytosin. Es kommt zu einer Transversion (G zu T), welche nun eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bzw. eine Aktivierung von Onkogenen herbeiführen kann [Marczynski et al., 1999; Dopp et al., 2002]. Zu den Tumorsuppressorgenen gehören u.a. das RB1 (Retinoblastomgen) und das p53.

Das Tumorsuppressorprotein P53 ist ein transkriptionaler Faktor, der durch das p53-Gen verschlüsselt wird. Die Aktivierung von P53 beeinflusst zahlreiche Gene, die das Zellwachstum hemmen und somit eine Zeitreserve gibt, DNA-Schäden zu reparieren. Sind die DNA-Schäden zu ausgedehnt, wird die Apoptose eingeleitet [Panduri et al.,

2006]. Durch Chrysotil und Krokydolith kommt es zu einer Phosphorylierung von p53 an spezifische Bindungsstellen (Serin 15) bei gleichzeitig erhöhter Produktion des P53-Proteins. Entsprechend wurde von Matsuoka et al. (2003) angenommen, dass es durch die Phosphorylierung zu einer Akkumulation von P53 kommt und die durch Asbestexposition hervorgerufene Fibrose dadurch progressiv verstärkt wird.

In den Zellen höherer Organismen findet sich DNA nicht nur in den Chromosomen des Zellkerns. Auch in den Mitochondrien lässt sich ringförmige DNA nachweisen [Doenecke et al., 2005]. Um sich vom Zytoplasma der Zelle abzugrenzen, werden die Mitochondrien von zwei Membranen umgeben. Die Mitochondrien sind für die Energieproduktion in den Zellen in Form von Adenosintriphosphat (ATP) unentbehrlich (oxidative Phosphorylierung durch Sauerstoff). Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Produktion von Lipiden, Aminosäuren und Nukleotiden, Ionenhomöostase, aktiven Transportprozessen (z.B. Elektronentransport) sowie Zellbeweglichkeit und Zellproliferation [Delsite et al., 2002]. Für diese Prozesse verschlüsselt die mitochondriale DNA (mtDNA) Proteine sowie transfer- und ribosomale Ribonukleinsäure (RNA). Zum Entschlüsseln dieser Informationen werden jedoch Proteine benötigt, die von der DNA des Zellkerns verschlüsselt und für die Replikation, Translation und Transkription der mtDNA entschlüsselt werden [Delsite et al., 2002]. Diese konstante Kommunikation zwischen Zellkern und Mitochondrien wird als „Mitochondrien-zu-Nukleus-Interaktion“ (oder auch „Crosstalk“) bezeichnet [Poyton et al., 1996; Delsite et al., 2002]. Darüber hinaus sind die Mitochondrien bedeutende Regulatoren der Apoptose [Kamp et al., 2002; Delsite et al., 2002; Verma et al., 2007], was auch als mitochondrialer (intrinsischer) Sterbeverlauf [Panduri et al., 2003] bezeichnet wird. Des Weiteren tragen diese Zellorganellen zur ROS-Produktion bei [Park et al., 2004]. Im Gegensatz zur nukleären DNA ist die mtDNA viel anfälliger für oxidativen Stress und besitzt eine zehnfach höhere Mutationsrate [Kamp et al., 2002; Panduri et al., 2003]. Obwohl die Mitochondrien selbst an der Produktion von ROS beteiligt sind, kann eine übermäßige Produktion dieser Radikale mit Reaktionen der mtDNA zu deren Schädigung führen. Gleichzeitig kann es auch zu einer Störung der Funktion der mitochondrialen Membran kommen. Kamp et al. (2002) beobachteten eine mitochondriale Dysfunktion mit Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials in alveolären Epithelzellen nach der Exposition gegenüber Asbest. Dabei kam es besonders durch das Krokydolith zu deutlichen Auswirkungen auf die mitochondriale

Einleitung

Membran, bedingt durch eine erhöhte eisenkatalysierte ROS-Produktion. Die gebildeten ROS können mit der äußeren Membran der Mitochondrien reagieren, wodurch die Elektronentransportprozesse gestört bzw. unterbrochen und schließlich Durchgangsporen geöffnet werden. Diese Poren werden normalerweise durch einen Ionen- bzw. Elektronengradienten angetrieben. Durch die Öffnung der Durchgangsporen kann es zu einem Angleichen der Ionen- und Elektronengradienten zwischen dem Inneren des Mitochondriums und seiner Umgebung kommen [Kamp et al., 2002]. Die Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials durch ROS mit erhöhter Permeabilität der Membranen führt außerdem zu einer Freisetzung apoptotischer Wirkstoffe (Cytochrom C, Caspase 9, AIF = apoptosis-inducing factor). Diese Wirkstoffe liegen im Normalfall im Zwischenraum beider Mitochondrienmembranen und werden durch die resultierende Entkopplung der Elektronentransportkette mit darauffolgender Einleitung der Apoptose freigesetzt.

Da jedoch nicht nur die Membran, sondern auch die mtDNA oxidativ verändert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass ein maligner Zellklon mit mutierter DNA entsteht [Kamp et al., 2002], der die Gefahr der Krebsentstehung mit sich bringt [Delsite et al., 2002; Verma et al., 2007]. Die Ursache könnte dabei in einer veränderten Interaktion zwischen Mitochondrien und Zellkern liegen.

An dieser veränderten „Mitochondrien-zu-Nukleus-Interaktion“ können zusätzlich auch Mutationen in der nukleären DNA durch eine Veränderung des bereits oben erläuterten p53 [Panduri et al., 2006] beitragen. Somit kann eine verstärkte Expression des p53 eine starke Wechselwirkung mit den Mitochondrien hervorrufen, wodurch eine veränderte Genexpression der mtDNA auftreten und eine asbestinduzierte mitochondriale Dysfunktion in alveolären Epithelzellen vermittelt werden kann [Panduri et al., 2006; Verma et al., 2007].

Entzündungsprozesse

Die Asbestexposition bedingt eine verstärkte Proliferation von Fibroblasten mit vermehrter Bildung von Kollagen, zunächst vor allem Typ III-Kollagen und später das für Narben typische, nicht mehr abbaubare Typ I-Kollagen [Konietzko und Teschler, 1992]. Diese Narbenbildung, hervorgerufen durch die Asbestfasern, wird durch Entzündungsreaktionen ausgelöst.

In vivo und *in vitro* Studien zeigten Hinweise auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, z.B. Fibronektin, PDGF (platelet-derived growth factor), TNF- α (Tumornekrosefaktor α), Interleukin-1 β , (IL-1 β) und IGF-1 (Insulin-like growth factor-1), welche die Lungenfibroblastenproliferation stimulieren. Diese einzelnen Mediatoren spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Asbestose (vgl. Abschnitt 1.1.6.). Vor allem TNF- α , ein proinflammatorisches Zytokin, und IL-1 β werden nach Stimulation von Makrophagen mit Asbestfasern verstärkt ausgeschüttet [Adamson et al., 1997; Mutsaers et al., 1998].

Die ROS und die Phagozytose der Fasern können auch die Freisetzung und Aktivierung des nukleären Faktors kappa B (NF- κ B) hervorrufen. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der sich an bestimmte regulatorische Abschnitte der DNA bindet und somit die Transkription von Genen beeinflusst. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und dem Zelltod [Mossman et al., 1997]. TNF- α besitzt spezifische Bindungsstellen für NF- κ B. Die Gene für TNF- α werden durch NF- κ B reguliert. TNF- α kann nach dem Verbrauch von GSH zu einer Induktion der Apoptose führen [Thannickal et al., 2000 und Bhattacharya et al., 2007].

1.2 Partikel: Toner und Kohlenruß

1.2.1 Allgemeines zu Feinstäuben

Feinstäube haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Es sind komplexe Mischungen aus Schadstoffen, die vor allem in der Außenluft von Ballungsräumen gemessen werden. Hauptverursacher erhöhter Feinstaubkonzentrationen sind Dieselfahrzeuge und Kraftwerke, die durch industrielle Verbrennungsprozesse Ruß produzieren (Industrieruß) [Kappos et al., 2003]. Feinstäube spielen deshalb eine wichtige Rolle, weil sie besonders durch Einatmung zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen, vor allem zu pulmonalen Erkrankungen, führen können [Krzyzanowski, 2005; Gillissen et al., 2006]. Folglich wurde von der Europäischen Union über eine Feinstaubrichtlinie entschieden und ein Jahresgrenzwert von 40 µg/m³ sowie ein 24-Stunden-Grenzwert von 50 µg/m³ festgelegt, der an höchstens 35 Tagen im Jahr überschritten werden darf [Gillissen et al., 2006; <http://www.epochtimes.de/articles/2007/02/27/93049.html>].

Feinstäube werden in primäre und sekundäre Partikel unterteilt. Die primären Partikel entstehen durch direkte Verbrennungsprozesse, z.B. in Verbrennungsmotoren, Ver-

feuerung von Festbrennstoffen wie z.B. Kohle, Aufwirbelung von Industriestäuben, im Bergbau und in der Zement- und Keramikindustrie, aber auch durch mechanischen Abrieb der Straßenbeläge, Bremsen und Reifen. Dazu zählen auch die industriell hergestellten Ruße (Carbon black), welche z.B. in der Druck- und Farbindustrie sowie als Füllstoffe in der Reifen- und Polymerindustrie Verwendung finden [Schmidt, 2003]. Sekundäre Partikel bilden sich in der Atmosphäre vor allem durch chemische Reaktionen gasförmiger Stoffe. Dazu gehören die Stickstoffoxide, die durch den Verkehr und die Industrie produziert werden, sowie Schwefeldioxid, welches durch die Verbrennung schwefelhaltiger Materialien entsteht [Krzyszowski, 2005].

Die Unterteilung der Feinstäube erfolgt anhand ihres Partikeldurchmessers: Teilchen mit weniger als 10 µm tragen die Bezeichnung PM₁₀ (PM = particulate matter). Dazu zählt der inhalierbare Feinstaub. Lungengängiger Feinstaub, der bis in die Alveolen gelangt, hat einen Durchmesser von unter 2,5 µm (PM_{2,5}). Daneben gibt es noch die ultrafeinen Partikel (UFP), auch als Nanopartikel bezeichnet, mit einem Durchmesser von unter 0,1 µm [Gillissen et al., 2006; DFG, 2007]. **Abb. 5** zeigt den Vergleich der einzelnen Partikelgrößen mit verschiedenen Beispielen.

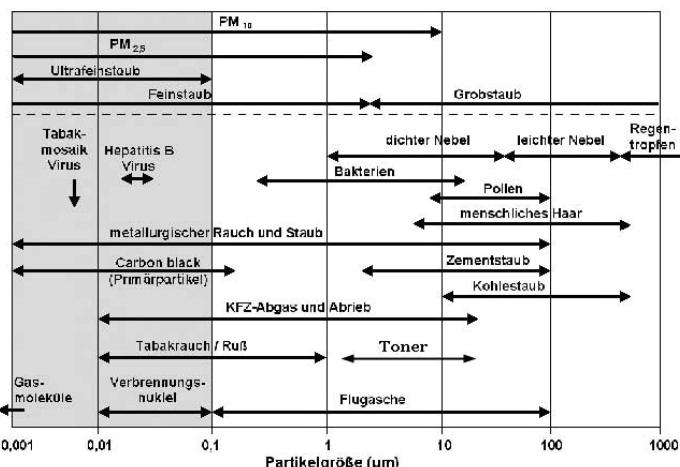


Abb. 5:
Größenbereiche verschiedener umweltrelevanter Partikel [nach Krug et al., 2004].

Abgesehen von den Feinstaubbelastungen in der Außenluft kann es auch in Büroräumen zu einer erhöhten Belastung mit Feinstäuben kommen. Der regelmäßige Einsatz tonerhaltiger Geräte, z.B. Laserdrucker in Büroräumen, kann umwelt- und gesundheitsrelevante Mengen an Staub, Tonerpartikeln, Gummiabriebe sowie flüchtige organische Verbindungen freisetzen.

Zur Farbgebung des Toners dienen Ruße (synthetische Kohlenstoffpartikel bzw. Carbon black). Als Schwarzpigment machen sie einen wichtigen Bestandteil des Toners aus [http://www.tonerstaub.info/html/gefahr_durch_toner.html].

Bei den Tonerpartikeln handelt es sich um lungengängigen Feinstaub mit einer durchschnittlichen Größe von 2-10 µm [UGZ, 2008]. Im Vergleich dazu kann die Größe des Carbon black 20-200 nm betragen [Watson und Valberg, 2001].

1.2.2 Toner

1.2.2.1 Zusammensetzung

Toner sind industriell hergestellte Kunststoffverbindungen. Es sind sehr komplexe Verbindungen mit verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften. Die Trägersubstanz von Tonerstäuben ist Harz (ein Styrolacrylatpolymer), welcher 90 % der Inhaltsstoffe ausmacht. Seltener finden sich als Bestandteil Polyester- oder Epoxidharze sowie Polypropylene (Zuschlagstoffe). Der Anteil an Farbstoffen beträgt ca. 5 %. Als Farbpigmente wurden früher häufig Azofarbstoffe verwendet, woraus kanzerogene Substanzen (aromatische Amine) entweichen können [Computer Bild, 2006]. Heute werden überwiegend Triphenylmethane, Perylene, aber auch Industrieruß (Carbon black) eingesetzt [Müller et al., 2007]. Zudem lassen sich verschiedene Metalle und Oxide nachweisen, wie z.B. Chrom, Eisen, Strontium, Titan, Zink sowie Nickel, Kobalt, Quecksilber, Blei, die als so genannte Carrierverbindungen die Aufladung und den Transport der Tonerteilchen verbessern sollen [Hahn et al., 2004]. Darüber hinaus können noch weitere in der Harzmatrix gebundene, geringe Mengen flüchtiger organischer Verbindungen wie z.B. Toluol, Xylol, Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren, Phenol, Ethylbenzol, das gesundheitsschädliche Styrol und das leukämieerregende, genotoxische Benzol enthalten sein [Stelting, 2005; Müller et al. 2007]. Auch zinnorganische Verbindungen, wie Dibutylzinn und Tributylzinn, können in verschiedenen Tonerpulvern gefunden werden, da diese vorrangig als Katalysatoren bei der Herstellung der Polyesterharze verwendet werden [Hahn et al., 2004; Computer Bild, 2006].

1.2.2.2 Vorkommen und Exposition

Tonerhaltige Materialien werden in Tonerpatronen für Laserdrucker, Kopierer, Laser-fax- und Multifunktionsgeräte verwendet [Stelting, 2003]. Einen Eindruck über das in den Experimenten verwendete Tonerpulver gibt **Abb. 6**.

Tonerbestandteile finden sich sowohl in schwarzen Kartuschen als auch in Farbpatronen. Messungen zeigen, dass es während des Druckerbetriebs zur Freisetzung



Abb. 6:
Tonerpulver aus der Kartusche eines Kopierers.

von flüchtigen organischen Verbindungen, Organozinn, Quecksilber sowie Tonerstäuben und sogar Benzol kommt [Hahn et al., 2004; Stelting, 2006]. Aber auch die Partikel selbst können während eines hohen Druckbetriebes ausgestoßen werden. Der Partikelausstoß ist vor allem bei Laserdruckern geräteabhängig [He et al., 2007]. In der Studie von He et al. (2007) wurden 62 Laserdrucker unterschiedlicher Hersteller (HP, Canon, Mita, Toshiba, Ricoh) hinsichtlich ihrer Partikelemission nach 48 Stunden untersucht. Dabei ergab sich, dass im täglichen Betrieb während der Arbeitszeit die durchschnittliche Partikelemissionsrate fünfmal höher als normal war, wobei in dem untersuchten Gebäude die Raumtemperatur klimatisiert und Rauchen verboten war. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Partikelemission unmittelbar nach dem Druckstart beginnt. Die Partikelgröße reichte dabei von 15 bis 750 nm. Ebenso wurde festgestellt, dass die einzelnen Emissionsraten innerhalb der Hersteller bei verschiedenen Modellen unterschiedlich waren. 15 der 62 untersuchten Geräte setzten mittlere bis hohe Emissionen frei. Die Autoren vermuteten, dass sowohl das Modell, aber auch die flächenmäßige Tonernutzung und das Alter der Kartuschen bedeutende Faktoren sind, die zu unterschiedlichen Emissionsraten der einzelnen Drucker führen.

In den Kopiergeräten wird mit Hilfe eines Laserstrahls eine Trommel belichtet und aufgeladen. Durch Druck und Hitze (ca. 120-170 °C) schmilzt der Hauptanteil an Harz im Toner und die Tonerpartikel werden an das Papier gebunden. Der Toner erreicht dabei eine Temperatur von etwa 130 °C, das Papier maximal 100 °C [Stelting, 2006].

Da Tonergeräte, vor allem Laserdrucker, einen schnellen Papierdurchsatz haben und auch Kopiergeräte mittlerweile unentbehrlich geworden sind, findet man diese Geräte heutzutage in jedem Büro. Daher kommt es vor allem bei Büroangestellten zu einem sehr häufigen, teilweise sogar dauerhaften Kontakt mit Tonergeräten [Stelting, 2006]. Eine besonders starke Exposition findet sich auch bei den Servicetechnikern, bei de-

nen der direkte Kontakt mit Tonerstäuben über die Haut oder durch Einatmen bei der Reinigung und Wartung von Tonergeräten nicht zu umgehen ist [Hahn et al., 2004].

1.2.2.3 Gesundheitliche Auswirkungen

Die genaue Wirkung von Tonerstäuben auf die menschliche Gesundheit ist bisher nicht bekannt. In Tierversuchen hat sich bislang gezeigt, dass es zu bronchopulmonalen Entzündungen kommen kann, wobei auch Lungenfibrosen beschrieben wurden [Müller et al., 2007].

Beim Menschen ergeben sich Hinweise auf pseudoallergische Reaktionen. Seit November 1998 werden von der Interessengemeinschaft Tonergeschädigter [ITG, 2007] Hinweise auf gesundheitliche Schädigungen durch Tonerstäube zusammengetragen. Dabei ergaben sich in den vergangen Jahren gehäuft Hinweise auf Erkrankungen, die durch vermehrten Kontakt mit Toner auftraten, wobei Laserdrucker als potenziell schädigender zu betrachten sind als Kopiergeräte. Die Erkrankungen können nicht nur vom Staub verursacht worden sein, sondern auch von den flüchtigen Substanzen, die durch die Erhitzung frei werden [Link, 2001]. Bei den Beschwerden handelt es sich in den meisten Fällen um Haut- und Schleimhauterkrankungen. Am häufigsten wurde von rezidivierenden Entzündungen der Atemwege mit Rhinitis, Epistaxis, Sinusitis, Bronchitis und Asthma bronchiale berichtet. Häufig kam es auch zu einem hyperreagiblen Bronchialsystem. Die ITG beschrieb Entzündungen der Haut (Hautjucken und –reizung sowie Exantheme), Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes und sogar Unfruchtbarkeit. Krebsfälle durch Tonerexposition wurden jedoch vorrangig mit einer Exposition gegenüber entstehender Dämpfe, wie z.B. Benzol, in Verbindung gebracht [Stelting, 2003]. Armbruster et al. (1996) beschrieben den Fall eines 39 Jahre alten Patienten mit einer granulomatösen Pneumonitis und mediastinaler Lymphadenopathie. Die Erkrankung wurde auf eine 18-monatige Tätigkeit in einer Zeitungsagentur zurückgeführt, bei der der Patient ständigen Kontakt mit Tonerstaub hatte. Durch Funktionstests der Lunge wurde eine bronchiale Obstruktion festgestellt. Bei der Röntgenuntersuchung der Lunge fanden sich beidseits mikronoduläre Verschattungen und eine Vergrößerung der hiliären und mediastinalen Lymphknoten. Zudem wurde eine Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage durchgeführt, bei der eine Erhöhung von Entzündungszellen (Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen) festgestellt wurde. Weitere Proben wurden durch

eine transbronchiale Lungenbiopsie und eine Mediastinoskopie gewonnen und zusammen mit dem Tonermaterial in der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Durch die Elementanalyse konnten sowohl im Tonerstaub, als auch in den Proben der Lymphknoten und der Lunge Kupfer- und Siliziumanreicherungen gefunden werden. Die Erkrankung wurde auf eine Tonerstaubemission zurückgeführt [Armbruster et al., 1996].

Zelluläre Reaktionen

Bei der Untersuchung von Tieren nach Tonerstaubexposition wurden durch Bellman et al. (1992) weibliche Ratten an sechs Tagen pro Woche für fünf Stunden über eine Dauer von drei Monaten gegenüber Tonerstaub exponiert. Der mittlere Durchmesser des Staubes betrug 4,0 µm. Die Inhalation erfolgte über die Nase mit Aerosolkonzentrationen von 0, 10 und 40 mg/m³. Nach Beendigung der Exposition konnte in den Lungen eine Tonerkonzentration von 0,4 mg bei geringen und 3 mg bei hohen Aerosolkonzentrationen ermittelt werden. Nach weiteren 15 Monaten lagen die Werte bei 0,12 bzw. 2,65 mg. Darüber hinaus waren in der mit hohen Konzentrationen exponierten Gruppe die Werte für LDH (ein Enzym in der Lunge, welches sich an der Energiegewinnung beteiligt), β-Glucuronidase (ein hydrolytisches Enzym in den Lysosomen, welches durch Zellnekrose freigesetzt wird) und Neutrophile deutlich erhöht. Die Anzahl der Makrophagen blieb in beiden Expositionsgruppen gleich niedrig. Sowohl die LDH als auch die Glucuronidase werden als Marker für die Zytotoxizität eingesetzt.

Es zeigte sich, dass die alveoläre Clearance auch zwölf Monate nach Beendigung der Exposition bei hohen Expositionskonzentrationen eingeschränkt blieb. Dabei wurden Ansammlungen von mit Toner beladenen Makrophagen in einigen Arealen gefunden. Im größten Teil der Lunge waren sie nur sporadisch zu finden. Zusätzlich wurde von Bellman et al. (1992) vermutet, dass sterbende Makrophagen Partikel freisetzen und diese erneut von anderen Makrophagen über Phagozytose aufgenommen werden, da die Menge an tonerbeladenen Makrophagen innerhalb von 15 Monaten von 25 auf 85 % anstieg. Sie vermuteten auch, dass partikelbeladene Makrophagen chemotaktische Stoffe freisetzen, was dazu führt, dass andere bereits beladene Zellen in der Umgebung verharren und nicht entfernt werden.

1.2.3 Kohlenruß (Carbon black)

1.2.3.1 Vorkommen und Exposition

Industrieruß (englisch: Carbon black) ist ein schwarzer, pulverförmiger Feststoff, der durch kontrollierte partielle Verbrennung oder Pyrolyse (thermische Spaltung chemischer Verbindungen) von Erdöl, Steinkohlenteer, Ethylen oder auch Pflanzenöl hergestellt wird. Die Herstellung von Carbon black kann in unterschiedlichen Verfahren erfolgen.



Am häufigsten wird das so genannte „Furnace-Verfahren“ angewendet. Hierbei werden die Ausgangsstoffe in ein Reaktorsystem eingeleitet, unter Sauerstoffmangel verbrannt, aufgespalten und dehydriert. Dabei entstehen pulverförmige Rußpartikelansammlungen mit einer Größe von 40 bis 48 und 49 bis 100 nm. Zur Verbesserung der Handhabung des Carbon blacks wird die Pulverform des Industrierußes durch eine Granulierung in eine geperlte Form überführt [http://www.degussa-fp.com/fp/de/gesch/gummiru/herstellung].

Dadurch entstehen Aggregate (vgl. **Abb. 8**) mit einem Durchmesser von 100 bis 430 nm [Kerr et al., 2002]. Das in den Experimenten dieser Arbeit verwendete Carbon black, dargestellt in **Abb. 7**, wurde durch das „Furnace-Verfahren“ gewonnen. Neben dem „Furnace-Verfahren“ werden auch das Gasruß-, Lampruß-, Acetylenruß- und Thermalrußverfahren angewendet, die ähnlich wie das „Furnace-Verfahren“ ablaufen [Yang et al., 2007].

Die Industrieruße sind zu unterscheiden von den Rußen, die als Nebenprodukt bei der Verbrennung von rußhaltigen Materialien entstehen und aus verschiedenen und oft unbekannten Stoffen zusammengesetzt sind [Baan, 2007].

Der Hauptbestandteil der Industrieruße ist Kohlenstoff. Daneben können noch andere Elemente wie z.B. Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel enthalten sein. An diese Verbindungen sind zusätzlich funktionelle Gruppen gebunden, z.B. Carboxyl- und Phenylgruppen. Diese tragen zu einer Verstärkung der elastischen Fähigkeiten bei [Park und Kim, 2000]. Industrieruße können zudem polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) enthalten, oder es können Benzene mit einem Anteil von 1,7 % gebunden sein [Rausch et al., 2004]. Die Eigenschaften von Carbon black sind abhängig von der Größe, der Morphologie, der Oberflächenbeschaffenheit, der kristallinen Struktur und ihrer Hitzestabilität. Beispielsweise sind

Abb. 7:
Partikelpulver des Carbon black.

Flammruß („Furnace Black“) und das „Channel Black“ runde Partikel mit einer Größe von 10-100 nm, die sich zu Agglomeraten formen. Hier spricht man auch von ultrafeinem Carbon black (ufCB). **Abb. 8** stellt den Unterschied der Agglomerate zu den Aggregaten dar. Dagegen sind die so genannten „Thermal Carbon blacks“, mit Verwendung in der Feuerfestzement-, Metall- und Kunststoffindustrie, eher grobkörnig und haben eine Größe von durchschnittlich 120 bis 200 nm bzw. max. 500 nm [Yang et al., 2007]. Diese bezeichnet man allgemein auch als feines bzw. nicht-ultrafeines Carbon black.

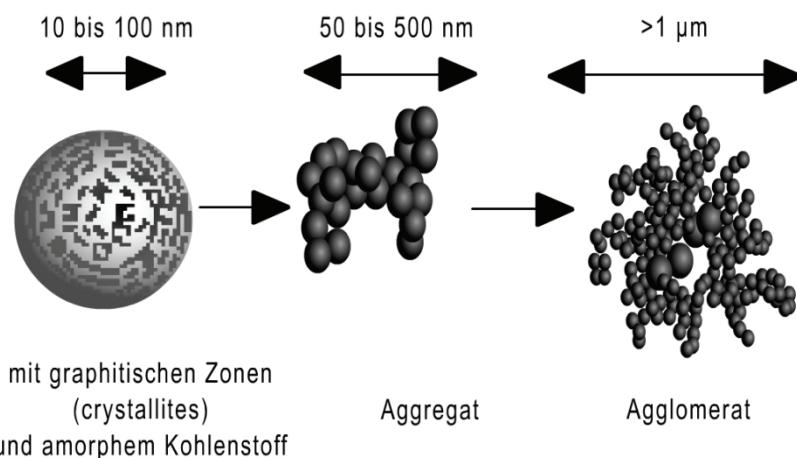


Abb. 8:
Ruß-Basispartikel fusionieren miteinander im Reaktor und bilden Aggregate und Agglomerate. Die Agglomerate sind eine dichte Ansammlung von Aggregaten [Accorsi, 1999].

Durch die komplexe chemische Zusammensetzung ergeben sich spezifische, in der Industrie gut nutzbare, physikalische und chemische Eigenschaften, die hauptsächlich zur Herstellung von Gummimaterialien, vor allem Autoreifen, genutzt werden.

Den Industrieruß kommt ebenso eine besondere Bedeutung durch die Verwendung als „Pigment-Ruß“ zu. Hier erfolgt der vielfältige Einsatz in Druckerpatronen als Druckerschwärze, z.B. für Laserdrucker, aber auch als schwarze Farbkomponente in Lacken und Farben, Beschichtungsmaterialien und Kunststoffen. Wichtige Beispiele, bei denen auch Industrieruß verwendet werden, sind Schuhleder, Möbel und Automobile [Spindler et al., 2000; Baan, 2007].

Die Herstellung von Industrieruß erfolgt zwar in komplett abgeschlossenen Reaktoren, jedoch nicht in abgegrenzten Gebäuden. Dadurch kann es im regelmäßigen Betrieb zu einer geringen Partikelfreisetzung kommen, mit denen die Angestellten in Kontakt geraten. In der anschließenden Verarbeitung (Pulverisierung, Granulierung, Trocknung) bestehen fabrikabhängig unterschiedlich hohe Risiken der Exposition, da die Verarbeitung in freier Umgebung oder unter abgeschlossenen Räumen erfolgen kann. Bei der Verpackung sind die Arbeiter den Partikeln am stärksten ausgesetzt.

Durch Einpacken in Papier-, Faser- oder Kunststoffbeutel oder beim Stapeln der Container für den Transport per Schiff oder Eisenbahn kommt es zur Freisetzung großer Staubmengen [Kerr et al., 2002].

1.2.3.2 Gesundheitliche Auswirkungen

Rausch et al. (2004) stellten Symptome von beruflich exponierten Patienten zusammen. Dabei wurden Irritationen der Nasenschleimhäute mit chronischer Rhinitis, blutiges Nasensekret und leichte Hautirritationen beschrieben [Rausch et al., 2004]. In einer Studie von Gardiner et al. (1993) wurde versucht, eine Beziehung zwischen kumulativer Carbon black-Exposition und der Lungenfunktion darzustellen. Die vorzugsweise männlichen Fabrikangestellten berichteten über Beschwerden wie Husten, Auswurf, chronische Bronchitis, Pfeifen beim Atmen und Atemnot (Dyspnoe). Die Symptome nahmen bei höherer Exposition sowie mit zunehmendem Alter und stärkerem Zigarettenkonsum deutlich zu. In den Lungenfunktionstests zeigte sich mit steigender Exposition eine zunehmende Abnahme der Lungenfunktion, vor allem bei dem forcierter exspiratorischen Volumen (FEV_1) [Gardiner et al., 1993].

Eine weitere Studie von Gardiner et al. (2001) konzentrierte sich besonders auf Symptome einer chronischen Lungenerkrankung. Sie untersuchte das Verhältnis zwischen der Carbon black-Exposition und respiratorischen Symptomen sowie einer eingeschränkten Lungenfunktion bei Angestellten ohne zuvor bestehende Lungenbeschädigung. Durch die Unterteilung der Angestellten in Nichtraucher, ehemalige und aktuelle Raucher konnten Anzeichen einer Interaktion zwischen Exposition und Rauuchen festgestellt werden. Im Gegensatz zu den aktuellen Rauchern waren die Symptome der Sputumproduktion bei den Nichtrauchern und das Symptom Husten bei ehemaligen Rauchern stärker. Bei kumulativer Staubexposition war der Husten das vorherrschende Symptom, wohingegen eine erhöhte Sputumproduktion sowohl bei kumulativer als auch gesamter Exposition bestand. In Bezug auf eine aktuelle und kumulative Staubexposition ergaben die Lungenfunktionstests eine Verschlechterung des $FEV_{25\%-75\%}$ (forcierter mittlerer Exspirationsfluss) sowie eine Abnahme des Verhältnisses FEV_1 (forcierter exspiratorisches Volumen)/FVC (forcierte Vitalkapazität). Die Testergebnisse waren bei den rauchenden Arbeitern am schlechtesten. Bei steigender Staubexposition war eine vermehrte Ausprägung der Symptome Husten mit Auswurf und Sputumbildung deutlich. Zusätzlich konnten auch Anzeichen einer

chronischen Bronchitis ermittelt werden. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Exposition gegenüber Carbon black deutlich schädigende Auswirkungen auf das respiratorische System und die Lungenfunktion hat. Die kumulative Exposition zeigte den stärkeren negativen Einfluss. Bei den Rauchern waren die Symptome nicht so stark. Deshalb wurde als Vermutung geäußert, dass die Folgen der Staubexposition nicht so ausgeprägt sind wie langes, starkes Rauchen [Gardiner et al., 2001]. Harber et al. (2003) untersuchten später die Auswirkungen einer Carbon black-Exposition bei Arbeitern, die vor allem in der Carbon black-Herstellung tätig waren. In der Studie wurde zwischen inhalierbaren und respirablen Staubanteilen unterschieden. Der inhalierbare Staubanteil bezeichnet den eingeatmeten Anteil, aus dem größere Partikel vor allem in der Nase, dem Rachen und im Kehlkopf deponiert werden. Der respirable Staubanteil bezeichnet die Fraktion, die bis in die Alveolen vordringen kann, wobei eine Teilmenge auch dort abgelagert wird (vgl. **Abb. 3**) [DFG, 2007]. Bei langzeitexponierten Personen, die einer Carbon black-Konzentration von 1 mg/Jahr ausgesetzt waren, konnte im Lungenfunktionstest ein statistisch signifikanter Abfall des FEV₁ festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich eine leicht erhöhte Neigung der Nichtraucher, an einer chronischen Bronchitis zu erkranken sowie eine leicht gesteigerte Tendenz einer chronischen Sputumproduktion bei gesteigerter Staubexposition zu entwickeln [Harber et al., 2003]. Puntoni et al. (2001) berichteten von einer erhöhten Inzidenz von Harnblasenkrebs bei Werftarbeitern, die durch das manuelle Verladen des Carbon blacks in Papiersäcke einer sehr hohen Partikelkonzentration ausgesetzt waren. Ebenfalls wurde ein vermehrtes Auftreten von Lungenkrebs mit einer erhöhten Carbon black-Exposition in Verbindung gebracht. Morfeld und McCunney (2007) konnten eine erhöhte Mortalität bei Angestellten einer Carbon black-Produktionsfabrik feststellen. Dabei wurde auch noch nach Beendigung des Arbeitsverhältnisses ein vermehrtes Auftreten von Lungenkrebs beobachtet.

1.2.3.3 Zelluläre Wirkung von Carbon black

Ablagerung und Phagozytose sowie Zytotoxizität

Donaldson et al. (2001) stellten bei der Untersuchung der Phagozytose von uFCB durch Alveolarmakrophagen fest, dass eine schädliche Wirkung dieser Partikel durch Hemmung der Phagozytose vermittelt werden kann. Bei steigenden Dosierungen

kam es zu einer Beeinträchtigung der Phagozytose durch die Makrophagen bis hin zu einer „volumetrischen Überladung“ mit Partikeln. Infolgedessen wurde die Vermutung aufgestellt, dass durch verminderte Phagozytose eine verstärkte Interaktion zwischen den Partikeln und dem Alveolarepithel stattfindet. Nach der Respiration kommt es zur Ablagerung kleinerer Mengen von Partikelagglomeraten auf der alveolären Oberfläche. Die einzelnen Partikel lagern sich in einem gleichförmigen Muster ab, was zu einer gesteigerten Aufnahme durch alveolare Epithelzellen führt. Die Beeinträchtigung der Phagozytose, bis hin zu einer Überladung, war bei uFCB stärker als bei den Feinpartikeläquivalenten. Diese Effekte wurden auf Unterschiede in Größe, Anzahl und Oberfläche der Partikel zurückgeführt. Im Vergleich zu den Feinpartikeln haben die ultrafeinen Partikel eine sehr viel größere Oberfläche bezogen auf die Menge [Renwick et al., 2001]. Renwick et al. (2001) stellten daher die Vermutung auf, dass eine beeinträchtigte Phagozytose durch Makrophagen vermittelt wird, indem Zell-Zell-Kontakte verhindern, dass angrenzende Makrophagen neue Partikel aufnehmen. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Partikelretention. Ein zusätzliches Anzeichen für eine Zytotoxizität ist die Freisetzung von Enzymen. *In vitro* Versuche von Barlow et al. (2005) wiesen eine signifikante LDH-Freisetzung aus L2-Zellen, einer rattealveolar Typ-II-Epithelzelllinie, nach. Ein Überblick über die pathogenetischen Zusammenhänge nach Partikelexposition von Zellen ist in **Abb. 9** dargestellt.

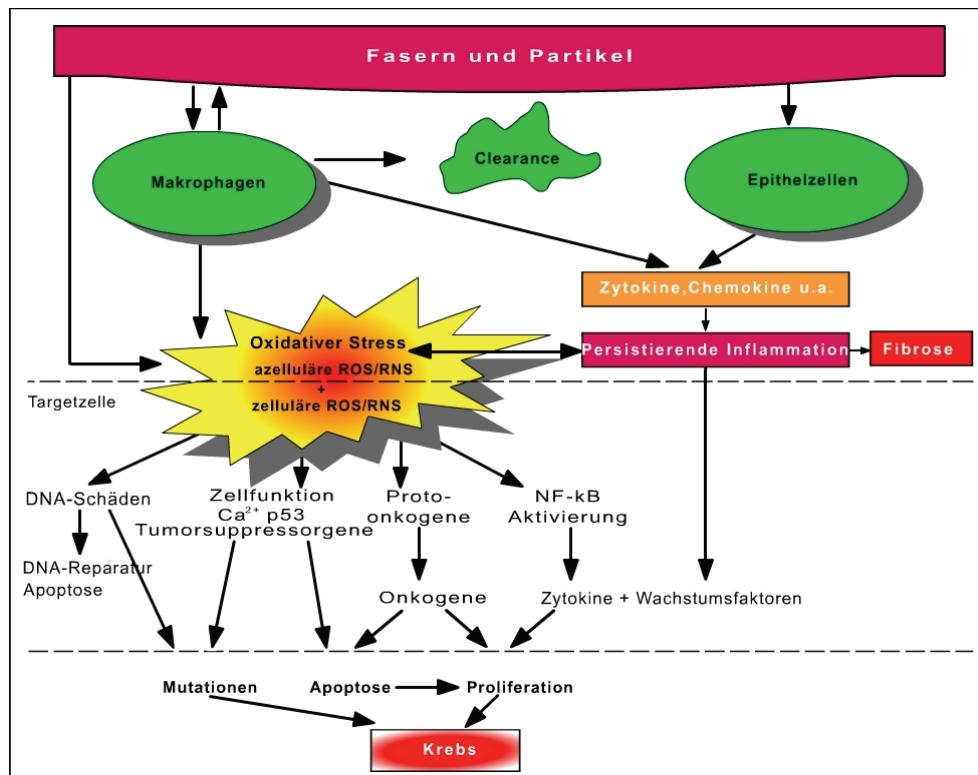


Abb. 9:
Mögliche pathogenetische Zusammenhänge, die nach Inhalation von Fasern und Partikeln zur Entstehung von Fibrose und Krebserkrankungen führen können [nach Geh, 2005].

Produktion von Radikalen und oxidativem Stress

Aam und Fonnum (2007) konnten in Zellkulturversuchen mit Rattenalveolarmakrophagen die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale nachweisen. Auch Shukla et al. (2000) beobachteten eine intrazelluläre Oxidantienproduktion in pulmonalen Epithelzellen nach einer Exposition gegenüber ufCB bei einer Konzentration von 10 µg/cm². Des Weiteren waren Carbon black Partikel in der Lage, DNA-Schädigungen in A549-Zellen (humane Typ-II-Alveolarepithelzellen) und humanen Monozyten hervorzurufen. Diese DNA-Schädigungen zeigten sich in den Zellkulturversuchen mit Monozyten von Don Porto Carero et al. (2001) bereits nach Carbon black-Expositionen bei Konzentrationen von 16 ng bis 1,6 µg/ml. Stone et al. (1998) exponierten A549-Zellen gegenüber Carbon black, um die Rolle des oxidativen Stresses und die Produktion freier Radikale zu untersuchen. Bewertet wurden der intrazelluläre Gehalt an GSH und seiner oxidierten Form GSSG sowie die Bildung von Hydroxylradikalen durch Gebrauch des Hydroxylradikalfängers Mannitol. Die Produktion der Hydroxylradikale wurde sowohl nach Exposition gegenüber ultrafeinem als auch gegenüber feinem Carbon black nachgewiesen. Darüber hinaus konnten Spaltungen in der DNA der Zellen beobachtet werden. Außerdem zeigte sich eine Hemmung der metabo-

lischen Aktivität, die durch Zugabe von Mannitol leicht gemindert werden konnte. Die Effekte waren bei ultrafeinem Carbon black stärker als bei feinem Carbon black [Stone et al., 1998].

Apoptose

Neben der Zytotoxizität, die sich u.a. in den Zellkulturversuchen von Renwick et al. (2001) zeigte, konnte von Möller et al. (2002) eine Apoptoseinduktion beobachtet werden, nachdem primäre Alveolarmakrophagen über 24 Stunden gegenüber Carbon black exponiert waren. Allerdings sank die zelluläre Lebensfähigkeit bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g}/\text{ml}/10^6$ Zellen nicht unter 75 %. Bei sehr hohen Konzentrationen von $360 \mu\text{g}/\text{ml}/10^6$ Zellen kam es jedoch zu einem deutlichen Anstieg nekrotischer Zellen. Im Vergleich dazu war die Anzahl apoptotischer Zellen deutlich geringer. Auch Sydlik et al. (2006) konnten in Lungenepithelzellen eine Apoptose nach einer Carbon black-Exposition über 24 Stunden nachweisen. Die Konzentration des Carbon blacks betrug dabei $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Proliferation der Zellen durch das ufCB induziert. Dies führte zu der Vermutung, dass die Proliferation als Kompensation einsetzt, um die durch Apoptose ausgefallenen Zellen zu ersetzen.

Entzündungsreaktionen und Einfluss auf die Genexpression

Durch den anhaltenden oxidativen Stress, der nach der Phagozytose der Partikel induziert wird, werden nicht nur Zytotoxizität und Apoptose, sondern auch Entzündungsreaktionen (Inflammationen) ausgelöst. Eine besondere Rolle spielen neben den Makrophagen auch die alveolären Epithelzellen vom Typ II, da sie zahlreiche Zytokine und Chemokine produzieren, die zu einer Proliferation und Inflammation führen können. Nach der Phagozytose von ufCB durch die Epithelzellen können diese proinflammatorischen Zytokine ausgeschüttet werden. Monteiller et al. (2007) stellten in ihren Zellkulturversuchen eine Erhöhung von Interleukin-8 fest. Allerdings werden nicht nur Zytokine und Chemokine freigesetzt. Es kann, ebenso wie bei Asbest, zu einer Aktivierung von NF-κB kommen, wie bereits von Shukla et al. (2000) bei einer Partikelkonzentration ($\text{PM}_{2,5}$) von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ beobachtet werden konnte. Monteiller et al. (2007) wiesen nach, dass nach einem partikelinduzierten GSH-Abfall ebenfalls eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB stattfindet.

2 Ziel der Arbeit

Die gesundheitlichen Auswirkungen wie Entzündungen, Fibrose und Krebs nach Inhalation von luftgetragenen Fasern und Partikeln sind an vielen Beispielen belegt. Besonders die kanzerogenen Eigenschaften von Asbest sind hinlänglich bekannt und gut untermauert. Allerdings wurden die zellulären Mechanismen, die zur Krankheitsentstehung führen, bisher weniger untersucht. Daher werden in der vorliegenden Arbeit, ausgehend von 3 asbestinduzierten Lungenerkrankungen an Patientenmaterial, die zellulären Mechanismen, die nach einer Faser- und auch nach einer Partikelexposition zum Tragen kommen, näher beleuchtet. Dazu werden Fibroblasten *in vitro* gegenüber verschiedenen Partikelarten (Toner, Carbon black) und gegenüber Asbest (Chrysotil, Krokydolith) exponiert. Die zellulären Effekte (Zytotoxizität, Apoptose) werden ermittelt und mit den beobachteten Effekten des Patientenmaterials verglichen. Darüber hinaus wird auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies untersucht und die Reaktivität der Faser- und Partikelproben vergleichend analysiert.

Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf die zellulären Mechanismen, die nach der Exposition gegenüber Asbestfasern und Partikeln ausgelöst werden, zulassen. Des Weiteren sollen die Ergebnisse eine Einschätzung der Wirkung des bislang unbekannten zytotoxischen Potentials von Toner- und Kohlenrußpartikeln ermöglichen.

3 Material und Methoden

Alle eingesetzten Materialien, Geräte und Chemikalien sowie die in den Versuchen verwendeten Substanzen sind zusammen mit dem Hersteller und Bezugsort tabellarisch im Anhang 1 aufgelistet.

3.1 Patientenmaterial

Zur histologischen Analyse von asbestinduzierten Lungenerkrankungen wurden drei Patientenfälle von Lungenasbestose ausgewertet. Dazu wurden von jedem Patienten Proben der Lungenresektate in Paraffin eingebettet. Die Patientenproben wurden sowohl mit dem Lichtmikroskop als auch im Raster- und Transmissionselektronenmikroskop am Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock und in der Abteilung Medizinische Biologie (Leiter: Prof. Dr. L. Jonas) untersucht.

Der 1. Fall wurde mir mit freundlicher Unterstützung vom HELIOS Klinikum Schwerin überlassen.

Fall 2 stammt aus dem Probenmaterial des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Rostock.

Der 3. Fall wurde mir mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus-Michael Müller, Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Von Fall 1 und 2 konnten mir die pathologischen Sektionsprotokolle bereitgestellt werden. Das Protokoll des 3. Falles stand leider nicht mehr zur Verfügung.

3.2 Zellkultur

Die *in vitro* Versuche wurden am Universitätsklinikum Essen, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin (Prof. Dr. A. W. Rettenmeier) in der AG „In-vitro- und Molekulare Toxikologie“ (Priv.-Doz. Dr. E. Dopp) durchgeführt.

3.2.1 Zelllinie

Für die *in vitro* Versuche wurden 3T3-Zellen, primäre embryonale, genetisch unveränderte Mäusefibroblasten (American Type and Culture Collection ATCC, USA), wie in **Abb. 10** dargestellt, verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

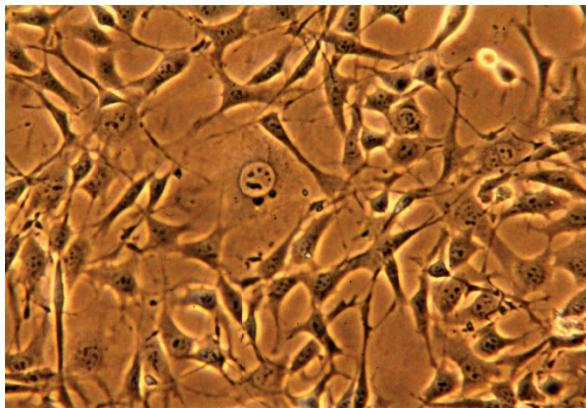


Abb. 10:
Adhären wachsende 3T3-Zellen in Zellkultur.
200fache Vergrößerung.

Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt ca. 18 Stunden. Da die Zellen kontaktinhibiert sind, stoppt ihre Proliferation (Vermehrung) bei gegenseitigem Kontakt. Die 3T3-Zellen sind eine etablierte Zelllinie. In der Zellkultur nehmen die Zellen, wie in **Abb. 11** zu sehen ist, eine langgestreckte Form ein. Über zytoplasmatische Fortsätze stehen sie untereinander in Kontakt (**Abb. 10** und **12**).

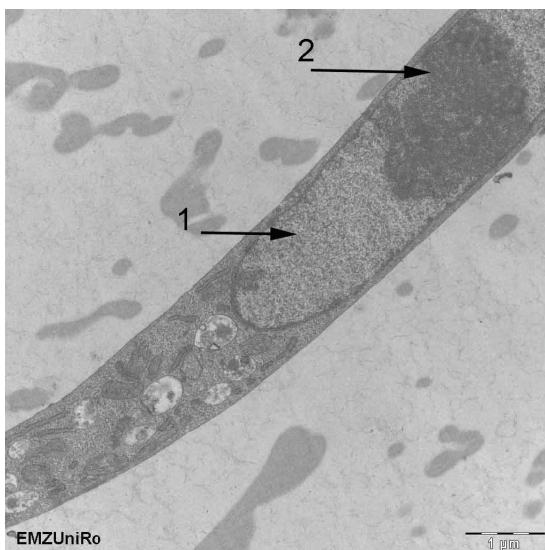


Abb. 11:
Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung des zellulären Aufbaus eines Fibroblasten. Deutlich sichtbar ist der Zellkern (1) mit Nukleolus (2). Charakteristisch ist die langgestreckte Form der Fibroblasten. Vergrößerung 11000x.

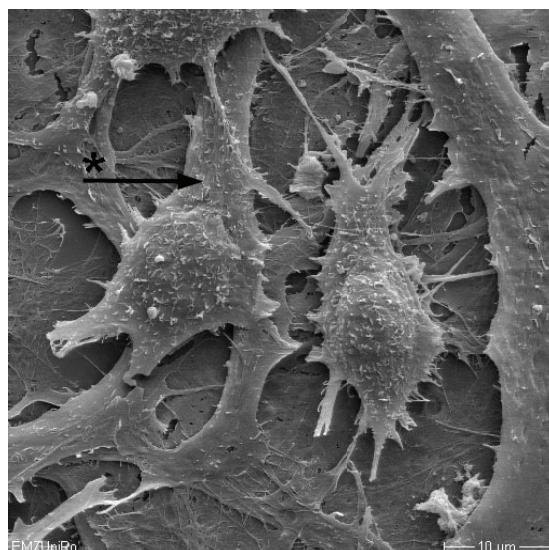


Abb. 12:
Darstellung der Fibroblastenkultur mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie. Die Zellen stehen über zytoplasmatische Fortsätze (*) untereinander in Kontakt. Sie nehmen ungefähr eine Größe von 25 μm ein. Vergrößerung 450x.

Kommt es in Geweben zu Entzündungsprozessen, weil z.B. Fasern oder Partikel in die Lunge eingedrungen sind, werden zunächst die nicht ortsständigen Makrophagen aktiviert. Diese können auch in Diffusionslufträume wie den Alveolen eindringen und produzieren z.B. Chemokine und Zytokine. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der ortsständigen Fibroblasten. Durch deren Produktion von Kollagen verursachen sie Umbauvorgänge bzw. produzieren Narbengewebe (Fibrose). Die Fibroblasten

besitzen auch die Fähigkeit zur Phagozytose. Sie wurden in den Zellkulturversuchen verwendet, um Reaktionen zu untersuchen, die unabhängig von anderen Zellen (z.B. Makrophagen, Epithelzellen) stattfinden und somit zusätzlich zu Entzündungsprozessen beitragen können.

3.2.2 Kultivierung von Zellen

Das Nährmedium für die 3T3-Zellen war aus DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), 15 % Fetales Kälberserum (nicht hitzeinaktiviert), 0,5 % Gentamycin und 2 % L-Glutamin zusammengesetzt.

Die Arbeit in der Zellkultur wurde unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Hatten die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreicht, bestand die Notwendigkeit der Subkultivierung. Dazu wurde das Kulturmedium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. In Abhängigkeit von der Größe der Kulturflasche mussten 3 bis 5 ml Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) mit einer Konzentration von 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA hinzugegeben werden. Dann wurde die Flasche für 25 Sekunden geschwenkt, das Trypsin mit Hilfe einer Pipette entfernt und die Kulturflasche für etwa 5 Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf der Zeit konnte durch Klopfen gegen die Seitenwände der Kulturflasche geprüft werden, ob sich die Zellen vom Boden gelöst hatten. War dies noch nicht erfolgt, kamen die Zellen für weitere 2 Minuten in den Brutschrank. Eine Fließbewegung im Zellrasen zeigte, dass sich die Zellen gelöst hatten. Anschließend wurden sie mit frischem, vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert (vereinzelt) und in neue Kulturflaschen ausgesät, in die bereits, in Abhängigkeit von der Flaschengröße, Medium vorgelegt war. Für die verschiedenen Zellkulturversuche war jeweils eine definierte Zellzahl erforderlich. Um die gewünschte Zellzahl in die einzelnen Kulturflaschen auszusäen, wurden die Zellen nach dem Vorgang des Trypsinierens in einer definierten Menge Kulturmedium resuspendiert, mittels Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) [Lindl, 2000] ausgezählt und die erforderliche Zellmenge in Kulturflaschen überführt.

3.2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit den 3T3-Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und im Wasserbad bewegt, bis sich die Eisklumpchen gelöst hatten. Unter der sterilen Werkbank wurden die Röhrchen von außen mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert. In 10 ml Zentrifugenröhren wurden 8 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt und der Inhalt der Kryoröhrchen in die Röhrchen überführt. Durch das Zentrifugieren bei 160 x g für 5 Minuten sollte das noch vorhandene Einfriermedium von den Zellen getrennt werden. Nach dem Abpipettieren des Überstands im Zentrifugenröhren konnten die 3T3-Zellen in dem Kulturmedium resuspendiert und in vorbereitete Kulturflaschen (25 cm² mit 5 ml Medium) gegeben werden.

Einfrieren von Zellen

Um die Bildung schädigender Eiskristalle beim Einfrieren der Zellen zu verhindern, sollte dem Einfriermedium 5 bis 10-prozentiges Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20-prozentiges FKS hinzugefügt werden. Anschließend musste das Medium auf Eis gelegt und im Kühlschrank auf 0 °C abgekühlt werden. Wie bereits bei der Kultivierung von Zellen beschrieben, wurde zur Vorbereitung für das Einfrieren das Kulturmedium aus den Kulturflaschen entfernt und die 3T3-Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin und einer Einwirkzeit von ca. 25 Sekunden musste das Trypsin verworfen werden und die Kulturflaschen für 5 Minuten im Brutschrank inkubieren. Hatten sich die 3T3-Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst, konnten sie mit etwa 10 ml Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl mittels Hämozytometer bestimmt und anschließend für 5 Minuten bei 160 x g zentrifugiert werden. Nach dem Verwerfen des Überstandes, erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit dem gekühlten Einfriermedium. Es wurden 1,8 ml der Zellsuspension in vorgekühlte Kryoröhrchen mit einer Zelldichte von etwa 1,5 bis 2 x 10⁶ Zellen (ca. 1 Million Zellen pro ml) pipettiert. Der Einfrierprozess erfolgte zunächst für ein bis zwei Stunden bei -20 °C. Als die Kryoröhrchen tief gefroren waren, wurden sie für maximal 24 Stunden bei -80 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag konnten die Röhrchen in Flüssigkeitstickstoff (-196 °C) überführt werden.

3.3 Faser- und Partikelproben

3.3.1 Asbest

Die verwendeten Asbestfasern Krokydolith und Chrysotil besaßen UICC-Standard und wurden von Dr. Liannainmaa (Universität Helsinki, Finnland) bezogen.

Krokydolith

Die typischerweise langgestreckte, speerartige Krokydolithfaser, wie deutlich in **Abb. 13** sichtbar wird, ist gekennzeichnet durch eine Spaltung in Längsrichtung. Charakteristisch sind auch sehr kleine Faserbruchstücke.

Bei der Bestimmung der Fasergeometrie lagen die durchschnittlichen Werte für Krokydolith bei 0,25 µm im Durchmesser und 1,71 µm in der Länge. Etwa 5 % der Krokydolithfasern wiesen eine Länge von mehr als 5 µm auf. Bei der Beurteilung der Faseranzahl wurden $1,4 \times 10^6$ Krokydolithfasern pro Mikrogramm ermittelt.

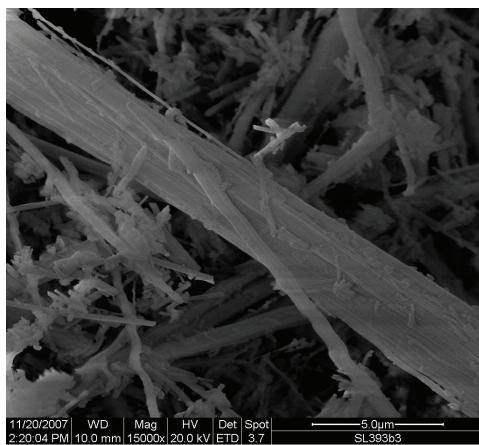


Abb. 13:
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Krokydoliths.
Vergrößerung: 15000x.

Die genaue Analyse der Faserzusammensetzung ist im Ergebnisteil 4.2.1.1 angegeben.

Chrysotil

Chrysotil besitzt eine gewellte Struktur. Die Enden fächern sich pinsel förmig auseinander, wie es auch in **Abb. 14** zu sehen ist. Bei der Ermittlung der fasergeometrischen Werte für Chrysotil ergaben sich ein mittlerer Durchmesser von 0,1 µm und eine durchschnittliche Länge von 2,24 µm.

Ungefähr 5 % der Chrysotilfasern wiesen eine Länge von mehr als 5 µm auf. Bei der Bestimmung der Faseranzahl wurden $11,2 \times 10^6$ Chrysotilfasern pro Mikrogramm ermittelt.

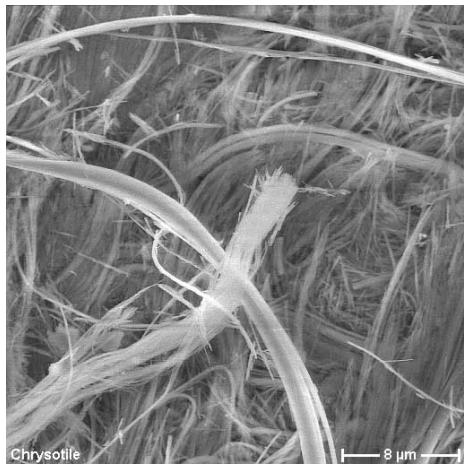


Abb. 14:
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Chrysotils.
Vergrößerung: 3000x.

Die Zusammensetzung der Chrysotilfasern wurde analysiert und im Ergebnisteil 4.2.1.2 dargestellt und aufgelistet.

3.3.2 Partikel

Toner

Die Tonerprobe wurde einer Tonerkartusche (MITA Copystar America Inc., heute unter KYOCERA MITA Deutschland GmbH, Meerbusch, bekannt) entnommen.

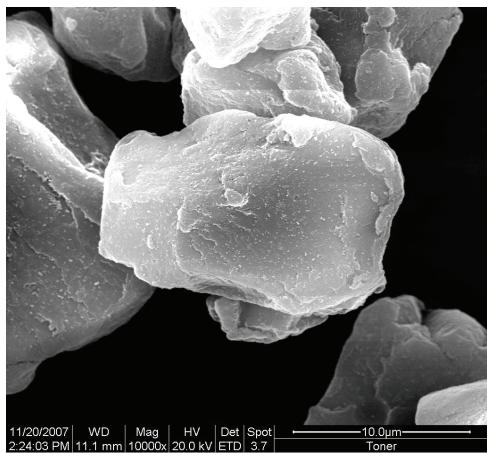


Abb. 15:
Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Tonerpartikel.
Vergrößerung: 10000x.

Der Toner gehört zu den Feinpartikeln und ist in **Abb. 15** dargestellt. Die Ergebnisse der durchgeföhrten Analyse der Tonerpartikel werden im Abschnitt 4.2.2.1 dargestellt.

Carbon black

Das Carbon black wurde von der Aditya Birla Group (Indien) bezogen. Die Partikel des Carbon blacks neigen dazu, Agglomerate zu bilden, wie in **Abb. 16** sichtbar ist.

Der Unterschied zwischen Aggregaten und Agglomeraten wurde bereits in **Abb. 8** veranschaulicht. Anhand der REM wurde die Zusammensetzung und Größe des Carbon blacks bestimmt und ist im Abschnitt 4.2.2.2 erläutert.

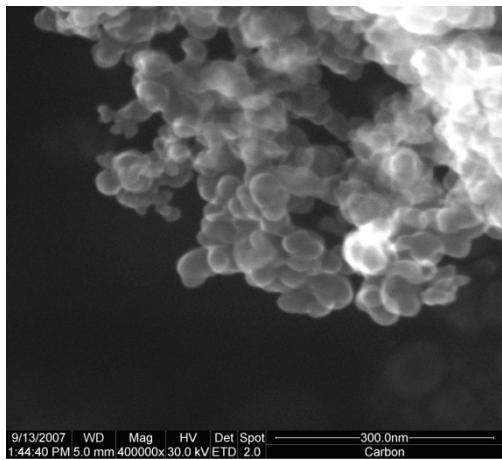


Abb. 16:
Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des Carbon blacks. Vergrößerung: 400000x.

Titandioxid

Als Negativkontrolle in den Zellkulturversuchen wurde Titandioxid (Anatas: 90 % Titandioxid; Evonik Degussa GmbH, Frankfurt am Main) verwendet. Das Titandioxid neigt durch seine feine Partikelstruktur, ebenso wie das Carbon black, zu einer Agglomeratbildung, wie es in **Abb. 17** zu erkennen ist. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde das Titandioxid auf seine Größe und Zusammensetzung untersucht. Zur Einsicht der Ergebnisse dieser Analyse wird auch hier auf den Abschnitt 4.2.2.3 verwiesen.

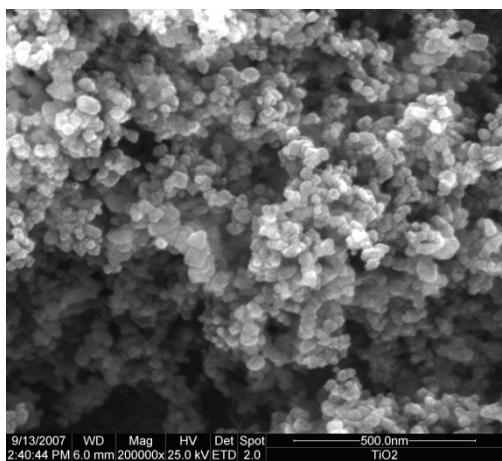


Abb. 17:
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Titandioxids (TiO_2). Vergrößerung: 200000x.

Für die Zellkulturversuche wurde eine Stammkonzentration sowohl für die Partikel als auch für die Fasern von 5 mg/ml verwendet. Die Fasern und Partikel wurden in PBS aufgenommen und suspendiert. Da für die einzelnen Versuche unterschiedliche Probenkonzentrationen verwendet wurden, waren verschiedene Volumina der Proben

erforderlich (genaue Berechnung vgl. Anhang 2.1). Vor der Applikation in die Zellkultur mussten die Lösungen mit den Fasern und Partikeln für 10 Minuten in ein Ultraschallbad (Bandelin Sonorey Super PK 1028, Bandelin electronic, Berlin) gestellt werden. Dabei wurden die Proben hochfrequenten Schallwellen ausgesetzt, um die Suspension der Stoffe zu verbessern und eine Reinigung der Proben zu erzielen.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Lichtmikroskopie

Die Proben der Patienten wurden im Durchlichtmikroskop (Leica DM LB, LEICA, Wetzlar) untersucht. Bei diesem Mikroskop wird das Präparat von unten mit Licht durchstrahlt, bevor das Bild vom Objektiv aufgefangen wird. Gelegentlich war es jedoch notwendig, die Zellen in den Kulturflaschen zu untersuchen, z.B. um zu kontrollieren, ob sie ausreichend konfluent waren. Hierfür war das Durchlichtmikroskop aufgrund des geringen Arbeitsabstandes zwischen Objektiv und Objekttisch ungeeignet. Daher musste für die Untersuchung der Zellen in den Flaschen das Inversmikroskop (Axiovert 10, ZEISS, Jena) verwendet werden. Im Gegensatz zum Durchlichtmikroskop wird bei dem Umkehrmikroskop die Probe aus der Richtung des Objektivs beleuchtet. Die gewünschte Vergrößerung des Bildes kann bei beiden Mikroskoparten durch die Auswahl des Objektivs zwischen 10x, 40x, 60x oder 100x und durch den Vergrößerungsfaktor der Okulare (8, 10 oder 12x) variiert werden.

Probenvorbereitung

Die in Paraffin eingebetteten Patientenproben wurden mit einem Mikrotom (Leica, Wetzlar) in 2 µm dünne Scheiben geschnitten und in ein Wasserbad gelegt. Von dort mussten die Schnitte auf einen beschichteten Objekträger überführt und getrocknet werden. Danach erfolgte die Einfärbung der Schnitte mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.) bzw. mit der Eisenfärbung (Berliner Blau). Für die Eisenfärbung nach Berliner Blau wurden Kaliumferrocyanid und Salzsäure sowie Kernechtrot verwendet. Zur Herstellung der H.-E.-Färbung wurden Hämalaun, Natriumiodad, Aluminiumkaliumsulfat, Essigsäure und Eosin eingesetzt. Nach dem Trocknen wurden Deckgläschchen auf die einzelnen Schnitte gebracht und mit Einschlusslack befestigt, um das Präparat dauerhaft zu versiegeln.

3.4.2 Elektronenmikroskopie

3.4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM) und energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX)

Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) bietet die Möglichkeit, die Oberflächenstruktur von Objekten im Nanometerbereich zu untersuchen. Dabei wird ein Elektronenstrahl erzeugt und über Magnetspulen abgelenkt. Die Probe wird an der Oberfläche nacheinander von dem Elektronenstrahl abgerastert. Dabei werden die Oberflächenatome in Schwingung versetzt und senden ihrerseits Sekundärelektronen ab, die aufgenommen und gebündelt werden, damit auf einem Bildschirm ein Abbild erzeugt werden kann. Durch die unterschiedliche Topographie der Proben treffen die ausgestrahlten Elektronen (Sekundärelektronen) in einem bestimmten Winkel auf den Detektor. Von dem Einfallswinkel ist die Ausbeute der Sekundärelektronen abhängig. Je höher die Ausbeute ist, desto mehr Energie wird detektiert. Demzufolge sind einige Stellen heller als andere, und auf dem Monitor des REM entsteht der Eindruck eines räumlichen Bildes.

Prinzip der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse

Die energiedispersive Röntgenanalyse (EDX = energy dispersive X-ray analysis) wird durchgeführt, um mit Hilfe von Röntgenstrahlung die qualitative und quantitative Zusammensetzung bestimmter Elemente in einer Probe zu analysieren. Hierbei wird ein Elektronenstrahl auf die zu untersuchende Probe gerichtet. Dadurch werden elementspezifisch Röntgenquanten aus den angeregten Atomen freigesetzt. Die entstandene Elektronenlücke in einer inneren Schale wird durch Elektronen mit höherer Energie aus den äußeren Schalen wieder aufgefüllt. Dabei kommt es zur Abstrahlung einer Energiedifferenz, die der Energie der Röntgenstrahlung entspricht und analysiert werden kann. Die austretende Röntgenstrahlung wird über einen entsprechenden EDX-Detektor aufgezeichnet. Für jedes Element ist eine bestimmte Energie menge charakteristisch. Im EDX-Spektrum werden dann die Peaks der einzelnen Elemente erfasst.

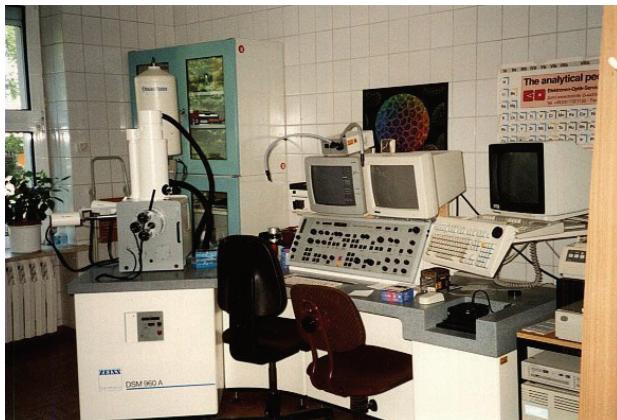


Abb. 18:
Rasterelektronenmikroskop der Universität Rostock. Elektronenmikroskopisches Zentrum.

Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie mussten die Zellen zunächst eine Stunde mit 4-prozentiger Glutaraldehyd-Lösung (verdünnt mit einem einmolaren Natriumphosphatpuffer) fixiert werden. Nach dem Spülen mit Natriumphosphatpuffer wurden sie mit gepuffertem, ein Prozentigem Osmiumtetroxid für 30 Minuten fixiert. Anschließend mussten die Zellen nochmals gewaschen und in einer aufsteigenden Acetonreihe (30 bis 100 %) dehydriert werden. Danach wurden die Zellen im Critical Point Dryer K850 (EMI-TECH, Ashford, England) getrocknet, auf spezielle Objektträger appliziert und in einem Spezialbedampfungsgerät (Sputter Coater SCD004, BAL-TEC, Lichtenstein) in einer Argonatmosphäre mit feinem Goldüberzug beschichtet. Der Goldüberzug ist notwendig, um die Leitfähigkeit des Präparates für die Elektronen zu verbessern. Andernfalls würde sich die Probe elektrisch aufladen, so dass nur weiße Bilder aufgenommen werden und eine Analyse nicht möglich wäre.

Zur Analyse der in Paraffin eingebetteten Gewebeproben der Patienten wurden zunächst mit einem Mikrotom Paraffinschnitte von 5 bis 10 µm angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Danach erfolgte eine Entparaffinierung zunächst dreimal mit reinem Xylol und dann mit einer absteigenden Ethanolverdünnungsreihe (3x 99 %; 1x 96 %; 1x 70 %; 1x 50 %). Anschließend mussten die Objektträger mit den Paraffinschnitten dreimal für 5 Minuten mit 50-prozentigem Ethanol gewaschen und schließlich in Wasser gespült werden. Nach dem Trocknen konnten die Proben für die Untersuchung mit Gold beschichtet und mit dem Rasterelektronenmikroskop DSM 960A (Zeiss, Oberkochen), wie in **Abb. 18** dargestellt, untersucht werden.

3.4.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Elementanalyse (EELS)

Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Abbildung des Objektes im Transmissionselektronenmikroskop (TEM), wie in **Abb. 19** dargestellt, wird eine Elektronenquelle verwendet. Durch das TEM wird es möglich, z.B. die innere zelluläre Struktur zu untersuchen. Bei der TEM wird das Präparat mit Elektronen durchstrahlt. Dazu wird innerhalb des Mikroskops ein Vakuum erzeugt, um einen zielgerichteten Elektronenstrahl zu gewährleisten. Die Elektronen werden von einer Kathode erzeugt und mit einer Hochspannung beschleunigt. Magnetspulen bzw. elektrische Linsen bündeln den Elektronenstrahl, der die Probe durchdringt und dann auf einen Leuchtschirm trifft. Über elektromagnetische Linsen können hohe Vergrößerungen erzeugt werden. Mit Hilfe eines Leuchtschirmes wird das Bild sichtbar gemacht und kann bei Bedarf mit einer Kamera oder einer Fotoplatte aufgenommen werden.

Prinzip der Elementanalyse

Um einzelne Elemente in der Probe bestimmen zu können, wird die so genannte Elektronen-Energieverlustspektroskopie (EELS) durchgeführt. Dabei treffen alle Elektronen mit gleicher Energie auf das Objekt. Beim Durchtritt durch das Präparat entsteht jedoch ein Energieverlust, der von der chemischen Zusammensetzung des Präparates abhängig ist. Über ein spezielles Prisma wird der Elektronenstrahl in seine einzelnen energetischen Anteile gespalten. Die Elektronen, die in dem zu untersuchenden Objekt besonders interessant sind, können über eine Blende durch den Elektronenverlust aussortiert werden, um ein Bild zu erzeugen, das mit der entsprechenden Elementverteilung übereinstimmt. Die Ladungen der einzelnen Elemente (vgl. Anhang 3) können aus Tabellen abgelesen werden. Mit Standardkurven kann man den Verlauf bzw. die Übereinstimmung der gemessenen Elemente ermitteln.



Abb. 19:
Transmissionselektronenmikroskop der Universität Rostock. Elektronenmikroskopisches Zentrum.

Probenvorbereitung

Um die 3T3-Zellen im Elektronenmikroskop auf ihre Ultrastruktur zu untersuchen, wurden sie zunächst mit 4-prozentigem Glutaraldehyd fixiert und dann im Kühlenschrank für 2 bis 24 Stunden inkubiert. Dann wurden die Präparate mit einprozentigem Osmiumtetroxid nachfixiert, in einer aufsteigenden Acetonreihe (30 bis 100 %) entwässert und anschließend über Aceton-Epoxidharzgemische in Durcapan Araldite Base Embedding ACM (Araldite casting resin M) eingebettet. Zur Polymerisierung des Epoxidharzes mussten die Präparate im Brutschrank für 48 Stunden bei 58 bis 60 °C aufbewahrt werden. Um Ultradünnschnitte herzustellen, wurden die gewönenen Zellblöcke mit Hilfe einer Rasierklinge pyramidenförmig zugespitzt. Mit einem Diamantmesser wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 50 nm angefertigt und auf Kupfernetze (Grids) aufgezogen. Danach erfolgte die Kontrastierung der Schnitte durch Applikation von je einem Tropfen Uranylacetat und Bleizitrat (zusammengesetzt aus Bleinitrat, Natriumhydroxid, Natriumzitrat) mit einer jeweils anschließenden Inkubation von 10 Minuten.

Um die Patientenproben mit dem in **Abb. 19** gezeigten Transmissionselektronenmikroskop EM 902A (Zeiss, Oberkochen) zu betrachten, wurden von den Präparaten Ultradünnschnitte angefertigt, diese auf die Kupfernetze gezogen und durch Applikation von je einem Tropfen Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert.

3.5 Ermittlung der Zytotoxizität mit Trypan Blau-Färbung

Prinzip:

Trypan Blau ist ein pH-abhängiger Farbstoff mit sauren Eigenschaften. Er wirkt als Anion und kann Proteine leicht binden. Der pH-Bereich ist ziemlich eng begrenzt, ei-

Material und Methoden

ne maximale Aufnahme von Trypan Blau erfolgt bei einem pH-Wert von 7,5. Zudem sollte sich im Medium keine Serumsubstanz mehr befinden, da sich mit steigender Serumkonzentration die Anzahl gefärbter Zellen vermindert. Dies würde eine Lebensfähigkeit der Zellen vortäuschen. Der Trypan Blau-Färbetest wird angewendet zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen vitalen und apoptotischen Zellen. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf und bleiben weiß. Da es bei apoptotischen Zellen zu einer Zerstörung der Membran kommt, kann der Farbstoff in die Zellen eindringen und färbt das Zytoplasma blau. Weil Trypan Blau ein zytotoxischer Farbstoff ist und ein Absterben vitaler Zellen bewirkt, müssen die Zellen innerhalb kürzester Zeit ausgezählt werden. Andernfalls kommt es zu einem Anstieg der als tot gezählten (apoptotischen oder nekrotischen) Zellen.

Vorbereitung:

Für das Experiment wurden ca. 400 000 Zellen/12,5 cm² Kulturflasche eingesät und 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Exposition gegenüber den Faser- und Partikelproben (0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200 µg/cm²) über einen definierten Zeitraum (24; 48; 72 Stunden). Damit nach der Exposition ein Absinken der Partikel auf den Zellrasen gewährleistet werden konnte, wurden die Zellen auf einen im Inkubator befindlichen Kleinschüttler (IKA-VIBRAX, Staufen) mit sehr geringer Bewegungsstufe gestellt.

Durchführung:

Die Zellen wurden, wie bereits unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben, für die Trypsinierung vorbereitet. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen wurden sie in PBS aufgenommen und gut resuspendiert. Ein Verhältnis von 500 µl Zellsuspension und 500 µl Trypan Blau wurde gemischt. Im Anschluss daran mussten die Zellen für 4 Minuten im Brutschrank inkubiert werden. Danach erfolgte das Auszählen der Zellen im Hämozytometer. Lebende Zellen blieben weiß, tote Zellen wurden blau angefärbt, wobei auch nur schwach blau gefärbte Zellen als tot betrachtet wurden. Bei 10-facher Vergrößerung erfolgte das Auszählen von 4 Großquadranten. Der Prozentsatz an lebenden Zellen wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte + gefärbte Zellen}} \times 100$$

Aus den vier Ergebnissen wird der Mittelwert gebildet.

3.6 Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen

Sauerstoffradikale sind hochreaktive und sehr kurzlebige, instabile Verbindungen, die eine Zellschädigung hervorrufen können.

Prinzip:

Zum fluorimetrischen Nachweis der Bildung von ROS wurde der Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) verwendet. In der Zelle wird durch ROS das nicht fluoreszierende Molekül H_2DCF zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Das Oxidationsprodukt DCF besitzt ein konjugiertes π -System, das durch Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 485$ nm zur Fluoreszenz angeregt und somit in einem Fluoreszenzspektrometer gemessen werden kann. Damit H_2DCF die Zellmembran besser überwinden kann, wird es als 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat ($H_2DCF\text{-DA}$) eingesetzt. In der Zelle spalten Esterasen die Esterbindung zu Acetat und H_2DCF , so dass der hydrophilere Farbstoff nun in seiner reduzierten, nichtfluoreszenten Form vorliegt.

Durchführung:

Zunächst ist die Messung standardisiert worden (vgl. Anhang 5). Für das Experiment musste von dem Farbstoff eine Stammlösung hergestellt werden, indem 1,2 mg $H_2DCF\text{-DA}$ in 25 μl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurden. Um das Endvolumen der Stammlösung zu erhalten, wurden die 25 μl DMSO mit 25 ml PBS verdünnt, was einer $H_2DCF\text{-DA}$ -Konzentration von 100 μM entspricht. Als Arbeitslösung wurde eine Verdünnung von 1:10 verwendet (vgl. Anhang 2.4).

In eine Multiwellplatte mit 24 Wells wurden 200 000 Zellen pro Platte ausgesät. Dann wurden je 2 ml DMEM in jedes Well hinzugegeben und die Zellen anschließend für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und eine definierte Menge an Asbestfasern (Krokydolith) und Partikeln (Titandioxid, Toner, Carbon black) wurde zu den Zellen gegeben. Im Fall des Experimentes waren es 5 μg Partikel/cm². Die Exposition erfolgte über die Zeiträume von 15, 30 und 45 Minuten sowie 1, 3, 6 und 12 Stunden. Im Inkubator wurden die Platten auf den Kleinschüttler gestellt, um das Absinken der Partikel zu erleichtern. Nach Ablauf der Zeit mussten die Zellen einmal mit PBS gewaschen werden. In jedes Well wurden 500 μl (10 μM) des vorbereiteten $H_2DCF\text{-DA}$ gegeben, der Farbstoff in den Platten belassen und die

Platte für 20 Minuten zurück in den Brutschrank gestellt. Nach dem Entfernen der Farbstofflösung wurden die Zellen noch einmal mit 500 µl PBS gespült. Anschließend wurden erneut 200 µl PBS hinzugefügt und die Zellen kräftig gelöst. Hatte sich ein Großteil der Zellen vom Boden der Wells abgelöst, konnte die Mischung aus der Farbstofflösung und den Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und diese bei 220 x g für 5 Minuten zentrifugiert werden. Im Anschluss wurde der restliche Farbstoff entfernt, die Zellen mit 500 µl PBS resuspendiert, noch einmal zentrifugiert und das Pellet mit 200 µl PBS erneut resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 96 Mikrotitierplatten pipettiert und die Fluoreszenz mit dem Microplattenleser GENios mit dem Programm XFLUOR4 Version: V 4.51 (TECAN, Crailsheim) gemessen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Erregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm. Da der Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist, sollte beim Arbeiten direkter Lichteinfall vermieden werden.

3.7 Apoptosemessung mittels FACS-Analyse

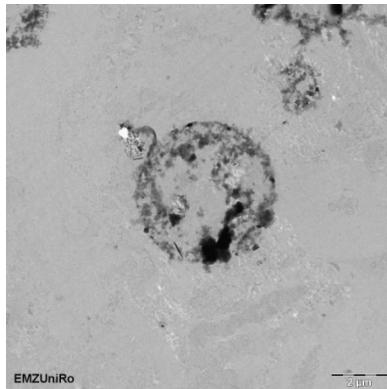


Abb. 20:
Apoptotische Zelle im Stadium der Kondensation und Schrumpfung (Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des 3. Patientenbeispiels). Vergrößerung: 450x.

Die Durchfluszytometrie kann die relative Zellgröße, Granularität und drei verschiedene Fluoreszenzfarben bei mehr als zehntausend Zellen in weniger als einer Minute bestimmen [Raffael, 1988]. Voraussetzung für die Analyse mit einem Durchfluszytometer ist, dass die Probe als Einzelzellsuspension vorliegt. Die Zellen werden vor der Untersuchung mit Annexin V gefärbt. Damit die Zellen im Durchfluszytometer gemessen werden können, ist an das Annexin V der Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) gebunden.

Jede Zelle besteht aus einer Doppelmembran, die sich aus Lipiden und Proteinen zusammensetzt. Den Hauptbestandteil der Lipide bilden die Phospholipide, wozu u.a. das Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin (PS) gezählt werden. In lebenden

Material und Methoden

Zellen ist das Phosphatidylcholin zum überwiegenden Teil nur auf der äußeren Seite der Zellmembran, das PS nur auf der Innenseite der Membran zu finden [van Engeland et al., 1998]. Setzt die Apoptose ein, kommt es zu einer Kondensation und Schrumpfung der Zelle mit Auflösung der Zellmembran, wie es in **Abb. 20** dargestellt ist. Zu Beginn der Apoptose wird das PS auf die Außenseite der Zellmembran, in **Abb. 21** veranschaulicht, verlagert. Zum Nachweis der Apoptose kann man Annexin V verwenden. Dieses Protein bindet, in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen, spezifisch an PS.

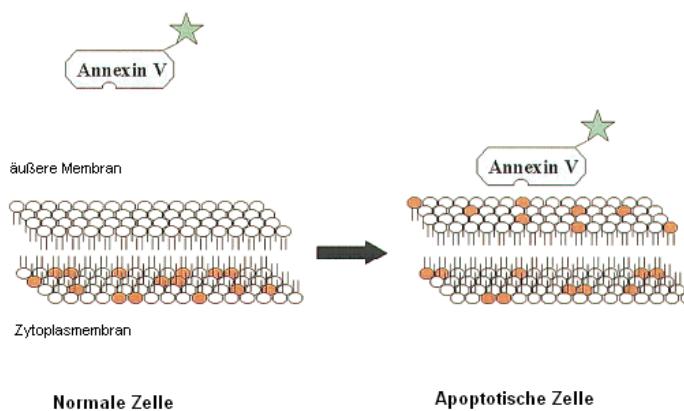


Abb. 21:
Schematische Darstellung der Bindung von Annexin V-FITC an Phosphatidylserin (hier orange markiert) bei einer apoptotischen Zelle [nach van Engeland et al., 1998].

Da an das Annexin V der Fluoreszenzfarbstoff FITC gebunden ist, können die apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden.

Um frühapoptotische von spätapoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, muss gleichzeitig eine Färbung mit Propidiumjodid (PI) und Annexin V erfolgen. Werden die Zellen nekrotisch, wird die Membran durchlässig, das PI dringt in die Zellen ein und färbt deren DNA. Somit kann auch das Annexin V in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Zellen binden. Zellen, die sich im Frühstadium der Apoptose befinden, werden nur mit Annexin V positiv angefärbt. Befindet sich die Zelle bereits im Stadium der späten Apoptose, wird sie sowohl mit Annexin V als auch mit PI gefärbt. Nekrotische Zellen werden überwiegend mit PI gefärbt und sind erscheinen Annexin V-negativ, da das Annexin V-FITC Signal gegenüber dem roten PI-Signal deutlich abgeschwächt ist (vgl. auch **Abb. 23**) [Vermes et al., 1995].

Probenvorbereitung

Je 300 000 Zellen wurden in 12,5 cm² große Kulturflaschen eingesät und 24 Stunden inkubiert. Die Exposition der Zellen erfolgte gegenüber den Substanzen Krokydolith,

Material und Methoden

Toner, Carbon black und Titandioxid mit einer Konzentration von 10 µg/cm² sowie Chrysotil mit einer Konzentration von 5 µg/cm².

Als Positivkontrolle bei der Apoptosemessung wurde das Zytostatikum Cisplatin (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet mit einer Konzentration von 100 µM je 12,5 cm² Kulturflasche [Berechnung im Anhang 2.2].

Die Fasern und Partikel wurden 24 Stunden auf den Zellen belassen, während die Kulturflaschen im Inkubator auf dem Kleinschüttler standen. Danach mussten die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und eine Zellsuspension mit PBS hergestellt werden. Da für die Durchflusszytometrie nicht mehr als 100 000 Zellen benötigt wurden, mussten die Zellen im Hämozytometer gezählt werden. Die Zellsuspension wurde in Röhrchen, die sich speziell für die Analyse in der Durchflusszytometrie eignen, überführt und für 5 Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl eiskaltem Bindungspuffer resuspendiert [zur Herstellung des Bindungspuffers vgl. Anhang 2.5]. Nach der Zugabe von 5 µl der Annexin V-FITC-Lösung zur Zellsuspension inkubierten die Zellen 10 Minuten im Dunkeln. Danach mussten 2,5 µl des PI zur Zellsuspension hinzugefügt, die Lösung vorsichtig gemischt und erneut für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert werden. Die Inkubation der Zellen mit Annexin V und PI sollte auf Eis erfolgen, um weitere Reaktionen zu verhindern. Im Anschluss wurden 400 µl des eiskalten Bindungspuffers zu den Präparaten hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Innerhalb von 30 Minuten mussten die Zellpräparate mit der Durchflusszytometrie analysiert werden [vgl. Anhang 2.5]. Die Analyse der Messwerte erfolgte mit dem Programm „Expo 32 ADC XL 4 Color“.

Ablauf der FACS – Analyse

Für die Untersuchungen wurde ein FACSScan® -Gerät der Firma Beckman Coulter (Coulter Epics XL MCL, Coulter Corporation, Miami, USA) verwendet. Die Abkürzung FACS bedeutet Fluorescence Activated Cell Sorting oder auch Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer. Das Prinzip der FACS-Analyse wird in **Abb. 22** dargestellt.

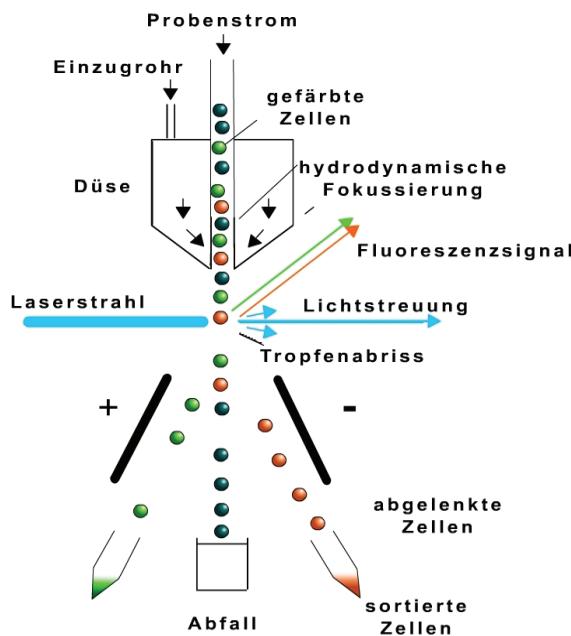


Abb. 22:

Prinzip der FACS-Analyse:
Die Zellen erreichen den Analysepunkt. Über einen Laserstrahl werden die fluoreszenzgefärbten einzelnen Zellen angeregt. Die von der Zelle ausgesendeten Lichtsignale werden über Detektoren empfangen und gemessen [nach <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>].

Die gefärbte Zellsuspension in den FACS-Röhrchen wird in das Gerät eingesetzt. Durch Überdruck gelangen die Zellen über eine Stahlkapillare in die Messküvette. In der Messkammer werden die Zellen stark beschleunigt, wodurch sich die einzelnen Aggregate auftrennen und den Analysepunkt erreichen (hydrodynamische Fokussierung). Gleichzeitig werden die Zellen durch einen luftgekühlten Argonionenlaserstrahl zur Fluoreszenz angeregt. Dieser erzeugt Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm. Ein Durchflusszytometer kann bis zu 5 Eigenschaften (2 Lichtstreuungen und 3 Fluoreszenzen) messen. Diese von der Zelle ausgesendeten Signale werden von Detektoren empfangen und über elektronische Schaltungen gemessen und quantifiziert. Das Setzen eines Filters, auch als Gate bezeichnet, lässt nur Zellen mit einer bestimmten Parameterkombination zu, z.B. die Streulichteigenschaften Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Andere Parameter wie z.B. Staubkörnchen oder Zelltrümmer werden dadurch ausgeschlossen. Die Werte werden dann als „Dot-Plot“ (korrelierte Zweiparameterdarstellung), wie in **Abb. 23** verdeutlicht, oder als Histogramm (Häufigkeitsverteilung), wie in **Abb. 24** erkennbar, dargestellt.

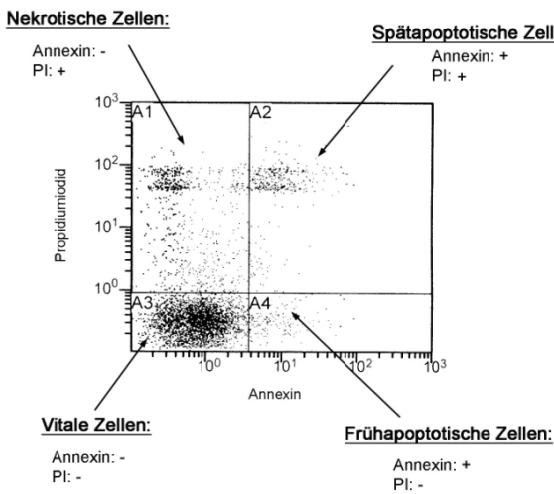


Abb. 23:

Allgemeine Aufnahme eines „Dot-Plot“ nach der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V- und PI-gefärbten, in den eigenen Experimenten verwendeten, 3T3-Zellen.

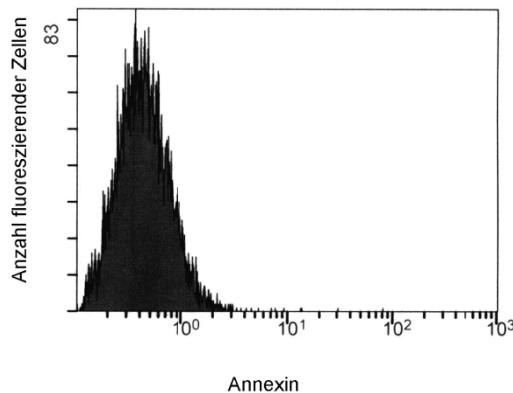


Abb. 24:

Allgemeine Darstellung Annexin V-gefärbter 3T3-Zellen in einem Histogramm nach der durchflusszytometrischen Analyse. Die Abszisse stellt die Fluoreszenz der Zellen dar. Die Ordinate kennzeichnet die Anzahl der Zellen.

In dem „Dot-Plot“ (**Abb. 23**) werden 2 Parameter miteinander korreliert. Die Intensität der beiden gemessenen Parameter wird für jede Zelle in dem Diagramm aufgetragen, so dass für jede Subpopulation ein charakteristisches Muster entsteht.

In dem Histogramm (**Abb. 24**) werden die Fluoreszenz auf der Abszisse und die Anzahl der Zellen auf der Ordinate dargestellt.

3.8 Statistische Auswertung

Der Trypan Blau-Färbetest (vgl. Abschnitt 2.5) wurde in drei separaten Versuchen durchgeführt. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit dem Hämozytometer, wobei pro erhaltene Zellmenge jeweils vier Werte (vier große Quadranten) je Kulturflasche ausgezählt wurden.

Aus den erhaltenen Werten wurde der arithmetische Mittelwert sowie die entsprechende Standardabweichung berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test.

Die Messung der reaktiven Sauerstoffverbindungen (vgl. Abschnitt 2.6) wurde in zwei separaten Versuchen mit jeweils vierfacher Messreihe durchgeführt. Von den erhaltenen Werten wurde auch hier der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung errechnet. Durch Abzug der Kontrollwerte von den Versuchsergebnissen konnten bereinigte Messwerte erstellt werden.

Die gewonnenen Rohdaten der einzelnen Versuche waren sowohl innerhalb der Zeitabschnitte als auch untereinander, aufgrund einer starken Streuung der einzelnen Messwerte, nicht vergleichbar. Daher wurde die Kontrolle auf 100 gesetzt und die einzelnen Werte über ein Verhältnis darauf bezogen. Dadurch entstanden untereinander vergleichbare Werte. Um die statistische Signifikanz mit dem t-Test zu bestimmen, mussten beide Versuchsdurchführungen separat berechnet werden.

Die Apoptosemessung wurde in zwei separaten Versuchsansätzen mit doppelter Messreihe durchgeführt. Die genaue Versuchsdurchführung wurde unter Abschnitt 2.7 beschrieben. Aus den Ergebnissen der Messreihen wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenmaterial

4.1.1 Analyse des Ersten Falls

Die Präparate stammten von einem 59-jährigen männlichen Patienten. Er wurde 1905 geboren und verstarb 1964. Aus dem Obduktionsbericht ging hervor, dass der Patient ein Jahr vor seinem Tod an einer Dyspnoe litt, welche sich zunehmend verschlechterte. Am Tag vor dem Tod des Patienten trat eine hochgradige Zyanose und Dyspnoe auf, an deren Folgen er verstarb. Zu Lebzeiten arbeitete der Patient bis etwa zum 30. Lebensjahr als Fliesenarbeiter. Dabei war er möglicherweise bei der Herstellung von Fliesen und asbesthaltigem Fliesenfugenmaterial gegenüber hohen Konzentrationen von Asbest ausgesetzt. Anschließend arbeitete er in einer Spirituosenfabrik. Es ist jedoch nicht bekannt, welcher Tätigkeit er in dieser Fabrik nachgegangen ist. Bei dem Patienten wurde 13 Jahre vor dem Tod eine Silikose der Lunge diagnostiziert. Aus dem pathologischen Bericht geht nicht hervor, ob der Patient Raucher oder Nichtraucher war. In dem Bericht wurde jedoch über eine häufige Teilnahme des Patienten an Heilverfahren in Rehabilitationskliniken für Lungenerkrankungen berichtet.

Mikroskopische Auswertung

Zur Untersuchung des Patienten standen Sektionspräparate der Lunge zur Verfügung. Um einen Überblick über die Lungenstruktur und ihrer pathologischen Beschaffenheit zu bekommen, wurden zunächst lichtmikroskopische Schnitte (vgl. Abschnitt 3.4.1) angefertigt und diese über die Berliner Blau- bzw. H.-E.-Färbung angefärbt. Beide Schnitte wurden im Lichtmikroskop untersucht, jedoch nur mit der Berliner Blau-Färbung ließen sich Asbestkörperchen bzw. Asbestfasern darstellen.

Lichtmikroskopie

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen (**Abb. 25 bis 31 sowie 32a und 33a**) ist Lungengewebe abgebildet. Dieses ist an der typischen feinen Struktur der Lunge zu erkennen. Besonders gut sind die alveolären Epithelzellen in **Abb. 25** dargestellt. Die Alveolen zeigen durch fibrotische Umbauvorgänge (Narbengewebe) nicht mehr den charakteristischen Aufbau. Diese starken Verdichtungen des Lungengewebes sind

Ergebnisse

besonders gut in **Abb. 28** und **32a** zu sehen. Einer der typischen Bronchioli terminales ist nur in **Abb. 33a** sichtbar.

Das gesamte Lungengewebe des Patienten ist durch fibrotische Narben gekennzeichnet. Diese Narben könnten durch die hohe Anzahl von Asbestfasern, die sich im gesamten Lungengewebe darstellen lassen, verursacht worden sein. Als Folge der Fibrose und der damit verbundenen Minderbelüftung der einzelnen Lungenabschnitte ist die Anzahl der Alveolen insgesamt vermindert, und es haben sich emphysemartige Aufweitungen (**Abb. 28** und **32a**) gebildet. In den Alveolen zeichnen sich entzündliche Infiltrate ab, bestehend aus Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen sowie Histozyten und es sind starke Schleimansammlungen zu sehen. Darüber hinaus finden sich, neben den Erythrozyten in den Gefäßquerschnitten, Hinweise auf Erythrozytenansammlungen im Alveolarraum und im Bindegewebe (Matrix).

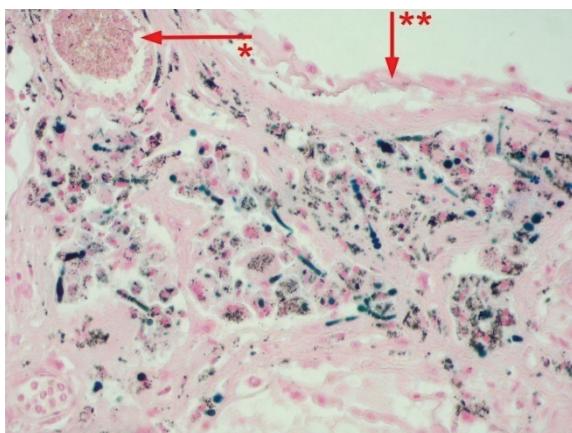


Abb. 25:
Übersichtsaufnahme, in der zahlreiche Ansammlungen von Asbestfasern zu sehen sind. Die Pfeile weisen auf einen Gefäßquerschnitt (*→) mit Erythrozyten bzw. auf alveolare Epithelzellen (**→) hin. 80fache Vergrößerung.

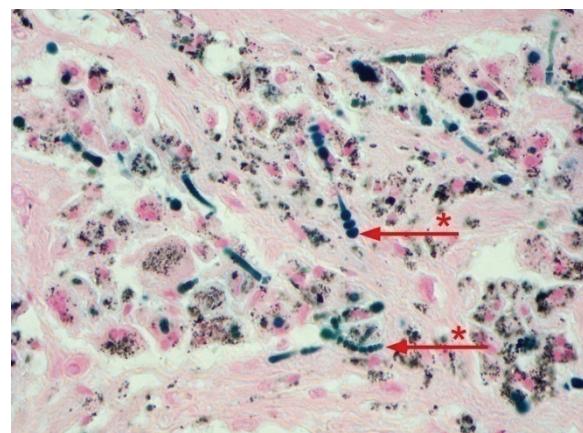


Abb. 26:
Quersegmentierungen (*→) der Proteinhüllen der Asbestfasern. 125fache Vergrößerung.

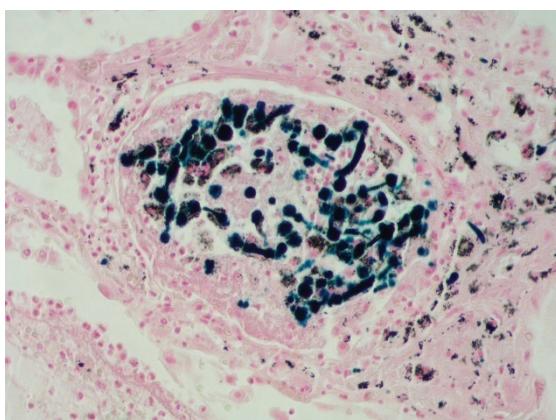


Abb. 27:
Ansammlung von Partikeln, Fasern und Entzündungszellen. Diese Ansammlung wird abgegrenzt durch eine Umkapselung. 80fache Vergrößerung.

Ergebnisse

Die Asbestfasern liegen in der Lunge überwiegend in Form von Asbestkörperchen vor. Die Asbestkörperchen werden im Englischen als „asbestos bodies“ bezeichnet. Sie stellen die umhüllte Form der Asbestfaser dar. Die Faser ist der zentrale Bestandteil dieses Körperchens und wird von Ferroproteinen (Transferrin) umhüllt. Die Umwandlung findet im Körper vor allem in den Makrophagen statt und ist eine lokale Reaktion. Charakteristisch für die Asbestkörperchen ist die Hantelform, bei der die Enden verdickt sind. Die Proteinhülle um die Zentralfaser ist in Quersegmente unterteilt. Die durchschnittliche Länge der Fasern liegt bei 30 bis 50 µm.

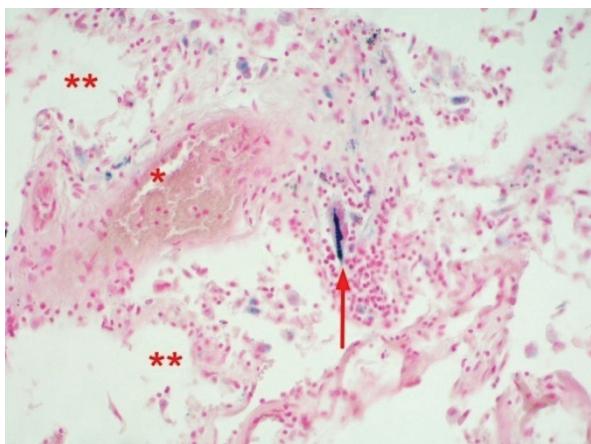


Abb. 28:

Unvollständige Phagozytose einer Asbestfaser durch einen Makrophagen (→). Das untere Faserende liegt noch außerhalb. Um den Makrophagen befinden sich Ansammlungen von Entzündungszellen und Erythrozyten sowie Narben-gewebe (*) und emphysemartige Aufweitungen (**). 100fache Vergrößerung.

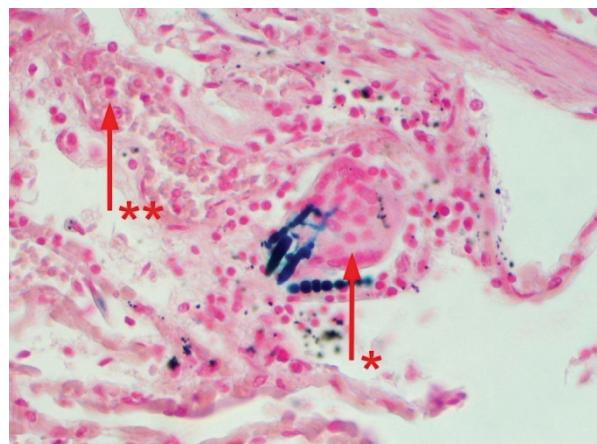


Abb. 29:

Mehrkernige Riesenzelle (→) bei der Phagozytose von 3 Asbestfasern. Starke Infiltration bestehend aus Granulozyten, Lymphozyten, Histiozyten (→). 130fache Vergrößerung.

Mit Hilfe der Berliner Blau-Färbung lassen sich in der Übersicht (**Abb. 25**) reichlich Ansammlungen von Asbestkörperchen mit ihrer typischen Hantelform und der Segmentierung erkennen, die noch deutlicher in den Vergrößerungsaufnahmen zu erfassen sind (**Abb. 26, 27, 29**). Darüber hinaus stellen sich auch Asbestfasern ohne Proteinmantel dar (**Abb. 28, 30**). Sie sind gekennzeichnet durch ihre lanzettenartige Form. Des Weiteren sind in den **Abb. 28** und **29** Makrophagen bzw. mehrkernige Riesenzellen zu erkennen, die die Asbestfasern nur unvollständig phagozytiert haben. Zusätzlich zu den Asbestansammlungen zeigen sich in den **Abb. 25, 26, 30, 31** und **33a** zahlreiche Ablagerungen nicht gefärbter schwarzer Partikel. Bei diesen Partikelablagerungen könnte es sich um Kohlenstoffablagerungen handeln. Einerseits könnten diese Ablagerungen einen Hinweis darauf geben, dass der Patient Raucher

war. Andererseits kommen meist in allen Lungen älterer Menschen zusätzlich Anreicherungen von Gesteinsstaub und Kohlenstaubpartikel vor, was auch als Anthrakose bezeichnet wird.

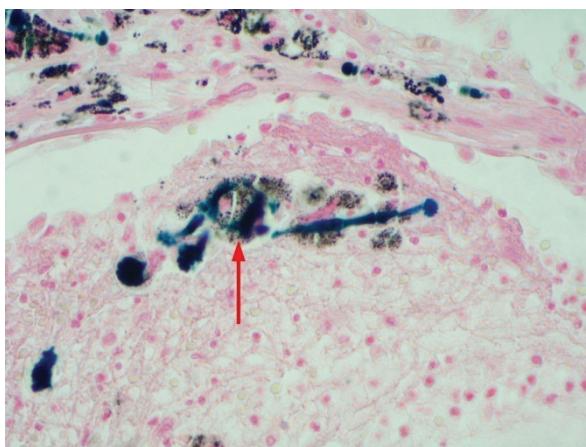


Abb. 30:
Makrophage (→) mit phagozytierten Asbestfasern und zahlreichen schwarzen Partikeln. 130fache Vergrößerung.



Abb. 31:
Makrophagen (→) mit phagozytierten schwarzen Partikeln. Rechts daneben teilweise umhüllte Asbestfaser mit trommelschlägelartiger Form (*). 125fache Vergrößerung.

Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen konnte keine Aussage über die mögliche Zusammensetzung dieser schwarzen Partikel getroffen werden. Um darüber hinaus die Elementzusammensetzung der Fasern im Gewebe zu analysieren, wurden die Proben sowohl im Raster- als auch im Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

Elementanalyse mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Um eine Elementanalyse mit der REM zu erhalten, wurden die in **Abb. 32a** und **33a** dargestellten Präparate untersucht. Da mit der REM keine gute bildliche Darstellung wie mit der Lichtmikroskopie möglich ist, wurden zur Veranschaulichung der untersuchten Präparate die lichtmikroskopischen Bilder aufgezeigt. Um diese lichtmikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe der REM untersuchen zu können, musste bei der Anfertigung der Präparate auf Objektträgern (vgl. Abschnitt 3.4.1) auf die Deckgläschchen verzichtet werden.

Die Untersuchung wurde sowohl an einem Präparat des rechten Lungenmittellappens (re. LML) als auch des linken Lungenunterlappens (li. LUL) durchgeführt.

Im li. LUL (**Abb. 32a**) stellen sich zahlreiche Ablagerungen von Asbestfasern dar. Im re. LML (**Abb. 33a**) sind die Asbestansammlungen nicht so zahlreich ausgeprägt. Dafür sind im re. LML Akkumulationen schwarzer Partikel zu erkennen, bei denen es

Ergebnisse

sich, anhand der Elementanalyse (**Abb. 33b**) verdeutlicht, um Kohlenstoff handelt. Diese Kohlenstoffablagerungen geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass der Patient Raucher gewesen ist oder anderen Kohlenstaubquellen ausgesetzt war (z.B. Heizungsmaterial, Rauch von Holz- und Kohlefeuern). Zum Vergleich der Messergebnisse aus li. LUL und re. LML wurden die Analysen nacheinander aufgeführt.

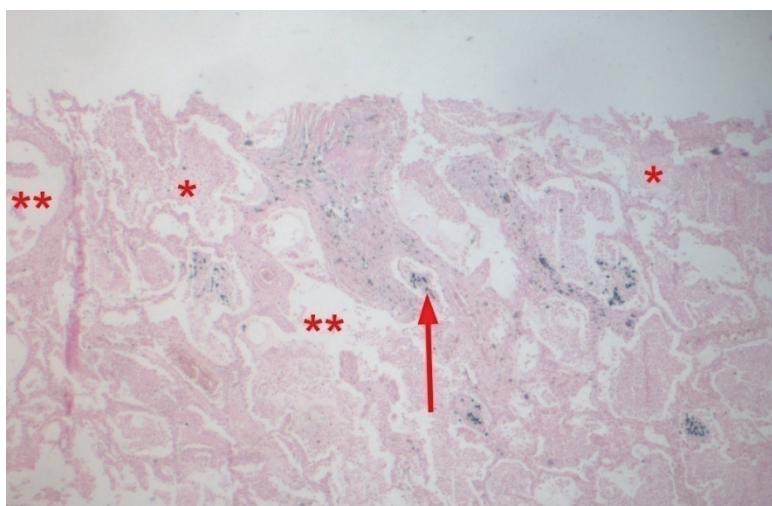


Abb. 32a: Lichtmikroskopische Darstellung aus dem linken Lungenunterlappen (li. LUL). Alveolen sind nicht mehr erkennbar. Sie sind durchsetzt mit Entzündungszellen und Narbengewebe (*) sowie emphysemartigen (**) Aufweiterungen. Reichliche Ansammlungen von Asbestkörperchen und Asbestfasern (→). Übersichtsaufnahme mit 10facher Vergrößerung.

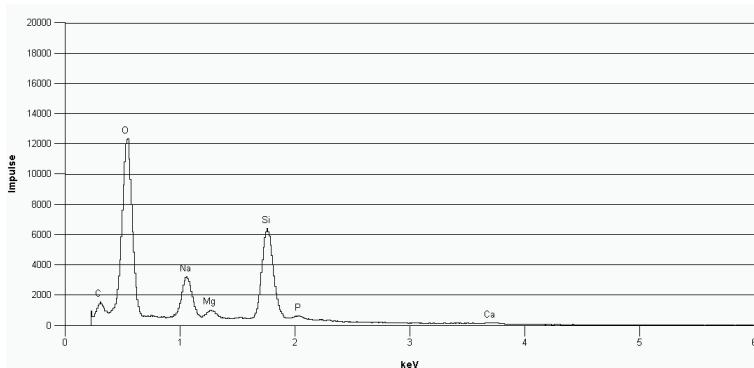


Abb. 32b: Die EDX-Messung des lichtmikroskopischen Präparates des li. LUL aus Abb. 32a mit erhöhten Peaks für Natrium, Magnesium, Silizium.

Die Messung im Rasterelektronenmikroskop wurde bei einer Beschleunigungsspannung von 10 keV durchgeführt. Bei der REM-Untersuchung konnten erhöhte Peaks für Natrium (Na), Magnesium (Mg), Silizium (Si) und Phosphor (P) ermittelt werden (vgl. **Abb. 32b** und **Abb. 33b**). Darüber hinaus zeigten sich ein deutlicher Peak für Kohlenstoff (C) und nur ein minimaler Anteil an Calcium (Ca). Der Sauerstoffanteil ist im Vergleich zu allen anderen Elementen deutlich erhöht.

Calcium kann zu geringen Anteilen im Lungengewebe vorkommen. Die Anteile an Phosphor und Magnesium können durch Verunreinigungen der Asbestfasern bedingt worden sein. Die stark erhöhten Peaks für Silizium und Natrium geben bereits Hinweise darauf, dass es sich bei den dargestellten Fasern wahrscheinlich um Asbestfasern (speziell Krokydolith) handelt. In diesem Fall konnte mit der EDX kein Eisen

nachgewiesen werden, was durch den geringen Eisengehalt in diesem Präparat bedingt sein könnte. Die Empfindlichkeit der EDX-Methode, um Eisen nachzuweisen, war für dieses Präparat zu gering.

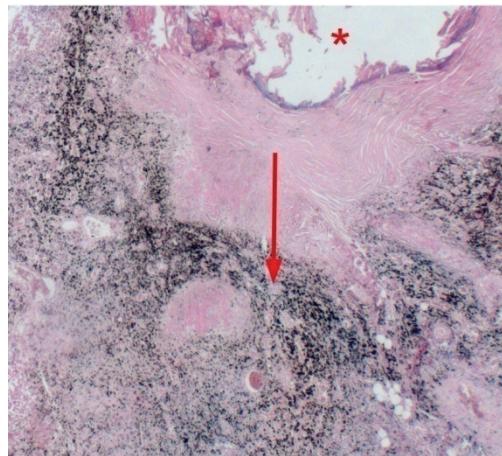


Abb. 33a:

Lichtmikroskopische Darstellung des rechten Lungenmittellappens (re. LML). Deutlich zu erkennen sind die Anhäufungen schwarzer Partikel (→, möglicherweise Kohlenstoffablagerungen). Bronchiolus terminalis (*). Übersichtsaufnahme mit 10facher Vergrößerung.

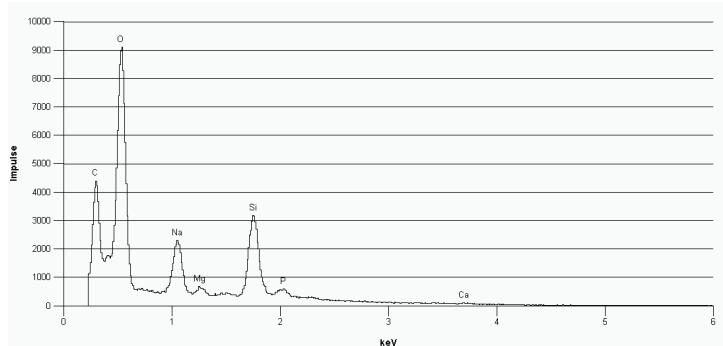


Abb. 33b:

EDX-Analyse im re. LML. Stark erhöhte Peaks für Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O), Natrium (Na) und Silizium (Si).

Auch im re. LML konnte, wie **Abb. 33b** zeigt, kein Eisen nachgewiesen werden. Der starke Peak für Sauerstoff, in den beiden **Abb. 32b** und **33b** erkennbar, stammt einerseits vom Lungengewebe, andererseits von der Fixierung. Dadurch kann es zu einer Oxidation im Gewebe gekommen sein. Darüber hinaus ist Sauerstoff in den Fasern enthalten und wurde daher zu einem hohen Anteil nachgewiesen. Im Gegensatz zur **Abb. 32b** ist der Kohlenstoffpeak in **Abb. 33b** deutlich höher. Dies gibt einen deutlichen Hinweis auf die starken Kohlenstoffablagerungen. Da dieser Patient möglicherweise ein Raucher gewesen ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen schwarzen Ablagerungen auch um Ruße aus dem Zigarettenrauch handeln könnte, wobei an diese Partikel zusätzlich polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) gebunden sein können.

Analyse in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zusätzlich zur REM wurde die TEM durchgeführt, um die Einschlüsse näher charakterisieren zu können. Die zelluläre Aufnahme der Fasern und die entsprechenden TEM-Bilder von Fasern und Partikeln wurden in den Zellkulturversuchen genauer analysiert und unter Abschnitt 4.3.1 erläutert.

Die Patientenpräparate wurden in der TEM untersucht, um die Struktur der Fasern und die sie umgebenden Proteinhüllen zu verdeutlichen. Darüber hinaus erfolgte die Elementanalyse EELS zur Charakterisierung eines bestimmten Elementes. Um die TEM durchführen zu können, wurden vom Patientenmaterial einige Proben vorbereitet (vgl. Abschnitt 3.4.2.2).

Auch diese Proben (**Abb. 34** und **35**) wurden erneut mit der EDX untersucht, um einen Aufschluss über die enthaltenen Elemente zu bekommen. Dabei ergab die Messung Eisen und Silizium (**Abb. 36**), aber auch Kupfer (Cu), Blei (Pb) und Osmium (Os). Allerdings stammt bei dieser Analyse das Kupfer von dem Kupfernetz, auf welches das Präparat aufgebracht wurde. Blei und Osmium stammen von der Kontrastierung und der Nachfixierung mit einprozentigem Osmiumtetroxid.

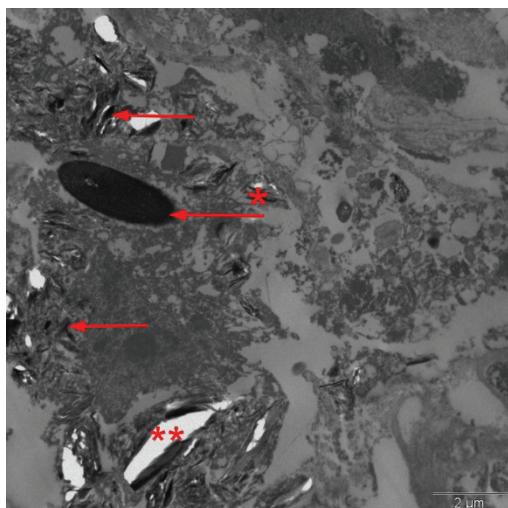


Abb. 34:
Die Proteinhülle (*→), die um die Faser gebildet wurde, ist sehr gut dargestellt. In unmittelbarer Umgebung fallen die Anhäufungen nicht umhüllter Fasern (→) auf. Artefakte (**).
TEM. Vergrößerung: 425x.

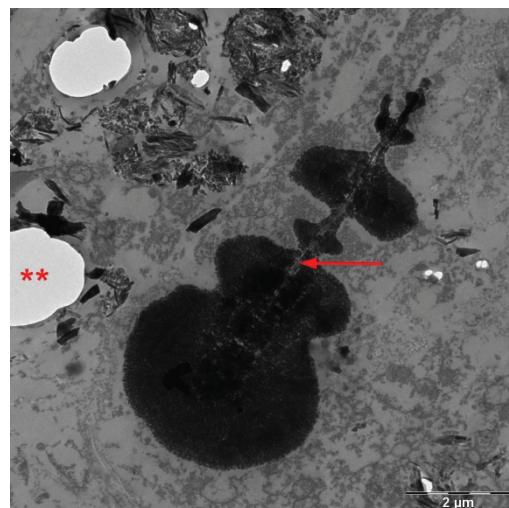


Abb. 35:
Im Zentrum ist die lange, transparente und gerade Asbestfaser (→) sichtbar. Sie wird umgeben von der aus Ferroprotein bestehenden Hülle. Besonders deutlich bei dieser Abbildung ist die charakteristische Quersegmentierung der Proteinhülle. Artefakte (**). TEM. Vergrößerung: 6000x.

Ergebnisse

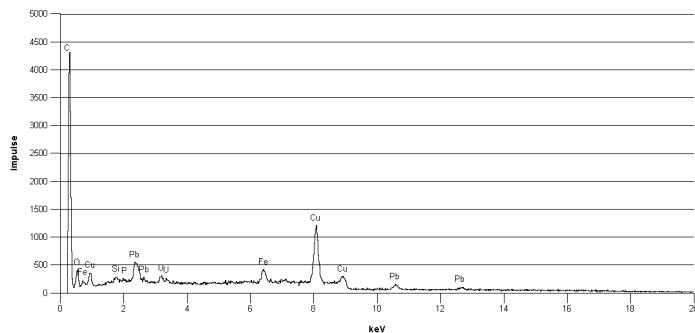


Abb. 36:

EDX-Messung der in Abb. 35 dargestellten Faser. Erhöhte Peaks für Silizium und Eisen.

Die Untersuchung in der TEM zeigt deutlich die Proteinhülle, die um die Faser gebildet wurde. Besonders **Abb. 35** stellt die charakteristische Quersegmentierung dieser Proteinhülle dar. Darüber hinaus ist die leicht transparente Zentralfaser gut zu erkennen. Aber auch die nackten Fasern in **Abb. 34** sind eindeutig identifizierbar.

Bei der TEM-Untersuchung sind die Präparate einem Elektronenstrahl ausgesetzt, der eine starke Beanspruchung für das Gewebe darstellt. Daher kommt es häufig zum Reißen des Gewebes, wodurch Artefakte (**Abb. 34, 35**) entstehen, die sich in Form von Löchern darstellen. Dies gestaltet sich für die Darstellung der Elemente in der TEM als schwierig. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Präparat (**Abb. 37a**) für die TEM vorbereitet und zur EDX-Analyse der enthaltenen Elemente erneut im REM (vgl. **Abb. 37c**) untersucht.

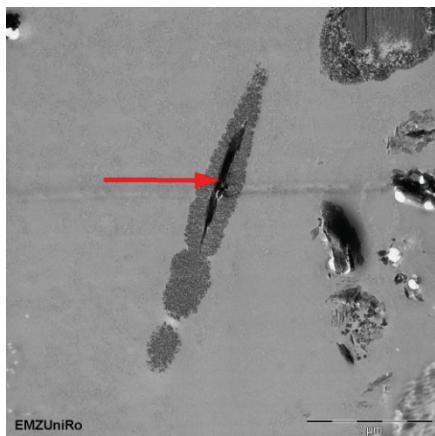


Abb. 37a:

Zentralfaser (→) mit der sie umgebenden Proteinhülle. Gut zu erkennen sind die Quersegmente der Proteinhülle. TEM. Vergrößerung: 10000x.

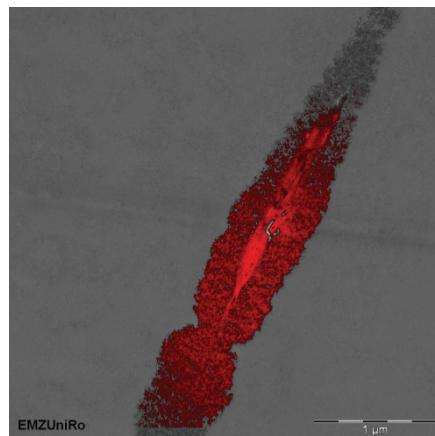


Abb. 37b:

Dieselbe Faser aus Abb. 37a in der Darstellung als Falschfarbenbild. Dabei wurde der Eisengehalt rot dargestellt. Das Eisen ist sowohl in der Faser als auch in der Proteinhülle nachweisbar. TEM. Vergrößerung: 19000x.

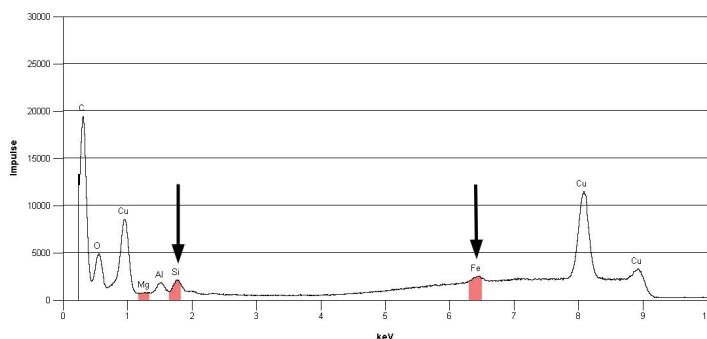


Abb. 37c:
EDX-Analyse der in Abb. 37a gezeigten Faser. Erhöhte Peaks für Silizium (Si) und Eisen (Fe).

Auch in diesem Präparat (**Abb. 37a**) konnten erhöhte Peaks für Silizium und Eisen (vgl. **Abb. 37c**) sowie ein hoher Kohlenstoffpeak ermittelt werden. Die analysierten Elemente Aluminium (Al) und Kupfer stammen von dem aus Aluminium bestehenden REM-Präparatshalter bzw. vom Kupfernetz (Fremdmaterialien). Silizium und Eisen weisen wiederum auf das Vorkommen der Asbestfasern hin.

Da diese Probe, im Gegensatz zu den Proben in **Abb. 34** und **35**, gut intakt war, konnte eine Analyse mit der TEM durchgeführt werden. Dabei wurde eine Falschfarbendarstellung für Eisen (vgl. **Abb. 37b**) erzeugt, da das Eisen sowohl in den Fasern als auch in der Proteinhülle nachweisbar ist. Dazu wurde zunächst die Stärke des Eisengehaltes (**Abb. 38**) ermittelt. Hier entspricht der Verlauf der roten Messkurve der grünen Standardkurve. Durch diese Analyse wurde das so genannte Falschfarbenbild erstellt, aus dem ersichtlich ist, dass Eisen nicht nur in der Proteinhülle, sondern auch mit einem hohen Anteil in der Asbestfaser enthalten ist. Somit handelt es sich bei der Asbestexposition des Patienten möglicherweise um eine Krokydolithexposition.

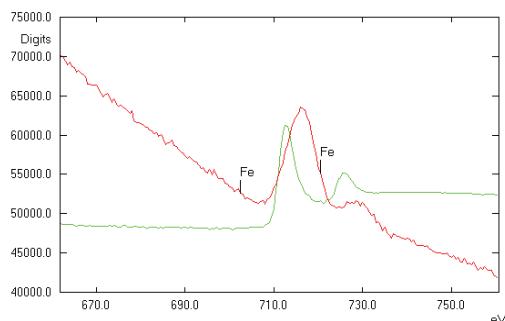


Abb. 38:
Nachweis des Eisens aus dem Präparat aus der Abb. 37a. Die rote Kurve stellt die Eisenmessung mit EELS dar; die grüne Kurve kennzeichnet die Standardkurve. TEM (EELS).

Ergebnisse

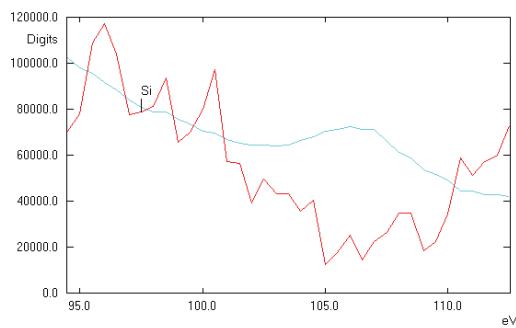


Abb. 39:

Die Messung des Siliziums weist starke Schwankungen in der roten Kurve auf. Die türkisfarbene Kurve stellt die Standardkurve dar. TEM (EELS).

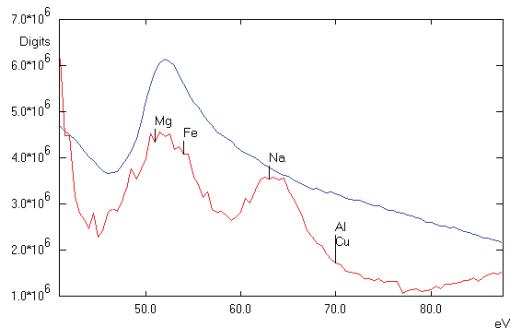


Abb. 40:

Nachweis des Magnesiumgehaltes. Die rote Messkurve zeigt einen deutlichen Ausschlag für Magnesium (Mg). Die Standardkurve für Magnesium ist dunkelblau markiert. TEM (EELS).

Gleichzeitig wurden der Silizium- und Magnesiumgehalt untersucht. Die Analyse für Silizium (**Abb. 39**) ergab im Unterschied zu Eisen keine eindeutigen Ergebnisse. Anders als die EDX-Untersuchung (**Abb. 37c**) zeigte die Magnesiumanalyse (**Abb. 40**) Hinweise auf einen leichten Magnesiumgehalt. Jedoch kam es bei dieser Analyse zu einer starken Schwankung in der Kurve im Gegensatz zu der Eisenkurve.

4.1.2 Analyse des Zweiten Falls

Der Patient lebte von 1932 bis 2002. Aus dem Obduktionsbericht geht hervor, dass der Patient an einer akuten fulminanten Lungenembolie verstarb. Zudem wird erwähnt, dass bei dem Patienten 17 Jahre vor dem Tod eine Pneumektomie rechts wegen eines Bronchialkarzinoms durchgeführt wurde. Aus dem Bericht geht nicht hervor, ob der Patient Raucher oder Nichtraucher war. Des Weiteren gibt der Bericht keine Auskunft darüber, welcher beruflichen Tätigkeit der Patient nachgegangen ist. Die im Folgenden dargestellten Ansammlungen von Asbestfasern im Lungengewebe lassen jedoch auf eine berufliche Exposition gegenüber Asbest schließen, die jedoch im Vergleich zum 1. Fall möglicherweise geringer war.

Mikroskopische Auswertung

Für die Untersuchung des 2. Falles wurden zunächst lichtmikroskopische Schnitte angefertigt. Dabei zeigte sich eine ähnliche strukturelle Veränderung der Lunge wie im 1. Fall.

Lichtmikroskopie

In der lichtmikroskopischen Abbildung (**Abb. 41**) wird Lungengewebe dargestellt. Die Alveolen sind emphysemartig vergrößert, wodurch ein Gasaustausch nicht mehr möglich ist. Ähnlich wie in dem 1. Fall sind einige Bereiche der Lunge zu fibrotischem Narbengewebe umgewandelt. Im Gegensatz zum 1. Fall sind jedoch deutlich weniger Ansammlungen von Asbest in der Lunge vorhanden und es lassen sich keine Schleimansammlungen finden. Ebenso ist die Anzahl der Entzündungszellen etwas geringer als im 1. Fall. Allerdings zeigen sich auch im 2. Fall Anhäufungen ungefärbter schwarzer Partikel, so dass angenommen werden kann, dass es sich bei diesem Patienten auch um einen Raucher gehandelt haben könnte. Ferner besteht die Möglichkeit, dass es sich hier um Kohlenstaubablagerungen durch Heizungsmaterial (Briketts), Rauch von Holz- oder Kohlefeuern, Autoabgase oder andere Emissionsquellen handeln könnte.

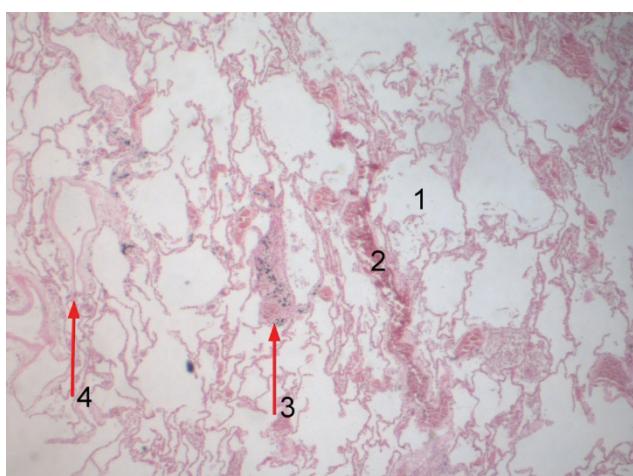


Abb. 41:
Emphysemartig vergrößerte Alveolen (1) und fibrotisches Narbengewebe (2). Die Anhäufungen von Asbestkörperchen (3→) sind in Lungenwebe eingelagert. Die schwarzen Partikelablagerungen sind nur schwach zu erkennen (4→). Lichtmikroskopische Über-sichtsaufnahme bei 10facher Vergrößerung.

Untersuchung in der Elektronenmikroskopie

Bedauerlicherweise standen von diesem Patienten nur 2 Paraffinblöcke des Lungengewebes zur Verfügung. Die EDX-Analyse, mittels REM (vgl. **Abb. 42**), ergab deutlich das Vorkommen von Silizium und Eisen.

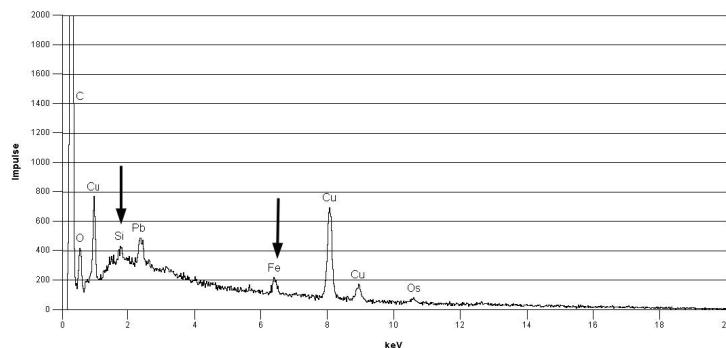


Abb. 42:

EDX-Untersuchung der Präparate aus den Abb. 43a und 44a mit deutlicher Silizium- und Eisenkurve.

Für die Analyse im TEM wurden zwei markante Stellen ausgewählt, bei denen es sich an erster Stelle (**Abb. 43a**) um eine Anhäufung von Asbestfasern handelt. Die Fasern weisen eine gestreckte Form auf und sind nicht mit Ferroprotein umhüllt. Die zweite Stelle ist durch einen Querschnitt durch die Proteinhülle (**Abb. 45a**) gekennzeichnet, wobei sich die zentrale Asbestfaser nicht mehr im Zentrum des Asbestkörperchens befindet, sondern außerhalb in unmittelbarer Nachbarschaft.

Bei der TEM-Analyse des Faserhaufens und der Proteinhülle ergab sich für Eisen ein deutlicher Ausschlag in der gemessenen Kurve (**Abb. 44** und **46**). Dabei war der Eisenanteil im analysierten Faserhaufen (**Abb. 44**) ähnlich hoch wie der gemessene Eisenanteil in der Proteinhülle (**Abb. 46**). Obendrein zeigt die rote Messkurve in beiden Abbildungen einen ähnlichen Verlauf wie die grüne Standardkurve.

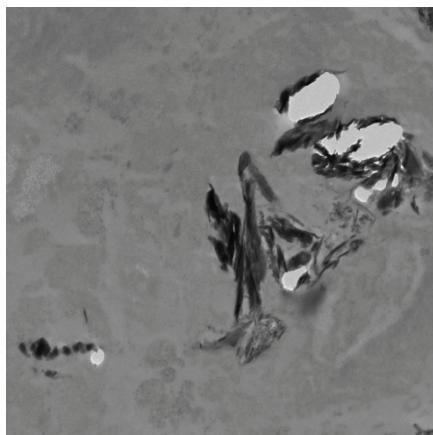


Abb. 43a:

Nicht umhüllte Fasern, in einem Faserhaufen zusammenliegend. Die Löcher im Präparat sind die Folge der hohen Elektronenbelastung. TEM. Vergrößerung: 20000x.

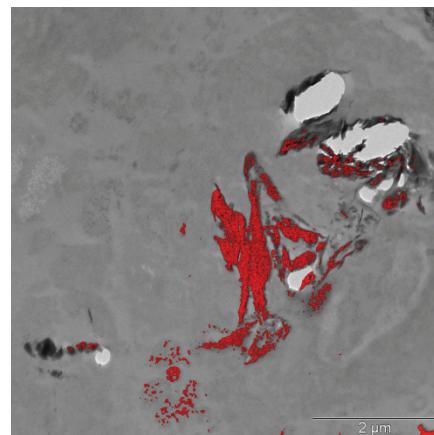


Abb. 43b:

Darstellung des Eisengehaltes in den reinen Asbestfasern durch Erstellung eines Falschfarbenbildes. Der Eisengehalt wurde rot markiert. TEM. Vergrößerung: 20000x.

Ergebnisse

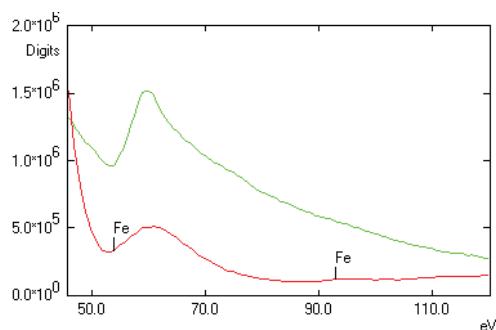


Abb. 44:
Eisennachweis der in Abb. 43a dargestellten Asbestfasern. Die rote Kurve ist die Messkurve, grün die Standardkurve für Eisen. TEM (EELS).

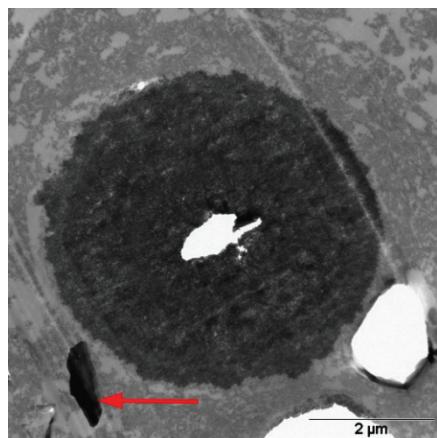


Abb. 45a:
Proteinhülle (schwarzer Kreis) einer Asbestfaser, Anteile der größtenteils fehlenden zentralen Asbestfaser sind noch sichtbar (→). TEM.
Vergrößerung: 8500x.

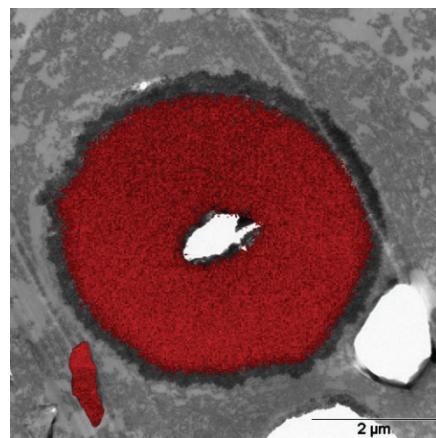


Abb. 45b:
Rote Markierung des Eisengehaltes in der Proteinhülle durch ein Falschfarbenbild.
TEM. Vergrößerung: 8500x.

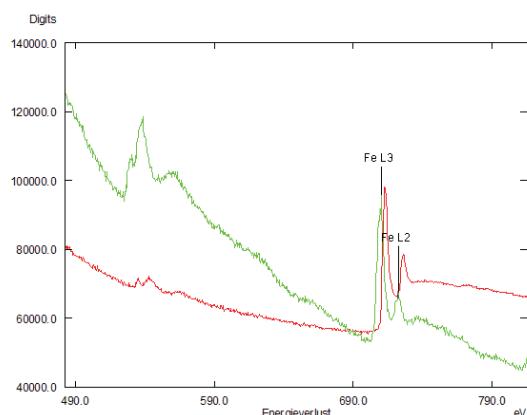


Abb. 46:
Nachweis eines Eisengehaltes in der Proteinhülle, die um die Asbestfaser gebildet wurde, wobei rot die Messkurve und grün die Standardkurve darstellt. TEM (EELS).

Um den Eisengehalt, wie bereits im 1. Fall erläutert, genau zu charakterisieren, wurde sowohl für den Asbestfaserhaufen als auch für die Proteinhülle ein Falschfarbenbild (**Abb. 43b** und **45b**) erstellt. Dabei sollte gezeigt werden, dass nicht nur die Proteinhülle, sondern auch die Fasern stark eisenhaltig sind.

Wie im 1. Fall lässt der Befund des 2. Falles vermuten, dass der 2. Patient verstärkt gegenüber Krokydolith exponiert war. Einen weiteren Hinweis auf eine Krokydolith-

exposition zeigt die Darstellung der Fasern in **Abb. 43a**, denn im Gegensatz zur gewellten Struktur des Chrysotil weisen diese Fasern eine gerade lanzettenartige Form auf.

4.1.3 Analyse des Dritten Falls

Der Obduktionsbericht zu diesem Patienten konnte leider nicht mehr ausfindig gemacht werden. Der hohe Gehalt an Asbestfasern führte jedoch zu der Vermutung, dass der Patient zu Lebzeiten einer hohen Asbestexposition ausgesetzt war. Sehr auffällig sind die Ähnlichkeiten zum 1. und 2. Fall in Bezug auf die Asbestfasern, aber auch die partikulären Einschlüsse.

Mikroskopische Analyse

Bei der Untersuchung des dritten Patienten wurden, wie auch schon in den ersten beiden Fällen, zwei markante Stellen untersucht, um die Resultate der ersten Analyse mit dem Ergebnis der zweiten Analyse zu untermauern. Da beide Untersuchungsergebnisse ähnlich waren, werden diese zusammen beschrieben.

Analyse mit dem Raster- und Transmissionselektronenmikroskop

Die EDX-Untersuchung von zwei Präparaten mittels REM zeigte bei beiden Analysen Anteile von Eisen und Silizium (in **Abb. 48** und **51** mit Pfeilen markiert). Ebenso konnte in beiden Präparaten ein hoher Kohlenstoffanteil ermittelt werden.

Die gemessenen Anteile von Kupfer stammen vom Kupfergitter (Grid), Aluminium vom REM-Präparatehalter und Osmium von der Fixierung mit Osmiumtetroxid.

Bei der Analyse im TEM konnte die Hantelform (vgl. **Abb. 47a**) mit der typischen Quersegmentierung dargestellt werden, die durch die Bildung eines Asbestkörperchens entsteht. Darüber hinaus befindet sich in unmittelbarer Umgebung eine nackte Asbestfaser. Auch in **Abb. 50a** sind nackte Asbestfasern erkennbar, die allerdings in eine granuläre Struktur eingelagert sind.

Ergebnisse

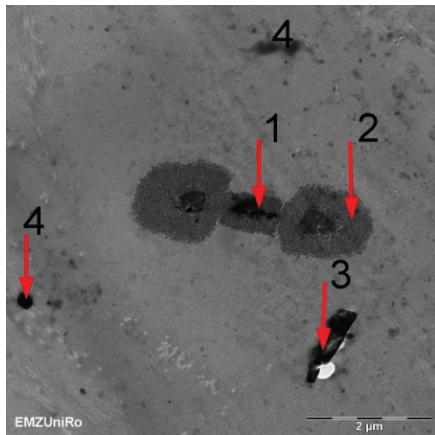


Abb. 47a:

Darstellung einer zentralen Asbestfaser (1). Sie wird umgeben von der quer segmentierten Proteinhülle (2). Leicht transparente, gut sichtbare Struktur der nicht umhüllten Faser (3) in unmittelbarer Umgebung, sowie Ablagerungen schwarzer Partikel (4). TEM. Vergrößerung: 8500x.

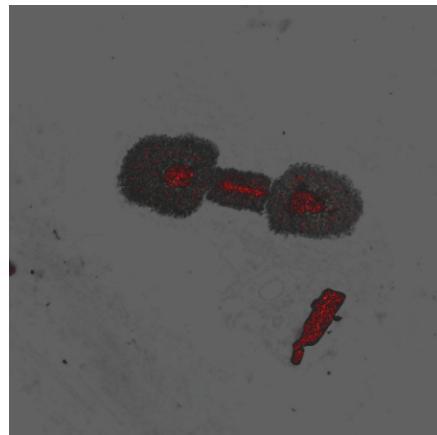


Abb. 47b:

Falschfarbendarstellung der zentralen Asbestfaser mit der sie umgebenden Proteinhülle. Der Eisengehalt wurde rot markiert und ist sowohl in der Asbestfaser als auch in der Proteinhülle zu finden. TEM. Vergrößerung: 8500x.

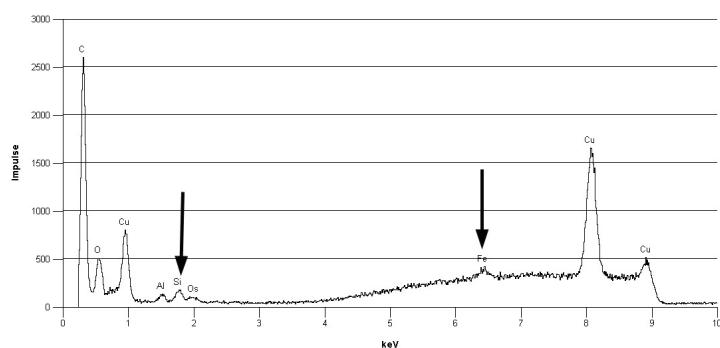


Abb. 48:

EDX-Analyse des Asbestkörperchens aus Abb. 47a mit leichten Ausschlägen für Silizium und Eisen (durch Pfeile markiert).

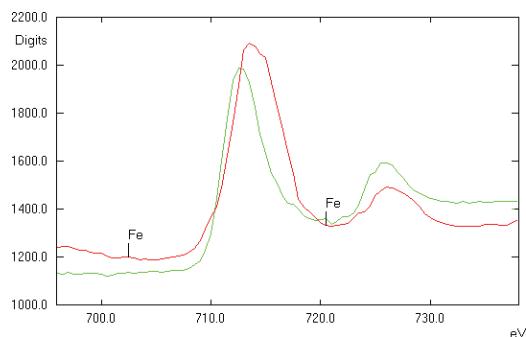


Abb. 49:

Deutlicher Eisenpeak des aus Abb. 47a dargestellten Asbestkörperchens. Die rote Kurve ist die Messkurve, die grüne die Standardkurve. TEM (EELS).

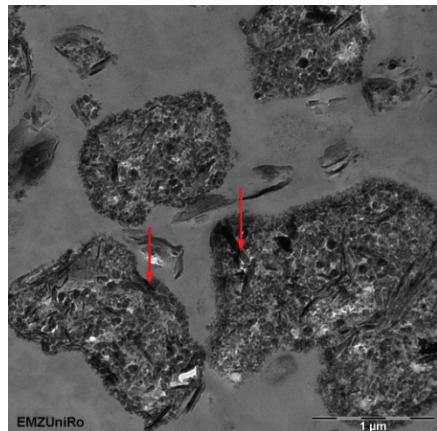


Abb. 50a:
Einlagerung von Asbestfasern (→) in einer granulären Struktur. TEM. Vergrößerung: 27000x.

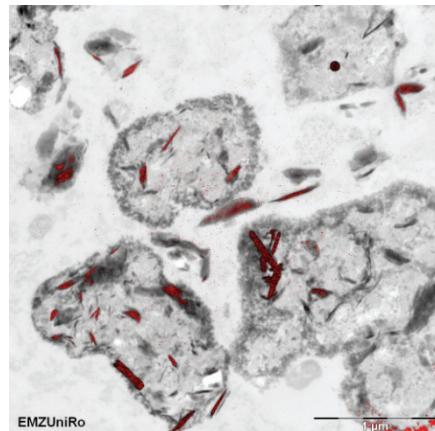


Abb. 50b:
Darstellung des Eisengehaltes in den Asbestfasern durch rote Markierung mittels Falschfarbenbild. TEM. Vergrößerung: 27000x.

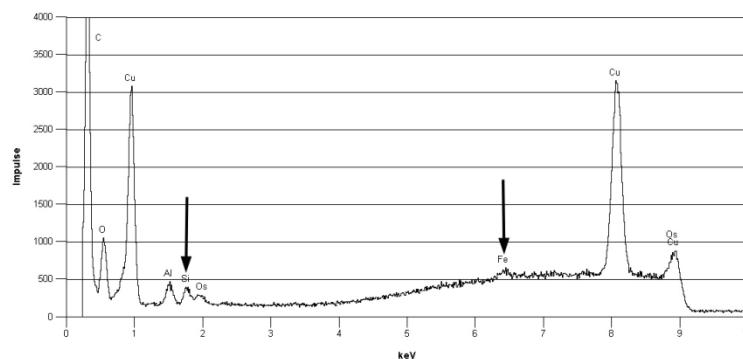


Abb. 51:
EDX-Faseranalyse der aus Abb. 50a dargestellten Faseransammlung. Hoher Kohlenstoffgehalt von den Kohlenstoffpartikeln und aus der organischen Matrix.

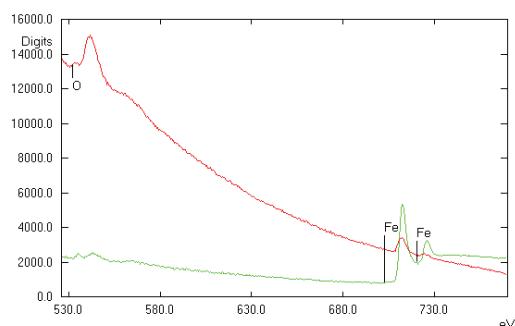


Abb. 52:
Eisennachweis in den Fasern. Sauerstoff als Vergleichswert. TEM (EELS).

Die Elementanalyse mit EELS zeigte bei diesem Fall in beiden Präparaten aus **Abb. 49** und **52** deutliche Eisenanteile. Durch diese Analyse konnte auch hier ein Falschfarbenbild für die beiden untersuchten Stellen erzeugt werden (**Abb. 47b** und **50b**), wodurch der hohe Eisengehalt vor allem in den Fasern deutlich wird. Die Analyse zeigt deutliche Asbestvorkommen in der Lunge des Patienten. Wie schon in den ersten beiden Fällen scheint der Patient während seiner beruflichen Tätigkeit einer hohen Konzentration gegenüber Asbestfasern, vor allem Krokydolith, ausgesetzt gewesen zu sein. Darüber hinaus ist auch eine Anthrakose sichtbar.

4.2 Zellkulturversuche

Um die Aufnahme der Asbestfasern und die partikulären Einschlüsse näher zu charakterisieren, wurden Zellkulturversuche durchgeführt. Zunächst wurden jedoch die Größenverteilung der Fasern und Partikel sowie deren Elementzusammensetzung bestimmt. Die untersuchten Fasern und Partikel wurden bereits unter Abschnitt 3.3 vorgestellt.

4.2.1 Größenverteilung und Elementanalyse der Faser- und Partikelproben für die Zellkulturversuche

Die einzelnen Faser- und Partikelproben wurden mit der EDX analysiert, um die Zusammensetzung der einzelnen Proben zu bestimmen. Die Verteilung der einzelnen Elemente wurde durch die Peaks dargestellt. Die Flächen der Peaks repräsentieren den prozentualen Massenanteil der Elemente. Die Goldpeaks (Au) in den Abbildungen der Elementanalyse entstanden durch das Beschichten der Proben mit Gold. Die Palladiumpeaks (Pd) stellen ebenfalls Verunreinigungen durch das Beschichten dar. Daher sind Gold und Palladium nicht bei der Analyse berücksichtigt und auch nicht in den Tabellen dargestellt worden.

4.2.1.1 Asbest

Krokydolith

Die Analyse der Größenverteilung der Asbestfasern ergab für Krokydolith einen mittleren Durchmesser von 0,25 µm. Bei der durchschnittlichen Länge wurden 1,71 µm bestimmt. Die EDX-Analyse für Krokydolith (vgl. **Abb. 53**) zeigte große Mengen an Silizium, Eisen und Natrium. Aber auch Spuren von Magnesium konnten nachgewiesen werden. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Elemente gibt die folgende **Tab. 1** wieder.

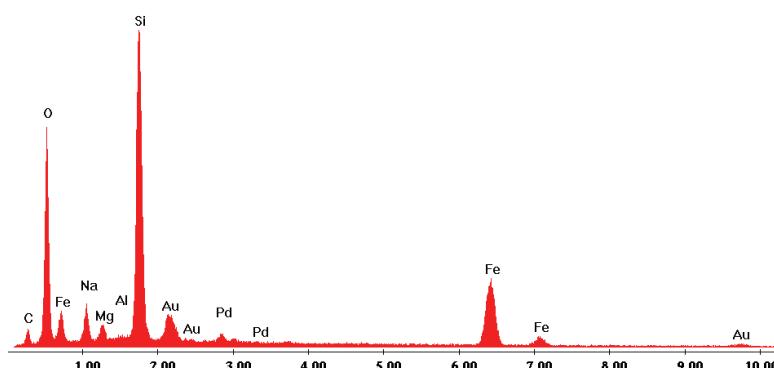


Abb. 53:
Elementare Zusammensetzung von Krokydolith. EDX (Größeneinteilung der x-Achse in keV).

Ergebnisse

Tab. 1: Prozentuale Verteilung der einzelnen Elemente im Blauasbest Krokydolith.

Krokydolith	
Enthaltene Elemente	Mengenanteil in %
O	45,54
Si	19,24
Fe	18,27
C	11,95
Na	3,79
Mg	1,21

Chrysotil

Bei der REM-Analyse der Größenverteilung für Chrysotil ergab sich ein mittlerer Durchmesser von 0,1 µm. Die Länge betrug im Schnitt 2,24 µm. Die umfassende Untersuchung hinsichtlich der Elementanalyse (vgl. Abb. 54) wies eindeutig auf die Bestandteile von Magnesium und Silizium hin. Aber auch ein minimaler Anteil von Eisen wurde gefunden, wie es in Tab. 2 dargestellt wird.

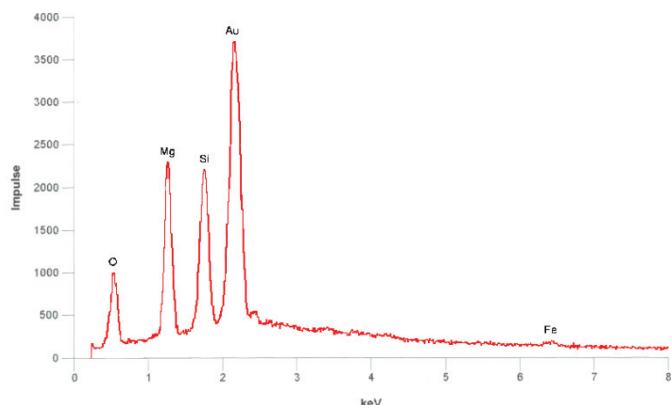


Abb. 54:
Elementare Zusammensetzung des Chrysotils.
EDX.

Tab. 2: Prozentuale Verteilung der einzelnen Elemente im Weißasbest Chrysotil.

Chrysotil	
Enthaltene Elemente	Mengenanteil in %
O	51,98
Mg	24,93
Si	21,39
Fe	1,69

4.2.1.2 Partikel

Toner

Bei der REM-Analyse ergab sich für Toner eine durchschnittliche Größe von 10 bis 20 µm je Partikel. Die Elementanalyse ermittelte einen 100-prozentigen Anteil an Kohlenstoff (vgl. **Abb. 55**).

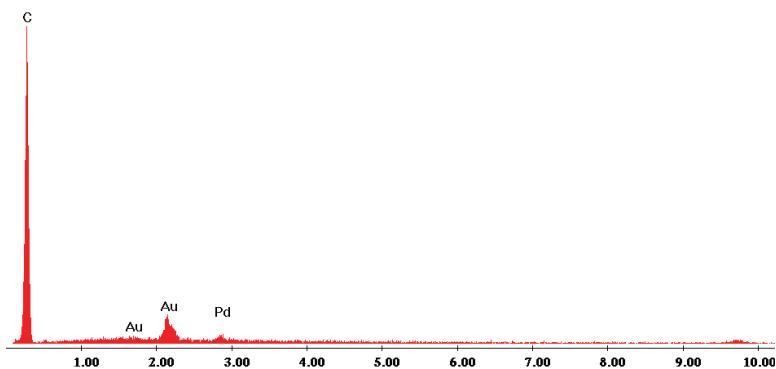


Abb. 55:
Elementare Zusammensetzung des Toners. EDX (Größeneinteilung der x-Achse in keV).

Carbon black

Carbon black ist sehr fein und liegt, wie bereits unter Abschnitt 1.2.3.1 beschrieben, in Agglomeraten vor. Die Carbon black-Partikel weisen eine durchschnittliche Größe von 55 nm auf. Bei der EDX-Analyse (vgl. **Abb. 56**) fand sich ein sehr hoher Anteil an Kohlenstoff. Wie in **Tab. 3** zu sehen ist, sind jedoch auch geringe Mengen an Sauerstoff und Schwefel (S) nachweisbar.

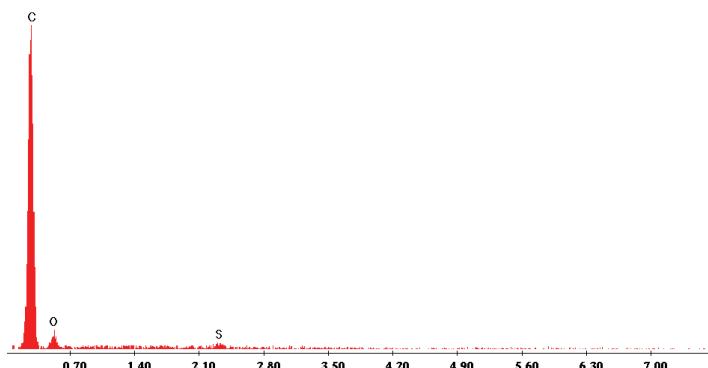


Abb. 56:
Elementare Zusammensetzung des Carbon blacks. EDX (Größeneinteilung der x-Achse in keV).

Tab. 3: Prozentuale Verteilung der einzelnen Elemente im Carbon black.

Carbon black	
Enthaltene Elemente	Mengenanteil in %
C	88,55
O	10,80
S	0,65

Titandioxid

Titandioxid weist ein ungefähr gleiches Größenverhältnis auf wie Carbon black. Die Partikel nehmen eine durchschnittliche Größe von 50 nm ein. Bei der Elementverteilung (vgl. **Abb. 57**) von Titandioxid macht Titan (Ti) den größten Bestandteil dieses Partikels aus, wie **Tab. 4** zeigt. Sauerstoff und geringe Mengen von Kohlenstoff sind ebenso nachweisbar.

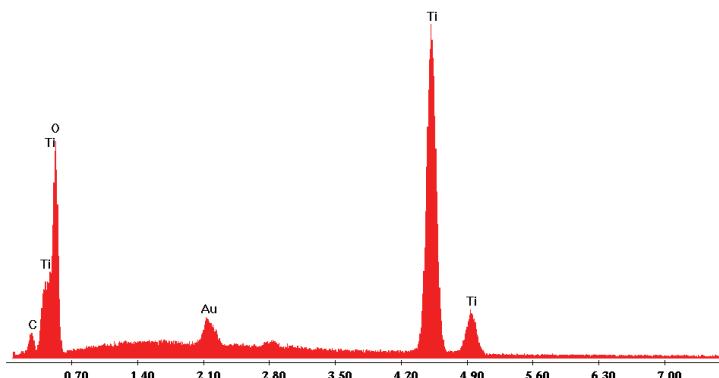


Abb. 57:
Elementare Zusammensetzung von
Titandioxid. EDX (Größeneinteilung
der x-Achse in keV).

Tab. 4: Prozentuale Verteilung der einzelnen Elemente im Titandioxid.

Titandioxid	
Enthaltene Elemente	Mengenanteil in %
Ti	55,98
O	40,98
C	3,04

4.3 Zelluläre Aufnahme von Fasern und Partikeln (REM, TEM)

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme von Fasern und Partikeln wurden die 3T3-Zellen gegenüber den Asbestfasern Krokydolith und Chrysotil sowie, beispielhaft für die Partikel, gegenüber Toner mit einer Konzentration von 5 µg/cm² für 24 Stunden exponiert. Mit dem REM sollte die äußere Struktur der Zellen und mögliche Veränderungen beurteilt werden. Mit Hilfe des TEM wurde die Phagozytose der Fasern und Partikel untersucht.

4.3.1 Aufnahme von Fasern

Die REM-Aufnahme stellt die Fibroblasten in Zellkultur nach der Exposition gegenüber Asbestfasern dar. Man kann erkennen, wie sich die Zellen sowohl nach Kroky-

dolithexposition (**Abb. 58**) als auch nach Chrysotilexposition (**Abb. 60**) über die Fasern gelegt haben.

Die Untersuchung mit dem TEM (**Abb. 59 und 61**) zeigt deutlich die Fasern in den Fibroblasten. Die Fasern wurden über die Phagozytose aufgenommen. Die Phagozytose bezeichnet die Aufnahme fester Stoffe. Sowohl Krokydolith (**Abb. 59**) als auch Chrysotil (**Abb. 61**) sind im Zytoplasma der 3T3-Zellen in der Nähe des Zellkerns lokalisiert, jedoch nicht in diesen eingedrungen. Auch die anderen Zellorganellen, wie die Mitochondrien und die Endoplasmatischen Retikula, die in der TEM eindeutig identifizierbar sind (vgl. **Abb. 59 und 61**), blieben von der Faseraufnahme unbeeinträchtigt. Auffällig ist die Abkapselung der Faseransammlungen, die sich in den transmissionselektronenmikroskopischen **Abb. 59 und 61** für Krokydolith bzw. für Chrysotil darstellen. Die Fasern sind im Zytoplasma der Zelle in Vesikel (**Abb. 59 und 61**) eingeschlossen.

Krokydolith

Nach der Krokydolithexposition erscheinen die Fibroblasten in der REM-Aufnahme, wie **Abb. 57** zeigt, im Gegensatz zu Chrysotil, äußerlich etwas deformiert. Die gleichförmige Morphologie, wie sie bereits eingangs unter Abschnitt 3.2.1 in **Abb. 12** dargestellt wurde, erscheint unregelmäßig. Weiterhin sind in der TEM nach der Krokydolithaufnahme (**Abb. 58**) frühe Apoptosen sichtbar. Das wird besonders an den zwei scheinbaren Nukleoli deutlich. Diese entstehen durch DNA-Fragmentation, die durch Endonukleasen bewirkt wird. Dabei kommt es zu einer Heterochromatinbildung.

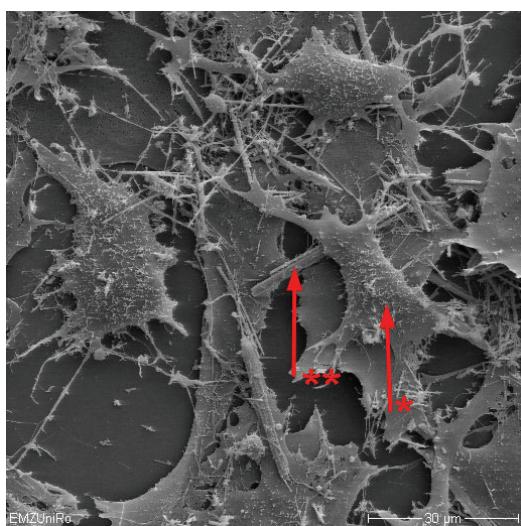


Abb. 58:
Veranschaulichung der Fibroblasten in Zellkultur nach Krokydolithexposition. Ein Fibroblast (*) hat sich bereits der Krokydolithfaser (**) angenähert.
REM. Vergrößerung: 700x.

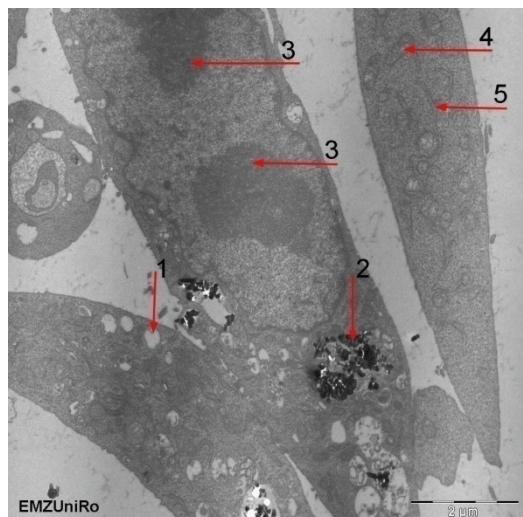


Abb. 59:
Ansammlungen von Krokydolith in den Fibroblasten in Vesikel nach der Phagozytose.
Vakuole (1); phagozytierte Krokydolithfasern im Vesikel (2); Nukleus mit zwei scheinbaren Nukleoli (3) als ein frühes Anzeichen der Apoptose (DNA-Fragmentation); Mitochondrium (4); Endoplasmatisches Retikulum (5).
TEM. Vergrößerung: 9750x.

Chrysotil

Bei der REM-Aufnahme weisen die Zellen, im Gegensatz zu Krokydolith, nach Chrysotilexposition eine regelmäßige Struktur auf (**Abb. 60**). Bereits bei diesen Aufnahmen lassen sich die in Apoptose befindenden Zellen darstellen, wobei die Apoptose noch deutlicher nach der TEM-Analyse (**Abb. 61**) erkennbar ist.

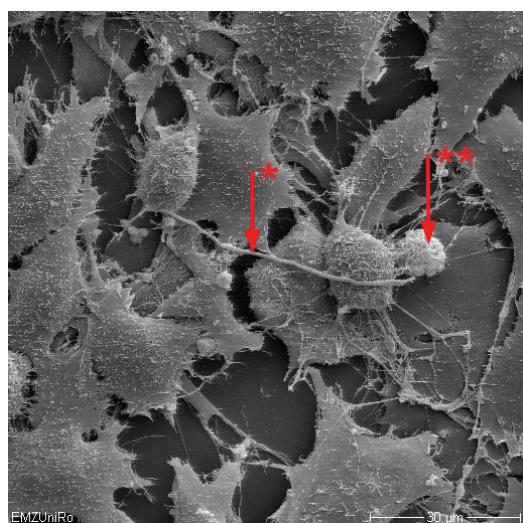


Abb. 60:
Aufnahme der Fibroblasten nach Chrysotilexposition.
Die gewellte Chrysotilfaser (*→) ist deutlich zu erkennen,
aber auch eine geschrumpfte apoptotische Zelle (**→)
mit ausgedehnter Blasenformation.
REM. Vergrößerung: 760x.

In **Abb. 61** liegen zwei Fibroblastenzellen nebeneinander. Bei der Zelle auf der linken Seite des Bildes beginnt sich der Zellkern aufzulösen. In unmittelbarer Nachbarschaft dieses veränderten Zellkerns sind deutlich Chrysotilfasern nachweisbar. Im Vergleich dazu ist der Zellkern der Nachbarzelle mit vier scheinbaren Kernkörperchen (Nukleoli) deutlich zu erkennen. Bei diesen Nukleoli handelt es sich um eine frühe Form der Apoptose mit der Bildung von Heterochromatin (DNA-Fragmentation durch Endonukleasen). Im späteren Verlauf entstehen Halbmonde und Kernfragmente. Die Zellorganellen sind jedoch in beiden Fibroblasten noch gut erhalten.

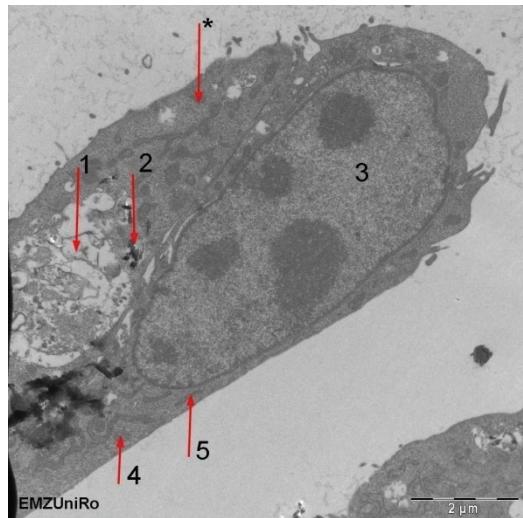


Abb. 61:

Darstellung von zwei nebeneinanderliegenden Fibroblasten in Zellkultur nach Chrysotilexposition. Beide Fibroblasten befinden sich in Apoptose. Bei einem der beiden Fibroblasten (*→) ist die Apoptose bereits deutlich fortgeschritten, erkennbar an der Auflösung des Zellkerns (1); phagozytierte Chrysotilfasern im Vesikel (2); Zellkern (3) mit vier scheinbaren Nukleoli (DNA-Fragmentation); Mitochondrium (4); Endoplasmatisches Retikulum (5). TEM. Vergrößerung: 10500x.

4.3.2 Aufnahme von Partikeln

Toner

In den **Abb. 62a** und **62b** des REM sieht man sowohl die Tonerpartikel als auch apoptotische Zellen. Die Zellen besitzen Mikrovilli an ihrer Oberfläche und erscheinen daher rau und uneben. Sie sind dadurch gut von den Tonerpartikeln zu unterscheiden. Die Partikel sind durch ihre glatte Oberfläche gekennzeichnet und sind kleiner als die intakten und apoptotischen Zellen (vgl. **Abb. 62a**).

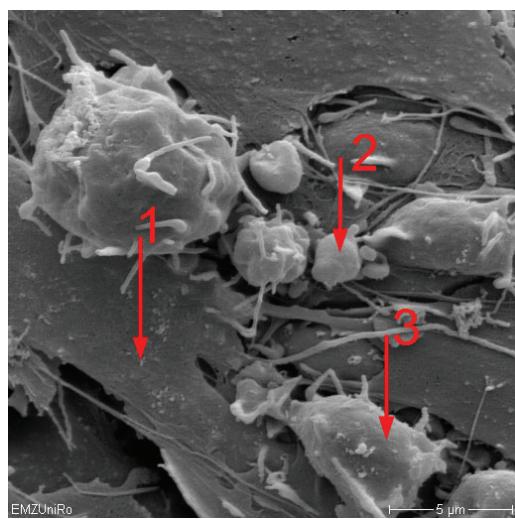


Abb. 62a:

Fibroblasten (1) nach Exposition gegenüber Tonerpartikeln (2). In unmittelbarer Umgebung befinden sich auch apoptotische Zellen (3). Diese Präapoptose ist durch die Abrundung der Zellen gekennzeichnet. REM. Vergrößerung: 3700x.

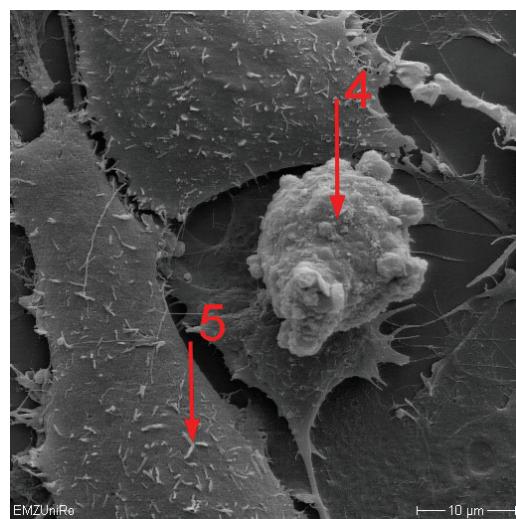


Abb. 62b:

REM-Darstellung einer apoptotischen Zelle (4) mit Blasenformation zwischen intakten Fibroblasten. Mikrovilli (5) einer intakten Zelle. REM. Vergrößerung: 1500x.

Ergebnisse

Die Darstellungen des TEM in den **Abb. 63a** und **63b** zeigen deutlich die erfolgte Aufnahme der Tonerpartikel in die Zellen. Auch hier ist der Toner im Zytoplasma lokalisiert. Große Anteile wurden mit Hilfe von Lysosomen (Heterolysosomen) abgekapselt. Genauso wie bei den Asbestfasern bleiben auch beim Toner die anderen Zellorganellen unbeeinträchtigt.

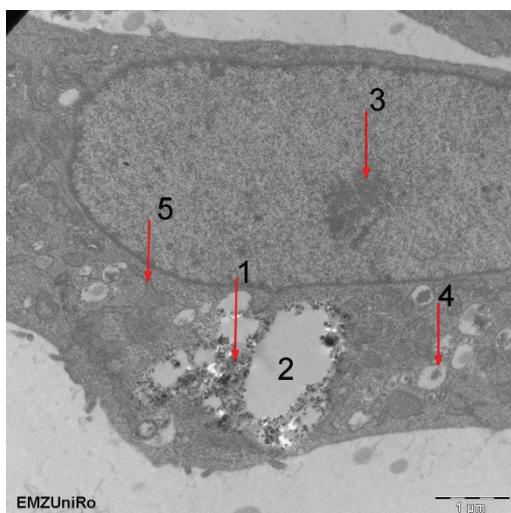


Abb. 63a:
Kleinere Anhäufungen des Toners (1) in Lysosomen (2), Nukleus (3) mit schwach erkennbarem Nukleolus (schwarz angedeutet), Lysosom bzw. Vakuole (4), Endoplasmatisches Retikulum (5).
TEM. Vergrößerung: 11500x.

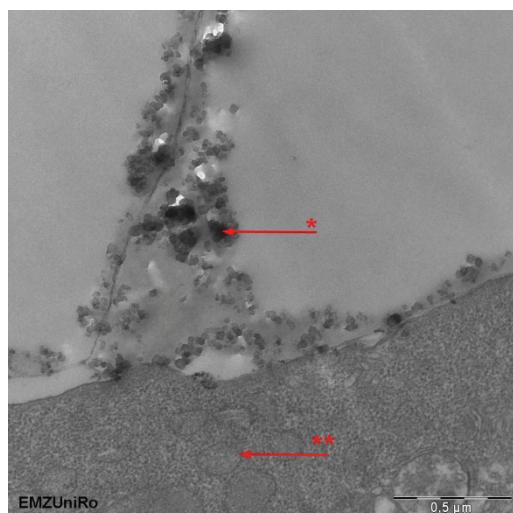


Abb. 63b:
Abkapselung der Tonerakkumulationen (*→) Deutlich zu erkennen sind die kleinen rundlichen Partikel. Mitochondrium (**→).
TEM. Vergrößerung: 36000x.

4.4 Zytotoxizität

Die Zytotoxizitätsversuche mit den 3T3-Zellen wurden über die Zeiträume von 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Dabei ergab das zytotoxische Verhalten der einzelnen Fasern und Partikel sehr unterschiedliche Ergebnisse. Für Krokydolith und Titandioxid wurden Konzentrationen bis 100 µg/cm² verwendet. Für Toner und Carbon black wurden Konzentrationen bis 200 µg/cm² eingesetzt.

Die in den Versuchen eingesetzten Fibroblasten sind schnell proliferierende Zellen mit einem Verdopplungszeitraum von 18 Stunden, so dass nach einer Expositionszeit von 72 Stunden bereits vier Proliferationszyklen abgelaufen sind. 72 Stunden sind daher ein langer Zeitraum für die Exposition gegenüber den einzelnen Fasern und Partikeln. Nach einem Zeitraum von 72 Stunden wurden bei Faser- und Partikelkonzentrationen bis 10 µg/cm² sehr viele vitale Zellen ausgezählt. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Zellen bei sehr hohen Partikelkonzentrationen von 50

Ergebnisse

bis $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zur Proliferation angeregt wurden. Andererseits sind bereits viele Zellen abgestorben und durch neue Zellen ersetzt worden. Nach 72 Stunden haben sich die toten Zellen aus dem Zellverband gelöst und schweben im Medium. Da die Zellen vor dem Auszählen in den Kulturflaschen mit PBS gespült worden sind, wurden bereits abgestorbene Zellen verworfen und konnten nicht mehr ausgewertet werden.

4.4.1 Krokydolith

Bei geringen Faserkonzentrationen bis $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, in den gemessenen Zeiträumen von 24, 48 und 72 Stunden, bestand kaum ein Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Die Anzahl vitaler Zellen lag ungefähr in dem gleichen Bereich wie der Anteil vitaler Zellen bei den Kontrollen. Ab einer Faserkonzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ kam es zu einem tendenziellen Abfall vitaler Zellen in allen 3 Zeiträumen, wie in **Abb. 64** zu erkennen ist. Dabei zeigte sich sowohl nach 24 als auch nach 48 und 72 Stunden bei einer Krokydolithkonzentration von $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ein hohes zytotoxisches Potential mit verstärktem Abfall der Zellvitalität. Hierbei sank die Anzahl vitaler Zellen auf 59,5 % nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden konnten nur 57,7 % vitale Zellen ausgezählt werden, wobei eine statistische Signifikanz von $p \leq 0,05$ ermittelt wurde. Bei der Expositionszeit von 72 Stunden betrug der Anteil an vitalen Zellen nur noch 57,2 % ($p \leq 0,05$). Die einzelnen ermittelten Werte, mit Markierung der statistischen Signifikanz mittels Sternchen, sind im Anhang 4 (Tab. 2) aufgelistet.

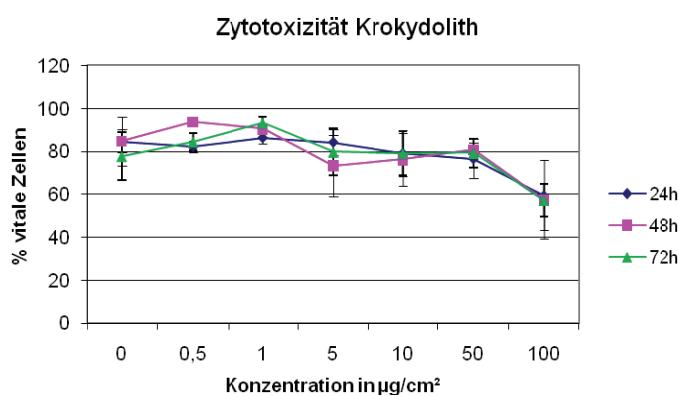


Abb. 64:
Nachweis der Zytotoxizität mit Trypan Blau bei Krokydolith.

4.4.2 Titandioxid

Im Gegensatz zu Krokydolith ist die Lebensfähigkeit der Zellen nach Titandioxidexposition weniger beeinflusst. Wie **Abb. 65** zeigt, blieb die Vitalität der Zellen in den Zeiträumen von 24, 48 und 72 Stunden bei geringen Partikelkonzentrationen bis $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ unbeeinflusst. Bei steigenden Partikelkonzentrationen von 10 bis

Ergebnisse

100 µg/cm² kam es zu einer Reduktion der Zellvitalität auf 66,8 % nach 24 Stunden sowie auf 65,5 % nach 48 Stunden. Dabei konnte jeweils eine statistische Signifikanz von $p \leq 0,05$ ermittelt werden. Nach 72 Stunden betrug die Zellvitalität 76,9 % ($p > 0,05$). Dies weist auf einen fehlenden zytotoxischen Einfluss auf die 3T3-Zellen hin. Die Wertetabelle 3 mit Markierung der statistischen Signifikanzen befindet sich im Anhang 4.

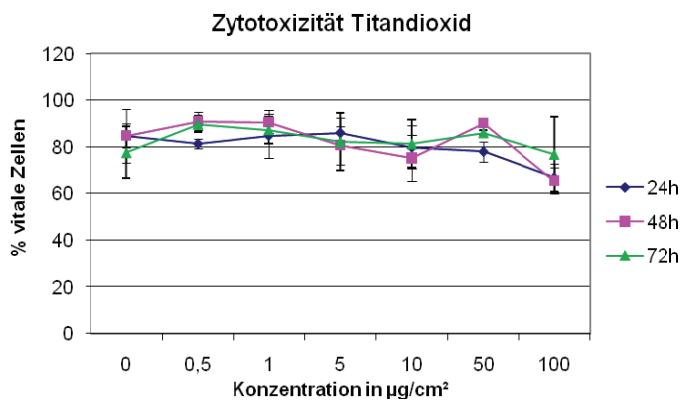


Abb. 65:
Zytotoxischer Nachweis mit Trypan Blau bei Titandioxid.

4.4.3 Toner

Toner ist ein Kunststoff, der sich aus relativ groben Partikeln zusammensetzt. Unter 1.2.1 und 1.2.2 erfolgte bereits die genauere Beschreibung des Toners. Da das Tonermaterial wasserabweisend ist, schwammen nach der Exposition eine große Anzahl der Partikel an der Oberfläche des Kulturmediums. Aus diesem Grund mussten die Zellkulturflaschen im Inkubator auf einen Kleinschüttler gestellt werden, wie bereits im Abschnitt 3.5 erwähnt wurde, um ein Absinken der Tonerpartikel zu erreichen. Wie die TEM-Aufnahmen unter Abschnitt 4.3.2 zeigten, wurden die Tonerpartikel von den 3T3-Zellen aufgenommen.

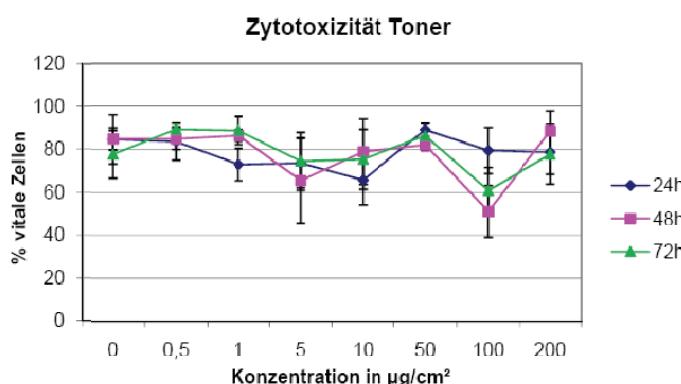


Abb. 66:
Nachweis der Zytotoxizität mit Trypan blau bei Toner.

Bei sehr niedrigen Tonerkonzentrationen (bis $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) blieb die Zellvitalität über die Expositionszeiträume von 24, 48 und 72 Stunden unbeeinflusst, wie in **Abb. 66** dargestellt ist. Ein Einfluss auf die Vitalität der Zellen konnte bei steigenden Konzentrationen (ab $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) gezeigt werden. Hierbei wurde ein zytotoxisches Potential nach einer Expositionszeit von 24 Stunden gegenüber Toner mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ermittelt. Die Vitalität der Zellen sank hierbei im Vergleich zur Kontrolle auf 65,7 % ($p \leq 0,05$). Die höchsten zytotoxischen Effekte ergaben sich nach 48 Stunden bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Hier konnte nur noch eine Zellvitalität von 51,1 % mit $p \leq 0,05$ ermittelt werden. Im Anhang 4 befindet sich die Wertetabelle 4 für Toner. Sehr auffällig ist ein Anstieg der vitalen Zellen bei einer Partikelkonzentration von $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

4.4.4 Carbon black

Carbon black, unter Abschnitt 1.2.3 eingehender erläutert, zeigte einen tendenziellen Abfall der Zellvitalität nach allen Expositionszeiten. Obwohl die Nanopartikel Titan-dioxid und Carbon black im gleichen Größenbereich liegen, wie die REM-Untersuchungen unter Abschnitt 3.3.2 und 4.2.2 zeigten, kam es bei Carbon black im Gegensatz zu Titandioxid zu deutlicheren Reaktionen. Ein starker Einfluss auf die Zellvitalität zeigte sich besonders nach der 24-stündigen Expositionszeit. Bei mittleren (5 und $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und hohen Konzentrationen (100 und $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) kam es zu einer deutlichen Verminderung der Zellvitalität (vgl. **Abb. 67**). Dabei sank die Vitalität der Zellen auf 66,9 % ($p \leq 0,05$) bei $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. auf 64,4 % ($p \leq 0,05$) bei $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Eine hohe Zytotoxizität wurde durch eine Partikelkonzentration von $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ausgeübt. Hier fiel die Zellvitalität auf 45,5 % ($p \leq 0,01$). Auch nach den Expositionszeiten von 48 und 72 Stunden wurde gegenüber der hohen Partikelkonzentration von $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Verminderung der vitalen Zellen sichtbar (69,9 % mit $p \leq 0,05$ nach 48 Stunden sowie 54,3 % mit $p \leq 0,05$ nach 72 Stunden; siehe auch Wertetabelle 5 im Anhang 4).

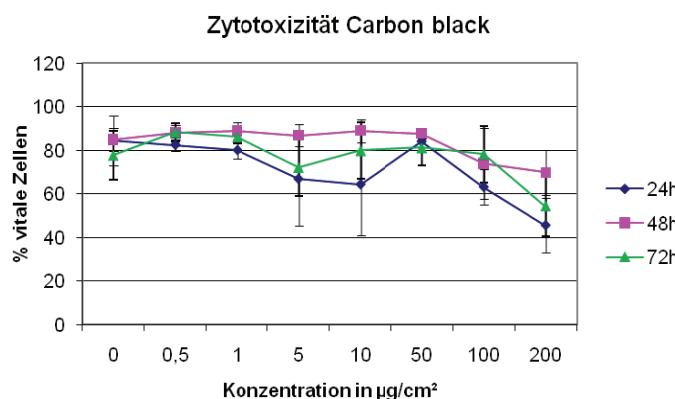


Abb. 67:
Nachweis der Zytotoxizität mit dem Trypan Blau-Färbetest bei Carbon black.

Bei der Exposition mit Carbon black finden sich ähnliche Verläufe wie bei Toner. Die zytotoxischen Effekte von Konzentrationen bis zu $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ der Partikel Carbon black und Toner sind bei geringen Konzentrationen klein, steigen jedoch bei sehr hohen Konzentrationen an ($100-200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Bei hohen Konzentrationen ist die Zytotoxizität beider Partikel (vor allem bei Carbon black) vergleichbar mit Krokydolith.

4.5 Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen

Um die Freisetzung intrazellulärer Radikale bestimmen zu können, wurde eine Fluoreszenzmessung mit H₂DCF-DA durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einer Menge von 5 μg Fasern bzw. Partikeln je cm^2 . Getestet wurde in den Zeitabschnitten von 15, 30 und 45 Minuten sowie 1, 3, 6 und 12 Stunden. Dabei sollte gezeigt werden, welche Auswirkungen sowohl die Asbestfasern (Krokydolith, Chrysotil) als auch die Partikel (Toner, Carbon black, Titandioxid) bereits in geringen Konzentrationen auf die Zellkultur haben. Zusätzlich sollte die Toxizität von Fasern und Partikeln verglichen werden.

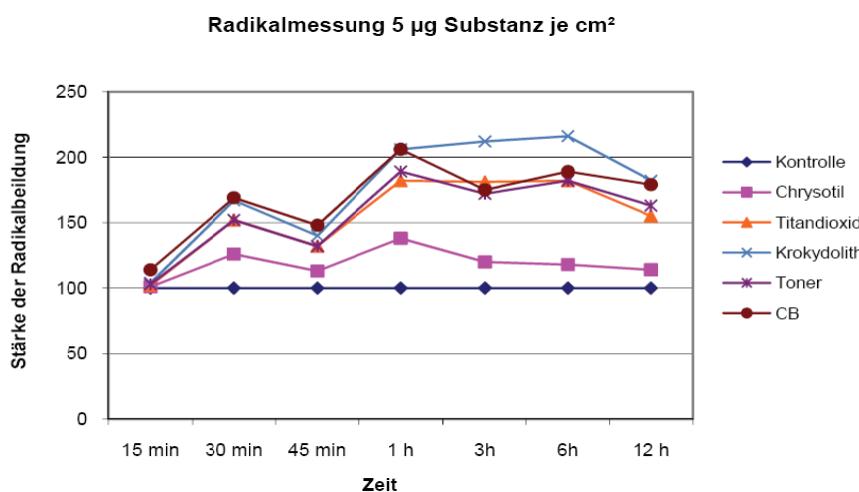


Abb. 68:
Nachweis der intrazellulären ROS-Produktion mit dem Farbstoff H₂DCF-DA bei verschiedenen Fasern und Partikeln über unterschiedliche Zeiträume bei einer jeweiligen Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

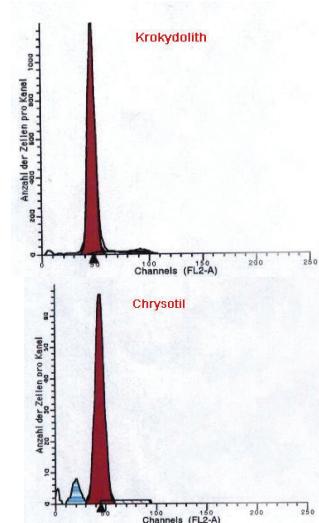
Ergebnisse

Zu Beginn ist für alle Fasern und Partikel, wie **Abb. 68** zeigt, ein Anstieg der Kurve nach 30 Minuten mit unterschiedlicher Intensität erkennbar. Nach 45 Minuten kam es zu einem Abfall der Radikalbildung, jedoch nicht zurück auf das Ausgangsniveau. Nach 1 Stunde konnte bei allen Fasern und Partikeln ein erneuter, jedoch auch erhöhter Anstieg der Radikale dargestellt werden. Sehr auffällig ist eine starke Radikalfreisetzung nach Krokydolithexposition, die während 1 Stunde anstieg und ihr Maximum nach 6 Stunden erreicht hat, um anschließend wieder deutlich zu sinken. Im Vergleich zu den anderen Partikeln und Fasern (Toner, Carbon black, Titandioxid sowie Chrysotil) war bei der Asbestfaser Krokydolith die höchste Radikalbildung festzustellen.

Das Maximum der Radikalfreisetzung bei Titandioxid, Toner, Carbon black und Chrysotil wurde nach 1 Stunde erreicht. Die Bildung der Radikale bei Chrysotil war im Vergleich zu den anderen Substanzen am schwächsten ausgeprägt und begann bereits nach 1 Stunde wieder deutlich unter das Niveau der anderen Partikel zu sinken. Titandioxid, das eigentlich als Negativkontrolle eingesetzt wurde, erreichte nach 1 Stunde sehr hohe Werte hinsichtlich der Radikalbildung. Allerdings besitzt Titandioxid eine sehr starke Eigenfluoreszenz, die einen hohen Einfluss auf die Messwerte nimmt, wodurch die reine Reaktion dieser Partikel mit den Zellen schlecht zu beurteilen war. Toner und Carbon black zeigen einen gleichförmigen Kurvenverlauf, d. h. die 3T3-Zellen weisen Ähnlichkeiten hinsichtlich der Radikalproduktion auf. Obwohl die Radikalbildung bei Carbon black etwas stärker ausgeprägt ist als bei Toner und Titandioxid, liegt sie jedoch im Vergleich zu Chrysotil deutlich höher. Nach 1 Stunde kam es zu einem leichten Abfall der Radikalbildung bei Carbon black und Toner, blieb dann aber bis zu 12 Stunden auf einem ähnlich hohen Niveau. Nach 12 Stunden lag die Menge der gebildeten Radikale bei den Substanzen auf einem ungefähr gleich hohen Stand. Die Daten aus den einzelnen Versuchen bzw. die daraus im Verhältnis berechneten Werte, wie bereits unter Abschnitt 3.8 erklärt, sind im Anhang 5 (Tab. 7 und 8) aufgelistet. Die Signifikanz wurde für beide Versuchsdurchgänge separat anhand der Rohdaten berechnet (vgl. Anhang 5, Tab. 9). Dabei ergab sich für beide Versuchsdurchführungen eine statistische Signifikanz nach 30 Minuten für Titandioxid, Krokydolith, Toner und Carbon black. Auch nach 1 Stunde und 3 Stunden im 1. Versuchsdurchgang sowie nach 6 und 12 Stunden in der Wiederho-

lung zeigte sich für Titandioxid, Krokydolith, Toner und Carbon black eine statistische Signifikanz.

4.6 Induktion von Apoptose durch Fasern und Partikel



Die Analyse der Apoptose wurde mittels FACS durch eine Annexin V-FITC-Färbung durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.7). Die Induktion der Apoptose durch die Asbestfasern Krokydolith und Chrysotil wurde bereits in Vorversuchen mit Rinderfibroblasten untersucht (wie die **Abb. 69** und die Abbildungen 2-5 im Anhang 6 darstellen). Dabei wurden eine Expositionszeit von 6 und 12 Stunden sowie eine Konzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ gewählt. Für Chrysotil wurde im Gegensatz zu Krokydolith nach 12 Stunden Exposition eine erhöhte Apoptoseinduktion ermittelt.

Abb. 69:

Apoptoseinduktion in den 3T3-Zellen durch Krokydolith und Chrysotil nach einer Expositionszeit von 12 Stunden bei einer Konzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Tab. 5: Prozentuale Verteilung frühapoptotischer, spätapoptotischer, nekrotischer und vitaler 3T3-Zellen nach FACS-Analyse mit Durchflusszytometrie \pm Standardabweichung.

Die Exposition gegenüber den verschiedenen Fasern und Partikeln erfolgte über 24 Stunden. Für die Expositionen wurden für Cisplatin $100 \mu\text{M}$, für Chrysotil $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eingesetzt. Die Expositionen mit Krokydolith, Titandioxid, Toner und Carbon black erfolgten mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

(Anzahl der Versuche n = 4)

	Frühapoptotisch (Annexin pos.) [%]	Spätapoptotisch (Annexin/PI pos.) [%]	Nekrotisch (PI pos.) [%]	Vitale (ungefärbte) [%]
Kontrolle	$0,9 \pm 0,4$	$3,2 \pm 3,1$	$8,9 \pm 3,8$	87 ± 4
Cisplatin	$0,4 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,6$	$12,5 \pm 3,5$	$86,2 \pm 3,1$
Chrysotil	$0,4 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,3$	$10,4 \pm 3,5$	$88,8 \pm 3,3$
Krokydolith	$0,3 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,2$	$12,7 \pm 3,1$	$86,9 \pm 2,9$
Titandioxid	$1,4 \pm 1,7$	$2,7 \pm 3,9$	$10,5 \pm 3,8$	$85,4 \pm 9,2$
Toner	$1,7 \pm 2,2$	$0,9 \pm 1,1$	$11,7 \pm 4,9$	$85,7 \pm 4,4$
Carbon black	$1,1 \pm 0,8$	$2,7 \pm 2,9$	$10,1 \pm 2,9$	$86,2 \pm 6,2$

Die Apoptoseinduktion in den Versuchen mit der Fibroblastenzelllinie 3T3 war bei den verschiedenen Fasern und Partikeln gering. Sowohl die apoptotischen als auch die nekrotischen Effekte in den Zellen innerhalb eines Gates waren minimal. Das Schädigungsmuster der betrachteten Zellen lag insgesamt zwischen 13,1 % und 14,6 %. Die prozentuale Verteilung frühapoptotischer, spätapoptotischer und nekroti-

Ergebnisse

scher Zellen ist in **Tab. 5** gegenübergestellt. Eine Darstellung der absoluten Werte findet sich im Anhang 7, Tabelle 10.

Im Vergleich zur Kontrolle kam es zu einer Induktion von Apoptose bei Toner mit einem Anteil von 1,7 % frühapoptotischer Zellen (**Abb. 70**) sowie bei Titandioxid und Carbon black mit einem Anteil der frühapoptotischen Zellen von 1,4 % bzw. 1,1 %. Die Asbestfasern Krokydolith und Chrysotil sowie das Cisplatin zeigten genauso wie die Kontrolle keine Erhöhung frühapoptotischer Zellen. Alle Analysen hinsichtlich der frühen Apoptose waren nicht statistisch signifikant (vgl. Tab. 11 im Anhang 7).

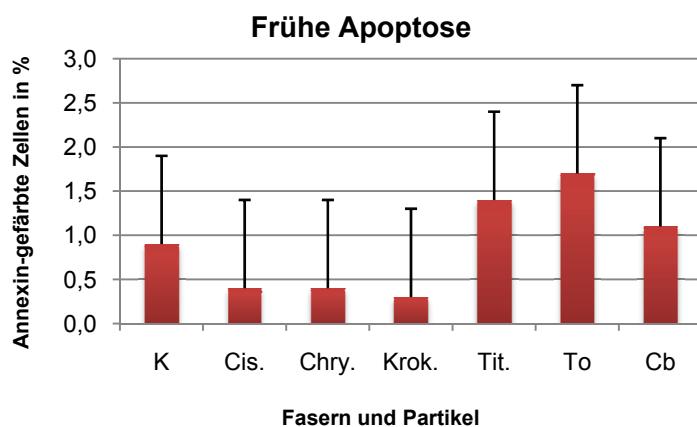


Abb. 70:

Prozentualer Anteil Annexin-gefärbter 3T3-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation bei einer Konzentration von 10 µg/cm².

K =Kontrolle
Cis. = Cisplatin
Chry. = Chrysotil
Krok. = Krokydolith
Tit. = Titandioxid
To = Toner
Cb = Carbon black

Der Anteil spätapoptotischer Zellen (**Abb. 71**) fiel nur sehr gering aus und war, wie bei der Kontrolle, nicht erhöht. Bei der Kontrolle erreichte der Anteil spätapoptotischer Zellen 3,2 %. Im Vergleich dazu betrug der Anteil spätapoptotischer Zellen bei Carbon black und Titandioxid 2,7 %. Bei Cisplatin und Toner konnte nur ein Anteil von 0,9 % spätapoptotischer Zellen ermittelt werden. Chrysotil und Krokydolith wiesen nur geringe Werte von 0,4 % bzw. 0,2 % auf. Die Ergebnisse der Analyse spätapoptotischer Zellen zeigten im t-Test keine statistische Signifikanz.

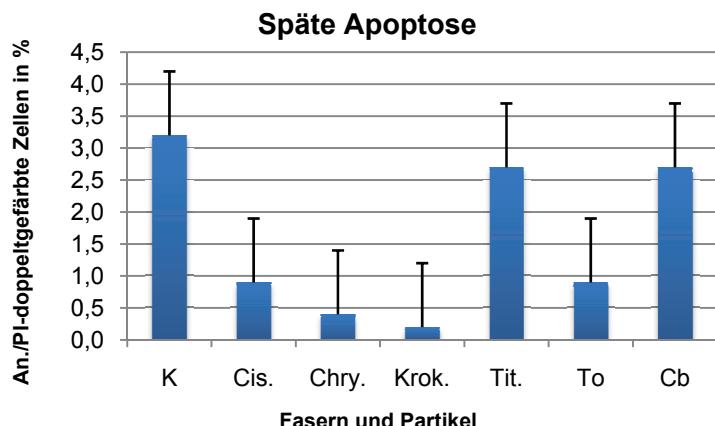


Abb. 71:
Prozentualer Anteil Annexin-/PI-doppelgefärbter 3T3-Zellen nach einer Exposition mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ über 24 Stunden.

K =Kontrolle
Cis. = Cisplatin
Chry. = Chrysotil
Krok. = Krokydolith
Tit. = Titandioxid
To = Toner
Cb = Carbon black

Der Anteil nekrotischer Zellen (**Abb. 72**) lag im Vergleich zur Kontrolle bei allen Fasern und Partikeln bei über 10 %. Dabei zeigten Cisplatin und Krokydolith die höchste Nekroseinduktion mit 12,5 % bzw. 12,7 %. Bei Chrysotil lag der Anteil nekrotischer Zellen bei 10,4 %. Allerdings ergab sich für Titandioxid eine ebenso hohe Nekoserate. Bei Toner ist der hohe Anteil nekrotischer Zellen mit 11,7 % sehr auffällig. Bei Carbon black wurden dagegen nur 10,1 % ermittelt. Die Analyse der nekrotischen Zellen war mit $p > 0,05$ für alle Fasern und Partikel nicht statistisch signifikant (Anhang 7, Tab. 11).

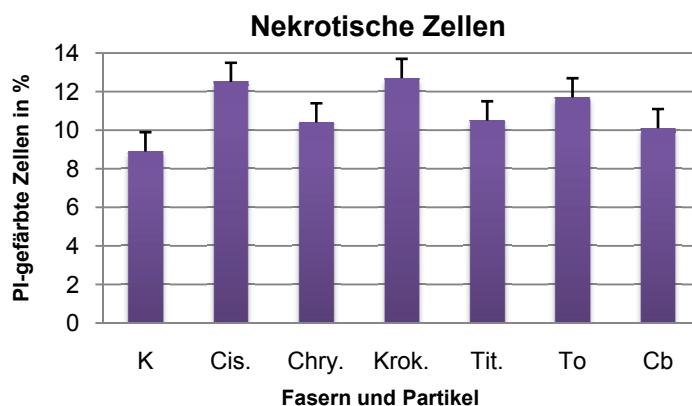


Abb. 72:
Prozentualer Anteil PI-gefärbter 3T3-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

K =Kontrolle
Cis. = Cisplatin
Chry. = Chrysotil
Krok. = Krokydolith
Tit. = Titandioxid
To = Toner
Cb = Carbon black

Bei allen Substanzen (Fasern und Partikel) war der Anteil nekrotischer Zellen im Vergleich zu den Kontrollen um 1,2 % bis 3,8 % höher. Durch den sehr kurzen Proliferationszyklus werden apoptotische Zellen sehr schnell verdrängt, so dass in den Ergebnissen die Auswirkungen deutlich geringer ausfielen als erwartet.

Insgesamt betrachtet, war der Anteil nekrotischer Zellen im Vergleich zu den früh- und spätapoptotischen Zellen am höchsten. Der Anteil frühapoptotischer, annexin-gefärbter Zellen war bei allen Substanzen - ausgenommen Toner - geringer als der Anteil spätapoptotischer, doppelgefäßrbter Zellen.

5 Diskussion

5.1 Auswirkungen der Inhalation von Fasern und Partikeln auf exponierte Arbeitnehmer

Die Asbestose wird definiert als eine bilaterale, diffuse, interstitielle Fibrose der Lunge, die durch die Inhalation von Asbestfasern verursacht wird. Die diffuse interstitielle Fibrose erscheint im fortgeschrittenen Fall wie eine interstitielle Pneumonie, aber auch das Vorhandensein von Asbestkörperchen ist ein entscheidendes Merkmal für die Diagnose der Erkrankung [Mossman und Churg, 1998].

In allen drei untersuchten Patientenfällen ließen sich Asbestfasern in der Lunge nachweisen, die offensichtlich zu der Entstehung einer Asbestose führten. Besonders im 1. Fall war die Asbestose sehr stark ausgeprägt. Starke Entzündungszellansammlungen mit fibrotischer Umwandlung des Lungengewebes führten zu einer respiratorischen Insuffizienz des Patienten. Durch die Minderbelüftung der Lunge entstanden emphysemartige Vergrößerungen. In der Folge traten starke Verschleimungen auf, an denen der Patient, aufgrund seiner eingeschränkten Lungenfunktion, wahrscheinlich erstickte.

Ein reichliches Vorkommen an Asbestfasern und Asbestkörperchen konnte im 1. Fall nachgewiesen werden. Im Allgemeinen unterliegt das Verhältnis von Asbestkörperchen zu Asbestfasern starken Schwankungen. Je länger sich die Fasern in der Lunge befinden und je größer die aufgenommene Fasermenge und Faserlänge ist, desto mehr Asbestkörperchen werden gebildet [Konietzko und Teschler, 1992; Dodson et al., 2003]. Chrysotil gilt als eher schlechter Asbestkörperchenbildner und wird als gering lungenpathogen eingestuft [Mossman und Churg, 1998; Gillissen et al., 2006]. Amphibole Fasern (z.B. Krokydolith) neigen dagegen stärker zur Bildung von Asbestkörperchen und werden im Gegensatz zu Chrysotil nicht abgebaut. Die amphibolen Fasern verbleiben in der Lunge oder werden in Abhängigkeit von ihrer Größe in andere Gewebe transportiert [Schmolz, 1989]. Mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenanalyse (EDX) wurden in den eigenen Analysen der Lungenpräparate mit den enthaltenen Asbestfasern gleichzeitig die Elemente Eisen (Fe) und Silizium (Si) nachgewiesen. Im 1. Fall konnte darüber hinaus Magnesium (Mg) in den Lungenproben ermittelt werden. Es wäre daher möglich, dass der Patient aus dem 1. Fall verstärkt verschiedenen Asbestfasern, vor allem Krokydolith und Chrysotil, ausgesetzt

war, so dass es zu einer Mischasbestose kam. Chrysotil wird jedoch im Laufe der Jahre abgebaut. Aus dem Chrysotilgerüst, vor allem nach der zellulären Aufnahme, werden die Magnesiumbestandteile herausgelöst [Schmolz, 1989]. Im Verlauf vieler Jahre sind die Chrysotilfasern dann nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu können Krokydolithfasern nicht abgebaut werden [Schmolz, 1989; Konietzko und Teschler, 1992]. Diese Fasern ließen sich besonders im 1. Fall anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Abbildungen gut darstellen, obwohl der Autopsiebericht des Patienten keine Aussage darüber gab, ob und wie lange der Patient gegenüber Asbest exponiert war. Es wurde nur eine Silikose erwähnt. Diese kann in seiner Tätigkeit in den Fliesenwerken begründet sein. Die Ursache der Asbestose könnte daher mit der beruflichen Exposition zusammenhängen. Vermutlich war er mit der Herstellung von Fugenmaterial beschäftigt, was die Asbestose auslöste. Die Beteiligung an der Herstellung der Fliesen könnte eine Ursache der Silikose sein. Da eine genaue berufliche Anamnese nicht mehr herauszufinden war, bleiben hier nur Spekulationen. Aufgrund der eigenen Analysen liegt die Vermutung nahe, dass der Patient überwiegend gegenüber Amphibolfasern exponiert war. Selbst wenn der Patient nicht sehr lange mit Asbest oder asbesthaltigen Stoffen gearbeitet hat, muss er aufgrund des hohen Asbestfaser- und Asbestkörperchengehaltes der Lunge hohen Asbestdosen ausgesetzt gewesen sein.

Obwohl im 2. und im 3. Fall nichts über die berufliche Anamnese der beiden Patienten bekannt ist, waren beide Patienten gegenüber Asbest exponiert. In beiden Fällen wurde mittels EDX kein Magnesium in den Lungenproben ermittelt, sondern nur Eisen und Silizium, so dass vermutlich eine überwiegende Amphibolexposition vorlag. Die Anzahl der Asbestfasern und -körperchen war im 2. Fall allerdings am geringsten, so dass dieser Patient möglicherweise nur sporadisch gegenüber dem Asbest exponiert war. Aus seiner Anamnese ist bekannt, dass der Patient zuvor wegen eines Bronchialkarzinoms operiert wurde. Die Ursache dafür könnte in Zusammenhang mit der Asbestexposition stehen. Das Bronchialkarzinom könnte durch einen möglichen Zigarettenabusus und evtl. genetische Dispositionen begünstigt worden sein [Gillissen et al., 2006].

Da für den 3. Fall kein Patientenbericht zur Verfügung stand, können auch hier nur Spekulationen vorgenommen werden. Aufgrund der hohen Dichte von Asbestfasern

und -körperchen muss der Patient in diesem Fall hohen Asbestfaserdosierungen ausgesetzt gewesen sein.

Speziell im 1. und 2. Fall zeigten sich neben den Asbestansammlungen auch Ablagerungen ungefärbter schwarzer Partikel. Möglicherweise kam es sowohl im 1. als auch im 2. Fall durch die Ablagerung von zwei Staubarten (Asbest und Rußpartikel) zu einer Triggerung der Lungenerkrankung. Denn wie es aus dem pathologischen Bericht des 1. Falles und auch anhand der lichtmikroskopischen Bilder hervorging, litt der Patient unter einer starken Lungenfibrose. Diese wies zudem Ähnlichkeiten mit einer massiven Pneumonie auf.

Mit Hilfe der EDX im Rasterelektronenmikroskop (REM) konnten besonders im 1. und 2. Fall, aber auch im 3. Fall, hohe Mengen des Elementes Kohlenstoff nachgewiesen werden. Kohlenstoff ist ein typischer Bestandteil von Rußen. Bei allen Patienten konnte eine zusätzliche Partikel- oder Staubexposition anamnestisch nicht eruiert werden. Es ist außerdem nicht bekannt, ob die Patienten Raucher oder Nichtraucher gewesen sind. Die Analyse von Kohlenstoff und auch das Erscheinungsbild der schwarzen Partikel in der Lunge der Patienten (Anthrakose), besonders im 1. Fall, geben deutliche Hinweise darauf, dass es sich um Rußpartikel handelt. In den Untersuchungen von Boland et al. (1999) sind humane bronchiale Epithelzellen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht worden, nachdem sie gegenüber Partikeln aus Dieselabgasen exponiert wurden. Dabei konnten ebenfalls schwarze Partikel intrazellulär dargestellt werden. Die Ursache für die gefundenen partikulären Ablagerungen in den drei Patientenfällen könnte in der beruflichen Staubbela stung, wie sie vor allem in der Industrie besteht, zu finden sein. Darüber hinaus ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass alle Patienten Raucher gewesen sind. Somit könnte es sich ebenso um Rußablagerungen aus dem Zigarettenrauch handeln. Eine weitere Rolle bei der Progression der Erkrankung könnten die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) gespielt haben. Diese sind als Grundbelastung nicht nur im Tabakrauch enthalten, sondern sie finden sich auch in Kohle, in Kraftstoffrußpartikeln (engl. DEP = Diesel Exhaust Particles) und können an Feinstaubpartikel gebunden sein. Die PAK besitzen ein mutagenes Potential und sind potentielle Kanzerogene. Auch in dem Bericht von Xia et al. (2004) wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass besonders die an Dieselabgaspartikel (DEP) oder

ultrafeinen Partikel gebundenen aromatischen Kohlenwasserstoffe für eine hohe Zelltoxizität verantwortlich sind.

Da die Patienten in jedem Fall Rußpartikeln ausgesetzt waren, konnten sich die Rußpartikel zusätzlich zum Asbest in der Lunge ablagern. Dementsprechend sind die Patienten möglicherweise auch mit PAK in Berührung gekommen, wodurch die Progression der Lungenerkrankungen bzw. der Asbestose wahrscheinlich verstärkt wurde und sich bei dem Patienten im 2. Fall ein Bronchialkarzinom entwickelte.

5.2 Vergleich der unterschiedlichen zellulären Wirkung von Fasern und Partikeln

Um die zelluläre Aufnahme der Fasern und Partikel zu untersuchen, wurden Fibroblasten gegenüber Krokydolith- und Chrysotilasbest sowie Tonerpartikeln exponiert. Bei den eigenen durchgeführten Experimenten konnte in der REM im Vergleich zur Kontrolle nach der Expositionsdauer von 24 Stunden gegenüber Krokydolith eine Veränderung der Morphologie der Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu blieb die Morphologie der Zellen nach Chrysotilexposition unverändert. In der TEM-Aufnahme wurde die Abkapselung der Fasern sowohl nach Krokydolith- als auch nach Chrysotilexposition deutlich.

Renwick et al. (2001) konnten über Mikrofotografie die Aufnahme von ultrafeinem Carbon black (ufCB) durch Makrophagen beobachten. In den eigenen Versuchen wurde die Partikelaufnahme am Beispiel des Toners untersucht. Dieser ist im Gegensatz zu Carbon black den Feinstaubpartikeln zuzuordnen. Bereits Furukawa et al. (2002) untersuchten die Aufnahme von Toner durch Makrophagen nach einer Expositionszeit von 18 Stunden und konnten durch REM- und TEM-Aufnahmen die Lokalisation des Toners im Zytoplasma der Zellen belegen. In den eigenen Experimenten war der Toner nach der Aufnahme durch die 3T3-Zellen ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert. Auch hier waren sowohl der Zellkern als auch die Zellorganellen (Mitochondrien und Endoplasmatische Retikula) nicht beeinträchtigt. Auch Bhattacharya (2008) demonstrierte in seinen Experimenten mit Lungenfibroblasten, dass der Zellkern und die Zellorganellen nach der Aufnahme von Feinpartikeln und ultrafeinen Partikeln nicht beeinträchtigt werden. Bei seinen *in vitro* Versuchen stellte er auch fest, dass die Feinpartikel und agglomerierten Nanopartikel über eine Umschließung

durch Filopodien (zytoplasmatische Ausstülpungen der Zelle) in das Zellinnere aufgenommen wurden. Somit kam es zu einer Phagozytose durch Pseudopodien und einer Invagination der Fremdkörper. Diese sind in Taschen an der Zelloberfläche konzentriert und locker gebunden.

5.2.1 Vergleich der Zytotoxizität durch die verschiedenen Fasern und Partikel

Bei den Zytotoxizitätsversuchen mit den 3T3-Zellen zeigten die Fibroblasten unterschiedliche Reaktionen nach der Exposition gegenüber den verschiedenen Fasern und Partikeln. Die ermittelte Zytotoxizität war sowohl bei der Asbestfaser Krokydolith als auch bei den Partikeln Toner und Carbon black am stärksten. Im Gegensatz dazu zeigte Titandioxid nur geringe zytotoxische Auswirkungen auf die Fibroblasten.

In den eigenen Versuchen konnte nach der Exposition der Zellen gegenüber hohen Krokydolithkonzentrationen ein starker Abfall der Zellvitalität beobachtet werden. Die Zellen zeigten sich gegenüber geringen Faserkonzentrationen jedoch eher unbeeinträchtigt. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Hong et al. (1997) bei den Versuchen mit Hamsterlungenfibroblasten (V79) und stellten nach 24 Stunden eine dosisabhängige Induktion der Zytotoxizität durch Krokydolith fest. Sie ermittelten nach einer Krokydolithkonzentration von 20 µg/ml nur noch $49,8 \times 10^4$ vitale Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit $87,8 \times 10^4$ vitalen Zellen.

Ebenso ähneln die Ergebnisse der eigenen Experimente den Versuchen von Craighead et al. (1980) sowie Chang et al. (1983), die bereits in den achtziger Jahren die zytotoxischen Effekte von Asbest auf Fibroblasten nachwiesen [Craighead et al., 1980; Chang et al., 1983]. Im Falle von Chang et al. (1983) zeigte sich jedoch auch, dass die Expositionen gegenüber Krokydolith und Chrysotil zu einer Stimulation der DNA-Synthese führten. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml konnte nach 28 Stunden eine verstärkte Proliferation der Fibroblasten beobachtet werden. In den eigenen Versuchen wurde die Proliferation nur indirekt gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die Proliferation der 3T3-Zellen zunächst konstant blieb, dann jedoch bei einer hohen Konzentration von $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sehr stark sank. In den eigenen Versuchen konnte bei dem Vergleich der Asbestfaser Krokydolith mit den Partikeln Toner und Carbon black beobachtet werden, dass die Zellen bei niedrigen Partikelkonzentrationen zur Proliferation angeregt wurden. Im Gegensatz dazu induzierten hohe

Asbestfaser- und Partikelkonzentrationen, in Abhängigkeit von der Zeit, ihrer Struktur und chemischen Zusammensetzung, ungefähr eine gleich hohe Zytotoxizität. Obwohl Toner den Feinpartikeln und Carbon black den ultrafeinen Partikeln zuzuordnen ist, waren die zytotoxischen Auswirkungen bei beiden Partikeln bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ gleich hoch. Es war jedoch auffällig, dass es bei einer Konzentration von $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei Toner, im Gegensatz zu Carbon black, zu einem erneuten Anstieg der Proliferation kam. Da es sich, wie bereits erwähnt, bei dem Toner um einen Feinstaubpartikel handelt, der sich in seiner Struktur und Zusammensetzung vom ufCB unterscheidet, wurde in den 3T3-Zellen ein Proliferationsschub ausgelöst. Auch Gminski et al. (2008) untersuchten die Zytotoxizität von Toner an Lungenepithelzellen (A549). Dabei ermittelten sie nach 24 Stunden eine Zytotoxizität bei einer Konzentration von $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität konnte ebenso durch Lin (1999) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnten Furukawa et al. (2002) keine Zytotoxizität feststellen, nachdem sie Rattenalveolarmakrophagen *in vivo* über 18 Stunden gegenüber Tonerkonzentrationen bis $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ exponierten. Keine schädigenden Auswirkungen fanden sich auch bei Möller et al. (2002) bei Versuchen mit Rattenalveolarmakrophagen. Sie beobachteten eine erhöhte Zytotoxizität in den Alveolarmakrophagen des Meerschweinchens nach der Exposition gegenüber Tonerkonzentrationen von $120 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen}$. Jedoch wurde keines dieser Experimente mit dem Trypan Blau-Test, sondern nur mit dem LDH-Test durchgeführt. In der Literatur waren allerdings keine Studien, die den Nachweis der Zytotoxizität von Toner mittels Trypan Blau-Test prüften, aufzufinden. Darüber hinaus wurden bei sämtlichen Versuchen keine Fibroblasten, sondern Makrophagen, Epithelzellen und Mesothelzellen verwendet. Somit kann kein Vergleich zu den eigenen Ergebnissen gezogen werden.

In den eigenen durchgeführten Versuchen verhielt sich die Zellvitalität der Fibroblasten nach der Exposition gegenüber Carbon black, ähnlich wie nach der Exposition gegenüber Toner. Im Vergleich zu den eigenen Experimenten mit Carbon black, untersuchten Renwick et al. (2001) ebenfalls die Zytotoxizität von ufCB in Mäusemakrophagen (J774-Zellen). Dabei konnten sie eine signifikante Zytotoxizität nach 48 Stunden bei einer Konzentration von $78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nachweisen. Auch Monteiller et al. (2007) fanden in ihren Versuchen mit A549-Zellen eine leicht erhöhte Zytotoxizität bei geringen Konzentrationen (bis $62 \mu\text{g}/\text{ml}$). Dabei zeigten sich jedoch keine Auswir-

kungen auf die Zellproliferation. In den Versuchen von Don Porto Carero et al. (2001) mit A549-Zellen konnte die Zytotoxizität des Carbon blacks jedoch nicht bestätigt werden. Die Studien, sowohl zu Toner als auch zu Carbon black, wurden fast ausschließlich mit Makrophagen und nicht, wie in den eigenen Versuchen, mit Fibroblasten durchgeführt. Somit ist auch eine zell- und artspezifische Reaktion denkbar. Fibroblasten sind anscheinend robuster als Epithelzellen und Makrophagen und reagieren mit einer erhöhten Proliferation nach Faser- und Partikelexposition, was auch die Fibrose der Lunge erklären könnte. Sie weisen aber auch, wie die Makrophagen, bei hohen Faser- und Partikelkonzentrationen eine Abnahme der Zellvitalität auf. Anhand der eigenen Ergebnisse zeigte sich, dass nicht nur Krokydolith starke zytotoxische Wirkungen auf die Zellen hat. Auch Toner und Carbon black weisen bei hohen Konzentrationen und nach längerer Expositionszeit eine deutliche Zytotoxizität auf, die mit der Stärke von Krokydolith vergleichbar ist. Bei dem Vergleich von Carbon black und Toner mit Titandioxid weist das Titandioxid geringere zytotoxische Wirkungen auf. Ähnliche Ergebnisse konnten Brunner et al. (2006) nachweisen, nachdem 3T3-Zellen über drei Tage gegenüber Titandioxid exponiert wurden. Es wurden in den Versuchen Konzentrationen von 30 µg/ml verwendet. Die Zellvitalität war nur gering reduziert auf 80 %. Eine hohe zytotoxische Auswirkung fand sich auch bei diesen Konzentrationen nach einer Expositionszeit von sechs Tagen. Bei Konzentrationen von weniger als 5 µg/cm² konnte nach 72 Stunden eine größere Anzahl vitaler Zellen ausgezählt werden. Bhattacharya (2008) stellte in seinen Experimenten mit humanen Lungenfibroblasten (IMR-90) zytotoxische Effekte fest, die sich verstärkt bei höheren Titandioxidkonzentrationen von 10 µg/cm² bzw. 50 µg/cm² nach einer Expositionszeit von 24 Stunden und 48 Stunden zeigten. Die Zellvitalität lag nach 24 Stunden nur noch bei 58 %. Die ermittelte Zytotoxizität des Titandioxids könnte auch mit seiner bekannten Phototoxizität zusammenhängen.

5.3 Auswirkungen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf Zellen und Gewebe

Die ROS entstehen unter normalen Bedingungen in der Zelle als Nebenprodukte von Reaktionsprozessen und metabolischen Vorgängen, wie z.B. der Energiegewinnung durch die Mitochondrien.

Die zelluläre Aufnahme von Fasern und Partikeln führt zu einer Steigerung der ROS-Produktion. Diese Überproduktion an ROS (oxidativer Stress) kann zu einer Zellschädigung führen. Um die Stärke der Radikalproduktion der einzelnen Fasern und Partikel zu vergleichen, wurden die 3T3-Zellen gegenüber Asbestfasern (Krokydolith und Chrysotil) sowie Partikeln (Toner, Carbon black, Titandioxid) exponiert.

Bei den Ergebnissen der Versuche war auffällig (**Abb. 68**, Abschnitt 4.5), dass es nach einem anfänglichen Kurvenanstieg nach 30 Minuten zu einem Kurvenabfall nach 45 Minuten kam, der anschließend wieder stieg, um nach einer Stunde sein Maximum zu erreichen. Der Abfall nach 45 Minuten ist möglicherweise erklärbar mit der Eigenreaktion des Farbstoffes in den Zellen. Dieser stellt ebenso einen Schadstoff dar und hat, wenn er zu lange einwirkt, eine ebenso toxische Wirkung. Der erneute Anstieg der Kurven nach 45 Minuten könnte mit der Partikelaufnahme zusammenhängen. Nach einer Stunde sind ausreichend Partikel aufgenommen worden, um eine Radikalproduktion zu induzieren, denn tendenziell kommt es in der Zeit zwischen 15 Minuten und einer Stunde zu einem stetigen Anstieg in der Radikalproduktion, die nach diesem Maximum bei allen Substanzen, bei Krokydolith etwas später, wieder fällt.

In vielen Studien wurde bisher gezeigt, dass es durch die Phagozytose von Asbest zu einer verstärkten Produktion von Radikalen kommt [Bhattacharya et al., 2005; Marczynski et al., 1999; Jaurand, 1997; Quinlan et al., 1994]. In den eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass von den Asbestfasern (Krokydolith und Chrysotil) das Krokydolith am stärksten zur Bildung von ROS neigt. Im Gegensatz dazu war die Bildung von ROS durch Chrysotil nur sehr gering. Es liegt nahe, dass dies durch den hohen Eisengehalt, der ein Bestandteil von Krokydolith ist, verursacht worden sein kann. Dadurch kann eine verstärkte Bildung von Radikalen hervorgerufen werden, wie es aus der Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion (vgl. Abschnitt 1.1.7) hervorgeht [Rahman et al., 2000]. Eine kurze Zusammenfassung der Reaktionen und der damit verbundenen Folgen wird in **Abb. 73** dargestellt.

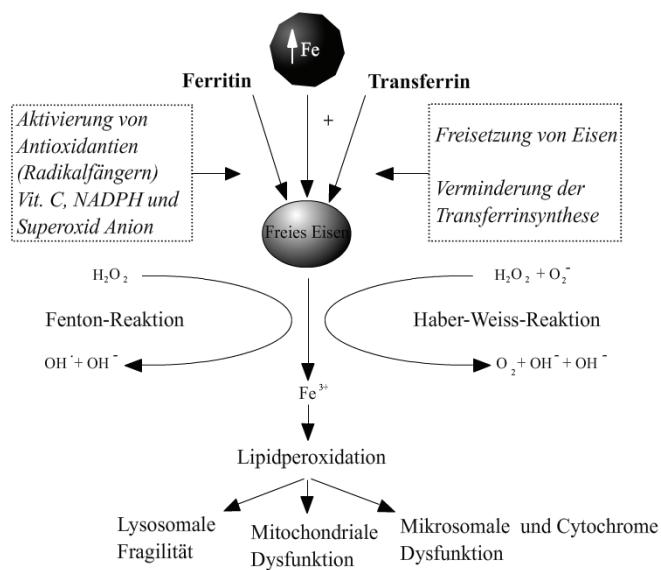


Abb. 73:

Quellen von freiem Eisen in der Lunge und die damit verbundenen oxidativen Reaktionen (NADPH = Nicotinsäure-Amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat) [nach Bhattacharya et al., 2005].

Die Fähigkeit von Krokydolith hohe Mengen an ROS zu produzieren, wurde durch die Oxidation von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) unter Verwendung von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat ($H_2DCF\text{-DA}$) ebenso in den Studien von Liu et al. (2000) sowie Xu et al. (2002) nachgewiesen. Bei der Produktion von ROS durch Asbestfasern kann es sich sowohl um Hydroxylradikale (OH^\cdot) und Wasserstoffperoxid ($H_2\text{O}_2$) als auch um Peroxynitrit (ONOO^\cdot) oder Hyperoxidanionen (O_2^\cdot) handeln [Aam und Fonnum, 2007]. Xu et al. (2002) und Liu et al. (2002) führten ihre Studien mit humanen Hamster-Hybridzellen bzw. Kaninchchenmesothelzellen durch. Wie jedoch der Vergleich von Mesothelzellen und Fibroblasten in den Experimenten von Kopnin et al. (2004) mit Chrysotilfasern zeigt, reagieren verschiedene Zellarten sehr unterschiedlich auf die Asbestfaserexposition. Genau wie in den eigenen Experimenten, konnten Kopnin et al. (2004) nur eine schwache ROS-Bildung nach einer Inkubation der Zellen mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Chrysotil über 6 Stunden ermitteln. Ebenso stellten die Wissenschaftler auch eine verminderte Proliferation der Zellen fest, nachdem diese gegenüber Chrysotil exponiert waren. Im Gegensatz dazu neigten die Zellen in den eigenen Versuchen nicht zu einer Stagnation der Proliferation.

Vergleicht man die Radikalproduktion der Asbestfaser Krokydolith mit den Partikeln Toner und Carbon black, ist ein ähnlich hohes Niveau der ROS-Produktion auffällig. Die stärkste Radikalproduktion wird durch Krokydolith induziert. Im Gegensatz dazu ist die Radikalproduktion nach Chrysotilexposition am geringsten. Die Stärke der Radikalproduktion nach der Exposition gegenüber Toner und Carbon black, aber auch

von Titandioxid lag deutlich über der von Chrysotil. Ebenso sanken die Messwerte von Chrysotil schneller auf das Ausgangsniveau zurück. Die beobachtete, starke ROS-Produktion durch Titandioxid könnte an der Eigenfluoreszenz des Titandioxids liegen. Die erhöhte Radikalbildung nach der Exposition gegenüber Titandioxid wurde auch in den Experimenten von Bhattacharya (2008) mit humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) nachgewiesen. Die Reaktion des Titandioxids sollte in den eigenen Versuchen nur als Negativkontrolle dargestellt werden. Dessen ungeachtet konnten Bhattacharya et al. (2008) in ihren Versuchen eine zytotoxische und auch eine genotoxische Wirkung aufgrund der Radikalbildung nicht ausschließen.

Aam und Fonnum (2007) wiesen *in vivo* mittels H₂DCF-DA nach der Exposition von Ratten gegenüber Carbon black eine dosisabhängige Steigerung der Radikalbildung nach. Dabei erreichte das Carbon black mit einer Konzentration von 20 µg/ml nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden die höchste Intensität in Alveolarmakrophagen. Eine Unterscheidung in Bezug auf feines oder ufCB wurde nicht erwähnt. Wilson et al. (2002) fanden dagegen bei dem Vergleich von feinem und ufCB nur eine erhöhte ROS-Produktion für ufCB. Bei ihren Versuchen exponierten sie, im Gegensatz zu den eigenen Experimenten, humane Makrophagen gegenüber feinem und ufCB mit einer Konzentration von 15,5 µg/ml über eine Dauer von 24 Stunden. Eine Radikalproduktion nach der Exposition gegenüber feinem Carbon black konnte nicht ermittelt werden. In den eigenen Versuchen konnte jedoch eine deutliche ROS-Produktion der 3T3-Zellen nach der Exposition sowohl gegenüber dem ufCB als auch dem Feinpartikel Toner dargestellt werden. Die Auswirkungen der ROS-Produktion werden nachfolgend (vgl. **Abb. 74**) diskutiert.

Das ufCB hat im Verhältnis zu seiner kleinen Masse eine recht große Oberfläche. Im Gegensatz dazu besitzt der Feinpartikel Toner im Verhältnis zu seiner Masse eine sehr kleine Oberfläche. Deshalb konnten weniger Tonerpartikel aufgenommen werden. Dennoch zeigte sich in den eigenen Versuchen, dass die ROS-Produktion von Toner annähernd so hoch ist wie die des ufCB.

Darüber hinaus muss erwähnt werden, dass mit der EDX-Analyse des Toners nur Elemente wie Kohlenstoff nachgewiesen werden konnten. Allerdings wurden vom Hersteller des Toners noch andere Inhaltsstoffe angegeben (vgl. Anhang 2.3). Diese chemischen Bestandteile sind jedoch mit der EDX nicht detektierbar. Außerdem ist die EDX nicht empfindlich genug, um die in Spuren enthaltenen Elemente zu ermit-

teln. Bei den zusätzlich enthaltenen Inhaltsstoffen des Toners handelt es sich, wie bereits in der Einleitung unter Abschnitt 1.2.2.2 aufgeführt wurde, um die flüchtigen organischen Verbindungen Dibutylzinn, Tributylzinn sowie um Schwermetalle, z.B. Cadmium, Blei, Quecksilber und Nickel [Einsiedler et al., 2003]. Diese können ebenso deutliche, gesundheitsschädigende Auswirkungen haben [Stelting, 2003; Müller et al., 2007]. Zeitschriften wie **Öko-Test** und **Computer Bild** haben Untersuchungen durchführen lassen, bei denen festgestellt wurde, dass einige Laserdrucker hohe Mengen dieser Schadstoffe (Styrol, Phenol, Dibutylzinn und Tributylzinn) während des Druckvorganges freisetzen können [Computer Bild 2006; Link, 2001]. Obwohl diese chemischen Verbindungen ebenfalls gesundheitliche Beeinträchtigungen hervorrufen können, sollte jedoch in den eigenen Versuchen nur der reine Partikeleffekt betrachtet werden.

Ein wichtiger Punkt bei der Radikalproduktion ist die ROS-vermittelte Entzündungsreaktion. Dabei führen von außen zugeführte, inhaledierte Schadstoffe wie Zigarettenrauch, Asbest und Partikel zu einer verstärkten ROS-Produktion durch die verschiedenen Zellen (Makrophagen, Neutrophile, Epithelzellen) und es wird eine Lipidperoxidation (vgl. Abb. 74) eingeleitet. Sie spielt eine wichtige Rolle, da die Lipide der Zellmembran, vor allem Phospholipide, einen bedeutenden Angriffspunkt für die ROS darstellen und sehr schnell oxidiert werden [Gossau und Rensing, 2002]. Dabei entstehen Schädigungen der Zellorganellen und -membranen, wodurch u.a. proinflammatorische Mediatoren, wie z.B. Zytokine, freigesetzt werden und eine Entzündung ausgelöst wird.

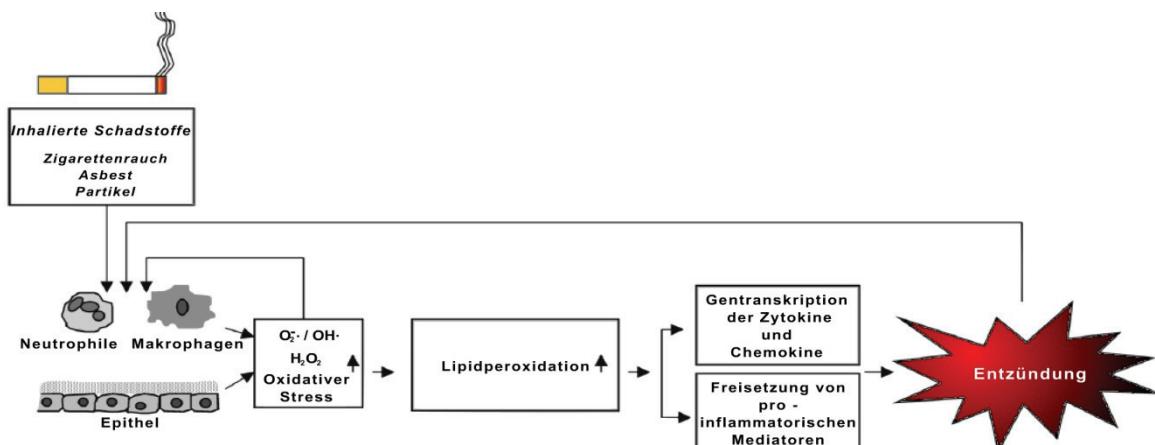


Abb. 74:
Mechanismus der ROS vermittelten Entzündungsreaktion. Die Inflammation wird durch inhaledierte Schadstoffe vermittelt [nach Rahman, 2003].

Dies ist ein möglicher Mechanismus, der zur Induktion der Lungenfibrose und damit zu den Folgeerkrankungen geführt haben könnte, wie sie bei den untersuchten Patientenfällen dargestellt wurden. Nicht nur der mögliche Zigarettenrauch, sondern auch die gefundenen Asbestfasern und Rußpartikel in den Lungen führten zu einer fortwährenden Entzündungsreaktion mit Produktion von ROS. Einen zusätzlichen Beitrag zur Progression der Erkrankungen könnte die durch die Fasern und Partikel eingeleitete Apoptose und Nekrose, oder auch die induzierte Zelltransformationen geleistet haben.

5.4 Induktion der Apoptose

Die Versuche der Induktion von Apoptose durch Asbestfasern (Krokydolith, Chrysotil) und Partikel (Toner, Carbon black, Titandioxid) wurden mittels Annexin V-FITC-/PI-Färbung durchgeführt. Insgesamt war bei den Versuchen auffällig, dass es nach der Exposition sowohl gegenüber den Asbestfasern als auch gegenüber den Partikeln eher zu einer Nekrose kam. Im Gegensatz dazu blieb im Vergleich zur Kontrolle die Induktion der Apoptose gering oder ganz aus. In den Vorversuchen mit Rinderfibroblasten bei einer Exposition gegenüber Chrysotil und einer Asbestfaserkonzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ konnte eine deutliche Apoptoseinduktion ermittelt werden. Dem gegenüber konnte bei Krokydolith keine Apoptose beobachtet werden. Im Vergleich zu den Vorversuchen zeigte sich auch in anderen Studien, dass Asbest zu einer deutlichen Apoptoseinduktion in verschiedenen Zellarten führen kann, wie z.B. in alveolären Epithelzellen [Kamp et al., 2002], in Mesothelzellen [Liu et al., 2000; Burmeister et al., 2004] und in Alveolarmakrophagen [Hamilton et al., 1996]. Auch Dopp et al. (1995) konnten eine Apoptose induzieren, nachdem sie Hamsterfibroblasten gegenüber einer Chrysotilkonzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ exponiert hatten. Allerdings beobachteten sowohl Broaddus et al. (1996) als auch Goldberg et al. (1997) eine Apoptoseinduktion durch Krokydolithkonzentrationen von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

In den aktuellen Versuchen mit 3T3-Zellen (Mäusefibroblasten) zeigte sich jedoch keine erhöhte Apoptose bei einer Chrysotilkonzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nach der Exposition gegenüber Krokydolith und Chrysotil bestand eine leicht erhöhte Tendenz zur Nekrose der 3T3-Zellen. Die Ursache können speziesspezifische Reaktionen nach der Exposition gegenüber den Asbestfasern sein. Bei den Mäusefibroblasten 3T3 konnte eher eine Nekrose induziert werden. Kopnin et al. (2004) ermittelten nach

einer Exposition von Lungenfibroblasten der Ratte gegenüber den Chrysotilkonzentrationen 5 µg/cm² und 10 µg/cm² überwiegend eine Nekrose. Dies entspricht den Ergebnissen der eigenen Experimente. Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass Fibroblasten, im Gegensatz zu anderen Zellarten, vermehrt zu einer Nekroseinduktion (in Abhängigkeit von der Tierspezies) neigen. Die Nekroseinduktion ist entscheidend für die Entzündungsreaktion. Die Zelltrümmer fördern die Entzündung. Die Apoptose hingegen induziert keine Entzündung, so dass durch die erhöhte Nekrose die Bildung einer Lungenfibrose verstärkt werden kann [Junqueria, L.C. et al., 1996; Bühlung et al., 2000].

Es wäre allerdings auch möglich, dass die verminderte Induktion einer Apoptose und Nekrose mit der hohen Proliferationsrate der 3T3-Zellen zusammenhängt. Da diese nur etwa 18 Stunden beträgt, könnten bereits in Apoptose übergegangene Zellen von den wachsenden Zellen verdrängt worden sein. Besonders deutlich sichtbar wurde dies anhand der Positivkontrolle mit dem stark toxischen Cisplatin. Der Anteil vitaler Zellen der Kontrolle unterschied sich kaum von der Positivkontrolle. Ähnlich verhielt sich auch der Anteil frühapoptotischer Zellen. Die wachsenden Zellen, die dennoch Asbest phagozytiert hatten, blieben äußerlich unverändert. Möglicherweise haben sie eine genetische Veränderung davongetragen, die erst in späteren Proliferationszyklen offensichtlich geworden wäre [Broaddus et al., 1996]. Andererseits besteht die Möglichkeit der kompensatorischen Hyperplasie, d.h. die Zellen ersetzen untergegangene Zellen durch eine verstärkte Proliferation [Goldberg et al., 1997], um die entstandenen Lücken im Zellverband zu schließen.

Die Ergebnisse der Zellversuche nach der Partikelexposition verhielten sich annähernd wie die Ergebnisse der asbestexponierten Zellen. Der Anteil nekrotischer Zellen nach Titandioxid-, Toner- und Carbon black-Exposition war etwa genauso hoch wie bei den asbestexponierten Zellen. Eine minimale Steigerung zeigte sich bei dem Anteil frühapoptotischer Zellen. Demnach könnten die Partikel eher zu einer Induktion der Apoptose in den 3T3-Zellen führen als die Asbestfasern. Dies mag vielleicht auch an dem Verhältnis der Oberfläche zur Masse der Partikel liegen. Bei Toner wurde der höchste Anteil frühapoptotischer Zellen gefunden. Im Falle des Carbon blacks konnten Chin et al. (1998) nach der Exposition von Rattenalveolarmakrophagen gegenüber ufCB keine Apoptose nachweisen. Allerdings konnten Sydlik et al. (2006) eine erhöhte Apoptoserate ermitteln, nachdem sie Rattenlungenepithelzellen

gegenüber 5 µg/cm² und 10 µg/cm² Carbon black exponiert hatten. Sowohl die Apoptose als auch die Induktion der Proliferation erfolgten dosisabhängig, wobei eine Konzentration von 10 µg/cm² die stärkste Apoptoseinduktion herbeiführte.

Nicht nur bei der Induktion der Apoptose, sondern auch bei der Nekrose spielen die Radikale eine wesentliche Rolle. Wie die eigenen Versuche zur Radikalbildung zeigten, kann es nach Faser- und Partikelexposition zu einer starken ROS-Produktion (OH^\cdot , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$) kommen, die einerseits von der chemischen Zusammensetzung [Upadhyay und Kamp, 2003; Liu et al., 2000], andererseits aber auch von der Form und Masse der Fasern und Partikel abhängig ist. Die ROS sind in der Lage, biologische Makromoleküle einschließlich der Proteine und Zellmembranen zu zerstören oder auch Nukleinsäuren zu verändern [Bergamini et al., 2004]. Die Bildung der ROS erfolgt in den Zellen in der Nähe des Zellkerns bzw. der DNA. Dadurch wird 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) gebildet [Vallyathan und Shi, 1997], wodurch Mutationen ausgelöst werden können. Kann diese DNA-Schädigung nicht repariert werden, folgt eine Transformation der Zelle [Upadhyay und Kamp, 2003] oder der Zelltod (Apoptose/Nekrose). Durch die massive Produktion der ROS werden auch die Mitochondrien beeinträchtigt. Durch die Phagozytose von Fremdstoffen werden sie zu einer Überproduktion von ROS angeregt (vgl. **Abb. 75**). Es kommt zu einer Störung des zellulären Metabolismus, da speziell die Asbestfasern nicht oder nur sehr schlecht abgebaut werden können. Da die Produktion von ROS auch im Zytosol der Zellen erfolgt, wird die zelluläre Membran der Mitochondrien angegriffen und sogar zerstört. Dadurch werden intramembranäre Enzyme (z.B. Cytochrom C, Caspase) freigesetzt, welche die Apoptose, wie in **Abb. 75** dargestellt, einleiten.

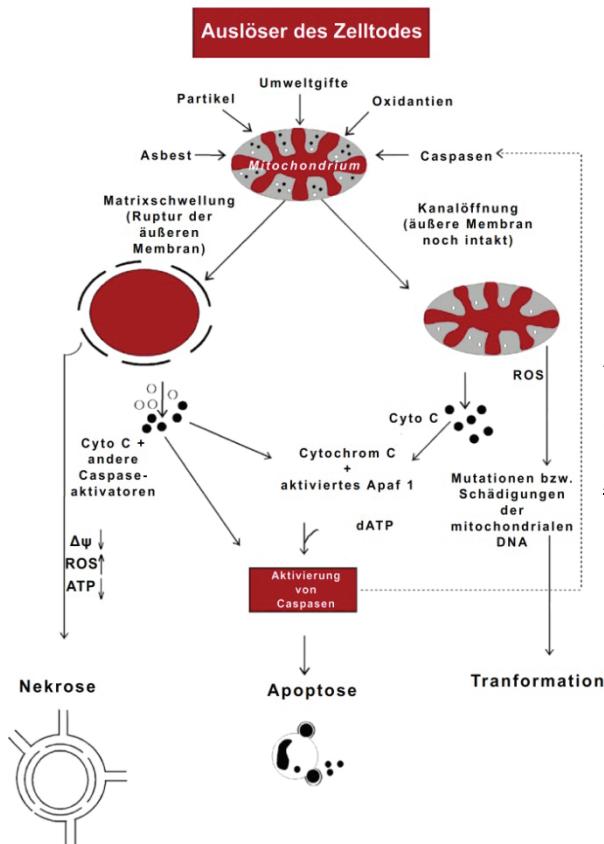


Abb. 75:
Folgen der Einwirkung zellschädigender Faktoren auf das Mitochondrium.

Apoptoseinduzierende Faktoren:

- Cytochrom C in der mitochondrialen Matrix (Regulation der Elektronentransportkette)
- Caspasen (Enzyme, die Apoptose auslösen können)
- Apaf (apoptotic protease activating factor; Aktivierung der Caspasen durch Interaktion mit Cytochrom C)

[Abb. modifiziert nach Kang, 2001 sowie nach Green und Reed, 1998]

Von Verma et al. (2007) wurde weiterhin die Möglichkeit der mitochondrialen Dysfunktion beschrieben. Dabei kommt es u.a. durch die Störung der mitochondrialen Membran zu einer Beeinträchtigung des Elektronentransportes [Panduri et al., 2003], zu einem damit verbundenen Ungleichgewicht des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) sowie zu einer verminderten Energiegewinnung in Form eines ATP-Verlustes. Infolgedessen wird die Nekrose eingeleitet. Die mitochondriale Dysfunktion kann aber auch eine Resistenz gegenüber der Apoptose bewirken [Verma et al., 2007]. Durch die ROS werden Schädigungen an der mitochondrialen DNA hervorgerufen, die zehnmal sensitiver gegenüber genetischen Schädigungen ist als die nukleäre DNA. Dies kann zu einer Störung bzw. Veränderung der Mitochondrien-zu-Nukleus-Kommunikation führen [Delsite et al., 2002; Verma et al., 2007]. Eine solche Veränderung könnte die Transformation einer Zelle zur Folge haben.

Durch die sehr lange Persistenz der Asbestfasern und der Partikel in der Zelle werden vermehrt ROS produziert. Somit ist nicht nur bei den Fasern, sondern auch bei den Partikeln eine gestörte Mitochondrien-zu-Nukleus-Kommunikation denkbar. Obwohl Toner und Carbon black in den eigenen Versuchen keine Apoptoseinduktion

zeigten, konnte dennoch in den Radikalversuchen ein eindeutiger Anstieg von ROS für beide Partikel ermittelt werden. Die starke Bildung von ROS durch die Zellen könnte die Nekrose der Zellen begünstigt haben. Ebenso kann es zu zellulären oder mitochondrialen DNA-Mutationen gekommen sein, die sich allerdings nur durch genetische Analysen bzw. durch Langzeitexpositionen ermitteln lassen.

Obwohl die *in vitro* Versuche nicht unbedingt vergleichbar sind mit Reaktionen *in vivo* [Brunner et al., 2006], bieten die Tests eine Möglichkeit zur Beurteilung der schädigenden Auswirkungen der Partikel.

Für die Untersuchungen wurden Mäusefibroblasten verwendet, da diese ein etabliertes Zellsystem darstellen. Die Fibroblasten sind eine sehr robuste Zellpopulation. Dies wurde vor allem durch eine relativ starke Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion nach einer Kurzzeitexposition von 24 Stunden gegenüber den Asbestfasern und Partikeln deutlich. Möglicherweise reagieren andere Zellen (z.B. Makrophagen, Epithelzellen) empfindlicher. Die in den eigenen Versuchen durch die Fasern und Partikel induzierte Nekrose ist jedoch von entscheidender Bedeutung.

Im Gegensatz zur Apoptose werden bei der Nekrose durch die entstandenen Zelltrümmer proinflammatorische Interleukine und Zytokine freigesetzt. Diese aktivieren Immunzellen (somit auch Fibroblasten) und können die chronische Fibrose, wie z.B. die Asbestose in den untersuchten Patientenfällen, begünstigen [Junqueria et al., 1996; Bühlung et al., 2000].

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, anhand von Patientenbeispielen und Zellkulturversuchen *in vitro*, die zellulären Mechanismen der Krankheitsentstehung nach einer Faser- und Partikelexposition zu untersuchen.

Die energiedispersive Röntgenanalyse mittels Rasterelektronenmikroskopie und die Untersuchungen im Transmissionselektronenmikroskop zeigten, dass die Patienten eindeutig an einer Asbestose litten. Alle drei Fälle wiesen Ähnlichkeiten auf, wobei die Asbestose des 1. Falles am stärksten ausgeprägt war. Die eingetretene Folgeerkrankung des 1. Patienten mit Dyspnoe und pneumonieartigen Symptomen sind typisch für die Asbestose. Auch das Bronchialkarzinom des 2. Patienten könnte in der Asbesterkrankung begründet sein. Bei den Patienten hat der Asbeststaub die Lungenasbestose ausgelöst, aber auch andere Toxine, wozu auch das Rauchen zählt, könnten zu einer Verstärkung der Krankheitserscheinungen (Dyspnoe, Bronchialkarzinom) geführt haben. Darüber hinaus waren in allen drei Fällen schwarze Partikel in den Lungen abgelagert, bei denen es sich um Ruße handeln könnte.

Um die Reaktionen von Asbest und Partikeln auf zellulärer Ebene (also Asbestose und Anthrakose) zu untersuchen, wurden beispielhaft Zellen gegenüber Fasern und Partikeln exponiert. Dabei wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie beobachtet, dass sowohl die Asbestfasern (Krokydolith, Chrysotil) als auch die Partikel (am Beispiel von Toner) von den Zellen aufgenommen wurden.

In den Zytotoxizitätsversuchen zeigte sich bei geringen Konzentrationen zunächst eine Induktion der Proliferation. Sowohl höhere Asbestfaserkonzentrationen (Krokydolith) als auch Partikelkonzentrationen (Toner und Carbon black) führten zu schädigenden Auswirkungen. Auch bei den Untersuchungen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) konnte eindeutig eine starke Reaktion der Fibroblasten nach Faser- und Partikelexposition ermittelt werden.

Die Versuche zur Apoptoseinduktion zeigten dagegen eine höhere Neigung der Fibroblasten zur Nekroseinduktion, jedoch waren sowohl die Apoptose als auch die Nekrose nur schwach ausgeprägt.

7 Thesen

1. Die Asbestose trat in den Patientenfällen als Folge einer Exposition gegenüber Asbestfasern ein.
2. Die Krankheitssymptome wurden offensichtlich durch Partikeleinlagerungen (Rauchen) verstärkt.
3. Die Exposition gegenüber Partikeln ließ sich mit der Transmissionselektronenmikroskopie sowie anhand der energiedispersiven Röntgenanalyse mittels Rasterelektronenmikroskopie nachweisen.
4. Sowohl die Fasern als auch die Partikel (Toner) wurden von den Zellen aufgenommen und in Vesikel eingeschlossen.
5. Durch die Aufnahme der Fasern und Partikel kam es zu einer erhöhten Proliferation der Fibroblasten.
6. Nach der Phagozytose von Krokydolith sowie den Partikeln Toner und Carbon black wurde bei hohen Konzentrationen eine starke Zytotoxizität induziert.
7. Nach der Exposition der Zellen gegenüber den Asbestfasern (Krokydolith, Chrysotil) und den Partikeln (Toner, Carbon black, Titandioxid) kam es zu einer starken Radikalproduktion in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).
8. Die Phagozytose der Fasern und Partikel konnte keine Apoptose induzieren, sondern zeigte eine erhöhte Tendenz zur Nekroseinduktion.

8 Literaturverzeichnis

1. Aam, B.B.; Fonnum, F.: Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages in vitro. *Arch Toxicol* **2007**, 81(6): 441-446
2. Accorsi, J.V.: Die Auswirkungen der Morphologie und der Dispersion von Ruß auf die Alterungsbeständigkeit von Polyäthylen. Cabot Corporation Billerica, Massachusetts, USA nach dem auf dem International Wire and Cable Symposium in Atlantic City am 18. November **1999** vorgestellten Originaltext
3. Adamson, I.Y.R.; Prieditis, H.; Young, L.: Lung mesothelial cell and fibroblast responses to pleural and alveolar macrophage supernatants and to lavage fluids from crocidolite-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1997**, 16(6): 650-656
4. Armbruster, C.; Dekan, G.; Hovorka, A.: Granulomatous pneumonitis and mediastinal lymphadenopathy due to photocopier toner dust. *Lancet* **1996**, 348(9028): 690
5. Baan, R.; Straif, K.; Grosse, Y.; Secretan, B.; El Ghissassi, F.; Cogliano, V., WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group: Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol* **2006**, 7(4): 295-296
6. Baan, R.A.: Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fiber: recent evaluations by an IARC Monograph. *Inhal Toxicol.* **2007**, 19 (Suppl.1): 213-228
7. Barlow, P. G.; Clouter-Baker, A.; Donaldson, K.; MacCallum, J.; Stone, V.: Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. Part Fibre Toxicol. **2005**, 2: 11 (14 Seiten)
8. Bellmann, B.; Muhle, H.; Creutzenberg, O.; Mermelstein, R.: Irreversible pulmonary changes induced in rat lung by dust overload. *Environ Health Perspect*. **1992**, 97: 189-191
9. Bergamini, C.; Fato, R.; Biagini, G.; Pugnaloni, A.; Giantomassi, F.; Foresti, E.; Lesci, G.I.; Roveri, N.; Lenaz, G.: Mitochondrial changes induced by natural and synthetic asbestos fibers: Studies on isolated mitochondria. *Cell Mol Biol* (Noisy-le-grand). **2004**, 50(Online Pub): OL691-OL700
10. Bhattacharya, K.; Dopp, E.; Kakkar, P.; Jaffery, F.N.; Schiffmann, D.; Jaurand, M.-C.; Rahman, I.; Rahman, Q.: Biomarkers in risk assessment of asbestos exposure. *Mutat Res.* **2005**, 579(1-2): 6-21
11. Bhattacharya, K; Alink, G.; Dopp, E.: Oxidative stress and changed gene expression profiles in fiber/particle-induced carcinogenesis. *Int J Hum Genet* **2007**, 7(1): 1-21
12. Bhattacharya, K.: Comparative analysis of fine and nanoparticles for cellular uptake, oxidative Stress and genomic damage in human lung cells. Inaugural Dissertation der Universität Duisburg-Essen **2008**
13. Bhattacharya, K; Cramer, H.; Albrecht, C.; Schins, R.; Rahman, Q.; Zimmermann, U.; Dopp, E.: Vanadium Pentoxide-coated ultrafine Titanium dioxide particles induce cellular damage and micronucleus formation in V79. *J Toxicol Environ Health A* **2008**, 71(13-14): 976-980
14. Boland, S.; Baeza-Squiban, A.; Fournier, T.; Houcine, O.; Gendron, M.-C.; Chévrier, M.; Jouvenot, G.; Coste, A.; Aubier, M.; Marano, F.: Diesel exhaust particles are taken up by

- human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **1999**, 276(4): L604-613
15. Broaddus, V.C.; Yang, L.; Scavo, L.M.; Ernst, J.D.; Boylan, A.M.: Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species. J Clin Invest. **1996**, 98(9): 2050-2059
16. Brunner, T.J.; Wick, P.; Manser, P.; Spohn, P.; Grass, R.N.; Limbach, L.K.; Bruinink, A.; Stark, W.J.: In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. Environ Sci Technol. **2006**, 40(14): 4374-4381
17. Bühling, K.J.; Lepenies, J.; Witt, K.: Intensivkurs : Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, **2000**, 2. Auflage.
18. Burmeister, B.; Schwerdtle, T.; Poser, I.; Hoffmann, E.; Hartwig, A.; Müller, W.-U.; Rettemeier, A.W.; Seemayer, N.H.; Dopp, E.: Effects of asbestos initiation of DNA damage, induction of DNA-strand breaks, P53-expression and apoptosis in primary, SV40-transformed and malignant human mesothelial cells. Mutat Res. **2004**, 558(1-2): 81-92
19. Chang, M.J.W.; Singh, N.P.; Turturro, A.; Hart, R.W.: Characterization of cytotoxic effect of asbestos on normal human fibroblast. Environ Health Perspect. **1983**, 51: 237-239
20. Chin, B.Y.; Choi, M.E.; Burdick, M.D.; Strieter, R.M.; Risby, T.H.; Choi, A.M.K.: Induction of apoptosis by particulate matter: role of TNF- α and MAPK. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **1998**, 275(5): L942-L949
21. Computer Bild: Vorsicht: Giftstoffe bei Farb-Laserdruckern, 07/**2006**
22. Craighead, J.E.; Mossman, B.T.; Bradley, B.J.: Comparative studies on the cytotoxicity of amphibole and serpentine asbestos. Environ Health Perspect. **1980**, 34: 37-46
23. Delsite, R.; Kachhap, S.; Anbazhagan, R.; Gabrielson, E.; Singh, K.K.: Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells. Mol Cancer **2002**, 1:6 (1-10)
24. DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft, MAK- und BAT-Werte-Liste 2007; Mitteilung 43 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe vom 01.07.**2007**; DFG, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim
25. Dodson, R.F.; Atkinson, M.A.L.; Levin, J.L.: Asbestos fiber length as related to potential pathogenicity: A critical review. Am J Ind Med. **2003**, 44(3): 291-297
26. Doenecke, D.; Koolman, J.; Fuchs, G.; Gerok, W.: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. 15. Auflage **2005**, Thieme-Verlag.
27. Doll, R.: Mortality from lung cancer in asbestos workers. Br J Ind Med. **1955**, 12: 81-86
28. Don Porto Carero, A.; Hoet, P.H.M.; Verschaeve, L.; Schoeters, G.; Nemery, B.: Genotoxic effects of Carbon black particles, diesel exhaust particles and urbain air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). Environ Mol Mutagen **2001**, 37(2): 155-163
29. Donaldson, K.; Stone, V.; Clouter, A.; Renwick, L.; MacNee, W.: Ultrafine particles. Occup Environ Med. **2001**, 58(3): 211-216

30. Dopp, E.; Saedler, J.; Stopper, H.; Weiss, D.G.; Schiffmann, D.: Mitotic disturbances and micronucleus induction in Syrian hamster embryo fibroblast cells caused by asbestos. Environ Health Perspect. **1995**, 103 (3): 268-271
31. Dopp, E.; Nebe, B.; Hahnel, C.; Papp, T.; Alonso, B.; Simkó, M.; Schiffmann, D.: Mineral fibers induce apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. Pathobiology **1995**, 63(4): 213-221
32. Dopp, E.; Jonas, L.; Nebe, B.; Budde, A.; Knippel, E.: Dielectric changes in membrane properties and cell interiors of human mesothelial cells in vitro after crocidolite asbestos exposure. Environ Health Perspect. **2000**, 108(2): 153-158
33. Dopp, E.; Poser, I.; Papp, T.: Interphase fish analysis of cell cycle genesis in asbestos-treated human mesothelial cells (HMC), SV40-transformed HMC (Met-5A) and mesothelioma cells (colo). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **2002**, 48(OnlinePub): OL271-OL277
34. Einsiedler, K.; Hildenbrand, S.L.; Schmahl, F.W.: Belastung des menschlichen Organismus mit Metallen und Lösungsmitteln durch Tonerpulver-haltige Geräte am Arbeitsplatz. Umweltmed Forsch und Prax **2003**, 8: 218-219
35. Friemann, J.: Asbest, Fibrose, Krebs. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York **1992**
36. Furukawa, Y.; Aizawa, Y.; Okada, M.; Watanabe, M.; Niitsuya, M.; Kotani, M.: Negative effect of photocopier toner on alveolar macrophages determined by in vitro magnetometric evaluation. Ind Health **2002**, 40(2): 214-221
37. Gardi, C.; Calzoni, P; Ferrali, M.; Comporti, M.: Iron mobilization from crocidolite as enhancer of collagen content in rat lung fibroblasts. Biochem Pharmacol. **1997**, 53(11): 1659-1665
38. Gardiner, K.; Threthowan, N.W.; Harrington, J.M.; Rossiter, C.E.; Calvert, I.A.: Respiratory health effects of carbon black: a survey of European carbon black workers. Br J Ind Med. **1993**, 50(12): 1082-1096
39. Gardiner, K.; van Tongeren, M.; Harrington, M.: Respiratory health effects from exposure to carbon black: results of the phase 2 and 3 cross sectional studies in the European carbon black manufacturing industry. Occup Environ Med **2001**, 58(8): 496-503
40. Geh, S.: Direkte und indirekte Genotoxizität alveolengängiger Betonitpartikel in Abhängigkeit ihrer Varietäten in vitro. Inauguraldissertation der Universität Essen-Duisburg **2005**
41. Ghio, A.J.; Taylor, D.E.; Stonehuerner, J.G.; Piantadosi, C.A.; Crumbliss, A.L.: The release of iron from different asbestos structures by hydrogen peroxide with concomitant O₂ generation. Biometals **1998**, 11(1): 41-47
42. Ghio, A.J.; Kadiiska, M.B.; Xiang, Q.-H.; Mason, R.P.: In vivo evidence of free radical formation after asbestos instillation: an ESR spin trapping investigation. Free Radic Biol Med. **1998**, 24(1): 11-17
43. Gillissen, A.; Gessner, C.; Hammerschmidt, S.; Hoheisel, G.; Wirtz, H.: Gesundheitliche Bedeutung inhalierter Stäube. Dtsch Med. Wochenschr **2006**, 131: 639-644
44. Gminski, R.; Decker, K.; Heinz, Ch.; Mersch-Sundermann, V.: Cytotoxic and genotoxic effects of three representative reprographic toner dusts and their dimethyl sulfoxide

- (DMSO) extracts on cultured human epithelial A549 lung cells in vitro. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **2008**, 377 (1): 82
45. Goldberg, J.L.; Zanella, C.L.; Janssen, Y.M.W.; Timblin, C.R.; Jimenez, L.A.; Vacek, P.; Taatjes, D.J.; Mossman, B.T.: Novel cell imaging techniques show induction of apoptosis and proliferation in mesothelial cells by asbestos. Am J Respir Cell Mol Biol. **1997**, 17(3): 265-271
46. Gosslau, A.; Rensing, L.: Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und antioxidative Mechanismen. Z Gerontol Geriat **2002**, 35 (2): 139-150
47. Green, D.R.; Reed, J.C.: Mitochondria and Apoptosis. Science **1998**, 281(5381): 1309-1312
48. Hahn, J.U.; Blome, H.; Hennig, M.; Hohensee, H.; Jungnickel, F.; Kleine, H.; Möller, A.; Nies, E.: Kriterienkatalog zur Prüfung von Tonerstäuben. Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft **2004**, 64 (Nr.1/2, Januar/Februar): 21-27
49. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.: Free radicals in Biology and Medicine. Third edition **1999**, Oxford Science Publications
50. Hamilton, R.F.; Iyer, L.L.; Holian, A.: Asbestos induces apoptosis in human alveolar macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **1996**, 271 (5): L813-819
51. Harber, P.; Muranko, H.; Solis, S.; Torossian, A.; Merz, B.: Effect of carbon black exposure on respiratory functions and symptoms. J Occup Environ Med **2003**, 45(2): 144-155
52. He, C.; Morawska, L.; Taplin, L.: Particle Emission Characteristics of Office Printers. Environ Sci Technol **2007**, 41(17): 6039-6045
53. Hoffmeyer, F.; van Kampen, V.; Brüning, T.; Merget, R.: Pneumokoniosen. Pneumologie **2007**, 61:774-797
54. Hong, Y.C.; Choi, S.S.: Cytotoxicity and multinucleate giant cell formation in chinese hamster lung fibroblast caused by crocidolite and chrysotile. J Korean Med Sci **1997**, 12(2): 99-104
55. ITG Interessengemeinschaft Tonergeschädigter c/o Hans- Joachim Stelting: Krank durch Toner - Feinstaubgefahr für Millionen 1. September **2007**, 2 Seiten [www.krank-durch-toner.de]
56. ITG- Information für Mediziner: Unterschätzt - Feinstaubgefahr aus Laserdruckgeräten. 01.09.**2007**, 2 Seiten
57. Jaurand, M.-C.: Mechanisms of fiber-induced genotoxicity. Environ Health Perspect **1997**, 105(Suppl.5): 1073-1084
58. Junqueria, L.C.; Carneiro, J.: Histologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, **1996**, 4. Auflage.
59. Kamp, D.W.; Panduri, V.; Weitzman, S.A.; Chandel, N.: Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis: Role of mitochondrial dysfunction caused by iron-derived free radicals. Mol Cell Biochem **2002**, 234-235(1-2): 153-160
60. Kane, A.: Asbestos bodies: Clues to the mechanism of asbestos toxicity? Hum Pathol, August **2003**, 34 (8): 735-736

61. Kang, Y.J.: Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. *Environ Health Perspect* March **2001**, 109(Suppl. 1): 27-34
62. Kappos, A.; Bruckmann, P.; Eikmann, T.; Englert, N.; Heinrich, U.; Höppe, P.; Koch, E.; Metz, N.; Rauchfuss, K.; Rombout, P.; Schabronath, J.; Schulz-Klemp, V.; Spallek, M.F.; Wichmann, H.-E.; Kreyling, W.G.; Krause, G.H.M.: Bewertung des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes zur gesundheitlichen Wirkung von Partikeln in der Luft. *Umweltmed Forsch Prax* **2003**, 8(5): 257-278
63. Kerr, S.M.; Muranko, H.J.; Vincent, J.H.: Personal sampling for inhalable aerosol exposure of carbon black manufacturing industry workers. *Appl Occup Environ Hyg* **2002**, 17(10):681-92
64. Konietzko, N.; Teschler, H.: Asbest und Lunge. Steinkopff Verlag Darmstadt **1992**
65. Kopnin, P.B.; Kravchenko, I.V.; Furalyov, V.A.; Pylev, L.N.; Kopnin, B.P.: Cell type-specific effects of asbestos on intracellular ROS levels, DNA oxidation and G1 cell cycle checkpoint. *Oncogene* **2004**, 23(54): 8834-8840
66. Krug, H.F.; Kern, K.; Diabaté, S.: Toxikologische Aspekte der Nanotechnologie. Versuch einer Abwägung. „Technikfolgenabschätzung“ Juni **2004**, 13(2): 58-64
67. Krzyzanowski, M.: Wie der Feinstaub in der Luft die Gesundheit schädigt. Weltgesundheitsorganisation Europa, Faktenblatt Euro/04/05; Berlin, Kopenhagen, Rom, 14. April **2005**
68. Lindl, T.: Zell und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin **2000**, Auflage 4
69. Lin, G.H.Y.: Toxicological studies of a representative xerox toner. *Int J Toxicol* **1999**, 18(1): 23-34
70. Link, C.: Öko-Test August 2001: Außen hui, innen pfui. Laser-Drucker, Toner. Erschienen am 30.07.**2001**
71. Liu, W.; Ernst, J.D.; Broaddus, V.C.: Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative Stress, DNA-damage, and apoptosis in mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2000**, 23(3): 371-378
72. Marczynski, B.; Rozynek, P.; Huber, H.; Baur, X.: Genotoxizität von Asbestfasern – eine Literaturauswertung. *Pneumologie* **1999**, 53: 454-458
73. Matsuoka, M; Igisu, H.; Morimoto, Y.: Phosphorylation of p53 protein in A549 human pulmonary epithelial cells exposed to asbestos fibers. *Environ Health Perspect* **2003**, 111 (4): 509-512
74. McLemore, T.; Corson, M.; Mace, M.; Arnott, M.; Jenkins, T.; Snodgrass, D.; Martin, R.; Wray, N.; Brinkley, B.R.: Phagocytosis of asbestos fibers by human pulmonary alveolar macrophages. *Cancer Lett* **1979**, 6(4-5): 183-192
75. McLemore, T.; Mace, M.L.Jr.; Roggli, V.; Marshall, M.V.; Lawrence, E.C.; Wilson, R.K.; Martin, R.R.; Brinkley, B.R.; Greenberg, S.D.: Asbestos body phagocytosis by human free alveolar macrophages. *Cancer Lett* **1980**, 9(2): 85-93
76. Möller, W.; Hofer, T.; Ziesenis, A.; Karg, E.; Heyder, J.: Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **2002**, 182(3): 197-207

77. Monteiller, C.; Tran, L.; MacNee, W.; Faux, S.; Jones, A.; Miller, B.; Donaldson, K.: The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on the epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med* **2007**; 64(9): 609-615
78. Morfeld, P.; McCunney, R.J.: Carbon black and lung cancer: Testing a new exposure metric in a German cohort. *Am J Ind Med* **2007**, 50(8): 565-567
79. Mossman, B.T.; Faux, S.; Janssen, Y.; Jimenez, L.A.; Timblin, C.; Zanella, C.; Goldberg, J.; Walsh, E.; Barchowsky, A.; Driscoll, K.: Cell signaling pathways elicited by asbestos. *Environ Health Perspect* **1997**, 105 (Suppl.5): 1121-1125
80. Mossman, B.T.; Churg, A.: Mechanisms in the pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, 157: 1666-1680
81. Müller, M.; Mittmann, M.; Buchter, A.: Innenraumbelastungen und Gesundheitsstörungen durch Drucker und Kopiergeräte - Gegenwärtiger Wissensstand und Vorschläge zur Prävention. *Saarländisches Ärzteblatt* 08/**2007**: S. 19-20 und 38- 40
82. Mutsaers, S.E.; Harrison, N.K.; McAnulty, R.J.; Liao, J.Y.-W.; Laurent, G.J.; Musk, A.W.: Fibroblast mitogens in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from asbestos-exposed subjects with and without clinical evidence of asbestosis: No evidence for the role of PDGF, TNF- α , IGF-1, or IL-1 β . *J Pathol* **1998**, 185 (2): 199-203
83. Okada, F.: Beyond foreign-body-induced carcinogenesis: Impact of reactive oxygen species derived from inflammatory cells in tumorigenic conversion and tumor progression. *Int J Cancer* **2007**, 121(11): 2364-2372
84. Panduri, V.; Weitzman, S.A.; Chandel, N.; Kamp, D.W.: The mitochondria-regulated death pathway mediates asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2003**, 28(2): 241-248
85. Panduri, V.; Surapureddi, S.; Soberanes, S; Weitzman, S.A.; Chandel, N.; Kamp, D.W.: p53 mediates amosite asbestos-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2006**, 34(4): 443-452
86. Park, S.J.; Kim, J.S.: Role of Chemically Modified Carbon Black Surfaces in Enhancing Interfacial Adhesion between Carbon Black and Rubber in a Composite System. *J Colloid Interface Sci* **2000**, 232(2): 311–316
87. Park, S.Y.; Choi, B.; Cheon, H.; Pak, Y.K.; Kulawiec, M.; Singh, K.K.; Lee, M.-S.: Cellular aging of mitochondrial DNA-depleted cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, 325(4): 1399–1405
88. Poser, I.; Rahman, Q.; Lohani, M.; Yadav, S.; Becker, H.-H.; Weiss, D.G.; Schiffmann, D.; Dopp, E.: Modulation of the genotoxic effect in asbestos-exposed primary human mesothelial cell by radical scavengers, metal chelators and a glutathione precursor. *Mutat Res* **2004**, 559(1-2): 19-27
89. Poyton, R.O.; McEwen, J.E.: Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* **1996**, 65: 563-607
90. Puntoni, R.; Ceppi, M.; Reggiardo, G.; Merlo, F.: Occupational exposure carbon black and risk of bladder cancer. *Lancet* **2001**; 358(9281): 562

91. Quinlan T.R.; Marsh, J.P.; Janssen, Y.M.W.; Borm, P.A.; Mossman, B.T.: Oxygen radicals and asbestos-mediated disease. *Environ Health Perspect* **1994**, 102(Suppl.10): 107-110
92. Raffael, A: Grundlagen der analytischen Durchflusszytometrie. *Labor-Medizin*, **1988**, 11: 89-97
93. Rahman, I: Oxidative Stress, Chromatin Remodeling and Gene Transcription in Inflammation and Chronic Lung Diseases. *J Biochem Mol Biol*. **2003**, 36(1):95-109
94. Rahman, Q.; Dopp, E.; Schiffmann, D.: Genotoxic effects of asbestos fibers. Peters & Peters: Sourcebook on Asbestos Diseases, Lexis Publishing **2000**, 21: 223-243
95. Rausch, L.J.; Bisinger, E.C.Jr.; Sharma, A.: Carbon black should not be classified as a human carcinogen based on rodent bioassay data. *Regul Toxicol Pharmacol* **2004**, 40(1): 28-41
96. Renwick, L.C.; Donaldson, K.; Clouter, A.: Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2001**, 172(2):119-127.
97. Schmidt, H.: ¹²⁹Xe-NMR-spektroskopische Untersuchungen an Carbon Black und Graphit. Dissertation an der Universität Duisburg-Essen **2003**
98. Schmolz, G.: Die kanzerogene Wirkung von Asbest. *Öffentliches Gesundheitswesen* **1989**, 51: 614-620
99. Shukla, A.; Timblin, C.; BeruBe, K.; Gordon, T; McKinney, W.; Driscoll, K.; Vacek, P.; Mossman, B.T.: Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF- κ B activation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2000**, 23(2): 182-187
100. Sies, H.: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **1993**, 215(2): 213-219
101. Spindler, M.; Dittrich, G.; Weimer W.: Globalisierung in der chemischen Industrie – eine Begriffsbestimmung; *Chemie in unserer Zeit* **2000**, 34(4): 232-9
102. Stelting, H.J.: Krank durch Toner – Informationen zur gesundheitsschädigenden Wirkung bestimmter Toner. *Umwelt-Medizin-Gesellschaft* **2003**, 16(4): 268-273
103. Stelting, H.J.: Tonerallergie – die unterschätzte Gefahr. *Internistische Praxis* **2005**, 45: 457-461
104. Stelting, H.J.: Krank durch Toner – Erfahrungen mit einer Nanopathologie. *Umweltmed Forsch Prax* **2006**, 11(5): 329 – 337
105. Stone, V.; Shaw, J.; Brown, D.M.; MacNee, W.; Faux, S.P.; Donaldson, K.: The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine Carbon black on epithelial cell function. *Toxicol in Vitro* **1998**, 12(6): 649- 659
106. Sydlik, U.; Bierhals, K.; Soufi, M.; Abel, J.; Schins, R.P.F.; Unfried, K.: 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* **2006**, 291(4): L725-L733
107. Thannickal, V.J.; Fanburg, B.L: Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2000**, 279(6): L1005-L1028

- 108.** UGZ, Umwelt- und Gesundheitsschutz Zürich, Umweltschutzfachstelle und Abteilung Umwelt: Raumbelastung durch Drucker und Kopierer. Januar **2008**
- 109.** Upadhyay, D.; Kamp, D.W.: Asbestos-induced pulmonary toxicity: Role of DNA damage and apoptosis. *Exp Biol Med (Maywood)*. Jun **2003**, 228(6):650-659
- 110.** Vallyathan, V.; Shi, X.: The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ Health Perspect* **1997**, 105 (Suppl.1): 165-177
- 111.** van Engeland, M.; Nieland, L.J.W.; Ramaekers, F.C.S.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C.P.M.: Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* **1998**, 31(1): 1-9
- 112.** Verma, M.; Naviaux, R.K.; Tanaka, M.; Kumar, D.; Franceschi,C.; Singh, K.K.: Meeting Report: Mitochondrial DNA and Cancer Epidemiology. *Cancer Res* **2007**, 67(2): 437-439
- 113.** Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **1995**, 184(1): 39-51
- 114.** Wagner, J.C.; Sleggs, C.A.; Marchand, P.: Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med*. **1960**, 17: 260-271
- 115.** Watson, A.Y.; Valberg, P.A.: Carbon black and soot: Two different substances. *AIHAJ* **2001**, 62(2): 218-228
- 116.** Wilson, M.R.; Lightbody J.H.; Donaldson, K.; Sales J.; Stone, V.: Interaction between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **2002**, 184(3): 172-179
- 117.** Xia, T.; Korge, P.; Weiss, J.N.; Li, N.; Venkatesen, M.I.; Sioutas, C.; Nel, A.: Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: Implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* **2004**, 112(14): 1347-1358
- 118.** Xu, A.; Zhou, H.; Yu, D.Z.; Hei, T.K.: Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: Implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species. *Environ Health Perspect* **2002**, 110(10): 1003-1008
- 119.** Yang, H.M.; Nam, W.K.; Park, D.W.: Production of nanosized Carbon Black from hydrocarbon by a thermal plasma. *J Nanosci Nanotechnol* **2007**, 7(11): 3744–3749

Anhang

Anhang 1

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte.

I. Zellen

3T3-Fibroblasten	American Type Culture Collection
------------------	----------------------------------

II. Zellkulturmedium

Dulbecco's modified eagle medium (4,5 g/l Glucose)	CC-PRO, Oberdorla
L-Glutamin	CC-PRO, Oberdorla
Fetales Kälberserum	GIBCO, Karlsruhe
Gentamycin	CC-PRO, Oberdorla
Phosphat-Buffer-Solution (PBS-DULBECCO)	GIBCO, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA)	CC-PRO, Oberdorla

III. Substanzen für die Versuche

III.1. Farbstofflösung für die Zytotoxizität

Trypan Blau	GIBCO, Karlsruhe
-------------	------------------

III.2. Fluoreszenzfarbstoff für die indirekte Radikalmessung

Dichlorodihydrofluoreszein, H ₂ DCF-DA (MG 487,29)	INVITROGEN, Oregon, USA
Dimethylsulfoxid, DMSO	FLUKA, Steinheim

III.3. Fluoreszenzfarbstoff für die Apoptosemessung

Annexin V-FITC Kit (mit Bindungspuffer, Propidiumiodid, Annexin V), PN IM 2375 20 Tests	BECKMANN-COULTER, Marseille, Frankreich
---	---

IV. Chemikalien für die Elektronenmikroskopie

Ethanol	RIEDEL-DE Haën, SIGMA-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Aceton	LABSCAN, Gliwice, Polen
Aceton-Epoxidharzgemische (Durcapan Araldite)	FLUKA, Steinheim
Base Embedding ACM)	MERCK, Darmstadt
Natriumphosphatpuffer	MERCK, Darmstadt
Glutaraldehyd	TED PELLA, Redding, CA, USA
Uranylacetat	

Anhang

Xylool BAKER ANALYSED, Deventer, Holland
Osmiumtetroxid VEB (Altbestände)

Bleizitrat (zusammengesetzt aus):

- Bleinitrat VEB (Altbestände)
- Natriumhydroxid MERCK, Darmstadt
- Natriumcitrat MERCK, Darmstadt

V. Chemikalien für die Lichtmikroskopie

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (hergestellt aus):

- Hämalaun FLUKA, Steinheim
- Natriumiodat MERCK, Darmstadt
- Aluminiumkaliumsulfat MERCK, Darmstadt
- Essigsäure J. T. BAKER, Deventer, Holland
- Eosin MERCK, Darmstadt

Berliner Blau-Färbung (hergestellt aus):

- Kaliumferrocyanid MERCK, Darmstadt
- Salzsäure MERCK, Darmstadt
- Kernechtrot MERCK, Darmstadt

VI. Materialien

Kulturflaschen 12,5 cm ²	FALCON, Heidelberg
Kulturflaschen 25; 75; 150 cm ²	TPP (Techno Plastics Products) AG, Transadingen, Schweiz
Pipetten (1; 2; 5; 10; 25 ml, steril)	GREINER Bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (p10; p20; p100; p1000; steril)	GREINER Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenrörchen (15; 50 ml)	GREINER Bio-one GmbH, Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	GREINER Bio-one GmbH, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	BD FALCON, Franklin Lakes, USA
24er Well plates	GREINER Bio-one GmbH, Frickenhausen
96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatten, schwarz (Kat.-Nr. 655086)	GREINER Bio-one GmbH, Frickenhausen
Kupfernetze	PLANO, Wetzlar

VII. Geräte

CO ₂ -Brutschrank	FORMA-SCIENTIFIC, Ohio, USA
Hämocytometer	BRAND, Wertheim
Sterilwerkbank	STEAG, Pfullingen
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), Burgwedel
Zentrifuge	KENDRO, Osterode
Kleinschüttler	IKA-VIBRAX-VXR, Labortechnik Staufen
Ultraschallbad	Bandelin Sonorey Super PK 1028, Bandelin electronic, Berlin
Inversmikroskop	Axiovert 10, ZEISS, Jena (Rostock) bzw. Labovert FS, LEITZ, Wetzlar (Essen)
Durchlichtmikroskop	Leica DM LB, LEICA, Wetzlar
Transmissionselektronenmikroskop EM 902A	ZEISS, Oberkochen
Rasterelektronenmikroskop DSM 960A	ZEISS, Oberkochen
Mikrotom	LEICA, Wetzlar
Klingen (Microtome Blade)	PFM AG, Köln (FEATHER, Osaka, Japan)
Diamantmesser	DIATOME AG, Biel, Schweiz
Microplattenleser GENios	TECAN, Crailsheim
FACSScan®	BECKMANN-COULTER; Coulter Corporation, Miami, USA
Critical Point Dryer	K850 EMI-TECH, Ashford, England
Sputter Coater	SCD004, BAL-TEC, Lichtenstein

VIII. Sonstige

Skinsept zur Händedesinfektion	ECOLAB, Düsseldorf
Perform zur Flächendesinfektion	SCHÜLKE & MAYR, Norderstedt

Anhang 2

2.1 Herstellung der Substanzlösungen der Faser- und Partikelproben

Das applizierte Endvolumen ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) wurde berechnet aus der Konzentration der Stammlösung, bezogen auf die Größe der Kulturflaschen:

Absolute Konzentration in μg = Substanzprobenkonzentration x Größe der Kulturflasche

$$\text{Appliziertes Endvolumen in } \mu\text{l} = \frac{\text{absolute Konzentration}}{\text{Konzentration der Stammlösung (5mg/ml)}}$$

Beispiel:

Bei der Verwendung von 5 μg in einer $12,5 \text{ cm}^2$ Kulturflasche:

$$\text{Abs. Konz.: } 5 \mu\text{g} * 12,5 \text{ cm}^2 = 62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$\text{Appl. Endvol.: } \frac{62,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2}{5 \text{ mg/ml}} = 62,5 * 0,2 = 12,5 \mu\text{l je } 12,5 \text{ cm}^2 \text{ Kulturflasche.}$$

2.2 Herstellung einer 100 μM Cisplatin-Konzentration

Biochemischer Name: *cis*-Diammineplatinum(II) dichloride; Formel: $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, Molekulargewicht: $300.05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$$300 \text{ g/l} \triangleq 1 \text{ M}$$

$$30 \text{ g/l} \triangleq 100 \text{ mM}$$

$$0,030 \text{ g/l} = 30 \text{ mg/l} \triangleq 100 \mu\text{M}, \text{ d.h. } 3 \text{ mg Cisplatin/100 ml sterilem PBS}$$

2.3 Inhaltsangabe des Toners laut Hersteller

Kohlenstoff - Industrieruß (Carbon Black)

weitere Inhaltsstoffe (nicht messbar in EDX):

2-Propansäure, 2-Methyl-butylester, Polymer mit Evinylbenzol, 1-Propan, Homopolymer; Chromat(1-), bis[1-[5-chloro-2-hydroxyphenyl] azo]-2-naphthalenolat(2-)-,hydrogen; Silan, dichlormethyl- Reaktionsprodukte mit Silizium-oxid, Aluminiumoxid

Anmerkung:

Kohlenstoff besitzt eine hohe Streuung und eine hohe Absorptionsrate bei sehr geringen Konzentrationen anderer Elemente (Silizium und Aluminium). Nach dem Besprühen mit Gold haben sowohl Silizium als auch Aluminium nur eine geringe Austrittstiefe im EDX, d.h. die EDX ist nicht empfindlich genug, um die in Spuren enthaltenen Elemente nachzuweisen. Die zusätzlich laut Hersteller enthaltenen Bestandteile im Toner sind nur durch besondere chemische Verfahren (z.B. Ausgasung des Toners) möglicherweise nachweisbar.

2.4 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (2', 7' Dihydrodichlorofluorescein Diacetate) – Radikalmessung

Benötigte Lösungen:

H₂DCF-DA: 100 mM Stammlösung in DMSO

DMEM – Medium

H₂O₂

Protokoll Standardisierung 3T3

Um zu bestimmen, ob die Zellen bei starker Exposition Radikale bilden, muss eine Standardreihe mit H₂O₂ gemessen werden. Außerdem muss die Beobachtung der optimalen Fluoreszenz-Farbstoffkonzentration erfolgen.

Bei der Standardisierung wurden 24er well plates verwendet. In jedes Näpfchen wurden 400 000 Zellen pro well 24 Stunden vor der Versuchsdurchführung eingesät.

Verwendete Konzentrationen

H₂O₂: 2 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM

Farbstoff (H₂DCF-DA): 5 µM, 10 µM, 20 µM

Vorbereitung von H₂O₂

H₂O₂ → Molekulargewicht – 34,01 g/l

→ 34 µl (H₂O₂ - 30 %ige Lösung) in 100ml (Aqua Bidest) => 10 mM

→ von 10 mM Stammlösung => 1:10 (Aqua Bidest) => 1mM (1000 µM)

→ von 1 mM Stammlösung => 1:10 (Aqua Bidest) => 100 µM = Stammlösung

Die Zellen werden gegenüber H₂O₂ exponiert, indem in jedes Näpfchen eine Menge von 2000 µl eingefüllt wird:

Für 40 µM => 800 µl von 100 µM Stammlsg. + 1200 µl Medium

Für 35 µM => 700 µl von 100 µM Stammlsg. + 1300 µl Medium

Für 30 µM => 600 µl von 100 µM Stammlsg. + 1400 µl Medium

Für 25 µM => 500 µl von 100 µM Stammlsg. + 1500 µl Medium

Für 20 µM => 400 µl von 100 µM Stammlsg. + 1600 µl Medium

Für 15 µM => 300 µl von 100 µM Stammlsg. + 1700 µl Medium

Für 10 µM => 200 µl von 100 µM Stammlsg. + 1800 µl Medium

Für 5 µM => 100 µl von 100 µM Stammlsg. + 1900 µl Medium

Für 2 µM => 40 µl von 100 µM Stammlsg. + 1960 µl Medium

H₂DCFDA-Vorbereitung

Stammlösung – 1,2 mg lösen in 25 µl DMSO

Diese 25 µl in 25 ml Aqua Bidest. lösen (Stammlösung mit Konzentration von 100 µM)

Herstellung des Endvolumens mit PBS:

5 µM Stammlsg. – 200 µl der Stammlsg. in 4 ml PBS

10 µM Stammlsg. – 400 µl der Stammlsg. in 4 ml PBS (Endvol.)

20 µM Stammlsg. – 800 µl der Stammlsg. in 4 ml PBS

Die Zellen wurden 24 Stunden in den 24 Well plates inkubiert bei einer Konzentration von 400 000 Zellen pro Well. Anschließend wurden die Zellen gegenüber den verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ für 30 Minuten exponiert. Danach wurde das H₂O₂ entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, die drei verschiedenen Konzentrationen des H₂DCF-DA hinzugegeben und 20 Minuten inkubiert. Anschließend mussten die Zellen mit PBS gewaschen und in jeweils 200 µl PBS resuspendiert werden. Die Suspension wurde in 96er black Wellplatten gefüllt und es erfolgte die Messung an einem ELISA Plattenleser (Genios TECAN).

Da die Zellen eine starke Radikalbildung zeigten, konnte der Versuch mit den 3T3-Zellen durchgeführt werden.

2.5 Messung der Apoptose mittels Annexin V-FITC

(Anleitung aus PN IM2375 – 20 Tests –übersetzt aus dem Englischen)

Reagenzien:

1 Ampulle Annexin V-FITC, gebrauchsfertig; flüssig; 100 µl, enthält 1 mg/ml BSA

1 Ampulle 10x konzentrierter Bindungspuffer,; flüssig; 1,7 ml

1 Ampulle Propidiumiodid, rotes Pulver; 250 µg

Fluoreszenz:

Annexin V-FITC:

Absorptionsmaximum: 492 nm

Emissionsmaximum: 520 nm

Propidiumiodid:

Absorptionsmaximum: 370 nm, 520 nm

Emissionsbreite: 560-680 nm

Vorbereitung:

Der 10x konzentrierte Bindungspuffer wurde mit destilliertem Wasser 10fach verdünnt und der 1x Bindungspuffer anschließend auf Eis gelegt. Es wurde eine Menge vorbereitet, die ausreichend war für die erwartete Anzahl von Analysen.

250 µg des Propidiumiodid (PI) wurden in 1 ml des 1x Bindungspuffers gelöst und die Lösung auf Eis gelegt.

Nach dem Gebrauch sollten die Lösungen bei 2 bis 8 °C gelagert werden.

Vorgehensweise

Erfassung der Apoptose in Zellsuspension:

1. Die Zellsuspension wurde mit eiskaltem Kulturmedium oder PBS gewaschen und zentrifugiert für 5 Minuten bei 500 x g bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl eiskaltem 1x Bindungspuffer resuspendiert zu $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ Zellen pro ml. Die Tubes wurden auf Eis gelegt.
2. 5 µl der Annexin V-FITC-Lösung wurden zur Zellsuspension hinzugefügt und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert.
3. Danach wurden 2,5 µl des PI zur Zellsuspension hinzugefügt, diese wurde vorbereitet wie in Schritt 1 beschrieben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt.
4. Die Tubes wurden im Eis aufbewahrt und im Dunkeln für weitere 10 Minuten inkubiert.
5. Jeweils 400 µl des eiskalten 1x Bindungspuffers wurden zu den Präparaten hinzugefügt und vorsichtig gemischt.
6. Die Zellpräparate sollten innerhalb von 30 Minuten mit Durchflusszytometrie analysiert werden.

Die Inkubation der Zellen mit Annexin V und PI sollte auf Eis erfolgen, um einen Fortschritt der Zellen durch die einzelnen Stadien anzuhalten,
Lebensfähigkeit → Apoptose → sekundäre Nekrose.

Anhang

Durch Messung im FACSScan® in Vorversuchen mit Cisplatin ergaben sich folgende Messwerte:

	FS	SS	FITC	PE	ECD	PC5	AUX
Voltage	90	350	606	750	557	915	500
Integral	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	10.0
	FS	SS	FITC	PE	ECD	PC5	AUX
Discriminator	30	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF
	FITC	PE	ECD	PC5			
FL1		0	5	0			
FL2	0		0	0			
FL3	30.2	0		0			
FL4	0	0	0				
Laser Power (mW)	15.00						

Anhang 3

Verwendete Elektronenvolt (eV)-Bereiche zur Analyse der einzelnen Elemente in der TEM.

Eisen (Fe)	M: 54 eV; L1: 702 eV; L2: 720 eV
Silizium (Si)	L2/3: 100 eV; L1: 149,5 eV
Natrium (Na)	L: 30,5 eV; K: 1075 eV
Magnesium (Mg)	L2/3: 54,5 eV; K: 1301 eV

Anhang 4

Analyse der Zytotoxizität mittels Trypan blau-Färbetest

In den Tabellen 2 bis 5 erfolgte die Angabe der lebenden Zellen in % ± Standardabweichung.

Tab. 2: Zytotoxizität von Krokydolith.

statistische Signifikanz: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Angabe der lebenden Zellen in % ± Standardabweichung; n = 3)

Zeit	Konzentration Krokydolith in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$						
	0	0,5	1	5	10	50	100
24h	84,7	82,1	86,3	84,2	79,1	76,5	59,5
	± 11,5	± 2,7	± 2,7	± 5,9	± 10,7	± 9,2	± 16,3
48h	84,9	93,7	90,5	73,4	76,2	80,8*	57,7**
	± 5,2	± 2,2	± 2,4	± 14,3	± 12,1	± 3,2	± 18,3
72h	77,7	84,4	93,2*	79,7	79,0	79,2*	57,2
	± 11,1	± 4,0	± 2,8	± 10,9	± 10,4	± 6,8	± 7,6

Tab. 3: Zytotoxizität von Titandioxid.

statistische Signifikanz: * $p \leq 0,05$ (Angabe der lebenden Zellen in % ± Standardabweichung ; n = 3)

Zeit	Konzentration Titandioxid in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$						
	0	0,5	1	5	10	50	100
24h	84,7	81,4	84,8	86,1	79,8	78,0	66,8*
	± 11,5	± 2,1	± 9,5	± 6,5	± 9,2	± 4,3	± 5,8
48h	84,9	91,0	90,7	80,6	75,2	90,2*	65,5*
	± 5,2	± 4,0	± 4,9	± 8,3	± 9,8	± 1,1	± 5,5
72h	77,7	89,7	87,3	82,2	81,3	86,1	76,9
	± 11,1	± 3,5	± 5,8	± 12,3	± 10,3	± 1,0	± 15,9

Tab. 4: Zytotoxizität von Toner.

statistische Signifikanz: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Angabe der lebenden Zellen in % ± Standardabweichung; n = 3)

Zeit	Konzentration Toner in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$							
	0	0,5	1	5	10	50	100	200
24h	84,7	83,6	72,9	73,6	65,7*	89,2	79,5	78,7
	± 11,5	± 8,6	± 7,5	± 11,5	± 11,6	± 2,9	± 10,8	± 10,3
48h	84,9	84,9	86,5	65,5	78,9**	82,1	51,1*	88,6
	± 5,2	± 5,0	± 2,8	± 19,9	± 15,3	± 2,7	± 12,0	± 9,4
72h	77,7	89,4	88,8	74,5	75,4	86,4	60,9	77,7
	± 11,1	± 1,2	± 6,6	± 13,5	± 14,0	± 5,6	± 10,7	± 13,9

Tab. 5: Zytotoxizität von Carbon black.

statistische Signifikanz: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Angabe der lebenden Zellen in % ± Standardabweichung; n = 3)

Zeit	Konzentration Carbon black in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$							
	0	0,5	1	5	10	50	100	200
24h	84,7	82,7	80,2	66,9*	64,4*	84,2	63,2*	45,5**
	± 11,5	± 3,0	± 4,2	± 21,4	± 23,3	± 4,8	± 8,0	± 12,6
48h	84,9	88,3	88,8*	87,0	89,0	87,7	74,0**	69,9*
	± 5,2	± 3,4	± 4,0	± 4,9	± 5,3	± 2,3	± 16,2	± 10,4
72h	77,7	88,3	86,3	72,1	79,9	81,2	78,2	54,3*
	± 11,1	± 4,3	± 3,2	± 13	± 12,9	± 8,2	± 13,0	± 13,6

Anhang 5

Intrazelluläre ROS-Produktion

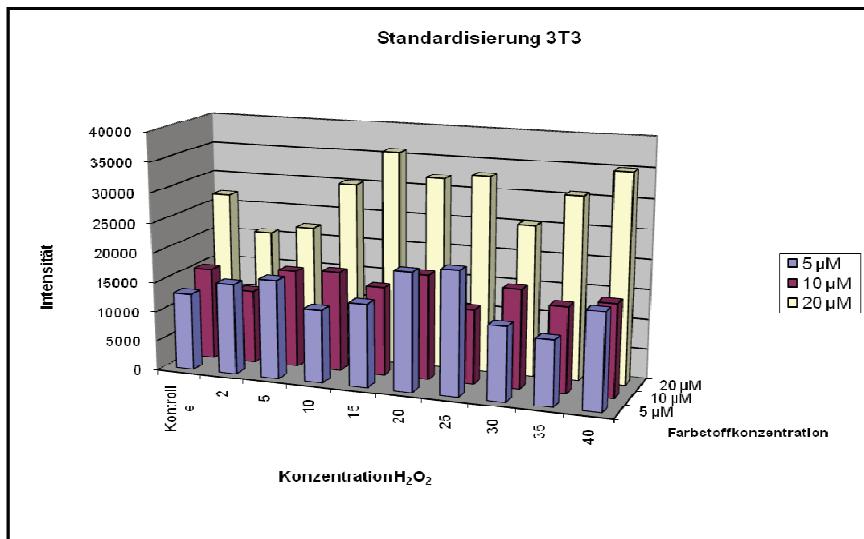


Abb. 1:

Standardisierung der 3T3-Zellen mit H₂O₂ um zu überprüfen, ob überhaupt eine Radikalbildung stattfindet. Die höchste Radikalbildung ergab sich bei einer Farbstoffkonzentration von 20 µM.

Tab. 6: Ergebnisse der Standardisierung der ROS-Messung für eine Konzentrationsreihe des Farbstoffes H₂DCF-DA und H₂O₂ ± Standardabweichung.

H ₂ DCFDA	Konzentration von H ₂ O ₂ in µm									
	Kontrolle	2	5	10	15	20	25	30	35	40
5 µM	12999	15301	16580	12282	13919	19798	20702	12391	10928	16135
	± 4926	± 7179	± 842	± 782	± 890	± 7769	± 10964	± 1602	-	± 1047
10 µM	15533	12337	16401	16823	14895	17608	12542	16550	14379	15528
	± 1150	± 1249	± 660	± 1060	± 1817	± 4671	± 3361	± 5168	± 2367	± 2825
20 µM	26938	20829	22243	30151	35929	32096	32894	25358	30709	35035
	± 4658	± 2491	± 3604	± 5961	± 4962	± 15105	± 2338	± 7688	± 4483	± 1314

Anhang

Tab. 7: Intrazelluläre ROS Messung mit dem Farbstoff H₂DCF-DA nach der Exposition mit Fasern und Partikeln bei einer Konzentration von 5 µg/cm² über verschiedene Zeiträume.
Da diese Messwerte (\pm Standardabweichung) untereinander aufgrund hoher Schwankungen nicht miteinander vergleichbar sind, wurden die Werte in ein Verhältnis gesetzt, wobei die Kontrolle 100 gesetzt wurde. Die Versuche mit 4 Messwerten wurden im Doppelansatz wiederholt.

	Zeit						
	15 min	30 min	45 min	1 h	3h	6h	12 h
Kontrolle	16837	9360	1543	6945	4805	2724	9542
	\pm 15289	\pm 9400	\pm 953	\pm 7016	\pm 1022	\pm 768	\pm 9339
Chrysotil	17326	12066	1701	10199	5784	3155	10658
	\pm 15675	\pm 12702	\pm 1039	\pm 10195	\pm 1451	\pm 454	\pm 10108
Titandioxid	15595	18517	2220	18973	13238	7531	21480
	\pm 13315	\pm 18924	\pm 1042	\pm 18942	\pm 3439	\pm 1094	\pm 20846
Krokydolith	17943	14897	1715	13122	8057	4581	13831
	\pm 16196	\pm 15074	\pm 914	\pm 13132	\pm 1214	\pm 376	\pm 12988
Toner	15423	14432	2012	14184	7552	4712	13803
	\pm 13267	\pm 14669	\pm 1101	\pm 14089	\pm 1217	\pm 801	\pm 13006
Carbon black	22333	18554	2373	16595	9342	5518	17843
	\pm 19891	\pm 18576	\pm 1261	\pm 16500	\pm 821	\pm 1054	\pm 16588

Tab. 8: Verhältnistabelle aus den Rohdaten \pm Standardabweichung. Die Kontrolle wurde 100 gesetzt.

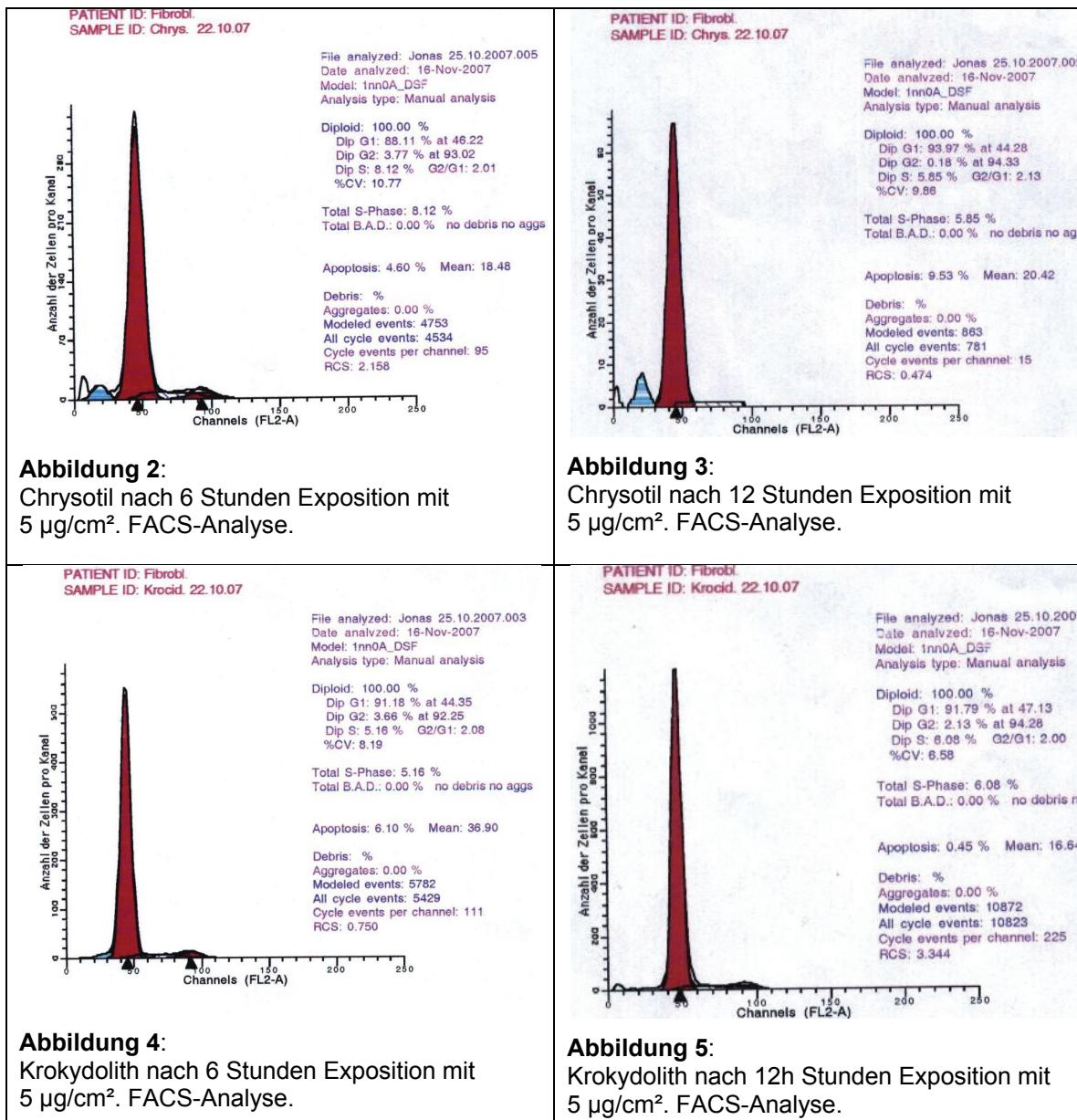
	Zeit						
	15 min	30 min	45 min	1 h	3 h	6 h	12 h
Kontrolle	100	100	100	100	100	100	100
Chrysotil	101 \pm 3	126 \pm 18	113 \pm 5	138 \pm 15	120 \pm 3	118 \pm 29	114
Titandioxid	102 \pm 18	152 \pm 8	132 \pm 45	182 \pm 37	181 \pm 44	182 \pm 22	155 \pm 12
Krokydolith	104 \pm 3	167 \pm 15	140 \pm 26	206 \pm 0	212 \pm 0	216 \pm 36	182 \pm 25
Toner	103 \pm 13	152 \pm 12	132 \pm 19	189 \pm 14	172 \pm 0	182 \pm 54	163 \pm 19
Carbon black	114 \pm 0	169 \pm 1	148 \pm 30	206 \pm 22	175 \pm 15	189 \pm 73	179 \pm 36

Tab. 9: Signifikanz (Signif.) der einzelnen Substanzversuche (aus den Rohdaten) aus der Messung der intrazellulären Radikale anhand des t-Test: n.s. nicht signifikant; statistische Signifikanz: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001

		1.Durchgang		Wiederholung	
		p-Wert	Signif.	p-Wert	Signif.
15 min	Chrysotil	0,977	n.s.	0,751	n.s.
	Titandioxid	0,009	**	0,444	n.s.
	Krokydolith	0,46	n.s.	0,514	n.s.
	Toner	0,473	n.s.	0,397	n.s.
	Carbon black	0,055	n.s.	0,068	n.s.
30 min	Chrysotil	0,317	n.s.	0,386	n.s.
	Titandioxid	0,017	*	0,013	*
	Krokydolith	0,012	*	0,048	*
	Toner	0,047	*	0,002	**
	Carbon black	0,003	**	0,0003	***
45 min	Chrysotil	0,750	n.s.	0,569	n.s.
	Titandioxid	0,007	**	0,019	*
	Krokydolith	0,140	n.s.	0,060	n.s.
	Toner	0,086	n.s.	0,069	n.s.
	Carbon black	0,044	*	0,013	*
1 h	Chrysotil	0,150	n.s.	0,056	n.s.
	Titandioxid	0,014	*	0,041	*
	Krokydolith	0,041	*	0,062	n.s.
	Toner	0,035	*	0,065	n.s.
	Carbon black	0,020	*	0,026	*
3h	Chrysotil	0,112	n.s.	0,531	n.s.
	Titandioxid	0,00001	***	0,008	**
	Krokydolith	0,001	***	0,072	n.s.
	Toner	0,002	**	0,106	n.s.
	Carbon black	0,001	***	0,019	*
6h	Chrysotil	0,627	n.s.	0,019	*
	Titandioxid	0,015	**	0,007	**
	Krokydolith	0,072	n.s.	0,002	**
	Toner	0,113	n.s.	0,002	**
	Carbon black	0,059	n.s.	0,001	***
12 h	Chrysotil	0,356	n.s.	0,431	n.s.
	Titandioxid	0,030	*	0,036	*
	Krokydolith	0,048	*	0,028	*
	Toner	0,081	n.s.	0,031	*
	Carbon black	0,027	*	0,018	*

Anhang 6

Vorversuche der Apoptosemessung mit Rinderfibroblasten.



Anhang 7

Bestimmung der Apoptose

Tab. 10: Absoluter Anteil an apoptotischen 3T3-Zellen ± Standardabweichung (n = 4).

	Frühapoptotisch (Annexin pos.)	Spätapoptotisch (Annexin/PI pos.)	Nekrotisch (PI pos.)	Vitale (ungefärbte)
Kontrolle	60,75 ± 25,71	217,5 ± 209,91	652,75 ± 307,35	6253 ± 1102,49
Cisplatin	25 ± 17,03	60,75 ± 43,8	773,75 ± 184,62	5442,25 ± 877,07
Chrysotil	23 ± 25,47	21,5 ± 23,35	406,75 ± 180,6	3905,25 ± 2068,07
Krokydolith	14,75 ± 20,29	8,5 ± 11,79	570 ± 160,31	3936 ± 866,78
Titandioxid	68,75 ± 82,83	129,5 ± 191,37	724,75 ± 286,7	3200,25 ± 1348,69
Toner	128,25 ± 176,62	61,5 ± 72,41	726,75 ± 265,18	5411 ± 1018,81
Carbon black	62,75 ± 49,74	161,75 ± 169,19	287,75 ± 160,57	5080,75 ± 738,28

Tab. 11: Statistische Signifikanz der Apoptosewerte. Im t-Test konnte kein statistisch signifikanter Unterschied für die einzelnen Messwerte ermittelt werden.

	p-Wert für Apoptose					
	Cisplatin	Chrysotil	Krokydolith	Titandioxid	Toner	Carbon black
Nekrotisch	0,32	0,67	0,32	0,71	0,47	0,75
Spätapoptotisch (SA)	0,41	0,32	0,3	0,88	0,42	0,89
Vitale	0,57	0,23	0,88	0,82	0,09	0,88
Frühapoptotisch (FA)	0,22	0,38	0,27	0,7	0,63	0,82

Danksagung

Herrn Prof. Dr. L. Jonas möchte ich für die Unterstützung des Projektes sowie die Möglichkeit der elektronenmikroskopischen Untersuchungen am EMZ danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin in Essen **Frau Priv.-Doz. Dr. E. Dopp** für die großartige Unterstützung und jegliche Hilfestellung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Für die Hilfe bei den Analysen am Raster- und Transmissionselektronenmikroskop möchte ich mich ganz herzlich bei **Herrn G. Fulda** sowie bei **Herrn W. Labs** bedanken. Für die Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate möchte ich mich auch bei **Frau U. Schulz** bedanken.

Darüber hinaus möchte ich **Frau Priv.-Doz. Dr. B. Nebe** für die Durchführung der Messung der Apoptose in Rostock danken.

Ich möchte mich auch bei **Herrn Prof. Dr. H. Nizze** für die Bereitstellung der Asbestfälle und die große Hilfe bei der Auswertung der lichtmikroskopischen Bilder bedanken.

Des Weiteren danke ich **Herrn Prof. Dr. K.-M. Müller** der Ruhr-Universität Bochum für die Bereitstellung der Asbestosefälle.

Einen großen Dank möchte ich **Frau G. Zimmer** in Essen aussprechen, die mir nicht nur in der Zellkultur mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, sondern mir auch in vielen Gesprächen immer Mut zugesprochen hat.

Darüber hinaus danke ich **Frau U. Zimmermann** in Essen für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den Laborversuchen.

Zusätzlich danke ich **Frau C. Lukat**, die mir bei der Anfertigung der lichtmikroskopischen Bilder der Patientenpräparate geholfen hat und auch den Mitarbeiterinnen der histopathologischen Abteilung, die für mich die lichtmikroskopischen Präparate hergestellt haben. Für die Einführung in die Zellkultur und ihre Hilfsbereitschaft danke ich **Frau U. Naumann**.

Danksagung

Ich möchte mich bei **Herrn K. Bhattacharya** bedanken, der mir bei aufgetretenen Problemen immer eine Hilfe war und Rat wusste. Ich danke auch **Herrn Dr. F. Mosel** in Essen für die hilfreiche Unterstützung bei Anfertigung von Fotos sowie bei der Lösung von Computer- und Dateiproblemen.

Herrn Prof. G. Iliakis von der Universität Duisburg-Essen danke ich für die Möglichkeit der durchflusszytometrischen Messung in Essen. Des Weiteren bedanke ich mich bei **Frau T. Mußfeld** für Durchführung der FACS-Analyse.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Hygiene und Arbeitsmedizin der Universität Duisburg-Essen, die hier nicht namentlich erwähnt werden, für das nette und freundliche Arbeitsklima bedanken.

Für die abschließende Durchsicht der Arbeit möchte ich meiner Mutter, meiner Tante, meinem Freund sowie meiner Freundin **S. Butt** und **R. Zdrenka** sowie **E. Preckel** ganz herzlich danken. Darüber hinaus danke ich meinem Freund für seine großartige Unterstützung.

Der größte Dank gebührt jedoch vor allem **meinen Eltern**, aber auch **meinen Großeltern**, die mich trotz aller Höhen und Tiefen, sowohl in der Zeit des Studiums als auch während der gesamten Doktorarbeit, mit ihrer Liebe und Güte unterstützt haben. Ihnen bin ich aus tiefstem Herzen dankbar, denn nur durch sie konnte ich meine Wünsche und Träume verwirklichen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorliegende Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht. Eine erfolglose Beendigung eines Promotionsverfahrens liegt nicht vor.

Susanne Tautz