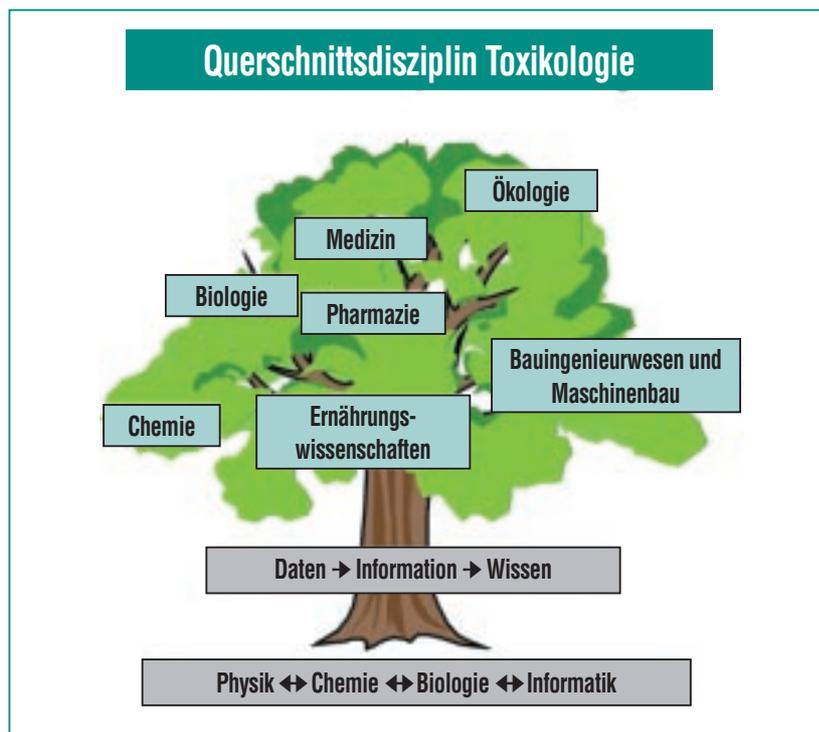


# Molekulare Umwelttoxikologie – ein interdisziplinärer Ansatz

H.F. Krug, S. Diabaté, S. Strack, ITG

Interdisziplinäre Forschung: eine Philosophie, ein Kunststil, ein Artefakt oder ein Antidot? So könnte die Frage provokativ gestellt sein, aber die molekulare Umwelttoxikologie – sowohl grundlagen- als auch anwendungsorientiert – kommt ohne Interdisziplinarität nicht aus. Von der Molekularbiologie über die Biotechnologie bis hin zur Betrachtung von Ökosystemen ist hier alles gefragt. Die toxikologischen Arbeitsgruppen im Forschungszentrum arbeiten nicht nur mit biologischen, chemischen und physikalischen Instituten der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren (HGF) zusammen, um z.B. die gesundheitsschädlichen Wirkungen ultrafeiner Staubpartikel zu erforschen, sie sind mit der Tumorklinik in Freiburg dabei, Antitumormittel zu testen und setzen auf neue Methoden im Bereich der Gentechnik, die ihnen Hilfsmittel wie die fluoreszierenden Fusionsproteine an die Hand geben, um in lebenden Zellen toxische Wirkungen verschiedener Umweltchemikalien erfassen zu können. Anhand einiger prägnanter Beispiele soll das interdisziplinäre Vorgehen verdeutlicht werden.

Bereits der Titel – Molekulare Umwelttoxikologie – beinhaltet interdisziplinäre Elemente. Das Wort „molekular“ bezeichnet im wesentlichen die Absicht, Wirkungsmechanismen verschiedener toxischer Noxen auf molekularer Ebene aufzuklären und stellt gleichzeitig einen Bezug zur „Molekularbiologie“ her. Der Begriff „Umwelt“ stellt hier klar, dass im Vordergrund diejenigen Einflüsse bzw. Substanzen stehen, die

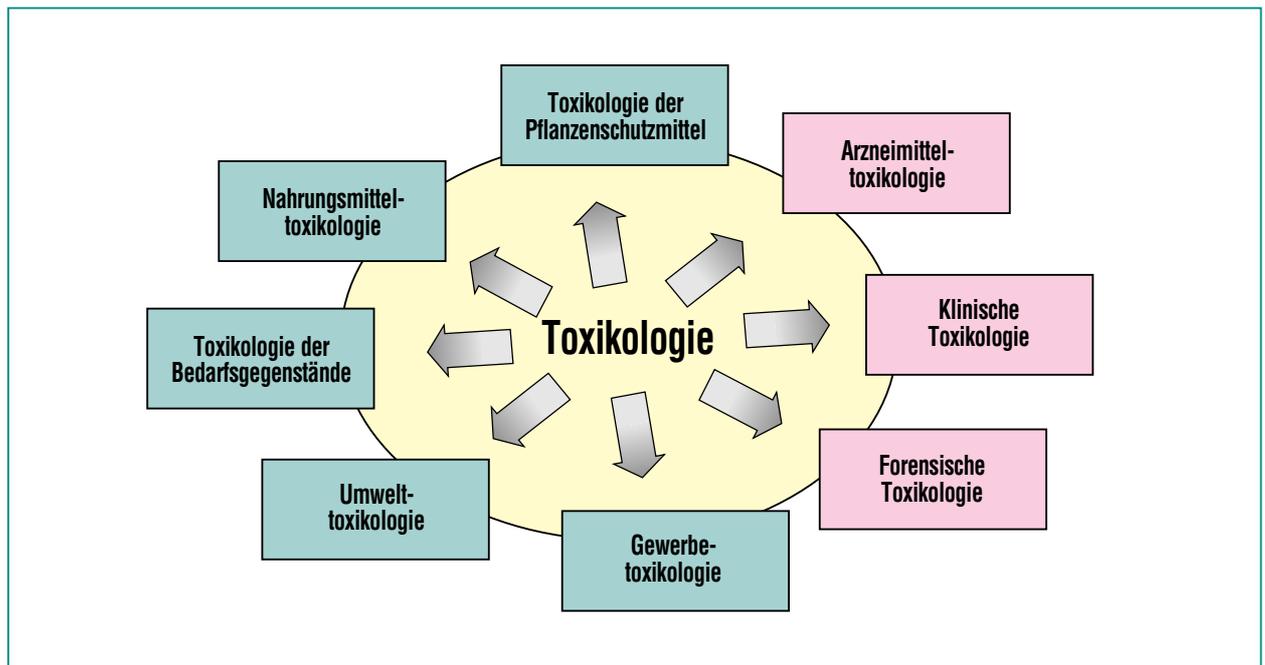


**Abb. 1: Toxikologie als Querschnittsdisziplin. Das Fachgebiet „Toxikologie“ kann sich nur als Querschnitt bzw. Summe aus vielen Einzeldisziplinen verstehen. Auf der Basis des Wissens aus Physik, Chemie und Biologie in Verbindung mit einer funktionstüchtigen Informatik wird daraus der Ausgangspunkt für eine wiederum in die anderen Disziplinen hineinwirkende Toxikologie.**

durch anthropogene Aktivitäten in die Umwelt gelangen und von dort auf lebende Organismen zurückwirken. Und letztlich sagt der Begriff „Toxikologie“ aus, dass damit schädliche Wirkungen gemeint sind, die unsere Lebensqualität direkt beeinträchtigen. Dabei ist die Toxikologie allein bereits ein Fachgebiet, das nicht klar umrissen werden kann und sich daher als eine „Querschnittsdisziplin“ darstellt. Die Grundlagen, die für ein Verständnis der Toxikologie notwendig sind, setzen sich aus den fundamentalen Kenntnissen der Physik, Chemie, Biologie, Medizin und Informatik zusammen. Die daraus gewonne-

nen Erkenntnisse und Daten führen zu einem verbesserten Wissen der Zusammenhänge, das von der Toxikologie innerhalb unterschiedlicher wissenschaftlicher Sektoren, wie Pharmazie und Medizin, Ernährungswissenschaften und Ökologie, aber auch z.B. im Bauwesen, angewandt wird (Abb. 1).

Auf dieser Basis baut die Fachdisziplin Toxikologie auf, wobei sie in eine Reihe weiterer Unterdisziplinen unterteilt werden kann. Grundsätzlich sind dabei grob zwei Richtungen zu unterscheiden: die eher medizinisch ausgerichteten toxikologischen Schwerpunkte (Abb. 2, rote Käst-



**Abb. 2: Die Teilgebiete der Toxikologie.** Die Umwelttoxikologie ist eines der vielen Teilgebiete der Toxikologie, wobei allerdings eine Reihe von Teilgebieten auch gleichzeitig in die Umwelttoxikologie als Oberbegriff hineinreichen (grüne Kästen). Die roten Kästen demonstrieren die medizinischen Teile der Toxikologie.

chen) und die auf die Umwelt des Menschen zielenden Disziplinen (grüne Kästchen), die im wesentlichen alle Produktionsvorgänge und Produkte, aber auch andere anthropogene Einflüsse beinhalten. In vielen Teilen überlappen diese Bereiche und aus der Vielfalt der Themen ergibt sich auch die Interdisziplinarität, die für unseren Institutsteil Toxikologie an einigen Beispielen genauer erläutert werden soll.

### Thema 1: Toxikologie der Metalle und ihrer Verbindungen

Die Metalle stellen die größte Gruppe umweltbelastender Einflüsse durch den Menschen [1]. Die Wirkung, die von ihren welt-

weiten anthropogenen Emissionen ausgeht, übertrifft dabei die aller organischen Substanzen als auch aller physikalischen Einflüsse, wie ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung und Lärm. Neben der krebserzeugenden Wirkung einiger metallischer Elemente bzw. Verbindungen (Tab. 1) greifen verschiedene Metallverbindungen in den Stoffwechsel der Organismen ein und können zu erheblichen Beeinträchtigungen führen.

Der Beginn solcher Untersuchungen setzt die Kenntnis voraus, welche Konzentrationen in den verschiedenen Umweltkompartimenten (Boden, Luft, Wasser, Organismen) vorliegen, also wird eine solide chemische Analytik<sup>1)</sup>

benötigt. Damit kann gezeigt werden, dass bestimmte Verbindungen wie Tributylzinn (TBT) in der Nahrungskette akkumulieren (Abb. 3). Die Biologie liefert ihrerseits Hinweise auf bereits beobachtbare Effekte im Freiland. So führt TBT entlang der großen Schifffahrtswege und in Hafengebieten zum Rückgang und Aussterben verschiedener Meeresschneckenpopulationen [3]. Nun kann die Molekulare Umwelttoxikologie daran gehen, den Wirkungsmechanismus auf Organ- und/oder Zellebene aufzuklären, um mögliche irreversible Schädigungen zu entlarven und notwendigen gesetzlichen Regelungen zur eingeschränkten Verwendung der Substanz eine wissenschaftliche Grundlage zu geben.

<sup>1)</sup> unterstrichen sind die an den Projekten jeweils beteiligten Disziplinen

Metall	Mensch <sup>1</sup>	Tier <sup>1</sup>	Einordnung <sup>2</sup>
Arsen (As)	S	L	Gruppe 1
Cadmium (Cd) und seine Verbindungen	S	S	Gruppe 1
Chrom (Cr-VI) Verbindungen	S	S <sup>3</sup>	Gruppe 1
Kobalt (Co) und seine Verbindungen	I	S <sup>4</sup>	Gruppe 2B
Blei (Pb)	I	S <sup>5</sup>	Gruppe 2B
Nickel (Ni) und seine Verbindungen	S	S <sup>6</sup>	Gruppe 1

- 1: S = ausreichende Beweise vorhanden; L = schwache Befunde; I = nicht ausreichende Befunde.  
2: Gruppe 1 = karzinogen bei Menschen; Gruppe 2B = möglicherweise karzinogen bei Menschen.  
3: Calciumchromat, Bleichromat, Strontiumchromat, Zinkchromat.  
4: Metallpulver, Co(II)oxid.  
5: Anorganische Bleiverbindungen.  
6: Nickelmonoxid, kristallines Nickelsulfid, Nickelhydroxide.

Tab. 1: Metalle, deren karzinogene Wirkung von der IARC (International Agency for Research on Cancer) klassifiziert wurde [2].

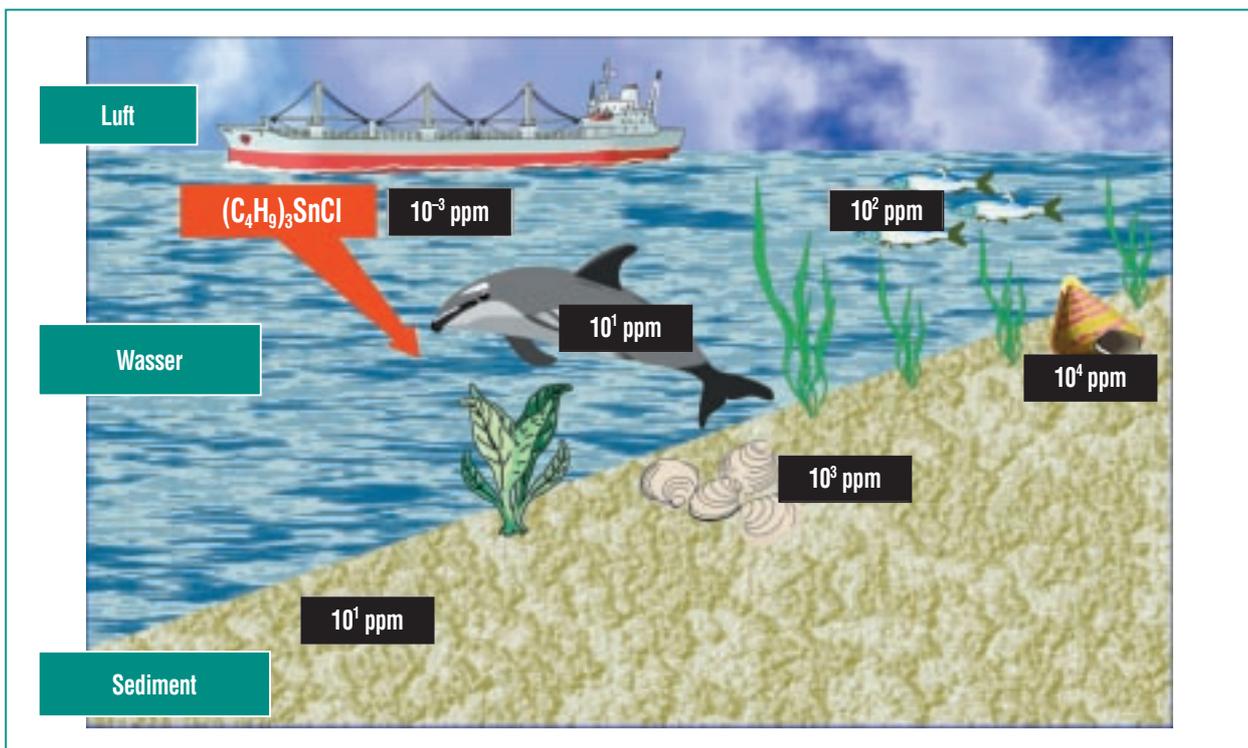


Abb. 3: Anreicherung von Tributylzinn ((C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnCl) in der Nahrungskette. Vom Wasser (ca. 10<sup>-3</sup> ppm) bis hin zu den Mollusken (10<sup>4</sup> ppm) findet eine Anreicherung um mehr als millionenfach statt [Zahlen aus 6 und 7].

### Thema 3: Fluoreszenzverfahren in der Molekularen Umwelttoxikologie

Für die Untersuchung cytotoxischer Effekte von Umweltgiften werden heute Gewebekulturen von unterschiedlichsten tierischen oder menschlichen Zellen verwendet, in denen mit Hilfe von fluoreszenz-mikroskopischen Methoden die toxischen Einwirkungen direkt sichtbar gemacht werden können. Die Fluoreszenzmikroskopie mit ihren heute weitreichenden Möglichkeiten für Strukturuntersuchungen und biochemische Analysen in zeitlicher und räumlicher Auflösung kann nicht nur zur Veranschaulichung biologisch-toxikologischer Prozesse beitragen, sondern auch zu ihrer Aufklärung und sogar zum quantitativen Nachweis – direkt am Reaktionsort – einen wichtigen Beitrag leisten. Hypothesen zu molekularen Mechanismen in der Zelle, die aufgrund von biochemischen Bestimmungen im Lysat\* der untersuchten Zellen entwickelt wurden, können durch Visualisierung der Vorgänge in den Zellorganellen bestätigt oder verworfen werden.

Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich neue fluoreszierende Proteine herstellen und in lebende Zellen einschleusen. Diese, unter der Bezeichnung „grün fluoreszierendes Protein“ (GFP) bekannt gewordenen Fluorochrome, wurden ursprünglich aus der pazifischen Qualle *Aequoria victoria* isoliert. Durch geeignete Vektoren\*, z.B. ringförmige DNA-Plasmide\*, die das GFP-Molekül

\*) Diese Begriffe sind im Glossar erläutert

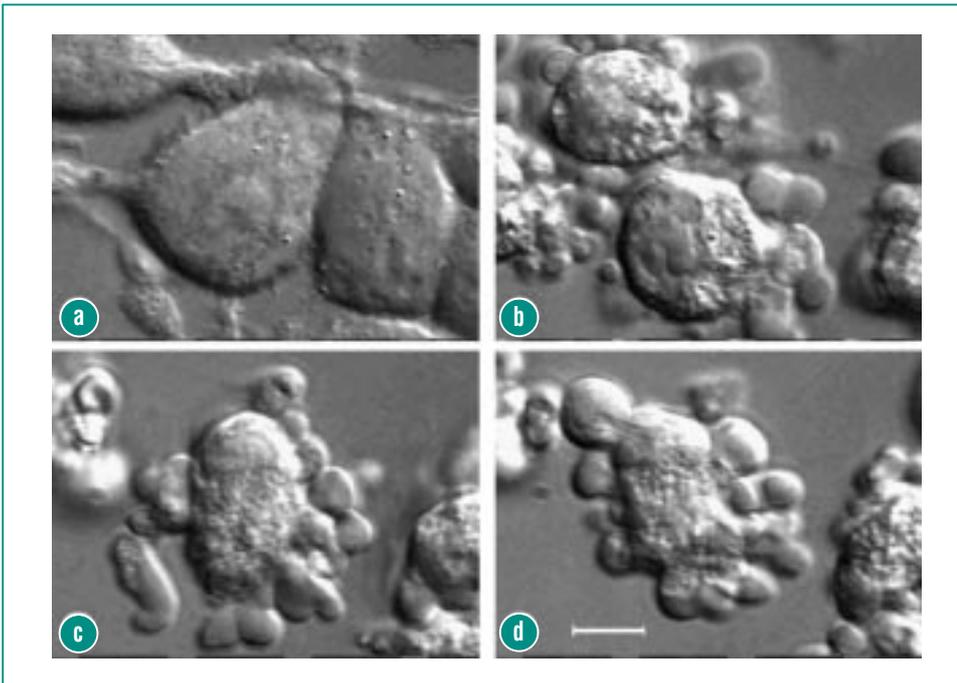


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Apoptose in einer einzelnen RBL-Zelle. Die basophilen Leukämiezellen der Ratte (RBL) wurden mit 5  $\mu\text{M}$  TBT behandelt und die zeitlichen Veränderungen der Morphologie im Mikroskop mit Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) verfolgt. Für den Originalfilm wurde alle 5 sec ein Bild aufgenommen. Die gezeigten Ausschnitte beginnen nach 60 min Vorbehandlung mit TBT: (a) 0. Minute; (b) 13. Minute; (c) 29. Minute; (d) 37. Minute (Objektiv 63fach, Ölimmersion, Maßstab 10  $\mu\text{m}$ ).

So konnten u.a. auch wir dazu beitragen, dass die organischen, trialkylierten Verbindungen von Blei und Zinn als Auslöser des regulierten Zelltodes (Apoptose) erkannt wurden (Abb. 4) und wie sie dies auf molekularer Ebene anstellen [4, 5].

### Thema 2: Synthetische Phospholipide als Antitumormittel: ein neues Konzept

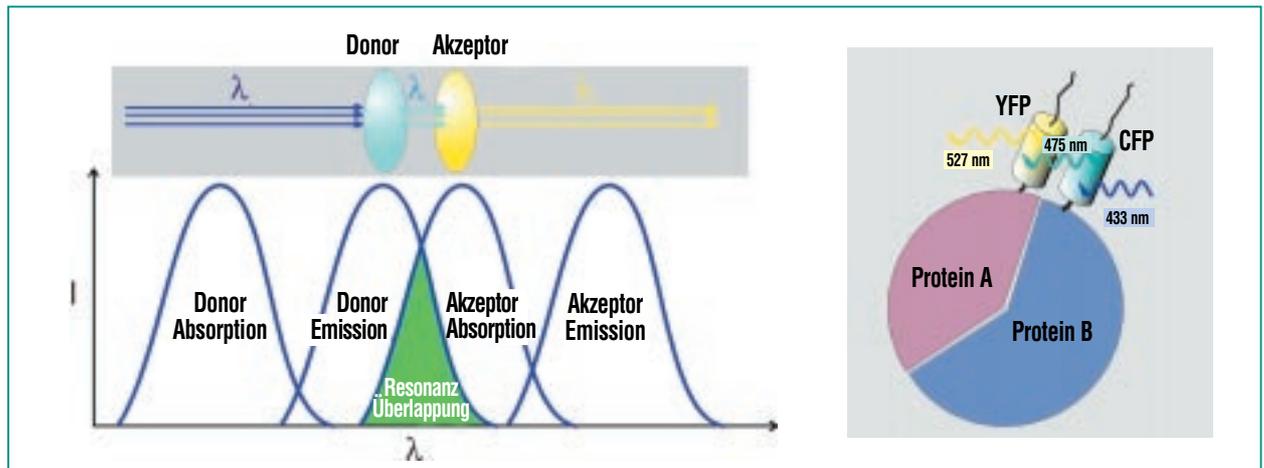
Unter diesem Titel haben wir im vergangenen Jahr an gleicher Stelle über ein „Nebenprodukt“ unserer Apoptose-Forschung berichtet [8]. In Zusammenarbeit mit Chemikern und Medizinern der Tu-

mobiologie in Freiburg wurde eine Gruppe neu synthetisierter Lipide (Fette) untersucht, die einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen ausüben. Die Molekulare Umwelttoxikologie übernahm die Aufgabe, den genauen molekularen Mechanismus ihrer Wachstumshemmung aufzuklären. Aus dieser Kooperation, die immer noch andauert, resultierten Ergebnisse, die auf zwei internationalen Tagungen mit Preisen ausgezeichnet wurden [9, 10]. Die Erkenntnisse aus unseren Arbeiten [11] sollen zu einer Optimierung der Substanzen führen, so dass diese in absehbarer Zeit einmal als Anti-Tumormittel eingesetzt werden können.

und ein zelleigenes Protein codieren, werden sogenannte Fusionsproteine, das sind zelleigene Proteine mit einem „GFP-Anhängsel“, von der Zelle selbst gebildet. Diese Fusionsproteine stellen dann hervorragende Sonden zum Aufspüren und zum Verfolgen von biochemischen Vorgängen in Zellgeweben dar. Die spektroskopischen Eigenschaften des GFP konnten durch Mutationen zusätzlich verändert werden, so dass für diese Untersuchungen eine Reihe verschiedenfarbiger GFP-Fluorochrome zur Verfügung stehen: blau (BFP), cyan (CFP), gelb (YFP) und ein verwandtes rotes (ds-Red), das aus der Seeanemone *Discosoma sp.* isoliert wurde.

Hierdurch haben sich die Einsatzmöglichkeiten in der biologisch-toxikologischen Forschung nochmals erheblich erweitert. Neben der Möglichkeit zwei verschiedene Zielstrukturen mit unterschiedlichen Farben zu versehen (Doppelmarkierung) gibt es darüber hinaus noch die Möglichkeit für den Nachweis spezifischer Protein-Protein-Interaktionen in der lebenden Zelle. Bei der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET) wird bei einer Anlagerung z.B. eines cyanen Proteins an ein gelbes bei Anregung mit blauem Licht eine gelbe Fluoreszenz beobachtbar, die dadurch entsteht, dass das gelbe Protein durch das cyan-farbene Licht des benachbarten Proteins angeregt wird (Abb. 5). Diese und eine große Anzahl weiterer fluoreszenz-mikroskopischer Methoden sind in jüngster Zeit durch das fruchtbare Zusammenwirken von physikalischem, chemi-

Glossar	
<b>Apoptose</b>	Ein genetisch festgelegter Plan für den „programmierten, regulierten Zelltod“. Die Zellen sterben ab, ohne dass ein Entzündungsherd gebildet wird. Durch Anschalten dieses „Selbstmordprogrammes“ können überschüssige, entartete oder geschädigte Zellen auf unproblematische Art vom Organismus eliminiert werden.
<b>Blebbing</b>	Aus dem englischen entnommener Begriff der „Blasenbildung“ auf der Zelloberfläche.
<b>DNA-Plasmid</b>	Kleines ringförmiges DNA-Molekül, das oft als Vektor* für die Klonierung* von DNA verwendet wird.
<b>Enzym</b>	Protein, das chemische Prozesse in der Zelle katalysiert.
<b>Fluoreszenz</b>	Die Eigenschaft eines Stoffes, Licht von hoher Energie zu absorbieren und Licht mit einer niedrigeren Energie abzustrahlen.
<b>Klonierung</b>	Bildung von Zell- oder Organismenpopulationen durch wiederholte (asexuelle) Teilung. Bei der Klonierung von Genen wird eine große Anzahl von Kopien eines Gens hergestellt.
<b>Lysat</b>	Inhalt von Zellen, der nach Zerreißen der Zellmembran frei wird.
<b>Meta-Analyse</b>	Wird teilweise mit dem Begriff „systematische Übersicht“ synonym verwendet. Streng genommen versteht man unter einer Meta-Analyse eine Methode, mit der die Resultate mehrerer Studien zu einer bestimmten Fragestellung gesammelt, beurteilt und in einem komplizierten statistischen Verfahren miteinander verglichen werden.
<b>Modalwert</b>	Derjenige Wert einer Verteilung, welcher am häufigsten besetzt ist.
<b>Nekrose</b>	Zell- oder Gewebetod durch direkte schädigende Einwirkungen. Durch die Nekrose wird meist eine Entzündung hervorgerufen, da der Zellinhalt unkontrolliert in die Umgebung abgegeben wird.
<b>Systemische Wirkung</b>	eine Wirkung, die sich im Körper entfaltet, also erst am gewünschten Ort bzw. Organ
<b>Toxin</b>	Im allgemeinen ein giftiger Stoff
<b>Transformation</b>	Eine Veränderung der Erbinformation einer Zelle durch Einbau von „Fremd-DNA“, die häufig zur Veränderung ihrer Eigenschaften führt.
<b>Vektoren</b>	In der Zellbiologie verwendetes Element (Virus oder Plasmid), um genetisches Material in eine Zelle oder einen Organismus einzubringen.
<b>Wirkmechanismus</b>	Eines der Ziele medizinischer Grundlagenforschung ist die Aufklärung der Mechanismen von therapeutisch bedeutsamen Substanzen. Dabei sind Fragen zu beantworten, welcher Art die Wirkung ist und auf welchem Wege sie zustande kommt. Im einzelnen muss geprüft werden, an welchem Punkt der Zelle die Substanz angreift, welche Signale dadurch ausgelöst werden und was dadurch letztendlich innerhalb der Zelle für Veränderungen stattfinden.
<b>Zelllinien</b>	Zellkulturen, die sich nahezu unbegrenzt permanent züchten lassen, da sich ihre Eigenschaften meist durch Transformation* soweit geändert haben, daß sie nicht mehr absterben.



**Abb. 5: Schematisches Prinzip der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer Mikroskopie (FRET). Messung von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von FRET, bei Markierung von Proteinen mit einem geeignetem Paar verschiedener GFP-Varianten (z.B. CFP/YFP) wird bei engem Kontakt unter Blaulicht-Anregung nur gelbes Licht emittiert.**

schem, biologischem und ingenieurwissenschaftlichem Know-how entstanden. In Tab. 2 sind als Beispiel einmal alle sogenannten „F-Techniken“ zusammengestellt, die in diesem Zusammenhang heute von Bedeutung sind.

<b>FSPIM</b>	Fluorescence <b>s</b> pectral imaging <b>m</b> icroscopy
<b>FRET</b>	Fluorescence resonance <b>e</b> nergy <b>t</b> ransfer
<b>FLIM</b>	Fluorescent life time imaging <b>m</b> icroscopy
<b>SFLIM</b>	<b>S</b> pectrally resolved fluorescent life time imaging <b>m</b> icroscopy
<b>FRAP</b>	Fluorescence recovery <b>a</b> fter <b>p</b> hoto-bleaching
<b>FLIP</b>	Fluorescence loss of intensity after <b>p</b> hoto-bleaching
<b>FCS</b>	Fluorescence <b>c</b> orrelation <b>s</b> pectroscopy

**Tab. 2: Zusammenstellung einer Auswahl von sog. „F-Techniken“, die in jüngster Zeit für die Fluoreszenz-Mikroskopie entwickelt wurden.**

### *Gelb-markiertes Aktin als Sonde für das Cytoskelett*

Bei der Untersuchung toxischer Wirkungen von Organometallen, werden von uns solche Methoden eingesetzt. Eine der wirksamsten Verbindungen dieser Art, das TBT (Tributylzinn, vgl. Thema 1), wird noch immer in sogenannten „Anti-fouling“ Anstrichen bei Schiffen und in Antiseptika verwendet, aber es wurde in jüngster Zeit bei uns auch in Textilien nachgewiesen, wo es vermutlich als Verunreinigung der als Konservierungsstoffe verwendeten dialkylierten Zinnverbindungen enthalten war. TBT löst in Kulturen von menschlichen Zellen und auch in Zellen von Säugern Apoptosen aus, wenn die Konzentration im Medium im Bereich zwischen 0,2 und 5,0  $\mu\text{M}$  ( $\cong$  0,07 bis 1,8  $\text{mg/l}$   $\leq$  1 ppm) liegt.

Für die Untersuchungen verwenden wir beispielsweise Epithel- oder Bindegewebszellen, die mit GFP-Vektoren transfiziert wur-

den. Diese Vektoren enthalten ein Fusionsprotein des Aktins, das bei Anregung gelb fluoresziert und sich somit gut zur Darstellung des Cytoskeletts eignet. Die Zellen werden auf Deckgläsern angezüchtet und mit einem Fluoreszenz-Mikroskop in einer klimatisierten Kammer für mehrere Stunden beobachtet. Mit einer Video-Kamera können nun Zeitraffer-Aufnahmen von lebenden Zellen aufgenommen werden.

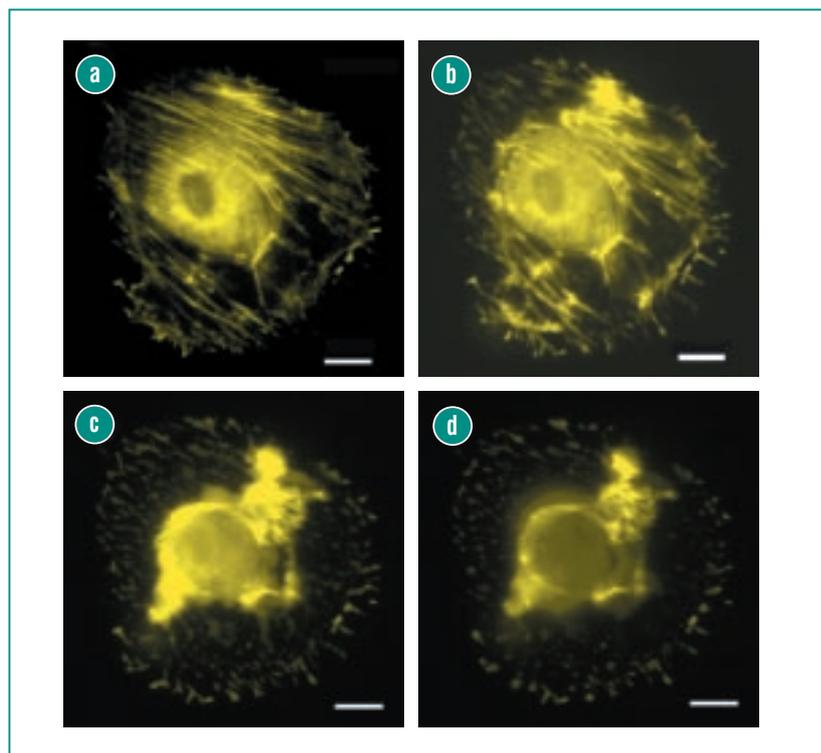
Eine der ersten beobachtbaren Veränderungen während des streng regulierten Absterbens (Apoptose) stellt neben der Abrundung und einem Schrumpfen der Zellen eine markante Umorganisation des Aktin-Cytoskeletts dar. Aktin-begrenzte Ausstülpungen der Zelle werden schon Minuten nach der Applikation von TBT zurückgezogen. Stressfasern, die besonders charakteristisch für epitheliale und Bindegewebszellen sind, lösen sich anschließend von ihren extrazellulären Anheftungspunkten, so

dass sich die meist unter Spannung stehenden Fasern in sich zusammenziehen (Abb. 6a und b, weitere Bilder und Filmbeispiele: <http://itgmv1.fzk.de/www/toxikologie/index.htm>). Je nach Anzahl und Anordnung der Fasern können sie sich so zu ringförmigen Strukturen um den Zellkern herum konzentrieren (Abb. 6c). Schließlich zerfallen die Aktin-Strukturen (Abb. 6d) bis schließlich die gesamte Zellsubstanz einschließlich Aktin in den apoptotischen Körpern „verpackt“ ist (siehe auch Abb. 4). In vivo, d.h. im lebenden Organismus, können diese dann von umliegenden Zellen des Gewebes oder von Makrophagen aufgenommen werden, ohne dass der Inhalt der abgestorbenen Zelle freigesetzt wird und dadurch Entzündungsprozesse auslöst.

#### Thema 4: Inhalationstoxikologie der Nanoteilchen

„Tod vom Allerfeinsten“ lautete kürzlich eine Schlagzeile in der „Zeit“ vom 30.08.2001 [12]. Winzige Staubpartikel sollen dafür verantwortlich sein, dass Menschen ernsthaft erkranken oder sogar sterben. Was steckt dahinter?

Staub gehört neben  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ , CO und Ozon zu den klassischen Luftschadstoffen. Durch effektive Minderungsmaßnahmen ist heute die Staubkonzentration in der Umwelt auf sehr niedrige Werte zurückgegangen. Studien im Raum Erfurt seit 1991/92 [13, 14] sowie in anderen Regionen der Welt [15] zeigen, dass zwar die Massenkonzentration des Staubes reduziert wurde, die Anzahl-



**Abb. 6:** Veränderungen des Cytoskeletts einer Epithel-Zelle während der Apoptose. Innerhalb von ca. 20 min wird das markante Netz von Stressfasern umorganisiert. Das zelleigene Aktin wurde durch YFP sichtbar gemacht: a) 20 Minuten nach Zugabe von TBT ( $2 \mu\text{M}$  TBT) ins Kulturmedium setzt das Zusammenziehen der Stressfasern ein; (b) nach 25 min ist der Abbau der Fasern weit fortgeschritten; c) das Aktin ordnet sich um den Zellkern herum an (36 min); d) die gesamte Zellsubstanz einschließlich des weitgehend abgebauten Aktins (41 min) wird schließlich in den apoptotischen Körpern „verpackt“ (siehe auch Abb. 4), Objektiv 40fach, Ölimmersion, Maßstab  $10 \mu\text{m}$ .

konzentration jedoch nicht. Dies ist auf den zahlenmäßig hohen Anteil an feinen ( $< 1 \mu\text{m}$ ) und ultrafeinen Partikeln (UFP,  $< 100 \text{ nm}$ ) zurückzuführen, die nur geringfügig zur Massenkonzentration beitragen. In epidemiologischen Untersuchungen wird statistisch eine Assoziation zwischen Staubkonzentration, gemessen als  $\text{PM}_{10}$  (Particulate Matter  $< 10 \mu\text{m}$ ), und Wirkungen auf die menschliche Gesundheit beobachtet. Bereits bei geringem

Anstieg der Staubkonzentrationen erhöht sich die Anzahl der Erkrankungen der Atemwege bzw. des Herz-Kreislauf-Systems sowie die Mortalität aufgrund dieser Erkrankungen. Diese akuten Effekte treten jedoch kaum bei gesunden, sondern insbesondere bei bereits erkrankten, sehr jungen und älteren Menschen auf. Eine Meta-Analyse\* zeigt, dass ein Anstieg der  $\text{PM}_{10}$ -Konzentration um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  mit einem Anstieg der Mortalität um ca. 1% assoziiert ist.

Erkrankungen des Respirationsstraktes und des Herz-Kreislaufsystems werden meistens durch mehr als einen Faktor ausgelöst. Zur Lösung der komplexen Fragestellungen zum Zusammenhang zwischen den Umweltschadstoffen und diesen Erkrankungen werden Kenntnisse aus den verschiedensten Fachbereichen benötigt: Physik und Ingenieurwissenschaften, um die Emissionen zu messen und die Partikel zu charakterisieren, Chemie, um die chemische Zusammensetzung unbekannter Partikel zu analysieren, Meteorologie, um den Transport von der Emissionsquelle bis zum Wirkort zu berechnen, Toxikologie und Molekularbiologie, um die biologischen Wirkungen von Partikeln mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Methoden zu untersuchen, Epidemiologie und Medizin, um die Korrelationen zwischen Luftschadstoffen und Gesundheitseffekten in der Bevölkerung und am Arbeitsplatz zu ermitteln und wiederum Physik und Ingenieurwissenschaft, um nach Identifizierung der toxischen Komponenten Minderungsstrategien zu entwickeln. Die genannten Arbeitsgebiete werden im Programm „Gesundheit – Umweltbedingte Störungen der Gesundheit“ zusammengefasst (Abb. 7).

Partikeldurchmesser (µm)	Partikelanzahl (n/cm³)	Partikeloberfläche (µm²/cm³)
0,02	2.400.000	3.016
0,5	153	120
2,5	1	24

Tab. 3: Anzahl und Oberfläche von monodispersen Partikeln gleicher Dichte bei einer Konzentration von 10 µg/m³ [17].

Von der Partikelgröße hängt ab, welche Teilchen eingeatmet werden und wo die Ablagerung im Atemtrakt erfolgt. Aus den hierfür vorliegenden experimentellen Daten (Abb. 8) wurden für die wirkungsbezogene Messung von

Staub Konventionen in der DIN ISO 7708 [16] festgelegt. Die gesamte einatembare Fraktion wird durch PM<sub>10</sub> und die bis in die Alveolen vordringende Fraktion durch PM<sub>2,5</sub> (Particulate Matter < 2,5 µm) annäherungsweise er-

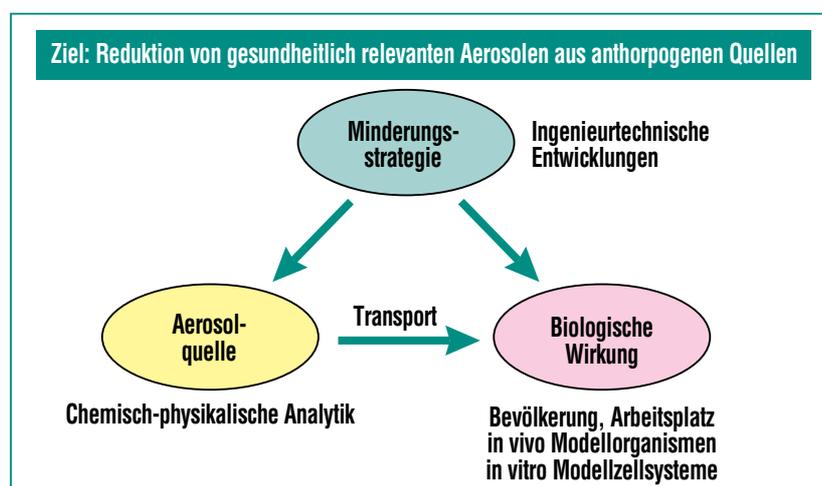


Abb. 7: Arbeitskonzept des „Aerosolprojekts“, das zusammen mit dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit und anderen Einrichtungen der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren (HGF) erarbeitet wurde. Die offenen Fragen zu den gesundheitsrelevanten Aerosolen können nur durch interdisziplinäre Zusammenarbeit beantwortet werden.

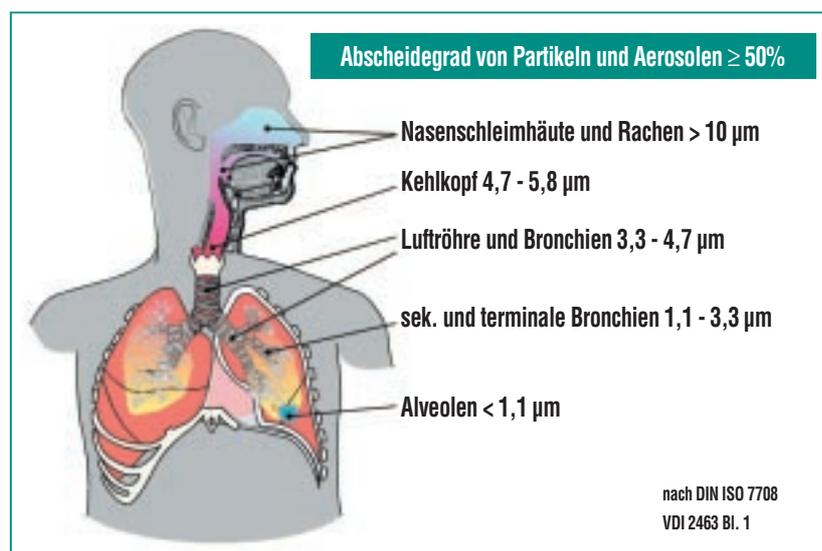


Abb. 8: Mittlere Wahrscheinlichkeit für Schwebstaub, in bestimmte Bereiche des Atemtraktes vordringen zu können (Abscheidegrad, nach DIN ISO 7708).

fasst. In der Europäischen Union gilt gegenwärtig eine Richtlinie für die Luftqualität für  $PM_{10}$  von  $50 \text{ mg/m}^3$  (Jahresmittelwert). Die amerikanische Umweltbehörde Environmental Protection Agency (EPA) hat kürzlich auch einen neuen Richtwert für  $PM_{2,5}$  mit  $25 \text{ mg/m}^3$  eingeführt.

Dass ultrafeine Partikel nur sehr wenig zur Massenkonzentration, jedoch enorm viel zur Anzahlkonzentration und zur Partikeloberfläche beitragen, zeigt die folgende Beispielrechnung (Tab. 3). Es genügt ein Partikel/ $\text{cm}^3$  mit einem Durchmesser von  $2,5 \text{ }\mu\text{m}$  für eine Massenkonzentration von  $10 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$ . Bei Partikeln der Größe  $20 \text{ nm}$  benötigt man mehr als  $2 \text{ Mio. Partikel/cm}^3$ , um die gleiche Massenkonzentration zu erhalten.

Die Größenverhältnisse werden durch einen direkten Vergleich von ultrafeinen Partikeln und zellulären Strukturen deutlich (Abb. 9).

Die anthropogen verursachten Komponenten der Umweltaerosole stammen vor allem aus industriellen Verbrennungsprozessen sowie aus Verbrennungen in Haushalten und aus dem Straßenverkehr [18]. Sie enthalten neben 30-50% Ruß auch Metalle, Säuren, organische Stoffe oder biogene Materialien. Für industrielle Anwendungen und für medizinische Zwecke werden in zunehmenden Maße Nanopartikel produziert, die u.U. Auswirkungen auf die Arbeitsplatzsicherheit haben.

Bisher ist nicht bekannt, welche Partikeleigenschaften für die Gesundheitseffekte von Bedeutung sind. Außerdem gibt es zum Mechanismus der Aufnahme von UFP in Zellen und ihren biologischen Wirkungen noch keine Klarheit. In der Toxikologie des ITG soll daher am Beispiel eines umweltrelevanten Aerosols mit lungenspezifischen *in vitro* Tests herausgefunden werden, welche chemischen Bestandteile und

welche Partikelgrößenfraktionen zur toxischen Wirkung beitragen. Als Beispiel für Umweltpartikel wurde Flugstaub aus einer industriellen Hausmüllverbrennungsanlage ausgewählt, weil der Verbrennungsprozess, ähnlich wie bei der Kohleverbrennung, gut untersucht ist und weil dieses Thema eines der Arbeitsschwerpunkte des Forschungszentrums darstellt [19]. Die zu untersuchende Flugasche besteht zu 70% aus wasserlöslichen Sulfaten und Chloriden von Na, K und Ca, sowie aus verschiedenen Metallen. Der Modalwert\* der Partikelgröße liegt bei  $200 \text{ nm}$ , es ist jedoch auch eine ultrafeine Fraktion mit nur 3% Massenanteil und 31% Anteil an der Partikelanzahl enthalten (Abb. 10). Die Partikel sollen einerseits als Suspension im Kulturmedium und andererseits als Aerosol an Zielzellen aus der Lunge appliziert werden und die biologischen Wirkungen werden mit denen von inerten Kontrollpartikeln verglichen. Beide Vorgehensweisen haben Vor- und

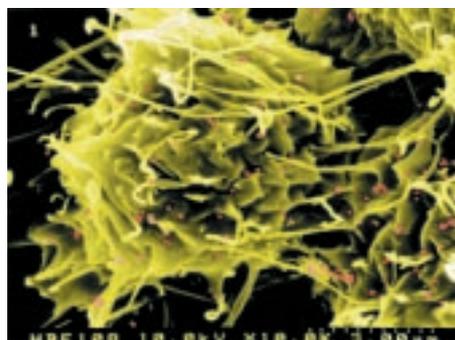
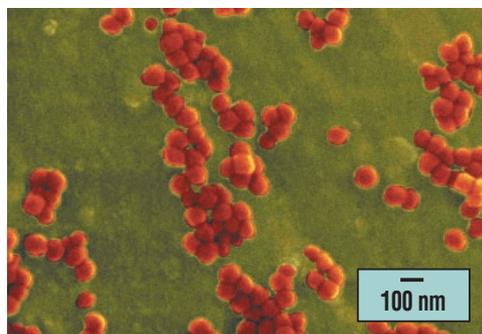


Abb. 9: Darstellung von Partikeln im Raster-Elektronenmikroskop (REM). Links: REM-Aufnahme (B. Neufang, HVT-HZ) von ultrafeinen Hämatitpartikeln ( $Fe_2O_3$ , mittlerer Durchmesser  $70 \text{ nm}$ ), die von W. Ferstl (ITC-WGT) synthetisiert wurden. Rechts: REM-Aufnahme (H. Zöltzer, Uni Kassel, Humanbiologie) eines Makrophagen der Maus-Zelllinie RAW 264.7 (gelb), der Hämatitpartikel phagozytiert (rot).

Nachteile. Die Resuspension von Flugasche in Kulturmedium erlaubt rasche Analysen, die löslichen und unlöslichen Bestandteile können getrennt untersucht werden, andererseits können Fehleinschätzungen der Ergebnisse nicht völlig ausgeschlossen werden, da z.B. die Wechselwirkungen der Partikel mit Mediumbestandteilen zu veränderten Reaktionen der Zellen führen können. Die Resuspension in Luft ist technisch sehr aufwendig, die realen Verhältnisse in der Lunge können bei direktem Kontakt des Aerosols mit den Zielzellen jedoch erheblich besser simuliert werden. Dazu wird aus der Flugasche ein definiertes Aerosol hergestellt. Die Lungenzellen werden über die Gasphase exponiert [20].

Für die Exposition werden die Zellen auf Transwell®-Membranen ausgesät, die in Zellkulturschalen in das Kulturmedium eingesetzt werden. Die Poren in der Membran mit dem Durchmesser

0,4  $\mu\text{m}$  stellen sicher, dass sich die Zellen mit Flüssigkeit versorgen können. Nach der Exposition werden die Zellen auf ihre Vitalität und das Kulturmedium auf den Gehalt an freigesetzten Gewebs-hormonen untersucht, die charakteristisch für entzündliche Veränderungen sind.

Bei bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Verfahren zur Resuspension von Flugasche in Luft und die Exposition von Lungenzellen über die Atmosphäre prinzipiell funktionsfähig ist. Die Zellen zeigten nach der Exposition mit zunächst niedrigen Aerosolkonzentrationen und kurzen Expositionszeiten noch keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dagegen konnte bei der Exposition im Kulturmedium schon für niedrige Konzentrationen gezeigt werden, dass Flugaschepartikel normale Funktionen der Zellen erheblich verstärken. Übertragen auf die menschl-

iche Gesundheit ist dies ein Hinweis, dass eine Partikelexposition bei einer gleichzeitigen Lungenerkrankung, wie Bronchitis, Keuchhusten, u.a., zur Störung der Abwehrreaktionen führen können [21, 22].

Mit Hilfe der beschriebenen Untersuchungen sollen Informationen zur Verfügung gestellt werden, mit denen die Gesundheitseffekte durch partikuläre Luftverschmutzungen aus einzelnen Quellen beurteilt werden können, um dann gezielte technische Maßnahmen zur Emissionsminderung vorzunehmen. Genauso wichtig ist die Einschätzung der Partikelemissionen, die bei der Anwendung von neuen Technologien oder beim Einsatz von neuen Brennstoffen entstehen können, damit die Entwicklungen so frühzeitig wie möglich in die richtige Richtung gelenkt oder Entscheidungen über eine ausgedehntere Anwendung getroffen werden können.

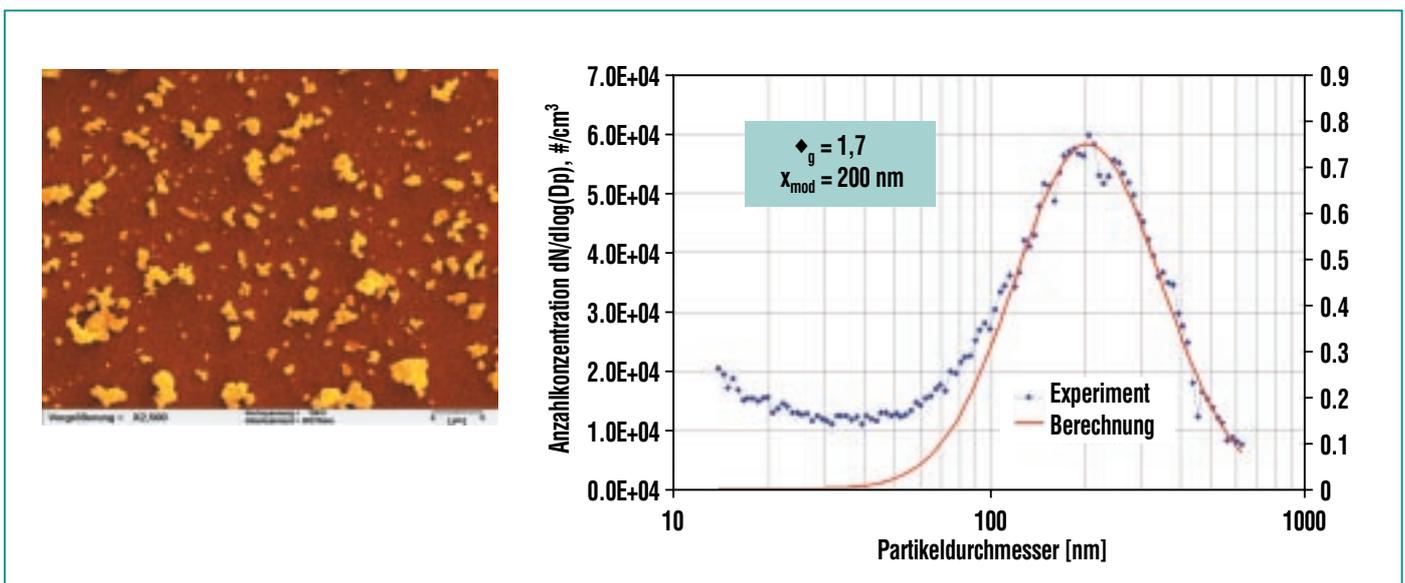


Abb. 10: Charakterisierung der Partikel aus Flugasche. Links: REM-Aufnahme der verwendeten Flugasche (M. Hauser, ITC-TAB). Rechts: Partikelgrößenverteilung der resuspendierten Flugasche (S. Mülhopt, ITC-TAB).

## Zusammenfassung und Ausblick

Die medizinischen und ökologischen Erkenntnisse der letzten 100 Jahre verdeutlichen eindringlich, dass eine technische Entwicklung die begleitende Risikobewertung der Prozesse und ihrer Einflüsse auf die Umwelt auch in der Zukunft unbedingt erfordert. Schon während der Erforschung neuer Techniken müssen mögliche Risiken ermittelt und weitestgehend ausgeschlossen werden. Dazu gehört eine starke Toxikologie, die sich von der reinen klinischen Form grundsätzlich unterscheidet. Die umweltbezogene Toxikologie muß daher

möglichst einfache Modelle entwickeln und bereitstellen, um solche Fragestellungen angehen zu können. Daraus resultieren Vorstellungen zu schädlichen Wirkungen von Chemikalien, technischen Einflüssen und Entwicklungen, die eine Risikoabschätzung ermöglichen. Diese ist dann die Grundlage für Entscheidungen, Veränderungen z. B. in Produktionsanlagen einzuführen.

## Danksagung

Für die interdisziplinäre Kooperation sind wir bisher folgenden Instituten und Institutionen dankbar: Labor für Elektronenmikroskopie des Institutes für Transura-

ne der European Commission, Joint Research Centre, Karlsruhe; Klinik für Tumorbilogie in Freiburg; Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät, Universität Ulm; Abteilung für Humanbiologie der Universität Kassel; Zoologisches Institut, Abt. Ökologie und Institut für Lebensmittelchemie der Universität Karlsruhe; Institut für technische Chemie, Forschungszentrum.

## Literatur

- [1] J.O. Nriagu, J.M. Pacyna, *Nature (Lond.)* 333, 134 (1988)
- [2] A. Hartwig, *Biometals* 8, 3 (1995)
- [3] J. Oehlmann, *Imposex bei Muriciden (Gastropoda, Prosobranchia) – eine ökotoxikologische Untersuchung zu TBT-Effekten*. Cuvillier Verlag, Göttingen (1994)
- [4] T. Ade, F. Zaucke, H.F. Krug, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354, 609 (1996)
- [5] F. Zaucke, H. Zöltzer, H.F. Krug, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361, 386 (1998)
- [6] K. Kannan, K. Senthikumar, B.G. Loganathan, S. Takahashi, D.K. Odell, S. Tanabe, *Environm. Sci. Technol.*, 31, 296 (1997)
- [7] K. Fent, *Crit. Rev. Toxicol.*, 26, 1 (1996)
- [8] A. Matzke, H.F. Krug, U. Massing, *Nachrichten*, 32 (1/2), 105 (2000)
- [9] A. Matzke, U. Massing, H.F. Krug, *J. Tumor Marker Oncol.*, 13, 62; *15th Int. Conf. Human Tumor Markers*, June 14-17, Lugano, Schweiz (1998)
- [10] H.F. Krug, A. Matzke, U. Massing, *Chem. Phys. Lipids*, 107: 40; *41st Int. Conf. Biochem. Lipids*, Sept. 13-16, Halle (2000)
- [11] A. Matzke, U. Massing H.F. Krug, *Eur. J. Cell Biol.* 80, 1 (2001)
- [12] *Die Zeit*, 30.08.2001 „Tod vom Allerfeinsten“, [www.zeit.de](http://www.zeit.de)
- [13] H.E. Wichmann, C. Spix, T. Tuch, G. Wölke, A. Peters, J. Heinrich, W.G. Kreyling, J. Heyder, *Daily mortality and fine and ultrafine Particles in Erfurt, Germany. Part I: Role of particle number and particle mass*. Health Effects Institute, Cambridge, USA, Report 98 (2000); <http://www.healtheffects.org/Pubs/Wichmann.pdf>
- [14] H.E. Wichmann, A. Peters, *Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 358, 2751-2769 (2000)
- [15] C.A. Pope, D.W. Dockery, *Epidemiology of particle effects*. In: *Air pollution and health (Holgate, S.T., Samet, J.M., Koren, H.S., Maynard R.L., eds.)* 673-705, Academic Press, San Diego, CA (1999)
- [16] *DIN ISO 7708: Luftbeschaffenheit – Festlegung von Partikelgrößenverteilungen für die gesundheitsbezogene Schwebstaubprobennahme* (Januar 1996)
- [17] G. Oberdörster, R.M. Gelein, J. Ferin, B. Weiss, *Association of particulate air pollution and acute mortality: Involvement of ultra-fine particles?* *Inhalation Toxicol.* 7, 111-124 (1995)
- [18] *LfU und UMEG, Schwebstaubbelastungen in Baden-Württemberg* (1998)
- [19] *Nachrichten*, 32, Heft 3 (2000)
- [20] S. Mülhopt, *Diplomarbeit am ITC-TAB* (2000)
- [21] S. Diabaté, S. Mülhopt, H.-R. Paur, H.F. Krug, *Ann. Occup. Hygiene* (2001, zur Veröffentlichung eingereicht)
- [22] geplant in: *Nachrichten*, Jahrgang 34, Heft 1 (2002)