

Partikel-induzierter Zellmigrationstest (PICMA)

Zellkulturmodell für Entzündungsreaktionen in der Lunge durch Partikel und Fasern am IPA etabliert



Isabell Schremmer, Götz Westphal, Nina Rosenkranz, Thomas Brüning, Jürgen Bünger

Die berufliche Exposition gegenüber Partikeln und Stäuben kann zu arbeitsbedingten Atemwegs- und Lungenkrankheiten führen. Mit dem am IPA etablierten Partikel-induzierten Zellmigrationstest (PICMA) kann der erste Schritt der Entzündungsreaktion nach einer Exposition gegenüber partikel- oder faserförmigen Stäuben abgebildet werden. Hierbei handelt es sich um die Einwanderung von „Entzündungszellen“ (Makrophagen, neutrophile Granulozyten) in die Lunge bis hin in die Lungenbläschen (Alveolen). PICMA ist eine einfache, robuste aber hochgradig standardisierte *In-vitro*-Methode mit hohem Durchsatz für ein Screening von partikelförmigen Arbeitsstoffen.

Berufsbedingte Atemwegs- und Lungenerkrankungen durch Partikel oder faserförmige Partikel sind die weitaus häufigsten beruflich bedingten Erkrankungen infolge des Berufs mit teils sehr schwerem Verlauf oder sogar tödlichem Ausgang. Laut Statistik der Unfallversicherungsträger wurden im Jahr 2014 allein 1.956 Fälle von Asbestose (BK 4103), 832 Fälle von Lungen beziehungsweise Kehlkopfkrebs im Zusammenhang mit Asbestexpositionen (BK4104), 1.040 Fälle von asbestbedingten Mesotheliomen (BK 4105) und 758 Quarzstaublungenerkrankungen (Silikose, BK4101) als Berufskrankheit anerkannt (DGUV-Statistiken für die Praxis 2014). Damit belegten diese Erkrankungen nach der Lärmschwerhörigkeit die Plätze zwei und drei der am häufigsten anerkannten Berufskrankheiten (BAuA, 2014). Trotz des 1993 erfolgten Verbots von Asbest ist infolge der langen Latenzzeit die Anzahl der asbestbedingten Erkrankungen im Jahr 2014 noch einmal angestiegen. Im Gegensatz dazu sind Lungenerkrankungen durch Quarz, dank gezielter Präventionsmaßnahmen und des Rückgangs hoch exponierter Berufszweige, wie beispielsweise des Untertagebergbaus, rückläufig. Allerdings sind Belastungen mit Partikeln und Fasern allgegenwärtig. Zudem werden heute neue Gefährdungen diskutiert, die sich aus dem zunehmenden Einsatz von neuen Werkstoffen, wie beispielsweise Nanomaterialien, ergeben können. Sogenannte „Multi-walled

carbon nanotubes“ (MWCNT) erwiesen sich im Tierexperiment als starke Kanzerogene, die in der Rattenlunge sogar stärker wirkten als Asbest (Rittinghausen et al. 2014).

Eine zeitnahe toxikologische Bewertung aller neuen Nanopartikel und -fasern ist derzeit aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwandes für tierexperimentelle Studien nicht möglich. Es werden deshalb sensitive *In-vitro*-Methoden benötigt, die eine valide und zeitnahe Gefährdungsbeurteilung neuer oder unzureichend untersuchter Materialien ermöglichen. *In-vitro*-Methoden sind im Vergleich zu tierexperimentellen Methoden deutlich kostengünstiger und erlauben einen deutlich höheren Probendurchsatz. Zudem ist der Ersatz von Tierversuchen aus ethischen Gründen gefordert. Die Etablierung zuverlässiger *In-vitro*-Methoden erfordert allerdings eine solide Datenbasis. Ein *In-vitro*-System muss die Wirkung von Stoffen, die aus tierexperimentellen oder humanen Daten bekannt sind, zuverlässig abbilden. Dies erfordert die Untersuchung einer ausreichenden Zahl von Stoffen mit bekannter Wirkung. Ein Testsystem ist nur dann ausreichend aussagekräftig, wenn es genügend sensitiv ist, einen gesundheitlich bedenklichen Partikel richtig zu erkennen und genügend spezifisch, um einen unbedenklichen Partikel nicht fälschlich als besorgniserregend einzustufen. Da-

rüber hinaus muss eine solche Methode genügend robust sein beziehungsweise eine geringe Fehleranfälligkeit aufweisen. Sie sollte die mögliche gesundheitsgefährdende Wirkung des untersuchten Stoffes spezifisch abbilden und ausreichend differenzieren zwischen Partikel ohne Wirkung und solchen mit schwacher, mittlerer und starker Toxizität. Ein Testsystem, das valide spezielle Gefährdungen durch Partikel abbildet, existiert derzeit nicht. Die verfügbaren Untersuchungsmethoden, die für lösliche Stoffe entwickelt wurden, bilden entweder keine relevanten toxikologischen Endpunkte für Partikel ab oder werden durch die Anwesenheit von Partikeln verfälscht.

Auswirkungen von Partikelexpositionen

Um einen geeigneten Endpunkt für ein *In-vitro*-System zu identifizieren, muss man den Mechanismus der toxischen Wirkung gut kennen: Der Entzündungsprozess in der Lunge als Reaktion auf die Inhalation von Partikeln oder Fasern wird gefördert durch die Interaktion verschiedener Zelltypen. Nachdem ein Partikel in die Alveolen gelangt, nehmen Alveolarmakrophagen sie auf. Die Partikel werden in den Lysosomen der Makrophagen aufgelöst oder aus der Lungen über den Lymphfluss abtransportiert. Schwerlösliche anorganische Partikel können von den Zellen aber nicht abgebaut werden und überfordern bei hoher und/oder langdauernder Exposition diesen Reinigungsprozess der Lunge. Fasern ab einer gewissen Länge können durch Makrophagen nicht aufgenommen werden. Infolge dieser „frustranten“ Phagozytose oder Überlastung des Reinigungsprozesses der Lunge durch hohe und anhaltende Expositionen werden aus dem Blutstrom weitere Makrophagen und schließlich neutrophile Granulozyten angelockt. Das Anlocken der Zellen geschieht über Botenstoffe (Chemokine), die von den gestressten Immunzellen abgesondert werden. Die zur Verstärkung angelockten Entzündungszellen wandern nun in Richtung der Freisetzungsquelle der Botenstoffe. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet.

Neutrophile Granulozyten (kurz „Neutrophile“) nehmen Partikel nicht auf, sondern versuchen sie chemisch zu bekämpfen. Hierbei werden zellschädigende Stoffe freigesetzt, die letztlich für die schädigenden Wirkungen einer Entzündung verantwortlich sind – unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Auf Basis dieser dauerhaften Entzündung entstehen schwere, partikelinduzierte Lungenerkrankungen. Hierzu gehören die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Fibrosen (z. B. Silikose und Asbestose) und Krebserkrankungen durch Partikel und Fasern (IARC 1997 und 2009).

Die Stärke dieser entzündlichen Reaktion der Lunge ist für verschiedene Partikel und Fasern sehr unterschiedlich. Jedoch selbst solche Partikel, die kaum toxische beziehungsweise entzündliche Wirkungen zeigen, können bei dauerhafter Überlastung der Reinigungsmechanismen der Lunge kreberzeugende Wirkungen haben. Für diese kanzerogene Wirkung von granulären Partikeln ohne spezifisch toxische Wirkung (GBS) wird aber ein schwellenabhängiges Wirkprinzip angenommen: Erst bei dauerhafter Überlastung der

Reinigungsmechanismen wird eine chronische Entzündung verursacht (Überladungshypothese). Bei Belastungen, die nicht zu einer Überladung führen, wäre damit kein zusätzliches Tumorrisiko gegeben (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2013).

Der Mechanismus der toxischen Wirkung von Partikeln mit unterschiedlicher Größe ist im Prinzip gleich. Allerdings kann die Höhe der Wirkschwelle von mikro- und nanoskaligen Partikeln sehr unterschiedlich sein. Es wird vermutet, dass sehr kleine, nanoskalige Partikel in Form ihrer Agglomerate bei gleicher Masse ein größeres Volumen im Makrophagen einnehmen. Dies soll – bezogen auf die Partikelmasse – zu einer größeren Entzündungswirkung führen (AGS 2015). Neben der Größe der Partikel können sich aber auch deren Oberflächeneigenschaften auf die Partikeltoxizität auswirken.

Bislang können Untersuchungen, die zuverlässig Gefährdungen durch Partikel und Fasern abbilden, nur im Tierversuch durchgeführt werden (Klein et al. 2012). Ein besonders zuverlässiger experimenteller Parameter, der auf entzündliche Wirkungen in der Lunge schließen lässt, ist dabei die eben beschriebene Einwanderung von „Neutrophilen“ in die Lunge. Derzeit existieren allerdings noch keine funktionellen *In-vitro*-Verfahren, die diese akut entzündlichen Wirkungen von Partikeln zuverlässig abbilden. Daher wurde im IPA ein solches *In-vitro*-System etabliert und validiert. Es kann als prädiktiver Test für neue Stoffe dienen und schnellere und kostengünstige Ergebnisse von inhalativ aufgenommenen Partikeln liefern, als es im Tierversuch möglich ist.

Prädiktive Methode für inflammatorische Partikeleigenschaften

Für den Partikel-induzierten Zellmigrationstest (PICMA, engl. Particle-induced cell migration assay) wird am IPA die sogenannte „Boyden Chamber“-Technik (Boyden, 1962) eingesetzt. Zunächst wird eine Alveolarmakrophagenzelllinie (NR8383) mit den Partikeln inkubiert. NR8383 Zellen weisen wesentliche Eigenschaften menschlicher Alveolarmakrophagen auf (Helmke et al. 1989). NR8383 Makrophagen können beispielsweise Partikel aktiv aufnehmen und können eine Reihe biochemischer Botenstoffe bilden. Die Überstände der exponierten NR8383 Makrophagen werden nun dahingehend untersucht, ob sie „Neutrophile“ Entzündungszellen anlocken.

Als Modellzelllinie für Neutrophile werden differenzierte HL-60 Zellen (dHL-60 Zellen) eingesetzt. Diese dHL-60 Zellen können in Richtung chemotaktischer Signale wandern (Breitman et al. 1980). In diesem Experiment werden dHL-60 Zellen in einen Einsatz mit kleinen Löchern (hier 3 µm) am Boden gegeben. Dieser Einsatz wird in einen Trog einer 24-Well-Platte eingehängt. Der untere Trog enthält die von den exponierten Makrophagen gewonnenen Zellüberstände. Sind chemotaktische, entzündungsfördernde Botenstoffe enthalten, wandern die dHL-60 Zellen durch die Löcher am Boden in den Trog mit den Botenstoffen (Abbildung 1). Die Anzahl der in den Trog eingewanderten Zellen ist daher ein Maß für die Freisetzung entzündlicher Botenstoffe durch die mit Testpartikeln inku-

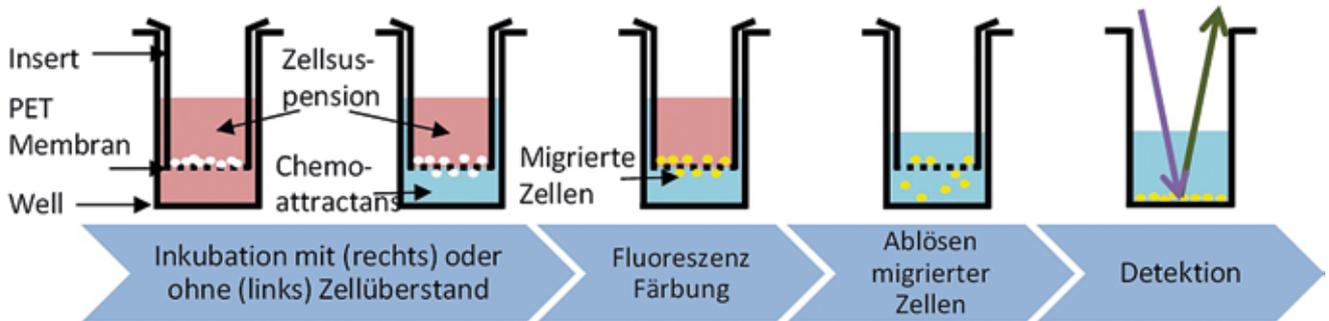


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Chemotaxisassays. Ein Insert mit permeablem PET-Boden trennt die Zellsuspension (im Insert) vom Chemoattraktans (unten im Well). Je nach chemoattraktiver Wirkung migrieren die Zellen aus dem Insert ins Well. Sie werden gefärbt, abgelöst und nach dem Entfernen des Inserts mit einem Photometer quantifiziert. Abbildung modifiziert nach www.gbo.com/bioscience.

bierten Makrophagen. Die eingewanderten Zellen werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und ihre Anzahl photometrisch bestimmt.

Für diese Experimente werden permanente Zellkulturen verwendet. Im Gegensatz zu frisch aus Tieren isolierten Zellen ist so eine hohe Reproduzierbarkeit als Voraussetzung für vergleichende Untersuchungen gewährleistet. Um das System zu etablieren, wurden zunächst Partikel untersucht, die beim Menschen oder im Tierexperiment erwiesenermaßen neutrophile Entzündungen hervorrufen, im Vergleich zu Partikeln mit bekanntermaßen schwacher oder keiner entzündlichen Wirkung. Hierzu wurden folgende Partikel vergleichend untersucht: grober kristalliner Quarz, verschiedene Arten und Korngrößen von Titandioxid (Rutil und Anatas), Industrieruß als Partikel mit bekannter starker entzündlicher Wirkung und als Partikel mit sehr geringer entzündlicher Wirkung Bariumsulfat (BaSO_4). Als Hypothese wird angenommen, dass Partikel unterschiedlich starker Entzündungswirkung ein unterschiedliches Ausmaß der Zellwanderung bewirken. Weiterhin sollten die Partikel konzentrationsabhängig wirken.

Physikochemische Partikeleigenschaften (Größe, Identität, Kristallinität) können einen entscheidenden Einfluss auf die inflammatori-

schen Eigenschaften der Partikel haben. Daher wurden die Identität der Partikel und ihre kristalline Struktur mit Hilfe der Röntgenpulverdiffraktometrie (XRPD) bestätigt. Die Rasterelektronenmikroskopie (SEM) diente zur Bestimmung der Größe der trockenen Partikel. Die Größe der gebildeten Agglomerate wurde mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Diese physikochemischen Analysen erfolgten in der Arbeitsgruppe von Prof. Mathias Epple (Leiter des Instituts für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen).

Erste Ergebnisse des PICMA

Wenn NR8383 Makrophagen verschiedenen Mengen an Quarz, Titandioxid oder Industrieruß, mit unterschiedlicher Partikelgröße und Beschaffenheit ausgesetzt wurden, führte dies zu Zellüberständen, die differenzierte HL-60 Zellen anlocken. Dieser vergleichsweise starke Effekt ist abhängig von der Masse der Partikel, denen die Makrophagen vorher ausgesetzt waren (Abbildung 2).

Quarzpartikel, die im Tierexperiment eine starke entzündliche Wirkung haben und beim Menschen Silikose und Lungentumoren auslösen können, verursachen in diesem System konzentrationsabhängig eine vergleichsweise starke und statistisch signifikante Migration von dHL-60 Zellen. Etwas schwächer war die Wirkung von

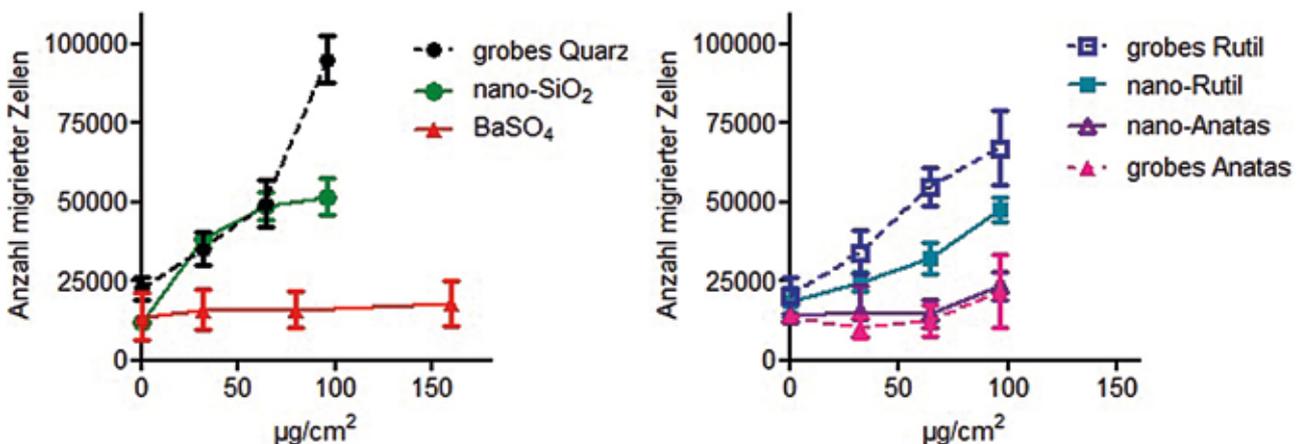


Abbildung 2: Zellmigration von dHL-60 Zellen in Richtung von Zellkulturüberständen von NR8383 Alveolarmakrophagen, die mit verschiedenen Partikeln inkubiert wurden.

amorphem SiO₂, das als Nanopartikel verfügbar war. Auch Partikel des weniger stark entzündlichen Titandioxid-Minerals Rutil lösen eine signifikante und dosisabhängige Migration von dHL-60 Zellen aus. Hierbei wirkte das grobe Rutil stärker als die Rutilnanopartikel. Bariumsulfat-Partikel, die im Tierversuch einen inerten Charakter haben, verursachen dagegen keine Zellmigration. Auch das vergleichsweise schwach inflammatorisch wirksame Titandioxid-Mineral Anatas löst kaum Zellmigration von dHL-60 Zellen aus (Abbildung 3) (Westphal et al. 2015).

Fazit

Mit dem *In-vitro*-Test PICMA kann erstmals auf Basis von etablierten, permanenten Zelllinien die entzündliche Partikelwirkung funktionell untersucht werden.

Zellüberstände von NR8383 Makrophagen, die gegen verschiedene Stäube exponiert waren, wirken stark chemotaktisch auf differenzierte HL-60 Zellen. Diese Wirkungen geben die entzündlichen Wirkungen dieser Stäube wieder. Hierfür spricht insbesondere, dass BaSO₄, das im Tierexperiment kaum entzündliche Wirkung zeigt, auch nicht zu Zellüberständen führt, die dHL-60 Zellen anlocken. Quarz hingegen, das für seine inflammatorische Wirkung in der menschlichen Lunge bekannt ist, führt zu Zellüberständen, die dosisabhängig dHL-60 Zelle anlocken.

Der etablierte PICMA-Screening-Test zeichnet sich zusammenfassend durch folgende Eigenschaften aus:

1. Er differenziert zwischen Partikeln ohne, mit schwacher und mit starker Entzündungswirkung
2. Er ist robust und gut reproduzierbar
3. Er kann in jedem gängigen Zelllabor mit geringen Kosten und hohem Durchsatz eingesetzt werden.

Aus dem Vergleich mit tierexperimentellen Studien oder Humanen, kann die Übertragbarkeit des *In-vitro*-Modells überprüft werden. So können Hinweise auf die Ursachen für unterschiedliche Partikelwirkungen gefunden werden. Diese Daten sind für die Gefährdungsbeurteilung von Partikeln und somit für die Prävention Staub-bedingter Lungenerkrankungen von besonderer Bedeutung. Der Test soll dazu genutzt werden, um die Anfrage der Berufsgenossenschaft Holz und Metall (BGHM) zur Biobeständigkeit und den biologischen Wirkungen von kritischen WHO-Fasern aus kohlefaserverstärkten Kunststoffen (CFK-Fasern, Faserbruch aus CFK-Material, thermisch belastete Fasern aus der Bearbeitung und Verwendung von CFK) zu bearbeiten. Erste Voruntersuchungen haben gezeigt, dass im Test auch mit Fasern (4 Asbestformen) unterschiedlich starke Migrationseffekte ausgelöst werden können. Hierbei muss naturgemäß die Biobeständigkeit parallel mit anderen geeigneten Methoden untersucht werden.

Die Autoren:

Prof. Dr. Thomas Brüning, Prof. Dr. Jürgen Büniger
Dr. Isabell Schremmer, PD Dr. Götz Westphal, Nina Rosenkranz
IPA

Literatur

1. AGS: Ausschuss für Gefahrstoffe - AGS-Geschäftsführung - BAuA - www.baua.de/ags. http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/AGS/pdf/AStaub.pdf?__blob=publicationFile&v=2
2. Boyden S: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453–466
3. Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ: Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2936–2940
4. DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft. Dust, general threshold limit value (respirable fraction, biopersistent granular dusts). 2013
5. Helmke RJ, German VF, Mangos JA: A continuous alveolar macrophage cell line: comparisons with freshly derived alveolar macrophages. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25: 44–48
6. IARC: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Silica, Some Silicates, Coal Dust and Para-Aramid Fibrils. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1997; 68: 1–475
7. IARC: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2009; 100C: 219–294
8. Klein CL, Wiench K, Wiemann M, Ma-Hock L, van Ravenzwaay B, Landsiedel R: Hazard identification of inhaled nanomaterials: making use of short-term inhalation studies. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1137–1151
9. Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A, Schaudien D: The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Part Fibre Toxicol* 2014; 11: 59
10. Westphal GA, Schremmer I, Rostek A, Loza K, Rosenkranz N, Brüning T, Epple M, Büniger J (2015). Particle-induced cell migration assay (PICMA): A new in vitro assay for inflammatory particle effects based on permanent cell lines. *Toxicol In Vitro* 2015; 29: 997–1005

Beitrag als PDF

