

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben mit den FKZ: 03Z22D511

„Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK)

**PlasMark – Markierungsfreie Diagnostik von Umweltplastik mittels
innovativer opto-physikalischer Verfahren - TP1: Multispektrale Verfahren“**

Ausführende Stellen: Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP)
ZIK *plasmatis*
Felix-Hausdorff-Str. 2
17489 Greifswald

Projektleiter: Dr. Kristian Wende (ZIK *plasmatis* / INP)

Projektlaufzeit: 01.10.2020 – 31.12.2022

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03Z22D511 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

**UNTERNEHMEN
REGION**
Die BMBF-Innovationsinitiative
Neue Länder

Inhalt

Anlage I	Kurzbericht
	<ol style="list-style-type: none">1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie den wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde2. Ablauf des Vorhabens3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen
Anlage II	Ausführliche Darstellung
	<ol style="list-style-type: none">1. Wissenschaftliche Ergebnisse2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten4. voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans5. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF
Anlage III	Erfolgskontrollbericht
	<ol style="list-style-type: none">1. Das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen2. Fortschreibung des Verwertungsplans3. Angaben zu Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben4. Angaben über die Einhaltung der Ausgaben- und der Zeitplanung5. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF
Anlage IV	Verwertungsplan

Anlage I - Kurzbericht

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie den wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde

Zunehmend wird bewusst, dass die durch den Menschen eingetragene Plastikteilchen (als Makro-, Mikro- bzw. Nanoplastik) in die weltweiten Nahrungsketten eingeschleust werden. Während die Auswirkungen auf aquatische Organismen besser verstanden sind, sind die Aufnahme und die Auswirkungen dieser Partikel auf die Gesundheit des Menschen größtenteils unerforscht. Gewebebanken könnten dabei eine wertvolle Ressource sein, insbesondere für die retrospektive Analyse von chronisch-entzündlichen Erkrankungen, z. B. des neurodegenerativen Formenkreises. Eine zentrale Herausforderung dabei ist die eindeutige Identifizierung von Plastikpartikeln in biologischen Matrices. Das Ziel des Vorhabens war es daher, eine Detektionsmethode auf Basis der Infrarotmikrospektroskopie zu entwickeln, mit deren Hilfe Plastikpartikel in biologischen Proben und vor allem in Gewebe-Dünnabschnitten markierungsfrei identifiziert werden können. Parallel dazu sollte untersucht werden, wie Plastikpartikel in Zellen bzw. Gewebe aufgenommen werden und ob die dabei ablaufenden Prozesse durch körpereigene Proteine oder Lipide moduliert werden. Zudem wurde der Fragestellung nachgegangen, welche Rolle Plastik für das Immunsystem und in chronisch-entzündlichen Prozessen spielt. Damit sollte ein nachhaltiger Beitrag zur Erforschung von Plastik als potentielles Gesundheitsrisiko für die Gesellschaft erbracht werden.

2. Ablauf des Vorhabens

Am ZIK plasmatis wurde unter Anleitung der bestehenden Projektleitenden Dr. S. Bekeschus und Dr. K. Wende eine weitere Gruppe aus zusätzlichem und bestehendem Personal aufgebaut, die ergänzende (Materialwissenschaften, Physik) oder erweiterte Expertisen (Biologie, Biochemie) bündelte und sich vollständig der Bearbeitung des Vorhabens widmete. Dabei gab es zwei Projektarme, einen mit biologisch-immunologischer Ausrichtung und einen weiteren mit physikalisch-biochemischer Fokussierung. In Rahmen der Projektarbeit wurden zudem wiss. Nachwuchsarbeit geleistet (2x Promotionsarbeit, 1x Master of Science, 2x Bachelor of Science). Labore, Geräte, Protokolle und Erfahrungen aus der vorausgegangen und der laufenden Förderung des Zentrums für Innovationskompetenz (ZIK) plasmatis unter den Mentoren Prof. K.-D. Weltmann, Prof. T. von Woedtke, Prof. H.-R. Metelmann und Prof. W. Motz standen zur Verfügung. Des Weiteren bestand Zugang zu Methoden und Expertisen bei den Verbundpartnern, dem ZIK HIKE an der Universität Greifswald sowie dem ZIK innoFSPEC am Leibniz-Institut für Astrophysik in Potsdam.

3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Im Rahmen des Vorhabens wurde die zentrale Fragestellung positiv beantwortet – eine Kombination aus Rasterkraftmikroskop und Mikroinfrarotspektroskopie ist grundsätzlich geeignet um Kunststoffpartikel im sub-Mikrometerbereich in biologischen Matrices zu identifizieren und chemisch zu charakterisieren. Durch die Kombination kann das Abbé-Limit umgangen werden und Partikel identifiziert werden die kleiner als die Wellenlänge des eingesetzten Infrarot-Laserlichts sind. Zusätzlich erlaubt die Aufnahme von Fingerprint-Spektren die Zuordnung der Partikel zu bestimmten Kunststoff-Typen. Aus Zeitgründen (verzögerte Auslieferung von relevanten Komponenten) konnten nicht alle sich aus dieser Möglichkeit ergebenden Aspekte beantwortet werden. Insbesondere Fragen zu Robustheit und der Sensitivität in Abhängigkeit vom Typ der biologischen Matrix blieben ungeklärt. Unter Verwendung der Laserablation, Nanofällung, und der mechanisch unterstützten Hydrolyse konnten Nanopartikel aus PET, PVC, PP, PC und PMMA im Größenbereich von 200 nm in ausreichender Menge

und Reinheit gewonnen werden um innerhalb des Teilverhabens und des Verbundprojekts damit arbeiten zu können. Die flankierende elektronenoptische Analyse der Eigenschaften und Lichtstreumessung dienten zur Qualitätssicherung und zeigten eine gute Vergleichbarkeit des chargenbasierten Herstellungsverfahrens. So wurde ein wesentlicher, über das Vorhaben hinausgehender Erfahrungsschatz zur Herstellung, Charakterisierung und Handhabung von Kunststoffnanopartikeln gesammelt und steht für Folgeprojekte im Bereich Umwelttoxikologie und Materialwissenschaften zur Verfügung.

Die Ergebnisse der Wirkungen von Plastikpartikel in verschiedenen biologischen Modellen waren zahlreich und in dieser Form noch nicht bekannt. Im Laufe des Projekts wurden über 50 verschiedene Plastikpartikel-Konfiguration (bspw. unterschiedliche Plastiktypen, Plastikpartikel-Geometrien, Plastikpartikel-Größen, Plastikpartikel-Konzentrationen) getestet. So konnte u.a. gezeigt werden, dass v.a. positiv geladene Plastikpartikel eine hohe Zytotoxizität aufweisen, und dass nur, wenn diese klein sind ($\leq 200\text{nm}$). Insgesamt korrelierten eine Reihe von zytotoxischen, inflammations-assoziierten und zellbiologischen Effekten invers mit der Partikelgröße (je kleiner, desto größer die Effekte). Darüber hinaus reagierten unterschiedliche Zelltypen (Leber, Haut, Lunge) im Detail unterschiedlich auf die Exposition mit Plastikpartikeln, bspw. bzgl. der Sekretion entzündungs-assozierter Chemokine und Zytokine. Im Allgemeinen konnte jedoch gerade im Bereich der Zytotoxizität keine Zelltyp-spezifische Effekte von Plastikpartikeln festgestellt werden. Auch in Tierstudien war bei täglicher Gabe von Plastik über die orale Route keine Toxizität zu beobachten. Dagegen zeigten sich geringe toxische Effekte bei der einmaligen Verabreichung von Plastikpartikeln im Hühnereimodell, v.a. bei großen Partikeln und in hoher Konzentration. In vitro zeigten solche Plastikexposition auch leichte genotoxische Effekte, die mit einem extra für diesen Zweck neu entwickelten Hochdurchsatz-Imaging-Verfahren mittels Algorithmus-basierter Auswertung gemessen wurden. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden, dass die Plastikpartikel-Exposition Signalwege induziert, welche u.a. für die Abwehr von oxidativem Stress verantwortlich sind. Dies war v.a. in Zellkulturen ausgeprägt, welche über mehrere Wochen hinweg (Dauerkultur) mit Plastikpartikeln inkubiert worden sind. Die meisten dieser Ergebnisse konnten in mehreren Artikeln (5) in etablierten Journalen mit hohem Impact-Factor (>7) publiziert werden, was die Relevanz der durchgeführten Arbeiten im PlasMark-Projekt unterstreicht.

Die Arbeiten im Vorhaben erfolgten in enger Zusammenarbeit mit den Verbundpartner, dem ZIK HIKE an der Universität Greifswald und dem ZIK innoFSPEC am AIP Potsdam. Zusätzlich bestanden Kooperationen mit dem CEITEC in Brno/Tsch. Republik, dem AWI für Meeresforschung Helgoland, und der Fa. Microparticels in Berlin-Adlershof.

Anlage II – Ausführliche Darstellung

Arbeitspaket 1: Plastik und Biophysik

Das AP1 beschäftigt sich mit der Auswahl und Charakterisierung von Plastikpartikeln sowie deren biochemischen und biophysikalischen Effekten in Bezug auf Lipide, Proteine, Membranvesikel und Zellen und wurde anteilig am ZIK plasmatis bearbeitet, vorrangig jedoch am ZIK HIKE Greifswald (siehe Bericht ZIK HIKE). Die Aufgaben am ZIK plasmatis beinhalteten die Herstellung von Nanomaterialien als Prüfkörper, deren Charakterisierung, und Testung von zerstörungsfreien Nachweisverfahren mittels spektrometrisch-bildgebender Verfahren. Weiterhin wurde die Interaktion unterschiedlicher Plastik-Nanopartikel mit Proteinen und Lipiden untersucht.

1.1.3

Aufgabenstellung

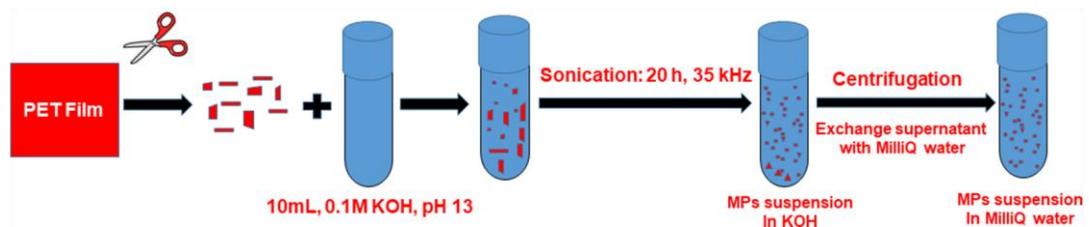
- Herstellung von artifiziellen Prüfkörpern mit eingebetteten Plastikpartikeln gemäß AP 1.1

Ergebnisse

- Drei unterschiedliche Verfahren zur Herstellung wurden entwickelt und getestet: Hydrolyse/Cavitation, Laser-Ablation (266nm oder 355nm Nd-YAG gepulster Laser), Nanopräzipitation, dabei wurden die folgenden, nicht-Polystyren-Kunststoffe zur Partikelherstellung geprüft: Polyvinylchlorid (PVC), Polypropylen (PP), Polyethylenterephthalat (PET), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polycarbonat (PC)
- Aus folgenden Kunststoffen konnten erfolgreich Nanopartikel gewonnen werden: PET (Hydrolyse/Cavitation), PVC (Laser-Ablation, Nanopräzipitation), PMMA (Nanopräzipitation), PP (Laser-Ablation, Nanopräzipitation). Die Größe und Qualität der Partikel waren individuell vom verwendeten Verfahren abhängig
- Reinigungsverfahren auf Basis der sequentiellen Zentrifugation/ Gradientenzentrifugation und der Dialyse wurden erfolgreich entwickelt/etabliert
- Partikel im Größenbereich zwischen 100 und 350nm wurden hergestellt; und dem PlasMark-Konsortium zur Verfügung gestellt (12x PVC ~100 nm, 6x PP ~200 nm, 2x PMMA ~150 nm)
- Partikel können bei Bedarf angefärbt werden (Nilrot, Safranin-T)
- Da sich die Einbettung in Gelmatrices als ungeeignet für die weitere Untersuchung der Partikel herausstellte wurde dieser Aspekt nicht weiterverfolgt.
- Unter Nutzung der Laser-Ablation wurde je nach Kunststoff eine deutliche Erosion/Oxidation der Oberfläche im Sinne der beschleunigten Alterung gemessen (Röntgenphotoelektronenspektroskopie /XPS)

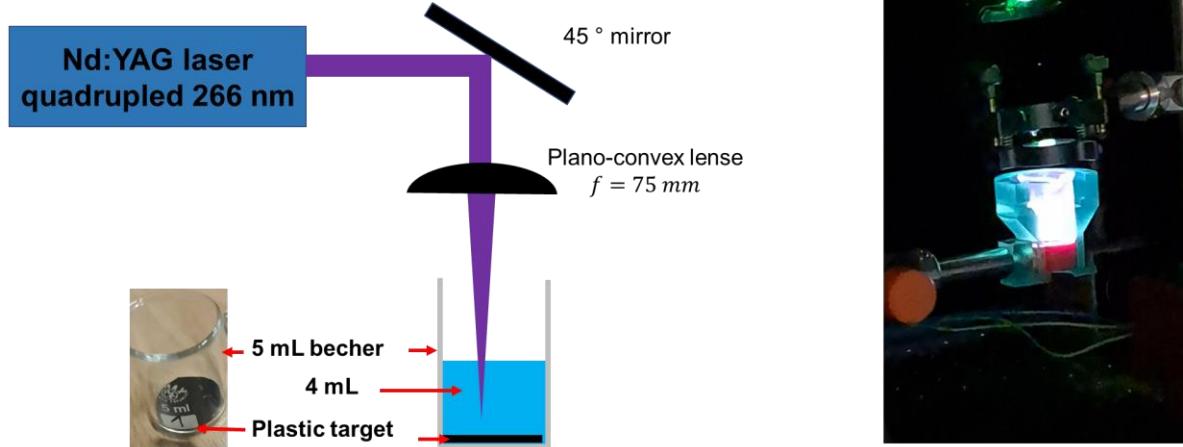
Grafik

- PET film was cut to the smaller films
- PET films were sonicated (20 h at 35 kHz) under hydrolytic conditions (10mL, 0.1M KOH) to make PET microplastics

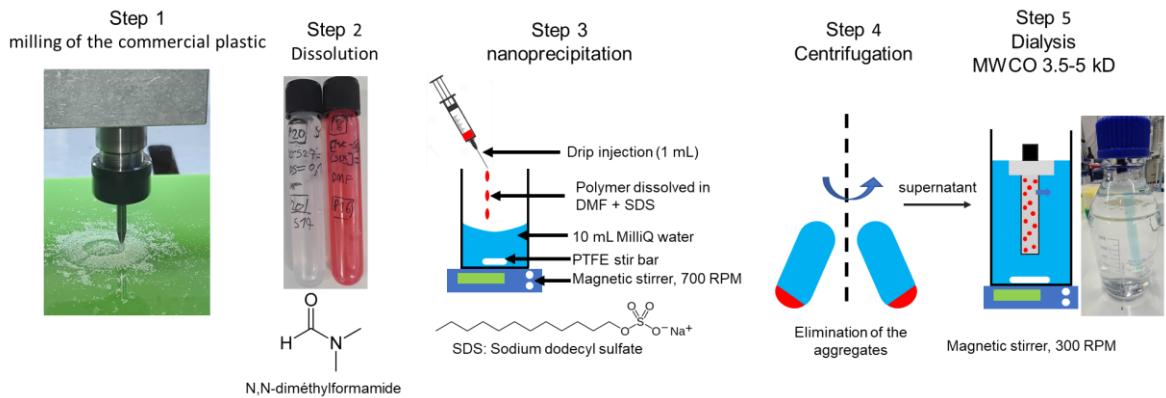


Herangehensweise zur Herstellung von Polyethylenterephthalat-Nanopartikeln mittels Hydrolyse/Cavitation

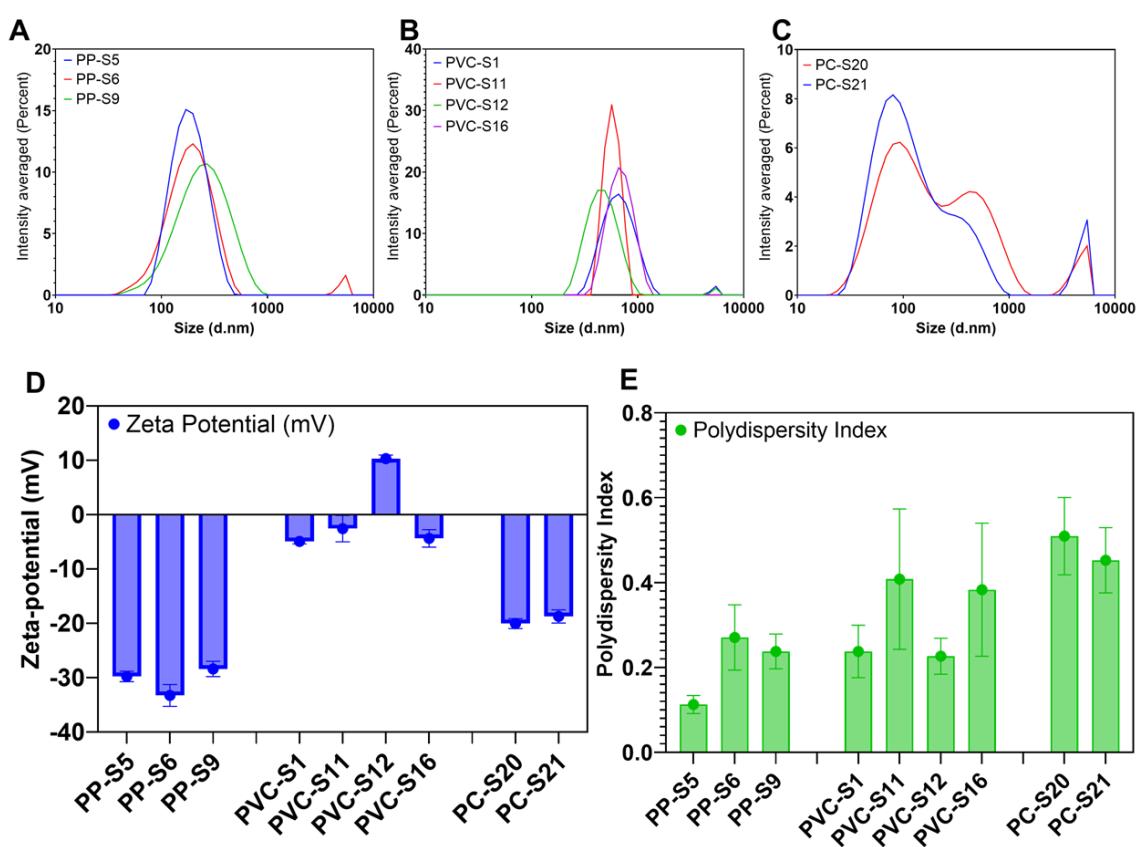
Advantage: usable with plastic insoluble in organic solvent
Treatment time ~30 min, 10 Hz, 75 mJ per pulse, 4-6 ns



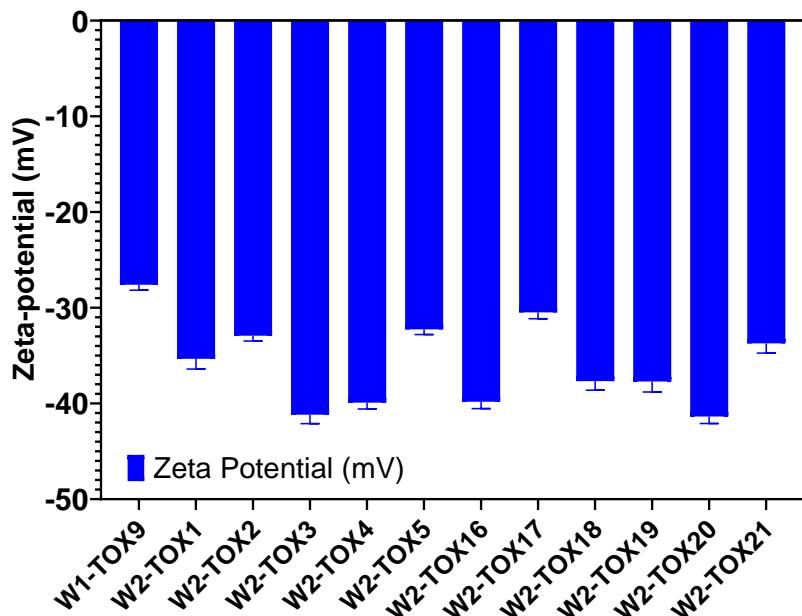
Herangehensweise zur Herstellung von Plastik-Nanopartikeln mittels 266nm Nd-YAG Laser-Ablation in wässrigen Flüssigkeiten



Herangehensweise zur Herstellung von Plastik-Nanopartikeln mittels Laser-Ablation in wässrigen Flüssigkeiten



Herstellung von Nanopartikeln mittels Laser-Ablation/Dialyse-Reinigung: Größenmessung (Multiangle dynamic light scattering, DLS) zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der Methode. PP (A), PVC (B), PC (C) sowie deren Zeta-Potential (D) und Polydispersitätsindex (E).



Zetapotential > 20mV zeigt gute Stabilität und Vergleichbarkeit unterschiedlicher PVC-nanopartikel-Batches nach Aufreinigung (Dialyse); Partikel wurden mittels Nanopräzipitation hergestellt.

Stand

→ Das Arbeitspaket wurde vollständig bearbeitet und abgeschlossen. Der Umfang der Bearbeitung ging aus mehreren Gründen sehr weit über die ursprüngliche Planung hinaus:

- Es konnten keine kommerziellen oder institutionellen Quellen für die Beschaffung von nicht-Polystyren-Nanopartikel gewünschter Größe identifiziert werden. Rücksprachen mit dem Alfred-Wegner-Institut Helgoland AK Gerdts ergaben, das Umweltproben mit geeigneten Partikeln extrem rar verfügbar sind.
- Bedarf des Konsortiums an Partikeln in Suspension, diese konnten nicht „stabil“ erzeugt werden da Zusatz von Stabilisatoren die Oberflächenchemie der Partikel und in biologischen Tests deren Toxizität unerwünscht beeinflussen – aufgrund der geringen Stabilität wurden häufige Wiederholungen der Herstellung erforderlich
- Sehr hoher Zeitaufwand bei der Etablierung der Laser-Ablation aufgrund nicht erkennbar defekter Hardware und der experimentellen Durchführung (1mg Partikel/Tag, zzgl. Aufreinigung)
- Verzögerte Lieferung des Imaging-Systems für Plastik-Partikel (erfolgte September 2022)

1.1.4

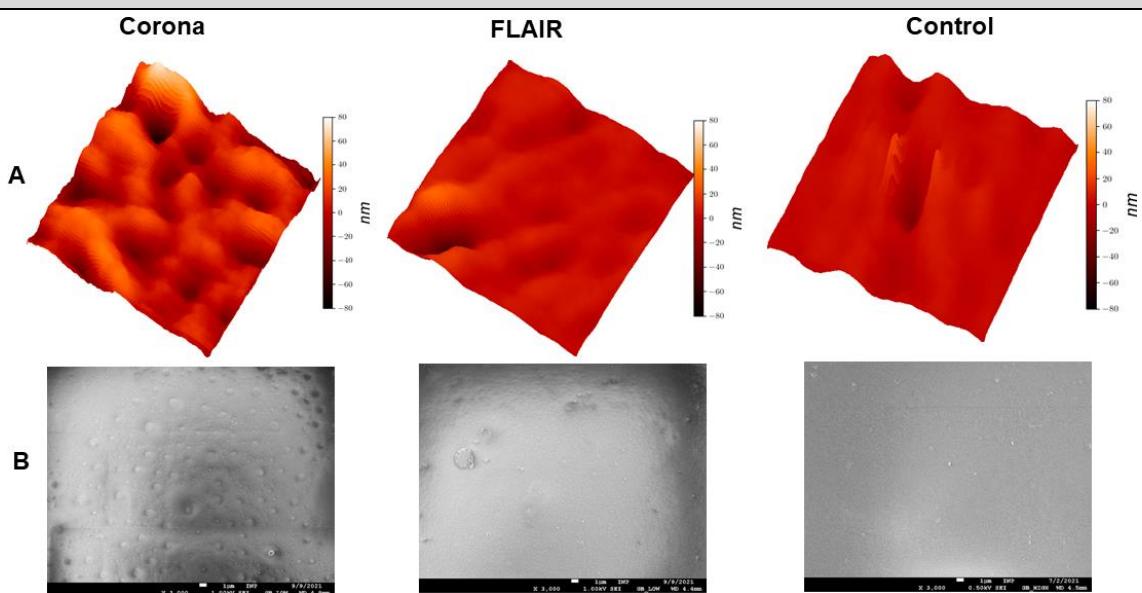
Aufgabenstellung

- Künstliche Alterung von Plastikpartikeln mittels physikalisch-chemischer Verfahren

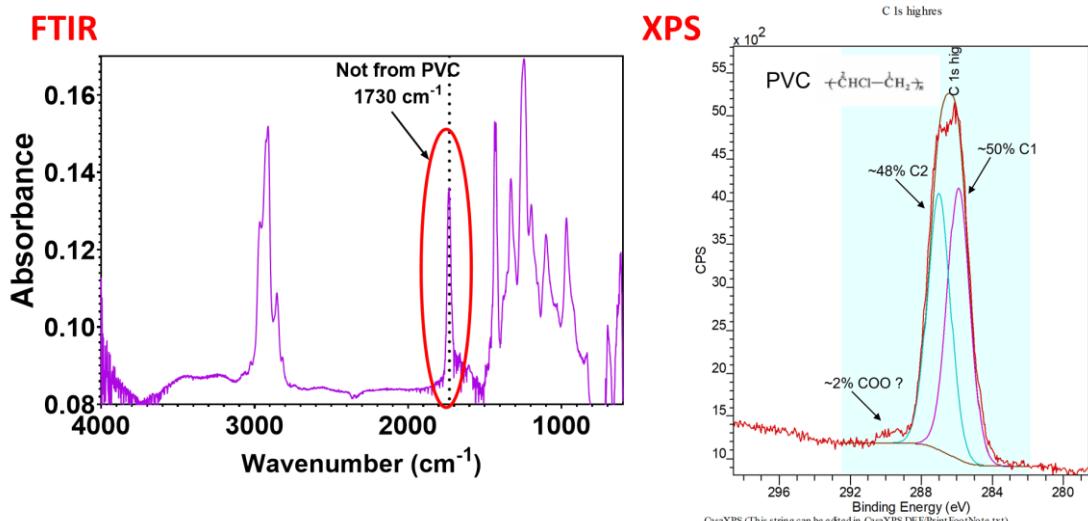
Ergebnisse

- Verschiedene Kunststoff-Nanopartikel und Verfahren zur Alterung mittels Plasmas und UV-Licht (254nm) wurden getestet, dabei waren folgende Verfahren besonders erfolgreich:
- Argon-Plasma-Quelle (Helix-Jet) erzielte eine gute Oxidation der Oberfläche, aber es kam zur deutlichen Partikelaggregation (Partikel kommen direkt in Kontakt zur aktiven Plasmazone) (Polystyren)
- Corona-Plasma-Behandlung an Luft erfolgreich, aber nur begrenzt für Partikel einsetzbar (Polyethylenterephthalat). Es kommt zu durch eintrag von funktionellen Gruppen und Aufspaltung der Ester-Bindungen zu einer Änderung der Polarität der Oberfläche gepaart mit minimaler Veränderung der Morphologie (erhöhte Rauigkeit)
- Oxidation mittels Laser-Ablation (Polyvinylchlorid, Polypropylen) – sehr gut geeignetes Verfahren bei dem es zu Veränderung in der Polymerkette (PP) bzw. Entfernung von Chlor aus der Partiktoberfläche (PVC) kommt
- Nicht erfolgreich war die Alterung in Flüssigkeiten mittels Argon Plasmajet (kINPen, Partikel kommen nicht in Kontakt mit der aktiven Plasmazone)

Grafik



Ptychography x-ray (A) and SEM (B) Darstellung von Plasma-behandelten Oberflächen/Kontrollen von PET-Filmen. Anstieg der Materialrauhigkeit durch chemische Ätzprozesse an der Oberfläche deutlich



Charakterisierung der Oberfläche von Polyvinylchlorid-Nanopartikeln (PVC) nach Laser-Ablation mittels Infrarotspektroskopie (FTIR, rechts) oder Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS, rechts). Abspaltung von Chlor-Atomen und Ersatz durch Sauerstoff wird sichtbar

Stand

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

1.1.5

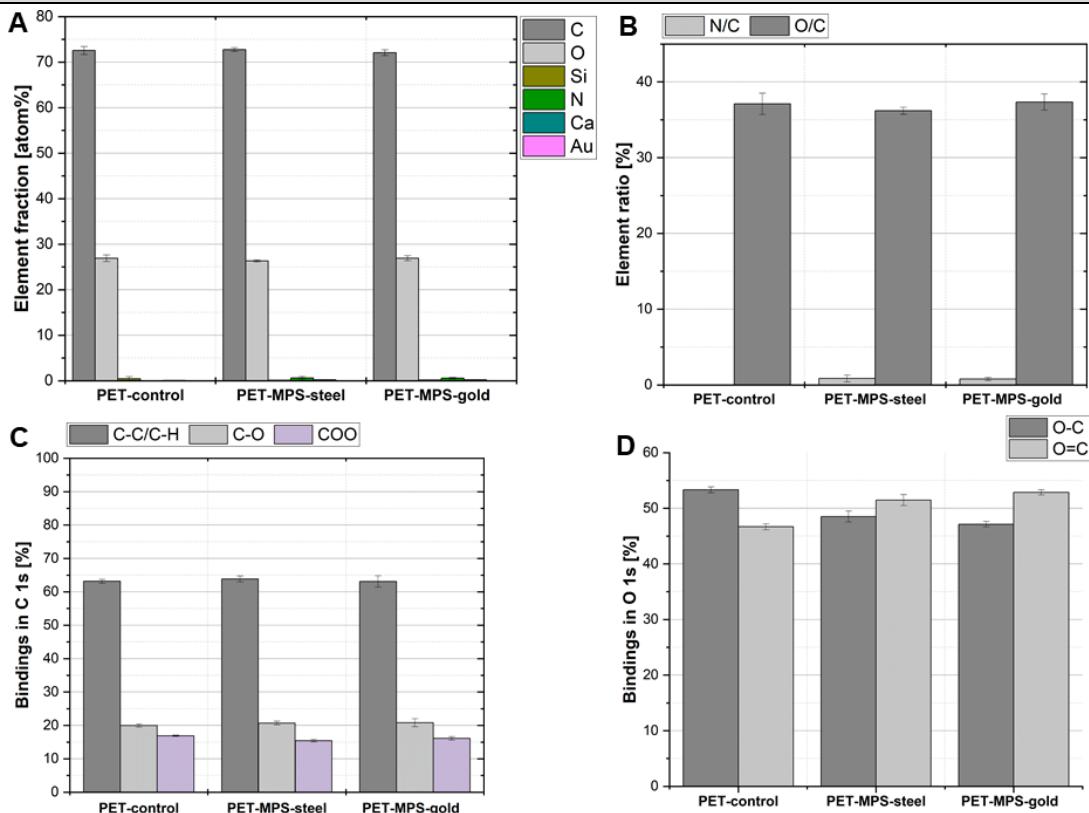
Aufgabenstellung

- Ermittlung der physikochemischen Eigenschaften der gealterten Partikel mit besonderer Berücksichtigung der chemischen Komposition der Oberfläche

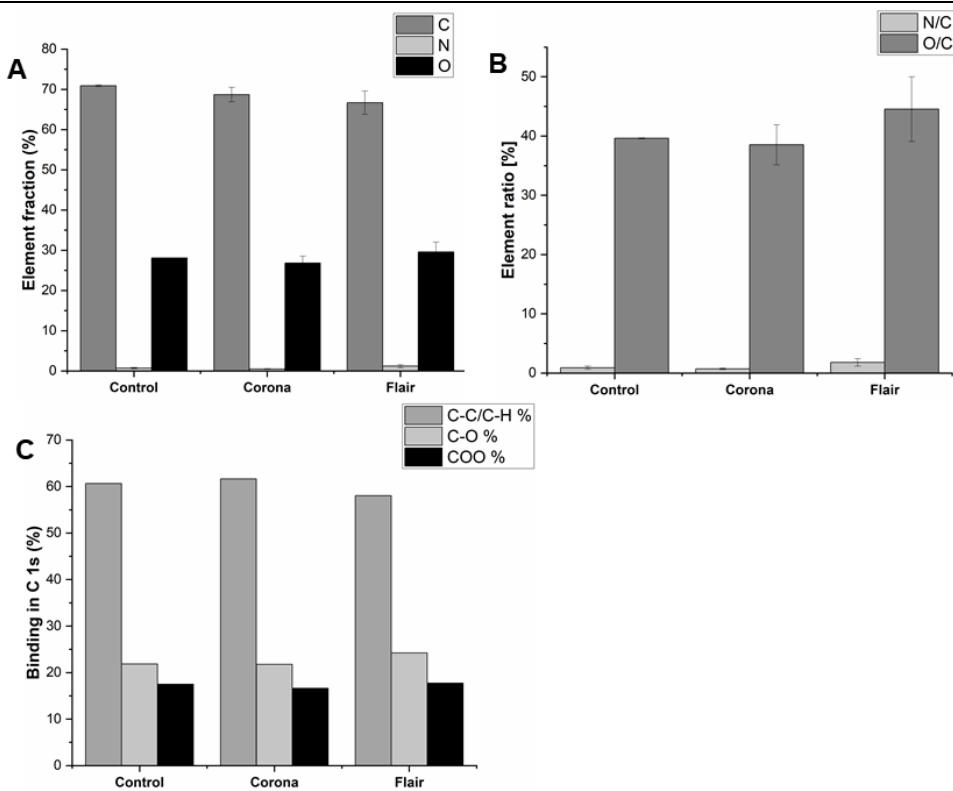
Ergebnisse

- Mittels Röntgenstreu-Spektroskopie (XPS) kann gezeigt werden, dass bei PET, PS und PE Sauerstoff- und Stickstoffatome in die Oberfläche (10nm) eingebracht werden
- Der Eintrag von Stickstoff ist dem von Sauerstoff untergeordnet
- Oxidation der oberflächennahen Kohlenstoffatome (C-H, C-O in C=O umgewandelt)
- Der Kern des Polymers bleibt chemisch unverändert (Infrarotmikroskopie)
- Die Oberfläche wird polarer, als Maß dessen sinkt das Zetapotential weiter ab

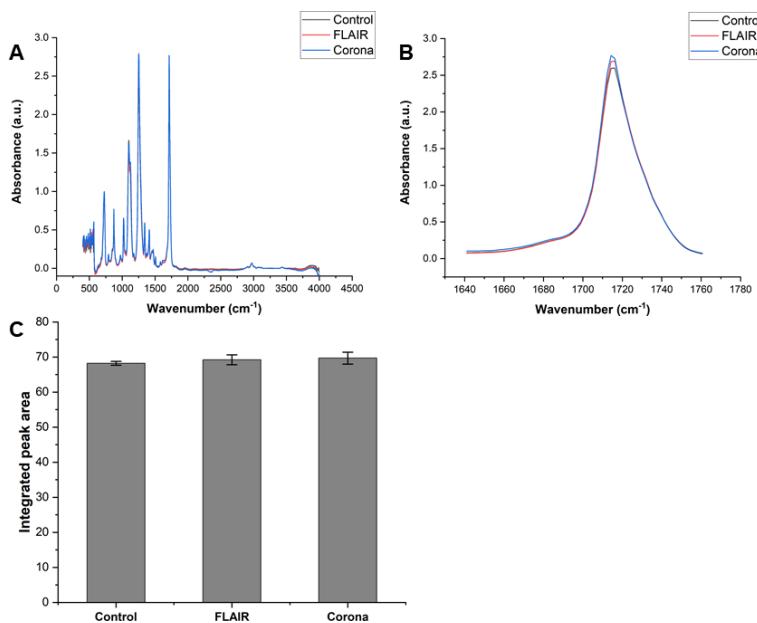
Grafik



Charakterisierung von Polyethylenterephthalat-Partikeln hergestellt mittels Hydrolyse/Cavitation. Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS): A) Elementekomposition (%), B) Verhältnis der Elemente (%), C) Anteil C in 1s-Bindungen (%), and D) Anteil von O in 1s-Bindungen (%). Oxidation der Oberflächennahen Bereiche des Partikels. Partikelbulk bleibt unverändert (IR-Mikroskopie)



Charakterisierung von Plasma-behandelten Polyethylenterephthalat-Filmen. Röntgenphotoelektronen-spektroskopie (XPS):
 A) Elementekomposition (%), B) Verhältnis der Elemente (%), C) Anteil C in 1s-Bindungen (%). Oxidation der Oberflächennahen Bereiche des Films. Materialbulk bleibt unverändert (FTIR-Mikroskopie, siehe unten)



Charakterisierung von Plasma-behandelten Polyethylenterephthalat-Filmen mittels ATR-IR-Mikroskopie A) Komplettes IR-Spektrum von drei Proben, B) Carbonyl-Bereich ($1650-1750 \text{ cm}^{-1}$), und C) AUC des Carbonyl-Bereichs

Stand

➔ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

1.2.5

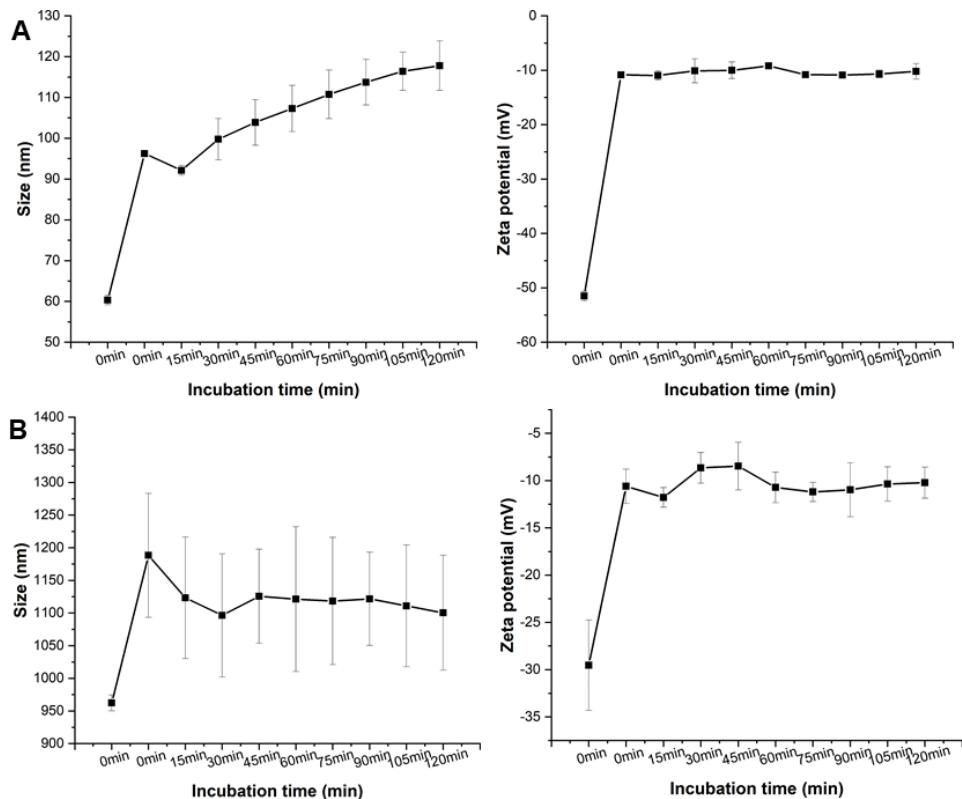
Aufgabenstellung

- Quantifizierung und Identifizierung der an Plastik bindenden Proteine aus Modellsystemen in AP 1.2.1 mittels Massenspektrometrie

Ergebnisse

- eine Proteincorona wird innerhalb weniger Minuten ausgebildet (Modellproteingemische Kälberserum oder humarer Speichel) und verändert sich dann langsam (in Abhängigkeit von der Oberflächenchemie und der Größe des Partikels); diese ist in hard (=innere) und soft (=äußere) Corona gegliedert
- Geschwindigkeit und Ausmaß werden von der Oberflächenchemie und dem Durchmesser der betrachteten Plastik-Partikel bestimmt

Grafik



Size and zeta potential of protein corona formation on PS-COOH particles with two sizes 50 nm (A) and 1 μm (B) recorded by DLS, every 15 min for 2 hours.

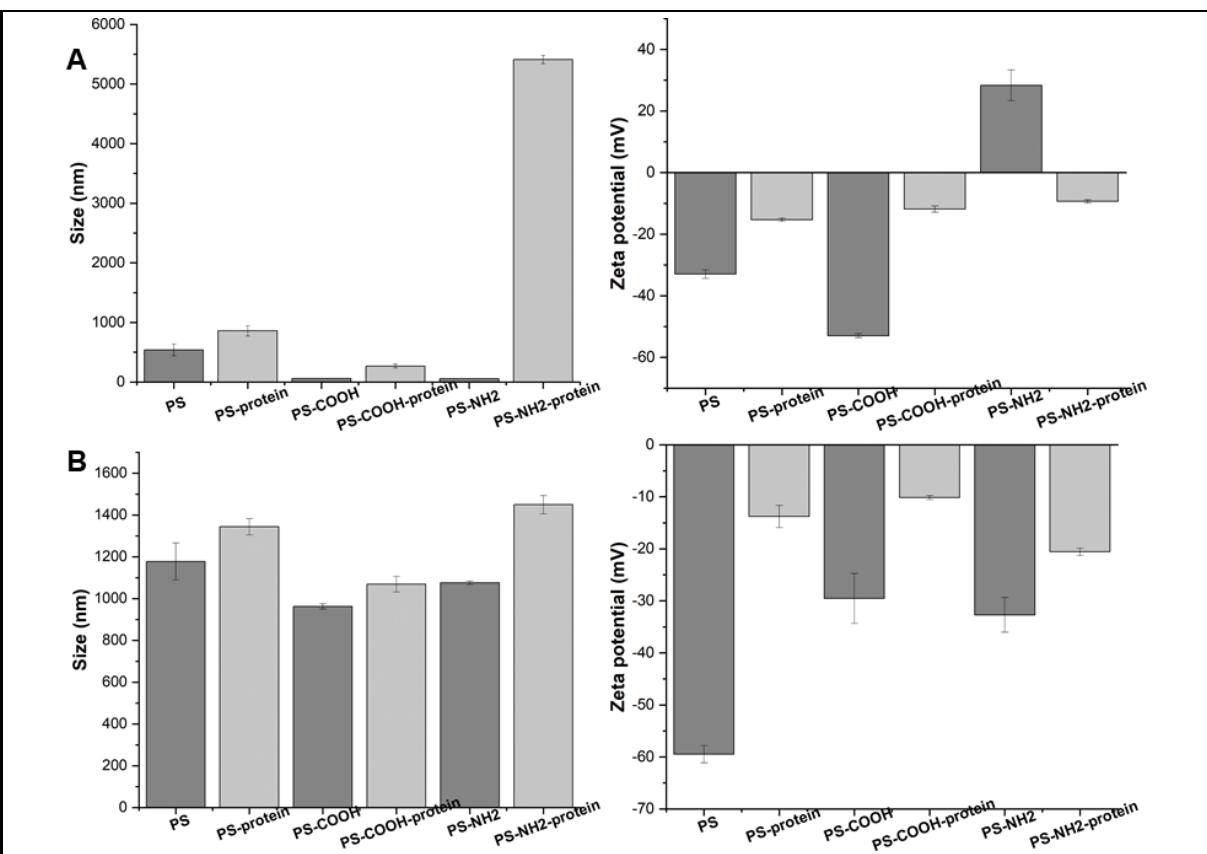
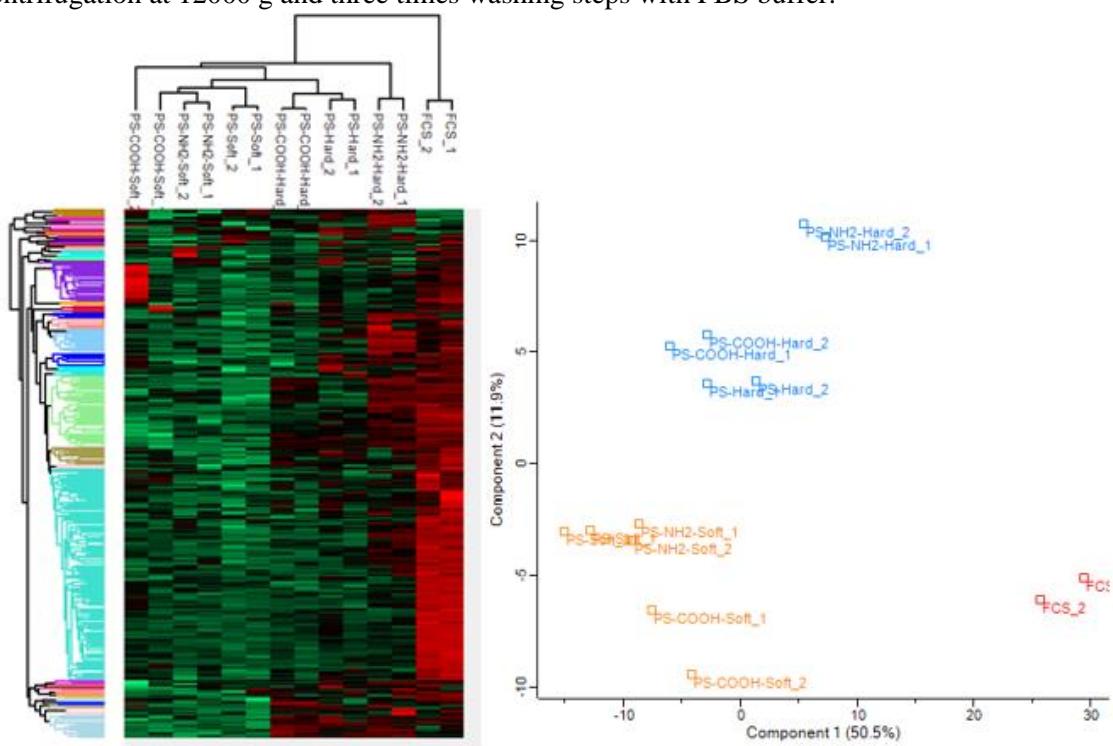
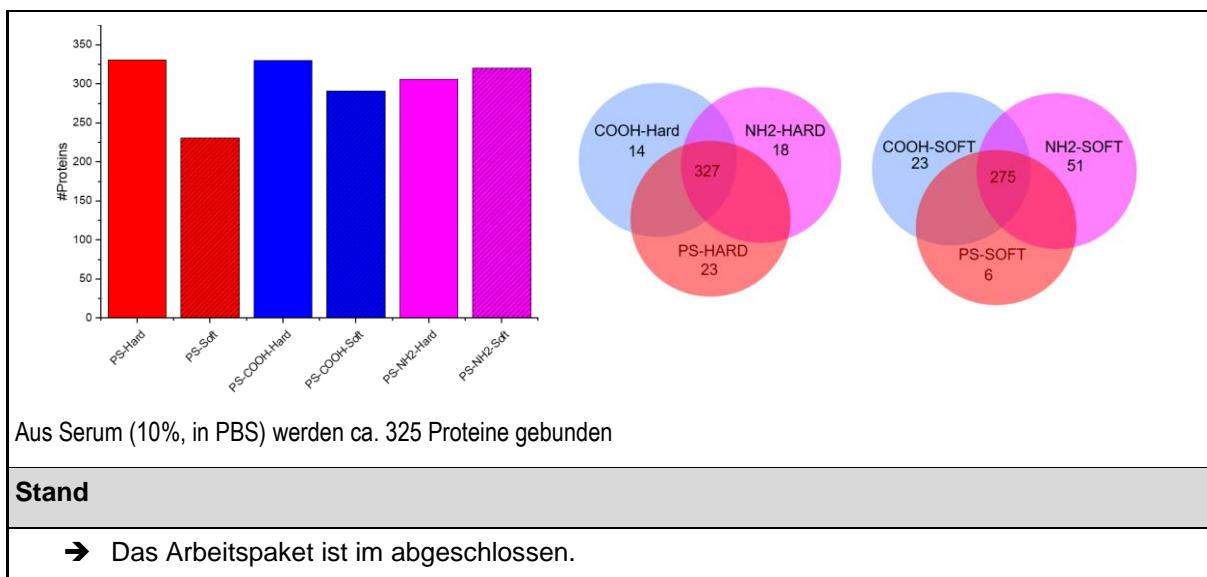


Figure 12. Size and zeta potential of protein corona formation on PS, PS-COOH and PS-NH₂ particles with two sizes 50 nm (A) and 1 μ m (B) recorded by DLS, after one hour incubation, 40 min centrifugation at 12000 g and three times washing steps with PBS buffer.



Die Proteincorona auf Polystyren-Partikel 1 μ m mit unterschiedlicher Oberflächenkomposition (neutral, sauer, basisch) unterscheidet sich in der Zusammensetzung der gebundenen Proteine.



1.3.5

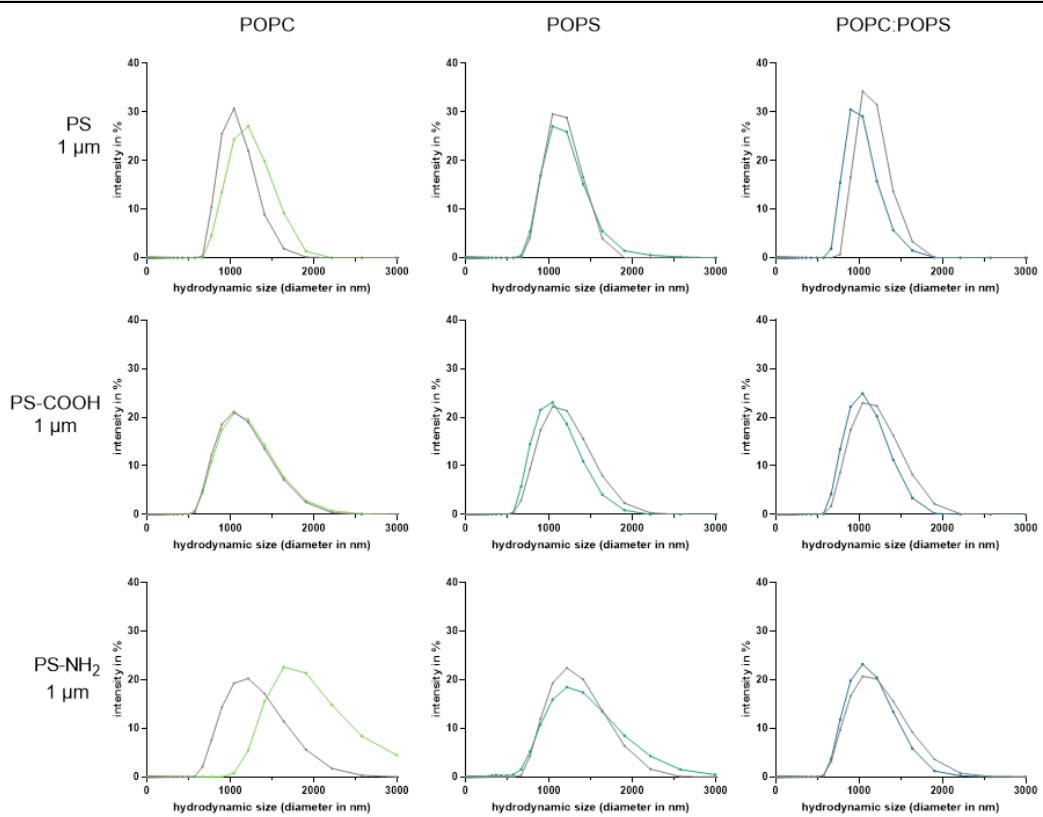
Aufgabenstellung

- Bestimmung der an Plastik-bindenden Lipide mittels Massenspektrometrie (Lipidkorona)

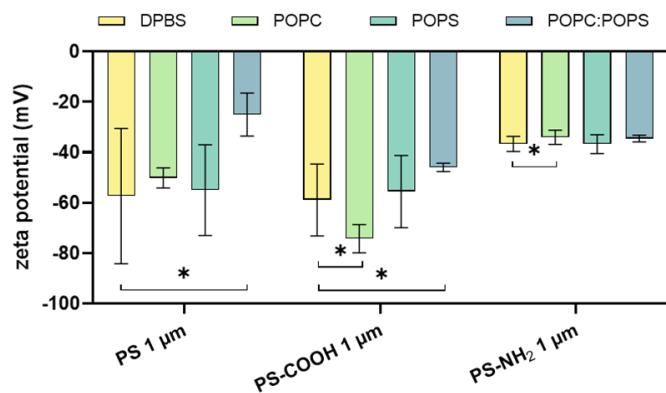
Ergebnisse

- Die Inkubation mit Phospholipiden (in Form von Liposomen) führt zur Ausbildung einer Lipidcorona in geringem Umfang, einhergehend mit minimalen Änderungen der (scheinbaren) Größe (keine Aggregation) und einer geringfügigen Änderung des Zetapotentials in Abhängigkeit von der Oberflächenchemie
- Unterschiedliche Labor-Protokolle wurden auf Eignung zur Extraktion der Lipidcoronas ohne einen zu hohen Background an Polymeren zu erhalten. Nur Methanol eignet sich, alle höherkettigen Alkohole, Ketone, oder Ether lösen die Oberfläche der Nanopartikel an und können nur eingeschränkt genutzt werden.
- Zwei Verfahren zur flüssigchromatographischen Trennung der Lipidgemische wurden erprobt (Hydrophilic interaction chromatography – HiLIC; reversed phase C18/C30), dabei wurden die besten Resultate mit der HiLIC-Variante erzielt
- Die Choreographie der beider Laborprotokolle wurden etabliert und erfolgreich getestet
- Die Komposition der Lipide, die an den Partikeln aus einem Gemisch binden wird durch die Oberflächenchemie der Partikel moduliert. Die Zwitterionischen polaren Phospholipide binden am stärksten auf unverändertem PS, am geringsten auf amino-funktionalisiertem PS

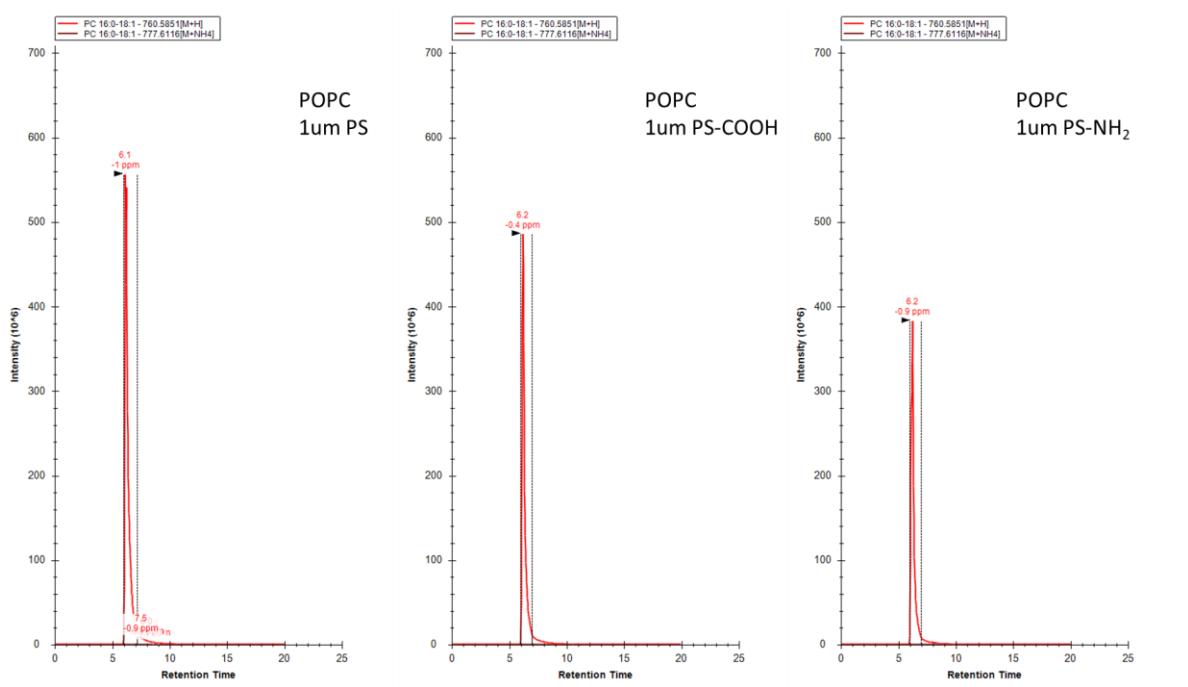
Grafik



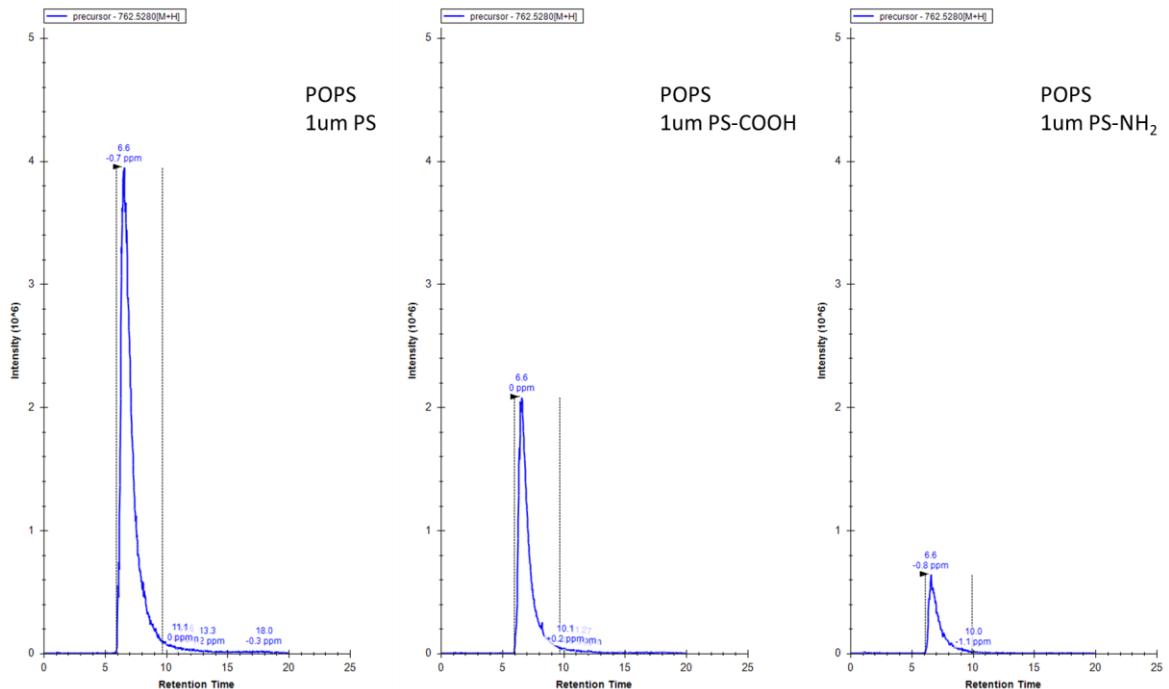
Größenentwicklung von 1000nm Polystyren-Partikeln Polystyren mit keiner (PS), Carboxy (COOH) oder Amino-Funktionalisierung (NH₂) nach Inkubation mit unterschiedlichen Phospholipiden (POPC, POPS, mix)



Veränderung des Zetapotentials von 1000nm Polystyren-Partikeln Polystyren mit keiner (PS), Carboxy (COOH) oder Amino-Funktionalisierung (NH₂) nach Inkubation mit unterschiedlichen Phospholipiden (POPC, POPS, mix)



Bindung von PC 16:0/18:1 (POPC) an Polystyren (links), PS-COOH (mitte), PS-NH₂ (rechts). Parallel reaction monitoring (PRM), Analyse mittels Skyline Software. Bindung an Partikel erfolgt, marginale Unterschiede der Intensitäten aufgrund der Oberflächenchemie der Partikel sind ersichtlich



Bindung von PS 16:0/18:1 (POPS) an Polystyren (links), PS-COOH (mitte), PS-NH₂ (rechts). Parallel reaction monitoring (PRM), Analyse mittels Skyline Software. Bindung des Lipids an Partikel erfolgt, deutliche Abnahme der Bindung bei polaren, insbesonders positiv geladenen Partikeln (PS-NH₂, rechts)

Stand

- Das Arbeitspaket ist abgeschlossen. Die Datenanalyse erfolgt weiter für die Finalisierung der Promotionsarbeit von A. Dorsch

1.3.6

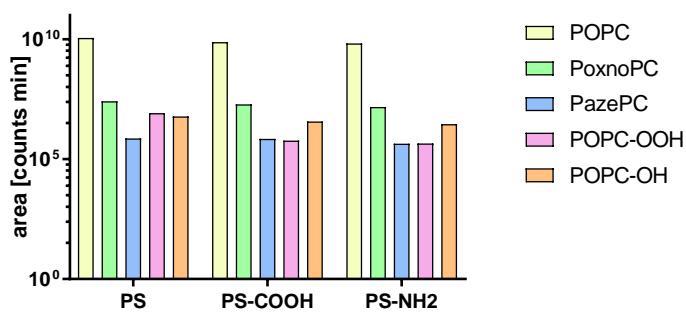
Aufgabenstellung

- Bestimmung des Oxidationsrisiko von plastik-gebundene Lipiden

Ergebnisse

- Herangehensweise etabliert (Protokolle angepasst, targeted-Datenanalyse mittels Skyline); siehe auch AP 1.3.5
- Lipidoxidation von polaren Phospholipiden wird nicht maßgeblich durch die eingesetzten Plastiknanopartikel verändert, nur ein sehr geringer Prozentsatz der Lipide liegt oxidiert vor (Trunkierung der Seitenkette + Addition von Sauerstoff)
- Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen chemischen Oberflächen (Polystyren, PS-COOH, PS-NH₂)

Grafik



Oxidation von POPC in Lipidcoronas auf Polystyren (links), PS-COOH (mitte), PS-NH₂ (rechts). PoxnoPC (PC 18:0/9:0 o xo), PazePC (PC 18:0/9:0 COOH), POPC-OOH (hydroperoxide), POPC-OH (Hydroxylierung). Parallel reaction monitoring (PRM), Analyse mittels Skyline Software

Stand

- Das Arbeitspaket ist abgeschlossen. Die Datenanalyse erfolgt weiter für die Finalisierung der Promotionsarbeit von A. Dorsch

1.3.4.4

Aufgabenstellung

- Identifikation der intrazellulären Proteine, welche nach Partikelaufnahme in Zellen an die Plastik binden

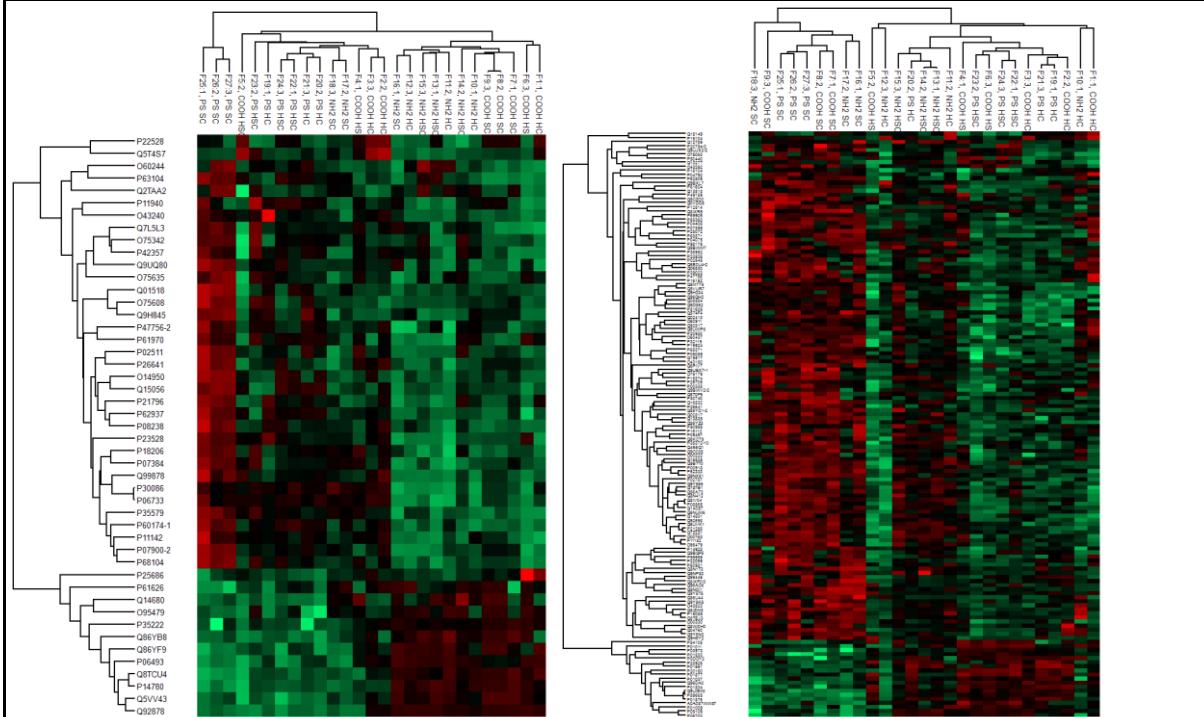
Ergebnisse

- Protokoll-Iterationen wurden getestet, Massenspektrometrisch gemessen und ausgewertet, jedoch konnten methodische Schwächen in der Erhebung eindeutiger Daten und finaler Ergebnisse in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht gelöst werden
- Magnetische Partikel hatten einen hinreichenden Erfolg, allerdings war die erzielte Proteinmenge zu gering
- Aufgrund dieser technischen Schwierigkeiten bei der Rückgewinnung der Nanopartikel als Zellen wurde abweichend statt mit humanen Zelllinien mit humanem Speichel als Proteinquelle gearbeitet, die auch bei der Ingestion von Partikeln den Erstkontakt darstellt

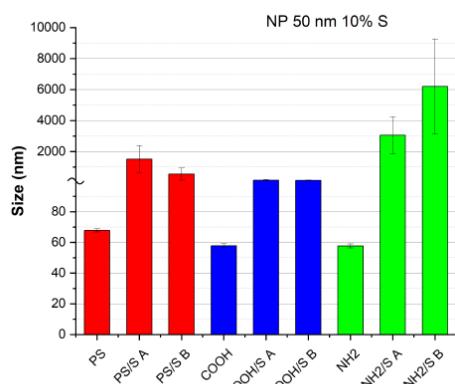
(Bachelorarbeit F. Förchner); siehe auch AP 2.3.3

- Es wird eine Protein-Corona gebildet, deren Komposition abhängig ist von a) der Komposition des Spender-Speichels und b) von der Oberflächenchemie der Partikel, wenn diese klein (50 nm) sind. Bei Partikeln mit einem Durchmesser von 1000nm spielt die Oberflächenchemie eine geringere Rolle, stattdessen bildet sich eine deutlich in hard- und soft-Corona unterteilte Proteinschicht aus
- Die Ausbildung der Corona geht mit Änderungen in der scheinbaren Partikelgröße (Aggregation, insbesondere bei Nanopartikeln < 200nm) und Verringerung der Zetapotential-Differenz zum Nullwert einher.

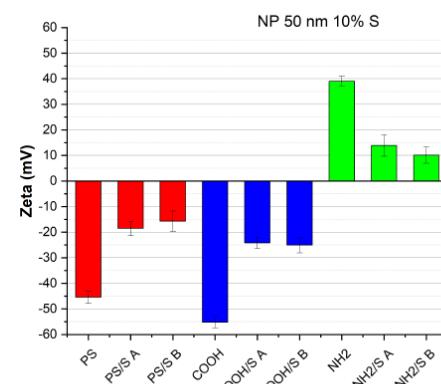
Grafik



Abundanz der signifikant unterschiedenen Proteine auf 50nm Polystyren mit keiner (PS), Carboxy (COOH) oder Amino-Funktionalisierung (NH2) (links) oder auf 1000nm-Partikeln (rechts), Cluster-Analyse mittels Perseus 2.0.6.0

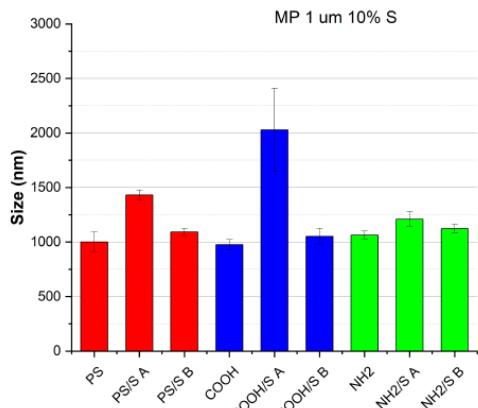


(a) NP 50 nm, 10% saliva, size

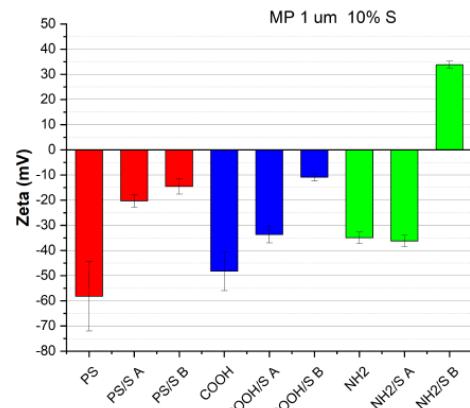


(b) NP 50 nm 10% saliva, zeta potential

Größe (links) und Zetapotential (rechts) von 50nm PS-Partikeln mit keiner (PS), Carboxy (COOH) oder Amino-Funktionalisierung (NH2) nach Ausbildung einer Protein-Corona (10% Speichel als Modellsystem (S), Donor A/B), gemessen mit DLS



(a) MP 1 μm 10% saliva, size



(b) MP 1 μm 10% saliva, zeta potential

Größe (links) und Zetapotential (rechts) von 1000nm PS-Partikeln mit keiner (PS), Carboxy (COOH) oder Amino-Funktionalisierung (NH2) nach Ausbildung einer Protein-Corona (10% Speichel als Modellsystem (S), Donor A/B), gemessen mit DLS

Stand

➔ Das Arbeitspaket ist abgeschlossen.

Arbeitspaket 2: Plastik- und Biomedizin

Das AP2 enthält die Unter-AP Akute Toxizität (1), Immunzell-Funktionalität (2), Adaption und molekulare Mechanismen (3), Genotoxizität (4) und Tiermodelle (5), die insgesamt erfolgreich abgeschlossen (1-4) bzw. Pandemie-bedingt nur teilweise bearbeitet und abgeschlossen (5) werden konnten.

AP 2.1 Akute Toxizität

2.1.1 Zellaktivität und -wachstum

Aufgabenstellung

- Bestimmung der akuten Toxizität verschiedener Plastikarten, -größen und -konzentrationen *in vitro*

Ergebnisse

- Plastikpartikelgrößen im Bereich von 50 nm, 200 nm und 1 μm mit und ohne Fluoreszenzmarkierung (a)
- Verwendung humaner Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (Epithelzellen, Hela; Nierenzellen, HEK 293; Keratinozyten, HaCaT; Lungenzellen, A549)
- Plastikaufnahmenachweis durch moderne hochauflösende Confocal-Laser-Scanning-Mikroskopie (b), Durchflusszytometrie und Analysen am Multiplatten-Reader in humane Zellen
- Die akute Toxizität von Plastikpartikeln ist in den meisten untersuchten Zelllinien gering
- Geringe Änderungen der Apoptose, Zellproliferation (c-e) und der Zellzyklusphasen wurden beobachtet
- Die Partikelgröße und deren Konzentration hat kaum einen Einfluss auf die Zytotoxizität
- Die eingesetzte Positivkontrolle (PS-NH₂) zeigt dagegen eine erhöhte Zytotoxizität

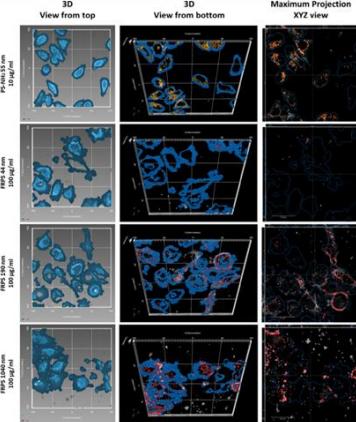
- Die dynamische Charakterisierung des Filamentgerüsts *in vitro* zeigt eine transiente Reorganisation einhergehend mit dem Verlust von Stressfasern des Zytoskeletts nach Aufnahme von Plastikpartikeln (d, untere Abbildung)
- Es wurden drei Veröffentlichungen erzielt, drei weitere sind in Vorbereitung

Abbildungen

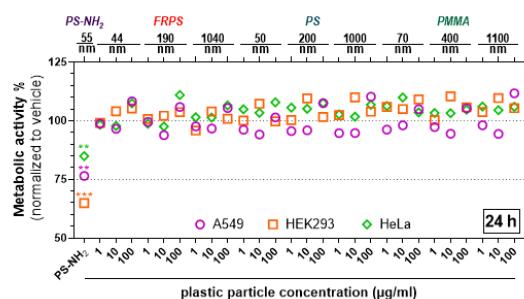
a) Plastikpartikel

Particle	Fluorescence	Manufacturer's Diameter size	Hydrodynamic size (Z-average; nm mean \pm SD)	Polydispersity Index (mean \pm SD)	Zeta-potential (mV mean \pm SD)
FRPS44	λ_{ex} 660 nm and λ_{em} 690 nm	44 nm	55.37 \pm 0.32	0.039 \pm 0.013	-23.61 \pm 1.39
FRPS190	λ_{ex} 660 nm and λ_{em} 690 nm	190 nm	198.3 \pm 0.85	0.015 \pm 0.011	-11.74 \pm 0.72
FRPS1040	λ_{ex} 660 nm and λ_{em} 690 nm	1.04 μ m	1023 \pm 15.9	0.037 \pm 0.008	-7.378 \pm 3.66
PS50	None	50 nm	50.21 \pm 0.53	0.094 \pm 0.019	-24.98 \pm 0.68
PS200	None	200 nm	217.2 \pm 2.79	0.023 \pm 0.032	-38.07 \pm 0.99
PS1000	None	1 μ m	960.1 \pm 14.2	0.147 \pm 0.027	-54.97 \pm 3.65
PMMA70	None	70 nm	57.09 \pm 0.03	0.071 \pm 0.008	-30.88 \pm 1.02
PMMA400	None	400 nm	704.8 \pm 10.6	0.265 \pm 0.017	-16.99 \pm 0.33
PMMA1100	None	1.1 μ m	1129 \pm 8.96	0.049 \pm 0.017	-11.01 \pm 2.41
PS-NH ₂	λ_{ex} 505-545 nm and λ_{em} 560-630	55 nm	59.66 \pm 0.18	0.047 \pm 0.011	23.37 \pm 2.30

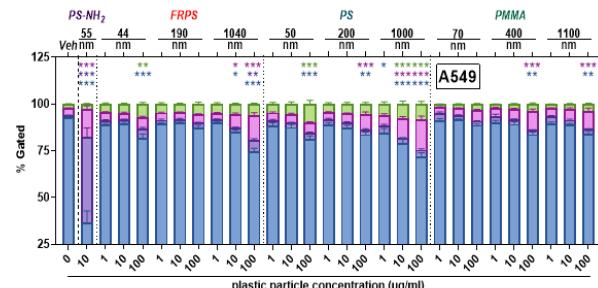
b) Plastikaufnahme in humane Zellen



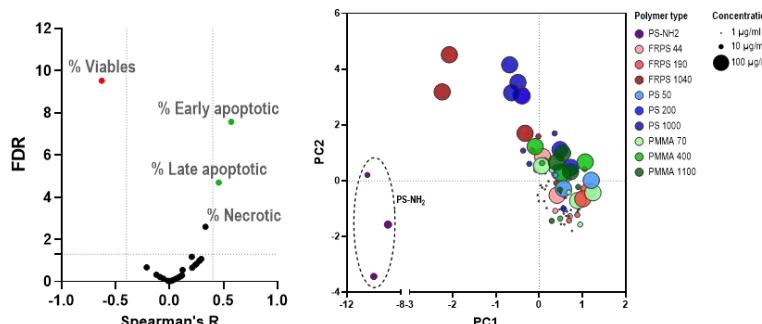
c) Zellmetabolismus



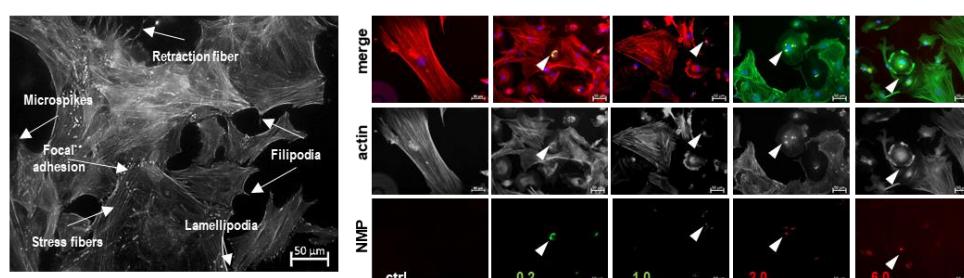
d) Zellviabilität



e) Apoptose



d) Filamentgerüst



(a) Ausgewählte Plastikpartikel mit und ohne Fluoreszenzmarkierung unterschiedlicher Größen; (b) Plastikaufnahme in Zellen; (c) akute Toxizität in drei Zelllinien 24 h nach Plastik-Inkubation mit verschiedenen Partikeln und -konzentrationen am Beispiel der metabolischen Aktivität; (d) der Zellvitalität und (e) der Apoptose; PCA-Analyse apoptotischer Vorgänge mit marginalen Änderungen, Ausnahme war die in allen Untersuchungen die Positivkontrolle PS-NH2 (d, unten); transienter breakdown des Aktinzytoskeletts (Verlust der Stressfasern) nach Plastikpartikel-Aufnahme in vitro.

Stand des Arbeitspaket

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.1.2 Zell-Zell-Verbindungen

Aufgabenstellung

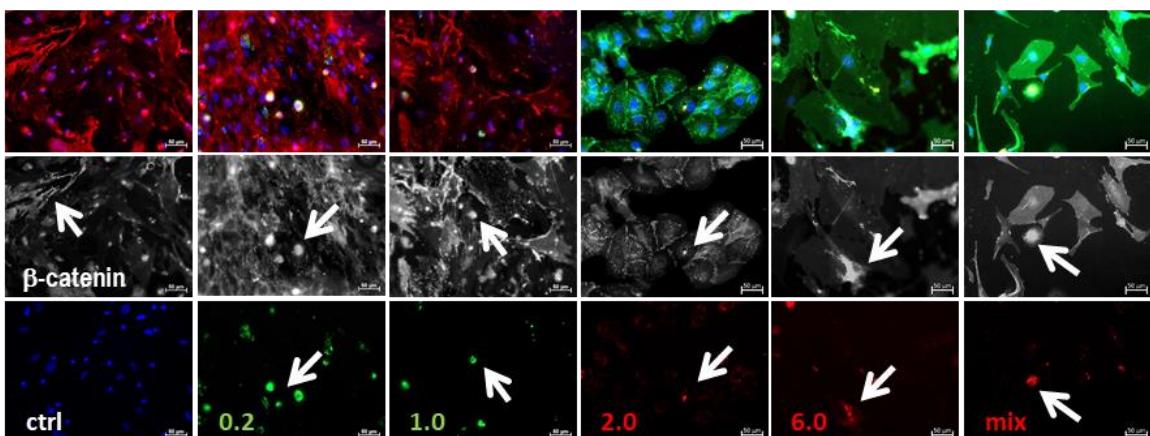
- Bestimmung des Einflusses von Plastik auf Zell-Zell-Verbindungen *in vitro*

Ergebnisse

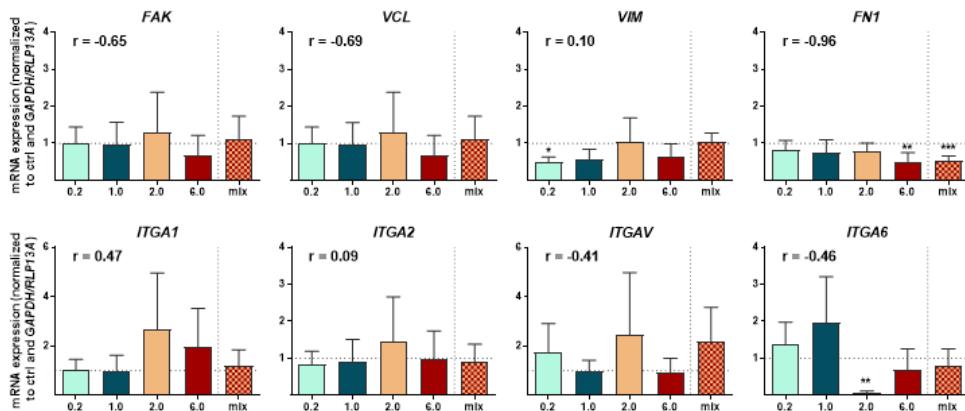
- Der Einfluss von Plastikpartikeln auf Zell-Zell-Verbindungen und deren Kontaktproteine war insgesamt in Abhängigkeit der untersuchten Zellen gering (a, c)
- Fokale Adhäsionsmoleküle (fokale Adhäsions-Kinase, Fak; Vinculin, Vcl), *Tight-* und *Gap-junction*-Moleküle (Claudin, Cldn1; Connexin (Cx) 43) und adhäsive Integrinkomplexe (ITGA1-6, ITGB) wurden nach einmaliger Plastikexposition nur moderat beeinflusst (b, d)
- Die Ergebnisse waren unabhängig von der verwendeten Untersuchungsmethode
- Diese konnten neben der quantitativen PCR-Analyse zur Untersuchung der Genexpression auch in verschiedenen Proteinanalysen mit dem WES-System und der Fluoreszenzmikroskopie (a-d) validiert werden

Abbildungen

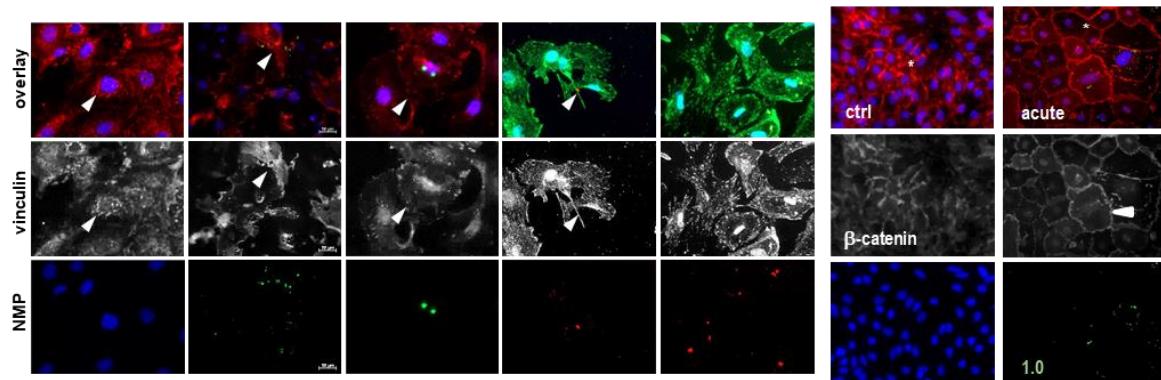
a) Distribution von Zell-Zell-Kontaktproteinen in Lungenzellen



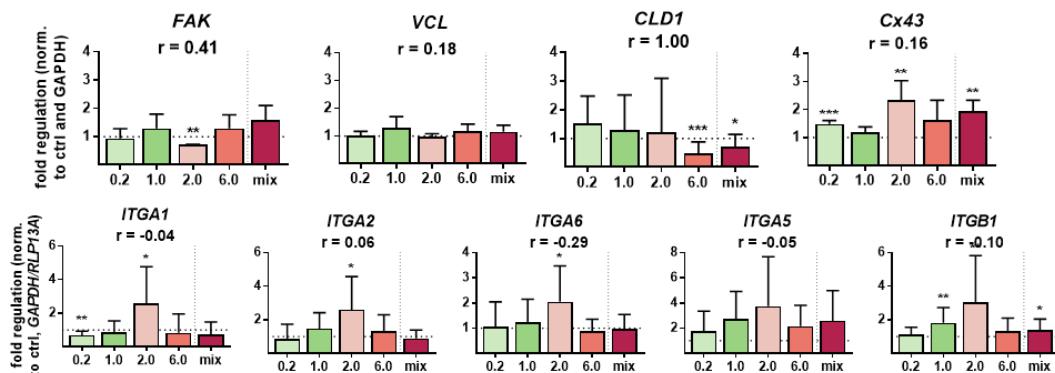
b) Expression von Zell-Zellkontaktproteinen in Lungenzellen



c) Lokalisation und Expression von Kontaktproteinen in Hautzellen



d) Expression von Zellkontaktproteinen in Hautzellen



In vitro wurden Zellen mit Plastikpartikeln unterschiedlicher Größen inkubiert; a) Fluoreszenz-Mikroskopie von β -Catenin sowie (b) Expression von Kontaktproteinen und Integrinen in Lungenzellen; (c) Fluoreszenz-Mikroskopie von Vinculin und β -Catenin, sowie (d) qPCR von fokalen Adhärenz-, tight und gap junction Molekülen in Hautzellen.

Stand des Arbeitspakets

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.1.3 Reaktive Spezies

Aufgabenstellung

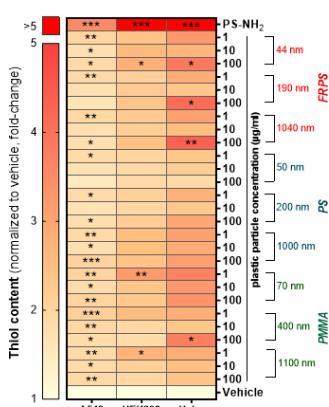
- Bestimmung der Auswirkungen von Plastik auf die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS) *in vitro*

Ergebnisse

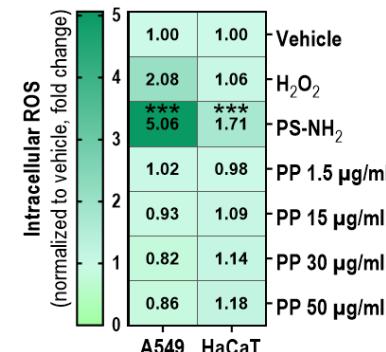
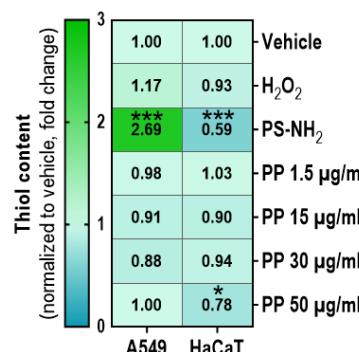
- Der Thiolgehalt (ändert sich je nach ROS-Level) der Zellen wurde z.T. signifikant nach Plastikexposition in Abhängigkeit der untersuchten Zellart verändert (a, c-d, f)
- Plastikpartikel (bspw. PS, PMMA, PP) haben einen nur geringen Einfluss auf die akute Produktion reaktiver Spezies (b-d) im Vergleich zur Positivkontrolle
- Eine zelluläre oxidative Stressantwort wurde in Abhängigkeit der Expositionsdauer der Partikel auf die Zellen (bspw. auf mRNA-Ebene: Expressionslevel von GSTA1, als Marker für die ROS-Bildung, steigt an; (c)) nachgewiesen
- Oxidative Abwehrmechanismen konnten in HaCaT-Keratinozyten *in vitro* nach Exposition mit PS- und PMMA-Partikeln nachgewiesen werden (e-f)

Abbildungen

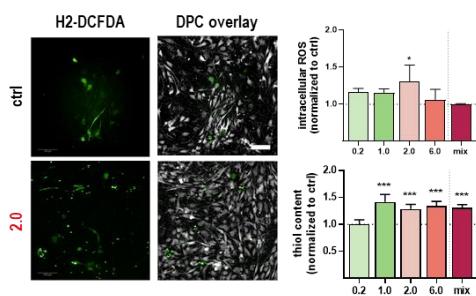
a) Thiolcontent



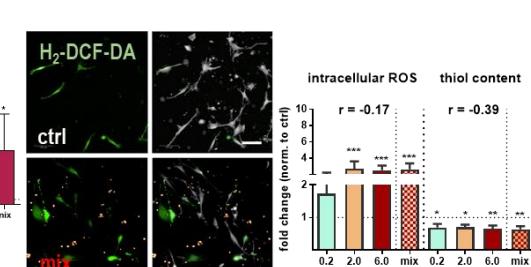
b) Intrazellulärer ROS-Gehalt

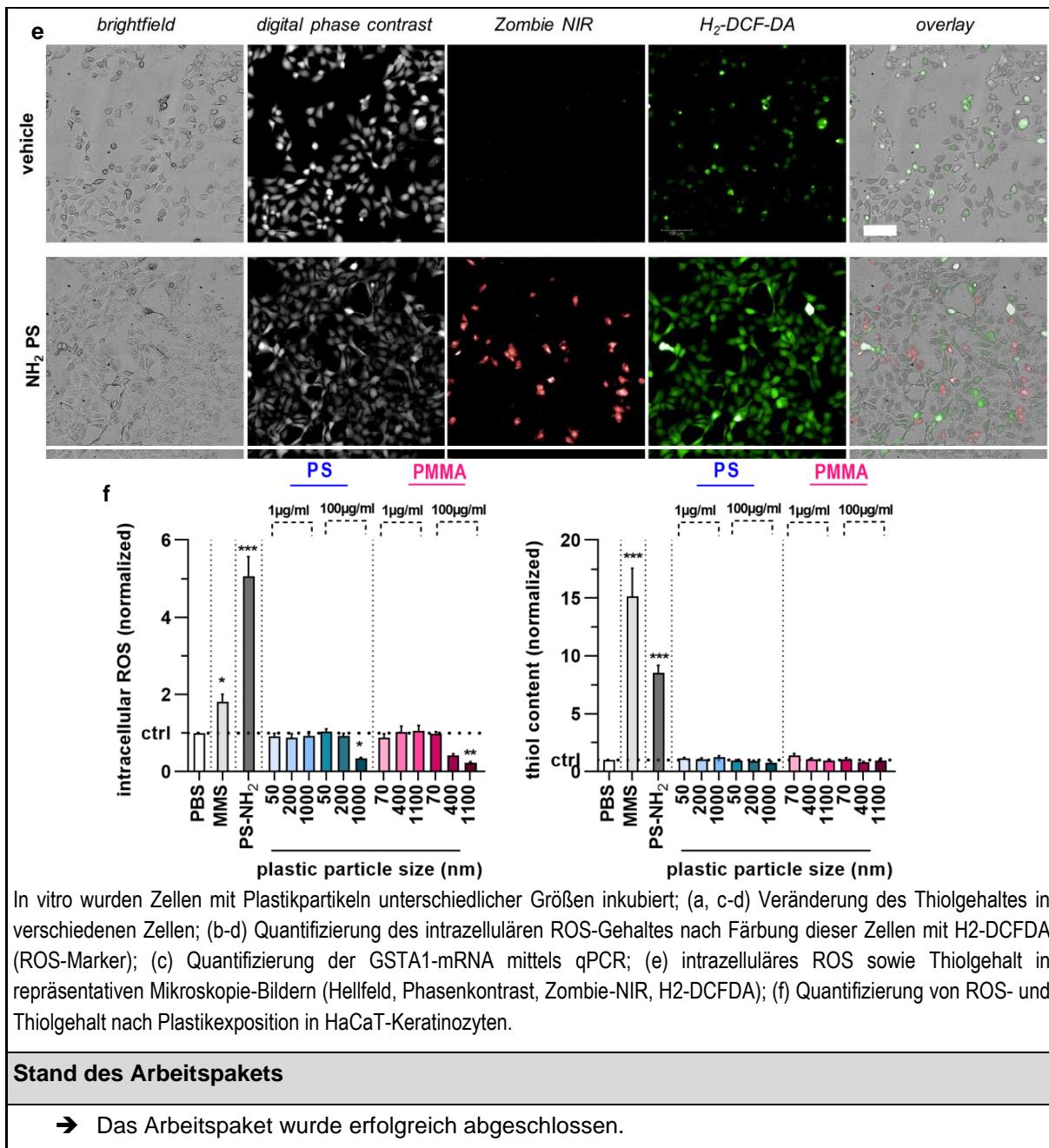


c) Intrazellulärer ROS-/Thiolgehalt in Hautzellen



d) Intrazellulärer ROS-/Thiolgehalt in Lungenzellen





2.1.4 Modifikation zellulärer Proteine

Aufgabenstellung

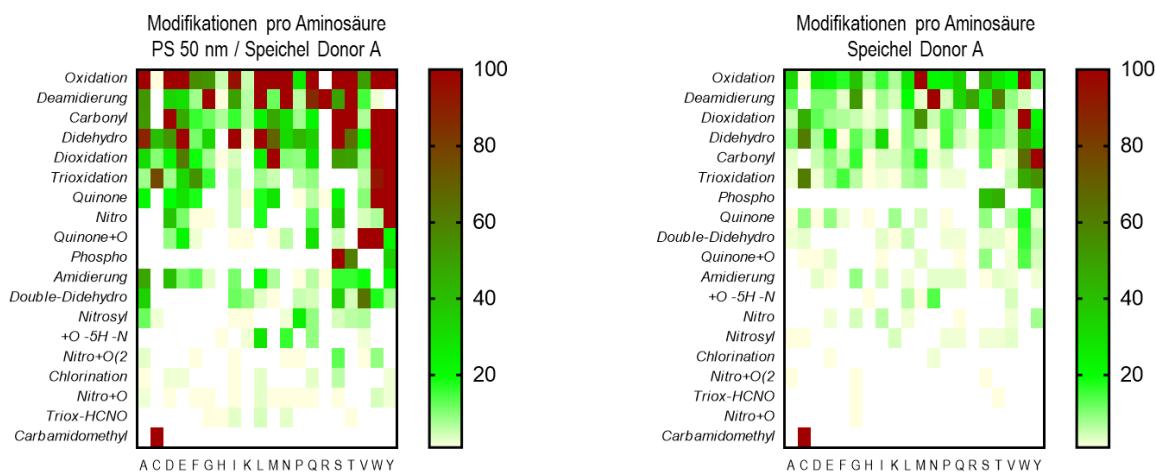
- Bestimmung von Modifikationen an zellulären Proteinen nach Plastikexposition, die durch reaktive Sauerstoffradikale vermittelt werden

Ergebnisse

- Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Rückgewinnung der Nanopartikel als Zellen wurde abweichend statt mit humanen Zelllinien mit humanem Speichel als Proteinquelle gearbeitet, die auch bei der Ingestion von Partikeln den Erstkontakt darstellt (Bachelorarbeit F. Förtschner); siehe auch AP 2.3.3
- In Abhängigkeit von der Größe der Partikel werden zusätzliche Modifikationen in den

- adsorbierten Proteinen eingebracht (je kleiner desto intensiver)
- Die Oberflächenchemie der Partikel spielt nur eine untergeordnete Rolle bei der Initialisierung der Oxidation, aber beeinflusst die Komposition der adhärierten Proteine

Abbildungen



Speichel von verschiedenen Spendern wurde gesammelt und vorbereitet, mit Polystyren-Partikeln unterschiedlicher Größe (50/1000nm) und Oberflächenchemie (pristine/Carboxy-Fkt./Amino-Fkt.) inkubiert. Anschliessend wurden die adsorbierten Proteine extrahiert und mittels nanoLC/HRMS analysiert (Proteinexpression + Vorhandensein von ox. Modifikationen). Dazu kamen die Software-Lösungen ProteinDiscoverer 2.4SP1 und PMI Bionic zum Einsatz.

Stand des Arbeitspakets

- Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.2.1 Auswirkung von Plastik auf T-Helferzellen

Aufgabenstellung

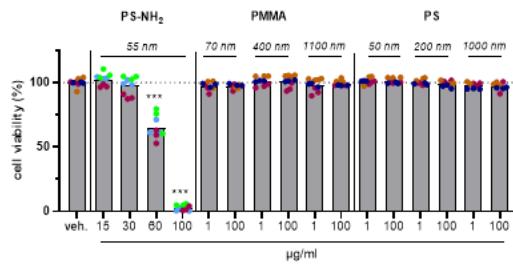
- Bestimmung der Wirkung von Plastik auf adaptive Immunzellen (T-Zellen)

Ergebnisse

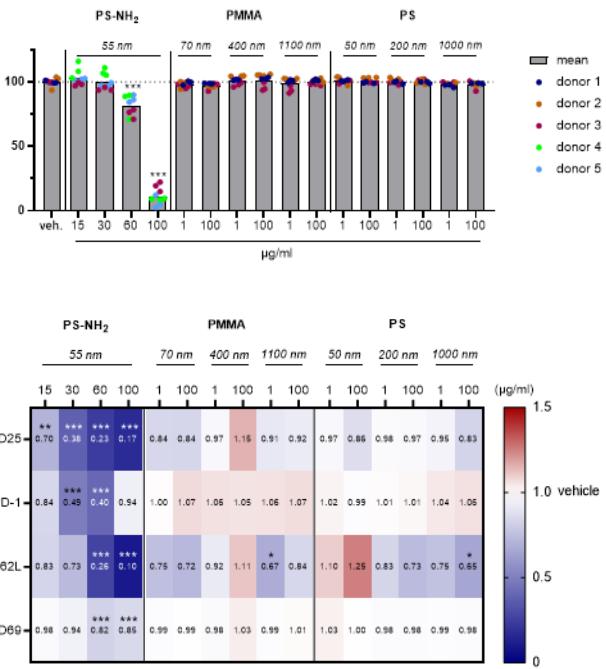
- Die Vitalität von T-Zellen wird nur unwesentlich durch Plastikpartikel-Exposition im Vergleich zur Positivkontrolle PS-NH₂ beeinflusst
- Das Expressionsprofil für ausgewählte immunphänotypische Oberflächenmarker ändert sich zum Teil für einzelne Analyten etwas deutlicher
- Die Aktivierbarkeit von T-Zellen bleibt trotz Inkubation mit Plastikpartikeln *in vitro* erhalten

Abbildungen

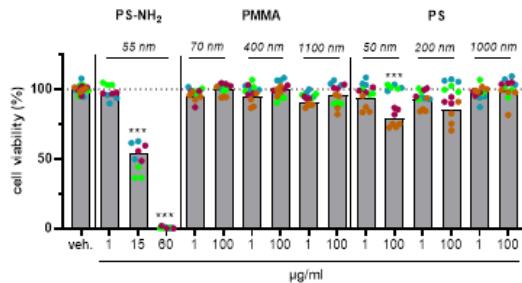
a) CD4⁺ T-Helferzellen



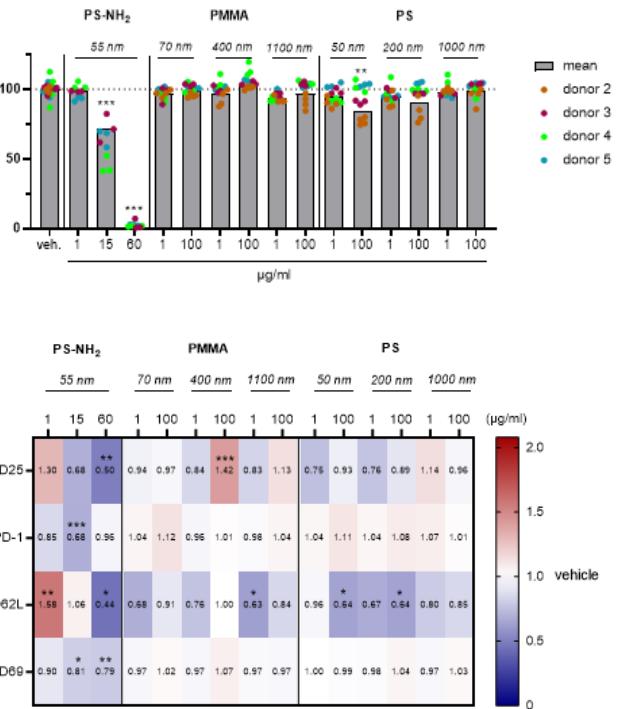
b) CD8⁺ zytotoxische T-Zellen



c) CD4⁺ T-Helferzellen



d) CD8⁺ zytotoxische T-Zellen



(a, c) Plastikeffekte in CD4-positiven T-Helferzellen sowie (b, d) zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen nach 24 h (a-b) und 72 h (c-d). Die korrespondierenden heatmaps zeigen das Expressionsprofil ausgewählter Oberflächenmarker nach der Exposition mit PMMA- und PS-Partikeln unterschiedlicher Größe.

Stand des Arbeitspakets

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.2.2 Auswirkung von Plastik auf neutrophile Granulozyten

Aufgabenstellung

- Bestimmung der Wirkung von Plastik auf neutrophile Granulozyten

Ergebnisse

- keine

Abbildungen

-

Stand des Arbeitspakets

→ Dieser Zelltyp konnte nur im Rahmen von Kooperationen am Standort Greifswald gewonnen werden. Pandemie-bedingt war ein regelmäßiger Austausch und Kooperation jedoch nicht möglich, sodass das AP aufgrund fehlender Zellen nicht bearbeitet werden konnte. Arbeitszeit und Ressourcen von 2.2.2 wurden anteilig in die APs 2.2.1 und 2.2.3 sowie 2.2.4 gelegt, um eine tiefer-gehende Immunzellanalyse der Subtypen „Lymphozyten“ und „myeloide Zellen“ zu ermöglichen.

2.2.3 Auswirkung von Plastik auf Makrophagen

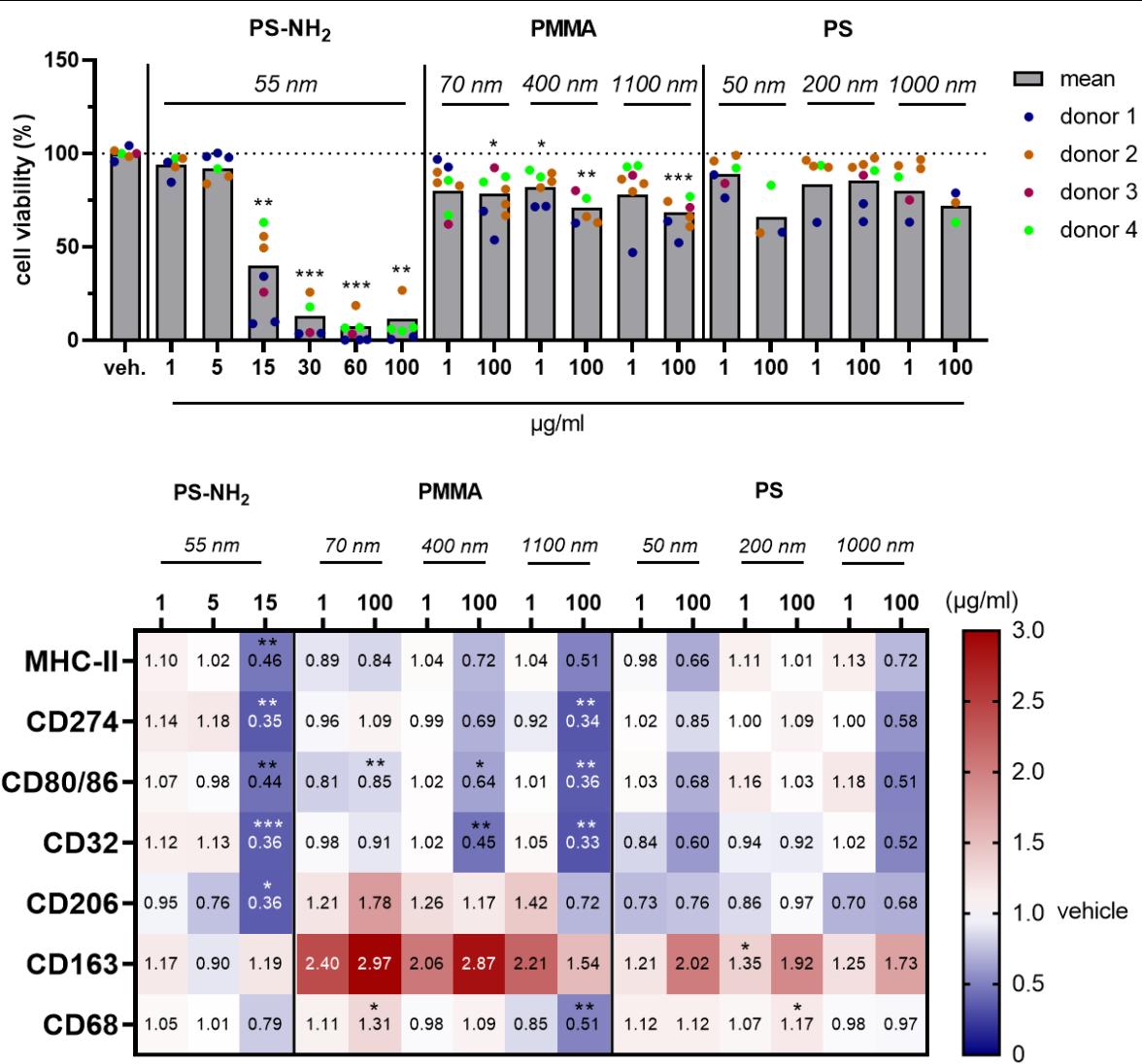
Aufgabenstellung

- Bestimmung der Wirkung von Plastik auf Makrophagen

Ergebnisse

- Makrophagen zeigten bei PMMA- und PS-Partikeln in höheren Konzentrationen (100 µg/mL) z.T. eine signifikante Verringerung der Zellvitalität, also nachweisbare toxische Effekte *in vitro*
- Die Oberflächenmarkeranalysen immunphänotypischer CD-Marker (siehe Heatmaps) zeigten insgesamt moderate, aber in Abhängigkeit der Zellen, spezifische Effekte
- Die Analysen zeigten außerdem eine Wirkung auf die M1/M2-Polarisation, einhergehend mit einer Verringerung der M1-Markerexpression (CD32, CD80/86); M2-Marker (CD163, CD206) korrelieren mit der Überlebensrate der Zellen

Abbildungen



Verringerte Makrophagen-Vitalität nach Exposition mit Plastikpartikeln verschiedener Größen, Arten (PMMA, PS), und Konzentrationen bei höheren Konzentrationen. In der heatmap ist die M1/M2-Expression ausgewählter CD-Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie bestimmt worden.

Stand des Arbeitspaket

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.2.4 Auswirkung von Plastik auf dendritische Zellen

Aufgabenstellung

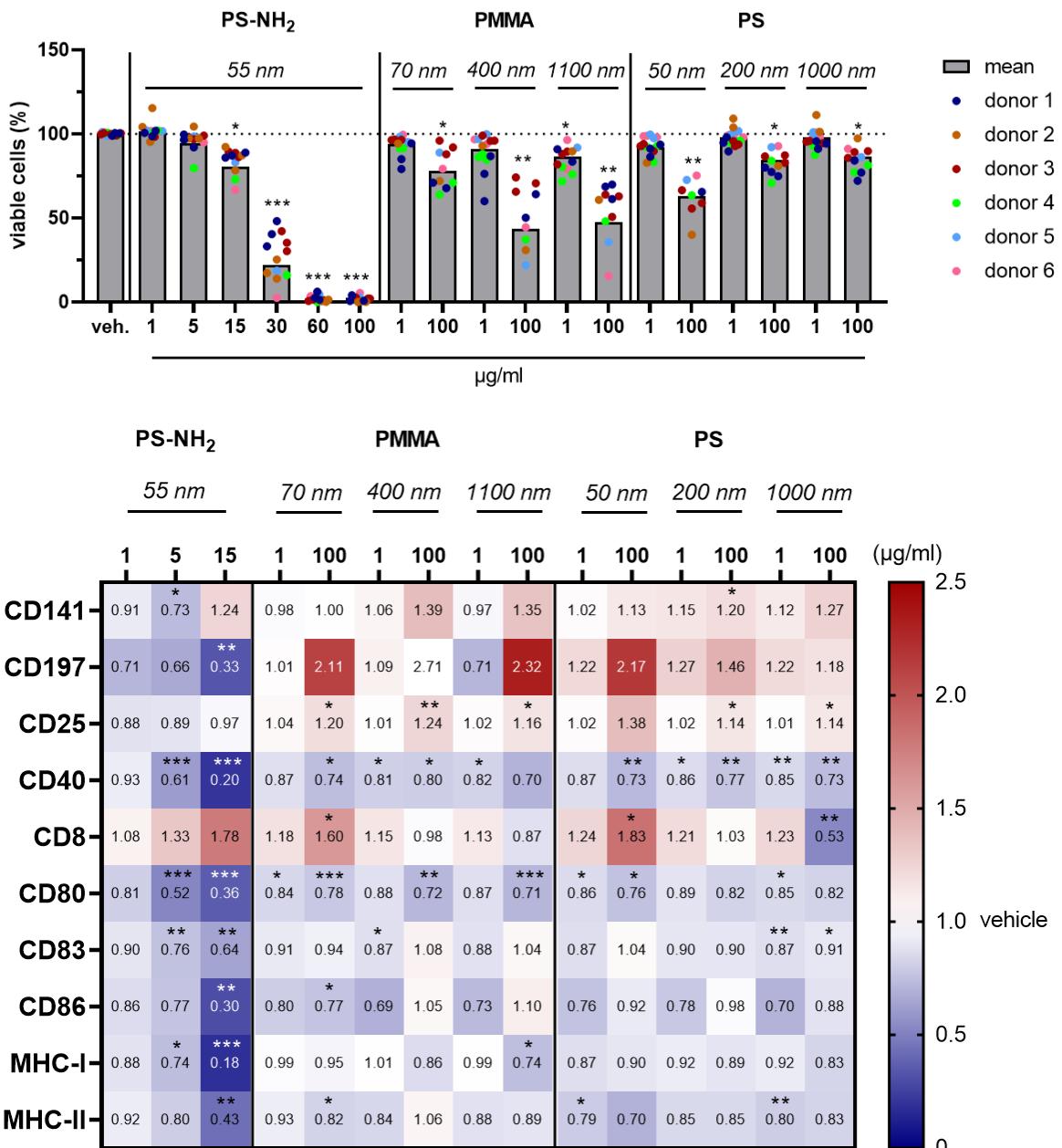
- Bestimmung der Wirkung von Plastik auf dendritische Zellen (DCs)

Ergebnisse

- Die Zellvitalität nach Plastikpartikel-Exposition in dendritischen Zellen verringerte sich bei höheren Konzentrationen, was auf toxische Effekte auf DC hinweist
- Das Oberflächenmarkerprofil zeigte moderate Veränderungen, wobei einzelne Marker wie

CD25, CD40 und CD80 stark mit einer Veränderung der Zellvitalität korrelieren

Abbildungen



Die Wirkung verschiedener Plastikpartikel (PMMA, PS) verschiedener Konzentrationen und Größen zeigen eine Verringerung der Zellvitalität, insbesondere für PMMA-Partikel. DCs zeigten ein spezifisches Expressionsprofil, insbesondere waren die Marker CD25, CD40, und CD80 verringert. Die Effekte sind Größenabhängig, größere PMMA-Partikel haben größere Effekte als kleinere PS-Partikel.

Stand des Arbeitspaketes

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.3.1 Langzeit *in vitro*-Modelle

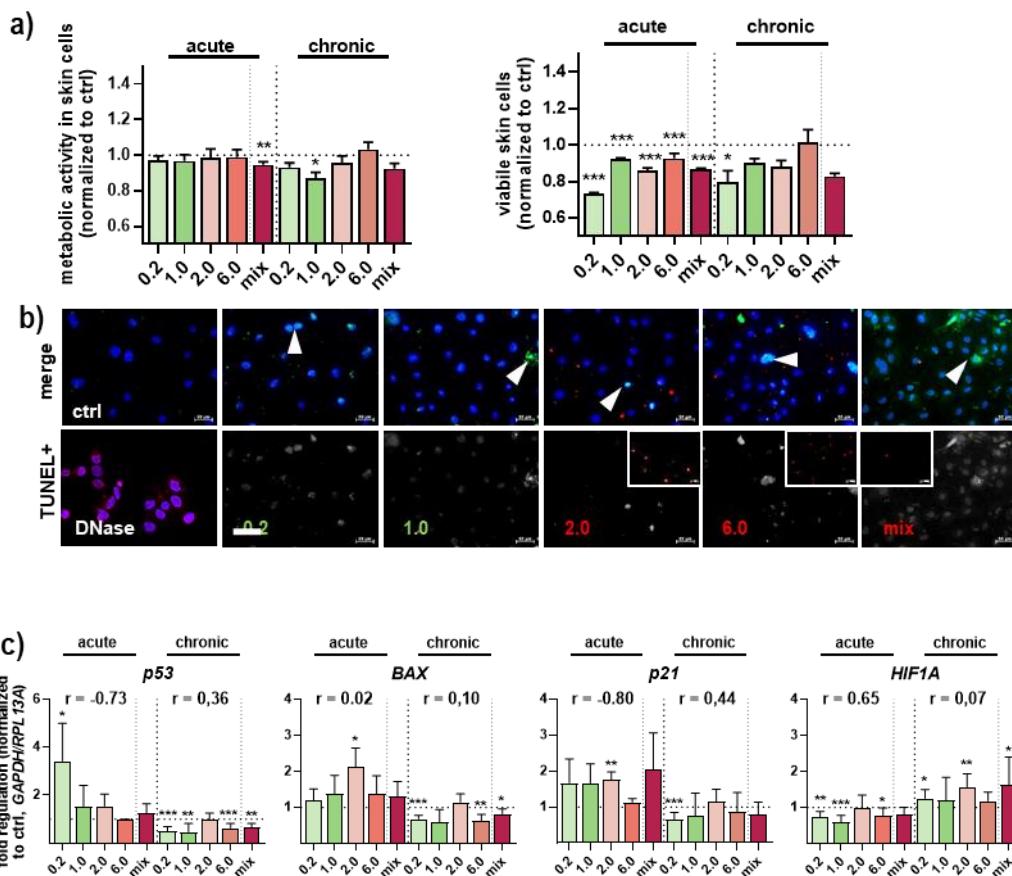
Aufgabenstellung

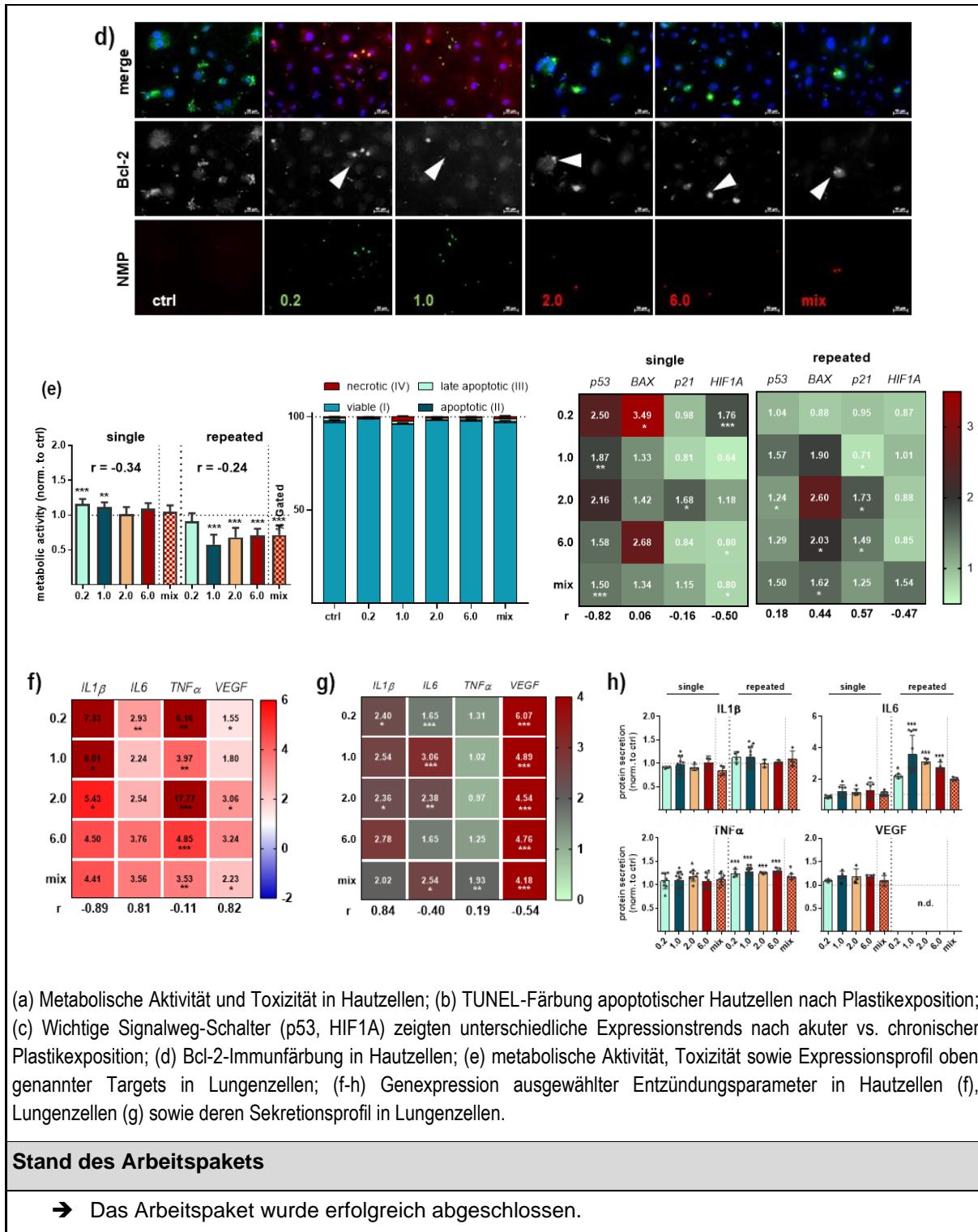
- Dauerkultur der Plastikwirkung auf Zellen *in vitro*

Ergebnisse

- Primär isolierte Zellen aus ausgewählten Geweben (Haut) und Organen (Lunge) sowie Zelllinien (HaCaT) wurden über mind. 4 Wochen *in vitro* mit PS- bzw. PMMA-Partikeln unterschiedlicher Größen wiederholt behandelt
- Die chronische Plastikexposition hat unterschiedliche Effekte auf die Zellvitalität, den Zellmetabolismus im Vergleich zur akuten (einmaligen) Plastikexposition und weist auf zum Teil toxische Effekte hin (a, e)
- Apoptotische Signalwege (p53) sowie deren down-stream Targets (BAX) oder der Hypoxie-induzierte Faktor 1A (HIF) wurden unter Plastikexposition reguliert (b-e)
- Auffallend sind spezifische Sekretionsprofile pro- und antiinflammatorischer Mediatoren in Abhängigkeit der Inkubationsdauer als auch Zellart

Abbildungen





2.3.2 Transkriptom und Protein-Phosphorylierung

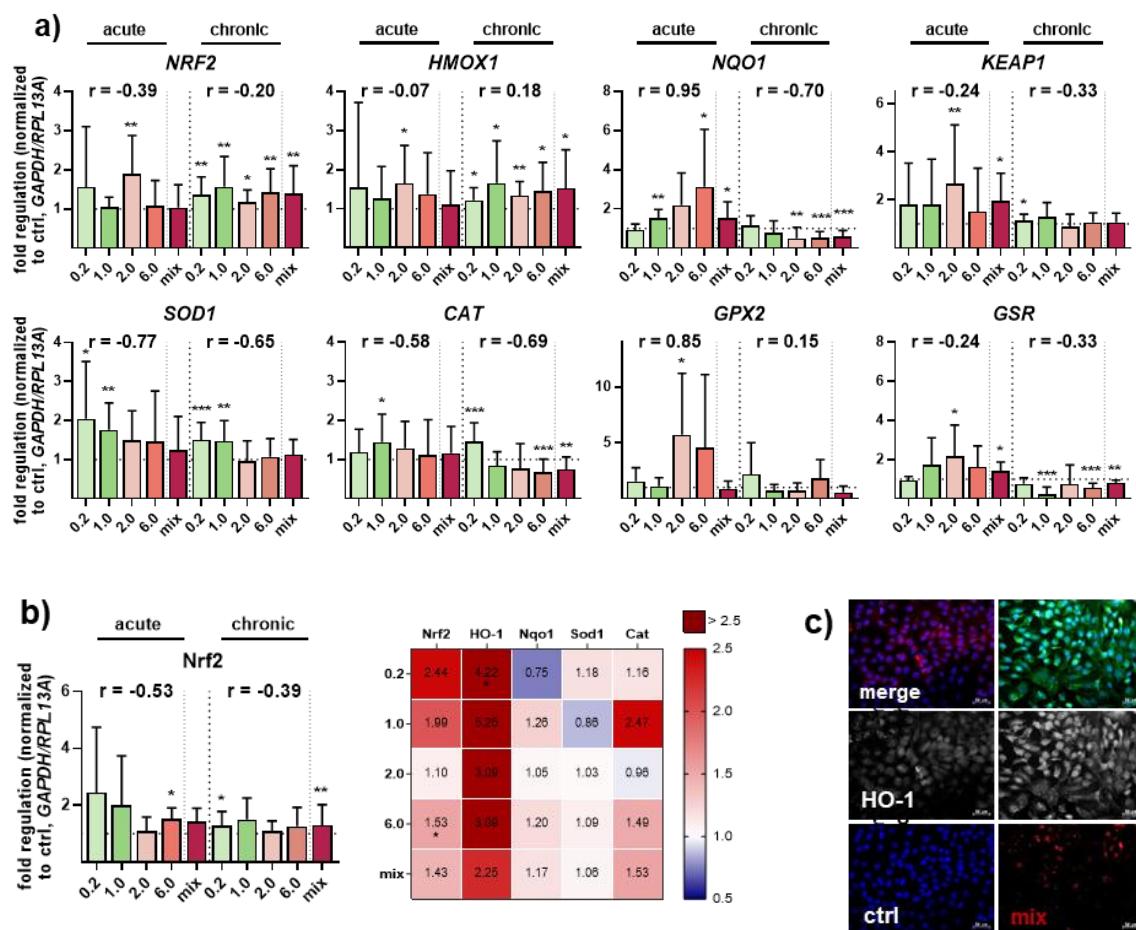
Aufgabenstellung

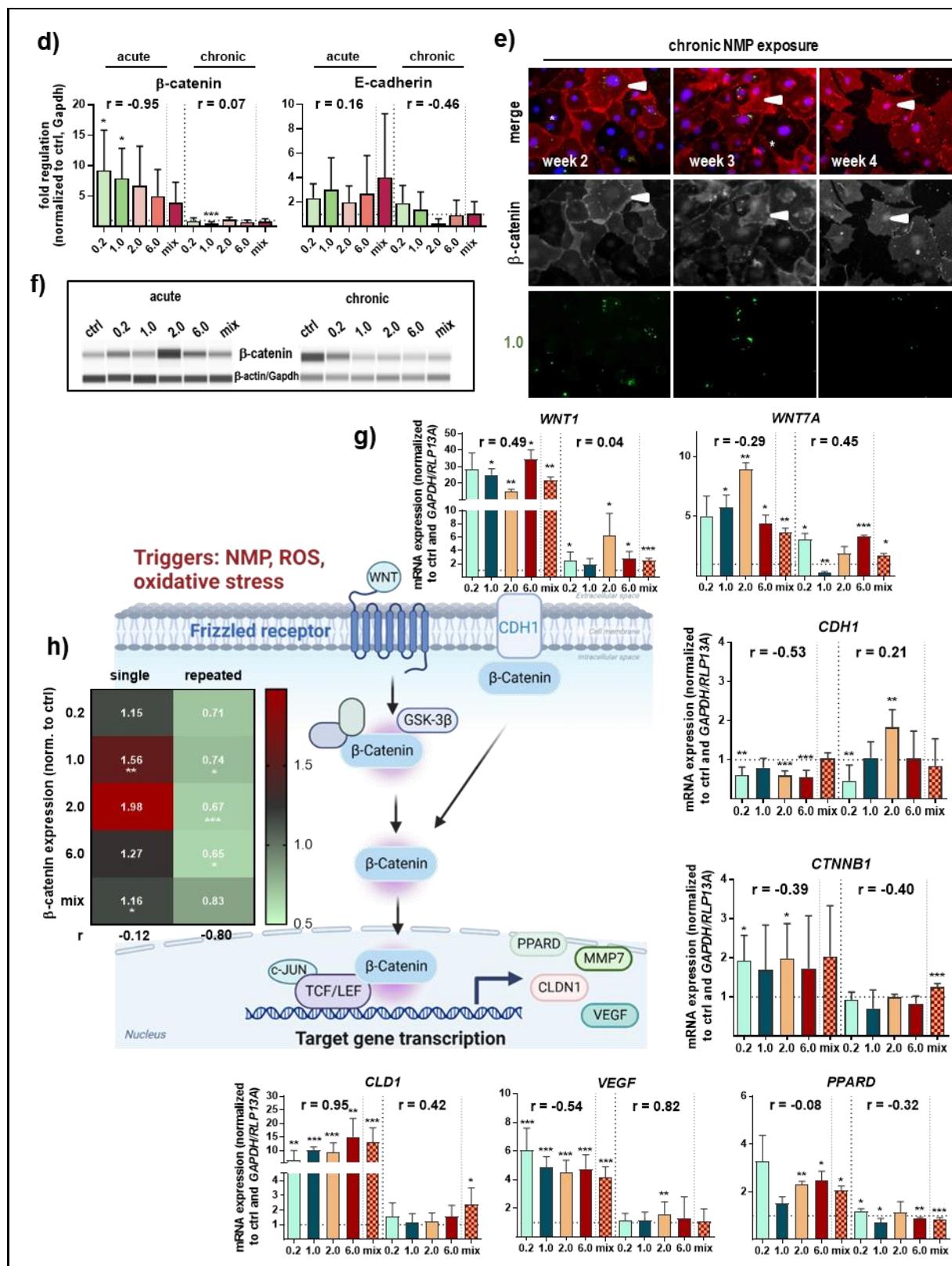
- Untersuchung des globalen Genexpressionsprofils und Analyse von Kinase-Phosphorylierungsmustern nach Plastikexposition *in vitro*

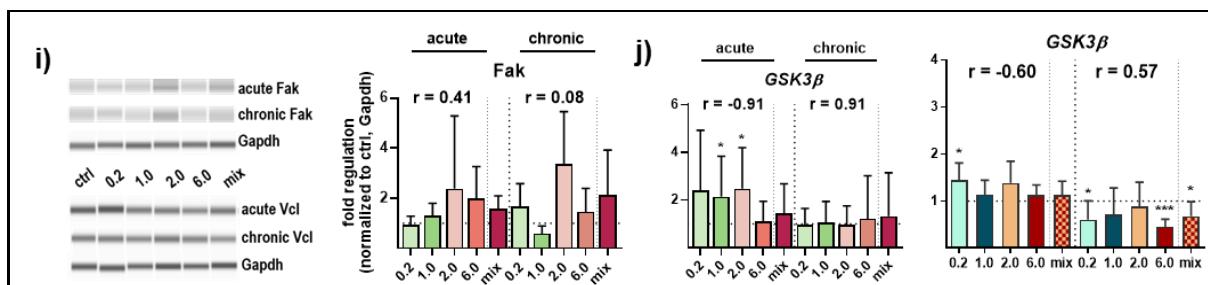
Ergebnisse

- Vielfältige Signaltransduktionswege (Nrf2, p53, Wnt etc.) wurden auf mRNA-Ebene untersucht
- Signalwege zur Regulierung oxidativer Stresssituationen (Nrf2) waren in der Zellantwort involviert und regulierten transkriptionelle Zielgene (HMOX1, SODs, CAT) (a)
- Auf Proteinebene wurde vor allem das Protein Hämoxigenase 1 (HO-1) deutlich verstärkt nach Plastikexposition translatiert (b-c)
- Kerntranslokalisierung von Proteinen wie β Catenin wurden identifiziert, diese weisen auf mögliche pathologische Entwicklungen hin (d-f)
- Die Bindung von β Catenin an Proteinkomplexe im Zellkern aktiviert deren Zielgene
- Membranrezeptoren werden durch Plastikpartikel gestresst und induzieren den kanonischen Wnt-Signalweg, der bei bestimmten Krebsformen angeschaltet ist (g-h)

Abbildungen







(a) Genexpressionsdaten zur Aktivierung Nrf2-Signalweg nach akuter und chronischer Plastikexposition in Hautzellen; (b) Proteinlevels ausgewählter Nrf2-Zielgene; (c) nukleare Translokation von HO-1; (d) differentielle Genexpression von β -Catenin und E-Cadherin; (e) Proteinexpressionsniveau von β -Catenin; (f) Translokierung von β -Catenin von der Zellgrenze in das Zytoplasma in den Zellkern hinein; (g) Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion nach einmaliger oder chronischer Plastikexposition in Lungenzellen; (h) Expressionslevel des β -Catenins; (i-j) Proteinexpressionsprofil der fokalen Adhäsionskinase Fak und der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3 β) in Haut- (i) und Lungenzellen (j) im Vergleich von akuter und chronischer Exposition.

Stand des Arbeitspakets

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen. Aufgrund von Pandemie-bedingten Lieferschwierigen waren keine Verbrauchsmittel erhältlich, mit denen wir globale Transkriptionsprofile mit unserem Labor-Analyse-System erstellen konnten. Wir haben stattdessen Transkriptionsprofile mit Hilfe von breit angelegten RNA-Untersuchungen (PCR) durchgeführt und diese mit Proteinphosphorylierungsstudien verschiedenster Kinasen (wie bspw. hier FAK und GSK3 β) ergänzt. Dadurch konnte das ursprüngliche Ziel, die Signalwege der akuten und chronischen Plastikexposition in Zellen aufzuklären, erreicht werden, nur auf einem anderen als dem ursprünglich beantragten Weg.

2.3.3

Aufgabenstellung

- Identifikation der intrazellulären Proteine, welche nach Partikelaufnahme in Zellen an die Plastik binden

Ergebnisse

- Es wurden verschiedene Protokolle getestet, um die Partikel selektiv aus Zellen heraus zu bekommen
- Magnetische Partikel hatten einen hinreichenden Erfolg, allerdings war die erzielte Proteinmenge zu gering
- Protokoll-Iterationen wurden getestet, Massenspektrometrisch gemessen und ausgewertet, jedoch konnten methodische Schwächen in der Erhebung eindeutiger Daten und finaler Ergebnisse in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht gelöst werden

Abbildungen

-

Stand des Arbeitspakets

→ Das Arbeitspaket wurde abgeschlossen. Allerdings gelang es trotz der Erprobung verschiedener Laborprotokolle nicht, ein Arbeitsschema zu etablieren, in dem ausschließlich Plastikpartikel aus Zellen isoliert werden konnten, welche dazu genutzt werden sollten, die

Proteine an diesen Partikeln mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Kontroll-Experimente zeigten stets eine hohe Abundanz von Hintergrundproteinen aus Zellen an, sodass die Messungen durchgeführt werden konnten, jedoch nicht zu eindeutigen finalen Ergebnissen geführt haben.

2.3.4

Aufgabenstellung

- Erstellung von Proteinexpressionsprofilen und Kreuzvalidierung der Genexpressionsprofile

Ergebnisse

- Aufgrund der starken Belastung der Proben mit zellulären Proteinen ohne Bindung an die Partikel (siehe 2.3.3) konnte bislang kein belastbarer Vergleich gezogen werden
- Protokoll-Iterationen wurden getestet, Massenspektrometrisch gemessen und ausgewertet, jedoch konnten methodische Schwächen in der Erhebung eindeutiger Daten und finaler Ergebnisse in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht gelöst werden

Abbildungen

Finale Ergebnisse befinden sich noch in der Entstehung.

Stand des Arbeitspaket

➔ Das Arbeitspaket wurde abgeschlossen. Allerdings gelang es trotz der Erprobung verschiedener Laborprotokolle nicht, belastbare Ergebnisse zu erzielen. Kontroll-Experimente zeigten stets eine hohe Abundanz von Hintergrundproteinen aus Zellen an, sodass die Messungen durchgeführt werden konnten, jedoch nicht zu eindeutigen finalen Ergebnissen geführt haben.

2.3.5

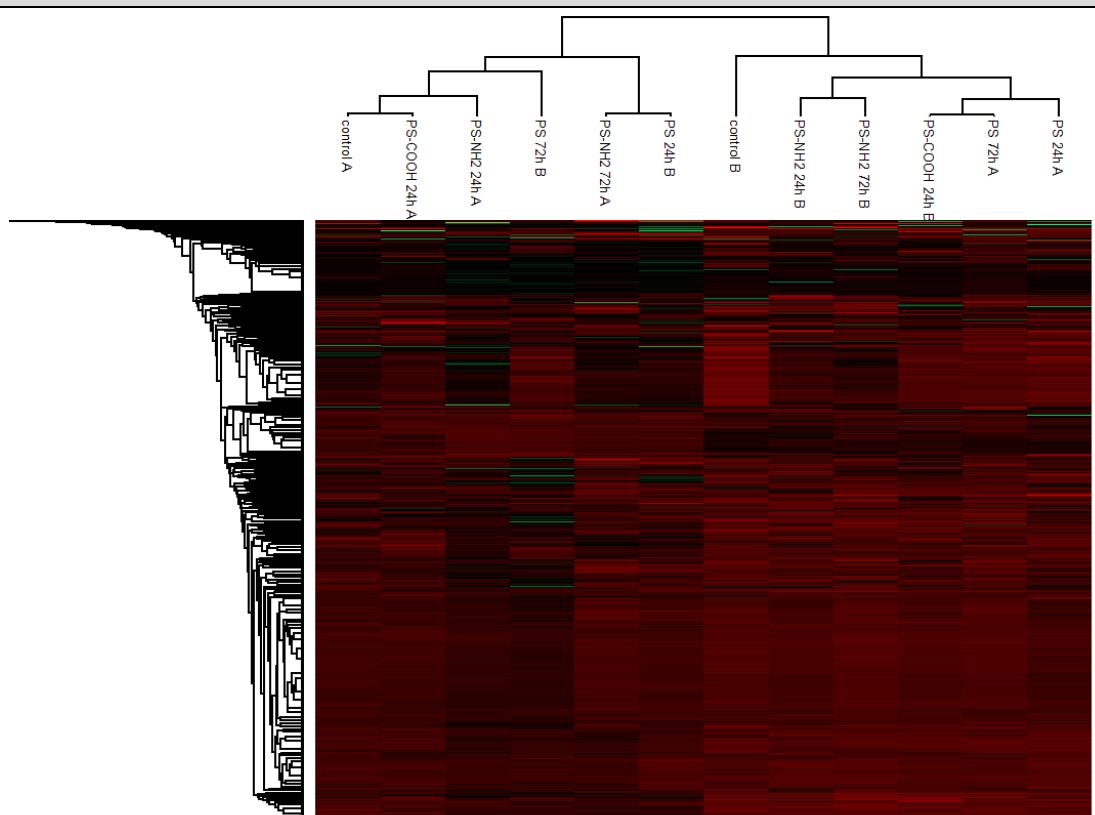
Aufgabenstellung

- Erstellung von Lipidexpressionsprofilen humaner Zellen nach Exposition mit Plastik-partikeln

Ergebnisse

- Unterschiedliche Methoden für die Lipidextraktion wurden getestet, dabei stellte sich eine modifizierte Methyl-tert-butyl ether (MTBE)/Methanol-Extraktion als am besten geeignet heraus
- Zwei Verfahren zur flüssigchromatographischen Trennung der Lipidgemische wurden erprobt (Hydrophilic interaction chromatography – HiLIC; reversed phase C18/C30), dabei wurden die besten Resultate mit der HiLIC-Variante erzielt
- Die Choreographie der beider Laborprotokolle wurden etabliert und erfolgreich getestet
- Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Lipidprofilen von A549-Zellen durch Inkubation für 24/72h mit 50 oder 1000 nm Polystyren-Nanopartikeln (pristine/amino/carboxy-funktionalisiert) gefunden

Abbildungen



Das Lipid-Expressionsprofil humaner A549-Zellen nach Inkubation mit 50nm Polystyren-Nanopartikeln zeigt keine Abhängigkeiten vom Material oder Inkubationszeit; mittels ANOVA wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede für einzelne Komponenten gefunden (Software Perseus 2.0.6)

Stand des Arbeitspakets

- Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.4.1 Gentoxizität *in vitro*

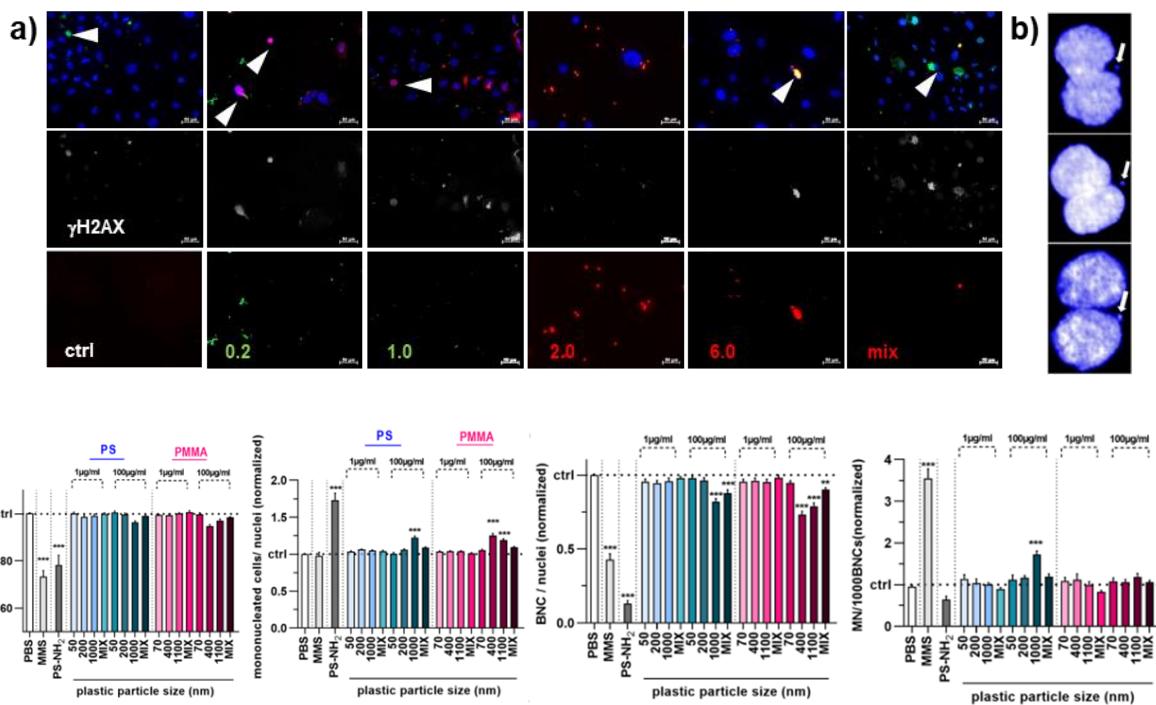
Aufgabenstellung

- Bestimmung der Genotoxizität von Plastik *in vitro*

Ergebnisse

- Inkubation verschiedener Zellmodelle mit ausgewählten Plastikpartikeln zur Untersuchung von DNA-Schäden; Bsp. γ H2AX in Hautzellen (a)
- Etablierung eines innovativen erweiterten *High-Content-Imaging* Verfahrens zur Durchführung des OECD-akkreditierten Zytokinese-Block- Mikronukleus-Test-Protokolls *in vitro* (b), welches als erstes weltweit in HaCaT Keratinozyten angewendet werden kann
- Das Testsystem wurde gegen die genotoxische Chemikalie Methylmethansulfonat, (MMS), die DNA-Schäden induziert, validiert
- Die automatisierte Auswertung mittels *high-content imaging* und Algorithmus-getriebener quantitativer Bildanalysen zeigte vereinzelt genotoxische Effekte *in vitro*, vor allem nach hochkonzentrierter Plastikgabe (c)

Abbildungen



(a) Darstellung der γ H2AX-Färbung in Hautzellen nach Inkubation mit Plastikpartikeln verschiedener Größen; (b) Darstellung von Fluoreszenzmikroskopischen Bildern von Mikrokernen (MNCs) in Relation zu bi-nukleären (BNCs) Kernen in repräsentativen Bildern; (c) CBPI, MNCs, BNCs und Frequenz genotoxischer Effekte in humanen Zellen.

Stand des Arbeitspakets

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.4.2 Hühnereimodell

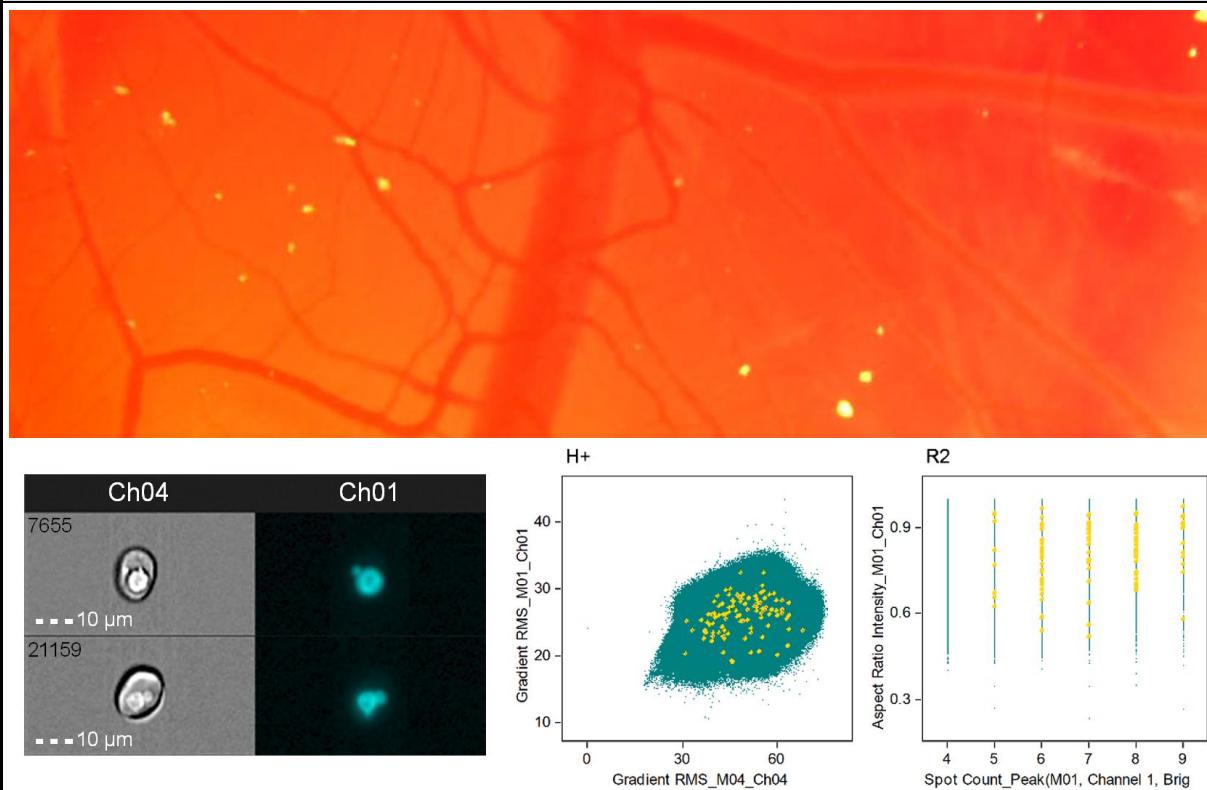
Aufgabenstellung

- Translation der Genotoxizitätsanalysen auf ein Wirbeltiermodell

Ergebnisse

- Die Etablierung des Models in bebrüteten Hühnerembryonen war sehr aufwendig, da sie weltweit noch nicht gelang oder publiziert wurde; finale Ergebnisse wurden nicht erzielt
- Es konnten eine Reihe von Etablierungsversuchen durchgeführt werden, in welchen verschiedene Hürden, bspw. die Applikation der Plastikpartikel, die Blutentnahme und unterschiedliche Färbemethoden erfolgreich getestet werden konnten
- Finale Ergebnisse konnten aufgrund von der sehr komplexen Analytik am Image-Zytometer Mark II nicht erzielt werden, da eine Reihe von Segmentationsalgorithmen trotz vielfacher Iteration nicht die gewünschten, reproduzierbaren Ergebnisse erzielten

Abbildung



Inkubation (leuchtende Punkte von Aggregaten Fluoreszenz-markierter Polystyrol-Partikeln) von Plastikpartikel auf der Chorio-Allantois-Membran (CAM) von bebrüteten Hühnerembryonen (oben). Nach Beendigung des Experiments wurde Blut entnommen und die Erythrozyten wurden mittels eines Nukleinfarbstoffs Fluoreszenz-markiert. Die Blutzellen wurden mittels Image-Zytometrie akquiriert (unten links: Hellfeld, links; DNA-Fluoreszenz, rechts), und vereinzelt konnten Mikrokerne in den Zellen identifiziert werden (unten rechts), welche jedoch nur einen sehr kleinen Anteil der Gesamtzellen darstellten (unten mitte).

Stand des Arbeitspaket

→ Das Arbeitspaket wurde abgeschlossen. Finale Ergebnisse konnten nicht erzielt werden. Insgesamt konnte die Methode nicht zufriedenstellend und damit final etabliert werden, was vor allem an der erschwerten Segmentation der Mikrokerne lag.

2.4.3 Mausmodell

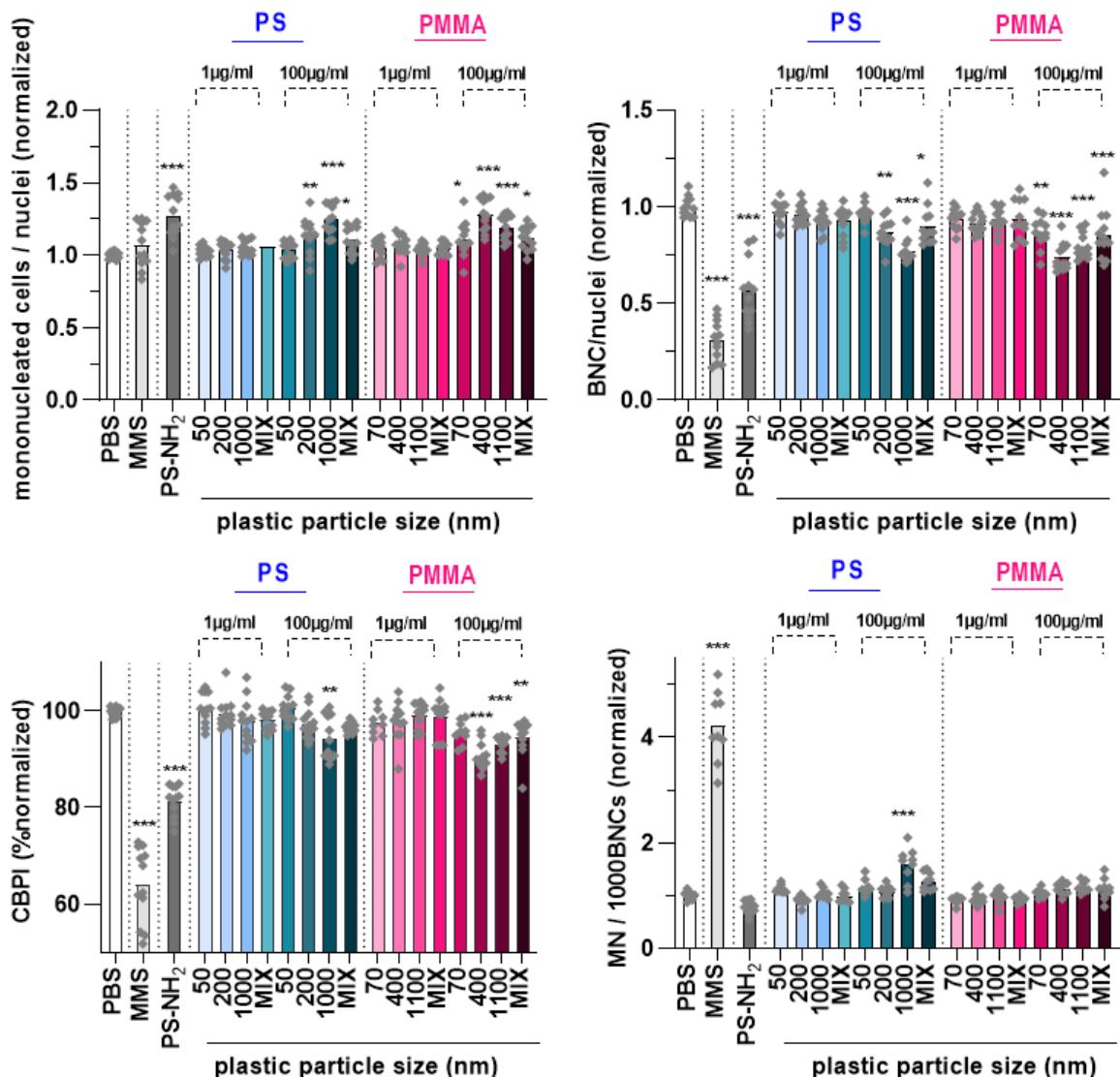
Aufgabenstellung

- Bestimmung der Mikronuklei-Frequenz in murinen Lymphozyten zur Bestimmung der Genotoxizität nach Plastikgabe

Ergebnisse

- Umfangreiche Tierversuche konnten wie in den Zwischenberichten dargelegt aufgrund der Einschränkungen in der Corona-Pandemie nicht durchgeführt werden

Abbildungen



Verschiedene Parameter des Mikrokern-Tests, welcher nach Maßgaben der OECD durchgeführt wurde und automatisiert verschiedene Metriken erfasste, bspw. die Einzelkern-Zellen (oben links), die Zweikern-Zellen (oben rechts), die Teilungsrate (unten rechts) und die Anzahl der Mikrokern-haltigen Zellen an allen Zweikern-Zellen (mindestens 1000 gezählte Zweikern-Zellen pro Kondition).

Stand des Arbeitspakets

- Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen. Dies erfolgte jedoch auf einem anderen Weg, als ursprünglich geplant. Da aus oben genannten Gründen die in diesem Arbeitspaket geplanten Tierversuche nicht durchgeführt werden konnten, wurden stattdessen die in vitro Genotoxizitätsversuche (2.4.1) deutlich umfangreicher und erfolgreich durchgeführt. Zu den dadurch erzielten Genotoxizitätsergebnissen zählen die Etablierung eines völlig neuen, quantitativen Ansatzes von Genotoxizitätsanalysen in humanen Keratinozyten, welche ausgiebig für 12 verschiedene Plastikarten getestet wurden. Des Weiteren wurden in diesem neuen System nicht nur eine Einmal-Plastik-Exposition mit HaCaT Keratinozyten durchgeführt, sondern auch eine Dauerbehandlung mit 12 unterschiedlichen Plastikarten über 4 Wochen. Dadurch wurden erstmalig Genotoxizitätsergebnisse zur Dauerbehandlung mit Plastikpartikeln in vitro erzielt. Die Ergebnisse wurden veröffentlicht (DOI: 10.3390/nano12244463).

2.5.1 Hühnerei-Modell

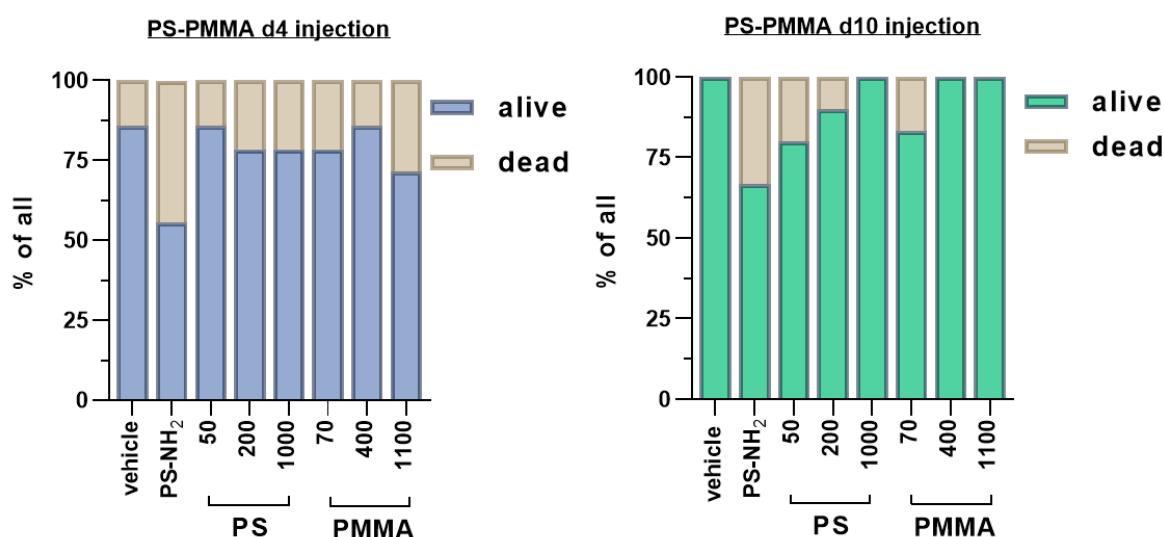
Aufgabenstellung

- Bestimmung der Wirkung unterschiedlicher Plastikkonzentrationen *in ovo*

Ergebnisse

- PS- und PMMA-Partikel wurden in drei verschiedenen Konzentrationen in das Chorion von bebrüteten Hühnerembryonen verabreicht
- Toxische Effekte wurden neben der Positivkontrolle (PS-NH₂) vor allem bei kleineren PS-Partikeln (50, 200 nm) sowie bei den 70 nm-großen PMMA-Partikeln identifiziert
- Die Effekte waren bei jungen Embryonen (4. Tag nach Bebrütung) stärker, als bei älteren Embryonen (10. Tag nach Bebrütung)

Grafik



Letale Wirkung von injizierten PS- oder PMMA-Plastikpartikeln in bebrüteten Hühnerembryonen vier Tage nach Gabe (links) oder 10 Tage nach Gabe (rechts); SM837 ist eine Positiv-Kontrolle.

Stand des Arbeitspaket

- Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.5.2 Mausmodell

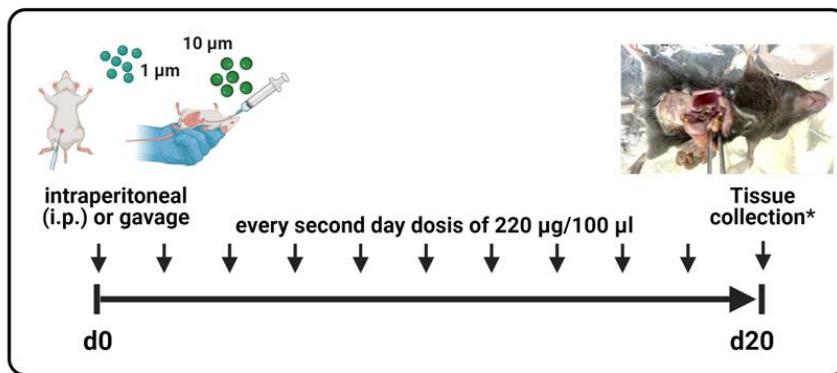
Aufgabenstellung

- Bestimmung der akuten Wirkung von Plastik im Mausmodell

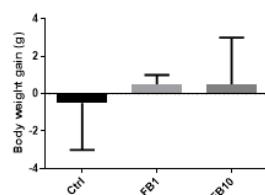
Ergebnisse

- Die Arbeiten wurden 2021 unter Pandemie-Bedingungen begonnen und ein Pilot-Versuch konnte unter großem Aufwand abgeschlossen werden
- Es konnte nur eine kleine Anzahl an Tieren einer Plastikexposition ausgesetzt werden, von denen ausgewählte Organe und Gewebe entnommen wurden

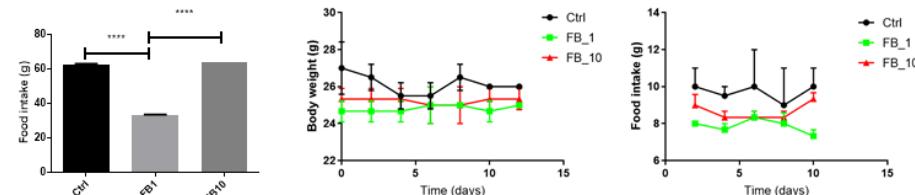
Abbildungen



a) i.p.



b) gavage



Das Schema zeigt die intraperitoneale Verabreichung von Plastikpartikeln (a) bzw. das Schlündern (b) mit PS-Plastikpartikeln zweier verschiedener Größen (1 und 10 µm) und die Effekte auf das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme von Mäusen.

Stand des Arbeitspakets

- Das Arbeitspaket wurde abgeschlossen. Die Arbeit war unter Pandemie-Bedingungen deutlich aufwendiger und wie in den Zwischenberichten erwähnt nur eingeschränkt (weniger Umfang der Versuche, bei höherem Aufwand) bzw. für andere Teilversuche (bspw. 2.5.3) gar nicht möglich.

2.5.3 Mausmodell

Aufgabenstellung

- Bestimmung der chronischen Wirkung von Plastik im Mausmodell

Ergebnisse

- Das Arbeitspaket war unter Pandemie-Bedingungen nicht durchführbar

Abbildungen

- -

Stand des Arbeitspakets

- Das Arbeitspaket konnte Aufgrund der Corona Pandemie nicht bearbeitet werden. Die Arbeitszeit wurde stattdessen in sehr umfangreiche Gen- und Proteinexpressionsanalysen nach Plastikexposition in Zellkulturen in vitro investiert (2.3.2.), wodurch ein erhöhter Erkenntnisgewinn erzielt wurde, der in zwei Veröffentlichungen mündete (DOI: 10.1186/s12989-023-00513-1 und 10.3390/antiox12020227).

2.5.4 Gewebeaufbereitung

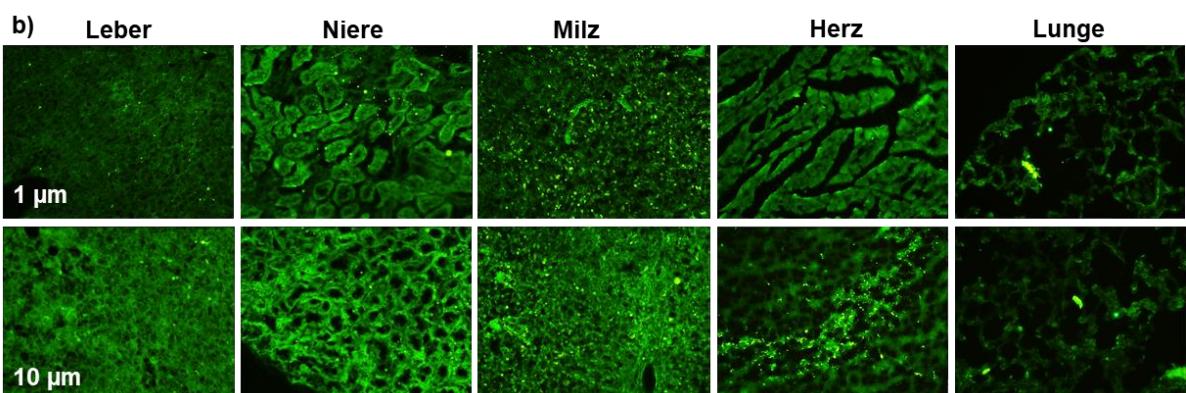
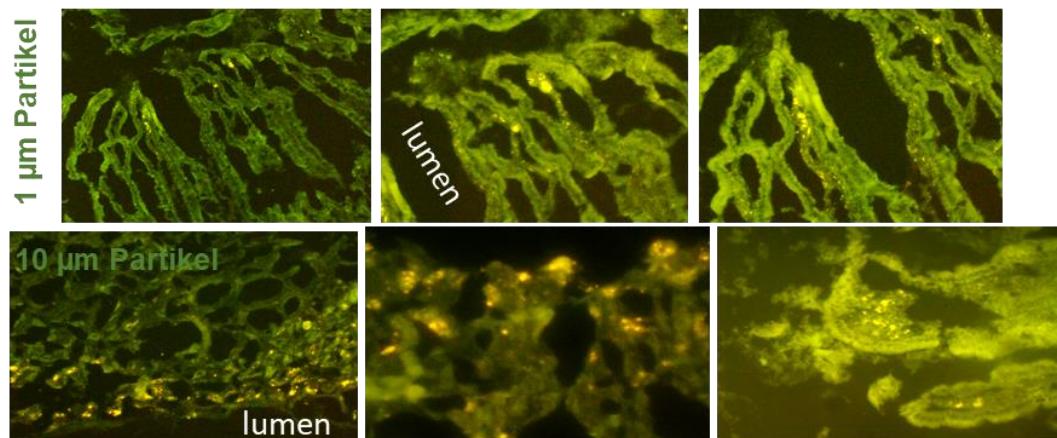
Aufgabenstellung

- Aufarbeitung der in den vorherigen Versuchen entnommenen Organe und Gewebe aus den Mausmodellen

Ergebnisse

- In diesem AP wurden mehrere Hundert Objektträger mit Ultradünnsschnitten von verschiedenen Mausgeweben und Organen angefertigt, um die Plastikpartikelexposition in diesen nachzuweisen
- Aufgrund des Wegfalls des AP 2.5.3 wurde noch tiefergehende Untersuchungen der Proben aus 2.5.2 durchgeführt

Abbildungen



(a) Verteilung der PS-Partikel im Dünndarm sowie (b) in anderen Organen wie Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge im Mausmodell.

Stand des Arbeitspakets

- ➔ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen.

2.5.5 Histologie und IHC

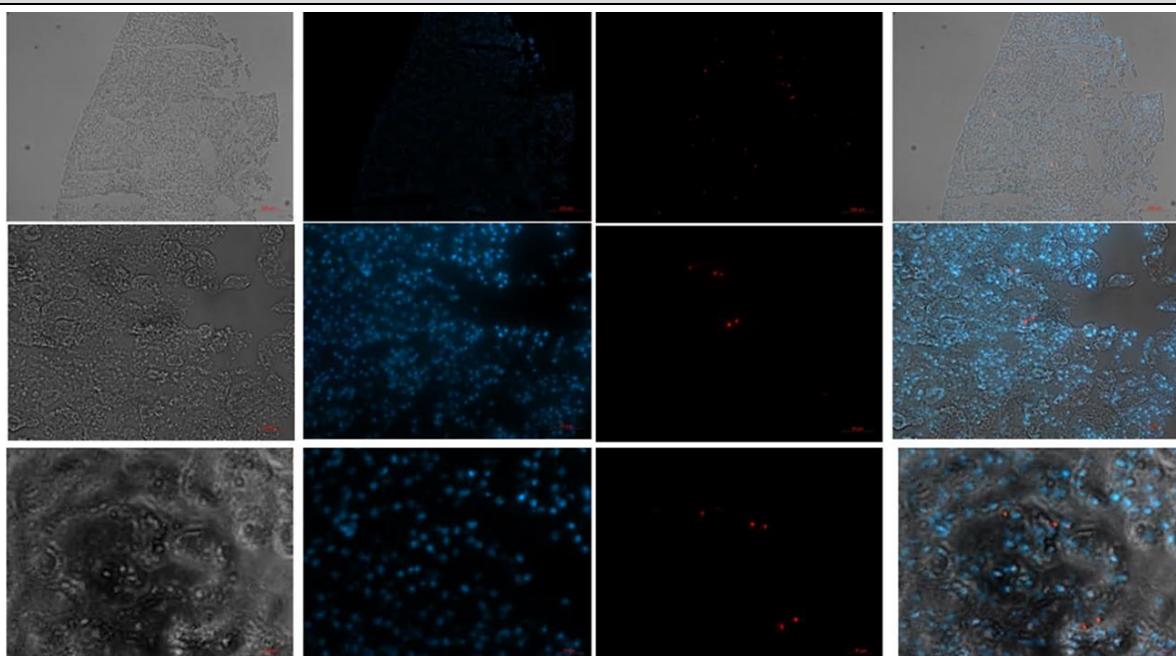
Aufgabenstellung

- Mikroskopische Analysen Zellveränderungen in den Gewebeschnitten aus den Mausmodellen

Ergebnisse

- Pandemie-bedingt konnten die Tierversuche in der Maus nicht durchgeführt werden
- Stattdessen wurden in verschiedenen Organen ex vivo Immunfluoreszenz-Analysen und Färbungen durchgeführt und analysiert
- Die Plastikpartikel reicherteten sich in verschiedenen Mausorganen (es wurden 6 verschiedene Organsysteme getestet) in unterschiedlichen Verteilungs-Intensitäten an
- In gut durchbluteten Organen (bspw. Niere, Leber) erschien die Verteilung von Plastikpartikeln im Gewebe weitreichend

Abbildungen



Nierengewebe-Fluoreszenzfärbung, exemplarisch für verschiedene Organ-Fluoreszenz-Gewebe-Analysen, die durchgeführt worden sind. Durchlicht-Bild (links), DAPI Fluoreszenz-Färbung (zweite von links), Fluoreszenzpartikelfärbung (zweite von rechts) und alle drei Bilder übereinandergelegt (rechts). Die Aufnahmen erfolgten bei geringer (oberste Reihe), mittlerer (mittlere Reihe) und hoher (untere Reihe) Vergrößerung. Man sieht gut einzelne rote Plastikpartikel in den Geweben, welche peri-nuklear (außerhalb des blauen Zellkerns) vorlagen.

Stand des Arbeitspaket

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen. Dies erfolgte auf einem anderen Weg, als ursprünglich geplant. Das Arbeitspaket wurde durch umfangreiche ex vivo-Plastikexpositionen von Geweben, bspw. Maus und bebrütete Hühnerembryonen isoliert worden sind, bearbeitet, deren Ultradünnsschnitte dann mittels verschiedener Färbungen u.a. auf Plastikpartikel-Distribution getestet worden sind.

2.5.6

Aufgabenstellung

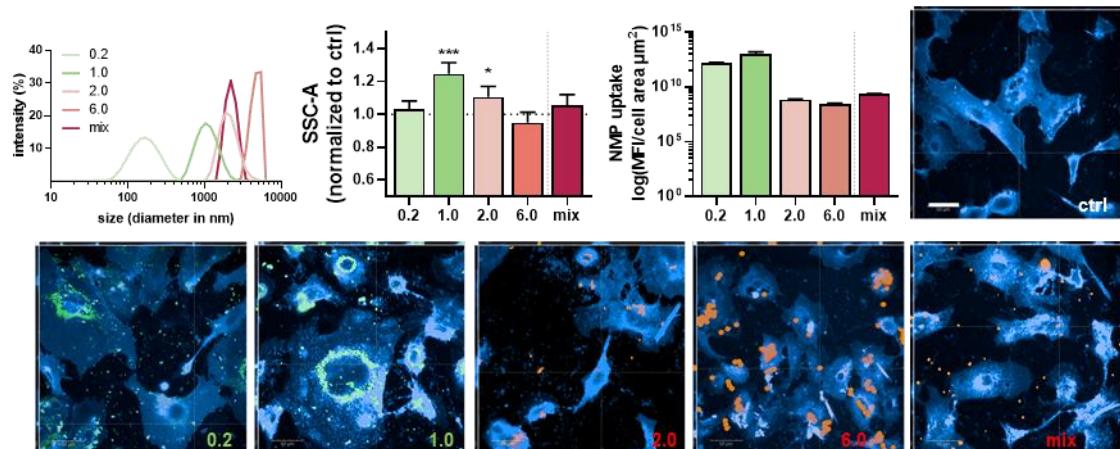
- Bestimmung der Gen- und Proteinexpression im Mausgewebe

Ergebnisse

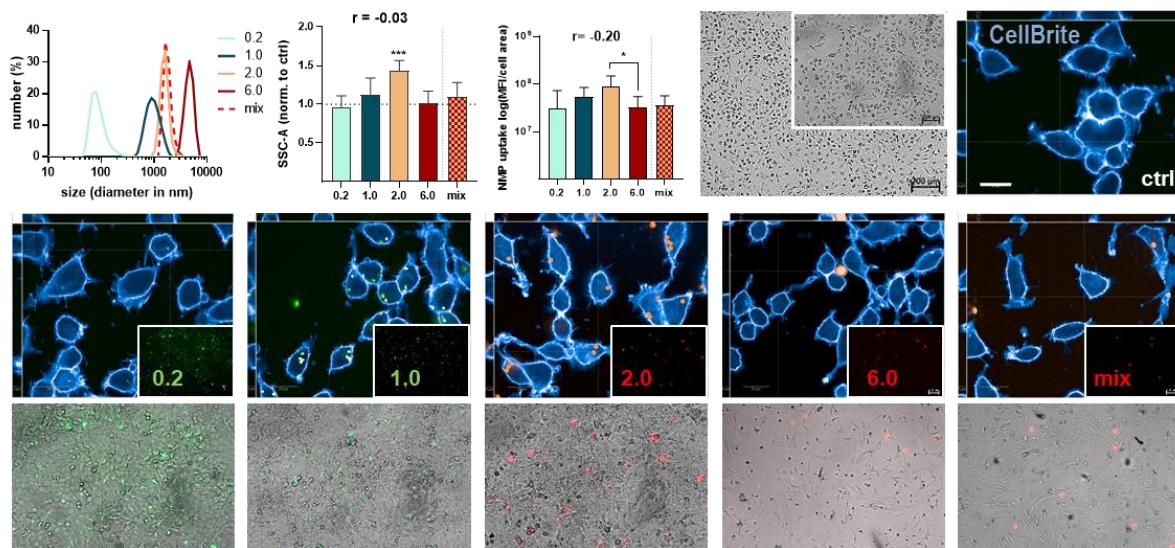
- Das Arbeitspaket wurde nicht durchgeführt, da keine ausreichend große Anzahl an Proben aus den Mausmodellen vorlagen
- Es erfolgte ein alternativer Erkenntnisgewinn durch ausführliche Versuche mit aus Haut- (a) und Lungengewebe (b) isolierten Zellmixen und der ex vivo Plastik-Inkubation
- Mittels Hochdurchsatzanalysen konnten nicht nur die Aufnahme von PS-Partikeln in Haut- und Lungenzellen mikroskopisch gezeigt werden, sondern auch der Nachweis über die Bestimmung der Lichtbrechung (side-scatter, SCC-A) erbracht werden

Abbildungen

a) Plastikaufnahme in primäre Hautzellen



b) Plastikaufnahme in primäre Lungenzellen



Nachweis der Aufnahme von PS-Partikeln im Bereich von 200 nm bis 6 µm in primäre Zellen; (a) Mix aus Hautzellen; (b) Mix aus epithelialen Lungenzellen.

Stand des Arbeitspakets

→ Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen. Dies erfolgte auf einem anderen Weg, als ursprünglich geplant. Das Arbeitspaket wurde durch umfangreiche *ex vivo*-Plastikexpositionen in primären Zellen, die aus Mausgewebe und Organen isoliert worden sind, erfolgreich bearbeitet.

Arbeitspaket 3: Opto-physikalische Identifikation von Plastik

In diesem Arbeitspaket werden die drei zu untersuchenden technischen Innovationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, in Zellen und Geweben angereichertes Plastik möglichst markierungsfrei zu detektieren, untersucht. Neben dem ZIK innoFSPEC am AIP und dem ZIK HIKE an der Universität Greifswald ist auch das ZIK plasmatis am INP Greifswald an Arbeiten des AP 3 beteiligt. Hier lag der Fokus auf der Etablierung und Testung von mikro-spektroskopischen Verfahren (multispektralanalytische Verfahren).

Das Arbeitspaket wurde trotz der verkürzten Bearbeitungszeit erfolgreich abgeschlossen. Es gelang in einem Pilotversuch, 1000nm Polystyren-Partikel mechanisch (Rasterkraft-Mikroskopie, AFM) und mikro-spektroskopisch mittels Ausnutzung der spezifischen Absorption bei 1492 cm^{-1} (IR) und der damit verbundenen thermischen Ausdehnung von Polystyren auf bzw. in der biologischen Matrix eines Lungenzellrasens nachzuweisen. Damit konnte gezeigt werden, dass das AFM-IR Verfahren grundsätzlich in der Lage ist, Plastik-Mikro- bzw. Nanopartikel zerstörungsfrei nachzuweisen.

3.2.1

Aufgabenstellung

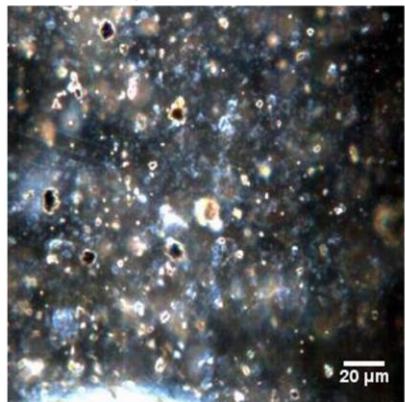
- Aufbau eines geeigneten und leistungsfähigen Multispektralmikroskopie-System

Ergebnisse

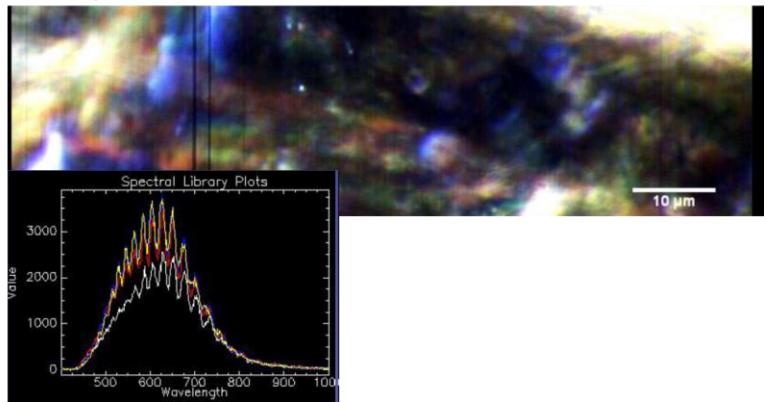
- Markterkundung/Literaturrecherche und Experteninterviews identifizierten drei distinkte Konzepte für Gerätesystem: Multispektral-Durchlichtmikroskopie, Dunkelfeldmikroskopie kombiniert mit spektraler Analyse des gestreuten Lichts, Kopplungen zwischen Rasterkraft-Mikroskopie und Infrarot-Spektroskopie
- Testproben $1\mu\text{m}$ PS Partikel in PEG-Matrix hergestellt und an vier Anbieter der o.g. Gerätesysteme versendet
- Erstellung Leistungsverzeichnis auf Basis der Auswertung Testmessungen, Diskussion mit Anbietern, Konzeption Aufbau mit Rücksicht auf zukünftige Targets
- Beschaffung System mit bester Leistung (AFM-IR-Kopplung)

Grafik

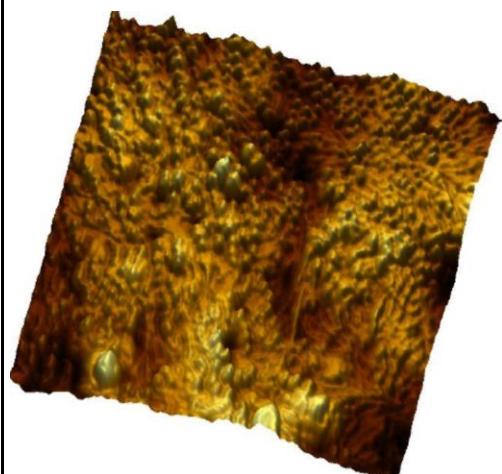
Model sample 2



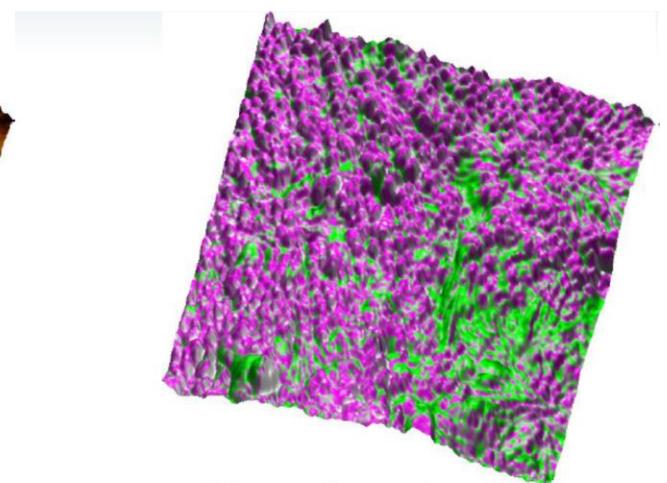
Model sample 5



Verfahren A: Dunkelfeldmikroskopie mit Multispektralsensor/VIS-naher Infrarotlichtquelle besitzt eine unzureichende optische und spektroskopische Auflösung (Testproben 1µm PS Partikel in PEG-Matrix)



Topography



Topography overlay with
IR ratio 1490:1102

Die Kopplung von Rasterkraftmikroskopie und IR-Spektroskopie (AFM-IR) unter Nutzung von Nahfeldeffekten am AFM-Tip erlaubt ein chemisches Mapping von Oberflächen

Stand

- Das Arbeitspaket wurde erfolgreich abgeschlossen. Die Lieferung des Gerätes erfolgte erst im September 2022. In der verbliebenen Projektlaufzeit (bis Ende 2022) konnten nur wenige Pilot-Experimente durchgeführt werden da die erforderliche Einarbeitung am Gerät und kleinere technische Schwierigkeiten nach der Installation keine umfangreiche und sofortige Nutzung zuließen. Hintergrund der sehr späten Lieferung waren rechtliche Fristen bei der Beschaffung, ein nachgelagerter Rechtstreit um den Zuschlag sowie die sehr lange Lieferzeit seitens des Anbieters.

3.2.2

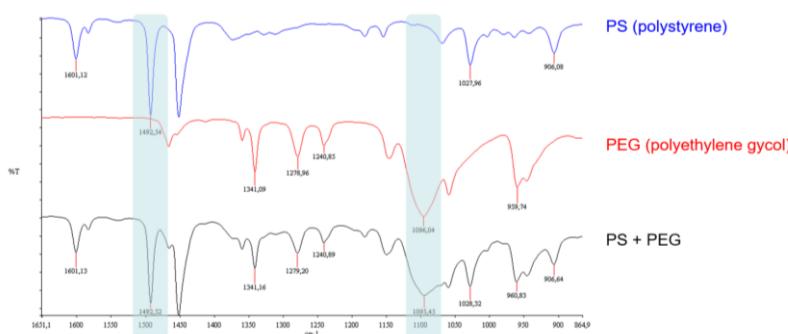
Aufgabenstellung

- Aufbau einer Spektrenbibliothek für Plastikpartikel & Optimierung der Geräteauflösung

Ergebnisse

- Methode für Messung von Infrarot-Spektren von Plastik-Bulk-Material etabliert und gestestet
- Einsatz für Polyethylglycol (Matrix für Testmessungen) und Polystyren (Partikel für Testmessungen) >> gut unterscheidbar VNIR/SWIR-Spektren
- Breiterer Einsatz von Materialien, insbesondere unter Verwendung des AFM-IR-Gerätes konnte aus Zeitgründen (Lieferung Gerät September 2022) nicht mehr durchgeführt werden

Grafik



VNIR/SWIR Spektren relevanter Polymere (Hyperion 3000 FTIR-Mikroskop) von Bulk-Materialien zur Identifizierung der spezifischen Wellenlängen für Testmessung/Pilot-Experiment am Multipsektralmikroskop/AFM-IR-Gerät

Stand

→ Arbeitspaket wurde nur anteilig bearbeitet, da es zu einer signifikanten Verzögerung der Lieferung des zentralen Geräts (AFM-IR) kam. Die dadurch freiwerdenden PM wurden für die Testung weiterer hochauflösender Mikroskopie-Verfahren (AP 3.2.8) eingesetzt (in Kooperation mit dem CEITEC Brno).

3.2.3

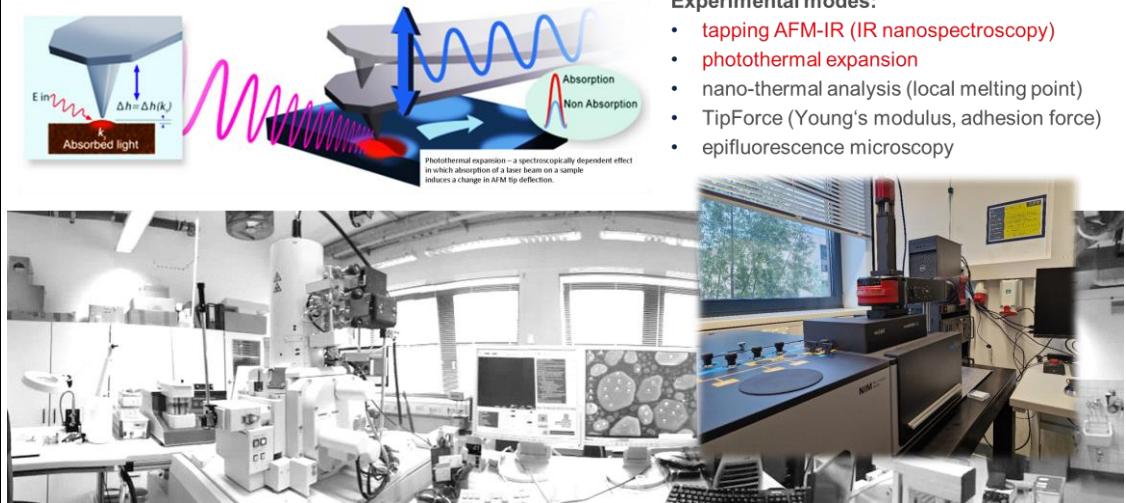
Aufgabenstellung

- Ermittlung der Nachweisgrenzen für Plastikpartikel in unterschiedlichen Prüfkörpern

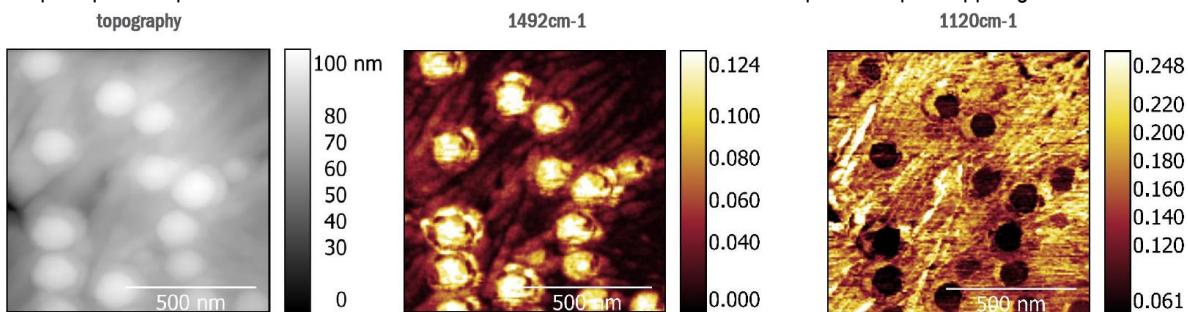
Ergebnisse

- Nachweis von Polystyren-Nanopartikeln (pristine) in der Größe 1000nm in einfacher biologischer Matrix erfolgreich mittels neu etablierten AFM-IR-System. Aufgrund der veränderten Rahmenbedingungen (Partikel in Suspension erforderlich, nicht in Einbettung) wurden freie Partikel untersucht.
- Screening anderer Größen/Materialien konnte aus Zeitgründen (Lieferung Gerät September 2022) nicht mehr durchgeführt werden

Grafik



Messprinzip und experimenteller Aufbau am INP Greifswald der Rasterkraft-Infrarotspektroskopie-Kopplung



Tip-enhanced Infrarot-Spektroskopie (AFM-IR, zwei relevante Anbieter) ermöglicht morphologische und chemische Charakterisierung der Partikel (Testproben 1µm PS Partikel in PEG-Matrix)



SEM-Aufnahmen von PS 1µm in PEG-Matrix (JEOL Mikroskop INP Greifswald) – sehr hohe Auflösungen können erreicht werden

Stand

➔ Arbeitspaket wurde nur anteilig bearbeitet, da es zu einer signifikanten Verzögerung der Lieferung des zentralen Geräts (AFM-IR) kam. Die dadurch freiwerdenden PM wurden für die Testung weiterer hochauflösender Mikroskopie-Verfahren (AP 3.2.8) eingesetzt (in Kooperation mit dem CEITEC Brno).

3.2.4

Aufgabenstellung

- Abschätzung des Einflusses einer Proteinkorona auf den Nachweis von Plastikpartikeln per reflexiver Hyperspektralmikroskopie

Ergebnisse

- nicht bearbeitet (– Verzögerung in der Lieferung des Gerätes)

Grafik

-

Stand

- ➔ Arbeitspaket konnte nicht bearbeitet werden das das Gerät nicht rechtzeitig zur Verfügung stand. Die dadurch freiwerdenden PM wurden für die Etablierung und Charakterisierung von nicht-PS-Nanopartikeln eingesetzt (AP 1.1.3).

3.2.5

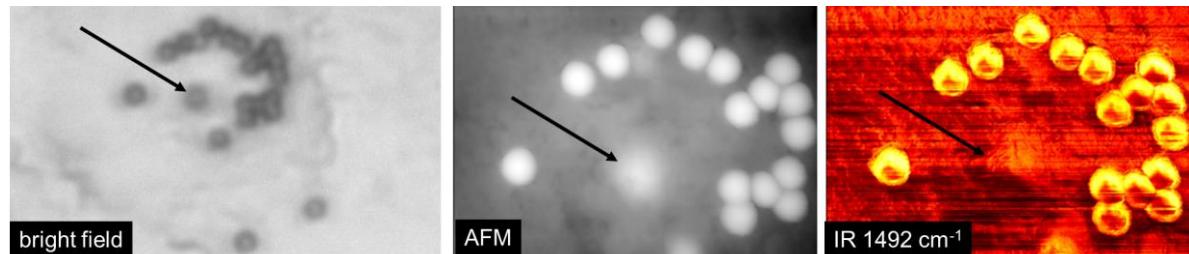
Aufgabenstellung

- Nachweis von Plastikpartikeln in Zellen mittel Hyperspektralmikroskopie

Ergebnisse

- Nachweis von Polystyren-Nanopartikeln (pristine) in der Größe 1000nm in komplexer biologischer Matrix (A549 Lungenzellen) erfolgreich mittels neu etablierten AFM-IR-System.
- Adsorption und Aufnahme in eukaryotische Zellen kann nachgewiesen werden

Grafik



1000nm Polystyren-Nanopartikel auf bzw. in einer A549-Lungenzelle im Hellfeld (links), mittels Rasterkraftmessung (Mitte) und als chemisches Mapping mittels IR-Spektroskopie (3mW QCL, 1492 cm^{-1} (Streckschwingung aromatische C=C-Bindung)

Stand

- ➔ Arbeitspaket wird Aug 2022 (designierter Liefertermin Gerät begonnen)

3.2.6

Aufgabenstellung

- Nachweis von Plastikpartikeln in komplexen Gewebemodellen mittel Hyperspektralmikroskopie

Ergebnisse

- nicht bearbeitet (– Verzögerung in der Lieferung des Gerätes)
- Nachweis der Aufnahme von Plastik-Nanopartikeln in Mausgeweben in vivo erfolgt - siehe AP 2
- Anknüpfung mit orthogonaler AFM-IR Technik möglich, aber aus Zeitgründen nicht mehr ausgeführt

Grafik

-

Stand

→ Arbeitspaket konnte nicht bearbeitet werden das das Gerät nicht rechtzeitig zur Verfügung stand. Die dadurch freiwerdenden PM wurden für die Etablierung und Charakterisierung von nicht-PS-Nanopartikeln (AP 1.1.3) und für die Testung weiterer hochauflösender Mikroskopie-Verfahren (AP 3.2.8) eingesetzt (in Kooperation mit dem CEITEC Brno).

3.2.7

Aufgabenstellung

- Anpassung der Multispektralmikroskopie für den Einsatz in der Durchflusszytometrie (RT-DC) oder der Hochdurchsatzmikroskopie

Ergebnisse

- Machbarkeit der Kopplung RT-DC/AFM-IR anhand Literaturstudium, Experteninterviews und Herstellern mit Oliver Otto/ZIK HIKE intensiv diskutiert
- Aufgrund der Entscheidung für AFM-basiertes Hyperspektralmikroskop (siehe AP 3.2.1) ist mechanischer Zugriff auf Probe erforderlich
- diese kann bei Durchfluss-basierten Verfahren nicht gewährleistet werden (nur optisch möglich)
- Chance zum Erreichen einer sinnvollen Kopplung als zu gering eingestuft (keine experimentellen Schritte geplant)

Grafik

-

Stand

→ Arbeitspaket abgeschlossen.

3.2.8

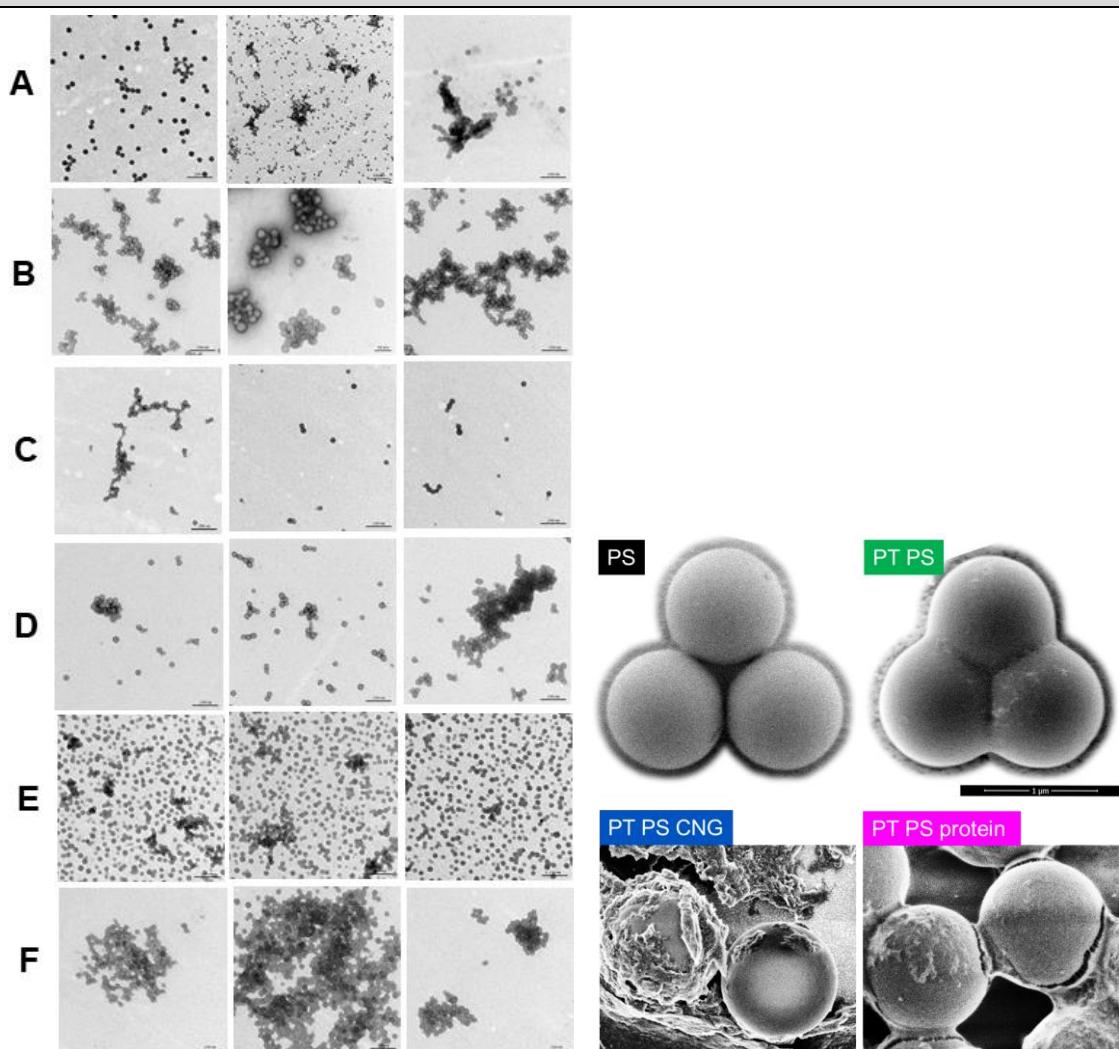
Aufgabenstellung

- Machbarkeitsstudie zur Identifikation von (markierten) Plastikpartikeln in Zellen/Geweben

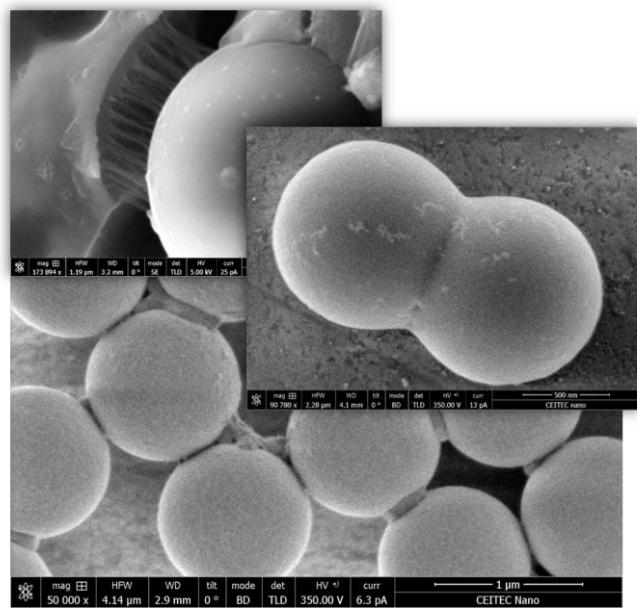
Ergebnisse

- (markierte) Partikel können mittels SEM und SEM/EDX morphologisch und chemisch adressiert werden, sehr hohe Auflösungen erreichbar. Nicht gut geeignet für Partikel in Zellen (schlechter Kontrast)
- Partikel $\geq 50\text{nm}$ können mittels TEM morphologisch adressiert werden (starker Trend zur Aggregation, durch Proteincorona intensiviert – siehe AP 1.3.4.4) – technisch auch für intrazellulären Nachweis denkbar aber Methode nicht verfügbar (Gefrierbruchtechnik)
- Markierte Partikel $> 200\text{nm}$ sind mittels konfokaler Mikroskopie sichtbar, da die genutzten Modellpartikel aggregieren und die Partikelaggregate das Abbe-Limit überschreiten
- Hochauflösende Elektronenmikroskopie Nachweis der Geometrie (1000nm PS) $D=1.03\pm0.03\text{ }\mu\text{m}$ (SD), in Anwesenheit von Proteinen oder künstlicher Alterung (Helix-Jet) wird starkes Clustering beobachtet. Die Rauhigkeit der Partikel nimmt erkennbar zu, ebenso die Haftung der Protein-Corona-Partikel an Oberflächen (van der Waals-Bindungen). Schichtdicke der Protein-Corona mit ca 20 nm (soft + hard) bestimmt.
- Holographische Mikroskopie (quantitatives Phasenkontrastsystem) am CEITEC Brno bietet eine gute Auflösung der Probepartikel, aber unzureichend für geplanten Einsatzzweck

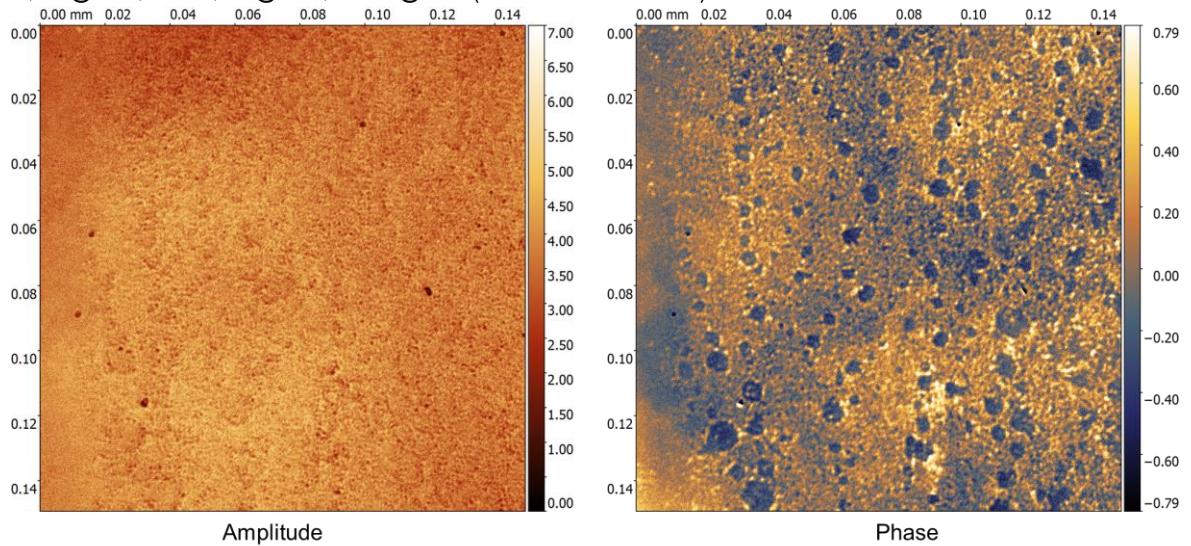
Grafik



Links: Transmissions-elektronenmikroskopie von 50nm Polystyren-Partikel vor bzw. nach Bildung einer Proteincorona. PS (A), PS-protein (B), PS-COOH (C), PS-COOH-protein (D), PS-NH₂ (E), and PS-NH₂-protein (F); rechts: Scanning electron-Mikroskopie mittels gentle-beam mode erlaubt nachweis von Carbon- oder Proteincorona um Partikel (hier: 1000nm Polystyren nach Plasmabehandlung (künstliche Alterung): PS = Polystyren, PT PS = plasma-behandeltes Polystyren, PT PS CNG = plasma-behandeltes Polystyren mit Carbon-Corona, PT PS protein = plasma-behandeltes Polystyren mit Proteincorona



Hochauflösende Elektronenmikroskopie @ Verios 4600L (CEITEC Brno): Unterschiedliche Partikel-Modelsysteme getestet: PS, PS@PEG, PT PS, PS@PCC, PT PS@PCC (PCC = Protein-Corona).



Holographische Mikroskopie (quantitatives Phasenkontrastsystem) am CEITEC Brno, Probe: 211112_L1suf_RS147nm (A); View field: 149.41 $\mu\text{m} \times 149.41 \mu\text{m}$ (1200 \times 1200 px2), Used objective: 40 \times , NA 0.95, Used illumination: red filter 660 nm (FWHM 10 nm) – gute Auflösung der Probepartikel, aber Auflösung bleibt hinter Erwartungen zurück

Stand

- Arbeitspaket wurde vollständig bearbeitet, aber aufgrund der Verzögerung bei der Lieferung des AFM-IR- Systems mit verändertem Fokus in Kooperation mit dem CEITEC Brno (holographische Mikroskopie + Elektronenmikroskopie)

3.2.9

Aufgabenstellung

- Ortsaufgelöste Massenspektrometrie (nanoSIMS) - Machbarkeitsstudie

Ergebnisse

- Etablierung Kontakt/Planung der Experimente als Auftrag an Dritte ist erfolgt
- In Vorbereitung zur Messung wurden Fluor-markierte Polystyren-Partikel hergestellt
-

Grafik

-

Stand

→ Arbeitspaket wurde anteilig bearbeitet, aber final nicht weiterverfolgt. Dafür gibt es drei Gründe: 1) da Verfahren als orthogonale Nachweismethode für den Nachweis von Plastik-Partikeln in Geweben mittels AFM gedacht war – diese Experimente aber erst kurz vor Projektende durchgeführt werden konnten; 2) Messungen am nanoSIMS bei einem dritten Institut mit langem Planungsvorlauf hätten durchgeführt werden müssen, dieser konnte wegen der unklaren Situation in punkto AFM-IR nicht gewährleistet werden, und 3) die Nutzbarkeit des nanoSIMS-Verfahrens für den gewünschten Einsatzzweck aufgrund technischer Hürden und Limitationen nicht grundsätzlich gegeben ist. Die freiwerdenden PM wurden in den APs 1.1.3 (künstliche Plastik-Nanopartikel) und 3.2.8 (hochauflösende Mikroskopieverfahren) eingesetzt.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die für das PlasMark-Vorhaben des ZIK *plasmatis* bewilligten Mittel wurden für die Realisierung des Vorhabens genutzt. Die Projektausgaben haben die Höhe der bewilligten Mittel leicht unterschritten. Eine zentrale Investition im Rahmen des Vorhabens war eine Kopplung zwischen Rasterkraftmikroskop und Infrarotspektrometer (AFM-IR-Mikroskop), welche zum chemisch-morphologischen Hyper-Mapping von Modell- bzw. Gewebeproben eingesetzt wurde.

Die wesentlichen Ausgabenpositionen waren die Personalkosten, sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben (insbesondere Verbrauchsmaterialien) und Investitionen. Ebenfalls wurden Mittel für Aufträge an Dritte, Kleingeräte sowie Dienstreisen. Alle Einzelabrechnungen sind dem zahlenmäßigen Nachweis zu entnehmen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die im Rahmen dieses Vorhabens „PlasMark“ des ZIK *plasmatis* geleitete Forschungsarbeit entspricht den im Projektantrag dargestellten Vorhaben. Das Ziel von PlasMark war es, Detektionsmethoden zu entwickeln, mit deren Hilfe Plastikpartikel in biologischen Proben und vor allem in Gewebe-Dünn schnitten markierungsfrei identifiziert werden können. Die Vision war, mit einem neuen und innovativen Verfahren, prospektive und retrospektive Korrelationen zwischen Plastikpartikeln in Geweben und verschiedenen Krankheitsbildern einschließlich Volkskrankheiten zu ermöglichen. Dabei handelt es sich um ein high-risk-high-gain-Projekt, da gesamtgesellschaftlich noch kein Konsens darüber existiert, welche Einfluss Plastik-Nanopartikel auf Ernährungsprinzipien, Pathogenesen und Gesundheitsfürsorge im weiteren Sinne haben. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es drei parallele Entwicklungen, die möglicher- aber nicht notwendiger Weise einander bedingen: 1) die Anzahl der im Boden, Luft und Wasserkörpern gefundenen Mikro- und Nanoplastik nimmt beschleunigt zu, 2) die Anzahl von Nachweisen, dass Plastik-Mikro- bzw. Nanopartikel in Organismen eindringen können nimmt zu, und 3) für eine große Zahl an neurodegenerativen oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen werden steigende Inzidenzen registriert ohne die zugrundeliegende Kausalität zweifelsfrei zu kennen. Hauptziel des Vorhabens war es also, durch technischen Fortschritt bei den zerstörungsfreien Detektionsmethoden Analysen aus Gewebebankproben zum Aufdecken möglicher Korrelationen möglich zu machen. Zusammen mit Untersuchungen zur Aufnahme von Plastik und dadurch verursachte Entzündungsreaktionen in relevanten Modellsystemen, welche zugleich der Methoden etablierung und -validierung der innovativen Detektionsmethode dienen, leistete PlasMark einen wesentlichen Beitrag um die Erforschung gesundheitlicher Risiken durch Plastik zu fördern. Da es sich beim Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. um eine Forschungseinrichtung zu Grundlagen und die technische Anwendung von Niedertemperaturplasmen handelt gehören die Inhalte des PlasMark-Forschungsprojektes nicht zu den satzungsgemäßen Forschungszielen des INP, weshalb diese ohne eine Förderung nicht möglich gewesen wäre.

4. voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Vorhaben PlasMark wurden am INP vier unterschiedliche Fragestellungen bearbeitet: a) Gewinnung, Charakterisierung, sowie Alterung von relevanten Plastiknanopartikeln, b) die Interaktion von Plastiknanopartikeln mit Biomolekülen, vor allem Proteinen und Lipiden, c) die Interaktion von Plastiknanopartikeln mit biologischen Modellen, und d) als zentrale Fragestellung die Erkundung von neuen Nachweismöglichkeiten derartiger Partikel in einer biologischen Matrix. Die dabei erzielten Ergebnisse wurden publiziert und auf Tagungen disseminiert (die Abschnitt 5 des vorliegenden Berichts), sodass die wissenschaftlichen Inhalte direkt der Community des Forschungsgebiets zur

Verfügung stehen. Innerhalb des INP wurde erhebliche Expertise auf dem Gebiet Laserablation von Polymeren und der Nanopräzipitation von Kunststoffen aufgebaut und steht für Folgeprojekte zur Verfügung. Gleiches gilt für die chemisch-morphologische Charakterisierung von kleinsten Polymerpartikeln mittels elektronenoptischer Verfahren (SEM, TEM, XPS), Lichtstreuung (DLS), und Atomabsorptionsspektroskopie.

Zu a/c) Nachweise von Polymerpartikeln in Zellen/tierische Gewebe hinein, gepaart mit Erkenntnissen zur redoxbiologischen Relevanz sind bisher selten. Hier konnte das PlasMark-Vorhaben sachlich-fundierten Input für unterschiedliche Forschungscommunities und die öffentliche Hand liefern. Die verhalten ausgeprägte Reaktion der im Vorhaben genutzten gut etablierten biologischen Modelle auf die untersuchten Plastiknanopartikel mit ihren qualitativ hochwertigen und robusten Daten sendet zum einen beruhigende Signale in die moralisch aufgeladene Debatte um die Bedeutung der Plastikpartikel für die Gesundheit. Zum anderen darf nicht verkannt werden, dass die planmäßig durchgeführten Experimente nur Akutszenarien beinhalteten. Es besteht daher weiterhin Forschungsbedarf um Fragen zur chronischen Toxizität derartiger Partikel beantworten zu können. Die im Vorhaben gesammelten Daten und Erfahrungen liefern die erforderliche Grundlage für die Einwerbung von Drittmitteln (siehe unten). Des Weiteren muss zur Kenntnis genommen werden, dass es regelmäßig zu einer Aufnahme von Plastikpartikeln in vitro und in vivo kommt. Wie erwähnt war die akute Reaktion darauf verhalten, aber es handelte sich um „saubere“ Kunststoffe. Bei Plastikpartikeln aus der Umwelt ist das nicht zwingend der Fall, da die Kunststoffe aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften organische Verbindungen, u.a. polyfluorierte Verbindungen (PFAS) und andere hochstabile Substanzen (persistent organic pollutants, POPs) aufzunehmen vermögen. Daher kann befürchtet werden, dass bei Aufnahme derartiger Partikel die darin gelösten Verbindungen in der Zelle freigesetzt werden und es zur Auslösung von sekundären Effekten kommt. Daraus folgen zwei mögliche Forschungsrichtungen, von denen eine – der Abbau von Schadstoffen aus (Industrie-) Abwässern mittels physikalischer Plasmen – bereits am INP beforscht wird. Die andere zielt auf die Untersuchung der chronischen Toxizität von PFAS/POPs. Diese Untersuchungen müssen in vivo erfolgen und erfordern daher einen geeigneten Partner. Zum aktuellen Zeitpunkt besteht keine Absicht diesen Aspekt weiter zu verfolgen.

Zu a/d) Da aufgrund der sehr späten Auslieferung des AFM-IR-Mikroskops nur einige wenige Pilotexperimente durchgeführt werden konnten, kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht abschließend bewertet werden, inwiefern die gewählte Herangehensweise in der Lage ist, die physikalischen Limitationen bei der Interaktion von Partikeln im Größenbereich der Wellenlänge des sichtbaren Lichts zu überwinden (Abbe-Limit). Die ersten Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Verfahren geeignet sein könnte, jedoch sind zusätzliche Arbeiten im Rahmen eines neuen Projekts erforderlich um diese Einschätzung zu substanziellisieren. Die geplante Anmeldung von Schutzrechten für das Verfahren oder dessen Teilespekte war daher noch nicht möglich. Ein ursprünglich für das Jahr 2022 geplanter Antrag zur Entwicklung neuartiger Nanopartikel und deren Detektionsmethoden zusammen mit polnischen, einer tschechischen und einer schweizerischen Forschungseinrichtung (Universität Krakau, technische Universität Prag, ETH Zürich) kam noch nicht zustande. Hier sollten in anderer Wichtung und mit anderen Methoden ähnliche Fragestellungen (a, c, d, siehe oben) wie im PlasMark-Konsortium weiterbearbeitet werden. Die Ursache für die Verzögerung liegt in den unterschiedlichen Sichtweisen zur Bearbeitung der Thematik sowie im komplexen multi-nationale Förderinstrument (DFG/Weave Lead Agency-Verfahren). Da die Thematik weiterhin für alle Beteiligten von Interesse ist und das am ZIK plasmatis im Vorhaben PlasMark angeschaffte AFM-IR sehr gut für dieses Kooperationsprojekt geeignet ist wird eine Intensivierung der Bemühungen in der zweiten Hälfte 2023 mit dem Ziel einen gemeinsamen Antrag einzureichen angestrebt.

Im Zuge des Vorhabens wurde eine Kooperation mit dem Central European Institute of Technology (CEITEC) in Brno/Tschech. Republik (AK D. Zicha) auf dem Gebiet der hochauflösenden Mikroskopie (Elektronenmikroskopie, holographische Mikroskopie) aufgebaut. Diese wird auch weiterhin aufrechterhalten und für Folgeprojekte zu Untersuchung von Core-shell-Nanopartikeln auf Kohlenstoffbasis genutzt. Zugleich wurde die Herstellung solcher und verwandter Partikel für unterschiedliche Aufgabenspektren mit dem CATRIN research center in Olomouc/Tschech. Republik

(Carbon Nanostructure and Biomacromolecules group) zusammen weiterentwickelt. Diese Interaktion wird in der Zukunft weiter intensiviert und wird Themen jenseits von Kunststoffpolymeren fokussieren.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die Thematik Mikroplastik besitzt weiterhin eine sehr hohe Dynamik, die Zahl der wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Veröffentlichungen steigt rasant („Microplastics“ 24.800 Einträge für 2022, 15.600 Einträge für 2021; Google Scholar). Im Frühjahr 2022 erschien eine Publikation von Leslie und Kollegen, die im besonderen Maße die Relevanz des Projekts PlasMark unterstrich. Es gelang der Nachweis von Plastik im menschlichen Blut mittels Pyrolyse-GC/MS¹. Aufgrund methodischer Limitationen kann nicht ausgeschlossen werden, dass keine Plastikpartikel, sondern nur deren Monomere nachgewiesen worden sind. Obzwar auch die Zahl der Probanden gering war bietet der Artikel international Anlass zur Beunruhigung und wurde bis Juni 2023 bereits 800-mal zitiert. Die Bestrebungen des PlasMark-Konsortiums, dem neben dem INP Greifswald die Universität Greifswald und das AIP Potsdam angehören, eine zerstörungsfreie Alternative zum Nachweis von Plastik in komplexen biologischen Systemen zu entwickeln sind in diesem Zusammenhang von besonderer Relevanz. Ein im Jahr 2021 erschienener Review-Artikel beleuchtet kritisch den Zusammenhang zwischen ubiquitär vorkommenden Plastikpartikeln und der Tumorentstehung². Im Artikel wird insbesondere auch der Bedarf von opto-physikalischen Techniken zum Nachweis der Partikel *in situ* unterstrichen. Ein weiterer Review von Zarus und Kollegen widmet sich den Hauptaufnahmerouten von Plastikpartikeln in den Menschen und den resultierenden Gesundheitsrisiken. Insgesamt wird resümiert, dass die zugrundeliegenden Mechanismen nicht ausreichend untersucht sind³. Eine Arbeit von Huang und Co-Worker berichtet über die Nutzung der Oberflächenplasmon-Resonanz zum Nachweis von Plastik-Partikeln⁴, eine weitere aus dem Jahr 2022 belegt, dass im menschlichen Sputum mittels IR-Mikroskopie Plastikmikropartikel vorhanden waren⁵. Allerdings liegt der Nachweigrenze der Methode bei 20µm, weit oberhalb dessen was im Moment als besonders kritisch angesehen wird ($\leq 1\mu\text{m}$). Ein im Juni 2023 erschienener Übersichtsartikel katalogisiert die Nachweise von Plastikpartikel im Menschen bzw. Proben humaner Herkunft, ohne dabei zerstörungsfreie Methoden aufzuführen⁶.

Zusammenfassend kann unterstrichen werden, dass keine Publikationen bekannt geworden sind, die Projektziele unmittelbar vorwegnehmen oder anderweitig die Notwendigkeit des Vorhabens reduzieren. Die publizierten Arbeiten unterstreichen die Relevanz der Thematik und die Richtigkeit des Ansatzes, eine zerstörungsfreie Diagnostik für Plastikpartikel in biologischen Systemen für systematische Forschungsvorhaben zu entwickeln.

¹ Leslie, H. A., et al. (2022). "Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood." *Environment International* 163: 107199.

² Alimba, C. G., et al. (2021). "Micro(nano)-plastics in the environment and risk of carcinogenesis: Insight into possible mechanisms." *Journal of Hazardous Materials* 416: 126143.

³ Huang, C. J., et al. (2021). "Measurement of Low Concentration of Micro-Plastics by Detection of Bioaffinity-Induced Particle Retention Using Surface Plasmon Resonance Biosensors." *Biosensors (Basel)* 11(7).

⁴ Huang, C. J., et al. (2021). "Measurement of Low Concentration of Micro-Plastics by Detection of Bioaffinity-Induced Particle Retention Using Surface Plasmon Resonance Biosensors." *Biosensors (Basel)* 11(7).

⁵ Huang, S., et al. (2022). "Detection and Analysis of Microplastics in Human Sputum." *Environmental Science & Technology* 56(4): 2476-2486.

⁶ Barceló, D., et al. (2023). "Microplastics: Detection in human samples, cell line studies, and health impacts." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 101: 104204.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Die akzeptierten veröffentlichten Publikationen, die unter Beteiligung der PlasMark-Projektmitarbeiter oder Projektleitern veröffentlicht wurden und fachlichen oder methodischen Bezug zu den Projektinhalten aufweisen, sind nachfolgend gelistet. Alle wissenschaftlichen Abhandlungen wurden in peer-reviewed Journals veröffentlicht, wenn möglich unter der Open-Access-Policy in Einklang mit den Vorgaben des Fördermittelgebers. PlasMark-Autoren sind fett gedruckt:

1. Farr, N.T.H.; Roman, S.; **Schäfer, J.**; Quade, A.; Lester, D.; Hearnden, V.; MacNeil, S.; Rodenburg, C. A novel characterisation approach to reveal the mechano–chemical effects of oxidation and dynamic distension on polypropylene surgical mesh. *Rsc Adv* 2021, 11, 34710-34723, 10.1039/d1ra05944k.
2. **da Silva Brito, W.A.; Mutter, F.; Wende, K.**; Cecchini, A.L.; **Schmidt, A.**; **Bekeschus, S.** Consequences of nano and microplastic exposure in rodent models: the known and unknown. *Particle and Fibre Toxicology* 2022, 19:1.
3. **da Silva Brito, W.A.; Singer, D.; Miebach, L.; Saadati, F.; Wende, K.; Schmidt, A.**; **Bekeschus, S.** Comprehensive in vitro polymer type, concentration, and size correlation analysis to microplastic toxicity and inflammation. *Sci Total Environ* 2022, 854, 158731, 10.1016/j.scitotenv.2022.158731.
4. **Saadati, F.; da Silva Brito, W.A.**; Emmert, S.; **Bekeschus, S.** Optimized High-Content Imaging Screening Quantifying Micronuclei Formation in Polymer-Treated HaCaT Keratinocytes. *Nanomaterials* 2022, 12:4, 4463.
5. **Ravandeh, M.**; Mehrjoo, M.; Kharitonov, K.; **Schafer, J.**; Quade, A.; **Honnorat, B.**; Ruiz-Lopez, M.; Keitel, B.; Kreis, S.; Pan, R., **Wende, K.**; Plönjes, E.: X-ray ptychographic imaging and spectroscopic studies of plasma-treated plastic films. *Polymers (Basel)* 2022, 14, 10.3390/polym14132528.
6. **Schmidt, A.; da Silva Brito, W.A.; Singer, D.; Mühl, M.; Berner, J.; Saadati, F.; Wolf, C.M.**; **Miebach, L.; Wende, K.; Bekeschus, S.** Short- and long-term polystyrene nano- and microplastic exposure promotes oxidative stress and divergently affects skin cell architecture and Wnt/beta-catenin signaling. *Particle and Fibre Toxicology* 2023, 20:3.
7. **Schmidt, A.; Mühl, M.; da Silva Brito, W.A.; Singer, D.; Bekeschus, S.** Antioxidant Defense in Primary Murine Lung Cells following Short- and Long-Term Exposure to Plastic Particles. *Antioxidants* 2023, 12:2, 227.

Weitere Manuskripte sind eingereicht, u.a. **Wolf** et al.: "Immune and inflammatory responses of human macrophages, dendritic cells, and T-cells in presence of micro- and nanoplastic of different types and sizes", **Dorsch** et al.: "Lipid corona formation on nanoplastic particles modulates uptake in A549 cells in vitro". Zwei weitere Publikationen zum Thema Laserablation/Nanopräzipitation (**Honnorat** et al.) und Biomolekül-Partikel-Interaktion sind noch in Arbeit (**Dorsch** et al.).

Tagungsbeiträge

International Conference on Laser Ablation 2022, Matsue/Japan (online)

Poster – Bruno Honnorat

Polypropylene and polyvinyl chloride nanoparticles generation using 355 nm laser ablation

Microplastics 2022, Ascona/Switzerland 2022

Vortrag – Dr. Mehdi Ravandeh

Protein corona formation and characterization of environmentally relevant microplastics generated by sonication

Vortrag – Nicholas McKitterick

Investigating Protein Corona Composition in Different Environmentally Relevant Plastic Particles

Poster – Anna Dorsch

Formation and dynamics of lipid coronas on model plastic particles and their influence on cellular transport processes

Betreuung von wissenschaftlichem Nachwuchs

Doktorand*innen

- Doktorand Walison da Silva Brito, seit 01.10.2020; Thema: Einfluss von Plastikmikropartikeln auf humane Zelllinien
- Doktorandin Anna Dorsch, seit 15.11.2020; Thema: Interaktion zwischen Plastiknanopartikeln und Lipiden
- Bachelorstudentin Melissa Mühl, 2022; Thema: Aufnahme und Wirkung von Nano- und Mikroplastikpartikeln in murinen Lungen-Epithelzellen
- Masterstudent Dirk Dattler, seit August 2022, „Die Rolle der Proteincorona für die Akkumulation von Metallionen an umweltrelevanten Mikro- und Nanopartikeln“ (erfolgreich abgeschlossen Juni 2023)
- Bachelorstudent Fritz Förstner, seit Oktober 2022; Thema: „Interaction of nano-/microplastics with human saliva: effect of size, surface chemistry on protein corona formation“ (erfolgreich abgeschlossen Juni 2023)

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel „Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK): PlasMark – Markierungsfreie Diagnostik von Umweltplastik mittels innovativer optophysikalischer Verfahren - TP1: Multispektrale Verfahren“	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Wende, Kristian	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2022
	6. Veröffentlichungsdatum 30.06.2023
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) Felix-Hausdorff-Str. 2 17489 Greifswald	9. Ber. Nr. Durchführende Institution 10. Förderkennzeichen 03Z22D511
	11. Seitenzahl 55
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 6
	14. Tabellen
	15. Abbildungen 51
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	

18. Kurzfassung

Die Aufnahme und die Auswirkungen von Mikro- bzw. Nanoplastik auf die Gesundheit des Menschen ist größtenteils unerforscht. Gewebebanken könnten dabei eine wertvolle Ressource sein, insbesondere für die retrospektive Analyse von chronisch-entzündlichen Erkrankungen, z. B. des neurodegenerativen Formenkreises. Eine zentrale Herausforderung dabei ist die eindeutige Identifizierung von Plastikpartikeln in biologischen Matrices. Das Ziel des Vorhabens war es daher, eine Detektionsmethode auf Basis der Infrarotmikrospektroskopie zu entwickeln, mit deren Hilfe Plastikpartikel in biologischen Proben und vor allem in Gewebe-Dünn schnitten markierungsfrei identifiziert werden können. Parallel dazu wurde untersucht, wie Plastikpartikel in Zellen bzw. Gewebe aufgenommen werden und ob die dabei ablaufenden Prozesse durch körpereigene Proteine oder Lipide moduliert werden. Zudem wurde der Fragestellung nachgegangen, welche Rolle Plastik für das Immunsystem und in chronisch-entzündlichen Prozessen spielt. Damit sollte ein nachhaltiger Beitrag zur Erforschung von Plastik als potentielles Gesundheitsrisiko für die Gesellschaft erbracht werden. Im Rahmen des Vorhabens gelang der Nachweis, dass eine Kombination aus Rasterkraftmikroskop und Mikroinfrarotspektroskopie grundsätzlich geeignet ist um Kunststoffpartikel im sub-Mikrometerbereich in biologischen Matrices zu identifizieren und chemisch zu charakterisieren. Unter Verwendung der Laserablation, Nanofällung, und der mechanisch unterstützten Hydrolyse konnten Nanopartikel aus PET, PVC, PP, PC und PMMA im Größenbereich von 200 nm in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen werden um innerhalb des Teilverhabens und des Verbundprojekts damit arbeiten zu können. Die flankierende elektronenoptische Analyse der Eigenschaften und Lichtstreumessung dienten zur Qualitätssicherung und zeigten eine gute Vergleichbarkeit des chargen-basierten Herstellungsverfahrens.

Aus zytologisch-toxikologischer Sicht wurden im Laufe des Vorhabens über 50 verschiedene Plastikpartikel-Konfiguration (bspw. unterschiedliche Plastiktypen, Plastikpartikel-Geometrien, Plastikpartikel-Größen, Plastikpartikel-Konzentrationen) getestet. So konnte u.a. gezeigt werden, dass v.a. positiv geladene Plastikpartikel eine hohe Zytotoxizität aufweisen, und dass nur, wenn diese klein sind ($\leq 200\text{nm}$). Insgesamt korrelierten eine Reihe von zytotoxischen, inflammations-assoziierten und zellbiologischen Effekten invers mit der Partikelgröße (je kleiner, desto größer die Effekte). Darüber hinaus reagierten unterschiedliche Zelltypen (Leber, Haut, Lunge) im Detail unterschiedlich auf die Exposition mit Plastikpartikeln, bspw. bzgl. der Sekretion entzündungs-assozierter Chemokine und Zytokine. Im Allgemeinen konnte jedoch gerade im Bereich der Zytotoxizität keine Zelltyp-spezifische Effekte von Plastikpartikeln festgestellt werden. Auch in Tierstudien war bei täglicher Gabe von Plastik über die orale Route keine Toxizität zu beobachten. Dagegen zeigten sich geringe toxische Effekte bei der einmaligen Verabreichung von Plastikpartikeln im Hühnereimodell, v.a. bei großen Partikeln und in hoher Konzentration. In vitro zeigten solche Plastikexposition auch leichte genotoxische Effekte, die mit einem extra für diesen Zweck neu entwickelten Hochdurchsatz-Imaging-Verfahren mittels Algorithmus-basierter Auswertung gemessen wurden. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden, dass die Plastikpartikel-Exposition Signalwege induziert, welche u.a. für die Abwehr von oxidativem Stress verantwortlich sind. Dies war v.a. in Zellkulturen ausgeprägt, welche über mehrere Wochen hinweg (Dauerkultur) mit Plastikpartikeln inkubiert worden sind. Die meisten dieser Ergebnisse konnten in mehreren Artikeln (5) in etablierten Journalen mit hohem Impact-Factor (>7) publiziert werden, was die Relevanz der durchgeführten Arbeiten im PlasMark-Projekt unterstreicht.

19. Schlagwörter

Plasma, Plasmamedizin, Plasma-Flüssigkeitseffekte

20. Verlag

21. Preis