

**Mikroplastik –
Herstellung, Toxikokinetik und Auswirkungen
auf die Niere**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Hannah Triebel
aus Coburg
im Jahr 2025

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

12.02.2025

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Wolf Hayo Castrop

Unterschrift:

„Wir müssen alles erwarten. Auch das Gute.“

- Jo Schück

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
1.	Plastikverschmutzung – ein wachsendes Problem	1
1.1	Mikroplastik in der Umwelt und in Nahrungsquellen	2
1.2	Mikroplastik im Menschen.....	2
1.3	Verwendung von Mikroplastik in der derzeitigen Forschung.....	3
1.4	Der Einfluss von Form und Größe auf die Effekte von MP	4
1.4.1	Ansätze zur Herstellung realitätsnahen Mikroplastiks.....	5
1.5	Labeling-Strategien für MP-Partikel	5
1.6	Bekannte Effekte von Nano- und Mikroplastik auf Organismen	7
2.	Toxikokinetik: Mögliche Wege der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Fremdstoffen im Körper – das ADME-Modell.....	8
2.1	A – Absorption bzw. Resorption.....	8
2.1.1	Das lymphatische System.....	9
2.2	D – Distribution.....	10
2.3	M – Metabolismus.....	10
2.4	E – Elimination bzw. Exkretion.....	11
3.	Die Niere – Funktion und Anatomie	12
3.1	Die glomeruläre Filtrationsbarriere (GFB).....	14
3.2	Regenerationspotential der Niere	15
II.	Fragestellung.....	17
III.	Methoden.....	18
1.	Produktion von realitätsnahem Mikroplastik	18
1.1	Nanofaser-Spinning	18
1.2	Degradierung der Nanofasern zu Mikroplastik	19
1.2.1	Vermahlung mit einer Planeten-Kugelmühle.....	19
1.2.2	Kryogenvermahlung	20
1.2.3	Zerkleinerung via Ultraturrax	20
1.3	Luminophores Labeling	21
1.3.1	Auswahl eines geeigneten Fluorophors	21
1.3.2	Upconverting Nanoparticles (UCNPs) als Label	21
1.3.3	Photobleaching	24
1.3.4	Leaching	24
1.4	Einbettung von DPA und UCNPs in die Polymermatrix des MPs.....	25
1.5	Charakterisierung der Nanofasern und Mikroplastikpartikel	25

Inhaltsverzeichnis

1.5.1	Rasterelektronenmikroskopie (SEM)	26
1.5.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	26
1.5.3	FTIR-Spektroskopie	26
1.5.4	Zeta-Potential	27
2.	Tierversuch zur Distribution und Ausscheidung von Mikroplastik-Fragmenten	29
2.1	Versuchstiere	29
2.2	Appliziertes Plastik und erwartbare Risiken.....	30
2.3	Aufbau des Tierversuchs und erwartbare Risiken	30
2.4	Probengewinnung.....	31
2.4.1	Metabolische Käfige.....	32
2.4.2	Organentnahme.....	32
2.5	Kremierung der 100%-Proben, Organe, Exkremente & Korpusse	32
2.6	Auswertung durch optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma... 33	
2.6.1	Funktionsprinzip.....	33
2.6.2	Probenvorbereitung	33
2.6.3	Kalibrierung.....	34
2.6.4	Messvorgang und Auswertung.....	34
3.	Pilotstudie zu Effekten von Mikroplastik auf die Niere.....	35
3.1	Versuchstiere	35
3.2	Struktur des Tierversuchs	36
3.3	Organentnahme	36
3.4	Kryokonservierung des Gewebes	37
4.	Isoliert perfundierte Nieren der Maus	38
4.1	Ablauf der ipN.....	38
4.2	Auswertung des Alexa-BSA-Versuchs	39
4.3	Statistische Auswertung	40
5.	Histologische Aufbereitung zur strukturellen Beurteilung des Nierengewebes und weiterer Organproben.....	41
5.1	Einbettung der Organe und Anfertigung von Gewebsschnitten	41
5.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	42
5.3	Konfokalmikroskopie.....	43
IV.	Ergebnisse	45
1.	Entwicklung und Charakterisierung des verwendeten Mikroplastiks	45
1.1	Markierungsoptionen der eigenproduzierten MP-Partikel	45
1.1.1	Evaluation zweier Fluorophore zur MP-Markierung anhand ihrer photophysikalischen Eigenschaften.....	46

1.1.2	Charakterisierung der hergestellten UCNPs zur MP-Markierung für quantitative Bestimmungen mittels ICP-OES.....	49
1.2	Einbettung der ausgewählten Label in die Polymermatrix (PS).....	51
1.2.1	Fasercharakteristika.....	52
1.2.2	Leaching von DPA und UCNPs aus der Matrix.....	53
1.3	Produktion des eigenen Mikroplastiks.....	54
1.3.1	Evaluation der MP-Produktionsstrategien anhand von Größe und Form.....	54
1.3.2	Charakterisierung der optimierten, eigenproduzierten MP-Fragmente zur Applikation.....	56
1.4	Charakterisierung und Qualitätskontrolle des zugekauften Mikroplastiks.....	59
1.4.1	FTIR – Materialkontrolle.....	60
1.4.2	Formen und Größenverteilung.....	61
2.	Deposition von MP im Organismus der Maus.....	63
2.1	Quantitative Vermessung der Ausscheidung und Distribution von Mikroplastik-Fragmenten in der Maus – Mikroplastik akkumuliert bereits nach einmaliger oraler Exposition in verschiedenen Organen.....	63
2.1.1	Exkretion des Mikroplastiks vorwiegend über Fäzes.....	64
2.1.2	MP-Akkumulation in Milz, Hoden und Pankreas besonders stark.....	64
2.1.3	99% oral aufgenommenen Mikroplastiks werden mit Fäzes eliminiert.....	66
2.2	MP-Funde in Organen und deren Lokalisation - jedes histologisch untersuchte Organ zeigte MP-Ablagerungen.....	67
2.2.1	Gehirn.....	68
2.2.2	Herz.....	69
2.2.3	Lunge.....	70
2.2.4	Leber.....	72
2.2.5	Magen.....	73
2.2.6	Proximaler Dünndarm.....	73
2.2.7	Distaler Dünndarm.....	74
2.2.8	Hoden.....	75
2.2.9	Skelettmuskel (Quadrizeps).....	76
3.	Lokalisation von Mikroplastik in der Niere <i>in vivo</i> : MP-Funde in Gefäßen, Glomeruli und Tubuli.....	77
3.1.1	Kontrollgruppe.....	77
3.1.2	Sphärische Polystyrol-Partikel.....	78
3.1.3	Irreguläre Polystyrol-Fragmente.....	79
3.1.4	Irreguläre Polypropylen-Fragmente.....	81
3.1.5	Irreguläre PET-Fragmente.....	83
4.	Überprüfung der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere nach MP-Applikation.....	85
4.1	MP-Applikation ex vivo in ipN reproduzierte Funde der in vivo Versuche.....	85

4.1.1	MP-Funde in Gefäßen ex vivo.....	85
4.1.2	MP-Funde in Glomeruli ex vivo.....	88
4.1.3	MP-Funde in Tubuli ex vivo.....	89
4.2	Mikroplastik führte zu gesteigerter Albumin-Reabsorption im proximalen Tubulus.....	90
4.2.1	Einzelauswertung.....	91
4.2.2	Gesamtauswertung.....	93
V.	Diskussion.....	95
1.	Nanofasern – ein vielversprechendes Grundmaterial zur Herstellung von realitätsgetreuem Mikroplastik zu Forschungszwecken.....	95
1.1	DPA als Fluoreszenzmarker favorisiert gegenüber Perylen.....	95
1.2	UCNPs: eine vielseitige Markierungsoption zur Detektion von MP.....	96
1.3	Nanofaser-Setup ermöglicht stabile und homogene Integration von Labeln.....	98
1.4	Nanofasern ermöglichen Herstellung kleiner MP-Fragmente sowie MP-Fasern.....	99
1.5	Charakterisierung zeigt realitätsnahe Mikroplastik-Partikel.....	100
1.6	Einsatz nicht-ionische Tenside zur Stabilisierung von MP-Suspension.....	100
1.7	Kommerziell erworbene Partikel weichen von angegebenen Größen ab.....	102
2.	Mikroplastik in allen untersuchten Organen zu finden.....	103
2.1	Fenestriertes oder diskontinuierliches Endothel begünstigt Mikroplastik-Ablagerungen.....	103
2.2	Exkretion von MP überraschenderweise auch mit Urin.....	105
2.3	Qualitative Untersuchungen zu MP in den Organen.....	106
2.4	MP-Aufnahme nach oraler Exposition: Persorption im Darm und Transport mit Lymphe.....	108
3.	Mikroplastik und die Niere: Mikroplastik-Fragmente selbst in Tubulussystem zu finden.....	110
3.1	Nur Fragmente in der Niere zu finden, keine Sphären.....	110
3.2	MP könnte lokale Immunreaktion auslösen.....	112
4.	MP-Fragmente beeinträchtigen die funktionelle Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere.....	114
4.1	Die ipN: ein geeignetes ex vivo Modell zur Untersuchung von MP-Auswirkungen.....	114
4.2	Erhöhte Albumindurchlässigkeit – Mikroplastik schädigt die GFB.....	115
4.3	Verstärkte Albuminfiltration begünstigt Nierenfibrose zusätzlich.....	116
VI.	Zusammenfassung.....	118
VII.	Appendix.....	119
1.	Verwendete Materialien.....	119
2.	Verwendete Reagenzien.....	119
3.	Verwendete Antikörper.....	121

Inhaltsverzeichnis

4.	Verwendete Geräte	122
5.	Verwendete Software	123
6.	Eidesstattliche Erklärung	123
VIII.	Literaturverzeichnis	124
IX.	Abbildungsverzeichnis	140
X.	Danksagung.....	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BSA.....	Bovines Serumalbumin
DMF.....	Dimethylformamid
DPA.....	9,10-Diphenylanthracen
FTIR-Spektroskopie.....	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GFB.....	Glomeruläre Filtrationsbarriere
ICP-OES.....	optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ipN.....	isoliert perfundierte Niere
IR.....	Infrarot
JGA.....	Juxtaglomerulärer Apparat
LDA.....	Laser-Doppler-Anemometrie
MP.....	Mikroplastik
NP.....	Nanoplastik
PET.....	Polyethylenterephthalat
PP.....	Polypropylen
PS.....	Polystyrol
ROS.....	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM.....	Rasterelektronenmikroskopie (<i>scanning electron microscopy</i>)
TEM.....	Transmissionselektronenmikroskopie
THF.....	Tetrahydrofuran
UCNPs.....	Upconverting Nanoparticles
α -SMA.....	alpha Smooth Muscle Actin

I. EINLEITUNG

1. Plastikverschmutzung – ein wachsendes Problem

Plastik ist ein äußerst vielseitiges Material, das sich durch seine chemische Inertheit, Langlebigkeit und Formbarkeit auszeichnet, weshalb es in nahezu allen Lebensbereichen unverzichtbar geworden ist. Die zahlreichen Kunststoffpolymere unterscheiden sich dabei in ihren spezifischen Eigenschaften und finden daher Anwendung in verschiedenen Gebieten. So wird Polystyrol (PS) beispielsweise häufig für Lebensmittelverpackungen und Einwegprodukte genutzt und Polypropylen (PP) aufgrund seiner Sterilisierbarkeit und chemischen Inertheit beispielsweise für Spritzen, Behälter, Laborausüstung und medizinische Textilien eingesetzt. Das Polykondensat Polyethylenterephthalat (PET) wird hingegen vorwiegend für Getränkeflaschen sowie für Arzneimittelverpackungen verwendet, findet jedoch auch in der Textilindustrie Gebrauch.

Durch den umfangreichen Einsatz des biopersistenten Materials¹ wird eine stetige Zunahme der globalen Plastikproduktion beobachtet², die zuletzt (im Jahr 2022) etwa 400 Millionen Tonnen pro Jahr erreichte, wobei Hochrechnungen davon ausgehen, dass sich diese Zahl bis 2050 sogar verdoppeln könnte³. Sollten die derzeitigen Trends fortbestehen, so gehen Schätzungen zudem davon aus, dass bis 2050 etwa 12 Milliarden Tonnen Plastikmüll in die Umwelt gelangen werden⁴. Etliche Plastikarten können dort allerdings nicht abgebaut werden und könnten somit über Jahrzehnte in Ozeanen, Landschaften und der Luft verbleiben und akkumulieren^{1,5}. Dort ist das Plastik Einflüssen wie mechanischem Abrieb, UV-Strahlung, aber auch biologischen Zersetzungsmechanismen ausgesetzt, deren Kombination dazu führt, dass mit der Zeit aus dem Plastik immer kleinere Partikel entstehen⁶ – sogenanntes Mikroplastik (MP) bzw. Nanoplastik (NP). Mikroplastik wird dabei größtenteils in einem Größenbereich von weniger als 5 mm definiert⁷, wohingegen der Begriff Nanoplastik meist Partikel von unter 1 µm⁸⁻¹², jedoch zuweilen auch unter 100 nm^{7,13,14} meint.

1.1 Mikroplastik in der Umwelt und in Nahrungsquellen

Schon jetzt ist Mikroplastik in der Umgebung weltweit allgegenwärtig und findet sich in etlichen Gewässern, Landschaften, Böden sowie in der Luft¹⁵⁻²¹. Für das Jahr 2030 wird derzeit mit einem weiteren Anstieg der MP-Emission von etwa 800 Milliarden (im Jahr 2024) auf 1,1 Billionen Tonnen in Größen von unter 0,5 cm gerechnet². Dabei entstammt das Mikroplastik nicht nur Plastikverpackungen²², sondern zu großen Teilen auch Textilien⁵.

Mikroplastik kommt in verschiedensten Formen vor, darunter Sphären, Fragmente, Fasern oder auch Folien. Mengenmäßig betrachtet bilden in der Umwelt und im Trinkwasser Fasern den größten Anteil, gefolgt von Fragmenten²³⁻²⁵. Sphärische Partikel hingegen bilden lediglich die sechstgrößte Gruppe²⁴. Hinsichtlich der verschiedenen verwendbaren Polymere zeichnet sich in der Literatur ab, dass Mikroplastik vorwiegend aus Polystyrol (PS), Polypropylen (PP) und Polyethylenterephthalat (PET) besteht²⁴.

Darüber hinaus gilt es zu bedenken, dass abgesehen von dem Mikroplastik selbst, auch ein Risiko von möglichen Zusätzen und adsorbierten Substanzen ausgeht. Gängige Zusätze bilden beispielsweise UV-Stabilisatoren, Weichmacher oder Farben²⁶. Adsorbiert werden an die MP-Partikel dagegen aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen häufig Arzneimittel²⁷ oder Schwermetalle, die in der Umwelt bzw. dem Wasser gegenwärtig sind^{28,29}.

1.2 Mikroplastik im Menschen

Jeder Mensch nimmt über den Tag unweigerlich Mikroplastik zu sich, sei es über Nahrung (z.B. Zucker, Honig, Meeresfrüchte oder Fleisch)³⁰, Flüssigkeitszufuhr (z.B. Mineralwasser, Bier, Kaffee oder Tee), die Haut³¹ oder die eingeatmete Luft^{21,30,32,33}. Selbst protektives Equipment wie z.B. ein medizinischer Mund- und Nasenschutz setzt Mikroplastik-Partikel frei³⁴, die direkt inhaliert oder oral aufgenommen werden können. Für die durchschnittlich in den Körper aufgenommene Menge an Mikroplastik liegen verschiedene Schätzungen vor, die sehr vom Lebensstil abhängen. So wird im Schnitt von 0,7 g MP (0,1-5 g) pro Woche ausgegangen bzw. einer Partikelzahl zwischen etwa 12.000 bis 190.000 pro Jahr, wobei Trinkwasser die größte MP-Quelle darstellt^{35,36}. Eine Wasserzufuhr aus Flaschen bedeutet dabei eine mehr als 20-fache MP-Aufnahme im Vergleich zu einer ausschließlichen Konsumierung von Leitungswasser³⁵. Aktuelle

Studien zeigten darüber hinaus, dass selbst im Rahmen von medizinischen Interventionen wie z.B. intravenösen Applikationen³⁷ und Injektionen^{38,39} oder auch von Koronarkathetern^{40,41} MP-Partikel in den Körper abgegeben werden.

Vor dem Hintergrund, dass der Mensch dem Mikroplastikvorkommen seiner Umwelt exponiert ist, erscheint es schlüssig, dass auch im Menschen hauptsächlich MP in Form von Fragmenten und Fasern gefunden wurde^{42,43}. Dabei fielen die meisten Partikel in die Größenbereiche 1-10 µm (42%) sowie 10-100 µm (42%)⁴³. Hinsichtlich der Plastikart ist ein breites Spektrum an Partikeln verschiedener Polymere im Menschen gefunden worden, zu denen z.B. Polystyrol, Polypropylen und Polyamide zählen, wobei besonders Polyester (wie z.B. PET) mit einem Anteil von fast 40% auffielen⁴³.

Mikroplastik, das in den menschlichen Körper gelangt, wird entweder mit Urin oder Fäzes ausgeschieden oder verbleibt im Körper. So wurden sowohl im menschlichen Urin kleinere Mengen an MP-Partikeln detektiert, sowie größere Mengen auch in den Fäzes^{44,45}. Einen interessanten Fund stellte diesbezüglich auch die Detektion von MP im Mekonium⁴⁶, dem ersten Stuhl von Neugeborenen, dar, der neben Funden in der Plazenta⁴⁷, der Muttermilch⁴⁸ sowie den Hoden⁴⁹, deutlich macht, dass die menschliche Reproduktion von einer MP-Exposition betroffen zu sein scheint⁵⁰. Darüber hinaus zeigten Funde in der Lunge⁵¹⁻⁵³, dem Sputum oder auch der Flüssigkeit nach bronchoalveolarer Lavage⁵⁴, dass eine Inhalation von Mikroplastik wahrscheinlich ist und somit der Respirationstrakt maßgeblich betroffen sein könnte. Neben lymphatischen Kompartimenten wie der Milz⁵⁵, waren auch in Stoffwechselorganen wie der Leber⁵⁵ und der Niere⁵⁶ MP-Partikel präsent. Selbst das Herzkreislauf-System zeigt sich mit Mikroplastik belastet, da auch im Blut⁵⁷, dem Herzen⁵⁸ sowie in Thromben⁵⁹ Partikel detektiert wurden. Abgesehen davon wurde kürzlich auch Mikroplastik in der Prostata⁶⁰, dem Gehirn⁶¹, dem Knochenmark⁶² sowie im Skelettmuskel⁶³ identifiziert.

Insgesamt wurde damit zum jetzigen Zeitpunkt bereits in zahlreichen menschlichen Organen Mikroplastik-Partikel gefunden, die vorwiegend über die eingeatmete Luft, Nahrung und Getränke in den Organismus gelangen⁴².

1.3 Verwendung von Mikroplastik in der derzeitigen Forschung

Richtet man den Blick nun auf das Mikroplastik, das derzeit in der Forschung Verwendung findet, fällt auf, dass es sich in manchen Punkten grundlegend von dem in

der Umwelt und im Menschen vorherrschenden Mikroplastik unterscheidet. Obwohl dort verschiedene Polymere zu finden sind und Fragmente sowie Fasern mehr als 80% der MP-Funde ausmachen, verwenden die meisten Studien in erster Linie sphärisches Mikroplastik aus Polystyrol²⁵, da dieses – im Gegensatz zu realitätsnahen Partikeln – sowohl gut verfügbar, als auch kosteneffizient ist. Hinsichtlich der verwendeten Größen nutze der Großteil der Studien Partikel zwischen 1-50 µm.

Daneben liegt ein großer Unterschied zwischen dem Mikroplastik der Umwelt und den häufig verwendeten PS-Sphären darin, dass das eingesetzte Forschungsmaterial weder die MP-Zusätze, noch mögliche Adsorbentien berücksichtigt.

1.4 Der Einfluss von Form und Größe auf die Effekte von MP

Dass in der Forschung vor allem runde Partikel Anwendungen finden, ist insofern kritisch zu betrachten, als dass die Form von Mikroplastik als einer der wichtigsten Faktoren angesehen wird, wenn es darum geht, den Verbleib sowie die Effekte von Mikroplastik in Organismen zu untersuchen^{25,64}. So ergaben Studien, in denen lediglich die Partikelform variabel war, dass beispielsweise die Ausscheidung von Fragmenten langsamer von statten ging als von runden Partikeln⁶⁵ und auch die negativen Effekte bei Fragmenten größer ausfielen als bei Sphären^{65,66}. Verschiedene Studien berichteten darüber hinaus, dass von MP-Fasern ein noch höheres Risiko ausgeht als von Fragmenten^{67,68}.

Dass auch die Größe des MPs eine entscheidende Rolle spielt, zeigten Studien mit sphärischen PS-Partikeln, die auf eine starke Korrelation zwischen Partikelgröße und Gewebsakkumulation der Partikel hindeuteten. Partikel im Größenbereich von 4-20 µm zeigten hierbei eine höhere Neigung, sich im Gewebe anzusammeln^{69,70}. Dem entsprechend zeigten Stock et al.⁷⁰ eine erhöhte Aufnahme von 4 µm großen PS-Sphären in intestinale Zellen. Begründet wurden diese Ergebnisse mit der Annahme, dass die 4 µm großen Partikel durch Phagozytose und Pinozytose und nicht nur durch Phagozytose aufgenommen werden können.

Die Datenlage verdeutlicht somit, dass die Verwendung realitätsnahen Mikroplastiks für aussagekräftige Toxizitätsstudien unerlässlich ist.

1.4.1 Ansätze zur Herstellung realitätsnahen Mikroplastiks

Um die Diskrepanz zwischen umweltgetreuem Mikroplastik und dem in der Forschung verwendeten zu überkommen, wurden verschiedene Ansätze erkundet, um faseriges bzw. fragmentiertes Mikroplastik herzustellen. Bisher verfolgte Ansätze, um MP-Fragmente zu erzielen, bestehen z.B. in Ultraschallbehandlung unter hydrolytischen Bedingungen⁷¹ oder einer im Labor nachgestellten Verwitterung der Partikel⁷², die jeweils eine breite Größenverteilung mit Durchmessern von 100 nm bis 1 mm erzielen. Daneben verwendete ein Großteil der Studien Kugelmöhlen, um das Material zu Größen zwischen 5-200 µm zu zerkleinern, wobei teilweise eine zusätzliche Stickstoffkühlung verwendet wurde, um das Material vorzuversprüden^{23,73-76}. Erste Versuche für die Herstellung von Mikroplastik-Fasern bestanden hingegen darin, kommerziell erhältliche Fasern mithilfe eines Kryotoms zu schneiden, wodurch Fasern mit den Dimensionen 10x10x40 µm erzielt werden konnten⁷⁷.

1.5 Labeling-Strategien für MP-Partikel

Die zweite Hürde, die es in Bezug auf die Produktion von Mikroplastik für Forschungszwecke wie z.B. histologische Applikationen zu nehmen gilt, ist es, diese zuverlässig und spezifisch detektieren zu können. Hierzu ist die Verwendung geeigneter Label und deren stabile Einbettung in die umgebende Matrix essentiell. Findet eine unzureichend stabile Integration des Labels in das Polymer statt, so kann das Label aus der Matrix ausbluten. In diesem Fall kann zum einen die Detektierbarkeit des Mikroplastiks vermindert sein, zum anderen ist es in Folge des Austretens nicht möglich zuzuordnen, ob beobachtete Effekte in den MP-Partikeln selbst begründet liegen oder dem Austreten des Farbstoffs aus diesen geschuldet sind^{25,78}. Im Falle von Labeln wie Nilrot ist ein Ausbluten aus der Matrix besonders kritisch, da dieses durch seine Fähigkeit an Chitin, Cellulose und Lipide zu binden, anschließend in der Probe zu falsch positiven Funden an natürlichem organischen Material führen kann⁷⁹.

Hinsichtlich der Integration eines Labels in MP-Partikel finden aktuell verschiedene Strategien Anwendung: Zum einen ein nachträgliches Einfärben des Mikroplastiks mit in Aceton oder Ethanol gelösten Farbstoffen⁷⁷, wobei teils zusätzlich Wärme zugeführt wird⁸⁰, zum anderen gemeinsames Einschmelzen und Verpressen von Farbstoff und Polymer bei 180 °C⁸¹, wobei die hohen Temperaturen die Auswahl von Polymer und

auch Label stark einschränken. Davon abgesehen besteht eine weitere Methode darin, Polymer und Farbstoff aufzulösen und gemeinsam zu präzipitieren, wobei in Bezug auf die Form jedoch lediglich sphärische Mikropartikel erzielt werden können ⁸².

Als Markierung bieten sich Fluorophore an, die mit ihrer hohen Quantenausbeute von bis zu 100% ⁸³, ihrer Kosteneffizienz und der einfachen Visualisierung mit standardmäßig ausgestatteten Fluoreszenzmikroskopen überzeugen. Typischerweise absorbieren Fluorophore Licht im UV/Vis-Bereich (etwa 200-800 nm) und emittieren in Richtung Rot verschobenes, also energieärmeres, sichtbares Licht ⁸³. Aufgrund der teils breiten Absorptions- und Emissionsbanden sollte die Auswahl eines Fluorophors mit Bedacht vorgenommen werden, um eine spektrale Überlappung zu verhindern und so zu gewährleisten, dass fluoreszenzmarkierte Antikörper der Immunhistochemie und das Mikroplastik gut voneinander getrennt werden können. Daneben können Fluorophore Ausbleich-Prozessen (Photobleaching) unterliegen, die vor allem in Bezug auf die Probenhandhabung und Langzeitmessungen Berücksichtigung finden sollten ⁸⁴.

Neben Fluorophoren, stellen UCNPs (Upconverting Nanoparticles) eine weitere Option zur Markierung von MP-Partikeln zu Forschungszwecken dar. Diese Partikel bestehen aus Übergangsmetallen, wie z.B. Yttrium, die meist mit Lanthanoiden oder Actinoiden, wie z.B. Ytterbium, Thulium oder Gadolinium dotiert sind. Die Besonderheit der Partikel steckt bereits in deren Namen: Sie sind zur Photonenaufwärtskonversion befähigt. Das bedeutet, sie absorbieren mehrere Photonen energiearmen Lichts, meist aus dem Infrarot-Bereich, und sind durch Energieübertragungen zwischen den verwendeten Elementen in der Lage, energiereicheres Licht, aus z.B. dem sichtbaren Bereich, zu emittieren ⁸⁵.

Bedeutende Vorteile der UCNPs bestehen in den schmalen Emissionsbanden, der sehr hohen chemischen Stabilität sowie der Tatsache, dass ihre Lumineszenz sich unter Bestrahlung nicht verändert und sie somit resistent gegenüber Photobleaching sind ^{86,87}. Die beschriebene Photostabilität der Partikel geht jedoch auf Kosten einer vergleichsweise geringen Quantenausbeute von maximal 13% ⁸⁸. Nichtsdestotrotz sind UCNPs durch ihre Anregung im Infraroten und Emission im UV/Vis-Bereich, vor allem für Gewebstudien attraktiv, da die Eindringtiefe des anregenden Lichts im Vergleich zu UV/Vis erhöht ist ⁸⁹⁻⁹² bei gleichzeitig sehr geringer Autofluoreszenz ⁹³. Darüber hinaus ermöglichen UCNPs ein Multiplexing mehrerer Materialien, die mit verschiedenen dotierten UCNPs markiert wurden, indem alle UCNPs sich mit derselben Wellenlänge

gleichzeitig anregen lassen, jedoch je nach Dotierung bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren^{85,93}. Abgesehen von den photophysikalischen Eigenschaften eröffnen UCNPs zudem eine Möglichkeit zur akkuraten Quantifizierung des markierten Materials mittels ICP-OES bzw. ICP-MS⁹⁴. Aufgrund der vielversprechenden Eigenschaften wurden bereits erste Versuche unternommen, UCNPs als Label in Mikroplastik zu integrieren⁹⁵.

1.6 Bekannte Effekte von Nano- und Mikroplastik auf Organismen

Neben der Frage, wie Mikroplastik in den Körper kommt und wo es verbleibt, ist aktuell Gegenstand der Forschung, welche Effekte es dort auslöst. Im Rahmen von Zellkulturexperimenten wurde vor allem die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und dadurch ausgelöster oxidativer Stress beobachtet^{12,96,97} sowie Entzündungsreaktionen mit Zytokin-Ausschüttung⁹⁸. Daneben zeigten sich in Nematoden unter anderem eine verkürzte Lebenszeit sowie eine Beeinflussung der Darmfunktion⁹⁹, wobei der negative Einfluss auf den Darm auch in Zebrafischen beobachtet wurde⁶⁸. In Fischmodellen waren zudem eine Neuro- und Immunotoxizität, Verhaltensänderungen¹⁰⁰, sowie Nierenschädigungen durch die MP-Exposition zu beobachten¹⁰¹. Ein großer Teil an Studien untersuchte vor allem Auswirkungen in Nagern, da diese als Säugetiere eine größere biologische Nähe zum Menschen aufweisen. Diese Studien dokumentierten eine Vielzahl an Effekten: Im Darm zeigten sich eine erniedrigte Mukusekretion, Störungen der Darmbarriere, Entzündungen sowie eine mikrobielle Dysbiose¹⁰². In der Leber waren neben Entzündungen auch Änderungen im Lipidmetabolismus zu beobachten^{103,104}. Weiter wurden Auswirkungen auf den Energie- sowie den Gallensäurenmetabolismus beschrieben^{102,105,106} und auch die Fortpflanzung zeigte sich darüber hinaus in Form einer Reproduktionstoxizität beeinträchtigt¹⁰⁷. Neueste Studien berichteten zuletzt nicht nur von Änderungen in Neurotransmitterleveln im Gehirn¹⁰⁸, sondern auch davon, dass Mikroplastikpartikel zu zerebralen Thrombosen und damit zu verändertem neurologischen Verhalten führten¹⁰⁹.

Auch Marker im Herzen sowie in der Niere zeigten Veränderungen durch Nano- und Mikroplastik^{103,110}. Am Herzen wurde darüber hinaus eine Kardiotoxizität beschrieben, bei der myokardiale Zellen beschädigt wurden¹¹¹.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Nano- und Mikroplastik speziessübergreifend zahlreiche Einflüsse auf diverse physiologische Abläufe nimmt, was die Bedeutsamkeit der Forschung auf diesem Gebiet unterstreicht.

2. Toxikokinetik: Mögliche Wege der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Fremdstoffen im Körper – das ADME-Modell

Wird eine Substanz als potentiell gesundheitsgefährdend bzw. toxisch eingeschätzt, so gilt es zwei Bereiche gezielt zu untersuchen: Die *Toxikodynamik* – d.h. inwiefern und auf welche Weise der Stoff den Organismus beeinflusst – und die *Toxikokinetik* – d.h. die Prozesse, denen der Stoff im Organismus unterliegt und wie diese ihn beeinflussen.

Die Abläufe im Rahmen der Toxikokinetik werden für gewöhnlich mithilfe des ADME-Modells beschrieben. Dieses beinhaltet die möglichen Mechanismen der Absorption bzw. Resorption, Distribution, Metabolisierung sowie der Elimination bzw. Exkretion ¹¹².

2.1 A – Absorption bzw. Resorption

Die Absorption bzw. Resorption beschreibt die Aufnahme einer Substanz in den Blutkreislauf oder das Lymphgefäßsystem, von wo aus anschließend eine Verteilung in verschiedene Kompartimente des Organismus stattfindet. In den meisten Fällen geschieht dies über Schleimhäute wie z.B. in der Nase bzw. üblicherweise über die des Verdauungstrakts, was als intestinale Absorption bezeichnet wird. Aufgrund seiner großen Oberfläche ist die Aufnahme über den Darm von besonderer Relevanz. Neben einer Absorption über die Schleimhäute, ist eine Aufnahme beispielsweise auch über die Lunge oder die Haut möglich. Wie gut eine Substanz absorbiert werden kann und damit einhergehend seine Bioverfügbarkeit, hängt mit verschiedenen Faktoren zusammen, wie z.B. der Löslichkeit des Stoffes, der Transitzeit in Magen und Darm, der Stabilität gegenüber Magensäure oder auch der Permeabilität durch die Darmwand.

Für die Absorption bzw. Resorption ist es daher grundlegend entscheidend, auf welchem Wege die Verabreichung stattfindet. Applikationen können beispielweise oral, inhalativ, intraperitoneal, intramuskulär, transdermal oder intravenös erfolgen.

Wird ein Stoff oral appliziert, z.B. über Nahrung, Tabletten oder auch eine Schlundsonde, so wird er primär im oberen Dünndarm absorbiert und gelangt so in den Blutkreislauf. Im Anschluss daran gelangt er über die Pfortader zur Leber, in der je nach Substanzeigenschaften eine Metabolisierung möglich ist. Erst nach Passage der Leber findet der Stoff seinen Weg in den systemischen Blutkreislauf. Für stark fettlösliche Substanzen besteht zudem die Möglichkeit, dass eine Absorption mit Lipiden in das Lymphsystem stattfindet. Eine weitere Besonderheit liegt für Stoffe vor, deren Ausscheidung biliär (mit der Galle) in den Zwölffingerdarm abläuft, da sie in distal liegenden Anteilen des Darms zum Teil oder vollständig reabsorbiert werden können – sie unterliegen in dem Fall dem *enterohepatischen Kreislauf*.

Anders verhält es sich, wenn eine Substanz durch eine intravenöse Applikation oder eine Aufnahme über das Lymphsystem direkt in die venöse Zirkulation aufgenommen wird. In diesem Fall wird der Stoff nicht zuerst über die Leber transportiert, sondern vom Herzen zunächst in die Lungen befördert, bevor es die arterielle Zirkulation erreicht. Von dort aus findet dann die Verteilung in nachfolgende Organe, wie die Leber oder die Niere, statt ^{112–115}.

2.1.1 Das lymphatische System

Dem lymphatischen System wird im Rahmen der Absorption meist weniger Bedeutung zugemessen als Hauptakteuren wie dem Darm. Neben den immunologischen Funktionen besteht jedoch eine der Hauptaufgaben des lymphatischen Systems im Abtransport von überschüssiger Gewebsflüssigkeit aus dem Interstitium und Proteinen bzw. weiteren Stoffen wie Fetten aus der Verdauung (in Form von Chylomikronen) oder auch externer Noxen in den venösen Blutkreislauf. Die Lymphe selbst besteht folglich aus extrakapillärer Flüssigkeit, die unter anderem Proteine, Chylomikronen, aber auch Elektrolyte und Lymphozyten (weiße Blutkörperchen) enthält.

Das Lymphgefäßsystem besteht im Kern aus vier verschiedenen Gefäßtypen: Die erste und kleinste anatomische Einheit bilden dabei die initialen Lymphgefäße, auch Lymphkapillaren genannt, die offen im Interstitium beginnen und ein Lumen von etwa 50 µm Durchmesser aufweisen. Die in ihnen entstandene Lymphe vereinigt sich anschließend in Sammelgefäßen, den 100 µm weiten Präkollektoren sowie nachfolgend den 150-600 µm weiten Kollektoren, die sie weiter abtransportieren. Im Anschluss führt

der Weg über Lymphgefäße in die sog. Lymphstämme wie beispielsweise den *Truncus trachealis* (Lufttröhrenstamm) oder den *Ductus thoracicus*. Sie versammeln in sich entsprechend die gesamte Lymphe und münden anschließend über die Venenwinkel in die venöse Blutbahn. Zwischengeschaltet sind in dieser Lymphbahn die Lymphknoten, deren Aufgaben in der Immunabwehr sowie der Filtration der Lymphe liegen ¹¹⁶.

2.2 D – Distribution

Der Begriff Distribution beschreibt die Verteilung einer aufgenommenen Substanz im Körper. Dies erfolgt meist mit dem Blutstrom, mit dem die Substanz in unterschiedlichem Ausmaß zu Muskeln und Organen transportiert wird. In welchen Mengen der Stoff an welchen Ort transportiert wird, hängt von mehreren Faktoren ab, u.a. der Größe des Stoffs, seiner Polarität, seiner Fähigkeit an Plasmaproteine zu binden sowie maßgeblich der regionalen Durchblutung der einzelnen Organe und Gewebe ^{112,113,115}. Je nach den Eigenschaften eines Stoffes, können Barrieren wie z.B. die Blut-Hirn-, die Blut-Plazenta oder auch die Blut-Hoden-Schranke die Distribution substantiell beeinflussen, indem sie bestimmte Stoffe stärker zurückhalten. Im Gegenteil dazu erleichtern fenestrierte und diskontinuierliche Endothelien den Übertritt in das Gewebe. Fenestrierte Endothelien finden sich beispielweise in den Glomeruli sowie peritubulären Gefäßen der Niere, der Darm- sowie Nasenschleimhaut und endokrinen Organen wie z.B. der Nebenniere oder dem endokrinen Pankreas ¹¹⁷⁻¹²⁰. Diskontinuierliche Endothelien hingegen treten z.B. in Sinusoiden der Leber und der Milz auf ^{121,122}.

2.3 M – Metabolismus

Manche Substanzen, die im Körper aufgenommen und verteilt wurden, können metabolisiert, also zu aktiven oder inaktiven Verbindungen, den sogenannten Metaboliten, verstoffwechselt werden. Man spricht in diesem Kontext auch von Biotransformation. Hauptort der Metabolisierung ist dabei die Leber, die meist mithilfe von Cytochrom-P450-Enzymen (CYP-Enzymen) Ausgangsstoffe zu Metaboliten verändert. Allerdings dienen auch andere Orte untergeordnet als metabolische Einheiten, wie z.B. Gehirn, Darm, Haut, Lunge oder Niere. Ziel einer solchen Verstoffwechslung ist grundsätzlich, lipophile Substanzen zu hydrophileren Metaboliten zu machen, um damit

die Ausscheidung in Galle oder Niere zu erleichtern. Diese Metabolisierung ist generell in zwei Mechanismen, Phase-I- und Phase-II-Reaktionen, untergliedert. Ziel der Phase-I-Reaktionen ist es, funktionelle Gruppen wie z.B. Hydroxyl- oder Aminogruppen einzufügen oder herauszulösen. Dies geschieht meist über oxidative, reduktive oder auch hydrolytische Prozesse. Bei Phase-II-Metabolisierungen werden Substanzen oder deren Phase-I-Metabolite hingegen mit endogenen Substraten wie z.B. Glucuronsäure oder Glutathion konjugiert ¹¹²⁻¹¹⁵.

2.4 E – Elimination bzw. Exkretion

Die Ausscheidung einer Substanz aus dem Körper wird in zwei Arten unterschieden: Die *Elimination*, d.h. nach Verstoffwechslung (Metabolisierung), und die *Exkretion*, was bedeutet, dass der Stoff den Organismus ohne Verstoffwechslung verlässt ¹²³. Findet die Ausscheidung nicht vollständig statt, so akkumuliert die Substanz über die Zeit im Organismus.

Aufgenommene Noxen, so wie auch Pharmaka, können auf verschiedene Weisen ausgeschieden werden. Die beiden Haupttrouten sind dabei: *Renal*, über die Niere durch z.B. glomeruläre Filtration, wobei die Substanz schlussendlich mit dem Urin den Körper verlässt, und *biliär*, über die Leber, was eine Ausscheidung mit den Fäzes zur Folge hat. Darüber hinaus ist eine Elimination bzw. Exkretion auch *pulmonal*, über die Lunge und damit die ausgeatmete Luft, oder *intestinal*, durch eine Sekretion ins Lumen des Dickdarms möglich. Seltener verlässt eine Substanz den Organismus über die Haut durch Evaporation, durch Abgabe über Haare bzw. Schweiß- und Talgdrüsen oder auch über die Brustdrüsen in der Muttermilch ^{112,113,115}.

In Anbetracht der vier Komponenten des ADME-Modells fällt ein Organ bei drei dieser Teilprozesse auf: die Niere. Im Rahmen der Distribution, da sie das am besten durchblutete Organ in Relation zu ihrem Gewicht ist und gleichzeitig ein fenestriertes Endothel besitzt, daneben bei der Metabolisierung, da sie zu Phase-II-Metabolisierungen (z.B. Konjugation mit Glucuronsäuren) befähigt ist und zuletzt bei der Elimination bzw. Exkretion, da sie eines der zwei wichtigsten Organen für die Ausscheidung von aufgenommenen Substanzen darstellt ¹¹⁴.

3. Die Niere – Funktion und Anatomie

Kaum ein Organ übernimmt so viele diverse Aufgaben im Körper wie die Niere. Sie ist zu Metabolisierungen befähigt, ist beteiligt an der langfristigen Regulation des Blutdrucks sowie auch der Homöostase, bildet essentielle Hormone wie z.B. Erythropoetin oder Renin und übernimmt mithilfe ihrer Filtrationsfunktion auch die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen ¹²⁴.

Anatomisch betrachtet liegen die Nieren unterhalb des Zwerchfells in der Fossa lumbalis beidseits der Wirbelsäule. Mit beeindruckenden 20-25% des Herzminutenvolumens ist die Niere in Relation zu ihrem Gewicht, das am stärksten durchblutete Organ. Der Zufluss erfolgt hierbei über die *Arteria renalis*, der Abfluss über die *Vena renalis*. Daneben ist die Niere durchzogen von Lymphgefäßen und besitzt neben dem Abfluss für Blut einen weiteren Abfluss für den Harn, den Ureter. Die Ureter der rechten und linken Niere führen jeweils in die Harnblase, von wo aus der Urin durch die Harnröhre (Urethra) ausgeschieden werden kann ¹¹⁶.

Makroskopisch untergliedert ist die Niere dabei in das Nierenparenchym, bestehend aus Nierenrinde (*Cortex renalis*) und äußerem bzw. innerem Nierenmark (*Medulla renalis*), und das Nierenbeckenkelchsystem. Das Nierenparenchym beinhaltet pro Niere mehr als eine Millionen Nephrone, die kleinsten funktionellen Einheiten der Niere. Ein Nephron besteht dabei aus einem Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*) mit der glomerulären Filtrationsbarriere und einem zugehörigen kanalartigen Tubulussystem, das über Sammelrohre mit dem Nierenbeckenkelchsystem verbunden ist ^{114,116,124}.

ermöglicht. Darüber hinaus ist der JGA durch seine Bildung von Renin maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks und Elektrolythaushaltes beteiligt ^{114,116,124}.

Im Anschluss an den Harnpol findet sich wie oben erwähnt das Tubulussystem der Niere, dessen Hauptaufgabe die Aufkonzentrierung des Primärharns ist, wobei sowohl resorptive als auch sekretorische Prozesse zum Tragen kommen. Hierzu durchläuft der Primärharn zunächst die *Pars convoluta* sowie die *Pars recta* des proximalen Tubulus, gefolgt einem Intermediärtubulus und erreicht im Anschluss die *Pars recta* sowie die *Pars convoluta* des distalen Tubulus, der schlussendlich gemeinsam mit weiteren distalen Tubuli durch Verbindungstubuli in einem Sammelrohr mündet und so den Endharn in das Nierenbeckenkelchsystem ableitet. Die *Pars recta* des proximalen Tubulus wird gemeinsam mit dem Intermediärtubulus und der *Pars recta* des distalen Tubulus auch als Henle-Schleife bezeichnet ^{114,116,124}.

Lokalisiert sind die einzelnen Nephronabschnitte im Nierenparenchym wie folgt: Der Cortex umfasst sämtliche Nierenkörperchen, alle gewundenen Anteile (*Partes convolutae*) der proximalen und distalen Tubuli sowie Abschnitte mancher Sammelrohre. Die angrenzende äußere Medulla beinhaltet die geraden Anteile (*Partes rectae*) der proximalen und distalen Tubuli, sowie Teile der Intermediärtubuli und Sammelrohre. In der inneren Medulla befinden sich entsprechend die übrigen Anteile von Intermediärtubuli und Sammelrohren ^{114,116,124}.

3.1 Die glomeruläre Filtrationsbarriere (GFB)

Die glomeruläre Filtrationsbarriere, die pro Tag etwa 180 L Primärharn aus dem Blut abfiltriert, befindet sich in den Nierenkörperchen zwischen dem Kapillarlumen der Glomerulusschlingen und dem Raum der Bowman-Kapsel. Dieser Filter besitzt einen dreischichtigen Aufbau: von der Blutseite beginnend bildet das Endothel der Glomeruluskapillaren mit seinem fenestrierten Endothel die erste Filtrationseinheit. Die feinen Poren des Endothels weisen hierbei einen Durchmesser von etwa 50-100 nm auf. Dem fenestrierten Endothel schließt sich die ihrerseits ebenfalls aus drei Schichten bestehende glomeruläre Basalmembran an. In ihrem Netzwerk aus Collagen IV, Laminin und Nidogen, finden sich Einlagerungen von Glykosaminglykanen, die aufgrund ihrer Ladung eine Anionenbarriere bilden. Abschließend liegt der glomerulären Basalmembran eine Podozytenschicht (auch als viszerales Blatt der Bowman-Kapsel bezeichnet) auf, die

eine negative Glykokalyx besitzt. Durch ein Ineinandergreifen der Fußfortsätze dieser spezialisierten Epithelzellen, entsteht ein Schlitzdiaphragma, das Poren von etwa 4x14 nm im Durchmesser aufweist. Zusammen entsteht daraus ein komplexes Filtrationssystem, das sowohl größen- als auch ladungsselektiv agiert.

Entsprechend dieser Selektionskriterien ergibt sich ein Ultrafiltrat, das zum größten Teil aus Wasser und kleinen Molekülen wie Harnstoff oder Glukose besteht. Eine freie Filtration von Stoffen ist nur dann möglich, wenn deren Radius unter 1,6-1,8 nm (ca. 6-15 kDa) liegt. Für größere Moleküle, wie Globuline, deren Radius sich bei etwa 4,4 nm (80 kDa) bewegt, ist der Filter im Normalzustand undurchlässig, genau wie für die noch deutlich größeren Erythrozyten. All solche Moleküle, die sich zwischen diesen beiden Grenzen bewegen, werden nur teilweise filtrierte, wobei deren Ladung entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Filtration, den sog. Siebkoeffizienten, hat.

Mit 69 kDa stellt das negativ geladene Serumalbumin genau einen solchen Fall dar, wobei dessen glomerulärer Siebkoeffizient mit $< 0,001$ sehr gering ausfällt. Der geringe Anteil an filtrierte Albumin (unter physiologischen Bedingungen) sowie größere, pathologische Mengen an filtrierte Albumin, denen ein Zugrundegehen der Größen- oder Ladungsselektivität der GFB zugrunde liegen kann, kann dem Primärharn jedoch bis zu einem gewissen Grad von den Zellen des proximalen Tubulus durch eine rezeptorvermittelte Endozytose mithilfe von Megalin und/oder Cubilin wieder entzogen werden ¹²⁴.

3.2 Regenerationspotential der Niere

Manche Organe, wie z.B. die Leber, besitzen ein herausragendes regeneratives Potential, das es ihnen ermöglicht, sich selbst von großen Schädigungen wieder zu erholen ¹²⁵. Bei der Niere von Säugetieren verhält es sich hingegen anders – sie zeigt nur begrenzte regenerative Fähigkeiten im Hinblick auf Läsionen oder Beeinträchtigungen ¹²⁶. Die Forschung konzentriert sich dabei auf drei Hauptfragen: die Regenerationsfähigkeit terminal differenzierter Zellen der adulten Niere, die Existenz multipotenter Vorläuferzellen, sowie die Rolle extrarenaler Zellen bei der Nierenreparatur. Studien liefern diesbezüglich Hinweise, dass überlebende Tubulusepithelzellen nach einer Läsion proliferieren und sich dedifferenzieren können, um Reparaturvorhänge zu unterstützen, während aktivierte Makrophagen in der Niere Proteine induzieren können, die die

Tubulusreparatur fördern. Darüber hinaus wird die Identifizierung möglicher Nierenstammzellen diskutiert, die in der Lage sind, verschiedene Nephronepithelien zu bilden. Passend dazu wurden auch Zellen, die Stammzellmarker exprimieren, aus menschlichen Nieren isoliert und es konnte gezeigt werden, dass diese in Nierenepithel und -endothel differenzieren und so die Heilung akuter Nierenverletzungen begünstigen können. Zuletzt kamen zudem Hinweise auf, dass Knochenmarksstammzellen in die Niere migrieren und dort an der Regeneration nach akuten Schädigungen beteiligt sein können ¹²⁷.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zwar Hinweise auf Reparaturmechanismen gibt, an denen verschiedene Zelltypen beteiligt sind, das Regenerationspotenzial der Niere im Vergleich zu anderen Organen allerdings trotzdem begrenzt ist.

II. FRAGESTELLUNG

Die Produktion und Nutzung sowie die daraus resultierende Deposition von Plastik in der Umwelt steigen immer weiter an. In logischer Konsequenz erhöht sich durch dessen stetige Degradation damit auch die Menge des entstehenden Mikroplastiks. Da der Mensch tagtäglich der oralen sowie inhalativen Aufnahme dieser Partikel unvermeidlich ausgesetzt ist, ist es essenziell, tiefere Erkenntnisse zu gewinnen, welche strukturellen und funktionellen Konsequenzen diese Exposition nach sich zieht.

Für eine realistische Einschätzung dieser Auswirkungen ist es notwendig, realitätsnahes Mikroplastik zu verwenden. Diese Forschungsarbeit sollte daher mit einer Produktion von fragment- und faserförmigen Partikeln zunächst der Diskrepanz zwischen dem Mikroplastik der Umwelt und den in der Forschung verwendeten Sphären beikommen.

Da von einer Mikroplastik-Aufnahme Schädigungen ausgehen könnten, sollte sich die Arbeit mit der Toxikokinetik sowie der Toxikodynamik der Partikel befassen.

Im Rahmen der Toxikokinetik sollten vor allem die Distribution des Materials nach oraler Aufnahme und dessen Exkretion untersucht werden. Während die Untersuchungen zur Exkretion die Hauptroute der Ausscheidung untersuchen sollten, dienen die Distributionsanalysen dazu, zu ermitteln, welche Organe besonders von Mikroplastik-Ablagerungen nach oraler Verabreichung betroffen sind und ob bestimmte Gewebetypen mit z.B. fenestriertem Endothel stärkere Akkumulationen zeigen.

Mit ihrer hohen Durchblutungsrate könnte besonders viel Mikroplastik über die Blutbahn in die Niere geleitet werden und sich dort in den glomerulären Kapillaren verfangen. Dort angerichtete Schäden wären aufgrund der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des Organs besonders bedenklich. Da realitätsnahe MP-Fragmente mit ihren Ecken im Gegensatz zu sphärischen Partikeln stärkere Läsionen in Gefäßen und Gewebe hervorrufen könnten, sollte im Rahmen der toxikodynamischen Untersuchungen die Hypothese geprüft werden, dass MP-Partikel verschiedener Formen sich in ihren Auswirkungen auf die Niere unterscheiden und realitätsnahe, fragmentierte Partikel dabei ein höheres Risiko bergen als die klassischen, sphärischen Forschungspartikel. Daneben sollte überprüft werden, ob die Partikel die GFB überwinden können und sie dabei unweigerlich beschädigen würden.

III. METHODEN

1. Produktion von realitätsnahem Mikroplastik

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Eigenproduktion von Mikroplastik-Fragmenten angestrebt, da kommerziell erwerbliche Partikel meist nur als Sphären (runde Partikel) angeboten werden. Zudem sind zu kaufende Partikel wenig individualisierbar hinsichtlich Polymer, Größe, Markierung und möglicher Zusätze. In der Umwelt kommt Mikroplastik jedoch vorwiegend in Form von Fragmenten und Fasern vor. Aus diesem Grund wurde die Herstellung dieser beiden MP-Formen angestrebt mit dem Ziel, dass individuelle Markierungen in die Matrix eingebettet werden können, um die Partikel später im Gewebe detektieren zu können.

1.1 Nanofaser-Spinning

Als Grundlage für die Mikroplastik-Fragmente wurden Polystyrol-Nanofasern gewählt, da sie bereits zwei Dimensionen im einstelligen Mikrometerbereich aufweisen. Die Nanofasern wurden mithilfe eines Elektrospinning-Prozesses produziert. Hierfür wurde eine Basis-Spinninglösung aus 15 m% Polystyrol (PS) (MW ~ 28.000) in einem 1:1-Gemisch aus Dimethylformamid (DMF) und Tetrahydrofuran (THF) über Nacht im Dunkeln gerührt.

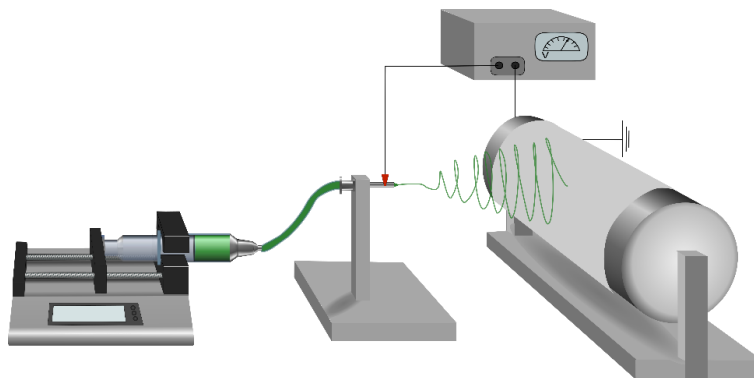


Abbildung 2: Elektrospinning-Setup zur Herstellung von Nanofasern mithilfe von Hochspannung.

Das Elektrospinning der Nanofasern erfolgte anschließend bei einer Hochspannung von 11 – 12 kV bei 22 °C Umgebungstemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von unter 35%. Die Lösung wurde mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ durch vier 18G-Nadeln

geleitet, die in einem hausintern gebauten Vierfach-Nadelhalter eingebaut waren. Der Abstand zwischen Nadel und Kollektor betrug jeweils 15 cm. Als Kollektor diente eine Drehtrommel (Easy Drum, Linari NanoTech). Die entstehenden Nanofasern wurden jeweils 3 h auf Aluminiumfolie gesammelt und vor der Vermahlung zu Mikroplastik-Partikeln von der Folie abgelöst.

Die Größenverteilung wurde anhand von SEM-Aufnahmen mithilfe von ImageJ ermittelt.

1.2 Degradierung der Nanofasern zu Mikroplastik

Zur Degradierung der Nanofasern zu Mikroplastik-Partikeln wurden verschiedene Methoden evaluiert. Hierzu gehörten Mahlprozesse mit einer Planeten-Kugelmühle, eine kryogene Vermahlung, sowie eine Zerkleinerung mithilfe eines Ultraturrax.

1.2.1 Vermahlung mit einer Planeten-Kugelmühle

Die gesponnenen PS-Nanofasern wurden unter Einsatz einer Planetenkugelmühle (PM100, Retsch) zerkleinert. Hierzu wurden die Nanofasern in den Mahlbecher (50 mL) überführt und sieben große Mahlkugeln (Durchmesser: 10 mm) hinzugegeben. Für optimale Vermahlungsbedingungen und um Metallabrieb zu vermeiden, sollte der Mahlbecher zu einem Drittel mit Ausgangsmaterial und einem Drittel Mahlkugeln gefüllt sein, während das restliche Drittel leeren Raum zur Bewegung der Kugeln bietet. Werden Nanofasern vermahlen, so nimmt die anfangs eingefüllte Menge von einem Drittel nach sehr kurzer Zeit auf einen Bruchteil davon ab, was zu einer Unterbefüllung führt und den Mahlvorgang beeinträchtigt. Aufgrund dessen waren mehrere Vorvermahlungsschritte nötig, um die Fasern zu größeren Fragmenten vorzuzerkleinern und so eine konstante Füllung zu einem Drittel zu erzielen. Die Vorvermahlung erfolgte bei 550 rpm für je 30 s, wobei nach jedem Schritt neue Nanofasern hinzugefügt und vorzerkleinert wurden. Sobald die vorgebrochenen Fasern den Mahlbecher zu etwa einem Drittel füllten, begann die Hauptvermahlung mit neun Zyklen bestehend aus zwei Minuten Vermahlung bei 550 rpm sowie einer Minute Zwischenkühlung des Mahlbeckers auf Eis, um während des gesamten Prozesses eine Temperatur unter 100 °C (Glasübergangtemperatur von Polystyrol) gewährleisten zu können.

Als Alternative zu den sieben großen Kugeln wurde der gleiche Prozessablauf mit ungefähr 3000 kleineren Mahlkugeln (Durchmesser: 2 mm) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Zerkleinerung durch eine erhöhte Reibungskraft, während durch die geringere Kugelgröße die Prallkraft abnahm. Dies vermindert einerseits den Abrieb des Equipments, bedeutet jedoch gleichzeitig eine erhöhte Wärmeentwicklung, die Zwischenkühlungsschritte noch essentieller macht.

In einem dritten Setup erfolgte eine Kombination der beiden vorherigen Methoden, in dem nach der Vorvermahlung neun Zyklen mit den großen Kugeln, sowie anschließend neun Zyklen mit den kleinen Kugeln inklusive der zugehörigen Zwischenkühlungen durchlaufen werden. Auf diese Weise wird die Prallwirkung der großen Kugeln zu Beginn der Vermahlung mit der Reibungswirkung der kleinen Kugeln in der zweiten Hälfte des Prozesses kombiniert.

1.2.2 Kryogenvermahlung

Zur Testung einer kryogenen Vermahlung (CryoMill, Retsch) wurden extern weitere Nanofasern vermahlen. Im Zuge dessen wurde der Mahlbecher (50 mL) mit 400 mg Nanofasern zusammen mit acht Mahlkugeln (Durchmesser: 12 mm) befüllt und für 13 min durch eine Umspülung mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Vermahlung erfolgte mit neun Zyklen zweiminütiger Vermahlung bei 30 Hz gefolgt von jeweils einer Minute Zwischenkühlung.

1.2.3 Zerkleinerung via Ultraturrax

Ein zusätzlicher Ansatz zur Degradierung des Grundmaterials unter Erhaltung der fasrigen Struktur bestand in der Verwendung eines Ultraturrax (IKA T18 basic), dessen Zerkleinerungsmechanismus auf einem Rotor-Stator-Prinzip basiert. Aufgrund der Hydrophobizität (Benetzungswinkel: etwa 94°)¹²⁸ wurden 240 mg Polystyrol-Fasern mit 20 mL einer 1 m% Sojalecithin-Lösung vermenget, um die Fasern adäquat zu suspendieren. Um der Schererwärmung entgegenzuwirken, wurde der gesamte Prozess auf Eis durchgeführt. Die Zerkleinerung erfolgte durch einminütige Schredder-Zyklen kombiniert mit jeweils fünf Minuten Zwischenkühlung. Es erfolgten insgesamt sieben Minuten Schreddern (sieben Zyklen). Anschließend wurde ein Teil der entstandenen Suspension mithilfe eines Metallsiebes (20 μm , pluriSelect) filtriert.

1.3 Luminophores Labeling

Um das Mikroplastik später in Gewebe detektieren zu können, wurden verschiedene Fluorophore sowie Upconverting Nanoparticles (UCNPs) evaluiert und für eine spätere Markierung der MP-Partikel gewählt.

1.3.1 Auswahl eines geeigneten Fluorophors

Zur Evaluierung der Fluorophore sowie der Identifizierung derer optimaler Doping-Bereiche wurden aus den gelabelten Spinninglösungen Polymerfolien durch *knife coating* (Messerbeschichtung) hergestellt. Aufgrund derer Absorption im (Ultra)Violetten, wurden als mögliche Fluorophore 9,10-Diphenylanthracen (DPA) und Perylen evaluiert. Zur Identifizierung der optimalen Doping-Konzentrationen wurden den Polymermischungen jeweils verschiedene Fluorophor-Konzentrationen zugesetzt.

Zur Herstellung von Fluoreszenz-gelabelten Polymerfolien durch *knife coating* wurden Mylarträger auf einem hausintern gebauten *knife coater* aufgebracht und die Dicke der entstehenden Folien mithilfe eines Spacers auf 30 µm eingestellt. Nach Zugabe von 330 µL der gewünschten Polymer-Farbstoff-Lösung wurde das Messer über die Folie gezogen, was zu einheitlichen Polymerfilmen führte. Diese wurden anschließend bei 80 °C für 3 – 4 h getrocknet.

Die gecoateten Folien wurden hinsichtlich ihrer Absorbanz (300 – 700 nm, Schrittweite: 1 nm) und Fluoreszenz mit einem Microplate-Reader (BioTek, Agilent) vermessen. Der Mittelwert sowie die Standardabweichungen ergaben sich aus Messungen an acht verschiedenen Stellen der Folie.

1.3.2 Upconverting Nanoparticles (UCNPs) als Label

Als Upconverting Nanoparticles (UCNPs) werden nanoskalige Partikel mit einem Durchmesser von 1-100 nm beschrieben, die eine Photonenaufwärtskonversion aufweisen. Im Rahmen der Photonenaufwärtskonversion erfolgt die Absorption zweier oder mehrerer einfallender Photonen relativ geringer Energie, welche in ein emittiertes Photon mit höherer Energie umgewandelt werden. In der Regel erfolgt die Absorption im nahen Infrarotbereich, während die Emission im sichtbaren und/oder ultravioletten Spektralbereich beobachtet wird. Die Anregung durch langwelliges Licht und die daraus

resultierende Penetrationstiefe sowie die hohe Photostabilität¹²⁹ machen UCNPs besonders interessant für Applikationen in Geweben.

1.3.2.1 Synthese von Kern-UCNPs

Zur späteren Einbettung in Nanofasern und somit MP-Fragmenten, wurden (Yb,Tm)-gedopte, kubische NaYF₄-UCNPs synthetisiert. Hierzu wurden für Ansatz von 5 mmol YCl₃×6 H₂O (3,72 mmol, 78%), YbCl₃×6 H₂O (1,25 mmol, 25%) und TmCl₃×6 H₂O (0,015 mmol, 0,3%) in Methanol dispergiert und unter Stickstofffluss in einen Dreihalsrundkolben überführt. Nach Zugabe von Ölsäure (30 mL) und 1-Oktadecen (50 mL) wurde die Mischung auf 110 °C geheizt und einem einstündigen Vakuum ausgesetzt. Die Mischung wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und Ammoniumfluorid (20 mmol), Natriumoleat (15,65 mmol) und 1-Oktadecen (25 mL) hinzugefügt. Nach einer weiteren 50-minütigen Vakuumphase und anschließendem Entgasen der Lösung wurde die Mischung unter Reflux bis auf 315 °C erhitzt (16 °C·min⁻¹) und dort für 20 min gekocht. Im Anschluss wurde die Lösung zügig auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Aufreinigung wurde das Reaktionsgemisch nach Präzipitation mit Ethanol bei 3850 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde danach dreimal in Cyclohexan redispersiert, erneut mit Ethanol gefällt und zentrifugiert. Zuletzt wurden die Partikel in 30 mL Cyclohexan aufgenommen und ein letztes Mal bei 1200 g für fünf Minuten zentrifugiert, um Aggregate abzutrennen. Die Lagerung der endgültigen Dispersion erfolgte bei 8 °C.

1.3.2.2 Ummantelung der UCNP-Kernpartikel

Zur Verbesserung der Upconversions-Effizienz wurden die UCNP-Kernpartikel mit einer inerteren NaYF₄-Hülle versehen. Zur Ummantelung wurden kubische NaYF₄-Partikel als Vorläufermaterial synthetisiert. Hierbei wurde in einem 10 mmol-Ansatz YCl₃×6 H₂O (10 mmol, 100%) in etwas Methanol aufgelöst und unter Stickstoff-Fluss in einen Dreihalsrundkolben eingebracht. Ölsäure (80 mL) und 1-Oktadecen (150 mL) wurden hinzugegeben bevor das Gemisch auf 160 °C erhitzt und ein 30-minütiges Vakuum angelegt wurde. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden NH₄F (40 mmol) und NaOH (25 mmol, in MeOH gelöst) zugefügt und die Reaktion erneut erhitzt, in diesem Fall auf 120 °C und so für weitere 30 min gekocht. Es folgte eine weitere Aufheizung auf

240 °C unter Reflux ($16\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$). Im Anschluss wurde die Reaktion schnell auf Raumtemperatur abgekühlt und nach dem gleichen Schema wie für die Kern-Partikel (s. 1.3.2.1) aufgereinigt.

Um etwa 3 nm dicke Hüllen zu generieren, wurden die hexagonalen Kernpartikel in Cyclohexan (1 mmol), Ölsäure (5 mL) und 1-Oktadecen (5 mL) dispergiert, in einen Dreihalsrundkolben überführt und unter dauerhaftem Stickstoffstrom auf 100 °C erhitzt. Die kubischen Vorläufer-Partikel (1,7 mmol) wurden daneben in einem weiteren Kolben in Cyclohexan, Ölsäure (8,55 mL) und 1-Oktadecen (8,55 mL) ebenfalls auf 100 °C aufgeheizt. Es wurde an beide Kolben ein einstündiges Vakuum angelegt. Danach wurde der Kolben mit den Kernpartikeln in Stickstoffatmosphäre auf 315 °C ($16\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$) erhitzt. Während der Erhitzung wurden kubisch Hüllen-Vorläufer-Partikel in folgendem Ablauf mithilfe einer Spritze hinzugegeben: Bei einer Temperatur von 230 °C wurde das erste Mal 1 mL der Kuben hinzugefügt. Nach Erreichen der 315 °C wurden alle acht Minuten zunehmend mehr Hüllen-Vorläufer beigefügt, um ein gleichmäßiges Hüllenwachstum zu gewährleisten. Nach vollständiger Zugabe der Kuben wurde das Gemisch für weitere 8 min auf 315 °C gehalten und anschließend wieder zügig auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Aufreinigung erfolgte ebenfalls wie unter 1.3.2.1 beschrieben.

1.3.2.3 Oberflächenmodifikation

Um die synthetisierten UCNPs in die Nanofasern und damit das spätere Mikroplastik einbetten zu können, musste ein Ligandenaustausch durchgeführt werden, bei dem die Ölsäure-überzogenen Partikel in DMF überführt werden. Für einen Ansatz von 100 mg wurden die in Cyclohexan dispergierten Partikel in einen Rundkolben eingebracht und 6 mL DMF unter stetigem Rühren beigemischt. Anschließend wurde die Mischung für 10 min bei 30 °C erhitzt, NOBF_4 (150 mg) hinzugefügt und die Temperatur auf 60 °C weiter erhöht. Die Reaktion wurde nachfolgend weitere 30 min bei erhöhter Temperatur und unter erhöhter Rührgeschwindigkeit (1200 rpm) gehalten. Nach einer kurzen Ultraschall-Behandlung wurden die Partikel durch einen Chlorform-Überschuss ausgefällt und das Präzipitat für 15 min bei 2500 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 2 mL DMF redispersiert.

1.3.3 Photobleaching

Um Mikroplastik-Partikel nach deren Applikation z.B. im Gewebe sicher detektieren zu können, muss sichergestellt sein, dass der lumineszente Farbstoff über lange Zeit und auch bei zeitweisen Arbeiten im Licht stabil und damit sichtbar bleibt.

Zur Bestimmung des Photobleachings (Ausbleichen durch Licht) bzw. der damit einhergehenden Überprüfung der Photostabilität wurden die *knife coated* Folien mit einer Xenonlampe (DPA: 385 nm, Perylen: 405 nm; Bandweite: 16 nm) für mehrere Stunden bestrahlt. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wurde alle fünf Sekunden gemessen mithilfe eines Spektrofluorometers (AMINCO Bowman Series 2 spectrofluorometer (AB2), Thermo Spectronics). Alle Messungen wurden auf das ursprüngliche Fluoreszenzsignal zu Beginn des Versuchs (auf 100% gesetzt) bezogen, sodass der entstehenden Fluoreszenzverlust durch Photobleaching jeweils verfolgt werden konnte. Aufgrund der bereits belegten hohen Photostabilität von UCNPs¹²⁹ wurde für diese auf eine Ermittlung des Photobleachings verzichtet.

1.3.4 Leaching

Für Forschung an Effekten von Mikroplastik ist es essentiell, dass beobachtete Effekte ausschließlich in der Applikation der Plastikpartikel begründet sind. Zur Qualitätssicherung wurde daher das Ausbluten von DPA und UCNPs aus den hergestellten Nanofasern untersucht, um eine spätere Toxizität des MPs aufgrund größerer Mengen austretenden Labels auszuschließen.

Zur Quantifizierung des Ausblutens wurden DPA-gelabelte PS-Nanofasern (515,82 mg) in einen Dialyseschlauch (12-14 kDa) überführt, in eine Schott-Flasche (100 mL) überführt und gegen 80 mL bidestillierten Wassers dialysiert. Das Dialysat wurde jeweils nach dem ersten Tag, sowie nach zwei, drei, sieben, zehn, 14, 28 und 35 Tagen vollständig ausgetauscht. Im Anschluss wurden die Dialysate je vollständig eingedampft, deren Rückstand durch Spülen in 1,5 mL Chloroform gelöst und die entsprechenden Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Anhand der Integration des Signals zwischen 421-441 nm wurde das prozentuale Ausbluten von DPA kalkuliert. Die Gesamtmasse ausgetretenen DPAs wurde mithilfe einer Kalibrierungsgeraden bestimmt.

Mit den UCNP-gelabelte Nanofasern (325,1 mg) wurde bis zum Eindampfen der Dialysate identisch verfahren. Anschließend wurden die Rückstände in 0,5 mL konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und mit 9,5 mL Salpetersäure (1,5 M) versetzt, um die Proben für ICP-OES-Messungen vorzubereiten. Das Ausbluten der UCNPs aus der Polymermatrix ergab sich aus dem Verhältnis der experimentell über ICP-OES bestimmten Massen zur theoretischen Masse an UCNPs in den Fasern. Die theoretische Masse wurde unter der Annahme errechnet, dass die gesamte in die Spinning-Lösung eingebrachte Masse an UCNPs homogen verteilt in den Nanofasern vorlag.

1.4 Einbettung von DPA und UCNPs in die Polymermatrix des MPs

Für eine zuverlässige Integration in das Endmaterial wurden die Luminophore vor dem Spinning-Prozess in die Basis-Spinninglösung eingearbeitet. Hierzu wurden für die fluoreszierenden DPA-Nanofasern 0,3 m% DPA zur Basis-Spinninglösung hinzugefügt. Zur Einbettung der UCNPs in die Fasern wurden 1050 mg Polystyrol mit 3,5 mL in DMF dispergierten UCNPs ($50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) sowie anschließend 3,5 mL THF versetzt und über Nacht gerührt. Die entstandenen gedopten Spinninglösungen wurden wie unter 1.1 aufgeführt zu Nanofasern versponnen.

1.5 Charakterisierung der Nanofasern und Mikroplastikpartikel

Bei der Entwicklung von innovativen Materialien ist eine fundierte Charakterisierung der Probe grundsätzlich nötig, um deren physikalische und chemische Eigenschaften beurteilen zu können und z.B. Hinweise zur Arbeit mit dem Material zu entwickeln.

Die selbst erzeugten MP-Partikel wurden daher hinsichtlich ihrer Größe (SEM), ihrer Zusammensetzung bzw. Reinheit (FTIR) sowie ihrer Suspendierbarkeit (Zeta-Potential) untersucht.

Auch bei kommerziell erworbenen Partikeln empfiehlt sich grundsätzlich eine Qualitätskontrolle hinsichtlich Größe und Reinheit. Entsprechend wurden die zugekauften Partikel, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, ebenfalls per SEM und FTIR charakterisiert.

1.5.1 Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Zur Größenauswertung sowie zur genaueren Betrachtung der Form und Oberflächenstruktur wurden die vorhandenen Plastik-Materialien (Nanofasern, selbst generierte MP-Partikel, erworbene MP-Partikel) rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Hierzu wurde die jeweilige Probe durch Aufkleben mit Kohletape (Nanofasern) oder Tropfen (Partikel; Suspension in 0,01 v% Triton X) auf einem SEM-Probenhalter aufgebracht, bei Bedarf über Nacht getrocknet und mit einer Gold-Palladium-Mischung gesputtert. Die Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop (LEO 1530, Zeiss) erfolgten anschließend bei 5 kV. Es wurden mindestens 8 verschiedene Stellen der Probe aufgenommen und bezüglich ihrer Größenverteilung ausgewertet.

Die Größenverteilung wurde mithilfe von ImageJ (jeweils $n > 400$) und Origin ermittelt.

1.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Größenbestimmung der synthetisierten UCNPs erfolgte mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Die Probenvorbereitung bestand aus einem Auftropfen der Partikel in Suspension ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) auf ein Carbon-schichtetes Kupfergitter (400 Mesh). Im Anschluss wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop (120 kV Philips CM12; FEI GmbH) Aufnahmen der Proben erzeugt. Zur Ermittlung der Größenverteilung wurden ImageJ und Origin genutzt.

1.5.3 FTIR-Spektroskopie

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) bezeichnet eine Analysemethode, die durch den Einsatz von infraroter Strahlung Schwingungsinformationen von Molekülen generiert und so eine Identifikation von Materialien ermöglicht.

1.5.3.1 Funktionsweise

Wird ein Stoff mit elektromagnetischen Wellen bestrahlt, so absorbiert er bestimmte Frequenzbereiche. Die Energie infraroter (IR) Strahlung (780 nm bis 1 mm) befindet sich im Bereich der Schwingungsniveaus von Molekülbindungen. Durch Absorption von

IR-Strahlung der passenden Energie bzw. Wellenzahl (Kehrwert der Wellenlänge) werden die entsprechenden Bindungen zur Schwingung angeregt. Da Molekülschwingungen im Bereich von $4000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ für bestimmte Atomgruppen charakteristisch sind, eignet sich die IR-Spektroskopie zur Bestimmung bestimmter Strukturelemente, insbesondere der funktionellen Gruppen des untersuchten Moleküls. Die hierzu notwendigen absorbierten Frequenzen sind charakteristisch für die jeweiligen Bindungen und ermöglichen dadurch die Identifizierung eines Materials bzw. von Gemischen. Neben der Absorption wird gelegentlich auch die Transmission der Wellenlängen als Maß genutzt. Aus Zeiteffizienzgründen werden heutzutage vorwiegend FTIR-Spektrometer verwendet, die durch Fourier-Transformation eine gleichzeitige Messung aller Wellenlängen ermöglicht, anstatt sequenzierter Messungen mit isolierten Wellenlängen.

1.5.3.2 Probenvermessung

Analysiert wurden sowohl die kommerziell erworbenen MP-Partikel (PS sphärisch, PS asphärisch, PP sphärisch, PET asphärisch; jeweils mit Perylen markiert), als auch die eigens hergestellten PS-MP-Fragmente.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem FTIR-Spektrometer (Cary 630; Agilent) mithilfe der Software MicroLab. Zur Auswertung und Darstellung wurde Origin genutzt.

1.5.4 Zeta-Potential

Anhand des Zeta-Potentials können Aussagen über die Suspendierbarkeit von Partikeln getroffen werden. Da die produzierten MP-Partikel in Suspension appliziert werden sollten, wurde das Zeta-Potential des MPs ermittelt.

1.5.4.1 Grundlagen

Befindet sich ein geladenes Teilchen bzw. ein geladener Partikel in einem Dispersionsmedium, sammeln sich an seiner Grenzschicht viele Gegenionen dicht gepackt an (Stern-Schicht). Da hierdurch meist noch keine vollständige Neutralisierung der Kernladung erfolgt, schließt sich an die Stern-Schicht noch eine weitere Ansammlung aus Ionen (diffuse Schicht) an. Je dicker diese Schicht wird, desto weiter geht die Nettoladung gegen Null. Bewegt sich das Teilchen bzw. der Partikel nun im Medium, z.B.

durch eine angelegte Spannung, so kommt es zur Scherung dieser Schicht und damit einer Änderung der Nettoladung. Das hierbei entstehende elektrokinetische Potential an der Grenze zwischen der mit dem Partikel wandernden und der ruhenden Phase des Dispersionsmittels (Scherebene) wird Zeta-Potential ζ genannt.

Das Zeta-Potential ist somit abhängig von der Bruttoladung des Teilchens, der Ionenstärke des Mediums, des pH-Werts und der Schergeschwindigkeit. Zu einem Anstieg des Zeta-Potentials führt beispielsweise eine zunehmende Scherung des Systems, ein höheres Nernst-Potential oder eine sinkende Ionenkonzentration im Lösungsmittel, da in diesem Fall weniger Ionen gegenwärtig sind, um die Ladung des Partikels zu kompensieren.

Nach der DLVO-Theorie (entwickelt von Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) ist für die Stabilität einer Dispersion entscheidend, dass die Abstoßungskräfte (elektrostatisch) die Anziehungskräfte (Van-der-Waals-Kräfte) überwiegen. Von einer stabilen Dispersion wird hierbei ab einem Zeta-Potential von $> \pm 30$ mV ausgegangen ¹³⁰.

1.5.4.2 Messung

Zur Bestimmung des Zeta-Potentials wurden die ungelabelten MP-Partikel in einer Konzentration von $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in destilliertem Wasser suspendiert und in speziell dafür vorgesehenen Küvetten dreifach mithilfe eines ZetaSizers (Nano ZS, Malvern) vermessen.

Die Messung mittels ZetaSizer basiert auf Laser-Doppler-Anemometrie (LDA). Bei der LDA wird ein Laserstrahl in zwei separate Strahlen geteilt, die sich am Messpunkt kreuzen und dort ein Interferenzstreifenmuster ergeben. Bewegt sich ein Partikel durch das Medium, begründet er ein Streulichtsignal am Photodetektor, dessen Frequenz proportional zur Geschwindigkeitskomponente ist. Aus diesem Signal wird die elektrophoretische Mobilität und daraus das Zeta-Potential ermittelt.

2. Tierversuch zur Distribution und Ausscheidung von Mikroplastik-Fragmenten

Dieser Versuch diente der quantitativen Bestimmung der Distribution von Mikroplastik im Organismus. Diese Distributionsanalyse sollte Aufschluss darüber geben, welche Organe von einer Ansammlung der Plastikpartikel besonders betroffen sind und somit richtungsweisende Erkenntnisse für weiterführende, organspezifische Untersuchungen liefern. Die Distribution wird nach einmaliger und chronischer (7 Tage) Applikation bestimmt. Zu Analyse Zwecken wurden für diesen Teil der Arbeit UCNP-markierte Mikroplastik-Fragmente verwendet.

2.1 Versuchstiere

Der Tierversuch wurde an Mäusen durchgeführt, da diese den Einsatz von genetisch veränderten Modellen für Folgestudien ermöglichen.

Es wurden Mäuse des Stamms 129S2/SvPasOrlRj (Janvier-Labs) gewählt, da Sie versuchstechnisch gesehen eine akkurate Beantwortung der Fragestellung erlauben und durch ihren guten genetischen Hintergrund sowie ihre guten Zuchteigenschaften die Möglichkeit zu genetischen Veränderungen in Folgestudien bieten.

Es wurden adulte Tiere verwendet, die zu Versuchsbeginn 6 Wochen alt waren.

Das Geschlecht der Mäuse wurde auf männliche Tiere beschränkt. Geschlechtsspezifische Unterschiede könnten zwar relevant sein, der Versuch sollte jedoch als Pilotversuch grundlegende Fragen beantworten und daher zusätzliche Variablen, wie das Geschlecht, vorerst ausklammern.

Es wurden insgesamt 10 Tiere in den Versuch eingeschlossen, die auf zwei Fünfer-Gruppen aufgeteilt wurden.

Die Tiere wurden in ihren Gruppen in klimatisierten Haltungsräumen gehalten (Raumtemperatur: $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$; Luftfeuchtigkeit: $(55 \pm 10)\%$; Luftwechsel: 16/h; Zuluft mit Schwebstofffiltern), Hell- und Dunkelphase wechselten sich alle zwölf Stunden ab.

Die Tiere erhielten Futter sowie Wasser *ad libitum*.

2.2 Appliziertes Plastik und erwartbare Risiken

Die Plastikpartikel für diesen Tierversuch bestanden aus Mikroplastik-Fragmenten, in die Ytterbium-haltige UCNPs fest eingebettet waren (siehe 1.3.2). Ytterbium konnte in der späteren Analyse durch Messungen an einem ICP-OES (Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma) quantitativ nachgewiesen werden und ermöglichte so eine Rückrechnung auf den Plastikgehalt in den einzelnen Proben. Da die quantitative Analyse nicht auf der Messung des Plastiks, sondern der speziellen Markierung des Plastiks beruhte, konnte auf eine Kontrollgruppe verzichtet werden. Kontroll-/Blank-Messungen hätten immer Null ergeben, da die Tiere nicht anderweitig mit dem gemessenen Ytterbium in Kontakt hätten kommen können, als durch die Applikation der markierten Plastikpartikel.

2.3 Aufbau des Tierversuchs und erwartbare Risiken

Die zehn Versuchstiere wurden in zwei Gruppen zu je fünf Tieren unterteilt. Einer Gruppe wurden einmalig je 10 mg der speziellen MP-Fragmente appliziert, um eine akute Exposition zu simulieren, der anderen Gruppe wurden je 10 mg der Partikel täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen verabreicht, um eine chronische Aufnahme abzubilden.

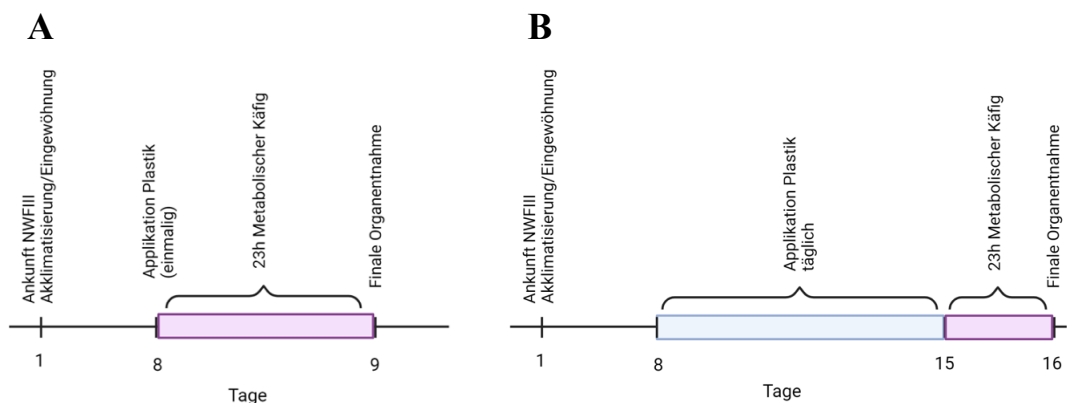


Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Tierversuchs der Gruppen "akut" (A, links) und "chronisch" (B, rechts).

Vor Versuchsstart durchliefen alle Tiere zur Stressreduktion eine einwöchige Akklimationierungsphase, die eine Gewöhnung an die Versuchsdurchführende, das Handling und die metabolischen Käfige beinhaltete.

Anschließend wurden den Mäusen im Alter von sieben Wochen einmalig (Gruppe „akut“) bzw. täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen (Gruppe „chronisch“) 10 mg UCNP-markierten Mikroplastiks in 200 µL Suspensionsmedium (1% Sojalecithin in destilliertem Wasser) ($c = 50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) über eine orale Gavage (Schlundsonde, 19G, 7 cm lang) direkt in den Magen appliziert. Auf diese Weise wurde eine genaue Dosierung gewährleistet.

Interne Vorversuche und Hochrechnungen hatten ergeben, dass die Ytterbium-Nanopartikel mit einem sehr geringen Anteil (ca. 0,2%) aus dem Plastik austreten können. In diesem Fall lösen sich die Ytterbium-Partikel schnell auf und setzen das Ytterbium frei. Ytterbium besitzt eine LD_{50} (Dosis, bei der 50% der Tiere versterben) von 6700 mg/kg bei peroraler Applikation ¹³¹, was für eine 25 g schwere Maus 167,5 mg Ytterbium bedeuten würde. Selbst bei siebentägiger Applikation von 10 mg Plastik pro Tag ergeben sich an Gesamtmasse (Plastik + Ytterbium-Nanopartikel) nur 70 mg, von denen Ytterbium einen sehr kleinen Bruchteil darstellt. Von diesem kleinen Bruchteil würden wiederum maximal 0,2% aus dem Plastik austreten. Entsprechend blieb die Menge an Ytterbium in diesem Versuch weit unterhalb der Toxizitätsgrenze von Ytterbium und es war von keiner Beeinträchtigung der Tiere durch die Markierung auszugehen.

2.4 Probengewinnung

Um das applizierte UCNP-MP quantitativ wiederfinden zu können, sollten alle möglichen Verbleibe des Plastiks erfasst werden. Konkret bedeutete dies eine Sammlung der Exkremente für den Fall einer Ausscheidung mit dem Urin oder den Fäzes, daneben eine Entnahme ausgewählter Organe sowie die Aufbewahrung und Analyse des verbleibenden Korpus.

Wichtig war zudem, die genauen Mengen des tatsächlich über eine Schlundung verabreichten Plastiks zu kennen. Hierzu wurden drei Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten so in Schmelztiegel so eingebracht, wie sie eine Maus im Magen erreichen würden („100%-Proben“).

2.4.1 Metabolische Käfige

Zur quantitativen Sammlung von Urin und Fäzes, wurden die Tiere über 23 h einzeln in metabolischen Käfigen gehalten, nachdem ihnen die Plastikpartikel das letzte Mal oral verabreicht wurden. Es folgte mindestens zweimal täglich eine Inaugenscheinnahme der Tiere. Die Sammlung von Urin und Fäzes diente der anschließenden quantitativen Bestimmung der Plastikpartikel darin. Die Exkreme wurden zur quantitativen Erfassung direkt in den Tiegeln aufgefangen, in denen die spätere Verarbeitung erfolgte.

2.4.2 Organentnahme

Alle Tiere wurden tierschutzgerecht mittels zervikaler Dislokation unter Isofluran-Narkose getötet und anschließend ausgewählte Organe zur Untersuchung der Partikel-Verteilung im Körper entnommen. Nach der Eröffnung des Abdomens wurden der Darm, das Pankreas, die Milz, die Leber, die Hoden, der Magen sowie beide Nieren und Nebennieren herausgenommen. Anschließend wurde nach Durchtrennung des Diaphragmas der Thorax eröffnet, um Herz und Lunge zu entnehmen. Zuletzt wurde die Schädeldecke durchbrochen, um das Gehirn freizulegen und herauszulösen.

Der nach den Entnahmen überbleibende Mauskorpus (nachfolgend „Korpus“ genannt) wurde zur späteren Analyse präpariert, um den gesamten Organismus abbilden zu können.

Alle entnommenen Organe sowie die zugehörigen Korpusse wurden zur späteren Aufarbeitung in Schmelztiigel entsprechender Größe eingewogen.

2.5 Kremierung der 100%-Proben, Organe, Exkreme & Korpusse

Zur späteren Analyse mussten sämtliche Proben kremiert werden. Hierzu wurden die 100%-Proben, Organe, Exkreme und Korpusse bei 90 °C für 48 h zur Massekonstanz getrocknet. Anschließend wurden die 100%-, Organ- und Exkrement-Proben in einem Muffelofen so schnell wie möglich auf 800 °C erhitzt und für 24 h bei dieser Temperatur verascht. Für die Korpusse wurde der Ofen über eine Zeitspanne von 24 h langsam aufgeheizt und die Proben ebenfalls über 24 h verascht. Zur Verbesserung des Veraschungsvorgangs wurden kleine Abstandshalter aus Quarzglas zwischen den Schmelztiiegeln und deren Deckeln angebracht, die eine Luftzirkulation ermöglichten.

2.6 Auswertung durch optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) beschreibt eine Methode, die die qualitative sowie quantitative Analyse von Elementen in sehr niedrigen Konzentrationen erlaubt. Üblicherweise liegen die Proben hierzu in flüssiger bzw. verflüssigter Form vor.

2.6.1 Funktionsprinzip

Die ICP-OES-Analytik basiert auf der Tatsache, dass Elemente ionisiert und zur Emission von Licht elementspezifischer Wellenlängen (Spektrallinien) angeregt werden können, wobei die Lichtintensität proportional zur Menge des Elements ist.

Das Kernstück eines ICP-Emissionsspektrometers bildet ein mehrere tausend Grad Celsius heißes induktiv gekoppeltes Argon-Plasma. Basis dieser induktiven Kopplung ist eine von Argon durchströmte Kupferspirale, die mit einer Radiofrequenz-Strahlung überlagert wird. Dies führt zur Induktion eines Wechselstroms in der Spule, der in selbiger sowohl ein elektrisches als auch ein magnetisches Feld erzeugt. Dem Argon werden durch Zündfunken Elektronen entrissen, die anschließend im Magnetfeld Beschleunigung erfahren und mit anderen Argon-Atomen kollidieren. Diese Kollisionen führen zur Freisetzung weiterer Elektronen und lösen somit eine Kettenreaktion aus. Infolgedessen entsteht ein Plasma aus Elektronen, Argon-Ionen und Argon-Atomen.

Üblicherweise wird eine flüssige Probe über ein pneumatisches Zerstäubersystem als Aerosol in das induktiv gekoppelte Argon-Plasma eingebracht, das zur Atomisierung der enthaltenen Elemente führt und so zur Lichtemission anregt. Das erhaltene Licht wird im Anschluss in dezidierte Wellenlängen aufgespalten, die zur Identifikation der Elemente genutzt werden (qualitative Analyse). Desweiteren werden die Lichtintensitäten dieser elementspezifischen Wellenlängen detektiert und ermöglichen aufgrund ihrer Proportionalität zur Menge eines enthaltenen Elements eine quantitative Analyse.

2.6.2 Probenvorbereitung

Um die Proben nach der Veraschung für die ICP-OES-Messungen aufzuschließen, wurden diese in ihren Schmelztiiegeln für 30 min in halbkonzentrierte Salpetersäure (100%-Probe/Organe/Exkremete: 2 mL; Korpuse: 4 mL) inkubiert und 4x für

30 Sekunden in einer Mikrowelle bei 600 W erhitzt. Nachfolgend wurde den Organ- und Exkrementproben konzentrierte Schwefelsäure beigefügt (0,5 mL). Auf diesen Schritt wurde für die Korpusse verzichtet, da dieser zu einer Präzipitation größerer Mengen Calciumsulfat führen würde. Die erhaltenen Lösungen wurden in Schnappdeckelgläser überführt und die Tiegel mit bidestilliertem Wasser (100%-Probe/Organe/Exkremente: 7,5 mL; Korpusse: 16 mL) nachgespült. Im Anschluss wurden die Proben mithilfe eines hydrophilen 0,45 µm PTFE-Filter filtriert.

2.6.3 Kalibrierung

Die Gerätekalibrierung erfolgte mithilfe eines Multielement-Standards (PerkinElmer). Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurden verschiedene Massen an UCNP-MPs (0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg; $n = 3$) in Schmelztiegel eingewogen. Nachfolgend wurden die Proben – identisch zu den Mausproben – bei 90 °C für 4 h zur Massekonstanz getrocknet und anschließend bei 800 °C über 24 h verascht, um die UCNPs aus der Polystyrol-Matrix freizulegen. Um die UCNPs im Anschluss via ICP-OES detektieren zu können, mussten diese in Ionen zerlegt werden. Hierzu erfolgte eine 30-minütige Inkubation in konzentrierter Schwefelsäure (0,5 mL), gefolgt von einer einminütigen Ultraschallbehandlung. Zuletzt schloss sich eine Zugabe von Salpetersäure (1,5 M; 9,5 mL) an.

Die entstandene Lösung wurde via ICP-OES vermessen, um die Konzentrationen von Yttrium (Y^{3+}), Thulium (Tm^{3+}) und Ytterbium (Yb^{3+}) zu bestimmen. Aus der Konzentration der Ionen und der Zusammensetzung der UCNPs erfolgte eine Rückrechnung auf die enthaltene Masse der UCNPs, welche für die Kalibriergeraden gegen das eingesetzte UCNP-MP aufgetragen wurde.

2.6.4 Messvorgang und Auswertung

Die Bestimmung der Ionen-Konzentrationen und der daraus errechneten UCNP- und MP-Konzentrationen erfolgte mittels ICP-OES (SPECTROBLUE FMX36, SPECTRO).

Für die 100%- sowie die Fäzesproben wurde mithilfe eines Kalibrierbereichs für Y^{3+} und Yb^{3+} von 1-20000 ppb und für Tm^{3+} von 1-1000 ppb vermessen. Für alle weiteren Proben wurde eine Kalibrierung zwischen 1-1000 ppb für alle drei Ionen verwendet.

Die 100%- und Fäzesprobe wurden 1:5 verdünnt, um in den Kalibrierbereich zu fallen.

Alle Messungen erfolgten dreifach. Der Mittelwerte sowie die Standardabweichungen wurden von der integrierten Gerätesoftware kalkuliert. Die Auswertung der ICP-OES-Ergebnisse erfolgte mithilfe von Excel.

3. Pilotstudie zu Effekten von Mikroplastik auf die Niere

Ziel des Tierversuchs war es, neue Einblicke in die Effekte der oralen Aufnahme von Mikroplastik zu gewinnen. Der Fokus sollte hierbei auf der strukturellen Integrität sowie Funktionalität der Niere liegen. Daneben wurde eine Auswahl an Organen auf ihr Plastikvorkommen untersucht. Eingesetzt wurden MP-Partikel verschiedener Form und Polymerzusammensetzung sowie eine Kontrollgruppe, um mögliche Auswirkungen dieser Variablen auf die Biotoxizität feststellen zu können.

3.1 Versuchstiere

Die Auswahl der Versuchstiere erfolgte analog zu der Beschreibung unter 2.1. Entsprechend wurde auch dieser Tierversuch mit ausschließlich männlichen Tieren der Linie 129S2/SvPasOrlRj mit einem Alter von 6 Wochen zu Versuchsbeginn durchgeführt. Von den in Tierversuchen häufig eingesetzten C57BL/6-Mäusen wurde abgesehen, da diese höhere Resistenzen gegenüber chronischen Nierenerkrankungen, Glomerulosklerose sowie interstitieller Fibrose aufweisen¹³².

Auch in diesem Versuch wurden adulte Tiere verwendet, die zu Versuchsbeginn 6 Wochen alt waren. Bei deutlich älteren Tieren hätte aufgrund der Alterungsprozesse und der damit verbundenen geringeren Regenerationsfähigkeit generell von einer höheren Belastung durch den Tierversuch ausgegangen werden müssen.

Das Geschlecht der Mäuse wurde erneut auf männliche Tiere beschränkt, um die Geschlechtsvariable in der Fragestellung dieses Pilotversuchs auszuschließen.

Generell hat sich die Niere des männlichen Organismus als sensibler für exogene Noxen erwiesen¹³², sodass für diesen Pilotversuch das sensibelste Modell gewählt wurde, um auch die Identifikation möglicher geringfügiger Effekte zu ermöglichen.

Der Tierversuch wurde als kommerzieller, externer Tierversuch bei Janvier-Labs (Frankreich) durchgeführt.

3.2 Struktur des Tierversuchs

In diesem Tierversuch wurden 30 Mäuse in fünf Gruppen zu je sechs Tieren unterteilt. Eine dieser Gruppen diente als Kontrollgruppe und erhielt das Suspensionsmedium (1% Sojalecithin in destilliertem Wasser) ohne Mikroplastik für 5 bzw. 10 Tage (je drei Tiere). Die übrigen vier Gruppen erhielten Mikroplastik der gleichen Größe, allerdings in Form oder Zusammensetzung verschieden. Als Polymere wurden Polystyrol (PS), Polypropylen (PP) sowie Polyethylenterephthalat (PET) eingesetzt. Zur Evaluation des Einflusses der Plastikform wurden sphärische (runde) sowie asphärische Partikel (Fragmente) genutzt. Konkret wurden den Gruppen folgende Varianten appliziert: sphärisches PS (50 μm), asphärisches PS (20-50 μm), asphärisches PP (20-50 μm) oder asphärisches PET (20-50 μm). Die spezifischen Größenangaben entstammten dem Hersteller (BS-Partikel) und wurden intern zu Qualitätszwecken überprüft.

In den fünf Gruppen wurden je drei Tieren für 5 Tage und drei Tieren für 10 Tage täglich das entsprechende Mikroplastik bzw. das reine Suspensionsmedium appliziert. Die Applikation erfolgte direkt in den Magen mithilfe einer Schlundsonde (orale Gavage). Hierbei wurden täglich 2,5 mg des unterschiedlichen Mikroplastiks in Form von 200 μL der MP-Partikel in Suspensionsmedium ($c = 12,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) in die Mäuse eingebracht.

Die Menge des oral applizierten Mikroplastiks pro Tag orientierte sich an einer aktuellen wissenschaftlichen Veröffentlichung, die für den Menschen eine tägliche orale Aufnahme von 0,1-5 mg kalkulierte³⁶. Ausgehend davon, dass die obere Grenze der Schätzung von 5 g pro Tag von einem Menschen mit 75 kg aufgenommen wird, entsprechen 2,5 mg pro Tag in einer etwa 25 g schweren Maus, dem 10fachen dessen, was ein Mensch voraussichtlich zu sich nimmt.

Nach Abschluss der Schlundungsperiode wurden die Tiere in die Laboratorien der Universität Regensburg überführt und es fand eine Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken wie nachfolgend beschrieben statt.

3.3 Organentnahme

Nach zervikaler Dislokation unter Isofluran-Narkose wurden die Tiere abdominell eröffnet. Anschließend wurde nach vorsichtiger Freilegung der Bauchgefäße die Vena cava mit einer Klemme gestaut und eine kleine Inzision an der abdominalen Aorta gesetzt. Mithilfe eines Gefäßdilators wurde die Schnittstelle leicht aufgespreizt, sodass eine

stumpfe Butterflykanüle eingeführt werden konnte. Die Kanüle wurde mit einer Klemme in ihrer Position fixiert. Nachdem die Klemme an der Vena cava entfernt war, wurde das Tier über die Kanüle mit 0,9%iger NaCl-Lösung, die einen Zusatz von 1% Heparin zur Gerinnungshemmung enthielt, blutleer gespült bevor die postmortale Perfusionsfixierung mit 3% PFA in PBS (filtriert, pH 7,41) erfolgte.

Bei der Perfusionsfixierung mit PFA, einem Polymer des Formaldehyds, werden Proteine und Nukleinsäuren reversibel quervernetzt, wodurch z.B. Autolyseprozesse unterbunden werden und das Gewebe somit in seinen originalen Ausprägungen erhalten bleibt.

Nach Abschluss der Perfusion wurden proximale und distale Anteile des Dünndarms, der Magen, die Nieren, die Leber, die Hoden sowie Teile der Quadrizeps-Muskulatur des rechten Hinterbeins für spätere Analysen entnommen.

Nachfolgend wurde das Diaphragma durchtrennt und der Thorax eröffnet, um Herz und Lunge zu entnehmen. Abschließend wurde das Gehirn aus der Schädelhöhle freigelegt und unter Erhalt der Struktur herausgelöst.

3.4 Kryokonservierung des Gewebes

Die Organe wurden im Anschluss an die Entnahme für mindestens 24 h in einem speziellen Puffer (200 mL PBS, 133 mL PFA (3%), 32 g Saccharose) zur Vorbereitung auf die nachfolgende Kryokonservierung gelagert. Während PFA der Nachfixierung diente, wurde die Saccharose als Kryoprotektor eingesetzt, da sie dank ihrer zahlreichen Hydroxylgruppen die Fähigkeit hat, Proteine zu stabilisieren und sie so vor Schädigungen durch den Einfrierprozess zu schützen. Darüber hinaus stört Saccharose die Kristallbildung und begünstigt somit einen amorphen Zustand.

Nachdem eine ausreichende Permeation des Gewebes durch den Puffer sichergestellt war, wurde es in Kryo-Röhrchen überführt und in ein Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff (-196 °C bei 1 atm) eingebracht.

Nachdem die Proben vollständig durchgefroren waren, wurden sie zügig aus dem Dewar-Gefäß in einen abgedichteten Tank mit flüssigem Stickstoff zur langfristigen Lagerung transferiert.

4. Isoliert perfundierte Nieren der Maus

Unter der Annahme, dass MP-Fragmente die Niere im Organismus auf dem Blutweg erreichen, wurde das Modell der isoliert perfundierten Niere (ipN) verwendet, um eine Deposition der Fragmente in der Niere zu simulieren.

4.1 Ablauf der ipN

Im Rahmen von ipN-Experimenten erfolgt eine Perfusion der Niere über die Nierenarterie mit einem Puffer, welcher das zu untersuchende Kunststoffmaterial beinhaltet. Die ipNs wurden nach Schweda et al.¹³³ mit Mäusen (Hintergrund: C57BL/6) als Nierenspender und den kommerziell erworbenen PS-Fragmente (Herstellerangabe: 20-50 µm) im Perfusionskreislauf durchgeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation vor der Eröffnung der Bauchhöhle. Im nächsten Schritt wurde die Aorta distal der Nierenarterie abgeklemmt, die Mesenterialarterie ligiert und eine Metallperfusionskanüle in die abdominale Aorta eingeführt. Im Anschluss wurde die Aortenklemme entfernt und die Kanüle bis zum Ursprung der rechten Nierenarterie vorgeschoben, wo sie fixiert wurde. Im Anschluss an die Ligatur der Aorta im proximalen Bereich der rechten Nierenarterie wurde die Perfusion initiiert. Im Anschluss wurde die rechte Niere entnommen, in eine thermostatisierte Befeuchtungskammer gelegt und bei einem konstanten Druck von 100 mmHg mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung mit physiologischen Aminosäuren und Glukose perfundiert. Das Perfusionsmedium wurde zur Funktionserhaltung kontinuierlich gegen ein größeres Volumen der gleichen Lösung dialysiert.

Zum Zwecke der reinen Lokalisation von Plastikpartikeln im Nierengewebe nach Eintreffen über die Blutbahn wurden ipNs nach obiger Beschreibung für 45 min mit 1 mg bzw. 5 mg perfundiert.

Für die Untersuchungen zur Funktion der Filtrationsbarriere wurden die Nieren auf die oben beschriebene Weise für 45 min perfundiert bevor dem Perfusionsmedium ein fluoreszenzgelabeltes Albumin (Alexa-BSA 594®) für eine Perfusionsdauer von weiteren 10 min hinzugefügt wurde. Diese Versuche erfolgten alle mit 0,5 mg Mikroplastik.

Schließlich wurden alle Nieren mit 3% Paraformaldehyd (pH 7,4) für die nachfolgende histologische Analyse perfundiert.

4.2 Auswertung des Alexa-BSA-Versuchs

Für die Auswertung dieses Albumin-Versuchs wurden drei ipNs angefertigt. Jede ipN wurde vollständig histologisch präpariert und mit Phalloidin-647 gefärbt (s. 5.1, 5.2 und 5.3). Die Proben zeigten demnach bis zu drei fluoreszente Merkmale: Mikroplastik (Anregung bei 405 nm), Albumin (Anregung bei 561 nm) und F-Aktin-Strukturen durch die Phalloidin-Färbung (Anregung bei 633 nm). Die 200 µm-dicken Nieren-Schnitte wurden im Anschluss am Konfokalmikroskop untersucht. Hierbei wurden Aufnahmen jedes Glomerulums angefertigt, bei dem ein Übergang in den proximalen Tubulus mikroskopisch klar ersichtlich war. Im Zuge der Mikroskopie wurden alle sichtbaren Ebenen des entsprechenden Glomerulus auf die Anwesenheit von Mikroplastik untersucht und die Glomeruli auf diese Weise in eine Kontrollgruppe (kein Mikroplastik sichtbar) und eine Mikroplastik-Gruppe (Mikroplastik sichtbar) aufgeteilt.

Die semiquantitative Analyse ist schematisch in Abbildung 4 zu sehen.

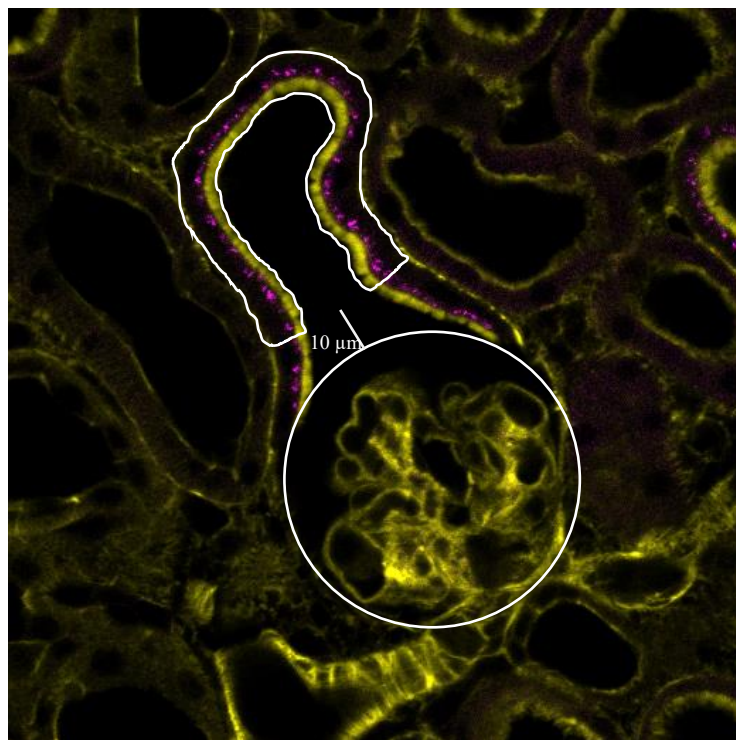


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Albumin-ipN-Auswertung anhand von mikroskopischen Aufnahmen.

Der entsprechende Glomerulus wurde seiner Größe entsprechend eingekreist und ein Lot mit der Länge von 10 μm auf den Kreis gefällt, welches in den Beginn des proximalen Tubulus gerichtet war. Ab dieser Grenze von 10 μm Abstand zum Glomerulus wurden die Zellen des sich anschließenden proximalen Tubulus umrandet. Für diese Areale wurden von der Software (ZEN lite) Fluoreszenzintensitäten pro markierter Fläche ausgegeben. Je länger ein Lichtweg im Gewebe ist, desto mehr Licht wird aufgrund von Streuungsphänomena absorbiert. Entsprechend kommt bei der Mikroskopie tiefer liegender Gewebsanteile weniger Licht am Anregungsort an und gleichzeitig auch weniger Emissionslicht zum Detektor zurück. Um dieser Tatsache beizukommen, wurde die Fluoreszenzintensität bei 561 nm-Anregung durch die Fluoreszenzintensität bei 633 nm-Anregung (identische Fläche) dividiert. Der Quotient der beiden Intensitäten wurde demnach zur Normalisierung auf die Gewebstiefe genutzt, um alle Aufnahmen innerhalb einer ipN miteinander vergleichen zu können.

4.3 Statistische Auswertung

Es erfolgten zwei Arten der Auswertung. Zum einen wurden die drei ipNs jeweils einzeln statistisch ausgewertet, indem die Fluoreszenzquotienten der Kontroll- und Mikroplastikgruppe innerhalb einer ipN miteinander verglichen wurden. Hierbei wurde ein Test auf Normalverteilung durchgeführt (Shapiro-Wilks-Test), auf den nach negativem Ergebnis (nicht normalverteilt) ein Mann-Whitney-U-Test als nicht parametrischer Test folgte.

Zum anderen wurden die Mittelwerte aller drei ipNs auch zusammen statistisch ausgewertet. Da aufgrund der interindividuellen Unterschiede die Werte einer Mikroplastik-Gruppe immer nur auf die Werte der Kontrollgruppe derselben ipN bezogen werden können, wurde eine zusätzliche Normalisierung innerhalb jeder ipN durchgeführt. Hierzu wurde jeweils der Mittelwert der Mikroplastikgruppe durch den Mittelwert der zugehörigen Kontrollgruppe dividiert. Dieses Vorgehen ergab den normalisierten Mittelwert der Mikroplastikgruppe (Fold Change zur Kontrollgruppe). Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde anschließend auf 1,0 (100%) festgesetzt. Da die vorhandene Stichprobengröße von $n = 3$ war zu gering, um einen aussagekräftigen Test hinsichtlich Normalverteilung durchzuführen, wurde für die statistische Auswertung davon ausgegangen, dass die Proben normalverteilt sind. Es wurde ein zweiseitiger, ungepaarter

t-Test durchgeführt, da die zusammengehörigen Werte (Kontrollgruppe und Mikroplastik-Gruppe derselben ipN) durch die Normalisierung auf die Kontrolle bereits einander zugeordnet worden waren. Der ungepaarte t-Test ist darüber hinaus weitestgehend robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilungsannahme.

5. Histologische Aufbereitung zur strukturellen Beurteilung des Nierengewebes und weiterer Organproben

Im Zuge dieser Arbeit erfolgte eine histologische Aufbereitung zur Beurteilung der isoliert perfundierten Nieren sowie der entnommenen Organe des externen Tierversuchs. Dies diente der Evaluation der strukturellen sowie funktionellen Integrität der Nieren, zudem einem Screening auf Vorhandensein von Mikroplastik in weiteren Organen.

5.1 Einbettung der Organe und Anfertigung von Gewebsschnitten

Zunächst galt es die kryokonservierten Organe zügig aufzutauen, um wie unter 3.4 beschrieben eine Kristallisation des Glaswassers im Übergang zu flüssigem Wasser und die damit verbundene Volumenexpansion zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden die Kryo-Cups, die die Proben enthielten, direkt nach Entnahme aus dem Stickstofftank in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad eingebracht.

Während die Proben vollständig auftauten, wurde eine ausgehärtete Lösung aus 3% Agarose in PBS in einem weiteren Wasserbad bei 80 °C zu einem viskosen Fluid aufgeschmolzen. Die einzubettenden Organe wurden nachfolgend aus den Kryo-Cups in einzelne Aluminium-Schälchen (Durchmesser ca. 1,5 cm) überführt und mit der viskosen Agarose-Lösung überzogen, bis sich oberhalb der Organe eine glatte, horizontale Oberfläche in den Schälchen bildete. Die Proben verblieben so über mind. eine Stunde unbewegt in den Schälchen, sodass die umgebende Agarose wieder vollständig erhärten konnte.

Zur Anfertigung der zu färbenden Schnitte wurde ein Vibratom (VT1200S, Leica) genutzt. In den Proben konnte Mikroplastik von Durchmessern von bis zu 50 µm enthalten sein, entsprechend wurde eine Schnittdicke gewählt, die ein Verbleiben der

MP-Partikel im Gewebe ermöglichte und das Risiko eines Herauslösen der Partikel während des Schneideprozesses minimierte, ohne dabei Gewebe zu verschwenden.

Aufgrund der weicheren Gewebsstruktur wurde für Hoden eine Schnittdicke von 200 µm gewählt. Alle weiteren Organe, abgesehen von Magen und Dünndarm (sowohl proximal als auch distal), wurden auf 150 µm geschnitten.

Präparate des Magen und des Dünndarms (sowohl proximal als auch distal) wurden nicht am Vibratom geschnitten, sondern zur histologischen Färbung sowie mikroskopischen Analyse lediglich längs aufgeschnitten, da ihre Gewebsflexibilität keine sauberen Schnitte am Vibratom ermöglichte und die geringe Gewebsdicke sich für eine direkte Einbettung des aufgeklappten Organs eignete. Entsprechend wurden diese Proben nach Auftauen nicht in Agarose eingebettet.

Alle Schnitte bzw. Proben wurden grundsätzlich zwischen zwei Deckgläsern mithilfe eines Spacers (iSpacer®, Sunjin Lab) in PBS eingebettet. Die Dicke der Spacer wurde grundsätzlich so gewählt, dass sie mindestens 0,5 µm dünner waren als die jeweilige Probe, um eine ausreichende Fixierung der Probe zwischen den Deckgläsern ohne Quetschung des Präparats zu gewährleisten.

5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Phalloidin-Färbungen

Zunächst wurden die Schnitte mehrmals mit PBS gewaschen. Es folgte ein einstündiger Blockierungsschritt mit 0,5% Triton X in PBS. Anschließend wurde die Probe mit einem fluoreszenzmarkierten Phalloidin-Antikörper über zwei Stunden bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert und zum Abschluss erneut mehreren Waschschritten mit PBS unterzogen.

Antikörper-Färbungen: CD3, CD20, CD31, Collagen III, F4/80, PDGFR-beta

Nach mehreren Waschschritten (insgesamt 15 min) mit PBS wurden die Schnitte mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS mit 10% Pferdeserum geblockt, bevor sie über Nacht bei 4 °C mit den jeweiligen Primär-Antikörpern inkubiert wurden. Am nächsten Tag erfolgten erneut mehrere Waschvorgänge in PBS, um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Im Anschluss wurden die passende Sekundär-Antikörper (gegen das Wirts-IgG des Primär-Antikörpers) in 1% BSA in PBS verdünnt und

zugegeben. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von drei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte erneut mehrmals mit PBS gewaschen.

Antikörper-Färbungen: Cubilin, Fibronectin

Die Färbungen erfolgten analog zur der für CD3 genannten, mit dem Unterschied, dass mit 5% BSA in PBS mit 0,04% Triton X blockiert wurde und die Sekundär-Antikörper in 0,5% BSA in PBS verdünnt wurden.

Antikörper-Färbungen mit Albumin

Auch diese Färbungen erfolgten analog zur der für CD3 genannten, es wurde zur Blockierung jedoch ein Albumin-freier Puffer (Superblock[®]) mit Zusatz von 0,04% Triton X verwendet und die Sekundär-Antikörper in reinem Superblock verdünnt.

Die verwendeten Antikörper und deren jeweilige Verdünnungen sind der entsprechenden Tabelle im Appendix zu entnehmen.

5.3 Konfokalmikroskopie

Aufgrund der Schnittdicke der Gewebeproben wurde zur visuellen Analyse eine konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM710, Zeiss) verwendet. Bei dieser speziellen Art der Mikroskopie wird das Präparat Stück für Stück Punkt für Punkt mit einem Laser abgerastert („laser scanning“) und das Gesamtbild im Nachgang zusammengefügt. Hierdurch können die detektierten Lichtintensitäten lokal zugeordnet werden. Darüber hinaus verfügt ein solches Mikroskop über eine Lochblende im Strahlengang des detektierten Lichts. Diese Blende ist durchlässig für Licht aus einem schmalen Bereich um die Fokusebene („konfokal“) und blockiert Licht, das anderen Ebenen entstammt. Auf diese Weise kann ein Bild einer sehr dünnen Ebene innerhalb eines dickeren Präparats erzeugt werden. Die Verwendung eines herkömmlichen Fluoreszenzmikroskops würde im Falle der in dieser Arbeit verwendeten Schnittdicke zu unscharfen Bildern führen.

Das für diese Arbeit verwendete Mikroskop war mit einem Ti: Sapphire Chameleon Ultra Vision II Laser (600-1200 nm; Coherent), einer UV-Laserdiode (405 nm), einem

Methoden

Mehrlinien-Argonlaser (458 nm, 488 nm, 514 nm), einem DPSS-Laser (561 nm) und einem HeNe-Laser (633 nm) ausgestattet. Die Bedienung erfolgte über die Software ZEN 2.3 SP1 (Zeiss). Die Bilder wurden mit einem 40x-Objektiv aufgenommen.

Mikroskopisch untersucht wurden die lumineszent markierten Nanofasern, sowie die hergestellten Mikroplastikpartikel. Daneben erfolgte eine mikroskopische Evaluation sämtlicher immunfluoreszent gefärbten Gewebeproben.

Bei der Analyse der Gewebeproben wurden bis auf den 2-Photonen-Laser alle Lichtquellen für verschiedene Anregungswellenlängen (405 nm, 488 nm, 543 nm, 647 nm) verwendet, um die Struktur und die Bestandteile des Gewebes sowie die Mikroplastikpartikel darzustellen.

Die Visualisierung der UCNP-markierten Nanofasern und MP-Partikel erfolgte unter 980 nm-Bestrahlung (2-Photonenlaser; 1200 mW). Das emittierte Licht wurde für diese Proben mit einem Kurspassfilter für 485 nm (SP485 IR+) aufgefangen.

Die Bilder wurden mit ZEN lite, ImageJ (Fiji, v1.5k) und CorelDRAW bearbeitet.

IV. ERGEBNISSE

1. Entwicklung und Charakterisierung des verwendeten Mikroplastiks

Mikroplastik kommt in Umwelt und auch im Menschen vorwiegend in Fragment- und Faserform vor^{23,42}. In der derzeitigen Forschung wird trotz dessen in erster Linie sphärisches Mikroplastik, vorwiegend aus Polystyrol, eingesetzt²⁵. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, durch eigene Produktion der Diskrepanz zwischen umweltgetreuem und in der Forschung genutztem Mikroplastik beizukommen.

Damit der Fokus lediglich auf den neuen Formen liegt und das Material als Variable vorerst exkludiert werden kann, wurde Polystyrol aufgrund seiner vielfachen Nutzung als Basismaterial zur Entwicklung der neuen MP-Partikel eingesetzt. Um diese realitätsgetreuen Partikel in Applikationen wie z.B. histologischen Untersuchungen zuverlässig und spezifisch detektieren zu können ist die Verwendung geeigneter Label und deren stabile Einbettung in die umgebende Matrix essentiell. Im Rahmen der Dissertation sollten zu diesem Zweck vorteilhafte Label anhand ihrer photophysikalischen Eigenschaften identifiziert und deren Einbettung beurteilt werden.

Darüber hinaus erfordert eine Neuentwicklung von Materialien grundsätzlich eine fundierte Charakterisierung dieser, um Erkenntnisse zu den physikalischen und chemischen Eigenschaften zu gewinnen. Entsprechend sollten die im Zuge dieser Arbeit neu entwickelten Mikroplastik-Partikel eingehend charakterisiert werden, was eine Größenanalyse via SEM, die Zusammensetzung bzw. Reinheit des Materials via FTIR, sowie die Beurteilung der Suspendierbarkeit anhand des Zeta-Potential einschloss.

Zur Qualitätskontrolle wurden auch die kommerziell erworbenen Partikel hinsichtlich Größenverteilung und Materialreinheit via SEM und FTIR charakterisiert.

1.1 Markierungsoptionen der eigenproduzierten MP-Partikel

Aufgrund der etablierten Nutzung von Fluoreszenzmikroskopen zur histologischen Evaluation von Geweben, wurde primär ein geeignetes Fluorophor als optisches Label

gesucht. Da für die geplanten Analysen keine Zellkern-Färbung mit DAPI ($\lambda_{\text{ex max}}$: 358 nm (möglich: 300-420 nm)) angedacht war, sollten die Fluorophore diese ungenutzte Standard-Anregungswellenlänge von 405 nm (am verwendeten LSM 710: UV-Laserdiode) nutzen können.

Daneben wurden UCNPs als mögliche MP-Marker untersucht, da sie sowohl mit einem NIR- oder Multi-Photonen-Laser visualisierbar sind als auch die Möglichkeit zur sensitiven Quantifizierung via ICP-OES (oder auch ICP-MS) bieten.

1.1.1 Evaluation zweier Fluorophore zur MP-Markierung anhand ihrer photophysikalischen Eigenschaften

Die folgenden Unterkapitel charakterisieren Grundzüge von zwei vorausgewählten Fluorophoren des gewünschten Anregungswellenlängenbereichs: 9,10-Diphenylanthracen (DPA) und Perylen. DPA besitzt zwei Anregungsmaxima: bei 373 nm sowie 393 nm^{134,135}. Perylen besitzt ebenfalls zwei Peaks in der Absorption des Anregungslichts, jedoch im etwas Energieärmeren: ein Maximum bei 438 nm sowie einen weiteren Peak von über 70% (bezogen auf das Maximum) bei 410 nm¹³⁴. Vorteilhaft ist zudem, dass beide Fluorophore sehr hohe Quantenausbeuten von 0,94 (Perylen) und 1,0 (DPA) aufweisen^{134,135}.

1.1.1.1 Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Konzentration

Üblicherweise sind die Fluoreszenzintensitäten von Fluorophoren unter anderem von deren Konzentration abhängig¹³⁶. Entsprechend sollten für DPA und Perylen Konzentrationen zwischen 0-1 m% vermessen werden, um beide Fluorophore miteinander vergleichen zu können sowie deren jeweiliges Doping-Optimum zu ermitteln.

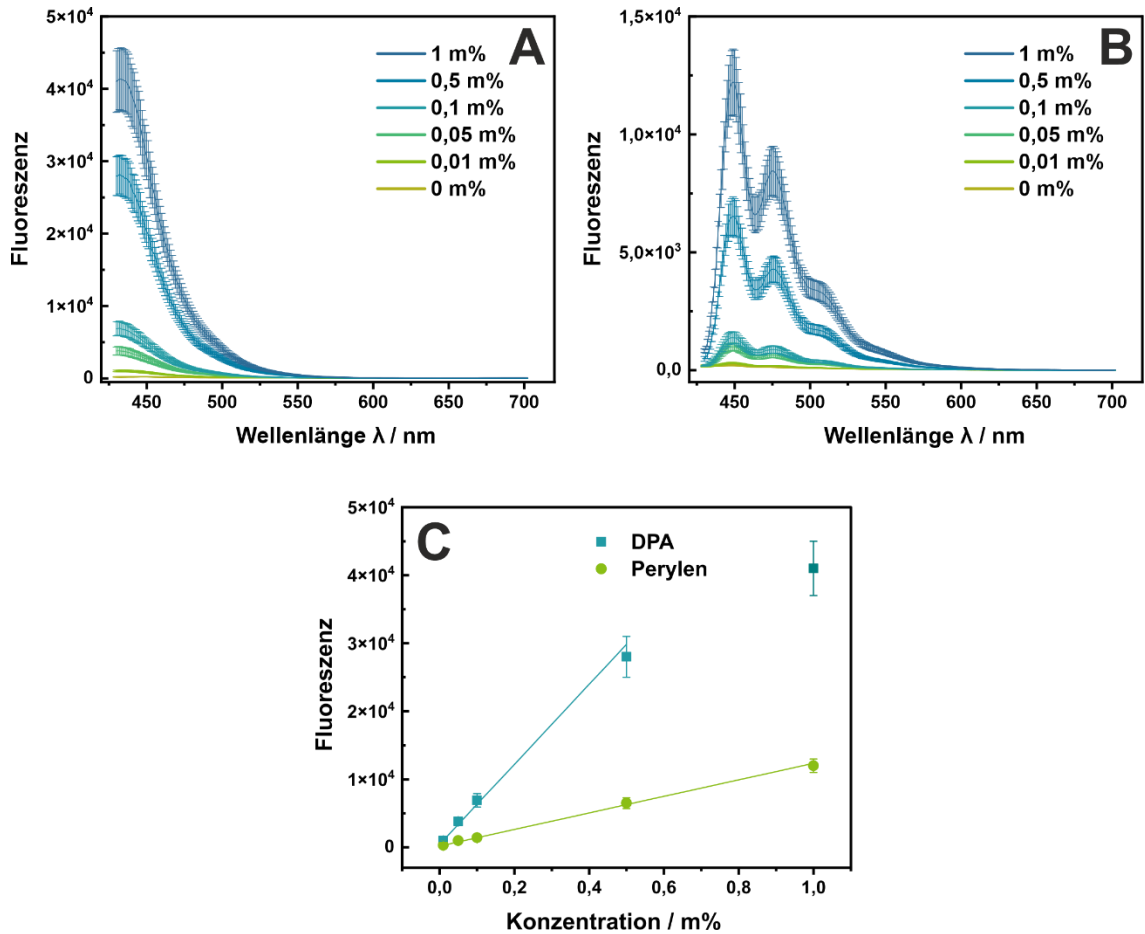


Abbildung 5: Fluoreszenzmessungen von *knife coated* Polystyrolfolien mit DPA (A,C) und Perylen (B, C). Fluoreszenzspektren in Abhängigkeit der Fluorophor-Konzentration bei einer Anregung bei 405 nm für DPA (A) und Perylen (B). (C) Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von DPA und Perylen von ihrer Konzentration in den Polystyrolfolien (jeweils $n = 8$). Die Anregung erfolgte bei 405 nm.

Sowohl DPA als auch Perylen zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von ihrer Konzentration. Wie Abbildung 5 zu entnehmen ist, wies DPA hierbei grundsätzlich höhere Fluoreszenzintensitäten auf als Perylen. Während sich bei Perylen ein linearer Zusammenhang bis zu 1,0 m% zeigte, flachte die Kurve für DPA zwischen 0,5 m% und 1,0 m% bereits ab, was ein Anzeichen für Quenching darstellte. Bei 0,5 m% Doping fluoreszierte DPA mehr als 3x so stark wie Perylen. In Bezug auf die konzentrationsabhängigen Fluoreszenzsignale erwies sich DPA daher vorteilhaft gegenüber Perylen. Als optimale Konzentration wurden für DPA 0,3 m% gewählt, um ausreichende Fluoreszenz bei möglichst geringer Beladung zu erzielen und Quenching vorzubeugen, wohingegen für Perylen 1,0 m% die höchste Fluoreszenzemission erzielte ohne Quenching zu zeigen und als dessen Optimum festgelegt wurden.

1.1.1.2 Fluoreszenzspektren bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen

Des Weiteren wurden die Fluoreszenzspektren von DPA und Perylen bei verschiedenen Anregungswellenlängen aufgenommen, die in der Fluoreszenzmikroskopie gängig sind. Konkret bedeutete dies eine Anregung bei 405 nm, 488 nm, 561 nm sowie 633 nm. Diese Maßnahme diente dazu, sicherzustellen, dass das Fluorophor mit einer Wellenlänge spezifisch angeregt werden kann und so die parallele Nutzung von verschiedenen Antikörpern ermöglicht, ohne mit diesen zu überlappen.

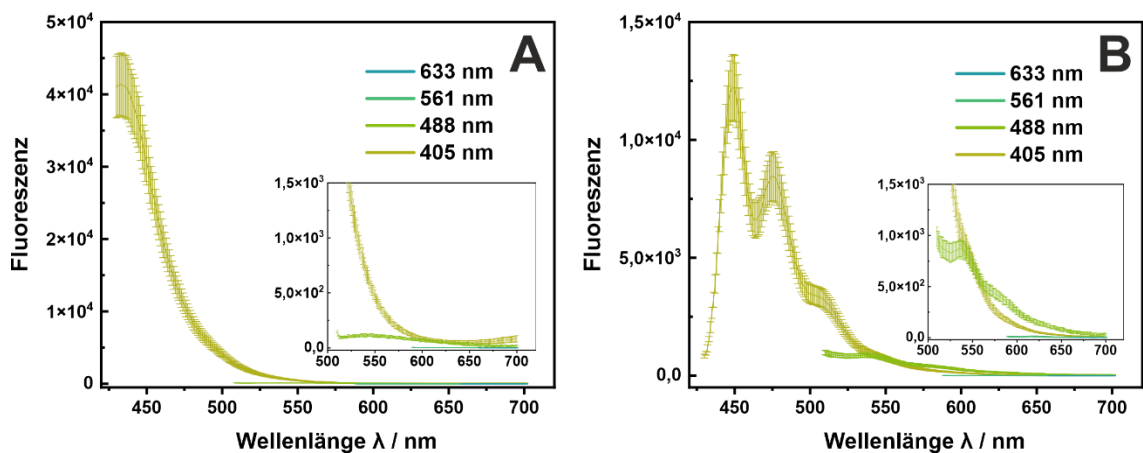


Abbildung 6: Fluoreszenzspektren von *knife coated* Polystyrolfolien bei verschiedenen Anregungswellenlängen mit DPA (A) und Perylen (B) bei 1%iger Fluorophormarkierung

Für DPA zeigte sich bei einer Anregung bei 405 nm ein deutliches Fluoreszenzspektrum mit einem Maximum bei etwa 420 nm. Alle weiteren Anregungswellenlängen führten lediglich zu einer minimalen Fluoreszenz (488 nm) bzw. keiner messbaren Fluoreszenz (561 nm, 633 nm). Perylen wies hingegen neben der deutlichen Anregbarkeit bei 405 nm auch eine relevante Fluoreszenz auf, wenn mit 488 nm exzitert wurde. Bei 561 nm sowie 633 nm führte hingegen nicht zu messbarer Fluoreszenz.

1.1.1.3 Photostabilität

Zuletzt wurden die beiden Fluorophore hinsichtlich ihrer Photostabilität untersucht, um zum einen für die MP-Eigenproduktion das geeignetere Fluorophor zu wählen und zum anderen die Photostabilität des kommerziell erworbenen Mikroplastiks, das mit Perylen gelabelt war, zu evaluieren. Ob ein Fluorophor Photobleaching, also einem Ausbleichen des Farbstoffes über die Zeit, unterliegt, ist besonders relevant für eine langfristige

Detektion des markierten Materials und erleichtert den Laboralltag, wenn Produktion und Experimente nicht im Abgedunkelten stattfinden müssen.

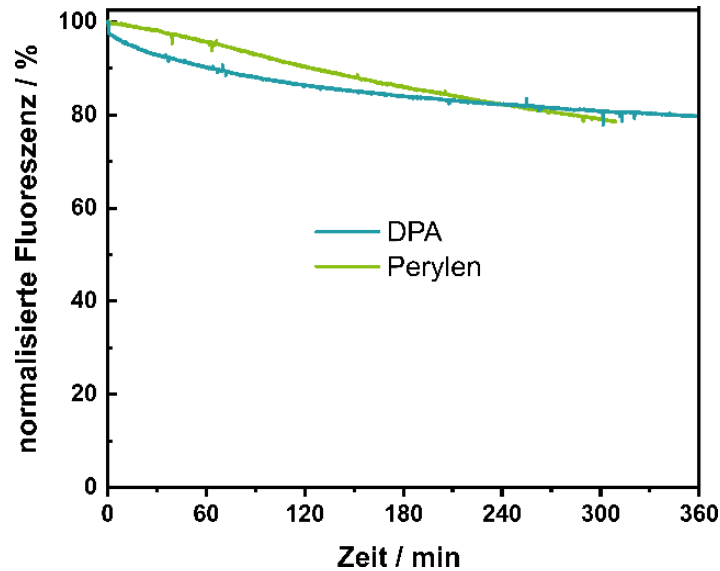


Abbildung 7: Photobleaching-Studie mit Anzeige der prozentualen Fluoreszenzabnahme über die Zeit. Durchgeführt mit knife coated Polystyrolfolien mit 1% DPA bzw. 1% Perylen (DPA Ex: 385 nm, Em: 410 nm; Perylen Ex: 405 nm, Em: 476 nm)

Die Photobleaching-Untersuchungen in Abbildung 7 ergaben, dass in Polystyrol eingebettetes DPA sowie Perylen nach Exposition mit UV-Licht einer Xenon-Blitzlampe über mehrere Stunden noch eine Fluoreszenz von 80% bezogen auf die ursprüngliche Fluoreszenz zeigen.

Insgesamt betrachtet wies DPA eine höhere Fluoreszenzintensität als Perylen auf sowie eine spezifische Anregbarkeit bei 405 nm, wohingegen Perylen auch bei 488 nm-Anregungslicht Fluoreszenz zeigte. Beide Farbstoffe zeigten eine hohe Photostabilität.

1.1.2 Charakterisierung der hergestellten UCNPs zur MP-Markierung für quantitative Bestimmungen mittels ICP-OES

Aufgrund ihrer Zusammensetzung, die sich zur Quantifizierung via ICP-OES eignet, und der sehr hohen Photostabilität^{84,86} werden UCNPs als alternative Markierungsoption zu Fluorophoren eingesetzt. Das Umgehen von Photobleaching geht jedoch mit einer geringen Quantenausbeute von max. 13%⁸⁸ einher.

Die synthetisierten UCNPs wurden vor deren Einbettung in die Polystyrolmatrix hinsichtlich ihrer Größenverteilung und Lumineszenz charakterisiert.

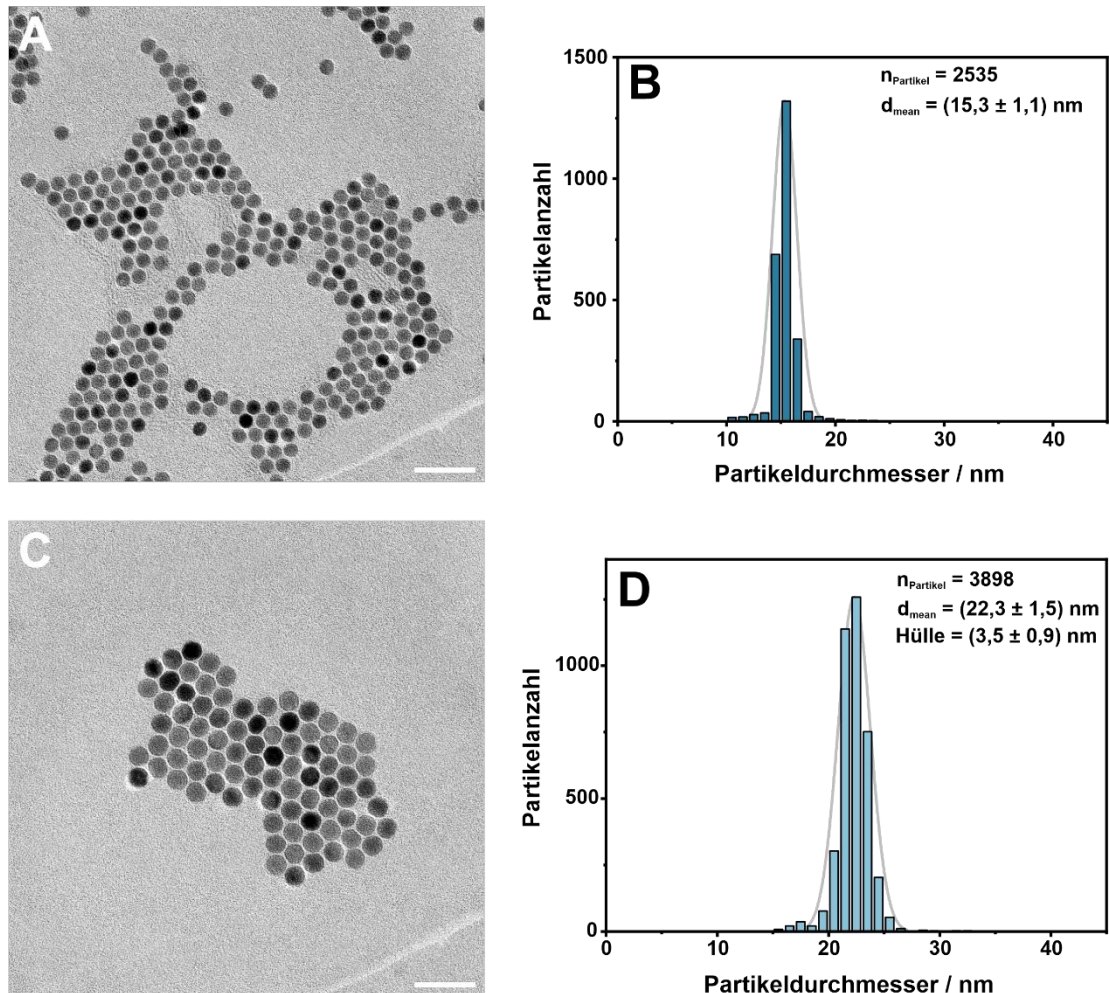


Abbildung 8: Charakterisierung der UCNPs , die als Markierung genutzt werden sollten. (A,B) TEM-Mikrografien mit zugehörigen Größenverteilungs-Histogrammen der NaYF₄:Yb,Tm-Kernpartikel (A,B) sowie der ummantelten Partikel aus NaYF₄:Yb,Tm@NaYF₄.(C,D). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

Die TEM-Aufnahmen aus Abbildung 8 zeigten einheitliche sphärische Partikel mit enger Größenverteilung sowohl der Kern-Partikel mit $(15,3 \pm 1,1) \mu\text{m}$, als auch der ummantelten Partikel mit $(22,3 \pm 1,5) \mu\text{m}$, die somit eine Hüllendicke von $(3,5 \pm 0,9) \mu\text{m}$ aufwiesen.

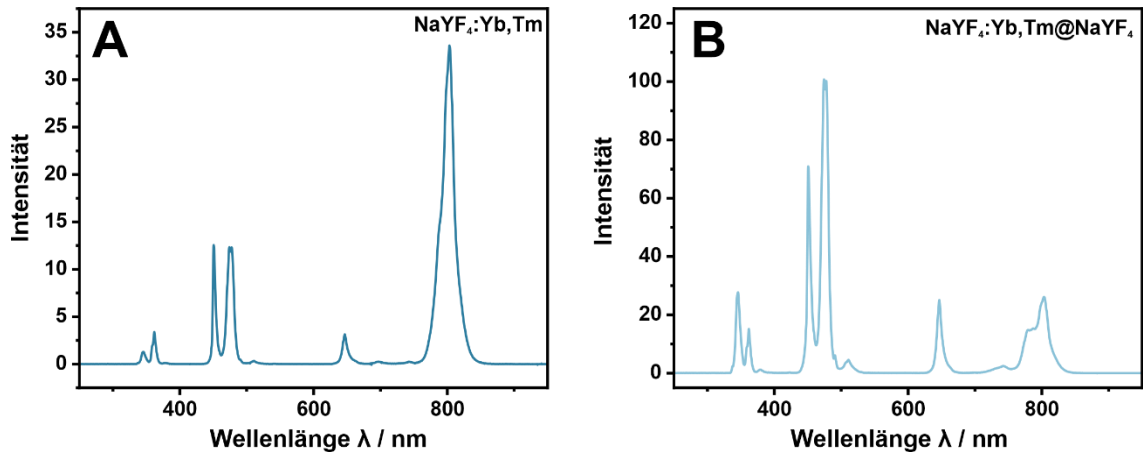


Abbildung 9: Lumineszenz-Charakterisierung von UCNPs (in Cyclohexan), die zur Einbettung in PS-Matrix verwendet werden sollten. (A) Lumineszenzspektrum der NaYF₄:Yb,Tm-Kernpartikel. (B) Lumineszenzspektrum der ummantelten Kernpartikel aus NaYF₄:Yb,Tm@NaYF₄. Die Spektren sind auf die jeweilige Yb³⁺-Konzentration normalisiert. Die Anregung erfolgte bei $\lambda_{\text{ex}} = 980 \text{ nm}$ mit $156 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Obenstehend abgebildet sind die Lumineszenzspektren der Kernpartikel mit (A) und ohne Ummantelung (B) bei einer Anregungswellenlänge von 980 nm. Die Peaks der Partikel waren in ihrer Lage jeweils nahezu identisch, allerdings lag das Emissionsmaximum der Kernpartikel im Roten (800 nm), wohingegen das Maximum der ummantelten Partikel sich ins Grüne (450-490 nm) verschoben zeigte. Wie den Grafiken zu entnehmen ist, wiesen die ummantelten Partikel insgesamt eine deutlich stärkere Lichtemission auf als die blanken Kernpartikel und waren zur Detektion via Lumineszenz daher zu bevorzugen. Aufgrund des höheren Gehalts an Yttrium, waren die ummantelten UCNPs auch für ICP-OES-Analysen zu bevorzugen, um ein niedrigeres Quantifizierungslimit zu erzielen.

Insgesamt wurden homogene UCNPs mit und ohne Hülle synthetisiert, die vor allem Licht im Roten (ohne Hülle) bzw. Grünen (mit Hülle) emittieren.

1.2 Einbettung der ausgewählten Label in die Polymermatrix (PS)

Unter Berücksichtigung der unter 1.1.1 erhobenen Daten erwies sich DPA aufgrund der spezifischen Anregbarkeit und Fluoreszenzintensität bei geringer Konzentration als präferiertes Fluorophor. Daneben wurden auch ummantelte UCNPs in die

Polystyrolmatrix der Nanofasern eingebettet, um deren Vorteile hinsichtlich Photostabilität und Quantifizierung mittels ICP-OES nutzen zu können.

1.2.1 Fasercharakteristika

Die elektrogesponnenen PS-Nanofasern zeigten eine schmale Größenverteilung sowohl bei Markierung mit DPA ($(0,95 \pm 0,13) \mu\text{m}$) als auch mit UCNPs ($(1,0 \pm 0,2) \mu\text{m}$).

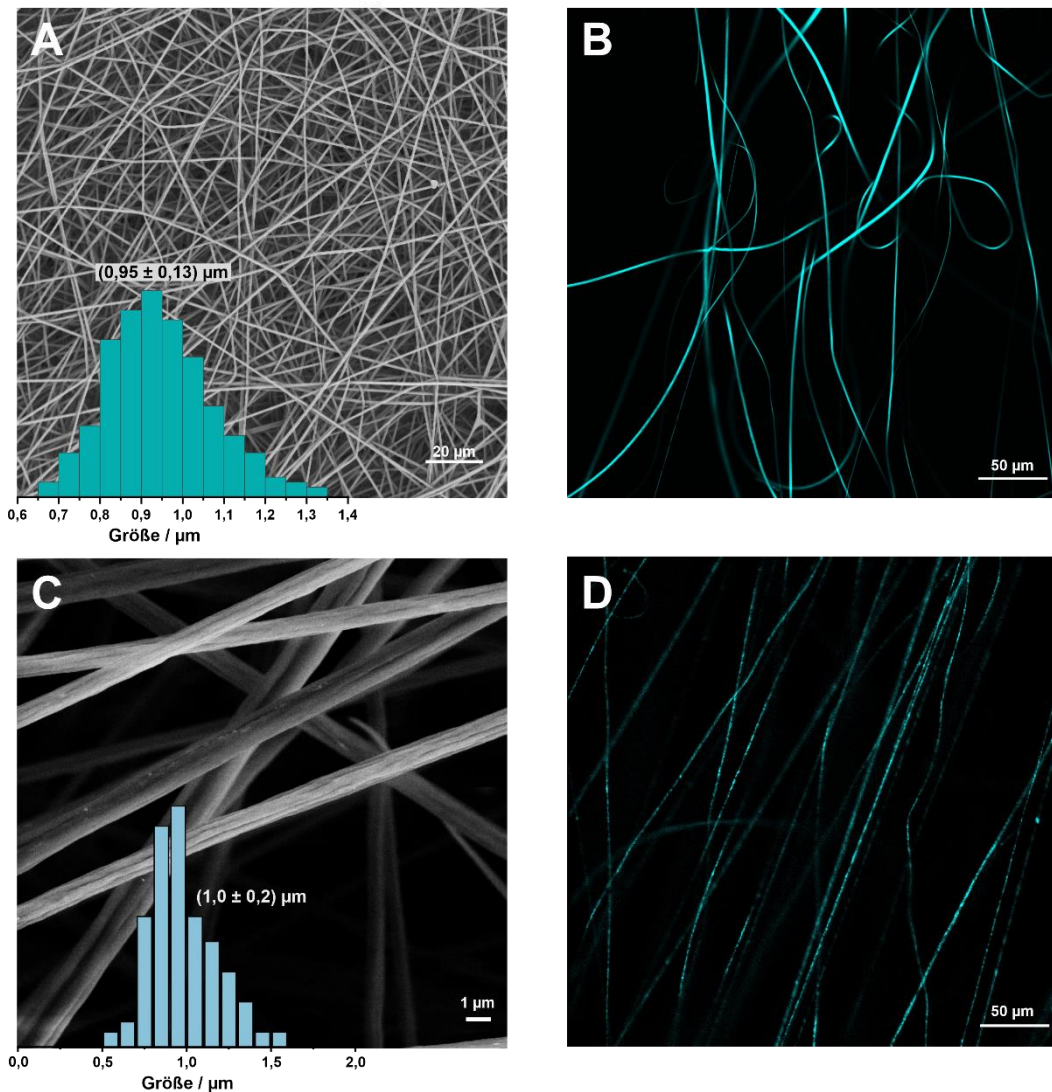


Abbildung 10: Aussehen und Größenverteilung von Polystyrol-Nanofasern mit 0,3 m% DPA-Markierung (A,B) bzw. 17 m% UCNP-Markierung (C,D). (A) SEM-Aufnahme der DPA-PS-Nanofasern inklusive entsprechender Größenverteilung. (B) Visualisierung der DPA-PS-Nanofasern bei Anregung am Fluoreszenzmikroskop (λ_{ex} : 405 nm, 1% Laserpower, $0,66 \mu\text{s}\cdot\text{Pixel}^{-1}$). (C) Nahaufnahme der PS-Nanofasern mit eingebetteten UCNPs inklusive deren Faser-Größenverteilung. (D) Mikroskopische Aufnahme der UCNP-PS-Nanofasern bei Anregung mit einem 2-Photonenlaser (λ_{ex} : 980 nm, 1200 mW, 50% Laserpower, $41,26 \mu\text{s}\cdot\text{Pixel}^{-1}$) und Detektion mithilfe eines 485 nm-Kurzpassfilters (SP485 IR+).

Die Lumineszenz der markierten PS-Nanofasern (Abbildung 10B,D) zeigte sich bei Ansicht am LSM sowohl für das DPA-Doping als auch das UCNP-Doping homogen, was eine homogene Einbettung der beiden Label in die Polymermatrix annehmen ließ.

In den SEM-Aufnahmen der UCNP-PS-Nanofasern (Abbildung 10C) waren darüber hinaus vereinzelt feine Risse zu erkennen, die eingearbeitete UCNPs freilegten.

1.2.2 Leaching von DPA und UCNPs aus der Matrix

Um die Qualität der Label-Einbettung in die Polystyrolfasern zu beurteilen, wurde eine Leaching-Studie durchgeführt, die zeigen sollte, wie viel des jeweiligen Labels aus der Matrix austritt. Diese Messungen dienten zudem als Grundlage für die Beurteilung einer möglichen Zytotoxizität der Label selbst.

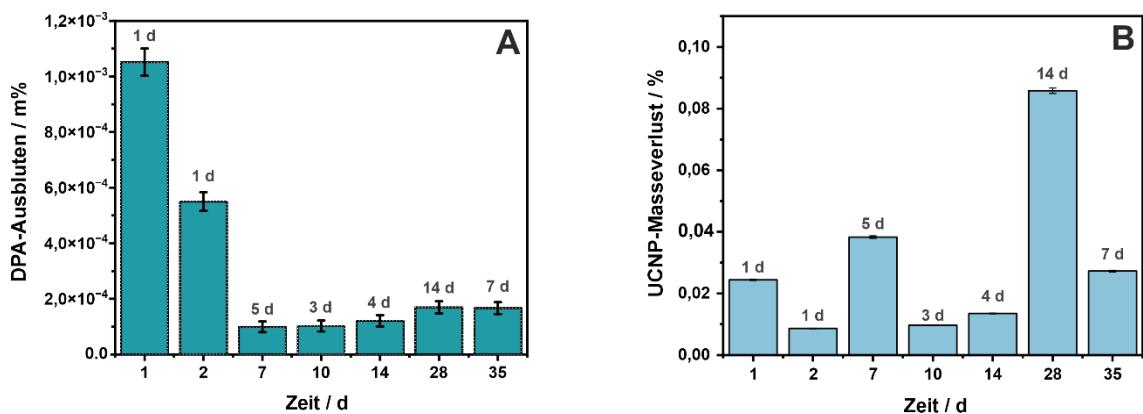


Abbildung 11: Leaching-Studie zur Untersuchung der austretenden Label aus der Polymermatrix in wässrige Lösungen über einen Zeitraum von 5 Wochen. Die Angaben über den Balken zeigen die effektive Zeit, die während eines Dialyseschritts vergangen ist. (A) Ausbluten von DPA aus PS-Nanofasern in eine wässrige Lösung über einen Zeitraum von 5 Wochen. Die Messung erfolgte über Fluoreszenzmessungen. (B) Masseverlust von UCNPs (entspricht Austreten von UCNPs aus der Matrix) aus NaYF₄:Yb,Tm@NaYF₄-markierten PS-Nanofasern in eine wässrige Lösung über einen Zeitraum von 5 Wochen. Die Quantifizierung erfolgte via ICP-OES.

Hierzu wurden die DPA- sowie UCNP-PS-Nanofasern über einen Zeitraum von insgesamt 5 Wochen in Wasser dialysiert und das Ausbluten von DPA (Abbildung 11A) bzw. der Masseverlust an UCNPs (Abbildung 11B) erfasst. Beide Nanofaser-Typen zeigten sehr geringe Labelverluste von 0,0023 m% DPA bzw. 0,2 m% UCNPs. Es ist daher von einer stabilen Einbettung der beiden Markierungen in die Polymermatrix auszugehen und auch während Langzeitexperimenten nicht mit einem Abfall der

Signalintensität zu rechnen. Die errechneten Konzentrationen an Lanthanoid- sowie Fluorid-Ionen, die durch den Masseverlust der UCNPs frei werden, lagen mit $3 \cdot 10^{-4}$ mM deutlich unterhalb der jeweiligen bisher berichteten Zytotoxizitätsgrenzen^{61,137–139}.

Die Analysen zeigten insgesamt eine homogene Distribution der Label in der Polymermatrix und ein sehr geringes Leaching dieser Label aus der Matrix heraus.

1.3 Produktion des eigenen Mikroplastiks

Mikroplastik kommt sowohl in der Umwelt größtenteils in Form von Fasern und Fragmenten vor, als auch im Menschen^{23–25,43}. Studien hingegen verwenden hauptsächlich sphärische Partikel, obwohl die Partikelform als wichtiger Einflussfaktor in Bezug auf die Effekte von Mikroplastik gilt⁷⁸.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher realitätsnahes Mikroplastik hergestellt werden, das entsprechend von irregulärer Form oder faserig sein sollte.

Dass auch die Größe des MPs eine entscheidende Rolle spielt, zeigten Studien mit sphärischen PS-Partikeln, die auf eine starke Korrelation zwischen Partikelgröße und Gewebsakkumulation der Partikel hindeuteten. Partikel im Größenbereich von 4-20 μm zeigten hierbei eine höhere Neigung sich im Gewebe anzusammeln⁶⁹. Dem entsprechend zeigten Stock et al.⁷⁰ eine erhöhte Aufnahme von 4 μm großen PS-Sphären in intestinale Zellen.

Für die MP-Fragmente wurde daher eine Größe von etwa 4 μm angestrebt.

1.3.1 Evaluation der MP-Produktionsstrategien anhand von Größe und Form

Getestet wurden insgesamt sechs verschiedene Degradierungsansätze, die Vermahlungen mit einer Planetenkugelmühle sowie einer Kryomühle und eine Zerkleinerung mithilfe eines Ultraturrax-Dispergierers einschlossen.

Während beide Mühlen je nach Mahlkugelgröße vorwiegend mit Prall oder Reibung arbeiten, nutzt eine Kryomühle zusätzlich sehr niedrige Temperaturen, um das Material vorzuverspröden. Die Zerkleinerung mit einem Ultraturrax-Dispergierer beruht hingegen auf einem Rotor-Stator-Prinzip.

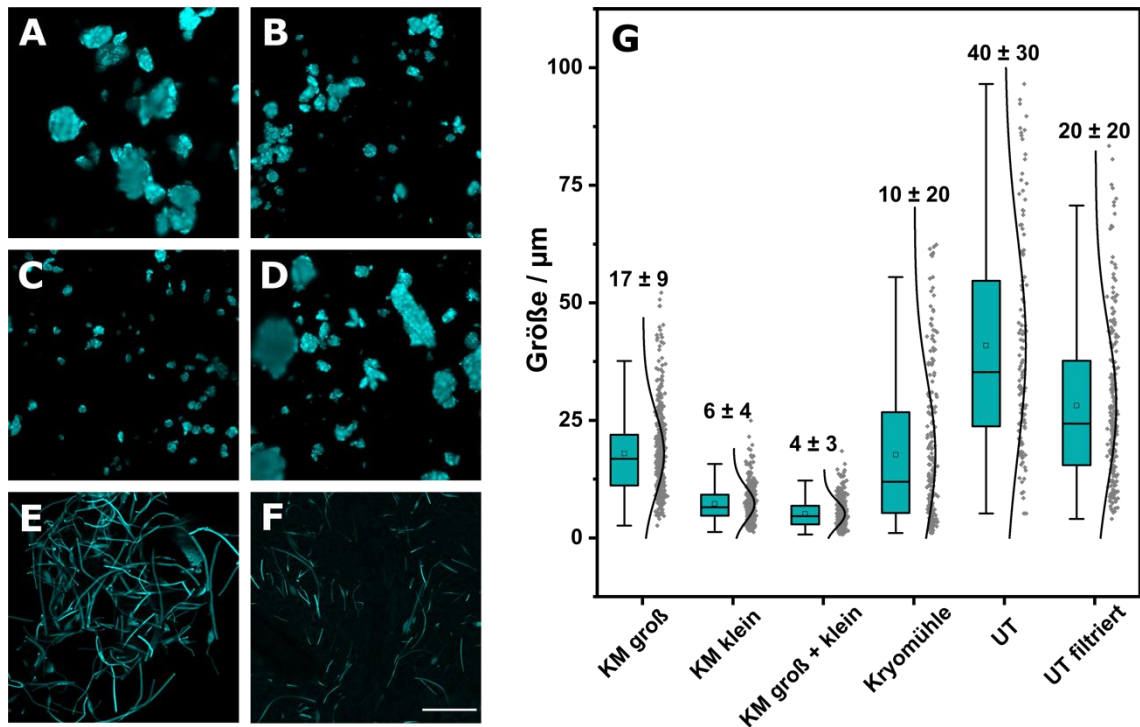


Abbildung 12: Vergleich von Partikelformen und der resultierenden Größenverteilungen je nach verschiedenen MP-Produktionsstrategien. (A) MP, das durch Vermahlung mit einer Planetenkugelmühle mit großen Mahlkugeln generiert wurde (7x 10 mm Mahlkugeln; 9 Mahlzyklen à 2 min). (B) MP, das durch Vermahlung mit einer Planetenkugelmühle mit kleinen Mahlkugeln generiert wurde (3000x 2 mm Mahlkugeln; 9 Mahlzyklen à 2 min). (C) MP-Partikel von (A) nach einem zweiten Mahlvorgang mit kleinen Mahlkugeln (3000x 2 mm Mahlkugeln; 9 Mahlzyklen à 2 min). (D) Durch Kryogenvermahlung erzeugtes MP (8x 12 mm Mahlkugeln; 9 Mahlzyklen à 2 min und 1 min Zwischenkühlung). (E) MP, das durch Zerkleinerung mithilfe eines Ultraturrax generiert wurde (in 1 m% Sojalecithin-Lösung). (F) Faserstücke aus (E) nach Filtration durch ein 20 μm Metallsieb. (G) Darstellung der Größenverteilungen der verschiedenen Zerkleinerungsmethoden ($n > 400$). Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Die geringsten Partikelgrößen konnten in Form von Fragmenten mit einem Durchmesser von $(4 \pm 3) \mu\text{m}$ bei Verwendung der Planetenkugelmühle mit sowohl großen Mahlkugeln (9x 2 min) als auch im Anschluss kleinen Mahlkugeln (9x 2 min) erzielt werden. Die Kombination aus Prall- und Reibungskräften erwies sich demnach als vorteilhaft gegenüber einer Nutzung von ausschließlich großen (Partikeldurchmesser: $(17 \pm 9) \mu\text{m}$) oder kleinen (Partikeldurchmesser: $(6 \pm 4) \mu\text{m}$) Mahlkugeln. Die kryogene Vermahlung resultierte in deutlich größeren Partikeldurchmessern von $(10 \pm 20) \mu\text{m}$, wobei die sehr breite Größenverteilung zu bemerken ist. Hinzu kamen sichtbare Metallverunreinigungen im Endprodukt, die einem Abrieb der Mahlwerkzeuge entstammten. Eine Zerkleinerung

mithilfe eines Ultraturrax-Dispergierers resultierte in faserigem Mikroplastik mit einer Länge von $(40 \pm 30) \mu\text{m}$ vor bzw. $(20 \pm 20) \mu\text{m}$ nach Filtration durch ein Metallsieb.

Somit konnten sowohl Mikroplastik-Fasern als auch Mikroplastik-Fragmente hergestellt werden, deren Formen (Abbildung 13) denen von Mikroplastik aus der Umwelt, wie es in der Literatur charakterisiert wurde, sehr nahe kommen^{72,140,141}.

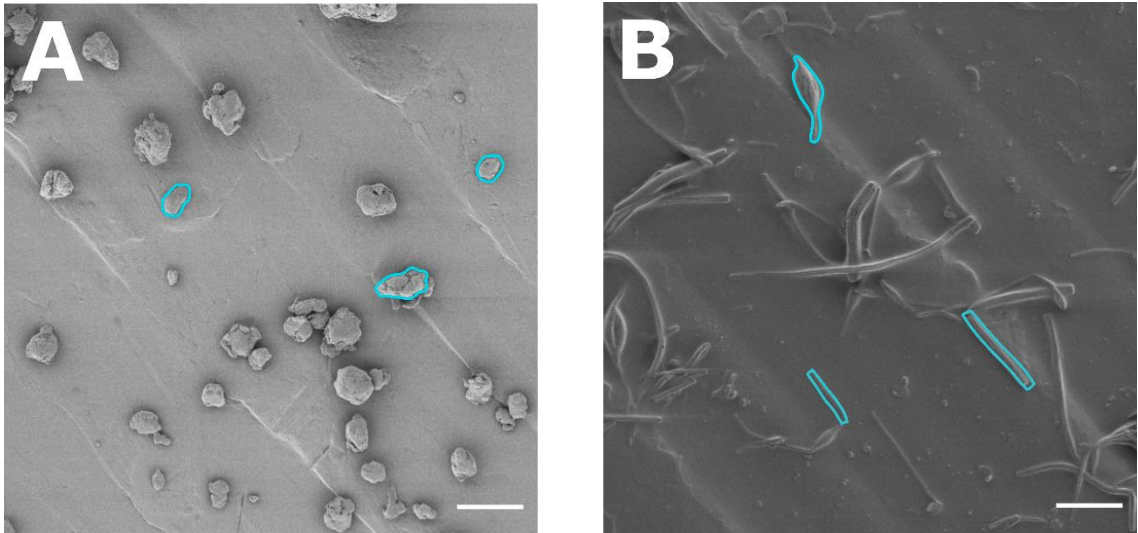


Abbildung 13: Abbildung der Formen des produzierten PS-MPs anhand von SEM-Aufnahmen von realitätsgetreuem MP aus Polystyrol, das mithilfe einer Kugelmühle zu Fragmenten (A) bzw. mithilfe eines Ultraturrax zu Faserstücken (B) zerkleinert wurde. Die blaue Umrandung zur Verdeutlichung der Partikelformen erfolgte händisch in Inkscape.

Die Maßstabsbalken entsprechen je $20 \mu\text{m}$.

Insgesamt betrachtet erzeugte eine Vermahlung mit großen sowie anschließend kleinen Mahlkugeln in der Planetenkugelmühle die kleinsten Mikroplastik-Fragmente. Mithilfe eines Ultraturrax ließen sich zudem auch MP-Fasern generieren.

1.3.2 Charakterisierung der optimierten, eigenproduzierten MP-Fragmente zur Applikation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl DPA- als auch UCNP-markierte PS-MP-Fragmente hergestellt, die einer späteren Applikation dienen sollten. Das fluoreszierende DPA-MP soll in zukünftigen Anwendungen eingesetzt werden. Für den Distributionsversuch von Mikroplastik im Organismus sollte das UCNP-MP anschließend aufgrund seiner guten Quantifizierbarkeit – ohne einer Kontrollgruppe zu

bedürfen – erstmalig Verwendung finden. Beide MP-Sorten wurden über eine Einbettung des Labels in die PS-Matrix im Zuge des Elektrosplinnings von Nanofasern und anschließender Vermahlung in einer Planetenkugelmühle mit sowohl großen als auch nachfolgend kleinen Mahlkugeln produziert.

Das entstandene Mikroplastik wurden hinsichtlich Veränderungen im Material via FTIR, bezüglich seiner Größe via SEM und in seiner Suspendierbarkeit via Zeta-Potential-Messungen charakterisiert.

1.3.2.1 Materialidentifizierung mittels FTIR

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie erlaubt die Charakterisierung bzw. Reinheitskontrolle IR-aktiven Materials.

Nachstehend ist in Abbildung 14 das FTIR-Spektrum des entstandenen MPs aufgetragen.

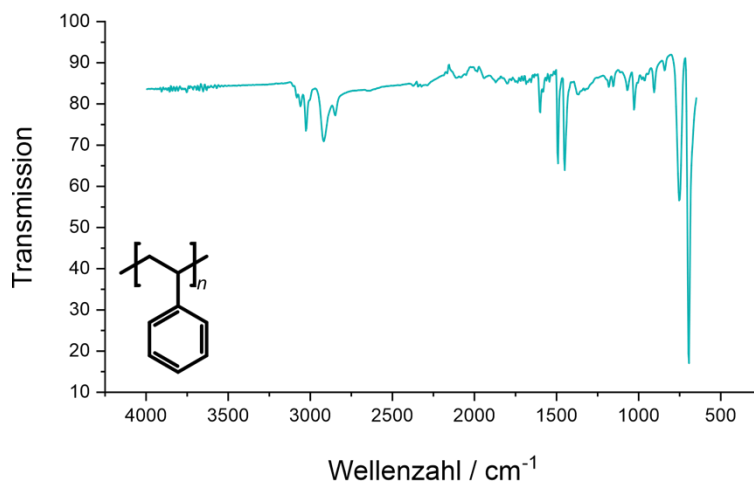


Abbildung 14: FTIR-Spektrum des selbst produzierten PS-Mikroplastiks.

Es zeigten sich die für PS typischen Banden wie sie in der Literatur beschrieben sind ¹⁴²: aromatische C-H-Streckschwingungen knapp über 3000 cm⁻¹, asymmetrische CH₂-Streckschwingungen bei etwa 2900 cm⁻¹, die typischen „Benzolfinger“ von 2000-1600 cm⁻¹, aromatische Ringmodi zwischen 1600-1450 cm⁻¹, sowie der für PS charakteristische Fingerprint-Bereich.

Daneben waren keine zusätzlichen Peaks ersichtlich, die auf Veränderungen wie z.B. Oxidation hingedeutet hätten.

Das Endmaterial konnte somit als Polystyrol bestätigt werden.

1.3.2.2 Formen und Größen der finalisierten MP-Partikel zur Applikation

Es wurden sowohl DPA- als auch UCNP-markierte MP-Partikel wie vorangehend beschrieben mithilfe von elektrogesponnenen Nanofasern und nachfolgender Zerkleinerung durch eine Planetenkugelmühle hergestellt.

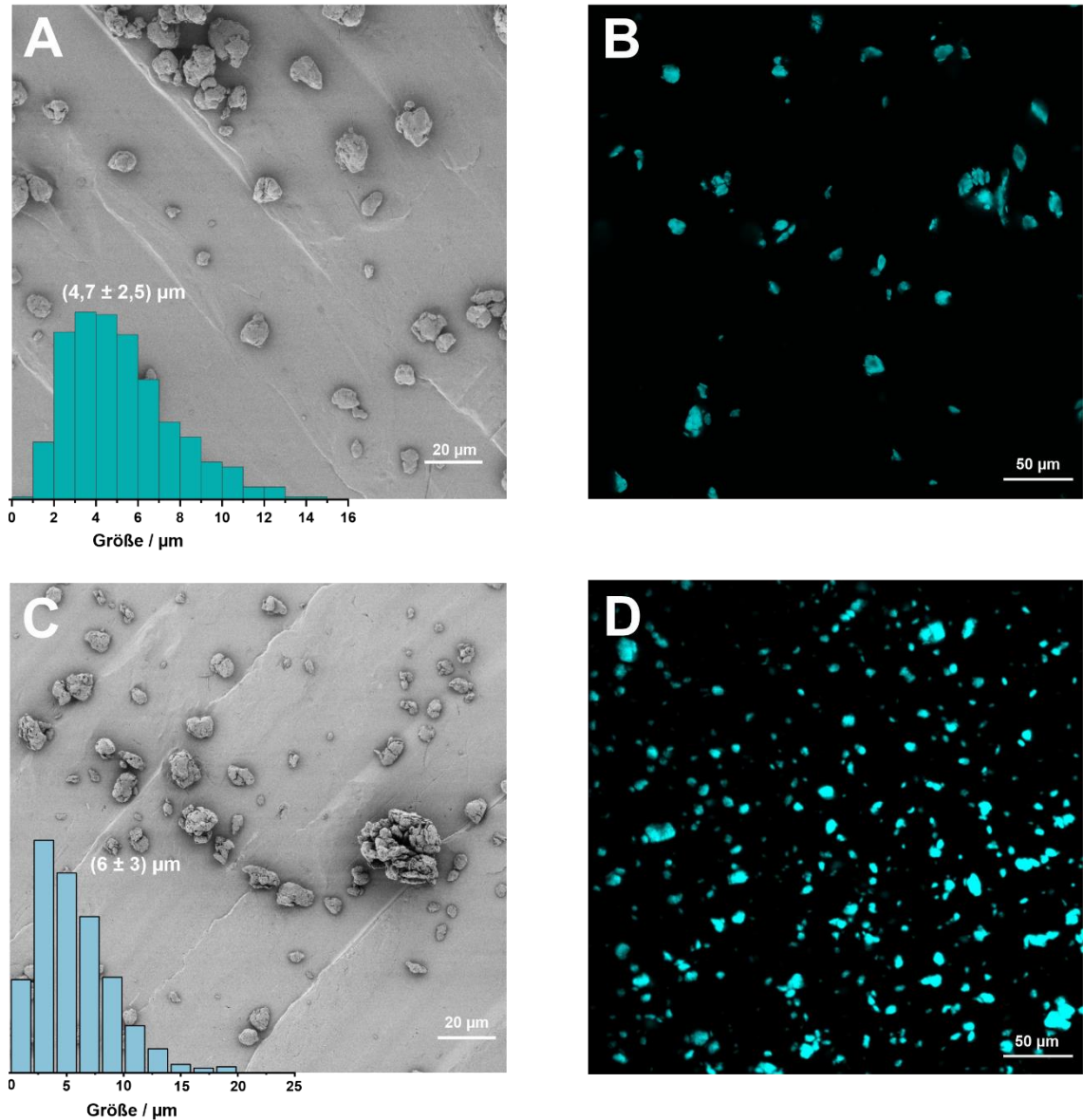


Abbildung 15: Formen und Größen der finalen MP-Partikel mit DPA-Markierung (A,B) und UCNP-Markierung (C,D). (A,C) SEM-Aufnahmen der MP-Fragmente mit dem jeweils zugehörigen Größenverteilungshistogramm. (B,D) Mikroskopische Aufnahmen der finalen Partikel. DPA-MP: $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, 1% Laserleistung, $0,66 \mu\text{s}\cdot\text{Pixel}^{-1}$. UCNP-MP: $\lambda_{\text{ex}} = 980 \text{ nm}$, 1200 mW, 50 % Laserleistung, $41,26 \mu\text{s}\cdot\text{Pixel}^{-1}$.

Beide MP-Sorten wiesen mit $(4,7 \pm 2,5) \mu\text{m}$ für DPA-MP und $(6 \pm 3) \mu\text{m}$ für UCNP-MP ähnliche Größen auf, die auch der erzielten Größe dieser Produktionsstrategie sehr nahekommen und somit auf eine gute Reproduzierbarkeit der Methodik hindeuteten. Beide Partikel-Arten zeigten sich in den SEM-Aufnahmen als irregulär geformte Fragmente. Sowohl das DPA-markierte MP (Abbildung 15B) als auch das UCNP-markierte MP (Abbildung 15D) ließen sich fluoreszenzmikroskopisch gut visualisieren mithilfe eines Argonlasers für DPA-MP und eines 2-Photonenlasers für UCNP-MP.

1.3.2.3 Zeta-Potential

Die eigens hergestellten Mikroplastik-Partikel sollten zukünftig vorwiegend in Suspensionen genutzt werden. Um die Suspendierbarkeit der MP-Fragmente zu ermitteln und daraus mögliche Suspensionsstabilisatoren abzuleiten, wurden exemplarisch unmarkierte Partikel ausgewählt und deren Zeta-Potential in destilliertem Wasser ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) bestimmt.

Die Messungen ergaben ein Zeta-Potential von $\zeta = (-31,3 \pm 1,63) \text{ mV}$. Ab einem Potential von $\pm 30 \text{ mV}$ wird eine stabile Dispersion angenommen¹³⁰.

Insgesamt konnte im Rahmen der Charakterisierung die Matrix der produzierten Partikel als Polystyrol bestätigt werden, wobei die DPA-Partikel etwas kleinere Partikelgrößen zeigten als solche mit UCNP-Markierung. Für die Partikel wurde ein Zeta-Potential von mehr als -30 mV in Wasser gemessen.

1.4 Charakterisierung und Qualitätskontrolle des zugekauften Mikroplastiks

Wie bereits erwähnt, wurden für einen Teil der geplanten Versuche verschiedene Mikroplastik-Partikel bei der BS-Partikel GmbH kommerziell erworben. Alle Partikel trugen Perylen in unbestimmter Konzentration als Fluoreszenz-Label.

Bei den Partikeln handelte es sich um sphärische Polystyrol-Partikel mit einem angegebenen Durchmesser von $40 \mu\text{m}$, sowie irreguläre Mikroplastikpartikel aus Polystyrol (PS), Polypropylen (PP) oder Polyethylenterephthalat (PET) mit jeweils angegebenem Durchmesser von $20\text{-}50 \mu\text{m}$.

Zur Qualitätssicherung fand eine Überprüfung der grundlegenden Parameter statt, d.h. des Polymer-Materials, der Form, sowie der Größe.

1.4.1 FTIR – Materialkontrolle

Die Überprüfung der Polymerzusammensetzung erfolgte mithilfe von IR-Spektroskopie, da die charakteristischen Absorptionsbanden bei spezifischen Wellenlängen einen Rückschluss auf das zugrundeliegende Material erlauben.

In Abbildung 16 sind die einzelnen Spektren der zugekauften Mikroplastik-Partikel abgebildet.

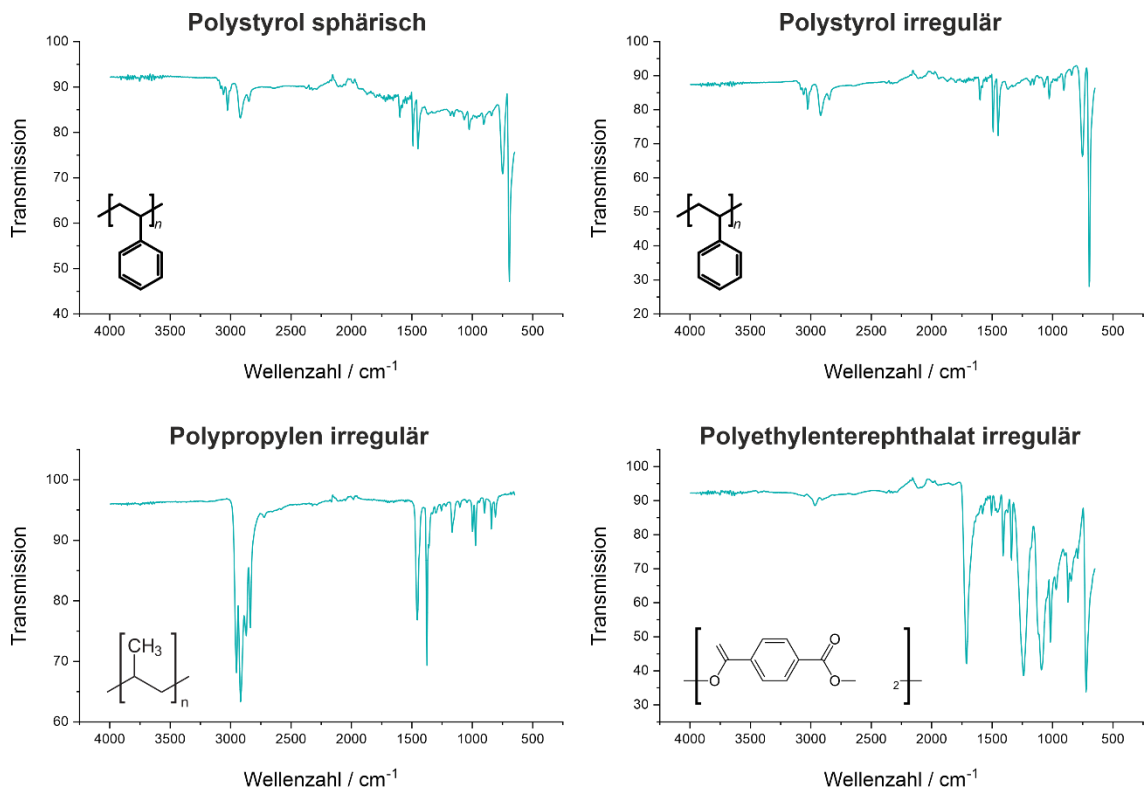


Abbildung 16: FTIR-Spektren der zugekauften Mikroplastik-Partikel.

Die Spektren der beiden zugekauften Polystyrol-Partikel (sphärisch und irregulär) zeigen Banden bei identischen Wellenlängen, die denen von Polystyrol entsprechen (siehe Banden-Zuordnung unter 1.3.2.1)¹⁴². Auch für die erworbenen Polypropylen-Partikel konnte die Materialidentität bestätigt werden, da dieses mit symmetrischen und

asymmetrischen Streckschwingungen von CH₃- und CH₂-Gruppen bei etwa 2900 cm⁻¹ und Inversionsschwingungen der Methylgruppen bei ca. 1400 cm⁻¹ die typischen Polypropylen-Banden zeigte¹⁴². Der Fingerprintbereich entsprach ebenfalls Polypropylen-Referenzen. Daneben wurden die Absorptionsbanden des irregulär geformten PETs mit jenen aus der Literatur¹⁴³ verglichen: eine Streckschwingung der Carbonylgruppe (C=O) Gruppe eines aromatischen bei rund 1700 cm⁻¹, eine solche Schwingung der C-C-O-Verbindung des aromatischen Esters bei 1250 cm⁻¹ sowie eine weitere Streckschwingung der O-C-C-Verbindung dieses Esters bei 1100 cm⁻¹. Die gemessenen Banden, sowie der Fingerprintbereich, entsprachen den Vergleichsspektren und belegten die Identität des Materials als PET.

1.4.2 Formen und Größenverteilung

Da die Form und Größe von Mikroplastik entscheidend Einfluss auf deren Aufnahme und Akkumulation im Organismus nimmt²⁵, wurden die bestellten Partikel zur Überprüfung der Herstellerangaben mittels SEM-Aufnahmen hinsichtlich Form und Größe analysiert. Geliefert wurden laut Herstellerangaben: sphärische PS-Partikel mit einem Durchmesser von 40 µm, sowie irreguläre Partikel aus PS, PP bzw. PET mit jeweils 20-50 µm.

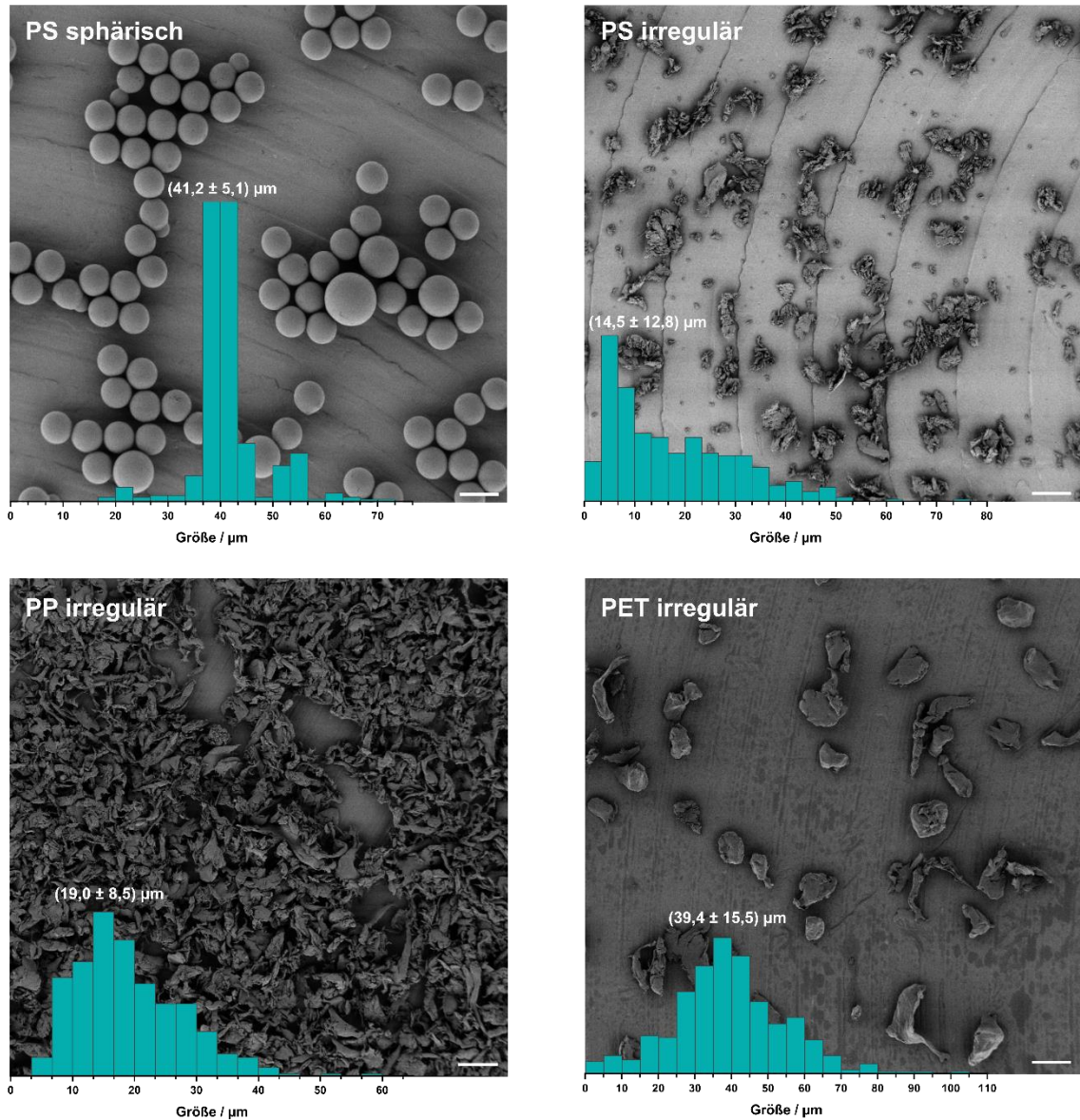


Abbildung 17: Formen und Größenverteilung der zugekauften Mikroplastik-Partikel anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm.

Die Auswertung mithilfe von SEM-Aufnahmen bestätigte die jeweils angegebenen Partikelformen, wobei die irregulär geformten Partikel viele spitze Anteile aufzeigten. Hinsichtlich der Größenverteilungen ergab sich für die sphärischen PS-Partikel ein weitgehend homogenes Bild mit einem Durchmesser von $(41,2 \pm 5,1) \mu\text{m}$. Die irregulären Partikel zeigten deutlich breitere Größenverteilungen von $(14,5 \pm 12,8) \mu\text{m}$ für Polystyrol, $(19,0 \pm 8,5) \mu\text{m}$ für Polypropylen sowie $(39,4 \pm 15,5) \mu\text{m}$ für Polyethylenterephthalat. Im Allgemeinen zeigten alle irregulären Partikel-Sorten sehr

viele Partikel unterhalb des angegebenen Größenbereichs von 20-50 µm, was für die Beurteilung von Partikelfunden im Gewebe Berücksichtigung finden musste.

Anhand der gezeigten Daten lässt sich zusammenfassen, dass die zugekauften Partikel in Material und Form den Angaben des Herstellers entsprachen. Hinsichtlich der Größe wurden vor allem für die irregulären PS- sowie PP-Fragmente allerdings erhebliche Abweichungen zugunsten kleinerer Partikeldurchmesser deutlich. Grundsätzlich enthielten alle irregulären MP-Sorten eine Vielzahl an Partikeln mit einem Durchmesser unterhalb der angegebenen 20 µm.

2. Deposition von MP im Organismus der Maus

Ziel der Analysen dieses Kapitels war die Aufklärung von Verteilung, Ablagerung und Ausscheidung von Mikroplastik-Fragmenten. Hierzu erfolgte zum einen eine quantitative Auswertung der Distribution von MP in der Maus sowie dessen Ausscheidung mit Stuhl oder Fäzes sowie zum anderen eine qualitative Beurteilung von MP-Ablagerungen in verschiedenen Organen einer Maus.

2.1 Quantitative Vermessung der Ausscheidung und Distribution von Mikroplastik-Fragmenten in der Maus – Mikroplastik akkumuliert bereits nach einmaliger oraler Exposition in verschiedenen Organen

Um potentiell gesundheitsschädliche Effekte von Partikeln zu untersuchen, ist es zunächst sinnvoll, die Betroffenheit verschiedener Organe bezüglich einer Ablagerung bzw. Akkumulation der Partikel auszumachen. Dies bildet die Basis für nachfolgende Analysen von Auswirkungen auf besonders belastete Organe oder solche, die sich von einem Schaden durch die Belastung nur in Maßen erholen können.

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die quantitative Verteilung von realitätsnahen Mikroplastik-Fragmenten im Körper der Maus sowie deren Ausscheidung. Hierzu wurde das UCNP-markierte Mikroplastik oral in die Mägen von Mäusen eingebracht, wobei eine akute Exposition (einmalig) sowie eine chronische Exposition (täglich über 7 Tage) simuliert wurden. Die Analyse erfolgte mittels ICP-OES.

2.1.1 Exkretion des Mikroplastiks vorwiegend über Fäzes

Im Rahmen der Distributionsanalysen stellte sich die wichtige Frage, auf welchem Weg oral aufgenommenes MP den Organismus wieder verlässt. Da bei Einbringen von Partikeln nicht mit einer Ausscheidung über die Haut zu rechnen war, wurden Urin sowie Fäzes als mögliche Exkretionsoptionen untersucht. Die Quantifizierung der MP-Ausscheidung mit Urin oder Fäzes erfolgte anhand von Proben, die jeweils über 24 h im Anschluss an die letzte MP-Applikation gesammelt wurden. In Abbildung 18 sind die Absolutwerte der jeweils ausgeschiedenen Mikroplastikmassen aufgetragen, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

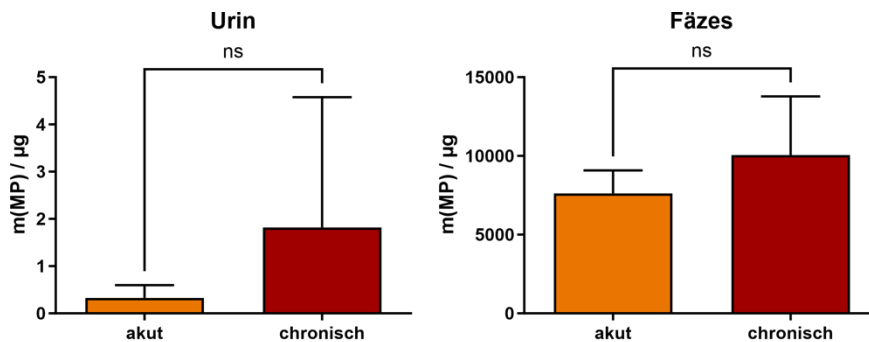


Abbildung 18: Ausscheidung oral aufgenommenen Mikroplastiks über Urin und Fäzes. Die MP-Applikation des UCNP-dotierten PS-MPs erfolgte einmalig (akut) bzw. über 7 Tage (chronisch). Das Probenmaterial wurde jeweils über 24 h im Anschluss in die letzte Applikation gewonnen.

Akut wurde etwa die 15.000fache Menge an MP über die Fäzes ausgeschieden im Vergleich zur Exkretion mit dem Urin. Auch chronisch (nach 7 Tagen) bildete sich ab, dass etwa die 10.000fache Menge den Organismus mit den Fäzes verließ. Sowohl bei der Betrachtung der Urin- als auch der Fäzes-Werte zeigte sich der Trend, dass mit einer längerfristigen Mikroplastik-Exposition eine erhöhte Ausscheidung einherging.

2.1.2 MP-Akkumulation in Milz, Hoden und Pankreas besonders stark

Neben der Exkretion des Plastiks, war die Ablagerung der Partikel in den Organen von besonderem Interesse. Hier erfolgte ebenfalls eine Gegenüberstellung der akuten und chronischen Werte, wobei die gefundenen MP-Mengen allerdings auf das Gewicht des jeweiligen Organs bezogen wurde, um Unterschiede in den Organgrößen zu berücksichtigen. Um zu überprüfen, ob nach der Organentnahme noch größere Mengen

MP im Korpus und damit in den restlichen Körperanteilen wie z.B. Fettgewebe oder Muskulatur verblieben waren, wurde auch dieser verascht und mittels ICP-OES analysiert.

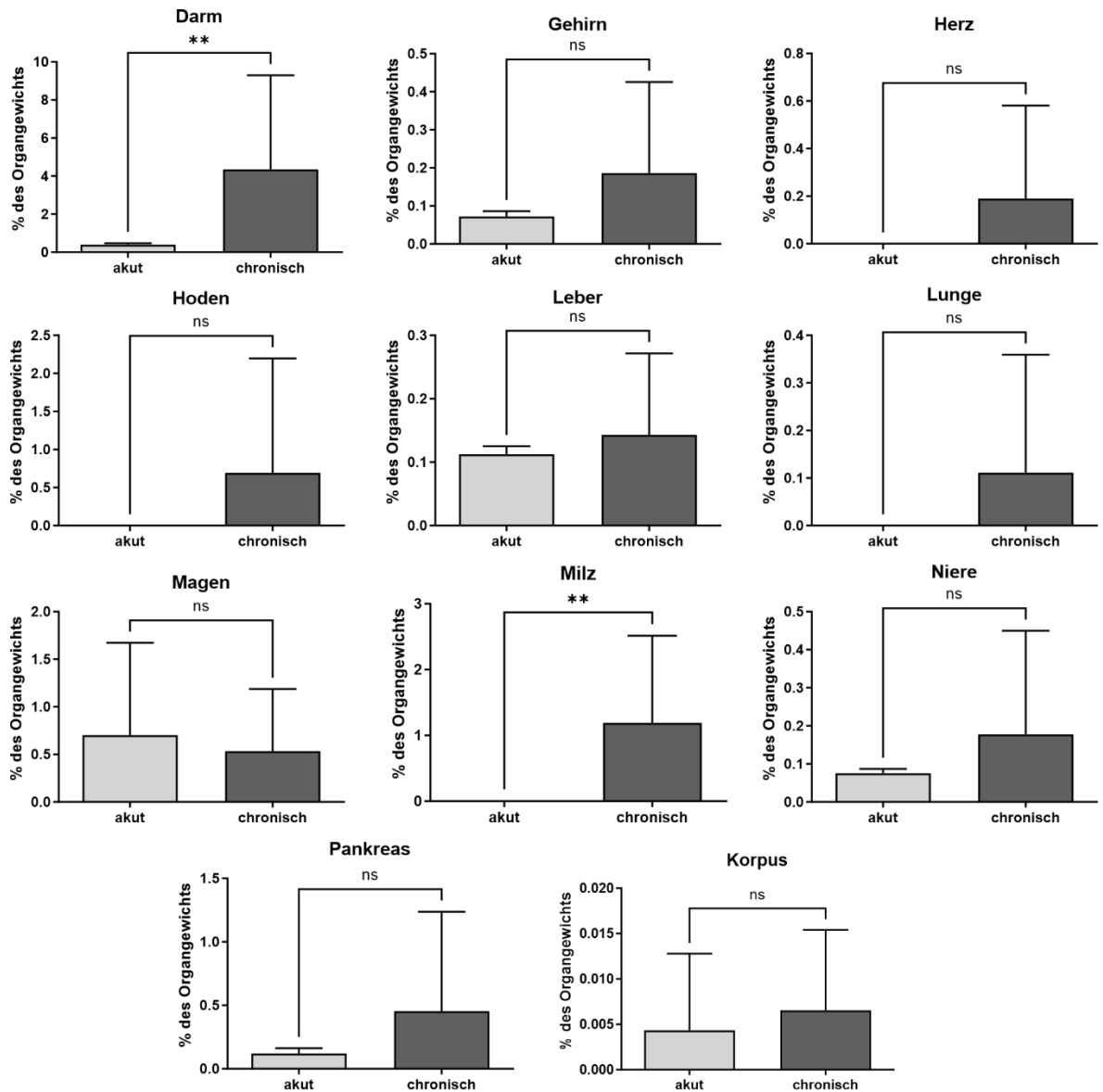


Abbildung 19: Prozentuale Belastung verschiedener Organe und dem übrigen Korpus nach einmaliger (akut) bzw. siebentägiger (chronisch) orale Applikation von UCNP-dotierten Mikroplastik-Fragmenten aus Polystyrol. Für die prozentuale Angabe wurden die gefundenen Massen auf das jeweilige Organgewicht bezogen.

Die Auswertung der in Abbildung 19 dargestellten Organe zeigt bis auf den Magen immer einen ansteigenden Trend von akuter zu chronischer Exposition. Besonders ausgeprägt sind dabei die Unterschiede in Darm und Milz, die sich beide statistisch signifikant

zeigen. Bei Magen und Darm gilt grundsätzlich zu berücksichtigen, dass die Organe vor der Veraschung nicht gespült wurden und sich deren Organgewicht somit zu großen Teilen aus dem enthaltenen Chymus ergibt. Den Daten für Herz, Hoden, Lunge und Milz ist zu entnehmen, dass nach akuter Gabe noch kein Mikroplastik detektiert werden konnte, die chronische Gabe jedoch zu einer sichtbaren Akkumulation an Partikeln geführt hat. Betrachtet man die prozentualen Anteile – Magen und Darm wegen der Gewichtsverzerrung durch den Chymus exkludiert – so zeigten sich vor allem die Milz, die Hoden sowie das Pankreas besonders von Mikroplastik-Ablagerungen betroffen. Davon abgesehen fällt auf, dass in Gehirn, Leber, Niere und Pankreas – Organen, die nicht wie Magen oder Darm direkt mit dem applizierten Material in Kontakt kamen – bereits nach einmaliger oraler Applikation erhebliche Mengen an MP zu finden war. Im restlichen Korpus verblieb ein sehr geringer Anteil an Partikeln.

2.1.3 99% oral aufgenommenen Mikroplastiks werden mit Fäzes eliminiert

Ein Kernelement dieser Arbeit war die Quantifizierung von Distribution und Exkretion von oral aufgenommenem Mikroplastik in der Maus. Die Daten der ICP-OES-Messungen sind in Abbildung 20 grafisch dargestellt als prozentualen Anteil am gesamten detektierten Mikroplastik, wobei zwischen akuter Gabe (einmalig 10 mg) und einer chronischen Gabe (7 Tage, 10 mg täglich) unterschieden wurde.

Bei beiden Applikationszeiträumen entsprachen die in den letzten 24 h gesammelten Fäzes etwa 99% des gefundenen MPs, während die Ausscheidung über den Urin einen sehr viel geringeren Teil ausmachte. Entsprechend wurde zum einen ein großer Teil im Darm gefunden, der noch Chymus enthielt, sowie auch Ablagerungen in der Niere, die mit der Applikationsdauer anstiegen. Massentechnisch betrachtet wurde von allen Organen in der Leber am meisten MP detektiert, gefolgt von Pankreas und Gehirn. Herz, Hoden, Lunge und Milz zeigten im Zuge der siebentägigen MP-Applikation messbare Ablagerungen des Plastiks. Hierbei waren in Lunge und Herz deutlich weniger Partikel zu finden als in Hoden und Milz. Da die Einbringung des MPs über eine orale Gavage direkt in den Magen erfolgte, wurden auch hier größere Mengen Plastik gefunden. Der restliche Korpus, der z.B. Fettgewebe, Knochen oder auch Muskulatur enthielt, wies im Durchschnitt der chronischen Gruppe nur noch rund 0,017% auf.

Prozentuale Verteilung des detektierten Mikroplastiks

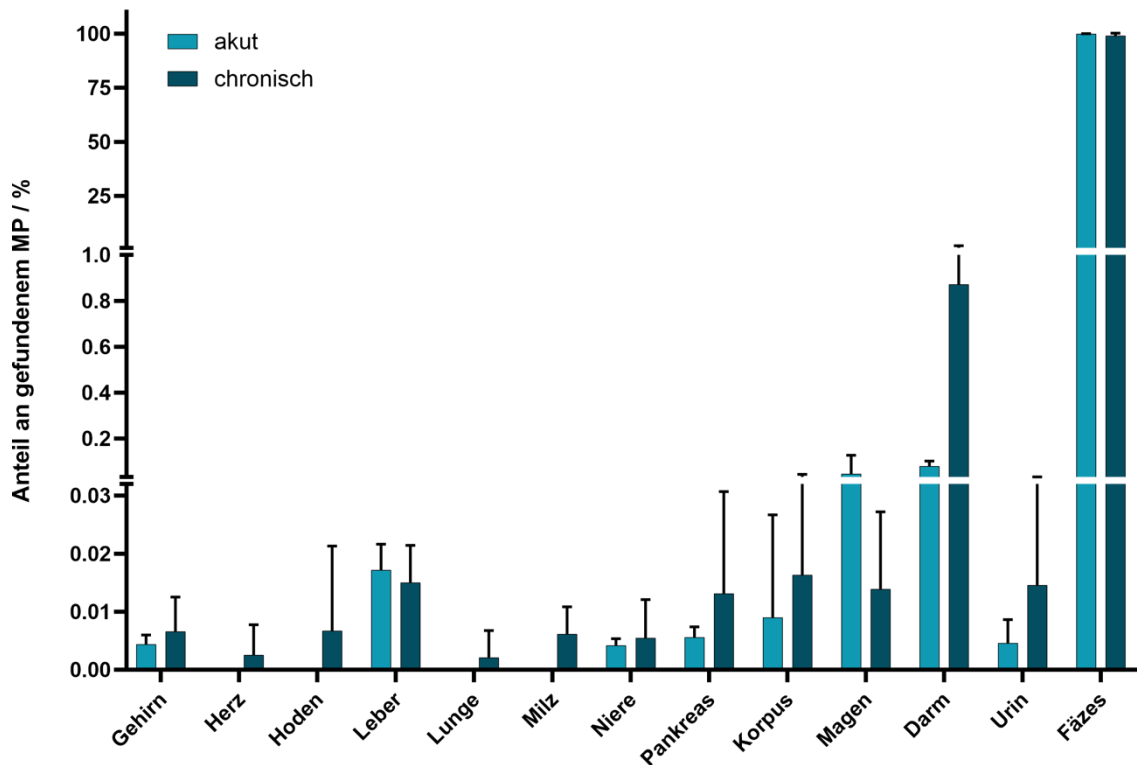


Abbildung 20: Prozentuale Verteilung des detektierten Mikroplastiks (Polystyrol-Fragmente mit UCNP-Dotierung) in Organen, restlichem Korpus, sowie Exkrementen. Dargestellt ist der jeweilige Anteil an der Gesamtmenge des im Tier detektierten Mikroplastiks.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Exkretion vorwiegend über die Fäzes stattfindet und auf diesem Wege etwa 99% des oral aufgenommenen MPs ausgeschieden werden. Grundsätzlich zeigten alle Organe messbare Ablagerungen, wobei in Bezug auf die reine Plastikmasse die Leber das meiste MP aufwies, gefolgt vom Pankreas. Bezogen auf das Gewicht des jeweiligen Organs hingegen, waren Milz, Hoden und Pankreas besonders betroffen.

2.2 MP-Funde in Organen und deren Lokalisation – jedes histologisch untersuchte Organ zeigte MP-Ablagerungen

Die qualitative Bewertung von MP-Ablagerungen erfolgte in verschiedenen Organen nach oraler Applikation wie unter 3.2 in den Methoden beschrieben. Die für diesen Versuchsteil ausgewerteten Tiere erhielten über 10 Tage täglich 2,5 mg Polystyrol-MP-Fragmente via oraler Gavage.

2.2.1 Gehirn

Wie unterstehender Abbildung 21 zu entnehmen ist, wurden in der Gehirnsubstanz MP-Partikel gefunden. Die Partikel waren sowohl von kleinerer als auch großer Dimension und waren zum Teil in direkter Nähe zu Blutgefäßen lokalisiert.

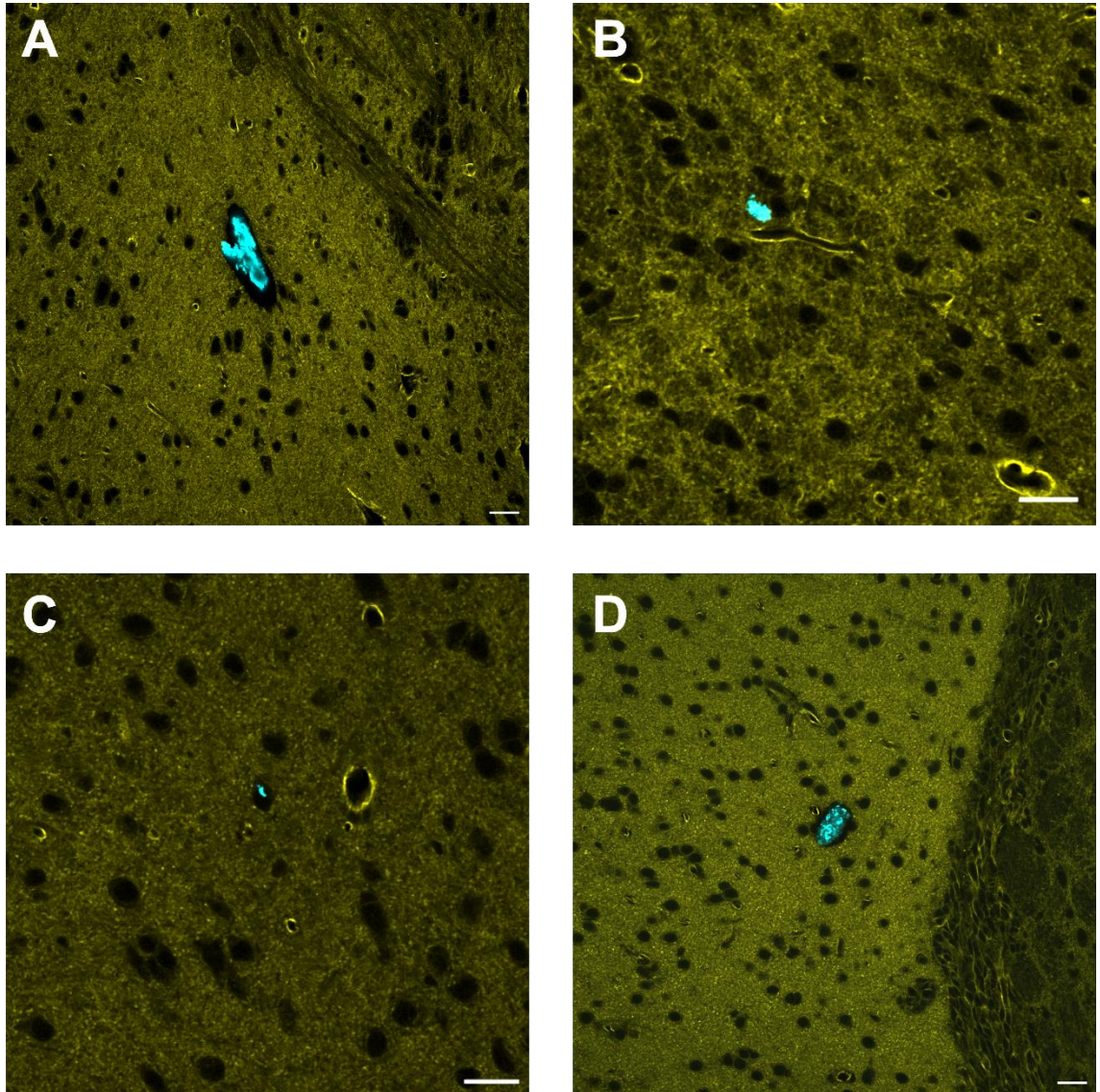


Abbildung 21: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten des Gehirns einer Maus nach Applikation von fragmentförmigem PS-MP mit anschließender Phalloidin-Färbung (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

2.2.2 Herz

Auch im Herzgewebe von Tieren, die die PS-Fragmente erhalten hatten, konnten vereinzelt Mikroplastik-Partikel detektiert werden. Teils wurden größere Partikel mit eher spitzen Formen erkennbar, teils auch kleinere Partikel, die weniger ausgeprägte Ecken aufwiesen.

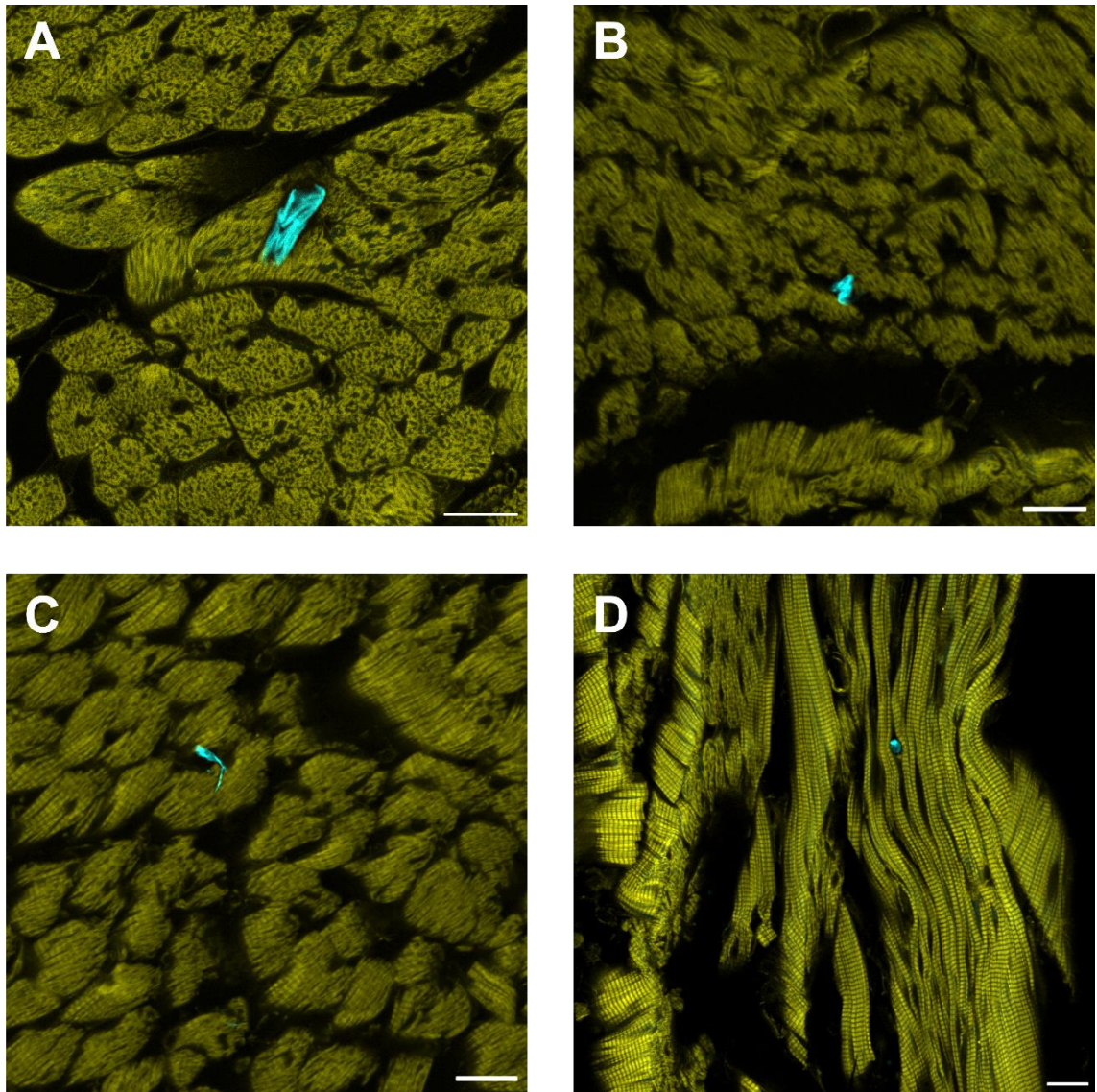


Abbildung 22: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten des Herzens einer Maus nach Applikation von fragmentförmigem PS-MP mit anschließender Phalloidin-Färbung (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

2.2.3 Lunge

In den Lungenschnitten der Versuchstiere wurden größere Mengen an MP-Fragmenten gefunden.

Auffallend war dabei, dass hier teils dichte Ansammlungen einer Vielzahl an Partikeln auf kleiner Fläche zu sehen waren. Ein bedeutender Anteil der PS-Fragmente zeigte sich zudem von Aktin-Strukturen (vgl. Phalloidin-Färbung) umschlossen.

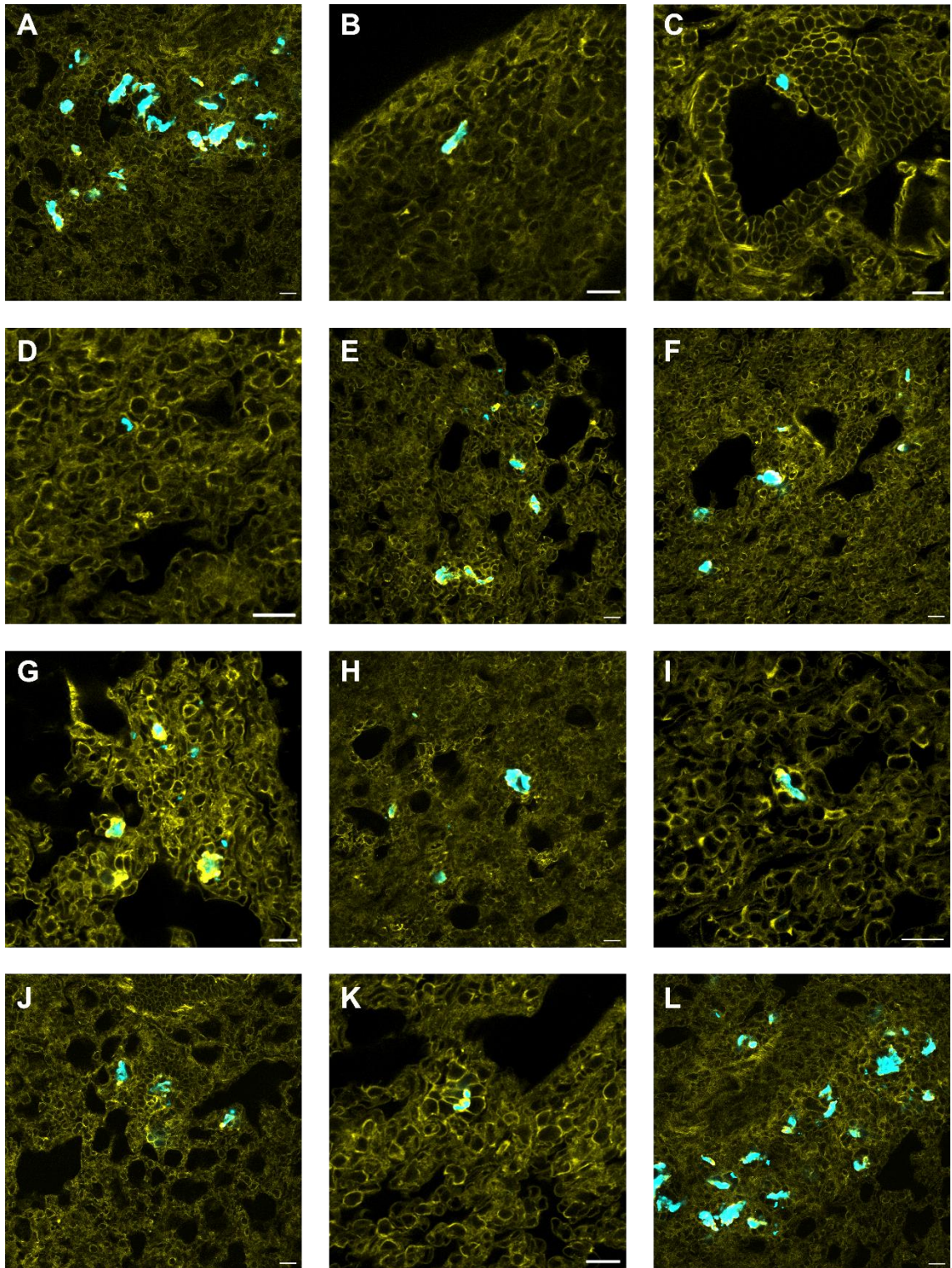


Abbildung 23: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten der Lunge einer Maus nach Applikation von fragmentförmigem PS-MP mit anschließender Phalloidin-Färbung (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

2.2.4 Leber

Auch die Leber wies eine Deposition des oral applizierten Mikroplastiks auf. Wie Abbildung 24 zeigt, waren die Partikel in Hepatozyten, Sinusiden bzw. bei Zentralvenen zu sehen.

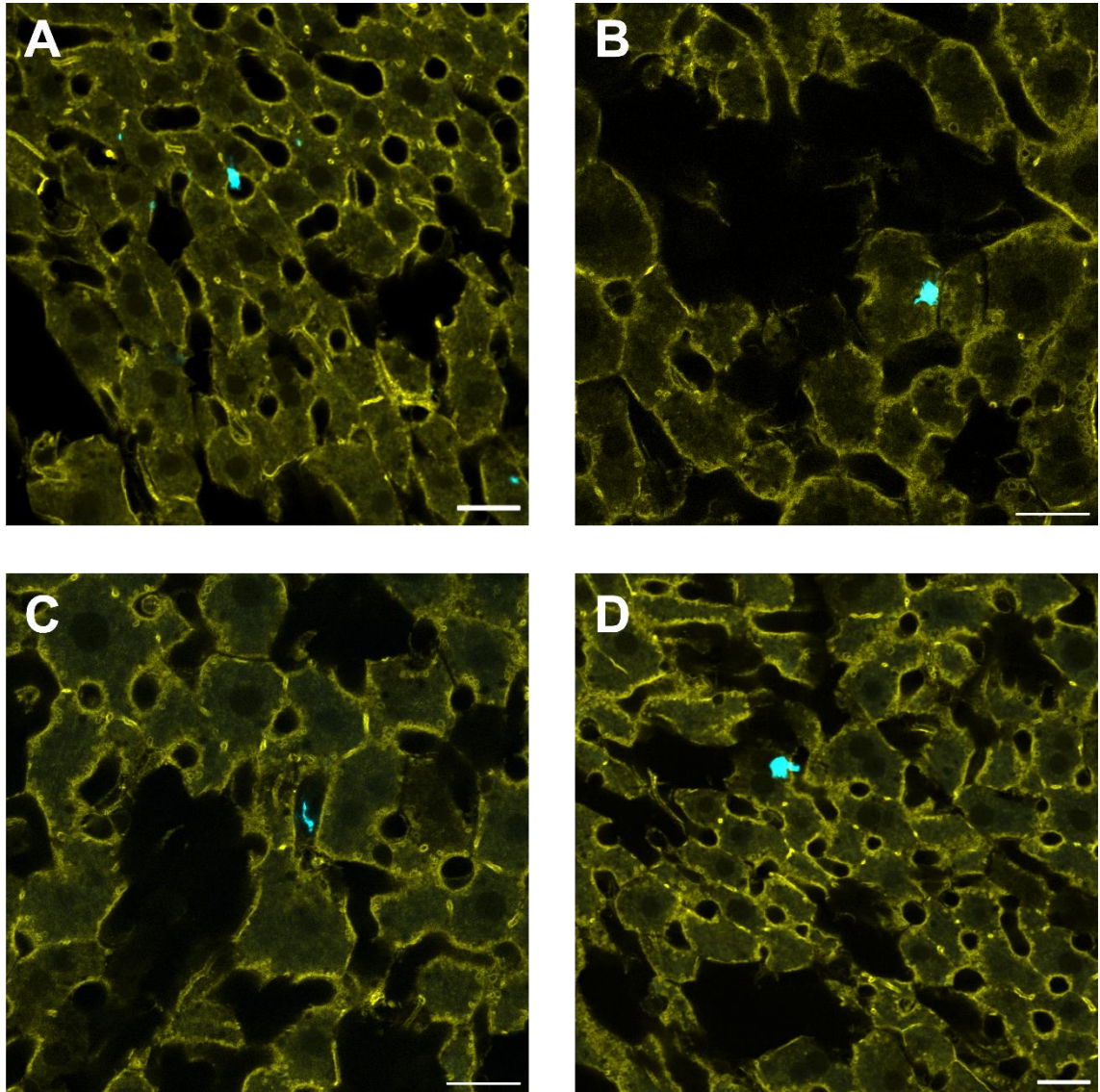


Abbildung 24: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten der Leber einer Maus nach Applikation von fragmentförmigem PS-MP mit anschließender Phalloidin-Färbung (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

2.2.5 Magen

Da das Mikroplastik über eine orale Gavage in den Magen eingebracht worden war, war davon auszugehen, dass sich dort Partikel finden würden. Nach den Waschprozessen des Magens, die vorgenommen wurden, um störenden Chymusresten beizukommen, waren wenige Fragmente zu erkennen.

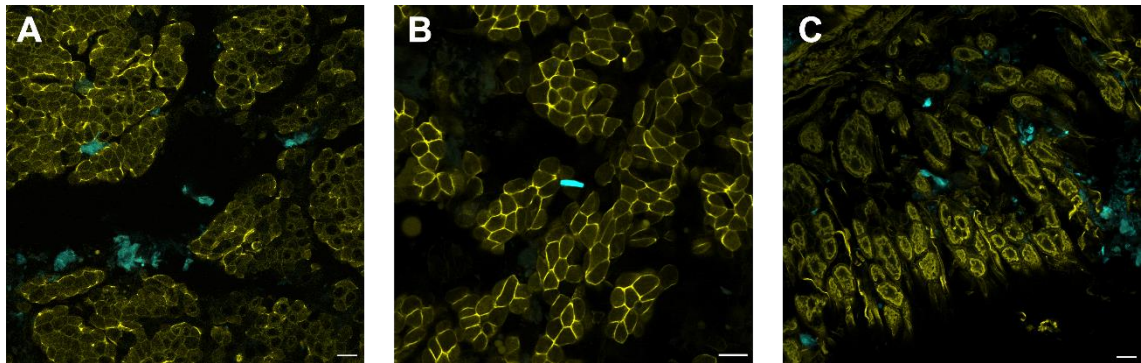


Abbildung 25: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Proben des Magens einer Maus nach Applikation von fragmentförmigem PS-MP mit anschließender Phalloidin-Färbung (gelb). Die Grafiken zeigen Aufnahmen von der luminalen Seite des Magens. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

2.2.6 Proximaler Dünndarm

Im Zuge des Organ-Screenings wurden auch Abschnitte zu Beginn (proximal) und gegen Ende (distal) des Dünndarms überprüft. Wie beim Magen wurden Waschprozesse durchgeführt, um Darminhalt zu entfernen, der die Untersuchungen gestört hätte. Entsprechend konnten auch im proximalen Dünndarm primär Partikel gefunden werden, die bereits durch Darmzellen aufgenommen wurden oder vereinzelt noch dem Epithel auf der luminalen Seite anhafteten. Aufnahmen von der basolateralen Seite des Darms zeigten auch Partikel, die in die äußeren muskulären Strukturen des Darms gelangt waren.

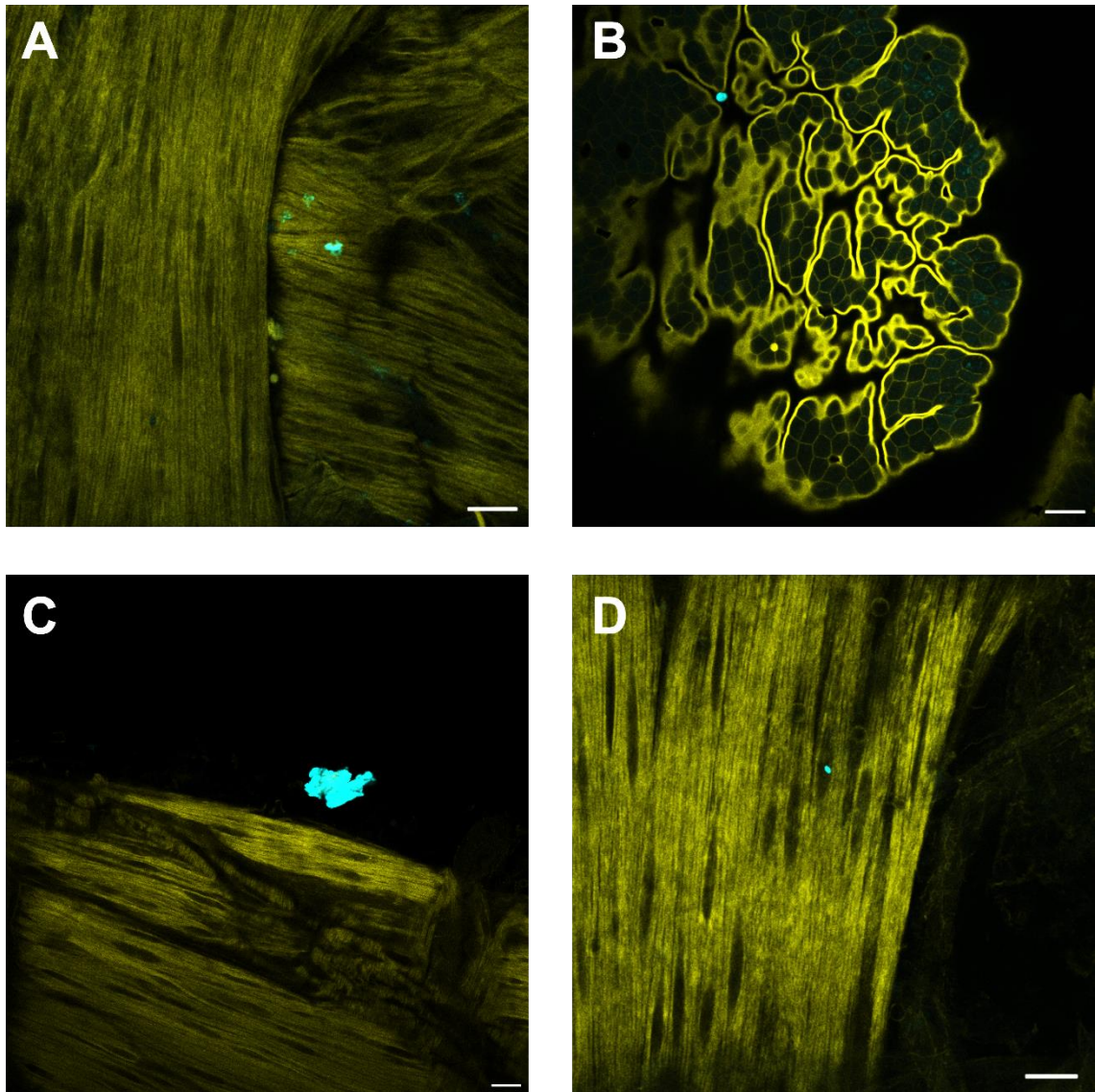


Abbildung 26: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Anteilen des proximalen Dünndarms einer Maus nach Applikation von fragmentförmigem PS-MP mit anschließender Phalloidin-Färbung (gelb). (A,C,D) Mikroskopische Aufnahme von der basolateralen Seite des Darms. (B) Mikroskopische Aufnahme von der luminalen Seite des Darms. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

2.2.7 Distaler Dünndarm

Für die distalen Darmabschnitte verhielt es sich wie für die proximalen Anteile bzw. den Magen. Auch hier waren nach den Reinigungsschritten wenige MP-Fragmente vorzufinden, die sich teils in muskulären Schichten des Darms befanden, teils ihren Weg in eine Darmzotte fanden (Abbildung 27C) bzw. bereits gefunden hatten.

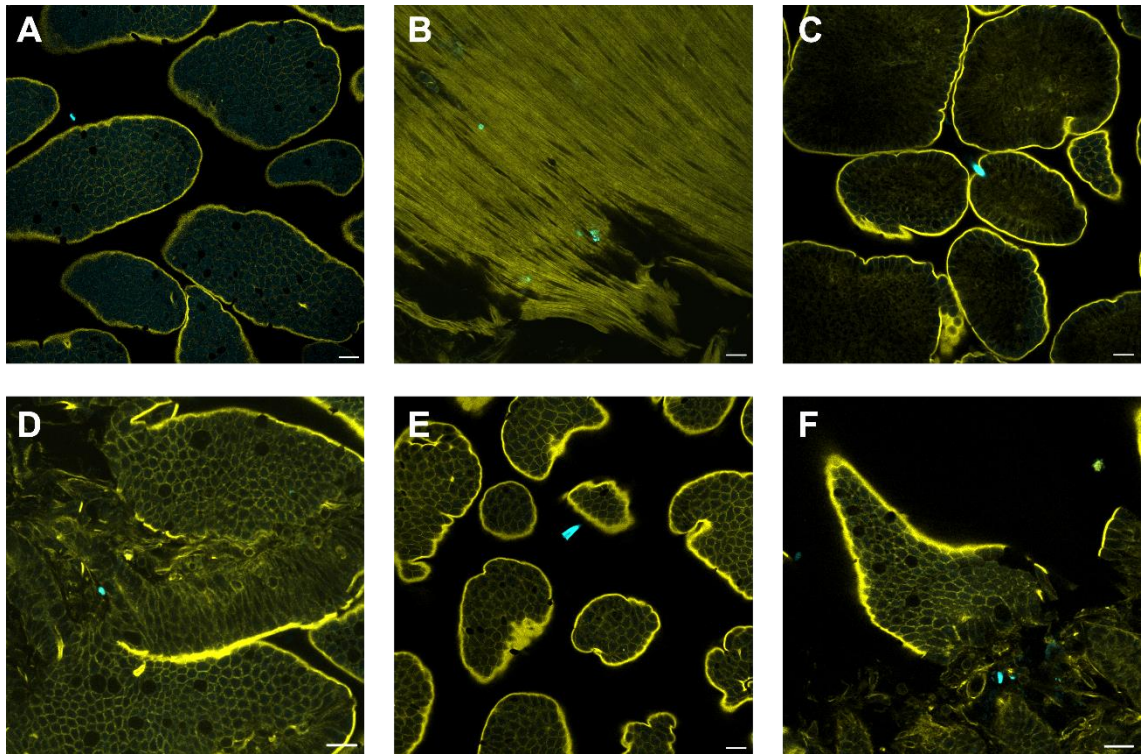


Abbildung 27: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Proben des distalen Dünndarms einer Maus nach Applikation von fragmentförmigem PS-MP und anschließender Phalloidin-Färbung (gelb). (A,C,D,E,F) Mikroskopische Aufnahme von der basolateralen Seite des Darms. (B) Mikroskopische Aufnahme von der basolateralen Seite des Darms. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 µm.

2.2.8 Hoden

Als innere Fortpflanzungsorgane des männlichen Geschlechts wurden auch die Hoden der Tiere auf MP-Ablagerungen untersucht. Hierbei zeigten sich sehr vereinzelt kleinere Partikel, die sich vorwiegend zwischen den Hodenläppchen befanden.

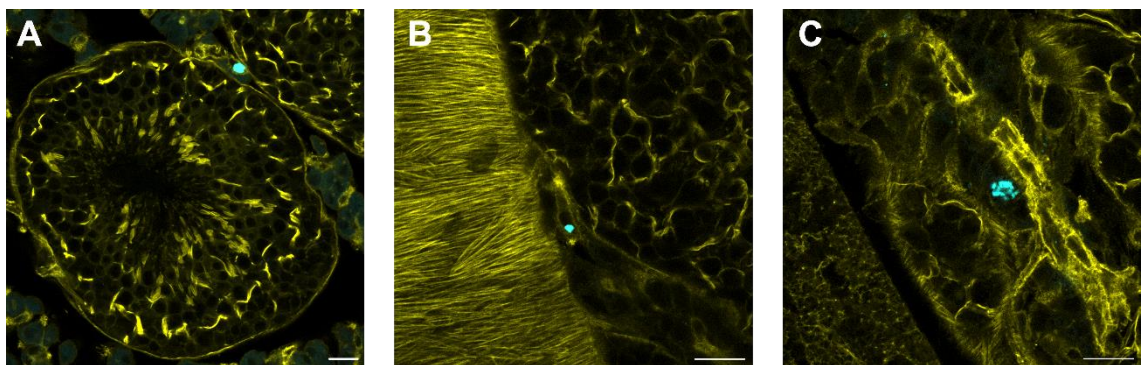


Abbildung 28: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten des Hoden einer Maus nach Applikation von fragmentförmigem PS-MP und anschließender Phalloidin-Färbung (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht je 20 µm.

2.2.9 Skelettmuskel (Quadrizeps)

Neben den klassischen Organen wurde den Versuchstieren auch der rechte Quadrizeps entnommen und auf eine Deposition von Mikroplastik untersucht. Hierbei präsentierte sich lediglich eine sehr geringe Anzahl an PS-Fragmenten, die sich alle zwischen Muskelfaserbündeln befanden.

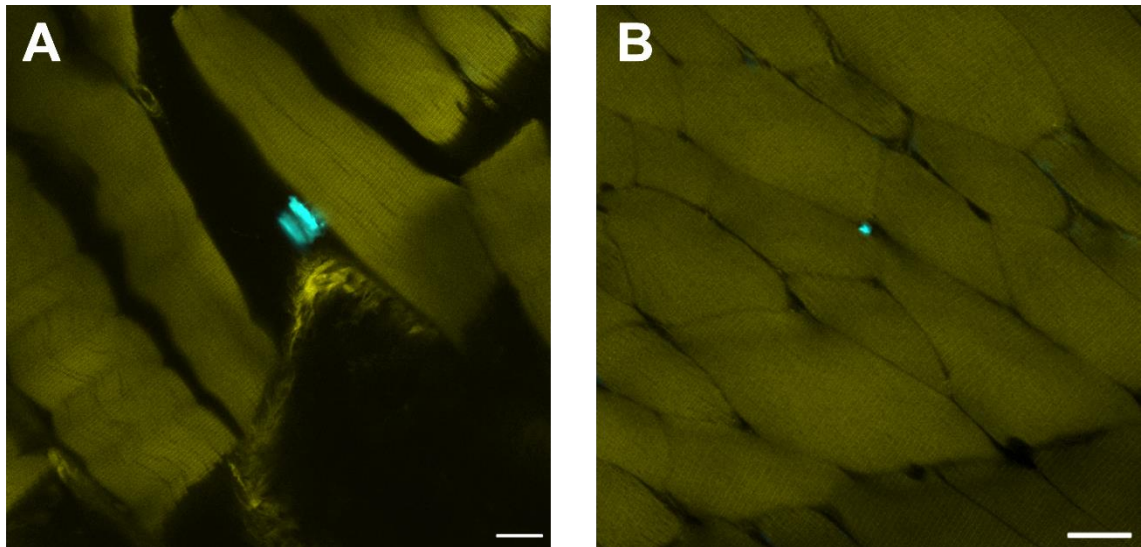


Abbildung 29: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten der Quadrizeps-Muskulatur einer Applikation von fragmentförmigem PS-MP und anschließender Maus nach Phalloidin-Färbung (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

Insgesamt wurden in allen untersuchten Organen Mikroplastik-Partikel identifiziert. Die Lunge fiel hierbei mit besonders großen MP-Akkumulationen auf, während sich in Muskulatur, Hoden und Magen deutlich geringere Mengen Plastik fanden.

3. Lokalisation von Mikroplastik in der Niere *in vivo*: MP-Funde in Gefäßen, Glomeruli und Tubuli

Der Fokus dieser Arbeit lag auf den Auswirkungen von Mikroplastik auf die Niere, da sie mit ihrem eingeschränkten Regenerationspotential als besonders vulnerabel gilt. Basis hierfür bildete zunächst die Lokalisation von MP-Partikeln in dem Organ. Wie in den Methoden unter 3.2 beschrieben, wurde hierzu Mäusen in einem *in vivo* Experiment Mikroplastik verschiedener Polymere bzw. Form über 5 bzw. 10 Tage über eine orale Gavage in den Magen appliziert und deren Nieren histologisch untersucht. Konkret wurden sowohl Polystyrol-Sphären als auch -Fragmente, sowie Polypropylen- und PET-Fragmente appliziert. Zudem erhielt eine Kontrollgruppe das reine Suspensionsmedium (1% Sojalecithin in Wasser) ohne Mikroplastik.

3.1.1 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe zeigten sich keine größeren Strukturen, die bei einer Anregung bei 405 nm stark fluoreszierten und somit MP-Partikel hätten sein können. Sichtbar waren bei dieser Anregung allerdings kleine kreisförmige Erscheinungen, die sich grundsätzlich in direkter Angrenzung an einen Zellkern befanden. Strukturell wurden keine Veränderungen der Nierengewebe beobachtet. Zwischen den 5- und 10-Tages-Tieren zeigten sich keine Unterschiede.

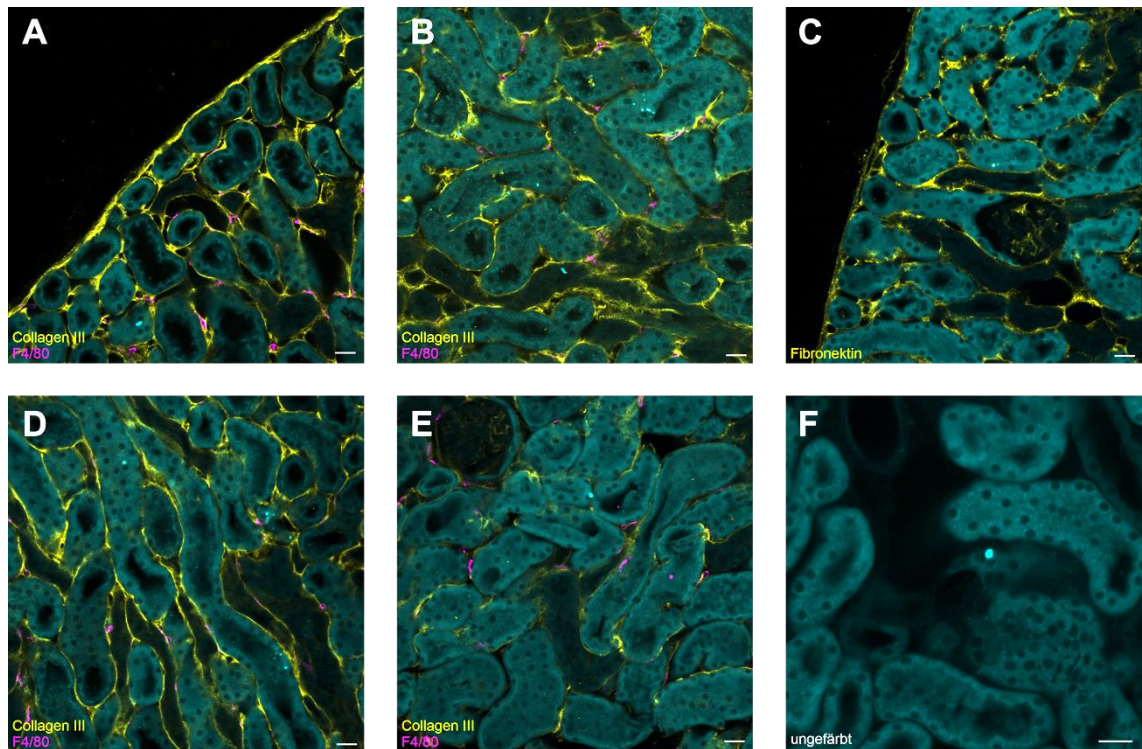


Abbildung 30: Histologisches Erscheinungsbild der Nieren der Kontrolltiere. (A-C) Applikation an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. (D-F) Applikation an 10 aufeinanderfolgenden Tagen. Die jeweiligen Antikörperfärbungen sind den Farben entsprechend unten links in den Aufnahmen zu entnehmen. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 20 μm .

3.1.2 Sphärische Polystyrol-Partikel

Die histologische Auswertung der Gruppe, der sphärische PS-Partikel appliziert worden waren, reproduzierte das Erscheinungsbild der Kontrollgruppe. Anhand der Größe und Form von fluoreszierenden Strukturen bei der richtigen Anregungswellenlänge, konnte auch hier eine Detektion des applizierten Mikroplastiks ausgeschlossen werden. Sichtbar waren auch in diesem Fall – wie in der Kontrollgruppe – lediglich kleine runde Punkte, die sich in direkter Nähe zu Zellkernen befanden. In dieser Gruppe wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Applikationszeiträumen deutlich.

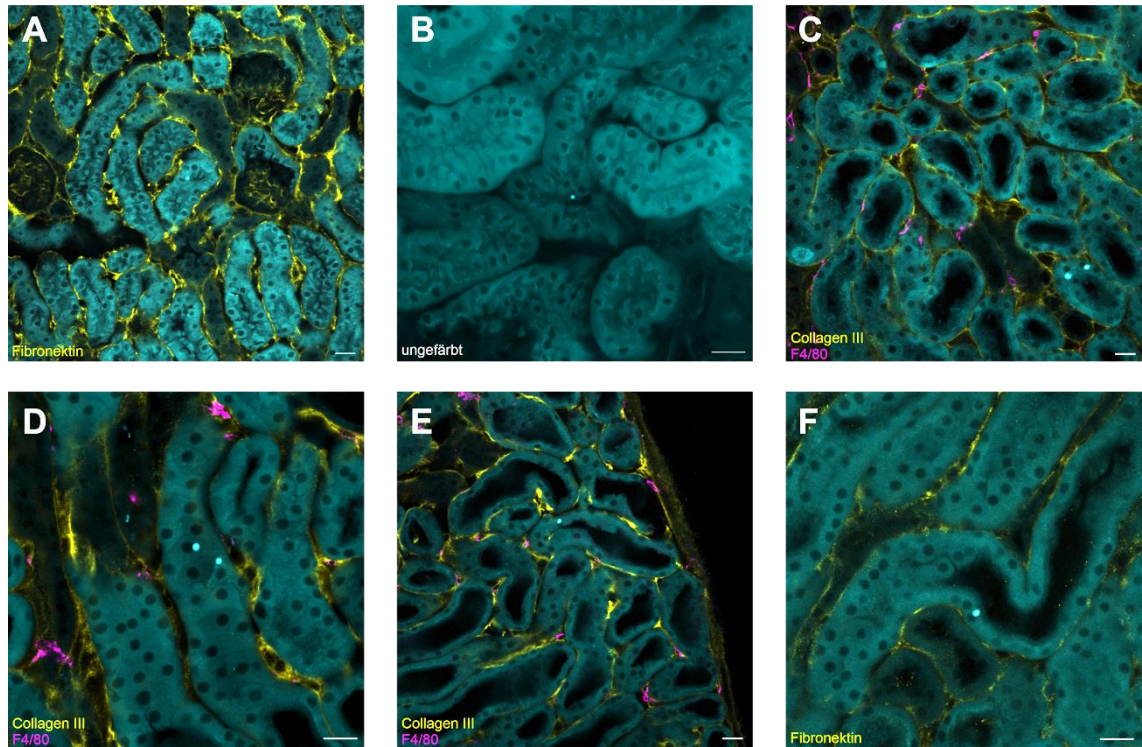


Abbildung 31: Mikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten der Mäuse, denen sphärische PS-Partikel appliziert wurden. (A-C) Applikation über 5 konsekutive Tage. (D-F) Applikation über 10 konsekutive Tage. Die jeweiligen Färbungen sind den einzelnen Grafiken unten links zu entnehmen. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

3.1.3 Irreguläre Polystyrol-Fragmente

Neben sphärischen Polystyrol-Partikeln wurden zum Vergleich der Formeffekte auch irregulär geformte PS-Fragmente in diesem *in vivo* Versuch eingesetzt.

Die Untersuchungen der resultierenden Nierenschnitte zeigten Ablagerungen von Partikeln, die anhand ihrer zutreffenden Fluoreszenz, Form und Größe als das applizierte Mikroplastik identifiziert wurde. Die Fragmente befanden sich sowohl in kleineren peritubulären Gefäßen, in Glomeruli, sowie in kortikalen Tubuli. Wie in Abbildung 32F zu sehen, fanden sich kleinere Partikel auch direkt an Cubilin in proximalen Tubulusabschnitten angelagert. Zwischen dem fünf- bzw. zehntägigem Applikationszeitraum wurden keine Differenzen festgestellt.

Ergebnisse

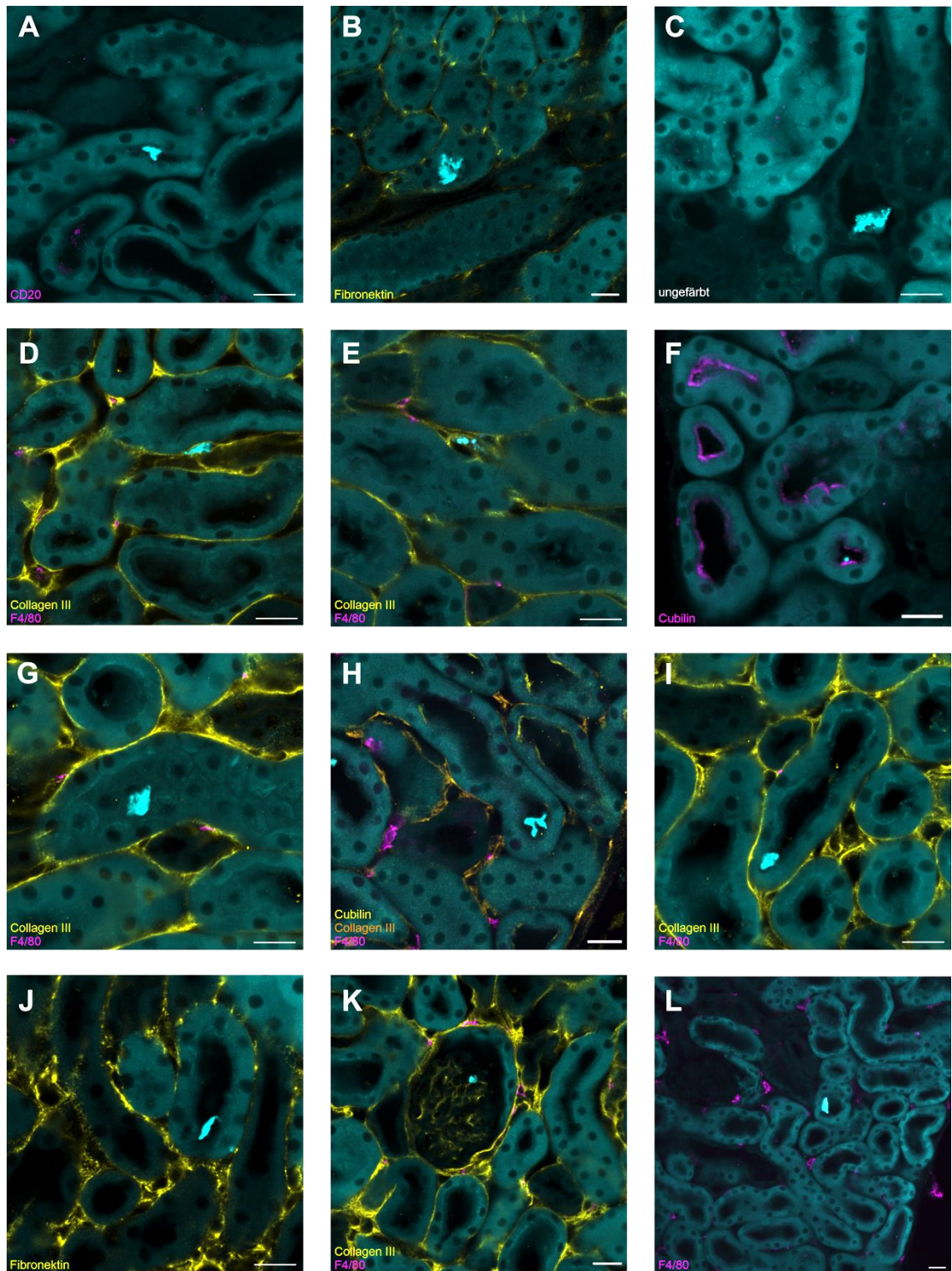


Abbildung 32: Mikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten der Mäuse, denen irreguläre PS-Fragmente appliziert wurden. (A-F) Applikation an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. (G-L) Applikation an 10 aufeinanderfolgenden Tagen. Die jeweiligen Färbungen sind den einzelnen Grafiken unten links zu entnehmen. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

Neben den Funden in den Gefäßen, Glomeruli und Tubuli fiel auf, dass manche Partikel zu einer Attraktion von Immunzellen, genauer B-Zellen sowie Makrophagen, führten.

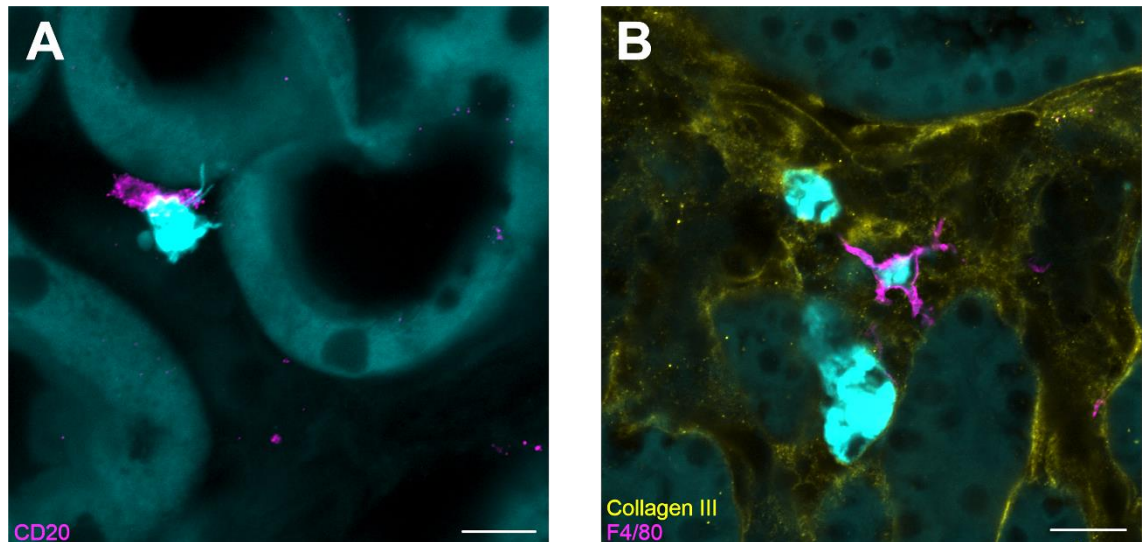


Abbildung 33: Co-Lokalisation von Mikroplastik-Fragmenten (intensiv cyan) mit Immunzellen nach fünftägiger Applikation. (A) Antikörperfärbung gegen CD20 zeigt eine dem peritubulären MP-Partikel anhaftende B-Zelle (magenta). (B) Abbildung einer Makrophage (magenta) durch Antikörperfärbung gegen F4/80, die ein MP-Fragment umschließt. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

3.1.4 Irreguläre Polypropylen-Fragmente

Um nicht nur die Form, sondern auch verschiedene Polymere von Mikroplastik als Einflussfaktor zu evaluieren, wurden neben den irregulären PS-Fragmenten auch irreguläre Partikel aus Polypropylen appliziert.

Die visuelle Auswertung der präparierten Nierenproben präsentierte ebenfalls eine Deposition kleinerer sowie durchaus großer Fragmente, die sowohl in peritubulären Gefäßen als auch in Glomeruli und Tubuli des Kortex zu finden waren. Der Großteil der tubulär gefundenen Fragmente zeigten deutlich ausgeprägte Ecken bzw. Spitzen und zeigten sich scheinbar im Tubuluslumen verhakt.

Die Funde und Ausprägungen der 5- und der 10-Tages-Gruppe zeigten keine Unterschiede.

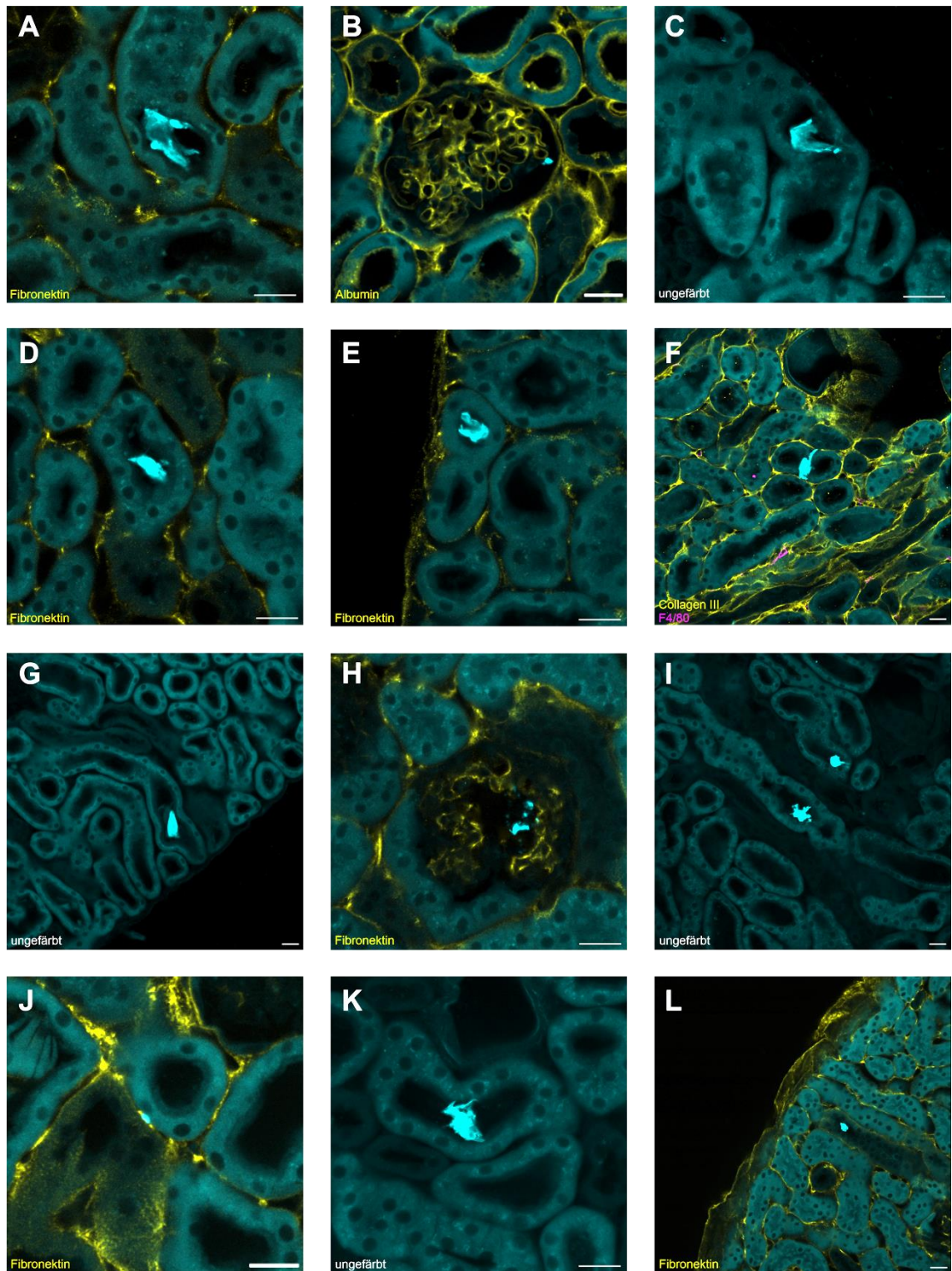


Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten der Mäuse, denen irreguläre PP-Fragmente appliziert wurden. (A-F) Applikation an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. (G-L) Applikation an 10 aufeinanderfolgenden Tagen. Die jeweiligen Färbungen sind den einzelnen Grafiken unten links zu entnehmen. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

3.1.5 Irreguläre PET-Fragmente

Neben Polystyrol und Polypropylen wurde auch PET in irregulärer Fragmentform über einen Zeitraum von 5 bzw. 10 Tagen über eine orale Gavage in den Magen von Mäusen eingebracht.

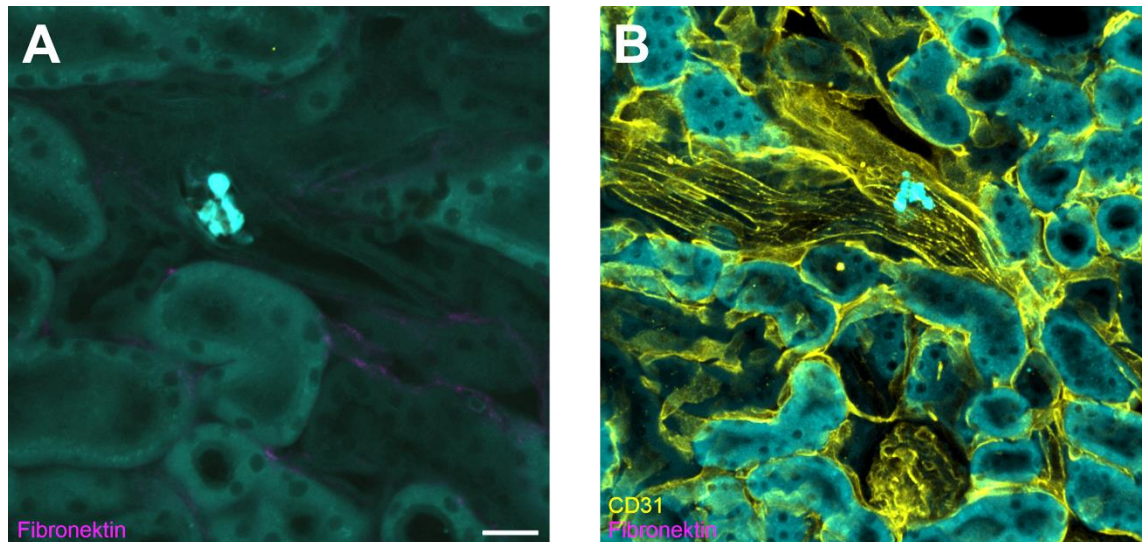


Abbildung 35: Aufnahmen eines PET-Mikroplastik-Fragments in einer Gefäßabzweigung. (A) MP-Partikel in gefäßähnlicher Struktur befindlich. (B) Abbild einer 3D-Rekonstruktion einer nachträglichen Färbung gegen CD31 zur Darstellung von Gefäßen, die ein Festsitzen des Partikels in einer Gefäßabzweigung bestätigt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Hierbei wurden wie bei den anderen Tieren, denen fragmentförmiges MP appliziert worden war, ebenfalls Partikel in Gefäßen gefunden. Wie Abbildung 35 zeigt, fanden sich auch größere Fragmente in dickeren Gefäßabschnitten, wobei der gezeigte Partikel sich an einer Gefäßgabelung stecken geblieben präsentierte. Dass es sich bei der umgebenden Struktur um ein Blutgefäß handelte, wurde anhand einer nachträglichen Färbung gegen CD31 belegt.

Darüber hinaus wurden PET-Fragmente abermals in Glomeruli sowie kortikalen Tubuli gefunden und anhand ihrer Fluoreszenz, Form und Größe als das applizierte MP identifiziert. Hierbei zeigten sich erneut an Cubilin angelagerte Partikel in proximalen Tubuli und ausgeprägte spitze Ausprägungen bei der Mehrheit der in Tubuli gelangten MP-Fragmente. Ob die Applikation des Mikroplastiks für 5 oder 10 Tage stattgefunden hatte, zeigte keine auffallenden Auswirkungen auf die strukturelle Integrität der Nieren.

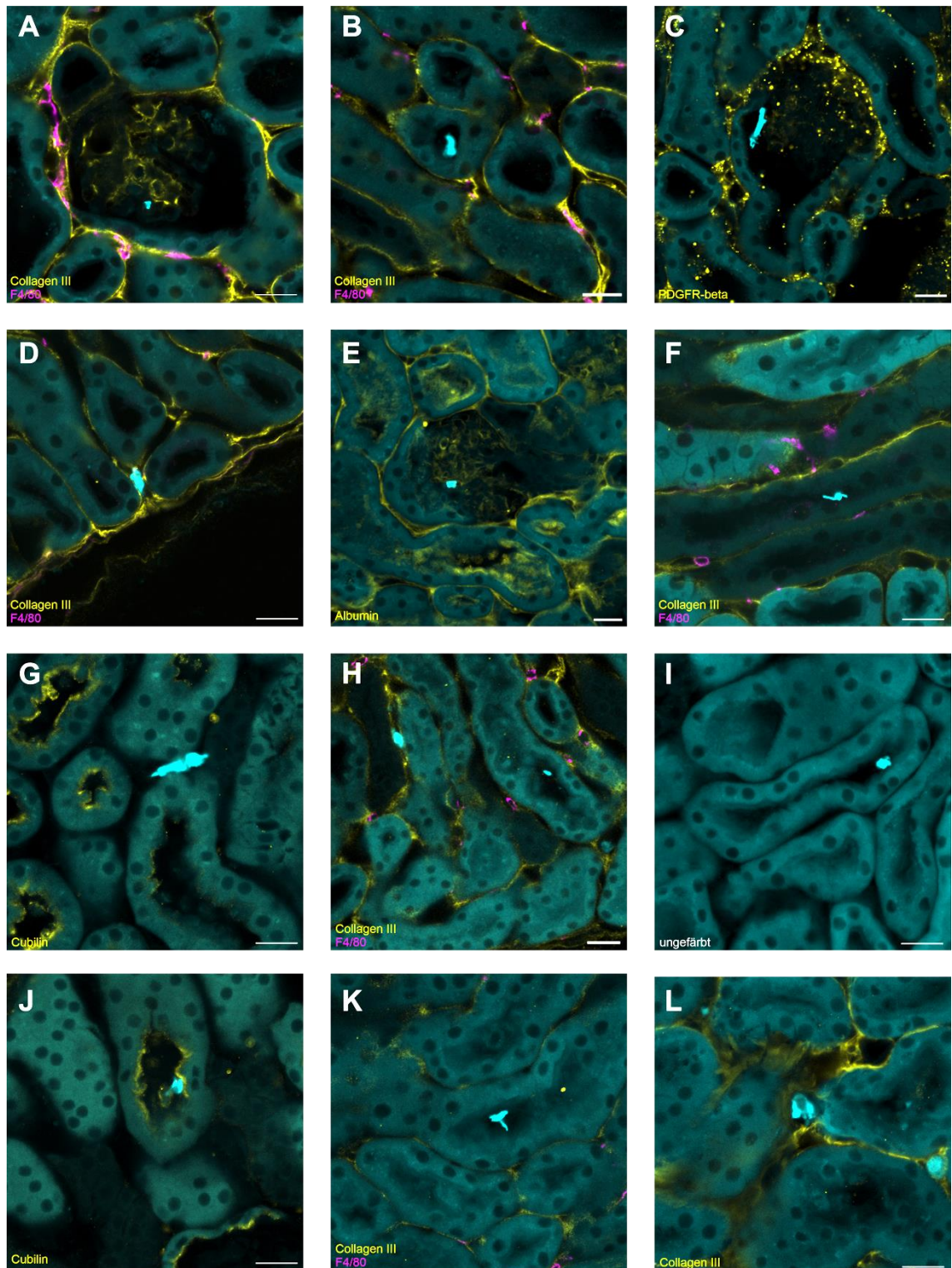


Abbildung 36: Mikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten der Mäuse, denen irreguläre PET-Fragmente appliziert wurden. (A-F) Applikation an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. (G-L) Applikation an 10 aufeinanderfolgenden Tagen. Die jeweiligen Färbungen sind den einzelnen Grafiken unten links zu entnehmen. Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μ m.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass in den Kontrolltieren sowie der Gruppe, die sphärische Polystyrol-Partikel erhielt, keine Mikroplastikpartikel in der Niere gefunden werden konnten. Dagegen wurden bei den Tieren, die fragmentförmiges Mikroplastik (PS, PP bzw. PET) erhielten, Partikel-Ablagerungen in Gefäßen, Glomeruli sowie Tubuli gefunden. Darüber hinaus führten manche Partikel zu einer Attraktion von Immunzellen.

4. Überprüfung der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere nach MP-Applikation

Herzstück der vorliegenden Arbeit sollte die Klärung von Effekten von Mikroplastik auf die Struktur und Funktion der Niere darstellen. Hierzu wurden isoliert perfundierte Nieren der Maus mit und ohne Zusatz von fluoreszentelem Albumin mit Mikroplastik in einem *ex vivo* Aufbau präpariert.

Die ipN als *ex vivo* Modell ermöglicht eine gezielte und dosisgenaue Applikation, weist kontrollierte Bedingungen bezüglich Parametern wie z.B. dem Perfusionsdruck auf und ist gleichzeitig unabhängig von intestinalen Resorptionsmechanismen. Systemische Einflüsse, wie beispielsweise durch Hormone, werden hingegen exkludiert.

4.1 MP-Applikation *ex vivo* in ipN reproduzierte Funde der *in vivo* Versuche

Zunächst sollte überprüft werden, ob sich in der ipN die gleichen Lokalisationsmuster wie im *in vivo* Versuch zeigen und die ipN damit als *ex vivo* Modell geeignet ist. In den Experimenten der ipN wurde ein Teil der Mausnieren mit 1 bzw. 5 mg der zugekauften Mikroplastik-Fragmente aus Polystyrol perfundiert, vereinzelt mit einem Zusatz fluoreszenten Albumins, und das Material im Anschluss histologisch untersucht.

4.1.1 MP-Funde in Gefäßen *ex vivo*

Nachfolgend abgebildet sind MP-Fragmente, die sich nach der histologischen Färbung mit fluoreszierendem Phalloidin, welches an F-Aktin bindet und so dessen Strukturen darstellt, fanden.

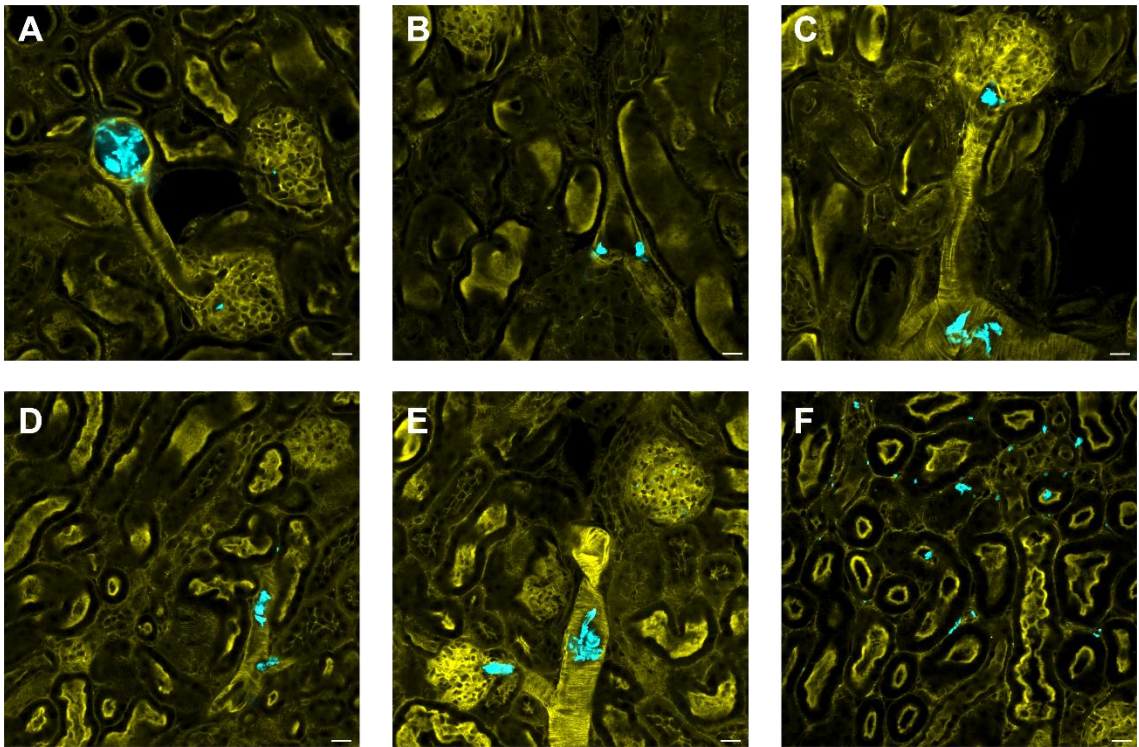


Abbildung 37: Mikroskopische Abbildung von Mikroplastik-Fragmenten (cyan) aus Polystyrol in Blutgefäßen der perfundierten ipNs. Die Darstellung erfolgte mithilfe von Phalloidin-Färbungen (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

Wie Abbildung 37 zu entnehmen ist, waren sowohl in größeren Gefäßen als auch in kleinen peritubulären Kapillaren MP-Fragmente zu finden. Dabei zeigten sich auch Partikel in der direkten Zuführung zu Glomeruli über das Vas afferens sowie Partikel, die an Gefäßabzweigungen hängengeblieben waren.

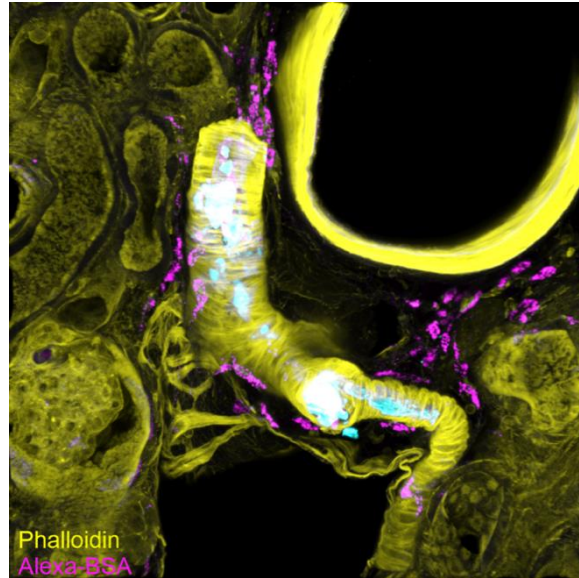


Abbildung 38: Abbild der 3D-Rekonstruktion eines Blutgefäßes, das fragmentförmiges PS-Mikroplastik (cyan) enthält und in dessen Umgebung ins Interstitium ausgetretenes, fluoreszentes Albumin (magenta) zu sehen ist. Die Darstellung der Gewebsstruktur erfolgte mithilfe einer Phalloidin-Färbung (gelb).

Verschiedenen Mikroplastik-ipNs, die mit einem Zusatz von Alexa-BSA perfundiert wurden, war darüber hinaus zu entnehmen, dass aus Gefäßen, welche MP-Fragmente enthielten, Albumin in das Interstitium ausgetreten war.

4.1.2 MP-Funde in Glomeruli *ex vivo*

Auch in Glomeruli wurden nach MP-Infusion in ipNs Mikroplastik-Fragmente gefunden, die in den glomerulären Kapillaren festzustecken schienen.

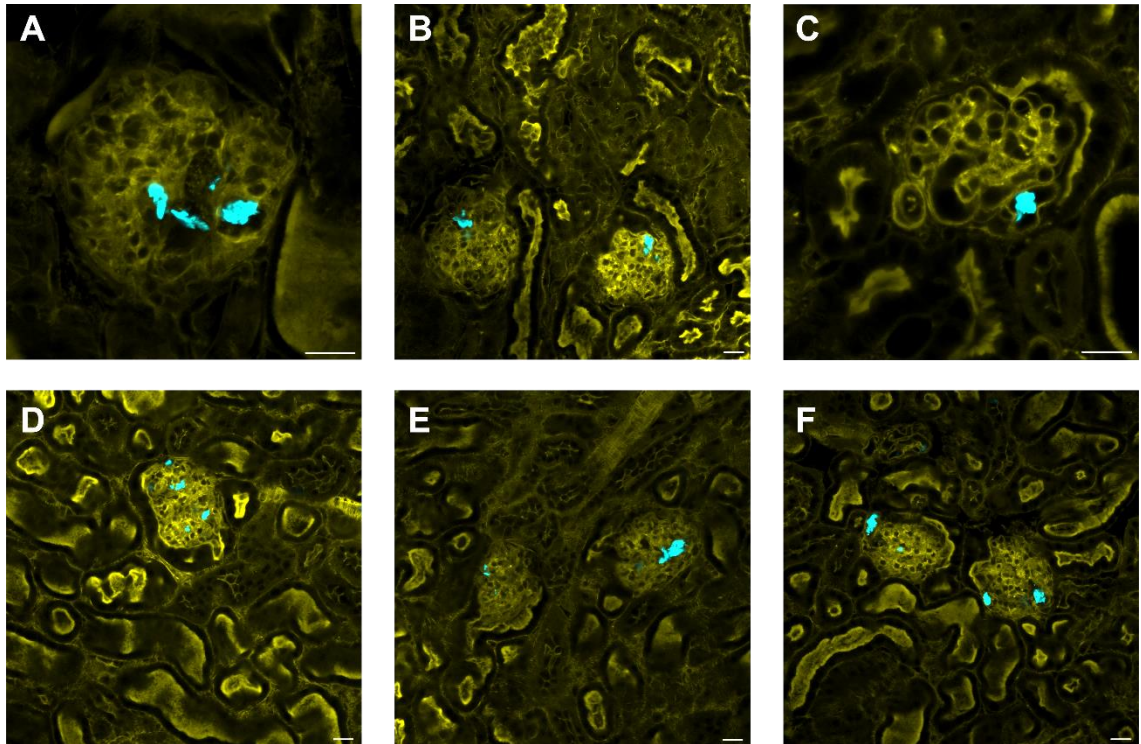


Abbildung 39: Mikroskopische Abbildung von PS-Mikroplastik-Fragmenten (cyan) in Glomeruli der perfundierten ipNs. Die Darstellung erfolgte mithilfe von Phalloidin-Färbungen (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

Von besonderem Interesse war ein Fund, der in Abbildung 40 dargestellt ist. Hierbei zeigte sich ein MP-Fragment im Übergang vom Glomerulus in den proximalen Tubulus, wo er in dessen Epithel hineingeböhrt schien. Durch Abschaltung des anregenden Lasers konnte verifiziert werden, dass sich der Partikel nicht dem Schnitt obenauf befand, sondern die Integrität des Tubulusepithels in der Tat strukturell geschädigt hatte.

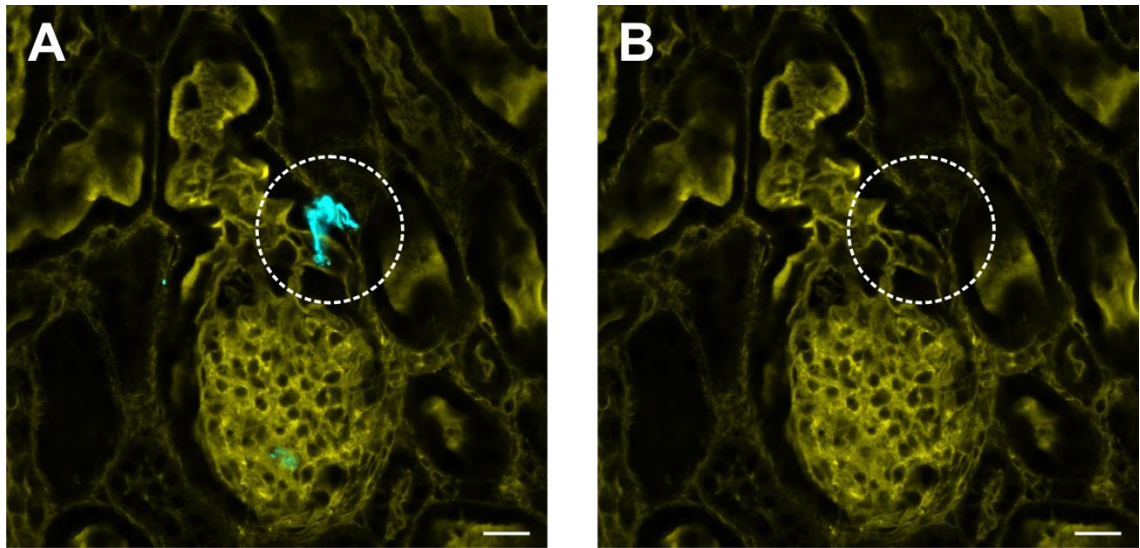


Abbildung 40: Mikroplastik-Fragmente aus Polystyrol (cyan) im Glomerulus sowie im Übergang von Glomerulus zu proximalem Tubulus mit Anregung des Plastiks (A) sowie ohne dessen Anregung (B). Die Gewebsstruktur wurde mit einer Phalloidin-Färbung (gelb) abgebildet. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

4.1.3 MP-Funde in Tubuli *ex vivo*

Passend zu dem Fund des MP-Partikels, der sich kurz nach dem Übergang aus dem Glomerulus in das Tubulusepithel gebohrt hatte, wurden in den ipN-Experimenten in mehreren Tubuli MP-Fragmente gefunden. Da für diese Partikel kein anderer Weg in den Tubulus führen konnte, mussten auch diese die glomeruläre Filtrationsbarriere überwunden haben, um den Glomerulus in Richtung des Tubulussystems zu verlassen.

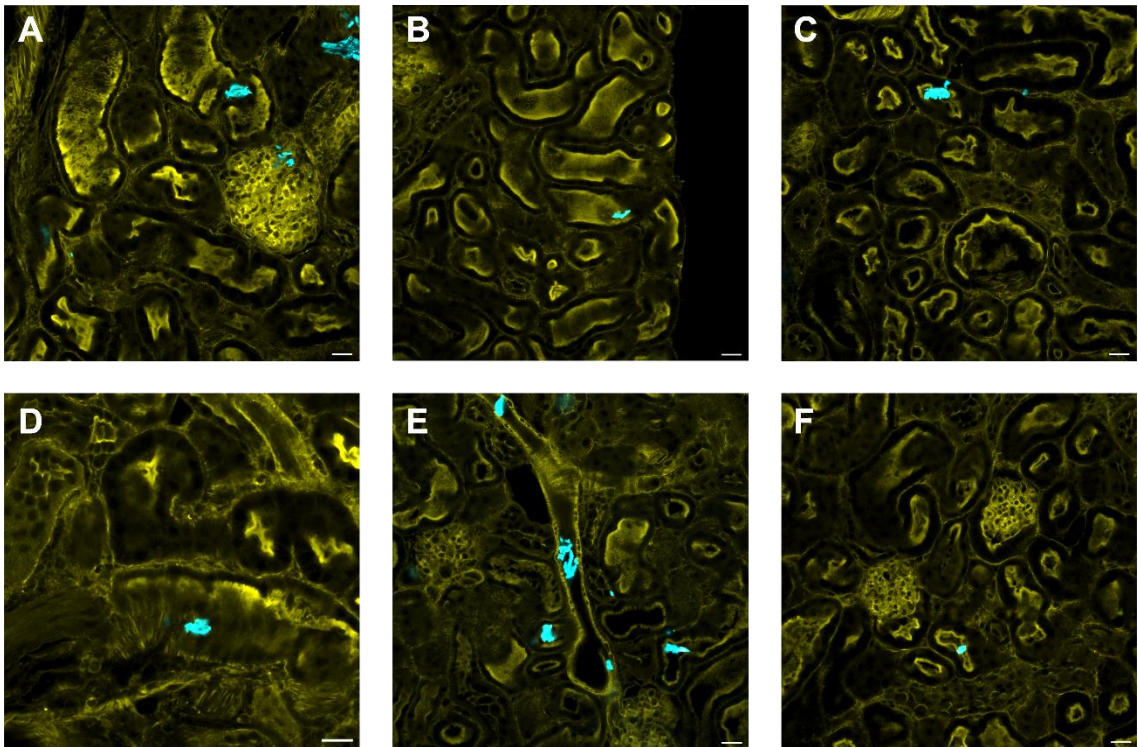


Abbildung 41: Mikroskopische Abbildung von PS-Mikroplastik-Fragmenten (cyan) in Tubuli der perfundierten ipNs. Die Darstellung erfolgte mithilfe von Phalloidin-Färbungen (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht je 20 μm .

Insgesamt wurden die MP-Partikel bei den gezeigten Untersuchungen erneut in Blutgefäßen, Glomeruli sowie Tubuli gefunden und reproduzierten somit die MP-Lokalisation der *in vivo* Versuche.

4.2 Mikroplastik führte zu gesteigerter Albumin-Reabsorption im proximalen Tubulus

Im Rahmen der Überprüfung der Integrität der GFB wurde die Reabsorption eines fluoreszenzmarkierten Albumins (Alexa-BSA 594[®]) im proximalen Tubulus untersucht. Albumin ist mit 69 kDa im Normalfall zu groß, um die GFB zu überwinden. Wenn es z.B. durch Schädigungen der GFB zu einer Filtration in das Tubulus-System kommt, so wird das Albumin vorwiegend im proximalen Tubulus endozytiert¹⁴⁴. Proximal aufgenommenes Albumin kann durch eine in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzmarkierung mikroskopisch detektiert und semiquantitativ beurteilt werden. Die Präparation der ipNs erfolgte wie unter 4.1 (Methoden) beschrieben. Die Messwerte in den proximalen Tubuli, die wie unter 4.2 (Methoden) beschrieben ermittelt wurden,

unterteilt in die Gruppen „Kontrolle“ und „Mikroplastik“. Zur Kontroll-Gruppe gehörten jeweils die proximalen Tubuli, in deren assoziierten Glomeruli kein MP zu finden war. Entsprechend bestand die Mikroplastik-Gruppe aus all jenen proximalen Tubuli, deren Glomeruli MP beinhalteten.

Aufgrund der interindividuellen Unterschiede wurden zunächst die einzelnen ipNs bezüglich ihrer Kontroll- und Mikroplastik-Gruppe statistisch miteinander verglichen. Anschließend fand eine Gesamtauswertung zwischen allen drei ipNs statt, wobei die Werte der Mikroplastik-Gruppe jeweils auf deren zugehörige Kontrollgruppe bezogen wurden, um die interindividuellen Unterschiede zwischen den ipNs zu berücksichtigen.

4.2.1 Einzelauswertung

Im Zuge der Einzelauswertungen der ipNs wurde zunächst je ein Test auf Normalverteilung durchgeführt. Dieser Shapiro-Wilks-Test ergab mit Werten von maximal 0,019 (MP-Gruppe der ipN Nr. 3), dass sämtliche Gruppen nicht normalverteilt sind. Entsprechend wurde für alle drei ipNs zur Auswertung der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrischer Test gewählt und auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt.

	ipN 1		ipN 2		ipN 3	
	Kontrolle	MP	Kontrolle	MP	Kontrolle	MP
Gruppengrößen	n = 205	n = 117	n = 223	n = 188	n = 665	n = 163
Median	0,2975	0,3385	0,6539	1,057	0,7798	0,9700
1. Quartil	0,2558	0,2860	0,4366	0,6381	0,6017	0,7454
3. Quartil	0,3731	0,3949	0,9280	1,3326	0,9891	1,2439
Arithmetisches Mittel	0,3140	0,3497	0,7573	1,0661	0,8171	1,0006
Standardabweichung	0,08721	0,08755	0,4122	0,5592	0,2793	0,3554
Shapiro-Wilks-Test	< 0,0001	0,0002	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,019
Normalverteilung?	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Mann-Whitney-U-Test (zweiseitig)	0,0003 = ***		< 0,0001 = ****		< 0,0001 = ****	

Tabelle 1: Übersicht der statistischen Parameter der Einzelauswertung der ipNs mit fluoreszenzmarkiertem Albumin (Alexa-BSA 594®).

Der Mann-Whitney-U-Test ergab für ipN Nr. 1 einen p-Wert von 0,0003 und somit einen höchst signifikanten Unterschied zwischen der Mikroplastik- und der Kontrollgruppe. Ähnlich verhielt es sich bei ipN Nr. 2 sowie ipN Nr. 3, die mit p-Werten von jeweils < 0,0001 ebenfalls höchst signifikante Unterschiede zeigten.

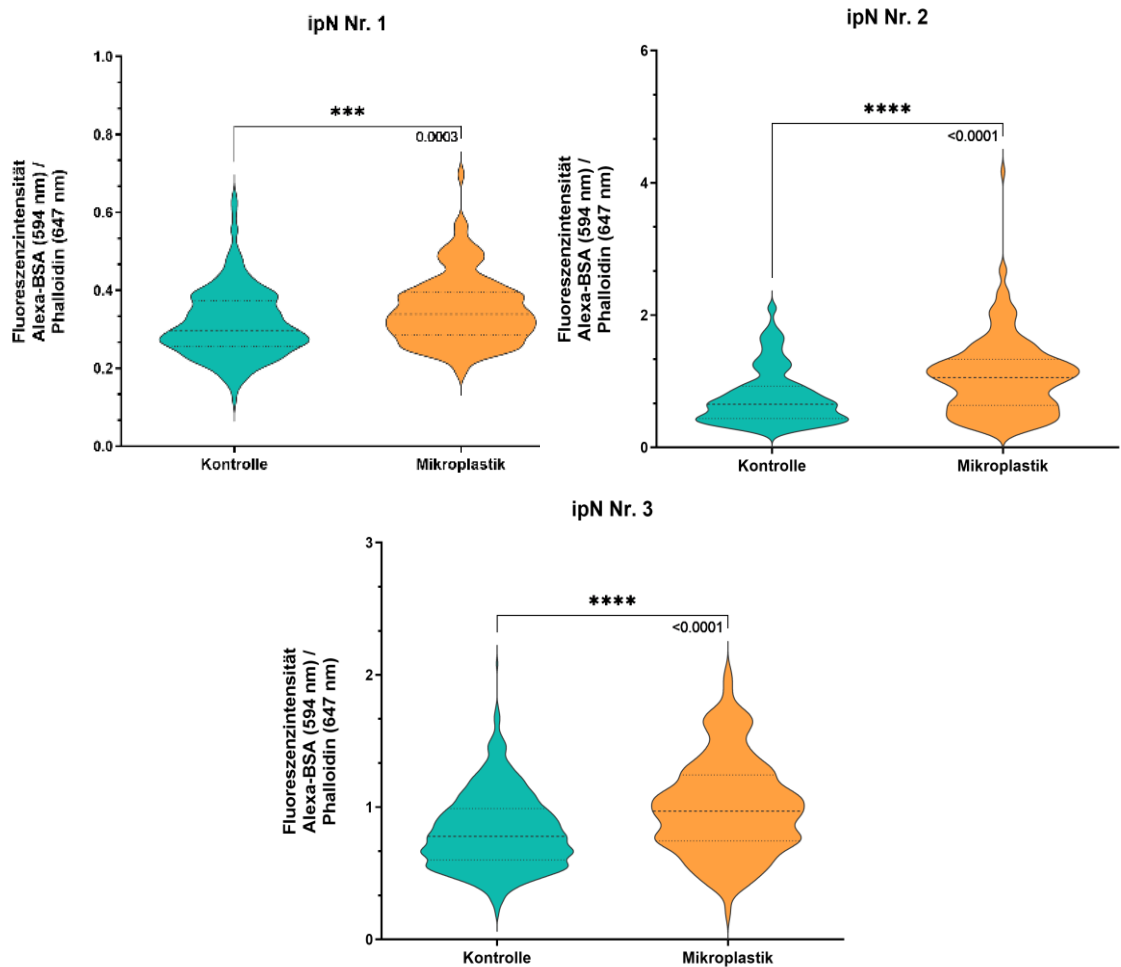


Abbildung 42: Violin-Plots der statistischen Einzelauswertungen der ipN-Versuche zur proximalen Albumin-Reabsorption.

Die Ergebnisse der Einzelauswertungen sind grafisch in Abbildung 42 als Violin-Plots dargestellt. Diese Darstellung zeigt die Verteilung der Datenpunkte und enthält sowohl Median (mittig, grob gestrichelt), als auch erstes (unten, fein gestrichelt) und drittes Quartil (oben, fein gestrichelt). Die zugehörigen Werte sind Tabelle 1 zu entnehmen.

4.2.2 Gesamtauswertung

In einem zweiten Ansatz wurden die arithmetischen Mittelwerte der drei ipNs zusammen ausgewertet.

Hierzu wurden die Mikroplastik- und Kontrollgruppe einer ipN vorab miteinander gepaart, indem der Wert der Mikroplastikgruppe auf die Kontrollgruppe normalisiert wurden (arithmetisches Mittel MP-Gruppe bzw. Kontrollgruppe dividiert durch arithmetisches Mittel Kontrollgruppe = „fold change“) und der Kontrollgruppen-Wert folglich auf 1,00 (100%) festgesetzt wurde.

	Kontrollen			Mikroplastik		
	ipN 1	ipN 2	ipN 3	ipN 1	ipN 2	ipN 3
Gruppengrößen	n = 3			n = 3		
Arithmetisches Mittel	0,3140	0,7573	0,8171	0,3497	1,0661	1,0006
Standardabweichung	0,08721	0,4122	0,2793	0,0876	0,5592	0,3554
Fold Change (Bezug: eigene Kontrolle)	1	1	1	1,1137	1,4079	1,2246
Arithmetisches Mittel nach Normalisierung/Pairung	1,000			1,249		
Standardabweichung nach Normalisierung/Pairung	0,0			0,0858		
Shapiro-Wilks-Test	n zu klein			n zu klein		
Normalverteilung?	—			—		
Ungepaarter t-Test (zweiseitig)	0,0441 = *					

Tabelle 2: Übersicht der statistischen Parameter der Gesamtauswertung der ipNs mit fluoreszenzmarkiertem Albumin (Alexa-BSA 594®).

Aufgrund der geringen Stichprobengröße von $n = 3$ konnte kein aussagekräftiger Test auf Normalverteilung durchgeführt werden. Es wurde sich daher für einen zweiseitigen, ungepaarten t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ entschieden, da dieser Test relativ robust gegenüber einer Verletzung der Normalverteilungsannahme ist und durch die Bezugnahme auf die eigene Kontrollgruppe bereits eine Paarung der zusammengehörigen Gruppen vollzogen war. Der t-Test ergab einen p-Wert von 0,0441 und somit einen signifikanten Unterschied zwischen der Mikroplastik- und der Kontrollgruppe.

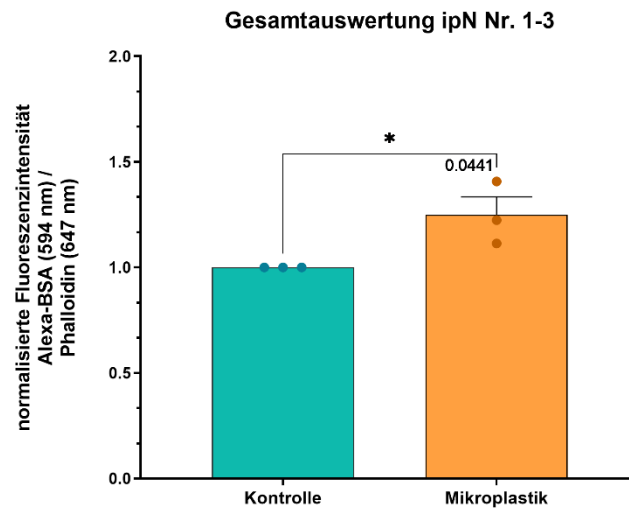


Abbildung 43: Balkendiagramm der statistischen Gesamtauswertung der ipN-Versuche zur proximalen Albumin-Reabsorption.

Im Gesamten betrachtet zeigten sowohl die Einzelauswertungen als auch die gemeinsame Auswertung aller ipNs zusammen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Mikroplastikgruppe besteht, wobei die MP-Gruppe eine gesteigerte Reabsorption von Albumin im proximalen Tubulus zeigte.

V. DISKUSSION

1. Nanofasern – ein vielversprechendes Grundmaterial zur Herstellung von realitätsgetreuem Mikroplastik zu Forschungszwecken

Dass der Mensch der täglichen Aufnahme von Mikroplastik unweigerlich ausgesetzt ist, ist unumstritten. Es ist daher essentiell zu verstehen, welche Risiken und Konsequenzen diese Exposition birgt. Die Partikel, die derzeit für Toxizitätsstudien verwendet werden, zeigen allerdings deutliche Abweichungen zu denen, die tatsächlich in der Umwelt vorkommen und auch im Menschen gefunden wurden²⁵. Ziel dieser Arbeit war es daher, dieser Diskrepanz beizukommen und Mikroplastik-Fragmente sowie -Fasern zu produzieren, die sich mit eingebetteten optischen Labeln zuverlässig und langfristig detektieren lassen.

1.1 DPA als Fluoreszenzmarker favorisiert gegenüber Perylen

Die Präselektion zur fluoreszenten Markierung ergab DPA und Perylen als mögliche Label, da beide mit der gewünschten Wellenlänge von 405 nm angeregt werden können^{134,135}.

Um die beiden Markierungen gegeneinander zu vergleichen, wurden Untersuchungen zu den Emissionsbanden, der Fluoreszenzintensität, der Anregbarkeit bei verschiedenen Wellenlängen sowie der Photostabilität durchgeführt. Die Tests erfolgten mithilfe von dünnen Polystyrolfolien, in die das jeweilige Fluorophor in der gewünschten Konzentration eingebettet worden war.

DPA zeigte sich hinsichtlich der Emissionsbanden vorteilhaft, da es lediglich eine Emissionsbande bei etwa 450 nm aufwies, während Perylen mit zwei Peaks (450 nm und 480 nm) deutlich breiter emittierte. Daneben wies DPA bis zu dreimal höhere Fluoreszenzintensitäten als Perylen bei gleicher Fluorophorkonzentration auf, was insofern vorteilhaft ist, als dass zur Markierung geringere Mengen DPA eingesetzt werden können. Aus einer geringeren Fluorophorbeladung resultiert ein geringeres Leaching aus

der Matrix, was mögliche Auswirkungen austretenden Labels aus dem MP minimiert. Verglichen mit der Literatur sind diese Ergebnisse schlüssig, da DPA ein Quantumyield von 1,0 konstatiert wird, während dieser für Perylen mit 0,94 geringer ausfällt ^{134,135}.

Darüber hinaus wurden Emissionsanalysen nach Anregung bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt. Getestet wurden hierbei die gängigsten Anregungswellenlängen, die in Fluoreszenzmikroskopen verbaut sind: 405 nm, 488 nm, 561 nm sowie 633 nm. Die Messungen ergaben, dass DPA lediglich bei 405 nm angeregt werden kann, während Perylen auch bei 488 nm noch eine bemerkenswerte Emission zeigte. Diese Emission ist insofern problematisch, als dass es damit zu einer Überlappung mit der Autofluoreszenz von z.B. Nierengewebe kommt, sowie mit Antikörperfärbungen, die diese Wellenlänge zur Detektion nutzen.

Abgesehen von den Emissionsuntersuchungen wurde für beide Fluorophore eine hohe Photostabilität festgestellt. Nach mehrstündiger Exposition unter starkem UV-Licht wiesen DPA und Perylen noch jeweils 80% ihrer ursprünglichen Fluoreszenzintensität auf, was als geringes Photobleaching zu werten ist. Anhand dieser Daten können beide Fluorophore als photostabil bezüglich kurz- bzw. mittelfristiger Tageslichtexposition betrachtet werden und ermöglichen unabgedunkelte Labor-Arbeiten (Probenvorbereitung, Handhabung in der Zellkultur, etc.) mit dem Material. Darüber hinaus ist eine Detektion von Material, das mit DPA oder Perylen markiert wurde, auch nach längerer Zeit möglich. Nichtsdestotrotz sollte das Material in der Dunkelheit gelagert werden.

Insgesamt ergaben die Fluorophoruntersuchungen, dass DPA aufgrund der schmalen Emissionspeaks, der stärkeren Fluoreszenz sowie der spezifischeren Anregbarkeit Perylen vorzuziehen ist. Für die Einbettung von DPA in Mikroplastik wurde aufgrund der Fluoreszenzdaten eine Markierungskonzentration von 0,3% festgelegt, da diese ausreichend starke Fluoreszenzintensitäten zeigt, noch keinem Self-Quenching unterliegt und gleichzeitig ein potentiell Ausbluten und dessen Einflüsse gering hält.

1.2 UCNPs: eine vielseitige Markierungsoption zur Detektion von MP

Upconverting Nanoparticles (UCNPs) bieten einige Vorteile: Sie ermöglichen sowohl eine visuelle Detektion, als auch eine quantitative Auswertung mittels ICP-OES oder ICP-MS ⁹⁴ und unterliegen keinem Photobleaching ^{86,87}. Die Anregung im Infraroten

(980 nm) ermöglicht zudem eine hohe Penetrationstiefe bei Detektion in Gewebe⁸⁹⁻⁹², während nur eine geringe Autofluoreszenz beobachtet wurde⁹³.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften [Yb,Tm]-gedopte UCNPs zur Einbettung in Polystyrol-MP synthetisiert. Die Quantifizierbarkeit sollte später zur Distributions- und Exkretionsanalyse genutzt werden. Die Partikel zeigten eine homogene Größenverteilung, die auch nach Ummantelung mit einer NaYF₄-Hülle zur Steigerung der optischen Emission homogen blieb. Die einheitlichen Größen stellten die Grundlage für eine homogene Verteilung in der PS-Matrix dar. Desweiteren exhibierten die UCNPs eine starke Lumineszenz, die sich bei den umhüllten UCNPs vorwiegend im Grünen bei etwa 480 nm zeigte.

Bei der Nutzung von UCNPs als optisches Label sind allerdings zwei Faktoren zu beachten: Zum einen besitzen UCNPs eine sehr geringe Quantenausbeute von maximal 13%⁸⁸. Entsprechend werden zur Anregung hohe Leistungsdichten bzw. Laserintensitäten benötigt oder hohe Dopingraten in der umgebenden Matrix¹⁴⁵. Zum Anderen lumineszieren die Partikel nach Anregung sehr lange¹⁴⁶. Zu bedenken ist dabei, dass einige Photodetektoren auf dem Prinzip basieren, dass sie das emittierte Licht aus der gesamten Probe aufnehmen und dem Punkt zuweisen, an dem in diesem Moment angeregt wird. Wenn UCNPs nun sehr lange nach ihrer eigentlichen Anregung lumineszieren, so entsteht mit diesen Detektoren ein streifig leuchtendes Bild. In der Praxis bedeutet das, dass dem Problem nur beizukommen ist, indem sehr langsame Scan-Zeiten gefahren werden, was wiederum ein erhöhtes Potential zur Gewebsschädigung bedeutet.

Perspektivisch gesehen, bieten UCNPs eine hervorragende Möglichkeit zum Multiplexing, da die Emissionswellenlängen der Partikel durch das Lanthanoid-Doping adjustiert werden können¹⁴⁷. Demnach wäre es dank UCNP-Labeln möglich, verschiedene MP-Polymere oder MP-Formen mit unterschiedlich emittierenden UCNP zu beladen und alle gleichzeitig bei 980 nm anzuregen^{85,93,148} – einer Wellenlänge, die für Antikörperfärbungen standardmäßig ohnehin keine Verwendung findet. Die jeweiligen Emissionen würden anschließend Aufschluss darüber geben, ob bestimmte Partikelarten z.B. stärker akkumulieren oder an unterschiedlichen Orten im Organismus wiederzufinden sind.

Darüber hinaus bietet eine Integration von UCNPs als optisches Label den großen Vorteil, dass eine Alterung des Mikroplastiks, so wie sie in der Natur stattfindet, künstlich mit z.B. UV-Licht nachgestellt^{149,150} werden kann ohne Einbußen in der lumineszenten Detektion zu verzeichnen.

1.3 Nanofaser-Setup ermöglicht stabile und homogene Integration von Labeln

Vor der Zerkleinerung der Polystyrol-Nanofasern wurde in diese beim Spinning-Prozess DPA bzw. UCNPs als Markierung eingebettet. Die entstandenen Fasern waren mit Durchmessern von 0,95 µm (DPA) und 1,0 µm (UCNPs) in etwa gleich dick, was eine gute Reproduzierbarkeit der PS-Nanofasern-Herstellung bezeugt. Sowohl DPA-PS-Fasern als auch UCNP-PS-Fasern zeigten bei mikroskopischer Betrachtung eine gleichmäßige Lumineszenz, was eine homogene Verteilung der Label indiziert. Somit kann auch nach der folgenden Zerkleinerung zu Mikroplastik davon ausgegangen werden, dass jeder MP-Partikel ausreichend mit Label zur Detektion beladen ist.

Neben der mikroskopischen Beurteilung schloss sich eine Leaching-Studie an, um das Ausbluten der Label aus der PS-Matrix zu quantifizieren. Sowohl für DPA- als auch für die UCNP-Nanofasern zeigte sich mit insgesamt 0,0023 m% (DPA) bzw. wie 0,2 m% (UCNPs) ein sehr geringes Ausbluten. Somit ist von einer stabilen Einbettung auszugehen, wobei die freigesetzten Lanthanoid- und Fluoridkonzentration sich deutlich unterhalb der dokumentierten Zytotoxizitätsgrenzen liegen^{137–139,151}.

Zusammenfassend lässt sich die Einbettung der Markierungen in die PS-Nanofasern als homogen und stabil beschreiben. Das direkte Einarbeiten der Label in die Polymermatrix im Spinningprozess bietet somit perspektivisch die Möglichkeit, je nach gewünschter Applikation unterschiedliche Farbstoffe zu integrieren, sowie auch weitere schädliche Substanzen wie Weichmacher oder Schwermetalle, die in der Umwelt in oder an den Partikeln vorkommen und so ihre Toxizität erhöhen könnten. Auch ein Wechsel auf andere Polymere ist möglich, solange sich diese mit Hochspannung zu Nanofasern verspinnen lassen.

1.4 Nanofasern ermöglichen Herstellung kleiner MP-Fragmente sowie MP-Fasern

Zur Zerkleinerung der PS-Nanofasern zu Mikroplastik wurden verschiedene Strategien evaluiert: Die Vermahlungen erfolgten mit Kugelmühlen, wobei große und/oder kleine Mahlkugeln zum Einsatz kamen. Daneben wurde ein Hochleistungs-Dispergierer (Ultraturrax) zur Herstellung von Mikroplastik-Fasern erprobt.

Die besten Ergebnisse zur Fragment-Herstellung wurden mit der Planetenkugelmühle erzielt, wenn nach der Vorvermahlung zunächst mit großen, anschließend mit kleinen Kugeln vermahlen wurde. Durch diese Kombination aus Prall- und Reibungswirkung der verschiedenen Kugelgrößen konnten Fragmente mit einem Durchmesser von $(4 \pm 3) \mu\text{m}$ gewonnen werden.

Überraschenderweise ergab die kryogene Vermahlung lediglich große Partikel mit breiter Streuung ($(10 \pm 20) \mu\text{m}$), obwohl aufgrund der niedrigen Temperatur eine erhöhte Sprödigkeit des Materials und damit eine bessere Zerkleinerung zu erwarten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung für das Ergebnis liegt in der Tatsache, dass die Vermahlung extern stattfand und hier zwar auch Zyklen von $9 \times 2 \text{ min}$ stattfanden, die allerdings nur mit großen Kugeln umgesetzt wurde. Zudem wurden durch das komplexe Handling des stickstoffgekühlten Mahlbeckers keine Vorvermahlungsschritte durchgeführt. Diese erwiesen sich im Handling mit der Planetenkugelmühle jedoch als essentiell, da aufgrund der starken Volumenverkleinerung von Fasern zu Fragmenten ansonsten keine adäquate Füllung des Mahlbeckers möglich war, die wesentlich zur erfolgreichen Vermahlung beiträgt und Metallabrieb minimiert.

Die hergestellten Fragmente besitzen mit $4 \mu\text{m}$ Durchmesser eine Größe, die sowohl gut von Zellen aufgenommen⁷⁰, als auch intestinal resorbiert werden kann. Darüber hinaus liegen sie auch im respirierbaren Bereich^{152,153} und könnten somit sogar bei inhalativen Applikationen Anwendung finden.

Abgesehen von den MP-Fragmenten konnten mithilfe des Hochleistungs-Dispergierers (Ultraturrax), der auf einem Rotor-Stator-Prinzip beruht, und einer anschließenden Filtration MP-Fasern mit Maßen von etwa $1 \times 1 \times 20 \mu\text{m}$ erzielt werden. Mit Optimierungen, wie z.B. längeren Scherzeiten, könnten in Zukunft noch kürzere Faserstücke erzielt werden, wenn dies für eine spezielle Anwendung gewünscht sein sollte.

1.5 Charakterisierung zeigt realitätsnahe Mikroplastik-Partikel

Abschließend wurde das Material sowohl über FTIR-Messungen als auch Rasterelektronenmikroskopie in Identität, Form und Größe charakterisiert.

Die FTIR-Messungen ergaben, dass durch die Vermahlung keine Veränderungen in der Polystyrolmatrix erzeugt wurden, da keine zusätzlichen Banden in Form von beispielsweise Oxidationspeaks auftraten.

Die erhaltenen Durchmesser lagen mit $4,7\ \mu\text{m}$ (DPA-PS) und $6\ \mu\text{m}$ (UCNP-PS) nah beieinander und verdeutlichten so die hohe Reproduzierbarkeit der hergestellten MP-Fragmente.

Von besonderem Interesse war im Rahmen der Produktion neben der Größe auch die Form der Partikel, da diese wie bereits erwähnt Einfluss auf die Effekte von MP²⁵ ausübt. Die SEM-Aufnahmen der hergestellten Fragmente aus Mikroplastik zeigten eine raue Oberfläche sowie unregelmäßige Formen, die denen von MP aus der Natur sehr nahe kommen^{72,140,154}. Auch die faserigen Partikel wiesen Strukturen auf, wie sie auch in der Umwelt z.B. nach Waschprozessen von Kleidung zu sehen sind¹⁵⁵.

Die produzierten MP-Fasern und -Fragmente bilden somit eine wichtige Ressource für MP-Studien, die die Formen der Partikel in der Umgebung berücksichtigen und somit realistische Ergebnisse zu potentiellen Gefahren von Mikroplastik erzielen können.

1.6 Einsatz nicht-ionische Tenside zur Stabilisierung von MP-Suspension

Mit der Produktion von MP-Partikel ist in der Regel erst die halbe Arbeit erledigt. Eine Hürde besteht danach in vielen Fällen vor allem darin, die Partikel so stabil zu suspendieren, dass die Dosiergenauigkeit gewährleistet ist und keine Agglomerate entstehen, die später z.B. Gefäße verstopfen können.

Einen Anhaltspunkt für die Stabilität von Partikelsuspensionen bietet das Zetapotential. Mit einem gemessenen Potential von $-31\ \text{mV}$ in destilliertem Wasser wird die Suspension des MPs gerade noch als stabil angenommen¹³⁰. Destilliertes Wasser ist weitgehend frei von Ionen – es hat also eine geringe Ionenstärke, was für die Stabilität von Suspensionen vorteilhaft ist. An diesem Punkt sei erwähnt, dass die zugrundeliegende DLVO-Theorie mit Idealisierungen arbeitet, die in der Interpretation bedacht werden sollten. So wird von sphärischen Partikeln gleicher Größe in Wasser und einem geringen Feststoffgehalt ausgegangen.

Während eine Applikation der Partikel in destilliertem Wasser für orale Applikationen unter gewissen Voraussetzungen möglich ist, bestehen für parenterale Applikationen deutlich strengere Grenzen. So muss z.B. für intravenöse Injektionen ein nahezu physiologischer pH-Wert sowie eine Osmolarität von etwa 300 mosmol (isoton bezogen auf das Blutplasma) eingehalten werden. Die hohe Ionenstärke von 300 mosmol führt jedoch bei Partikeln zu einer Absenkung des Zetapotentials gegen Null. Entsprechend sinkt die Stabilität des System, eine Zusammenlagerung der Partikel wird bei hohen Ionenstärken immer weiter erleichtert und Suspensions-Stabilisatoren werden nötig¹⁵⁶.

Grundsätzlich müssen neben dem Zetapotential bei derart hydrophoben Partikeln auch hydrophobe Wechselwirkungen mit den anderen Partikeln bedacht werden, die eine Zusammenlagerung der Partikel oder auch eine Adsorption an Wände von Plastikbehältnissen stark begünstigen.

Zur Stabilisierung eines solchen Systems sind verschiedene Zusätze denkbar, beispielsweise Viskositätserhöher, Peptisatoren oder nicht-ionische Tenside.

Eine erhöhte Viskosität und somit eine behinderte Zusammenlagerung können Stoffe wie Hydroxyethylcellulose bezwecken. Hierbei gilt allerdings zu bedenken, dass die Viskosität von Ionenstärke, pH-Wert oder Temperatur beeinflusst werden und eine viskose Suspension in der Handhabung bzw. Applikation durch Kanülen hinderlich sein kann. Peptisatoren, wie z.B. Calciumtartrat oder Natriumcitrat, sind mehrfach negativ geladen (mehrprotonige Säuren) und können das Nernst-Potential (= das Potential am Partikel selbst; Oberflächenpotential) überkompensieren und somit zu einer Erhöhung des Zetapotentialbetrags führen, was wiederum die Suspension stabilisieren kann. Je nach Applikationsart muss hierbei allerdings beachtet werden, dass solche Peptisatoren sowohl Einfluss auf den pH-Wert als auch auf die Osmolarität nehmen.

In Bezug auf die hydrophoben PS-Partikel, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, stellen nicht-ionische Tenside, wie z.B. Polysorbate oder Poloxamere, die beste Option dar. Sie besitzen auf der einen Seite einen hydrophoben Teil, der sich gut an die hydrophobe Oberfläche der PS-Partikel anlagern kann, und auf der anderen Seite mehrere hydrophile Reste (im Fall von Polysorbat aus Polyethern), die eine Lösung in Wasser ermöglichen und sich gleichzeitig durch die Länge dieser hydrophilen Ketten gegenseitig auf Distanz zueinander halten. Somit steigt die Benetzbarkeit der Partikel in Wasser und

Agglomerationen werden unterbunden, während kein nennenswerter Einfluss auf den pH-Wert oder die Osmolarität genommen wird.

1.7 Kommerziell erworbene Partikel weichen von angegebenen Größen ab

Zuletzt wurden auch die kommerziell erworbenen Partikel zur Qualitätskontrolle hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, der Form und der Partikelgrößen charakterisiert. Die angegebenen Materialien und Formen konnten dabei bestätigt werden, wobei anzumerken ist, dass die irregulär geformten Fragmente deutlich prominente Spitzen und Ecken aufwiesen als das intern produzierte Mikroplastik. Diese Tatsache liegt vermutlich in den verschiedenen Herstellungsprozessen begründet, wobei zur Produktion der zugekauften Partikel laut Herstellerangaben Laserablation zum Einsatz kam.

Im Hinblick auf die Größe stellte sich heraus, dass die zugekauften MP-Fractionen bis auf die sphärischen Partikel nicht den Herstellerangaben entsprachen. Alle irregulär geformten MP-Sorten (PS, PP, PET) beinhalteten neben den angegebenen 20-50 µm großen Partikel in allen Fällen auch deutlich kleinere Partikel. Im Falle von PET waren zudem auch Größen jenseits der 50 µm präsent. Überraschenderweise lagen die Partikeldurchmesser für die irregulären PS- und PP-Fragmente sogar im Durchschnitt mit 14,5 bzw. 19,0 µm unterhalb der angegebenen 20 µm als Untergrenze. Diese Abweichungen von den gewünschten Größen erschwerten den Vergleich mit den PS-Sphären, da diese mit einer engen Verteilung um etwa 40 µm nun deutlich größer waren als die entsprechenden Fragmente.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mithilfe der elektrogesponnenen Nanofasern sowohl die stabile Einbettung verschiedener Labels als auch die Zerkleinerung in fragment- sowie faserförmiges Mikroplastik ermöglicht wurde. Diese Produktionsstrategie eröffnet neben der Adaptierung des Labels je nach Applikationswunsch auch die Möglichkeit zur Produktion von Mikroplastik verschiedenster Polymere, solange sich diese zu Nanofasern spinnen lassen. Je nach Zerkleinerungstechnik können anhand der Vermahlungszeiten, -Zyklen und Kugelgrößen auch andere Größenverteilungen erzielt werden.

2. Mikroplastik in allen untersuchten Organen zu finden

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellten Untersuchungen zur Toxikokinetik von oral aufgenommenen Mikroplastikfragmenten dar. Mithilfe von UCNP-markiertem PS-MP sollten sowohl die Ausscheidungswege als auch besonders betroffene Organe identifiziert werden. Neben der Quantifizierung erfolgte auch eine qualitative Analyse, die Informationen über die Lokalisation der Partikel in den Organen preisgeben sollte.

2.1 Fenestriertes oder diskontinuierliches Endothel begünstigt Mikroplastik-Ablagerungen

Im Zuge der Distributionsanalyse wurde Mäusen einmalig (akut) bzw. über 7 Tage (chronisch) über eine orale Gavage Mikroplastik appliziert. Nach akuter Exposition konnte MP in Darm, Gehirn, Leber, Magen, Niere und Pankreas detektiert werden. Nach chronischer Exposition zeigte sich bis auf den Magen in all diesen Organen die Tendenz, dass die längere Exposition einen Anstieg der MP-Konzentration bezogen auf das Organgewicht bedeutet. Darüber hinaus hatten sich nach dieser siebentägigen Applikation auch in den übrigen Organen Herz, Hoden und Milz MP-Partikel abgelagert. Bei den Magen- und Darmproben gilt es zu beachten, dass beide Organe vor der Verarbeitung nicht gewaschen wurden und somit der Chymus mitsamt enthaltenem MP darin verblieb. Entsprechend erlauben die ermittelten Werte für Magen und Darm keine Rückschlüsse auf die jeweils aufgenommenen Mengen an Mikroplastik. Im Darm wurde im Gegensatz zum Magen allerdings signifikant mehr MP detektiert, was insofern bemerkenswert ist, als dass die Transitzeit durch den Darm einer Maus etwa 6-8 h beträgt¹⁵⁷ und somit eigentlich kein MP der vorhergehenden Tage hätte im Chymus detektiert werden sollen. Möglicherweise wurde hier also tatsächlich eine erhöhte Aufnahme des MP innerhalb des Darms und daraus resultierend die Akkumulation beobachtet.

Auch im Korpus, also dem restlichen Körper der Maus nach Organentnahme, wurden größere Mengen an MP gefunden, was darauf schließen lässt, dass auch MP in Muskulatur, Fett- und Bindegewebe, Gefäßen oder Knochen verblieben ist.

Die hohe Standardabweichung der chronischen Exposition liegt in den Werten eines Individuums begründet, bei dem deutlich höhere MP-Ablagerungen in allen Organen detektiert wurden, was für eine grundsätzlich höhere Aufnahme vom Magen-Darm-Trakt

in die Zirkulation spricht. Der Grund hierfür konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden, jedoch wäre eine erhöhte Durchlässigkeit des Darms z.B. im Rahmen eines „leaky gut“ denkbar.

Bezogen auf das Organgewicht zeigten Hoden, Milz und Pankreas die höchsten MP-Konzentrationen. Was diesen drei Organen gemein ist, ist ein fenestriertes (Hoden, Pankreas) bzw. diskontinuierliches (Milz) Endothel¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Diese Poren bzw. Unterbrechungen im Endothel könnten es MP-Partikeln erleichtern, die Blutbahn in diesen Organen zu verlassen und dort so höhere MP-Ablagerungen begünstigen. Dass Mikroplastik die Spermatogenese bzw. Reproduktionsfähigkeit beeinträchtigen kann, wurde bereits mehrfach gezeigt¹⁶¹⁻¹⁶³ und liefert zusammen mit der in dieser Arbeit dokumentierten starken Ablagerung des Materials in den Hoden Anlass zu weiteren Untersuchungen.

Betrachtet man die Funktionsweise der Milz, die neben immunologischen Funktionen auch alte oder fehlerhafte Erythrozyten mit ihrem Filtersystem in der roten Pulpa aus der Zirkulation entfernen soll¹⁶⁴, erscheint es logisch, dass in diesem Maschenwerk neben den alten Erythrozyten auch Mikroplastikpartikel hängen bleiben, die im Gegensatz zu den roten Blutkörperchen jedoch nicht von Makrophagen abgebaut werden können und so in der Milz verbleiben. In diesem Zuge ist es denkbar, dass das Mikroplastik die Funktionen der Milz beeinträchtigen könnte und somit auch Einfluss auf z.B. die Infektabwehr nimmt, was bereits *in vivo* beobachtet wurde¹⁶⁵.

Im Pankreas findet sich das fenestrierte Endothel ebenfalls nicht ubiquitär, sondern lediglich im endokrinen Teil. Ohne die Mengen des gefundenen MP im Pankreas den endo- oder exokrinen Anteilen zuordnen zu können, ist aufgrund der Fenestrierung von einer verstärkten Ablagerung im endokrinen Pankreas auszugehen. Es ist daher plausibel, dass diese Akkumulation zu endokrinen Störungen führen könnte. Neuste Veröffentlichungen zeigten, dass eine Mikroplastik-Exposition mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus einherging¹⁶⁶, was im Einklang mit den hier erhobenen Daten steht und in einer Beeinträchtigung des endokrinen Pankreas begründet liegen könnte.

Absolut betrachtet zeigte neben Magen und Darm (siehe Diskussion bzgl. Chymus) die Leber die stärksten MP-Ablagerungen. Die Leber ist stark vaskularisiert und besitzt ebenfalls ein diskontinuierliches Endothel in den Sinusoiden¹⁶⁷, durch welches die

MP-Partikel leichter die Blutbahn in das umliegende Gewebe verlassen können und so im Organ akkumulieren.

Darüber hinaus fielen in den absoluten Werten auch deutliche Ablagerungen im Gehirn auf. Dies steht im Einklang mit Funden im Menschen⁶¹ und ist aufgrund der neusten wissenschaftlichen Erkenntnisse durchaus besorgniserregend, da MP im Gehirn bei Mäusen zu zerebralen Thrombosen führte¹⁰⁹.

Denkt man nun das Schema weiter, dass MP vor allem in Regionen mit fenestriertem bzw. diskontinuierlichem Endothel akkumuliert, so müsste auch das Knochenmark betroffen sein (hier Teil der Probe „Korpus“). Unterstützt wird diese These von jüngsten Funden im Menschen, die tatsächlich Mikroplastik im Knochenmark detektierten, vorwiegend in einer Größe zwischen 20-100 µm⁶².

Interessant wird es in dieser Hinsicht auch bei Tumorgewebe, da neu entstehende Kapillaren, die Tumore versorgen, ebenfalls ein diskontinuierliches Endothel und somit eine Hyperpermeabilität aufweisen^{168,169}. Der Hypothese folgend müsste sich somit auch in Tumorgewebe mehr Mikroplastik ablagern, was für Lungentumoren im Vergleich zu normalem Lungengewebe kürzlich belegt wurde⁵³.

Neben Tumoren können auch andere pathologische Vorgänge, wie beispielsweise Entzündungen, zu vergrößerten endothelialen Zwischenräumen führen¹⁷⁰ und so möglicherweise eine Ablagerung von MP erleichtern, was in diesen bereits belasteten Arealen vermutlich einen zusätzlichen Nachteil im Hinblick auf eine Genesung darstellen würde.

2.2 Exkretion von MP überraschenderweise auch mit Urin

Zur Untersuchung der Exkretion von MP-Fragmenten wurden im Tierversuch Urin sowie Fäzes jeweils über 23 h Urin nach der letzten MP-Applikation aufgefangen.

Dass ein Großteil des oral aufgenommenen Mikroplastiks mit den Fäzes eliminiert wird, war insofern wenig überraschend, als dass in den Magen applizierte Partikel zwangsläufig in den Darm übertreten würden und von dort in die Fäzes gelangen, wenn keine Aufnahme der Partikel stattfindet. Demnach ist es schlüssig, dass etwa 99% des insgesamt gefundenen Plastiks mit den Fäzes eliminiert wurden. Das übrige Prozent, dass es in die Zirkulation schafft, mag im ersten Moment nach wenig klingen, stellt jedoch je nach Expositionshöhe eine nicht zu vernachlässigende Menge dar.

Mit einer intestinalen Passagezeit von 6-8 h¹⁵⁷, konnte zudem davon ausgegangen werden, dass der Anteil an der applizierten MP-Menge pro Tag innerhalb von 24 h vollständig mit den Fäzes ausgeschieden wird. Die erhobenen Daten zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der mit den Fäzes ausgeschiedenen Menge nach akuter bzw. chronischer Exposition, was aufgrund der Tatsache, dass in den Fäzes aufgrund der Passagezeit keine Akkumulation stattfinden konnte, schlüssig ist.

Überraschenderweise wurde jedoch auch im Urin eine Ausscheidung von Mikroplastik-Partikeln detektiert. Für diese Beobachtung ist es unumgänglich, dass MP nach der Applikation in die Zirkulation aufgenommen worden sein muss und auf diesem Weg in die Nieren gelangt ist. Damit eine Substanz schlussendlich mit dem Urin ausgeschieden wird, sind drei Mechanismen physiologisch: eine glomeruläre Filtration, eine tubuläre Rückresorption und zuletzt eine tubuläre Sekretion in den Urin¹¹⁴. Aufgrund der Hydrophobizität und Größe der Partikel ist eine tubuläre Rückresorption oder aktive Sekretion nicht denkbar. Aufgrund der Größe von etwa 6 µm im Durchmesser, ist jedoch auch eine freie Filtration ausgeschlossen. Was bleibt, ist somit die Option, dass die Partikel die GFB im Zuge einer Schädigung überwinden konnten und so ins Tubulussystem und damit den Urin gelangt sind. Die Scharfkantigkeit der Partikel könnte darüber hinaus ein Austreten der Partikel aus dem Blutstrom ins Interstitium und ein weiteres Durchbohren des Parenchyms bis in einen Tubulus bewirkt haben, allerdings ist diese Möglichkeit statistisch und histologisch betrachtet sehr unwahrscheinlich.

Auch wenn diese Ergebnisse durchaus Fragen nach dem Übertritt in den Urin offen lassen, so stehen sie trotzdem im Einklang mit Exkretionsanalysen am Menschen, bei denen neben größeren Mengen MP-Fragmenten in den Fäzes ebenfalls MP-Partikel im Urin gefunden wurden⁴⁵.

2.3 Qualitative Untersuchungen zu MP in den Organen

Das histologische Organ-Screening erfolgte mithilfe von Mäusen, die über 10 Tage das zugekaufte, irreguläre PS-Mikroplastik oral appliziert bekommen hatten. Aufgrund der Perfusionsfixierung der Tiere war in diesem Versuchsaufbau grundsätzlich mit weniger MP-Funden als bei den nicht perfundierten Tieren der Distributionsanalyse zu rechnen und daher mit einer Unterschätzung der eigentlichen Mengen, da mit der Perfusion auch MP aus dem System gespült werden kann. Zudem wurden nicht das komplette

Organgewebe untersucht und ein Einfluss lokaler Verteilungsmuster ist somit nicht auszuschließen.

Unter Berücksichtigung aller Aspekte stehen die qualitativen Analysen trotzdem im Einklang mit der quantitativen Beurteilung. So zeigten sich vereinzelt Partikel im Herzen sowie in der Skelettmuskulatur (Quadrizeps) sowie etwas häufiger in Leber, Hoden und Gehirn. Besonders im Gehirn fiel dabei eine Nähe der Partikel zu Blutgefäßen auf. Die Funde in der Niere werden im nächsten Kapitel detailliert abgebildet.

Abweichend von den Quantifizierungswerten wurden im Magen sowie proximalen und distalen Teilen des Dünndarms nur wenige Partikel detektiert. Dieser Unterschied ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der unterschiedlichen Probenaufarbeitung geschuldet, da für die Quantifizierung keine Reinigung von Magen und Darm stattfand, für die histologischen Untersuchungen allerdings mehrere Waschschriffe von Nöten waren, um unspezifische Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Im Zuge des Waschens wurde alles im Chymus enthaltene Mikroplastik entfernt und es konnten lediglich aufgenommenen MP-Fragmente gefunden werden.

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich bei der Untersuchung der Lunge, da in den histologischen Proben große Mengen an MP-Ablagerungen sichtbar wurden. Bei der Distributionsanalyse zeigten sich allerdings deutlich geringere Akkumulationen. Begründet liegt diese Diskrepanz vermutlich in den Größenunterschieden der applizierten Partikel. Während bei der quantitativen Auswertung das selbst produzierte UCNP-PS mit einem Durchmesser von 6 μm zum Einsatz kam, wurden im Rahmen der qualitativen Analyse die zugekauften PS-Fragmente mit Durchmessern von $(14,5 \pm 12,8) \mu\text{m}$ eingesetzt. Neben der hohen MP-Menge fiel in der Lunge auf, dass der Großteil der gefundenen MP-Fragmente von Aktin-reichen Strukturen (vgl. Phalloidin-Färbung) eingeschlossen schien. Für diese Strukturen gibt es zwei mögliche Erklärungsansätze: Zum einen könnten diese Strukturen konkret α -SMA (alpha Smooth Muscle Actin) darstellen, welches einen Marker für aktivierte Fibroblasten darstellt und in Remodelingprozessen, wie z.B. im Rahmen einer Lungenfibrose, erhöht ist ¹⁷¹. Diese Funde würden demnach fibrotische Prozesse in der Lunge durch die Ablagerung von großen MP-Fragmenten nach oraler Applikation implizieren. Zum anderen könnte das Aktin auch Teil des Zytoskeletts von Makrophagen sein, die im Rahmen der Phagozytose zu multinukleären Riesenzellen (Fremdkörperriesenzellen oder Langhans-Riesenzellen)

fusioniert sind. Neben der Tatsache, dass diese Riesenzellen auch auf Implantaten prominent sind¹⁷², stellt dieser Zelltyp ein häufiges Merkmal einiger chronischer Entzündungszustände der Lunge dar, welche wiederum häufig zu fibrotischen Veränderungen und Granulomaten führen¹⁷³. Die zugrunde liegenden Abläufe und die Auswirkungen von oral aufgenommenem Mikroplastik auf die Lunge werfen somit neben den Effekten auf Fortpflanzungsorgane, die Milz oder das endokrine Pankreas wichtige Forschungsfragen auf, auch im Bezug auf eine Immunzellbeteiligung.

2.4 MP-Aufnahme nach oraler Exposition: Persorption im Darm und Transport mit Lymphe

Sowohl bei den quantitativen als auch bei den qualitativen Untersuchungen der Distribution von oral aufgenommenen MP-Fragmenten kommt die Frage auf, auf welchem Weg die Partikel zu den Organen gelangen. Es scheint logisch, dass eine großräumige Verteilung schlussendlich über den Blutkreislauf stattfindet. Auf welchem Weg die Partikel allerdings vom Magen-Darm-Trakt in den Blutkreislauf gelangen, wirft vor allem im Hinblick auf die teils sehr großen Partikel (vgl. irreguläres PS mit $14,5 \pm 12,8$ μm) größere Fragen auf.

Kombiniert man alle Beobachtungen der bereits erläuterten Experimente, so bleibt nur ein logischer Schluss: Die *Persorption* des Mikroplastiks im Darm.

Unter Persorption versteht man eine Form der parazellulären Resorption. Dabei treten feste Partikel von 5 bis etwa 100 μm im Durchmesser zwischen den Epithelzellen eines intakten Epithelverbands, wie z.B. im Darm, hindurch^{114,174}. Aus dem subepithelialen Raum können die Partikel über Lymphbahnen oder auch Venen abtransportiert werden und auf diesen Wegen in den Blutkreislauf gelangen¹⁷⁵. Aufgrund der Partikelgrößen in den in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche, ist lediglich die Aufnahme durch Lymphgefäße plausibel, da nur die offenen Enden der Lymphkapillaren mit einem Durchmesser von etwa 50 μm groß genug sind, um die verwendeten Partikel aufzunehmen. Die so in die Lymphe gelangten Partikel werden über den *Ductus thoracicus* im linken Venenwinkel dem venösen Blutstrom zugeführt und erreichen über die obere Hohlvene das Herz und das arterielle System¹¹⁶.

Geht man von der Aufnahme über die Lymphe aus, so erscheinen nun auch die mengenmäßigen Unterschiede zwischen den in der Lunge gefundenen Partikeln bei den

quantitativen (kleinere Partikeldurchmesser) und qualitativen (größere Partikeldurchmesser) Untersuchungen schlüssig, da die Lunge als erstes Kapillarnetz von dem MP-beladenen Blut durchströmt wird und dort vor allem die großen Partikel verstärkt hängenbleiben, während für kleinere Partikel eine höhere Chance besteht, den Lungenkreislauf zu passieren.

Betrachtet man erneut die histologische Aufnahme im distalen Dünndarm in Abbildung 27C, so zeigt diese vermutlich genau diesen Persorptionsmechanismus, bei dem das MP-Fragment gerade zwischen den Epithelzellen hindurchtritt. Diese Aufnahme entspricht in ihrer Erscheinung hierbei ziemlich genau der in der Literatur beschriebenen¹⁷⁴. Im Rahmen eines Reviews stellten auch Prata et al.¹⁵³ die These auf, dass Persorption einen möglichen Aufnahmeweg darstellen könnte.

Zuletzt sei gesagt, dass, wenn die verstärkte Verteilung von Mikroplastik in Regionen mit fenestriertem Endothel und der Abtransport des Plastiks über Lymphkapillaren stattfinden, dringend Studien zu Mikroplastik im Knochenmark benötigt werden, da dieses über sein fenestriertes Endothel besonders exponiert wäre, während im Knochenmark jedoch gleichzeitig Lymphkapillaren fehlen¹⁷⁶ und somit kein Abtransport der akkumulierenden MP-Partikel stattfinden würde.

Insgesamt lässt sich bezüglich der toxikokinetischen Parameter festhalten, dass oral applizierte MP-Fragmente höchstwahrscheinlich über Persorption im Darm aufgenommen werden, mit der Lymphe in den Blutkreislauf gelangen und sich von dort in sämtliche Organe verteilen, wobei fenestrierte Endothelien eine Ablagerung von Mikroplastik im Gewebe begünstigen.

3. Mikroplastik und die Niere: Mikroplastik-Fragmente selbst in Tubulussystem zu finden

Ein Kernthema dieser Arbeit sollte die Frage darstellen, welche Auswirkungen die orale Applikation von Mikroplastik auf die Niere hat, da ihre Fähigkeit zur Regeneration stark begrenzt ist. Vor dem Hintergrund, dass neben dem Polymer auch die Partikelform eine entscheidende Rolle im Hinblick auf mögliche Auswirkungen spielen kann²⁵, wurden wie beschrieben Mäusen Mikroplastik-Partikel verschiedener Polymere (PS, PP, PET) und Formen appliziert (Sphären, Fragmente). Daneben erhielt eine Kontrollgruppe lediglich das Suspensionsmedium.

Da die Tiere ebenfalls postmortal für die histologischen Untersuchungen perfundiert wurden, muss auch in diesem Teilprojekt davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Partikelmengen die tatsächlichen unterschreiten, da vermutlich alle Partikel, die nicht stark feststeckten oder sich verkeilt hatten, bei der abschließenden Perfusionsfixierung aus dem Tier ausgespült wurden.

3.1 Nur Fragmente in der Niere zu finden, keine Sphären

In der Kontrollgruppe wurde der Erwartung entsprechend kein Mikroplastik in der Niere gefunden. Was allerdings auffiel, waren kleine, runde Punkte innerhalb mancher tubulärer Zellen, die ebenfalls bei 405 nm fluoreszierten und sich immer in direkter Nachbarschaft zum Zellkern befanden. Der Erscheinung nach handelt es sich hierbei höchstwahrscheinlich um intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen. Diese Proteinaggregate bestehen meist aus defekten oder unvollständig gefalteten Proteinen, denen beispielsweise eine übermäßige Proteinsynthese zugrunde liegt, und die schlussendlich im Zellkern oder Zytoplasma präzipitieren. Von solchen Einschlusskörperchen in kortikalen Tubulusepithelzellen wurde in der Literatur beispielsweise nach Applikation von Medikamenten in Ratten berichtet, wobei die betroffenen Zellen keine Anzeichen von zellulärer Degeneration, Nekrose oder Entzündung zeigten¹⁷⁷. Da diese Einschlüsse über allen Gruppen hinweg auftraten, ist davon auszugehen, dass die Ursache hierfür außerhalb des Versuchsprotokolls liegt.

Für die Gruppe, die sphärische PS-Partikel erhalten hatte, zeigte sich das gleiche Bild, wie in der Kontrollgruppe: Kleine (potentielle) Einschlusskörperchen, jedoch keine Plastikfunde. Erstaunlicherweise wurden jedoch in allen Gruppen, die fragmentförmiges MP erhalten hatten, unabhängig vom Polymertyp MP-Partikel in der Niere entdeckt. Zunächst zeigte sich z.B. ein fast 20 µm großes Fragment, das – trotz Perfusion – in einem größeren Blutgefäß im Cortex gefunden wurde und an einer Abzweigung des Gefäßes feststeckte. Dieser Fund stellte einen eindeutigen Hinweis dafür dar, wie das MP in die Niere gelangte, nämlich mit der arteriellen Blutzufuhr. Betrachtet man den Zustrom des Blutes über größere Gefäße zum *Vas afferens* bis in den Glomerulus, so war die Entdeckung von MP-Partikeln in Glomeruli eine logische Konsequenz. Dort waren Partikel aufgrund ihrer Größe im Kapillarbett hängen geblieben. Kleinere Partikel, die den Glomerulus passieren konnten, blieben danach vereinzelt in peritubulären Kapillaren stecken. Auch diese Funde waren im Hinblick auf den Transport des MP im Blut nicht verwunderlich.

Was hingegen sehr überraschte, waren etliche Funde von teils sehr großen Fragmenten mit ausgeprägten Spitzen und Ecken im Tubulussystem. In dieses Tubulussystem und schlussendlich in den Urin können auf physiologischem Wege nur Substanzen gelangen, die entweder frei über die GFB filtriert oder aber in den Tubulus sezerniert werden. Beides ist aufgrund der Größe der Partikel für Mikroplastik nicht denkbar. Entsprechend ist davon auszugehen, dass sich die MP-Fragmente auf pathologische Weise ihren Weg in das Tubulussystem gebahnt haben, aller Wahrscheinlichkeit durch die GFB hindurch, bei der demnach ein Schaden zu erwarten wäre. Die Untersuchung dieser funktionellen Schädigung ist Teil des nachfolgenden Kapitels.

Dass nur irregulär, teils spitz geformte Partikel detektiert wurden, liegt höchstwahrscheinlich an dem Formfaktor, der es offensichtlich sogar ermöglicht, dass die Partikel biologische Barrieren durchdringen. Verkantet sich ein scharfkantiges Stück Mikroplastik im Gewebe und ist dort möglicherweise zusätzlichen Scherkräften durch z.B. einen hohen Blutfluss ausgesetzt, so ist es vorstellbar, dass sich das Fragment immer weiter in und später sogar durch das Epithel bohrt und es so beschädigt. Auch im Rahmen der vorgestellten Persorption als Aufnahmeweg ist es durchaus schlüssig, dass eckige Partikel auf diese Weise verstärkt zwischen den Darmepithelzellen hindurchtreten als sphärische und somit vermehrt in die Zirkulation gelangen. Die schmale

Größenverteilung der sphärische PS-Partikel von $(41 \pm 5) \mu\text{m}$ könnte die Unterschiede zu den irregulären Partikeln noch dazu begünstigt haben, da bei den irregulären Partikeln auch deutlich kleinere Fragmente im Material waren, die durchströmte Kapillargebiete, wie die Lunge, sowohl aufgrund von Form als auch Größe leichter passiert haben könnten und so überhaupt zur Niere gelangen konnten. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wäre es daher sinnvoll, auch Lungengewebe nach oraler Applikation der PS-Sphären zu untersuchen, da somit unterschieden werden könnte, ob diese Partikel weniger persorbiert werden oder aber aufgrund der Größe und der geringeren „Durchtrittskraft“ (weniger Ecken) vermehrt in der Lunge abgefangen werden vor Eintritt in die Niere.

Zwischen den verschiedenen Polymertypen innerhalb der Fragment-Gruppen wurden keine nennenswerten Unterschiede gefunden. Dies könnte entweder daran liegen, dass das Polymer nur untergeordnet oder gar keinen Einfluss nimmt, oder daran, dass die zugekauften Partikel sich in ihren irregulären Formen und Größenverteilungen teils stark unterschieden.

In keiner der MP-Gruppen waren Differenzen zwischen der fünf- und der siebentägigen Applikation erkennbar. Dies könnte darin begründet liegen, dass bereits nach 5 Tagen nahezu die maximal mögliche Menge akkumuliert ist (*steady state*) oder aber darin, dass durch die unvollständige Analyse der Nierengewebe schlicht die insgesamt Menge der gefundenen Partikel nicht aussagekräftig bewertet werden konnte.

3.2 MP könnte lokale Immunreaktion auslösen

Bereits nach fünftägiger Applikation wurde zudem eine Attraktion von Immunzellen zu manchen tubulointerstitiellen MP-Partikeln beobachtet. Wie in Abbildung 33 zu sehen, wurde sowohl eine Anlagerung von B-Zellen an Partikel als auch ein Einschluss der Fragmente von Makrophagen beobachtet.

Makrophagen haben in der Niere wichtige Funktionen: Sie tragen zur Homöostase in der Niere bei und spielen eine zentrale Rolle in der Reaktion auf akute und chronische Nierenschädigungen, wobei ihr Phänotyp stark von der Art und Dauer der Schädigung abhängig ist. So können sich proinflammatorische M1-Makrophagen entwickeln, die Zytokine ausschütten, oder aber antiinflammatorische M2-Makrophagen, die vor allem an der Reparatur von Gewebe und fibrotischen Prozessen beteiligt sind. Makrophagen, die aus dem Knochenmark stammen, können sich sogar zu Myofibroblasten (MMT,

macrophage-to-myofibroblast transition) entwickeln und so direkt zu einer Nierenfibrose beitragen. Dieser Übergang in Myofibroblasten wird unter anderem durch TGF- β induziert und ist so von zentraler Bedeutung bei der Entwicklung von einer chronischen Entzündung hin zu einer Nierenfibrose¹⁷⁸. Obwohl die genaue Art Makrophagen in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, lässt sich festhalten, dass im Rahmen all dieser Makrophagen-Mechanismen bei längerfristiger Exposition mit MP in der Niere entweder durch eine chronische Inflammation oder auf direktem Wege mit fibrotischen Veränderungen zu rechnen ist, deren Ausmaß sicherlich abhängig von der Menge an abgelagertem Mikroplastik ist.

Auch B-Lymphozyten können im Zuge verschiedener pathologischer Mechanismen die Niere infiltrieren. Dabei wandern sie jedoch nicht überall ein, sondern fast ausschließlich ins Tubulointerstitium. Sie tragen hier ebenfalls zur lokalen Immunantwort bei, indem sie unter anderem durch Zytokinausschüttung sowohl die T-Zell-Proliferation begünstigen als auch die Neubildung von lymphatischen Gefäßen in tubulointerstitiellem Gewebe, was gerade für persistierende Partikel relevant sein könnte¹⁷⁹.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass nach oraler Applikation nur irregulär geformte MP-Fragmente in der Niere gefunden wurden. Sie fanden sich in Gefäßen, Glomeruli, aber auch in kortikalen Tubuli und müssen auf dem Weg dorthin die GFB – vermutlich einhergehend mit einer Beschädigung – überwunden haben. Es ist also davon auszugehen, dass die Partikel die strukturelle Integrität der Niere beeinträchtigt haben. Tubulointerstitiell abgelagerte Partikel lockten sowohl Makrophagen als auch B-Zellen an, was zu inflammatorischen Prozessen und infolgedessen zu einer Nierenfibrose bzw. einem Nierenschaden führen könnte.

Da sich die Form der Partikel einmal mehr als wichtiger Einflussfaktor auf die MP-Konsequenzen zeigte, ist es essentiell, dass nachfolgende Studien realitätsnahes Mikroplastik, also Fasern oder Fragmente verwenden, um auch realitätsgetreue Forschungsergebnisse zu erhalten.

4. MP-Fragmente beeinträchtigen die funktionelle Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere

Eine zentrale Frage dieser Dissertation war es, wie sich Mikroplastik auf die Funktion der Niere auswirkt. Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass sich MP-Fragmente im Tubulussystem finden lassen und gaben somit Hinweise darauf, dass die Partikel die glomeruläre Filtrationsbarriere überwunden haben mussten. Um diesen Hinweisen nachzugehen, sollte die Integrität der GFB überprüft werden.

4.1 Die ipN: ein geeignetes *ex vivo* Modell zur Untersuchung von MP-Auswirkungen

Um die Integrität der GFB überhaupt untersuchen zu können, musste ein geeignetes Modell gefunden werden. Dabei bot sich die isoliert perfundierte Niere (ipN) aufgrund ihrer Unabhängigkeit von der intestinalen Aufnahme als *ex vivo* Modell an.

Die Perfusion der Nieren mit den zugekauften MP-Fragmenten aus Polystyrol, die auch bei der histologischen Untersuchung der Niere verwendet wurden, führte zu denselben Ablagerungsmustern, wie sie auch *in vivo* beobachtet worden waren. Demnach wurden auch hier MP-Partikel in zuführenden sowie peritubulären Gefäßen, in Glomeruli, sowie auch in Tubuli des renalen Cortex gefunden.

Die dargelegten Voruntersuchungen ergaben somit, dass sich die ipN als *ex vivo* Modell für Untersuchungen zu Auswirkungen von Mikroplastik auf die Niere grundsätzlich eignen, da sie die *in vivo* Funde reproduzierten.

Darüber hinaus gab es zwei interessante Entdeckungen: Einerseits konnten Aufnahmen angefertigt werden, die einen Partikel im Übergang eines Glomerulus in den proximalen Tubulus zeigten (siehe Abbildung 40). Dies bildete einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass die Partikel in der Lage sind, die GFB zu passieren. Der Partikel hatte sich im Epithel des proximalen Tubulus mit seinen auffällig ausgeprägten Ecken stark verhakt und so zu einer sichtbaren Läsion des Tubulusepithels geführt. Entsprechend ist in der Niere nicht nur von einer Schädigung der GFB, sondern auch des nachfolgenden Tubulussystems auszugehen. Andererseits zeigte sich bei einer ipN, die nach der MP-Perfusion zu Testzwecken auch mit fluoreszenzmarkiertem Albumin perfundiert worden war, dass um

größere Gefäße herum, die stark mit Mikroplastik gefüllt waren, das gelabelte Albumin aus dem Gefäß ins umliegende Interstitium ausgetreten war (siehe Abbildung 38). Dieses Ausbluten deutet an, dass die MP-Fragmente auch Blutgefäße beschädigen können, was auf deren Scharfkantigkeit zurückzuführen sein könnte. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

4.2 Erhöhte Albumindurchlässigkeit – Mikroplastik schädigt die GFB

Um mithilfe der ipN die Integrität der GFB zu überprüfen, wurde nach der MP-Perfusion kurzzeitig mit fluoreszenzmarkiertem Albumin (Alexa-BSA 594[®]) perfundiert. Wie bereits beschrieben besitzt Albumin aufgrund seiner Größe und Ladung einen sehr geringen Siebkoeffizienten¹²⁴, kann aber nach einem physiologischen oder pathologischen Übertreten der GFB vor allem im proximalen Tubulus endozytiert werden¹⁴⁴.

Die auf diese Weise perfundierten Nieren wurden im Anschluss histologisch präpariert und die Menge an proximal endozytiertem Albumin an einem konfokalen Mikroskop semiquantitativ ausgewertet. Unterschieden wurden hierbei eine Kontroll-Population, in deren zugehörigen Glomeruli kein MP zu sehen war, und eine Mikroplastik-Population, deren Glomeruli MP enthielten. Aufgrund interindividueller Unterschiede fand neben einer Gesamtauswertung (n = 3) auch eine Auswertung der einzelnen ipNs (je mind. n > 100) statt.

In den Einzelauswertungen zeigten sich jeweils statistisch höchst signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der MP-Gruppe, wobei die Mikroplastik-Gruppe höhere Fluoreszenzwerte im proximalen Tubulus zeigte, was für eine erhöhte Aufnahme und somit für eine Hyperfiltration des fluoreszenten Albumins spricht. Die absoluten Unterschiede in den Fluoreszenzen zwischen den verschiedenen ipNs können zum einen auf die genannten interindividuellen Differenzen zurückgeführt werden sowie zum anderen auf die Verwendung verschiedener Phalloidin-Chargen zur Gewebefärbung, auf die die Absolutwerte der Albumin-Fluoreszenz bezogen wurden.

Selbst die Gesamtauswertung ergab trotz ihrer sehr niedrigen Stichprobengröße einen statistisch signifikanten Anstieg der Albumin-Reabsorption im proximalen Tubulus durch Mikroplastik.

Betrachtet man die Violin-Plots der einzelnen ipNs (siehe Abbildung 42), so zeigen auch die Verteilungsmuster deutlich, dass in den MP-Gruppen vermehrt hohe Werte beobachtet wurden gegenüber den Kontroll-Gruppen.

Grundsätzlich ist in diesem Versuchsaufbau davon auszugehen, dass die Auswirkungen des MPs unterschätzt werden. Dies liegt darin begründet, dass folgende Szenarien in der MP- bzw. Kontrollgruppe möglich sind: In der MP-Gruppe wurde mindestens ein Partikel im Glomerulus detektiert, welcher dort entweder nur stecken geblieben ist oder aber einen Schaden z.B. im Sinne einer kleinen Perforation angerichtet hat. Hat ein Partikel einen großen Schaden verursacht, der ihm einen Durchtritt durch die GFB und somit ins Tubulussystem ermöglicht hat, so ist der Partikel nicht mehr im Glomerulus zu finden und dieser Glomerulus wird fälschlicherweise der Kontrollgruppe zugeordnet. Ähnlich verhält es sich, wenn ein MP-Fragment sich in einem anderen histologischen Schnitt als dem betrachteten befindet und somit auch hier davon ausgegangen wird, dass der Glomerulus kein MP enthält. Jede dieser möglichen Falschzuordnungen führt immer dazu, dass ein Glomerulus, der eigentlich MP enthält oder enthielt, der Kontrollgruppe zugeschrieben wird. Entsprechend führt jede falsche Einteilung dazu, dass der Effekt von MP fälschlich gemindert wird. Vor allem in dem Fall, dass ein Partikel die Filtrationsbarriere durch größere Schädigungen überwunden und den Tubulus erreicht hat, ist diese falsche Zuordnung besonders gravierend, da hierbei entsprechend große Mengen Albumin filtriert werden und nachfolgend proximal endozytiert werden, was sich stark überhöhend auf die Ergebnisse der Kontrollgruppe auswirkt.

4.3 Verstärkte Albuminfiltration begünstigt Nierenfibrose zusätzlich

Eine Hyperfiltration von Albumin ist nicht nur diagnostisch, sondern auch pathophysiologisch von großer Bedeutung. Bestehen größere Defekte in der glomerulären Filtrationsbarriere, so kann eine übermäßige Menge an Protein in das Tubulussystem übertreten und dort vom proximalen Tubulus vermehrt reabsorbiert werden¹⁴⁴. Was zunächst positiv klingt, birgt allerdings auch Probleme: Durch das Mehrangebot an Albumin bzw. Protein werden in den Epithelzellen des proximalen Tubulus verschiedenste entzündliche und fibrotische Signalwege aktiviert, die über eine verstärkte Bildung von Extrazellulärmatrix (frühzeitig z.B. α -SMA) letztendlich in einer interstitielle Fibrose als auch einer Glomerulosklerose münden können¹⁸⁰⁻¹⁸³.

Der profibrotische Mechanismus durch eine Hyperfiltration von Albumin in Kombination mit der Attraktion von Immunzellen, die ebenfalls inflammatorische und fibrotische Prozesse begünstigen, lässt die Schlussfolgerung zu, dass Mikroplastik sowohl im Rahmen einer Immunantwort als auch durch eine Schädigung der Filtrationsbarriere, auf längere Sicht ein großes Risiko für eine Fibrosierung der Niere birgt.

Abgesehen von den inflammatorischen und fibrotischen Risiken haben die erhobenen Daten gezeigt, dass Mikroplastik zu einem Austreten von Albumin und somit auch von Flüssigkeit aus renalen Blutgefäßen in das Interstitium führen kann. Demnach besteht durch Mikroplastik auch ein Risiko für interstitielle Ödeme in der Niere.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit *ex vivo* festgestellt werden, dass fragmentförmiges MP nicht nur in der Lage ist die GFB zu überwinden, sondern dabei auch tatsächlich deren funktionelle Integrität beeinträchtigt. Darüber hinaus wurden weitere Hinweise auf eine potentielle Entwicklung einer Nierenfibrose durch Mikroplastik gesammelt, da neben der Immunzellinfiltration auch eine gesteigerte Filtration von Albumin fibrotische Prozesse in der Niere begünstigt.

Diesen Erkenntnissen sollten weitere *in vivo* Untersuchungen folgen, die sich z.B. den langfristigen Auswirkungen einer oralen MP-Exposition mit GFR-Messungen, fibrotischen Veränderungen und einer möglichen Regeneration der Niere nach Mikroplastik-Applikation widmen.

Darüber hinaus sollte ein besonderes Augenmerk der Mikroplastik-Forschung dialysepflichtigen Patienten gelten, da vermutlich auch aus dem Dialysematerial Mikroplastik freigesetzt wird¹⁸⁴, welches folglich intravenös in deren Körper gelangt und die ohnehin eingeschränkte Nierenfunktion weiter verschlechtern könnte.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Produktion von Plastik und die damit einhergehende Freisetzung von Mikroplastik steigt jährlich an. Der Mensch ist der Aufnahme von Mikroplastik unweigerlich ausgesetzt, die Auswirkungen dieser Exposition sind weitgehend ungeklärt und daher im Fokus der jüngsten Forschung. Obwohl die Form des MP entscheidenden Einfluss nimmt, wird in Studien derzeit meist auf sphärisches Mikroplastik zurückgegriffen, da realitätsnähere fragment- oder faserförmige Partikel kommerziell kaum verfügbar sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher realitätsnahes, detektierbares Mikroplastik hergestellt werden. Darüber hinaus sollte die Toxikokinetik (Aufnahme, Verteilung und Exkretion) nach oraler Applikation und die Auswirkungen von Mikroplastik auf die Niere geklärt werden.

Es gelang eine Produktion von realitätsnahen MP-Fragmenten und -Fasern, die sowohl mit einem fluoreszenten (DPA) als auch einem quantitativ nachweisbaren Label (UCNPs) beladen werden konnten und sich somit für eine Vielzahl an Forschungsfragen eignen.

Die toxikokinetischen Auswertungen zeigten, dass sich nach oraler Aufnahme in jedem untersuchten Organ MP-Fragmente ablagerten, wobei Organe mit fenestriertem oder diskontinuierlichem Endothel besonders betroffen waren. Die Exkretion des Mikroplastiks erfolgte zum überwiegenden Teil mit den Fäzes, allerdings wurde auch eine Ausscheidung von Partikeln mit dem Urin beobachtet, was ein Überwinden der GFB implizierte. Als möglichen Aufnahmeweg etablierte sich anhand der Daten die intestinale Persorption.

In der Niere wurden nach oraler Applikation ausschließlich *MP-Fragmente* gefunden, was den Einfluss der Form auf die Verteilung im Organismus belegte. Die Partikel fanden sich in Gefäßen, Glomeruli sowie in kortikalen Tubuli und lockten Immunzellen an. Funktionelle Untersuchungen mithilfe der isoliert perfundierten Niere (ipN) zeigten eine Hyperfiltration von Albumin mit verstärkter Endozytose im proximalen Tubulus und belegten so eine Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsbarriere, die zusammen mit der beobachteten Immunreaktion langfristig Nierenschädigungen begünstigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die hohe Relevanz der Forschung zu Mikroplastik, das sich im Körper verteilt und dort zu erheblichen Schäden führen kann.

VII. APPENDIX

1. Verwendete Materialien

Material	Info	Hersteller
Falcons	15 mL	Sarstedt
Deckgläser	High Precision 24x60 mm	Marienfeld
Dewar-Gefäß	Dewar-Transportgefäß Typ C	KGW-Isotherm
Dialyseschläuche	Spectra/Por 12-14 kDa	Spectrum Labs
Reagiergefäße	1,5 mL	Sarstedt
iSpacer	verschiedene Größen	SunJin Lab
Schmelztiiegel groß	hohe Form, 120 mL	
Schmelztiiegel klein	hohe Form, 15 mL	
Schmelztiiegel-Deckel	50/51/52 mm	Morgan Advanced Materials Hald
Zetapotential-Küvetten	Folded Capillary Zeta Cell	Malvern Panalytical

2. Verwendete Reagenzien

Reagenz	Info	Hersteller
9,10-Diphenylanthracen		Sigma Aldrich
Agarose	niedrig schmelzend	Biozym Scientific
Ammoniumfluorid	≥ 99,99%	Sigma Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)		Sigma Aldrich
Chloroform	≥ 99%	Fisher Chemicals
Cyclohexan	≥ 99,5%	Fisher Chemicals
Dialysat für ipN	modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer*	AG Schweda (hausintern)
Dimethylformamid (DMF)	≥ 99,5%	Fisher Chemicals

Appendix

Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)		Sigma Aldrich
Ethanol	technische Qualität	CSC Jäklechemie
Ethanol	p.A.	Sigma Aldrich
Methanol	≥ 99,9%	Fisher Chemicals
Natriumhydroxid	p.A.	Merck
Natriumoleat	> 82%	Sigma Aldrich
Nitrosyltetrafluorborat	≥ 95%	Sigma Aldrich
Ölsäure	≥ 90%	Fisher Chemicals
Paraformaldehyd		Merck
Perylene		Sigma Aldrich
Pferdeserum		Merck
Polystyrol	MW ≈ 28,000	Sigma Aldrich
Saccharose		Thermo Fisher
Salpetersäure	65% v/v	Fisher Chemicals
Schwefelsäure	96% v/v	Fisher Chemicals
Sojalecithin		Sigma Aldrich
Tetrahydrofuran (THF)	≥ 99,8%	Fisher Chemicals
Thulium(III)-chloridhexahydrat	≥ 99,99%	Sigma Aldrich
Ytterbium(III)-chloridhexahydrat	≥ 99,9%	Treibacher Industry AG
Yttrium(III)-chloridhexahydrat	≥ 99,9%	Treibacher Industry AG
SuperBlock [®]		Thermo Fisher
Triton X-100		Sigma Aldrich

**Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer*

Appendix

Aminoplasma 10%	50 mL
Ampicillin	0,150 g
CaCl ₂ x H ₂ O	0,91 g (1,24 mM)
Flucoxacillin	0,15 g
Glukosemonohydrat	7,5 g (75,5 mM)
Harnstoff	1,802 g (6 mM)
KCl	1,65 g (4,4 mM)
Kaliumlaktat	1,175 g (2,1 mM)
Kaliummalat	0,78 g (0,88 mM)
Kaliumpyruvat	0,165 g (0,3 mM)
Kreatinin	0,075 g (0,13 mM)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (0,2 M)	1 g (0,98 mM)
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (0.1 M)	0,588 g (0,83 mM)
Natrium-2-oxoglutarat	1,1305 g (1 mM)
NaCl	31,5 g (108 mM)
Natriumglutamat x H ₂ O	0,292 g (0,35 mM)
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (0.1 M)	0,41 g (0,68 mM)
NaHCO ₃	11.55 g (27.5 mM)
→ ad 5 L mit MilliQ-Wasser	
→ pH-Einstellung auf 7,7 (mit NaOH)	

3. Verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Produkt-Nr.	Hersteller
------------	------	------------	-------------	------------

CD20	Ratte	1:100	ab271288	abcam
CD3	Kaninchen	1:150	ab135372	abcam
CD31	Ziege	1:100	AF3628	R&D Systems
Collagen III	Kaninchen	1:1000	R1040	Acris
F4/80	Ratte	1:100	ab6640	abcam
Phalloidin- iFluor 555	-	1:1000	ab176756	abcam
Phalloidin- iFluor 647	-	1:1000	ab176759	abcam
PDGFR-beta	Kaninchen	1:100	ab32570	abcam
Albumin	Ziege	1:200	ab19194	abcam
Cubilin	Schaf	1:50	AF3700	R&D Systems
Fibronectin	Kaninchen	1:200	Ab2413	abcam

4. Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Drehtrommel	Easy Drum	Linari Nanotech
ICP-OES	SPECTROBLUE FMX36	SPECTRO
Infrarotspektrometer	Cary 630 FTIR	Agilent
Konfokalmikroskop	LSM710	Zeiss
Metallsieb	Steel Basket-Strainer 20 µm	pluriSelect
Microplatten-Reader	BioTek	Agilent
Planetenkugelmühle	PM100	Retsch
Rasterelektronenmikroskop (SEM)	LEO 1530	Zeiss
Spektrofluorometer	AMINCO Bowman Series 2 Spectrofluorometer (AB2)	Thermo Spectronics (jetzt Thermo Fisher Scientific)
Ultraturrax	T18 basic	IKA
ZetaSizer	ZetaSizer Nano ZS	Malvern Panalytical

Transmissionselektronen- mikroskop (TEM)	120 kV Philips CM12	FEI GmbH
---	---------------------	----------

5. Verwendete Software

- BioRender
- Corel Draw
- GraphPad Prism
- Inkscape
- ZEN black
- ZEN lite

6. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Landrigan, P. J. *et al.* The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health. *Annals of global health* **89**, 23 (2023).
2. Balabantaray, S. R., Singh, P. K., Pandey, A. K., Chaturvedi, B. K. & Sharma, A. K. Forecasting global plastic production and microplastic emission using advanced optimised discrete grey model. *Environmental science and pollution research international* **30**, 123039–123054 (2023).
3. Zhang, G. *et al.* Identification of a PET hydrolytic enzyme from the human gut microbiome unveils potential plastic biodegradation in human digestive tract. *International journal of biological macromolecules* **283**, 137732 (2024).
4. Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* **3**, e1700782 (2017).
5. Chandra, S. & Walsh, K. B. Microplastics in water: Occurrence, fate and removal. *Journal of contaminant hydrology* **264**, 104360 (2024).
6. Ivleva, N. P., Wiesheu, A. C. & Niessner, R. Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **56**, 1720–1739 (2017).
7. Prüst, M., Meijer, J. & Westerink, R. H. S. The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Particle and fibre toxicology* **17**, 24 (2020).
8. Cai, H., Chen, M., Du, F., Matthews, S. & Shi, H. Separation and enrichment of nanoplastics in environmental water samples via ultracentrifugation. *Water research* **203**, 117509 (2021).
9. Hartmann, N. B. *et al.* Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental science & technology* **53**, 1039–1047 (2019).
10. ter Halle, A. *et al.* Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environmental science & technology* **51**, 13689–13697 (2017).
11. Valsesia, A. *et al.* Detection, counting and characterization of nanoplastics in marine bioindicators: a proof of principle study. *Micropl.&Nanopl.* **1** (2021).
12. Rodrigues, A. C. B. *et al.* Scientific Evidence about the Risks of Micro and Nanoplastics (MNPLs) to Human Health and Their Exposure Routes through the Environment. *Toxics* **10** (2022).

13. Alimi, O. S., Farner Budarz, J., Hernandez, L. M. & Tufenkji, N. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environmental science & technology* **52**, 1704–1724 (2018).
14. Shang, Q. *et al.* Exposure to polystyrene microplastics during lactational period alters immune status in both male mice and their offspring. *The Science of the total environment* **951**, 175371 (2024).
15. Boccia, P., Mondellini, S., Mauro, S., Zanellato, M., Parolini, M. & Sturchio, E. Potential Effects of Environmental and Occupational Exposure to Microplastics: An Overview of Air Contamination. *Toxics* **12** (2024).
16. Eriksen, M. *et al.* A growing plastic smog, now estimated to be over 170 trillion plastic particles afloat in the world's oceans-Urgent solutions required. *PloS one* **18**, e0281596 (2023).
17. Kumar, D. *et al.* Micro and nanoplastics pollution: Sources, distribution, uptake in plants, toxicological effects, and innovative remediation strategies for environmental sustainability. *Plant physiology and biochemistry : PPB* **213**, 108795 (2024).
18. Lee, J.-Y. *et al.* A comprehensive review of urban microplastic pollution sources, environment and human health impacts, and regulatory efforts. *The Science of the total environment* **946**, 174297 (2024).
19. Li, W. *et al.* Microplastics in aquatic environments: detection, abundance, characteristics, and toxicological studies. *Environmental monitoring and assessment* **197**, 150 (2025).
20. Lusher, A. L., Tirelli, V., O'Connor, I. & Officer, R. Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Scientific reports* **5**, 14947 (2015).
21. Maurizi, L., Simon-Sánchez, L., Vianello, A., Nielsen, A. H. & Vollertsen, J. Every breath you take: High concentration of breathable microplastics in indoor environments. *Chemosphere* **361**, 142553 (2024).
22. Huang, Z. *et al.* Quantification of microplastics released from plastic food containers during rinsing and migration by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Food chemistry* **472**, 142934 (2025).
23. Kefer, S., Miesbauer, O. & Langowski, H.-C. Environmental Microplastic Particles vs. Engineered Plastic Microparticles-A Comparative Review. *Polymers* **13**, 2881 (2021) <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/17/2881>.

24. Koelmans, A. A., Mohamed Nor, N. H., Hermesen, E., Kooi, M., Mintenig, S. M. & France, J. de. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water research* **155**, 410–422 (2019).
25. Rozman, U. & Kalčíková, G. Seeking for a perfect (non-spherical) microplastic particle - The most comprehensive review on microplastic laboratory research. *J. Hazard. Mater* **424**, 127529 (2022).
26. Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E. & Purnell, P. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of hazardous materials* **344**, 179–199 (2018).
27. McDougall, L., Thomson, L., Brand, S., Wagstaff, A., Lawton, L. A. & Petrie, B. Adsorption of a diverse range of pharmaceuticals to polyethylene microplastics in wastewater and their desorption in environmental matrices. *The Science of the total environment* **808**, 152071 (2022).
28. Liu, Q. *et al.* Adsorption mechanism of trace heavy metals on microplastics and simulating their effect on microalgae in river. *Environmental Research* **214**, 113777 (2022).
29. Tenea, A.-G. *et al.* Exploring adsorption dynamics of heavy metals onto varied commercial microplastic substrates: Isothermal models and kinetics analysis. *Heliyon* **10**, e35364 (2024).
30. Heo, S. J., Moon, N. & Kim, J. H. A systematic review and quality assessment of estimated daily intake of microplastics through food. *Reviews on environmental health* (2024).
31. Menichetti, A., Mordini, D. & Montalti, M. Penetration of Microplastics and Nanoparticles Through Skin: Effects of Size, Shape, and Surface Chemistry. *Journal of xenobiotics* **15** (2024).
32. Pomata, D. *et al.* Plastic breath: Quantification of microplastics and polymer additives in airborne particles. *The Science of the total environment* **932**, 173031 (2024).
33. Ruggieri, F. *et al.* From food-to-human microplastics and nanoplastics exposure and health effects: A review on food, animal and human monitoring data. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **196**, 115209 (2024).

34. Esmeralda, V. G., Patterson, J. & Shelciya, S. Preliminary study on the ejection of microplastics from different types of face masks. *Journal of occupational and environmental hygiene*, 1–12 (2025).
35. Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L., Dower, J. F., Juanes, F. & Dudas, S. E. Human Consumption of Microplastics. *Environmental science & technology* **53**, 7068–7074 (2019).
36. Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S. & Palanisami, T. Estimation of the mass of microplastics ingested - A pivotal first step towards human health risk assessment. *Journal of hazardous materials* **404**, 124004 (2021).
37. Cui, T. *et al.* Is intravenous infusion an unrecognized route for internal microplastic human exposure? A general assessment. *Journal of hazardous materials* **480**, 135769 (2024).
38. Liu, Z., Wang, D., Liu, Z., Xu, C., Zhang, Y. & Liu, P. Microplastic injection? Identification and quantification of plastic particles in medical injections. *The Science of the total environment* **954**, 176468 (2024).
39. Wang, J., Xie, L.-G., Wu, X.-F., Zhao, Z.-G., Yang, H.-Y. & Sun, H.-M. Identification and quantification of micro-nano-plastics in polypropylene-bottled injections. *Heliyon* **10**, e35101 (2024).
40. Dewika, M., Kantha, N., Markandan, K., Nagaratnam, S., Irfan, N. A. & Khalid, M. Microplastics release from coronary catheters: Insights from catheter analysis. *Chemosphere* **366**, 143428 (2024).
41. Liu, S. *et al.* Percutaneous coronary intervention leads to microplastics entering the blood: Interventional devices are a major source. *Journal of hazardous materials* **476**, 135054 (2024).
42. Roslan, N. S. *et al.* Detection of microplastics in human tissues and organs: A scoping review. *J. Glob. Health* **14**, 4179 (2024).
43. Vdovchenko, A. & Resmini, M. Mapping Microplastics in Humans: Analysis of Polymer Types, and Shapes in Food and Drinking Water-A Systematic Review. *International journal of molecular sciences* **25** (2024).
44. Schwabl, P. *et al.* Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case Series. *Annals of internal medicine* **171**, 453–457 (2019).

45. Zhu, L. *et al.* Unveiling Small-Sized Plastic Particles Hidden behind Large-Sized Ones in Human Excretion and Their Potential Sources. *Environmental science & technology* **58**, 11901–11911 (2024).
46. Zhu, M. *et al.* Microplastic Particles Detected in Fetal Cord Blood, Placenta, and Meconium: A Pilot Study of Nine Mother-Infant Pairs in South China. *Toxics* **12** (2024).
47. Zhu, L., Zhu, J., Zuo, R., Xu, Q., Qian, Y. & An, L. Identification of microplastics in human placenta using laser direct infrared spectroscopy. *The Science of the total environment* **856**, 159060 (2023).
48. Ragusa, A. *et al.* Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. *Polymers* **14** (2022).
49. Hu, C. J. *et al.* Microplastic presence in dog and human testis and its potential association with sperm count and weights of testis and epididymis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **200**, 235–240 (2024).
50. Inam, Ö. Impact of microplastics on female reproductive health: insights from animal and human experimental studies: a systematic review. *Archives of gynecology and obstetrics* (2025).
51. Amato-Lourenço, L. F., Carvalho-Oliveira, R., Júnior, G. R., Dos Santos Galvão, L., Ando, R. A. & Mauad, T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of hazardous materials* **416**, 126124 (2021).
52. Jenner, L. C., Rotchell, J. M., Bennett, R. T., Cowen, M., Tentzeris, V. & Sadofsky, L. R. Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. *The Science of the total environment* **831**, 154907 (2022).
53. Chen, Q. *et al.* An emerging role of microplastics in the etiology of lung ground glass nodules. *Environ Sci Eur* **34** (2022).
54. Momeni, M. K., Taghipour, H., Ghayebzadeh, M., Mohammadi, M. & Keikhaee, R. Isolation and characterization of microplastics from the human respiratory system: Sputum, broncho-alveolar lavage fluid, and pleural fluid simultaneously. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **365**, 125389 (2025).
55. Horvatits, T. *et al.* Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. *EBioMedicine* **82**, 104147 (2022).
56. Massardo, S. *et al.* MicroRaman spectroscopy detects the presence of microplastics in human urine and kidney tissue. *Environment international* **184**, 108444 (2024).

57. Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J. & Lamoree, M. H. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environ. Int.* **163**, 107199 (2022).
58. Yang, Y. *et al.* Detection of Various Microplastics in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *Environmental science & technology* **57**, 10911–10918 (2023).
59. Di Wu *et al.* Pigment microparticles and microplastics found in human thrombi based on Raman spectral evidence. *Journal of advanced research* **49**, 141–150 (2023).
60. Demirelli, E. *et al.* The first reported values of microplastics in prostate. *BMC urology* **24**, 106 (2024).
61. Amato-Lourenço, L. F. *et al.* Microplastics in the Olfactory Bulb of the Human Brain. *JAMA network open* **7**, e2440018 (2024).
62. Guo, X. *et al.* Discovery and analysis of microplastics in human bone marrow. *Journal of hazardous materials* **477**, 135266 (2024).
63. Lu, S. *et al.* New insights: Discovery of microplastics in human bone and skeletal muscle. *TIME* **2**, 100100 (2024).
64. Botterell, Z. L. R. *et al.* Bioavailability of Microplastics to Marine Zooplankton: Effect of Shape and Infochemicals. *Environmental science & technology* **54**, 12024–12033 (2020).
65. Frydkjær, C. K., Iversen, N. & Roslev, P. Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **99**, 655–661 (2017).
66. Choi, J. S., Jung, Y.-J., Hong, N.-H., Hong, S. H. & Park, J.-W. Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Marine Pollution Bulletin* **129**, 231–240 (2018).
67. Jabeen, K. *et al.* Effects of virgin microplastics on goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere* **213**, 323–332 (2018).
68. Qiao, R. *et al.* Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere* **236**, 124334 (2019).
69. Dong, X., Liu, X., Hou, Q. & Wang, Z. From natural environment to animal tissues: A review of microplastics(nanoplastics) translocation and hazards studies. *The Science of the total environment* **855**, 158686 (2023).

70. Stock, V. *et al.* Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo. *Arch. Toxicol.* **93**, 1817–1833 (2019).
71. Esch, E. von der *et al.* Simple Generation of Suspensible Secondary Microplastic Reference Particles via Ultrasound Treatment. *Front. Chem.* **8**, 169 (2020).
72. Sarkar, A. K., Rubin, A. E. & Zucker, I. Engineered Polystyrene-Based Microplastics of High Environmental Relevance. *Environ. Sci. Technol.* **55**, 10491–10501 (2021).
73. Choi, D., Bang, J., Kim, T., Oh, Y., Hwang, Y. & Hong, J. In vitro chemical and physical toxicities of polystyrene microfragments in human-derived cells. *J. Hazard. Mater.* **400**, 123308 (2020)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389420312978>.
74. Eitzen, L., Paul, S., Braun, U., Altmann, K., Jekel, M. & Ruhl, A. S. The challenge in preparing particle suspensions for aquatic microplastic research. *Environmental Research* **168**, 490–495 (2019).
75. Hrovat, B. *et al.* Preparation of synthetic micro- and nano plastics for method validation studies. *Sci. Total Environ.* **925**, 171821 (2024)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969724019648>.
76. Schmidt, J., Plata, M., Tröger, S. & Peukert, W. Production of polymer particles below 5 µm by wet grinding. *Powder Technol.* **228**, 84–90 (2012)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591012003063>.
77. Cole, M. A novel method for preparing microplastic fibers. *Sci. Rep.* **6**, 34519 (2016).
78. Rozman, U. *et al.* An extensive characterization of various environmentally relevant microplastics - Material properties, leaching and ecotoxicity testing. *The Science of the total environment* **773**, 145576 (2021).
79. Ho, D., Liu, S., Wei, H. & Karthikeyan, K. G. The glowing potential of Nile red for microplastics Identification: Science and mechanism of fluorescence staining. *Microchem. J.* **197**, 109708 (2024)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X23013279>.
80. Villacorta, A. *et al.* Fluorescent labeling of micro/nanoplastics for biological applications with a focus on "true-to-life" tracking. *J. Hazard. Mater.* **476**, 135134 (2024) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389424017138>.
81. Arenas-Vivo, A., Beltrán, F. R., Alcázar, V., La Orden, M. U. de & Martínez Urreaga, J. Fluorescence labeling of high density polyethylene for identification and separation of selected containers in plastics waste streams. Comparison of thermal

- and photochemical stability of different fluorescent tracers. *Mater. Today Commun.* **12**, 125–132 (2017).
82. Bertelà, F. *et al.* Dye-Doped Polymeric Microplastics: Light Tools for Bioimaging in Test Organisms. *Polymers* **15** (2023).
 83. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy* (Springer, New York, NY, 2006).
 84. Demchenko, A. P. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods Appl. Fluoresc.* **8**, 22001 (2020) <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2050-6120/ab7365/meta>.
 85. Ehlert, O., Thomann, R., Darbandi, M. & Nann, T. A four-color colloidal multiplexing nanoparticle system. *ACS nano* **2**, 120–124 (2008).
 86. Bettinelli, M., Carlos, L. & Liu, X. Lanthanide-doped upconversion nanoparticles. *Physics Today* **68**, 38–44 (2015).
 87. Mader, H. S., Kele, P., Saleh, S. M. & Wolfbeis, O. S. Upconverting luminescent nanoparticles for use in bioconjugation and bioimaging. *Current opinion in chemical biology* **14**, 582–596 (2010).
 88. Li, F. *et al.* Size-dependent lanthanide energy transfer amplifies upconversion luminescence quantum yields. *Nat. Photon.* **18**, 440–449 (2024) <https://www.nature.com/articles/s41566-024-01393-3>.
 89. Douplik, A., Saiko, G., Schelkanova, I. & Tuchin, V. V. The response of tissue to laser light, 47–109.
 90. Prasad, P. N. *Introduction to biophotonics* (Wiley-Interscience, Hoboken NJ, 2003).
 91. Wilson, B. C. & Jacques, S. L. Optical reflectance and transmittance of tissues: principles and applications. *IEEE J. Quantum Electron.* **26**, 2186–2199 (1990).
 92. Zhang, P., Steelant, W., Kumar, M. & Scholfield, M. Versatile Photosensitizers for Photodynamic Therapy at Infrared Excitation. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 4526–4527 (2007).
 93. DaCosta, M. V., Doughan, S., Han, Y. & Krull, U. J. Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: a review. *Analytica chimica acta* **832**, 1–33 (2014).

94. Bulska, E. & Wagner, B. Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **374** (2016).
95. Yakovenko, N. *et al.* Top-down synthesis of luminescent microplastics and nanoplastics by incorporation of upconverting nanoparticles for environmental assessment. *Environ. Sci.: Nano* **9**, 2453–2463 (2022).
96. Remigante, A. *et al.* Internalization of nano- and micro-plastics in human erythrocytes leads to oxidative stress and estrogen receptor-mediated cellular responses. *Free radical biology & medicine* **223**, 1–17 (2024).
97. Siwach, S. *et al.* Unveiling the ecotoxicological impact of microplastics on organisms - the persistent organic pollutant (POP): A comprehensive review. *Journal of contaminant hydrology* **266**, 104397 (2024).
98. Weber, A. *et al.* Nanoplastics affect the inflammatory cytokine release by primary human monocytes and dendritic cells. *Environment international* **163**, 107173 (2022).
99. Shang, X. *et al.* Microplastic (1 and 5 μm) exposure disturbs lifespan and intestine function in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Science of the total environment* **705**, 135837 (2020).
100. Hasan, A. K. M. M., Hamed, M., Hasan, J., Martyniuk, C. J., Niyogi, S. & Chivers, D. P. A review of the neurobehavioural, physiological, and reproductive toxicity of microplastics in fishes. *Ecotoxicology and environmental safety* **282**, 116712 (2024).
101. Yang, H., Ju, J., Wang, Y., Zhu, Z., Lu, W. & Zhang, Y. Micro- and nano-plastics induce kidney damage and suppression of innate immune function in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *The Science of the total environment* **931**, 172952 (2024).
102. Yong, C. Q. Y., Valiyaveetil, S. & Tang, B. L. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. *International journal of environmental research and public health* **17** (2020).
103. Du, B. *et al.* Analysis of Biodistribution and in vivo Toxicity of Varying Sized Polystyrene Micro and Nanoplastics in Mice. *International journal of nanomedicine* **19**, 7617–7630 (2024).
104. Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z. & Jin, Y. Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *The Science of the total environment* **631-632**, 449–458 (2018).

105. Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B. & Ren, H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci. Rep.* **7**, 46687 (2017) <https://www.nature.com/articles/srep46687>.
106. Jin, Y., Lu, L., Tu, W., Luo, T. & Fu, Z. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *The Science of the total environment* **649**, 308–317 (2019).
107. Ebrahim, M. M., El-Dakdoky, M. H., El-Shafiey, S. H. & Amer, A. S. Oral exposure to polystyrene nanoplastics altered the hypothalamic-pituitary-testicular axis role in hormonal regulation, inducing reproductive toxicity in albino rats. *Birth defects research* **116**, e2368 (2024).
108. Kim, N.-H., Choo, H.-I. & Lee, Y.-A. Effect of nanoplastic intake on the dopamine system during the development of male mice. *Neuroscience* **555**, 11–22 (2024).
109. Huang, H., Hou, J., Li, M., Wei, F., Liao, Y. & Xi, B. Microplastics in the bloodstream can induce cerebral thrombosis by causing cell obstruction and lead to neurobehavioral abnormalities. *Science advances* **11**, eadr8243 (2025).
110. Huang, H. *et al.* Micro/nano plastics in the urinary system: Pathways, mechanisms, and health risks. *Environment international* **193**, 109109 (2024).
111. Xiong, Z., Kong, Q., Hua, J., Chen, Q. & Wang, D. Cardiotoxicity of polystyrene nanoplastics and associated mechanism of myocardial cell injury in mice. *Ecotoxicology and environmental safety* **290**, 117712 (2025).
112. Koch, H. P. & Ritschel, W. A. *Synopsis der Biopharmazie und Pharmakokinetik / Koch, Ritschel* (Ecomed, Landsberg, 1986).
113. Fan, J. & Lannoy, I. A. M. de. Pharmacokinetics. *Biochemical pharmacology* **87**, 93–120 (2014).
114. Geisslinger, G., Menzel, S., Gudermann, T., Hinz, B., Ruth, P. & Mutschler, E. *Mutschler Arzneimittelwirkungen Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie Geisslinger/Menzel/Gudermann/Hinz/Ruth ; begründet von Ernst Mutschler, Mainz ; bearbeitet von Gerd Geisslinger, Frankfurt/M., Sabine Menzel, Bad Soden, Thomas Gudermann, München, Burkhard Hinz, Rostock, Peter Ruth, Tübingen* (WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2020).
115. Pfeifer, S., Pflugel, P., Borchert, H.-H., Langner, A. & Mehnert, W. *Biopharmazie* (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, , 2018).

116. Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. *Prometheus - Lernatlas der Anatomie : innere Organe / Michael Schünke, Erik Schulte, Udo Schumacher ; Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker* (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2022).
117. Olsson, R. & Carlsson, P.-O. The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **38**, 492–497 (2006).
118. Ryan, U. S., Ryan, J. W., Smith, D. S. & Winkler, H. Fenestrated endothelium of the adrenal gland: freeze-fracture studies. *Tissue & cell* **7**, 181–190 (1975).
119. Satchell, S. C. & Braet, F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *American journal of physiology. Renal physiology* **296**, F947-56 (2009).
120. van Helden, D. F. Insights into permeability control of the fenestrated endothelium of the jejunal microvasculature. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **474**, 485–486 (2022).
121. Koch, P.-S., Lee, K. H., Goerdts, S. & Augustin, H. G. Angiodiversity and organotypic functions of sinusoidal endothelial cells. *Angiogenesis* **24**, 289–310 (2021).
122. Yu, T., Hubbard, D., Ray, A. & Ghandehari, H. In vivo biodistribution and pharmacokinetics of silica nanoparticles as a function of geometry, porosity and surface characteristics. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **163**, 46–54 (2012).
123. Rowland, M. & Tozer, T. N. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications / Malcolm Rowland, Thomas N. Tozer* (Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 2011).
124. Pape, H.-C., Brenner, B., Klinke, R., Kurtz, A. & Silbernagl, S. *Physiologie hrsg. von Hans-Christian Pape ... Begr. von Rainer Klinke und Stefan Silbernagl. Mit Beitr. von Bernhard Brenner ... Ill. von Rüdiger Gay und Astrid Rothenburger* (Thieme, Stuttgart, 2014).
125. Mao, S. A., Glorioso, J. M. & Nyberg, S. L. Liver regeneration. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **163**, 352–362 (2014).
126. Hopkins, C., Li, J., Rae, F. & Little, M. H. Stem cell options for kidney disease. *The Journal of pathology* **217**, 265–281 (2009).
127. Benigni, A., Morigi, M. & Remuzzi, G. Kidney regeneration. *Lancet (London, England)* **375**, 1310–1317 (2010).

128. Hoseini, M., Stead, J. & Bond, T. Ranking the accelerated weathering of plastic polymers. *Environmental science. Processes & impacts* **25**, 2081–2091 (2023).
129. Yu, M. *et al.* Laser scanning up-conversion luminescence microscopy for imaging cells labeled with rare-earth nanophosphors. *Analytical chemistry* **81**, 930–935 (2009).
130. Kumar, A. & Dixit, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. In *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids* 43–58 (Elsevier, 2017).
131. Haley, T. J. Pharmacology and toxicology of the rare earth elements. *Journal of pharmaceutical sciences* **54**, 663–670 (1965).
132. Rabe, M. & Schaefer, F. Non-Transgenic Mouse Models of Kidney Disease. *Nephron* **133**, 53–61 (2016).
133. Schweda, F., Wagner, C., Krämer, B. K., Schnermann, J. & Kurtz, A. Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**, F770-7 (2003).
134. Berlman, I. B. *Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules. 2.ed* (Academic Press, New York, N., 1971).
135. Taniguchi, M. & Lindsey, J. S. Database of Absorption and Fluorescence Spectra of 300 Common Compounds for use in PhotochemCAD. *Photochem. Photobiol.* **94**, 290–327 (2018) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/php.12860>.
136. Melhuish, W. H. QUANTUM EFFICIENCIES OF FLUORESCENCE OF ORGANIC SUBSTANCES: EFFECT OF SOLVENT AND CONCENTRATION OF THE FLUORESCENT SOLUTE 1. *J. Phys. Chem.* **65**, 229–235 (1961).
137. Bastos, V. *et al.* Stability, dissolution, and cytotoxicity of NaYF₄-upconversion nanoparticles with different coatings. *Scientific reports* **12**, 3770 (2022).
138. Guth, S. *et al.* Toxicity of fluoride: critical evaluation of evidence for human developmental neurotoxicity in epidemiological studies, animal experiments and in vitro analyses. *Arch. Toxicol.* **94**, 1375–1415 (2020).
139. Hirano, S. & Suzuki, K. T. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environmental health perspectives* **104 Suppl 1**, 85–95 (1996).
140. Chen, J., Wang, W., Liu, H., Xu, X. & Xia, J. A review on the occurrence, distribution, characteristics, and analysis methods of microplastic pollution in ecosystem s. *Environ. Pollut. Bioavailab.* **33**, 227–246 (2021).

141. Tirkey, A. & Upadhyay, L. S. B. Microplastics: An overview on separation, identification and characterization of microplastics. *Marine Pollution Bulletin* **170**, 112604 (2021).
142. Smith, B. C. The Infrared Spectra of Polymers III: Hydrocarbon Polymers. *Spectroscopy*, 22–25 (2021).
143. Smith, B. C. Infrared Spectroscopy of Polymers, VIII: Polyesters and the Rule of Three. *Spectroscopy*, 25–28 (2022).
144. Gekle, M. Renal Proximal Tubular Albumin Reabsorption: Daily Prevention of Albuminuria. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **13**, 5–11 (1998).
145. Buchner, M. *et al.* Embedded nanolamps in electrospun nanofibers enabling online monitoring and ratiometric measurements. *J. Mater. Chem. C* **5**, 9712–9720 (2017).
146. Jethva, P., Momin, M., Khan, T. & Omri, A. Lanthanide-Doped Upconversion Luminescent Nanoparticles-Evolving Role in Bioimaging, Biosensing, and Drug Delivery. *Materials (Basel, Switzerland)* **15** (2022).
147. Wang, F. & Liu, X. Upconversion multicolor fine-tuning: visible to near-infrared emission from lanthanide-doped NaYF₄ nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5642–5643 (2008).
148. Liu, S., An, Z. & Zhou, B. Optical multiplexing of upconversion in nanoparticles towards emerging applications. *Chemical Engineering Journal* **452**, 139649 (2023).
149. He, W. *et al.* Recent advances on microplastic aging: Identification, mechanism, influence factors, and additives release. *The Science of the total environment* **889**, 164035 (2023).
150. Sait, S. T. L. *et al.* Microplastic fibres from synthetic textiles: Environmental degradation and additive chemical content. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **268**, 115745 (2021).
151. Oliveira, H. *et al.* Critical Considerations on the Clinical Translation of Upconversion Nanoparticles (UCNPs): Recommendations from the European Upconversion Network (COST Action CM1403). *Adv. Healthc. Mater.* **8**, e1801233 (2019).

152. Brown, J. S., Gordon, T., Price, O. & Asgharian, B. Thoracic and respirable particle definitions for human health risk assessment. *Particle and fibre toxicology* **10**, 12 (2013).
153. Prata, J. C. Microplastics and human health: Integrating pharmacokinetics. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **53**, 1489–1511 (2023).
154. Rosal, R. Morphological description of microplastic particles for environmental fate studies. *Marine Pollution Bulletin* **171**, 112716 (2021).
155. Corami, F., Rosso, B., Bravo, B., Gambaro, A. & Barbante, C. A novel method for purification, quantitative analysis and characterization of microplastic fibers using Micro-FTIR. *Chemosphere* **238**, 124564 (2020).
156. Fahr, A. & Voigt, R. *Voigt, Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf Alfred Fahr ; begründet von Rudolf Voigt, Berlin ; fortgeführt von Alfred Fahr, Jena ; unter Mitarbeit von Heike Bunjes, Braunschweig [und 6 andere]* (Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2021).
157. Padmanabhan, P., Grosse, J., Asad, A. B. M. A., Radda, G. K. & Golay, X. Gastrointestinal transit measurements in mice with ^{99m}Tc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. *EJNMMI research* **3**, 60 (2013).
158. Abe, K., Takano, H. & Ito, T. Microvasculature of the mouse epididymis, with special reference to fenestrated capillaries localized in the initial segment. *The Anatomical record* **209**, 209–218 (1984).
159. Ergün, S., Davidoff, M. & Holstein, A. F. Capillaries in the lamina propria of human seminiferous tubules are partly fenestrated. *Cell and tissue research* **286**, 93–102 (1996).
160. Muratore, M., Santos, C. & Rorsman, P. The vascular architecture of the pancreatic islets: A homage to August Krogh. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* **252**, 110846 (2021).
161. Lin, Z. *et al.* Size-dependent deleterious effects of nano- and microplastics on sperm motility. *Toxicology* **506**, 153834 (2024).
162. Lin, Z. *et al.* Microplastics from face mask impairs sperm motility. *Marine Pollution Bulletin* **203**, 116422 (2024).
163. Zhao, M. *et al.* Disturbance of mitochondrial dynamics led to spermatogenesis disorder in mice exposed to polystyrene micro- and nanoplastics. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **362**, 124935 (2024).

164. Weiss, L. The Red Pulp of the Spleen: Structural Basis of Blood Flow. *Clinics in Haematology* **12**, 375–393 (1983).
165. Huang, H., Hou, J., Liao, Y., Wei, F. & Xing, B. Polyethylene microplastics impede the innate immune response by disrupting the extracellular matrix and signaling transduction. *iScience* **26**, 107390 (2023).
166. Hsiao, H.-Y., Nien, C.-Y., Shiu, R.-F., Chin, W.-C. & Yen, T.-H. Microplastic and nanoplastic exposure and risk of diabetes mellitus. *World journal of clinical cases* **13**, 98110 (2025).
167. Li, Z.-W. & Wang, L. The role of liver sinusoidal endothelial cells in liver remodeling after injury. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* **22**, 22–27 (2023).
168. McDonald, D. M. & Baluk, P. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer research* **62**, 5381–5385 (2002).
169. Ward, J. D., Hadfield, M. G., Becker, D. P. & Lovings, E. T. Endothelial fenestrations and other vascular alterations in primary melanoma of the central nervous system. *Cancer* **34**, 1982–1991 (1974).
170. Barua, S. & Mitragotri, S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects. *Nano Today* **9**, 223–243 (2014).
171. Holm Nielsen, S. *et al.* Serological Assessment of Activated Fibroblasts by alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA): A Noninvasive Biomarker of Activated Fibroblasts in Lung Disorders. *Translational oncology* **12**, 368–374 (2019).
172. McNally, A. K. & Anderson, J. M. Macrophage fusion and multinucleated giant cells of inflammation. *Advances in experimental medicine and biology* **713**, 97–111 (2011).
173. Prieditis, H. & Adamson, I. Y. Alveolar macrophage kinetics and multinucleated giant cell formation after lung injury. *Journal of leukocyte biology* **59**, 534–538 (1996).
174. Volkheimer, G. Passage of particles through the wall of the gastrointestinal tract. *Environmental health perspectives* **9**, 215–225 (1974).
175. Volkheimer, G. Persorption von Mikropartikeln. *Der Pathologe* **14**, 247–252 (1993).
176. Boes, K. M. & Durham, A. C. Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System 724-804.e2.

177. Radi, Z. A., Stewart, Z. S., Grzemski, F. A. & Bobrowski, W. F. Renal pathophysiologic role of cortical tubular inclusion bodies. *Toxicologic pathology* **41**, 32–37 (2013).
178. Tang, P. M.-K., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H.-Y. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nature reviews. Nephrology* **15**, 144–158 (2019).
179. Segerer, S. & Schlöndorff, D. B cells and tertiary lymphoid organs in renal inflammation. *Kidney international* **73**, 533–537 (2008).
180. Abbate, M., Zoja, C., Rottoli, D., Corna, D., Tomasoni, S. & Remuzzi, G. Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. *Kidney international* **61**, 2066–2077 (2002).
181. Huang, R., Fu, P. & Ma, L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines. *Signal transduction and targeted therapy* **8**, 129 (2023).
182. Remuzzi, G. Abnormal protein traffic through the glomerular barrier induces proximal tubular cell dysfunction and causes renal injury. *Current opinion in nephrology and hypertension* **4**, 339–342 (1995).
183. Sharma, S. & Smyth, B. From Proteinuria to Fibrosis: An Update on Pathophysiology and Treatment Options. *Kidney & blood pressure research* **46**, 411–420 (2021).
184. Passos, R. S. *et al.* Microplastics and nanoplastics in haemodialysis waters: Emerging threats to be in our radar. *Environmental toxicology and pharmacology* **102**, 104253 (2023).

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung zweier Nephrone im Nierenparenchym.....	13
Abbildung 2: Elektrosinning-Setup zur Herstellung von Nanofasern	18
Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Tierversuchs.....	30
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Albumin-ipN-Auswertung.....	39
Abbildung 5: Fluoreszenzmessungen von <i>knife coated</i> Polystyrolfolien	47
Abbildung 6: Fluoreszenzspektren von <i>knife coated</i> Polystyrolfolien bei verschiedenen Anregungswellenlängen.....	48
Abbildung 7: Photobleaching-Studie	49
Abbildung 8: Charakterisierung der UCNPs	50
Abbildung 9: Lumineszenz-Charakterisierung von UCNPs	51
Abbildung 10: Aussehen und Größenverteilung von Polystyrol-Nanofasern.....	52
Abbildung 11: Leaching-Studie zur Untersuchung der austretenden Label	53
Abbildung 12: Vergleich von Partikelformen und der resultierenden Größenverteilungen.....	55
Abbildung 13: Abbildung der Formen des produzierten PS-MPs	56
Abbildung 14: FTIR-Spektrum des selbst produzierten PS-Mikroplastiks.	57
Abbildung 15: Formen und Größen der finalen MP-Partikel	58
Abbildung 16: FTIR-Spektren der zugekauften Mikroplastik-Partikel.	60
Abbildung 17: Formen und Größenverteilung der zugekauften Mikroplastik-Partikel.....	62
Abbildung 18: Ausscheidung oral aufgenommenen Mikroplastiks über Urin und Fäzes.....	64
Abbildung 19: Prozentuale Belastung verschiedener Organe.....	65
Abbildung 20: Prozentuale Verteilung des detektierten Mikroplastiks.....	67
Abbildung 21: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten des Gehirns	68
Abbildung 22: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten des Herzens	69
Abbildung 23: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten der Lunge	71
Abbildung 24: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten der Leber	72
Abbildung 25: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Proben des Magens	73
Abbildung 26: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Anteilen des proximalen Dünndarms.....	74
Abbildung 27: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Proben des distalen Dünndarms.....	75

Abbildung 28: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten des Hoden	75
Abbildung 29: Mikroplastik-Funde (cyan) in histologisch aufgearbeiteten Schnitten der Quadripeds-Muskulatur.....	76
Abbildung 30: Histologisches Erscheinungsbild der Nieren der Kontrolltiere.....	78
Abbildung 31: Mikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten der Mäuse, denen sphärische PS-Partikel appliziert wurden.	79
Abbildung 32: Mikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten der Mäuse, denen irreguläre PS-Fragmente appliziert wurden.....	80
Abbildung 33: Co-Lokalisation von Mikroplastik-Fragmenten (intensiv cyan) mit Immunzellen	81
Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten der Mäuse, denen irreguläre PP-Fragmente appliziert wurden.....	82
Abbildung 35: Aufnahmen eines PET-Mikroplastik-Fragments in einer Gefäßabzweigung.....	83
Abbildung 36: Mikroskopische Aufnahmen von Nierenschnitten der Mäuse, denen irreguläre PET-Fragmente appliziert wurden.	84
Abbildung 37: Mikroskopische Abbildung von Mikroplastik-Fragmenten (cyan) aus Polystyrol in Blutgefäßen der perfundierten ipNs.....	86
Abbildung 38: Abbild der 3D-Rekonstruktion eines Blutgefäßes, das fragmentförmiges PS-Mikroplastik (cyan) enthält.....	87
Abbildung 39: Mikroskopische Abbildung von PS-Mikroplastik-Fragmenten (cyan) in Glomeruli der perfundierten ipNs.	88
Abbildung 40: Mikroplastik-Fragmente aus Polystyrol (cyan) im Glomerulus sowie im Übergang von Glomerulus zu proximalem Tubulus.....	89
Abbildung 41: Mikroskopische Abbildung von PS-Mikroplastik-Fragmenten (cyan) in Tubuli der perfundierten ipNs.	90
Abbildung 42: Violin-Plots der statistischen Einzelauswertungen der ipN-Versuche	92
Abbildung 43: Balkendiagramm der statistischen Gesamtauswertung der ipN-Versuche zur proximalen Albumin-Reabsorption.....	94

X. DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Hayo Castrop. Lieber Hayo, vielen Dank für die Möglichkeit in deiner Arbeitsgruppe zu promovieren, das Überlassen dieses spannenden Themas und dem damit einhergehenden Vertrauen in mich. Ich schätze mich glücklich, dass ich dieses neu begonnene Projekt eigenständig und nach meinen Vorstellungen entwickeln durfte, dass auch meine unkonventionelleren Ideen immer auf offene Ohren bei dir trafen und deine Kritik grundsätzlich konstruktiv ausfiel. Auch dass du mir jegliche Fort- und Weiterbildungen sowie große internationale Kongresse ermöglicht hast, ist nicht selbstverständlich und ich weiß es sehr zu schätzen.

Ich danke Frau Prof. Silke Härteis für die Erstellung des Zweitgutachtens und das Mentoring im Rahmen von RIGeL. Herrn Prof. Jens Schlossmann möchte ich dafür danken, dass er sich als Drittprüfer für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Frank Schweda. Lieber Frank, danke für deine fachlichen Anregungen hinsichtlich der ipN-Experimente und die gelungene Ablenkung vor meinem Vortrag in Wien. Darüber hinaus möchte ich auch Robert Götz aus der AG Schweda danken. Lieber Robert, danke für die fabelhafte Umsetzung der ipNs, auch wenn sie dich manchmal sicher einige Nerven gekostet haben.

Liebe Kolleg*innen aus dem ganzen Institut, danke, dass ihr mich so herzlich in eurer Mitte aufgenommen habt und mich immer mit Rat und Tat unterstützt habt. Ein besonderer Dank gilt diesbezüglich Dr. Katharina Broecker. Liebe Katha, danke dass ich auch mit den simpelsten Fragen immer wieder zu dir kommen konnte und jedes Mal hilfreiche Antworten bekommen habe.

Wie sich diese ganze Dissertation entwickelt hat, wäre ohne Kolleg*innen und Freund*innen aus anderen Instituten nicht denkbar gewesen. Ich möchte mich deshalb von Herzen bei allen bedanken, die ihr Wissen und ihre Zeit immer bedingungslos mit mir geteilt haben und deren Gedanken mich immer wieder auf neue Wege geführt haben.

Ein riesengroßes Danke gebührt Alissa Wieberneit und Sophia Baumann. Liebe Alissa, liebe Sophia, mit niemand anderem hätte unser Trio-Projekt mehr Drive, Neugierde und Potential gehabt. Die witzigen, aufschlussreichen und inspirierenden Meetings mit euch

Danksagung

haben mir auf fachlicher und persönlicher Ebene wirklich viel gegeben. Auf die Experimente dieser Arbeit bezogen danke ich Alissa für das Elektrosponning sämtlicher Nanofasern als Grundlage für das Mikroplastik (selten wurde ein Abzug so liebevoll mit Alufolie abgeklebt). Daneben auch für die Analysen zu den Charakteristika der fluoreszenten Label inklusive Photostabilität und Leaching, sowie den Ultraturrax-Versuchen und den Auswertungen zu den Zerkleinerungsmethoden. Sophia gilt ein weiterer Dank für die Synthese der UCNPs, deren Charakterisierung und des Leachings der UCNPs aus der PS-Matrix. Darüber hinaus für die Kremierung der Mäuseteile für den Distributionsversuch und das unermüdliche Messen am ICP-OES. Ihr beide habt viele Nerven für mich und mit mir gelassen und ich danke euch von Herzen dafür.

Daneben möchte ich Sarah Dietrich danken, die als Masterandin aus unserem Trio ein Quartett gemacht hat. Liebe Sarah, danke, dass du nicht nur unsere Produktion optimiert, sondern auch eigenständig auf PMMA ausgeweitet und neue Ultraturrax-Studien durchgeführt hast – es hätte uns mit einer Masterandin auf diesem Projekt nicht besser treffen können. Daneben möchte ich Christoph Bruckschlegel danken, der sich (auch maximal kurzfristig) Zeit genommen hat, um sämtliche SEM-Aufnahmen meines Mikroplastiks oder entstandener Sesamstangen anzufertigen.

Liebe Luisa, bald Dr. Schnobrich, ich bin dir unendlich dankbar, dass du alle Höhen und Tiefen dieser PhD-Zeit zusammen mit mir durchgestanden hast. Danke, dass ich mich absolut immer auf dich verlassen konnte und du mich, wenn nötig, sogar bis nachts um 3 Uhr bei meinen Experimenten unterstützt hast.

Fernab der Uni möchte ich mich bei meinem Team der Osteria Federico Secondo bedanken – danke für hunderte schöne Schichten mit euch während Studium und auch Promotion. Im Speziellen danke Anna, dass du mir die Donnerstagabende mit deinem Spice und deiner Freundschaft versüßt hast und danke Nguyen, dass wir so viel zusammen lachen konnten und du meinen zeitweisen Frust immer mit dem besten Essen und etlichen Töpfen Zabaione bekämpft hast.

An dieser Stelle möchte ich gerne auch allen anderen Freund*innen danken. Danke, dass ihr immer an mich glaubt, mir ermöglicht das zu tun, was mir wichtig ist, und jeden noch so kleinen Erfolg mit mir feiert.

Danksagung

Liebe Ella bzw. liebe Nanni, danke, dass du mir jetzt seit mehr als einem Jahr innerhalb und außerhalb der Uni immer zur Seite stehst, einer meiner größten Fans bist und Sommerrolle um Sommerrolle mit mir verdrückst. Allein für diese Freundschaft hat sich diese Promotion für mich gelohnt.

Lieber Bene, danke für zahlreiche Bauhaus-Ausflüge, dein Verständnis, deine endlose Unterstützung und die vielen festen Drücker, wenn es mal nicht so gut lief. Außerdem wäre ich ohne dich vermutlich auf dem Weg zum Dokortitel kläglich verhungert. Und danke, dass ich Setz-Ei sagen darf und du mich trotzdem liebst.

Lieber Lucas, dank dir kann ich, wenn nötig, kämpfen wie ein echter Grobian. Spaß. Danke, dass du immer an mich glaubst, für mich da bist und mich mit deinen Werten und deiner Integrität immer wieder inspirierst.

Liebe Mama, danke, dass du dir diese Dissertation schon vorab zu Gemüte geführt hast, um peinliche Patzer zu verhindern, und mir auch in allen anderen Lebenslagen immer eine große Hilde bist.

Lieber Papa, danke für all die Umzüge, die du auf diesem Weg tapfer mit mir bestritten hast, damit ich machen kann, wonach mir der Sinn gerade steht und dass du dich für alles begeisterst, was auch mich begeistert.

Danke Mama und Papa für eure bedingungslose Liebe – ganz egal, ob ich mal einen Dokortitel trage oder doch für immer in der Osteria bleiben möchte. Ihr seid und bleibt meine ganz großen Vorbilder.