

**Toxikologische Auswirkung von
Nanopartikelaerosolen auf primäre 3D-Lungen-
Co-Kulturen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinischen Wissenschaften (Dr. rer. medic.)

für das Fachgebiet Umwelttoxikologie

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Diana Michaela Eckstein

Betreuerin: Prof. Heidi Foth

Gutachter:innen:

PD Dr. Marcus Krüger, Halle (Saale)

Prof. Dr. Robert Landsiedel, Ludwigshafen

Datum der Verteidigung: 15.06.2023

Referat

In der vorliegenden Arbeit wird die toxikologische Auswirkung von Bariumsulfat- und Titandioxid-Nanopartikeln auf eine 3D-Co-Kultur untersucht. Für die Co-Kultur kommen primäre periphere Lungenzellen aus Teilresektaten als Lungenepithelzellen und die Zelllinie EA.hy926 als Endothelzellen zur Anwendung. Die Nanopartikel-Aerosole werden aus einer wässrigen Suspension hergestellt. Mit Hilfe der Messgeräte *Scanning Mobility Particle Sizer* (SMPS) und *Optical Particle Sizer* (OPS) werden die Partikelgrößen im Aerosol detektiert. Die Vitalität der 3D-Co-Kulturen wird mit Hilfe des Resazurin-Assays bestimmt. Die Membranintegrität und damit der Austritt des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) wird mittels dem LDH-Assay ermittelt. Für die Bestimmung der möglicherweise gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies und damit der potenziellen Entstehung von oxidativem Stress wird der 2',7'-dichlorofluorescein-Assay (DCF-Assay) verwendet. Als weiterer Parameter für die Entstehung von oxidativem Stress wird der Glutathion-Gehalt (GSH-Gehalt) mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie gemessen. Um die inflammatorische Wirkung von Bariumsulfat und Titandioxid zu überprüfen, werden *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA) für die Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-8, Interferon- γ und *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) durchgeführt. Die Messungen des SMPS und OPS zeigen, dass sowohl das Bariumsulfat- als auch das Titandioxidaerosol im nanoskaligen Bereich liegen. In der 3D-Co-Kultur mit chronischer gespülter Titandioxid-Exposition ist eine maximale Abnahme der Vitalität bis auf 0 % bei der Kultur des Patienten 332 in der niedrigen Konzentration (0,1 g/l) zu erkennen. Ein Anstieg des LDH-Gehaltes auf 1,71-fache kann bei der Kultur des Patienten 338 nach der 24-stündigen Exposition mit Titandioxidaerosol in der niedrigen Konzentration (0,1 g/l) gezeigt werden. In keiner der Co-Kulturen konnte eine Bildung von ROS gezeigt werden. Bei der Bestimmung des GSH-Gehaltes konnten patientenabhängige Anstiege oder ein Absinken gemessen werden. Die Betrachtung der Zytokine ergibt, dass leichte Entzündungsreaktionen ausgelöst werden. Nach 24 Stunden steigen die Gehalte von IL-8 und INF- γ deutlicher an als nach 72 Stunden Exposition mit Bariumsulfat oder Titandioxid. In allen Experimenten ist festzustellen, dass die hohe Konzentration (0,9 g/l) bei Bariumsulfat einen wahrnehmbareren Einfluss auf die Co-Kulturen hat. Bei der Exposition mit Titandioxid sind die Auswirkungen klarer in der niedrigen Konzentration (0,1 g/l) zu erkennen.

Inhaltsverzeichnis

Referat	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Partikel und Fasern	1
1.2. Nanopartikel	1
1.2.1. Nanopartikel und die Lunge	2
1.2.2. Biologische Wirkung von Nanopartikeln und Nanotoxikologie	3
1.2.3. Bariumsulfat	3
1.2.4. Titandioxid	4
1.2.5. Lebenszyklus von Nanopartikeln in der Umwelt	6
1.3. 3D-Zellkulturmodell	6
1.3.1. Primäre Lungenzellkultur	7
1.3.2. Zellkulturträger MatriGrid®	8
1.4. Aerosolexposition	9
2. Zielstellung	11
3. Material und Methoden	12
3.1. Material	12
3.1.1. Chemikalien	12
3.1.2. Nanopartikel	14
3.1.3. Kulturmedien und Lösungen	14
3.1.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
3.1.5. Gebrauchsfertige Kits	16
3.1.6. Biologisches Material	16
3.2. Methoden	18
3.2.1. Zellkultur	18
3.2.2. Herstellung des Nanopartikel-Aerosols	20

3.2.3. Exposition der Co-Kulturen mit Aerosol	21
3.2.4. Messung der Partikelgrößen im Aerosol	22
3.2.5. Vitalitätstest.....	23
3.2.6. Laktatdehydrogenase-Test	23
3.2.7. DCF-Test (ROS-Test)	24
3.2.8. Glutathionbestimmung.....	25
3.2.9. Proteinbestimmung.....	25
3.2.10. Inflammatorische Zytokine	26
3.2.11. Statistik.....	26
4. Ergebnisse.....	27
4.1. Charakterisierung der Nanopartikelaerosole	27
4.2. Vitalität der 3D-Zellkultur.....	29
4.3. Membranintegrität der 3D-Zellkultur	34
4.4. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der 3D-Zellkultur.....	39
4.5. Glutathiongehalt der 3D-Zellkultur.....	41
4.6. Inflammatorische Zytokine in der 3D-Zellkultur	46
5. Diskussion	58
5.1. Allgemeine Nanotoxikologie und in-vitro-Modelle	58
5.2. Erzeugung nanoskaliger Aerosole.....	59
5.3. akute Wirkung von BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP auf die 3D-Co-Kultur	60
5.4. chronische Wirkung von BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP auf die 3D-Co-Kultur.....	64
5.5. Vergleich der akuten und chronischen Daten.....	66
5.6. Vergleichende <i>in-vivo</i> Daten zu Bariumsulfat- und Titandioxid-Nanopartikeln.....	67
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis.....	70
8. Thesen..	79
Selbstständigkeitserklärung.....	VIII
Erklärung über frühere Promotionsversuche	IX
Danksagung.....	X

Abkürzungsverzeichnis

A549	humane Lungentumorzelllinie
AECG	<i>Airway Epithelium Cell Growth Medium</i>
ALI	<i>air-liquid-interface</i> (Luft-Wasser-Grenzschicht)
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FKS	fetales Kälberserum
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion (Glutathionsulfid)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
IL	Interleukin
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
mBrB	Monobrombiman
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MLU	Martin-Luther-Universität
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NM	Nanomaterial
NP	Nanopartikel
NSCLC	<i>non-small-cell lung carcinoma</i> (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
OPS	<i>Optical Particle Sizer</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PLZ	periphere Lungenzellen
PM	<i>particulate matter</i> (Feinstaub)
PY	Packungsjahr (entspricht 20 Zigaretten/Tag ein Jahr lang)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SD	Standardabweichung
SMPS	<i>Scanning Mobility Particle Sizer</i>
TAS	teilaktives System

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Hersteller.	12
Tabelle 2: Charakteristika der beiden Nanomaterialien.	14
Tabelle 3: Verwendete Geräte bzw. Verbrauchsmaterialien und Hersteller.	14
Tabelle 4: Erfassung der Patientendaten des verwendeten Resektionsmaterials.	17
Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der relativen Vitalität der 3D-Co-Kulturen nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP-Aerosol ermittelt durch den Resazurin-Test.	30
Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der relativen Vitalität nach mehrfacher mit BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP-Aerosol ermittelt durch den Resazurin-Test.	32
Tabelle 7: Tabellarische Darstellung des relativen LDH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP-Aerosol ermittelt durch den Laktatdehydrogenase-Test.	34
Tabelle 8: Tabellarische Darstellung des relativen LDH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach mehrmaliger Exposition mit BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP-Aerosol ermittelt durch den Laktatdehydrogenase-Test.	37
Tabelle 9: Tabellarische Darstellung des relativen ROS-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach einstündiger Exposition mit BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP-Aerosol ermittelt durch den DCF-Test.	39
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des relativen GSH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP-Aerosol ermittelt durch Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender HPLC.	41
Tabelle 11: Tabellarische Darstellung des relativen GSH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach mehrmaliger Exposition mit BaSO ₄ - und TiO ₂ -NP-Aerosol ermittelt durch Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender HPLC.	44
Tabelle 12: Tabellarische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen nach 24- und 72-stündiger BaSO ₄ -NP-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.	46
Tabelle 13: Tabellarische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen nach 24- und 72-stündiger TiO ₂ -NP-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.	49
Tabelle 14: Tabellarische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen nach mehrmaliger BaSO ₄ -Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.	52

Tabelle 15: Tabellarische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen nach mehrmaliger TiO₂-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA..... 55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Depositionsmechanismen von inhaltierten Partikeln im Atmungstrakt	2
Abbildung 2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Bariumsulfat-Agglomerates.....	4
Abbildung 3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Titandioxid-Agglomerates.....	6
Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der primären Lungenzellen auf einem MatriGrid®	8
Abbildung 5: Darstellung der Blut-Luft-Schrank (rechts) und REM-Aufnahme des Blut-Luft-Schranken-Äquivalents, dem MatriGrid (links)	9
Abbildung 6: Entwurf des MALIES zur Exposition von 3D-Zellkulturen.....	10
Abbildung 7: Kultivierungsschema von primären Lungenzellen.....	19
Abbildung 8: Zeitliche Übersicht der Expositionsexperimente	20
Abbildung 9: Versuchsaufbau der Expositionsexperimente	21
Abbildung 10: Messprinzip des Scanning Mobility Particle Sizer	22
Abbildung 11: Messprinzip des Optical Particle Sizer	23
Abbildung 12: Größen-Anzahl-Verteilung des BaSO ₄ -Aerosols der akuten Versuche ermittelt mit Hilfe von SMPS und OPS.	27
Abbildung 13: Größen-Anzahl-Verteilung des TiO ₂ -Aerosols der akuten Versuche ermittelt mit Hilfe von SMPS und OPS.	28
Abbildung 14: Größen-Anzahl-Verteilung des BaSO ₄ -Aerosols der chronischen Versuche ermittelt mit Hilfe von SMPS und OPS.....	29
Abbildung 15: Größen-Anzahl-Verteilung des TiO ₂ -Aerosols der chronischen Versuche ermittelt mit Hilfe von SMPS und OPS.....	29
Abbildung 16: Grafische Darstellung der relativen Vitalität der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO ₄ - (A-C) und TiO ₂ -NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den Resazurin-Test.	31
Abbildung 17: Grafische Darstellung der relativen Vitalität der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger Exposition mit BaSO ₄ - (A-C) und TiO ₂ -NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den Resazurin-Test.....	33
Abbildung 18: Grafische Darstellung des relativen LDH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO ₄ - (A-C) und TiO ₂ -NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den Laktatdehydrogenase-Test.	36
Abbildung 19: Grafische Darstellung des relativen LDH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger Exposition mit BaSO ₄ - (A-C) und TiO ₂ -NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den Laktatdehydrogenase-Test.....	38

Abbildung 20: Grafische Darstellung des relativen ROS-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach einstündiger Exposition mit BaSO ₄ - (A-C) und TiO ₂ -NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den DCF-Test.	40
Abbildung 21: Grafische Darstellung des relativen GSH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO ₄ - (A-C) und TiO ₂ -NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender HPLC.	43
Abbildung 22: Grafische Darstellung des relativen GSH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger Exposition mit BaSO ₄ - (A-C) und TiO ₂ -NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender HPLC.	45
Abbildung 23: Grafische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24- und 72-stündiger BaSO ₄ -NP-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.	48
Abbildung 24: Grafische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24- und 72-stündiger TiO ₂ -Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.	51
Abbildung 25: Grafische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger BaSO ₄ -Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.	54
Abbildung 26: Grafische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger TiO ₂ - Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.	57

1. Einleitung

1.1. Partikel und Fasern

Partikel und Fasern sind Bestandteile unserer täglichen Umgebungsluft. Einige kommen natürlich vor, wie z.B. Quarzsand. Andere hingegen werden technisch hergestellt, beispielsweise Karbonfasern. Bereits im letzten Jahrhundert wurde festgestellt, dass Partikel oder Fasern gesundheitliche Beeinträchtigungen hervorrufen können. Bergman und Casswell (1972) konnten zeigen, dass Kohlestaub in Kohlebergwerken die Gesundheit und die Lebensdauer der Arbeiter erheblich reduziert. Quarzstaub, der z.B. für die Herstellung von Glas verwendet wird, hat das Potenzial reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden und dadurch Schäden an der DNA in Lungenzellen zu verursachen (Borm *et al.*, 2018). Mehrere Studien mit Ratten zeigten, dass eine inhalative Gabe des Quarzstaubes zu Einwanderung von Makrophagen in das Lungengewebe, Vermehrung der Neutrophilen in der bronchioalveolären Lavage, zur Ausschüttung von Entzündungsmarkern und schlussendlich zu Lungentumoren führen kann (Seiler *et al.*, 2001; Muhle *et al.*, 1989). Weitere Verursacher von gesundheitlichen Schäden in der Lunge können Fasern sein. Asbest ist dabei eines der prominentesten Beispiele. Es wurde bis in die 1990er Jahre vermehrt im Hausbau eingesetzt (Wichmann *et al.*, 2003). Lippmann konnte zeigen, dass es beim Grad der Schädigung auf die Größe der Nanomaterialien ankommt. Dünnere Fasern werden bis in die Pleura transportiert und können da ein Mesotheliom auslösen. Die dickeren Fasern bleiben dagegen im Gewebe und können Fibrose sowie Lungentumore verursachen (Lippmann, 1990; Lippmann, 1988). Zu den aktuellen Themen zählen die Luftbelastungen und die daraus folgenden Schäden für Mensch und Umwelt, welche durch Dieselstaub verursacht werden. Partikel aus dem Dieselstaub können in Lungenepithelzellen (Beas-2B-Zellen) oxidativen Stress auslösen, Entzündungen hervorrufen und Desribonukleinsäure-Addukte (DNA) bilden (Almeida-Silva *et al.*, 2022).

1.2. Nanopartikel

Partikel und Fasern werden auch als *particulate matter* (PM) bezeichnet. PM ist ein Begriff für die allgemeine Einteilung von Partikeln, welche die Luft verschmutzen. Diese Partikel variieren in ihrer Anordnung und Größe, welche aus ihrer anthropogenen Herkunft resultieren. Die Größe der PM₁₀ (Feinstaub) liegt in einem Bereich von 2,5 – 10 µm. In der Luft können auch Partikel vorhanden sein, die kleiner als 2,5 µm sind. Diese werden als ultrafeine Partikel bezeichnet (El Morabet, 2019). Partikel die kleiner als 100 nm sind, werden als Nanopartikel (NP) bezeichnet. Dabei müssen 50 % der Anzahlgrößenverteilung zwischen 1 und 100 nm liegen (Europäische Kommission, 2011).

1.2.1. Nanopartikel und die Lunge

Die Inhalation ist der Hauptaufnahmeweg für Partikel aus der Luft. Partikel dringen mit der Luft über die Nase oder den Mund in den Körper ein. Dabei verbleiben Partikel größer $11\ \mu\text{m}$ in den Nasenlöchern oder gelangen in den oberen Verdauungstrakt. Die Partikel der Größe $7 - 11\ \mu\text{m}$ gelangen bis in die Nasenhöhle. Je kleiner die Partikel werden, desto tiefer gelangen sie in den Respirationstrakt ($4,7 - 7\ \mu\text{m}$ bis in den Larynx; $3,3 - 4,7\ \mu\text{m}$ bis in die Tracheabronchialregion; $2,1 - 3,3\ \mu\text{m}$ bis in die Bronchien; $1,1 - 2,1\ \mu\text{m}$ bis in die terminalen Bronchien; $0,65 - 1,1\ \mu\text{m}$ bis in die Bronchiolen und $0,43 - 0,65\ \mu\text{m}$ bis in die Alveolen) bevor sie deponieren (Manisalidis *et al.*, 2020). Auf diesem Weg wirken unterschiedliche physikochemische Kräfte, die diese Partikel beeinflussen. Die Impaktion wirkt vom Nasen-/Rachenraum bis in die Bronchiolen. Impaktation bedeutet, dass große schnelle Teilchen an Gabelungen und Verengungen aufprallen (Hentsch und Psychrembel Redaktion, 2016). Die Diffusion wirkt in Nasen-/Rachenraum und den Alveolen. In den Bronchiolen hat wieder die Impaktion Einfluss auf die Partikel. Aufgrund der niedrigen Luftgeschwindigkeit in den Alveolen können die Partikel sedimentieren (McClellan und Henderson, 1995).

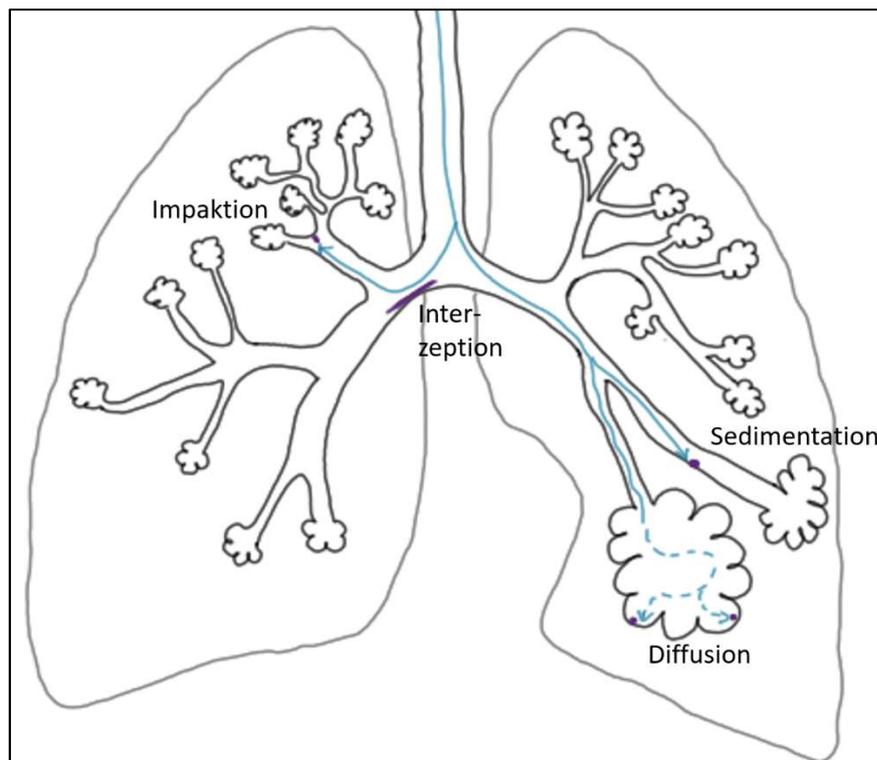


Abbildung 1: Depositionsmechanismen von inhalierten Partikeln im Atmungstrakt (nach Marquardt, 2013)

Die Elimination der Partikel aus der Lunge wird als *Clearance* bezeichnet. Im oberen Atmungstrakt können die Partikel durch mucoziliären Transport aus der Lunge transportiert werden. In den unteren Regionen des Respirationstraktes können die Fremdkörper ins umliegende

Gewebe wandern, sich dort auflösen oder von Phagozyten und Makrophagen aufgenommen werden, die diese Partikel anschließend auflösen. Des Weiteren können Partikel über das Interstitium in die Lymphknoten oder auch in die Kapillaren gelangen. Von den Kapillaren aus können die Nanopartikel anschließend im ganzen Körper verteilt werden und in andere Organe einwandern (Marquardt, 2013).

1.2.2. Biologische Wirkung von Nanopartikeln und Nanotoxikologie

Heutzutage gibt es eine Vielzahl an Nanomaterialien (NM). Es gibt längliche NM (z.B. *Carbon Nanotubes*), plattenförmige NM (z.B. Graphenflocken) und kugelförmige NM (z.B. Goldpartikel). Die Partikeltoxizität wird durch eine Vielzahl an Parametern beeinflusst, wie z.B. Größenverteilung, Wasserlöslichkeit, chemische Reaktivität und Expositionszeit. Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Je kleiner das Volumen der Partikel oder Fasern ist, desto größer ist die Oberfläche (Bakand *et al.*, 2012). Donaldson *et al.* (2005) zeigten, dass *Carbon Black* NP, Dieselstaub, Schweißrauch und Kohleflugasche oxidativen Stress auslösen können. Dieser oxidative Stress aktiviert den Mitogen-aktiviertes-Protein-Kinase-Signalweg (MAPK) und führt letztendlich zu Entzündungsreaktionen in der Lunge. Eine solche Entzündungsreaktion kann zu einer systemischen Entzündung und in Folge zu Ischemie und Tod durch Herz-Kreislaufversagen führen (Donaldson *et al.*, 2005). Eine Studie mit Eisen-(III)-oxid-NP, Yttriumoxid-NP und Zinkoxid-NP konnte zeigen, dass die Nanopartikel in die Zelle aufgenommen werden und Entzündungen auslösen (Gojova *et al.*, 2007). Inhalationsexperimente mit Ratten zeigten, dass ultrafeine Manganoxid-Partikel, nach einer inhalativen Aufnahme, sich im ganzen Körper verteilen können und dabei Tumore im olfaktorischen Zentrum und Neurodegeneration auslösen können (Elder *et al.*, 2006). *Carbon Nanotubes* haben die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und im Gehirn schwerwiegende Veränderungen des Proteinhaushaltes von Gehirnzellen vorzunehmen. Dies kann zu Alzheimer und anderen degenerativen Erkrankungen des Gehirns führen (Mostovenko *et al.*, 2021).

1.2.3. Bariumsulfat

Bariumsulfat (BaSO_4) bildet farblose rhombische Kristalle. Es ist nahezu unlöslich, ausgenommen in heißer konzentrierter Schwefelsäure. Es kann zwischen Baryt (Schwerspat, natürliches Bariumsulfat) und *Blanc fixe* (synthetisch durch Fällung hergestelltes Bariumsulfat, Permanentweiß) unterschieden werden. Baryt wird bei der Erdöl- und Erdgasförderung als Bohrspat verwendet. In der Kunststoff-, Lack- und Farbenindustrie wird es als Füllstoff gebraucht und in der Röntgenmedizin wird es als Röntgenkontrastmittel genutzt. *Blanc fixe* wird in Anstrichen als *Spacer* zur Verbesserung der Streueigenschaften verwendet. Vorteil des *Blanc fixe* ist die individuelle Einstellbarkeit der Teilchengröße. Außerdem findet es Anwendung bei der Herstellung von harten und kratzfesten Oberflächen (RÖMPP-Redaktion *et al.*, 2009).

BaSO₄-Partikel können inhalativ in den Körper aufgenommen werden, jedoch nicht über die Haut. Bei BaSO₄-Partikeln handelt es sich um chemisch inerte Partikel. Sie werden zu den schwerlöslichen Stäuben gezählt. Diese Stäube zeigen, entsprechend den granulären biobeständigen Stäuben (GBS), allgemeine Partikeleffekte. GBS können in der Lunge bzw. in den Lymphknoten akkumulieren und so die *Clearance*-Funktion beeinträchtigen. Aufgrund des Akkumulationspotentials in der Lunge haben BaSO₄-NP das Potenzial, Tumore im Lungengewebe auszulösen. Eine chronische und hohe Exposition gegenüber BaSO₄-Staub führt zur Barytose. Dies ist eine nicht-fibrotische Pneumokoniose. Die maximale Arbeitsplatzkonzentration für BaSO₄-Partikel beträgt 1,35 mg/m³ (0,3 mg/m³ x Materialdichte) für alveolengängige Partikel und Stäube (Hartwig und MAK-Kommission, 2017).

Aninwene *et al.* (2013) konnte zeigen, dass die Verwendung von BaSO₄-NP in medizinischen Produkten mit Pellethan die Bakterienproliferation hindert. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass BaSO₄-NP keine oder kaum toxischen bzw. genotoxischen Effekte nach inhalativer Aufnahme in Ratten auslöst (Cordelli *et al.*, 2017; Konduru *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2019; Schwotzer *et al.*, 2017; Schwotzer *et al.*, 2018).

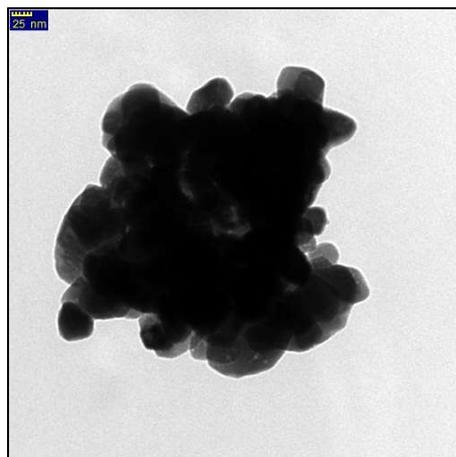


Abbildung 2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Bariumsulfat-Agglomerates

1.2.4. Titandioxid

Titandioxid (TiO₂) ist die bedeutendste Titan-Verbindung in der Technik. Es kommt in drei unterschiedlichen Modifikationen vor: Anatas (tetragonale Kristalle), Brookit (orthorhombische Kristalle) und Rutil (ebenfalls tetragonale Kristalle und stabilste Form des Titandioxids). Bei Temperaturen über 700 °C wandelt sich die Anatas-Phase irreversibel in die Rutil-Phase um. TiO₂ ist chemisch, mechanisch und thermisch sehr stabil. Es ist ein weißes, amorphes, geschmackloses und geruchloses Pulver. In Wasser, organischen Lösungsmitteln, verdünnten Säuren und Basen lässt sich TiO₂ nicht lösen. Ähnlich wie BaSO₄, lässt sich TiO₂ auch in heißer konzentrierter Schwefelsäure lösen (Sitzmann *et al.*, 2016).

In der Anatas- und Rutil-Phase wird TiO_2 als Weißpigment verwendet. Daher ist es in Farben und Kosmetika zu finden. Durch die hohe Brechzahl der beiden Modifikationen (Rutil 2,61 und Anatas 2,52 bei 589 nm) findet TiO_2 Anwendung in Sonnencremes und Perlglanzpigmenten. In der Lebensmittelindustrie wird es zur Umhüllung verwendet (Sitzmann *et al.*, 2016). Seit Anfang 2022 ist Titandioxid als Zusatz in Lebensmitteln verboten (Europäische Kommission, 2022). In seiner nicht-pigmentären Form wird es in der Elektroindustrie zum Beispiel in Kondensatoren verarbeitet. Ein weiteres Anwendungsfeld für TiO_2 ist die Keramikindustrie (Sitzmann *et al.*, 2016).

TiO_2 -NP werden, wie BaSO_4 -NP, zu den GBS-Stäuben gezählt. 2009 wurde TiO_2 in die Kategorie 3A (krebserzeugende Wirkung ist gegeben, aber noch nicht 100 % gesichert) eingeordnet, da zu diesem Zeitpunkt keine MAK-Werte aufgestellt werden konnten. Aufgrund des Entzündungspotenzials im Alveolar- und Bronchialbereich und der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche hauptsächlich für die kanzerogene Wirkung in Ratten verantwortlich sind, wurde TiO_2 mit den GBS-Stäuben in Kategorie 4 (krebserzeugende Stoffe, die keine genotoxischen Effekte zeigen) eingeordnet. Analog zu den GBS-Stäuben und BaSO_4 wird die Arbeitsplatzkonzentration als $0,3 \text{ mg/m}^3 \times \text{Materialdichte}$ ($1,23 \text{ mg/m}^3$) angegeben (Hartwig und MAK-Kommission, 2019).

TiO_2 wird in der Partikeltoxikologie häufig als Positivkontrolle genutzt, da schon viele Studien toxische Wirkungen nachgewiesen haben. Es konnte gezeigt werden, dass bei intraperitonealer Gabe, in Mäusen und Ratten, die Partikel Schäden in Leber und Nieren verursachen (Abbasi-Oshaghi *et al.*, 2019; Alarifi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010). Es konnten auch Lungenschäden und Tumore bei Ratten, nach inhalativer Gabe von TiO_2 , festgestellt werden (Baisch *et al.*, 2014; Bermudez *et al.*, 2004). Shi *et al.* (2013) konnten in ihrer Veröffentlichung zeigen, wie sich TiO_2 im ganzen Körper verteilt. TiO_2 besitzt in großen Konzentrationen das Potenzial die Blut-Hirn- und die Blut-Fetus-Schranke zu überwinden (Shi *et al.*, 2013). Boland *et al.* (2014) klärten den zellulären Mechanismus der TiO_2 -Toxizität auf. Die Partikel gelangen z.B. über Lysosomen in die Zelle. Die Lysosomenmembran kann durch die Partikel geschädigt werden. Dies führt zu einem ‚Auslaufen‘ des Lysosoms. Durch die Schäden am Lysosom werden Hydrolasen frei, die das Inflammasom aktivieren und zur Apoptose führen können (Boland *et al.*, 2014).

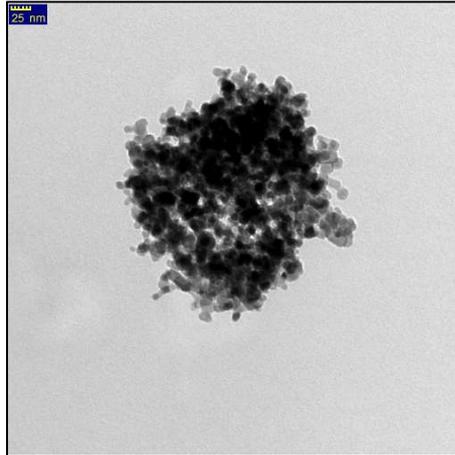


Abbildung 3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Titandioxid-Agglomerates

1.2.5. Lebenszyklus von Nanopartikeln in der Umwelt

Das Gefährdungspotenzial eines Stoffes wird nicht ausschließlich durch dessen Nanoskaligkeit bestimmt. Faktoren für das schädliche Potenzial können z.B. Größe, Geometrie, Kristallstruktur und Oberflächeneigenschaften sein. Außerdem kann die Toxizität von den Umgebungsfaktoren, wie pH-Wert, Salzgehalt und Gehalt an natürlichen organischen Substanzen, beeinflusst werden (Umweltbundesamt, 2020).

Die Nanopartikel können in ihrem ganzen Lebenszyklus freigesetzt werden und in die Umwelt gelangen. Ein solcher Lebenszyklus umfasst die Herstellung, den Transport, den Gebrauch, das Recycling sowie die Abfallbeseitigung. So können Arbeiter in TiO₂-Betrieben bei der Herstellung den Nanopartikeln ausgesetzt sein (Ellis *et al.*, 2010). Außerdem können Patienten in der Radiologie BaSO₄ ausgesetzt sein, wenn sie Kontrastmittel bekommen. Dieses Kontrastmittel wird zu großen Teilen vom Körper ausgeschieden. So gelangt das BaSO₄ ins Klärwasser und schließlich wieder in die Umwelt (Groh *et al.*, 2011). TiO₂ ist ein Bestandteil von Sonnencremes und kann beim Baden in Seen und anderen Gewässern in die Umwelt eingebracht werden (Gebel *et al.*, 2014). Von Thomas und Kolleg:innen wurde gezeigt, dass die Filtersysteme in Abfallverbrennungsanlagen keine Partikel in die Umwelt frei lassen (Thomas, 2020; Thomas, 2017).

1.3. 3D-Zellkulturmodell

Seit Mitte des letzten Jahrhunderts versuchen Wissenschaftler:innen die Tierversuche zu ersetzen. Im Jahre 1959 veröffentlichten W.M.S. Russell und R.L. Burch in *The Principles of Humane Experimental Technique* das 3R-Prinzip (*Replacement, Reduction, Refinement*). *Replacement* steht für das Ersetzen der Tierversuche durch alternative Methoden wie z.B. Zellkulturen, *Reduction* für die Reduktion der Tieranzahl in Tierversuchen und *Refinement* für das Verwenden

von Methoden, die potentielle Schmerzen oder Leiden auf ein Minimum beschränken und das Wohlergehen der Tiere verbessern (Russell und Burch, 1992).

Der Tatsache geschuldet, sich von den Tierversuchen lösen zu wollen, hat in den letzten Jahren vermehrt Modelle hervorgebracht, die als gute Ansätze in der Inhalationstoxikologie betrachtet werden können. Die Zelllinie A549 (Explantkultur des Lungenkarzinoms eines 58 Jahre alten männlichen Kaukasiers, (Giard *et al.*, 1973) wird gerne verwendet, um die Epithelzellen des Lungengewebes nachzuahmen (Fytianos *et al.*, 2017; Bitterle *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2013). Permanente (Tumor-)Zelllinien, wie die Zelllinie A549, zeichnen sich zwar durch ihr konstantes Wachstumsverhalten und eine stabile Morphologie über viele Passagen aus, zeigen jedoch nicht alle ursprünglichen *in-vivo* Charakteristika der Zellen und sind somit teilweise ungeeignet (Schmitz, 2010). Da das Lungengewebe nicht nur aus Epithelzellen besteht, werden zunehmend sogenannte Co-Kulturen entwickelt. Diese Co-Kulturen besitzen Kombinationen von verschiedenen Zelltypen. Welche Zellen in einer Studie verwendet werden, hängt dabei von dem Endpunkt ab, der betrachtet werden soll. Alfaro-Moreno *et al.* (2008) entwickelten eine Tetrakultur (Epithelzellen, Endothelzellen, Mastzellen und Makrophagen), um die Zellkommunikation an der Blut-Luftschranke zu betrachten. Sie zeigten die pulmonale Kommunikation zwischen den Zellen nach einer Exposition mit Feinstaub [urban PM10] (Alfaro-Moreno *et al.*, 2008). Klein *et al.* (2013) entwickelten die Tetrakultur weiter und adaptierten diese für die Exposition mit Goldnanopartikeln.

1.3.1. Primäre Lungenzellkultur

Humane primäre Lungenzellkulturen sind von Vorteil in der Inhalationstoxikologie, da menschliches Gewebe verwendet wird und somit Extrapolationen zwischen den Spezies wegfallen. Die Handhabung ist jedoch etwas aufwändiger als bei Tumorzelllinien, da sie nicht unendlich oft proliferieren und somit nur eine begrenzte Zellzahl zur Verfügung steht (Runge *et al.*, 2001). Primäre Lungenepithelzellen können käuflich erworben werden. Der Vorteil jedoch von eigens kultivierten primären Lungenzellkulturen aus Patienten ist, dass alle Zellen, die normal im Lungengewebe vorkommen, bereits in einer Kultur vorhanden sind. Es müssen nicht aufwändig mehrere Zelllinien vereint werden, wie bei Klein und Alfaro-Moreno. Jedoch sind deren Modelle definierter (Klein *et al.*, 2013; Alfaro-Moreno *et al.*, 2008). Die Kulturen aus Patientenmaterial haben zu 90 - 95 % epithelialen Charakter (Torky *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit kam ein ähnliches Modell wie von Klein *et al.* (2013) zum Einsatz. Anstatt drei verschiedene Zelltypen (auf der apikalen Seite) für das Lungengewebe zu verwenden, wurden primäre Lungenzellen von Tumorpatienten eingesetzt. Die primären Lungenzellen stammten aus einer tumorfreien Region und bilden daher gut die verschiedenen Zelltypen der menschlichen Lunge ab.

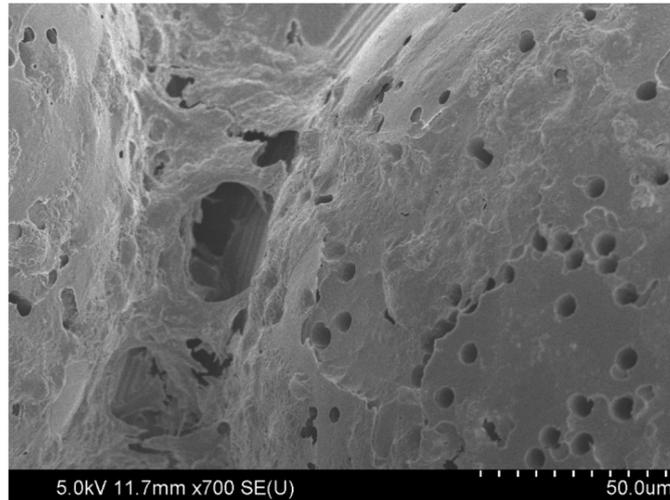


Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der primären Lungenzellen auf einem MatriGrid®.

1.3.2. Zellkulturträger MatriGrid®

Die Lunge stellt für die tierfreien Experimente eine Hürde dar. An der Blut-Luftschranke treffen zwei verschiedene Umgebungen aufeinander. Die Zellen der Blutgefäße und das Parenchym sind mit Flüssigkeit umgeben und die Epithelzellen, welche die Lunge auskleiden, haben nur an der basalen Seite Kontakt zu Flüssigkeit. Um dieses Problem zu lösen, bedienen sich viele Wissenschaftler:innen den sogenannten Inserts (Latvala *et al.*, 2016; Loret *et al.*, 2016; Mizoguchi *et al.*, 2022; Mai *et al.*, 2013; Mai, 2014; Alfaro-Moreno *et al.*, 2008; Hermanns *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2013; Rothen-Rutishauser *et al.*, 2008). Bokhari *et al.* entwickelten 2007 ein solches Insert. Die Membran besteht meistens aus Polycarbonat oder Polyethylenterephthalat, ist planar und in verschiedenen Größen erhältlich (u.a. bei Vitrocell, Cultex, Alvetex). Es gibt verschiedene Arten, die Zellen mit Hilfe der Inserts zu kultivieren. Eine Möglichkeit ist es, nur Zellen auf die Oberseite des Inserts auszubringen und die Zellen mittels eines *air-liquid*-Systems zu kultivieren (Mizoguchi *et al.*, 2022; Mai *et al.*, 2013; Loret *et al.*, 2016). Eine weitere Möglichkeit ist, beide Seiten für die Kultivierung zu verwenden und anschließend *air-liquid* zu kultivieren (Mai *et al.*, 2013; Hermanns *et al.*, 2009; Rothen-Rutishauser *et al.*, 2008). Außerdem können Zellen auf den Boden der Zellkulturplatten gesät werden und eine andere Zelllinie auf der Oberseite des Inserts. Bei dieser Variante kann sowohl eine *air-liquid*- als auch eine submerse Kultivierung verwendet werden (Mai *et al.*, 2013; Alfaro-Moreno *et al.*, 2008). All diese Kultivierungsmöglichkeiten sind gute Optionen, um Zell-Zell-Kommunikation zu studieren (Alfaro-Moreno *et al.*, 2008; Rothen-Rutishauser *et al.*, 2008).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inserts (MatriGrids®) bestehen ebenfalls aus Polycarbonat und wurden durch *Mirco-Thermoforming* hergestellt, so dass 187 alveoläre Kavitäten entstanden (Mai, 2014; Mai *et al.*, 2022). Durch das *Micro-Thermoforming* kann auf

der einen Seite die Membran sehr viel dünner geformt werden (Porendurchmesser = 2 - 4 μm , Porendichte = 106 Poren/ cm^2 , Membrandicke = 10 - 40 μm) und auf der anderen Seite wird die Lungenalveolenform für die Zellkultur vorgegeben (Mai *et al.*, 2022). Die Membran ist in ein teilaktives System (TAS) eingeschweißt und wurde passend für die 24-Kavitäten-Platte von der Fa. Greiner entwickelt.

Die Technische Universität Ilmenau (Institut für Nanobiosystemtechnik unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Schober) hat auch für andere Organe MatriGrid®-Zellkulturträger entworfen, unter anderem für das Nervensystem, die Leber und das Herz (Mai *et al.*, 2017a; Mai *et al.*, 2022; Mai *et al.*, 2016).

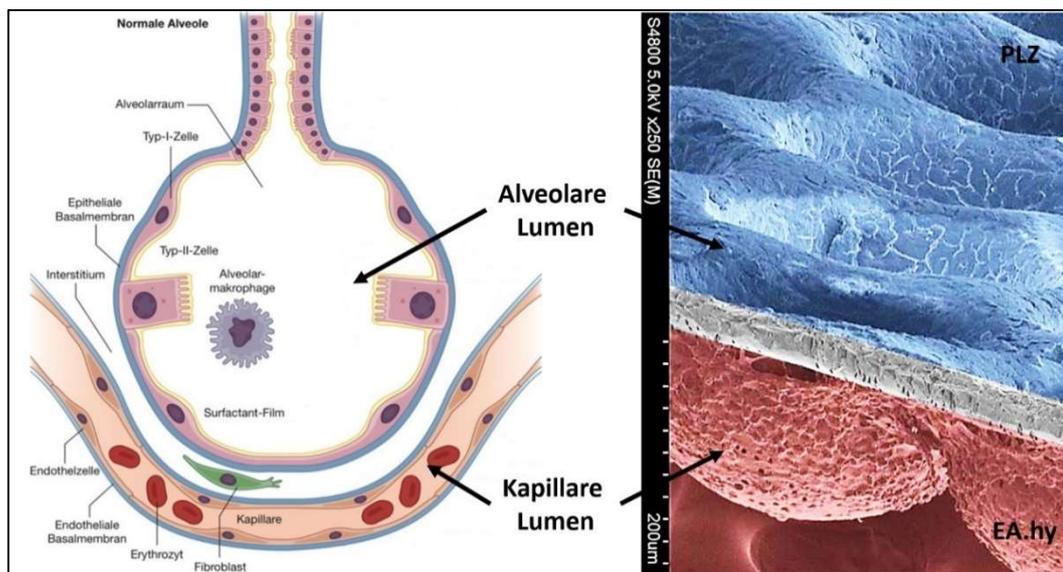


Abbildung 5: Darstellung der Blut-Luft-Schranke (rechts) und REM-Aufnahme des Blut-Luft-Schranken-Äquivalents, dem MatriGrid (links)

1.4. Aerosolexposition

Partikel sind ein Bestandteil der uns täglich umgebenden Luft. Um die Auswirkungen dieser und anderer Partikel (z.B. in Herstellungsstätten) zu messen, bedient man sich traditionell des Tiermodells. Es gibt zwei verbreitete Verfahren, die Versuchstiere den Aerosolen auszusetzen. Zum einen die Ganzkörperexposition, hier lebt das Tier für eine bestimmte Zeit in einem mit Aerosol gefüllten Raum (Huang *et al.*, 2021). Die zweite Möglichkeit wäre eine *nose-only* Exposition. Bei dieser Methode werden die Tiere in eine Röhre gesetzt, in der sie sich kaum bewegen können und nur ihre Nasen mit dem Aerosol in Kontakt gebracht werden (Fröhlich und Salar-Behzadi, 2014).

In der Inhalationstoxikologie führte das zur Entwicklung von Systemen, die für die Exposition von Zellkulturen mit Aerosolen geeignet sind. Die Fa. TSE Systems hat eine Expositionseinheit entworfen, die Platz für zwei Standardzellkulturplatten (6 - 24 Kavitäten) hat. Die

Expositionseinheit wurde so entwickelt, dass alle Geräte für die Tierinhalationstoxikologie auch mit der Zellkultureinheit kompatibel sind und so gut zwischen *in-vivo* und *in-vitro* verglichen werden kann (TSE Systems). Ein weiteres System ist das CULTEX® *exposure* System. CULTEX® hat bereits zwei Generationen von Expositionssystemen entworfen. Beide haben drei Kavitäten, in die Zellkulturträger eingehängt werden können. Anders als beim TSE System, besitzt das CULTEX® System einen Zulauf für Medium, damit die Zellen während der Exposition nicht austrocknen (Aufderheide *et al.*, 2002; Aufderheide *et al.*, 2003; Aufderheide *et al.*, 2017).

Für die Erstellung dieser Arbeit wurde ein Expositionsaufsatz (MALIES) der Technischen Universität Ilmenau verwendet (Mai, 2014; Mai *et al.*, 2014; Mai *et al.*, 2017b). Der Aufsatz ist für 4-Kavitäten einer 24-Kavitäten-Platte der Fa. Greiner designt und dichtet die, auf den in der Multititerplatte befindlichen, TAS mit MatriGrids® ab. Das Aerosol kommt über einen zentralen Eingang in den Aufsatz und wird im Inneren homogen in vier Kanäle aufgesplittet. Über die Expositionsdüsen gelangt das Aerosol schließlich direkt auf die im MatriGrid® kultivierte ALI-Kultur. Über kleine Öffnungen neben den Expositionsdüsen kann die einströmende Luft, nach Überströmung der Zellkultur, wieder in einen Sammelkanal entweichen. Jedes TAS mit Zellkultur stellt damit ein diskretes und zur Umgebung abgedichtetes System dar (Abbildung 6).

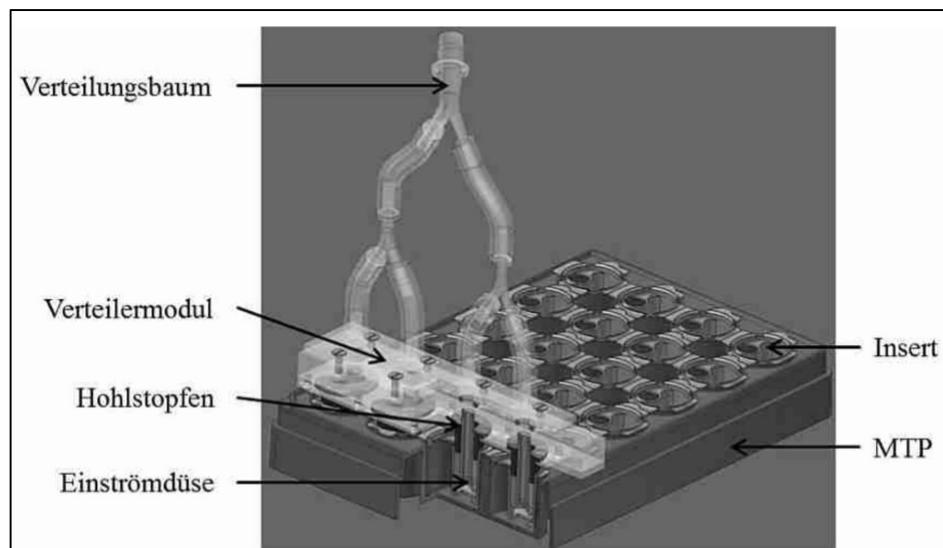


Abbildung 6: Entwurf des MALIES zur Exposition von 3D-Zellkulturen (Mai, 2014)

2. Zielstellung

Die menschliche Lunge wird täglich mit vielen Partikeln und Fasern konfrontiert. Diese beeinflussen, abhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung, Größe und Form die menschliche Gesundheit. Heutzutage befasst sich die Forschung größtenteils mit den Auswirkungen von nanoskaligen Strukturen (Größe: 1 – 100 nm), die durch den verstärkten Einsatz in der Industrie, immer mehr in den Alltag eindringen (z.B. BaSO₄- und TiO₂-Nanopartikel). Ein wichtiger Bestandteil der Forschung mit Nanomaterialien (NM) ist das Verständnis der Beziehung zwischen dem Organismus und den Auswirkungen nach einer NM-Exposition. Die Partikeltoxikologie hat das Ziel, die biopathologischen Prozesse zu identifizieren und aufzuklären. Auswirkungen einer solchen NM-Exposition können zum Beispiel Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Entzündungen, genetische Schädigungen, die Hemmung der Zellteilung und der Zelltod sein. In einigen Studien wird beschrieben, dass es keine spezifischen Wirkmechanismen für Nanomaterialien gibt. Es ist jedoch bekannt, dass nanoskalige Materialien eine größere Effektwirkung zeigen, als die jeweiligen Mikromaterialien. Die inhalative Aufnahme von Nanomaterialien spielt in der heutigen Forschung eine große Rolle. Daher ist das Ziel in der vorliegenden Arbeit, die toxikologische Wirkung von BaSO₄- und TiO₂-Nanopartikeln auf ein 3D-Zellkulturmodell zu untersuchen (Mai *et al.*, 2017b). Dabei kommt ein neuer Zellkulturträger (MatriGrid[®]) und ein neuer Expositionsaufsatz (MALIES) zum Einsatz. Des Weiteren wurden für das 3D-*in-vitro*-Modell primäre humane Lungenzellen und eine permanente Endothelzelllinie verwendet. Im Zuge der 3R-Diskussion (*replace, reduce, refine*) existieren nur wenige gut charakterisierte und prädiktive *in-vitro*-Alternativen zum Tierversuch im Bereich der inhalativen Nanotoxikologie. Mit dem verwendeten 3D-*in-vitro*-Modell soll die Oberfläche der Alveolen bestmöglich nachgeahmt werden. Dies ist möglich durch eine 3D-Oberfläche der Zellkulturträger, die wie Alveolen vorgeformt ist. An dieser Alveolen-ähnlichen 3D-Zellkultur werden die Vitalität der gesamten Kultur, die Membrandurchlässigkeit und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach einer Nanopartikel-Aerosol-Exposition bestimmt. Zusätzlich wird der Glutathiongehalt und die inflammatorische Wirkung nach BaSO₄- und TiO₂-Exposition untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Hersteller.

Name	Konzentration/ Zusätze	Hersteller/ Land
2-Propanol		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA)		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2',7'-Dichloro-fluorescein-Diacetat (H ₂ DCF-DA)		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acetonitril		Merck, Darmstadt, Deutschland
AECG-Medium	+ Supplement	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
CHES		EMD Chemicals Inc., San Diego, USA
DMEM-Medium	+ 10 % FKS, + 2 % L-Ala-L-Glu, + 1 % Pen/Strep, + 1 % Na-Pyr	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DTT		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)		Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Name	Konzentration/ Zusätze	Hersteller/ Land
Kupfersulfat-Lösung		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Alanyl-L-Glutamin (L-Ala-L-Glu)		Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Leibovitz L-15 Medium		PromoCell, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamin <i>reduced</i>		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Menadion		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Monobrombiman (mBrB)		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NADH		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natrium-Pyruvat (Na-Pyr)		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natronlauge	2 N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	10.000 Units/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)		Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Protein-Standard		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resazurin-Salz		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Name	Konzentration/ Zusätze	Hersteller/ Land
Salzsäure (HCl)	1 N	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	0,025 %/ 0,01 %	PromoCell, Heidelberg, Deutschland

3.1.2. Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit kamen Bariumsulfat-Nanopartikel (BaSO₄-NP) der Firma Huntsman (Salt Lake City, USA) und Titandioxid-Nanopartikel (TiO₂-NP) der Firma Evonik (Essen, Deutschland) zum Einsatz. Alle Nanopartikel wurden vor dem Einsatz in den Experimenten mittels Gammastrahlung sterilisiert.

Tabelle 2: Charakteristika der beiden Nanomaterialien.

Eigenschaften	Bariumsulfat	Titandioxid
Partikelgröße laut Hersteller [nm]	40	17
Coating laut Hersteller	Kein Coating	Kein Coating

3.1.3. Kulturmedien und Lösungen

Als Zellkulturmedien wurden das *Airway Epithelium Cell Growth Medium* (AECG; mit Supplement und 1 % Penicillin/Streptomycin; pH 7,4) und das *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; mit 10 % FKS, 2 % L-Alanin-L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Natrium-Pyruvat; pH 7,4) verwendet. Für die Herstellung der Nanopartikelsuspension wurde bidest. Wasser als Grundlage genutzt.

3.1.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Geräte bzw. Verbrauchsmaterialien und Hersteller.

Name	Hersteller/ Land
Abdecktuch, Foliodrape	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Abzug (Radionuklidabzug)	Köttermann, Uetze, Deutschland
Ansaughilfe	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Heracus Instruments, Hanau, Deutschland
Chromolith RP-18-Säule (RP-18, 100 - 4,6 mm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chromolith RP-C18 <i>endcapped</i> Vorsäule	Merck, Darmstadt, Deutschland

Name	Hersteller/ Land
Diffusionstrockner	TOPAS, Dresden, Deutschland
Expositionsaufsatz (MALIES)	Technische Universität Ilmenau, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland, TPP, Trasadingen, Schweiz
Fuchs-Rosenthal-Kammer (Tiefe: 0,2 mm, Größe: 0,0625 mm ²)	GLW, Würzburg, Deutschland
HEPA-Filter	TSI, Shoreview, USA
<i>high performance liquid chromatography</i> (HPLC) (LaChrom) Module: L-7100, L7200, L7480, D-7000	Merck (Hitachi), Darmstadt, Deutschland
Hybridisierungs-ofen (OV5)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Mastercontroller	TSE Systems GmbH, Berlin, Deutschland
MatriGrid [®]	Technische Universität Ilmenau, Deutschland
Mehrkanalpipette	VWR International, Radnor, USA
Mikroskop (Eclipse TS 100)	Nikon, Chiyoda, Japan
Mullkompressen (steril)	Fuhrmann, Much, Deutschland
Multipipette (Multipipette plus)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Optical Particle Sizer</i> (OPS)	TSI, Shoreview, USA
PARI-Boy-Vernebler	PARI, Starnberg, Deutschland
pH-Meter (pH 330)	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten (2,5 µl – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 300 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland bzw. Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Platten-Reader (GENios)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Pumpe	JunAir, Münster, Deutschland
Reinstwasser-Anlage	Wilhelm Werner GmbH, Leverkusen, Deutschland
<i>Scanning Mobility Particle Sizer</i> (SMPS)	TSI, Shoreview, USA
Skalpell (Einmalskalpell)	Servopax, Wesel, Deutschland
Splitter	TSI, Shoreview, USA
Sterilbank (Hera-safe)	Heracus Instruments, Hanau, Deutschland
Teilaktives System (TAS)	Technische Universität Ilmenau, Deutschland
Ultraschallsonde (Sonoplus HD3100 mit Beschallungsbecher)	Bandelin, Berlin, Deutschland

Name	Hersteller/ Land
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Verdünner	TSI, Shoreview, USA
Waage (fein, Mettler AE 240)	Schmieder, Leipzig, Deutschland
Wärmeplatte	VWR International, Radnor, USA
Zentrifuge (2-16KL)	Sigma, Osterode am Harz, Deutschland
Zentrifuge (Biofuge Fresco)	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² & 75 cm ²)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten (24-Kavitäten)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (60 mm ²)	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.5. Gebrauchsfertige Kits

Kit	Hersteller/ Land
Detach Kit	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
ELISA Buffer Set (ABTS)	PeptoTech, Cranbury, USA
ELISA Buffer Set (TMB)	PeptoTech, Cranbury, USA
ELISA MAX Deluxe Set Human INF- γ	Biologend, San Diego, USA
Human IL-1 β Pre-Coated ELISA KIT	Biogems/PeptoTech, Cranbury, USA
Mini TMB EDK Human IL-8 (CXCL8)	PeptoTech, Cranbury, USA
Standard ABTS EDK Human MCP-1 (CCL2)	PeptoTech, Cranbury, USA

3.1.6. Biologisches Material

a) EA.hy926

Die Zellen der Zelllinie EA.hy926 (ATCC, Manassas, USA) sind permanente Endothelzellen, die durch eine Fusion von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und Zellen der permanenten Lungentumorzelllinie A549 entstanden sind (Edgell *et al.*, 1983).

b) Periphere Lungenzellen

Die peripheren Lungenzellen wurden aus humanem Lungengewebe gewonnen, welches aus tumorfreien Regionen von Lungenteilresektionen stammte. Meistens handelt es sich dabei um Patient:innen, bei denen operativ Lungenteilresektionen vorgenommen wurden. Das heißt, es fand keine gezielte Entnahme für die durchgeführten Experimente statt. Das operativ entnommene Lungengewebe wurde dem Institut für Umwelttoxikologie von Herrn PD Dr. med. Krüger, Klinik für Thoraxchirurgie des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dölau zur Verfügung gestellt. Diagnosen, Alter, Geschlecht, berufliche Exposition, Tabakkonsum und andere Besonderheiten wurden durch einen Patientenfragebogen erfasst. Die Nutzung des

Patientenmaterials zu Forschungszwecken wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. Das Votum wurde am 16.08.2017 erteilt (Bearbeitungsnummer 2016-20).

Mehr als 95 % der primären Lungenzellen der Kultur besitzen einen epithelialen Charakter (Lehmann, 2001).

Tabelle 4: Erfassung der Patientendaten des verwendeten Resektionsmaterials.

Pat. ID	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Raucherstatus	Arbeitsumfeld
332	81 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), rechter UL	NR	Tischler
334	55 ♂	Pulmonale Metastase (Rektumkarzinom), linker UL	NR	Fotograf
337	70 ♂	Bronchialkarzinom (NSCLC), linker UL	Seit 20 Jahren NR, vorher ca. 35 PY	Industriebau (geringer Asbestkontakt)
338	65 ♂	Pulmonale Metastasen (Plattenepithelkarzinom Oropharynx), linker UL	Seit drei Jahren NR, vorher ca. 15 PY	Kein Risiko
341	72 ♂	Pulmonale Metastasen (Plattenepithelkarzinom, Ohrmuschel), linker OL	NR	mglw. private Asbestexposition

♂: Männlich, NR: Nichtraucher, NSCLC: nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (*non small cell lung cancer*), OL/ ML/ UL: Oberlappen/ Mittellappen/ Unterlappen, PY: *Packyear* (ein PY entspricht 20 Zig/d über einen Zeitraum von einem Jahr), Zig/d: gerauchte Zigaretten pro Tag.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

a) EA.hy926

Die Zellen der Zelllinie EA.hy926 wuchsen als *Monolayer* in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen und wurden mit dem Zellkulturmedium DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) als submerse Kultur geführt. Die Kultivierung fand in einem Brutschrank mit 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit statt.

Alle sieben Tage wurde überprüft, ob der Zellrasen eine Konfluenz von 80 - 90 % (100 % entspricht einem geschlossenen Zellrasen) erreicht hatte. Sobald der Zellrasen diese Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit vorgewärmten PBS vorsichtig gespült, um alle Proteinreste des Mediums zu entfernen. Anschließend wurde Trypsin zugegeben und für fünf Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit der doppelten Menge PBS abgestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die festen Bestandteile der Suspension wurden mittels Zentrifugation (1000 U/min für fünf Minuten) von dem flüssigen Teil getrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in neuem DMEM-Medium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer. Für die Weiterführung der Zellkultur wurden die gewünschten Zellzahlen in neue Kulturflaschen ausgebracht und dreimal pro Woche mit neuem Medium versorgt.

b) periphere Lungenzellen (PLZ)

In Kooperation mit der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde am Institut für Umwelttoxikologie eine Explantkultur primärer Zellen aus humanem Lungengewebe entwickelt. Die Methode wurde von Runge und Kolleg:innen etabliert (Runge *et al.*, 2001).

Das Lungengewebe wurde im Rahmen einer Lungenteilresektion entnommen und unmittelbar im Anschluss das tumorfreie Gewebe in das kühle, sterile Transportmedium Leibovitz L-15 überführt und zeitnah für die Kultivierung vorbereitet. Das Gewebematerial wurde mit 37 °C warmen PBS (enthält 1 % Penicillin/Streptomycin) gewaschen und in ca. 8 mm³ große Stücke geschnitten. Die Gewebestücken wurden in Kulturschalen gelegt und mit AECG-Medium überschichtet und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Bis zum Auswachsen der Lungenzellen aus dem Gewebe wurde dreimal wöchentlich das Medium gewechselt. Nach zwei bis vier Wochen wuchsen Zellen aus dem Gewebe aus und bildeten einen *Monolayer*. Bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurden die Zellen passagiert. Die Gewebestücke

wurden subkultiviert und dafür in neue Zellkulturschalen umgesetzt, woraufhin eine neue Generation PLZ auswachsen konnte. Für die Passagierung der ausgewachsenen Primärzellen wurde das “Detach Kit“ von Promocell (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden dabei für ca. fünf bis sieben Minuten trypsiniert. Zur Erhaltung der jeweiligen Generation wurden die PLZ als submerse Kultur in Zellkulturflaschen ausgesät. Das Medium wurde auch hier dreimal wöchentlich gewechselt.

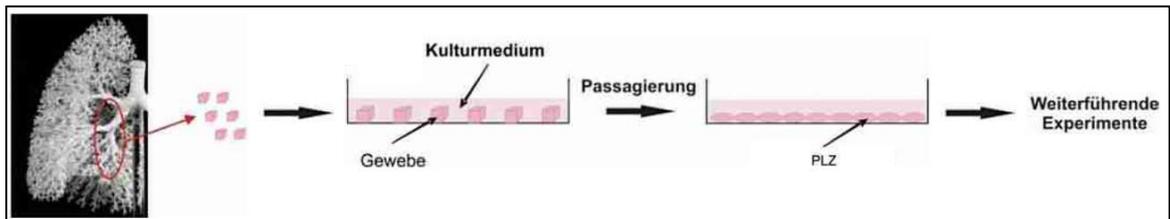


Abbildung 7: Kultivierungsschema von primären Lungenzellen

c) 3D-Co-Kultur

Für die Co-Kultur auf dem Zellkulturträger (MatriGrid®) wurden die EA.hy926 und die peripheren Lungenzellen genutzt. Die EA.hy926 repräsentieren in dem verwendeten Modell die Endothelzellen der Blutgefäße und die peripheren Lungenzellen stellen die Epithelzellen an der Blut-Luft-Schranke dar. Beide Zelllinien wurden wie beschrieben kultiviert. Nach der Zellzählung wurden die errechneten Volumina (für EA.hy926: 200000 Zellen pro MatriGrid®; für PLZ: 100000 Zellen pro MatriGrid®) abgenommen und nochmals bei 2000 U/min zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen in einem definierten Volumen AECG-Medium aufgenommen und gut resuspendiert. Beide Zelllinien erhielten 25 µl Nährmedium pro MatriGrid®. Die Endothelzellen wurden gut resuspendiert, auf die Unterseite der Membran der Zellkulturträger aufgebracht und anschließend für drei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturträger in eine 24-Kavitäten-Platte mit bereits vorgelegten 500 µl AECG-Medium überführt. Die peripheren Lungenzellen wurden auf die obere Seite der Membran gegeben und nochmals für eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Für eine optimale Nährstoffversorgung wurden für die ersten 24 Stunden weiter 500 µl AECG-Medium über die Membran geschichtet. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde das Medium sowohl über als auch unter der Membran verworfen. Im weiteren Verlauf wurde die Co-Kultur als ALI-Kultur (*air-liquid-interface*-Kultur) und mit nur 500 µl Nährmedium in der unteren Kammer weitergeführt.

Bei den Versuchen zur akuten Toxizität wurden zwei Zeitschemen gewählt. Das erste Schema ist das 72 Stunden-Experiment. Nach dem Wechsel zu ALI-Bedingungen wurde die 3D-Co-Kultur weitere drei Tage bei ALI-Bedingungen mit 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im

Brutschrank inkubiert (Wachstumsphase). Anschließend wurden die Co-Kulturen eine Stunde mit Nanopartikelaerosolen exponiert. Im Nachgang erfolgte eine erneute Inkubation im Brutschrank mit 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 71 Stunden (Nachinkubation). Im zweiten Schema (24 Stunden-Experiment) änderten sich nur die Wachstumsphase und die Nachinkubation. Die Wachstumsphase betrug fünf Tage und die Nachinkubation 23 Stunden.

Für die längerfristigen Versuche (hier auch als chronische Versuche bezeichnet) wurden die 3D-Co-Kulturen insgesamt zweimal für eine Stunde mit NP-Aerosol exponiert. Zusätzlich wurde überprüft, ob es Unterschiede zwischen gespülten Kulturen und nicht gespülten Kulturen gab. Daraus folgte der Zeitplan für die gespülten Kulturen mit drei Tagen Wachstumsphase, drei Tagen Zwischeninkubation (Zeitraum zwischen erster und zweiter Aerosolexposition, im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit), spülen der Kulturen vor der zweiten Exposition und vier Tage Nachinkubation. Die nicht gespülten Co-Kulturen hatten, aus Gründen des Zeitmanagements der Versuche, fünf Tage Wachstumsphase, drei Tage Zwischeninkubation und vier Tage Nachinkubation (Abbildung 8).

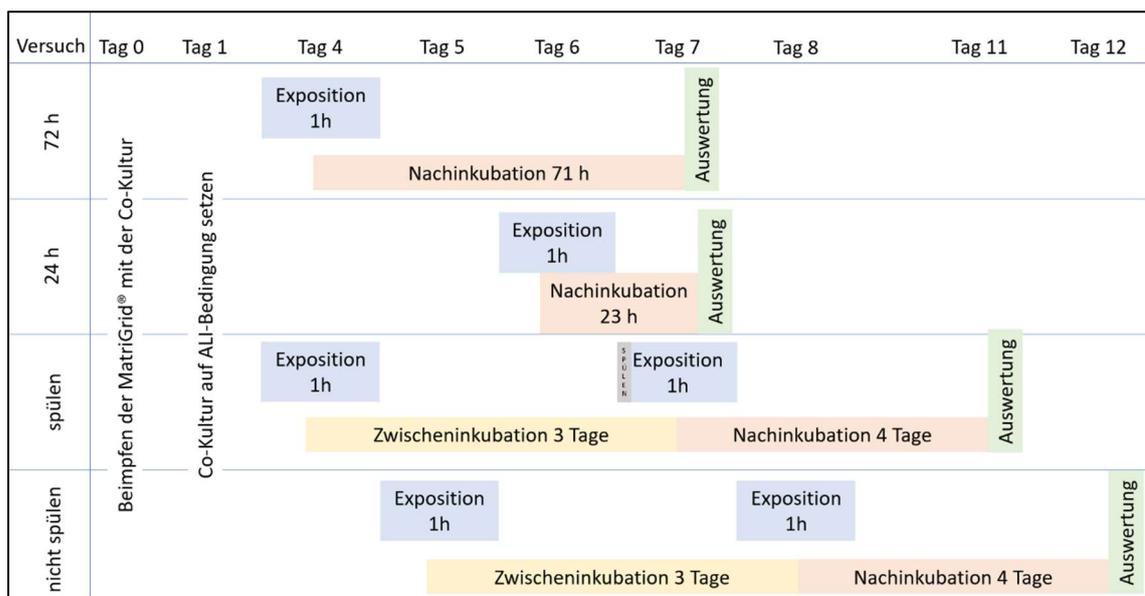


Abbildung 8: Zeitliche Übersicht der Expositionsexperimente

3.2.2. Herstellung des Nanopartikel-Aerosols

Für die Herstellung der Nanopartikel-Suspensionen wurden zunächst Stamm-Suspensionen von BaSO₄- und TiO₂-NP in bidest. Wasser hergestellt und in der Ultraschallsonde mit Beschallungsbecher behandelt (BaSO₄: drei Minuten, Energieeintrag von ca. 15 kJ; TiO₂: eine Minute; Energieeintrag von ca. 5 kJ). Die Stammsuspension wurde verdünnt, um Arbeitssuspensionen mit 0,1 g/l und 0,9 g/l zu erhalten. Die Arbeitssuspensionen wurden erneut mit Ultraschall behandelt (BaSO₄: drei Minuten, Energieeintrag von ca. 15 kJ; TiO₂: eine Minute; Energieeintrag von ca. 5 kJ). Das Protokoll wurde von Frau Sarah Thomas am Institut für

Umwelttoxikologie etabliert. Außerdem konnte Frau Thomas zeigen, dass diese Aufarbeitung zu reproduzierbaren Nanopartikelgrößenverteilungen führt (Thomas, 2020).

3.2.3. Exposition der Co-Kulturen mit Aerosol

Die Expositionsexperimente wurden von einem Computer und einem *Mastercontroller* (TSI, Shoreview, USA) gesteuert. Um den Luftstrom im System zu generieren, waren an den *Mastercontroller* ein Kompressor und eine Pumpe angeschlossen. Die Druckluft aus dem Kompressor wurde durch eine Aktivkohlekartusche und einen *Mass-flow-Controller* (MFC) zur Steuerung der Luftmenge in den PARI-Boy-Vernebler geleitet. Dieser diente zur Herstellung des Nanopartikel-Aerosols aus der Nanopartikelsuspension. Die Aerosole wurden über einen Diffusionstrockner zum Expositionsaufsatz (MALIES) geleitet. Dieser wurde im Fachgebiet Nanobiosystemtechnik der Technischen Universität Ilmenau, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Schober, entworfen und ist präzise auf die Form der TAS mit MatriGrid[®] abgestimmt (Mai *et al.*, 2014). Um stabile reproduzierbare Bedingungen sicher zu stellen wurde das Aerosol direkt am MALIES durch einen weiteren MFC und eine Vakuumpumpe abgesaugt. Der beschriebene Versuchsaufbau wurde im Unterdruck (~ -2 mbar) und mit einem Gesamtfluss von ~ 3 l/min betrieben, entsprechend einem Fluss von $\sim 0,5$ l/min über jedes MatriGrid[®] (Abbildung 9).

Bei der Exposition wurde der MALIES direkt auf je drei Kavitäten einer 24-Kavitäten-Platte mit TAS (mit MatriGrid[®]) gesetzt und für eine Stunde die 3D-Co-Kultur von oben mit Aerosol exponiert und von unten mit Hilfe einer Wärmeplatte bei 37 °C gehalten. Bei jedem Expositionsexperiment wurde ein Ausgang des MALIES genutzt, um das Aerosol hinsichtlich der Größenverteilung zu charakterisieren.

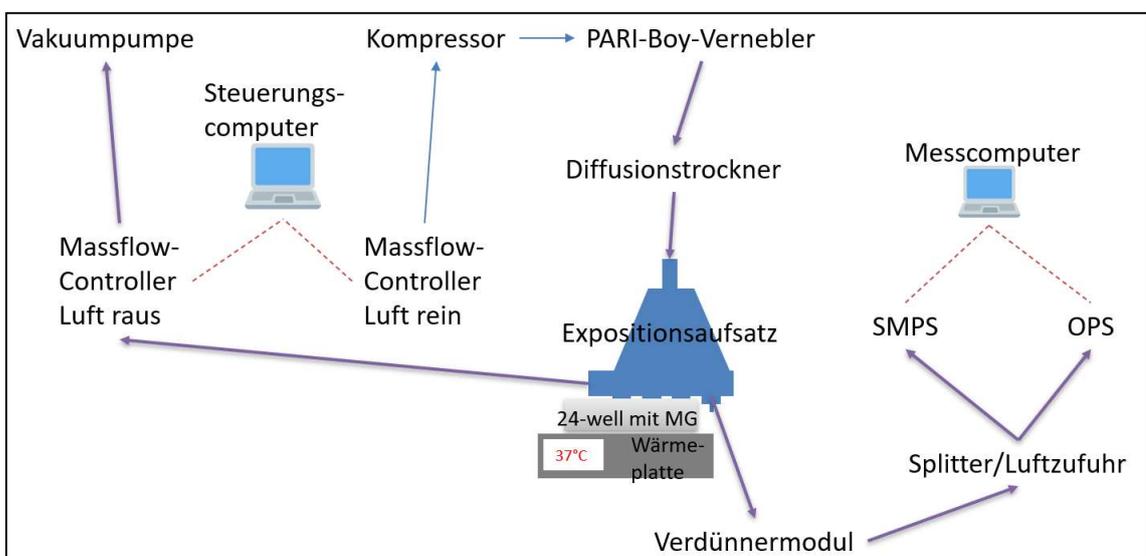


Abbildung 9: Versuchsaufbau der Expositionsexperimente.

3.2.4. Messung der Partikelgrößen im Aerosol

Die Bestimmung der Größenverteilung im Aerosol wurde mit Hilfe eines *Scanning Mobility Particle Sizer* (SMPS, TSI, Shoreview, USA) und eines *Optical Particle Sizer* (OPS, TSI, Shoreview, USA) durchgeführt.

Für Partikelgrößen bis ca. 300 nm wurde das SMPS verwendet. Das SMPS ist ein Kondensationspartikelzähler. Das Aerosol wird bei einer hohen Temperatur mit Isopropanol gesättigt. Im Kondensator wird das Gemisch anschließend wieder abgekühlt. Dabei wird die Luft übersättigt. Die Feuchtigkeit, die nicht mehr von der Luft aufgenommen werden kann, kondensiert auf der Oberfläche der Partikel. Durch die größere Oberfläche kann eine optische Messzelle nun die Partikel erfassen. Von Bedeutung bei der Messung ist das Verhältnis zwischen Geschwindigkeit des Stofftransports und der Geschwindigkeit des Wärmetransports (TSI Incorporated).

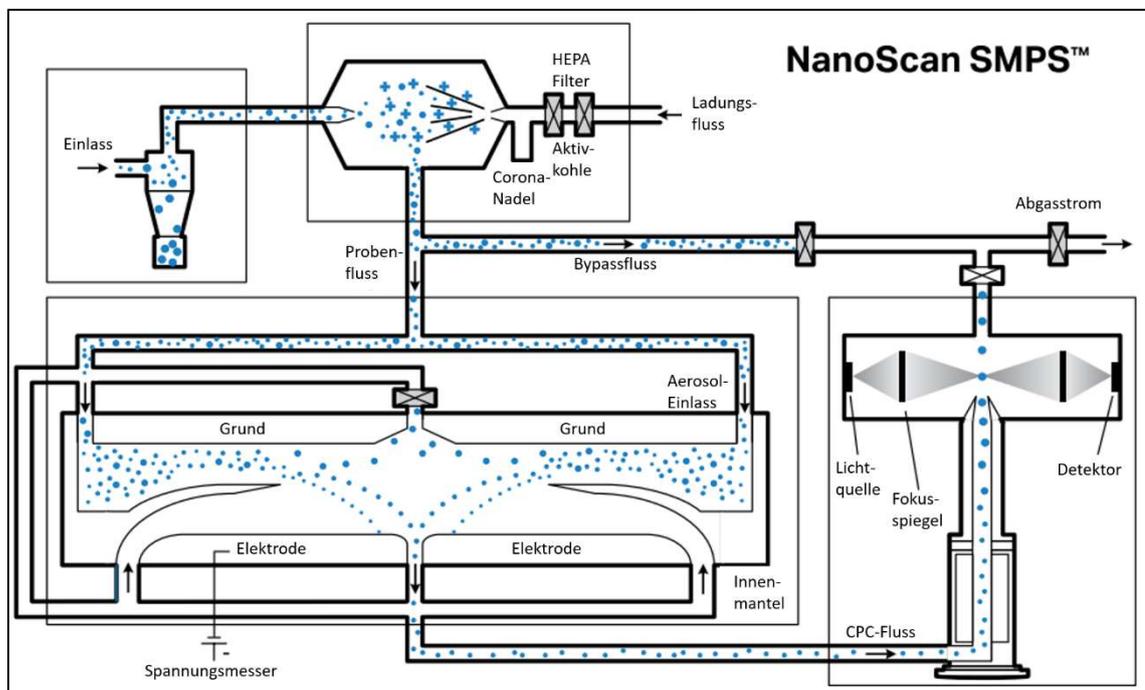


Abbildung 10: Messprinzip des Scanning Mobility Particle Sizer (nach TSI Incorporated)

Bei dem OPS kommt die optische Methode der Partikelmessung zur Anwendung. Das Aerosol wird in die optische Messzelle geleitet und mit Licht bestrahlt. Durch die Form und Größe der einzelnen Partikel wird das Licht unterschiedlich abgelenkt. Die abgelenkten Lichtstrahlen werden von einem Detektor aufgefangen und so Anzahl und Größe bestimmt (TSI Incorporated).

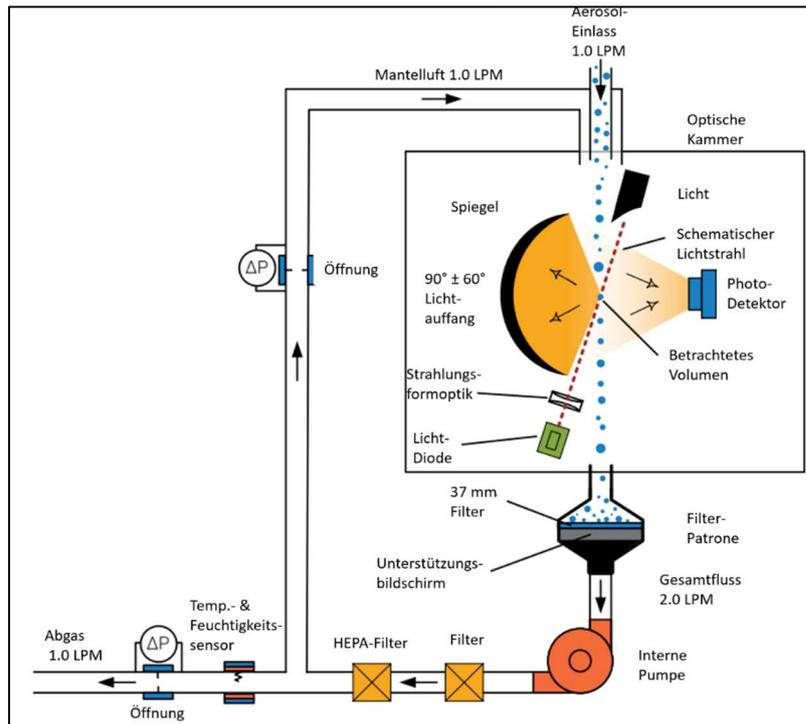


Abbildung 11: Messprinzip des Optical Particle Sizer (nach TSI Incorporated)

3.2.5. Vitalitätstest

Ein schneller und sensitiver Vitalitätstest ist der Resazurin-Test. Der Farbstoff hat keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Das oxidierte Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) hat eine blaue Farbe und wird durch mitochondriale Enzyme zu dem Farbstoff Resorufin (pink-fluoreszierend) reduziert. Die Reduktion von Resazurin zu Resorufin korreliert hierbei mit der Anzahl der lebenden Zellen (O'Brien *et al.*, 2000).

Der Resazurin-Test erfolgte nach Ablauf der Nachinkubationszeit. Die Zellen wurden auf der Membran mit vorgewärmten PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit jeweils 500 µl in der oberen und unteren Kammer mit einer Resazurin-PBS-Arbeitslösung (44 µM) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde im Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

3.2.6. Laktatdehydrogenase-Test

Der Laktatdehydrogenase-Test bestimmt die Membranintegrität der Zellen. Dabei wird die Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. LDH befindet sich normalerweise im Zytoplasma der Zelle. Bei zerstörten oder beschädigten Zellen wird LDH in das umgebende Medium abgegeben und ist somit im Überstand nachweisbar. Die Aktivität der LDH wird mit Hilfe eines enzymatischen Assays bestimmt. Bei der LDH-vermittelten Reaktion von Pyruvat zu Laktat wird NADH (Nicotinamadeninindinukleotid) verbraucht. Dieser Verbrauch von NADH

wird mittels einer kinetischen Absorptionsmessung mit einem Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Dabei zeigt die Abnahme der Extinktion die Anwesenheit von LDH an. Die Differenz der Extinktion zwischen der ersten und letzten Messung wird ins Verhältnis zur negativen Kontrolle gesetzt (Han *et al.*, 2011).

Jeweils 25 µl der Proben wurden in eine 96-Kavitäten-Platte überführt. Anschließend wurden zügig und luftblasenfrei, jeweils 125 µl 0,4 mM NADH-Lösung und 125 µl 2 mM Natrium-Pyruvatlösung hinzu pipettiert. Die Platte wurde in den Platten-Reader gestellt und die Messung über zwölf Zyklen (ein Zyklus entspricht 90 Sekunden) durchgeführt.

3.2.7. DCF-Test (ROS-Test)

Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) kann mit Hilfe des DCF-Tests nachgewiesen werden. Beim DCF-Test handelt es sich um einen Fluoreszenz-Test. Das 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) wird dabei als Fluoreszenz-Farbstoff verwendet. Das unpolare H₂DCF-DA wird von den Zellen aufgenommen und durch die intrazellulären Esterasen deacetyliert. Dadurch wird der Farbstoff reduziert und liegt nun in seiner polaren und nicht fluoreszierenden Form in der Zelle vor. Durch die reaktiven Sauerstoffspezies wird H₂DCF-DA zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Dieses kann fluorimetrisch bestimmt werden (Halliwell und Gutteridge, 2005). Die Versuchsdurchführung beruhte hauptsächlich auf der Publikation von Schmid *et al.* (2007) und den Vorarbeiten zweier Diplomarbeiten am Institut für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Kerwien, 2010; Schumann, 2012).

Für den ROS-Test wurden die Co-Kulturen auf den Zellkulturträgern konfluent kultiviert. Für die Vorinkubation mit H₂DCF-DA wurde das Zellkulturmedium entfernt. Anschließend wurde jeweils 500 µl H₂DCF-DA-Gebrauchslösung (30 µM in AECG-Medium ohne Supplement) in die obere und untere Kammer gegeben und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die H₂DCF-DA-Lösung entfernt und je 500 µl AECG-Medium unter die Membran gegeben. Danach wurden die Co-Kulturen für eine Stunde den Aerosolen ausgesetzt. Anschließend wurde auf Eis weitergearbeitet und das Kulturmedium entfernt. Die Membranen wurden mit PBS gewaschen. Für die Messung wurden je 500 µl PBS in die obere und untere Kammer gegeben. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Als Blindwerte wurden zum einen Membranen ohne Bewuchs und zum anderen Membranen mit unbehandelten Zellen verwendet, die beide nicht mit H₂DCF-DA inkubiert wurden.

3.2.8. Glutathionbestimmung

Der Glutathiongehalt wurde als Gesamt-Glutathion (GSH) bestimmt, d.h. erst nach Reduktion des oxidiert vorliegenden GSH (GSSG) mit 1,4-Dithiothreit, wurde die spezifische Derivatisierung mit Monobrombiman, modifiziert nach (Newton *et al.*), durchgeführt (Newton *et al.*, 1981). Das GSH wurde mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatografie (HPLC) bestimmt. Nach Ablauf der Nachinkubationszeit wurden die Membranen vorsichtig mit warmen PBS gewaschen und anschließend aus dem TAS geschnitten. Zum Lysieren der Zellen wurden je zwei Membranen in 250 µl 0,1 N HCl gegeben und bei -80 °C eingefroren und gelagert bis zur Weiterverarbeitung. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für drei min im Ultraschallbad behandelt. Der Ansatz wurde bei 13.000 U/min für 20 Minuten und bei 4 °C zentrifugiert, um die festen Bestandteile von den flüssigen Bestandteilen zu trennen. Aus dem Überstand erfolgte zum einen die Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (siehe 3.2.9. Proteinbestimmung) und zum anderen die Bestimmung des GSH.

Vom Überstand wurden 120 µl für die Bestimmung des GSH-Gehalts verwendet. Des Weiteren wurden 180 µl CHES und 30 µl DTT hinzugegeben und kurz gevortext. Dieses Gemisch wurde für eine Stunde bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit je 10 µl Monobrombiman (mBrB) versetzt. Die Ansätze wurden erneut gut gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (lichtgeschützt) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 250 µl 5 %iger Essigsäure abgestoppt. Vor der Messung durch die HPLC wurden die Proben gut gemischt und zentrifugiert. Als stationäre Phase wurde eine Chromolith RP-18-Säule (RP-18 100 - 4,6 mm) mit einer Chromolith RP-C18 *endcapped* Vorsäule verwendet. Als mobile Phase wurden zwei unterschiedliche Eluenten verwendet (Phase A: 2 % Methanol/ 98 % H₂O/ 0,25 % Essigsäure (pH 4,3) und Phase B: 90 % Methanol/ 10 % H₂O/ 0,25 % Essigsäure (pH 3,9)). Die Flussrate betrug 3 ml/min. Jeweils 30 µl der Proben wurden für die Messung in der HPLC verwendet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Detektor mit der Anregungswellenlänge 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm.

3.2.9. Proteinbestimmung

Für die Vergleichbarkeit der Glutathiongehalte wurde der Proteingehalt der Proben mit Hilfe von Bicinchoninsäure bestimmt und als Bezugseinheit (µg/mg Protein) verwendet. Dieser Test ist eine Kombination der Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem. Das Prinzip des BCA-Tests beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺. Dabei bilden die Cu⁺-Ionen mit BCA einen Farbkomplex, der einen kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm zulässt (Smith *et al.*, 1985).

Aus der Probenvorbereitung für die GSH-Bestimmung wurden 10 µl des Zellüberstandes der in 0,1 N HCl lysierten Zellen, mit 200 µl einer Kupfer(II)-Lösung und Bicinchoninsäure (BCA)

versetzt und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Farbumschlag wurde bei 562 nm photometrisch vermessen. Es wurde eine Verdünnungsreihe von Serumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg/ml BSA als Kalibrierung mitgeführt.

3.2.10. Inflammatorische Zytokine

Die Untersuchung einer möglichen Auswirkung auf die Expression von inflammatorischen Zytokinen durch die Nanopartikelaerosole auf die 3D-Co-Kultur ist ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Die Analysen wurden mittels ELISA durchgeführt. Es wurden Kits für Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-1 β (IL-1 β), *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) und Interferon- γ (INF- γ) verwendet.

Die Zytokine wurden aus den Überständen des Zellkulturmediums behandelter Zellen bestimmt. Die Kits wurden entsprechend der Protokolle vom Hersteller durchgeführt. Das Prinzip aller Kits ist der Sandwich-ELISA. Im ersten Schritt wurde ein *Capture* Antikörper in einer Kavitäten-Platte ausgebracht. Anschließend wurde der Überstand aus den Experimenten zu dem Antikörper gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Kavitäten mit Pufferlösung gewaschen und der Detektionsantikörper (Antikörper mit gekoppeltem Enzym) wurde in die Kavitäten gegeben. Nach weiterer Inkubation wurden die Ansätze wieder gewaschen und die Substratlösung wurde zugegeben. Im Falle der TMB-Kits wurde die Reaktion nach 20 Minuten gestoppt und die Kavitäten-Platte wurde im Platten-Photometer bei 450 nm gemessen. Bei den ABTS-Kits wurde der Farbumschlag ca. 20 Minuten mit dem Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt

3.2.11. Statistik

Die Auswertung der Rohdaten des Platten-Photometers erfolgte direkt mit Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Die graphische Darstellung aller Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA) als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde eine Friedman-ANOVA mit dem Bonferroni-Post-hoc-Test durch das Programm SPSS Statistics 25 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Da die Ergebnisse der Co-Kulturen mit Primärzellen aus dem verwendeten Patientenmaterial sehr unterschiedlich waren, wurde auf einen Vergleich zwischen den Patienten verzichtet. Aufgrund der neuesten Entwicklungen in der epidemiologischen Statistik, wurde auf den Begriff ‚signifikant‘ und die Darstellung der p-Werte verzichtet (Wasserstein *et al.*, 2019; Amrhein *et al.*, 2019).

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Nanopartikelaerosole

Die Größenverteilungen wurden bei jedem Versuch mittels eines SMPS und eines OPS gemessen. Beide Messgeräte überwachten die Aerosol-Exposition über den gesamten Zeitraum von einer Stunde. Die Größenverteilungen sind als Mittelwert aus drei Messtagen aufgetragen und als $dN/d\log DP$ dargestellt.

a) akute Toxizität

In Abbildung 12 sind drei verschiedene $BaSO_4$ -Aerosole gezeigt. Als Negativkontrolle wurde bidest. Wasser verwendet. Dem 0,1 g/l Aerosol lag eine Arbeitssuspension mit 0,1 g/l $BaSO_4$ zugrunde. Analog wurde bei dem 0,9 g/l Aerosol eine Arbeitssuspension mit 0,9 g/l $BaSO_4$ verwendet. Insgesamt wurden von SMPS und OPS $6,41 \times 10^5$ Partikel/cm³ in der Negativkontrolle, $7,32 \times 10^5$ Partikel/cm³ in dem Aerosol mit 0,1 g/l $BaSO_4$ und $1,19 \times 10^6$ Partikel/cm³ in dem Aerosol mit 0,9 g/l $BaSO_4$ gezählt. In der Negativkontrolle und der 0,1 g/l Probe sind in der Größenverteilung Maxima bei 15 nm und bei 30 nm zu sehen. Bei der Negativkontrolle sind alle Partikel kleiner als 100 nm. Die 0,1 g/l Proben zeigen einige wenige Partikel, die größer sind als 100 nm. In der Probe mit 0,9 g/l $BaSO_4$ entsteht ein kleinerer Spitzenwert als bei 0,1 g/l bei 30 nm und ein deutlicher Spitzenwert bei 100 nm. Des Weiteren wurden auch Partikel detektiert, die bis zu 300 nm groß waren.

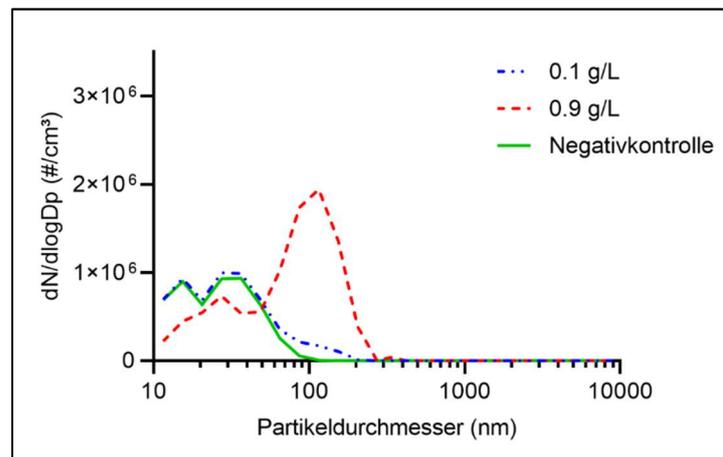


Abbildung 12: Größen-Anzahl-Verteilung des $BaSO_4$ -Aerosols der akuten Versuche ermittelt mit Hilfe von SMPS und OPS.

Die Darstellung der Größen-Anzahl-Verteilung erfolgte als $dN/\log DP$ und ist als Anzahl pro cm³ angegeben. $N = 3$; $n = 16$.

Die TiO_2 -Versuche beinhalten die drei gleichen Konzentrationen wie die $BaSO_4$ -Versuche. Die Gesamtpartikelanzahl betrug für die Negativkontrolle $6,41 \times 10^5$ Partikel/cm³, für das 0,1 g/l TiO_2 -Aerosol $7,44 \times 10^5$ Partikel/cm³ und für 0,9 g/l TiO_2 -Aerosol $2,09 \times 10^5$ Partikel/cm³. In der

Negativkontrolle ist ein Spitzenwert bei 15 nm und bei 30 nm zu sehen. Bei der Negativkontrolle sind alle Partikel kleiner als 100 nm. Die 0,1 g/l Proben zeigen eine kleine Spitze bei 15 nm und eine breitere Spitze bei 40 - 100 nm. Des Weiteren sind bis zu einer Größe von 200 nm Partikel im Aerosol vorhanden. In der Probe mit 0,9 g/l BaSO₄ entsteht eine kleine Spitze bei 30 nm und ein deutlicher Spitzenwert bei 100 nm. Das OPS misst Partikel bis zu einer Größe von 400 nm (Abbildung 13).

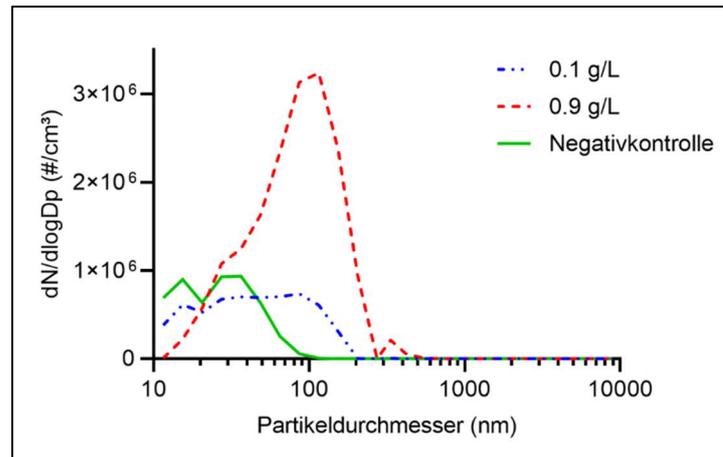


Abbildung 13: Größen-Anzahl-Verteilung des TiO₂-Aerosols der akuten Versuche ermittelt mit Hilfe von SMPS und OPS.

Die Darstellung der Größen-Anzahl-Verteilung erfolgte als $dN/\log DP$ und ist als Anzahl pro cm^3 angegeben. $N = 3$; $n = 16$.

b) chronische Toxizität

Bei den Experimenten mit wiederholter Aerosolexposition wurden ebenfalls die drei bereits genannten verschiedenen Aerosole verwendet. Die Gesamtpartikelanzahl der BaSO₄-Versuche lag in der Negativkontrolle bei $9,02 \times 10^5$ Partikel/ cm^3 , für die 0,1 g/l Probe bei $6,52 \times 10^5$ Partikel/ cm^3 und in der 0,9 g/l Probe bei $9,46 \times 10^5$ Partikel/ cm^3 . In der Abbildung 14 sieht man erneut Spitzenwerte in der Negativkontrolle und bei der 0,1 g/l Probe bei 15 nm und 30 nm. Die 0,9 g/l Proben zeigen Spitzenwerte bei 25 nm und bei 100 nm. Auch hier wurden Partikel bis zu einer Größe von 300 nm detektiert (Abbildung 14).

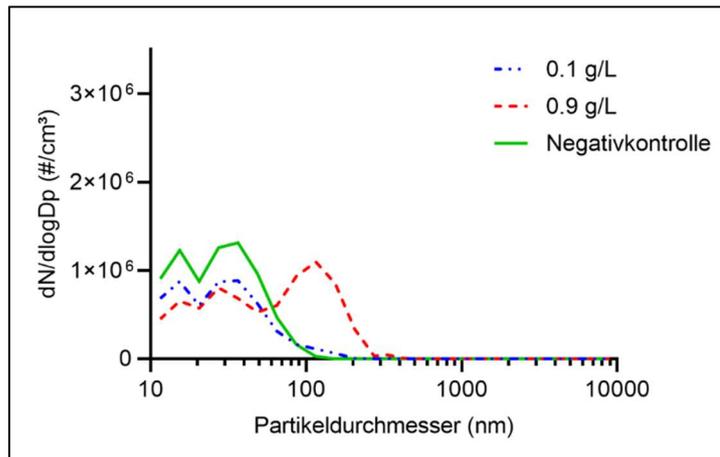


Abbildung 14: Größen-Anzahl-Verteilung des BaSO₄-Aerosols der chronischen Versuche ermittelt mit Hilfe von SMPS und OPS.

Die Darstellung der Größen-Anzahl-Verteilung erfolgte als dN/logDP und ist als Anzahl pro cm³ angegeben. N = 3; n = 16.

Die chronischen TiO₂-Versuche wurden ebenfalls mit den drei Konzentrationen durchgeführt. In der Negativkontrolle wurden insgesamt 9,02x10⁵ Partikel/cm³, in der 0,1 g/l Probe 8,84x10⁵ Partikel/cm³ und in der 0,9 g/l Probe 1,81x10⁶ Partikel/cm³ erfasst. In Abbildung 15 sind erneut die zwei Spitzenwerte bei 15 nm und 30 nm der Negativkontrolle zu erkennen. Auch bei den Proben mit 0,1 g/l und 0,9 g/l TiO₂ sind die Spitzenwerte wie bei den akuten Versuchen zu sehen.

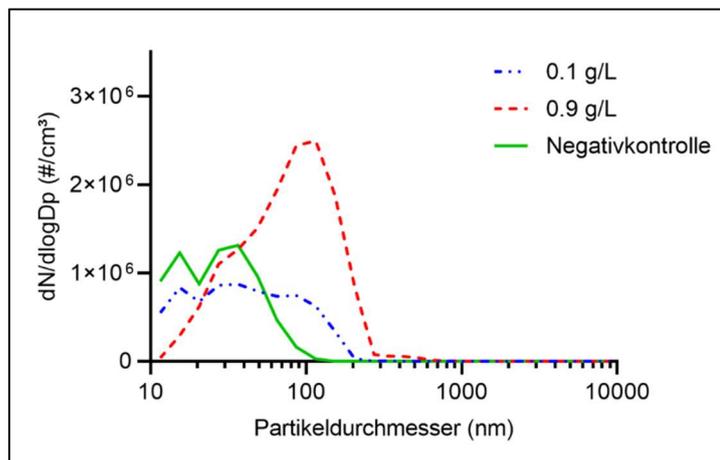


Abbildung 15: Größen-Anzahl-Verteilung des TiO₂-Aerosols der chronischen Versuche ermittelt mit Hilfe von SMPS und OPS.

Die Darstellung der Größen-Anzahl-Verteilung erfolgte als dN/logDP und ist als Anzahl pro cm³ angegeben. N = 3; n = 16.

4.2. Vitalität der 3D-Zellkultur

Die 3D-Co-Kulturen wurden mit unterschiedlichen Aerosolen exponiert und anschließend die Vitalität mit Hilfe des Resazurin-Assays gemessen. Die Werte sind relativ zur Negativkontrolle angegeben.

a) akute Toxizität

Die Verläufe der Vitalitätswerte der Zellkulturen der verschiedenen Patienten unterscheiden sich deutlich. Die Kulturen der Patienten 332 und 338 zeigen einen dosisabhängigen Abfall der Vitalität sowohl nach der 24-Stunden als auch nach 72-Stunden-Exposition mit BaSO₄. Diese ist nach 24 Stunden bei der 3D-Kultur des Patienten 332 sehr deutlich zu sehen mit einem Abfall auf 22 %. Die Co-Kultur des Patienten 341 zeigt ebenfalls einen dosisabhängigen Abfall nach einer 24-Stunden-Exposition mit BaSO₄. Jedoch ist nach der 72-Stunden-Exposition ein Anstieg der Vitalität bis auf 127 % zu sehen (Abbildung 16A-C; Tabelle 5)

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der relativen Vitalität der 3D-Co-Kulturen nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosol ermittelt durch den Resazurin-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgte prozentual im Vergleich zu einer mit Aerosol-Kontrolle ohne NP (100 % Vitalität) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	24 Stunden			72 Stunden		
	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341
0,1 g/l BaSO ₄	46 ± 11	85 ± 40	112 ± 19	103 ± 25	90 ± 20	95 ± 21
0,9 g/l BaSO ₄	22 ± 23	67 ± 33	85 ± 14,5	87,5 ± 6	83 ± 10	127 ± 12
0,1 g/l TiO ₂	50 ± 6,5	57 ± 40	65,5 ± 4	70 ± 15	66 ± 24	98 ± 13
0,9 g/l TiO ₂	67 ± 16	82 ± 18	98 ± 13	101 ± 10	66 ± 7	111 ± 22

Nach den Expositionen der 3D-Kulturen mit dem TiO₂-Aerosol zeichnet sich ein deutlich anderes Bild als bei den BaSO₄-Versuchen ab. In den Kulturen aller Patienten wird die Vitalität stärker von der niedrigen Konzentration beeinträchtigt. Den deutlichsten Abfall sieht man bei Patient 332 mit einer Vitalität von 50 % nach einer 24-Stunden-Exposition. Nach der 72-Stunden-Exposition mit TiO₂-Aerosol kann in der niedrigen Konzentration auch eine kleine Abnahme erkannt werden. Jedoch kehrt sich dieser, in der hohen Konzentration bei den Patienten 332 und 341, in einen leichten Anstieg um (Abbildung 16D-F; Tabelle 5).

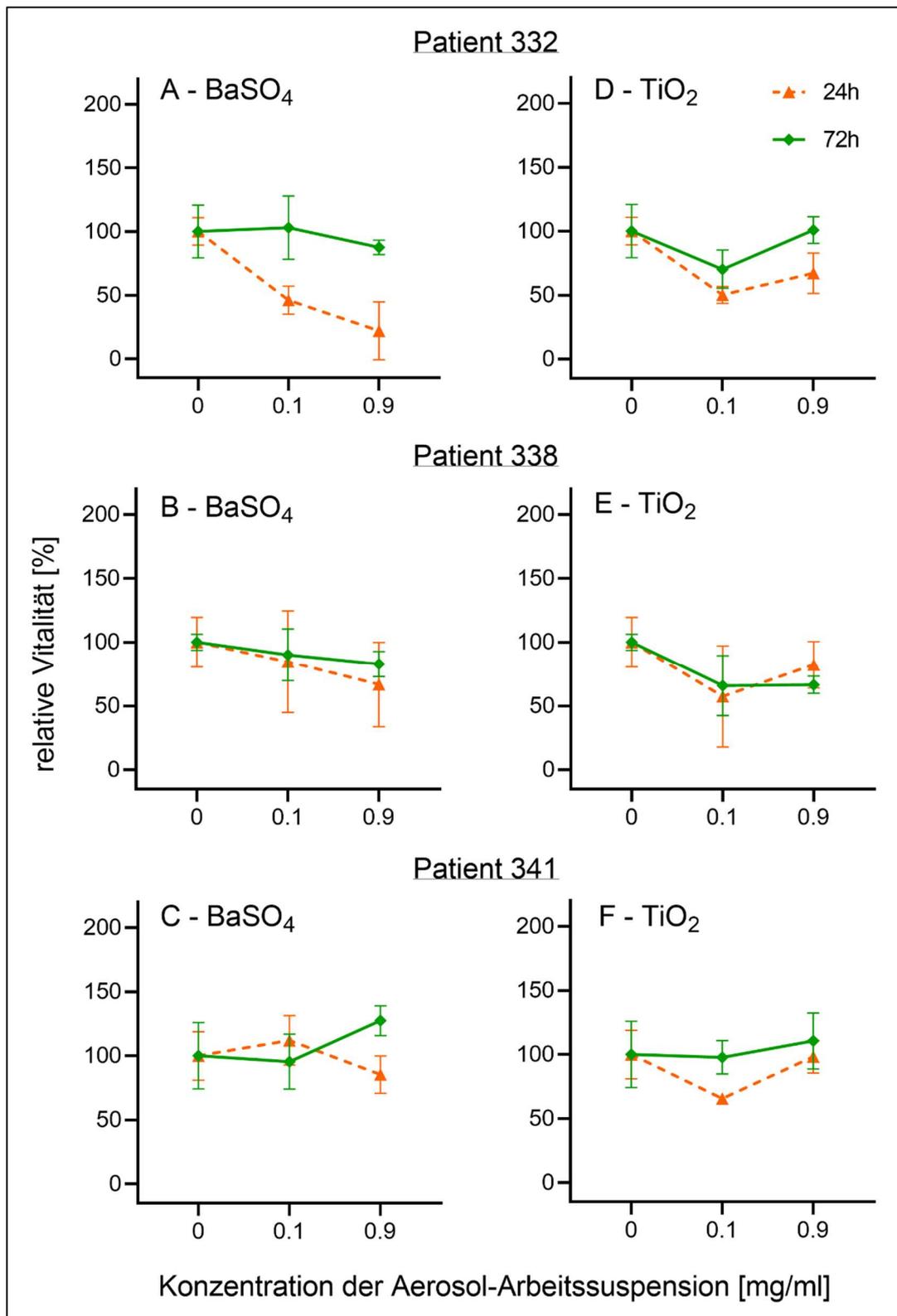


Abbildung 16: Grafische Darstellung der relativen Vitalität der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO₄- (A-C) und TiO₂-NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den Resazurin-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgte prozentual im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (100 % Vitalität) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

b) chronische Toxizität

In den Graphen der mehrmaligen BaSO₄-Exposition gibt es kein einheitliches Bild. Jede Co-Kultur der verschiedenen Patienten reagiert unterschiedlich auf das Nanopartikel-Aerosol. Die Kulturen der Patienten zeigen einen dosisabhängigen Abfall der Vitalität nach einer zweimaligen Exposition mit Spülung. Die 3D-Kultur von Patient 332 fällt sogar auf einen Vitalitätswert von 33 %. Die Kultur von Patient 334 zeigt in beiden Experiment-Aufbauten einen Abfall gegenüber der Kontrolle. Jedoch ist kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen zu erkennen. Wie bereits erwähnt, ist ein Abfall der Vitalität im Spül-Versuch bei der Co-Kultur von Patient 341 zu sehen. Im Nicht-Spül-Versuch ist dagegen ein deutlicher Anstieg bis auf 163 % zu verzeichnen (Abbildung 17A-C; Tabelle 6).

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der relativen Vitalität nach mehrfacher mit BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosol ermittelt durch den Resazurin-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgte prozentual im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (100 % Vitalität) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	spülen			nicht spülen		
	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341
0,1 g/l BaSO ₄	63 ± 30,5	70 ± 6	93 ± 34	77 ± 24	49 ± 4	106 ± 38
0,9 g/l BaSO ₄	33 ± 16,5	72,5 ± 9	61 ± 27,5	72,5 ± 5,5	57 ± 7	163 ± 39
0,1 g/l TiO ₂	0	34 ± 19	79 ± 40	68 ± 14	34 ± 24	100 ± 48
0,9 g/l TiO ₂	5 ± 5	72 ± 15	101 ± 14	78 ± 42	61 ± 10	116 ± 30

Nach einer mehrmaligen TiO₂-Exposition ist zu erkennen, dass in den Kulturen der Patienten 332 und 341 das Spülen einen größeren Einfluss auf die Vitalität der Kultur hat, im Vergleich zum nicht Spülen. Für die Co-Kultur von Patient 332 bedeutet dies sogar einen Abfall der Vitalität auf einen Wert von 0 %. Die 3D-Zellkultur des Patienten 338 zeigt keine Unterschiede zwischen den beiden Experimentaufbauten. Bei allen Kulturen steigt die Vitalität von der niedrigen zur hohen Konzentration an. Am deutlichsten wird dies bei der Co-Kultur des Patienten 338. Hier steigt die Vitalität von 34 % in der niedrigen Konzentration (in beiden Aufbauten) auf 72 % (spülen) und 61 % (nicht spülen) an (Abbildung 17D-F; Tabelle 6).

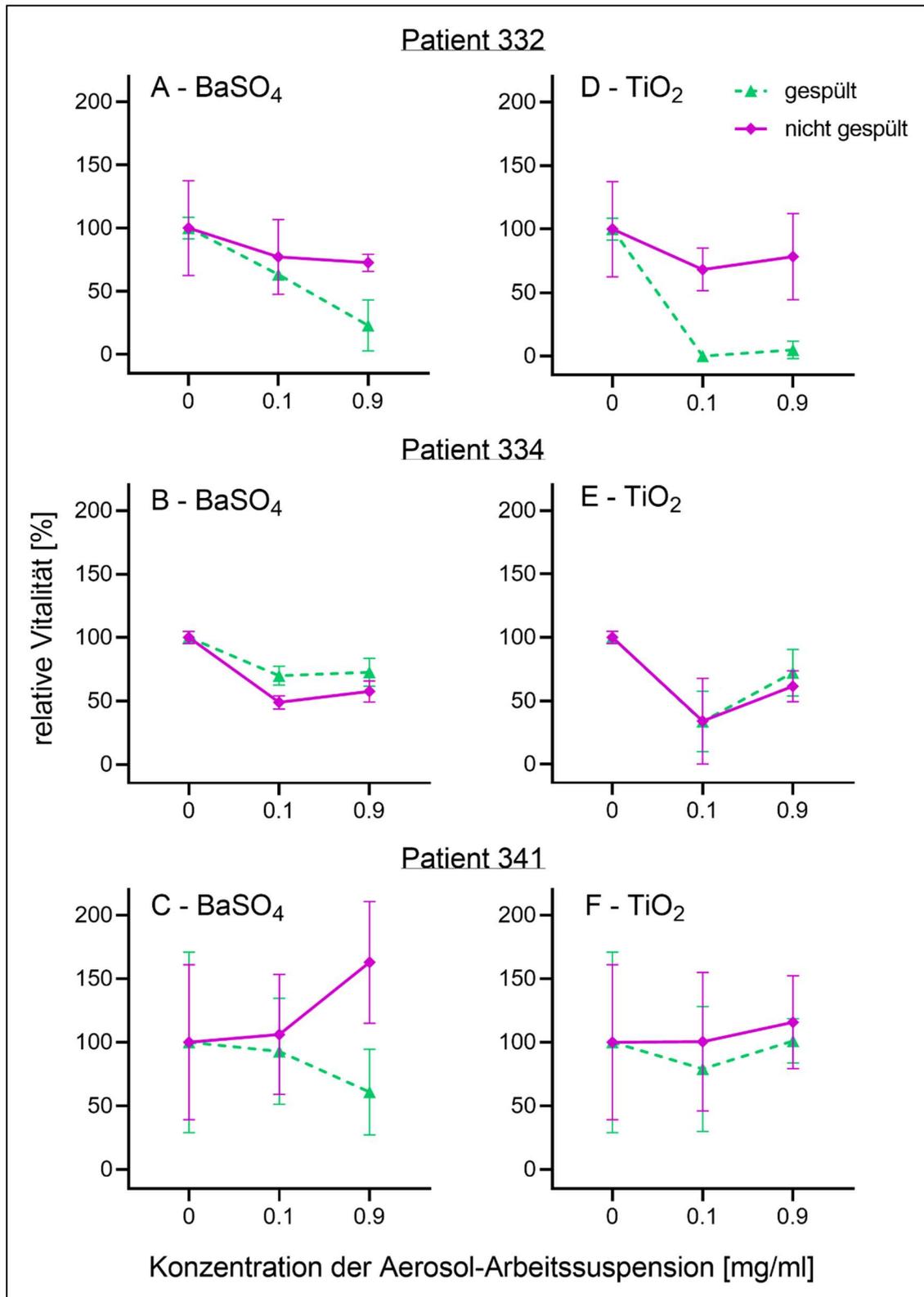


Abbildung 17: Grafische Darstellung der relativen Vitalität der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger Exposition mit BaSO₄- (A-C) und TiO₂-NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den Resazurin-Test.

Die Darstellung der Vitalität erfolgte prozentual im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (100 % Vitalität) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

4.3. Membranintegrität der 3D-Zellkultur

Die Membranintegrität wurde durch die zytosolische Laktatdehydrogenase (LDH) im umgebenden Medium bestimmt. Es wurden die Mediumüberstände der Vitalitätsexperimente verwendet. Die Negativkontrolle wurde auf eins normiert und alle anderen Proben als relative Werte gegen die Negativkontrolle aufgetragen.

a) akute Toxizität

Die LDH-Gehalte der Co-Kulturen der verschiedenen Patienten zeigen, wie bereits bei der Vitalität Unterschiede. In der Kultur des Patienten 332 ist in der niedrigen Konzentration nach der 24-Stunden-Exposition mit BaSO₄ kein Effekt zu sehen. Die hohe Konzentration nimmt dagegen in derselben Zeitspanne ab. Nach der 72-Stunden-Exposition kehrt sich das Bild um. In der niedrigen Konzentration ist ein leichter Abfall erkennbar und in der hohen Konzentration eine Zunahme zu sehen. In der 3D-Zellkultur des Patienten 338 ist nur ein Anstieg nach der 24-Stunden-Exposition mit BaSO₄ in der niedrigen Konzentration zu beobachten. Bei allen anderen Konzentrationen und Zeitpunkten sind keine Veränderungen des LDH-Gehaltes gegenüber der Negativkontrolle zu verzeichnen. Die Zellkultur des Patienten 341 zeigt eine dosisabhängige Abnahme des LDH-Gehaltes nach der 24-Stunden-Exposition mit BaSO₄ bis auf das 0,72-fache der Negativkontrolle. Nach der 72-Stunden-Exposition fallen beide Konzentrationen dosisunabhängig ab (Abbildung 18A-C; Tabelle 7).

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung des relativen LDH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosol ermittelt durch den Laktatdehydrogenase-Test.

Die Darstellung des LDH-Gehaltes erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (LDH-Gehalt = 1) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	24 Stunden			72 Stunden		
	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341
0,1 g/l	1,07 ±	1,3 ±	0,79 ±	0,91 ±	0,93 ±	0,73 ±
BaSO ₄	0,05	0,38	0,32	0,25	0,14	0,09
0,9 g/l	0,53 ±	1,06 ±	0,72 ±	1,12 ±	0,96 ±	0,8 ±
BaSO ₄	0,14	0,09	0,02	0,4	0,08	0,15
0,1 g/l	1,09 ±	1,71 ±	0,55 ±	0,95 ±	0,99 ±	0,46 ±
TiO ₂	0,14	0,18	0,15	0,34	0,09	0,15
0,9 g/l	0,75 ±	1,45 ±	0,44 ±	0,83 ±	1,04 ±	0,57 ±
TiO ₂	0,34	0,23	0,1	0,09	0,02	0,29

Die LDH-Gehalte der Kulturen der verschiedenen Patienten nach einer TiO_2 -Exposition haben Ähnlichkeit mit den Gehalten nach einer BaSO_4 -Exposition. Wie auch beim BaSO_4 ist ein Anstieg des LDH-Gehaltes in der niedrigen Konzentration nach der 24-Stunden-Exposition bei Patient 332 zu sehen. Bei weiteren 48 Stunden Exposition mit TiO_2 ist ein dosisabhängiger Abfall des Gehaltes bis auf das 0,83-fache im Vergleich zur Negativkontrolle zu beobachten. Die 3D-Kultur von Patient 338 zeigt nach einer 24-stündigen Exposition mit TiO_2 -Aerosol einen deutlichen Anstieg. In der niedrigen Konzentration steigt der LDH-Gehalt sogar bis auf das 1,71-fache im Vergleich zur Negativkontrolle. Nach der 72-stündigen Exposition mit TiO_2 -Aerosol zeigt die Kultur des Patienten 338 keine Veränderungen des LDH-Gehaltes. Wie bereits bei der BaSO_4 -Exposition der Co-Kultur von Patient 341 ist ein dosisabhängiger Abfall des LDH-Gehaltes nach 24 Stunden zu beobachten. Dieser ist deutlicher als beim BaSO_4 . Exponiert man die Kulturen des Patienten 341 weitere 48 Stunden mit TiO_2 -Aerosol fällt der LDH-Gehalt in beiden Konzentrationen stark ab (Abbildung 18D-F; Tabelle 7).

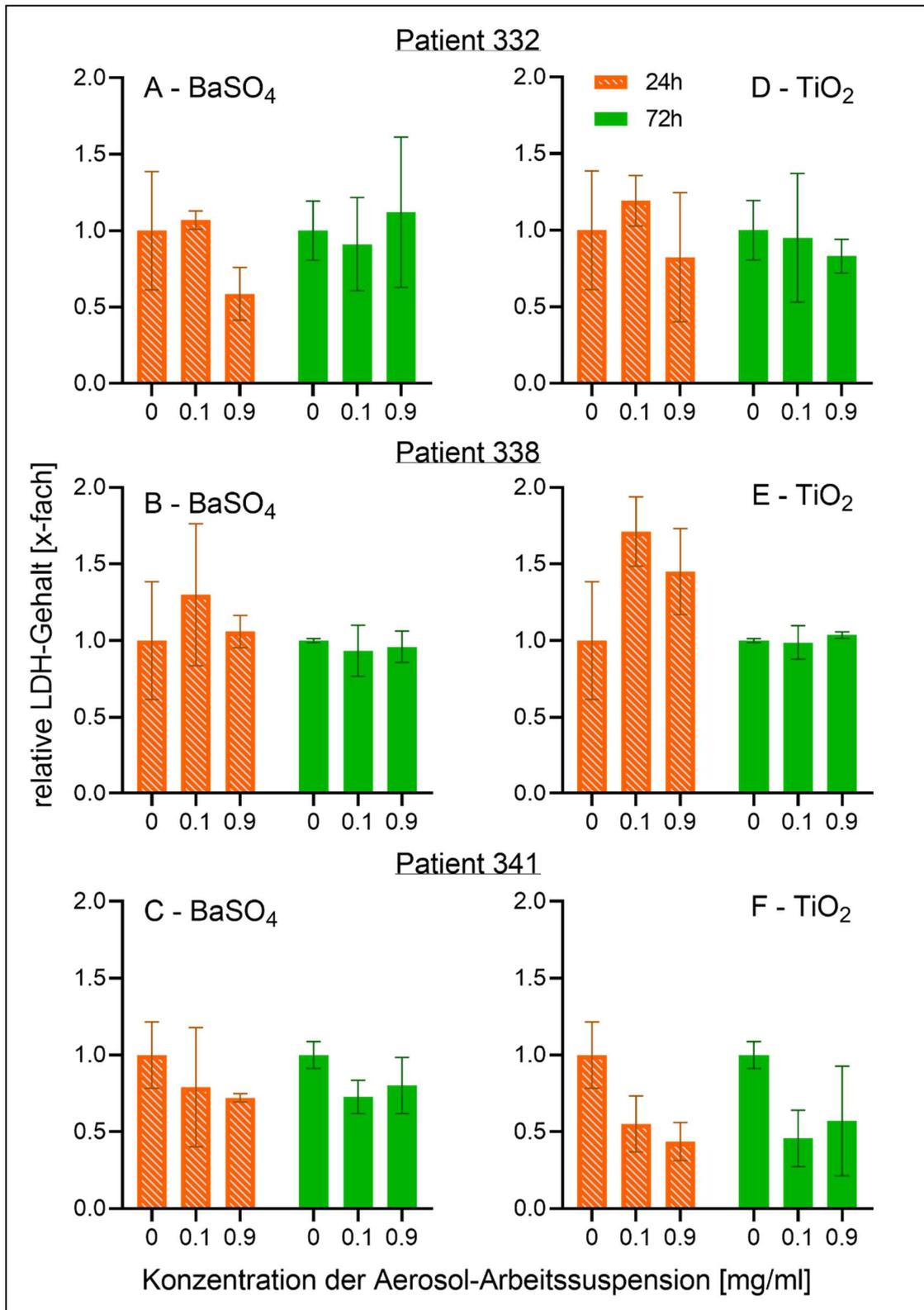


Abbildung 18: Grafische Darstellung des relativen LDH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO₄- (A-C) und TiO₂-NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den Laktatdehydrogenase-Test.

Die Darstellung des LDH-Gehaltes erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (LDH-Gehalt = 1) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

b) chronische Toxizität

Bei einer ungespülten Behandlung mit BaSO₄-Aerosol zeigt sich keine Veränderung der Membranintegrität der Co-Kulturen des Patienten 332. Wurden die Zellen jedoch gespült, fällt der LDH-Gehalt dosisabhängig bis auf das 0,55-fache ab. Ein anderes Bild zeigen die Ergebnisse der 3D-Zellkulturen von Patient 334. Es ist ein deutlicher Abfall der LDH-Werte bei beiden Behandlungsarten zu sehen. Die Kultur des Patienten 341 spricht auf die Behandlungen unterschiedlich an. Im ‚Spül‘-Experiment fallen die LDH-Gehalte dosisabhängig bis auf das 0,66-fache im Vergleich zur Negativkontrolle. Die ungespülten Proben zeigen dagegen im Vergleich zur Kontrolle einen Abfall in der niedrigen Konzentration und einen Anstieg in der hohen Konzentration (Abbildung 19A-C; Tabelle 8).

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung des relativen LDH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach mehrmaliger Exposition mit BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosol ermittelt durch den Laktatdehydrogenase-Test.

Die Darstellung des LDH-Gehaltes erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (LDH-Gehalt = 1) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	spülen			nicht spülen		
	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341
0,1 g/l BaSO ₄	0,67 ± 0,39	0,61 ± 0,39	0,92 ± 0,21	0,95 ± 0,05	0,65 ± 0,07	0,89 ± 0,12
0,9 g/l BaSO ₄	0,55 ± 0,21	0,55 ± 0,42	0,66 ± 0,21	0,94 ± 0,03	0,63 ± 0,02	1,23 ± 0,21
0,1 g/l TiO ₂	0,2 ± 0,11	0,33 ± 0,04	1,05 ± 0,22	0,98 ± 0,03	0,39 ± 0,12	1,12 ± 0,29
0,9 g/l TiO ₂	0,39 ± 0,11	0	0,84 ± 0,05	0,86 ± 0,19	0,64 ± 0,03	1,15 ± 0,33

Die chronischen Versuche mit TiO₂-Aerosol zeigen wieder sehr unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Patienten. Die ungespülte Behandlung beeinflusst die Zellen von Patient 332 kaum, wohingegen bei der gespülten Behandlungsart der LDH-Gehalt auf das 0,2-fache in der niedrigen Konzentration fällt. Die gespülte Behandlung hat auch auf die Co-Kultur des Patienten 334 einen sehr großen Einfluss. In der hohen Konzentration des TiO₂-Aerosols kann kein LDH mehr nachgewiesen werden. Die nicht gespülten Co-Kulturen zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle einen deutlichen Abfall. Der LDH-Gehalt der 3D-Kultur des Patienten 341 steigt in den ungespülten Proben leicht an. Die gespülten Proben zeigen in der niedrigen Konzentration einen leichten Anstieg und einen Abfall in der hohen Konzentration (Abbildung 19D-F; Tabelle 8).

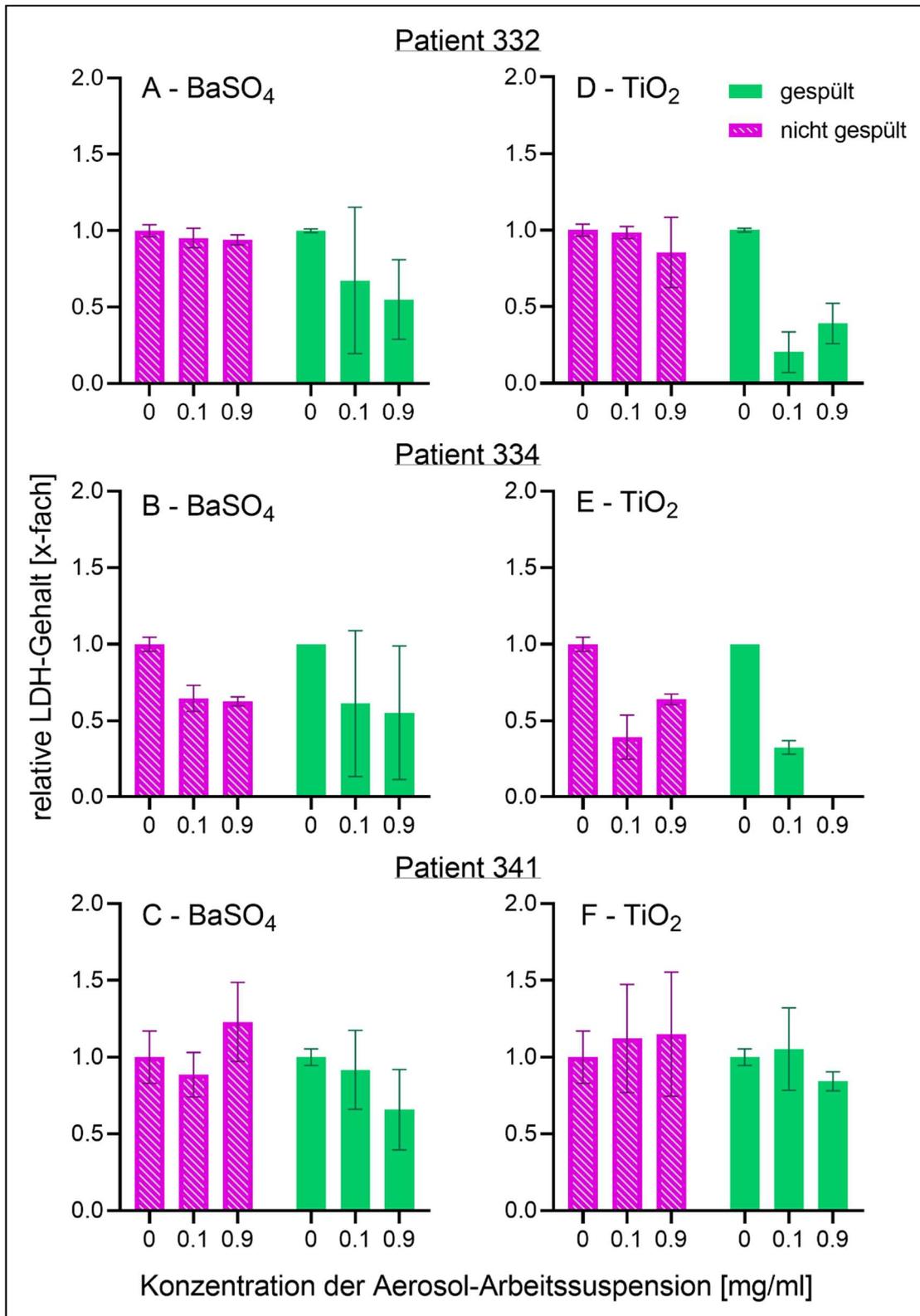


Abbildung 19: Grafische Darstellung des relativen LDH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger Exposition mit BaSO₄- (A-C) und TiO₂-NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den Laktatdehydrogenase-Test.

Die Darstellung des LDH-Gehaltes erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (LDH-Gehalt = 1) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

4.4. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der 3D-Zellkultur

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde aufgrund der hohen Reaktivität bereits nach einer Stunde gemessen. Die Negativkontrolle ist auf eins normiert und alle anderen Konzentrationen wurden mit dieser ins Verhältnis gesetzt.

Die Kulturen aller drei Patienten zeigen einen deutlichen Abfall der ROS-Gehalte nach einer BaSO₄-Exposition. Dabei ist bei der Kultur von Patient 334 kein Unterschied zwischen der hohen und niedrigen Konzentration zu sehen. Bei den 3D-Kulturen von Patient 337 und 338 fällt der ROS-Gehalt der niedrigeren Konzentration etwas mehr ab als die hohe Konzentration (Abbildung 20A-C; Tabelle 9).

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung des relativen ROS-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach einstündiger Exposition mit BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosol ermittelt durch den DCF-Test. Die Darstellung des ROS-Gehaltes erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (ROS-Gehalt = 1) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	Pat. 334	Pat. 337	Pat. 338
0,1 g/l BaSO ₄	0,3 ± 0,09	0,27 ± 0,04	0,14 ± 0,03
0,9 g/l BaSO ₄	0,28 ± 0,02	0,31 ± 0,06	0,22 ± 0,03
0,1 g/l TiO ₂	0,29 ± 0,01	0,65 ± 0,20	0,81 ± 0,15
0,9 g/l TiO ₂	0,3 ± 0,005	0,37 ± 0,09	0,41 ± 0,08

Nach einer Exposition mit TiO₂-Aerosol zeigen die Co-Kulturen der drei Patienten einen dosisabhängigen Abfall des ROS-Gehaltes. Der ROS-Gehalt der 3D-Co-Kultur von Patient 334 fällt bis auf das 0,3-fache, von Patient 337 bis auf das 0,37-fache und Patient 338 bis auf das 0,41-fache (Abbildung 20D-F; Tabelle 9).

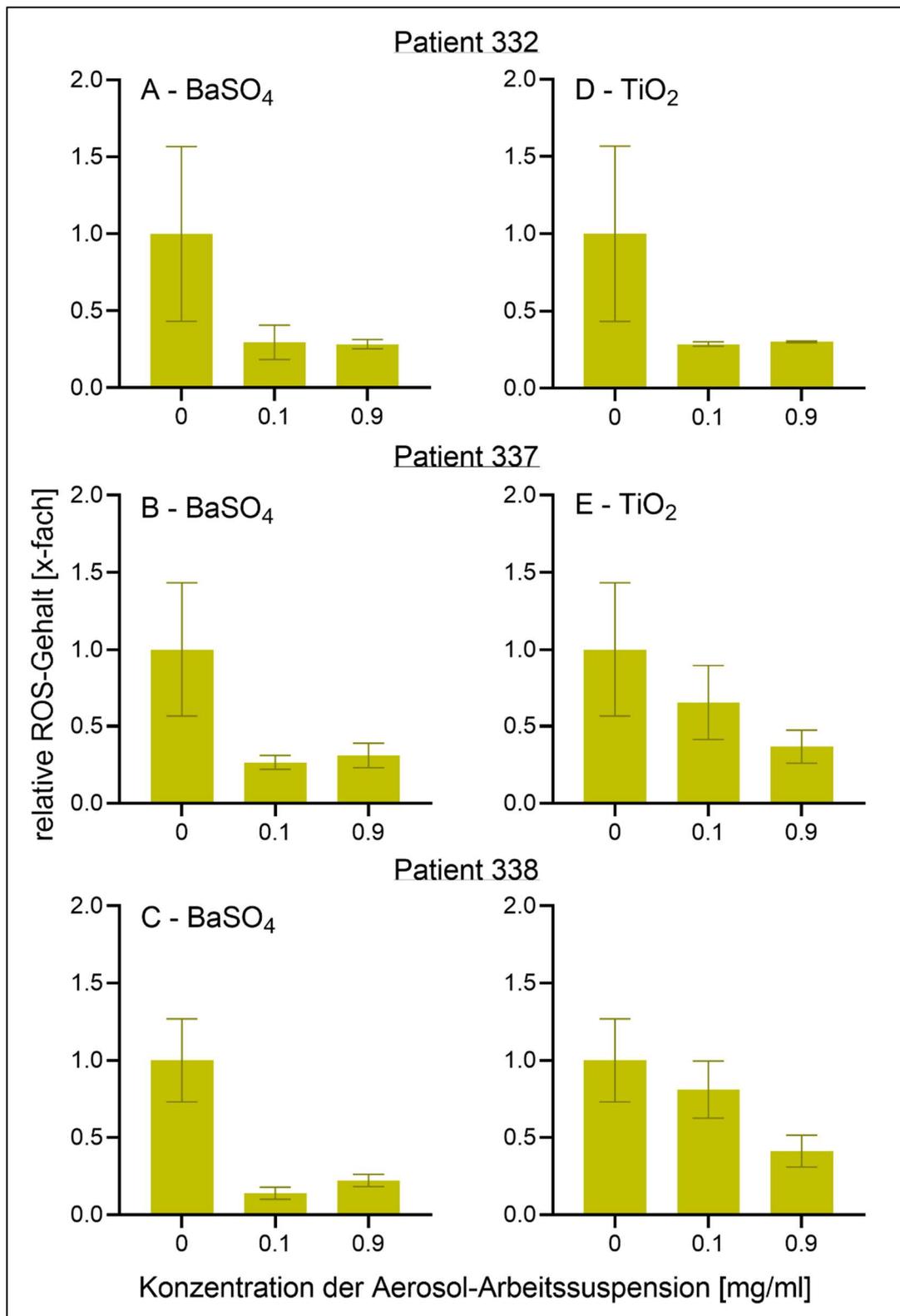


Abbildung 20: Grafische Darstellung des relativen ROS-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach einstündiger Exposition mit BaSO₄- (A-C) und TiO₂-NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch den DCF-Test.

Die Darstellung des ROS-Gehaltes erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (ROS-Gehalt = 1) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

4.5. Glutathiongehalt der 3D-Zellkultur

Die Bestimmung des Glutathions erfolgte mit Hilfe einer Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender Detektion durch eine HPLC. Die GSH-Werte wurden auf den Proteingehalt der Zelle normiert und sind als relativer GSH-Gehalt dargestellt.

a) akute Toxizität

Die Antwort der Zellen auf oxidativen Stress, ausgelöst durch die BaSO₄-Aerosole, unterscheidet sich sehr zwischen den verschiedenen Patienten. Der GSH-Gehalt der Co-Kultur des Patienten 332 sinkt in der niedrigen Konzentration und steigt in der hohen Konzentration nach einer 24-Stunden-Exposition. Der 72-Stunden-Versuch zeigt ein Anstieg des Glutathions in beiden Konzentrationen. In Abbildung 21B sind die GSH-Gehalte der Zellkultur des Patienten 338 dargestellt. Es ist zu sehen, dass beide Behandlungszeiten einen dosisabhängigen Abfall des GSH-Gehaltes hervorrufen. Die 3D-Kultur des Patienten 341 zeigt einen Anstieg des Glutathions in der niedrigen Konzentration sowohl nach 24 also auch nach 72 Stunden. Gegenüber der niedrigen Konzentration fällt der GSH-Gehalt nach 24 deutlich und nach 72 Stunden leicht ab (Abbildung 21A-C; Tabelle 10).

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des relativen GSH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosol ermittelt durch Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender HPLC.

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgte prozentual im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (GSH-Gehalt = 100 %) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	24 Stunden			72 Stunden		
	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341
0,1 g/l BaSO ₄	64,5 ± 5	89 ± 19	212 ± 9	140 ± 59	104 ± 12	139 ± 8
0,9 g/l BaSO ₄	213 ± 78	55 ± 12	90 ± 78	123 ± 5,5	86 ± 12	133,5 ± 0,6
0,1 g/l TiO ₂	198 ± 17	103 ± 17	13 ± 5	54 ± 3	119 ± 16	137 ± 6
0,9 g/l TiO ₂	98 ± 14	84 ± 2	24 ± 14	69 ± 29	103 ± 4	142 ± 24,5

Die Zellkultur des Patienten 332 zeigt keine dosisabhängige GSH-Produktion nach einer TiO₂-Exposition. Es ist ein Anstieg in der niedrigen Konzentration und ein leichter Abfall in der hohen Konzentration nach der 24-Stunden-Exposition zu sehen. Nach einer 72-stündigen Exposition mit TiO₂-Aerosol fallen die GSH-Gehalte sowohl in der niedrigen Konzentration als auch in der hohen Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle. Die GSH-Werte der Co-Kultur des

Patienten 338 unterscheiden sich im Mittel nicht mehr als 20 % von der Negativkontrolle und ähneln damit denen aus der BaSO₄-Exposition. Die deutlichsten Auswirkungen auf den GSH-Gehalt zeigt die Kultur des Patienten 341. Im 24-Stunden-Versuch fällt der GSH-Gehalt auf 12 % in der niedrigen Konzentration und auf 24 % in der hohen Konzentration. Dagegen ist ein dosisabhängiger Anstieg nach der 72-stündigen Exposition zu erkennen (Abbildung 21D-F; Tabelle 10).

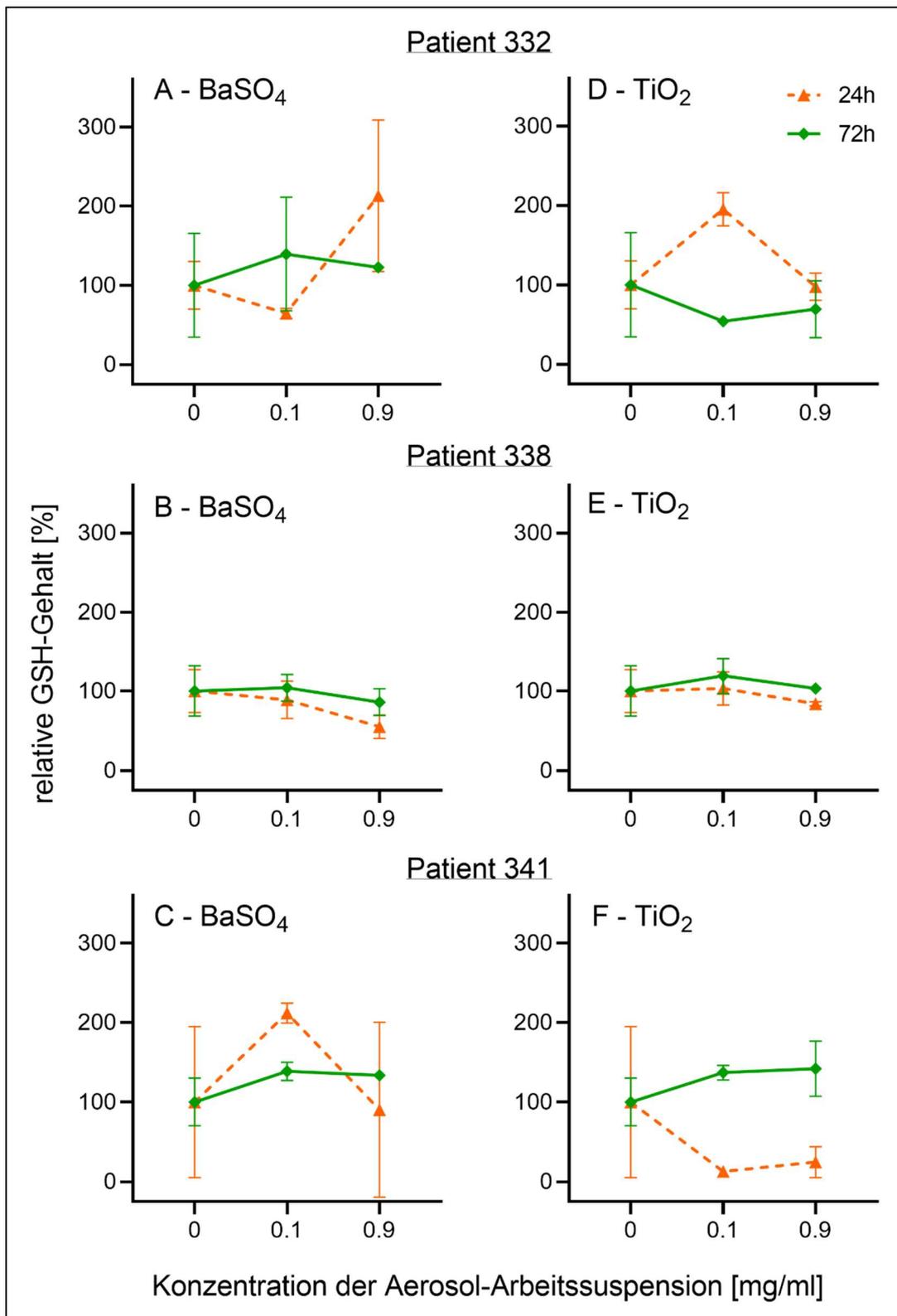


Abbildung 21: Grafische Darstellung des relativen GSH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24 und 72 Stunden Exposition mit BaSO₄- (A-C) und TiO₂-NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender HPLC.

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgte prozentual im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (GSH-Gehalt = 100 %) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

b) chronische Toxizität

Nach zweimaliger Exposition mit BaSO₄-Aerosol steigen die Glutathion-Werte der 3D-Kultur des Patienten 332 im gespülten und nicht gespülten Versuch an (beides in der hohen Konzentration). Die Zellkultur des Patienten 334 wird durch die gespülte oder ungespülte Behandlung kaum beeinflusst. Die größte Abweichung von der Negativkontrolle ist dabei die gespülte 0,9 g/l BaSO₄-Behandlung mit einer Repression auf 66 %. Eine Zunahme des GSH-Gehaltes ist bei der Kultur des Patienten 341 im ‚Spülversuch‘ mit der niedrigen Konzentration zu erkennen. Die ungespülte Exposition zeigt nahezu keine Auswirkung auf das GSH der 3D-Co-Kultur (Abbildung 22A-C; Tabelle 11).

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung des relativen GSH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen nach mehrmaliger Exposition mit BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosol ermittelt durch Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender HPLC.

Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgte prozentual im Vergleich zu einer mit Aerosol-Kontrolle ohne NP (GSH-Gehalt = 100 %) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	spülen			nicht spülen		
	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341
0,1 g/l BaSO ₄	222,5 ± 19	66,5 ± 17	120 ± 0,9	107 ± 26	94,5 ± 18	102 ± 9
0,9 g/l BaSO ₄	213 ± 30,5	66 ± 9	102 ± 5	125 ± 22	95 ± 15	106 ± 5
0,1 g/l TiO ₂	294 ± 53	49 ± 3	110 ± 23	122 ± 70	80,5 ± 10	96 ± 12
0,9 g/l TiO ₂	201,5 ± 39	65 ± 26	115 ± 37	104 ± 15	98 ± 3	98 ± 7

Die Graphen der TiO₂-Exposition ähneln denen der BaSO₄-Versuche sehr. Bei der Co-Kultur des Patienten 332 ist der größte Anstieg des GSH-Gehalts in der niedrigen Konzentration (in beiden Experiment-Aufbauten) zu beobachten. Die 3D-Kultur des Patienten 334 dagegen zeigt in derselben Konzentration einen leichten Abfall des GSH-Gehaltes. Die Co-Kultur des Patienten 341 zeigt nahezu keine Auswirkungen der TiO₂-Aerosole auf den GSH-Gehalt. Die größte Abweichung von dem Glutathion-Gehalt der Negativkontrolle ist in der gespülten Probe mit 0,9 g/l nachzuweisen (Abbildung 22D-F; Tabelle 11).

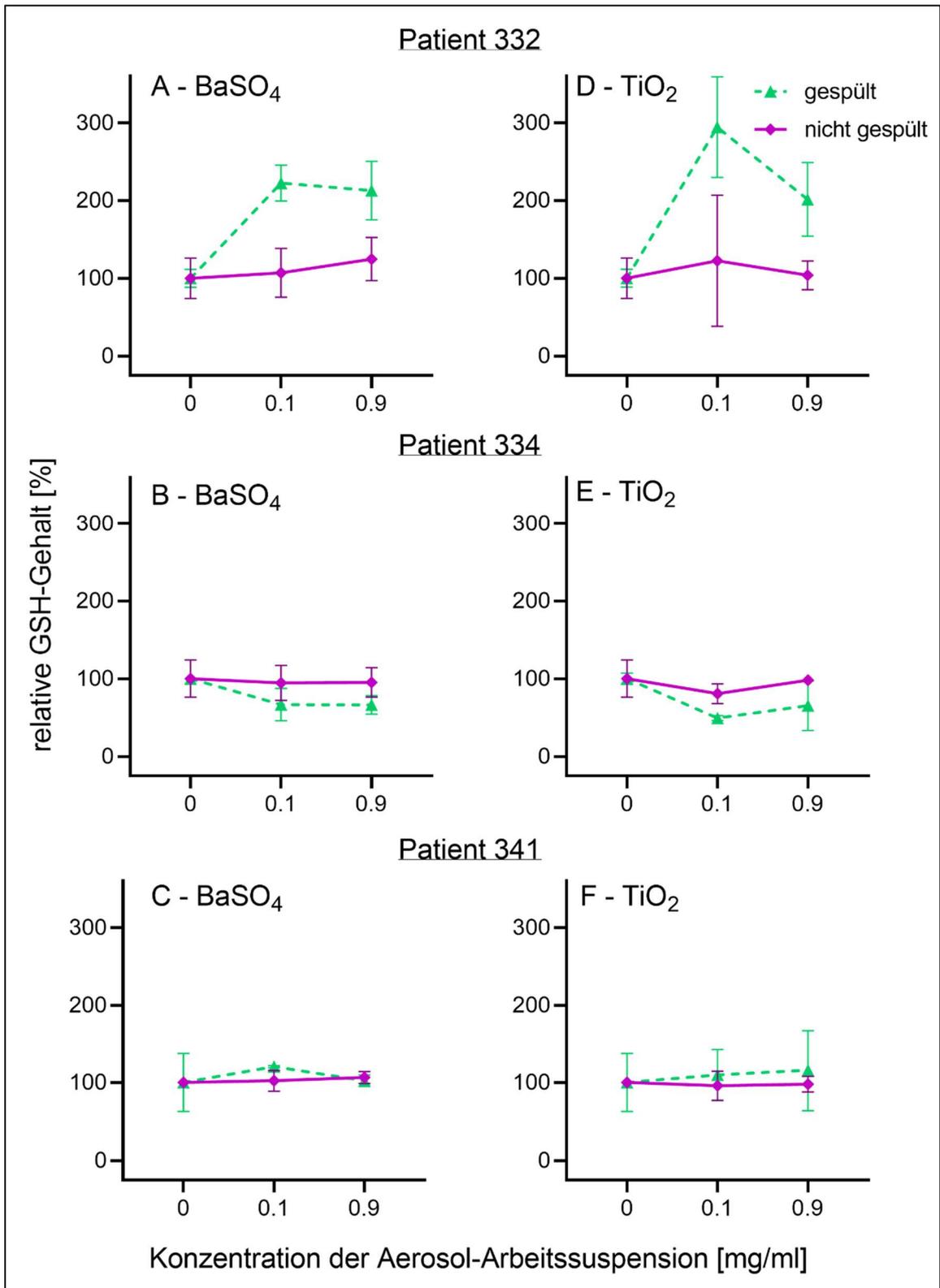


Abbildung 22: Grafische Darstellung des relativen GSH-Gehaltes der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger Exposition mit BaSO₄- (A-C) und TiO₂-NP-Aerosol (D-F) ermittelt durch Derivatisierung mit Monobrombiman und anschließender HPLC. Die Darstellung des GSH-Gehaltes erfolgte prozentual im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (GSH-Gehalt = 100 %) als Mittelwert ± Standardabweichung (N = 3; n = 3).

4.6. Inflammatorische Zytokine in der 3D-Zellkultur

Die inflammatorischen Zytokine wurden aus den Überständen der Glutathion- und Vitalitätsbestimmungen gemessen. Die Zytokine jeder Konzentration wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Werte der behandelten Kulturen wurden auf die Negativkontrolle normiert.

a) akute Toxizität

Die inflammatorische Reaktion nach BaSO₄-Exposition zeigt sich bei den verwendeten Zellkulturen aller drei Patienten auf sehr unterschiedliche Weise.

Tabelle 12: Tabellarische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen nach 24- und 72-stündiger BaSO₄-NP-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.

Die Darstellung der Zytokin-Gehalte erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (Zytokin-Gehalt = 1) als Mittelwert \pm Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	24 Stunden			72 Stunden		
	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341
Interleukin 1β						
0,1 g/l	0	0	0,47 \pm	0,43 \pm	0,92 \pm	1,14 \pm
BaSO ₄			0,38	0,22	0	0,04
0,9 g/l	0	0	4,77 \pm	0	0,4 \pm	1,46 \pm
BaSO ₄			0,67		0	0,17
Interleukin 8						
0,1 g/l	1,03 \pm	1,49 \pm	1,24 \pm	0,68 \pm	0,78 \pm	2,64 \pm
BaSO ₄	0,002	0,19	0,23	0,006	0,02	0,008
0,9 g/l	1,19 \pm	1,81 \pm	0,49 \pm	0,61 \pm	0,15 \pm	3,98 \pm
BaSO ₄	0	0,2	0,02	0,11	0,003	0,06
Interferon γ						
0,1 g/l	1,28 \pm	1,65 \pm	0,99 \pm	0,98 \pm	1,25 \pm	1,01 \pm
BaSO ₄	0,01	0,06	0,02	0,04	0,02	0,01
0,9 g/l	1,63 \pm	1,97 \pm	0,99 \pm	1,04 \pm	1,35 \pm	1,25 \pm
BaSO ₄	0,05	0,05	0,06	0,04	0,06	0,15
monocyte chemoattractant protein 1						
0,1 g/l	0,61 \pm	20,47 \pm	0	0,6 \pm	0,43 \pm	0,99 \pm
BaSO ₄	0,03	0,89		0,07	0,02	0,08
0,9 g/l	0,21 \pm	20,63 \pm	0	0,28 \pm	0,26 \pm	0,41 \pm
BaSO ₄	0,008	0,94		0,02	0,02	0,01

Die Zellkultur des Patienten 332 zeigt eine deutliche Abnahme des Zytokins IL-1 β nach 24 und 72 Stunden. Auch die 3D-Kultur des Patienten 338 weist einen dosisabhängigen Abfall des IL-1 β -Gehaltes nach beiden Zeitpunkten auf. Ein dosisabhängiger Anstieg ist in der Co-Kultur des Patienten 341 nach 72 Stunden zu sehen. Nach einer 24-stündigen Exposition mit BaSO₄ ist ein Abfall in der niedrigen Konzentration und ein Anstieg in der hohen Konzentration zu erkennen (Abbildung 23A1, B1, C1; Tabelle 12).

Das Zytokin IL-8 der Kultur des Patienten 332 zeigt nach einer 72-stündigen Exposition mit BaSO₄-Aerosol einen dosisabhängigen Abfall. Nach der 24-stündigen Inkubation steigt der Gehalt des Zytokins IL-8 auf das 1,19-fache. Die Co-Kultur des Patienten 338 zeigt ebenfalls einen dosisabhängigen Abfall des IL-8-Gehaltes nach 72 Stunden und einen deutlichen dosisabhängigen Anstieg nach 24 Stunden Exposition mit BaSO₄-Aerosol. Bei der 3D-Kultur des Patienten 341 hat die Exposition mit BaSO₄ einen Anstieg in der niedrigen Konzentration und einen Abfall in der hohen Konzentration nach 24 Stunden zur Folge. Nach 72-stündiger Exposition ist ein dosisabhängiger Anstieg des IL-8-Gehaltes zu beobachten (Abbildung 23A2, B2, C; Tabelle 12).

Der Gehalt des INF- γ der Co-Kultur des Patienten 332 verzeichnet keine deutlichen Unterschiede nach der 72-Stunden-Exposition. Bei einer Exposition für 24 Stunden ist ein dosisabhängiger Anstieg auf das 1,03-fache zu beobachten. Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 72 Stunden Exposition der Kultur des Patienten 338 mit BaSO₄-Aerosol ist ein dosisabhängiger Anstieg des INF- γ -Gehaltes zu sehen. Das INF- γ der 3D-Kultur des Patienten 341 spricht kaum auf die Behandlung mit BaSO₄-Aerosol an. Nur nach der 72-stündigen Behandlung mit der hohen Konzentration ist ein Anstieg auf das 1,25-fache zu sehen (Abbildung 23A3, B3, C3; Tabelle 12).

Das MCP-1 zeigt, sowohl im 24- als auch 72-Stunden-Versuch, eine dosisabhängige Abnahme des Gehaltes in der Kultur des Patienten 332. Bei der Zellkultur des Patienten 338 fällt nach 72 Stunden BaSO₄-Aerosol Exposition der MCP-1-Gehalt, ähnlich wie bei Patient 332, auf das 0,26-fache. Im 24-Stunden-Versuch kann keine Dosisabhängigkeit erkannt werden. Beide getesteten Konzentrationen steigen auf das 20-fache der Negativkontrolle an. Das Bild des MCP-1-Gehaltes der 3D-Kultur des Patienten 341 ähnelt dem des Patienten 332. Nach 24-stündiger Exposition ist kein MCP-1 mehr nachzuweisen. Der MCP-1-Gehalt nach der 72 Stunden Exposition fällt bis auf das 0,41-fache (Abbildung 23A4, B4, C4; Tabelle 12).

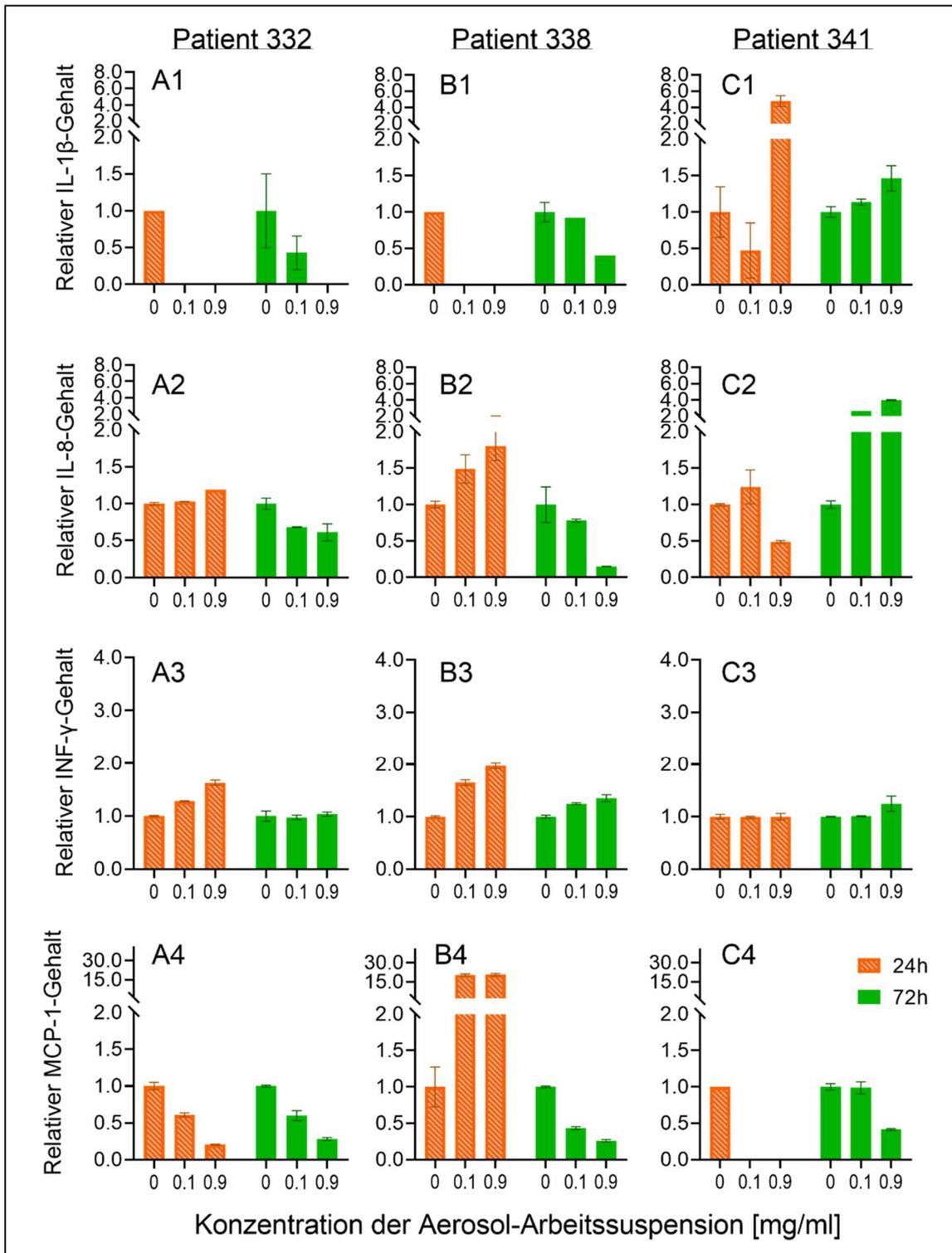


Abbildung 23: Grafische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach 24- und 72-stündiger BaSO₄-NP-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.

Die Darstellung der Zytokin-Gehalte erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (Zytokin-Gehalt = 1) als Mittelwert \pm Standardabweichung (N = 3; n = 3).

TiO₂-Aerosole haben, ähnlich wie die BaSO₄-Aerosole, verschiedene Auswirkungen auf die Expression der Zytokine bei den verschiedenen Zellkulturen der einzelnen Patienten.

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen nach 24- und 72-stündiger TiO₂-NP-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.

Die Darstellung der Zytokin-Gehalte erfolgte relativ im Vergleich zu einer mit Aerosol-Kontrolle ohne NP (Zytokin-Gehalt = 1) als Mittelwert \pm Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	24 Stunden			72 Stunden		
	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 338	Pat. 341
Interleukin 1β						
0,1 g/l	0	0	5,01 \pm	0	1,2 \pm	0,69 \pm
TiO ₂			0,009		0,36	0,02
0,9 g/l	0	0	2,29 \pm	0	0,83 \pm	0,43 \pm
TiO ₂			0,41		0,07	0,12
Interleukin 8						
0,1 g/l	1,71 \pm	1,49 \pm	0,31 \pm	1,03 \pm	0,17 \pm	1,58 \pm
TiO ₂	0,07	0,12	0,02	0,02	0,004	0,15
0,9 g/l	1,97 \pm	1,92 \pm	0,21 \pm	0,96 \pm	0,22 \pm	1,04 \pm
TiO ₂	0,03	0,1	0,01	0,05	0,004	0,13
Interferon γ						
0,1 g/l	1,39 \pm	2,11 \pm	1,0 \pm	0,84 \pm	1,27 \pm	1,26 \pm
TiO ₂	0,06	0,03	0,02	0,02	0,07	0,18
0,9 g/l	1,33 \pm	1,95 \pm	1,08 \pm	0,76 \pm	1,64 \pm	1,12 \pm
TiO ₂	0,09	0,04	0,005	0,01	0,18	0,07
monocyte chemoattractant protein 1						
0,1 g/l	0,12 \pm	14,56 \pm	0	0,72 \pm	0,11 \pm	0,19 \pm
TiO ₂	0,02	1,11		0,08	0,009	0,008
0,9 g/l	1,65 \pm	12,35 \pm	0	0,91 \pm	0,04 \pm	0,07 \pm
TiO ₂	0,02	1,53		0,005	0,003	0,008

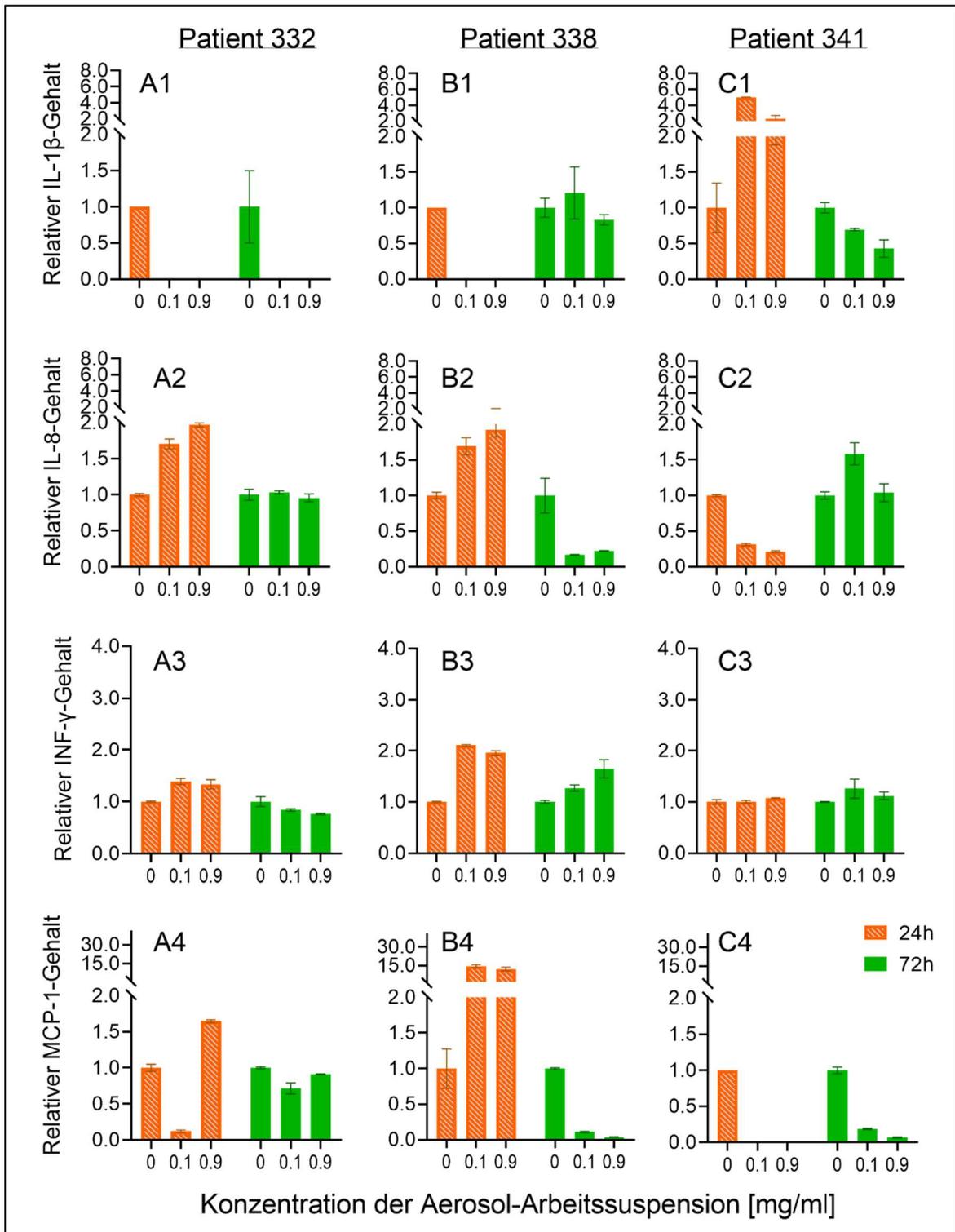
Das IL-1 β der 3D-Kultur des Patienten 332 reagiert, wie schon beim BaSO₄, mit einem Abfall des Gehaltes auf 0. Die Kultur des Patienten 338 fällt im IL-1 β -Gehalt ebenfalls nach einer 24-stündigen Exposition mit TiO₂-Aerosol auf ein relatives Gehalt von 0 ab. Nach 72 Stunden Exposition ist ein Anstieg auf das 1,2-fache in der niedrigen Konzentration und ein Abfall auf das 0,83-fache in der hohen Konzentration zu sehen. Die 3D-Kultur des Patienten 341 zeigt einen deutlichen Anstieg des IL-1 β -Gehaltes nach 24-stündiger Exposition auf das 5,01 in der niedrigen Konzentration und auf das 2,29-fache in der hohen Konzentration. Nach 72-stündiger Inkubation

mit TiO₂-Aerosol zeigt sich ein dosisabhängiger Abfall auf das 0,43-fache (Abbildung 24A1, B1, C1; Tabelle 13).

Die Expression des IL-8 der Kultur des Patienten 332 zeigt nach 72 Stunden keinen deutlichen Unterschied. Nach 24 Stunden dagegen ist ein dosisabhängiger Anstieg bis auf das 1,97-fache zu beobachten. Bei der Co-Kultur des Patienten 338 zeigt sich ein dosisabhängiger Anstieg des Gehaltes auf das 1,92-fache nach 24-stündiger Exposition mit TiO₂-Aerosol. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation fällt der Gehalt des IL-8 bis auf das 0,17-fache in der niedrigen Konzentration. Der Gehalt des IL-8 der 3D-Kultur des Patienten 341 fällt nach 24 Stunden deutlich auf das 0,21-fache in der hohen Konzentration. 72 Stunden nach der Aerosol-Exposition steigt der Gehalt des IL-8 auf das 1,58-fache in der niedrigen Konzentration an und bleibt in der hohen Konzentration vergleichbar mit der Negativkontrolle (Abbildung 24A2, B2, C2; Tabelle 13).

Der Gehalt des INF- γ der 3D-Kultur des Patienten 332 zeigt nach 72-stündiger Exposition einen dosisabhängigen Abfall bis auf das 0,76-fache und nach einer 24-stündigen Exposition einen Anstieg des Gehaltes bis auf das 1,39-fache in der niedrigen Konzentration. Bei der Zellkultur des Patienten 338 steigt der INF- γ -Gehalt sowohl nach 24- als auch nach 72-stündiger Exposition an. Dabei ist der Anstieg nach 72 Stunden dosisabhängig. Die INF- γ -Gehalte der Co-Kultur des Patienten 341 sind nahezu gleich der Negativkontrolle. Den größten Anstieg zeigt die niedrige Konzentration nach 72-stündiger Inkubation mit TiO₂-Aerosol (Abbildung 25A3, B3, C3; Tabelle 13Tabelle 12).

Das MCP-1 der Zellkultur des Patienten 332 zeigt einen deutlichen Abfall nach einer 24-stündigen Exposition mit der niedrigen Konzentration und einen Anstieg auf das 1,65-fache in der hohen Konzentration. Nach 72-Stunden-Exposition mit dem Aerosol ist ein leichter Abfall zu erkennen. Die Co-Kultur des Patienten 338 zeigt nach einer 24-stündigen Exposition einen Anstieg des MCP-1-Gehaltes auf das 14,56-fache in der niedrigen Konzentration. Nach 72 Stunden geht die Expression des MCP-1 fast vollständig auf 0 zurück. Das MCP-1 der 3D-Kultur des Patienten 341 spricht sehr deutlich auf die Aerosolbehandlung mit TiO₂ an. Nach beiden Inkubationszeiten sinkt der Gehalt von MCP-1 auf nahezu 0 (Abbildung 24A4, B4, C4; Tabelle 13Tabelle 13).



b) chronische Toxizität

Bei der Betrachtung der chronischen BaSO₄-Daten sind ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen der Patienten zu erkennen.

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen nach mehrmaliger BaSO₄-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.

Die Darstellung der Zytokin-Gehalte erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (Zytokin-Gehalt = 1) als Mittelwert \pm Standardabweichung (N = 3; n = 3).

	spülen			nicht spülen		
	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341
Interleukin 1β						
0,1 g/l	0	0	0,61 \pm	0	1,47 \pm	1,63 \pm
BaSO ₄			0,12		0,12	0,08
0,9 g/l	0	0	0,42 \pm	0	0,93 \pm	1,31 \pm
BaSO ₄			0,07		0,009	0,05
Interleukin 8						
0,1 g/l	1,19 \pm	0,9 \pm	1,85 \pm	0,31 \pm	10 \pm 1	0,75 \pm
BaSO ₄	0,03	0,05	0,25	0,01		0,27
0,9 g/l	1,36 \pm	0,8 \pm	1,43 \pm	0,72 \pm	7 \pm 1	0,51 \pm
BaSO ₄	0,04	0,2	0,06	0,05		0,11
Interferon γ						
0,1 g/l	1,07 \pm	0,9 \pm	0,87 \pm	0,9 \pm	0,89 \pm	0,92 \pm
BaSO ₄	0,02	0,004	0,02	0,03	0,01	0,04
0,9 g/l	1,07 \pm	1,08 \pm	1,14 \pm	0,83 \pm	0,91 \pm	0,82 \pm
BaSO ₄	0,03	0,14	0,002	0,04	0,02	0,03
monocyte chemoattractant protein 1						
0,1 g/l	0,18 \pm	0,14 \pm	0,22 \pm	0,60 \pm	2,96 \pm	0,85 \pm
BaSO ₄	0,02	0,02	0,04	0,04	0,2	0,007
0,9 g/l	0,1 \pm	0,04 \pm	0,06 \pm	0,4 \pm	1,18 \pm	0,54 \pm
BaSO ₄	0,01	0,01	0,005	0,04	0,06	0,05

Das Interleukin IL-1 β der Zellkultur des Patienten 332 zeigt wie beim akuten Versuch keine messbaren Ergebnisse für die Exposition mit BaSO₄-Aerosol. Die IL-1 β -Gehalte der Co-Kultur des Patienten 334 sind wie beim Patienten 332 nach 24 Stunden nicht messbar. Im ‚nicht Spülen‘-Experimentaufbau gibt es einen Anstieg bis auf das 1,47-fache in der niedrigen Konzentration zu sehen. Die 3D-Kultur des Patient 341 zeigt einen messbaren dosisabhängigen Abfall des IL-1 β -

Gehaltes im ‚Spülversuch‘. In den nicht gespülten Proben kann man einen Anstieg auf das 1,63-fache in der niedrigen Konzentration und auf das 1,31-fache in der hohen Konzentration beobachten (Abbildung 25A1, B1, C1; Tabelle 14).

Der IL-8-Gehalt der Co-Kultur des Patienten 332 steigt nach dem ‚Spülversuch‘ dosisabhängig an. Im Versuch mit den nicht gespülten Proben ist ein Abfall auf das 0,31-fache in der niedrigen Konzentration und auf das 0,72-fache in der hohen Konzentration zu beobachten. Bei den Zellen des Patienten 334 zeigt sich ein dosisabhängiger Abfall des IL-8-Gehaltes im ‚Spülversuch‘. Die gespülten Proben steigen auf das 10-fache (im Vergleich zur nicht mit BaSO₄-behandelten Probe) in der niedrigen Konzentration. Für die 3D-Kultur des Patienten 341 ist ein dosisabhängiger Abfall des IL-8-Gehaltes auf das 0,51-fache im ‚Nichtspülversuch‘ zu sehen. Im Spülversuch steigt der Gehalt in beiden Konzentrationen an im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 25A2, B2, C2; Tabelle 14).

Für das INF- γ der Zellkultur des Patienten 332 zeigt sich im ‚Spülversuch‘ kaum eine Veränderung im Vergleich zur Negativkontrolle. Anders dagegen die INF- γ -Gehalte der ungespülten Proben. Es ist ein leichter dosisabhängiger Abfall bis auf das 0,83-fache wahrzunehmen. Das INF- γ zeigt, wie bei den anderen beiden Patienten, keinen deutlichen Unterschied zur Negativkontrolle (Abbildung 25A3, B3, C3; Tabelle 14).

Der MCP-1-Gehalt der Zellen des Patienten 332 zeigt in beiden Experiment-Aufbauten einen dosisabhängigen Abfall. Die MCP-1-Gehalte der Co-Kultur des Patienten 334 fallen nach dem ‚Spülversuch‘ fast auf Null ($0,04 \pm 0,01$). Die nicht gespülten Proben zeigen einen Anstieg auf das 2,96-fache in der niedrigen Konzentration und auf das 1,18-fache in der hohen Konzentration. Der MCP-1-Gehalt der 3D-Kultur des Patienten 341 zeigt in beiden Aufbauten einen dosisabhängigen Abfall (Abbildung 25A4, B4, C4; Tabelle 14).

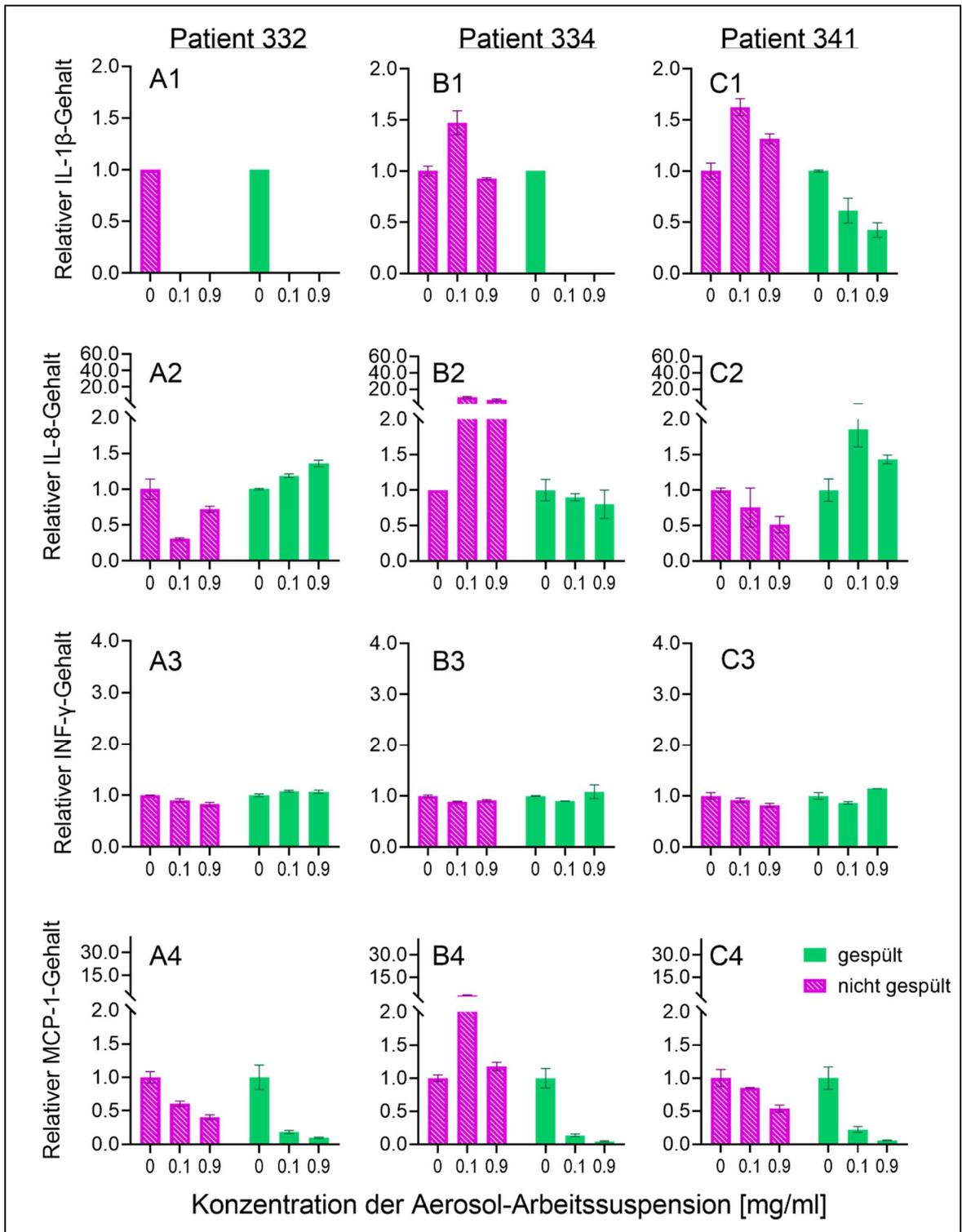


Abbildung 25: Grafische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen (PLZ/EA.hy926) nach mehrmaliger BaSO₄-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.

Die Darstellung der Zytokin-Gehalte erfolgte relativ im Vergleich zu einer Aerosol-Kontrolle ohne NP (Zytokin-Gehalt = 1) als Mittelwert \pm Standardabweichung (N = 3; n = 3).

Die chronischen TiO₂-Aerosol-Daten zeigen, wie bereits im akuten Experiment und bei den chronischen BaSO₄-Daten, Unterschiede zwischen den Co-Kulturen der Patienten.

Tabelle 15: Tabellarische Darstellung des relativen Gehalts von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und INF- γ der 3D-Co-Kulturen nach mehrmaliger TiO₂-Aerosol-Exposition ermittelt durch Sandwich-ELISA.

Die Darstellung der Zytokin-Gehalte erfolgte relativ im Vergleich zu einer mit Aerosol-Kontrolle ohne NP (Zytokin-Gehalt = 1) als Mittelwert \pm Standardabweichung (N = 3; n = 3).

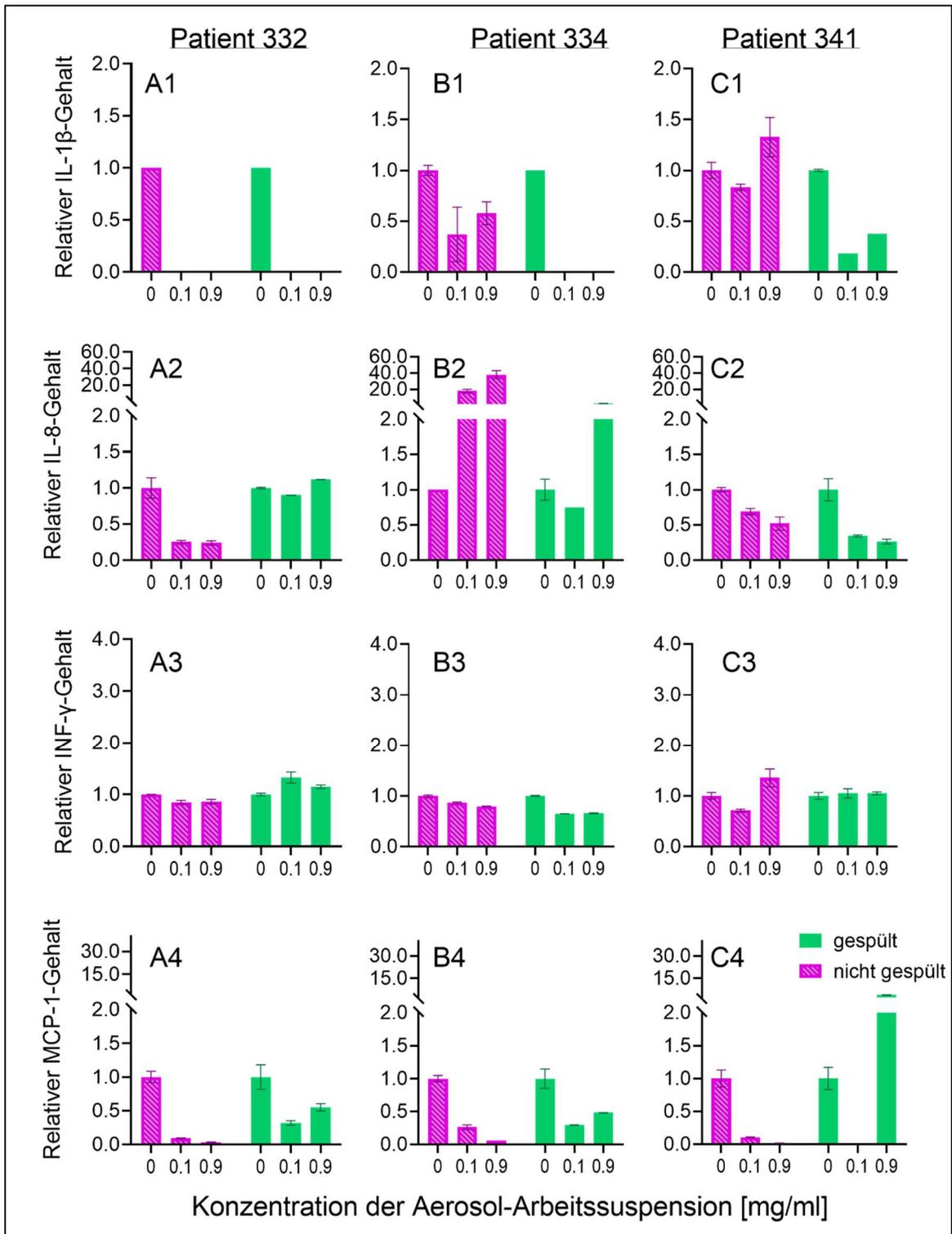
	spülen			Nicht spülen		
	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341	Pat. 332	Pat. 334	Pat. 341
Interleukin 1β						
0,1 g/l	0	0	0,18 \pm 0	0	0,37 \pm	0,83 \pm
TiO ₂					0,27	0,03
0,9 g/l	0	0	0,38 \pm 0	0	0,58 \pm	1,33 \pm
TiO ₂					0,11	0,19
Interleukin 8						
0,1 g/l	0,9 \pm	0,75 \pm	0,34 \pm	0,25 \pm	18 \pm 2	0,49 \pm
TiO ₂	0,004	0	0,01	0,02		0,04
0,9 g/l	1,12 \pm	2,55 \pm	0,27 \pm	0,24 \pm	38 \pm 5	0,52 \pm
TiO ₂	0,002	0,15	0,03	0,03		0,09
Interferon γ						
0,1 g/l	1,33 \pm	0,64 \pm	1,05 \pm	0,85 \pm	0,86 \pm	0,72 \pm
TiO ₂	0,1	0,003	0,09	0,04	0,02	0,02
0,9 g/l	1,15 \pm	0,66 \pm	1,05 \pm	0,86 \pm	0,79 \pm	1,35 \pm
TiO ₂	0,03	0,01	0,03	0,04	0,005	0,18
monocyte chemoattractant protein 1						
0,1 g/l	0,32 \pm	0,3 \pm	0,001 \pm	0,09 \pm	0,26 \pm	0,11 \pm
TiO ₂	0,03	0,004	0	0,005	0,03	0,005
0,9 g/l	0,55 \pm	0,48 \pm	3,69 \pm	0,03 \pm	0,06 \pm	0,02 \pm
TiO ₂	0,06	0,005	0,22	0,003	0	0,0009

Der IL-1 β -Gehalt der Co-Kultur des Patienten 332 ist, wie bereits in den akuten TiO₂-Experimenten, nicht messbar. Die Werte des ‚IL-1 β -Spülversuches‘ sind für die 3D-Kultur des Patienten 334 nicht messbar und die Werte des ‚Nichtspülversuches‘ fallen bis auf das 0,37-fache in der niedrigen Konzentration. Die Kultur des Patient 341 zeigt im IL-1 β -Gehalt sowohl im ‚Spül-‘ als auch ‚Nichtspülversuch‘ einen Abfall in der niedrigen Konzentration, gefolgt von einem Anstieg in der hohen Konzentration (Abbildung 26A1, B1, C1; Tabelle 15).

Der IL-8-Gehalt der Co-Kultur des Patienten 332 ist im ‚Spülversuch‘ nicht deutlich unterschiedlich zur Negativkontrolle. Im ‚Nichtspüleexperiment‘ ist ein dosisabhängiger Abfall zu sehen. Das IL-8 ist bei der 3D-Kultur des Patient 332 das einzige Zytokin, das einen Anstieg des Gehaltes zeigt. So steigt der Gehalt im ‚Spülversuch‘ auf das 2,55-fache und im ‚Nichtspülversuch‘ auf das 38-fache der Negativkontrolle (beides in der hohen Konzentration). Der IL-8-Gehalt der Zellen des Patienten 341 zeigt in beiden Versuchsmodellen einen dosisabhängigen Abfall (Abbildung 26A2, B2, C2; Tabelle 15).

Die INF- γ -Werte der Kultur des Patienten 332 des ‚Nichtspülversuches‘ zeigen einen Anstieg in beiden Konzentrationen gegenüber der Negativkontrolle. In beiden Versuchsaufbauten kann für die Zellkultur des Patienten 334 einen Abfall der INF- γ -Gehalte im Gegensatz zur Negativkontrolle beobachtet werden. Die Werte des INF- γ -Gehaltes der Zellen des Patienten 341 zeigen im ‚Spülversuch‘ keine deutlichen Unterschiede zur Negativkontrolle. Im ‚Nichtspülversuch‘ ist ein Anstieg des Gehaltes auf das 1,35-fache in der hohen Konzentration und ein Abfall auf das 0,72-fache in der niedrigen Konzentration zu sehen (Abbildung 26A3, B3, C3; Tabelle 15).

In der Messung des MCP-1 der Co-Kultur des Patienten 332 zeigt sich ein Abfall in beiden Versuchsmodellen. Der MCP-1-Gehalt der 3D-Kultur des Patienten 334 fällt in beiden Versuchsvarianten deutlich ab. Für der MCP-1-Gehalt der Zellen des Patienten 341 ist im ‚Spülversuch‘ ein Wert, der nahezu Null ist in der niedrigen Konzentration zu beobachten. In der hohen Konzentration steigt der Gehalt auf das 3,69-fache an. Im ‚Nichtspülversuch‘ ist ein dosisabhängiger Abfall zu sehen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**Abbildung 26A4, B4, C4; Tabelle 15).



5. Diskussion

5.1. Allgemeine Nanotoxikologie und in-vitro-Modelle

Bariumsulfat- und Titandioxid-Nanopartikel finden sich heutzutage vermehrt in Farb- und Kosmetikprodukten (Petrova *et al.*, 2008; Abbasi-Oshaghi *et al.*, 2019). Das bedeutet, dass Menschen immer mehr BaSO₄- und TiO₂-NP ausgesetzt sind. Die NP-enthaltenden Produkte durchlaufen einen Lebenszyklus von der Produktion bis zur Entsorgung. Zu jedem Zeitpunkt des Lebenszyklus können NP mit verschiedenen Organismen in Kontakt kommen. Während der Herstellung, des Gebrauchs oder der Entsorgung können Nanopartikel in die Luft gelangen und später durch Inhalation von Mensch oder Tier aufgenommen werden (Goswami *et al.*, 2017). Es existieren bereits *in-vivo*-Studien zu den Auswirkungen von NP-Aerosolen (Konduru *et al.*, 2014; Cordelli *et al.*, 2017; Schwotzer *et al.*, 2017; Schwotzer *et al.*, 2018; Molina *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2010; Alarifi *et al.*, 2013; Abbasi-Oshaghi *et al.*, 2019; Bermudez *et al.*, 2004; Baisch *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2013).

Im Hinblick auf die Übertragbarkeit zum Menschen sollten einige Argumente beachtet werden. Aus ethischen Gründen folgen Wissenschaftler den 3R-Prinzip nach Russel und Burch (Russell und Burch, 1992). Dies hat zur Folge, dass Tierversuche mit einer möglichst kleinen Anzahl an Tieren durchgeführt werden sollen. Diese kleine Tieranzahl und die Verwendung des Signifikanzniveaus $p = 0,05$ führt dazu, dass möglicherweise positive Ergebnisse überbewertet und infolgedessen falsch-positive Ergebnisse ausgegeben werden (Schlüter, 2019). Ein weiteres Problem stellt die monozentrische Studiendurchführung dar. Die Tiere haben alle denselben genetischen Hintergrund (es sind Inzuchtstämme), sie bekommen alle dasselbe Futter und leben unter denselben Umgebungsbedingungen. Es ist somit von keinen umweltbedingten Abweichungen auszugehen. In der Vergleichbarkeit der Studie mag dies von Vorteil sein. Jedoch ist damit die Übertragbarkeit auf den Menschen, die eine heterogene Gruppe von Individuen darstellt, erschwert (Schlüter, 2019).

Eine weitere Herangehensweise ist die Nutzung von *in-vitro*-Modellen z.B. Zellkulturen. Auch hier existieren bereits Studien, die Auswirkungen von NP auf einzelne Zelllinien untersuchen (Gurr *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Loza *et al.*, 2016; Schumann, 2021; Thomas, 2020). Weitere geeignete *in-vitro*-Modelle für die toxikologische Bewertung sind Miniorgankulturen oder precision-cut lung slices. Jedoch bringen diese aufgrund ihrer Komplexität Schwierigkeiten in der Auswertung mit sich. Der Nachteil der meisten Studien ist die Nutzung nur einer Zelllinie. Für bestimmte Endpunkte ist dies eine passende Herangehensweise. Soll jedoch z.B. die Luft-Blut-Schranke betrachtet werden, ist die Aussagekraft begrenzt, da nicht alle Zellen in der Kultur vertreten sind. Park *et al.* (2008) verwendeten für ihre Studie eine Tumorzelllinie (BEAS-2B). Die Handhabung einer solchen

Zelllinie ist einfacher, als primäre Zelllinien zu nutzen. Doch auch hier verliert das Modell an Aussagekraft, da durch die Immortalisierung Merkmale verloren gehen können, die wichtig für das gewünschte Modell sind. Thomas (2020) nutzte für ihre Experimente primäre Zellen aus Lungenteilresektionen und bildete damit eine mehrzellige Kultur ab. Jedoch kultiviert sie die Lungenzellen unter submersen Bedingungen, was nicht den realen Bedingungen in der Lunge entspricht. Eine Verbesserung dieses Modells könnte durch eine *air-liquid*-Kultivierung erreicht werden. Alfaro-Moreno *et al.* (2008) entwickelten eine *air-liquid*-Tetrakultur für die Blut-Luft-Schranke. Klein *et al.* (2013) entwickelten diese Tetrakultur weiter und verwendeten sie für Gold-NP. Die Datenlage für BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosole auf *air-liquid*-Zellkulturen ist sehr gering. In der vorliegenden Arbeit soll auf die Auswirkungen von BaSO₄- und TiO₂-NP-Aerosole auf einer 3D-Co-Zellkultur eingegangen werden. Um den Zellen eine noch natürlichere Physiologie zu bieten, wurde die TAS mit MatriGrid® des Institutes für Nanobiosystemtechnik der Technischen Universität Ilmenau gewählt. Durch die Vorwölbung der Membran, sollen die Zellen noch besser die Alveolen und damit die Luft-Blut-Schranke darstellen (Mai *et al.*, 2022). Wie bereits erwähnt, ist die Nutzung von Tumorzelllinien nur für bestimmte Endpunkte möglich. Daher wurden die im Institut für Umwelttoxikologie etablierten primären Lungenzellen aus dem gesunden Gewebe von Tumorteilresektionen verwendet und mit einer Endothelzelllinie als Blut-Luft-Schranke auf MatriGrids® kombiniert. Durch die Nutzung von Patientenmaterial ist es möglich, Auswirkungen auf humane Lungenzellen zu ermitteln, die nicht durch einen Tumor verändert sind. In der primären Lungenzellkultur waren nahezu alle Zellen, die in der humanen Lunge vorkommen enthalten und es benötigte kein weiteres Abstimmen von mehreren Zelllinien. Bei der Arbeit mit primärem Material ist zu beachten, dass die Zellen außerhalb des Zellverbandes deutlich schneller wachsen als die anderen Zellen im Verband. Durch spezielle Techniken (z.B. Dynabeads und MagniSort Technologie von Invitrogen) können Zellen extrahiert werden oder durch spezielle Nährmedien unterdrückt werden (Schmitz, 2010). Außerdem muss beachtet werden, dass primäre Zellkulturen einer schnelleren Seneszenz unterliegen und sind damit im Gegensatz zu den Kulturen von Alfaro-Moreno *et al.* (2008) und Klein *et al.* (2013) nur begrenzt verwendbar.

5.2. Erzeugung nanoskaliger Aerosole

In der Inhalationstoxikologie ist die Herstellung von stabilen NP-Aerosolen eine besondere Herausforderung. Deswegen ist es erforderlich, die Experimente mit einem Partikelmessgerät zu überwachen. Durch vorherige Etablierung konnte gezeigt werden, dass für die Herstellung der Stammlösung bidestilliertes Wasser ausreicht, um nanoskalige Aerosole zu erhalten. Thomas (2017) konnte zeigen, wie unterschiedlich die durchschnittliche Größe der verschiedenen NP in verschiedenen Suspensionen ist. Sie konnte für BaSO₄- und TiO₂-NP einen durchschnittlichen Durchmesser von 100 nm in bidestilliertem Wasser messen (Thomas, 2017). In Nährlösungen mit

fetalem Kälberserum oder anderen Proteinen kann es durch den Kontakt zwischen NP und Protein zu Agglomerationen kommen. Diese benötigen zusätzliche Behandlung, um Agglomerationen zu unterbinden (Guiot und Spalla, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnten Aerosole erzeugt werden, die stabil im Nanobereich nach der Empfehlung der Europäische Kommission (2011) liegen.

5.3. akute Wirkung von BaSO₄- und TiO₂-NP auf die 3D-Co-Kultur

Für die Vitalitätsmessungen wurde der Resazurin-*Assay* verwendet. Anders als beim MTT-*Assay* beeinträchtigen die NP die Fluoreszenzmessung nicht. Die relativen Vitalitätswerte der 3D-Co-Kulturen der verwendeten Patienten im akuten Versuch unterscheiden sich in einzelnen Aspekten. Patient 332 zeigt einen größeren Abfall der Vitalität nach 24 Stunden, die Patienten 338 und 341 zeigen kaum Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten. Bei der Arbeit mit Patientenmaterial ist immer die Vorexposition der Lunge mit zu berücksichtigen. Patient 332 ist Nichtraucher und von Beruf Tischler. Studien konnten zeigen, dass Holzstaub eine sensibilisierende und auch eine kanzerogene Wirkung haben kann (World Health Organization, 1995). Daher ist es denkbar, dass die Zellen durch eine vorangegangene Sensibilisierung nach 24 Stunden deutlicher auf die NP-Aerosole reagieren als bei den anderen beiden Patienten. Ein Punkt, der jedoch deutlich auffällt, ist die Tatsache, dass in den TiO₂-Versuchen die Vitalität der niedrigen Konzentration immer geringer ist als die dazugehörige hohe Konzentration. Das hohe Gefahrenpotential geht bei NP vorrangig von deren Größen-Volumen-Verhältnis aus (Bakand *et al.*, 2012). Wie in den Charakterisierungen der TiO₂-Aerosole zu sehen ist, sind die Partikel in der hohen Konzentration deutlich größer. In Vitalitätsexperimenten mit den BaSO₄-Aerosolen ist eher ein leichter dosisabhängiger Abfall zu beobachten. Dies stützt die Aussage von Loza *et al.* (2016), dass BaSO₄ bioinerte Partikel sind. Beim BaSO₄ könnte angenommen werden, dass die Partikelmenge eher die Kultur überschichtet und somit die Zellen keine gute Sauerstoffversorgung mehr haben.

Thomas (2020) und Schumann (2021) konnten zwar zeigen, dass BaSO₄-NP von der Zelle aufgenommen werden können, jedoch gelingt dies nur einem Teil der Partikel. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS), die Aufnahme der Partikel in die Zelle zu zeigen. Jedoch scheiterte der Versuch aufgrund der geringen Zellzahl auf den MatriGrids®.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Resazurin-*Assays* mit den Daten des LDH-*Assays* scheint die Überschichtung der Co-Kultur mit Partikeln ein sinnvolles Argument. Es ist nur ein Anstieg des relativen LDH-Gehaltes nach 24 Stunden bei den 3D-Co-Kulturen der Patienten 332 und 338 zu sehen. Das Größen-Volumen-Verhältnis der Nanopartikel hat auf die Membranpermeabilität scheinbar einen deutlicheren Einfluss als auf die Vitalität. Sowohl bei den BaSO₄-, als auch den

TiO₂-Aerosolen ist ein höherer Anstieg in der niedrigen Konzentration zu beobachten. Laut Danpure (1984) ist es physiologisch, dass immer eine gewisse Menge an LDH aus der Zelle ins umgebende Medium gelangt. Das zeigen auch die Ergebnisse von Patient 332 und 338 nach einer 24-stündigen NP-Aerosol-Exposition. Jedoch fällt der LDH-Gehalt von Patient 341 deutlich ab. Bei gesonderter Betrachtung der LDH-Ergebnisse des Patienten 341 könnte der Eindruck entstehen, dass der *Assay* durch die Nanopartikel beeinflusst wird. Dies wurde jedoch in vorangegangenen submersen Experimenten ausgeschlossen. Bei einem Blick auf die Rohdaten konnte festgestellt werden, dass die Negativkontrollen (0 g/l) schon einen höheren LDH-Gehalt haben als eine extra mitgeführte Kulturkontrolle, die nicht dem Aerosol ausgesetzt wurde. Warum die Negativkontrolle deutlicher ansteigt als die Kulturkontrolle, konnte nicht abschließend geklärt werden. Jedoch erklären die erhöhten Negativkontrollwerte den folgenden Abfall der NP-exponierten 3D-Co-Kulturen.

Bei der zusätzlichen Betrachtung der relativen GSH-Gehalte ist festzustellen, dass die Zellkultur des Patienten 332 in den verschiedenen NP deutlich unterschiedliche Reaktionen zeigt. Bei der Exposition mit BaSO₄-Aerosol fällt der GSH-Gehalt nach 24 Stunden in der kleinen Konzentration leicht ab. Vergleichend mit den Daten der Vitalität und der Membranpermeabilität ist dies plausibel, weil die Zellzahl der lebenden Zellen deutlich geringer ist als in der Negativkontrolle. Im Verhältnis zur Kontrolle kann nicht mehr GSH gebildet werden, da weniger Zellen vorhanden sind, die GSH bilden. Der GSH-Gehalt der hohen Konzentration des gleichen Patienten nach 24-stündiger BaSO₄-Exposition fällt deutlich höher aus. Wie bei der niedrigen Konzentration ist die Vitalität deutlich niedriger als bei der Negativkontrolle. Das zeigt, dass auch in dieser 3D-Co-Kultur weniger Zellen vorhanden sind, die GSH produzieren können. Jedoch wurde ein höherer GSH-Gehalt detektiert als in der Kontrolle. Zum einen wäre es möglich, dass das Angebot an schwefelhaltigen Aminosäuren im Verhältnis sehr viel höher ist und damit die Zellen deutlich mehr GSH bilden können. Dieser Aspekt kann, durch einen Blick auf die Ergebnisse von Patient 332 mit dem TiO₂-Aerosol und Patient 341 mit dem BaSO₄-Aerosol nach 24-stündiger Exposition, ausgeschlossen werden. Die hohen GSH-Werte desselben Patienten bei verschiedenen Zellvitalitäten legen nahe, dass kein Mangel an schwefelhaltigen Aminosäuren vorliegt. Eine andere Erklärung liefert die Konfluenz der Kultur. Es ist bekannt, dass Kulturen, die eine hohe Konfluenz haben, eine protektive Wirkung auf den Umgang mit oxidativem Stress zeigen. Das bedeutet, je mehr Zellkontakte eine Zelle hat, ohne zu eng umwachsen zu sein, desto mehr schützt sich der Zellverband gegen Agenzien, die oxidativen Stress auslösen. Ein wichtiger Aspekt könnte der Zugang des Agens zur Zelloberfläche sein. In Kulturen mit hoher Konfluenz, gelangt das Agens nur auf die obere Seite der Zelle (bei stabilen Zell-Zellverbindungen). Bei niedriger Konfluenz erreicht die Substanz alles, außer den Abschnitt der auf der Kulturflasche adhäriert. Bei der Exposition des Patienten 332 mit TiO₂-Aerosol ist nach 24 Stunden ein Anstieg

des GSH-Gehaltes zu verzeichnen. Patient 338 zeigt bei beiden NP einen dosisabhängigen Abfall. Der Effekt des GSH-Mangels nach einer NP-Exposition konnte bereits in Ratten und in humanen Lungenepithelzellen gezeigt werden (Abbasi-Oshaghi *et al.*, 2019; Akhtar *et al.*, 2018). Laut D'Alessio *et al.* (2004) dient der GSH-Mangel dem Überleben der Zelle. Sie exponierten verschiedene Zellkulturen mit Buthioninsulfoximin, um die Neusynthese von GSH zu unterbinden. Im Weiteren führte der GSH-Mangel und das Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffspezies zu einem hohen Abbau von Bcl-2. Die Zelle hat an diesem Punkt zwei Möglichkeiten, mit dem Mangel an GSH und Bcl-2 umzugehen. Die eine Möglichkeit wäre die Apoptose. In diesem Fall wird der Bcl-2-Level beibehalten. Als zweite Möglichkeit hat die Zelle das Überleben, welches eine Hochregulierung des Bcl-2 erfordert (D'Alessio *et al.*, 2004). Bei Patient 341 steigt der GSH-Gehalt in der niedrigen Konzentration nach 24-stündiger BaSO₄-Aerosol-Exposition an und fällt in der hohen Konzentration. Einen ähnlichen Effekt konnte Akhtar *et al.* (2018) in humanen Lungenepithelzellen nach einer MgO-Exposition zeigen. Sowohl nach 72-stündiger BaSO₄- als auch nach TiO₂-Exposition steigen beide Konzentrationen leicht an. Dies zeigt, dass die Kulturen oxidativen Stress durch die Exposition erleiden und durch das Glutathionsystem regulieren. Die 24-stündige TiO₂-Exposition zeigt einen deutlichen Abfall des GSH-Gehaltes in beiden Konzentrationen. Vergleichend mit der Vitalität kann gesagt werden, dass weniger Zellen vorhanden sind, die GSH bilden können. Jedoch sollten die GSH-Ergebnisse des Patienten nicht überinterpretiert werden, da in allen Proben große Standardabweichungen dargestellt sind.

Um den oxidativen Stress zu quantifizieren, wurde der DCF-Test zu Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies durchgeführt. Da ROS sehr instabil sind, wurden die NP-Aerosolexpositionen auf nur eine Stunde begrenzt. Alle Patienten und alle NP-Aerosole zeigen einen Abfall des ROS-Gehaltes. Aus vorangegangenen Experimenten in submersen Kulturen konnte gezeigt werden, dass ROS durch die verwendeten NP ausgelöst werden können. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Messung auf den MatriGrids[®] nicht funktioniert hat. Es wurden viele Anpassungen vorgenommen, um die ROS zu messen. Jedoch waren alle erfolglos. Daher ist zu empfehlen, dass in zukünftigen Experimenten mit MatriGrids[®] Methoden verwendet werden, die keine Fluoreszenzmessung benötigen. Aufgrund dieser technischen Probleme konnte leider nicht genauer ermittelt werden, wieviel oxidativem Stress die Co-Kulturen ausgesetzt sind.

Weiterhin wurden vier verschiedene inflammatorische Zytokine betrachtet. In der Betrachtung des IL-1 β ist schnell zu erkennen, dass bei den 3D-Co-Kulturen der Patienten 332 und 338 keine relativen Gehalte nach 24-stündiger Exposition (sowohl BaSO₄ als auch TiO₂) gemessen werden konnten. Es ist durchaus möglich, dass die Konzentrationen des IL-1 β so gering waren, dass sie unterhalb der Detektionsgrenze des Tests lagen. Auch nach 72-stündiger Exposition mit beiden NP zeigt sich ein deutlicher Abfall oder eine Abwesenheit des IL-1 β . Die 72-Stunden-Exposition

mit BaSO₄ zeigt bei Patient 338 einen dosisabhängigen Abfall. Dasselbe Phänomen ist im IL-1 β -Gehalt des Patienten 341 nach 72-stündiger Exposition mit TiO₂ zu sehen. In der Literatur sind keine Daten zu sinkenden IL-1 β -Gehalten nach NP-Exposition zu finden. Jedoch könnte ein hoher Verbrauch des IL-1 β und damit ein Abfall des Proteins in der Zelle eine Erklärung bieten. Ähnlich wie beim GSH, kann die Reserve des IL-1 β erschöpft sein und manifestiert sich somit durch einen dosisabhängigen Abfall. Im Vergleich zu anderen Studien zeigt sich, dass der IL-1 β -Gehalt ansteigt und so zu typischen Entzündungsabläufen in der Zelle führt (Kim *et al.*, 2017; Nogueira *et al.*, 2012). Dieser Anstieg ist bei Patient 341 nach 24-stündiger Exposition mit BaSO₄ in der hohen Konzentration zu sehen. Außerdem stellt sich nach 72-stündiger Exposition ein dosisabhängiger Anstieg dar. Nach der 72-Stunden-Exposition mit TiO₂-Aerosol steigt der Gehalt deutlicher in der niedrigen Konzentration an. Das kleinere Partikel einen größeren Effekt haben, ist wieder deutlich in der 24-Stunden-Exposition mit TiO₂ des Patienten 341 zu sehen. Wird das IL-8 in die Betrachtung mit einbezogen, zeigt sich nach 24 Stunden ein Anstieg des Gehaltes in der 3D-Co-Kultur der Patienten 332 und 338. Bei Patient 338 ist der Anstieg des IL-8 Gehaltes etwas deutlicher als bei Patient 332. Dies kann auf den Raucherstatus des Patienten zurückgeführt werden. Fields *et al.* (2005) beschrieben, dass IL-8 durch Rauchen hochreguliert wird. Somit reagieren die Zellen deutlich sensibler auf Entzündungsreize als Zellen von Nichtrauchern. Die 72-Stunden-Expositionen des Patienten 332 zeigt keinen bis leichten Abfall des IL-8-Gehaltes. Dies deutet darauf hin, dass die Entzündungsreaktion zurück gegangen ist. Bei Patient 338 ist der Abfall sogar deutlich zu sehen. Dies deutet auf eine IL-8-Erschöpfung nach einer Entzündung hin. Die niedrige Konzentration der 24-stündigen BaSO₄-Exposition zeigt bei Patient 341 einen Anstieg. Alle anderen Proben bilden einen Abfall des IL-8-Gehaltes ab. Vergleichend mit den Vitalitätsdaten, ist der ausschlaggebende Faktor für die niedrigen IL-8-Gehalte wohl eher die kleinere Zellmasse im Gegensatz zur Negativkontrolle. Nach 72-stündiger Exposition zeigt sich wieder das typische Bild, dass bei BaSO₄ ein dosisabhängiger Anstieg des IL-8-Gehaltes und bei TiO₂ ein deutlicherer Anstieg in der niedrigen Konzentration zu sehen ist. Dies weist erneut daraufhin, dass die Größe der TiO₂-Partikel einen großen Einfluss auf die Effekte in der Zelle hat. INF- γ ist ein typisches Zytokin des Abwehrmechanismus der Zelle. Es ist für die Rekrutierung von Makrophagen zuständig und ist an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt (Schroder *et al.*, 2004). Der INF- γ -Gehalt untermauert nochmal eindeutig, dass in den 3D-Co-Kulturen der Patienten 332 und 338 nach der 24-Stunden-Exposition eine Entzündungsreaktion stattfindet. Patient 332 hat diese nach 72 Stunden bereits überwunden und bei Patient 338 werden die Anstiege des INF- γ -Gehaltes auch kleiner. Patient 341 zeigt keine bis kaum Effekte des INF- γ auf die Exposition. Nur in der hohen BaSO₄-Konzentration und niedrigen TiO₂-Konzentration ist ein Anstieg des Gehaltes zu beobachten. Dieser kann jedoch aufgrund der Standardabweichung vernachlässigt werden. Abschließend soll in den akuten Experimenten das MCP-1 betrachtet werden. MCP-1 ist eines der Hauptchemokine, dass die Migration und Infiltration von

Makrophagen und Monozyten in das Gewebe reguliert (Deshmane *et al.*, 2009). Bei der Betrachtung der MCP-1-Gehalte der 3D-Co-Kultur des Patienten 332 fällt auf, dass sie den Kurven der Vitalität gleichen. Der Abfall des MCP-1-Gehaltes korreliert demnach mit der Zellmasse. Die 3D-Co-Kultur des Patienten 338 zeigt nach 24-stündiger Exposition einen eindeutigen Anstieg des MCP-1-Gehaltes. Die Hochregulierung des MCP-1 dient der Anlockung von Makrophagen, die die NP entfernen und somit die Entzündungsreaktion abschließen sollen (Deshmane *et al.*, 2009). Nach der 72-stündigen Exposition ist bei beiden NP ein Abfall des MCP-1-Gehaltes zu beobachten. Der Verlauf ähnelt, wie bei Patient 332, den Kurven der Vitalität, was eine Korrelation des MCP-1-Gehaltes mit der kleineren Zellmasse nahelegt. Für Patient 341 konnten nach 24-Stunden-Exposition keine Daten generiert werden. Der Grund für die Abwesenheit konnte leider nicht abschließend geklärt werden. Auch kann keine plausible Erklärung für die Abnahme des MCP-1-Gehaltes bei Patient 341 gefunden werden.

5.4. chronische Wirkung von BaSO₄- und TiO₂-NP auf die 3D-Co-Kultur

In den chronischen Experimenten gab es zwei verschiedene Versuchsaufbauten. Die Kulturen des ersten Modells wurden zweimal mit Aerosol exponiert und vor der zweiten Exposition mit Medium gespült. Im zweiten Modell wurden die Kulturen zwischen den beiden Expositionen nicht gespült.

Bei einem Blick auf die relativen Vitalitäten ist festzustellen, dass bei fast allen Patienten und NP die Vitalität der gespülten Proben niedriger ist. Dies führt zu der Annahme, dass die nicht gespülten Proben eine Art Barriere während der längeren Inkubationszeit (im Vergleich zu den akuten Experimenten) gebildet haben, um sich vor weiteren Einwirkungen über den Luftweg zu schützen und dass diese Barriere bei den gespülten Proben entfernt wurde. Collectine sind Proteine, welche die Lunge vor äußeren Einflüssen schützen. Surfactant-A und Surfactant-D gehören zu den Collectinen und sind an der Immunabwehr von Fremdstoffen beteiligt (Crouch, 2000; Haagsman, 1998). Jeder Patient hat eine individuelle Schutzfunktion und produziert unterschiedliche Mengen an Surfactant. Dies hängt u.a. von vorherigen Belastungen der Lunge durch z.B. Holzstaub (wie bei Patient 332) oder durch eine eventuelle Exposition mit Asbest (wie bei Patient 341) ab. Darüber hinaus kann auch Rauchen zu einem Abfall des Surfactant-A und Surfactant-D führen (Haagsman, 1998; Crouch, 2000). Bei den TiO₂-Expositionen ist erneut ein größerer Abfall in der niedrigen Konzentration zu beobachten.

Bei der Betrachtung der Membranpermeabilität ist festzustellen, dass bei den 3D-Co-Kulturen der Patienten 332 und 341 nach der nicht gespülten Exposition keine bis kaum Effekte zu sehen sind. Im Vergleich mit den gespülten Proben scheint es als hätten die nicht gespülten Proben einen besseren Schutzmechanismus. Denkbar wäre, dass in den gespülten Proben ebenfalls eine Art Barriere gegen die Partikel gebildet wird. Diese Barriere existiert jedoch nicht in der

Negativkontrolle. Beim Blick auf die Rohdaten ist festzustellen, dass die Vitalität der Negativkontrolle erneut höher als die der Kulturkontrolle ohne Aerosol ist und alle anderen Proben ähnlich der Kulturkontrolle sind. Das legt nahe, dass durch die NP ein Schutzmechanismus in Gang gesetzt wird, der durch die bloße Aerosol-Exposition nicht ausgelöst wird. Diese Barriere kann z.B. durch die Produktion von Surfactant-Proteinen gewährleistet werden. Mousseau und Berret (2018) konnten zeigen, dass Surfactant mit NP interagiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Surfactant als Schutz gegen NP-Exposition in *air-liquid*-Kulturen produziert wird (Radiom *et al.*, 2020).

Bei der weiteren Betrachtung sind nur bei Patient 332 deutliche Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsarten zu erkennen. Die gespülte Behandlungsart erhöht der GSH-Gehalt deutlicher als die nicht gespülte Exposition. Wie in den akuten Versuchen wird deutlich mehr GSH gebildet, wenn die Vitalität geringer ist. Gegenüber den anderen Patienten scheint Patient 332 eine höhere Kapazität zu besitzen, Glutathion neu zu bilden. Die Lunge hat aufgrund ihrer großen Oberfläche und ihrem ständigen Kontakt mit Luft und Partikeln von vornherein schon einen hohen GSH-Gehalt, um die Zellen vor oxidativem Stress zu schützen. Bei Rauchern oder Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen ist der GSH-Gehalt nochmals höher als bei Nichtrauchern (Cantin *et al.*, 1987; Drost *et al.*, 2005). Da die beiden Patienten 334 und 341 (beide Nichtraucher) nicht deutlich von den Partikel-Aerosolen beeinflusst zu werden, ist deren Kapazität GSH zu bilden geringer als bei Rauchern.

Da GSH antiinflammatorisch in der Lunge wirkt (Cantin *et al.*, 1987; Drost *et al.*, 2005), sollten die getesteten Zytokine keine Unterschiede zu den Kontrollen zeigen. Wie schon in den akuten Versuchen konnte das IL-1 β bei Patient 332 nach einer NP-Exposition nicht detektiert werden. Bei Patient 334 konnte nach dem Spülversuch ebenfalls kein IL-1 β -Gehalt gemessen werden. In den BaSO₄-Expositionen ist ein Anstieg in der niedrigen Konzentration zu beobachten. Bei TiO₂ hingegen fallen beide Konzentrationen ab, wobei die niedrige Konzentration einen größeren Abfall zeigt. Ein ähnliches Bild zeigt die 3D-Co-Kultur des Patienten 341 im Spülversuch. Im Nichtspül-Versuch ist bei BaSO₄ ein dosisabhängiger Abfall zu erkennen. Bei TiO₂ fallen beide Konzentrationen wieder ab und die niedrigere Konzentration zeigt wieder einen größeren Abfall als die hohe Konzentration. Wie bereits erwähnt sind in der Literatur keine sinkende IL1 β -Gehalte zu finden. Im Spülversuch ist es denkbar, dass die Zellen eine deutliche Antwort auf die NP-Exposition geben. Jedoch wird das IL-1 β mit dem Medium weggespült und fällt somit geringer als die Negativkontrolle aus, die die IL-1 β -Produktion nicht deutlich erhöht. Warum jedoch der IL-1 β -Gehalt bei einer nicht gespülten TiO₂-Exposition abfällt, kann abschließend nicht geklärt werden. Für die Zukunft wäre eine Messung der Genexpression möglicherweise sinnvoller, um die Entzündungsreaktion besser beurteilen zu können. Wird das IL-8 betrachtet, ist ein Abfall des IL-8-Gehaltes im Nichtspül-Versuch bei den 3D-Co-Kulturen der Patienten 332 und 341 zu

sehen. Bei Patient 334 zeigt sich bei beiden NP-Aerosolen ein Anstieg in beiden Konzentrationen. Im Spülversuch ist nach der BaSO₄-Exposition ein Anstieg in beiden Konzentrationen bei den Patienten 332 und 341 zu beobachten. Patient 334 zeigt dagegen einen Abfall in diesem Versuchsaufbau. Bei den gespülten TiO₂-Versuchen gibt es keine Gemeinsamkeiten in den Daten des IL-8-Gehaltes. Patient 332 zeigt kaum Unterschiede zur Kontrolle, Patient 334 fällt in der niedrigen Konzentration ab und in der hohen steigt der IL-8-Gehalt an und Patient 341 zeigt einen dosisabhängigen Abfall des IL-8-Gehaltes. Im Vergleich der Spül- und Nichtspüldata des IL-8-Gehaltes von Patient 334 wird deutlich, dass die nicht gespülte Exposition bei beiden NP einen deutlicheren Einfluss auf die Kultur hat als die gespülte Exposition. Dies spricht erneut für die Theorie, dass die nicht gespülten Kulturen eine Art Barriere gebildet haben und dass diese Barriere womöglich durch das Spülen entfernt wurde. Bei den beiden anderen Patienten ist die Vorexposition durch Holzstaub (bei Patient 332) und eventuell durch Asbest (bei Patient 341) größer als der zusätzliche Effekt der NP-Aerosole, im Hinblick auf den IL-8-Gehalt. INF- γ ist ein Zytokin, das antiinflammatorisch wirkt und vermehrt bei chronischen Entzündungen auftritt (Mühl und Pfeilschifter, 2003). Die antiinflammatorische Eigenschaft teilt es sich mit dem GSH (Cantin *et al.*, 1987; Drost *et al.*, 2005). Im Vergleich mit den GSH-Daten werden die Werte des INF- γ -Gehaltes bestätigt. Bei allen Patienten, allen Behandlungsarten und bei allen NP zeigen sich keine deutlichen Unterschiede des INF- γ -Gehaltes zu den Negativkontrollen. Die Daten von GSH und INF- γ legen nahe, dass in den Langzeitexperimenten keine Entzündungsreaktion entsteht. Bei der Betrachtung der MCP-1-Gehalte nach der chronischen Exposition ist zu erkennen, dass der MCP-1-Gehalt fast überall gegenüber der Negativkontrolle abnimmt. Ausgenommen sind die Behandlungen der nicht gespülten BaSO₄-Exposition bei Patient 334 und die gespülte TiO₂-Exposition bei Patient 341. Vergleichend mit der Literatur, zeigen sich in der vorliegenden Arbeit ungewöhnliche Daten des MCP-1-Gehaltes. Abbasi-Oshaghi *et al.* (2019) konnten in Ratten zeigen, dass der MCP-1-Gehalt nach einer mehrfachen oralen Gabe von TiO₂-NP nahezu gleichbleibt. Warum die MCP-1-Gehalte in 3D-Co-Kulturexperimenten sich von diesen Ergebnissen so unterscheiden, konnte abschließend nicht geklärt werden. In zukünftigen Experimenten ist es möglicherweise ratsam auf ELISA-Assays zu verzichten und die Genexpression der Zytokine zu betrachten, vorausgesetzt die Zytokinexpression wird auf der Ribonukleinsäure-Ebene (RNA) reguliert.

5.5. Vergleich der akuten und chronischen Daten

Es kann gesagt werden, dass die Beeinträchtigung der 3D-Co-Kultur mehr durch die Exposition an sich als durch die NP verursacht wurde. Dies wird in den akuten Experimenten sehr deutlich. Bei den 24 Stunden Experimenten stellen sich deutlichere Effekte dar als bei den 72 Stunden Experimenten. Der Effekt durch die Exposition scheint nach 72 Stunden durch die Zellen ausgeglichen zu sein, wohingegen nach 24 Stunden die Zeit für die Normalisierung nicht

ausgereicht hat. Dies zeigt sich auch in den chronischen Daten, die ebenfalls nicht so deutliche Effekte aufweisen wie die 24 Stunden Versuche.

In den Vorexperimenten wurde deutlich, dass die Zellkulturen an einem Flüssigkeitsverlust (sichtbar durch die Verdunstung des Mediums) litten. Daraufhin wurde der Volumenstrom herabgesetzt. Dieser Effekt konnte jedoch nicht gänzlich beseitigt werden. Des Weiteren war in den ersten Versuchen ein deutlicher pH-Wert-Abfall in Richtung sauren Bereich zu sehen. Auch hier wurde das System angepasst und der Luft 5 % CO₂ zugemischt. Diese Anpassung verbesserte das Problem ebenfalls.

Auch könnten sich die Co-Kulturen eine Barriere schaffen, um mit etwaigen Stressoren umzugehen (vgl. Radiom *et al.*, 2020). Dies wird in chronischen Versuchen deutlich, da es hier mehr Effekte in den gespülten Experimenten gibt.

Bei der Arbeit mit primären Explantkulturen sollte darüber hinaus immer die Herkunft des Gewebes betrachtet werden. Die Vorexpositionen des Spendenden können durchaus veränderte Effekte zur Folge haben (u.a. World Health Organization, 1995).

5.6. Vergleichende *in-vivo* Daten zu Bariumsulfat- und Titandioxid-Nanopartikeln

Die kalkulierte Aerosolkonzentration liegt in der vorliegenden Arbeit für beide NP bei ca. 2 mg/m³. Im Vergleich mit *in-vivo* Studien liegt diese Konzentration im Bereich der nicht-*overload*-Situation für beide NP. In der nicht-*overload*-Situation sind für beide NP keine bis geringe adverse Effekte im Tierversuch beschrieben worden (Bermudez *et al.*, 2004; Landsiedel *et al.*, 2014; Ma-Hock *et al.*, 2009; Rehn *et al.*, 2003; Konduru *et al.*, 2014; Schwotzer *et al.*, 2017; Molina *et al.*, 2019). Diese Daten der Literatur decken sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit in der 3D-Co-Kultur. Als *Overload*-Konzentration bei BaSO₄-NP wurde die Konzentration 50 mg/m³ beschrieben (Molina *et al.*, 2019; Konduru *et al.*, 2014; Schwotzer *et al.*, 2017). Bei dieser Konzentration von BaSO₄-NP konnte gezeigt werden, dass im Langzeitexperiment der LDH-Gehalt in der Bronchoalveolarlavageflüssigkeit und die Belastung der Lunge mit Partikeln mit der Zeit ansteigen (Schwotzer *et al.*, 2017). Außerdem haben Konduru *et al.* (2014) und Molina *et al.* (2019) gezeigt, dass sich BaSO₄-NP im Körper verteilen. Dabei wird ein Großteil über die Fäzes und ein geringer Teil über den Urin ausgeschieden. Des Weiteren stellte Molina *et al.* (2019) fest, dass eine Umverteilung des Barium (nach intratrachealer Instillation) von der Lunge hauptsächlich in die Knochen stattfindet. Bei TiO₂ wurde die *Overload*-Konzentration auf 10 mg/m³ festgelegt (Ma-Hock *et al.*, 2009; Landsiedel *et al.*, 2014; Rehn *et al.*, 2003; Bermudez *et al.*, 2004). Ab dieser Konzentration können erhöhte Zellzahlen (Gesamtzellzahl, Monozyten und Neutrophile) in der

Bronchoalveolarlavageflüssigkeit gefunden werden. Es wurden außerdem erhöhte Werte der Enzyme γ -Glutamyltransferase, LDH und alkalische Phosphatase festgestellt. In der mikroskopischen Begutachtung wurden pigmentgeladene Makrophagen und leichte diffuse Histiozytose beobachtet (Landsiedel *et al.*, 2014; Ma-Hock *et al.*, 2009). Bermudez *et al.* (2004) beobachteten die Auswirkungen von inhalativ aufgenommenen ultrafeinem TiO₂ auf Mäuse, Ratten und Hamster. Dabei stellten sie fest, dass die *Clearance* bei Hamstern deutlich schneller verläuft als bei Mäusen und Ratten (Bermudez *et al.*, 2004). Im Vergleich der *in-vivo*-Daten mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen 3D-Co-Kultur-Modell sollte bedacht werden, dass auch die *Clearance* zwischen Tier und Mensch verschieden sein kann. Oberdörster und Pott (1987) konnte zeigen, dass sich z.B. die Akkumulation von Cadmium (aus Zigaretten) in der Lunge der Ratte von der Akkumulation im Menschen unterscheidet. Daher sollte bei der Betrachtung von *in-vivo*-Daten immer berücksichtigt werden, dass es sich um eine andere Spezies handelt, die eventuell nicht wie der Mensch auf die Partikel reagiert. Umso wichtiger erscheint es, humane *in-vitro*-Zellkulturmodelle zu etablieren. Die 3D-Co-Kultur besitzt im Vergleich zum Gesamtorganismus in den Tierversuchen eine geringere Komplexität, kann jedoch im Rahmen der 3R eine gute Alternative zu den bisher häufig eingesetzten humanen Monokulturen darstellen.

6. Zusammenfassung

Heutzutage sind Nanopartikel in vielen Produkten des alltäglichen Lebens zu finden z.B. in Textilien oder Kosmetika. Sie können während aller Stufen ihres Lebenszyklus, von der Fertigung bis hin zur Entsorgung, an die Umwelt abgegeben werden. Hauptsächlich werden Nanopartikel über das respiratorische System in den Körper aufgenommen. Deshalb wird es immer wichtiger, *in-vitro*-Modelle für den humanen Respirationstrakt zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein neues Zellkultur-Expositionssystem genutzt. Dabei handelt es sich um eine Polycarbonat-Membran in einem teilaktiven System (MatriGrid®). Die MatriGrids® sind ähnlich wie die Alveolen geformt und wurden mit primären peripheren Lungenzellen und der endothelialen Zelllinie EA.hy926 kultiviert. Die Vitalität der Co-Kulturen wurde mittels des Resazurin-*Assays* bestimmt. Die Membranintegrität wurde mit Hilfe des LDH-*Assays* ermittelt. Um den oxidativen Stress nach der Nanopartikelaerosol-Exposition abschätzen zu können, wurden DCF-*Assay* und Bestimmung des Glutathion-Gehaltes mit HPLC durchgeführt. Für die Einschätzung des inflammatorischen Geschehens wurden ELISA-*Assays* für die Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-8, Interferon- γ und MCP-1 vorgenommen. Mit Hilfe eines Kompressor-Düsenvernebler-Systems (PARI BOY®) konnten Aerosole erzeugt werden, die BaSO₄- und TiO₂-NP enthielten. In den verschiedenen Experimenten wurden teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Kulturen der einzelnen Patienten gefunden. Die Kultur des Patienten 332 zeigt eine Abnahme im chronisch gespülten TiO₂-Experiment bis auf 0 %, wohingegen Patient 341 nur auf 79 % abfällt. Ähnliche Ergebnisse lassen sich bei der Membranintegrität, dem GSH-Gehalt und den inflammatorischen Zytokinen beobachten. In allen Experimenten, ausgenommen dem DCF-Test, zeigen die hohen BaSO₄- und die niedrigeren TiO₂-Konzentrationen einen deutlicheren Effekt als die jeweils niedrigere bzw. höhere Konzentration. Außerdem zeigen sich stärkere Effekte nach der 24-stündigen Exposition als nach der 72-stündigen Exposition. Auch in den chronischen Versuchen gibt es Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsarten. Gespülte 3D-Co-Kulturen sind sensitiver gegenüber erneuten Expositionen als nicht gespülte Kulturen. Um die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu beurteilen, wurde der DCF-Test verwendet. Jedoch konnten keine verwendbaren Ergebnisse erzielt werden, da die Membran des MatriGrid's® die Fluoreszenzmessung verfälscht hat. Daher kann keine Abschätzung getroffen werden, wieviel oxidativem Stress die Kulturen nach der NP-Exposition ausgesetzt waren. Für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die inflammatorischen Zytokine ist es ratsam, in zukünftigen Experimenten auf Methoden zurückzugreifen, die eine Expression der Gene analysiert.

7. Literaturverzeichnis

- Abbasi-Oshaghi E, Mirzaei F, Pourjafar M (2019) NLRP3 inflammasome, oxidative stress, and apoptosis induced in the intestine and liver of rats treated with titanium dioxide nanoparticles: in vivo and in vitro study. *Int J Nanomedicine* 14:1919–1936.
- Akhtar MJ, Ahamed M, Alhadlaq HA, Alrokayan SA (2018) MgO nanoparticles cytotoxicity caused primarily by GSH depletion in human lung epithelial cells. *J Trace Elem Med Biol* 50:283–290.
- Alarifi S, Ali D, Al-Doaiss AA, Ali BA, Ahmed M, Al-Khedhairi AA (2013) Histologic and apoptotic changes induced by titanium dioxide nanoparticles in the livers of rats. *Int J Nanomedicine* 8:3937–3943.
- Alfaro-Moreno E, Nawrot TS, Vanaudenaerde BM, Hoylaerts MF, Vanoirbeek JA, Nemery B, Hoet PHM (2008) Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10. *Eur Respir J* 32:1184–1194.
- Almeida-Silva M, Cardoso J, Alemão C, Santos S, Monteiro A, Manteigas V, Marques-Ramos A (2022) Impact of Particles on Pulmonary Endothelial Cells. *Toxics* 10.
- Amrhein V, Greenland S., McShane B. (2019) Scientists rise up against statistical significance. *Nature* 567:305–307.
- Aninwene GE, Stout D, Yang Z, Webster TJ (2013) Nano-BaSO₄: a novel antimicrobial additive to pellethane. *Int J Nanomedicine* 8:1197–1205.
- Aufderheide M, Heller W-D, Krischenowski O, Möhle N, Hochrainer D (2017) Improvement of the CULTEX® exposure technology by radial distribution of the test aerosol. *Exp Toxicol Pathol* 69:359–365.
- Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D (2002) A method for the in vitro exposure of human cells to environmental and complex gaseous mixtures: application to various types of atmosphere. *Altern Lab Anim* 30:433–441.
- Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D (2003) Novel approaches for studying pulmonary toxicity in vitro. *Toxicology Letters* 140-141:205–211.
- Baisch BL, Corson NM, Wade-Mercer P, Gelein R, Kennell AJ, Oberdörster G, Elder A (2014) Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. *Part Fibre Toxicol* 11:5.
- Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F (2012) Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 24:125–135.

- Bariumsulfat. RÖMPP-Redaktion, Sitzmann H, Groteklaes M (2009) Abrufdatum 10.08.2022.
<https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-02-00258>.
- Bergman I, Casswell C (1972) Lung dust and lung iron contents of coal workers in different coalfields in Great Britain. *Br J Ind Med* 29:160–168.
- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 77:347–357.
- Bitterle E, Karg E, Schroepel A, Kreyling WG, Tippe A, Ferron GA, Schmid O, Heyder J, Maier KL, Hofer T (2006) Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere* 65:1784–1790.
- Bokhari M, Carnachan RJ, Cameron NR, Przyborski SA (2007) Novel cell culture device enabling three-dimensional cell growth and improved cell function. *Biochem Biophys Res Commun* 354:1095–1100.
- Boland S, Hussain S, Baeza-Squiban A (2014) Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 6:641–652.
- Borm PJA, Fowler P, Kirkland D (2018) An updated review of the genotoxicity of respirable crystalline silica. *Part Fibre Toxicol* 15:23.
- Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG (1987) Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* (1985) 63:152–157.
- Cell Culture Units Culture Exposure Systems. TSE Systems. Abrufdatum 11.08.2022.
<https://www.tse-systems.com/service/cell-culture-units/>.
- Cordelli E, Keller J, Eleuteri P, Villani P, Ma-Hock L, Schulz M, Landsiedel R, Pacchierotti F (2017) No genotoxicity in rat blood cells upon 3- or 6-month inhalation exposure to CeO₂ or BaSO₄ nanomaterials. *Mutagenesis* 32:13–22.
- Crouch EC (2000) Surfactant protein-D and pulmonary host defense. *Respir Res* 1:93–108.
- D'Alessio M, Cerella C, Amici C, Pesce C, Coppola S, Fanelli C, Nicola M de, Cristofanon S, Clavarino G, Bergamaschi A, Magrini A, Gualandi G, Ghibelli L (2004) Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells. *FASEB J* 18:1609–1611.
- Danpure CJ (1984) Lactate dehydrogenase and cell injury. *Cell Biochem Funct* 2:144–148.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29:313–326.

- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V (2005) Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. Part Fibre Toxicol 2:10.
- Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W (2005) Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. Thorax 60:293–300.
- Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A 80:3734–3737.
- El Morabet R: Effects of Outdoor Air Pollution on Human Health: Encyclopedia of Environmental Health. Elsevier, 2019, 278–286.
- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G (2006) Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. Environmental Health Perspectives 114:1172–1178.
- Ellis ED, Watkins J, Tankersley W, Phillips J, Girardi D (2010) Mortality among titanium dioxide workers at three DuPont plants. J Occup Environ Med 52:303–309.
- Europäische Kommission (2011) Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien.
- Europäische Kommission (2022) Verordnung (EU) 2022/63 der Kommission zur Änderung der Anhänge II und III der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich des Lebensmittelzusatzstoffs Titandioxid (E 171)
- Fields WR, Leonard RM, Odom PS, Nordskog BK, Ogden MW, Doolittle DJ (2005) Gene expression in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells following in vitro exposure to cigarette smoke condensate. Toxicol Sci 86:84–91.
- Fröhlich E, Salar-Behzadi S (2014) Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. Int J Mol Sci 15:4795–4822.
- Fytianos K, Chortarea S, Rodriguez-Lorenzo L, Blank F, Garnier C von, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B (2017) Aerosol Delivery of Functionalized Gold Nanoparticles Target and Activate Dendritic Cells in a 3D Lung Cellular Model. ACS Nano 11:375–383.
- Gebel T, Foth H, Damm G, Freyberger A, Kramer P-J, Lilienblum W, Röhl C, Schupp T, Weiss C, Wollin K-M, Hengstler JG (2014) Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment. Arch Toxicol 88:2191–2211.

- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51:1417–1423.
- Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI (2007) Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environmental Health Perspectives* 115:403–409.
- Goswami L, Kim K-H, Deep A, Das P, Bhattacharya SS, Kumar S, Adelodun AA (2017) Engineered nano particles: Nature, behavior, and effect on the environment. *J Environ Manage* 196:297–315.
- Groh D, Pipke L, Galander F, Schneider S (2011) Arzneimittelrückstände in der Umwelt - Datenbankauszug aus der Umweltforschungsdatenbank UFORDAT:42.
- Guiot C, Spalla O (2013) Stabilization of TiO₂ nanoparticles in complex medium through a pH adjustment protocol. *Environ Sci Technol* 47:1057–1064.
- Gurr J-R, Wang ASS, Chen C-H, Jan K-Y (2005) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213:66–73.
- Haagsman HP (1998) Interactions of surfactant protein A with pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1408:264–277.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*. 3. Aufl., Oxford Univ. Press, Oxford, 2005.
- Han X, Gelein R, Corson N, Wade-Mercer P, Jiang J, Biswas P, Finkelstein JN, Elder A, Oberdörster G (2011) Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology* 287:99–104.
- Hartwig A und MAK-Kommission (2017) Bariumsulfat (alveolengängige Fraktion):67–73.
- Hartwig A und MAK-Kommission (2019) Titandioxid (alveolengängige Fraktion):857–869.
- Hermanns MI, Fuchs S, Bock M, Wenzel K, Mayer E, Kehe K, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (2009) Primary human coculture model of alveolo-capillary unit to study mechanisms of injury to peripheral lung. *Cell and Tissue Research* 336:91–105.
- Huang MC, Willson CJ, Jaligama S, Baker GL, Singer AW, Cao Y, Pierfelice J, Mutlu E, Burbach B, Xie G, Malarkey DE, Sparrow B, Ryan K, Stout M, Roberts GK (2021) Whole-body inhalation exposure to 2-ethyltoluene for two weeks produced nasal lesions in rats and mice. *Inhal Toxicol* 33:334–346.

- Impaktion. Hentsch Sund Psychrembel Redaktion (2016) Abrufdatum 12.08.2022.
<https://www.pschyrembel.de/Impaktion/K0R1D>.
- Kerwien S. 2010. Adaptive Antwort von Lungenzellen auf Stressoren. Diplomarbeit. Halle: Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg.
- Kim BG, Lee PH, Lee SH, Park MK, Jang AS (2017) Effect of TiO₂ Nanoparticles on Inflammation-Mediated Airway Inflammation and Responsiveness. *Allergy Asthma Immunol Res* 9:257–264.
- Klein SG, Serchi T, Hoffmann L, Blömeke B, Gutleb AC (2013) An improved 3D tetraculture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Part Fibre Toxicol* 10:31.
- Konduru N, Keller J, Ma-Hock L, Gröters S, Landsiedel R, Donaghey TC, Brain JD, Wohlleben W, Molina RM (2014) Biokinetics and effects of barium sulfate nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 11:55.
- Landsiedel R, Ma-Hock L, Hofmann T, Wiemann M, Strauss V, Treumann S, Wohlleben W, Gröters S, Wiench K, van Ravenzwaay B (2014) Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 11:16.
- Latvala S, Hedberg J, Möller L, Odnevall Wallinder I, Karlsson HL, Elihn K (2016) Optimization of an air-liquid interface exposure system for assessing toxicity of airborne nanoparticles. *J Appl Toxicol* 36:1294–1301.
- Lehmann T (2001) Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology* 167:59–72.
- Li N, Duan Y, Hong M, Zheng L, Fei M, Zhao X, Wang J, Cui Y, Liu H, Cai J, Gong S, Wang H, Hong F (2010) Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters* 195:161–168.
- Lippmann M (1988) Asbestos exposure indices. *Environmental Research* 46:86–106.
- Lippmann M (1990) Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. *Environmental Health Perspectives* 88:311–317.
- Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B (2007) Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environmental Health Perspectives* 115:1631–1637.
- Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Aguerre-Chariol O, Bressot C, Le Bihan O, Amodeo T, Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G (2016) Air-liquid interface exposure to aerosols

- of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part Fibre Toxicol* 13:58.
- Loza K, Föhring I, Bünger J, Westphal GA, Köller M, Epple M, Sengstock C (2016) Barium sulfate micro- and nanoparticles as bioinert reference material in particle toxicology. *Nanotoxicology* 10:1492–1502.
- Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, van Ravenzwaay B, Landsiedel R (2009) Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol* 21:102–118.
- Mai P (2014) Mikrobioreaktor und 3D-Lungenzellkulturmodell für Expositionsuntersuchungen mit Xenobiotika.
- Mai P, Baca M, Borowiec J, Brauer D, Gebinoga M, Hampl J, Schlingloff G, Singh S, Weise F, Behr R, Beck J, Frey J, Voigt A, Schober A (2017a) MatriGrids Mimicking real organ structures with biolithomorphic processed porous membranes.
- Mai P, Borowiec J, Hampl J, Weise F, Singh S, Schlingloff G, Schober A (2016) Designs for scaffold based organotypic cell culture systems.
- Mai P, Fernekorn U, Hampl J, Foth H, Schober A (2013) Microstructured Polymeric Scaffold Termed MatriGrid for 3D-CO-Cultures.
- Mai P, Fernekorn U, Hampl J, Schober A, Foth H (2014) New 3D-co-culture model and microbioreactor for lung exposure experiments.
- Mai P, Hampl J, Baca M, Brauer D, Singh S, Weise F, Borowiec J, Schmidt A, Küstner JM, Klett M, Gebinoga M, Schroeder IS, Markert UR, Glahn F, Schumann B, Eckstein D, Schober A (2022) MatriGrid® Based Biological Morphologies: Tools for 3D Cell Culturing. *Bioengineering (Basel)* 9.
- Mai P, Hampl J, Weise F, Brauer D, Singh S, Schober A (2017b) Modular air-liquid-interface exposure system (MALIES) for even distribution of aerosolized nanoparticles to membrane cultures.
- Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E (2020) Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front Public Health* 8:14.
- Marquardt, H (Hrsg): *Toxikologie: Mit 378 Tabellen*, WVG Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart, 2013.
- McClellan, RO, Henderson, RF (Hrsg): *Concepts in inhalation toxicology*, Taylor & Francis, Washington, D.C, 1995.

- Mizoguchi I, Katahira Y, Inoue S, Sakamoto E, Watanabe A, Furusaka Y, Irie A, Senju S, Nishimura Y, Mizukami S, Hirayama K, Nakamura S, Eto K, Hasegawa H, Yoshimoto T (2022) A novel coculture system for assessing respiratory sensitizing potential by IL-4 in T cells. *ALTEX*.
- Molina RM, Konduru NV, Queiroz PM, Figueroa B, Fu D, Ma-Hock L, Groeters S, Schaudien D, Brain JD (2019) Fate of Barium Sulfate Nanoparticles Deposited in the Lungs of Rats. *Sci Rep* 9:8163.
- Mostovenko E, Saunders S, Muldoon PP, Bishop L, Campen MJ, Erdely A, Ottens AK (2021) Carbon Nanotube Exposure Triggers a Cerebral Peptidomic Response: Barrier Compromise, Neuroinflammation, and a Hyperexcited State. *Toxicol Sci* 182:107–119.
- Mousseau F, Berret J-F (2018) The role of surface charge in the interaction of nanoparticles with model pulmonary surfactants. *Soft Matter* 14:5764–5774.
- Mühl H, Pfeilschifter J (2003) Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- γ . *International Immunopharmacology* 3:1247–1255.
- Muhle H, Takenaka S, Mohr U, Dasenbrock C, Mermelstein R (1989) Lung tumor induction upon long-term low-level inhalation of crystalline silica. *Am J Ind Med* 15:343–346.
- NanoScan SMPS™ Nanoparticle Sizer Models 3910. TSI Incorporated. Abrufdatum 11.08.2022. https://tsi.com/getmedia/3188cb1d-2362-44c0-82b4-f2cc60afef17/NanoScan%20SMPS%203910_5001411?ext=.pdf.
- Newton GL, Dorian R, Fahey RC (1981) Analysis of biological thiols: Derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 114:383–387.
- Nogueira CM, Azevedo WM de, Dagli MLZ, Toma SH, Leite AZda, Lordello ML, Nishitokukado I, Ortiz-Agostinho CL, Duarte MIS, Ferreira MA, Sipahi AM (2012) Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World J Gastroenterol* 18:4729–4735.
- Oberdörster G, Pott F (1987) Extrapolation from rat studies with Environmental Tobacco Smoke (ETS) to humans: Comparison of particle mass deposition and of clearance behavior of ETS compounds. *Toxicology Letters* 35:107–112.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267:5421–5426.

- Optical Particle Sizer Model 3330. TSI Incorporated. Abrufdatum 11.08.2022.
https://tsi.com/getmedia/acc8a418-8ea8-458f-8ba3-a74c69ff35d7/A4_3330_5001324_Web?ext=.pdf.
- Park E-J, Yi J, Chung K-H, Ryu D-Y, Choi J, Park K (2008) Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters* 180:222–229.
- Petrova A, Hintz W, Tomas J (2008) Untersuchungen zur Herstellung von nanoskaligem Bariumsulfat. *Chemie Ingenieur Technik* 80:359–363.
- Radiom M, Sarkis M, Brookes O, Oikonomou EK, Baeza-Squiban A, Berret J-F (2020) Pulmonary surfactant inhibition of nanoparticle uptake by alveolar epithelial cells. *Sci Rep* 10:19436.
- Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M (2003) Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicology and Applied Pharmacology* 189:84–95.
- Rothen-Rutishauser B, Blank F, Mühlfeld C, Gehr P (2008) In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:1075–1089.
- Runge D, Stock T, Lehmann T, Taege C, Bernauer U, Beer Stolz D, Hofmann S, Foth H (2001) Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. *Arch Toxicol* 75:335–345.
- Russell WMS, Burch RL: *The principles of humane experimental technique*. 1959. Aufl., Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, Herts., 1992.
- Schlüter K-D (2019) Tierversuche: Übertragbarkeit auf den Menschen und ihre Durchführbarkeit. *Z Herz- Thorax- Gefäßchir* 33:67–71.
- Schmid M, Zimmermann S, Krug HF, Sures B (2007) Influence of platinum, palladium and rhodium as compared with cadmium, nickel and chromium on cell viability and oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Environ Int* 33:385–390.
- Schmitz S: *Der Experimentator: Zellkultur*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 2010.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163–189.
- Schumann B. 2012. Oxidativer Stress durch Tabakrauchkondensat in verschiedenen Zellkulturen. Diplomarbeit. Halle: Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg.

- Schumann B. 2021. Toxikologische Bewertung von Bariumsulfat-Nanopartikeln an verschiedenen Zellkulturmodellen der humanen Lunge.
- Schwotzer D, Ernst H, Schaudien D, Kock H, Pohlmann G, Dasenbrock C, Creutzenberg O (2017) Effects from a 90-day inhalation toxicity study with cerium oxide and barium sulfate nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol* 14:23.
- Schwotzer D, Niehof M, Schaudien D, Kock H, Hansen T, Dasenbrock C, Creutzenberg O (2018) Cerium oxide and barium sulfate nanoparticle inhalation affects gene expression in alveolar epithelial cells type II. *J Nanobiotechnology* 16:16.
- Seiler F, Rehn B, Rehn S, Hermann M, Bruch J (2001) Quartz exposure of the rat lung leads to a linear dose response in inflammation but not in oxidative DNA damage and mutagenicity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:492–498.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 10:15.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76–85.
- Thomas S. 2020. Toxikologische Bewertung von Bariumsulfat-Nanopartikeln und Filterstäuben. Dissertation. Halle: Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg.
- Thomas, S (Hrsg): NanoEmission: Schlussbericht, 2017.
- Titandioxid. Sitzmann H, Wölk H-J, Groteklaes M, Hartmann-Schreier J (2016) Abrufdatum 10.08.2022. <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-20-01896>.
- Torky A-RW, Stehfest E, Viehweger K, Taege C, Foth H (2005) Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture. *Toxicology* 207:437–450.
- Umweltbundesamt (2020) Nanomaterialien in der Umwelt – Aktueller Stand der Wissenschaft und Regulierungen zur Chemikaliensicherheit.
- Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA (2019) Moving to a World Beyond “ $p < 0.05$ ”. *The American Statistician* 73:1–19.
- Wichmann HE, Schlipkötter H-W, Fülgraff G: Handbuch der Umweltmedizin: Toxikologie, Epidemiologie, Hygiene, Belastungen, Wirkungen, Diagnostik, Prophylaxe, ecomed, Landsberg/Lech, 2003.
- World Health Organization: Wood dust and formaldehyde, World Health Organization International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1995.

8. Thesen

1. Aus einer wässrigen Nanopartikel-Suspension können mittels eines Kompressor-Düsenvernebler-Systems stabile Nanopartikel-Aerosole hergestellt werden.
2. Hohe Konzentrationen des BaSO₄-NP-Aerosoles beeinflussen die Vitalität, die Membranintegrität, den Glutathiongehalt und die Bildung inflammatorischer Zytokine in 3D-Co-Kulturen mit EA.hy926 und primären peripheren humanen Lungenzellen deutlicher als niedrige Konzentrationen.
3. Niedrige Konzentrationen des TiO₂-NP-Aerosoles beeinflussen die Vitalität, die Membranintegrität, den Glutathiongehalt und die Bildung inflammatorischer Zytokine in 3D-Co-Kulturen mit EA.hy926 und primären peripheren humanen Lungenzellen deutlicher als hohe Konzentrationen.
4. Nach 24-stündiger Exposition sind die Auswirkungen auf die 3D-Co-Kultur sichtbarer als nach 72-stündiger Exposition.
5. Bei additiver Aerosolgabe bildet sich eine Art Barriere durch Partikelauflagerung, die durch einen Waschvorgang entfernt werden kann.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Diana Eckstein

Halle (Saale), 28.11.2022

Erklärung über frühere Promotionsversuche

- (1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

- (2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Diana Eckstein

Halle (Saale), 28.11.2022

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidi Foth, die mir die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Umwelttoxikologie gab. Außerdem möchte ich ihr danken für die ausgezeichnete Betreuung, Förderung und Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung der gesamten Arbeit.

Auch möchte Herrn Dr. Felix Glahn danken, dass er mir stets mit wissenschaftlichem und technischem Rat zur Seite. Auch bei allen weiteren aktuellen und ehemaligen Kolleg:innen des Instituts für Umwelttoxikologie Sarah Thomas, Berit Schumann, Sabine Herrmann, Tina Röder und Oliver Krings möchte ich mich herzlich für die Unterstützung im Labor und in allen anderen Lebenslagen bedanken.

Herrn PD Dr. Marcus Krüger und Kolleg:innen (Klinik für Thoraxchirurgie des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dörlau), Herrn Prof. Dr. Andreas Schober und dessen Arbeitsgruppe (Institut für Nanobiosystemtechnik der TU Ilmenau), Herrn Dr. Martin Herzberg (Institut für Biologie/Mikrobiologie der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg) und allen weiteren Projektpartnern möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Laufe dieser Promotion danken.

Meinem Ehemann, meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die fortwährende moralische Unterstützung, Motivation und die offenen Ohren während meiner Promotion.