# Partikelinduzierte Zellmigration *in vitro*: Etablierung und Validierung eines Screening-Tests zur Beurteilung des inflammatorischen Potenzials von Partikeln

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

# **Isabell Schremmer**

aus Bochum

Bochum, August 2015

Angefertigt am Institut für Prävention und Arbeitsmedizin (IPA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (Institut der Ruhr-Universität Bochum)

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jürgen Bünger

Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2015

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität" erstellt worden ist.

Die meisten der für die Anfertigung dieser Arbeit erforderlichen Methoden wurden von mir selbst durchgeführt. Sowohl die Synthese als auch die Charakterisierung der Bariumsulfat-Partikel wurden durch Frau Kateryna Loza am Lehrstuhl für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Darüber hinaus hat Frau Loza die rasterelektronenmikroskopischen Bilder aller Partikel und Fasern aufgenommen.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 20. August 2015

(Isabell Schremmer)

# Inhalt

1		Zusa	amm	enfassung	8
2		Abs	tract		10
3		Einle	eitun	g und Grundlagen	12
	3.	1	Defi	nitionen	12
	3. Ai	2 rbeit:	Ges splatz	undheitsgefährdungen durch partikuläre und faserförmige Stäube z	am 13
	3. m	3 olek	Wirk ulare	kungsweise von partikulären und faserförmigen Stäuben auf zellulärer r Ebene	und 19
		3.3.	1	Clearance	19
		3.3.	2	Inflammatorische Signalwege in der Lunge	21
	3.	4	Ziels	setzung dieser Arbeit	28
4		Mate	erial/	Methoden	30
	4.	1	Zelll	inien	30
		4.1.	1	HL-60 Zellen	30
		4.1.	2	NR8383 Zellen	30
		4.1.	3	THP-1 Zellen	31
		4.1.4	4	A549 Zellen	31
		4.1.	5	Übersicht: eingesetzte Zelllinien	32
		4.1.	6	Zellen zählen und Life/Dead Staining mit Trypanblau	32
	4.	2	Inku	bation von NR8383 Zellen mit Partikeln	33
	4.	3	Aufr	nahme und Toxizität der Partikel in NR8383 Zellen	34
		4.3.	1	Lichtmikroskopie	34
4.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie		Konfokale Laserscanningmikroskopie	34		
		4.3.	3	Durchflusszytometrie	35
	4.	4	Che	motaxisassay	36
	4.	5	Zyto	toxizitätsassay	38
	4.	6	Iden	tifizierung von Chemokinen und Zytokinen	40
		4.6.	1	Aufreinigung der RNA	41

4.6.2	RNA-Quantifizierung und Qualitätskontrolle42
4.6.3	cDNA-Synthese und Eliminierung genomischer DNA43
4.6.4	Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Assays44
4.6.5	Immunassays46
4.7 Cha	arakterisierung der Partikel48
4.7.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM)49
4.7.2	Pulver-Röntgendiffraktometrie (PXRD)50
4.7.3	Dynamische Lichtstreuung51
4.7.4	Bestimmung der spezifischen Oberfläche52
4.7.5	Bestimmung des Zetapotenzials54
4.7.6	Fluoreszenzspektroskopie54
4.8 Syr	nthese von Bariumsulfat-Partikeln55
4.9 Cha	arakterisierung der Fasern56
4.10 Sta	tistische Analysen
5 Ergebni	sse60
5.1 Eta Alveolarm	blierung eines Chemotaxisassays auf der Basis von NR8383 akrophagen und dHL-60 Zellen, sowie Charakterisierung der Partikel60
5.1.1	Partikelcharakterisierung60
5.1.2	Toxizität66
5.1.3	Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit dHL-60 Zellen71
5.2 Eta Alveolarm kinetische	blierung eines Chemotaxisassays auf der Basis von NR8383 akrophagen, Charakterisierung beteiligter Zytokine und Chemokine sowie r Verlauf der Reaktion
5.2.1 Zellen	Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit unbehandelten NR8383
5.2.2	Regulation der Transkription von Zytokinen und Chemokinen81
5.2.3 Abhäng	Chemotaxis sowie Transkription von Zytokinen und Chemokinen in igkeit von der Inkubationszeit mit Partikeln
5.3 Eta Zellen	blierung eines Chemotaxisassays auf der Basis von THP-1 Zellen und dHL-60

	5	.3.1	Inkubation der THP-1 Zellen und A549 Zellen mit SiO <sub>2</sub> und rutilem TiO <sub>2</sub> 88
	5	.3.2	Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit THP-1 Zellen88
	5	.3.3	Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit A549 Zellen90
	5.4 Cha	Anv arakteri	vendung der Chemotaxisassays auf synthetisierte Bariumsulfat-Partikel, sierung der Partikelaufnahme und -toxizität91
	5	.4.1	Charakterisierung der Partikel91
	5	.4.2	Lokalisation innerhalb der NR8383 Zellen und Phagozytoseleistung94
	5	.4.3	Toxizität101
	5	.4.4	Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit Bariumsulfat104
	5	.4.5	Freisetzung von Zytokinen107
	5.5 Zyto	Anv okine u	vendung der Chemotaxisassays auf Asbestfasern, Charakteri-sierung beteiligter nd Chemokine und kinetischer Verlauf110
	5	.5.1	Charakterisierung der Fasern110
	5	.5.2	Toxizität111
	5	.5.3	Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA)112
	5	.5.4	Identifikation von Zytokinen und Chemokinen116
6	D	iskussi	on120
	6.1	Eigi	nung des entwickelten Assays und der eingesetzten Zellen
	6.2	Dos	ierungsschema des entwickelten Assays124
	6.3	Kor	relation von <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Ergebnissen – Prädiktivität127
	6	.3.1	Kristallines Quarz und amorphes SiO <sub>2</sub> 130
	6	.3.2	Titandioxid131
	6	.3.3	Carbon Black133
	6	.3.4	Bariumsulfat
	6.4	Einf	luss von Partikelparametern138
	6.5	Bisł	nerige in vitro-Möglichkeiten und Beteiligung einzelner Zytokine142
	6.6	Eta	blierung des PICMA mit Asbestfasern147
7	S	chluss	olgerungen und Ausblick152
8	А	nhang.	

8.1	Lite	eraturverzeichnis	154
8.2	Ab	bildungsverzeichnis	183
8.3	Ab	kürzungsverzeichnis	191
8.4	Wi	ssenschaftliche Leistung	194
8.4	.1	Veröffentlichungen	194
8.4	.2	Konferenzbeiträge	194
8.5	ΡX	RD-Spektren	196
8.6	ED	X-Analysen	199
8.7	Flu	oreszenzspektroskopische Analysen	201
8.8	Danksagung		

# 1 Zusammenfassung

Ein sehr großer Teil der Erkrankungen und Todesfälle von Personen mit anerkannten Berufskrankheiten wird durch die inhalative Belastung der Beschäftigten mit partikulären und faserförmigen Stäuben verursacht. Der derzeit gültige Arbeitsplatzgrenzwert (AGW) für "granuläre biobeständige, schwer lösliche Stäube" (GBS) von 1,5 mg/m<sup>3</sup> für alveolengängige Partikel wird kritisch diskutiert aufgrund des Verdachts, dass auch geringere Mengen an Partikeln schwere Erkrankungen der Lunge verursachen können. Die Bewertung der Faserwirkungen befindet sich aktuell ebenfalls aufgrund der potentiell toxischen Wirkung von vielen verschiedenen, neu entwickelten faserartigen Nanomaterialien in der Diskussion. Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten bislang nicht im Detail erklärt werden. Aus diesen Gründen werden dringend neue leistungsfähige und günstige toxikologische Screening-Methoden benötigt. Berücksichtigt man die hohen Kosten und die ethischen Probleme von Tierversuchen, sind leistungsfähige *in vitro*-Methoden eine notwendige Alternative, mit der die toxischen Eigenschaften von Partikeln und Fasern schnell und günstig charakterisiert werden können.

Die Toxizität der Partikel und Fasern wird maßgeblich durch ihre inflammatorischen Eigenschaften bestimmt. Für die akuten und chronischen Partikelwirkungen *in vivo* ist die Einwanderung von Entzündungszellen in die Lunge ein zuverlässiger toxikologischer Endpunkt. Im Rahmen dieses Projektes wurde die dosisabhängige Chemotaxis von Entzündungszellen als Reaktion auf eine inhalative Partikelexposition *in vitro* untersucht und in Form eines neuen Assays etabliert. Die so genannte Chemotaxis bezeichnet eine Migration von Zellen, beispielsweise neutrophilen Granulozyten, an den Ort einer entzündlichen Reaktion. Sie wird vermittelt durch Chemokine wie z.B. CXCL8.

Zu kultivierten NR8383 Alveolarmakrophagen wurden Partikel und Fasern mit entzündlicher unterschiedlich starker Wirkung gegeben: Bariumsulfat (BaSO<sub>4</sub>) (Inertkontrolle), Quarz und amorphes Siliziumdioxid (SiO<sub>2</sub>), Titandioxid (TiO<sub>2</sub>) (Kristallformen Anatas und Rutil), jeweils in verschiedenen Partikelgrößen und -dosierungen (32 bis 96 µg/cm<sup>2</sup>) sowie Asbestfasern verschiedenen Ursprungs (1 bis 64 µg/cm<sup>2</sup>). Die Zellen wurden für 16 Stunden mit den Partikeln und Fasern inkubiert. In dieser Zeit wurden sie von den Makrophagen phagozytiert, die als Reaktion chemotaktische Botenstoffe in das Medium abgaben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen und die Partikel abzentrifugiert und der Zellüberstand abgenommen. Mithilfe der Überstände wurde die Chemotaxis von unbehandelten NR8383 Zellen und differenzierten HL-60 Zellen induziert. An dieser Reaktion beteiligte Zytokine und Chemokine wurden auf RNA- und Proteinebene identifiziert und quantifiziert. Darüber hinaus wurden die Zytotoxizität der Partikel und Fasern bestimmt (Durchflusszytometrie und Real Time Cell Analyzer) und es fand eine umfangreiche physikochemische Charakterisierung der Partikel und Fasern statt.

Die Überstände von mit Partikeln und Fasern inkubierten NR8383 Zellen induzierten eine signifikante und dosisabhängige Chemotaxis von unbehandelten NR8383 Zellen und dHL-60 Zellen. BaSO<sub>4</sub> als Inert-Kontrolle löste keine und das schwach inflammatorisch wirksame TiO<sub>2</sub>-Mineral Anatas nur sehr schwache chemotaktische Wirkungen aus, während Partikel mit einem bekannten hohen inflammatorischen Potenzial eine starke Migration von Immunzellen auslösten (SiO<sub>2</sub>/Quarz > rutiles TiO<sub>2</sub>). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden die Zytokine CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL3 sowie TNF $\alpha$  in den untersuchten Proben deutlich hochreguliert.

Der Migrationsassay bildet Effekte reproduzierbar und dosisabhängig ab. Er ist leicht zu handhaben und kommt ohne den Einsatz von Primärzellen aus. Der Test bietet die Möglichkeit, inerte und inflammatorische Partikel *in vitro* zu unterscheiden. Darüber hinaus könnte er zukünftig eine schnelle und kostengünstige Vorstufe zum Tierversuch darstellen und für die Beurteilung der inflammatorischen Wirkung weiterer Partikel und Fasern (z.B. Nanomaterialien) eingesetzt werden. Der Ansatz eignet sich auch für grundlagenorientierte Forschung, da Effekte wie beispielsweise die Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen oder die Expression entsprechender Zellrezeptoren in einem funktionellen Zusammenhang untersucht werden können. Auch der Einfluss modifizierter Partikelparameter (z.B. Änderungen der Morphologie oder der Oberfläche) kann untersucht werden.

# 2 Abstract

Inhalation of particles and fibers are a major cause for occupational diseases and deaths. The German general occupational exposure limit (OEL) (1,5 mg/m<sup>3</sup>) for "respirable, insoluble particles regardless of composition" is currently re-assessed because there is growing evidence that these dusts are capable of toxic effects at relatively low exposure concentrations, implying that the control limit for dusts may not give adequate protection against occupational lung diseases. Toxicity of fibers is also re-evaluated because of the potential adverse health effects of nanofibers to the general environment. The underlying toxicity mechanisms are still not well-understood. As a consequence, there is great need for new efficient and cost-effective toxicological screening methods. Taking into consideration the high costs and the ethical probems of animal testing, reliable high-throughput *in vitro* screening methods are an attractive option for quick and inexpensive characterization of inflammatory and toxic properties of particles and fibers.

The extent of toxic effects of particles and fibers is a consequence of their inflammatory potentials. Accumulation of macrophages and neutrophils in the lung is a key feature of acute and chronic inflammatory reactions following particle exposures *in vivo*. This study investigates the chemotaxis of inflammatory cells in response to respired particles as a novel *in vitro*-system to assess particle-related health effects. Chemotaxis means the migration of cells (e.g. immune cells such as neutrophils) towards an inflammatory reaction, mediated by chemokines e.g. CXCL8.

NR8383 alveolar macrophages were challenged with particles and fibers causing different inflammatory effects: barium sulfate (BaSO<sub>4</sub>) (inert control), quartz and silica (SiO<sub>2</sub>), titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) (modifications anatase und and rutile), each of different sizes and doses (32 to 96  $\mu$ g cm<sup>-2</sup>) and asbestos fibers of different origins (1 to 64  $\mu$ g cm<sup>-2</sup>). The alveolar macrophages were challenged for 16 hours. During this time, particles and fibers were phagocytized and messenger molecules were secreted by the macrophages into the culture medium. Cells and particles were removed by centrifugation and the cell supernatants were used to induce cell migration of non-exposed NR8383 rat macrophages and differentiated HL-60 cells (dHL-60 cells). Chemokines and cytokines that play an important role in the inflammatory process inside the lung were determined by quantification of RNA and inflammatory proteins. Cytotoxicity of particles and fibers was determined using flow cytometry and a Real Time Cell Analyzer. A comprehensive physicochemical characterization of the particles and fibers contributed to the validity of the data.

The cell supernatants induced significant and dose-dependent cell migration of NR8383 and dHL-60 cells. BaSO<sub>4</sub> particles (inert control) induced no and low inflammatory anatase  $TiO_2$ 

only weak chemotactic effects. Particles with known high inflammatory potential induced a strong migration of immune cells (SiO<sub>2</sub>/quartz > rutile TiO<sub>2</sub>). CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL3, and TNF $\alpha$  were upregulated in response to the various particles to an extent correlating with the chemotactic effects.

This new model shows clearly differentiated effects in a highly reproducible and dosedependent way. The assay is easy to handle and avoids the use of primary cells. Thus, the assay is a useful approach to study inert and inflammatory particles *in vitro*. Moreover, it may also enable a rapid and cost effective screening of most other existing and newly developed particles and fibers (e. g. nanomaterials) for possible inflammatory effects. It is also useful to gain in-depth understanding of inflammatory signaling as a response to particles and fibers (e.g. release of pro- and anti-inflammatory cytokines and expression of their corresponding cell receptors) and to investigate the influence of different particle parameters (such as morphology or surface area) on inflammatory reactions.

# 3 Einleitung und Grundlagen

# 3.1 Definitionen

Die gesundheitsschädigende Wirkung von Luftverschmutzungen durch Stäube bzw. Aerosole am Arbeitsplatz und in der Umwelt stellen schon seit vielen Jahrzehnten ein Problem dar. Aerosole sind häufig am Arbeitsplatz zu finden und stehen im Fokus zahlreicher aktueller Diskussionen um atemwegstoxische Substanzen. Bei den *Aerosolen* handelt es sich um mehrphasige Systeme von Gasen (insbesondere Luft) und darin dispers verteilte partikelförmige Feststoffe oder Flüssigkeiten. Sie können als *Stäube*, *Rauche* oder *Nebel* vorliegen.

*Stäube* sind disperse Verteilungen fester Stoffe in Gasen, entstanden durch mechanische Prozesse, wie Sägen, Schleifen, Flexen oder Schweißen oder durch Aufwirbelung, beispielsweise von Schüttgut oder beim Pflügen (DFG, 2014). *Rauche* sind feinste disperse Verteilungen fester Stoffe in Gasen, insbesondere Luft, entstanden durch thermische (z. B. Schweißrauch oder Ruß) oder chemische Prozesse (z. B. durch die Reaktion von Ammoniak mit Chlorwasserstoff). *Nebel* sind disperse Verteilungen partikelförmiger flüssiger Stoffe (Tröpfchen) in Gasen, insbesondere Luft (DFG, 2014).

Aerosole, die in der Umwelt auftreten, sind sehr heterogen zusammengesetzt und haben verschiedene Ursprünge (WHO, 1999):

- mineralische Stäube, z.B. solche, die freies kristallines Quarz enthalten, Kohle- oder Zementstäube, auch Asbest
- metallische Stäube, z.B. Blei-, Cadmium-, Nickel- oder Berylliumstäube
- andere chemische Stäube z.B. von Bulkchemikalien oder Pestiziden
- Stäube organischen Ursprungs, z.B. Mehl-, Holz-, Baumwoll- oder Teestaub
- biologische Agentien, z.B. Schimmelsporen, Bakterien oder Viren

Darüber hinaus können Stäube nicht nur bei Arbeitsprozessen auftreten und problematisch werden, sondern auch natürlichen Ursprungs sein z.B. in Form von Pollen, Vulkanasche oder Sandstürmen (WHO, 1999).

Im Rahmen der Berufskrankheiten sind fibrinogene Stäube besonders relevant, z.B. Asbest oder andere ähnliche faserartige Materialien. Asbest ist eine zusammenfassende Bezeichnung natürlich vorkommender, mineralischer Silikat-Fasern, die eine Serpentin-(Schichtsilikat) oder Amphibol-Form (Kettensilikat) aufweisen. Typisch für Asbestminerale ist deren leichte Spaltbarkeit in der Längsachse zu feinsten Fasern, die bei Einatmung in tiefere Atemwegs- und Lungenabschnitte gelangen können. Aufgrund dieser Form und ihrer Biobeständigkeit besitzen sie ein erhöhtes gesundheitsschädigendes Potenzial (Review: Donaldson et al., 2010). Abgeleitet von diesem Potenzial werden Partikel mit einem Durchmesser < 3 µm und einer Länge > 5 µm und einem Seitenverhältnis von  $\ge$  3:1 als Fasern bezeichnet (WHO, 1997). Somit gehört nicht nur Asbest in diese Gruppe; weitere Beispiele sind synthetische Fasern wie Stein- oder Glaswolle, aber auch Keramik-, Nylon oder Carbonfasern.

# 3.2 Gesundheitsgefährdungen durch partikuläre und faserförmige Stäube am Arbeitsplatz

Die Freisetzung von Stäuben kann an jedem Arbeitsplatz auftreten, an dem Materialien abgebaut, zerkleinert, transportiert oder weiterverarbeitet werden. Im Folgenden seien nur einige Beispiele angeführt (WHO, 1999):

- Bergbau, Steinbrucharbeiten, Tunnelbau
- Schiffsbau
- Glas-, Keramik- und Steinmanufaktur
- pharmazeutische Industrie (Umgang mit Zwischenprodukten)
- Herstellung und Verarbeitung von Farben, Lacken, Pestiziden sowie insbesondere auch von Gummiprodukten
- Landwirtschaft (Pflügen, Ernten usw.)

Besonders risikobehaftet sind diejenigen Stäube, die eine mit fibrotischen Veränderungen einhergehende Staublungenerkrankung (z. B. Silikose durch Quarz) verursachen können. Hierzu sind insbesondere auch faserförmige Stäube in der Lage (z.B. Asbestose durch Asbest) (WHO, 1999).Unter allen gesundheitsgefährdenden Stoffen am Arbeitsplatz verursachen besonders Quarz- und Asbeststäube häufig schwerwiegende berufsbedingte Erkrankungen. Laut Statistiken der Unfallversicherungsträger wurden im Jahr 2013 3636 Fälle von Asbestose und 1503 Fälle von Silikose als Verdachtsfälle gemeldet. Davon wurden 1926 Fälle von Asbestose und 770 Fälle von Silikose durch die Berufsgenossenschaft anerkannt. Damit belegten diese Erkrankungen nach der Lärmschwerhörigkeit die Plätze 2 und 3 der am häufigsten anerkannten Berufskrankheiten (BAuA, 2014). Statistiken der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) zeigen zudem, dass sie von allen Stoffen am weitaus häufigsten zu berufsbedingten Todesfällen führten (Abbildung 1).



**Abbildung 1**: Infolge einer anerkannten Berufskrankheit (BK) verstorbene Personen im Jahr 2013. Abbildung modifiziert nach: Bericht "Sicherheit und Gesundheit bei der Arbeit 2013" der BAuA.

Ein wichtiges Instrument zum Schutz der Beschäftigten vor Gefährdungen ihrer Gesundheit und Sicherheit durch Gefahrstoffe stellen die Arbeitsplatzgrenzwerte dar. Nach § 2 Abs. 7 der Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) gibt der Arbeitsplatzgrenzwert an, bei welcher Konzentration eines Stoffes akute oder chronische schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit im Allgemeinen nicht zu erwarten sind (Technische Regeln für Gefahrstoffe TRGS 905 und TRGS 910, 2014).

Ob das jeweilige Aerosol eine inhalative Gesundheitsgefährdung darstellt, hängt stark von der Höhe der Exposition ab und davon, ob es eingeatmet werden kann und die tiefen Lungenkompartimente erreicht, aus denen es nur schwer eliminierbar ist. Bei hohen Expositionen, welche die Reinigungsmechanismen der Lunge überfordern (Overload), kann praktisch jeder Staub fibrotische Veränderungen bis hin zu Tumoren erzeugen; auch solche Stäube, die ansonsten als inert gelten (granuläre biobeständige Stäube; GBS) (Thurlbeck und Churg, 1995, WHO, 1999). Wegen der Vielzahl der vorkommenden Stäube und ihrer sehr heterogenen Zusammensetzung wurde ein "Allgemeiner Staubgrenzwert" (AGSW) eingeführt, der am Arbeitsplatz nicht überschritten werden darf (Technische Regel für Gefahrstoffe TRGS 900, 2014) Aufgrund der unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften ist dieser Grenzwert nach der Größe der Stäube (aerodynamischer Durchmesser) gestaffelt, bzw. nach deren Lungengängigkeit in alveolengängen (A)- und einatembaren (E)- Staub (Abbildung 2). Diese Fraktionen werden in der DIN EN 481 definiert. Den Massenanteil aller im Atembereich vorhandenen Teilchen, der durch Mund und Nase eingeatmet wird, bezeichnet man als einatembare Fraktion (E-Staub). Während kleinere Partikel

(Aerodynamischer Durchmesser < 5  $\mu$ m) fast vollständig eingeatmet werden, nimmt die Inhalierbarkeit zu größeren Partikeln hin ab (nichteinatembarer Anteil). Der *E*-Staub lässt sich, je nach Ablagerungsort in der Lunge, in weitere Staubfraktionen unterteilen (z. B. alveolengängige Fraktion, *A*-Staub).

Unter der alveolengängigen Fraktion versteht man den Teil des einatembaren Staubes, der so fein ist, dass er bis in die kleinsten Verzweigungen der Lunge, in die Alveolen (Lungenbläschen), vordringen kann. Für diese Teilchen lässt sich keine genaue Größe angeben, sondern lediglich eine Größenverteilung. Beschrieben wird dieser Bereich in der DIN EN 481 (Abbildung 2). Die abgebildete Kurve für die *A*-Fraktion stellt somit die Sammeleffizienz dar, mit der Teilchen mit einem bestimmten aerodynamischen Durchmesser in den Alveolen abgeschieden werden.



**Abbildung 2:** Unterschied zwischen alveolengängiger Fraktion (*A*) und einatembarer Fraktion (*E*). Wie tief Partikel in die Atemwege eindringen und in welchem Maße sie deponiert werden, hängt im Wesentlichen von ihrem aerodynamischen Partikeldurchmesser  $d_{ae}$  ab. Abbildung entnommen aus VBG, 2011.

Auch in der englischsprachigen Literatur erfolgt eine Klassifikation anhand des aerodynamischen Durchmessers d<sub>ae</sub>, wenngleich die Begrifflichkeiten sich leicht von denen der DIN EN 481 unterscheiden. Partikelstaub wird dort weitläufig als "PM" (particulate matter) bezeichnet. Der Vollständigkeit halber werden die Begrifflichkeiten hier kurz erwähnt (Abbildung 3).

Die  $PM_{10}$ -Fraktion beinhaltet alle einatembaren Partikel, deren aerodynamischer Durchmesser kleiner als 10 µm ist. Die  $PM_{2,5}$  Fraktion enthält Partikel mit einem d<sub>ae</sub> kleiner 2,5 µm und kann bis in die Alveolen vordringen (Donaldson und Stone, 2003, Oberdörster et al., 2005). Die Partikelgrößendefinitionen der sogenannten UFP (Ultrafeine Partikel) und NP (Nanopartikel) überschneiden sich teilweise: Ultrafeine Partikel sind kleiner als 100 nm und auch NP sind laut EU-Kommission als solche Teilchen definiert, deren Durchmesser höchstens 100 nm beträgt; jedoch haben sie eine Mindestgröße von 1 nm (European Commission, 2011). Nanopartikel und Ultrafeine Partikel können besser aufgrund ihrer Herkunft abgegrenzt werden: Im Gegensatz zu UFP bezeichnen NP industriell hergestellte Materialien mit ganz bestimmten Anforderungen (Gwinn und Vallyathan, 2006). Als UFP bezeichnet man z.B. Abgase von Verbrennungsmotoren, aber auch Vulkanstaub.



**Abbildung 3:** Depositionsschema inhalierbarer Partikel. Abbildung entnommen aus Kroker, 2014, modifiziert nach Nemmar et al., 2013.

Die Festlegung der Arbeitsplatzgrenzwerte erfolgt auf der Basis vorliegender arbeitsmedizinischer und toxikologischer Erkenntnisse. Auf nationaler Ebene arbeiten sowohl die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MAK-Kommission) als auch der Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS) derzeit intensiv an neuen Grenzwerten und weiteren Schutzmaßnahmen bezüglich partikelförmiger Gefahrstoffe. In diesem Zusammenhang ist die Bewertung von Quarz- und Asbeststäuben aufgrund nachgewiesener adverser Gesundheitseffekte belegt (z.B. Baan, 2007). Die wiederholte inhalative Exposition gegenüber Quarz führt zu Silikose und Lungenkrebs (Hnizdo und Vallyathan, 2003, Peretz et al., 2006), während die Exposition mit Asbest zu Asbestose, Mesotheliomen und Lungenkrebs führt (Review: Donaldson et al., 2010). Die aktuelle Diskussion konzentriert sich auf die oben genannten granulären biobeständigen Stäube (GBS), und zwar nicht nur auf (sub-)mikroskalige Partikel, sondern aufgrund des sehr schnell wachsenden Marktanteils auch auf nanoskalige Partikel. Es wird diskutiert, dass die Inhalation von Nanopartikeln eventuell toxischer auf die Lunge wirken könnte als die Exposition gegenüber Mikropartikeln des gleichen Minerals (Napierska et al., 2009 und 2010, Zhang et al., 2013). Bestimmte Nanofasern (sogenannte Multi-walled Carbonnanotubes MWCNT) stehen im Verdacht, eine ähnliche Wirkung in der Lunge zu haben wie Asbestfasern (Donaldson et al., 2010), und werden deshalb kritisch bewertet. Eine aktuelle Studie belegt den karzinogenen Effekt von vier verschiedenen MWCNTs in Ratten (Rittinghausen et al., 2014).

Ein aktueller Review beschreibt hingegen, dass adverse Gesundheitseffekte durch Nanopartikel bislang nicht durch epidemiologische Humanstudien belegt werden konnten. Vielmehr besteht durch den relativ kleinen Kreis an exponierten Beschäftigten und durch eine in der Regel kurze Expositionsdauer nur eine sehr schlechte epidemiologische Datenlage (Schulte et al., 2009). In diesem Zusammenhang stellen auch Mischexpositionen ein Problem dar. Oft sind Beschäftigte nicht nur einer Partikelart und auch nicht nur einer Partikelgröße ausgesetzt, so dass die Auswertung von epidemiologischen Daten zusätzlich erschwert wird. Darüber hinaus sind die Herstellung und der innovative Einsatz von Nanopartikeln ein so neuer Industriezweig, dass eine Auswertung bezüglich karzinogener Effekte erst in einigen Jahren erwartet werden kann.

Die Bewertung des inhalativen Risikos von GBS und Nanopartikeln und -fasern erfolgt durch entsprechende Gremien daher vor allem auf tierexperimenteller Datenlage. Insgesamt betrachtet ist die Beurteilung möglicher Gefährdungen durch partikuläre Stäube infolge der lückenhaften tierexperimentellen und epidemiologischen Datenlage sowohl für die nationalen als auch internationalen Gremien eine große Herausforderung.

Im Rahmen der Risikobeurteilung bzw. zur Vorhersage von toxischen Eigenschaften werden häufig Versuche an Tieren durchgeführt. Der Goldstandard für die Risikobeurteilung inhalativ aufnehmbarer Substanzen besteht in einer 90-tägigen subchronischen Inhalationsstudie an Nagern, die nicht nur eine eingehende Analyse von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) bezüglich Neutrophilen und Makrophagen, sondern auch histopathologische Untersuchungen der Lunge und Veränderungen an weiteren Organe einschließt (OECD, 2009). Das Durchführen von Tierstudien wird jedoch zunehmend kritisiert: Zum einen, weil die Ergebnisse aus Tierversuchen nur begrenzt auf die menschliche Spezies übertragen werden können (Leist und Hartung, 2013), zum anderen aus Gründen des Tierschutzes. Dies führte zum Beispiel zu einem EU-weiten Verkaufsverbot von Kosmetika, die mithilfe von Tierversuchen entwickelt wurden (European Commission, 2013). Die Untersuchung toxischer Effekte an lebenden Zellen ist hier eine vielversprechende Alternative, denn lebende Zellen sind als Zelllinien verfügbar und werden standardmäßig in der *in vitro*-Diagnostik eingesetzt.

Ein großer Vorteil von *in vitro*-Systemen ist, dass sie Aufklärungen von Wirkungsmechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene ermöglichen, die mit Studien am Rattenmodell und epidemiologischen Erhebungen so nicht möglich sind (BMBF, 2001). Ein Nachteil bei der Arbeit mit Zellkulturmodellen ist, dass die Wirkungsmechanismen oft nur bedingt auf andere Zelltypen übertragbar sind. Die komplexen interzellulären Interaktionen von verschiedenen Zelltypen *in vivo* können im Modell ebenfalls nicht vollständig berücksichtigt werden. Standardmäßig können nur bis zu zwei, in selteneren Fällen drei Zelltypen zusammen kultiviert werden. Dennoch können sie wertvolle Hinweise auf die Wirkungsweise von Partikeln und Fasern geben (Stone et al., 2009).

Beispiele für bereits alternativ zum Tierversuch etablierte *in vitro*-Systeme sind die Hautmodelle "EpiSkin" und "EpiDerm" (Netzlaff et al., 2005). Bislang sind leider nur wenige dieser tierversuchsfreien toxikologischen Prüfmethoden international anerkannt und in den Richtlinien der Europäischen Union (EU) und der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) als offizielle Prüfmethoden verankert. Erstrebenswert ist daher die Entwicklung und Validierung neuer *in vitro*-Methoden.

Gerade vor dem Hintergrund der Harmonisierung des Chemikalienrechts durch die sog. REACH-Verordnung (European Parliament, 2006), die eine zeitnahe Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien durch den Hersteller erfordert, ist die Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch dringend (Sayes et al., 2007) und wird durch eine Vielzahl von nationalen und internationalen Projekten gefördert (z.B. OECD Sponsorship Programme, 2010). Es wird angestrebt, zukünftig vielversprechende *in vitro*-Teststrategien mit *in vivo*-Studien zu kombinieren und die Risikobeurteilung auf Basis einer breiten Datenlage kostengünstig und im Rahmen des 3R-Prinzips ("Replacement, Reduction, Refinement of animal testing") ethisch unbedenklicher zu gestalten (Oomen et al., 2014, European Parliament, 2010).

# 3.3 Wirkungsweise von partikulären und faserförmigen Stäuben auf zellulärer und molekularer Ebene

Bezüglich der Toxizität von partikulären und faserförmigen Stäuben sind folgende Parameter von besonderer Wichtigkeit, die in diesem Kapitel erläutert werden sollen: Die Retentionsdauer der Substanzen in der Lunge (bzw. die Clearance) und die persistierende Entzündung im Alveolus, welche mit einer fortschreitenden Epithelproliferation und fibrotischen Veränderungen einhergeht (Muhle und Mangelsdorf, 2003).

#### 3.3.1 Clearance

Die Atemwege sind mit einem effektiven System zur Eliminierung abgeschiedener Partikel ausgestattet (Fokkens und Scheeren, 2000). Überwinden Partikel den nasopharyngealen Raum und werden in den Atemwegen deponiert, können sie wie folgt wieder eliminiert werden: Durch die sogenannte mukoziliäre Clearance (durch Zilientätigkeit), durch Bewegung der Bronchiolen (z.B. Husten), und mittels alveolärer Clearance (d.h. durch Makrophagen).

Das Epithel in den Alveolen besitzt keine Zilien. Unlösliche Partikel, die die Alveolen erreichen, scheiden sich auf den Epithelzellen ab (Gehr et al., 1990), bis sie von Alveolarmakrophagen erkannt und phagozytiert werden (Casarett et al., 2001). Diese Makrophagen sind daher die erste Abwehrlinie der Alveolen. Sie nehmen die Schlüsselrolle für die Clearance und die inflammatorischen Reaktionen gegenüber biopersistenten Substanzen innerhalb des unteren Respirationstraktes ein. Ihre Population macht etwa 40-50 % der Zellen in einer BALF aus sowie etwa 5 % der Zellpopulation gemessen an allen Lungenzellen (Riechelmann, 2004). Wie Makrophagen die Partikel erkennen und phagozytieren, war lange Zeit unbekannt. Mittlerweile gilt die Rolle von Scavenger-Rezeptoren in diesem Zusammenhang als gut belegt (Chnari et al., 2006, Arredouani et al., 2004). Diese Rezeptoren sind die einfachste Form der sogenannten Pattern Recognition-Rezeptoren. Sie sind vorrangig auf Makrophagen zu finden, werden zum Teil aber auch durch respiratorische Epithelzellen exprimiert (Stringer et al., 1996, Riechelmann, 2004). Nach der Phagozytose können die folgenden drei Möglichkeiten eintreten: Entweder der Alveolarmakrophage erreicht das Zilienepithel und wird dann aufwärts transportiert (sog. "mucociliary escalator") (Brain, 1988), der Alveolarmakrophage bleibt im Alveolarraum oder der Alveolarmakrophage migriert ins lymphatische System (Vincent und Donaldson, 1990).

Die *langsame Clearance* wird durch Alveolarmakrophagen vermittelt und für die Ratte mit einer Rate von ca. 1 % pro Tag geschätzt, was einer Halbwertzeit von etwa 60 bis 70 Tagen entspricht (Vincent, 1995). Andere Autoren verweisen auf eine bis zu 10-mal langsamere, indirekt gemessene alveoläre Clearance von Partikeln aus der menschlichen Lunge (Oberdörster, 1995, Snipes, 1989). In diversen experimentellen Tierstudien konnte gezeigt werden, dass eine Akkumulation großer Mengen unlöslicher Partikel in der Lunge die Clearance stark beeinträchtigt (Jones et al., 1988). In diesem Fall spricht man von einem Overload und vermutet eine deutliche Verstärkung toxischer Effekte. Aufgrund der hohen Biopersistenz und der damit einhergehenden langen Clearancezeit kann es im Fall einer lange andauernden (z.B. beruflichen) Exposition zu einem Overload der Makrophagen mit unlöslichen Partikeln kommen, selbst wenn die eingeatmete Dosis nur relativ gering ist (Tran et al., 1999). Dieser Overload wird als Risikofaktor für Lungenkrebs diskutiert, sogar für Substanzen, die eigentlich keine toxischen Effekte haben (Morrow, 1992). Diese sogenannte *indirekte Toxizität* resultiert aus einem über einen langen Zeitraum andauernden Inflammationsgeschehen in der Lunge. Auch wenn sie durch die Partikelexposition ausgelöst wird, so besitzt der Partikel selbst keine toxischen Wirkungen auf die Lungenzellen (Drew et al., 2009).

Im Falle einer Exposition gegenüber faserförmigen Stäuben (z.B. Asbestfasern) ist zudem die Faserlänge ein limitierender Faktor für die Makrophagen-vermittelte Clearance. Überschreitet die Faserlänge den Durchmesser des Aveolarmakrophagen, so ist die Faser nur unvollständig phagozytierbar (Ye et al., 1999). Diese so genannte frustrierte Phagozytose kann, vermittelt u.a. durch die Generierung von ROS (Radikalen Sauerstoffspezies), zu weiteren Gewebeschädigungen führen (Schinwald und Donaldson, 2012).

Im direkten Zusammenhang mit der verlangsamten pulmonalen Clearance wird auch die Anlockung von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum assoziiert (Donaldson et al., 1988, Tran et al., 2000), weil der Makrophage infolge der Phagozytose eine Reihe von proinflammatorischen Botenstoffen freisetzen kann. Manche Partikel können, sofern sie zytotoxische Eigenschaften haben (wie z.B. Quarzstäube), die Alveolarmakrophagen auch abtöten (WHO, 1999).

Auch der obere Respirationstrakt spielt bei der Clearance von partikulären und faserförmigen Stäuben eine wichtige Rolle. Sowohl in der Trachea als auch in den Bronchien, bis hin zu den terminalen Bronchiolen, befindet sich ein Zilienepithel, welches mit einer Mukusschicht überzogen ist. Die Zilien bewegen sich permanent und synchron, wodurch sich die Mukusschicht kontinuierlich aufwärts bewegt. Die Geschwindigkeit beträgt etwa fünf Millimeter pro Minute, weswegen man hier auch von der *schnellen Clearance* spricht (Vincent, 1995). Unlösliche Partikel bewegen sich auf dem Zilienepithel in Richtung der Epiglottis aufwärts, bis sie heruntergeschluckt oder ausgespuckt werden. Intermittierende peristaltische Bewegungen der Bronchiolen sowie Husten und Niesen kann Partikel oder von Makrophagen phagozytierte Partikel im Mukus aufwärts treiben (Houtmeyers et al., 1999).

#### 3.3.2 Inflammatorische Signalwege in der Lunge

Die große Oberfläche der Lunge stellt ein Target für eingeatmete Luftverschmutzungen und Partikel dar. Ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Signalen ist essentiell für die Homöostase der Lunge (Keane und Strieter, 2002).

Die Funktion der Alveolarmakrophagen beruht auf einem sehr empfindlichen Gleichgewicht und eine Dysbalance kann die Entstehung von chronischen Erkrankungen der Lunge fördern (Fels und Cohn, 1986, Rubins, 2003, Haberzettl et al., 2007). Entzündliche Prozesse involvieren verschiedene Zelltypen, die sich wechselseitig beeinflussen, und ein komplexes Informationsnetz aus Botenstoffen und Zellrezeptoren, die diese Signale verarbeiten bzw. an andere Zellen weiterleiten. Auf diese Weise werden z.B. Makrophagen, Neutrophile oder Eosinophile angelockt oder die Migration und Differenzierung von dendritischen Zellen beeinflusst und somit das Ausmaß der Immunantwort bestimmt. Immunzellen sezernieren eine Vielzahl von niedermolekularen Peptidmediatoren (Molekulargewicht ca. 8 bis 30 kDa), die sowohl parakrin als auch autokrin wirken können (Abbas et al., 2012). In den folgenden Abschnitten sind die Zytokine und Chemokine, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, und die komplexe Interaktion von Zelltypen innerhalb des Alveolus dargestellt.

*Zytokine* sind meist hochwirksam, weswegen sie einer strikten Regulation auf Transkriptionsund Translationsebene unterliegen. Ihre Bindung an spezifische Zytokinrezeptoren auf den Zielzellen mündet in eine Signaltransduktion mit anschließender Aktivierung von Genen und nachgeschalteter Proteinbiosynthese. Sie wirken meist pleiotrop, (d.h. auf verschiedene Zielzellen) und können somit auch unterschiedliche Effekte verursachen. Nicht nur das Ausmaß von Entzündungs- und Immunabwehrreaktionen, sondern auch die Hämatopoese wird durch Zytokine beeinflusst. Zu den Zytokinen zählen die Interleukine, die Interferone, die Tumornekrosefaktoren und die Koloniestimulierenden Faktoren (Tabelle 1). Darüber hinaus können sie in pro- und antiinflammatorische Zytokine eingeteilt werden. Klassische Beispiele für entzündungsfördernde Vertreter sind der Tumornekrosefaktor (TNF $\alpha$ ) sowie die Interleukine 1, 2, 6 und 12. Entzündungshemmende Zytokine wie IL-10 und der Transformierende Wachstumsfaktor (TGF)- $\beta$  unterdrücken die Immunantwort und sind dafür verantwortlich, dass die Entzündungsreaktion wieder abklingt (Saloga et al., 2011). **Tabelle 1:** Die für diese Arbeit relevanten Zytokine, ihre produzierenden Zellen, ihre Zielrezeptoren und ihre Effekte (Abbas et al., 2012).

Zytokin	Produzierende Zelle	Zytokinrezeptor	Zielzellen und Effekte			
Familie der Typ 1 Zytokine						
	Makronhage	CD126 (IL-6Ra)	Leber: Synthese von akute-Phase-Proteinen			
Interleukin-6 (IL-6)	Endothelzelle, T-Zelle	CD130 (gp130)	Knochenmark: Proliferation von AK- produzierenden Zellen			
Granulozyt-Monozyt- CSF (GM-CSF, CSF 2)	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten	CD116 (GM-CSFRα) CD131 (β <sub>c</sub> )	Reifung von Granulozyten und Monozyten, Aktivierung von Makrophagen			
Monozyt CSF (M-CSF, CSF 1)	Makrophagen, Endothelzellen, Knochenmarkzellen, Fibroblasten	CD115 (CSF1R)	Reifung von Monozyten			
Granulozyten CSF (G- CSF, CSF 3)	Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen	CD114 (CSF3R)	Reifung von Granulozyten			
	Familie der T	yp 2 Zytokine				
	Dondritische Zellen	IFNAR1	Aktivierung von NK- Zellen			
Interferon-α	Makrophagen	CD118 (IFNAR2)	Alle Zellen: erhöhte Expression von Klasse I MHC			
Interleukin-10 (IL-10)	Makrophagen, T-Zellen	CD210 (IL-10R1) CD210B (IL-10R2)	Makrophagen, dendritische Zellen: IL- 12 Expression↓			
Interleukin-19 (IL-19)	Makrophagen	IL20R1 CD210B (IL-10R2)	Stimulation der IL-1 und TNFα -Sekretion (Makrophagen)			
	Zytokine der T	NF Superfamilie	,			
Tumornekrosefaktor (TNFα)	Makrophagen, NK Zellen, T-Zellen	CD120a (TNFRSF1) oder CD120b (TNFRSF2)	Aktivierung von Endothelzellen (Inflammation, Coagulation); Aktivierung von Neutrophilen; Synthese von akute-Phase- Proteinen (Leber)			
	Zytokine de	r IL-1 Familie				
Interleukin-1α (IL-1α)	Makrophagen, dendritische Zellen,	CD121a (IL-1R1) II -1BAP	Aktivierung von Endothelzellen			
Interleukin-1β (IL-1β)	Endothelzellen, Keratinozyten, Hepatozyten	oder CD121b (IL-1R2)	(Inflammation), Synthese von akute- Phase-Proteinen (Leber)			
Interleukin-18 (IL-18)	Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen	CD218a (IL-18R1) CD218b (IL-18RAP)	Monozyten:Expression↑ TNFα, IL-1β; Neutrophile: Aktivierung, Zytokinfreisetzung ↑			

Die sogenannten *Chemokine* sind eine Untergruppe der Familie der Zytokine. Sie haben ein geringes Molekulargewicht zwischen 7 und 15 kDa und stimulieren die Anlockung von Leukozyten (Oppenheim et al., 1991), d.h. sie üben eine chemotaktische Funktion auf die jeweiligen Zielzellen aus. Damit spielen sie eine zentrale Rolle bei Entzündungsprozessen. Hat sich lokal in einem Gewebe eine Infektion ausgebreitet, locken die Chemokine Monozyten, neutrophile Granulozyten und naive T-Zellen zur Wanderung in Richtung des Infektionsherdes an. Typischerweise wird ihre Ausschüttung zunächst von primären inflammatorischen Mediatoren induziert (z.B. Interleukin-1 oder TNFα), bevor sie als sekundäre proinflammatorische Mediatoren Leukozyten anlocken. Alle Chemokine haben eine genomische Grundstruktur aus drei Exons und zwei Introns gemeinsam. Die Aminosäuresequenz der Zytokine enthält vier konservierte Cysteinreste, welche Disulfidgruppen bilden. Je nach Position dieser Disulfidgruppen unterscheidet man vier Zytokinfamilien: CC-Chemokine (auch β-Chemokine) sind auf dem Chromosom 17 lokalisiert und stimulieren Monozyten, aber auch Basophile, Eosinophile, T-Lymphozyten und NK-Zellen (Graves und Jiang, 1995) (Tabelle 2).

CC-Chemokin	ursprüngl. Name	Chemokinrezeptor	Funktion
CCL1	I-309	CCR8	Anlockung von Monozyten, Migration von Endothelzellen
CCL2	MCP-1	CCR2	Anlockung von Leukozyten
CCL3	MIP-1α	CCR1, CCR5	Anlockung von Leukozyten
CCL4	MIP-1β	CCR5	Anlockung von T-Zellen, Dendritischen Zellen, Monozyten und NK-Zellen
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	Anlockung von Leukozyten
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	Anlockung von Leukozyten
CCL8	MCP-2	CCR3, CCR5	Anlockung von Leukozyten
CCL11	Eotaxin	CCR3	Anlockung von Eosinophilen, Basophilen und T <sub>H</sub> 2-Zellen
CCL12	-	CCR2	Anlockung von Leukozyten
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3	Anlockung von Leukozyten
CCL15	MIP-1δ	CCR1, CCR3	Anlockung von Leukozyten
CCL17	TARC	CCR4	Anlockung von T-Zellen und Basophilen

**Tabelle 2:** Übersicht der für diese Arbeit relevanten CC-Chemokine (Abbas et al., 2012).

CXC-Chemokine (auch  $\alpha$ -Chemokine genannt) sind auf dem Chromosom 4 lokalisiert (Mukaida et al., 1989). Primär stimulieren sie Neutrophile. Die Bindestelle der CXC-

Chemokine befindet sich am N-terminalen Ende des Liganden. An dieser Stelle ist eine Glu-Leu-Arg Sequenz entscheidend für die Bindung (Clark-Lewis et al., 1993) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der für diese Arbeit relevanten CXC-Chemokine (Abbas et al., 2012).					
CXC-Chemokin	ursprüngl. Name	Chemokinrezeptor	Funktion		
CXCL1	GROα	CXCR2	Anlockung von Neutrophilen		
CXCL2	GROβ	CXCR2	Anlockung von Neutrophilen		
CXCL3	GROγ	CXCR2	Anlockung von Neutrophilen		
CXCL4	PF4	CXC3B	Thrombozytenaggregation		
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Anlockung von Neutrophilen		
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Anlockung von Neutrophilen		
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Anlockung von Neutrophilen		
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Anlockung von Neutrophilen		
CXCL9	Mig	CXCR3	Anlockung von Effektor-T- Zellen		
CXCL10	IP-10	CXC3, CXCR3B	Anlockung von Effektor-T- Zellen		
CXCL11	I-TAC	CXC3	Anlockung von Effektor-T- Zellen		
CXCL12	SDF-1αβ	CXCR4	Anlockung von Leukozyten		
CXCL13	BCA-1	CXCR5	B-Zellmigration in Follikel		

Zwei weitere, kleine Familien der Chemokine sind die XC-Chemokine, zu denen das Lymphotactin (XCL-1) gehört, und außerdem die  $CX_3C$ -Chemokine mit CX3CL1 als bekanntestem Vertreter (Abbas et. al, 2012).

Wie die Zytokine wirken auch die meisten Chemokine pleiotrop. Sie binden an einen, in vielen Fällen auch an mehrere GTP-gekoppelte Chemokin-Rezeptoren. Diese Rezeptoren lassen sich wiederrum einteilen in solche, deren Expression induzierbar ist (proinflammatorisch) und solche, die konstitutiv exprimiert sind (homöostatisch). Die Chemokin-Rezeptor-Paare Induktion einiger spielt in chronisch-entzündlichen Lungenerkrankungen eine wichtige Rolle: z.B. CCL3, CCL4 und Rezeptor CCR5 (Abbildung 4) (Johnson et al., 2005). Sie könnten ein interessanter Ansatz für die Betrachtung von entzündlichen Wirkungen von partikulären und faserförmigen Stäuben sein.



**Abbildung 4:** Liganden und Rezeptoren des Chemokin-Systems. Konstitutiv exprimierte Rezeptoren sind in blau, induzierbare in rot abgebildet. Krankheiten, deren Pathogenese von bestimmten Rezeptor-Liganden-Paaren beeinflusst wird, sind in grau dargestellt (Johnson et al., 2005).

Auch wenn die Beteiligung einzelner Chemokine und Zytokine im Falle einer Partikelexposition bislang nicht gut untersucht ist, so ist die Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten in der Lunge der wahrscheinlich deutlichste Marker für eine partikelinduzierte Entzündungsreaktion *in vivo* (Klein et al., 2012, Ma-Hock et al., 2009a).

Eine Vergrößerung der Makrophagen- und/oder Neutrophilenpopulation innerhalb der Lunge ist ein häufig verwendeter Marker für eine inflammatorische Reaktion nach einer inhalativen Partikelexposition (Duffin et al., 2001). Diverse Studien verknüpfen die wiederholte inhalative Exposition gegenüber granulären biobeständigen Stäuben mit einer konstanten Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen und irreversiblen Effekten wie Fibrosen oder COPD (Bringardner et al., 2008, MacNee und Donaldson, 2003, Tirouvanziam, 2006). Ihre Beteiligung an der Pathogenese von Lungenkrebserkrankungen gilt als gut belegt (Knaapen et al., 2006, Schottenfeld und Beebe-Dimmer, 2006, Skillrud et al., 1986, Tetley, 2005). Die folgende Abbildung zeigt daher eine kurze Einführung in den Ablauf der neutrophilen Entzündung im Alveolus (Abbildung 5), die für diese Arbeit von zentraler Bedeutung ist:



**Abbildung 5:** Gleichgewichtszustand im Alveolus und dort anzutreffende Zelltypen (A) und Makrophagen-vermittelte neutrophile Migration in den Alveolus (B) mit anschließender Freisetzung zytotoxischer Faktoren durch den aktivierten neutrophilen Granulozyten. Abbildung entnommen und modifiziert aus Grommes und Soehnlein, 2011.

Der Alveolus wird von einer Kapillare umschlossen und ist der zentrale Ort für den Austausch von Sauerstoff und CO<sub>2</sub> zwischen Blut und Atemluft. Typ I Pneumozyten formen die äußere Struktur des Alveolus und sind für den Gasaustausch verantwortlich, während Typ II Pneumozyten für die Produktion von Surfactant verantwortlich sind. Eine wichtige Rolle für die erste Abwehr nehmen die Alveolarmakrophagen ein, die wie bereits

beschrieben als erste Immunzellen mit eingeatmeten Pathogenen (bzw. Partikeln) in Kontakt treten (Abbildung 5A). Im Falle einer Überlastung der Makrophagen-vermittelten Clearance kommt es zu einer Aktivierung der Alveolarmakrophagen, welche mit einer Erhöhung des Zellmetabolismus, der -mobilität sowie einer gesteigerten lysozymalen Aktivität einhergeht (Fujihara et al., 2003). Ferner kommt es durch eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren zu einer verstärkten Migration von Neutrophilen in den Alveolus (Abbildung 5B). Der Alveolarmakrophage setzt Zytokine frei (z.B. IL-1, IL-8, TNFa), aber auch Eicosanoide (z.B. Leukotrien  $B_4$ ) (Fuller, 1992), welche die Leukozyten (insbesondere neutrophile Granulozyten und Monozyten) in fünf Schritten aus dem Blut ins Gewebe leiten: Zunächst vermitteln Selektine eine lockere Haftung zwischen Endothel- und Immunzellen (1). Es erfolgt eine lose Bindungsbildung und -ablösung und durch die Scherkraft des Blutstroms "rollt" die Immunzelle an der Gefäßwand entlang (2). Wird die Endothelzelle durch Chemokine aktiviert (3), erfolgt eine Integrin-vermittelte Adhäsion, die der Scherkraft des Blutstroms widersteht (4). Der Leukozyt migriert daraufhin durch die Endothelzellnischen und durch das Interstitium in den Alveolus (5) und setzt dort zytotoxische Faktoren frei (z.B. radikale Sauerstoffspezies ROS, NO) (Grommes und Soehnlein, 2011). Um eine überschießende Reaktion zu vermeiden, können Alveolarmakrophagen ihre eigenen Mediatoren durch Freisetzung von freiem TNF-Rezeptor oder durch Bildung von IL-10 blockieren (Nicod et al., 1995).

Zahlreiche Untersuchungen belegen die Freisetzung unterschiedlicher proinflammatorischer Mediatoren nach der inhalativen Exposition gegenüber partikulären Stäuben. Kim et al. (1999) weisen in ihrer Arbeit auf die Möglichkeit unterschiedlicher Mechanismen hin, über die Partikel ihre toxischen Wirkungen entfalten können. In vitro-Ansätze in diesem Zusammenhang konzentrieren sich oft nur auf die Freisetzung einzelner Zytokine wie z.B. TNFa oder IL-6 und spiegeln diese unterschiedlichen toxischen Wirkungen nur unzureichend wieder. Diese Betrachtungen liefern keine schlüssige Erklärung für die unterschiedliche pathogene Wirkung von Partikeln. Da unterschiedliche Substanzen zur Freisetzung unterschiedlicher Signalmoleküle führen könnten, wird daher empfohlen, im Rahmen von in vitro-Ansätzen eine ganzes Spektrum an Zytokinen zu quantifizieren (Stone et al., 2009). Als Einflussfaktoren auf die Toxizität von Partikeln werden weiterhin diverse physikochemische Eigenschaften von Partikeln diskutiert. Sowohl die spezifische Oberfläche, die Größe der Primärpartikel und die der Agglomerate und die Oberflächenladung können möglicherweise das toxische Potenzial von Partikeln beeinflussen (OECD, 2009, Review: Landsiedel et al., 2010). Bisherige experimentelle Möglichkeiten sind oft dadurch eingeschränkt, dass Partikel mit den Endpunkten der toxikologischen in vitro-Tests interferieren können. Deren Endpunkte basieren zumeist auf optischen Verfahren, sodass Adsorption und Streuung an den Partikeln die Ergebnisse beeinflussen können (Kroll et al., 2009). Wünschenswert wären demnach neue *in vitro*-Verfahren, welche die toxischen Wirkungen von partikulären und faserförmigen Stäuben besser abbilden und nicht mit den optischen Endpunkten der Detektionsverfahren interferieren.

## 3.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Partikuläre und faserförmige Stäube können sich bekanntermaßen in der Art und in dem Ausmaß der verursachten entzündlichen Wirkungen unterscheiden. Obwohl viele dieser Mechanismen noch unklar sind. so ist eine wesentliche Beteiligung von Alveolarmakrophagen unumstritten. Sie sind verantwortlich für die Clearance der Partikel und Fasern aus dem Alveolarraum, aber auch für die Rekrutierung weiterer Entzüngungszellen und die Produktion gewebeschädigender Sauerstoffund Stickstoffradikale. Eine wichtige Schlüsselrolle in diesem Zusammenhang nimmt auch die Infiltration von Neutrophilen in den Alveolus ein, welche der Freisetzung von chemotaktischen Signalen aus Alveolarmakrophagen zugeschrieben wird. In vitro ließe sich dieses Zusammenspiel möglichweise mit Hilfe eines Migrationsassays abbilden. Es soll untersucht werden, ob Makrophagen in vitro je nach Art und Konzentration der Partikel in unterschiedlicher Weise Mediatoren freisetzen, die Neutrophile anlocken. Dies könnte sich für einen prädiktiven Test auf entzündliche Wirkungen von granulären biobeständigen sowie faserförmigen Stäuben im Alveolarraum nutzen lassen. Mit diesem Test könnten auch das Krankheitsgeschehen und eventuelle Einflussfaktoren genauer untersucht werden.

Im Rahmen dieser Dissertation soll daher ein Migrationsassay (auch Chemotaxisassay) etabliert werden, mit dem Untersuchungen zur entzündlichen Wirkung von Partikeln erfolgen können. Um die Migration von Zellen in Richtung eines chemotaktischen Signals zu untersuchen, gibt es eine Reihe von etablierten Ansätzen (Review: Entschladen et al., 2005). Im Rahmen der Experimente soll eine Variante zum Einsatz kommen, die an die "Boyden Chamber"-Technik angelehnt ist (Boyden, 1962). Entzündliche Reaktionen auf Partikel und Fasern sollen untersucht werden, indem Makrophagen verschiedenen Partikeln ausgesetzt werden. In den Überständen der exponierten Makrophagenkulturen können Botenstoffe enthalten sein, die Neutrophile anlocken. Dieses System soll dann genutzt werden, um Partikel zu untersuchen, die im Menschen oder im Tierexperiment neutrophile Entzündungen hervorrufen können, vergleichend zu Partikeln, die dies nicht tun. Es soll so geprüft werden, ob diese Wirkung in vitro nachvollzogen werden kann. Um die schlechte Verfügbarkeit von primären Zellen zu umgehen und von Beginn an eine hohe Standardisierung und Reproduzierbarkeit anzustreben, sollen etablierte, permanente Zelllinien zum Einsatz kommen (Landsiedel et al., 2010). Die vorgeschlagenen Experimente sollen durchgeführt werden mit Hilfe von NR8383 Alveolarmakrophagen (Helmke et al., 1987), sowie humanen THP-1, A549 und HL-60 Zellen. HL-60 Zellen können zu einem neutrophilen Phänotyp (dHL-60 Zellen) ausdifferenziert werden (Breitman et al., 1980).

Im Idealfall können im Anschluss die chemotaktischen Signalstoffe, mit denen die Makrophagen die Neutrophilen anlocken, näher charakterisiert werden. Abschließend soll beurteilt werden, ob sich das System als prädiktiver Test für entzündliche Wirkungen von Partikeln eignet. Dazu müssen die Testergebnisse aus dem Assay in bestehende in vivo und in vitro-Studien eingeordnet werden. Im Idealfall werden stark fibrinogene Partikel (z.B. Quarz) im Chemotaxisassay eine hohe Migration von Neutrophilen verursachen, während eher als inert beurteilte Partikel (z.B. Bariumsulfat) dies nicht tun. Als Einflussfaktoren auf die Toxizität von Partikeln werden darüber hinaus diverse physikochemische Eigenschaften von granulären biobeständigen Stäuben diskutiert. Die OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development) hat physikochemische Parameter benannt, die einen Einfluss auf die Toxizität von Partikeln haben könnten. Dazu zählen Wasserlöslichkeit, Kristallinität, Kristallitgröße, Morphologie, Partikelgrößenverteilung, Zetapotenzial, photokatalytische Eigenschaften, Dichte und Porosität (OECD 2008, Madl und Pinkerton, 2009). Um später eine toxikologische Einordnung der Ergebnisse durchführen zu können, müssen daher möglichst viele physikochemische Eigenschaften der Partikel bestimmt werden: chemische Zusammensetzung und Reinheit (PXRD, ICP-MS), Kristallinität (PXRD), Morphologie und Größe der Primärpartikel (REM), spezifische Oberfläche (BET), Suspendierbarkeit sowie Oberflächeneigenschaften (z.B. Zetapotenzial) (Landsiedel et al., 2010, Powers et al., 2006, Murdock et al., 2008, Warheit, 2008).

Zusammenfassend können die Ziele der vorliegenden Arbeit wie folgt formuliert werden:

- 1. Auswahl geeigneter etablierter Zelllinien für ein realitätsnahes Entzündungsmodell basierend auf Makrophagen und Neutrophilen
- 2. Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der verwendeten Partikel auf die Zelllinien (Dosisfindung)
- 3. Etablierung und Validierung eines realitätsnahen in vitro-Migrationsassays
- 4. Untersuchung der partikelinduzierten Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen im Zellkulturmodell auf Transkriptions- oder Proteinebene
- 5. Chemisch-physikalische Charakterisierung der Partikel und Korrelation mit den beobachteten Effekten im Migrationsassay

Nach erfolgreicher Etablierung des Systems sollen die Untersuchungen auf Fasern ausgedehnt werden, z.B. Chrysotil (weißer Asbest) (Miller et al., 1999), Keramikfasern oder Carbonnanopartikel und -nanotubes (Donaldson et al., 2010).

# 4 Material/Methoden

# 4.1 Zelllinien

## 4.1.1 HL-60 Zellen

Die Zelllinie HL-60 ist eine permanente promyeloische Zelllinie, welche 1977 etabliert wurde (Collins et al., 1978). Es handelt sich um periphere Leukozyten, die von einer 36-jährigen Kaukasierin mit akuter promyeloischer Leukämie gewonnen wurden. Die Zelllinie ist phagozytisch aktiv und reagiert auf chemotaktische Stimuli (Gallagher et al., 1979). Die HL-60 Zellen wurden von der DSMZ (Braunschweig) geliefert und in RPMI-1640 Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin), mit 10 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin), 100  $\mu$ g/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Suspensionszellen wurden so kultiviert, dass sie eine Konzentration zwischen 1x10<sup>5</sup> und 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml hatten. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Zur Lagerung wurden 5x10<sup>6</sup> Zellen mit 70 % Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO bei –70 °C eingefroren.

Für den Chemotaxisassay wurden zu einem neutrophilen Phänotyp ausdifferenzierte HL-60 Zellen eingesetzt: Die HL-60 Zellen wurden für drei Tage in RPMI-1640 Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin), 10 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin), 100 µg/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin) und zusätzlich 1 µM all-*trans*-Retinal bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (Breitman et al., 1980). Im Folgenden werden diese ausdifferenzierten HL-60 Zellen als dHL-60 Zellen (kurz für "differenzierte HL-60 Zellen") bezeichnet.

Zur Vorbereitung auf die Zellmigration wurden die Zellen, wie im Standardprotokoll von Greiner beschrieben, über Nacht in FCS-freiem RPMI-1640 Medium kultiviert (Online-Protokoll: http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/ThinCert/492en\_Protocol\_Migration\_Assay.pdf).

## 4.1.2 NR8383 Zellen

NR8383 ist eine permanente Alveolarmakrophagenzelllinie aus der Ratte, die 1983 durch Klonierung aus normalen Ratten-Alveolarzellen gewonnen wurde. Durch dauerhafte Stimulation der Zellen mit IL-3 und GM-CSF wurde daraus eine proliferierende Zelllinie geschaffen (Helmke et al., 1987). Die Zellen eignen sich besonders für *in vitro*-Untersuchungen, weil sie viele Eigenschaften von echten Makrophagen aufweisen, z.B. Phagozytose (u.a. von Zymosan und Pseudomonas aeruginosa) (Helmke et al., 1989) und Sekretion von IL-1, TNFα und IL-6 (Helmke et al., 1987).

NR8383 Zellen wurden über LGC Standards GmbH, Wesel von ATCC bezogen. Die Zellen wurden kultiviert in Ham's F-12 mit stabilem Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin), 15 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin), 100  $\mu$ g/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wachsen gemischt adhärent und in Suspension. Ihre Konzentration im Medium betrug zwischen 1x10<sup>5</sup> und 4x10<sup>5</sup> Zellen/ml. Das Medium wurde zwei Mal pro Woche erneuert. Um die Zellen bei –70 °C aufzubewahren, wurden 5x10<sup>6</sup> Zellen in Kulturmedium und 5 % DMSO suspendiert und eingefroren.

#### 4.1.3 THP-1 Zellen

Bei der permanenten Zelllinie THP-1 handelt es sich um eine humane Zelllinie aus peripheren Blutmonozyten. Sie wurde 1980 aus dem Blut eines 1-jährigen Kindes isoliert, welches an akuter monozytärer Leukämie litt und weist phagozytierende Eigenschaften auf (Tsuchiya et al., 1980). THP-1 Zellen wurden von der DSMZ (Braunschweig) bezogen und in RPMI-1640 Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin) mit 10 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin) und 100  $\mu$ g/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Es handelt sich um Suspensionszellen, deren Konzentration in der Regel zwischen  $2x10^5$  und  $6x10^5$  Zellen/ml lag. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Um die Zellen bei –70 °C aufzubewahren, wurden  $5x10^6$  Zellen in Kulturmedium mit 5 % DMSO suspendiert und eingefroren.

Für den Chemotaxisassay wurden die THP-1 Zellen mithilfe des Phorboldiesters TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) ausdifferenziert (Tsuchiya et al., 1982): Hierfür wurden sie über Nacht in RPMI-1640 Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin), 10 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin), 100  $\mu$ g/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin) und zusätzlich 0,16 nM 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) (20 ng/ml in DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 4.1.4 A549 Zellen

A549 Zellen sind permanente Lungenepithelzellen menschlichen Ursprungs. Die Zelllinie wurde 1972 etabliert, indem das Lungenkarzinom eines 58-jährigen Kaukasiers *in vitro* kultiviert wurde (Giard et al., 1973). Die Zellen wurden von der DSMZ (Braunschweig) bezogen und in einer 1:1 Mischung Dulbecco's MEM/Ham's F-12 mit stabilem Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin), 10 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin), 100 µg/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. A549 Zellen sind adhärente Zellen und wurden nach Entfernen des Kulturmediums stets mit 10 ml PBS (Biochrom GmbH, Berlin) gewaschen und danach mit einer Lösung aus Trypsin/EDTA

(Biochrom GmbH, Berlin) (0,05 /0,02 %) von der Zellkulturflasche abgelöst (3 ml, 5 min, 37 °C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Kulturmedium mit FCS gestoppt. Die Zellen wurden in Konzentrationsbereichen zwischen  $2x10^3$  und  $1x10^4$ /ml kultiviert und das Medium zweimal pro Woche erneuert. Die Lagerung erfolgte bei –70 °C mit 70 % Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO (Aliquots von 0,5x10<sup>6</sup> Zellen).

## 4.1.5 Übersicht: eingesetzte Zelllinien

Tabelle 4: In dieser Arbeit eingesetzte Zellinien im Überblick (Quelle: ATCC Datenbank).						
Zelllinie	Organismus	Ursprungsgewebe	Zelltyp	Besonderheit		
NR8383	Rattus norvegicus, Ratte	Lunge	Alveolarmakrophage	Eigenschaften eines normalen Makrophagen		
HL-60	<i>Homo sapiens,</i> human	Peripherblut	Promyeloblast	Ausdifferenzierbar zu neutrophilem Phänotyp		
THP-1	<i>Homo sapiens,</i> human	Peripherblut	Monozyt	Ausdifferenzierbar mit Phorboldiester		
A549	<i>Homo sapiens,</i> human	Lunge	Epithelzelle			

## 4.1.6 Zellen zählen und Life/Dead Staining mit Trypanblau

Alle Zellzählungen wurden in einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip, Biochrom, Berlin) durchgeführt. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl in der Zellsuspension anhand folgender Formel ermittelt:

$$ausgezählte Zellzahl * Verdünnungsfaktor * 10^4 = Zellzahl pro ml$$

Um vitale von nicht vitalen Zellen zu unterscheiden (sog. Life/Dead-Staining), wurden die Zellen zunächst mit Trypanblau angefärbt. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der sich in nicht vitalen Zellen anreichert und diese blau anfärbt. Vitale Zellen sind in der Lage, Trypanblau aus dem Zytoplasma zu eliminieren, daher werden sie nicht gefärbt. 40 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden mit 40 µl Trypanblau-Lösung (0,4 %) vermischt. Nach drei Minuten wurden die Anzahl der gefärbten und der ungefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Der Vitalitätsindex entsprach dabei dem Anteil vitaler Zellen pro Anzahl der gesamten Zellen. Als Qualitätskriterium für die Kultivierung der Zellen wurde ein Vitalitätsindex von 95 % angelegt.

# 4.2 Inkubation von NR8383 Zellen mit Partikeln

Jeweils  $3x10^6$  NR8383 Alveolarmakrophagen wurden in 3 ml Ham's F-12 Medium mit stabilem Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin), 15 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin), 100 µg/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin) suspendiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Partikel wurden zunächst jeweils 3 Stunden bei 220 °C hitzesterilisiert. Von den Partikeln wurden daraufhin unter sterilen Bedingungen Stammlösungen in PBS angefertigt und aufbewahrt. Um einen Einfluss des Suspensionsmittels auf die Experimente auszuschließen, wurden die Stammlösungen so angesetzt, dass jeweils das gleiche Volumen (100 µl) Partikelsuspension zu den Zellen gegeben werden musste, um die jeweilige Zielkonzentration zu erreichen (Tabelle 5).

Zielkonzentration	Stammlösung	entnommenes Volumen
300 μg/ml	24 mg/2000 μl	100 μl (ad 3 ml)
200 μg/ml	12 mg/2000 μl	100 µl (ad 3 ml)
100 µg/ml	6 mg/2000 ul	100 µl (ad 3 ml)
50 ug/ml	3 mg/2000 µl	100 µl (ad 3 ml)
25 µg/ml	1.5 mg/2000 ul	100 µl (ad 3 ml)
12.5 µg/ml	0.75 mg/2000 μl	100 µl (ad 3 ml)
12,5 μg/m	0,75 mg/2000 μi	100 μl (ad 3 ml)
6,25 μg/mi	0,375 mg/2000 μl	100 μi (ad 3 ml)

Tabelle 5: Herstellung der Stammlösungen.

Diese Stammlösungen wurden für das Experiment aufgeschüttelt und mit Kulturmedium auf die benötigte Endkonzentration verdünnt. Das endgültige Volumen in der Zellkulturflasche (BD Biosciences, Heidelberg) betrug 4 ml. Die Oberfläche der Zellkulturflaschen betrug 12,5 cm<sup>2</sup> (entpspricht 960.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>). Als Negativkontrolle wurde immer eine Probe ohne Partikel bereitgestellt. In den Ergebnissen sind die eingesetzten Dosierungen in  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Zellkulturoberfläche angegeben. Für eventuelle Vergleiche mit anderen Studien, in denen die Inkubationskonzentration in  $\mu$ g/ml angegeben ist, ist die korrespondierende Konzentration hier beispielhaft angegeben: Eine Dosierung von 32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> entspricht der Konzentration 100  $\mu$ g/ml, 64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> entspricht 200  $\mu$ g/ml, 96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> entspricht 300  $\mu$ g/ml usw.

Die Partikel wurden in Dosierungen bis 96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> bzw. in einigen Fällen bis 160  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 16 Stunden mit den Partikeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm, 5

Minuten, Thermo Fisher Scientific, Multifuge 3SR+) entfernt. Freie Partikel wurden im Anschluss 10 Minuten bei 15000 rpm abzentrifugiert. Die so von Zellen und Partikeln befreiten Überstände wurden für den Migrationsassay eingesetzt.

# 4.3 Aufnahme und Toxizität der Partikel in NR8383 Zellen

## 4.3.1 Lichtmikroskopie

Mittels Lichtmikroskopie (Olympus CX 41, Camera Olympus SC100, Olympus Europe SE & Co. KG, Hamburg) wurde überprüft, ob die NR8383 Makrophagen die Partikel effizient phagozytiert haben. Gleichzeitig wurde die Partikeltoxizität durch Trypanblau-Färbung (0,4 %, Sigma-Aldrich, Steinheim) untersucht. Eventuell nicht aufgenommene Partikel bzw. Partikel auf der Zelloberfläche wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt.

#### 4.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Nach der Inkubation von NR8383 Zellen mit fluoreszenzmarkierten Partikeln wurde mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (LSM) überprüft, ob die Partikel effizient phagozytiert wurden. In diesem Zusammenhang wurde darüber hinaus die Lokalisation der Partikel innerhalb des Makrophagen mit verschiedenen Farbstoffen bestimmt (Zellorganell-Markierung). Die Inkubation von 3x10<sup>6</sup> NR8383 Zellen erfolgte in Chamber Slides (Lab-Tek II 154453, Thermo Fisher Scientific) anstelle von kleinen Zellkulturflaschen. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die suspendierten Zellen abgelöst und abzentrifugiert. 10 µl Lysosomen-Tracker (LysoTracker Red-DND-99,1 mM, Invitrogen, Molecular Probes) wurden mit 90 µl RPMI-1640 Medium verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden mit 100 µl RPMI-1640 Medium auf die abzentrifugierten NR8383 Zellen bzw. auf die adhärente Zellfraktion auf dem Chamber Slide gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl RPMI-1640 Medium gewaschen und die Zellkerne gefärbt mit 10 µl Hoechst (33342, 350/461 nm, Invitrogen, Molecular Probes) und 1000 µl RPMI-1640 Medium. Die Färbung erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur. 10 µl der Zellsuspension wurden zum Mikroskopieren in eine Neubauer-Zählkammer (C-Chip, Biochrom, Berlin) pipettiert. Die adhärenten Zellen wurden direkt auf dem Chamber Slide mikroskopiert.

Bei dem eingesetzten Mikroskop handelte es sich um ein konfokales Laserscanningmikroskop der Firma Zeiss (LSM700 mit Software Zeiss 2010).

#### 4.3.3 Durchflusszytometrie

Mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie und unter Zuhilfenahme von Färbetechniken erhält man einen guten Eindruck über die Vitalität der Zelle, daher sind diese Techniken für einen ersten Eindruck sehr wertvoll. Allerdings sind mikroskopische Analysetechniken schwer guantifizierbar und in hohem Durchsatz sehr aufwändig. Außerdem kann immer nur eine sehr kleine Zellpopulation untersucht werden. Aus diesem Grund wurde am Beispiel der Bariumsulfat-CMC-Partikel durchflusszytometrisch untersucht, ob die eingesetzten NR8383 Zellen die Partikel konzentrationsabhängig phagozytieren konnten. In der Durchflusszytometrie werden suspendierte Zellen an einem Objektiv vorbei geleitet und von einem fokussierten Lichtstrahl getroffen. Durch den Kontakt einer Zelle mit dem Lichtstrahl entstehen bestimmte optische Signale wie Fluoreszenz und Lichtstreuung. Durch das optische System des Geräts werden die Signale jeder einzelnen Zelle gemessen, anschließend wird aus der Summe der Einzelzellmessungen eine Analyse der Zellsuspension berechnet. Die erhaltenen Signale lassen sich in morphologische und Fluoreszenz-Messgrößen einteilen. Die morphologischen Messgrößen beinhalten das sogenannte Streulicht und werden durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wiedergegeben. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) liefert dabei Informationen über die Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht (SSC) korreliert mit der Granularität der untersuchten Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten hängen in erster Linie von den eingesetzten Farbstoffen ab und werden in verschiedenen Kanälen des Durchflusszytometers detektiert (Shapiro, 2003).

Im Rahmen der Toxizitätsbestimmung wurde der Anteil der nekrotischen Zellen mit 7-AAD im PerCP-Kanal bestimmt (Vermes et al., 1995). 7-AAD ist ein Farbstoff, der in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringt und sich im Zellkern an die DNA anlagert. Die Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgte mit Annexin V im APC-Kanal (Schmid et al., 1992). Annexin V bindet unter Anwesenheit von Calcium an Phosphatidylserin, ein Phospholipid, das sich unter Normalbedingungen auf der Innenseite der Zellmembran befindet und im Falle einer Apoptose nach außen geschleust wird. Im Falle einer nekrotischen Zelle kann Annexin V in die Zelle eindringen und auf der Innenseite der Membran an Phosphatidylserin binden. Aus diesem Grund wurden für die Auswertung die 7-AAD-positiven Zellen von den Annexin V-positiven Zellen subtrahiert. Die in dieser Arbeit eingesetzten Farbstoffe sind in Tabelle 6 zusammengefasst (BD Bioscience, Heidelberg).

Tabelle 6: Für die Durchflusszytor	etrie in dieser Arbeit ein	gesetzte Farbstoffe.
------------------------------------	----------------------------	----------------------

Farbstoff	Hersteller	Analytik
7-AAD (7-Aminoactinomycin)	BD, Cat. No. 559925	Nekrose
Annexin V, APC	BD, Cat. No. 550474	Apoptose

Darüber hinaus erlaubte die Aminofluorescein-Markierung auf den Bariumsulfat-Partikeln eine Quantifizierung der Aufnahme von Bariumsulfat durch die Makrophagen im FITC-Kanal. Je höher die Partikelaufnahme durch die NR8383 Zellen, desto höher das Fluoreszenzsignal (MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität). Gleichzeitig wurde die Granularität der Zellen über das SSC-Signal (Site Scatter Intensity, d.h. das Seitwärtsstreulicht) gemessen. Je mehr Partikel sich in der Zelle befanden, desto höher die Granularität der Zelle, desto höher das SSC-Signal.

Zunächst wurden NR8383 Zellen mit verschiedenen Partikeldosierungen über Nacht unter Zellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (wie im Kapitel "Inkubation von NR8383 Zellen mit Partikeln" dargestellt). Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen (suspendierte Fraktion) und die im Well zurückgebliebene adhärente Fraktion mit purem RPMI-1640 Medium gewaschen, mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %, Biochrom GmbH, Berlin) abgelöst und in Kulturmedium suspendiert. Beide Fraktionen wurden abzentrifugiert (1200 g, 5 min), in jeweils 500 µl frischem Medium resuspendiert und in Polystyrol-Röhrchen (Falcon 2052 Polystyrene Tubes, Fisher Scientific) überführt. Die Aufnahme der Partikel in NR8383 Zellen wurde mit einem Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson untersucht. Für jede Messung wurden 10.000 Zellen eingesetzt. Jede Messung wurde mindestens in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels CELLQuest™ 1.2.2 Software (Becton Dickinson). Nach dem Erreichen der optimalen Geräteinstellungen wurden diese Einstellungen für alle Messungen konstant gehalten. Alle Kalibrierungsreagenzien für die Kanäle und Lösungen (z.B. Waschlösungen) für die Durchflusszytometrie stammten ebenfalls von Becton Dickinson.

## 4.4 Chemotaxisassay

Mithilfe des Chemotaxisassays wurde die Zellmigration von Entzündungszellen *in vitro* simuliert (Publikation: Westphal et al., 2015). Die Idee ist angelehnt an die sogenannte "Boyden Chamber" Methode (Boyden, 1962) und funktioniert unter Zuhilfenahme einer semipermeablen Membran. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

In die Inserts (ThinCert<sup>™</sup> Cell Culture Inserts, 3 µm Porengröße, Greiner Bio One) wurden jeweils 2x10<sup>5</sup> dHL-60 Zellen (ausdifferenzierte HL-60 Zellen) in 200 µl RMPI-1640 Medium ohne FCS ausgesät. Wie oben beschrieben befanden sich die dHL-60 Zellen in der Nacht vor dem Experiment in FCS-freiem Medium. Die Inserts wurden in schwarze 24-Well-Fluoreszenzplatten (Krystal, Duna Labortechnik, Asbach) eingehängt. Die Wells der 24-Well-Platte enthielten jeweils 500 µl Überstand der mit Partikeln und Fasern inkubierten NR8383 Zellen. Bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> fand die Zellmigration über einen Zeitraum von 16 Stunden
statt. Vier Wells enthielten keine Inserts, sie blieben für die Kalibrierung leer. Zu diesem Zweck wurden 0, 50.000, 100.000 und 200.000 dHL-60 Zellen direkt ins Well eingesät.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Chemotaxisassays. Ein Insert mit permeablem PET-Boden trennt die Zellsuspension (im Insert) vom Chemoattraktans (unten im Well). Je nach chemoattraktiver Wirkung migrieren die Zellen aus dem Insert ins Well. Sie werden gefärbt, abgelöst und nach dem Entfernen des Inserts mit einem UV-Photometer quantifiziert. Abbildung modifiziert nach www.gbo.com/bioscience.

Die migrierten Zellen wurden daraufhin mit 500 µl des Farbstoffs Calcein-AM (> 90 % HPLC, Sigma-Aldrich) angefärbt. Calcein-AM wurde in DMSO geliefert (4 mM) und in Aliquots bei -18 °C gelagert. Kurz vor der Färbung wurden 12,5 µl dieser Lösung in 12,5 ml PBS gelöst, um eine Endkonzentration von 4 µM zu erhalten. Die Färbung erfolgte für 60 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellsuspensionen aus den Wells entfernt und in Eppendorf-Tubes bei 400 rpm für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. 850 μl des Überstandes wurden verworfen und das Pellet in den verbleibenden 150 μl resuspendiert. Gleichzeitig wurden an der Unterseite des Inserts adhärente Zellen abgelöst, indem die Inserts in den Wells mit 500 µl Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %, Biochrom GmbH, Berlin) für 10 min inkubiert wurden (Hauert et al., 2002). Daraufhin wurden die Inserts aus der 24-Well-Platte entfernt und die Proben wieder in die Wells zurückgegeben, aus der sie entnommen wurden. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz bei 490/520 nm gemessen (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Vor jeder Messung fand eine automatische Durchmischung der Proben durch das Photometer statt. Die genaue Zellzahl eingewanderter dHL-60 Zellen bzw. unbehandelter NR8383 Zellen wurde anhand der eingesäten Zelltitration durch die Software Softmax® Pro 5, Firma MSD des Fluoreszenzphotometers errechnet.

Als mögliche Positivkontrollen kamen zunächst fetales Kälberserum (FCS, Biochrom), fMLP (Sigma-Aldrich, Steinheim) und fNLPNTL (Bachem, Bubendorf, Schweiz) zum Einsatz (Hauert et al., 2002), als Negativkontrolle diente FCS-freies Medium. Im Fortgang der Arbeit wurde in späteren Experimenten feines SiO<sub>2</sub> als Positivkontrolle eingesetzt, denn es löste eine stabile und hohe Migration aus. In einer zweiten Variante wurde der Test mit NR8383 Makrophagen als migrierende Zellen (in dieser Arbeit als "unbehandelte" NR8383 Zellen

bezeichnet) durchgeführt, d.h. unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen wurden NR8383 Makrophagen, die ebenfalls über Nacht (16 h) in FCS-freiem Medium vorgehungert wurden, zu gleicher Zahl in die Inserts eingesät. Das gesamte weitere Vorgehen entsprach der oben genannten Durchführung.

In weiteren Varianten wurde die Zellmigration zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht, um Hinweise auf mögliche kinetische Schwankungen des Migrationsverhaltens zu erhalten. Die Inkubation der Zellen mit den Partikeln bzw. Fasern wurde dafür entsprechend auf 1 Stunde bzw. 4 Stunden verkürzt. Das gesamte übrige Vorgehen entsprach der oben genannten Durchführung.

Sofern im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurden alle Experimente zur Zellmigration mindestens in Dreifachbestimmung durchgeführt. In späteren Anwendungsstudien des PICMA (Kapitel *5.4* und *5.5*) wurde die Positivkontrolle (feines SiO<sub>2</sub>) als Akzeptanzkriterium stets mitgetestet. Die Positivkontrollen aller in Kapitel *5.4* und *5.5* dargestellten Versuche lagen im Rahmen der historischen, in Kapitel *5.1 und 5.2* dargestellten Positivkontrolle.

# 4.5 Zytotoxizitätsassay

Die Untersuchung der Zelladhäsion von NR8383 Zellen und der Partikel- und Fasertoxizität wurden mit dem Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) untersucht mittels Zellkulturplatten, die mit Mikroelektroden ausgestattet sind (sogenannte E-Plates) (siehe auch: Sergent et al., 2012 sowie Gebrauchsanweisung des Herstellers). Weil nicht auszuschließen war, dass Partikel und Fasern mit "normalen" fluorometrischen Zytotoxizitätsassays interferieren, wurde sich für dieses System entschieden, welches eine elektronische Detektion von Zellen erlaubt. Ein weiterer großer Vorteil der Methode ist, dass toxikodynamische Betrachtungen möglich sind, da die Messungen in Echtzeit erfolgen.

Das Prinzip der Detektion ist Folgendes: Die Impedanz an der Elektrode ist abhängig von der Konzentration von Ionen im Well und auch davon, ob Zellen an der Elektrode anhaften. In Abwesenheit von Zellen ist die Impedanz daher vor allem von der Ionenumgebung an der Elektrodenoberfläche und im Medium abhängig (Abbildung 7A). Sobald eine Zelle an der Elektrodenoberfläche anhaftet, wirkt sie als Isolierschicht und verursacht einen Impedanzanstieg (Abbildung 7B). Je mehr Zellen die Elektrode berühren, desto höher ist der verursachte Impedanzanstieg (Abbildung 7C). Darüber hinaus wird die Impedanz auch erhöht, wenn die Zellen fester an der Elektrode anhaften, d.h. wenn ihre Kontaktfläche mit der Oberfläche größer wird (Abbildung 7D).



**Abbildung 7:** Prinzip der Impedanzmessung innerhalb der E-Plates (aceabio.com, 2013). Im zellfreien Medium hängt die Impedanz nur von der Ionenkonzentration im Well ab (A), während die Zugabe von Zellen einen Impedanzanstieg auslöst (B). Je mehr Zellen im Well anhaften, desto höher ist die gemessene Impedanz (C). Je höher die Kontaktfläche von Zelle und Elektrode, desto höher ist die Impedanz (D). Der Wellboden mit den vorhandenen Mikroelektroden ist schematisch auf der rechten Seite als Aufsicht angedeutet.

Um die relative Änderung der elektrischen Impedanz wiederzugeben, wird der Zellindex als Parameter ohne Einheit eingeführt. Wenn keine Zellen im Medium vorhanden sind, bleibt die Impedanz an der Elektrode gleich:  $Z = Z_0$ . Je mehr Zellen sich an der Elektrode befinden, desto höher ist die Impedanz Z<sub>i</sub>. Der Zellindex (CI) berechnet sich daraus wie folgt:

$$CI = \frac{(\text{Zi} - \text{ZO})}{15\Omega}$$

mit  $Z_i$ : Impedanz zu einem bestimmten Zeitpunkt im Experiment,  $Z_0$ : Impedanz zum Zeitpunkt 0 und 15  $\Omega$ : Elektrischer Widerstand des Materials (Materialkonstante).

In den ersten Experimenten wurde die optimale Zellzahl an eingesäten NR8383 Makrophagen bestimmt, indem Zellzahlen zwischen 10.000 und 70.000 in die Wells gegeben wurden. Die optimale Zellzahl (40.000 NR8383 Zellen) wurde in Folgeexperimenten zur Bestimmung der Toxizität eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in Ham's F-12 mit 15 % FCS, 100 µg/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zur Bestimmung des Backgrounds Z<sub>0</sub> wurden 100 µl Kulturmedium in jedes Well pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl Zellsuspension eingesät (40.000 Zellen pro Well). Die E-Plate wurde wieder 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann ins RTCA DP Instrument (Roche Diagnostics) gestellt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert, während die Impedanz alle zehn Minuten gemessen wurde. Nach 24 Stunden wurden 50  $\mu$ l der jeweiligen Partikelsuspension in die Wells pipettiert, so dass Dosierungen von 1 bis 500  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> erreicht wurden. Dafür wurde mit den gleichen Stammlösungen gearbeitet, mit der die Makrophagen für den Migrationsassay vorinkubiert wurden (s. Seite 33).

Aufgrund der starken Sedimentation der Partikel wurde die Dosisberechnung auf die Fläche der adhärenten Zellen auf dem Wellboden bezogen. Der Anteil der Zellen, die in Suspension verblieben, war dadurch praktisch nicht mit Partikeln exponiert. Die Dosierung der Partikel (Masse pro cm<sup>2</sup> Zellkulturoberfläche) berechnete sich wie folgt aus den Herstellerangaben:

$5,00 mm (\pm 0,075 \mu m)$
$A = \pi r^2 = \pi * 2{,}5^2mm^2 = 19{,}63mm^2 \approx 20mm^2$
$V = 200 \ \mu l$

 $1 \mu g/ml$  entspricht 0,2  $\mu g/Well$  entspricht 0,2  $\mu g/20 \text{ mm}^2 = 1 \mu g/cm^2$ 

Im Anschluss wurde die Impedanz mindestens weitere 20 Stunden gemessen (Messintervall: alle 10 Minuten). Um zu bestätigen, dass die Impedanz nicht von den Partikeln beeinflusst wurde, wurden auch Messungen ohne Zellen durchgeführt. Dies geschah in einem Well, welches ausschließlich Kulturmedium und die Maximaldosierung der getesteten Partikel enthielt.

Alle Toxizitätsassays wurden mindestens in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zu GraphPad Prism exportiert und eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt (log(Inhibitor) vs. Zellindex), um  $IC_{50}$ -Werte für jede einzelne Substanz zu erhalten (s. Kapitel "Statistische Analysen").

# 4.6 Identifizierung von Chemokinen und Zytokinen

Um die Rolle der an der Zellmigration beteiligten Zytokine aufzuschlüsseln, wurde mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) untersucht, welche Zytokine und Chemokine infolge der Partikelinkubation eine erhöhte Transkription auf RNA-Ebene aufwiesen. In einem ersten Schritt wurden vier repräsentative Proben ausgewählt, die eine unterschiedliche Migration von unbehandelten NR8383 Zellen ausgelöst haben (Tabelle 7).

Partikel	relativer Effekt auf die Zellmigration bei 16 h
Kontrolle	kein
BaSO <sub>4</sub> (32 µg/cm <sup>2</sup> )	wenig (nicht signifikant zur Kontrolle)
grobes Quarz (64 µg/cm <sup>2</sup> )	mittel (signifikant zur Kontrolle)
feines SiO <sub>2</sub> (16µg/cm <sup>2</sup> )	hoch (signifikant zur Kontrolle)
feines SiO <sub>2</sub> (96 μg/cm <sup>2</sup> )	sehr hoch (signifikant zur Kontrolle)

**Tabelle 7:** Für die RNA Analytik repräsentativ ausgewählte Proben.

In einem zweiten Schritt wurde zudem untersucht, ob die Betrachtung eines einzigen Endpunktes (16 Stunden) das inflammatorische Potenzial zuverlässig abbilden kann. Dafür wurde RNA aus NR8383 Zellen isoliert, welche nur eine Stunde bzw. vier Stunden mit den ausgewählten Partikeln inkubiert worden waren (s. Kapitel *Inkubation von NR8383 Zellen mit Partikeln*). Generell entsprach das Vorgehen dem folgenden Ablauf:

- 1.) Einfrieren der inkubierten, abzentrifugierten Zellen in RNA/ater® Lösung
- 2.) Auftauen der Zellsuspension und Aufreinigung der RNA
- 3.) Reverse Transkription: RNA in cDNA umschreiben
- 4.) Quantitative Real-Time PCR Expressionsanalyse (qPCR)

Die NR8383 Zellen, welche mit Partikeln inkubiert worden waren, wurden nach dem Experiment abzentrifugiert und in 400 µl RNA*later*® Lösung (Artikelnr. AM7020, Life Technologies, Darmstadt) aufgenommen, um eine längere Stabilität der RNA für eine spätere Analyse zu gewährleisten. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei –70 °C, bis sie für die Versuche aufgetaut wurden.

# 4.6.1 Aufreinigung der RNA

Die in RNA*later*® eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Artikelnr. 74134, Qiagen, Hilden) wurde die RNA wie folgt isoliert: Die Überstände wurden entfernt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 350 µl Buffer RLT Plus (Herstellung: 1 ml RLT Plus Puffer + 10 µl Mercaptoethanol) lysiert. Zur Homogenisierung wurden die Zellen direkt auf eine Säule pipettiert, die sich in einem 2 ml-Sammeltube befand. Daraufhin wurde zwei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Das homogenisierte Lysat wurde zum Entfernen von genomischer DNA auf eine im Kit enthaltene "gDNA Eliminator Spin Säule" pipettiert. Daraufhin wurde 30 s bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen. Zu dem Filtrat (350 µl) wurde ein Volumenteil Ethanol (70 %) gegeben und mit der Pipette gemischt. 700 µl der Probe wurden auf eine im Kit enthaltene

"RNeasy Spin Säule" pipettiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 s, 8000 g) wurde das Filtrat verworfen. Die Säule wurde daraufhin mit 700 μl Puffer RW1 gewaschen und 15 s bei 8000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule zweimal mit jeweils 500 μl Puffer RPE gewaschen (Zentrifugation: 2 min, 8000 g). Zur Entfernung von eventuell noch vorhandenem Ethanol wurde die Säule daraufhin in ein frisches 2 ml Tube gestellt und noch einmal bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert. Daraufhin wurde die RNA folgendermaßen eluiert: 30 μl RNase-freies Wasser wurde direkt auf die Säule gegeben und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die isolierten RNA-Proben wurden bei –20 °C jeweils max. zwei Wochen gelagert.

#### 4.6.2 RNA-Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Das NanoDrop®-Spektrophotometer und der Bioanalyzer sind Geräte zur Quantifizierung und Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA.

Unter Zuhilfenahme des NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben. Bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgte eine Absorptionsmessung von 1 µl der aufbereiteten Probe. Die RNA-Konzentration (µg RNA/ml) berechnete sich daraus nach folgender Formel:

$$c \ \frac{\mu g \ RNA}{ml} = A^{260} * 40$$

Demnach entsprach eine Absorptionseinheit  $A_{260}$  einer Masse von 40 µg ssRNA/ml. Zusätzlich wurden eventuell vorhandene Lösemittel- und Proteinverunreinigungen detektiert, da sie die gemessene Absorption beeinflussen. Der Absorptionskoeffizient ( $A_{260}/A_{280}$ ) kommt hier als Qualitätskriterium zum Tragen. Er beschreibt den Quotienten aus gemessener Absorption bei 260 nm und der gemessenen Absorption bei 280 nm. Für reine RNA beträgt der Absorptionsquotient  $A_{260}/A_{280}$  in etwa 1,9–2,1. Eine Verunreinigung mit z.B. DNA verschiebt den Absorptionskoeffizienten nach unten (ca 1,7–1,8). Somit war neben der Quantifizierung der RNA auch eine Qualitätskontrolle der isolierten RNA möglich. Die Messungen wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Für die qPCR-Versuche wurden nur Proben aufbereitet, deren Absorptionskoeffizient zwischen 1,9 und 2,1 lag.

Mittels RNA-6000-Nano-LabChipKit und Agilent-2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen) wurde die Integrität der isolierten RNA ermittelt. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Kapillargelelektrophorese. Die Proben und ein mitgeführter Standard wurden in die Wells des Nano-LabChips pipettiert und bewegten sich, wie in der Kapillargelelektrophorese, im elektrischen Feld durch mikrofeine Kapillaren, woraufhin sie eine Trennkapillare passierten und ihre Laufzeiten durch einen Fluoreszenzdetektor detektiert wurden. Die Auswertung erfolgte mittels zugehöriger Computersoftware, die für jede untersuchte RNA-Probe aus den Laufzeiten eine sogenannte RNA Integrity Number (RIN) errechnete. Das RIN-Spektrum reichte von 1 (vollständige Degradation) bis 10 (keine Degradation). Diese Methodik ist aufwändiger, aber zuverlässiger in der Bewertung der RNA-Proben als die Nanodrop-Spektrophotometrie und wurde in den Protokollen der qPCR-Assays von Qiagen, nach deren Vorgabe im Folgenden weitergearbeitet wurde, als Qualitätsstandard empfohlen. Um nur Proben mit ausreichender Integrität zu beurteilen, wurde als Qualitätskriterium für die Versuche ein RIN von mindestens 8 angelegt. Die niedrigste gemessene RIN betrug in diesen Versuchen 8,3.

## 4.6.3 cDNA-Synthese und Eliminierung genomischer DNA

Im Rahmen der reversen Transkription wurde grundsätzlich mit einer RNA-Masse von 500 ng gearbeitet. Da in den nachfolgend dargestellten Schritten höchstens mit einem Volumen von 8  $\mu$ I RNA-Lösung gearbeitet werden konnte, fand in manchen Fällen vorher eine Aufkonzentrierung statt (d.h. die Ausbeute an aufgereinigter RNA betrug eingangs  $\leq$  62,5 ng/ $\mu$ I). In diesem Fall wurden die Proben einrotiert und danach die Quantifizierung der RNA erneut durchgeführt.

Im Rahmen der reversen Transkription wurde zunächst mittels enzymatischer Aktivität der RT (Reverse Transkriptase) RNA in cDNA umgeschrieben. Zuerst bildete die Polymerase einen komplementären DNA-Strang, indem sie sich an den RNA-Einzelstrang anheftete. Im darauffolgenden Schritt synthetisierte die reverse Transkriptase einen Hybridstrang aus RNA und DNA. Anschließend baute sie den RNA-Anteil des Hybridstranges ab und es folgte die Vervollständigung von einzel- zur doppelsträngiger DNA (Knippers et al., 2006).

Die Synthese der cDNA und die vorherige Eliminierung genomischer DNA wurden mit dem RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Artikelnr. 330401, Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll. Für die Eliminierung genomischer DNA wurden die Proben folgendermaßen vorbereitet und gemischt:

Komponente	Menge
RNA	500 ng
Puffer GE	2 μΙ
RNase-freies Wasser	q.s.
Volumen insgesamt	10 µl

Tabelle 8: Pipettierschema: Eliminierung genomischer DNA.

Die Proben wurden fünf Minuten lang bei 42 °C inkubiert und daraufhin sofort für eine Minute auf Eis gestellt. Für den zweiten Schritt, die reverse Transkription, wurde die Probe folgendermaßen weiterverarbeitet:

Tabelle 9: Pipettierschema: Reverse Transkriptase Mix.				
Menge				
4 μΙ				
1 μl				
2 μΙ				
3 μΙ				
10 μl				

Jeweils 10 µl des Reverse Transkriptase Mix wurden zu jeder Probe zugegeben und mit der Pipette gemischt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation bei 42 °C für 15 Minuten und eine sofort anschließende Inkubation bei 95 °C für 15 Minuten, um die Reaktion zu stoppen. Im Anschluss wurden die Proben mit jeweils mit 91 µl RNAse-freiem Wasser verdünnt und bei –20 °C gelagert, sofern die qPCR nicht sofort im Anschluss durchgeführt wurde.

## 4.6.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Assays

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht durch eine spezifische, primerabhängige enzymatische *in vitro*-Reaktion eine effiziente Vervielfältigung einer DNA-Sequenz (Mullis und Faloona, 1987). Auf der Grundlage dieser Methodik sind im Rahmen der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) eine Amplifikation sowie die Detektion von PCR-Produkten mit Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit möglich (Review: Wong und Medrano, 2005). Die qPCR-Analysen fanden unter folgenden Bedingungen statt:

- 1. Aktivierung der Polymerase: 10 min 95 °C
- 2. Denaturierung: 15 s 95 °C
- 3. Primer Annealing und Elongation: 1 min 60 °C
- 4. 40 Wiederholungen der Schritte 2 und 3 (40 Zyklen)
- 5. Finale Extension: 15 min 60 °C
- 6. Schmelzkurvenanalyse: 15 s 95 °C, 20 s 60 °C, 15 s 95 °C

In allen Versuchen kam der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zum Einsatz, der in die DNA-Doppelstränge interkaliert und dann Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert (Vitzthum und Bernhagen, 2002). Dieses Fluoreszenzsignal wird am Ende jedes PCR-Zyklus gemessen, also am Ende der Elongationsphase. Zum einen liegt dann die maximale Menge an doppelsträngiger DNA vor, zum anderen löst sich der Farbstoff während der darauffolgenden Denaturierungsphase wieder aus der DNA heraus, weil die DNA wieder in Einzelstränge getrennt wird. Die Zunahme der Fluoreszenz über die Zyklen hat einen exponentiellen Verlauf. Der sogenannte C<sub>t</sub>-Wert (cycle threshold) beschreibt den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals über den Hintergrundwert ansteigt und eignet sich daher für die relative Quantifizierung eines RNA-Transkripts: Je niedriger der erhaltene C<sub>t</sub>-Wert, desto höher war die Ausgangskonzentration des RNA-Transkripts. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5 (Qiagen, Hilden) basierend auf relativer Quantifizierung und der sogenannten komparativen C<sub>t</sub>-Methode (auch  $\Delta\Delta C_t$ -Methode genannt): Im ersten Schritt wurden die C<sub>t</sub>-Werte von Zielgen und Referenzgen voneinander subtrahiert ( $\Delta C_t$ ). Daraufhin wurde die Differenz der  $\Delta C_t$ -Werte der unterschiedlichen Gruppen gebildet ( $\Delta\Delta$ Ct), welche in folgende Formel eingesetzt wurde (Review: Wong und Medrano, 2005):

### $n - fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Um die Verfälschung durch unspezifische Produkte und Primer-Dimere möglichst gering zu halten, wurde ein kommerziell erhältlicher SYBR-Green-Mastermix (RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX gPCR, Artikelnr. 330522, Qiagen, Hilden) eingesetzt. Dennoch musste die Produktspezifität im Anschluss an die qPCR kontrolliert werden, was automatisiert am Ende durch eine Schmelzpunktanalyse erfolgte. Die Temperatur wurde kontinuierlich erhöht und der Schmelzpunkt der doppelsträngigen DNA (d.h. die Temperatur, die einen Zerfall in beide Einzelstränge verursacht) wurde in Form eines Peaks sichtbar. Zeigte eine Schmelzpunktkurve zwei oder mehr Peaks, lagen auch dementsprechend viele Produkte vor, d.h. während der PCR wurde kein spezifisches Endprodukt gebildet. Daher wurden in allen Experimenten die Schmelzpunktkurven ausgewertet. War mehr als ein Peak sichtbar, wurde das Ergebnis nicht in die Auswertung eingeschlossen.

Für die Messungen kamen zwei verschiedene Produkte zum Einsatz (Tabelle 10): Zunächst wurden sogenannte RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays (Qiagen, Hilden) eingesetzt, um aus einem Pool von 84 Zytokinen und Chemokinen diejenigen zu identifizieren, deren RNA-Transkripte nach der Inkubation mit Partikeln und Fasern anstieg.

Diese Versuche wurden jeweils für drei verschiedene Partikel in Doppelbestimmung durchgeführt (jeweils ein biologisches Replikat). Aus den Daten wurde ein Heat Map erstellt und Gene, eine relevante Erhöhung des "Fold Change" (s.u.) aufwiesen, wurden mittels RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assays in Doppelbestimmung nachgewiesen. Auch hier wurde mit biologischen Replikaten gearbeitet.

verwendeter Primer Array/Assay	Artikelnummer (Qiagen, Hilden)
RT <sup>2</sup> Profiler <sup>™</sup> PCR Array Rat Cytokines & Chemokines	PARN-150Z
RT <sup>2</sup> qPCR Primer CXCL1	PPR06663A-200
RT <sup>2</sup> qPCR Primer CXCL3	PPR06598A-200
RT <sup>2</sup> qPCR Primer CCL3	PPR06717A-200
RT <sup>2</sup> qPCR Primer CCL4	PPR06718A-200
RT² qPCR Primer TNFα	PPR06411F-200
RT <sup>2</sup> qPCR Primer IL-6	PPR06483B-200
RT² qPCR Primer IL-10	PPR06479A-200
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Rplp1	PPR42363C-200
RT <sup>2</sup> qPCR Primer gDNA Control	330011

 Tabelle
 10:
 In
 dieser
 Arbeit
 verwendete
 Assays/Arrays,
 die
 zur
 Identifizierung
 und

 Quantifizierung von Zytokinen und Chemokinen eingesetzt
 wurden.

 <t

Unter den verwendeten Primer Arrays für Chemokine und Zytokine in Tabelle 10 befindet sich auch der Primer für das zur Normalisierung verwendete Housekeeping-Gen (Ribosomal Protein, large, P1; Abkürzung Rplp1) und eine sogenannte gDNA-Kontrolle, die das Vorliegen genomischer DNA anzeigt und daher als Qualitätskriterium eine wichtige Funktion einnahm. In allen in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen lag der C<sub>t</sub>-Wert der gDNA-Kontrolle oberhalb des Cut-offs, d.h. in keiner Probe konnte genomische DNA nachgewiesen werden.

#### 4.6.5 Immunassays

Unter Zuhilfenahme von Immunassays wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine und Chemokine in den Überständen von mit Partikeln inkubierten NR8383 Zellen bestimmt. Es kamen zwei verschiedene Verfahren zum Einsatz, der sogenannte Sandwich-ELISA und der kompetitive Immunassay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, EIA) (Schuurs und van Weemen, 1980).

Beim Sandwich-ELISA befindet sich ein für das zu quantifizierende Antigen spezifischer Antikörper (sog. "Capture Antibody") in der Kavität der Mikrotiterplatte. Nach der Probenzugabe erfolgt eine Bindung zwischen nachzuweisendem Antigen und dem Capture Antibody. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper zugegeben ("Detection Antibody"), der an ein anderes Epitop des Antigens bindet als der Capture Antibody und der ein Reporterenzym enthält. Überschüssige Capture Antibodies werden durch Waschen entfernt und es wird ein farbloses Substrat zugegeben, das durch das Reporterenzym zu einem farbigen Produkt umgesetzt wird, welches photometrisch erfasst wird. Das Signal ist direkt proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Antigens. Der kompetitive Immunassay folgt einem anderen Prinzip: Die Detektion erfolgt nicht mit einem zweiten Antikörper. Stattdessen wird in die Wells ein markiertes Antigen hinzugefügt, das dem zu quantifizierenden Antigen strukturell ähnlich ist. Es erfolgt eine Konkurrenzreaktion zwischen dem Analyten und dem kompetitiven Antigen und daraufhin der photometrische Nachweis des markierten kompetitiven Antigens. Das erfasste Signal ist daher umgekehrt proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Antigens (Abbas et al., 2012).

Für die Konzentrationsbestimmungen von CCL2, IL-6, TNFα wurden die enstsprechenden Quantikine Kits von R&D Systems und für die Konzentrationsbestimmung von Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) das Parameter Kit von R&D Systems eingesetzt (Tabelle 11). Während es sich bei den Quantikine Kits um Sandwich-ELISAs handelt, ist das Parameter Kit zur Bestimmung von LTB<sub>4</sub> ein kompetititver Assay.

**Tabelle 11:** In dieser Arbeit verwendete ELISA Kits, die zur Identifizierung von Zytokinen im Zellüberstand eingesetzt wurden.

verwendetes ELISA Kit	Artikelnummer (R&D Systems, Wiesbaden)
Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit	R6000B
Rat TNFα Quantikine ELISA Kit	RTA00
Rat CCL2/JE/MCP-1 Quantikine ELISA	MJE00
LTB₄ Parameter Assay Kit	KGE006B

Die Überstände wurden vor der Messung bei –20 °C gelagert, für die Messungen aufgetaut und unverdünnt verwendet bzw. verdünnt zur Erfassung von TNF $\alpha$  (50 µl Probe + 100 µl Calibrator Diluent RD5-17). Das Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll. Die Kits von R&D Systems enthielten alle für die Durchführung benötigten Reagenzien und Puffer sowie eine Positivkontrolle, die in einem bestimmten Konzentrationsbereich liegen musste (Akzeptanzkriterium).

Die Quantifizierung erfolgte mittels mitgeliefertem und laut Herstellerprotokoll verdünntem Standard mit einem Plattenphotometer (MRX Revelation, Dynex Technologies, VA, USA). Die Vorbereitung der Positivkontrollen erfolgte nach Bahra et al. (2004) wie folgt: Für die Freisetzung von IL-6, TNF $\alpha$  und CCL2 wurden die NR8383 Zellen für 24 Stunden mit Lipopolysacchariden (LPS, 100 ng/ml) stimuliert (L4516, Sigma-Aldrich, Steinheim). Für die Freisetzung von LTB<sub>4</sub> wurden die Zellen mit Arachidonsäure (AA, 50 µg/ml) für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Tube stimuliert (A3555, Sigma-Aldrich, Steinheim).

# 4.7 Charakterisierung der Partikel

Für die Charakterisierung der Partikel wurde mir Zugang zum Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen gewährt. Die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Epple besitzt langjährige Erfahrung und eine hohe Fachkompetenz auf dem Gebiet der (Nano-) Partikelsynthese und deren Analytik und hat mich in die Methoden eingeführt.

Kommerziell erhältliche Partikel wurden bestellt bei Sigma-Aldrich, Steinheim. Bariumsulfat wurde von Herrn Dipl.-Ing. Christian Monz (Institut für Gefahrstoffforschung, Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie BG RCI, Bochum) zur Verfügung gestellt. In einer zweiten Reihe von Migrationsexperimenten kamen eigens für diese Arbeit synthetisierte Partikel zum Einsatz. Die Synthese erfolgte durch Frau Kateryna Loza am Lehrstuhl für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen und wird im Kapitel "Synthese von Bariumsulfat-Partikeln" näher erläutert. Eine Übersicht über die kommerziell erworbenen Partikel und ihren Größen laut Hersteller findet sich in Tabelle 12.

Partikel	Herkunft	Durchmesser [nm] (Herstellerangabe)
Quarz (grob)	Sigma-Aldrich S5631-100g	1000–5000
Quarz (fein)	Sigma-Aldrich 637238-50g	10–20
TiO <sub>2</sub> , rutil (grob)	Sigma-Aldrich 224227-5g	< 5000
TiO <sub>2</sub> , rutil (fein)	Sigma-Aldrich 637262-25g	< 100
TiO <sub>2</sub> , anatas (grob)	Sigma Aldrich 232033-100g	nicht angegeben
TiO <sub>2</sub> , anatas (fein)	Sigma-Aldrich 637254-50g	< 25
Carbon Nanopowder, graphitized	Sigma-Aldrich 14029-U Supelco	< 200
BaSO₄	Inst. für Gefahrstoff- forschung, BG RCI	nicht angegeben

**Tabelle 12:** Übersicht über die eingesetzten Partikel und ihre Charakterisierung durch den Hersteller, sofern verfügbar.

Zur Applikation in der Zellkultur und für die Gesamtaussagekraft dieser Arbeit musste sicher ausgeschlossen werden, dass die Partikel mit Bakterien bzw. Pyrogenen/Endotoxinen kontaminiert sind. Daher wurden sie über einen Zeitraum von 3–4 Stunden bei 220 °C heißluftsterilisiert (s. Ph. Eur., Ausgabe 8, Kapitel 5.1.1.).

Folgende Parameter wurden im Rahmen der Partikelcharakterisierung bestimmt: Identität (chemische Zusammensetzung), ggf. Verunreinigungen, Kristallinität, Form und Größe der

Primärpartikel, Größe der Agglomerate, Zetapotenzial, Bestimmung des Polymeranteils und der Anregungswellenlänge (bei synthetisierten Partikeln). Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die angewendeten Methoden.

Information	Methode
Form/Größe der Primärpartikel	Rasterelektronenmikroskopie (REM)
Spazificaba Obarflägba (m²/a)	Rasterelektronenmikroskopie (berechnet)
Spezifische Obernache (m/g)	BET-Messungen (experimentell bestimmt)
Partikelgrößenverteilung	REM (trockene Partikel), dynamische Lichtstreuung (Partikel in Suspension, z.B. Kulturmedium)
Identität und Kristallinität	Röntgendiffraktometrie
Zetapotenzial	Dynamische Lichtstreuung
Bestimmung des Polymeranteils	Thermogravimetrie (nur selbst synthetisierte Partikel)
Bestimmung der Anregungswellenlänge	Fluoreszenzspektroskopie (nur selbst synthetisierte Partikel)

 Tabelle 13: Übersicht über die für die Partikelcharakterisierung angewendeten Methoden.

## 4.7.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Da das Auflösungsvermögen durch die Wellenlänge der Strahlungsquelle limitiert wird, sind kolloidale Partikel mithilfe eines Lichtmikroskops nicht mehr zu detektieren. Das maximale Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops liegt nach Abbé bei 200 nm. Aus diesem Grund kommen bei der Charakterisierung von kolloiddispersen Systemen Elektronenmikroskope zum Einsatz. Die Rasterelektronenmikroskopie ist prinzipiell der Auflichtmikroskopie ähnlich, es rastert jedoch ein Elektronenstrahl zeilenförmig über eine Probenoberfläche. Aus einer Glühkathode werden thermische Elektronen (sogenannte Primärelektronen) emittiert, die mithilfe eines elektrischen Feldes von bis zu 200 kV beschleunigt werden. Der Elektronenstrahl wird zunächst auf einen Strahldurchmesser von 1 bis 10 nm gebündelt und anschließend mittels Objektlinsen auf die Probe fokussiert. Um das Hin- und Herführen in einem kontrollierten Muster (Rastern) über die Probe zu ermöglichen, werden zusätzliche Ablenkspulen verwendet, die ein Magnetfeld erzeugen (Romeis et al., 2010).

Mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurden die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung der trockenen Partikel bestimmt. Dies wurde durchgeführt mit einem Rasterelektronenmikroskop Quanta 400 ESEM (FEI, Gräfeling) im Vakuum, nachdem die Proben mit Au:Pd (80:20) gesputtert worden waren. In diesem Rahmen wurde die energiedispersive Röntgenanalyse mit einem Genesis 4000 Gerät (EDAX, Wiesbaden)

durchgeführt. Außerdem konnten im Falle der synthetisierten Bariumsulfat-Partikel sowohl die Partikelanzahl (pro g) als auch die spezifische Oberfläche (m<sup>2</sup> pro g) berechnet werden. Die kommerziell erworbenen Partikel waren für solche Berechnungen nicht sphärisch genug, so dass die Berechnungen von Partikelanzahl und spezifischer Oberfläche zu fehlerbehaftet gewesen wären.

## 4.7.2 Pulver-Röntgendiffraktometrie (PXRD)

Die Röntgendiffraktometrie ist ein analytisches Verfahren zur Strukturaufklärung von Kristallen, bei dem Röntgenstrahlung mit einem Feststoff wechselwirkt. Es wird hochenergetische Röntgenstrahlung (10<sup>-8</sup> bis 10<sup>-12</sup> m) verwendet, da diese kurze Wellenlänge im Bereich der Atomabstände im Kristallgitter (im folgenden Netzebene genannt) liegt. Die Strahlung wird deshalb nicht vollständig von der Oberfläche des Festkörpers reflektiert, sondern beim Auftreffen auf den Kristall entsprechend gebeugt (Abbildung 8). Der Abstand der parallelen Netzebenen wird über die Bragg<sup>´</sup>sche Gleichung bestimmt:

$$n * \lambda = 2 * d * sin\theta$$

n: ganzzahlige Beugungsordnung

λ: Wellenlänge der eingestrahlten Röntgenstrahlung

d: Abstand der Netzebenen

θ: gemessener Beugungswinkel

Wird diese Gleichung nach d umgestellt, kann man den Netzebenenabstand berechnen.



**Abbildung 8:** Streuung der Röntgenstrahlung an parallelen Netzebenen im Kristall, Einfallswinkel = Ausfallswinkel ( $\vartheta$ ), der untere Strahl legt einen längeren Weg zurück, den sogenannten Gangunterschied. Abbildung modifiziert (Römpp et al., 1995).

Jede kristalline Substanz besitzt ein charakteristisches Beugungsmuster. Daher kann die Identität einer Substanz durch Abgleichen des Beugungsmusters mit Literaturwerten ermittelt bzw. überprüft werden.

Weil amorphes Material kein Beugungsmuster ausbildet, ist eine Unterscheidung von amorphem und kristallinem Zustand möglich oder auch eine quantitative Auswertung des amorph/kristallinen Verhältnisses in einer Probe (Naumer und Heller, 1997).

Mithilfe eines Röntgendiffraktometers Bruker D8 Advance Instrument (Mannheim) wurden Identität und Kristallinität der Partikel unter folgenden Bedingungen bestimmt: Bragg-Brentano Geometrie, Cu Kα Strahlung (1,54 Å).

## 4.7.3 Dynamische Lichtstreuung

Der Faraday-Tyndall-Effekt beschreibt die Streuung von Licht an Partikeln, die in einem Gas oder einer Flüssigkeit suspendiert sind. Mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) lassen sich nicht nur die Größen von Partikeln bestimmen, sondern auch die Breite ihrer Größenverteilung (Dispersität). Sie wird durch den sogenannten PDI (Polydispersitätsindex) beschrieben.

Das physikalische Grundprinzip bildet der Dopplereffekt, der bei der Betrachtung von Schallwellen und Strahlung das Phänomen der Frequenzverschiebung zu tieferen bzw. höheren Frequenzen beschreibt, abhängig davon, ob der Sender sich auf den Empfänger zu- oder von ihm wegbewegt. Nach dem gleichen Prinzip bewegen sich unter Versuchsbedingungen die dispergierten Teilchen zufällig (aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung) entweder auf die Strahlungsquelle zu oder entfernen sich von ihr. Aufgrund dieser Bewegungen treten Interferenzen auf, da die Partikel innerhalb sehr kurzer Zeitabstände mehrmals bestrahlt werden. Es kommt zu Fluktuationen der gemessenen Streulichtintensität.

Geht man von sphärischen Kolloiden in der Dispersion aus, so lässt sich der hydrodynamische Radius r der Partikel gemäß der Stokes-Einstein-Beziehung berechnen:

$$D = \frac{kT}{6n\eta r}$$

D: Diffusionskoeffizient

k: Boltzmannkonstante

T: absolute Temperatur

η: dynamische Viskosität des Lösemittels

r: Partikelradius

Mithilfe einer sogenannten Korrelationsfunktion lassen sich Aussagen über die Dispersität eines kolloiddispersen Systems treffen. Die Korrelationsfunktion hat einen exponentiellen Verlauf, wenn monodisperse Partikel vorliegen, während im polydispersen System eine Abweichung beobachtet wird. Aufgrund dieser Abweichung erfolgt eine Annäherung an den exponentiell erhaltenen Kurvenverlauf mithilfe einer Reihenentwicklung. Aus den Kumulanten der Verteilungsfunktion erhält man den Polydispersitätsindex (PDI), der in streng monodispersen Systemen einen Wert von 0 annimmt. Liegt der Wert des PDI zwischen 0 und 0,3 kann die Dispersion noch als monodispers angesehen werden, während bei Werten oberhalb von 0,3 ein polydisperses System vorliegt (Hulst, 1981, Dörfler, 1994, Pecora, 2000).

Um einen realistischen Eindruck der Agglomeratgröße der Partikel in biologischem Medium zu erhalten, wurden die Partikel 24 Stunden im Zellkulturmedium der NR8383 Zellen (Ham's F-12, 15 % FCS, 100  $\mu$ g/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) inkubiert und die Agglomeratgrößen in den Proben dann mit einem Zetasizer Nanoseries Gerät (MalvernNano-ZS, Wellenlänge des Lasers = 633 nm) vermessen. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Daten wurden der Malvern Software ohne weitere Nachbearbeitung entnommen.

## 4.7.4 Bestimmung der spezifischen Oberfläche

Bei Partikeln differenziert man zwischen äußerer und innerer Oberfläche. Die äußere Oberfläche (Abbildung 9, rechts) berücksichtigt keine Poren oder Oberflächenrauigkeiten ("innere Oberfläche"). Äußere und innere Oberfläche addieren sich zur Gesamtoberfläche (Abbildung 9, links), die als spezifische Oberfläche (m<sup>2</sup>/g Material) angegeben wird.

Die experimentelle Bestimmung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels Stickstoffadsorption nach BET (Brunauer, Emmett und Teller). Diese Methode erforderte eine gewisse Beladungsmenge des Gerätes (etwa zwei Gramm) und konnte daher nur mit den kommerziell erworbenen Partikeln durchgeführt werden.



**Abbildung 9:** Oberfläche eines Partikels nach Gaspermeation und Gasadsorption. Gesamtoberfläche (links), zu unterscheiden von der äußeren Oberfläche (rechts), jeweils durch gestrichelte Linien angedeutet.

Die BET-Methode dient der Bestimmung der spezifischen Oberfläche einer Partikelprobe mit Hilfe der physikalischen Adsorption von Stickstoff an dessen Oberfläche. Die physikalische Adsorption ist auf schwache Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte) zwischen den Stickstoffmolekülen und der Oberfläche der Partikel zurückzuführen und kann folgendermaßen ermittelt werden (Ph. Eur. Monographie 2.9.26): Zunächst ist ein Entgasen der Proben zwingend erforderlich, damit alle Gase und Dämpfe (z.B. Restfeuchtigkeit) von der Oberfläche der Partikel entfernt werden. Für diesen Schritt wurden die Partikel in die Probenröhrchen eingefüllt und dann bei 200 °C für zwei Stunden im Vakuum getrocknet (SmartPrep, Micrometrics, Norcross, GA, USA). Das mit einem Stopfen verschlossene Probennahmeröhrchen wurde gewogen und die Einwaage berechnet. Dann wurde das Probenröhrchen im Gerät (Micrometics Tri Star, Norcross, GA, USA) befestigt und zunächst das Totvolumen mit Helium bestimmt. Die Probenröhrchen wurden in flüssigen Stickstoff eingetaucht und bei elf verschiedenen P/P<sub>0</sub>-Werten zwischen 0,05 und 0,3 wurde das jeweils adsorbierte Volumen V<sub>a</sub> gemessen. Die gesammelten Daten wurden mit der Gleichung für Adsorptionsisothermen aufbereitet (Brunauer et al., 1938):

$$\frac{1}{[V_a\left(\frac{P_0}{P}-1\right)]} = \frac{C-1}{V_m * C} * \frac{P}{p_0} + \frac{1}{V_m * C}$$

P: Partialdruck des Prüfgases in Pascal im Gleichgewicht mit der Oberfläche bei 77,4 K (Siedepunkt von flüssigem Stickstoff)

P<sub>0</sub>: Sättigungsdruck des Prüfgases in Pascal

Va: Volumen des adsorbierten Gases in ml bei Normaltemperatur und Normaldruck

V<sub>m</sub>: Volumen des adsorbierten Gases in ml, das bei Normaltemperatur und Normaldruck eine monomolekulare Schicht an der Oberfläche der Probe bildet

C: dimensionslose Konstante, in der die Enthalpie der Gasadsorption auf der Oberfläche der Probe enthalten ist

Aus der Gleichung wurde das Volumen des adsorbierten Gases  $V_m$  berechnet, und daraus wiederum die spezifische Oberfläche S in m<sup>2</sup>/g nach folgender Gleichung:

$$S = \frac{V_m * N * a}{m * 22400}$$

N: Avogadro-Zahl (6,022 \* 10<sup>23</sup> mol/l)

a: effektive Querschnittsfläche eines adsorbierten Prüfgasmoleküls Stickstoff (0,162 nm<sup>2</sup>)m: Einwaage der Partikelprobe in Gramm

Die synthetisch gewonnen Bariumsulfat-Partikel waren im Gegensatz zu den kommerziell erworbenen Partikeln annähernd sphärisch, weswegen eine Kalkulation der spezifischen Oberfläche aus der Partikelgrößenverteilung sinnvoll war. Darüber hinaus war die jeweils synthetisierte Menge so gering, dass sie für eine Beladung des BET-Geräts nicht ausgereicht hätte.

Die Bestimmung der Oberfläche erfolgte daher näherungsweise anhand der Partikelanzahl *N* und folgender Gleichung:

 $S = 4\pi r^2 N_{Partikel\,pro\,1\,g}$ 

*S:* Oberfläche in m<sup>2</sup>/g *N:* Partikelanzahl pro 1 g

## 4.7.5 Bestimmung des Zetapotenzials

Wird ein Partikel in einem flüssigen Medium suspendiert, kommt es abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit zu einer Anlagerung von Ionen aus dem flüssigen Medium. Dies führt zum Aufbau einer elektrochemischen Doppelschicht, die aus einem starren (nicht mobilen) und einem diffusen (mobilen) Anteil besteht. Da die Wechselwirkungen mit steigender Entfernung von der Grenzfläche abnehmen, wird das Potenzial in diese Richtung immer schwächer. Durch das Vorbeiströmen des flüssigen Mediums kann es zu einem Abscheren der mobilen Phase kommen. Das an der Scherebene verbleibende Potenzial wird als elektrokinetisches Potenzial bzw. Zetapotenzial  $\zeta$  bezeichnet (Dörfler, 1994).

Im Rahmen der dynamischen Lichtstreuung konnte gleichzeitig das Zetapotenzial bestimmt werden, sofern man für die Messungen eine spezielle Küvette einsetzte. Das Zetapotenzial wurde ebenfalls mit dem Zetasizer Nanoseries Gerät (MalvernNano-ZS, Wellenlänge des Lasers = 633 nm) bestimmt.

## 4.7.6 Fluoreszenzspektroskopie

Da die synthetisierten Bariumsulfat-Partikel mit Aminofluorescein fluoreszenzmarkiert waren, wurde die Fluoreszenz der Partikel bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm gemessen (Carry Eclipse Fluorescence Spektrophotometer).

Ein solches Fluoreszenzspektrum ist im Anhang (Abbildung 73) beispielhaft dargestellt. Die Daten dienten vor allem zur Überprüfung der Fluoreszenzmarkierung und sind im Ergebnisteil nicht gesondert aufgeführt.

# 4.8 Synthese von Bariumsulfat-Partikeln

Aufgrund der hohen Tendenz zur Agglomeratbildung der Partikel in Suspension kamen in einer zweiten Reihe von Experimenten eigens für diese Arbeit synthetisierte Partikel zum Einsatz.

Die Synthese erfolgte durch Frau Kateryna Loza am Lehrstuhl für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen.

Die fluoreszierenden Bariumsulfat-Mikropartikel wurden aus einer wässrigen Lösung aus Bariumhydroxid (Ba(OH)<sub>2</sub>) und Natriumsulfat (Na<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)) ausgefällt. Die Reaktion fand statt in Anwesenheit von Carboxymethylcellulose (CMC), konjugiert mit 6-Aminufluorescein (CMC-F). Bariumhydroxid-Lösung (100 mM, 12 ml) und Nariumsulfat-Lösung (100 nM, 12 ml) wurden durch eine Peristaltikpumpe in ein Gefäß mit 25 ml CMC-F Lösung (2 g/l) eingeleitet (30 s) und dann 10 Minuten gerührt.Die Partikel wurden durch Zentrifugation aufgereinigt (1250 g, 30 min), dann in Wasser redispergiert und erneut zentrifugiert. Die endgültige Redispergierung in Wasser erfolgte im Ultraschallbad.

Die fluoreszierenden submikroskaligen Bariumsulfatpartikel wurden ebenfalls aus einer wässrigen Lösung aus Bariumhydroxid (Ba(OH)<sub>2</sub>) und Natriumsulfat (Na<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)) ausgefällt. Die Reaktion fand statt in Anwesenheit von Carboxymethylcellulose (CMC), konjugiert mit 6-Aminufluorescein (CMC-F). Bariumhydroxid-Lösung (100 mM, 12 ml) und Nariumsulfat-Lösung (100 nM, 12 ml) wurden durch eine Peristaltikpumpe mit Y-Anschluss in ein Gefäß mit 25 ml CMC-F Lösung (2 g/l) eingeleitet (30 s) und dann 10 Minuten gerührt. Die Partikel wurden durch Zentrifugation aufgereinigt (1250 g, 30 min), dann in Wasser redispergiert und erneut zentrifugiert. Die endgültige Redispergierung in Wasser erfolgte im Ultraschallbad.

Das fluoreszierende nanoskalige Bariumsulfat wurde ebenfalls aus einer wässrigen Lösung aus Bariumhydroxid (Ba(OH)<sub>2</sub>) und Natriumsulfat (Na<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)) ausgefällt. Die Reaktion fand statt in der Anwesenheit von Carboxymethylcellulose (CMC), konjugiert mit 6-Aminufluorescein (CMC-F). 1 ml der Natriumsulfat-Lösung (50 mM, Ethanol:Wasser = 1:1 v/v %) wurde durch eine Peristaltikpumpe in ein Gefäß gepumpt (4 min), welches 25 ml Bariumchlorid-CMC-F-Lösung enthielt (50 mM BaCl<sub>2</sub>; 2 g/I CMC-F).

Anschließend wurde 10 Minuten gerührt. Die Partikel wurden durch Zentrifugation aufgereinigt (29000 g, 30 min), dann in Wasser redispergiert und erneut zentrifugiert. Die endgültige Redispergierung in Wasser erfolgte im Ultraschallbad.

# 4.9 Charakterisierung der Fasern

Im Rahmen eines weltweiten Forschungsprojekts sind vor einigen Jahrzehnten verschiedene Asbestproben von der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (Union internationale contre le cancer, UICC) als Standardreferenzen etabliert worden (Vertrieb durch SPI Supplies/Structure Probe, Inc., West Chester, USA).

Vier von diesen fünf Standardreferenzen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht: Chrysotil A, Chrysotil B, Krokydolith und Amosit (Tabelle 14). Die fünfte Standardreferenz war zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht verfügbar und wurde daher nicht eingesetzt.

Tabelle 14: Obersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Asbestproben.						
	Chrysotil A Rhodesian	Chrysotil B Canadian	Krokydolith	Amosit		
Referenz-Nummer	4173-111-2	4173-111-1	4173-111-3	4173-111-4		
Ursprung	Simbabwe	Kanada	Südafrika	Südafrika		

sicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Asbestoroben

Diese Proben werden seit Jahrzehnten in vielen Experimenten als Standards eingesetzt und eignen sich daher gut für die Etablierung der Migrationsexperimente mit Fasern und für den Vergleich mit anderen toxikologischen in vitro- und in vivo-Experimenten.

Die Asbestfasern sind bereits vor einer langen Zeit charakterisiert worden. Aufgrund des hohen Anspruchs an die Charakterisierung von Fasern wird an dieser Stelle auf diese umfassende Charakterisierung zurückgegriffen, auch wenn sie bereits viele Jahre zurückliegt (Timbrell et al., 1968). Die Autoren stellten einen hohen Anspruch an die Homogenität dieser Referenzen, weil sie schon damals davon ausgingen, dass die Referenzen über viele Jahre in sehr kleinen Mengen eingesetzt werden und daher auch eine Menge von wenigen Milligramm repräsentativ sein muss. Aufgrund des Alters der Daten wurde die Längenverteilung der Asbestfasern mithilfe von Rasterelektronen-mikoskopie (REM) neu beurteilt wie im Kapitel "Rasterelektronenmikroskopie" beschrieben.

Folgende Parameter wurden in der Arbeit von Timbrell untersucht: Homogenität (via Zusammensetzung, sehr geringe Abweichungen), Mineralölgehalt, Kontamination durch die verwendeten Probenbehältnisse, chemische Zusammensetzung (via Neutronenaktivierung, Atomabsorptionsspektroskopie (AAS), Flammenemissionsspektroskopie (FES), Gravimetrie), Längenverteilung von in Ethanol suspendierten Fasern (Mikroskopie) sowie von trockenen Fasern (Mikroskopie bzw. Elektronenmikroskopie), aerodynamischer Durchmesser und

spezifische Oberfläche (Stickstoffadsorption). Die für diese Arbeit interessanten Parameter finden sich in den Tabellen 15 – 19 (Timbrell et al., 1968).

Tabelle 15: Elementare Zusammensetzung	der Asbestfasern in % bzw. ppm. Folgende
Analysenmethoden kamen zum Einsatz: A	= Atomabsorptionsspektroskopie (AAS), F =
Flammenemissionsspektroskopie (FES), G	= Gravimetrische Analyse, N = Neutronen-
aktivierung.	

Zusammensetzung	Chrysotil A Rhodesian	Chrysotil B Canadian	rysotil B Krokydolith nadian		
Aluminium (%)	0,4 (N)	0,27 (N)	0,47 (N)	0,34 (N)	
Eisen (%)	1,7 (N); 0,88 (A)	2,6 (N); 1,14 (A)	27 (N); 15,1 (A)	28 (N), 15,1 (A)	
Magnesium (%)	31 (N)	32 (N)	3,6 (N)	11,0 (N)	
Natrium als Na <sub>2</sub> O (%)	0,04 (F)	0,02 (F)	5,8 (F)	0,11 (F)	
Silicon als SiO <sub>2</sub> (%)	39,1 (G)	18,6 (G)	49,1 (G)	50,3 (G)	
freies SiO <sub>2</sub> (%)	< 0,01 (A)	0,13 (A)	2,06 (A)	3,0 (A)	
Cobalt (ppm)	55 (N), 54 (A)	46 (N), 45 (A)	2 (N), 9 (A)	7 (N), 11 (A)	
Chrom (ppm)	) 1390 (N), 1395 490 (N), 316 16 (N), 22 (A) (A)		35 (N), 32 (A)		
Mangan (ppm)	430 (N)	510 (N)	870 (N)	15000 (N)	
Nickel (ppm)	1250 (N)	990 (N)	1250 (N)	< 100 (N)	
Antimon (ppm)	4 (N)	-	2 (N)	2 (N)	
Scandium (ppm)	6 (N)	5 (N)	0,5 (N)	5 (N)	

**Tabelle 16:** Längenverteilung der suspendierten Fasern, gemessen in Ethanol (mikroskopische Analyse). Angegeben ist jeweils der Prozentsatz an Fasern, der länger ist als die entsprechende Größe.

Faser	2 µm	5 µm	10 µm	15 µm	20 µm	30 µm	40 µm	60 µm	80 µm
Chrysotil A Rhodesian	100	28,47	10,61	5,41	3,27	1,43	1,12	0,61	0,30
Chrysotil B Canadian	100	31,67	14,86	10,10	6,8	3,98	2,23	1,16	0,77
Krokydolith	100	26,38	8,04	2,84	1,48	0,86	0,37	0	0
Amosit	100	27,49	9,43	4,12	2,92	1,59	0,66	0,66	0,26

**Tabelle 17:** Längenverteilung der trockenen Fasern, gemessen unter dem Elektronenmikroskop. Die Messung wird ungenau ab einer Größe von mehr als 3  $\mu$ m. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz an Fasern, der länger ist als die entsprechende Größe.

Faser	0,2 µm	0,5 µm	1 µm	2 µm	5 µm	10 µm	15 µm	20 µm
Chrysotil A Rhodesian	100	95,11	81,65	61,05	25,35	7,81	2,71	1,91
Chrysotil B Canadian	100	91,53	73,60	54,41	26,99	9,55	4,5	3,20
Krokydolith	100	82,71	60,59	32,52	8,54	2,78	0,91	0,54
Amosit	100	86,3	70,47	54,65	31,10	15,08	7,38	4,87

**Tabelle 18:** Längenverteilung der trockenen Fasern, gemessen unter dem Lichtmikroskop. Nur Fasern mit einer Länge von mind. 2 µm wurden erfasst, dafür können hier auch längere Fasern gemessen werden als mit dem Elektronenmikroskop. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz an Fasern, der länger ist als die entsprechende Größe.

Faser	2 µm	4 µm	8 µm	12 µm	16 μm	20 μm	30 µm	40 μm	50 μm	60 µm
Chrysotil A Rhodesian	100	81,52	44,73	27,19	19,76	15,95	8,74	5,89	4,37	3,04
Chrysotil B Canadian	100	70,3	29,7	15,65	10,36	7,83	2,32	1,17	0,71	0
Krokydolith	100	60,2	18,82	9,02	4,44	3,11	1,48	1,38	1,30	1,28
Amosit	100	64,3	22,2	12,27	7,6	4,59	1,58	0,75	0,61	0,48

Fazit: Krokydolith weist im Mittel die kürzesten Fasern auf (sowohl in Ethanol-Suspension als auch im trockenen Zustand), gefolgt von Amosit. Darauf folgen Chrysotil A und Chrysotil B (Suspension) bzw. Chrysotil B und A (trocken). Dennoch muss festgehalten werden, dass die Faserlängen recht nah beieinander liegen und die Unterschiede relativ gering sind.

Tabelle 19: Spezifische Oberfläche der Fasern, gemessen durch Stickstoffabsorption
--

Faser	spezifische Oberfläche (m²/g)
Chrysotil A Rhodesian	21,3 (+/- 1,5)
Chrysotil B Canadian	26,8 (+/- 0,7)
Krokydolith	8,3 (+/- 0,5)
Amosit	5,7 (+/- 0,3)

# 4.10 Statistische Analysen

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mindestens dreimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte ( $\overline{x}$ ) mit den zugehörigen Standardabweichungen (SD) angegeben. Mithilfe des Programms GraphPad Prism (San Diego, CA, USA) wurde zum statistischen Vergleich der Ergebnisse eine ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) mit Post-Hoc-Mehrfachvergleich Tukey-HSD (HSD = honestly significant difference", dt. "ehrlicher Signifikanzunterschied") durchgeführt. Als statistisch signifikant galt p < 0,05 (\*), p < 0,005 (\*\*) und p < 0,001 (\*\*\*).

Zur Ermittlung der in dieser Arbeit dargestellten  $IC_{50}$ -Werte wurden die Zellindices (= relative Änderungen der Zellzahlen) zu einem festgelegten Zeitpunkt (40 Stunden) mithilfe des Programms GraphPad Prism gegen den Logarithmus der jeweils eingesetzten Dosierung aufgetragen (g/cm<sup>2</sup>). Daraufhin wurde eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt (log(Partikeldosis) vs. Zellindex). Der Wendepunkt der ermittelten Kurve wurde als  $IC_{50}$ -Wert angegeben.

Zum Teil wurden die Ergebnisse in Kapitel 5.4 als % der Kontrolle angegeben. Hierfür wurde der Mittelwert der Kontrollen aus drei unabhängigen Versuchen als 100 %-Wert bestimmt. Alle Kontrollen und Proben wurden als prozentuale Mittelwerte (x) mit den zugehörigen Standardabweichungen (SD) angegeben.

# 5 Ergebnisse

Da zwei Varianten des Assays etabliert werden konnten, folgen zunächst die Ergebnisse der Etablierung der beiden Chemotaxisassays: In beiden Fällen wurden, wie im Kapitel "Inkubation von NR8383 Zellen mit Partikeln" beschrieben, NR8383 Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Partikeln (Tabelle 12) vorinkubiert. Die Überstände wurden im Migrationsassay eingesetzt, um die Chemotaxis von a) differenzierten HL-60 Zellen (Simulation der Einwanderung von Neutrophilen) und b) NR8383 Zellen (Simulation der Infiltration durch Makrophagen) zu induzieren.

In den folgenden Kapiteln 5.1 und 5.2 ist dargestellt, dass beide Varianten des Migrationsassays eine inflammatorische Wirkung reproduzierbar, dosisabhängig und statistisch signifikant abbilden können. Im Rahmen der Experimente konnten darüber hinaus die beteiligten Zytokine und Chemokine auf RNA-Ebene nachgewiesen und mit den Ergebnissen korreliert werden. Eine dritte Variante des Assays auf der Basis von Humanzellen scheiterte hingegen an der schlechten Phagozytoseleistung der THP-1 Zellen (s. Kapitel 5.3). Im Fortgang der Arbeiten wurden die Chemotaxisassays für die Beurteilung des inflammatorischen Potenzials von Asbestfasern (Kapitel 5.5) und von eigens für dieses Projekt synthetisierten Bariumsulfatpartikeln (Kapitel 5.4) eingesetzt.

# 5.1 Etablierung eines Chemotaxisassays auf der Basis von NR8383 Alveolarmakrophagen und dHL-60 Zellen, sowie Charakterisierung der Partikel

## 5.1.1 Partikelcharakterisierung

## 5.1.1.1 Größe und Morphologie der Primärpartikel

Sowohl die Größe als auch die Morphologie der trockenen Partikel (Abbildung 10A-H) wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop bestimmt. Insgesamt wiesen die Partikel eine sehr heterogene Partikelgrößenverteilung und Form auf.

Die Aufnahmen von Bariumsulfat (Abbildung 10G) zeigten annähernd sphärische Partikel mit einer recht großen Partikelgrößenverteilung, während das grobe Quarz aus polymorphen Körnern verschiedener Größen bestand (Abbildung 10B). Sowohl grobes (Abbildung 10F) als auch feines Anatas (Abbildung 10E) bestanden aus einer recht homogenen Körnung mit einer mehr oder weniger sphärischen Morphologie. Feines Quarz (Abbildung 10A) und Carbon Black (Abbildung 10H) waren amorph. Aus diesen Gründen erscheinen diese rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen leicht verschwommen.



**Abbildung 10:** Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen von feinem SiO<sub>2</sub> (A), grobem Quarz (B), feinem Rutil (C), grobem Rutil (D), feinem Anatas (E), grobem Anatas (F), Bariumsulfat (G), Carbon Black (H).

Die mit dem Rasterelektronenmikroskop ermittelten Partikelgrößen wiesen aufgrund der heterogenen Größenverteilung zum Teil recht hohe Standardabweichungen auf (z.B. im Fall von grobem Quarz). Außerdem konnte die Größenangabe des Herstellers nicht für alle Partikel bestätigt werden. Vor allem das grobe Quarz hatte einen deutlich geringeren Durchmesser als durch den Hersteller angegeben, weitere Abweichungen betrafen das feine SiO<sub>2</sub> und Carbon Black (Tabelle 20).

Partikel	Durchmesser (Hersteller- angabe) [nm]	mittlerer Partikeldurch- messer ± SD (REM) [nm]
grobes Quarz	1000–5000	384 (± 216)
feines SiO <sub>2</sub>	10–20	49 (±12)
grobes Rutil	< 5000	1140 (± 430)
feines Rutil	< 100	67 (± 18)
grobes Anatas	nicht angegeben	140 (± 38)
feines Anatas	< 25	33 (± 7)
Carbon Black	< 200	83 (± 23)
BaSO <sub>4</sub>	nicht angegeben	2250 (± 920)

**Tabelle 20:** Mittlerer Partikeldurchmesser ± SD des trockenen Pulvers, bestimmt aus den REM-Aufnahmen.

#### 5.1.1.2 Identität und Kristallinität

Mithilfe der aufgenommenen PXRD-Spektren wurde unter Zuhilfenahme von Referenzspektren die Identität aller eingesetzten Partikel bestätigt. Darüber hinaus wurde für alle Partikel ein kristalliner Zustand nachgewiesen. Nur die Partikel Carbon Black und feines SiO<sub>2</sub> waren amorph (Tabelle 21).

Nachfolgend ist das PXRD-Spektrum von grobem Quarz und feinem SiO<sub>2</sub> exemplarisch dargestellt (Abbildung 11). Aufgetragen wurde stets der Beugungswinkel gegen die Intensität.

Beim feinen SiO<sub>2</sub> (rot) sind die Peaks stark verbreitet, woraus auf einen amorphen Materialzustand geschlossen werden kann. Im Falle des groben Quarzes (schwarz) sieht man eine Serie von scharfen Peaks, wie es für eine kristalline Substanz typisch ist. Die PXRD-Spektren aller weiteren in dieser Arbeit eingesetzten Partikel befinden sich im Anhang (Abbildung 64 bis Abbildung 67).



**Abbildung 11:** Röntgenpulverdiffraktogramme von feinem SiO<sub>2</sub> (rot) und grobem Quarz (schwarz) sowie Referenz (blau) mit der PDF-Nr. 46-1045.

Partikel	Kristallinität
grobes Quarz	kristallin
feines SiO <sub>2</sub>	amorph
grobes Rutil	kristallin
feines Rutil	kristallin
grobes Anatas	kristallin
feines Anatas	kristallin
Carbon Black	amorph
BaSO₄	kristallin

Tabelle 21: Ergebnisse der PXRD-Messungen zur Kristallinität der Partikel.

## 5.1.1.3 Dichte und spezifische Oberfläche

Zunächst wurde die mittlere Dichte der kommerziell erworbenen Partikel bestimmt. Dieser Wert wurde dann zur experimentellen Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Stickstoffadsorption zur Hilfe genommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Die Dichte und die spezifische Oberfläche der synthetisch gewonnenen Bariumsulfat-Partikel und der Asbestfasern konnten nicht experimentell bestimmt werden, da nicht genug Probenmaterial zur Verfügung stand. Im Falle der Asbestfasern wird die spezifische Oberfläche ohnehin nicht als Einflussfaktor für ihre toxischen Eigenschaften diskutiert. Hier stehen andere physikalische Parameter wie Länge, Durchmesser und Biopersistenz im Vordergrund.

Die feinen Partikel wiesen generell eine deutlich größere spezifische Oberfläche auf als die gröberen Partikel. Feines Anatas und Carbon Black hatten mit 55,01 m<sup>2</sup>/g bzw. 68,68 m<sup>2</sup>/g die größten spezifischen Oberflächen, gefolgt von feinem SiO<sub>2</sub> (34,22 m<sup>2</sup>/g) und BaSO<sub>4</sub> (32,76 m<sup>2</sup>/g), das trotz seiner großen Körnung eine verhältnismäßig hohe Oberflächengröße aufwies. Absteigend folgten feines Rutil (27,53 m<sup>2</sup>/g) und grobes Anatas (11,37 m<sup>2</sup>/g). Die kleinsten spezifischen Oberflächen hatten das grobe Quarz (5,83 m<sup>2</sup>/g) und das grobe Rutil (2,56 m<sup>2</sup>/g) (Tabelle 22).

**Tabelle 22:** Dichte (bestimmt mittels Heliumpyknometer bei 24 °C aus 5 Versuchen) sowie die spezifische Oberfläche (bestimmt mittels BET) der Partikel, jeweils  $\overline{x} \pm SD$ .

Partikel	Mittlere Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	Spezifische Oberfläche [m²/g]
grobes Quarz	2,67 ± 0,01	5,83 ± 0,02
feines SiO <sub>2</sub>	1,98 ± 0,01	34,22 ± 0,60
grobes Rutil	4,35 ± 0,01	2,56 ± 0,01
feines Rutil	4,44 ± 0,01	27,53 ± 0,10
grobes Anatas	4,00 ± 0,01	11,37 ± 0,05
feines Anatas	3,84 ± 0,01	55,01 ± 0,18
Carbon Black	1,85 ± 0,01	68,68 ± 0,76
BaSO <sub>4</sub>	4,01 ± 0,01	32,76 ± 0,14

#### 5.1.1.4 Hydrodynamischer Partikeldurchmesser in biologischem Medium

Um eine eventuelle Agglomeration der Partikel im Suspensionsmedium zu quantifizieren, wurde eine Partikelgrößenverteilung im suspendierten Zustand aufgenommen. Eine Charakterisierung der Partikelgröße im trockenen Zustand (REM) hätte die Exposition der NR8383 Zellen nur unzureichend wiedergegeben, da die Partikel im Medium (aufschüttelbare) Agglomerate bildeten und sich auch sehr schnell im Gefäß absetzten. Starke Sedimentationseffekte erschwerten die Messungen und führten teilweise zu annähernd reproduzierbaren (z.B. feines Rutil), teilweise zu stark schwankenden Messergebnissen mit großen Standardabweichungen.

Aufgrund dieser Sedimentationseffekte sind die nun folgenden Partikelgrößen nur als Annäherung zu betrachten. Sie sollen hier als Einschätzung dienen, wie groß die Agglomerate waren, mit welchen die NR8383 Makrophagen exponiert wurden. Um den Einfluss von FCS-haltigem Kulturmedium oder Wasser auf die Agglomeratbildung der Partikel zu testen, wurden die Partikel jeweils zusätzlich in Reinstwasser suspendiert und ihre hydrodynamischen Durchmesser bestimmt. Die hydrodynamischen Durchmesser in Reinstwasser waren deutlich größer als die in Kulturmedium mit FCS-Zusatz. Die Ergebnisse aller Agglomeratgrößenbestimmungen sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Ursprünglich wurde mit diesem Ansatz versucht, die Stabilität der Partikelsuspensionen zu erhöhen (z.B. über einen erhöhten FCS-Zusatz, da die Partikel evtl. an der Oberfläche der Proteine anhaften können). Diese Idee wurde aber verworfen, da selbst in reinem FCS der hydrodynamische Durchmesser der Agglomerate nicht weiter herabgesetzt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus korrelierten die Durchmesser der Agglomerate nicht mit den Primärpartikelgrößen. So bildete das feine SiO<sub>2</sub> deutlich größere Agglomerate als das grobe Quarz. Gleiches gilt für die Anatas-Partikel. Nur im Falle von Rutil waren die Agglomerate der feineren Variante deutlich kleiner als die der groben Variante (Tabelle 23).

Partikel	Durchmesser (Herstellerangabe) [nm]	ermittelter Durchmesser in Kulturmedium [nm]	ermittelter Durchmesser in H <sub>2</sub> O [nm]
grobes Quarz	1000 – 5000	1145 (± 69)	1482 (± 90)
feines SiO <sub>2</sub>	10 – 20	2063 (± 699)	1360 (± 159)
grobes Rutil	< 5000	1588 (± 248)	4801 (± 279)
feines Rutil	< 100	587 (± 52)	423 (± 10)
grobes Anatas	nicht angegeben	537 (± 7)	390 (± 5)
feines Anatas	< 25	1681(± 121)	1338 (± 33)
Carbon Black	< 200	566 (± 66)	310 (± 5)
BaSO <sub>4</sub>	nicht angegeben	3653 (± 909)	238 (± 39)

**Tabelle 23:** Gegenüberstellung des Durchmessers (Herstellerangabe) und des Durchmessers der Agglomerate in Kulturmedium und Wasser ( $\overline{x}$  aus drei DLS- Messungen ± SD).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine Suspendierung der Partikel in FCS-haltigem Medium oder in Wasser aufgrund von Agglomerationen zu erheblichen Änderungen der jeweiligen Partikelgrößenverteilung führte. Ob und welche Partikel Agglomerate bildeten, korrelierte nicht mit der Größe der Primärpartikel und war daher nicht vorhersehbar. Darüber hinaus hatte auch das Suspensionsmedium (Wasser, Kulturmedium, mit oder ohne FCS-Zusatz) einen Einfluss auf die Größen der gebildeten Agglomerate, jedoch konnte keines der ausprobierten Suspensionsmittel die Sedimentation bzw. Agglomeratbildung deutlich senken.

### 5.1.2 Toxizität

## 5.1.2.1 Trypanblau-Färbung

Unter dem Lichtmikroskop konnte nachgewiesen werden, dass alle in dieser Arbeit verwendeten Partikel in Dosierungen von bis zu 160  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> durch NR8383 Zellen phagozytiert wurden. Mittels Trypanblau-Färbung konnten gleichzeitig vitale von nicht vitalen Zellen unterschieden werden. Toxische Effekte (sichtbar durch viele blau angefärbte und demnach nicht vitale Zellen) traten vor allem in Dosisbereichen ab ca. 80  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> auf. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse für die Inkubation von Makrophagen mit grobem Rutil exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 12 A-D:** NR8383 Makrophagen nach der Inkubation mit grobem Rutil in verschiedenen Dosierungen (A: 0  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, B: 32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, C: 80  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, D: 160  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>). Die Partikel innerhalb der Zellen erscheinen auf dem Bild schwarz und nicht vitale Zellen sind mit Trypanblau angefärbt.

Auf den Abbildungen erkennt man, dass die nicht-exponierten Zellen (Abbildung 12A) zum größten Teil einzeln vorlagen. Nicht vitale Zellen (blau) konnte man nur vereinzelt erkennen. Bei einer Partikeldosis von 32 μg/cm<sup>2</sup> erfolgte eine Aufnahme der Partikel in die

Makrophagen (Abbildung 12B, innerhalb der Zellen als schwarze Agglomerate erkennbar). Auch hier lagen nur vereinzelt nicht vitale Zellen vor. Nach einer Steigerung der Dosis auf 80  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> (Abbildung 12C) ließ sich ein deutlicher Anstieg an nicht vitalen, durch Trypanblau angefärbten Zellen erkennen. Nach der Inkubation mit der höchsten Dosis Rutil (Abbildung 12D, 160  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) waren nicht nur viele nicht vitale Zellen vorhanden; viele der mit Partikeln überladenen Makrophagen bildeten auch auffällige Zellverbände. Es konnte in keinem Fall beobachtet werden, dass alle Partikel durch die NR8383 Zellen aufgenommen wurden. Stattdessen waren auch jederzeit freie Partikel als kleine schwarze Punkte sichtbar, die nicht repräsentativ fotografiert werden konnten.

Eine quantitative Auswertung des Verhältnisses vitaler/nicht vitaler Zellen erfolgte nicht. Vielmehr konnten mit der Trypanblau-Färbung Dosisbereiche abgeschätzt werden, in dem inflammatorische bzw. toxische Effekte zu erwarten sind. Diese Effekte wurden auf Basis dieser Datenlage für grobes Rutil auf deutlich unter 80  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> geschätzt. Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde eine genauere Toxizitätsbestimmung (IC<sub>50</sub>-Wert) mittels Messung der Impedanz in Echtzeit durchgeführt.

#### 5.1.2.2 Toxizitätsbestimmung in Echtzeit

Der eigentliche Toxizitätstest erfolgte mittels Impedanzmessung auf dem Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument. Nachdem die Zellen 20 bis 24 Stunden mit den Partikeln vorinkubiert wurden, erhielt man ein charakteristisches Spektrum, das den sog. Zellindex (relative Änderung der Zellzahl) gegen die Zeit darstellt. Dieses ist in Abbildung 13 beispielhaft für feines SiO<sub>2</sub> dargestellt. Zu Beginn des Experimentes (0 h) begann die Vorinkubationszeit, an die sich die Zugabe von sieben Dosierungen der Partikel bzw. der Fasern anschloss. Diese Zugabe ist als Peak bei ca. 24 Stunden zu erkennen. Zusätzlich wurde in ein Well nur Medium (= 0  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) als Kontrolle pipettiert. Je nach zugegebener Partikeldosierung starben die Zellen ab, was man in Abbildung 13 als Absinken des Zellindex erkennen kann. Während die Zellen bei einer Zugabe von 1  $\mu$ g feinem SiO<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup> weiter wuchsen (Zellindex steigt), sank der Zellindex nach Zugabe von 8–125  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> deutlich ab.

Im Anschluss wurde die relative Änderung der Zellzahl zu einem bestimmten Zeitpunkt für die Berechnung des IC<sub>50</sub>-Wertes benutzt. Dafür wurde bei immer gleichem Zeitpunkt (den die Software automatisch auswählt, in diesem Fall 40 Stunden) der Zellindex gegen die Dosis zum Zeitpunkt 40 Stunden aufgetragen. Nach Logarithmierung der Dosis (g/cm<sup>2</sup>) erhielt man für jede Partikelart und für jede Faser eine charakteristische Hemmkurve (Abbildung 14 bis Abbildung 17).



**Abbildung 13:** Toxizitätsbestimmung mittels Impedanzmessung, hier beispielhaft für feines SiO<sub>2</sub>. Die relative Änderung der Zellzahl (= Zellindex) ist in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden aufgetragen. Zunächst begann zum Zeitpunkt 0 Stunden eine Vorinkubationszeit, an die sich die Partikelzugabe (Peak bei 24 Stunden) anschloss. Während die Zellen bei einer Zugabe von 1 µg feinem SiO<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup> weiter wuchsen (steigender Zellindex), sankt der Zellindex nach Zugabe von 8-125 µg/cm<sup>2</sup> deutlich ab (fallender Zellindex).

Die folgenden Abbildungen zeigen die Hemmkurven und die daraus abgeleiteten  $IC_{50}$ -Werte für alle im Migrationsassay eingesetzten Partikel. Aufgetragen ist jeweils der Zellindex (die relative Änderung der Zellzahl) gegen die logarithmische Partikeldosis in g/cm<sup>2</sup>. Der Wert der halbmaximalen Hemmung entspricht dem  $IC_{50}$ -Wert.

In Abbildung 14 sind die Hemmkurven für feines SiO<sub>2</sub> und grobes Quarz dargestellt. Es ergab sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der berechneten  $IC_{50}$ -Werte: Für feines SiO<sub>2</sub> lag dieser bei 5 µg/cm<sup>2</sup>, im Falle vom groben Quarz bei 81 µg/cm<sup>2</sup>. Es ist somit davon auszugehen, dass grobes Quarz auf NR8383 Zellen deutlich weniger toxisch wirkt als feines SiO<sub>2</sub>.



**Abbildung 14:** Relative Änderung der Zellzahl zum Zeitpunkt 40 Stunden (= Zellindex zum Zeitpunkt 40 Stunden) in Abhängigkeit von der logarithmischen Dosis (g/cm<sup>2</sup>) des eingesetzten feinen SiO<sub>2</sub> und Quarz.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betrugen 5 µg/cm<sup>2</sup> (feines SiO<sub>2</sub>) und 81 µg/cm<sup>2</sup> (grobes Quarz).

In Abbildung 15 sind die Hemmkurven für feines und grobes Rutil dargestellt. Die Differenz bezüglich der berechneten  $IC_{50}$ -Werte war hier nicht so ausgeprägt wie im Falle der SiO<sub>2</sub>-Partikel: Für feines Rutil betrug er 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, für grobes Rutil 18  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>.



**Abbildung 15:** Relative Änderung der Zellzahl zum Zeitpunkt 40 Stunden (= Zellindex zum Zeitpunkt 40 Stunden) in Abhängigkeit von der logarithmischen Dosis (g/cm<sup>2</sup>) des eingesetzten feinen und groben Rutils.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betrugen 5 µg/cm<sup>2</sup> (feines Rutil) und 18 µg/cm<sup>2</sup> (grobes Rutil).

Außerdem ist somit davon auszugehen, dass feines Rutil auf NR8383 Zellen ähnlich toxisch wirkt wie feines SiO<sub>2</sub>. In Abbildung 16 sind die Hemmkurven für feines und grobes Anatas dargestellt. Auch hier ergab sich ein Unterschied bezüglich der berechneten IC<sub>50</sub>-Werte: Für feines Anatas lag dieser bei 196  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, im Falle von grobem Anatas bei 255  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. Besonders im Vergleich zu den rutilen Titandioxid-Partikeln und auch zu den SiO<sub>2</sub>-Partikeln fallen bei beiden Anatas-Körnungen deutlich höhere IC<sub>50</sub>-Werte und somit eine deutlich niedrigere Toxizität für die NR8383 Zellen auf.



**Abbildung 16:** Relative Änderung der Zellzahl zum Zeitpunkt 40 Stunden (= Zellindex zum Zeitpunkt 40 Stunden) in Abhängigkeit von der logarithmischen Dosis (g/cm<sup>2</sup>) des eingesetzten feinen und groben Anatas.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betrugen 196 µg/cm<sup>2</sup> (feines Anatas) und 255 µg/cm<sup>2</sup> (grobes Anatas).

Abbildung 17 stellt die Hemmkurven für die Bariumsulfat- und Carbon Black-Partikel dar. Bariumsulfat zeigte von allen Partikeln den deutlich höchsten  $IC_{50}$ -Wert (456 µg/cm<sup>2</sup>) und war somit von allen Partikeln und Fasern die für NR8383 Zellen am wenigsten toxische Substanz. Verglichen mit den anderen Partikeln zeigte Carbon Black eine mittlere Toxizität mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 55 µg/cm<sup>2</sup>.



**Abbildung 17:** Relative Änderung der Zellzahl zum Zeitpunkt 40 Stunden (= Zellindex zum Zeitpunkt 40 Stunden) in Abhängigkeit von der logarithmischen Dosis (g/cm<sup>2</sup>) des eingesetzten Bariumsulfats bzw. Carbon Blacks.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betrugen 456 µg/cm<sup>2</sup> (BaSO<sub>4</sub>) bzw. 55 µg/cm<sup>2</sup> (Carbon Black).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass mit dieser Methode für alle Partikel eine Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes möglich war. Am toxischsten wirkten feines  $SiO_2$  ( $IC_{50} = 5 \ \mu g/cm^2$ ) und feines Rutil ( $IC_{50} = 5 \ \mu g/cm^2$ ), gefolgt von grobem Rutil ( $IC_{50} = 18 \ \mu g/cm^2$ ), Carbon Black ( $IC_{50} = 55 \ \mu g/cm^2$ ) und grobem Quarz ( $IC_{50} = 81 \ \mu g/cm^2$ ). Am wenigsten toxisch wirkten feines Anatas ( $IC_{50}$ -Wert = 196  $\mu g/cm^2$ ), grobes Anatas ( $IC_{50} = 255 \ \mu g/cm^2$ ) und Bariumsulfat ( $IC_{50} = 456 \ \mu g/cm^2$ ) auf NR8383 Zellen. Dennoch traten bei allen Messungen mehr oder weniger große Schwankungen auf. Die Messpunkte zeigten im Falle von Bariumsulfat oder feinem SiO<sub>2</sub> nur geringe Standardabweichungen, bei anderen Partikeln (v.a. Anatas und grobem Quarz) waren die Schwankungen relativ hoch. Für den Migrationsassay wurden auf der Basis dieser Ergebnisse zunächst als zu testende Dosierungen 32, 64 und 96  $\mu g/cm^2$  ausgewählt.

#### 5.1.3 Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit dHL-60 Zellen

Diese im Folgenden dargestellte erste Variante des Chemotaxisassays ist die ursprünglich für diese Arbeit geplante Abbildung der neutrophilen Entzündung in der Lunge nach einer Partikelexposition.

Die entwickelte Methode war in der Lage, die inflammatorischen Wirkungen von Partikeln reproduzierbar mit nur geringen Standardabweichungen abzubilden. Hierbei zeigten sich nicht nur Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen, sondern auch signifikante dosisabhängige Effekte.

Die Exposition von 3x10<sup>6</sup> NR8383 Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Partikeln in Dosierungen von bis zu 96 µg/cm<sup>2</sup> führte zu Überständen, die in diesem Modell eine dosisabhängige Migration von dHL-60 Zellen herbeiführen konnten.

Abbildung 18 stellt zunächst den Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen auf das Migrationsverhalten von  $2x10^5$  dHL-60 Zellen dar. Für die vergleichende Darstellung mit SiO<sub>2</sub> wurden die FCS-Anteile von prozentualer (%) Konzentration in die Masse pro Volumen ( $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) umgerechnet (0 %, 2 %, 5 % und 10 % bzw. 0, 320, 800 und 1600  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>).



**Abbildung 18:** Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach Stimulation durch Medium mit unterschiedlichem FCS-Gehalt (0 %, 2 %, 5 % und 10 % bzw. 0, 320, 800 und 1600  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>).  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: p < 0,01.

Der Einfluss von FCS war stabil und gut reproduzierbar, allerdings lag er deutlich unter den nachfolgend vorgestellten Partikeleffekten. Daher wurde in den Folgeexperimenten feines  $SiO_2$  (32, 64 und 96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) als Positivkontrolle etabliert, welches ebenfalls eine hohe Reproduzierbarkeit und kleine Standardabweichungen aufwies (Abbildung 19).

In Abbildung 19 ist der Einfluss der verschiedenen SiO<sub>2</sub>-Partikel auf die Migration von dHL-60 Zellen dargestellt. Bei beiden Partikelarten konnte mittels ANOVA ein signifikanter dosisabhängiger Effekt nachgewiesen werden (p < 0,001). Während die Anzahl der migrierten Zellen in den Dosierungen 32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> und 64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> annähernd übereinstimmte, lag im Falle des groben Quarz vor allem in der höchsten Dosis eine deutliche und statistisch signifikante Verstärkung inflammatorischer Effekte vor.
Wenn man berücksichtigt, dass insgesamt 2x10<sup>5</sup> dHL-60 Zellen ins Insert eingesät wurden, wanderten an dieser Stelle etwa 50 % aller Zellen in Richtung des chemotaktischen Signals.

Insgesamt betrachtet wiesen sowohl das feine SiO<sub>2</sub> als auch das grobe Quarz in diesem Ansatz eine dosisabhängige und vergleichsweise hohe inflammatorische Wirkung auf.



**Abbildung 19**: Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit feinem SiO<sub>2</sub> (links) und mit grobem Quarz (rechts) inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: feines SiO<sub>2</sub>: p < 0,001; grobes Quarz: p < 0,001.

Im Falle der eingesetzten Titandioxid-Kristallformen (Rutil und Anatas) unterschied sich das Ausmaß der Migration stark je nach Kristallmuster, und nachrangig auch hier nach der Größe der jeweiligen Partikel (Abbildung 20). Beide Rutil-Körnungen lösten eine signifikant dosisabhängige Zellmigration aus (ANOVA: feines Rutil: p < 0,01; grobes Rutil: p < 0,05), wobei das grobe Rutil in allen untersuchten Dosierungen deutlich aktiver war als das feine Rutil. Mit Überständen von mit Rutil inkubierten NR8383 Zellen konnte eine signifikant höhere Zellmigration induzieren werden als mit Überständen von mit Anatas inkubierten Zellen (Abbildung 20 und Abbildung 21).



**Abbildung 20:** Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit feinem (links) und grobem (rechts) Rutil inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: feines Rutil: p < 0,01; grobes Rutil: p < 0,05.

Dieser Größenunterschied zwischen den beiden Körnungen löste im Falle von Anatas keine Unterschiede in der Zellmigration aus (Abbildung 21). Weder das grobe noch das feine Anatas verursachten eine signifikante Zellmigration in Dosierungen bis 96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. Auch hier waren die Effekte robust und mit kleinen Standardabweichungen reproduzierbar.



**Abbildung 21:** Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit grobem (links) und feinem (rechts) Anatas inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns.

Vergleicht man die nanoskaligen Partikel (feines SiO<sub>2</sub> und feines Rutil) miteinander, fällt auf, dass sie sich bezüglich der ausgelösten Chemotaxis in den niedrigeren Dosierungen (32 und

64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) unterscheiden und in der hohen Dosis (96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) darin fast übereinstimmen. Auch die Überstände von mit Carbon Black inkubierten NR8383 Zellen lösten eine ähnlich hohe und statistisch signifikante Zellmigration aus (Abbildung 22). Das mögliche Abflachen der Migration bei 160  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> könnte durch das beginnende Einsetzen toxischer Effekte in dieser Dosis erklärt werden.



**Abbildung 22:** Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit Carbon Black Partikeln inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: p < 0,0001.

Bariumsulfat, welches aufgrund seiner extrem niedrigen Löslichkeit und seiner bekanntermaßen untoxischen Eigenschaften in Studien oft als "Inertpartikel" eingesetzt wird, konnte in dieser Versuchsreihe als adäquate Negativkontrolle eingesetzt werden (Abbildung 23). Die Induktion der Migration war bei allen getesteten Dosierungen (0, 32, 80 und 160  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) ähnlich schwach. In keiner angewendeten Dosierung unterschied sich die Anzahl migrierter Zellen signifikant von der Kontrolle, obwohl die höchste getestete Dosis mit 160  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> höher war als die übliche höchste Dosis (96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>).



**Abbildung 23:** Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit BaSO<sub>4</sub> als Negativkontrolle inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns.

Sortiert man den Einfluss der in diesem Kapitel beschriebenen Partikel auf die Zellmigration absteigend, kommt man zu folgender Reihenfolge: grobes Quarz ( $IC_{50} = 81 \ \mu g/cm^2$ ) löst im Mittel die höchste Zellmigration aus, gefolgt von feinem SiO<sub>2</sub> ( $IC_{50} = 5 \ \mu g/cm^2$ ), Carbon Black ( $IC_{50} = 55 \ \mu g/cm^2$ ) und feinem ( $IC_{50} = 5 \ \mu g/cm^2$ ) und grobem Rutil ( $IC_{50} = 18 \ \mu g/cm^2$ ). Grobes und feines Anatas ( $IC_{50} = 255 \ \mu g/cm^2$  und  $IC_{50} = 196 \ \mu g/cm^2$ ) und BaSO<sub>4</sub> ( $IC_{50} = 446 \ \mu g/cm^2$ ) hatten in diesem Assay nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zellmigration, der in keiner Dosis statistisch signifikant war.

## 5.2 Etablierung eines Chemotaxisassays auf der Basis von NR8383 Alveolarmakrophagen, Charakterisierung beteiligter Zytokine und Chemokine sowie kinetischer Verlauf der Reaktion

### 5.2.1 Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit unbehandelten NR8383 Zellen

Nicht nur die Einwanderung von dHL-60 Zellen (Neutrophilen), sondern auch die Chemotaxis von NR8383 Alveolarmakrophagen als Antwort auf eine Partikelexposition konnte mit dem Assay abgebildet werden. Zur Abgrenzung von den mit Partikeln inkubierten NR8383 Zellen werden diese im Folgenden unbehandelte NR8383 Zellen genannt.

Analog zu PICMA-Variante 1 zeigten sich hier nicht nur Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen, sondern auch signifikante dosisabhängige Effekte, die mit kleinen Standardabweichungen reproduzierbar waren. Diese Testvariante begann ebenfalls mit der Etablierung einer geeigneten Positivkontrolle. In Abbildung 24 ist zunächst der Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen (0 %, 2 %, 5 % und 10 % bzw. 0, 320, 800 und 1600  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) auf das Migrationsverhalten von 2x10<sup>5</sup> unbehandelten NR8383 Zellen dargestellt.

Der Einfluss von FCS auf die Zellmigration war stabil, signifikant und gut reproduzierbar. Wie bei Variante 1 des Migrationsassays lag er allerdings deutlich unter den nachfolgend vorgestellten Partikeleffekten. Daher wurde auch hier feines SiO<sub>2</sub> als Positivkontrolle für die Folgeexperimente etabliert.



**Abbildung 24:** Anzahl migrierter unbehandelter NR8383 Zellen nach Stimulation mit Medium mit unterschiedlichem FCS-Gehalt (0 %, 2 %, 5 % und 10 % bzw. 0, 320, 800 und 1600  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>).  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: p < 0,01.

Die Exposition von 3x10<sup>6</sup> NR8383 Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Partikeln in Dosierungen von bis zu 96 µg/cm<sup>2</sup> führte zu Überständen, die in diesem Modell eine dosisabhängige Migration von unbehandelten NR8383 Zellen herbeiführen konnten. In Abbildung 25 ist der Einfluss der verschiedenen SiO<sub>2</sub>-Partikel auf die Migration von unbehandelten NR8383 Zellen dargestellt.

Der Effekt von grobem Quarz auf die Zellmigration war sehr gut reproduzierbar und lag unter dem des feinen SiO<sub>2</sub>. Verglichen mit der ersten Variante des Assays war das inflammatorische Potenzial des groben Quarzes hier zwar auch deutlich ausgeprägt (signifikante Erhöhung der Migration in allen Dosierungen gegenüber der Kontrolle, ANOVA < 0,001), aber die Anzahl migrierter Zellen war insgesamt geringer.

Der Effekt von feinem SiO<sub>2</sub> auf die Zellmigration war dosisabhängig und ähnlich ausgeprägt wie in der ersten Testvariante. In den höchsten Dosierungen wanderten etwa 30.000 der eingesäten 2x10<sup>5</sup> Zellen in die Richtung des chemotaktischen Signals, während bei den dHL-60 Zellen fast 100.000 Zellen migriert sind.



**Abbildung 25:** Anzahl migrierter unbehandelter NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit SiO<sub>2</sub>-Partikeln inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: feines SiO<sub>2</sub>: p < 0,05; grobes Quarz: p < 0,001.

Die Anzahl der migrierten unbehandelten NR8383 Zellen unterschied sich stark je nach Kristallmuster der eingesetzten Titandioxid-Partikel (Rutil und Anatas), und nachrangig auch hier nach der Partikelgröße (Abbildung 26). Beide Rutil-Körnungen lösten eine signifikant dosisabhängige Zellmigration aus (feines Rutil: p < 0,01; grobes Rutil: p < 0,0001), wobei das feine Rutil in allen untersuchten Dosierungen deutlich aktiver war als die grobe Körnung.



**Abbildung 26:** Anzahl migrierter unbehandelter NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit rutilen TiO<sub>2</sub>-Partikeln inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: feines Rutil: p < 0,01; grobes Rutil: p < 0,0001.

Die Überstände von mit Rutil inkubierten NR8383 Zellen induzierten eine signifikant höhere Zellmigration als die Überstände von mit Anatas inkubierten Zellen (Abbildung 27). Analog zu den Ergebnissen aus PICMA-Variante 1 lösten beide Anatas-Körnungen in keiner Dosierung eine signifikante Zellmigration aus. Ein Unterschied zwischen den Partikelgrößen ließ sich nicht ableiten.



**Abbildung 27:** Anzahl migrierter unbehandelter NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit grobem und feinem Anatas inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns.

Bariumsulfat eignete sich auch in dieser Variante des PICMA als Negativkontrolle (Abbildung 28). Die Induktion der Migration war bei allen getesteten Dosierungen (0, 32, 64 und 96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) ähnlich schwach und überstieg die Kontrolle zwar in geringem Ausmaß, aber nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 28:** Anzahl migrierter unbehandelter NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit BaSO<sub>4</sub> als Negativkontrolle inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns.

Sortiert man den Einfluss auf die Zellmigration absteigend, erhält man folgende Reihenfolge: Feines SiO<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> = 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) löste die stärkste Migration von unbehandelten NR8383 Zellen aus, gefolgt von feinem Rutil (IC<sub>50</sub> = 5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), grobem Rutil (IC<sub>50</sub> = 18  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und grobem Quarz (IC<sub>50</sub> = 81  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>). Grobes und feines Anatas (IC<sub>50</sub> = 255  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> und IC<sub>50</sub> = 196  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und BaSO<sub>4</sub> (IC<sub>50</sub> = 446  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), welches als Negativkontrolle eingesetzt wurde, lösten keine signifikante Zellmigration aus. Übereinstimmend mit den berechneten IC<sub>50</sub>-Werten stiegen die Effekte bis zu einer Dosis von 32–64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> in den meisten Fällen stark an und verliefen dann als Zeichen beginnender Toxizität flacher.

Im Gesamtergebnis konnten auch in dieser Variante des PICMA nicht nur Unterschiede zwischen den einzelnen Partikeln, sondern auch signifikante dosisabhängige Effekte abgebildet werden. Die Ergebnisse waren mit geringen Standardabweichungen gut reproduzierbar und stimmten zum größten Teil mit den Beobachtungen aus der PICMA-Variante 1 überein: Bariumsulfat und grobes und feines Anatas zeigten auch hier kein inflammatorisches Potenzial, während das "Ranking" hier im Einzelfall umgekehrt ausfällt (feines SiO<sub>2</sub> und grobes Quarz).

### 5.2.2 Regulation der Transkription von Zytokinen und Chemokinen

Nach der Inkubation von NR8383 Alveolarmakrophagen mit Partikeln enthielt der Überstand nachweisbar einen komplexen Mix aus pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Sieben dieser Schlüsselproteine wurden in einem ersten Schritt in sogenannten qPCR-Arrays aus 84 Zytokinen identifiziert und in einem zweiten Schritt quantifiziert (vgl. Methodenkapitel "Quantitative Real-Time PCR").

### 5.2.2.1 Screening für Zytokine und Chemokine (Arrays)

Im qPCR Array wurde zunächst die Regulation der Transkription von 84 pro- und antiinflammatorischen Schlüsselproteinen im Anschluss an eine Partikelexposition untersucht. Ein Heat Map mit den erhaltenen "Fold Changes" ist in Abbildung 29 dargestellt. Ein Fold Change > 2 wurde dabei als Veränderung der Transkription eingestuft. Der Abbildung kann entnommen werden, dass Bariumsulfat, das in einer Dosierung von 32 µg/cm<sup>2</sup> im PICMA keine signifikante Einwanderung von dHL-60 und NR8383 Zellen auslöste, bis auf wenige Ausnahmen keinen Anstieg der RNA-Transkription verursachte. Grobes Quarz und feines SiO<sub>2</sub> hingegen induzierten einen deutlichen Anstieg der Transkription diverser inflammatorischer Signalmoleküle. Auf Basis dieser Daten wurden sieben Chemokine und Zytokine ausgewählt, die im Array einen deutlichen Fold Change aufwiesen (d.h. nach der 16-stündigen Inkubation von 3x10<sup>6</sup> NR8383 Zellen mit Partikeln waren ihre RNA-Transkripte um ein Vielfaches erhöht). Dazu zählten die folgenden Signalmoleküle: CXCL1, CXCL3, CCL3, CCL4, IL-6, IL-10 und TNFa. Rplp1 konnte aus fünf verschiedenen Housekeeping Genen, die im Array enthalten waren, als geeignetes Housekeeping Gen verifiziert werden, da im Anschluss an eine Partikelexposition der berechnete Fold Change konstant bei 1,0 lag (Abbildung 29). Feines SiO<sub>2</sub> wurde in der Dosis von 96 µg/cm<sup>2</sup> für weitere PCR-Experimente ausgeschlossen. Vermutlich bedingt durch den niedrigen IC<sub>50</sub>-Wert und den damit einhergehenden hohen toxischen Effekten in diesem Dosisbereich lag bei fast jedem Signalmolekül eine Vermehrung von RNA-Transkripten um das bis zu 100-fache vor (Abbildung 29). Streng genommen konnte keine Auswertung dieser Probe stattfinden, weil keines der im Array enthaltenen Housekeeping-Gene in dieser Dosis konstant exprimiert wurde. Daher wurden folgende Proben für die Quantifizierung in Einzelassays ausgewählt:

Probe	Effekt auf die Migration von unbehandelten NR8383 Zellen		
Kontrolle	keiner (Mittelwert: 12179 migrierte NR8383 Zellen)		
BaSO₄ (32 μg/cm²)	keiner (Mittelwert: 11134 migrierte NR8383 Zellen)		
grobes Quarz (64 µg/cm <sup>2</sup> )	mittel (Mittelwert: 25923 migrierte NR8383 Zellen)		
feines SiO <sub>2</sub> (16µg/cm <sup>2</sup> )	hoch (Mittelwert: 37531 migrierte NR8383 Zellen)		

**Tabelle 24:** Auf Basis der Ergebnisse aus dem Array ausgewählte repräsentative Proben.

	BaSO₄ (32 μg/cm²)	grobes SiO₂ (64 µg/cm²)	feines SiO <sub>2</sub> (16 μg/cm²)	feines SiO2 (96 µg/cm²)		BaSO₄ (32 µg/cm²)	grobes SiO₂ (64 µg/cm²)	feines SiO₂ (16 μg/cm²)	feines SiO₂ (96 µg/cm²)		
Adipoq	1,1	1,1	2,1	6,3	ll17a	1,1	1,1	2,1	6,3		0
Bmp2	1,1	1,1	2,1	6,3	ll17f	4,7	9,6	0,9	21,2		1
Bmp4	1,1	1,1	2,1	6,3	II18	0,8	0,8	0,5	0,7		2
Bmp6	1,1	1,2	1,6	6,1	ll1a	0,8	0,9	0,5	3,9		3
Bmp7	1,1	1,1	2,1	6,3	ll1b	1,9	1,9	0,7	9,6		4
C5	1,1	1,1	2,1	6,3	ll1rn	2,7	5,6	7,3	12,5		5
Ccl 1	1,2	1,3	2,1	7,7	112	1,1	1,1	2,1	6,3		6
Ccl11	1,1	1,1	2,1	6,3	II21	1,1	1,1	2,1	6,3		7
Ccl12	0,6	0,5	0,7	3,0	1122	1,1	1,1	2,1	6,3		8
Ccl17	2,2	0,9	0,3	1,8	II23a	1,2	1,2	0,6	1,9		9
Ccl19	1,1	1,1	2,1	6,3	1124	3,3	1,7	2,1	18,5		10
Ccl2	1,4	1,0	1,5	27,8	1127	1,8	1,4	0,6	2,3		50
Ccl20	1,1	1,1	2,1	9,5	113	1,1	1,5	2,1	7,4		100
Ccl21	1,1	1,1	2,1	6,3	114	1,1	1,1	2,1	6,3		
Ccl22	0,9	4,0	0,3	2,5	115	1,1	1,1	2,1	6,3		
Ccl24	1,1	1,1	2,1	6,3	116	2,2	5,1	5,6	141,2		
Ccl3	2,8	5,2	3,1	16,2	117	0,8	0,9	0,5	1,3		
Ccl4	5,2	8,3	23,8	84,4	119	1,1	1,1	2,1	6,3		
Ccl5	2,6	1,6	0,5	8,9	Lif	2,6	4,0	9,9	25,1		
Ccl7	0,9	1,0	0,2	12,1	Lta	1,5	1,6	2,1	6,3		
Cd40lg	1,5	1,1	2,1	6,3	Ltb	1,5	1,4	0,7	1,7		
Cd70	2,7	5,3	5,5	9,1	Mif	1,7	1,3	0,9	1,8		
Cntf	0,6	0,8	1,1	2,3	Mstn	1,1	1,1	2,1	6,3		
Csf1	1,1	1,5	2,1	9,7	Nodal	1,0	0,4	0,7	1,4		
Csf2	1,0	1,9	3,0	32,9	Osm	1,9	3,4	5,7	17,3		
Csf3	1,1	1,8	2,1	41,3	Pf4	5,0	2,3	3,0	6,3		
Ctf1	0,9	0,8	0,3	1,3	Ppbp	1,9	1,5	2,1	6,3		
Cx3cl1	1,1	1,1	2,1	6,3	Spp1	1,7	3,1	7,2	9,5		
Cxcl1	5,5	4,5	4,1	90,6	Tgfb2	1,1	1,1	2,1	8,2		
Cxcl10	0,8	0,7	0,1	3,0	Thpo	1,2	1,1	0,3	1,3		
Cxcl11	1,1	0,5	0,2	1,8	Tnfα	0,8	3,1	7,2	33,3		
Cxcl12	1,1	1,1	2,1	6,3	Tnfrsf11b	1,1	1,1	2,1	6,3		
Cxcl13	0,7	0,8	1,2	6,2	Tnfsf10	0,3	0,2	0,1	0,3		
Cxcl16	1,7	1,5	1,2	2,0	Tnfsf11	1,1	1,1	2,1	6,3		
Cxcl3	4,5	5,1	7,4	95,6	Vegfa	0,6	1,6	0,9	4,0		
Cxcl9	0,9	0,4	0,7	1,4	Xcl1	1,1	1,1	2,1	6,3		
Faslg	0,8	1,0	5,0	9,2	Actb	1,2	1,1	0,8	1,5		
Gdf15	4,8	8,2	15,7	27,5	B2m	1,6	1,3	0,8	1,6		
Gpi	1,2	1,1	0,5	1,6	Hprt1	1,3	1,4	0,3	1,6		
lfna2	1,1	1,1	2,4	6,6	Ldha	1,3	1,3	0,8	1,8		
Ifng	1,1	1,1	2,1	6,3	Rplp1	1,0	1,0	1,0	1,0		
II 10	4,1	12,2	1,6	44,2	RGDC	1,1	1,1	2,1	6,3		
II11	1,1	1,1	2,1	6,3	RTC	1,0	1,0	0,6	5,8		
ll12a	1,1	1,1	2,1	6,3	RTC	1,0	1,1	0,6	5,9		
ll12b	1,1	1,1	2,1	6,3	RTC	1,1	1,1	0,6	5,9		
II13	1,1	1,1	2,1	6,3	PPC	1,4	1,2	0,5	6,2		
II 15	0,9	0,7	0,5	0,7	PPC	1,4	1,2	0,5	6,1		
II16	0,4	0,2	0,3	0,5	PPC	1,6	1,2	0,4	6,4		

**Abbildung 29:** "Fold Change" von 84 proinflammatorischen Schlüsselproteinen nach der 16stündigen Inkubation von  $3x10^6$  NR8383 Zellen mit BaSO<sub>4</sub> (32 µg/cm<sup>2</sup>), grobem Quarz (64 µg/cm<sup>2</sup>), feinem SiO<sub>2</sub> (16 µg/cm<sup>2</sup>) und feinem SiO<sub>2</sub> (96 µg/cm<sup>2</sup>).

# 5.2.2.2 Partikel: Quantifizierung der Transkripte von Zytokinen und Chemokinen (Primer Assays)

Die in Tabelle 24 genannten, repräsentativ ausgewählten Proben wurden in einzelnen qPCR Assays bezüglich einer Veränderung der Transkription von sieben Chemokinen und Zytokinen untersucht (CXCL1, CXCL3, CCL3, CCL4, IL-6, IL-10 und TNFα). Im Folgenden sind die Ergebnisse aufgeschlüsselt nach Chemokinen (Abbildung 31A) und Zytokinen (Abbildung 31B) dargestellt. Um die Ergebnisse besser mit den Effekten im Migrationsassay verknüpfen zu können, sind die PICMA-Ergebnisse für die drei repräsentativ ausgewählten Partikel in Abbildung 30 noch einmal zusammengefasst. Es wurden Proben ausgewählt, die eine signifikante Erhöhung der Zellmigration gegenüber der Kontrolle aufwiesen und sich auch voneinander signifikant unterschieden.



**Abbildung 30:** Anzahl migrierter unbehandelter NR8383 Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit verschiedenen Partikeln, die repräsentativ für die kinetischen Untersuchungen ausgewählt wurden. Getestete Dosierungen: BaSO<sub>4</sub> (32 µg/cm<sup>2</sup>), grobes Quarz (64 µg/cm<sup>2</sup>), feines SiO<sub>2</sub> (16 µg/cm<sup>2</sup>).  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: p < 0,001. Der Unterschied zwischen BaSO<sub>4</sub> und grobem Quarz, als auch der zwischen grobem Quarz und feinem SiO<sub>2</sub> war statistisch signifikant (# = p < 0,05).

In allen Proben von Überständen der exponierten NR8383 Zellen, mit denen unbehandelte NR8383 Zellen angelockt werden konnten, waren die RNA-Transkripte der betrachteten Chemokine deutlich erhöht (Abbildung 31A). Der Fold Change (x-fache Erhöhung verglichen mit der Kontrolle) liegt im Fall von hohen migrierten Zellzahlen bei den Chemokinen CXCL1,

CXCL3 und CCL2 bei einer etwa fünffachen bis zehnfachen Erhöhung, bei CCL4 bei einer sogar etwa 40-fachen Erhöhung. Ein Fold Change von mindestens 2 (gestrichelte Linie) wurde als Veränderung der Transkription bewertet. Bei einer geringeren Anzahl migrierter Zellen (wie etwa nach der Inkubation mit grobem Quarz) wurde ein Anstieg des Fold Change um das drei- bis zehnfache nachgewiesen, während die Exposition mit der Negativkontrolle Bariumsulfat, welches auch im PICMA keine Chemotaxis von unbehandelten NR8383 und dHL-60 Zellen auslöste, keine signifikante Veränderung der Transkription von CXCL1, CXCL3, CCL3 und CCL4 festzustellen war.

In allen Proben von Überständen der exponierten NR8383 Zellen, mit denen unbehandelte NR8383 Zellen angelockt werden konnten, waren die RNA-Transkripte der betrachteten Zytokine deutlich erhöht (Abbildung 31B). Eine Exposition mit Bariumsulfatpartikeln als Negativkontrolle verursachte im Einklang mit den Ergebnissen aus dem PICMA keine Erhöhung der RNA-Transkripte von IL-6, IL-10 und TNFα.

Das antiinflammatorische IL-10 war nach der Exposition der NR8383 Zellen mit grobem Quarz und feinem SiO<sub>2</sub> deutlich erhöht (grobes Quarz > feines SiO<sub>2</sub>). Die Transkripte der proinflammatorischen Signalmoleküle IL-6 und TNF $\alpha$  waren ebenfalls nach der Exposition mit grobem Quarz und feinem SiO<sub>2</sub> erhöht (feines SiO<sub>2</sub> > grobes Quarz).



**Abbildung 31:** Partikelart, mit der inkubiert wurde, sowie der gemessene Fold Change im Vergleich zur Kontrolle von Chemokinen (A) und Zytokinen (B). Getestete Dosierungen: Bariumsulfat (32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), grobes Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), feines SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>).  $\overline{x} \pm$  SD aus zwei unabhängigen Versuchen.

# 5.2.3 Chemotaxis sowie Transkription von Zytokinen und Chemokinen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Partikeln

Um kinetische Unterschiede in der Transkription von Zytokinen herauszuarbeiten bzw. die Aussagekraft des Migrationsassays zu einem bestimmten Zeitpunkt zu bestätigen, wurden von den hier repräsentativ eingesetzten Proben zusätzlich gPCR-Messungen und Migrationstests nach einer Expositionsdauer von einer Stunde und vier Stunden durchgeführt. Die folgende Abbildung 32 fasst die Chemotaxis-Ergebnisse dieser kinetischen Untersuchungen zusammen. Die Überstände von mit Bariumsulfat (32 µg/cm<sup>2</sup>) inkubierten Zellen lösten weder nach einer einstündigen, vierstündigen noch nach einer 16-stündigen Inkubationsphase eine signifikante Migration von unbehandelten NR8383 Zellen aus. Im Gegensatz dazu verursachten sowohl grobes Quarz (64 µg/cm<sup>2</sup>) als auch feines SiO<sub>2</sub> (16 µg/cm<sup>2</sup>) eine signifikante Migration von unbehandelten NR8383 Zellen (16 h). Exponierte man die Alveolarmakrophagen für nur vier Stunden mit Quarz und feinem SiO<sub>2</sub>, konnte auch mit diesen Überständen eine signifikante Zellmigration verursacht werden. Nach einer einstündigen Inkubation konnte keine signifikante Migration festgestellt werden, unabhängig davon, mit welchem Partikel exponiert worden war. Offenbar wird die inflammatorische Anwort toxikokinetisch beeinflusst: Auffällig ist, dass die inflammatorische Antwort auf grobes Quarz bereits nach 4 Stunden etwas höher ist als nach 16 Stunden.



Kinetik - Migrationsassay

**Abbildung 32:** Migration von unbehandelten NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit verschiedenen Partikeln inkubiert wurden. Getestete Dosierungen: BaSO<sub>4</sub> (32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>); grobes Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>); feines SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>).  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 33:** Fold Change der RNA-Expression von Zytokinen und Chemokinen in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit Partikeln. Getestete Dosierungen: BaSO<sub>4</sub> (32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>); grobes Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>); feines SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>).  $\overline{x} \pm$  SD aus zwei unabhängigen Versuchen.

Somit ließ sich eine eindeutige toxikokinetische Abhängigkeit des Migrationsassays belegen. Die Regulation der Transkription der in die Untersuchung eingeschlossenen Zytokine und Chemokine entsprach den Ergebnissen des PICMA weitestgehend (Abbildung 33). Auch hier wurde eine Verdopplung des Fold Change (gestrichelte Linie) als Veränderung der Transkription bewertet. Nach einer Stunde Inkubationsdauer erreichte keines der gemessenen Zytokine einen signifikanten Fold Change von > 2 (Abbildung 33 A–E). In mit Bariumsulfat ( $32 \mu g/cm^2$ ) inkubierten NR8383 Zellen wurde weder nach einer einstündigen, vierstündigen, noch nach einer 16-stündigen Inkubationsphase eine signifikante Transkription von CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL3 und TNF $\alpha$  nachgewiesen. Die Ergebnisse stimmen überein mit den Daten aus dem Chemotaxisassay, in welchem Bariumsulfat keine Migration von dHL-60 Zellen und unbehandelten NR8383 Zellen auslöste (vgl. Abbildung 32).

Die RNA-Transkripte von CCL4 (Abbildung 33B), CXCL3 (Abbildung 33D) und TNF $\alpha$  (Abbildung 33E) waren, analog zu den Ergebnissen aus dem Migrationsassay (Abbildung 32), nach Inkubation mit grobem Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) bereits nach einer vierstündigen Expositionsphase signifikant erhöht. Im Falle von CXCL1 und CXCL3 war diese Erhöhung zwar auch vorhanden, aber aufgrund höherer Standardabweichungen nicht statistisch signifikant. Auch nach einer vierstündigen Inkubationsphase mit feinem SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) war ein Fold-Change von ca. 5 der RNA-Transkripte aller Signalmoleküle nachweisbar. Dieser war signifikant für CCL3 (Abbildung 33A).

Nach der 16-stündigen Inkubationsphase mit grobem Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und feinem SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) waren die RNA-Transkripte der Zytokine und Chemokine immer noch deutlich und in den meisten Fällen (CCL3, CCL4, CXCL3 und TNF $\alpha$ ) auch signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Auffällig war, dass nach der vierstündigen Inkubation mit grobem Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) analog zu den Ergebnissen aus dem Migrationsassay (Abbildung 32) der berechnete Fold Change genauso hoch (CCL4, CXCL1) oder sogar höher (CCL3, CXCL3, TNF $\alpha$ ) lag als nach der 16-stündigen Inkubationsphase.

Ebenfalls analog zu den Ergebnissen aus dem PICMA verhielten sich die mit feinem SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) inkubierten Proben genau umgekehrt: Im Migrationsassay lösten die Überstände von NR8383 Zellen, die 16 Stunden mit feinem SiO<sub>2</sub> inkubiert wurden, eine höhere Zellmigration aus als Überstände von Zellen, die nur 4 Stunden inkubiert wurden (Abbildung 32). Im Einklang mit diesen Daten lagen die Fold Changes der hier untersuchten Signalmoleküle nach einer 16-stündigen Inkubation deutlich höher (CCL4, CXCL1, CXCL3, TNF $\alpha$ ) oder ähnlich hoch (CCL3), verlichen mit den Fold Changes nach einer vierstündigen Inkubation.

### 5.3 Etablierung eines Chemotaxisassays auf der Basis von THP-1 Zellen und dHL-60 Zellen

### 5.3.1 Inkubation der THP-1 Zellen und A549 Zellen mit SiO<sub>2</sub> und rutilem TiO<sub>2</sub>

In einer dritten Variante des PICMA wurde versucht, den Assay nur auf der Basis von humanen Zelllinien zu etablieren (vgl. Kapitel "THP-1 Zellen"). Anstelle von NR8383 Alveolarmakrophagen wurden mittels TPA differenzierte THP-1 Zellen bzw. A549 Zellen mit Partikeln inkubiert und ihre Überstände benutzt, um wie in der Variante 1 des PICMA dHL-60 Zellen anzulocken.

Diese Variante wurde mit vier der zur Verfügung stehenden Partikeln getestet. Die Phagozytoseleistung der THP-1 Zellen war, lichtmikroskopisch betrachtet, sehr niedrig. In keiner Zelle waren nennenswerte Ansammlungen von Partikeln lichtmikroskopisch zu erkennen (Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Ausdifferenzierte THP-1 Zellen nach der 16-stündigen Inkubation mit grobem Rutil (96 µg/cm<sup>2</sup>). Nicht vitale Zellen wurden mit Trypanblau angefärbt. Wie auch bei den NR8383 Zellen (Abbildung 12) wurden freie Partikel durch einen Waschschritt entfernt. Eine nennenswerte Phagozytose der Partikel durch THP-1 Zellen konnte bei keiner der Zellen beobachtet werden (exemplarischer Bildausschnitt).

### 5.3.2 Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit THP-1 Zellen

Inkubierte man  $3x10^{6}$  THP-1 Zellen anstelle von NR8383 Zellen mit grobem Quarz und feinem SiO<sub>2</sub> (0, 32, 64 und 96 µg/cm<sup>2</sup>) konnte mit den Überständen unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen keine Chemotaxis von dHL-60 Zellen ausgelöst werden (Abbildung 35). In keiner der eingesetzten Dosierungen wurde eine nennenswerte oder statistisch signifikante Migration von dHL-60 Zellen beobachtet.



**Abbildung 35:** Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach der Stimulation mit Überständen von THP-1 Zellen, die mit SiO<sub>2</sub> verschiedener Dosierungen inkubiert wurden (linke Seite). Dazu im Vergleich die Anzahl eingewanderter dHL-60 Zellen nach der Inkubation von NR8383 Zellen (rechte Seite).  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Nach der Inkubation von THP-1 Zellen bestand keine signifikante Erhöhung der Zellzahl in Bezug auf die Kontrolle. ANOVA: ns.

Ähnliche Ergebnisse ließen sich mit den verschiedenen Rutil-Körnungen erzielen: Wurden THP-1 Zellen mit Rutil in den Dosierungen 32, 64 und 96 μg/cm<sup>2</sup> inkubiert, lösten die Überstände keine signifikante Migration von dHL-60 Zellen aus (Abbildung 36). In vereinzelten Versuchen wurde eine geringe Migration gemessen, die jedoch zu keinem Messzeitpunkt signifikant war.



**Abbildung 36:** Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach der Stimulation mit den Überständen von THP-1 Zellen, die mit grobem und feinem Rutil verschiedener Dosierungen inkubiert wurden (linke Seite). Dazu im Vergleich die Anzahl eingewanderter dHL-60 Zellen nach der Inkubation von NR8383 Zellen (rechte Seite).  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Nach der Inkubation von THP-1 Zellen bestand keine signifikante Erhöhung der Zellzahl in Bezug auf die Kontrolle. ANOVA: ns.

### 5.3.3 Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit A549 Zellen

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob unter ansonsten identischen Bedingungen die Inkubation von A549 Zellen (als Modell für humane Epithelzellen) mit Partikeln eine Migration von Entzündungszellen auslösen kann. Die Überstände von mit Rutil und feinem SiO<sub>2</sub> (32, 64 und 96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) inkubierten A549 Zellen konnten in diesem Modell ebenfalls keine Migration von dHL-60 Zellen auslösen (Daten nicht gezeigt).

### 5.4 Anwendung der Chemotaxisassays auf synthetisierte Bariumsulfat-Partikel, Charakterisierung der Partikelaufnahme und -toxizität

### 5.4.1 Charakterisierung der Partikel

### 5.4.1.1 Identität und Kristallinität

Mithilfe der aufgenommenen PXRD-Spektren wurde unter Zuhilfenahme von Referenzspektren die Identität aller eingesetzten Partikel bestätigt. Alle Partikel lagen nachweisbar in kristalliner Form vor (Tabelle 25). Die aufgenommenen Spektren befinden sich im Anhang (Abbildung 68A-C).

 Tabelle 25: Ergebnisse der PXRD-Messungen der Bariumsulfat-Partikel.

Partikel	Kristallinität
BaSO₄-CMC-Aminofluorescein (nano)	kristallin
BaSO <sub>4</sub> -CMC-Aminofluorescein (submikro)	kristallin
BaSO <sub>4</sub> -CMC-Aminofluorescein (mikro)	kristallin

### 5.4.1.2 Primärpartikelgröße, Morphologie und spezifische Oberfläche

Die Morphologie der synthetisierten Bariumsulfat-CMC-Partikel war deutlich weniger heterogen als diejenige der kommerziell erworbenen Partikel (Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) nanoskaligem, (B) submikroskaligem und (C) mikroskaligem Bariumsulfat-CMC.

Eine bestimmte Partikelgröße (z.B. 1000 nm) wurde durch eine entsprechend längere Reaktionszeit bei der Herstellung erzielt, und diese längere Reaktionszeit bedingte wiederum, dass die Partikel sphärischer waren. Deswegen war die Morphologie der mikroskaligen Bariumsulfat-Partikel (Abbildung 37C) annähernd kugelförmig, während die kleineren Partikel (Abbildung 37A und Abbildung 37B) eher ovaler bzw. kornförmiger Gestalt waren. Rein optisch betrachtet war die Größenverteilung eher schmal. Die spezifischen Oberflächen aller Partikel wurden aus der Partikelanzahl berechnet (Tabelle 26).

Partikel	Partikelgröße [nm]	Partikelzahl pro 1g	Spezifische Oberfläche [m²/g]
Bariumsulfat-CMC (nano)	40	3,9*10 <sup>15</sup>	25,3
Bariumsulfat-CMC (submikro)	270	2,2*10 <sup>13</sup>	4,8
Bariumsulfat-CMC (mikro)	1300	1,3*10 <sup>11</sup>	0,8

**Tabelle 26:** Zusammenfassung der rasterelektronenmikroskopischen Charakterisierung der selbst synthetisierten BaSO<sub>4</sub>-Partikel.

Erwartungsgemäß lag der Partikeldurchmesser der Bariumsulfat-Partikel, der mit dem REM bestimmt wurde, etwas unter den nachfolgend vorgestellten, mit der DLS ermittelten Partikeldurchmessern. In der dynamischen Lichtstreuung wird im Gegensatz zum REM die elektrische Dipolschicht auf den suspendierten Partikeln mit erfasst (hydrodynamischer Durchmesser).

### 5.4.1.3 Hydrodynamischer Durchmesser und Sedimentation

Die Oberflächen der synthetisch gewonnenen Bariumsulfat-Partikel enthielten Carboxymethylcellulose (CMC) als Polymer, welches eine Stabilisierung der Primärpartikel im Kulturmedium erzielte. Anders als bei den kommerziell erworbenen Partikeln, die innerhalb von wenigen Minuten auf den Küvettenboden sedimentierten (vgl. Kapitel 5.1.1.4), wurde daher von einer stabileren Suspension ausgegangen und daher erfolgten die DLS-Messungen über mehrere Stunden. Aus diesem Grund ist bei den folgenden Abbildungen (Abbildung 38A-C) der hydrodynamische Partikeldurchmesser gegen die Zeit aufgetragen. Während bei den nano- und submikroskaligen Partikeln ein konstanter Partikeldurchmesser gemessen wurde (Abbildung 38A-B), nahm bei den mikroskaligen BaSO<sub>4</sub>-Partikeln die gemessene Partikelgröße infolge von Sedimentationseffekten im Laufe von zwei Stunden deutlich ab. Dies war auch optisch sichtbar: Nach 24 Stunden waren alle Partikel auf den Gefäßboden sedimentiert (Abbildung 38C).



**Abbildung 38:** Darstellung des Partikeldurchmessers im zeitlichen Verlauf (A) nanoskaliges, (B) submikroskaliges, (C) mikroskaliges Bariumsulfat.

Im Ergebnis konnte auf diesem Wege eine monodisperse Größenverteilung (PDI < 0,3) in Wasser und in Kulturmedium erzielt werden (Tabelle 27).

**Tabelle 27:** Zusammenfassungen der hydrodynamischen Partikeldurchmesser der selbst synthetisierten BaSO<sub>4</sub>-Partikel abhängig vom jeweiligen Suspensionsmedium. PDI = Polydispersitätsindex.

Partikel	Durchmesser ± SD [nm]	PDI
Bariumsulfat-CMC (nano)	70 ± 15	0,253
Bariumsulfat-CMC (submikro)	420 ± 196	0,181
Bariumsulfat-CMC (mikro)	1480 ± 260	0,079

Der PDI lag bei allen Messungen im optimalen Bereich (< 0,3). Aus den Stabilitätsuntersuchungen über mehrere Stunden (Abbildung 38) geht allerdings hervor, dass die Suspension aus Mikropartikeln bereits nach einer Stunde nicht mehr stabil war, da die Partikel auf den Gefäßboden sedimentierten.

### 5.4.1.4 Zetapotenzial

Das Zetapotenzial von allen Bariumsulfat-Partikeln ist in Tabelle 28 zusammengefasst. Bei allen Partikeln lag eine negative Ladung vor und die Unterschiede waren recht gering.

Partikel	Zetapotenzial ± SD [mV]
Bariumsulfat-CMC (nano)	-23 ± 3
Bariumsulfat-CMC (submikro)	-26 ± 6
Bariumsulfat-CMC (mikro)	-35 ± 6

**Tabelle 28:** Zetapotenzial aller getesteten Bariumsulfat-Partikel.

### 5.4.2 Lokalisation innerhalb der NR8383 Zellen und Phagozytoseleistung

Durch eine Zellorganellfärbung der Lysosomen und des Zellkerns wurde nachgewiesen, dass die phagozytierten Partikel sich in Lysosomen befanden (Abbildung 40 bis Abbildung 42). Vor den Aufnahmen wurden die NR8383 Zellen mit einer Konzentration von jeweils 50 µg/ml der jeweiligen Partikelart inkubiert. Für die Abbildungen wurden repräsentative Bereiche aus der adhärenten Zellpopulation ausgewählt. Die Aufnahmen erfolgten bei 50-facher Vergrößerung. In Abbildung 39A bis Abbildung 42A ist jeweils die Zellpopulation der NR8383 Zellen im Hellfeld zu sehen. Zusätzlich sind die blau angefärbten Zellkerne erkennbar. In Abbildung 39B bis Abbildung 42B sind die Lysosomen dargestellt. Aufgrund der Anfärbung erscheinen sie in roter Farbe. Abbildung 39C bis Abbildung 42C wurden im Fluoreszenz-Kanal des konfokalen Laserscanning-Mikroskops aufgenommen. Bei der Aufnahme der Kontrolle erscheint dieses Bild schwarz, da die Zellen keine Partikel phagozytiert haben (Abbildung 39C).



**Abbildung 39:** Lasermikroskopische Abbildungen von NR8383 Alveolarmakrophagen, die 16 Stunden ohne Bariumsulfat-Partikel (Kontrolle) inkubiert waren. A: Hellfeld mit angefärbten Zellkernen (blau) B: angefärbten Lysosomen (rot), C: Eigenfluoreszenz der Partikel (grün).



**Abbildung 40:** Lasermikroskopische Abbildungen von NR8383 Zellen, die 16 Stunden mit nanoskaligem Bariumsulfat-CMC (50 µg/ml) inkubiert waren. A: Hellfeld mit angefärbten Zellkernen (blau) B: angefärbten Lysosomen (rot), C: Eigenfluoreszenz der Partikel (grün).



**Abbildung 41:** Lasermikroskopische Abbildungen von NR8383 Zellen, die 16 Stunden mit submikroskaligem Bariumsulfat-CMC (50 µg/ml) inkubiert waren. A: Hellfeld mit angefärbten Zellkernen (blau) B: angefärbten Lysosomen (rot), C: Eigenfluoreszenz der Partikel (grün).



**Abbildung 42:** Lasermikroskopische Abbildungen von NR8383 Zellen, die 16 Stunden mit mikroskaligem Bariumsulfat-CMC (50 µg/ml) inkubiert waren. A: Hellfeld mit angefärbten Zellkernen (blau) B: angefärbten Lysosomen (rot), C: Eigenfluoreszenz der Partikel (grün).

Es gibt keinen Anhaltspunkt dafür, dass die Partikel in den Zellkern gelangen. Die phagozytierten Partikel befinden sich offenbar in den Lysosomen.

Anhand von durchflusszytometrischen Analysen konnte darüber hinaus eine Konzentrationsabhängigkeit der Phagozytoseleistung nachgewiesen werden. Die Intensität des Fluoreszenzsignals stieg mit steigender Phagozytose der Bariumsulfat-CMC-Partikel in Abhängigkeit von der Konzentration, mit der die Zellen inkubiert wurden (Abbildung 43).

Während die Fluoreszenzintensität bei der Kontrolle im Mittel  $10^2$  betrug, lag sie bei der höchsten getesteten Konzentration (100 µg/ml) bei >  $10^3$ . Die folgende Abbildung 43 zeigt exemplarisch eine Messung mit mikroskaligem Bariumsulfat-CMC.



**Abbildung 43:** Exemplarische Darstellung einer Messung mit Bariumsulfat-CMC (mikro). Aufgetragen wurde die Zellzahl gegen die Intensität des Fluoreszenzsignals (FITC-Kanal). Die Intensität des Fluoreszenzsignals stieg mit der Dosis an phagozytiertem Bariumsulfat-CMC, mit der die Alveolarmakrophagen zuvor inkubiert wurden. Bei der niedrigsten Konzentration (rot) lag sie etwa im Bereich der Negativkontrolle (orange).

Die folgenden Abbildungen zeigen die Mittelwerte aus jeweils drei Messungen mit nano-(Abbildung 44A), submikro- (Abbildung 44B) und mikroskaligem (Abbildung 44C) Bariumsulfat-CMC. Der adhärente und der suspendierte Anteil der Zellpopulation wurden getrennt voneinander analysiert. In allen Fällen war ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals mit steigender Partikelkonzentration sichtbar (ANOVA < 0,001). Der Anstieg der Fluoreszenzintensität war konzentrationsabhängig und signifikant zur Kontrolle in den höheren Konzentrationen (50 und 100 µg/ml). Beim submikroskaligen und nanoskaligen Bariumsulfat-CMC nahmen die suspendierten Zellen im Mittel weniger Partikel auf als die adhärenten Zellen, der Unterschied zwischen den Fraktionen war allerdings nicht statistisch signifikant. Bei den mikroskaligen Partikeln war die unterschiedliche Aufnahme durch suspendierte und adhärente Zellen innerhalb der Populationen der Alveolarmakrophagen hingegen signifikant (p < 0,001, s. Rauten in Abbildung 44C). Sowohl in der Konzentration 50 µg/ml als auch in der Konzentration 100 µg/ml nahmen die adhärenten Zellfraktionen signifikant mehr Partikel auf als die suspendierten. Dieses Ergebnis stimmte überein mit der Erkenntnis aus der Partikelcharakterisierung, dass die mikroskaligen Bariumsulfatpartikel nicht lange eine stabile Suspension im Medium bildeten, sondern nach ca. zwei Stunden begannen, auf den Gefäßboden abzusinken, wohingegen die submikroskaligen Partikel über viele Stunden stabil suspendiert blieben. Das schnelle Absinken vergrößerte den Kontakt zu den adhärenten Zellen und erklärt die höhere Phagozytose.



**Abbildung 44:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der NR8383 Zellen in % der Kontrolle nach 16-stündiger Inkubation mit Bariumsulfat-Partikeln.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die Rauten in der Abbildung zeigen signifikante Unterschiede zwischen der suspendierten und adhärenten Fraktion gleicher Konzentration an (### p < 0,001). ANOVA: mikro: p < 0,0001, submikro: p < 0,001, nano: p < 0,001.

Während der Anstieg der Fluoreszenz zunächst nur ein Beweis für eine Assoziation von Partikeln und Zelle war, konnte über die Zunahme der Granularität bewiesen werden, dass die Partikel tatsächlich konzentrationsabhängig phagozytiert wurden.

Aus der folgenden Abbildung 45 kann entnommen werden, dass die Intensität des Seitwärtsstreulichts (SSC) mit steigender Konzentration an Bariumsulfat-CMC, mit der die Zellen inkubiert wurden, stieg. Der Effekt war deutlich, wenn auch weniger anschaulich als der Anstieg der Fluoreszenzintensität.

In diesem beispielhaft präsentierten Fall (mikroskaliges Bariumsulfat-CMC) lag die SSC-Intensität von mit 6,25  $\mu$ g/ml Bariumsulfat-CMC inkubierten Alveolarmakrophagen im Bereich der Kontrolle. Bariumsulfat-CMC-Konzentrationen von 12,5 und 25  $\mu$ g/ml verursachten eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurve und bei den höchsten Konzentrationen (50 und 100  $\mu$ g/ml) lag die SSC-Intensität am höchsten.



**Abbildung 45:** Exemplarische Darstellung einer Messung mit Bariumsulfat-CMC (mikro). Aufgetragen wurde die Zellzahl gegen die Intensität des Seitwärtsstreulichts (SSC) als Maß für die Granularität der NR8383 Zellen. Die Granularität der Makrophagen stieg mit der Konzentration an Bariumsulfat, mit der sie zuvor inkubiert wurden. Bei der niedrigsten Konzentration (rot) lag sie etwa im Bereich der Negativkontrolle (orange). Die folgende Abbildung 46 zeigt die Mittelwerte der Zellgranularität aus jeweils drei Messungen nach der Inkubation mit nano- (Abbildung 46A), submikro- (Abbildung 46B) und mikroskaligem (Abbildung 46C) Bariumsulfat-CMC. Dargestellt ist jeweils die mittlere Zellgranularität (% der Kontrolle) der NR8383 Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit den Partikeln. In allen drei Fällen stieg die Granularität mit zunehmender Partikelkonzentration, bei submikroskaligem und mikroskaligem Bariumsulfat war sie statistisch signifikant (ANOVA, p < 0,0001). Besonders bei den hohen Partikelkonzentrationen war die Granularität gegenüber den jeweiligen Kontrollen signifikant erhöht.

Beim nano- und submikroskaligen Bariumsulfat-CMC wurde beobachtet, dass die suspendierten Fraktionen der NR8383 Zellen im Mittel etwas weniger Partikel aufnahmen als die adhärenten Zellen. Der Unterschied zwischen den Fraktionen war allerdings nicht statistisch signifikant (Abbildung 46A und B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Experimenten zur mittleren Fluoreszenzintensität (Abbildung 44C) war die unterschiedliche Aufnahme von mikroskaligen Partikeln durch suspendierte und adhärente Zellen innerhalb der Alveolarmakrophagenpopulation signifikant in einer Konzentration (50 µg/ml) (Abbildung 46C). Dieses Ergebnis stimmt weiterhin überein mit der Erkenntnis aus der Partikelcharakterisierung, dass die mikroskaligen Bariumsulfatpartikel nicht lange eine stabile Suspension im Medium bildeten, sondern nach ca. zwei Stunden begannen, auf den Gefäßboden abzusinken. Dahingehen blieben die submikroskaligen Partikel über viele Stunden stabil suspendiert.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass die Partikel konzentrationsabhängig und statistisch signifikant bis zu einer Partikelkonzentration von 100 µg/ml von den NR8383 Alveolarmakrophagen aufgenommen wurden. Die adhärente Fraktion der Zellpopulation nahm im Falle der nicht lange stabilen Suspension (mikroskaliges Bariumsulfat-CMC) signifikant mehr Partikel auf als die adhärente Fraktion. Es wird daher vermutet, dass dieser Unterschied im Falle der kommerziell erworbenen Partikel noch viel ausgeprägter war, da diese Partikel nur für einige Minuten eine stabile Suspension mit dem Medium bildeten. Daher wurde in den Kapiteln 5.1 und 5.2 die Partikeldosis, mit der inkubiert wurde, nicht als Konzentration (Partikelmasse/ml) angegeben, sondern nachträglich in Partikelmasse/cm<sup>2</sup> Zellkulturoberfläche umgerechnet. Bei den Bariumsulfat-CMC-Partikeln wird allerdings weiterhin die Konzentration in Partikelmasse/ml angegeben, da die Suspensionen über einen längeren Zeitraum stabil blieben. Nur das mikroskalige Bariumsulfat-CMC war von den Sedimentationseffekten betroffen. Das submikro- und nanoskalige Bariumsulfat-CMC wurde offensichtlich gleichermaßen von der adhärenten und der suspendierten Zellfraktion aufgenommen.



**Abbildung 46:** Mittlere Zellgranularität (% der Kontrolle) der NR8383 Zellen nach 16stündiger Inkubation mit verschiedenen Bariumsulfat-CMC-Partikeln.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA A: ns. B und C: p < 0,0001. Die Rauten in der Abbildung zeigen signifikante Unterschiede zwischen der suspendierten und adhärenten Zellfraktion gleicher Konzentration an (# p < 0,05).

### 5.4.3 Toxizität

Im Rahmen der Toxizitätsbestimmung wurde der Anteil nekrotischer Zellen mit dem Farbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD) im PerCP-Kanal des Durchflusszytometers bestimmt. Der Anteil apoptotischer Zellen ergab sich aus der Färbung mit Annexin V (APC) und nachfolgender Subtraktion 7-AAD-positiver Zellen (s. Kapitel *Durchflusszytometrie*).

Aus der folgenden Abbildung 47 (Seite 102) kann entnommen werden, dass der Anteil nekrotischer Zellen (d.h. 7-AAD-positiver Zellen) mit steigender Konzentration an submikround mikroskaligem Bariumsulfat-CMC stieg, nicht aber mit steigender Konzentration an nanoskaligem Bariumsulfat-CMC. Dieser Trend war jedoch nicht statistisch signifikant (ANOVA). Nur im Falle der höchsten Konzentration (200 µg/ml) der eingesetzten mikroskaligen Bariumsulfat-CMC-Partikel war der Anteil nekrotischer Zellen signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 47C).

Die nanoskaligen Bariumsulfat-CMC-Partikel schienen den Anteil der nekrotischen Zellen in der Konzentration 200 µg/ml sogar leicht, aber nicht signifikant zu senken (Abbildung 47A). Möglicherweise könnte hier eine Aktivierung der Zellen als Folge der Inkubation mit den Partikeln eine Rolle spielen. Insgesamt betrachtet verursachte keines der Bariumsulfat-CMC-Partikel in Konzentrationen bis 200 µg/ml eine Nekrose von NR8383 Zellen.

Die nachfolgende Abbildung 48 (Seite 103) stellt den mittleren Anteil apoptotischer Zellen (% der Kontrolle) nach 16-stündiger Inkubation mit verschiedenen Bariumsulfat-CMC-Partikeln dar. Eine Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen mit steigender Konzentration von Bariumsulfat-CMC-Partikeln war nicht nachweisbar.

Im Fall der nanoskaligen Bariumsulfat-CMC-Partikel schien eine Inkubation mit einer Partikelkonzentratin von 200 µg/ml den Anteil der apoptotischen Zellen sogar zu senken (Abbildung 48C). Möglicherweise kam dieser Trend aber durch die Subtraktion der 7-AAD-positiven Zellen zustande, oder die Zellen wurden infolge der Partikelinkubation aktiviert. Insgesamt betrachtet verursachte keines der eingesetzten Bariumsulfat-CMC-Partikel in Konzentrationen bis zu 200 µg/ml eine signifikante Zunahme der Apoptose von NR8383 Zellen.

Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgte die Festlegung der Dosisbereiche für den Migrationsassay. Es wurde entschieden, dass die Konzentration in Höhe von 200  $\mu$ g/ml dort eingeschlossen werden sollte.



**Abbildung 47:** Mittlerer Anteil nekrotischer Zellen (% der Kontrolle) nach 16-stündiger Inkubation mit verschiedenen Bariumsulfat-CMC-Partikeln.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns (A, B und C).



**Abbildung 48:** Mittlerer Anteil apoptotischer Zellen (% der Kontrolle) nach 16-stündiger Inkubation mit verschiedenen Bariumsulfat-CMC-Partikeln.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns (A, B und C).

### 5.4.4 Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA) mit Bariumsulfat

Im PICMA konnte das oft als untoxisch beschriebene Bariumsulfat in keiner eingesetzten Partikelgröße und -konzentration eine signifikante Migration von dHL-60 Zellen und unbehandelten NR8383 Zellen auslösen. Die Ergebnisse sind auf den folgenden Seiten in Abbildung 49 (Seite 105) (dHL-60 Zellen) und Abbildung 50 (Seite 106) (NR8383 Zellen) dargestellt. Die Inkubation von NR8383 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (6,25 bis 200 µg/ml) von Bariumsulfat-CMC-Partikeln führte zu Überständen, die in diesem Modell keine erhöhte Migration von dHL-60 Zellen (Abbildung 49) verursachen konnten. Weder die nanoskaligen (Abbildung 49A), die submikroskaligen (Abbildung 49B), noch die mikroskaligen (Abbildung 49C) Bariumsulfat-CMC-Partikel lösten eine signifikante Änderung der Zellmigration von dHL-60 Zellen gegenüber der Kontrolle aus. Das Ergebnis der ANOVA war nicht signifikant. Die Positivkontrollen (feines SiO<sub>2</sub>: 32, 64 und 96 µg/cm<sup>2</sup>) lagen im Bereich der historischen Werte. Die Inkubation von NR8383 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (6,25 bis 200 µg/ml) von Bariumsulfat-CMC-Partikeln löste ebenfalls keine erhöhte Migration von unbehandelten NR8383 Zellen aus (Abbildung 50). Weder die nanoskaligen (Abbildung 50A), die submikroskaligen (Abbildung 50B), noch die mikroskaligen (Abbildung 50C) Bariumsulfat-CMC-Partikel lösten eine signifikante Anderung der Zellmigration von dHL-60 Zellen gegenüber der Kontrolle aus. Die ANOVA Analyse war auch hier nicht signifikant. Auch bei diesen Messungen lagen die Positivkontrollen (feines  $SiO_2$ : 32, 64 und 96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) im Bereich der historischen Werte.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel erfolgreich nachgewiesen werden, dass das synthetisch hergestellte Bariumsulfat-CMC in allen hergestellten Partikelgrößen signifikant und konzentrationsabhängig durch NR8383 Zellen phagozytiert und in Lysosomen eingeschlossen wurde, und zwar sowohl von der adhärenten als auch von der suspendierten Zellfraktion. Verglichen mit dem kommerziell erworbenen Bariumsulfat, das im Rahmen dieser Arbeit zunächst als Negativkontrolle eingesetzt wurde (s. Kapitel 5.1 und 5.2), bestand auch in diesem Fall eine sehr niedrige Toxizität (keine Nekrose/Apoptose bis zu einer Konzentration von einschließlich 100 bzw. 200 µg/ml nachweisbar). Weiterhin wurde mit den Überständen von mit Bariumsulfat-CMC-Partikeln inkubierten NR8383 Zellen in Konzentrationen bis zu 200 µg/ml keine Migration von dHL-60 Zellen und unbehandelten NR8383 Zellen ausgelöst. Auch die kommerziell erworbenen Bariumsulfat-Partikel verursachten keine signifikante Migration beider Zelltypen. Der Einfluss der primären Partikelgröße konnte im Rahmen dieses Kapitels ohne störende Agglomeratbildung untersucht werden. Weder die Toxizität noch die Migration im PICMA wurde von der Primärpartikelgröße der Bariumsulfat-CMC-Partikel beeinflusst.



**Abbildung 49:** Migration von dHL-60 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit verschiedenen Bariumsulfat-CMC-Partikeln inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns (A, B und C). Bei allen Messungen lag die Positivkontrolle (feines SiO<sub>2</sub>) im Bereich der historischen Kontrolle.







**Abbildung 50:** Migration von unbehandelten NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit verschiedenen Bariumsulfat-CMC-Partikeln inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns (A, B und C). Bei allen Messungen lag die Positivkontrolle (feines SiO<sub>2</sub>) im Bereich der historischen Kontrolle.

### 5.4.5 Freisetzung von Zytokinen

Mittels ELISA wurde untersucht, ob NR8383 Alveolarmakrophagen nach der Inkubation mit Bariumsulfat-CMC-Partikeln IL-6, TNFα, CCL2 oder LTB<sub>4</sub> freisetzten. Die gleiche Analytik wurde mit feinem SiO<sub>2</sub> (32, 64 und 96  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) durchgeführt, das im Migrationsassay als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Als Positivkontrollen für die ELISA-Messungen wurden Arachidonsäure (AA, 50 µg/ml) und Lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) eingesetzt. Es wurde nachgewiesen, dass feines SiO<sub>2</sub> in den Konzentrationen 32,64 und 96 µg/cm<sup>2</sup> eine sehr hohe und signifikante Freisetzung von TNFa induzierte (Abbildung 51, links). Eine erhöhte Freisetzung von IL-6 war hingegen in keiner gesteteten Dosis nachweisbar (Abbildung 51, links). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Erkenntnissen aus Kapitel 5.2.3.: Eine signifikante Erhöhung der RNA-Expression von TNFα nach der Inkubation von NR8383 Zellen mit feinem SiO<sub>2</sub> konnte dort nachgewiesen werden. Die Transkription von IL-6 war dort ebenfalls deutlich erhöht, allerdings nicht signifikant zur Kontrolle (Abbildung 31A). Darüber hinaus führte die Inkubation mit feinem SiO<sub>2</sub> zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von CCL2 (in den Konzentrationen 64 und 96 µg/cm<sup>2</sup>) nicht aber von LTB<sub>4</sub> (Abbildung 51, rechts). In der Positivkontrolle für LTB<sub>4</sub> (NR8383 Zellen stimuliert mit Arachidonsäure (AA, 50 µg/ml)) konnte eine signifikant erhöhte Freisetzung von LTB<sub>4</sub> detektiert werden (Abbildung 51, rechts). In den Positivkontrollen für IL-6, TNFa, CCL2 (NR8383 Zellen stimuliert mit LPS (100 ng/ml)) wurden signifikant erhöhte Freisetzungen von LPS IL-6, TNFa und CCL2 nachgewiesen (Abbildung 51, links und rechts), wobei die drei Messwerte von TNF $\alpha$  hierbei oberhalb der Kalibiergerade lagen (> 5000-fach erhöht). Daher fehlen hier sowohl die Standardabweichung als auch die Signifikanzberechnung.



**Abbildung 51:** Zytokinfreisetzung (% der Kontrolle) nach 16-stündiger Inkubation mit feinen SiO<sub>2</sub>-Partikeln in verschiedenen Konzentrationen. Positivkontrollen: Arachidonsäure (AA) 50  $\mu$ g/ml für LTB<sub>4</sub> und LPS 100 ng/ml für IL-6, TNF $\alpha$  und CCL2.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 52:** Zytokinfreisetzung (% der Kontrolle) nach 16-stündiger Inkubation mit verschiedenen Bariumsulfat-CMC-Partikeln.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. Positivkontrollen: Arachidonsäure (AA) 50 µg/ml für LTB<sub>4</sub> und LPS 100 ng/ml für IL-6, TNF $\alpha$  und CCL2.
Die Exposition von NR8383 Zellen mit nanoskaligen Bariumsulfat-CMC-Partikeln führte in der höchsten getesteten Konzentration (100  $\mu$ g/ml) zu einer erhöhten Freisetzung von TNF $\alpha$  und CCL2 (Abbildung 52A, links). Die Werte waren in beiden Fällen signifikant zur Kontrolle und lagen unterhalb der gemessenen TNF $\alpha$ - und CCL2- Konzentrationen nach der Inkubation mit feinem SiO<sub>2</sub>. Alle weiteren darunter liegenden getesteten Konzentrationen (6,25 bis 50  $\mu$ g/ml) führten nicht zur einer Freisetzung von TNF $\alpha$  und CCL2 (Abbildung 52A, links).

Ebensowenig bedingte die Exposition mit nanoskaligen Bariumsulfat-Partikeln eine vermehrte Freisetzung von CCL2 und LTB<sub>4</sub>. Wenn überhaupt, kann hier nur in der höchsten getesteten Konzentration von einem inflammatorischen Potenzial gesprochen werden. Um im Migrationsassay eine signifikante Einwanderung von Entzündungszellen auszulösen, reichte dieses offenbar nicht aus (Abbildung 49 und Abbildung 50).

Im Einklang mit den Ergebnissen aus dem PICMA (Abbildung 49 und Abbildung 50) führte die Exposition von NR8383 Zellen mit submikro- und mikroskaligem Bariumsulfat-CMC (Konzentrationen: 6,25 bis 100  $\mu$ g/ml) nicht zu einer erhöhten Freisetzung von TNF $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, IL-6 und CCL2 (Abbildung 52B und C). Ein inflammatorisches Potenzial war demnach in dieser Studie für diese Partikel in keiner der getesteten Konzentrationen nachweisbar.

Da es sich bei dem LTB<sub>4</sub>-Assay um einen kompetititven Immunassay handelte, lag die Nachweisgrenze höher als bei den anderen Kits (Sandwich-ELISAs). Aus diesem Grund wirken die Abbildungen so, als ob die Werte stark schwankten. Tatsächlich lagen die gemessenen Werte aber grundsätzlich unterhalb der Nachweisgrenze.

# 5.5 Anwendung der Chemotaxisassays auf Asbestfasern, Charakterisierung beteiligter Zytokine und Chemokine und kinetischer Verlauf

## 5.5.1 Charakterisierung der Fasern

Sowohl die Größe als auch die Morphologie der trockenen Asbestfasern (Abbildung 53A-D) wurden elektronenmikroskopisch bestimmt. Insgesamt wiesen die Fasern eine heterogene Form und Größenverteilung auf. Die Chrysotilasbestfasern Chrysotil A (Abbildung 53A) und Chrysotil B (Abbildung 53C) waren, in Übereinstimmung mit den 1968 publizierten Daten zur Größenverteilung, sichtbar länger als die Fasern der Amphibolasbeste Amosit (Abbildung 53D) und Krokydolith (Abbildung 53B). Auffällig war, dass Chrysotil A und B (Abbildung 53A und C) im Durchmesser dünner erschienen als Krokydolith (Abbildung 53B) und Amosit (Abbildung 53D). Im Einklang mit den Daten von Timbrell et al. schienen Krokydolith und Amosit kürzere Faserbruchstücke aufzuweisen als die Chrysotilasbeste.



**Abbildung 53:** Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen von Chrysotil A (A), Krokydolith (B), Chrysotil B (C) und Amosit (D).

### 5.5.2 Toxizität

Die Toxizität wurde auch hier mittels Impedanzmessung auf dem Real-Time Cell Analyzer bestimmt. Auf der Basis dieser Daten wurden die IC<sub>50</sub>-Werte für alle im Migrationsassay einzusetzenden Asbestfasern berechnet. Wie auch bei den Partikeln wurde jeweils der Zellindex (die relative Änderung der Zellzahl) gegen die logarithmische Faserdosis in g/cm<sup>2</sup> aufgetragen und der IC<sub>50</sub>-Wert mittels nichtlinearer Regressionsanalyse berechnet.

Abbildung 54 zeigt, dass die Asbestfaser Chrysotil A mit einem  $IC_{50}$  von 9 µg/cm<sup>2</sup> die für NR8383 Zellen toxischste Faser war. Verglichen mit den zuvor getesteten Partikeln lag sie etwa im Bereich von feinem Rutil und feinem SiO<sub>2</sub>.



**Abbildung 54:** Relative Änderung der Zellzahl zum Zeitpunkt 40 Stunden (= Zellindex zum Zeitpunkt 40 Stunden) in Abhängigkeit der logarithmischen Dosis (g/cm<sup>2</sup>) der eingesetzten Asbestfasern Chrysotil A und B.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betrugen IC<sub>50</sub> = 9 µg/cm<sup>2</sup> (Chrysotil A) bzw. 40 µg/cm<sup>2</sup> (Chrysotil B).

Chrysotil B hatte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 40  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> eine weniger toxische Wirkung als Chrysotil A. Es wirkte für NR8383 Zellen auch etwas weniger toxisch als die anderen beiden untersuchten Asbestfasern Krokydolith und Amosit (Abbildung 55), allerdings waren die Unterschiede insgesamt nicht signifikant.



**Abbildung 55:** Relative Änderung der Zellzahl zum Zeitpunkt 40 Stunden (= Zellindex zum Zeitpunkt 40 Stunden) in Abhängigkeit der logarithmischen Dosis (g/cm<sup>2</sup>) der eingesetzten Asbestfasern Krokydolith und Amosit.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betrugen IC<sub>50</sub> = 28 µg/cm<sup>2</sup> (Krokydolith) bzw. IC<sub>50</sub> = 15 µg/cm<sup>2</sup> (Amosit).

Diese relativ junge Messmethode ermöglichte eine Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von allen eingesetzten Fasern möglich. Wie beim Testansatz mit den Partikeln waren auch hier gewisse Messschwankungen zu beobachten. Die Standardabweichungen waren im Falle von Chrysotil A vergleichsweise gering, die Messwerte der anderen Faserproben schwankten deutlicher. Die Sinnhaftigkeit einer deutlichen Abgrenzung bzw. eines Rankings der  $IC_{50}$ -Werte ist daher an dieser Stelle fraglich. Nichtsdestotrotz konnten für folgende Experimente deutliche toxische Effekte in Dosisbereichen von 5 bis 50 µg/cm<sup>2</sup> erwartet werden. Für den Migrationsassay wurden auf der Basis dieser Ergebnisse daher vor allem die niedrigen Dosierungen hoch aufgelöst und als zu testende Dosierungen 64, 32, 16, 8, 4, 2 und 1 µg/cm<sup>2</sup> ausgewählt.

## 5.5.3 Particle-Induced Cell Migration Assay (PICMA)

Die Exposition von 3x10<sup>6</sup> NR8383 Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Asbestfasern führte zu Überständen, die eine signifikante und dosisabhängige Migration von dHL-60 Zellen auslösten. Das als Positivkontrolle etablierte feine SiO<sub>2</sub> wurde auch für diesen Versuchsteil eingesetzt, wie im Methodenteil beschrieben.

Alle Asbestfasern lösten in diesem Modell eine Chemotaxis von dHL-60 Zellen aus (Abbildung 56). Besonders ausgeprägt war die Migration im Falle von Chrysotil A (Abbildung 56A). Mittels ANOVA konnte eine signifikante Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden (p <

0,0001). In den hohen Dosierungen waren die Anzahl der migrierten dHL-60 Zellen signifikant erhöht zur Kontrolle und überstiegen die Effekte der Positivkontrolle (feines SiO<sub>2</sub>).

Alle anderen getesteten Asbestfasern verursachten im Wesentlichen eine geringere Migration von dHL-60 Zellen (Abbildung 56 B-D). In niedrigen Dosisbereichen (bis 20  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) ergab sich eine hohe Übereinstimmung der Migration, in höheren Dosierungen von 32 und 64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> verursachten Amosit (Abbildung 56D) und Chrysotil B (Abbildung 56B) eine signifikante Migration von dHL-60 Zellen, Krokydolith (wahrscheinlich bedingt durch höhere Standardabweichungen) (Abbildung 56C) jedoch nicht.



**Abbildung 56:** Migration von dHL-60 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit verschiedenen Asbestfasern inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: Chrysotil A: p < 0,0001, Chrysotil B: p < 0,01, Krokydolith: ns, Amosit: p < 0,0001. Bei allen Messungen lag die Positivkontrolle (feines SiO<sub>2</sub>) im Bereich der historischen Kontrolle.

Auffällig war, dass bei allen Fasern die Effekte bereits in niedrigen Dosisbereichen bis 16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> deutlich anstiegen und in Übereinstimmung mit den berechneten IC<sub>50</sub>-Werten ab ca. 50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> aufgrund verstärkter toxischer Effekte wieder abflachten.

Der Einfluss der zur Verfügung stehenden Asbestfasern wurde auch auf die Migration von unbehandelten NR8383 Alveolarmakrophagen getestet. Auch hier erhielt man durch die Exposition von 3x10<sup>6</sup> NR8383 Zellen mit verschiedenen Asbestfasern Überstände, die eine signifikante und dosisabhängige Migration von NR8383 Zellen herbeiführten (Abbildung 57). Wie im Methodenteil beschrieben wurde auch in dieser Versuchsreihe feines SiO<sub>2</sub> als Positivkontrolle eingesetzt.



**Abbildung 57:** Migration von unbehandelten NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit verschiedenen Asbestfasern inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: Chrysotil A: p < 0,0001, Chrysotil B: n.s, Krokydolith: p < 0,001, Amosit: p < 0,05. Bei allen Messungen lag die Positivkontrolle (feines SiO<sub>2</sub>) im Bereich der historischen Kontrolle.

Mit Asbestfasern konnten in diesem Modell ausgeprägte und signifikante Migrationseffekte von unbehandelten NR8383 Zellen ausgelöst werden. Im Fall von Chrysotil A war die Anzahl migrierter Zellen erneut besonders hoch (Abbildung 57A), bei Amosit (Abbildung 57D) und Krokydolith (Abbildung 57C) in der höchsten Dosis (64 µg/m<sup>2</sup>) signifikant zur Kontrolle und bei Chryosotil B (Abbildung 57B) war die Anzahl migrierter Zellen in keiner Dosis signifikant erhöht. An dieser Stelle fiel eine Erhöhung der Kontrollprobe bei Chrysotil B und Amosit auf (ca. 35.000 statt 20.000 Zellen), die mit kleinen Standardabweichungen reproduzierbar war. Eine Wiederholung der Versuche führte zu den gleichen Kontrollwerten. Die Positivkontrolle lag bei diesen Versuchen stets im validierten Rahmen.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass eine dosisabhängige Zellmigration von dHL-60 Zellen und unbehandelten NR8383 Zellen auch mit Asbestfasern ausgelöst werden konnte. Sie war in höheren Dosierungen signifikant zur Kontrolle und mit kleinen Standardabweichungen reproduzierbar. Sortiert man den Einfluss auf die Zellmigration absteigend, ergibt sich folgende Reihenfolge, die in etwa der absteigenden Faserlänge entspricht: Chrysotil A >> Chrysotil B > Amosit und Krokydolith, die sich sehr ähnlich verhielten (Chrysotil B löste nur eine Migration von dHL-60, Krokydolith nur von unbehandelten NR8383 Zellen aus).

### 5.5.4 Identifikation von Zytokinen und Chemokinen

Nach der Inkubation von NR8383 Alveolarmakrophagen mit Asbestfasern enthielt der Zellüberstand nachweisbar einen komplexen Mix aus pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. In sogenannten qPCR Arrays wurden aus 84 Schlüsselproteinen die wichtigsten Signalmoleküle identifiziert und in einem zweiten Schritt quantifiziert (vgl. Methodenkapitel "Quantitative Real-Time PCR").

### 5.5.4.1 Fasern: Screening nach Zytokinen und Chemokinen (Arrays)

Im qPCR Array wurde zunächst die Regulation der Transkription von 84 pro- und antiinflammatorischen Schlüsselproteinen im Anschluss an eine Asbestfaserexposition untersucht. Ein Heat Map mit den erhaltenen "Fold Changes" ist in Abbildung 58 dargestellt (n = 2). Ein Fold Change > 2 wurde dabei als Veränderung der Transkription eingestuft. Der Abbildung kann entnommen werden, dass selbst eine niedrige Dosierung von Asbestfasern (Chrysotil A, 4 µg/cm<sup>2</sup>) einen deutlichen Anstieg einiger Zytokine und Chemokine verursacht. Auch die weiteren getesten Asbestfasern Chrysotil A (32 µg/cm<sup>2</sup>), Krokydolith (16 µg/cm<sup>2</sup>), Chrysotil B (32 µg/cm<sup>2</sup>) und Amosit (64 µg/cm<sup>2</sup>) induzierten in den angegebenen Dosierungen einen deutlichen Anstieg der Transkription diverser proinflammatorischer Signalmoleküle. Auf der Basis dieser Daten wurden sieben Chemokine und Zytokine ausgewählt, die im Array einen deutlichen Fold Change aufwiesen (d.h. nach der 16stündigen Inkubation von 3x10<sup>6</sup> NR8383 Zellen mit Partikeln waren ihre RNA-Transkripte um ein Vielfaches erhöht) (Abbildung 58). Dazu zählten die folgenden Signalmoleküle: CCL2 (Fold Change bis zu 22-fach), CCL3 (Fold Change bis zu 28-fach), CCL4 (Fold Change bis zu 55-fach), CXCL1 (Fold Change bis zu 267-fach), CXCL3 (Fold Change bis zu 168-fach), TNFα (Fold Change bis zu 20-fach) und GDF15 (Fold Change bis zu 138-fach). Rplp1 war auch hier ein geeinetes Housekeeping Gen (Fold Change beträgt konstant 1). Die Übereinstimmung der Zytokine, deren RNA Transkription durch Inkubation mit Asbest anstieg, mit dem Spektrum an Zytokinen, deren RNA durch Partikelinduktion erhöht transkribiert wurde (vgl. Abbildung 29), ist demnach relativ hoch. Die Quantifizierung in Einzelassays erfolgte exemplarisch anhand folgender Proben (Tabelle 29):

Material	Effekt im PICMA (dHL-60)	Effekt im PICMA (NR8383)
Chrysotil A (4 μg/cm²)	gering	gering
Krokydolith (16 μg/cm <sup>2</sup> )	gering	keiner
Chrysotil A (32 μg/cm²)	hoch	hoch
Chrysotil B (32 µg/cm <sup>2</sup> )	hoch	gering
Amosit (64 μg/cm²)	hoch	mittel

Tabelle 29: Repräsentativ ausgewählte Proben für die gPCR-Analytik

	Chrysotil A (4 uɑ/m²)	Krokydo- lith (16 µg/m²)	Chrysotil A (32 µg/m²)	Chrysotil B (32 µg/m²)	Amosit (64 μg/m²)		Chrysotil A (4 ug/m²)	Krokydo- lith (16 µg/m²)	Chrysotil A (32 µg/m²)	Chrysotil В (32 µg/m²)	Amosit (64 μg/m²)	
Adipoq	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	ll17a	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	0
Bmp2	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	ll17f	1,1	2,6	6,4	66,9	39,4	1
Bmp4	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	1118	0.8	0.7	0.4	0.6	0.7	2
Bmp6	1.4	0.8	0.9	1,0	1,1	ll1a	0.7	1.1	1,8	3,6	3,1	3
Bmp7	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	ll1b	1.3	1.6	1.7	4,3	2,6	4
C5	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	ll1rn	3,4	6,4	17,8	13,2	14,3	5
Ccl1	1.4	0.8	0.9	1.0	1,1	112	1.4	0.8	0.9	1.0	1,1	6
Ccl 11	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	1121	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	7
Ccl 12	0.3	0,2	0.4	0.9	0.9	1122	1.4	0.8	0.9	1.0	1,1	8
Ccl 17	0,7	0.6	0,8	0.9	1.2	II23a	0.6	0.9	1.0	1.3	1.1	9
Ccl 19	1.4	0.8	0.9	1.0	1,1	1124	1,4	0.8	0.9	1.0	1,1	10
Ccl2	2.3	2.8	4.5	21,8	22,2	1127	1.0	0.8	0.9	1,1	0,9	50
Ccl20	1.4	0.8	1,4	2,6	3,7	113	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	100
Ccl21	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	114	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	
Ccl22	5.1	12,5	13,8	7,2	8,8	115	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	
Ccl24	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	116	1,4	0,8	2,9	50,0	10,1	
Ccl3	4,3	6,5	21,5	24,0	27,7	117	1,0	1,6	1,4	0,9	0,7	
Ccl4	9,1	11,3	44,2	40,1	55,8	119	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
Ccl5	1,1	1.5	2,6	4,3	3,2	Lif	6,3	14,4	96,0	111,0	88,1	
Ccl7	1,6	1,8	2,5	25,0	21,3	Lta	1,4	0,8	0,9	1,5	1,6	
Cd40lg	1.3	0.9	0,8	0,9	1,0	Ltb	1.1	0.6	0.8	1.0	0.9	
Cd70	1,4	1,9	2,7	3,0	2,4	Mif	1.3	0.7	0.9	0.9	0.8	
Cntf	0.6	1.1	1.2	1,3	1,1	Mstn	1.4	0.8	0,9	1,0	1,1	
Csf1	1,4	2,0	9,4	8,2	8,3	Nodal	0,5	0,4	0,3	0,4	0,4	
Csf2	1.4	1.1	12,2	10,5	8,4	Osm	5.7	10,0	76,4	82,4	70,1	
Csf3	1,4	0,8	1,7	26,3	13,7	Pf4	4,3	5,4	6,4	2,6	0,8	
Ctf1	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	Ppbp	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
Cx3cl1	1,2	0,7	0,8	0,8	0,9	Spp1	2,1	4,3	18,7	41,8	20,0	
Cxcl1	2,8	10,0	81,9	234,6	267,1	Tgfb2	1,4	1,3	3,0	11,7	9,2	
Cxcl10	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	Thpo	0,5	0,7	0,8	1,6	1,4	
Cxcl11	0,5	0,5	0,1	0,3	0,3	Tnfα	2,4	3,6	12,9	15,6	20,1	
Cxcl12	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	Tnfrsf11k	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
Cxcl13	1,4	0,8	0,9	2,9	1,1	Tnfsf10	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	
Cxcl16	1,1	1,7	1,7	1,8	1,4	Tnfsf11	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
Cxcl3	1,7	9,3	55,2	169,4	167,9	Vegfa	2,6	3,9	4,6	5,0	2,1	
Cxcl9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,1	Xcl1	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
Faslg	1,4	0,9	4,9	7,0	2,8	Actb	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1	
Gdf15	10,1	15,8	109,6	119,0	138,3	B2m	0,8	0,9	1,1	1,2	1,0	
Gpi	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	Hprt1	0,6	0,9	1,2	1,3	1,1	
lfna2	1,4	0,8	1,1	2,2	1,3	Ldha	0,8	1,0	1,2	1,1	1,0	
lfng	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	Rplp1	1,2	1,0	0,9	0,9	1,0	
1110	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	RGDC	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
II11	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	RTC	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
II12a	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	RTC	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
II12b	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	RTC	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	
II13	1,4	0,8	0,9	1,0	1,1	РРС	1,4	0,8	0,9	1,1	1,1	
II15	0,5	0,5	0,4	0,5	0,3	РРС	1,4	0,8	0,9	1,1	1,1	
II16	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	PPC	1,4	0,9	0,9	0,8	1,1	

**Abbildung 58:** "Fold Change" von 84 proinflammatorischen Schlüsselproteinen nach der 16stündigen Inkubation von  $3x10^6$  NR8383 Zellen mit Chrysotil A (4 µg/cm<sup>2</sup> bzw. 32 µg/cm<sup>2</sup>), Krokydolith (16 µg/cm<sup>2</sup>), Chrysotil B (32 µg/cm<sup>2</sup>) und Amosit (64 µg/cm<sup>2</sup>).

## 5.5.4.2 Fasern: Quantifizierung von Zytokinen und Chemokinen (Primer Assays)

Die in Tabelle 29 genannten, repräsentativ ausgewählten Proben wurden in einzelnen qPCR Assays bezüglich einer Veränderung der Transkription von sieben ausgwählten Zytokinen und Chemokinen untersucht (CXCL1, CXCL3, CCL2, CCL3, CCL4, GDF15, TNFα). Die Ergebnisse sind in Abbildung 59 dargestellt. Wie auch bei den mit Partikeln inkubierten NR8383 Zellen wurde ein Fold Change der RNA von mindestens 2 (gestrichelte Linie) als Veränderung der Transkription gewertet.



**Abbildung 59:** Fasertyp, mit dem inkubiert wurde, sowie der gemessene Fold Change im Vergleich zur Kontrolle. Getestete Dosierungen: Chrysotil A (4  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> bzw. 32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), Krokydolith (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), Chrysotil B (32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und Amosit (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>).

In allen mit Asbest exponierten NR8383 Zellen waren die RNA-Transkripte der betrachteten Zytokine und Chemokine deutlich erhöht (Abbildung 59). Auffällig war, dass die Proben in allen Dosierungen eine Änderung des Fold Change um mehr als 2 aufweisen, sogar in den Proben, die nur eine geringe Zellmigration auslösten, und zwar Chrysotil A (4  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) bzw. Krokydolith (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>). In diesen Proben waren CXCL1, CXCL3, CCL2, CCL3, CCL4, GDF15 und TNF $\alpha$  um das 4- bis 20-fache erhöht. Besonders in den Proben, die eine hohe Zellmigration auslösten (Chrysotil A und B (32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und Amosit (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)), stieg die Transkription der RNA der proinflammatorischen Signalmoleküle um das bis zu 400-fache. Hier ist die Beteiligung von CXCL1, CXCL3 und GDF15 besonders eindeutig, deren Fold Change noch deutlich höher ausfiel als derjenige von TNF $\alpha$  und von den Chemokinen CCL2,

CCL3, CCL4. Insgesamt betrachtet korrelierten die Daten eher mit den Migrationseffekten auf dHL-60 Zellen als mit denen auf unbehandelte NR8383 Zellen (vgl. Tabelle 29). Das Ausmaß der Transkription proinflammatorischer Signalmoleküle war nach der Inkubation mit Asbestfasern deutlich höher als nach der Inkubation mit Partikeln, wo der durchschnittlich bestimmte Fold Chance bei ca. 5-fach bis 15-fach lag.

# 6 Diskussion

# 6.1 Eignung des entwickelten Assays und der eingesetzten Zellen

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines *in vitro*-Assays, der sich für die Erforschung von inflammatorischen Effekten durch inhalativ aufgenommene Partikel eignet, robuste Ergebnisse liefert und im Routinemaßstab einsetzbar ist. Außerdem sollten für eine hohe Wiederfindungsrate zwischen verschiedenen Laboren nur etablierte, permanente Zelllinien zum Einsatz kommen. Darüber hinaus sollte die Methode eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung aufweisen und die Detektion der Effekte durfte nicht mit den eingesetzten Partikeln interferieren. Selbstverständlich ist eine Entzündungsreaktion *in vitro*-Assay diese nicht vollständig abbilden kann. Im Rahmen dieser Arbeit war es aber dennoch möglich, eine Reaktion nachzuahmen, die das Entstehen einer solch komplexen Entzündungsreaktion begünstigt. Das Einwandern von Neutrophilen und die Rekrutierung weiterer Makrophagen zum Ort der Inflammation ist in diesem Zusammenhang der erste Schritt der Entzündung. Abgerundet durch die gemessene Transkription von Zytokinen und Chemokinen wurde in dieser Arbeit dargelegt, dass es offenbar Partikel gibt, die das Entstehen einer Entzündungsreaktion begünstigen, während andere Partikel dies nicht oder nur in einem geringen Umfang tun.

Wie eingangs erwähnt, stellen die gesamten Atemwege ein Target für einatembare Partikel und Fasern dar. Während Partikel > 2,5 µm sich überwiegend in den Bronchien oder in den oberen Atemwegen abscheiden, dringen Partikel mit einem Durchmesser von < 2,5 µm (PM<sub>2.5</sub>-Fraktion) bis in den Alveolus vor (Donaldson und Stone, 2003, Oberdörster et al., 2005). Sie scheiden sich auf den Epithelzellen ab und werden daraufhin von Alveolarmakrophagen erkannt und phagozytiert (Casarett et al., 2001, Gehr et al., 1990). Der Alveolarmakrophage nimmt daher eine Schlüsselrolle als erster Abwehrmechanismus der Alveolen ein. Die Clearance aus dem Alveolus ist generell sehr langsam und wird für den Menschen auf etwa 0,1 % pro Tag geschätzt (Oberdörster, 1995). Bedingt durch eine hohe oder über einen langen Zeitraum andauernde niedrige Belastung mit granulären biobeständigen Stäuben kann es somit zu einer Akkumulation großer Mengen unlöslicher Partikel im Alveolus kommen (Jones et al., 1988). In diesem Fall spricht man von einem alveolären Overload durch granuläre biobeständige Stäube (IARC, 2010). Dieser Overload führt zu einer Aktivierung von Alveolarmakrophagen und über eine Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen u.a. zu einer Anlockung von Neutrophilen und weiteren Makrophagen in den Alveolus sowie zu einer chronischen Entzündung, einem erhöhten Lungengewicht, Zellproliferation, Fibrose und im schlimmsten Fall Lungenkrebs (Abbildung 60) (Muhle et al., 1990, IARC, 2010).



**Abbildung 60:** Zusammenfassung der Reaktion des Alveolus auf granuläre biobeständige Stäube (Abbildung modifiziert nach Tran et al., 2000 und IARC, 2010).

Die Rekrutierung von Neutrophilen ins Lungengewebe ist einer der wichtigsten Entzündungsmarker im Zusammenhang mit einer inhalativen Partikelexposition (Ma-Hock et al., 2009a, Donaldson et al., 2008). Der Anstieg von Neutrophilen in der BALF wurde auch in Humanstudien belegt: ein statistisch signifikanter Anstieg an Neutrophilen in der BALF wurde bei Arbeitern beobachtet, die gegenüber Asbest, Kohlenstaub oder Quarz exponiert waren (Rom, 1991). Eine erhöhte Neutrophilenzahl wurde auch in der BALF von Bergarbeitern nachgewiesen, welche unter einer Pneumokoniose litten (Vallyathan et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesen Gründen mit Neutrophilen als funktionellem Parameter gearbeitet. Die Zelllinie HL-60 ist eine sehr gut charakterisierte Zelllinie, die in Chemotaxismodellen zum Einsatz kommt (Nuzzi et al., 2007). HL-60 Zellen können zu einem neutrophilen Phänotyp ausdifferenziert werden (Breitman et al., 1980). Diese dHL-60 Zellen sind besonders gut geeignet, um Chemotaxis-Experimente durchzuführen (Millius und Weiner, 2010). Außerdem haben sie als permanente Zelllinie den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu Primärkulturen keine begrenzte Lebenszeit haben. Die Zellen können unter immer gleich bleibenden Bedingungen vermehrt werden und liefern reproduzierbare Ergebnisse, da sie vom selben Klon stammen.

Im Inflammationsgeschehen haben Makrophagen drei Hauptfunktionen: Phagozytose, Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie die Präsentation von Antigenen. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Initiation, Aufrechterhaltung und im Abklingen des Entzündungsprozesses (Fujiwara und Kobayashi, 2005). Dem Alveolarmakrophagen wird daher eine Schlüsselrolle innerhalb der inflammatorischen Reaktion gegenüber partikulären und faserförmigen Stäuben zugeschrieben. Landsiedel et al. (2014a) stellen sogar infrage, ob die Etablierung eines *in vitro*-Systems ohne Makrophagen in diesem Zusammenhang ein adäquater Ansatz sei. Während andere Studien die Wirkung von Partikeln und Fasern auf Epithelzellen untersuchen (z.B. Barlow et al., 2005a), gibt es auch eine Reihe von toxikologischen Experimenten mit Alveolarmakrophagen: Der Effekt von Quarz auf aus dem Meerschweinchen isolierte Alveolarmakrophagen wurde untersucht (Bruch et al., 2004). Darüber hinaus wurde berichtet, dass Makrophagen auf eine Inkubation mit Nanopartikeln mit der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies oder z.B. NF- $\kappa$ B reagieren (Brown et al., 2004). Andere Autoren setzten die murine Alveolarmakrophagenzelllinie J774.A1 für ihre Studien ein (Clift et al., 2008). Auch NR8383 Alveolarmakrophagen kamen in toxikologischen Studien schon zum Einsatz, z.B. zur Beurteilung der apoptotischen Wirkung von Zementstaub (Ogunbileje et al., 2014, van Berlo et al., 2009). Kürzlich wurde gezeigt, dass das Alter von primären Alveolarmakrophagen einen entscheidenden Einfluss auf die Freisetzung von IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10 nach der Inkubation mit Titandioxid-Partikeln hat (Bruno et al., 2015). Um Schwankungen zu vermeiden, sollte daher mit einer etablierten Alveolarmakrophagenzelllinie gearbeitet werden.

NR8383 Zellen erwiesen sich für diese Arbeit als gut geeignet, da sie als permanente Zelllinie verfügbar sind und ihre phagozytierenden Eigenschaften sowie ihre Fähigkeiten, Zytokine zu produzieren, sehr gut belegt sind (Helmke et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, dass Überstände von mit Partikeln exponierten Zellen chemotaktische Signale freisetzen, mit denen dHL-60 Zellen dosisabhängig und gut reproduzierbar angelockt wurden. Darüber hinaus war von Beginn der Experimente an geplant, dass ein *in vitro*-Assay entwickelt werden sollte, der auch Fasertoxizität erkennt. Makrophagen eignen sich für dieses Vorhaben, da sie auch in der Clearance von faserförmigen Stäuben eine Schlüsselrolle einnehmen. Zu einem späteren Zeitpunkt könnten die Daten der Asbestfasern dann zum Beispiel mit solchen aus Carbonnanotubes (CNTs) verglichen werden.

Bislang existiert kein funktionelles *in vitro*-Modell, das die Akkumulation von Makrophagen und Neutrophilen als Reaktion auf eine Partikel- bzw. Faserexposition dosisabhängig und im Einklang mit *in vivo*-Befunden abbildet. Daten bezüglich der Anlockung von Neutrophilen sind bisher nicht überzeugend. Lugano et al. (1982) instillierten Meerschweinchen mit Quarzstaub, isolierten Makrophagen aus der Bronchiallavage und lockten damit sowohl Neutrophile als auch Makrophagen an. In einer anderen Studie wurden Typ II Epithelzellen mit Carbon Black inkubiert und mit den Überständen Alveolarmakrophagen angelockt (Barlow et al., 2005b). In beiden Fällen waren die gemessenen Effekte sehr schwach und zeigten keine Dosisabhängigkeit. Eine andere Arbeit untersuchte die Migration von undifferenzierten HL-60 Zellen nach der Inkubation mit Nanopartikeln, allerdings konnte keine signifikante Migration ausgelöst werden (Skoczen et al., 2011). Der im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Migrationsassay hingegen bildet die Migration von Neutrophilen und Makrophagen, die beide als Standardparameter in Tierexperimenten gelten, signifikant und dosisabhängig ab. Die Testdauer von drei Tagen ist kurz, der Test ist deutlich günstiger als Tierexperimente und leicht zu handhaben.

Um ein möglichst realitätsnahes Modell zu erhalten, wurde auch versucht, den Test ausschließlich mit humanen Zelllinien zu etablieren (d.h. Inkubation von THP-1 bzw. A549 Zellen und Chemoattraktion von dHL-60 Zellen, vgl. Kapitel 5.3). In einer älteren Studie wurde beschrieben, dass die schlechte Phagozytoseleistung von THP-1 Zellen durch Zusatz des Phorbolesters PMA erhöht werden konnte (Tsuchiya et al., 1982). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch trotz dieser zusätzlichen Ausdifferenzierung keine nennenswerte Phagozytose von Partikeln durch THP-1 Zellen beobachtet werden. Zu Beginn der Experimente wurden "Verständigungsschwierigkeiten" zwischen humanen Zellen und Rattenzellen befürchtet. Eines der am häufigsten im Menschen beschriebenen Chemokine ist CXCL8, das eine Art Schlüsselrolle als neutrophiles Chemoattraktans einnimmt. Ein CXCL8-Homolog existiert nicht in der Ratte, allerdings werden seine Funktionen hier durch andere Chemokine ersetzt, z.B. CCL3 und CXCL1 (Bozic et al., 1994, Frevert et al., 1995). Die "Verständigungsschwierigkeiten" erwiesen sich im Einklang mit den Beobachtungen von Bozic et al. und Frevert et al. als unbegründet. Die Beteiligung sowohl von CXCL1 und CCL3 am Migrationsverhalten der NR8383 und dHL-60 Zellen konnte im Rahmen dieser Studie nachgewiesen werden.

Ein wichtiger großer Kritikpunkt bei der Diskussion um die Übertragbarkeit der Daten auf die physiologischen Realbedingungen ist die Suspendierung der Partikel und Fasern für die Zellkultur. Wie bereits erwähnt, ist die Verwendung von biologischen Medien, in welchem die Partikel und Fasern suspendiert werden, eine besondere Herausforderung bei der Entwicklung eines zellbasierten Assay-Systems (Schnekenburger et al., 2009). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Toxizität von Zinkoxid-Partikeln sich unter Kulturbedingungen stark verändert (Heng et al., 2011). Dies wird häufig auf eine sogenannte Proteinkorona zurückgeführt, die sich auf den Partikeln formt, sobald diese in biologischem Medium mit Proteinanteil suspendiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass SiO2- und Titandioxid-Partikel eine hohe Tendenz zur Agglomeratbildung und gleichzeitig eine hohe Affinität zu FCS aufwiesen (Sauer et al., 2015). Dies könnte z.B. die Aufnahme durch Alveolarmakrophagen und somit auch nachgeschaltete Vorgänge wie die Freisetzung von Zytokinen beeinflussen (Vranic et al., 2013, Landsiedel et al., 2012). Allerdings muss beachtet werden, dass auch in vivo die Alveolarzellen mit einer oberflächenaktiven Substanz überzogen sind, dem sogenannten Surfactant, welches einen hohen Lipid- und Proteinanteil aufweist. Dass "nackte" Partikel in Kontakt mit Lungenzellen geraten, wird daher als unwahrscheinlich angesehen (Landsiedel et al., 2014a). Versuche mit einer dem humanen Surfactant ähnlichen Substanz aus dem Schwein (Curosurf®) zeigten, dass die

Agglomeration von Titandioxid-Partikeln (verglichen mit dem FCS-haltigen Kulturmedium) kaum beeinflusst werden konnte (Vippola et. al, 2009). Bei Carbonnanotubes wurde beobachtet, dass ein vorheriges Beschichten mit Curosurf® die Freisetzung von TNFα in Makrophagenzellen reduziert (Gasser et al., 2012). Insofern ist davon auszugehen, dass wahrscheinlich *in vivo* genau wie *in vitro* eine Proteinadsorption die Toxizität von Partikel beeinflusst.

Aus diesem Grund wurde sich dagegen entschieden, die Partikel in FCS-freiem Medium zu applizieren bzw. die Zellkulturbedingungen der Experimente vollständig FCS-frei durchzuführen, wie es z.B. von Gerloff et al. (2012) durchgeführt wurde. Wie groß der Unterschied zwischen der Proteinkorona *in vivo* und *in vitro* tatsächlich ist und ob dieser Unterschied einen Einfluss auf die Toxizität hat, blieb bislang ungeklärt. Es kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *in vitro*-Assay das inflammatorische Potenzial der getesteten Partikel verfälscht vorhersagt. Der PICMA stößt hier insofern an seine Grenzen, als dass eine Applikation der Partikel in reinem Surfactant unter Zellkulturbedingungen nicht zu realisieren ist.

# 6.2 Dosierungsschema des entwickelten Assays

Eine chronische Entzündung der Lunge kann sowohl nach kurzzeitigen und hohen, als auch nach lange andauernden niedrigen Belastungen der Lunge auftreten (Oberdörster, 1995). Sinnvoll festgelegte Dosierungen sind ein notwendiges Kriterium, damit ein *in vitro*-Test überhaupt eine Aussagekraft hat (Oberdörster, 2009). Eine besondere Herausforderung bei der Dosisfindung für *in vitro*-Tests ist die Verwendung von biologischen Medien, welche die Partikel z.B. bezüglich ihres Agglomerations- und Sedimentationsverhaltens stark beeinflussen können. Die gewählte Dosis an Partikeln erreicht unter Umständen gar nicht alle Zellen, weshalb von Fall zu Fall entschieden werden muss, wie sinnvoll welche Dosierung ist (Stone et al., 2009). In vielen Arbeiten mit adhärenten Zellen wird argumentiert, dass die zugegebene Partikelmasse auf die Oberfläche der Zellkulturflasche/-platte oder auf die Zellzahl pro Oberflächeneinheit bezogen werden sollte, da die Konzentration pro Volumen des Zellkulturmediums nicht die gleiche Aussagekraft hat (Stone et al., 2009, Rushton et al., 2010, Monteiller et al., 2007, Landsiedel et al., 2014a, Heng et al., 2011). Ein für alle *in vitro*-Systeme einheitliches Dosierungsschema ist daher nicht sinnvoll (Landsiedel et al., 2014a).

Darüber hinaus wird vorgeschlagen, dass die Dosierung der Partikel nicht auf Grundlage ihrer Masse, sondern ihrer spezifischen Oberfläche berechnet werden sollte (Oberdörster 2009; Braakhuis et al., 2014, Duffin et al., 2002). Andere Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen der auf Makrophagen applizierten Partikelmasse und Daten aus intratrachealen Experimenten an Ratten (Wiemann und Bruch, 2009). Die spezifische Oberfläche der Partikel konnte erst in einem sehr weit fortgeschrittenen Stadium der vorliegenden Arbeit bestimmt werden und kam daher nicht mehr für ein Dosierungsschema in Frage. Da die Partikel insgesamt sehr ausführlich charakterisiert wurden, ist eine Umrechnung der Dosierung jedoch möglich (z.B. von Masse/cm<sup>2</sup> in Masse/ml oder von Masse/cm<sup>2</sup> in spezifische Oberfläche/cm<sup>2</sup>). Ein Berechnungsbeispiel findet sich im Kapitel "Inkubation von NR8383 Zellen mit Partikeln".

In einem anderen in vitro-Experiment mit NR8383 Zellen erfolgte eine Inkubation mit Quarzund Kaolinstäuben, in welchem mit Konzentrationen von 50 bis 400 µg/ml verschiedene apoptotische Endpunkte gemessen wurden (Gao et al., 2001). Es wurde berechnet, dass eine lebenslange alveoläre Belastung mit Titandioxid und Carbonnanotubes mit in vitro-Dosen von bis zu 400 µg/ml simuliert werden kann (Gangwal et al., 2011), auch wenn diese Konzentrationen einem anderen Autor zufolge bereits das obere Ende der Dosierung bei in vitro-Experimenten mit Partikeln darstellt (Oberdörster, 2012). Eine andere Arbeitsgruppe setzt noch deutlich niedrigere Dosen ein: Kroll et al. (2011) berechneten, dass eine Substanzzugabe von 3 bis 10 µg pro 1 cm<sup>2</sup> Zellkulturoberfläche bereits einem alveolären Overload entsprechen würde. Dennoch liegen die in dieser Arbeit eingesetzten Dosierungen von 1–100 µg Partikelmasse/cm<sup>2</sup> Zellkulturoberfläche in einem Dosierungsbereich, welcher in vitro auch in anderen Studien eingesetzt wurde. Sayes et al. (2007) setzten in ihrer Studie mit humanen Epithelzellen ebenfalls Partikeldosierungen zwischen 0,052 und 520 µg/cm<sup>2</sup> Zellkulturoberfläche ein und vermuteten in Dosisbereichen von 52 µg/cm<sup>2</sup> bis 520 µg/cm<sup>2</sup> auf der Basis von gemessenen Zytotoxizitätsparametern einen alveolären Overload. In einer Studie von Morin et al. (2008) wird ausgesagt, dass Dieselemissionen in einer Dosierung von 10 bis 100 µg/cm<sup>2</sup> Zellkulturmonolayer einer Partikelinhalation von 10 bis 100 g durch einen Menschen von 70 kg entsprächen. Die Autoren beschrieben allerdings nicht, auf welcher Basis sie diese Extrapolation vorgenommen haben.

Zusätzlich sollte man beachten, dass die Lunge ein derart komplexes und fein verästeltes Organ ist, sodass Partikel und Fasern sich oft an Verästelungen sammeln und dort eine Art "Hot-Spot" bilden. Es kann keinesfalls davon ausgegangen werden, dass sich inhalierte GBS gleichmäßig über die Alveolarregion verteilen. An diesen "Hot-Spots" ist die Beladung der Epithelzellen mit Partikeln deutlich höher als an anderen Stellen in der Lunge (Donaldson et al., 2008). Sie schließen vor allem die Carina tracheae und die Verzweigungspunkte der Bronchien ein (Miller et al., 2014, Hofmann et al., 2000). Beim Menschen entwickeln sich daher Tumoren besonders an diesen Stellen (Balashazy et al., 2003). Eine "Rückrechnung" von im Assay verwendeter Alveolarmakrophagenzahl und Partikeldosis auf physiologische Bedingungen im Menschen ist demnach nicht zielführend. Aus diesem Grund schlagen Stone et al. (2009) vor, dass man zunächst bei der Etablierung eines *in vitro*-Experiments die Vitalität/Toxizität (z.B.  $LC_{50}$ ) ermittelt, um von diesen Werten ausgehend ein Dosierungsschema für andere, eventuell relevantere Endpunkte zu ermitteln. So wurden bereits im Rahmen einer anderen Studie mit NR8383 Zellen und Fasern toxische Dosierungen ermittelt und in der Studie selbst Dosierungen bis zu 50 µg/cm<sup>2</sup> eingesetzt (Wieckenberg, 2005). Diesen Ansätzen folgend wurden in dieser Arbeit die toxischen Effekte der eingesetzten Partikel auf NR8383 Zellen zunächst genau untersucht. Nach einem Screening mittels Trypanblau-Test wurde für jede Substanz impedanzbasiert ein IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt.

Es gibt eine ganze Reihe von etablierten Vitalitäts-/bzw. Toxizitätstests, von denen der wahrscheinlich bekannteste der MTT-Test ist. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Umwandlung des gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in das violette, wasserunlösliche Formazan (Mosmann, 1983). Leider sind die meisten dieser optischen Messverfahren nur begrenzt darauf anwendbar, die Toxizität von Partikeln zu bestimmen. Dies liegt vor allem daran, dass die Partikel oft bei gleicher Wellenlänge absorbieren wie das zu quantifizierende Testreagenz, wodurch die Anzahl der noch vitalen Zellen überschätzt wird (Stone et al., 2009). Andere Wissenschaftler beschreiben eine umfangreiche Adsorption des Farbreagenz an die große Oberfläche der Partikel (Worle-Knirsch et al., 2006). Carbon Black zum Beispiel kann im MTT-Test nicht eingesetzt werden (Schnekenburger et al., 2009). Die Interferenz von Nanopartikeln mit klassischen Toxizitätsassays, die auf optischen Messverfahren basieren, ist ein häufig auftretendes Problem (Review: Kroll et al., 2009).

Aus diesem Grund wurde die Toxizität der kommerziell erworbenen Partikel auf die NR8383 Alveolarmakrophagen nicht mit einem solchen optischen Assay durchgeführt, sondern in Echtzeit mit der RTCA Station. Diese Methode ist noch relativ jung, aber für die generelle Beurteilung der Toxizität von Agenzien auf Zellpopulationen ein etablierter Ansatz (Limame et al., 2012, Ramis et al., 2013). Ein großer Vorteil dieser Bestimmungsmethode liegt darin, dass die Partikel nicht mit der Messmethode interferieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden stets auch Impedanz-Messungen mit Partikeln und Fasern ohne Zellen durchgeführt und es konnte bewiesen werden, dass der Zusatz von Partikeln und Fasern keinerlei Einfluss auf die Impedanz hatte, also keine Verfälschung der Zellzahl herbeiführte. Darüber hinaus konnten alle Versuche in Echtzeit beobachtet werden. Ein Nachteil der Anwendung der Impedanzbasierten Toxizitätsbestimmung sind die relativ hohen Standardabweichungen der Messwerte. Es mangelt noch an validen Daten, wie die Methode für NR8383 Zellen optimiert werden kann. Da die Toxizitätsbestimmung in erster Linie zur Dosisfindung dienen sollte, konnten diese Messschwankungen akzeptiert werden. Die nachfolgend im Migrationsassay eingesetzten Dosierungen orientierten sich daran und lagen möglichst unterhalb der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte.

Wie bereits erwähnt kann eine Angabe der Partikelzugabe in Masse pro Oberfläche oder in Masse pro ml sinnvoll sein. In diesem Fall wurde die Entscheidung zusätzlich erschwert durch die Tatsache, dass die NR8383 Alveolarmakrophagen gemischt adhärent und in Suspension wachsen. Im Falle des synthetisierten Bariumsulfats konnte deutlich gezeigt werden, dass die größte Partikelgröße (die nach etwa 2 Stunden nachweisbar sedimentiert war), signifikant besser von den adhärenten als von den suspendierten Zellen phagozytiert wurde. Dies legt den Schluss nahe, dass dieses Phänomen bei den kommerziell erworbenen Partikeln noch viel ausgeprägter gewesen sein muss, denn diese sedimentierten innerhalb von Minuten. Aus diesem Grund wurde im Nachhinein festgelegt, dass hier eine Dosierung in Masse pro Oberfläche (µg/cm<sup>2</sup>) sinnvoller war. Die Konzentration in Masse/ml wurde im Methodenteil zusätzlich angegeben, um eine gewisse (wenn auch eingeschränkte) Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu geben. Die Konzentration der synthetisierten Bariumsulfatpartikel wurde hingegen weiterhin in Masse pro ml (µg/ml) angegeben, da vor allem die kleineren Partikelgrößen über einen längeren Zeitraum stabil suspendiert blieben und auch die suspendierte Zellfraktion nachweisbar einen deutlichen Anteil Partikel phagozytieren konnte.

# 6.3 Korrelation von in vitro- und in vivo-Ergebnissen – Prädiktivität

Um das inflammatorische bzw. toxische Potenzial von inhalativ aufgenommenen Partikeln und Fasern zu beurteilen, stehen verschiedene Studientypen mit unterschiedlicher Studiendauer (Erfassung akuter/chronischer Endpunkte) zur Verfügung (Übersicht: Abbildung 61). *Epidemiologische Studien*, die chronische Auswirkungen von inhalativ aufgenommenen Partikeln erfassen, sind zum einen dadurch limitiert, dass sich die Abschätzung der Exposition am Arbeitsplatz schwierig gestaltet, andererseits dauern Humanstudien sehr lange und sind mit hohen Kosten verbunden. Außerdem wird die Beurteilung von Effekten durch andere, inhalativ aufgenommen Agenzien (andere Expositionen am Arbeitsplatz, Umweltfaktoren, Tabakrauch) stark erschwert. Aus diesem Grund wurde am IPA ein Expositionslabor eingerichtet, mit dem akute Effekte von inhalativ aufgenommenen Partikeln unter standardisierten Bedingungen am Menschen ermittelt werden können (Monsé et al., 2012).

*Tierexperimentelle Daten* zu Partikelexpositionen werden anhand von Nagern, zumeist Ratten oder Mäusen, gewonnen. Standardisierte und optimierte Prüfprotokolle für die

tierexperimentelle Bestimmung der inhalativen Toxizität werden von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) veröffentlicht. Neben akuten und subchronischen Effekten sind auch chronische Effekte bis zu 52 Wochen unter standardisierten Bedingungen messbar (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, 2009). Wie auch bei den Humanstudien ist hier mit einem großen Zeit- und Kostenaufwand zu rechnen.

Im Gegensatz dazu können *in vitro*-Studien, die an Zellen oder kultivierten Zellverbänden durchgeführt werden, ausschließlich akute Effekte abbilden. Bislang wurde kein *in vitro*-Ansatz, der inhalative toxische Wirkungen von Chemikalien abbildet, in einer OECD-Guideline umgesetzt. *In vitro*-Assays sind preiswerter als Human- und Tierstudien und bieten die Möglichkeit, viele verschiedene Substanzen mit einem geringeren Zeitaufwand zu beurteilen.

(	Mensch <ul> <li>akute Effekte (Expositionslabor)</li> <li>chronische Effekte (Kohortenstudie)</li> </ul>		<ul> <li>Bestimmung eines NOAEL</li> <li>AGW kann abgeleitet werden</li> <li>Untersuchung zum Wirkmechanismus stark eingeschränkt</li> </ul>
_	Tierversuch (Nager)		Bestimmung eines NOAEL
	<ul> <li>akute Effekte (OECD TG 403)</li> <li>subchronische Effekte (90 Tages-Studie, OECD</li> <li>chronische Effekte (52 Wochen-Studie, OECD T</li> </ul>	TG 413) <sup>-</sup> G 452/453)	<ul> <li>AGW: Extrapolation von Nager auf Mensch</li> <li>Eingeschränkte Untersuchung des Wirkmechanismus</li> </ul>
(	In vitro-Studien • akute Effekte		<ul> <li>Extrapolation eines AGW nicht möglich</li> <li>Studien zum Wirkmechanismus (auf</li> </ul>
			Zellebene) möglich <ul> <li>vergleichende Studien möglich</li> </ul>

**Abbildung 61:** Überblick zu Studiendesigns und untersuchten Spezies (inhalative Toxizität) sowie mögliche Schlussfolgerungen aus den Studiendesigns. NOAEL = No Observed Adverse Effect Level.

Da unter Zellkulturbedingungen eine dauerhafte Exposition gegenüber Partikeln und Fasern nicht realisierbar ist, wird auch im Rahmen dieser Arbeit angenommen, dass ein unter *in vitro*-Bedingungen gemessener hoher akuter Effekt auf chronische Effekte übertragen werden kann. Die Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten in der Lunge ist ein deutlicher Marker für eine Entzündungsreaktion im Zusammenhang mit einer inhalativen Partikelexposition. Sie wird auch in innovativen Ansätzen zur Optimierung bzw. Verkürzung von Tiermodellen als sinnvoller Endpunkt eingesetzt (Klein et al., 2012). Eine Vergrößerung der Makrophagen- und Neutrophilenpopulation innerhalb der Lunge ist ein häufig verwendeter Marker für eine inflammatorische Reaktion. Diverse Studien verknüpfen die wiederholte inhalative Exposition gegenüber granulären biobeständigen Stäuben mit einer konstanten Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen und irreversiblen Effekten wie Fibrosen und COPD (Bringardner et al., 2008, MacNee und Donaldson, 2003, Tirouvanziam, 2006). Ihre Beteiligung an der Pathogenese von Lungenkrebs gilt als gut belegt (Knaapen et al., 2006, Skillrud et al., 1986, Tetley, 2005).

Die Grundvoraussetzung für die Etablierung eines prädiktiven in vitro-Testsystems ist, neben dosisabhängigen Ergebnissen, das Vorliegen von Daten, die mit bestehenden in vivo-Daten in Einklang gebracht werden können (Landsiedel et al., 2014a, Steimer et al., 2005). Die Korrelation von Ergebnissen aus in vitro-Assays mit bestehenden in vivo-Daten ist daher ein wichtiger Diskussionspunkt bei der Entwicklung und Validierung dieses Systems. Inhalationsstudien werden zumeist am Tiermodell untersucht, da die humane Exposition gegenüber Partikeln so am ehesten abgebildet werden kann (Pauluhn und Mohr, 2000). Allerdings existieren nur wenige Studien, welche die gleichen Partikel sowohl in vitro als auch am Tiermodell untersuchten. Beispielsweise wurden Partikel aus Eisen, kristallinem SiO<sub>2</sub>, amorphem SiO<sub>2</sub> und Zinkoxid gleichzeitig in vivo im Rattenmodell (intratracheale Instillation) und in vitro an primären Rattenmakrophagen untersucht. Die Daten aus den in vitro-Versuchen (z.B. MTT-Assays, LDH Leakage, Zytokin-Level) korrelierten nicht mit den in vivo-Daten (PMNs aus Bronchiallavage, LDH-Level) (Sayes et al., 2007). Im Rahmen einer weiteren Studie wurden mit SiO2- und Titandioxid-Partikeln ähnliche Ergebnisse in vivo (PMNs aus Bronchiallavage) und in vitro (Anstieg von IL-8) erzielt (Donaldson et al., 2008). Andere Autoren fanden mit amorphen SiO<sub>2</sub>-Partikeln ein ähnliches Ausmaß an oxidativem Stress in vivo und in vitro, allerdings wurden die Partikel den Ratten nicht inhalativ, sondern intraperitoneal verabreicht (Park und Park, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine korrespondierenden Tierversuche mit dem gleichen Material durchgeführt werden. Aus diesem Grund kann der PICMA vor allem durch die Korrelation mit experimentellen und epidemiologischen Daten von Partikeln bekannter Toxizität validiert werden (Sauer et al., 2015, Stone et al., 2009). Es gibt eine Vielzahl bisher durchgeführter tierexperimenteller Studien zur Toxizität von SiO<sub>2</sub>, Titandioxid, Carbon Black und vereinzelt zu Bariumsulfat. Der Vergleich mit bisherigen durchgeführten Studien ist einerseits dadurch begrenzt, dass es sich um eine heterogene Expositionsdauer handelt (akute oder subchronische Expositionen), andererseits kamen verschiedene Tierstämme, Dosierungen und zu testende Partikel zum Einsatz (Steimer et al., 2005). Somit finden sich häufig auch in bereits publizierten *in vitro*- und *in vivo*-Studien widersprüchliche Befunde (z.B. bezüglich Titandioxid und Carbon Black), die eine endgültige Einordnung der hier gewonnenen *in vitro*-Ergebnisse erschweren. Um die Einordnung möglichst übersichtlich zu

gestalten, erfolgt der Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit der bestehenden Datenlage in den Folgekapiteln aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Partikeln und anhand der in Abbildung 61 gezeigten Abfolge (Epidemiologische Studien  $\rightarrow$  tierexperimentelle Studien  $\rightarrow$  *in vitro*-Studien).

## 6.3.1 Kristallines Quarz und amorphes SiO<sub>2</sub>

Im Gegensatz zu allen anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Partikeln ist kristallines Quarz ein "Human Group I carcinogen" (IARC, 1997) und bekannt dafür, chronische Entzündungsreaktionen der Lunge auszulösen (Castranova, 2000, Rimal et al., 2005). Die dauerhafte inhalative Exposition gegenüber Quarz kann Silikose und Lungenkrebs auslösen (Hnizdo und Vallyathan, 2003, Peretz et al., 2006). Eine Humanstudie an 20 Bergarbeitern belegte einen Anstieg der inflammatorischen Antwort der Lunge mit steigender Konzentration an kristallinem Quarz im Kohlestaub. Auch hier wurde die inflammatorische Antwort über die Anzahl alveolärer Makrophagen und PMNs in der BALF gemessen (Kuempel et al., 2003).

In einer subchronischen Inhalationsstudie (6 h/Tag, 5 Tage/Woche) wurden fibrotische Veränderungen in den Lungen von Ratten nachgewiesen, die gegenüber Quarzstaub exponiert waren (Reuzel et al., 1991). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die subchronische Inhalation von Quarzstaub mit einer primären Freisetzung von proinflammatorischen Chemokinen einhergeht (Johnston et al., 2000, Rao et al., 2004) und schlussendlich zur Entstehung von Karzinomen führt (Johnson et al., 1987). Van Ravenzwaay et al. (2009) zeigten, dass bereits nach einer fünftägigen Inhalation (6 h/Tag) von Quarz sowhl Läsionen als auch eine Aktivierung von Entzündungszellen (Neutrophile, Makrophagen) in der Lunge von Wistar-Ratten nachweisbar sind. In einer anderen Studie waren im Anschluss an eine fünftägige inhalative Quarzstaub-Exposition von Wistar-Ratten besonders nach einem und nach drei Monaten entzündliche Effekte messbar (Arts et al., 2007). In Fischer-344 Ratten führte die chronische Exposition (6 h/Tag, 5 Tage/Woche für 24 Monate) gegenüber Quarz zu neoplastischen Veränderungen in der Lunge und in allen Tieren der exponierten Gruppe zu Lungentumoren (Muhle et al., 1995). Aus diesen Gründen wurde Quarz in einer Studie von Klein et al. (2012) als Positivkontrolle für inhalative Partikeleffekte an der Ratte eingesetzt.

In einem *in vitro*-Experiment induzierte kristallines Quarz eine siginifikante Freisetzung von IL-6 und TNFα in RAW264.7 Zellen (Balduzzi et al., 2004). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit war das inflammatorische Potenzial von kristallinem Quarz, verglichen mit den anderen getesteten Materialien, sehr stark. Es löste eine dosisabhängige und

signifikante Einwanderung von dHL-60 Zellen aus, in der höchsten getesteten Dosis (96 µg/cm<sup>2</sup>) war kristallines Quarz hier der Partikel mit dem höchsten inflammatorischen Potenzial (Abbildung 19). Verglichen damit lag das Potenzial zur Auslösung der Migration von unbehandelten NR8383 Alveolarmakrophagen allerdings nach 16-stündiger Inkubationszeit bei gleicher Dosierung deutlich niedriger (Abbildung 25); es konnte aber gezeigt werden, dass die maximale Migration von unbehandelten NR8383 Zellen bereits nach einer 4-stündigen Quarzexposition erzielt wurde (Abbildung 32). Insgesamt betrachtet bilden daher beide Varianten des PICMA die verhältnismäßig starke inflammatorische Antwort auf die Exposition gegenüber kristallinem Quarz sehr gut ab.

Auch amorphes SiO<sub>2</sub> (engl: "silica") ist bezüglich seiner inflammatorischen und fibrotischen Eigenschaften untersucht worden. Epidemiologisch betrachtet ist der Nachweis adverser Gesundheitseffekte am Menschen dadurch erschwert, dass eine Mischexposition mit kristallinem Quarz bislang in keiner Studie ausgeschlossen werden konnte (Merget et al., 2002).

In inhalativ exponierten Wistar-Ratten verursachten drei verschiedene amorphe SiO<sub>2</sub>-Partikel ( $25 \ \mu g/m^3$ ) eine signifikante Einwanderung von Neutrophilen sowie einen Anstieg von Albumin, ALP und LDH in der BALF. Histopathologisch war eine Akkumulation von Makrophagen zu erkennen. Drei Monate nach der Exposition waren diese Effekte nicht mehr nachweisbar (Arts et al., 2007). Ein teilweiser oder vollständiger Rückgang von silica-induzierten inflammatorischen Veränderungen der Lunge wird auch in anderen tierexperimentellen Studien beschrieben (Reuzel et al., 1991, Warheit et al., 1991 und 1995, Johnston et al., 2000).

Liu et al. (2012) demonstrierten in einer Cokultur aus Endothelzellen und THP-1 Monozyten, dass amorphe SiO<sub>2</sub>-Partikel über eine Aktivierung von CD40-CD40L direkt den JNK/NF-κB Weg aktivieren und demonstrierten somit einen zugrunde liegenden Mechanismus für die inflammatorischen Eigenschaften von SiO<sub>2</sub>. Im Einklang mit diesen Daten war im PICMA ebenfalls ein hohes akutes inflammatorisches Potenzial der amorphen SiO<sub>2</sub>-Partikel nachzuweisen.

## 6.3.2 Titandioxid

Titandioxid ist unter allen granulären biobeständigen Stäuben das wohl am eingehensten untersuchte Material. Es steht im Fokus der meisten Studien, welche die Toxizität von mikroskaligen Partikeln, aber auch Nanopartikeln untersuchen, da es in großem Maßstab produziert und weiterverarbeitet wird (Noël et al., 2013). Es ist als "possibly carcinogenic to

humans (Group 2b)" eingestuft (IARC, 2010), da es epidemiologisch betrachtet bislang keinen Beweis für eine kanzerogene Gefahr durch inhalativ aufgenommenes Titandioxid gibt (Ramanakumar et al., 2008).

Bereits 1985 wurde von Lee et al. anhand einer zweijährigen Studie (6 h/Tag, 5 Tage/Woche) an CD-Sprague-Dawley-Ratten gezeigt, dass sich bei hohen inhalativen Expositionen von 250 mg/cm<sup>3</sup> Lungenkarzinome manifestieren. In einer anderen Studie wurden Wistar-Ratten gegenüber ultrafeinem Titandioxid exponiert (15–40 nm, 10 mg/m<sup>3</sup>, 18 für 2 Jahre). Im Anschluss an eine 30-monatige h/Tag, 5 Tage/Woche Nachbeobachtungszeit bestand ein statistisch signifikanter Anstieg an Adenokarzinomen der Lunge in der Expositionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Heinrich et al., 1995). Die Exposition gegenüber niedrigeren Dosierungen Titandioxid (10 und 50 mg/m<sup>3</sup>, 6 h/Tag, 5 Tage/Woche) verursachte einen alveolären Overload in Hamstern, Ratten und Mäusen, der mit erhöhten Makrophagen- und Neutrophilenzahlen in der BALF einherging. Bei der Hamsterpopulation verschwand der Effekt innerhalb 46-wöchigen der Nachbeobachtungsphase, während er bei den Ratten und Mäusen, deren alveoläre Clearance generell langsamer verläuft, bestehen blieb (Bermudez et al., 2002 und 2004). Auch van Ravenzwaay et al. (2009) zeigten, dass eine kurzzeitige Exposition (5 Tage, 6 h/Tag) von 100 und 250 mg/m<sup>3</sup> mit einem deutlichen Anstieg der Neutrophilen in der BALF von Wistar-Ratten einherging, auch wenn er nach zwei Wochen teilweise reversibel war. Innerhalb einer anderen Inhalationsstudie mit nano-Titandioxid (25 nm) führte die 30monatige Exposition zu vergleichbaren Ergebnissen (Ma-Hock et al., 2009a). Grassian et al. (2007) führten eine 4-stündige (akute) und eine 10-tägige Inhalationsstudie an C57b1/6-Mäusen durch (7,22 bzw. 8,88 mg/m<sup>3</sup>). In der Gruppe der Mäuse, die für 10 Tage exponiert wurden, konnte innerhalb der zweiwöchigen Nachbeobachtungszeit ein signifikanter Anstieg inflammatorischer Parameter (Anstieg der Gesamtzellund Makrophagenzahl) nachgewiesen werden, der nach insgesamt drei Wochen Nachbeobachtungszeit nicht mehr vorhanden war.

In einer *in vitro*-Studie mit humanen A549-Lungenepithelzellen verursachten Titandoxid-Partikel in einer Konzentration von 100 µg/ml einen Anstieg von LDH, IL-8, ROS und eine reduzierte Aktivität der Mitochondrien. Innerhalb dieser Studie war Anatas zwar zytotoxischer als Rutil, aber ausschließlich nach der Einwirkung von UV-Licht (Sayes et al., 2006). Die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) sowie Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde nach der Inkubation von Beas2B-Bronchialzellen mit Rutil (200 nm) und Anatas (200 nm) untersucht. Unter Ausschluss von UV-Licht waren in dieser Studie nur nach der Inkubation mit rutilem Titandioxid erhöhte ROS und eine Erhöhung an NO messbar, nicht aber nach der Inkubation mit Anatas. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte ein ausgeprägter und signifikanter Unterschied bezüglich des inflammatorischen Potenzials von Rutil und Anatas gezeigt werden (Abbildung 20 und Abbildung 21 bzw. Abbildung 26 und Abbildung 27). Unterschiedliche Wirkungen der verschiedenen Partikelgrößen waren im Falle von rutilem Titandioxid zwar auch erkennbar, aber nicht besonders stark ausgeprägt. Vielmehr lösten beide Rutilkörnungen eine signifikante und dosisabhängige Migration von dHL-60 Zellen und unbehandelten NR8383 Zellen aus (Abbildung 20 und Abbildung 26). Anatas löste in allen Migrationsexperimenten (unabhängig von der eingesetzten Korngröße und Dosierung) nur schwache bis gar keine Migration aus, weder von dHL-60 Zellen (Abbildung 21) noch von unbehandelten NR8383 Zellen (Abbildung 27). Die Toxizität (anhand der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte) war darüber hinaus mit 196 bzw. 255  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> deutlich geringer als die des rutilen Titandioxids (5 bzw. 18  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) (Abbildung 15 und Abbildung 16). Wie bereits angedeutet, haben bezüglich der unterschiedlichen inflammatorischen Wirkung der unterschiedlichen Kristallformen des Titandioxids verschiedene Studien widersprüchliche Ergebnisse geliefert: In vivo wurde ein signifikanter Anstieg an Entzündungsparametern (% Anstieg von Neutrophilen in der BALF) sowohl für Rutil als auch Anatas in Wistar-Ratten beobachtet. In beiden Fällen fielen die Werte innerhalb einer dreimonatigen Nachbeobachtungszeit wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe zurück (Warheit et al., 2006). In einer weiteren in vivo-Studie wurde beobachtet, dass ultrafeines Anatas einen stärkeren Anstieg von Entzündungsmarkern in der BALF und der Zellproliferation verursacht als rutiles Titandioxid (Warheit et al., 2007a). Spezielle Eigenschaften der Oberfläche und das Agglomerationsverhalten der Partikel wurden als Gründe für diese widersprüchliche Datenlage diskutiert (Roursgaard et al., 2011).

In der bereits erwähnten *in vitro*-Studie mit A549 Zellen wirkte Anatas zytotoxischer als Rutil, aber ausschließlich nach der Einwirkung von UV-Licht. In einer weiteren Studie an Caco-2 Zellen induzierten gemischt zusammengesetzte Partikel (Anatas + Rutil) im Gegensatz zu reinen Anatas-Partikeln einen signifikanten Anstieg von LDH und eine deutlich höhere Toxizität bezogen auf die Oberfläche in Caco-2 Zellen (Gerloff et al., 2012).

Für die zuverlässige Interpretation der im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse ist eine breitere Datenbasis mit standardisierten Partikelparametern nötig und bereits in Planung.

### 6.3.3 Carbon Black

Adverse Gesundheitseffekte durch die inhalative Belastung mit Carbon Black konnten in epidemiologischen Studien am Menschen bisher nicht nachgewiesen werden. Sowohl die "WHO International Agency for Research on Cancer" (IARC) als auch die deutsche MAK- Kommission (Greim, 1999) bewerten die Datenlage als nicht ausreichend für einen Beweis für adverse Gesundheitseffekte durch Carbon Black. In einem aktuellen Review wird beschrieben, dass epidemiologische Studien derzeit weder ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs noch für andere dosisabhängige Gesundheitseffekte belegen (Valberg et al., 2006).

In einer Tierstudie mit Wistar-Ratten hingegen konnte gezeigt werden, dass Carbon Black-Partikel in den gleichen, niedrigen Konzentrationen (2,5 mg/m<sup>3</sup> und 7 mg/m<sup>3</sup>) wie Diesel-Partikel unter Overload-Konditionen zu Tumoren führten (Heinrich et al., 1995). BALF Parameter wurden in dieser Studie jedoch nicht erfasst. Innerhalb einer subchronischen Inhalationsstudie mit Printex 90 (6 h/Tag, 5 Tage/Woche, 13 Wochen) wurden erhöhte Neutrophile und Makrophagen in der BALF sowie erhöhte Zytokine (CXCL2 und CCL2) nach Expositionen von 7,1 bzw. 52,8 mg/m<sup>3</sup> nachgewiesen, nicht aber in der niedrigsten Konzentration von 1,1 mg/m<sup>3</sup>. Es konnten in der mittleren und hohen Expositionsgruppe Hypertrophien von Typ II Alveolarzellen nachgewiesen werden, die während des 8monatigen Follow-Ups bestehen blieben (Driscoll et al., 1996). Gilmour et al. (2004) exponierten Wistar-Ratten für 7 Stunden gegenüber feinem (1,40 mg/m<sup>3</sup>) und ultrafeinem (1,66mg/m<sup>3</sup>) Carbon Black. Ein Anstieg der Gesamtzellzahl sowie ein Anstieg der Neutrophilen in der BALF waren direkt im Anschluss an die Detektion und auch nach 16 Stunden messbar. Auch hier war eine Erhöhung von CXCL2 2 Tage nach der Exposition mit ultrafeinem Carbon Black nachweisbar (Gilmour et al., 2004).

*In vitro* führte die 48-stündige Exposition von humanen Bronchialepithelzellen (16HBE14o-) mit Carbon Black-Partikeln (95 nm) zu einer vermehrten Freisetzung von GM-CSF und IL-8, wenn auch in einem niedrigeren Ausmaß als die ebenfalls getesteten Dieselpartikel (Boland et al., 1999). Innerhalb der toxikologischen Studien des NanoCare-Projekts wurde Carbon Black *in vitro* getestet (Schnekenburger et al., 2009): Es wurde auf diverse Zelllinien (u.a. A549, RLE-6TN) appliziert und anschließend verschiedene Entzündungsmarker erfasst, z.B. LDH-Freisetzung, ROS und IL-8-Sekretion. Die Exposition von murinen RAW 264.7 Makrophagen und der humanen Bronchialepithelzelllinie A549 gegenüber relativ niedrigen Konzentrationen Carbon Black (0,5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) führte bereits zu einer vermehrten Freisetzung von radikalen Sauerstoffspezies. Eine vermehrte Freisetzung von LDH und IL-8 konnte ab einer Dosis von 25 bzw. 50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> gemessen werden.

Im Einklang mit den meisten vorliegenden Daten zeigte Carbon Black innerhalb dieser Arbeit *in vitro* ein vergleichsweise hohes inflammatorisches Potenzial. Die Migration von dHL-60 Zellen konnte mit den Überständen von mit Carbon Black inkubierten NR8383 Zellen signifikant und dosisabhängig ausgelöst werden (Abbildung 22). Da Carbon Black ein

ausgesprochen hydrophobes Material ist, wurde es nur schlecht von biologischem Medium benetzt und schwamm teilweise auf der Oberfläche des Mediums. Aus diesem Grund wurde in der zweiten Version des PICMA nicht mehr getestet, ob Carbon Black auch unbehandelte NR8383 Zellen anlocken kann. Ein inflammatorisches oder toxisches Potenzial von Carbon Black konnte epidemiologisch bislang nicht nachgewiesen werden. Ähnlich wie beim Titandioxid ist die Datenlage hier nicht breit genug und zu kontrovers diskutiert, als dass man bezüglich der inflammatorischen Eigenschaften eine endgültige Aussage treffen könnte, auf deren Basis die vorgelegten Ergebnisse eingeordnet werden können.

### 6.3.4 Bariumsulfat

Bariumsulfat ist der wohl bislang am wenigsten untersuchte Vertreter der poorly soluble particles bzw. der granulären biobeständigen Stäube, obwohl er ein wichtiger und weit verbreiteter Bestandteil von Farben und Coatings ist und unter anderem bei der Herstellung von Cellophan verwendet wird. Darüber hinaus gibt es innovative Anwendungsfelder von nanoskaligem Bariumsulfat als Zusatz zu Knochenzement und weiteren Medizinprodukten (Gillani et al., 2010, Aninwene et al., 2013).

Bariumsulfat ist so unlöslich, dass es in großen Mengen peroral als Röntgenkontrastmittel verabreicht werden kann, obwohl das Barium-Ion selbst toxische Eigenschaften aufweist. Eine berufliche inhalative Exposition gegenüber Bariumsulfat-Partikeln kann überall auftreten, wo Bariumsulfat-haltige Produkte produziert, transportiert oder weiterverarbeitet werden (Konduru et al., 2014). Epidemiologisch wurde diskutiert, dass vor allem mikroskalige Bariumsulfatpartikel in Bergleuten eine benigne Pneumokoniose auslösen (Doig, 1976, Dosios und Karydas, 2003). Eine Mischexposition mit z.B. Quarzstäuben ist im Bergbau jedoch üblich und konnte in keiner der Studien ausgeschlossen werden, weswegen das toxische Potenzial von Bariumsulfat auf der Basis von epidemiologischen Studien nicht evaluiert werden konnte.

Insgesamt wurden nur wenige Studien mit Bariumsulfat-Partikeln an Ratten durchgeführt. In einer subchronischen Inhalationsstudie mit Ratten war ein Anstieg an Neutrophilen in der BALF nach der Exposition mit Titandioxid, nicht aber mit Bariumsulfat messbar. Die Größe beider Partikel bewegte sich im Mikrometerbereich und die Exposition war bei beiden Partikeln ähnlich hoch (37,5 and 75 mg/m<sup>3</sup>) (Tran et al., 2000, Cullen at al., 2000). Neuerdings wurden Inhalationsstudien publiziert, in denen das inflammatorische Potenzial von nano-Bariumsulfat untersucht wurde (Klein et al., 2012, Landsiedel et al., 2014b). Ratten wurden mit einer Dosis von 50 mg BaSO<sub>4</sub>/m<sup>3</sup> exponiert, jeweils 6 Stunden/Tag über einen Gesamtzeitraum von 5 Tagen. Direkt nach der Exposition betrug die Beladung der Lunge 1,1 mg, sie reduzierte sich während der Nachbeobachtungszeit auf 0,24 mg/Lunge. Innerhalb der Expositionszeit und des Follow-Ups wurden bis zu einer Konzentration von 50 mg/m<sup>3</sup> keine lokalen oder systemischen Effekte gemessen. Untersucht wurde u.a. der Anstieg von Neutrophilen, LDH, GCP-2 und MCP-1. In einer weiteren Studie kamen Bariumsulfat-Partikel in einem Größenbereich von 100-300 nm zum Ensatz (je nach Konzentration), mit denen Ratten 4 Wochen (50 mg/m<sup>3</sup>) exponiert wurden. Nach einem Tag wurde ein leichter Anstieg an neutrophilen Granulozyten und Chemokinen (z.B. MCP-1) festgestellt, jedoch wurde ein vollständiger Rückgang der Effekte nach 35 Tagen nachgewiesen (Konduru et al., 2014).

Innerhalb der toxikologischen Studien des NanoCare-Projekts wurde Bariumsulfat in vitro getestet (Schnekenburger et al., 2009): Es erfolgte eine Applikation auf diverse Zelllinien (u.a. A549, RLE-6TN) mit anschließender Messung verschiedener Entzündungsmarker, z.B. LDH Freisetzung, ROS und IL-8 Sekretion. Bariumsulfat war in dieser in vitro Studie auch ein ausgesprochen inertes Material und wird innerhalb des Rankings der in vitro-Toxizität als untoxischstes Material innerhalb der untersuchten Substanzen eingeordnet, auch deutlich unterhalb des getesteten Titandioxids. In keiner der genannten Studien lag Bariumsulfat wirklich als Nanopartikel vor, sondern die Exposition erfolgte mit Agglomeraten aus Nano-Bairumsulfatpartikeln, die im Mikrometer-Bereich lagen. Verlässliche Rückschlüsse über die Toxizität von Nano-Bariumsulfatpartikeln konnten aus diesen Studien daher nicht gezogen werden. Der Durchmesser eines Nanopartikels beträgt per Definition zwischen 1 und 100 nm (Tsuji et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Bariumsulfatpartikel synthetisiert, die (auch für den Chemotaxisassay suspendiert) der Definition eines Nanopartikels entsprechen. Diese Partikel konnten bezüglich ihrer inflammatorischen und toxischen Eigenschaften vergleichend untersucht werden zu submikround mikroskaligen Bariumsulfatpartikeln gleicher Zusammensetzung.

Im Einklag mit bisher publizierten Daten weist Bariumsulfat innerhalb dieser Arbeit kein inflammatorisches Potenzial auf. Die Inkubation von NR8383 Zellen mit dem kommerziell erhältlichen, stark agglomerierten Bariumsulfat führte nicht zu Zellüberständen, mit denen eine Migration von unbehandelten NR8383 und dHL-60 Zellen ausgelöst werden konnte (Abbildung 23 und Abbildung 28). Der experimentell bestimmte  $IC_{50}$ -Wert lag ebenfalls vergleichsweise hoch (456 µg/cm<sup>2</sup>, Abbildung 17).

Aus diesen Gründen eignete sich Bariumsulfat sehr gut, um mögliche Auswirkungen einer Modifikation von Partikelparametern auf das inflammatorische Potenzial zu untersuchen. Im Fortgang der Arbeit wurden daher suspendierbare Bariumsulfat-Partikel synthetisiert und im Migrationsassay untersucht (Abbildung 49 und Abbildung 50). Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch nanoskaliges Bariumsulfat, welches effizient von Alveolarmakrophagen phagozytiert wird, in vitro kein inflammatorisches und toxisches Potenzial aufweist (keine Zellmigration im Migrationsassay, keine Freisetzung von TNFa, CCL2, IL-6 und LTB<sub>4</sub>). Auch in den anderen synthetisierten Größen konnten die Partikel in keiner Konzentration eine signifikante Migration von NR8383 und dHL-60 Zellen bewirken. Im Durchflusszytometer konnte erst ab einer Konzentration von 200 µg/ml (Abbildung 47C, mikroskalige Partikel) ein nekrotischer Effekt nachgewiesen werden, bei allen anderen Partikeln in keiner der gesteteten Konzentrationen (Abbildung 47A und B sowie Abbildung 48). Die Kombination aus detaillierten in vitro-Untersuchungen und der gezielten Synthese (Nano)-Materialien bietet einen funktionellen Ansatz, mit dem weitere von Partikeleigenschaften (z.B. Modifikationen der Oberfläche, s. Kapitel 6.4) zukünftig gezielt untersucht werden können.

Abschließend betrachtet sind Versuche an Tieren – abgesehen von der Bedenklichkeit seitens des Tierschutzes – mit zahlreichen Problemen behaftet. Die Lunge von Versuchstieren entspricht generell in ihrem komplexen Aufbau durchaus dem des Menschen, allerdings ist auch hier mit diversen speziesbedingten Besonderheiten zu rechnen. Zum Beispiel führt die unterschiedliche Verästelung der Ratten- bzw. der Menschenlunge (d.h. eine unterschiedliche Lungengeometrie) zu unterschiedlichen Depositionsmechanismen, Depositionsorten und -kinetiken (Ménache et al., 1995 und 2008). Auch die oberen Atemwege unterscheiden sich deutlich voneinander. Hier sind die Ausprägung von Nasenbzw. Mundatmung, die Aktivität (Ruhe oder in Bewegung) und die Geometrie der oberen Atemwege wichtige Einflussfaktoren (Hofmann et al., 2000, Miller et al., 2014). Ratten sind obligatorische Nasenatmer, während Menschen durch Nase und Mund atmen und das Verhältnis zusätzlich je nach körperlicher Aktivität schwankt. Daher findet in der Nasenregion der Ratte eine höhere Partikeldeposition statt als in der des Menschen, und die Größe der inhalierbaren Partikel ist bei Mensch und Ratte unterschiedlich (Ménache et al., 1995).

Außerdem ist die alveoläre Clearance bei der Ratte etwa 10-mal schneller als beim Menschen (Snipes, 1989), obwohl der Mensch über ein deutlich größeres Gesamtvolumen an Alveolarmakrophagen verfügt (Geiser, 2010). Dennoch sind Tierexperimente derzeit die beste Möglichkeit, um die Toxizität von inhalativ aufgenommenen Partikeln für den Menschen zu beurteilen (Pauluhn und Mohr, 2000). Daher wird auf Basis dieser Einordnungen zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen, dass der Test sich eignet, um die relativen toxischen bzw. inflammatorischen Wirkungen von verschiedenen Materialien (SiO<sub>2</sub>, Quarz, Bariumsulfat) dosisabhängig, kostengünstig und richtig vorherzusagen. In der Folge der Studie könnten daher synthetisch hergestellte modifizierte Partikel zum Einsatz kommen, um den Einfluss z.B. der Partikelgröße, des Zetapotenzials oder der Morphologie gezielt und zunächst ohne den Einsatz von Tieren zu testen.

## 6.4 Einfluss von Partikelparametern

Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Parameter auf die Toxizität von Partikeln. Aus diesem Grund existiert ein Mindestmaß an Partikeleigenschaften, die bestimmt werden müssen, um deren Einfluss auf die Toxizität beurteilen zu können: chemische Zusammensetzung, Reinheit und Form (Limbach et al., 2007, Yang et al., 2009) (PXRD, ICP-MS), Kristallinität (PXRD), Größe der Partikel (Auffan et al., 2009) (REM), spezifische Oberfläche (Duffin et al., 2007, Donaldson et al., 2008) (BET), Löslichkeit/Suspendierbarkeit in Wasser, Oberflächeneigenschaften (z.B. Zetapotenzial) (die jeweils von Landsiedel et al. (2010) vorgeschlagenen analytischen Verfahren in Klammern). Auch die OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development) hat physikochemische Parameter benannt, die einen Einfluss auf die Toxizität von Partikeln haben könnten: Hierzu zählen Agglomeration, Wasserlöslichkeit, Kristallinität, Kristallitgröße, Morphologie, Partikelgrößenverteilung, Zetapotenzial, photokatalytische Eigenschaften, Dichte und Porosität (OECD 2008, Madl und Pinkerton, 2009). Darüber hinaus wird eine kritische Volumenbelastung des Makrophagen angegeben, aus der eine verminderte Clearanceleistung resultiert (Morrow, 1988). Pauluhn argumentiert in mehreren Publikationen (2010, 2011, 2014), dass bis zu einer Volumenbelastung von 6 % des Alveolarmakrophagen mit Partikeln keine adversen Effekte und keine Zunahme an Entzündungszellen oder markern stattfinden. Daher müsste auch die Agglomeratdichte der Partikel im Makrophagen Beachtung finden.

Ohne ausführliche Charakterisierung des Probenmaterials ist weder eine deutliche Aussage noch eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien möglich (Murdock et al., 2008). Aus diesem Grund war die physikochemische Charakterisierung der Partikel ein wichtiger und integraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit, vor allem weil die Einordnung der Ergebnisse auf Basis bisher publizierter Tierversuche ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Aussagekraft des Assays ist.

Von allen Partikeln konnten der Anteil und die Identität kristalliner Phase, Morphologie und Größe der Primärpartikel, Agglomerationsgröße im Kulturmedium, Partikelgrößenverteilung und die Größe der spezifischen Oberfläche bestimmt werden. Das Zetapotenzial wurde nur von den Bariumsulfat-Partikeln bestimmt, da die schnelle Sedimentation der kommerziell erworbenen Partikel innerhalb der Messküvette eine Bestimmung des Zetapotenzials unmöglich machte. Auf die Bestimmung der Wasserlöslichkeit konnte an dieser Stelle verzichtet werden, da GBS sich über ihre ausgesprochen schlechte Wasserlöslichkeit zur Bestimmung photokatalytischer Eigenschaften der Partikeloberfläche lag zum Zeitpunkt der

Durchführung dieser Arbeiten nicht vor, ebensowenig für die Bestimmung der Agglomeratdichte innerhalb der Makrophagen.

Die meisten der bisher publizierten Studien, die den Einfluss verschiedener Partikelparameter auf die Toxizität untersuchen, wurden mit schwerlöslichen Partikeln wie z.B. Titandioxid oder Carbon Black durchgeführt. Auf der Basis von *in vivo*-Studien wird zumeist die Größe der Partikel als wichtiger Einflussfaktor für ihr toxisches Potenzial beschrieben (Oberdörster et al., 1990, Ferin et al., 1990). Auch Donaldson et al. schlussfolgern aus ihren Studien, dass ultrafeine Partikel von Metalloxiden ein höheres inflammatorisches Potenzial aufweisen als feine Partikel des gleichen Materials (2002, 2008). In epidemiologischen Studien fand sich bislang kein Beweis dafür, dass die Partikelgröße (fein oder ultrafein) einen Einfluss auf deren Toxizität hat (Barn et al., 2006). Auf der Basis der nach wie vor sehr lückenhaften Datenlage lehnen Gebel et al. (2014) die generelle Einschätzung von Nanomaterialien als Gesundheitsgefahr ab und schlagen eine differenziertere Betrachtung der Partikel (gruppiert nach chemischen Eigenschaften) vor.

Dennoch wird die Partikelgröße besonders als Einflussfaktor auf eine mögliche Translokation der Partikel in den Zellkern im Anschluss an die Phagozytose diskutiert. Nanoskalige, fluoreszenzmarkierte Partikel können möglicherweise z.B. in Epithelzellen aufgenommen werden, an der zytoplasmatischen Seite der Zellkernmembran akkumulieren und in den Zellkern eindringen (Unfried et al., 2007). In einer Studie von Chen und Mikecz (2005) wurden fluoreszenzmarkierte SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel im Zellkern von verschiedenen *in vitro* inkubierten humanen Lungenepithelzellen und Fibroblasten nachgewiesen. Als Folge werden in diesem Zusammenhang DNA-Schäden diskutiert, z.B. die Induktion von Mutationen und die Aktivierung von Signalkaskaden, die zur Apoptose der Zelle führen (Schins und Hei, 2006). Porter et al. (2006) wiesen Nanopartikel aus Carbon nicht nur in Lysosomen, sondern ebenfalls im Kern von humanen Monozyten nach.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte die Distribution verschiedener Bariumsulfat-CMC-Partikel in NR8383 Alveolarmakrophagen vergleichend untersucht werden. Es wurde überprüft, ob nanoskalige Partikel in diesem Modell in den Zellkern aufgenommen werden (einhergehend mit möglichen apoptotischen Effekten), während submikro- und mikroskalige Partikel dies eventuell nicht tun. Unabhängig von der Größe der Partikel war nach 16stündiger Inkubationszeit keine Translokation des Bariumsulfats in den Zellkern nachweisbar. Eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nach der Inkubation mit Bariumsulfat-Partikeln war ebenfalls nicht nachweisbar. Ein Einfluss der Partikelgröße auf den zellulären Schädigungsmechanismus der eingesetzten NR8383 Alveolarmakrophagen kann in dieser Studie daher nicht belegt werden. Andere Autoren messen der Größe der Partikeloberfläche einen entscheidenden Einfluss auf deren inflammatorische Eigenschaften bei (Stoeger et al., 2006, Duffin et al., 2007). Es wird angenommen, dass das inflammatorische Potenzial der granulären biobeständigen Stäube direkt von der Größe der Oberfläche bestimmt wird (Donaldson et al., 2000, Brown et al., 2001). Unabhängig davon sind manche Partikel (z.B. SiO<sub>2</sub>, besonders in der kristallinen Form Quarz) bekannt für ihre spezifische Toxizität, die unter anderem durch katalytische Eigenschaften auf der Oberfläche hervorgerufen werden könnte (Warheit et al., 2007a und b, Marzaioli et al., 2014). Die inflammatorischen Eigenschaften von DQ12-Quarz konnten durch ein Coating der Partikel mit Polyvinylpyridine-N-oxid bzw. Aluminiumlactat reduziert werden (Albrecht et al., 2004 und 2005).

Trotz sorgfältiger Charakterisierung der Partikel war anhand der kommerziell erworbenen Partikel keine Korrelation auf Basis der physikochemischen Eigenschaften möglich; weder auf Basis der Daten zur Morphologie, noch zur spezifischen Oberfläche, der Agglomeratgröße im Medium oder der primären Partikelgröße. Ihre physikochemischen Eigenschaften waren zu heterogen, als dass sich ein besonders kritischer Partikelparameter herausgestellt hätte. Daher kamen im zweiten Teil der Untersuchungen eigens für diese Arbeit synthetisierte Bariumsulfat-Partikel zum Einsatz. Sie wurden gezielt so synthetisiert, dass sie sich nur in einem Parameter unterschieden (z.B. Partikelgröße), während z.B. das Zetapotenzial und die Suspendierbarkeit in biologischem Medium konstant blieben. Der Einfluss einzelner physikochemischer Eigenschaften kann somit isoliert untersucht werden. Die Bariumsulfat-Partikel waren mit relativ geringem Aufwand herstellbar und blieben in Zellkulturmedium stabil.

Daher entfiel in diesem Teil der Arbeit der Einfluss der Agglomeratbildung, der zuvor die Aussagekraft des Assays in Bezug auf die Primärpartikelgröße begrenzte. Um eine eventuelle Agglomeration der Partikel im Suspensionsmedium zu quantifizieren, wurden die hydrodynamischen Partikeldurchmesser im suspendierten Zustand aufgenommen. Eine Charakterisierung der Partikelgrößen im trockenen Zustand (REM) hätte die Exposition der NR8383 Zellen nur unzureichend wiedergegeben. Schon beim ersten optischen Eindruck und später beim Handhaben/Pipettieren der Suspensionen aus den kommerziell erworbenen Partikeln wurde deutlich, dass die Partikel im Medium (aufschüttelbare) Agglomerate bildeten und auch sehr schnell im Gefäß sedimentierten. Der gleiche Effekt erschwerte die Messungen mit dem DLS-Gerät: Es wurden pro Messung jeweils drei Wiederholungen durchgeführt, von denen eine jeweils fünf Minuten dauerte. Die Küvette mit den suspendierten Partikeln befand sich demnach 15 Minuten im Messgerät. In dieser Zeit fanden Sedimentationseffekte statt, die sich auch in den Messergebnissen niederschlugen: Bei manchen Messungen war die ermittelte Partikelgröße annähernd reproduzierbar (z.B. feines Rutil), während die Messwerte von feinem Quarz oder Bariumsulfat nicht nur von Messung zu Messung schwankten, sondern zusätzlich eine große Standardabweichung aufwiesen. Aufgrund dieser Sedimentationseffekte sind die hydrodynamischen Partikeldurchmesser der kommerziell erworbenen Partikel nur als Annäherung zu betrachten. Sie sollen hier als Einschätzung dienen, in welcher Größenordnung die Agglomerate lagen, welchen die NR8383 Makrophagen ausgesetzt wurden.

Darüber hinaus korrelierte die Größe der Agglomerate nicht mit den Primärpartikelgrößen. So bildete das feine SiO<sub>2</sub> im Kulturmedium größere Agglomerate als das grobe Quarz; gleiches gilt für die Anatas-Partikel. Nur im Falle von Rutil waren die Agglomerate der feineren Variante kleiner als die der groben Variante (Tabelle 23). Selbst bei den synthetisch gewonnenen, mikroskaligen Bariumsulfat-Partikeln spielt die verhältnismäßig deutlich langsamere Sedimentierung noch immer eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die adhärenten Zellen auf dem Boden der Zellkulturflasche eine signifikant höhere Menge mikroskaliges Bariumsulfat aufnahmen als die suspendierten Zellen (Abbildung 44C und Abbildung 46C). Die Partikel, die nachweisbar über einen Zeitraum von 16 Stunden suspendiert blieben (nano- und submikroskaliges Bariumsulfat), wurden von beiden Zellfraktionen gleich gut phagozytiert (Abbildung 44A und B und Abbildung 46A und B). So konnte der Einfluss des Dispersionsmediums, den andere Autoren als eines der größten Hindernisse bei der Etablierung eines in vitro-Systems beschreiben (Schulz et al., 2008), zum ersten Mal kontrolliert werden. Anhand der Bariumsulfatpartikel konnte der Einfluss der Primärpartikelgröße auf das inflammatorische Potenzial untersucht werden, obwohl biologisches Medium zum Einsatz kam. Bislang lag nur eine einzige in vitro Stude zu Bariumsulfat vor, dort waren die Primärpartikel aber zu Mikropartikeln aggregiert (Schnekenburger et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die den Einfluss von Nano- und Mikropartikeln *in vitro* ohne einen störenden Einfluss durch Agglomeratbildung vergleichend gegenüberstellen konnte. Ein Einfluss der Partikelgröße auf das inflammatorische Potenzial von Bariumsulfat konnte im Rahmen der Untersuchungen nicht gezeigt werden. Vielmehr stellten sich die Bariumsulfatpartikel in allen drei Größen als ausgesprochen inert dar. Die vorliegenden Daten legen den Schluss nahe, dass es auch innerhalb der GBS einige Partikel (z.B. rutiles Titandioxid) gibt, die eine spezifische Toxizität aufweisen, andere Partikel (z.B. Bariumsulfat) hingegen nicht. Die Kombination aus detaillierten *in vitro*-Untersuchungen, einschließlich des hier vorgestellten PICMA, und der gezielten Synthese von (Nano)-Materialien bieten einen neuen funktionellen Ansatz, mit dem weitere Partikeleigenschaften (z.B. Modifikationen der Oberfläche) zukünftig gezielt untersucht werden können.

## 6.5 Bisherige in vitro-Möglichkeiten und Beteiligung einzelner Zytokine

Die Entwicklung, Standardisierung und Validierung von *in vitro*-Assays zum Screening von neuen potentiellen inhalierbaren Gefahrstoffen wird in verschiedenen Arbeiten mit großer Priorität behandelt (Sayes et al., 2007, Stone et al., 2009). Viele *in vitro*-Assays fokussieren auf den Gebrauch von alveolären Epithelzellen, auf denen sich die inhalierten Partikel zunächst deponieren (Review: Steimer et. al., 2005). Besonders die humanen Bronchialepithelzelllinien Beas2B und A549 wurden in der Vergangenheit eingesetzt, um die Einwirkung von Substanzen auf alveoläres Epithel zu untersuchen, sei es durch Ozon (Mögel et al., 1998), biobeständigen Staub (Kennedy et al., 1998) oder Zigarettenrauch (Fukano et al., 2006). Da den Alveolarmakrophagen eine Schlüsselrolle in der Clearance von unlöslichen Partikeln aus der Lunge zukommt, ist die Aussagekraft eines *in vitro*-Assays, der ganz ohne Makrophagen auskommt, allerdings fraglich (Landsiedel et al., 2014a).

In letzter Zeit werden auch sehr komplexe *in vitro*-Kulturmodelle beschrieben, mit denen z.B. die Einwirkung von Zigarettenrauch an einem sogenannten "air-liquid interface" untersucht wird. Das potentiell toxische Agens wird in diesem Fall direkt auf humane Bronchialepithelzellen vernebelt (Aufderheide et al., 2015). Darüber hinaus wurden vereinzelt interessante Co-Kulturmodelle aus Epithelzellen und Makrophagen etabliert, welche die komplexen zellulären Interaktionen in der Lunge realistischer wiedergeben sollen (Diabaté et al., 2008, Wottrich et al., 2004). Leider beschränkten sich die Autoren in diesen Studien ausschließlich auf die Freisetzung einzelner Zytokine und Chemokine als Endpunkt, z.B. IL-6 und IL-8. Das komplexe Gemisch aus Zytokinen, das für die Migration von Entzündungszellen verantwortlich ist, wurde in diesem Rahmen vernachlässigt.

Sowohl Alveolarmakrophagen als auch Epithelzellen und Neutrophile können Zytokine produzieren (Courtney et al., 2004). Wie eingangs erwähnt, ist die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten infolge einer inhalativen Partikelexposition einer der bekanntesten Marker für die *in vivo*-Toxizität (Klein et al., 2012). Mehrere Autoren beschreiben die Attraktion von Neutrophilen als einen der sensitivsten inflammatorischen Endpunkte im Zusammenhang mit der inhalativen Exposition gegenüber Partikeln (Ma-Hock et al., 2009a, Donaldson et al., 2008). Auch der kontinuierliche Influx von Makrophagen zum Entzündungsherd wird im Zusammenhang mit adversen Gesundheitseffekten durch Partikel beschrieben (Brain, 1986). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit genau dieser funktionelle Endpunkt, nämlich das Ausmaß der Migration von Entzündungszellen, als *in vitro*-Assay etabliert. Es konnten zum ersten Mal dosisabhängige, signifikante und mit *in vivo*-Daten vereinbare Effekte von schwer löslichen, partikulären und faserförmigen Stäuben mit einem Migrationsassay abgebildet werden. Parallele Untersuchungen des Zytokin/Chemokin-

Musters, die im Rahmen der Etablierung dieses Assays durchgeführt wurden, zeigten dabei, dass ein sehr breites Spektrum an Zytokinen sezerniert wird. Andere *in vitro*-Studien fokussieren zumeist darauf, Zellen zunächst mit Partikeln oder Fasern zu inkubieren und daraufhin Zytokine (z.B. TNFα) im Überstand der Zellen nachzuweisen.

Die Beteiligung einzelner Entzündungsmediatoren, die auch in vorherigen Studien schon beschrieben wurden, konnte in dieser Arbeit durchaus bestätigt werden (z.B. TNFα, IL-6 und IL-10). Dennoch wurde das komplexe Gemisch aus Zytokinen, das *in vitro* (und vermutlich auch *in vivo*) für die Migration von Entzündungszellen verantwortlich ist, in bisherigen *in vitro*-Ansätzen vernachlässigt. In einem aktuellen Review wird die Quantifizierung proinflammatorischer Proteine als sehr hilfreich evaluiert, allerdings wird auch hier darauf hingewiesen, dass es sinnvoller sei, ein breites Spektrum an Zytokinen zu messen, da einzelne dieser Proteine unterschiedlich reguliert sein könnten (Stone et al., 2009). Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Chemotaxisassay wurde validiert, in dem die RNA-Transkription verschiedener Zytokine gemessen wurde. Nichtsdestotrotz muss bei der Betrachtung der Ergebnisse bedacht werden, dass die transkribierte RNA nicht zwangsläufig mit der Proteinmenge korreliert. Einflussfaktoren können hier posttranskriptionale Modifikationen, die Stabilität der RNA oder die Stabilität des Proteins sein (Brown et al., 2004). Daher ist im nächsten Schritt der systematische Nachweis von Zytokinen und Chemokinen mittels ELISA geplant.

TNFα spielt eine zentrale Rolle als Entzündungsmediator. Insbesondere fördert es die Permeabilität des Endothels für Neutrophile und stimuliert deren Einwanderung in Richtung des Entzündungsherdes (Brett et al., 1989, Furie und McHugh, 1989), übt selbst aber keine chemotaktische Wirkung auf Immunzellen aus (Driscoll et al., 1997). Erhöhte Konzentrationen von TNFa wurden in der BALF von Patienten mit einer Lungenfibrose nachgewiesen (Courtney et al., 2004). Im Mausmodell spielt TNFα eine zentrale Rolle bei der Induktion einer Silikose (Davis et al., 1998). In in vitro-Studien führte die Exposition von humanen und Ratten-Makrophagen mit SiO<sub>2</sub> und Asbestfasern zu einer vermehrten Freisetzung von TNF $\alpha$  (Dubois et al., 1989, Claudio et al., 1995, Driscoll et al., 1990, Simeonova und Luster, 1995). Im Einklang mit diesen Daten konnte in den Überständen von mit feinem SiO<sub>2</sub> exponierten NR8383 Zellen eine erhöhte TNFα-Transkription gemessen werden (Abbildung 51A), nicht aber in den mit Bariumsulfatpartikeln inkubierten Zellen (Abbildung 52). Hier führte nur die Exposition der Zellen mit nanoskaligen Bariumsulfat-CMC-Partikeln in der höchsten Konzentration (100 µg/ml) zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von TNFa (Abbildung 52A), sodass man, wenn überhaupt, den nanoskaligen Bariumsulfat-Partikeln ein inflammatorisches Potenzial zuordnen könnte, nicht aber den mikro- und submikroskaligen Partikeln. Darüber hinaus führte die 4- bzw. 16-stündige

Inkubation von NR8383 Zellen mit feinem SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und grobem Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) zu einer signifikant erhöhten Transkription von TNF $\alpha$  (Abbildung 33E). Die Erhöhung befand sich jeweils im Einklang mit der im PICMA gemessenen Anzahl migrierter Zellen (Abbildung 32).

Weiterhin induzierte die Inkubation von humanen primären Alveolarmakrophagen mit Partikeln eine Freisetzung von TNF- $\alpha$ , ebenso von IL-6 (Gosset et al., 1991). IL-6 wird als Co-Stimulans für die Mobilisierung von T-Zellen diskutiert (Kimber et al., 2000) und war in Studien an der Maus ebenfalls nach der intratrachealen Applikation von Quarz und Titandioxid erhöht (Roursgaard et al., 2011, Review: Shi et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein deutlicher, aber nicht statistisch signifikanter Anstieg von IL-6 auf RNA-Ebene belegt werden in NR8383 Zellen, die über einen Zeitraum von 16 Stunden mit feinem SiO<sub>2</sub> (16 µg/cm<sup>2</sup>) bzw. grobem Quarz (64 µg/cm<sup>2</sup>) inkubiert worden waren (Abbildung 31A). Dieser Anstieg war nicht vorhanden in denjenigen NR8383 Zellen, die mit Bariumsulfat (32 µg/cm<sup>2</sup>) inkubiert worden waren (Abbildung 31A). Im Anschluss an eine 16-stündige Inkubation von NR8383 Zellen mit synthetisch hergestelltem Bariumsulfat war IL-6 mittels ELISA nicht nachweisbar (Abbildung 52), aber auch ebensowenig nach der Exposition mit feinem SiO<sub>2</sub> (Abbildung 51). In der Gesamtbetrachtung scheint die Beteiligung von IL-6 an der hier *in vitro* abgebildeten Entzündungsreaktion gering zu sein.

Das CXC-Chemokin IL-8 (bzw. CXCL8) ist beim Menschen ein sehr potenter Mediator für die Einwanderung von Neutrophilen und deshalb ein häufig gewähltes Target bei der Untersuchung chronischer entzündlicher Effekte durch Partikel (Murphy, 1997). Es ist eines der am häufigsten *in vivo* beschriebenen Chemokine, das eine Art Schlüsselrolle als neutrophiles Chemoattraktans einnimmt. Ein CXCL8-Homolog existiert nicht in der Ratte, allerdings werden seine Funktionen als Chemoattraktrans für Neutrophile hier durch andere Chemokine ersetzt, z.B. CCL3, CCL4 und CXCL1 (Bozic et al., 1994, Frevert et al., 1995, Scuri et al., 2010). Ein Anstieg von CXCL1 (auch KC genannt) sowie von Neutrophilen in der Lunge von BALB/c-Mäusen wurde nach der Inhalation von SiO<sub>2</sub>-gecoatetem Rutil (4 Tage bzw. 4 Wochen) gemessen. Die Stimulation von murinen Keratinozyten mit diesen Partikeln führte zu einer vermehrten Freisetzung von CXCL1 und CXCL8 (Rossi et al., 2010). In anderen Studien wird es im Zusammenhang mit Partikel-induzierter Entzündung der Lunge als eines der proinflammatorischen Schlüsselproteine *in vitro* diskutiert (Musah et al., 2012) und in Beas2B Bronchialepithelzellen nach der Exposition von PM<sub>10</sub> Staub vermehrt gebildet (Oeder et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein deutlicher Anstieg der RNA-Transkripte von CXCL1 nach der 4- und 16-stündigen Exposition der NR8383 Zellen mit grobem Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und feinem SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), nicht aber nach der Exposition mit Bariumsulfat (32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)
nachgewiesen (Abbildung 31B und Abbildung 33C). Die erhöhte Transkription befand sich jeweils im Einklang mit der im PICMA gemessenen Anzahl migrierter Zellen (Abbildung 30) und scheint daher im Zusammenhang mit der Partikel-induzierten Migration von Neutrophilen und Makrophagen eine wichtige Rolle einzunehmen.

CCL3 ist ein Chemoattraktans für Entzündungszellen in Mäusen, Ratten und Menschen. Es wurde gezeigt, dass das sogenannte Macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1/CCL3) eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Immunzellen in der Lunge der Maus einnimmt. In intratrachealen Instillationen mit SiO<sub>2</sub> und Titandioxid wurde mit subtoxischen Konzentrationen der Partikel ein Anstieg von CCL3 (und CXCL2) erzielt. Daraus wurde gefolgert, dass sowohl CCL3 als auch CXCL2 zumindest teilweise für die Rekrutierung von Immunzellen nach der Deposition von Partikeln in der Lunge verantwortlich sind (Driscoll et al., 1993). Im Rahmen dieser Arbeit lösten Quarz (64 µg/cm<sup>2</sup>) und feines SiO<sub>2</sub> (16 µg/cm<sup>2</sup>) nach der 4- und 16-stündigen Inkubationszeit einen deutlichen Anstieg der RNA-Expression von CCL3 (MIP-1α) aus (signifikant zur Kontrolle bei feinem Quarz zu beiden Zeitpunkten) (Abbildung 31B und Abbildung 33A). Dieser Anstieg war nicht nachweisbar nach der 1-, 4- und 16-stündigen Inkubation mit Bariumsulfat (32 µg/cm<sup>2</sup>) (Abbildung 33A).

Leukotrien B<sub>4</sub> ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ein potentes Chemoattraktans (Bray et al., 1981). Nach der Stimulation von primären Alveolarmakrophagen (Ratte/Rind) durch SiO<sub>2</sub> *in vitro* konnte eine gesteigerte LTB<sub>4</sub> Aktivität nachgewiesen werden (Dubois et al., 1989, Englen et al., 1989). Auch in *in vivo* Studien konnten gesteigerte LTB<sub>4</sub> Level während der akuten Form der Silikose nachgewiesen werden (Sporn, 1990). Daher wurde die Leukotrien B<sub>4</sub>-Bildung sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Eine veränderte Regulation der Leukotrien B<sub>4</sub>-Transkription konnte aber nicht beobachtet werden nach der Exposition von NR8383 Zellen mit BaSO<sub>4</sub> (32 µg/cm<sup>2</sup>), grobem Quarz (64 µg/cm<sup>2</sup>), feinem SiO<sub>2</sub> (16 µg/cm<sup>2</sup>) und feinem SiO<sub>2</sub> (96 µg/cm<sup>2</sup>) (Abbildung 29). Ebensowenig konnte eine vermehrte Bildung von Leukotrien B<sub>4</sub> durch ELISA nachgewiesen werden, weder nach der Exposition mit synthetisch gewonnenem Bariumsulfat (Abbildung 52) noch nach der Exposition mit feinem SiO<sub>2</sub> in verschiedenen Dosierungen (32, 64, 96 µg/cm<sup>2</sup>) (Abbildung 51). LTB<sub>4</sub> scheint daher im hier vorgestellten *in vitro*-Modell keine entscheidende Rolle zu spielen. Ob NR8383 Zellen Leukotrien B<sub>4</sub> überhaupt produzieren und freisetzen können, ist nicht geklärt.

Andere Chemokine und Zytokine wurden im Zusammenhang mit einer Partikel-induzierten Entzündung bislang nur in Einzelfällen beschrieben. So wurde eine Erhöhung von CXCL3 in der Lunge von Mäusen festgestellt, die mit Toner exponiert worden waren (Rouse et al., 2008). In Mäusen führte die Inhalation von Dieselpartikeln (1,0 und 3,0 mg Dieselpartikel/m<sup>3</sup> für 4 Wochen) zu einem signifikanten Anstieg von CXCL3 (Fujimaki et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein starker und signifikanter Anstieg der RNA-Transkription von CXCL3 nach der 4- und 16-stündigen Exposition der NR8383 Makrophagen mit feinem SiO<sub>2</sub> (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und grobem Quarz (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) beobachtet (Abbildung 31B und Abbildung 33D). Die Erhöhung befand sich jeweils im Einklang mit der im PICMA gemessenen Anzahl migrierter Zellen (Abbildung 32) und nahm daher im Zusammenhang mit der partikel-induzierten Migration von Neutrophilen und Makrophagen in diesem Modell eine wichtige Rolle ein.

Darüber hinaus verursachte in einer kürzlich vorgestellten Studie die Inkubation von primären Alveolarmakrophagen mit Titandioxid-Partikeln (100 µg/ml) einen signifikanten Anstieg von IL-10 (Bruno et al., 2014). IL-10 ist ein antiinflammatorisches Protein, das die Synthese von I-kB fördert, einem Inhibitor von NF-kB. Da NF-kB einen entscheidenden Einfluss auf die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF $\alpha$ ) ausübt, kommt es durch die Freisetzung von IL-10 zu einer Abschwächung der inflammatorischen Wirkung (Barnes und Karin, 1997). IL-10 beeinflusst den Verlauf einer Partikel-induzierten Entzündung in vivo: Driscoll et al. (1988) zeigten, dass die Quarz-induzierte pulmonale akute Entzündungsreaktion in der Rattenlunge durch das Blockieren von IL-10 deutlich verstärkt werden kann (Anstieg von Neutrophilen und von MIP-2). Auch in IL-10 defizienten NMRI-Mäusen war das Ausmaß der DQ12-Quarz-induzierten Entzündungsreaktion deutlich erhöht (Huaux et al., 1998). Im Rahmen dieser Studie war nach der 16-stündigen Inkubation mit grobem Quarz, nicht aber nach der Inkubation mit feinem SiO<sub>2</sub>, die Transkription des antiinflammatorischen IL-10 deutlich hochreguliert (Abbildung 31A). Eine mögliche Erklärung könnte die toxikokinetische Betrachtungsweise der Quarzwirkung liefern: Da offenbar das Maximum der toxischen Wirkung (im Gegensatz zu feinem SiO<sub>2</sub>) bei 4 Stunden liegt, ist es wahrscheinlich, dass die antiinflammatorische Gegenregulation bei 16 Stunden bereits erfolgt bzw. nicht mehr nachweisbar ist.

Zusammenfassend zeigten parallele Untersuchungen des Zytokin/Chemokin-Musters im Rahmen dieser Arbeit, dass ein sehr breites Spektrum an Zytokinen sezerniert wurde. Andere *in vitro*-Studien fokussieren den Nachweis einzelner Zytokine oder Chemokine im Zellüberstand (z.B. TNFα) und vernachlässigen das komplexe Gemisch aus Zytokinen, das *in vitro* (und sehr wahrscheinlich auch *in vivo*) für die Migration von Entzündungszellen verantwortlich ist. Die Beteiligung einzelner Schlüsselproteine, die auch in vorherigen Studien schon beschrieben wurden, konnte in dieser Arbeit im Einklang mit den Daten aus dem Migrationsassay durchaus bestätigt werden (z.B. TNFα, CCL3). Darüber hinaus haben offensichtlich auch andere Chemokine eine starke Beteiligung an der Partikel-induzierten Zellmigration, die bislang nur in Einzelfällen in diesem Zusammenhang beschrieben wurden z.B. CXCL3 und IL-10.

Ob und welche Partikel zur Freisetzung unterschiedliche Entzündungsmediatoren führen könnten (Stone et al., 2009), kann in diesem Zusammenhang bislang nicht beantwortet werden. Die Etablierung eines funktionellen Endpunktes als *in vitro*-Assay, nämlich des Ausmaßes der Migration von Neutrophilen, ist daher eine vielversprechende Alternative. Nichtsdestotrotz konnte der PICMA durch den Nachweis von Zytokinen und Chemokinen auf Protein- und RNA-Ebene sinnvoll validiert werden.

## 6.6 Etablierung des PICMA mit Asbestfasern

Asbest ist ein Terminus, der eine Klasse natürlicher Mineralfasern zusammenfasst, die einige physikalische Eigenschaften teilen. Bei Asbest handelt es sich nicht um eine einzige Mineralfaserart, sondern um eine inhomogene Gruppe unterschiedlicher Fasertypen (Neumann et al., 2011). Man unterscheidet anhand der Silikatstruktur, die alle Asbestfasern gemein haben, zwischen den sogenannten Schichtsilikaten (Serpentinasbest) und den Kettensilikaten (Amphibolasbest). Darüber hinaus unterscheidet sich die chemische Zusammensetzung u.a. in Bezug auf den Gehalt an Magnesium, Aluminium, Calcium und Eisen (IARC, 2009).

Ein Zusammenhang zwischen Asbest und Lungenkrebs wurde bereits im Jahre 1935 beschrieben (Gloyne, 1935). Zwischen einer Krokydolithexposition und Mesotheliomen wurde von Wagner et al. im Jahre 1960 ein Zusammenhang beobachtet. Die inhalative Exposition gegenüber Asbestfasern kann in der menschlichen Lunge Mesotheliome, Lungenkrebs und Asbestose (chronische Lungenfibrose) auslösen (IARC, 2002 und 2009, Shukla et al., 2003). Nach der ersten Exposition beträgt die Latenzzeit hierfür zwischen 20 und 40 Jahren (IARC, 1997). Daher ist die Herstellung, das Inverkehrbringen und der Einsatz von Asbestfasern und ihrer Produkte verboten (European Parliament, REACH-Verordnung, 2006).

Für die Genese der durch Fasern verursachten Erkrankungen sind veschiedene Eigenschaften der Fasern wichtige Einflussgrößen: Neben der Dosis sind vor allem die Fasergeometrie und die Biopersistenz entscheidend (Abbildung 62) (Pott und Friedrichs, 1972, Stanton und Wrench 1972). Als so genannte kritische Fasergeometrie gibt die WHO folgende Definition an: Länge > 5  $\mu$ m, aerodynamischer Durchmesser < 3  $\mu$ m, Seitenverhältnis > 3:1. Wie auch bei den Partikeln ist die Eindringtiefe von Fasern in die Lunge von ihrem Durchmesser abhängig, wobei Fasern mit einem Durchmesser < 3  $\mu$ m sich in den unteren Lungenabschnitten abscheiden können (IARC, 2009). Faserförmige Partikel mit einem Durchmesser, der größer als 3  $\mu$ m ist, können die unteren Atemwege (die Alveoli) nicht erreichen und daher auch keine Fasertoxizität hervorrufen (Gebel et al., 2014). Ein Faserdurchmesser < 0,5  $\mu$ m begünstigt das Eindringen der Faserspitze in die Bronchialwand (Bernstein et al., 2005).

Lippmann (1990) folgert auf der Basis toxikologischer und epidemiologischer Studien, dass eine Faserlänge von mehr als 5  $\mu$ m das Risiko für Mesotheliome erhöht. Bereits ab einer Faserlänge von 5  $\mu$ m bleibt die starre Faser zwischen den Mesothelzellen der parietalen Pleura hängen und gelangt nicht durch die Stomata in das lymphatische System (Donaldson et al., 2010). Schinwald et al. (2012a) ermittelten anhand einer tierexperimentellen Studie eine sogenannte kritische Faserlänge von 4  $\mu$ m, ab der Asbestfasern Mesotheliome in C57Bl/6-Mäusen auslösten.

Überschreitet die Faserlänge zudem den Durchmesser des Aveolarmakrophagen, so ist die Faser nur unvollständig phagozytierbar (Ye et al., 1999). Diese so genannte frustrierte Phagozytose kann, vermittelt u.a. durch die Generierung von ROS und RNS, zu weiteren Gewebeschädigungen führen (Schinwald und Donaldson, 2012). Die Größe des Alveolarmakrophagen ist von der Spezies abhängig und schwankt zwischen 10 und 13 µm (Ratte) bzw. 14 und 21 µm (Mensch) (Stone et al., 1992, Crapo et al., 1983). Zum Teil können Alveolarmakrophagen auch Fasern phagozytieren, die etwas länger sind als ihr Durchmesser, jedoch ist eine Faserlänge von mehr als 20 µm limitierend (Dörger et al., 2001).

Faserförmige Partikel, die nicht abgebaut/zerkleinert werden können und schwer löslich sind, werden als biopersistent bezeichnet (Bernstein et al., 2005). Die Biopersistenz ist abhängig von der Spezies, Depositionsort und -rate, der Löslichkeit innerhalb der Lungenflüssigkeit, der Bruchfestigkeit der Faser und der Translokationsrate (Broaddus et al., 1996). Sie unterscheidet sich grundlegend zwischen den Gruppe der Chrysotil- und Amphibolasbeste.

Amphibole Asbestfasern weisen eine vergleichsweise hohe Biopersistenz auf (Hesterberg et al., 1996 und 1998a). In einer Inhalationsstudie an Ratten hatte Krokydolith die höchste Biopersistenz (Eliminationshalbwertzeit = 817 Tage), gefolgt von Amosit (Eliminationshalbwertzeit = 418 Tage) (Hesterberg et al., 1996). Nach drei Monaten bzw. nach einem Jahr hatte sich die Struktur der Fasern in der Lunge nicht verändert (Hesterberg et al., 1998a). Studien zur Biopersistenz von Chrysotil zeigen hingegen, dass es schneller aus der Lunge

entfernt wird und möglicherweise eine geringere fibrogene und kanzerogene Potenz als Amphibolasbest aufweist (Hesterberg et al., 1998b). Typischerweise werden innerhalb der Faser viele kleinere Fibrillen durch van-der-Waals-Kräfte zusammengehalten (Fubini und Otero Areán, 1999). In einer tierexperimentellen Studie wurde für brasilianischen Chrysotilasbest eine Halbwertzeit von nur einem Tag ermittelt, nachdem die Ratten ein definiertes Faseraerosol über einen Zeitraum von 5 Tagen inhalierten. Im Anschluss wurden die Lungen verascht und die Menge der noch vorhandenen Fasern und die Faserlänge wurden bestimmt (Bernstein et al., 2004). An dieser Studie wurde jedoch von Mossman et al. (2011) kritisiert, dass eine vollständige Deposition der inhalierten Fasern angenommen wird (100 %). Von diesen Autoren wird angenommen, dass die tatsächlich in der Lunge deponierte Faserdosis, abhängig von der jeweiligen Spezies, nur etwa 10–20 % beträgt.

Biopersistente Fasern können sich im Lungengewebe und in der Pleura anreichern (Dodson et al., 1990) und die bereits beschriebenen adversen Gesundheitseffekte auslösen. In verschiedenen epidemiologischen Studien konnten die Effekte von Amphibol- und Chrysotilasbest nicht endgültig voneinander abgegrenzt werden. Zwar beschreiben Studien auch das Auftreten von Mesotheliomen nach der Exposition gegenüber kanadischem Chrysotil (Liddell et al., 1997, Hein et al., 2007), jedoch besteht eine Kontamination von chrysotilem Asbest mit amphibolem Asbest in einer Größenordnung von etwa 1 %.



**Abbildung 62:** Länge, Durchmesser und Biopersistenz als kritische Eigenschaften von Fasern (in blau dargestellt), übersetzt aus Donaldson et al., 2010.

Auch wenn die Biopersistenz der Asbestfasern sich grundlegend unterscheidet, so sind in mathematisch angenommenen Modellen ihre Löslichkeitskonstanten *in vitro* vernachlässigbar gering und bewegen sich im Bereich von 1–2 ng/h/cm<sup>2</sup>, unabhängig davon, ob es sich um amphibolen oder um chrysotilen Asbest handelt (Eastes und Hadley, 2007, Hesterberg et al., 1998b, Zoitos et al., 1997). Donaldson et al. (2010) vermuten aufgrund der

Studie von Bernstein et al. (2004) allerdings, dass Chrysotil sich in den Stunden nach der Deposition *in vivo* in kürzere Fragmente zersetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden keine Stabilitätsuntersuchungen bezüglich der suspendierten Asbestfasern in biologischem Medium durchgeführt, da diese nur mikroskopisch auszuwerten gewesen wären und daher einen sehr hohen Arbeitsaufwand bedeutet hätten. Stattdessen wurden sicherheitshalber die verwendeten Asbestsuspensionen am Tag des Versuchs frisch angesetzt, um das Experiment unter möglichst realistischen Bedingungen durchzuführen.

Der wohl größte Diskussionspunkt bei der Etablierung des PICMA mit Asbestfasern ist die Tatsache, dass nicht alle getesteten Asbestfasern die Biopersistenz aufweisen, welche für die adversen Effekte *in vivo* eine sehr hohe Relevanz hat. In dieser Studie wurde für Chrysotilasbest ein vergleichsweise hohes inflammatorisches Potenzial (Abbildung 56A und Abbildung 57A) und eine hohe Toxizität (durch niedrige IC<sub>50</sub>-Werte) (Abbildung 54) nachgewiesen – diese hohe biologische Reaktivität wäre *in vivo* aber aufgrund der vermuteten schnelleren Clearance des Chrysotilasbestes unter Umständen gar nicht relevant. Sofern eine Faser löslich ist oder in kleinere Bruchstücken zersetzt werden kann, ist mit einer effektiven Phagozytoseleistung durch Alveolarmakrophagen und nicht mit adversen Gesundheitseffekten zu rechnen (Drew et al., 2009). Vielmehr muss man an dieser Stelle die Aussagekraft des PICMA aufgrund der unterschiedlichen Biopersistenz der eingesetzten Fasern differenziert betrachten. Es ist anzunehmen, dass nur die biologische Reaktivität der Asbestfasern vom PICMA abgebildet wird, und dass die Ergebnisse des PICMA durch geeignete *in vivo*-Biopersistenzstudien zu ergänzen sind, um ein sinnvolles Gesamtbild zu erhalten.

In einer *in vitro*-Studie mit Alveolarmakrophagen wurde gezeigt, dass kurze Amosit-Faser-Bruchstücke, die durch Vermahlen gewonnen wurden, weniger inflammatorisch wirken als das nicht zerkleinerte Amosit. Zur Beurteilung des inflammatorischen Potenzials wurde die Freisetzung von TNF $\alpha$  gemessen (Donaldson et al., 1992). Auch das durch den PICMA vorhergesagte inflammatorische Potenzial korrelierte mit der Faserlänge, die wie folgt angegeben wurde: Chrysotil A/B hatte die im Mittel längsten Fasern (und den größten Anteil oberhalb der kritischen Faserlänge von 5 µm), gefolgt von Amosit und Krokydolith (Tabelle 16 bis Tabelle 18). Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten diese Größenverteilungen grob bestätigt werden (Abbildung 53). Entsprechend dieser Sortierung verhält sich auch das im PICMA bestimmte inflammatorische Potenzial: Chrysotil A (IC<sub>50</sub> = 9 µg/cm<sup>2</sup>) >> Chrysotil B (IC<sub>50</sub> = 40 µg/cm<sup>2</sup>) > Amosit (IC<sub>50</sub> = 15 µg/cm<sup>2</sup>) und Krokydolith (IC<sub>50</sub> = 29 µg/cm<sup>2</sup>). Zum Teil ist der Einfluss auf das Migrationsverhalten in den zwei Assayvarianten unterschiedlich: Chrysotil B löst nur eine Migration von dHL-60, Krokydolith nur von unbehandelten NR8383 Zellen aus (Abbildung 56 und Abbildung 57).

Die Beteiligung bestimmter inflammatorischer Schlüsselproteine wurde auch im Falle der Asbestfasern nachgewiesen (Abbildung 58 und Abbildung 59): Die Transkription von CXCL1, CXCL3, CCL2, CCL3, CCL4, GDF15 und TNF $\alpha$  war nach der Inkubation mit allen im Rahmen dieser Arbeit getesteten Asbestfasern erhöht, nach der Inkubation von NR8383 Zellen mit Chrysotil A sogar in der niedrigsten Dosis (4 µg/cm<sup>2</sup>).

Allerdings liegen sowohl die Längenverteilungen als auch die IC<sub>50</sub>-Werte der vier untersuchten Asbestminerale relativ nah beieinander (Abbildung 54 und Abbildung 55). Schlussendlich kann ein Einfluss unterschiedlichen auch der elementaren Zusammensetzung (Tabelle 15) nicht ausgeschlossen werden. Die EDX-Spektren im Anhang (Abbildung 69 bis Abbildung 72) belegen diese unterschiedliche, sehr heterogene elementare Zusammensetzung der Asbestminerale. Während der Silicium-Gehalt (Si) annähernd gleich liegt, schwanken die prozentualen Eisen-Gehalte (Fe) zwischen 2 und 36 % bzw. die prozentualen Magnesium-Gehalte (Mg) zwischen 2 und 30 %. Das Vorhandensein von z.B. Eisenionen und daraus hervorgehendes Redoxpotenzial könnte die Wirkung der Fasern auf die NR8383 Zellen im PICMA ebenso beeinflussen wie enthaltenes SiO<sub>2</sub>.

Da die Kanzerogenität von Asbest maßgeblich durch die geometrischen Eigenschaften bestimmt wird, stehen nanoskalige Materialien mit ähnlicher Geometrie und Biopersistenz im Verdacht, ähnliche adverse Gesundheitseffekte auszulösen (Gebel et al., 2014). Diese Diskussion betrifft vor allem sogenannte multi-walled Carbonnanotubes (MWCNTs), die neben der ähnlichen Geometrie einen ähnlich starren (d.h. unflexiblen) Grundkörper aufweisen wie Asbestfasern (Rittinghausen et al., 2014, Sakamoto et al., 2009, Takagi et al., 2008). Andere Nanotubes, die entweder kürzer als 5 µm sind oder flexibel, wirken im Tierversuch offenbar nicht wie Asbestfasern (Ma-Hock et al., 2009b).

Es wäre wünschenswert, dass der PICMA in Zukunft auch zur Testung der Fasertoxizität von neuen Nanomaterialien eingesetzt werden kann. Aus den oben genannten Gründen wäre allerdings eine entsprechend differenzierte Betrachtung (eventuell mit Durchführung ergänzender Biopersistenzstudien) eine notwendige zusätzliche Herausforderung.

## 7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Einwanderung von Entzündungszellen, z.B. Neutrophilen und Makrophagen, wird häufig als inflammatorischer Endpunkt im Zusammenhang mit der inhalativen Exposition gegenüber Partikeln beschrieben. *In vitro* existierte hierfür bislang kein analoges Verfahren. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit genau dieser funktionelle Endpunkt, nämlich das Ausmaß der Migration von Neutrophilen und Makrophagen, als *in vitro*-Assay etabliert. Der Migrationsassay bildet inflammatorische Effekte reproduzierbar und dosisabhängig ab. Er ist leicht zu handhaben und kommt ohne den Einsatz von Primärzellen aus.

Es konnten zum ersten Mal dosisabhängige, signifikante und mit *in vivo*-Daten vereinbare Effekte von schwer löslichen, partikulären und faserförmigen Stäuben mit einem Migrationsassay abgebildet werden. Zur funktionellen Validierung wurde die Zellmigration auf RNA- und Proteinebene mit freigesetzten Botenstoffen (Zytokine, Chemokine) korreliert. Diese Untersuchungen des Zytokin/Chemokin-Musters zeigten, dass ein sehr breites Spektrum an Zytokinen sezerniert wird, wobei CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL3, IL-6, IL-10 und TNFα wichtige Funktionen einnehmen, bzw. CXCL1, CXCL3, CCL2, CCL3, CCL4, GDF15 und TNFα im Falle der faserförmigen Partikel. Die komplexe Beteiligung verschiedener Zytokine und Chemokine zeigt, dass die Betrachtung von einzelnen Entzündungsmediatoren für die Beurteilung des inflammatorischen Potenzials von Partikeln nicht ausreichend ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bariumsulfatpartikel hergestellt, die auch in Suspension einen Durchmesser < 100 nm haben und somit der Definition eines Nanopartikels entsprechen. Zum ersten Mal konnten Bariumsulfat-Nanopartikel *in vitro* bezüglich ihrer inflammatorischen und toxischen Eigenschaften vergleichend untersucht werden zu submikro- und mikroskaligen Bariumsulfatpartikeln gleicher Zusammensetzung. Bariumsulfat konnte in keiner Primärpartikelgröße eine Migration von unbehandelten NR8383 Zellen und dHL-60 Zellen induzieren.

Dahingegen verursachten Partikel mit bekanntem inflammatorischem Potenzial eine signifikante und dosisabhängige Zellmigration (Quarz, amorphes SiO<sub>2</sub>, rutiles Titandioxid). Daraus wird geschlussfolgert, dass der Migrationsassay die Möglichkeit bietet, inerte und inflammatorische Partikel *in vitro* zu unterscheiden. Daher könnte er zukünftig eine schnelle und kostengünstige Vorstufe zum Tierversuch darstellen und für die Beurteilung der inflammatorischen Wirkung weiterer Partikel und Fasern (z.B. Nanomaterialien) im Sinne eines Screenings eingesetzt werden (Abbildung 63). Interessant wären insbesondere vergleichende Untersuchungen von Asbestfasern und Carbonnanotubes, vor allem

MWCNTs, aber auch Zinkoxidpartikel und andere Metalloxide, welche im Expositionslabor im IPA derzeit in Humanstudien untersucht werden.



**Abbildung 63:** Ranking des Gefährdungspotenzials (steigende Toxizität) anhand von Human- und Tierdaten, die der PICMA abbildet. Durch weitere Validierungsschritte wäre eine erste Einstufung der Gefährdung durch neue Stoffe (z.B. MWCNTs) *in vitro* möglich.

Darüber hinaus kann der Einfluss verschiedener Partikelparameter (z.B. Änderungen der Größe, Morphologie oder der Oberfläche) untersucht werden, indem Partikel mit entsprechenden Eigenschaften synthetisiert und unter standardisierten Bedingungen getestet werden. Es können so Hinweise gefunden werden, die Auskunft geben über die Ursachen für unterschiedliche Partikelwirkungen. Solche Aussagen über Struktur-Aktivitätsbeziehungen sind für Gefährdungsbeurteilungen von besonderem Wert: Zum Beispiel zeigten die ersten Untersuchungen von Asbestfasern im PICMA, dass die chemotaktischen Effekte mit der kritischen Faserlänge korrelierten.

Ein weiterer Vorteil des PICMA ist, dass er sich auch für grundlagenorientierte Forschung eignet. Im Detail sind die Interaktionen zwischen Partikeln und Lungenzellen, die zu adversen Gedundheitseffekten führen, noch nicht verstanden (Unfried et al., 2007). Effekte wie beispielsweise die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und die Expression entsprechender Zellrezeptoren oder der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies können mit dem PICMA in funktionellem Zusammenhang untersucht werden. Im Idealfall können auf Zellebene identifizierte Marker durch Humanstudien im Expositionslabor des IPA validiert werden. Eine direkte Korrelation von *in vitro*-Ergebnissen und Humandaten wurde bislang in dieser Form nicht berichtet.

Zukünftig könnte der PICMA im Ablauf weiter vereinfacht werden, indem er auf die RTCA-Station übertragen wird, die im Rahmen dieser Arbeit für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte verwendet wurde. Für das Gerät gibt es Inserts, die den in dieser Arbeit eingesetzten Thincerts® ähneln, sodass in Zukunft auch die Chemotaxis in Echtzeit gemessen werden kann.

## 8 Anhang

## 8.1 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtmann AH, Pillai S. **Cellular and Molecular Immunology**, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012.

Albrecht C, Schins RP, Höhr D, Becker A, Shi T, Knaapen AM, Borm PJ. Inflammatory time course after quartz instillation: role of tumor necrosis factor-alpha and particle surface. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, 31(3):292–301.

Albrecht C, Knaapen AM, Becker A, Höhr D, Haberzettl P, van Schooten FJ, Borm PJ, Schins RP. The crucial role of particle surface reactivity in respirable quartz-induced reactive oxygen/nitrogen species formation and APE/Ref-1 induction in rat lung. *Respir Res* 2005, 6:129.

Aninwene GE 2nd, Stout D, Yang Z, Webster TJ. Nano-BaSO<sub>4</sub>: a novel antimicrobial additive to pellethane. *Int J Nanomed* 2013, 8:1197–1205.

Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, Kobzik L. **The scavenger** receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med* 2004, 200(2):267–272.

Arts JH, Muijser H, Duistermaat E, Junker K, Kuper CF. **Five-day inhalation toxicity study** of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem Toxicol* 2007, 45(10):1856–1867.

Aufderheide M, Scheffler S, Ito S, Ishikawa S, Emura M. Ciliatoxicity in human primary bronchiolar epithelial cells after repeated exposure at the air-liquid interface with native mainstream smoke of K3R4F cigarettes with and without charcoal filter. *Exp Toxicol Pathol* 2015, doi: 10.1016/j.etp.2015.04.006. [Epub ahead of print]

Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR. **Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective.** *Nat Nanotechnol* 2009, 4(10):634–641.

Baan RA. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal Toxicol* 2007, 19 Suppl 1:213–228.

Bahra P, Poll CT, Westwick J, Li SW. Characterisation of inflammatory mediator release by the rat alveolar macrophage cell line NR8383: potential role of Ca2+ influx. *British Pharmacological Society*, 2004, 099P GKT. Verfügbar unter http://www.pa2online.org/ Vol1Issue4abst099P.html.

Balashazy I, Hofmann W, Heistracher T. Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *J Appl Physiol* 2003, 94(5):1719–1725.

Balduzzi M, Diociaiuti M, De Berardis B, Paradisi S, Paoletti L. In vitro effects on macrophages induced by noncytotoxic doses of silica particles possibly relevant to ambient exposure. *Environ Res* 2004, 96(1):62–71.

Barlow PG, Clouter-Baker A, Donaldson K, Maccallum J, Stone V. Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part Fibre Toxicol* 2005a, 2:11.

Barlow PG, Donaldson K, MacCallum J, Clouter A, Stone V. Serum exposed to nanoparticle carbon black displays increased potential to induce macrophage migration. *Toxicol Lett* 2005b, 155(3):397–401.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997, 336(15):1066–1071.

Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 2002, 70(1):86–97.

Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. **Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles.** *Toxicol Sci* 2004, 77(2):347–357.

Bernstein D, Castranova V, Donaldson K, Fubini B, Hadley J, Hesterberg T, Kane A, Lai D, McConnell EE, Muhle H, Oberdorster G, Olin S, Warheit DB; ILSI Risk Science Institute Working Group. **Testing of fibrous particles: short-term assays and strategies.** *Inhal Toxicol* 2005, 17(10):497–537.

Bernstein DM, Rogers R, Smith P. The biopersistence of brazilian chrysotile asbestos following inhalation. *Inhal Toxicol* 2004, 16(11-12):745–761.

Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chévrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F. **Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production.** *Am J Physiol* 1999, 276(4 Pt 1):L604–L613.

Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962, 115:453–466.

Bozic CR, Gerard NP, von Uexkull-Guldenband C, Kolakowski LF, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ, Gerard C. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *J Biol Chem* 1994, 269(47):29355–29358.

Braakhuis HM, Park MV, Gosens I, De Jong WH, Cassee FR. **Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation.** *Part Fibre Toxicol* 2014, 11:18.

Brain JD. Toxicological aspects of alterations of pulmonary macrophage function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986, 26:547–565.

Brain JD. Lung macrophages: how many kinds are there? What do they do? *Am Rev Respir Dis* 1988, 137(3):507–509.

Bray MA, Ford-Hutchinson AW, Smith MJ. Leukotriene B4: an inflammatory mediator in vivo. *Prostaglandins* 1981, 22(2):213–222.

Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77:2936–2940.

Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 1989, 169:1977–1991.

Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, Marsh CB. **The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis**. *Antioxid Redox Signal* 2008, 10:287–301.

Broaddus VC, Yang L, Scavo LM, Ernst JD, Boylan AM. Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species. *J Clin Invest* 1996, 98(9):2050–2059.

Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. **Size-dependent** proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, 175(3):191–199.

Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Denhart M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V. **Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF** • **cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 286:L344–L353.

Bruch J, Rehn S, Rehn B, Borm PJ, Fubini B. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health* 2004, 207(3):203–216.

Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 1938, 60:309–319.

Bruno ME, Tasat DR, Ramos E, Paparella ML, Evelson P, Rebagliati RJ, Cabrini RL, Guglielmotti MB, Olmedo DG. Impact through time of different sized titanium dioxide particles on biochemical and histopathological parameters. *J Biomed Mater Res A* 2014, 102(5):1439–1448.

Bruno ME, Sittner M, Cabrini RL, Guglielmotti MB, Olmedo DG, Tasat DR. In vitro age dependent response of macrophages to micro and nano titanium dioxide particles. *J Biomed Mater Res A* 2015, 103(2):471–478.

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). Sicherheit und Gesundheit bei der Arbeit 2013 - Unfallverhütungsbericht Arbeit. 1. Auflage 2014, 144–147.

Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (Hrsg.). Hightech statt Tiere – Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen. 2001, 31–39.

Casarett LJ, Doull J, Klaasen CD. **Toxicology. The Basic Science of Poisons**. 3rd Edition. New York: McGraw-Hill Medical Pub, 2001.

Castranova V. From coalmine dust to quartz: mechanisms of pulmonary pathogenicity. *Inhal Toxicol* 2000, 12(3):7–14.

Chen M, von Mikecz A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO2 nanoparticles. *Exp Cell Res* 2005, 305(1):51–62.

Chnari E, Nikitczuk JS, Uhrich KE, Moghe PV. **Nanoscale anionic macromolecules can inhibit cellular uptake of differentially oxidized LDL.** *Biomacromolecules* 2006, 7(2):597– 603.

Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90(8):3574–3577.

Claudio E, Segade F, Wrobel K, Ramos S, Lazo PS. Activation of murine macrophages by silica particles in vitro is a process independent of silica-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 13:547–554.

Clift MJ, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, Guy K, Stone V. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, 232(3):418–427.

Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75(5):2458–2462.

Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004, 3(4):223–231.

Crapo JD, Young SL, Fram EK, Pinkerton KE, Barry BE, Crapo RO. **Morphometric** characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis* 1983, 128(2 Pt 2):S42–46.

Cullen RT, Tran CL, Buchanan D, Davis JM, Searl A, Jones AD, Donaldson K. Inhalation of poorly soluble particles I. Differences in inflammatory response and clearance during exposure. *Inhal Toxicol* 2000, 12(12):1089–1111.

Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR. Persistent overexpression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in murine silicosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1998, 17:99–114.

Deutsche Forschungsgemeinschaft. Aerosole, in MAK- und BAT-Werte-Liste 2014: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland, 2014, 197–205. Diabaté S, Mülhopt S, Paur HR, Krug HF. **The response of a co-culture lung model to fine and ultrafine particles of incinerator fly ash at the air-liquid interface.** *Altern Lab Anim* 2008, 36(3):285–298.

Dodson RF, Williams MG Jr, Corn CJ, Brollo A, Bianchi C. Asbestos content of lung tissue, lymph nodes, and pleural plaques from former shipyard workers. *Am Rev Respir Dis* 1990, 142(4):843–847.

Doig AT. Baritosis: a benign pneumoconiosis. *Thorax* 1976, 31:30–39.

Donaldson K, Bolton RE, Jones A, Brown GM, Robertson MD, Slight J, Cowie H, Davis JM. **Kinetics of the bronchoalveolar leucocyte response in rats during exposure to equal airborne mass concentrations of quartz, chrysotile asbestos, or titanium dioxide.** *Thorax* 1988, 43(7):525–533.

Donaldson K, Li XY, Dogra S, Miller BG, Brown GM. Asbestos-stimulated tumour necrosis factor release from alveolar macrophages depends on fibre length and opsonization. *J Pathol* 1992, 168(2):243–248.

Donaldson K. Nonneoplastic lung responses induced in experimental animals by exposure to poorly soluble nonfibrous particles. *Inhal Toxicol* 2000, 12(1-2):121–139.

Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V. **The** pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 2002, 15(2), 213–220.

Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* 2003, 39:405–410.

Donaldson K, Borm PJ, Oberdorster G, Pinkerton KE, Stone V, Tran CL. **Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: the key role of the proximal alveolar region.** *Inhal Toxicol* 2008, 20:53–62.

Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol* 2010, 22;7:5.

Dörfler, H. Grenzflächen- und Kolloidchemie, Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 1994.

Dörger M, Münzing S, Allmeling AM, Messmer K, Krombach F. **Differential responses of rat alveolar and peritoneal macrophages to man-made vitreous fibers in vitro.** *Environ Res* 2001, 85(3):207–214.

Dosios T, Karydas AG. **Baritosis of the mediastinal lymph nodes.** *Ann Thorac Surg* 2003, 76:297.

Drew R, Frangos J, Hagen T. Engineered Nanomaterials: a review of the toxicology and health hazards. 2009, ISBN 978 0 642 32921 9, erhältlich unter http://www.safeworkaustralia.gov.au

Driscoll KE, Higgins JM, Leytart MJ, Crosby LL. **Differential effects of mineral dusts on the in vitro activation of alveolar macrophage eicosanoid and cytokine release.** *Toxicol In Vitro* 1990, 4(4-5):284–288.

Driscoll KE, Hassenbein DG, Carter J, Poynter J, Asquith TN, Grant RA, Whitten J, Purdon MP, Takigiku R. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993, 8(3):311–318.

Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB, Oberdörster G. **Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, 136(2):372–380.

Driscoll KE, Carter JM, Hassenbein DG, Howard B. Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect* 1997, 105 Suppl 5:1159–1164.

Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein D, Burdick M, Kunkel SL, Strieter RM. Interleukin-10 regulates quartz-induced pulmonary inflammation in rats. *Am J Physiol* 1998, 275:L887–L894.

Dubois CM, Bissonette E, Rola-Pleszczynski M. Asbestos fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. *Am Rev Respir Dis* 1989, 139:1257–1264.

Duffin R, Gilmour PS, Schins RP, Clouter A, Guy K, Brown DM, MacNee W, Born PJ, Donaldson K, Stone V. Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression, and nuclear factor-kappaB activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, 176:10–17.

Duffin R, Tran CL, Clouter A, Brown DM, MacNee W, Stone V, Donaldson K. The importance of surface area and specific reactivity in the acute pulmonary inflammatory response to particles. *Ann Occup Hyg* 2002, 46(Suppl 1):242–245.

Duffin R, Tran CL, Brown D, Stone V, Donaldson K. **Proinflammogenic effects of low**toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhal Toxicol* 2007, 19:849–856.

Eastes W, Hadley JG. A mathematical model of fiber carcinogenicity and fibrosis in inhalation and intraperitoneal experiments in rats. *Inhal Toxicol* 2007, 8(4):323–343.

Englen MD, Taylor SM, Laegreid WW, Liggitt HD, Silflow RM, Breeze RG, Leid RW. **Stimulation of arachidonic acid in silica-exposed alveolar macrophages.** *Exp Lung Res* 1989, 15(4):511–526.

Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, Masur K, Palm D, Bastian P, Niggemann B, Zaenker KS. **Analysis methods of human cell migration.** *Exp Cell Res* 2005, 307(2):418–426.

European Commission. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official Journal of the European Union* 2011, 2011/696/EU, 1–3.

European Commission. Communication from the commission to the European Parliament and the Council on the animal testing and marketing ban and on the state of play in relation to alternative methods in the field of cosmetics. 2013, 1–15.

European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) No 1907/2006 of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH, 2006) [...]. 2006, 1–516.

European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 2010, 1–80.

Fels AO, Cohn ZA. The alveolar macrophage. J Appl Physiol 1986, 60(2):353–369.

Ferin J, Oberdoster G, Penney DP, Soderholm SC, Gelein R, Piper HC. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? I. Particle clearance, translocation, morphology. *J Aerosol Sci* 1990, 21:381–384.

Fokkens WJ, Scheeren RA. **Upper airway defense mechanisms**. *Paediatr Respir Rev* 2000, 35:621–635.

Frevert CW, Huang S, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. *J Immunol* 1995, 154(1):335–344.

Fubini B, Otero Areán C. Chemical aspects of the toxicity of inhaled mineral dusts. *Chem Soc Rev* 1999, 28:373–381.

Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. **Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex.** *Pharmacol Ther* 2003, 100:171–194.

Fujimaki H, Kurokawa Y, Yamamoto S, Satoh M. Distinct requirements for interleukin-6 in airway inflammation induced by diesel exhaust in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006, 28(4):703–714.

Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005, 4(3):281–286.

Fukano Y, Yoshimura H, Yoshida T. Heme oxygenase-1 gene expression in human alveolar epithelial cells (A549) following exposure to whole cigarette smoke on a direct in vitro exposure system. *Exp Toxicol Pathol* 2006, 57(5-6):411–418.

Fuller RW. Asthma. Macrophages. Br Med Bull 1992, 48(1):65-71.

Furie MB, McHugh DD. Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor alpha. *J Immunol 1989*, 143:3309–3317.

Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979, 54(3):713–733.

Gangwal S, Brown JS, Wang A, Houck KA, Dix DJ, Kavlock RJ, Hubal EA. Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential. *Environ Health Perspect* 2011, 119(11):1539–1546.

Gao N, Keane MJ, Ong T, Ye J, Miller WE, Wallace WE. Effects of phospholipid surfactant on apoptosis induction by respirable quartz and kaolin in NR8383 rat pulmonary macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, 175(3):217–225.

Gasser M, Wick P, Clift MJ, Blank F, Diener L, Yan B, Gehr P, Krug HF, Rothen-Rutishauser B. **Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)** influences their oxidative and pro-inflammatory potential in vitro. *Part Fibre Toxicol* 2012, 24;9:17.

Gebel T, Foth H, Damm G, Freyberger A, Kramer PJ, Lilienblum W, Röhl C, Schupp T, Weiss C, Wollin KM, Hengstler JG. **Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment.** *Arch Toxicol* 2014, 88(12):2191–2211.

Gehr P, Schürch S, Berthiaume Y, Im Hof V, Geiser M. **Particle retention in airways by surfactant.** *J Aerosol Med* 1990, 3:27–43.

Geiser M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010, 23(4):207–217.

Gerloff K, Fenoglio I, Carella E, Kolling J, Albrecht C, Boots AW, Förster I, Schins RP. **Distinctive toxicity of TiO2 rutile/anatase mixed phase nanoparticles on Caco-2 cells.** *Chem Res Toxicol* 2012, 25(3):646–655.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973, 51(5):1417–1423.

Gillani R, Ercan R, Qiao A, Webster TJ. **Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives.** *Int J Nanomed* 2010, 5:1–11.

Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, Vickers MA, Drost EM, Ford I, Karg E, Mossa C, Schroeppel A, Ferron GA, Heyder J, Greaves M, MacNee W, Donaldson K. **Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, 195(1):35–44.

Gloyne SR. **Two cases of squamous carcinoma of the lung occurring in asbestosis.** *Tubercle* 1935, 17:5–10.

Gosset P, Lassalle P, Vanhée D, Wallaert B, Aerts C, Voisin C, Tonnel AB. **Production of** tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed in vitro to coal mine dust. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, 5(5):431–436.

Grassian VH, O'shaughnessy PT, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, Thorne PS. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect* 2007, 115(3):397–402.

Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995, 6(2):109–118.

Greim H. Industrieruße (Carbon black) in Form atembarer Stäube. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Toxikologisch-Arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten, 1999, 29. Lieferung, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1–45.

Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* 2011, 17(3-4):293–307.

Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect* 2006, 114(12):1818–1825.

Haberzettl P, Duffin R, Krämer U, Höhr D, Schins RP, Borm PJ, Albrecht C. Actin plays a crucial role in the phagocytosis and biological response to respirable quartz particles in macrophages. *Arch Toxicol* 2007, 81(7):459–470.

Hauert AB, Martinelli S, Marone C, Niggli V. Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol* 2002, 34(7):838–854.

Hein MJ, Stayner LT, Lehman E, Dement JM. Follow-up study of chrysotile textile workers: cohort mortality and exposure-response. *Occup Environ Med* 2007; 64(9):616–625.

Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K. Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* 1995, 7(4):533–556.

Helmke RJ, Boyd RL, German VF, Mangos JA. From growth factor dependence to growth factor responsiveness: the genesis of an alveolar macrophage cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987, 23:567–574.

Helmke RJ, German VF, Mangos JA. A continuous alveolar macrophage cell line: comparisons with freshly derived alveolar macrophages. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989, **25(1)**:44–48.

Heng BC, Zhao X, Xiong S, Ng KW, Boey FY, Loo JS. Cytotoxicity of zink oxide nanoparticles in influenced by cell density and culture format. *Arch Toxicol* 2011, 85(6):695–704.

Hesterberg TW, Miiller WC, Musselman RP, Kamstrup O, Hamilton RD, Thevenaz P. Biopersistence of man-made vitreous fibers and crocidolite asbestos in the rat lung following inhalation. *Fundam Appl Toxicol* 1996, 29(2):269–279.

Hesterberg TW, Chase G, Axten C, Miller WC, Musselman RP, Kamstrup O, Hadley J, Morscheidt C, Bernstein DM, Thevenaz P. **Biopersistence of synthetic vitreous fibers and amosite asbestos in the rat lung following inhalation.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1998a, 151(2):262–275.

Hesterberg TW, Hart GA, Chevalier J, Miiller WC, Hamilton RD, Bauer J, Thevenaz P. **The importance of fiber biopersistence and lung dose in determining the chronic inhalation effects of X607, RCF1, and chrysotile asbestos in rats.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1998b, 153(1):68–82.

Hnizdo E, Vallyathan V. Chronic obstructive pulmonary disease due to occupational exposure to silica dust: a review of epidemiological and pathological evidence. *Occup Environ Mol* 2003, 60:237–243.

Hofmann W, Asgharian B, Bergmann R, Anjilvel S, Miller FJ. **The effect of heterogeneity of lung structure on particle deposition in the rat lung.** *Toxicol Sci* 2000, 53(2):430–437.

Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. **Regulation of mucociliary** clearance in health and disease. *Eur Respir J* 1999, 13(5):1177–1188.

Huaux F, Louahed J, Hudspith B, Meredith C, Delos M, Renauld JC, Lison D. **Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 18(1):51–59.

Hulst HC vd. Light Scattering by small particles. Dover Publications: New York, 1981.

IARC. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Silica, Some Silicates, Coal Dust and Para-Aramid Fibrils. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1997, 68:1–475.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2009, 100C:219–294.

IARC. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2010, 93:1–452. Johnson NF, Smith DM, Sebring R, Holland LM. Silica-induced alveolar cell tumors in rats. *Am J Ind Med* 1987;11(1):93–107.

Johnson Z, Schwarz M, Power CA, Wells TN, Proudfoot AE. **Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system.** *Trends Immunol* 2005, 26(5):268–274.

Johnston CJ, Driscoll KE, Finkelstein JN, Baggs R, O'Reilly MA, Carter J, Gelein R, Oberdörster G. Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci* 2000, 56(2):405–413.

Jones AD, McMillan C, Johnston AM, McIntosh C, Cowie H, Parker I, Donaldson K. Animal Studies to Investigate the Deposition and Clearance of Inhaled Mineral Dusts. Final Report on CEC Contract 7248/33/026, 1988.

Keane MP, Strieter RM. The importance of balanced pro-inflammatory and antiinflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir Res* 2002, 3:5.

Kennedy T, Ghio AJ, Reed W, Samet J, Zagorski J, Quay J, Carter J, Dailey L, Hoidal JR, Devlin RB. Copper-dependent inflammation and nuclear factor-kappaB activation by particulate air pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 19(3):366–378.

Kim JK, Lee WK, Lee EJ, Cho YJ, Lee KH, Kim HS, Chung Y, Kim KA, Lim Y. **Mechanisms** of silica- and titanium dioxide-induced cytotoxicity in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health* 1999, 58(7):437–450.

Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Bhushan M, Griffiths. **Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization.** *Br J Dermatol* 2000, 142:401–412.

Klein CL, Wiench K, Wiemann M, Ma-Hock L, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. **Hazard identification of inhaled nanomaterials: making use of short-term inhalation studies.** *Arch Toxicol* 2012, 86(7):1137–1151.

Knaapen AM, Güngör N, Schins RP, Borm PJ, Van Schooten FJ. **Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review.** *Mutagenesis* 2006, 21(4):225–236.

Knippers R. Molekulare Genetik. 9. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2006.

Konduru N, Keller J, Ma-Hock L, Gröters S, Landsiedel R, Donaghey TC, Brain JD, Wohlleben W, Molina RM. **Biokinetics and effects of barium sulfate nanoparticles.** *Part Fibre Toxicol* 2014, 11(1):55.

Kroker C. Die modulierende Wirkung von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf Immunreaktionen der Lunge und die protektive Wirkung des kompatiblen Solutes Ectoin. Dissertation. Universität Düsseldorf, 2014.

Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. **Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges.** *Eur J Pharm Biopharm* 2009, 72(2):370–377.

Kroll A, Dierker C, Rommel C, Hahn D, Wohlleben W, Schulze-Isfort C, Göbbert C, Voetz M, Hardinghaus F, Schnekenburger J. **Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays.** *Part Fibre Toxicol* 2011, 8;9.

Kuempel ED, Attfield MD, Vallyathan V, Lapp NL, Hale JM, Smith RJ, Castranova V. **Pulmonary inflammation and crystalline silica in respirable coal mine dust: doseresponse.** *J Biosci* 2003, 28(1):61–69.

Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, Hahn D, Schnekenburger J, Wiench K, Wohlleben W. **Testing metal-oxide nanomaterials for human safety.** *Adv Mater* 2010, 22(24):2601–2627.

Landsiedel R, Ma-Hock L, Haussmann HJ, van Ravenzwaay B, Kayser M, Wiench K. Inhalation studies for the safety assessment of nanomaterials: status quo and the way forward. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2012, 4(4):399–413.

Landsiedel R, Sauer UG, Ma-Hock L, Schnekenburger J, Wiemann M. **Pulmonary toxicity** of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. *Nanomedicine (Lond)* 2014a, 9(16):2557–2585.

Landsiedel R, Ma-Hock L, Hofmann T, Wiemann M, Strauss V, Treumann S, Wohlleben W, Gröters S, Wiench K, van Ravenzwaay B. **Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials.** *Part Fibre Toxicol* 2014b, 11:16.

Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. **Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO2) by inhalation for two years.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, 79(2):179–192.

Leist M, Hartung T. Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Arch Toxicol* 2013, 87(4):563–567.

Liddell FD, McDonald AD, McDonald JC. **The 1891-1920 birth cohort of Quebec chrysotile miners and millers: development from 1904 and mortality to 1992.** *Ann Occup Hyg* 1997, 41(1):13–36.

Limame R, Wouters A, Pauwels B, Fransen E, Peeters M, Lardon F, De Wever O, Pauwels P. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* 2012, 7(10):e46536.

Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinink A, Stark WJ. **Exposure of engineered** nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environ Sci Technol* 2007, 41(11):4158–4163.

Lippmann M. Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. *Environ Health Perspect* 1990, 88:311–317.

Liu X, Xue Y, Ding T, Sun J. Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions. *Part Fibre Toxicol* 2012, 18;9:36.

Lugano EM, Dauber JH, Daniele RP. Acute experimental silicosis. Lung morphology, histology, and macrophage chemotaxin secretion. *Am J Pathol* 1982, 109:27–36.

MacNee W, Donaldson K. Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J Suppl* 2003, 40:47s–51s.

Madl AK, Pinkerton KE. Health effects of inhaled engineered and incidental nanoparticles. *Crit Rev Toxicol* 2009, 39(8):629–658.

Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal Toxicol* 2009a, 21(2):102–118.

Ma-Hock L, Treumann S, Strauss V, Brill S, Luizi F, Mertler M, Wiench K, Gamer AO, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. *Toxicol Sci* 2009b, 112(2):468–481.

Marzaioli V, Aguilar-Pimentel JA, Weichenmeier I, Luxenhofer G, Wiemann M, Landsiedel R, Wohlleben W, Eiden S, Mempel M, Behrendt H, Schmidt-Weber C, Gutermuth J, Alessandrini F. Surface modifications of silica nanoparticles are crucial for their inert versus proinflammatory and immunomodulatory properties. *Int J Nanomedicine* 2014, 9:2815–2832.

Ménache MG, Miller FJ, Raabe OG. **Particle inhalability curves for humans and small laboratory animals.** *Ann Occup Hyg* 1995, 39(3):317–328.

Ménache MG, Raabe OG, Miller FJ. An Empirical Dosimetry Model of Aerodynamic Particle Deposition in the Rat Respiratory Tract. *Inhal Toxicol* 2008, 8(6):539–578.

Merget R, Bauer T, Küpper HU, Philippou S, Bauer HD, Breitstadt R, Bruening T. **Health** hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Arch Toxicol* 2002, 75(11-12):625–634.

Miller BG, Jones AD, Searl A, Buchanan D, Cullen RT, Soutar CA, Davis JM, Donaldson K. Influence of characteristics of inhaled fibres on development of tumours in the rat lung. *Ann Occup Hyg* 1999, 43(3):167–179.

Miller FJ, Asgharian B, Schroeter JD, Price O, Corley RA, Einstein DR, Jacob RE, Cox TC, Kabilan S, Bentley T. **Respiratory tract lung geometry and dosimetry model for male Sprague-Dawley rats.** *Inhal Toxicol* 2014, 26(9):524–544.

Millius A, Weiner OD. Manipulation of neutrophil-like HL-60 cells for the study of directed cell migration. *Methods Mol Biol* 2010, 591:147–158.

Mögel M, Krüger E, Krug HF, Seidel A. A new coculture-system of bronchial epithelial and endothelial cells as a model for studying ozone effects on airway tissue. *Toxicol Lett* 1998, 96-97:25–32.

Monsé C, Sucker K, van Thriel C, Broding HC, Jettkant B, Berresheim H, Wiethege T, Käfferlein H, Merget R, Bünger J, Brüning T. **Considerations for the design and technical setup of a human whole-body exposure chamber.** *Inhal Toxicol* 2012, 24(2):99–108.

Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K. **The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area.** *Occup Environ Med* 2007, 64(9):609–615.

Morin JP, Hasson V, Fall M, Papaioanou E, Preterre D, Gouriou F, Keravec V, Konstandopoulos A, Dionnet F. **Prevalidation of in vitro continuous flow exposure systems as alternatives to in vivo inhalation safety evaluation experimentations: outcome from MAAPHRI-PCRD5 research program.** *Exp Toxicol Pathol* 2008, 60(2-3):195–205.

Morrow PE. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* 1988, 10(3):369–384.

Morrow PE. Dust overloading of the lungs: update and appraisal. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992, 113:1–12.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65:55–63.

Mossman BT, Lippmann M, Hesterberg TW, Kelsey KT, Barchowsky A, Bonner JC. **Pulmonary endpoints (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos.** *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2011, 14(1–4):76–121.

Muhle H, Creutzenberg O, Bellmann B, Heinrich U, Mermelstein R. Dust overloading of lungs: investigations of various materials, species differences, and irreversibility of effects. *J Aerosol Med* 1990, 3 Suppl 1:111–128.

Muhle H, Kittel B, Ernst H, Mohr U, Mermelstein R. **Neoplastic lung lesions in rat after chronic exposure to crystalline silica.** *Scand J Work Environ Health* 1995, 21 Suppl 2:27–29.

Muhle H, Mangelsdorf. Inhalation toxicity of mineral particles: critical appraisal of endpoints and study design. *Toxicol Lett* 2003, 140–141:223–228.

Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* 1989, 143(4):1366–1371.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987, 155:335–350.

Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci* 2008, 101(2):239–253.

Murphy PM. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol* 1997, 34(4):311–318.

Musah S, DeJarnett N, Hoyle GW. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates interactions between macrophages and epithelial cells underlying proinflammatory gene expression induced by particulate matter. *Toxicology* 2012, 299(2-3):125–132.

NA 095, Normenausschuss Sicherheitstechnische Grundsätze (NASG). **DIN EN 481.** Arbeitsplatzatmosphäre; Festlegung der Teilchengrößenverteilung zur Messung Iuftgetragener Partikel. Deutsche Fassung, 1993.

Napierska D, Thomassen LC, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, Martens JA, Hoet PH. **Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells.** *Small* 2009, 5(7):846–853.

Napierska D, Thomassen LC, Lison D, Martens JA, Hoet PH. **The nanosilica hazard: another variable entity.** *Part Fibre Toxicol* 2010, 7(1):39.

Naumer H, Heller W. **Untersuchungsmethoden in der Chemie.** Weinheim: Wiley-Vch Verlag 1997.

Nemmar A, Holme JA, Rosas I, Schwarze PE, Alfaro-Moreno E. **Recent advances in** particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *Biomed Res Int* 2013, 2013:279371.

Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm* 2005, 60(2):167–178.

Neumann V, Theile A, Löseke S, Tannapfel A. Neue Aspekte zur Pathogenese der Asbestose. Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed 2011, 46:569–579.

Nicod LP, el Habre F, Dayer JM, Boehringer N. Interleukin-10 decreases tumor necrosis factor alpha and beta in alloreactions induced by human lung dendritic cells and macrophages. *Am J Respir Cell Biol* 1995, 13:83–90.

Noël A, Charbonneau M, Cloutier Y, Tardif R, Truchon G. **Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO2: effect of primary particle size and agglomeration state.** *Part Fibre Toxicol* 2013, 10:48.

Nuzzi PA, Lokuta MA, Huttenlocher A. **Analysis of neutrophil chemotaxis.** *Methods Mol Biol* 2007, 370:23–36.

Oberdörster G, Ferin J, Finkelstein J, Wade P, Corson N. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies. *J Aerosol Sci* 1990, 21:384–387.

Oberdörster G. Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul Toxicol Pharmacol* 1995, 21(1):123–135.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. **Nanotoxicology: an emerging discipline** evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005,113: 823–839.

Oberdörster G. Safety assessment for nanotoxicology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Int Med* 2009, 267(1):89–105.

Oberdörster G. **Nanotoxicology: in vitro-in vivo dosimetry.** *Environ Health Perspect* 2012, 120(1):A13.

OECD. Guidance manual for the testing of manufactured nanomaterials: OECD's sponsorship programme. First revision. ENV-JM-MONO (2009) 20-REV, Paris, 2010, 1–92.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Section 4, Health Effects. 2009.

Oeder S, Jörres RA, Weichenmeier I, Pusch G, Schober W, Pfab F, Behrendt H, Schierl R, Kronseder A, Nowak D, Dietrich S, Fernández-Caldas E, Lintelmann J, Zimmermann R, Lang R, Mages J, Fromme H, Buters JT. **Airborne indoor particles from schools are more toxic than outdoor particles.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012, 47(5):575–582.

Ogunbileje JO, Nawgiri RS, Anetor JI, Akinosun OM, Farombi EO, Okorodudu AO. **Particles internalization, oxidative stress, apoptosis and pro-inflammatory cytokines in alveolar macrophages exposed to cement dust.** *Environ Toxicol Pharmacol* 2014, 37(3):1060–1070.

Oomen AG, Bos PM, Fernandes TF, Hund-Rinke K, Boraschi D, Byrne HJ, Aschberger K, Gottardo S, von der Kammer F, Kühnel D, Hristozov D, Marcomini A, Migliore L, Scott-Fordsmand J, Wick P, Landsiedel R. Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment--report of the NanoSafety Cluster Working Group 10. *Nanotoxicology* 2014, 8(3):334–348.

Oppenheim J, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. **Properties of the novel proinflammatory supergene "intercine" cytokine family.** *Ann Rev Immunol* 1991, 9:617–648.

Park EJ, Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett* 2009, 184(1):18–25.

Pauluhn J, Mohr U. Inhalation studies in laboratory animals - current concepts and alternatives. *Toxicol Pathol* 2000, 28(5):734–753.

Pauluhn J. Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol Sci* 2010, 113(1):226–242.

Pauluhn J. Poorly soluble particulates: searching for a unifying denominator of nanoparticles and fine particles for DNEL estimation. *Toxicology* 2011, 279(1-3):176–188.

Pauluhn J. Derivation of occupational exposure levels (OELs) of Low-toxicity isometric biopersistent particles: how can the kinetic lung overload paradigm be used for improved inhalation toxicity study design and OEL-derivation? *Part Fibre Toxicol* 2014, 11(1):72.

Pecora R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research* 2000, 2:23–131.

Peretz A, Checkoway H, Kaufman JD, Traiber I, Lerman Y. Silica, silicosis, and lung cancer. *Isr Med Assoc* 2006, 8:114–118.

Porter AE, Muller K, Skepper J, Midgley P, Welland M. Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomater* 2006, 2(4):409–419.

Pott F, Friedrichs KH. Tumoren der Ratte nach i.p. Injektion faserförmiger Stäube. *Naturwissenschaften* 2010, 59:318–324.

Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. **Research** strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol Sci* 2006, 90(2):296–303.

Ramanakumar AV, Parent ME, Latreille B, Siemiatycki J. **Risk of lung cancer following** exposure to carbon black, titanium dioxide and talc: results from two case-control studies in Montreal. *Int J Cancer* 2008, 122(1):183–189.

Ramis G, Martínez-Alarcón L, Quereda JJ, Mendonça L, Majado MJ, Gomez-Coelho K, Mrowiec A, Herrero-Medrano JM, Abellaneda JM, Pallares FJ, Ríos A, Ramírez P, Muñoz A. **Optimization of cytotoxicity assay by real-time, impedance-based cell analysis.** *Biomed Microdevices* 2013, 15(6):985–995.

Rao KM, Porter DW, Meighan T, Castranova V. **The sources of inflammatory mediators in the lung after silica exposure.** *Environ Health Perspect* 2004, 112(17):1679–1686.

Reuzel PG, Bruijntjes JP, Feron VJ, Woutersen RA. **Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats**. *Food Chem Toxicol* 1991, 29(5):341–354.

Riechelmann H. Cellular and molecular mechanisms in environmental and occupational inhalation toxicology. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 2004, 3:Doc02.

Rimal B, Greenberg AK, Rom WN. **Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding.** *Curr Opin Pulm Med* 2005, 11(2):169–173.

Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A, Schaudien D. The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Part Fibre Toxicol* 2014, 11:59.

Rom WN. Relationship of inflammatory cell cytokines to disease severity in individuals with occupational inorganic dust exposure. *Am J Ind Med* 1991, 19(1):15–27.

Romeis B, Mulisch M, Welsch U. **Mikroskopische Technik**, 18. Auflage, Heildelberg: Springer, 2010.

Römpp H, Falbe J, Regitz M. **Römpp Chemie-Lexikon**, 10. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1995.

Rossi EM, Pylkkänen L, Koivisto AJ, Vippola M, Jensen KA, Miettinen M, Sirola K, Nykäsenoja H, Karisola P, Stjernvall T, Vanhala E, Kiilunen M, Pasanen P, Mäkinen M, Hämeri K, Joutsensaari J, Tuomi T, Jokiniemi J, Wolff H, Savolainen K, Matikainen S, Alenius H. Airway exposure to silica-coated TiO2 nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci* 2010, 113(2):422–433.

Roursgaard M, Jensen KA, Poulsen SS, Jensen NE, Poulsen LK, Hammer M, Nielsen GD, Larsen ST. Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice. *Scientific World Journal* 2011, 11:801–825.

Rouse RL, Murphy G, Boudreaux MJ, Paulsen DB, Penn AL. Soot nanoparticles promote biotransformation, oxidative stress, and inflammation in murine lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, 39(2):198–207.

Rubins JB. Alveolar macrophages: wielding the double-edged sword of inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167(2):103–104.

Rushton EK, Jiang J, Leonard SS, Eberly S, Castranova V, Biswas P, Elder A, Han X, Gelein R, Finkelstein J, Oberdörster G. **Concept of assessing nanoparticle hazards considering nanoparticle dosemetric and chemical/biological response metrics.** *J Toxicol Environ* 2010, Health A 73(5), 445–461.

Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A. Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci* 2009, 34(1):65–76.

Saloga J, Klimek L, Buhl R, Mann W, Knop J. Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis. Stuttgart: Schattauer, 2011.

Sauer UG, Aumann A, Ma-Hock L, Landsiedel R, Wohlleben W. Influence of dispersive agent on nanomaterial agglomeration and implications for biological effects in vivo or in vitro. *Toxicol In Vitro* 2015, 29(1):182–186.

Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 2006, 92(1):174–185.

Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci* 2007, 97(1):163–180.

Schinwald A, Donaldson K. Use of back-scatter electron signals to visualise cell/nanowires interactions in vitro and in vivo; frustrated phagocytosis of long fibres in macrophages and compartmentalisation in mesothelial cells in vivo. *Part Fibre Toxicol* 2012, 9:34.

Schinwald A, Murphy FA, Prina-Mello A, Poland CA, Byrne F, Movia D, Glass JR, Dickerson JC, Schultz DA, Jeffree CE, MacNee W, Donaldson K. **The threshold length for fiberinduced acute pleural inflammation: shedding light on the early events in asbestosinduced mesothelioma.** *Toxicol Sci* 2012a, 128(2):461–470.

Schins RPF, Hei TK. **Genotoxic Effects of Particles**. *Particle Toxicology*. Taylor and Francis Group, 2006, 285–298.

Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. **Dead cell discrimination with 7amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry.** *Cytometry* 1992, 13(2):204–208.

Schnekenburger J, Landsiedel R, Wiemann S, [...] Wohlleben W, Zünkeler S. **Chapter Toxicological Studies.** In: NanoCare, Health related aspects of nanomaterials. Final scientific report 2009, Dechema, Frankfurt, Germany, 22–73.

Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 2006, 56(2):69–83.

Schulte PA, Schubauer-Berigan MK, Mayweather C, Geraci CL, Zumwalde R, McKernan JL. Issues in the development of epidemiologic studies of workers exposed to engineered nanoparticles. *J Occup Environ Med* 2009, 51(3):323–335.

Schulz C, Kroll CM, Lehr UF, Schaefer K, Becker J, Schnekenburger C, Wohlleben W. **Not** ready to use – Overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* 2008, 2:51–61.

Schuurs AH, van Weemen BK. Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool. *J Immunoassay* 1980, 1(2):229–249.

Scuri M, Chen BT, Castranova V, Reynolds JS, Johnson VJ, Samsell L, Walton C, Piedimonte G. Effects of titanium dioxide nanoparticle exposure on neuroimmune responses in rat airways. *J Toxicol Environ Health A* 2010, 73(20):1353–1369.

Sergent JA, Paget V, Chevillard S. Toxicity and genotoxicity of nano-SiO2 on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann Occup Hyg* 2012, 56:622–630.

Shapiro AM. Practical flow cytometry. 4th Edition, New York: Wiley-Liss, 2003.

Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 2013, 15;10:15.

Shukla A, Gulumian M, Hei TK, Kamp D, Rahman Q, Mossman BT. **Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases.** *Free Radic Biol Med* 2003, 34(9):1117–1129.

Simeonova PP, Luster MI. Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced tumor necrosis factor-alpha response from alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 12(6):676–683.

Skillrud DM, Offord KP, Miller RD. **Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study.** *Ann Intern Med* 1986, 105(4):503–507.

Skoczen SL, Potter TM, Dobrovolskaia MA. Method for analysis of nanoparticle effects on cellular chemotaxis. *Methods Mol Biol* 2011, 697:247–253.

Snipes MB. Long-term retention and clearance of particles inhaled by mammalian species. *Crit Rev Toxicol* 1989, 20(3):175–211.

Sporn PHS, Murphy TM, Peters-Golden M. Complex effects of in vitro hyperoxia on alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 2:81–90.

Stanton MF, Wrench C. Mechanisms of mesothelioma induction with asbestos and fibrous glass. *J Natl Cancer Inst* 1972, 48:797–821.

Steimer A, Haltner E, Lehr CM. Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery. *J Aerosol Med* 2005, 18(2):137–182.

Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroeppel A, Karg E, Ritter B, Heyder J, Schulz H. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect* 2006, 114:328–333.

Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992, 6(2):235–243.

Stone V, Barlow PG, Hutchison GR, Brown D. **Proinflammatory effects of Particles on Macrophages and Epithelial Cells.** *Particle Toxicology*. Taylor and Francis Group, 2006, 183–196. Stone V, Johnston H, Schins RP. **Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations.** *Crit Rev Toxicol* 2009, 39(7), 613–626.

Stringer B, Imrich A, Kobzik L. Lung epithelial cell (A549) interaction with unopsonized environmental particulates: quantitation of particle-specific binding and IL-8 production. *Exp Lung Res* 1996, 22(5):495–508.

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci* 2008, 33(1):105–116.

Technische Regeln für Gefahrstoffe: **Arbeitsplatzgrenzwerte (900).** Ausgabe Januar 2006, 1–58. Erhältlich über www.baua.de.

Technische Regel für Gefahrstoffe: Verzeichnis krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender Stoffe (905). Ausgabe März 2014, 1–20. Erhältlich über www.baua.de.

Technische Regel für Gefahrstoffe: **Risikobezogenes Maßnahmenkonzept für Tätigkeiten mit krebserzeugenden Gefahrstoffen (910).** Ausgabe Februar 2014, 1–158. Erhältlich über www.baua.de.

Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005. 4:607–618.

Thurlbeck WM, Churg AM. **Pathology of the lung.** 2nd Edition. New York: Thieme Medical Publishers, New York. 1995.

Timbrell V, Gibson JC, Webster I. **UICC standard reference samples of asbestos.** *Int J Cancer* 1968, 3(3):406–408.

Tirouvanziam R. Neutrophilic inflammation as a major determinant in the progression of cystic fibrosis. *Drug News Perspect* 2006, 19(10):609–614.

Tran CL, Jones AD, Cullen RT, Donaldson K. **Exploration of the mechanisms of retention and clearance of low-toxicity particles in the rat lung using a mathematical model.** *Inhal Toxicol* 1999, 11(12):1077–1108.

Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K. **Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance.** *Inhal Toxicol* 2000, 12(12):1113–1126.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** *Int J Cancer* 1980, 26(2):171–176.

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. **Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester.** *Cancer Res* 1982, 42(4):1530–1536.

Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, Santamaria AB. **Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles.** *Toxicol Sci* 2006, 89(1):42–50.

Unfried K, Albrecht C, Klotz LO, von Mikecz A, Grether-Beck S, Schins RPF. **Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms.** *Nanotoxicology* 2007, 1(1): 52–71.

Valberg PA, Long CM, Sax SN. Integrating studies on carcinogenic risk of carbon black: epidemiology, animal exposures, and mechanism of action. *J Occup Environ Med* 2006, 48(12):1291–1307.

Vallyathan V, Goins M, Lapp LN, Pack D, Leonard S, Shi X, Castranova V. **Changes in bronchoalveolar lavage indices associated with radiographic classification in coal miners.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162(3 Pt 1):958–965.

van Berlo D, Haberzettl P, Gerloff K, Li H, Scherbart AM, Albrecht C, Schins RP. Investigation of the cytotoxic and proinflammatory effects of cement dusts in rat alveolar macrophages. *Chem Res Toxicol* 2009, 22(9):1548–1558.

van Ravenzwaay B, Landsiedel R, Fabian E, Burkhardt S, Strauss V, Ma-Hock L. Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO(2), pigmentary TiO(2) and quartz. *Toxicol Lett* 2009, 186(3):152–159.

VBG – Ihre gesetzliche Unfallversicherung. **Praxishilfe "Gib dem Staub keine Chance".** BC-Verlag, Wiesbaden, 2011. Erhältlich unter www.dguv.de/staub-info.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995, 184(1):39–51.

Vincent JH, Donaldson K. A dosimetric approach for relating the biological response of the lung to the accumulation of inhaled mineral dust. *Br J Ind Med* 1990, 47(5):302–307.

Vincent JH. Aerosol Science for Industrial Hygienists. Pergamon/Elsevier, Oxford, UK 1995, ISBN-0-08-042029-X.

Vippola M, Falck GC, Lindberg HK, Suhonen S, Vanhala E, Norppa H, Savolainen K, Tossavainen A, Tuomi T. **Preparation of nanoparticle dispersions for in-vitro toxicity testing.** *Hum Exp Toxicol* 2009, 28(6-7):377–385.

Vitzthum F, Bernhagen J. SYBR Green I: an ultrasensitive fluorescent dye for doublestranded DNA quantification in solution and other applications. *Recent Res Devel Anal Biochem* 2002, (2):65–93.

Vranic S, Garcia-Verdugo I, Darnis C, Sallenave JM, Boggetto N, Marano F, Boland S, Baeza-Squiban A. Internalization of SiO<sub>2</sub> nanoparticles by alveolar macrophages and lung epithelial cells and its modulation by the lung surfactant substitute Curosurf. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013, 20(5):2761–2170.

Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* 1960, 17:260–271.

Warheit DB, Carakostas MC, Kelly DP, Hartsky MA. Four-week inhalation toxicity study with Ludox colloidal silica in rats: pulmonary cellular responses. *Fundam Appl Toxicol* 1991, 16(3):590–601.

Warheit DB, McHugh TA, Hartsky MA. **Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts.** *Scand J Work Environ Health* 1995, 21 Suppl 2:19–21.

Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci* 2006, 91(1):227–236.

Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007a, 230:90–104.

Warheit DB, Webb TR, Colvin VL, Reed KL, Sayes CM. **Pulmonary bioassay studies with** nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci* 2007b, 95:270–280.
Warheit DB. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci* 2008, 101(2):183–185.

Westphal GA, Schremmer I, Rostek A, Loza K, Rosenkranz N, Brüning T, Epple M, Bünger J. Particle-induced cell migration assay (PICMA): A new in vitro assay for inflammatory particle effects based on permanent cell lines. *Toxicol In Vitro* 2015, 29(5):997–1005.

Wieckenberg M. Charakterisierung der Ratten-Makrophagenzelllinien R2 und NR8383 und Untersuchung des Einflusses ausgewählter mineralischer Fasern und Partikel auf die Freisetzung immunologisch wirksamer Substanzen. Dissertation. Universität Marburg, 2005.

Wiemann M, Bruch J. **Chapter Comparison of in vivo and in vitro findings.** In: NanoCare, Health related aspects of nanomaterials. Final scientific report 2009, Dechema, Frankfurt, Germany, 68–73.

Wong ML, Medrano JF. **Real-time PCR for mRNA quantitation.** *BioTechniques* 2005, 39:75–85.

World Health Organization. **Determination of airborne fibre number concentrations.** ISBN 92 4 154496 1, 1997, 3–4.

World Health Organization. Hazard prevention and control in the work environment: Airborne dust. WHO/SDE/OEH/99.14, 1999, 10–11.

Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. **Oops they did it again! Carbonnanotubes hoax** scientists in viability assays. *Nano Lett* 2006, 6:1261–1268.

Wottrich R, Diabaté S, Krug HF. **Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture.** *Int J Hyg Environ Health* 2004, 207(4):353–361.

Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol* 2009, 29(1):69–78.

Ye J, Shi X, Jones W, Rojanasakul Y, Cheng N, Schwegler-Berry D, Baron P, Deye GJ, Li C, Castranova V. Critical role of glass fiber length in TNF-alpha production and transcription factor activation in macrophages. *Am J Physiol* 1999, 276(3 Pt 1):L426–L434.

Zhang J, Song W, Guo J, Zhang J, Sun Z, Li L, Ding F, Gao M. **Cytotoxicity of different sized TiO2 nanoparticles in mouse macrophages.** *Toxicol Ind Health* 2013, 29(6):523–533.

Zoitos BK, De Meringo A, Rouyer E, Thelohan S, Bauer J, Law B, Boymel PM, Olson JR, Christensen VR, Guldberg M, Koenig AR, Perander M. In vitro measurement of fiber dissolution rate relevant to biopersistence at neutral pH: an interlaboratory round robin. *Inhal Toxicol* 1997, 9(6):525–540.

# Web-Referenzen

ATCC Datenbank: http://www.atcc.org/

Protokoll der Fa. Acea Biosciences: http://www.aceabio.com

Protokolle der Fa. Greiner: http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/ThinCert/492en\_Protocol\_Migration\_Assay.pdf http://www.gbo.com/bioscience

### 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 8: Streuung der Röntgenstrahlung an parallelen Netzebenen im Kristall, Einfallswinkel = Ausfallswinkel ( $\vartheta$ ), der untere Strahl legt einen längeren Weg zurück, den sogenannten Gangunterschied. Abbildung modifiziert (Römpp et al., 1995)......50

Abbildung 10: Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen von feinem SiO<sub>2</sub> (A), grobem Quarz (B), feinem Rutil (C), grobem Rutil (D), feinem Anatas (E), grobem Anatas (F), Bariumsulfat (G), Carbon Black (H)......61

Abbildung 11: Röntgenpulverdiffraktogramme von feinem SiO<sub>2</sub> (rot) und grobem Quarz (schwarz) sowie Referenz (blau) mit der PDF-Nr. 46-1045......63

Abbildung 16: Relative Änderung der Zellzahl zum Zeitpunkt 40 Stunden (= Zellindex zum Zeitpunkt 40 Stunden) in Abhängigkeit von der logarithmischen Dosis (g/cm<sup>2</sup>) des eingesetzten feinen und groben Anatas.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betrugen 196 µg/cm<sup>2</sup> (feines Anatas) und 255 µg/cm<sup>2</sup> (grobes Anatas)......70

Abbildung 17: Relative Änderung der Zellzahl zum Zeitpunkt 40 Stunden (= Zellindex zum Zeitpunkt 40 Stunden) in Abhängigkeit von der logarithmischen Dosis (g/cm<sup>2</sup>) des eingesetzten Bariumsulfats bzw. Carbon Blacks.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die IC<sub>50</sub>-Werte betrugen 456 µg/cm<sup>2</sup> (BaSO<sub>4</sub>) bzw. 55 µg/cm<sup>2</sup> (Carbon Black)......71

Abbildung 20: Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit feinem (links) und grobem (rechts) Rutil inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm SD$  aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: feines Rutil: p < 0,01; grobes Rutil: p < 0,05.......74

Abbildung 25: Anzahl migrierter unbehandelter NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit SiO<sub>2</sub>-Partikeln inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: feines SiO<sub>2</sub>: p < 0,05; grobes Quarz: p < 0,001......78

Abbildung 26: Anzahl migrierter unbehandelter NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit rutilen TiO<sub>2</sub>-Partikeln inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: feines Rutil: p < 0,01; grobes Rutil: p < 0,0001.....79

Abbildung 29: "Fold Change" von 84 proinflammatorischen Schlüsselproteinen nach der 16stündigen Inkubation von  $3x10^6$  NR8383 Zellen mit BaSO<sub>4</sub> (32 µg/cm<sup>2</sup>), grobem Quarz (64 µg/cm<sup>2</sup>), feinem SiO<sub>2</sub> (16 µg/cm<sup>2</sup>) und feinem SiO<sub>2</sub> (96 µg/cm<sup>2</sup>)......82

Abbildung 36: Anzahl migrierter dHL-60 Zellen nach der Stimulation mit den Überständen von THP-1 Zellen, die mit grobem und feinem Rutil verschiedener Dosierungen inkubiert wurden (linke Seite). Dazu im Vergleich die Anzahl eingewanderter dHL-60 Zellen nach der

Abbildung 39: Lasermikroskopische Abbildungen von NR8383 Alveolarmakrophagen, die 16 Stunden ohne Bariumsulfat-Partikel (Kontrolle) inkubiert waren. A: Hellfeld mit angefärbten Zellkernen (blau) B: angefärbten Lysosomen (rot), C: Eigenfluoreszenz der Partikel (grün). 94

Abbildung 40: Lasermikroskopische Abbildungen von NR8383 Zellen, die 16 Stunden mit nanoskaligem Bariumsulfat-CMC (50 µg/ml) inkubiert waren. A: Hellfeld mit angefärbten Zellkernen (blau) B: angefärbten Lysosomen (rot), C: Eigenfluoreszenz der Partikel (grün). 94

Abbildung 41: Lasermikroskopische Abbildungen von NR8383 Zellen, die 16 Stunden mit submikroskaligem Bariumsulfat-CMC (50 µg/ml) inkubiert waren. A: Hellfeld mit angefärbten Zellkernen (blau) B: angefärbten Lysosomen (rot), C: Eigenfluoreszenz der Partikel (grün). 95

Abbildung 42: Lasermikroskopische Abbildungen von NR8383 Zellen, die 16 Stunden mit mikroskaligem Bariumsulfat-CMC (50 µg/ml) inkubiert waren. A: Hellfeld mit angefärbten Zellkernen (blau) B: angefärbten Lysosomen (rot), C: Eigenfluoreszenz der Partikel (grün). 95

Abbildung 50: Migration von unbehandelten NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit verschiedenen Bariumsulfat-CMC-Partikeln inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: ns (A, B und C). Bei allen Messungen lag die Positivkontrolle (feines SiO<sub>2</sub>) im Bereich der historischen Kontrolle.

Abbildung 53: Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen von Chrysotil A (A), Krokydolith (B), Chrysotil B (C) und Amosit (D)......110

Abbildung 57: Migration von unbehandelten NR8383 Zellen nach Stimulation mit Überständen von NR8383 Zellen, die mit verschiedenen Asbestfasern inkubiert wurden.  $\overline{x} \pm$ SD aus drei unabhängigen Versuchen. ANOVA: Chrysotil A: p < 0,0001, Chrysotil B: n.s, Krokydolith: p < 0,001, Amosit: p < 0,05. Bei allen Messungen lag die Positivkontrolle (feines SiO<sub>2</sub>) im Bereich der historischen Kontrolle.

Abbildung 59: Fasertyp, mit dem inkubiert wurde, sowie der gemessene Fold Change im Vergleich zur Kontrolle. Getestete Dosierungen: Chrysotil A (4  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> bzw. 32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), Krokydolith (16  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), Chrysotil B (32  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) und Amosit (64  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)......118

bbildung 66: PXRD-Spektrum von Carbon Black. Carbon Black (rot), Referenz (blau) PDF- Ir. 75-2078
bbildung 67: PXRD-Spektrum von Bariumsulfat. BaSO <sub>4</sub> (rot), Referenz (blau) PDF-Nr. 24- 035197
bbildung 68: PXRD-Spektren von synthetisiertem Bariumsulfat-CMC. (A) nanoskaliges, (B) ubmikroskaliges, (C) mikroskaliges BaSO4 (schwarz). Referenz (rot) PDF-Nr. 00 024 1035. .198
bbildung 69: EDX-Analyse von Chrysotil A. Ermittelte Zusammensetzung: O: 41,32 %, Fei ,43 %, Mg: 29,50 %, Al: 0,80 %, Si: 25,96 %199
bbildung 70: EDX-Analyse von Krokydolith. Ermittelte Zusammensetzung: O: 28,56 %, Na: ,76 %, Mg: 1,55 %, Si: 29,46 %, Ca: 1,08 %, Fe: 34,59 %
bbildung 71: EDX-Analyse von Chrysotil B. Ermittelte Zusammensetzung: O: 40,35 %, Al: ,78 %, Mg: 29,90 %, Si: 26,03 %, Fe: 2,94 %200
bbildung 72: EDX-Analyse von Amosit. Ermittelte Zusammensetzung: O: 32,09 %, Mg: 4,69%, Si: 27,39 %, Fe: 35,83 %
bbildung 73: Exemplarische Darstellung der fluoreszenzspektroskopischen Messung von nikroskaligen Bariumsulfat-CMC-Partikeln

# 8.3 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonic acid, Arachidonsäure (dt.)
Abb	Abbildung
AGS	Ausschuss für Gefahrstoffe
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse (dt.)
BALF	bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BAuA	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
BET	Brunauer, Emmett, Teller
BK	Berufskrankheit
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
٥C	Grad Celsius
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
cDNA	Complementary DNA, komplementäre DNA (dt.)
CI	Cell Index, Zellindex (dt.)
CMC	Carboxymethylcellulose
CNT	Carbonnanotube
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease, Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (dt.)
Ct-Wert	cycle threshold, Zyklusschwellenwert (dt.)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleinsäure (dt.)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EU	Europäische Union
FCS	Fetal Calf Serum, Fetales Kälberserum (dt.)
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
fNLPNTL	N-Formyl-Norleucyl-Leucyl-Phenylalanyl-Norleucyl-Tyrosyl-Lysin
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht (dt.)
et al.	et altera (und andere)
g	Gramm
GBS	granuläre biobeständige Stäube

gDNA	genomic DNA, genomische DNA (dt.)
GefStoffV	Gefahrstoffverordnung
HSD	honestly significant difference, ehrlicher Signifikanzunterschied (dt.)
IC <sub>50</sub>	inhibitorische Konzentration (bei halbmaximaler Wirkung)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IL	Interleukin
IPA	Institut für Prävention und Arbeitsmedizin
I	Liter
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
LSM	Laserscanningmikroskopie
LT	Leukotrien
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MFI	Mean Fluorescence Intensity, Mittlere Fluoreszezintensität (dt.)
min	Minute
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mRNA	messenger RNA
nM	Nanomolar (nmol/l)
NP	Nanopartikel
ns	nicht signifikant
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development, Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (dt.)
(q)PCR	(quantitative Echtzeit) Polymerase Chain Reaction
PDI	Polydispersitätsindex
PICMA	Particle-Induced Cell Migration Assay, Partikel-induzierter Zellmigrationstest (dt.)
PM	Paticulate matter, "Schwebstaub" oder "partikuläre Luftverschmutzung"
PSP	"Poorly soluble particles", schwerlösliche Partikel (dt.) bzw. engl. für GBS
PXRD	Powder X-Ray Diffraction, Pulver-Röntgendiffraktometrie (dt.)
q.s.	quantum satis, so viel wie nötig (dt.)
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (dt.)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIN	RNA Integrity Number, RNA Integritätszahl (dt.)
RNA	Ribonucleic acid, Ribonucleinsäure (dt.)
RNS	Reactive Nitrogen Species, Reaktive Stickstoffradikale (dt.)
ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies (dt.)

Rplp1	Ribosomal Protein, large, P1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RTCA	Real Time Cell Analyzer, Zellanalyse in Echtzeit (dt.)
S	Sekunde
SD	Standard deviation, Standardabweichung (dt.)
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht (dt.)
Tab	Tabelle
ΤΝFα	Tumornekrosefaktor α
ТРА	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
UFP	Ultrafine Particles, Ultrafeine Partikel (dt.)
UICC	Union internationale contre le cancer, Internationale Vereinigung
	gegen Krebs (dt.)
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μΜ	Mikromolar (µmol/l)

Alle chemischen Elemente und Verbindungen sind nach der IUPAC- (International Union of Pure and Applied Chemistry) Nomenklatur abgekürzt.

### 8.4 Wissenschaftliche Leistung

#### 8.4.1 Veröffentlichungen

Westphal GA, Schremmer I, Rostek A, Loza K, Rosenkranz N, Brüning T, Epple M, Bünger J. Particle-induced cell migration assay (PICMA): A new in vitro assay for inflammatory particle effects based on permanent cell lines. *Toxicol In Vitro* 2015, 29(5):997-1005.

Schremmer I, Brik A, Weber DG, Rosenkranz N, Rostek A, Brüning T, Johnen G, Epple M, Bünger J, Westphal GA. Chemotaxis, cytokine and chemokine release of NR8383 macrophages after exposure to amorphous silica, crystalline quartz, barium sulfate and titanium dioxide. (Eingereicht bei Particle and Fibre Toxicology)

Loza K\*, Schremmer I\*, Bünger J, Westphal GA, Köller M, Epple M, Sengstock C (\*Equal contributors). Barium sulfate particle synthesis, internalization, apoptosis, necrosis and pro-inflammatory effects in NR8383 alveolar macrophages. (Manuskript in Vorbereitung)

Westphal GA, Schremmer I, Rosenkranz N, Mattenklott M, Brüning T, Bünger J. Asbestos induced cell migration of dHL-60 cells correlates with cytotoxicity and migration on NR8383 macrophages with fiber length. (Manuskript in Vorbereitung)

#### 8.4.2 Konferenzbeiträge

Schremmer I, Bryk O, Rosenkranz N, Weber D, Johnen G, Brüning T, Bünger J, Westphal GA. **Particle-induced cell migration is accompanied by the upregulation of proinflammatory cytokines and chemokines.** Abstracts of the 81th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2015, 388:S84.

Schremmer I, Bryk O, Rosenkranz N, Weber D, Johnen G, Brüning T, Bünger J, Westphal GA. Particle-induced cell migration: Silica and quartz but not barium sulfate induce migration of NR8383 alveolar macrophages. Chemical risk: innovative methods and techniques, 08.-10.04.2015, Nancy.

Schremmer I. Partikel-induzierte Zellmigration: Etablierung eines *in vitro*-Assays zur Beurteilung der inflammatorischen Wirkung von Partikeln in der Lunge. Nachwuchssymposium der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V., 18.-20.03.2015, München.

Schremmer I, Bryk O, Rosenkranz N, Weber DG, Johnen G, Brüning T, Bünger J, Westphal GA. **Correlation of particle-induced cell migration with pro-inflammatory cytokines and chemokines.** 14. Fraunhofer-Seminar Translational Airway Research Models of Lung Disease, 05. - 06.02.2015, Hannover.

Westphal GA, Schremmer I, Rostek A, Loza K, Rosenkranz N, Brüning T, Epple M, Bünger J. NR8383 rat macrophages can induce migration of differentiated HL-60 cells following challenge with TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> or carbon black. Abstracts of the 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). *Toxicol Lett.* 2014, 229:S200.

Schremmer I, Rosenkranz N, Brüning T, Bünger J, Westphal GA. **Migration of differentiated HL-60 cells can be induced by NR8383 rat macrophages following challenge with TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> or carbon black. Abstracts of the 80th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2014, 387:S87.** 

# 8.5 PXRD-Spektren



**Abbildung 64:** PXRD-Spektrum von Rutil. Feines Rutil (rot), grobes Rutil (schwarz), Referenz (blau) PDF-Nr. 21-1276.



**Abbildung 65:** PXRD-Spektrum von Anatas. Feines Anatas (rot), grobes Anatas (schwarz), Referenz (blau) PDF-Nr. 21-1272.



**Abbildung 66:** PXRD-Spektrum von Carbon Black. Carbon Black (rot), Referenz (blau) PDF-Nr. 75-2078.



**Abbildung 67:** PXRD-Spektrum von Bariumsulfat. BaSO<sub>4</sub> (rot), Referenz (blau) PDF-Nr. 24-1035.



**Abbildung 68:** PXRD-Spektren von synthetisiertem Bariumsulfat-CMC. (A) nanoskaliges, (B) submikroskaliges, (C) mikroskaliges BaSO<sub>4</sub> (schwarz). Referenz (rot) PDF-Nr. 00 024 1035.

### 8.6 EDX-Analysen



**Abbildung 69:** EDX-Analyse von Chrysotil A. Ermittelte Zusammensetzung: O: 41,32 %, Fe: 2,43 %, Mg: 29,50 %, Al: 0,80 %, Si: 25,96 %



**Abbildung 70:** EDX-Analyse von Krokydolith. Ermittelte Zusammensetzung: O: 28,56 %, Na: 4,76 %, Mg: 1,55 %, Si: 29,46 %, Ca: 1,08 %, Fe: 34,59 %



**Abbildung 71:** EDX-Analyse von Chrysotil B. Ermittelte Zusammensetzung: O: 40,35 %, Al: 0,78 %, Mg: 29,90 %, Si: 26,03 %, Fe: 2,94 %



**Abbildung 72:** EDX-Analyse von Amosit. Ermittelte Zusammensetzung: O: 32,09 %, Mg: 4,69 %, Si: 27,39 %, Fe: 35,83 %

# 8.7 Fluoreszenzspektroskopische Analysen



**Abbildung 73:** Exemplarische Darstellung der fluoreszenzspektroskopischen Messung von mikroskaligen Bariumsulfat-CMC-Partikeln.

### 8.8 Danksagung

Im Rahmen dieser Arbeit haben mir viele Kollegen den Zugang zu ihren Laboratorien und Messgeräten ermöglicht und dieses Projekt mit ihrer Fachkompetenz, und ihrer Hilfs- und Diskussionsbereitschaft unterstützt. Im Folgenden möchte ich daher bei allen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Jürgen Bünger für die Überlassung des interessanten Themas und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Proksch bedanke ich mich herzlichst für die freundliche Übernahme des Korreferates, die fakultätsübergreifende Betreuung und sein lebendiges Interesse an dieser Arbeit.

Ich danke PD Dr. Götz Westphal, der als Toxikologe dieses Projekt mit vielen guten Ideen gefüttert hat und dessen Tür stets für eine Diskussion offen stand.

Herrn Prof. Dr. Epple (*Center for Nanointegration Duisburg-Essen*) schulde ich sehr großen Dank für den großzügigen Zugang zu seinen modernen Laboratorien. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei M. Sc. Alexander Rostek für die Einweisungen in Methoden und Geräte, seine Leistungsbereitschaft und den ein oder anderen sonnigen Nachmittag auf dem Campus der Universität Essen. Besonderen Dank auch an Frau M. Sc. Kateryna Loza, die die Bariumsulfat-Partikel neben ihrer regulären Arbeit für mich synthetisiert und charakterisiert hat und stets für eine kollegiale und zuverlässige Zusammenarbeit zur Verfügung stand.

Herzlichen Dank an Alexander Brik für seine Expertise auf dem Gebiet der qPCR-Analytik, die eine qualitativ hochwertige Durchführung der Analysen überhaupt erst möglich machte. Auch bei Dr. Daniel Weber möchte ich mich bedanken für seine Diskussionsbereitschaft bezüglich der qPCR-Analytik, und für seine offene Art, die diese Arbeit noch angenehmer gemacht haben; und auch bei Dr. Georg Johnen für den abteilungsübergreifenden Zugang zu seinen Laboratorien.

Bei Herrn Prof. Dr. Köller und Frau Jun.-Prof. Dr. Christina Sengstock, Chirurgische Forschung Bergmannsheil Bochum, bedanke ich mich für die konstruktiven Vorschläge bezüglich der immunologischen Aspekte dieser Arbeit und den Zugang zu ihren Laboratorien, die Einweisung in die Durchflusszytometrie und ELISAs und in die konfokale Laserscanning-Mikroskopie.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Müller, Georg-August-Universität Göttingen, für sein Engagement als (Fern-)Weiterbildungsermächtigter im Rahmen meiner Weiterbildung zur Fachapothekerin für Toxikologie und für sein aufrichtiges Interesse an meiner Forschung.

Ich möchte mich ebenfalls bei Prof. Dr. Kleinebudde, Institut für Pharmazeutische Technologie der HHU Düsseldorf, dafür bedanken, dass ich die BET-Analysen in seinem Labor durchführen durfte. Bei Herrn Apotheker Robin Meier bedanke ich mich ganz herzlich für die kompetente Geräteeinweisung und die kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Birte Rauschning vom Zentralbereich des IPA ist es zu verdanken, dass ich gut gelaunt und pünktlich bei jeder Weiterbildung und jedem Kongress ankam, soweit es in ihren Händen lag.

Danke an M. Sc. Ria van Hecke (Lehrstuhl für Stochastik der Ruhr-Universität Bochum) für die kompetente statistische Beratung während und außerhalb des Lauftreffs.

Bei Tina Fleischer bedanke ich mich für die jederzeit gute Stimmung sowohl im Labor als auch bei der ein oder anderen gemeinsam verbrachten sportlichen Einheit nach Feierabend.

Zu guter Letzt muss hier Nina Rosenkranz ganz besonders erwähnt werden: Nina hat entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen, indem sie mich geduldig in alle Tücken der Zellkultur eingearbeitet hat. Sie hat während meiner Zeit als Doktorandin all meine Launen ertragen, mit mir auf wirklich jeden Teilerfolg angestoßen und das letzte Korrekturlesen dieser Arbeit übernommen, ohne dass ich sie überhaupt darum bitten musste. Sie ist während meiner Zeit am IPA nicht nur jeden Tag eine super Kollegin gewesen, sondern eine sehr gute Freundin für mich geworden. Danke für alles, Nina!

Natürlich danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden ("Wie läuft's mit den Zellen?") dafür, dass sie immer für mich da sind, und ganz besonders Lars, der immer an mich geglaubt hat.