

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Untersuchung der Zytotoxizität von Stäuben auf A549 und L929 Zellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katrin Gohlsch

aus Frankfurt an der Oder

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Betreuer: Priv. Doz. Dr. Dr. Harald Mückter (verstorben), Prof. Dr. rer. nat. Ingrid Boekhoff

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Rudolf Jörres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2020

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary	2
3	Einleitung.....	3
3.1	Gesundheitliche Schäden durch Partikel in der Atemluft.....	3
3.1.1	Aufnahme von Partikel.....	3
3.1.2	Aufbau und Funktion der Lunge.....	4
3.1.3	Auswirkungen von Partikeln auf die Gesundheit	5
3.2	REACH.....	6
3.2.1	Tierschutz unter REACH	6
3.3	Inhalationstoxikologie	7
3.3.1	Herausforderungen bei der Entwicklung von Alternativmethoden.....	9
3.3.2	Alternativmethoden in der Inhalationstoxikologie	12
3.3.3	CULTEX® Radial Flow System	13
3.4	Zelllinien	14
3.5	Testsubstanzen.....	15
3.5.1	Böhmit (Al(OH)O)	15
3.5.2	Cetylpyridiniumchlorid (C ₂₁ H ₃₈ ClN · H ₂ O)	16
3.5.3	β-Cyclodextrin (C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅)	16
3.5.4	di-Ammoniumphosphat ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	17
3.5.5	Kaliumpyrophosphat (K ₄ P ₂ O ₇)	17
3.5.6	Kupfer-II-hydroxid (Cu(OH) ₂).....	17
3.5.7	Kupfer-II-oxid (CuO)	18
3.5.8	Kupfer-II-sulfat (CuSO ₄)	18
3.5.9	D(+)-Laktose Monohydrat (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · H ₂ O).....	18
3.5.10	Natriumfluorophosphat (Na ₂ PO ₃ F)	18
3.5.11	Natriummetavanadat (NaVO ₃)	19
3.5.12	Natrium-N-lauroylsarcosinat (C ₁₅ H ₂₈ NO ₃ Na).....	19
3.5.13	Neodymoxid (Nd ₂ O ₃)	20
3.5.14	Siliziumdioxid (SiO ₂).....	20
3.5.15	Tetraacetylenylendiamin (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄)	21
3.5.16	Tetrabromphthalsäureanhydrid (C ₈ Br ₄ O ₃)	21
3.5.17	Vanadium-III-oxid (V ₂ O ₃)	21
3.5.18	Wolfram-IV-carbid (WC).....	22

3.5.19	Zinkdimethyldithiocarbamat ($C_6H_{12}N_2S_4Zn$)	22
3.6	Ziel der Arbeit.....	23
4	Material.....	24
4.1	Geräte.....	24
4.2	Verbrauchsmaterialien.....	25
4.3	Nährmedien, Pufferlösungen und Zusätze.....	26
4.4	Verwendete Testsubstanzen.....	27
4.5	Verwendete Zelllinien	27
5	Methoden.....	28
5.1	Zellkultur	28
5.1.1	Kultivierung der untersuchten Zelllinien.....	28
5.1.2	Zellzahlbestimmung	28
5.1.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	28
5.2	Biochemische Tests	29
5.2.1	Bestimmung der zellulären Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay)	29
5.3	Exposition von Zellen	30
5.3.1	<i>Air liquid interface</i> Exposition	30
5.3.1.1	Vorbereitung der Zellen	36
5.3.1.2	Expositionsdurchführung	37
5.3.1.3	Vitalitätsbestimmung	39
5.3.2	Submerse Exposition	40
5.3.2.1	Vorbereitung der Zellen	41
5.3.2.2	Expositionsdurchführung	41
5.3.2.3	Vitalitätsbestimmung	43
5.4	Statistik.....	44
6	Ergebnisse	45
6.1	Etablierung der Expositionsanlage	46
6.2	Expositionsversuche mit A549-Zellen	51
6.2.1	Böhmit ($Al(OH)O$)	51
6.2.2	β -Cyclodextrin ($C_{42}H_{70}O_{35}$).....	52
6.2.3	Kaliumpyrophosphat ($K_4P_2O_7$)	53
6.2.4	Kupfer-II-hydroxid ($Cu(OH)_2$).....	54
6.2.5	Natriummetavanadat ($NaVO_3$).....	56
6.2.6	Natrium-N-lauroylsarcosinat ($C_{15}H_{28}NO_3Na$).....	57
6.2.7	Neodymoxid (Nd_2O_3)	58

6.2.8	Siliziumdioxid (SiO ₂).....	59
6.2.9	Tetraacetylenhendiämin (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄)	60
6.2.10	Tetrabromphthalsäureanhydrid (C ₈ Br ₄ O ₃)	61
6.2.11	Cetylpyridiniumchlorid (C ₂₁ H ₃₈ ClN · H ₂ O)	62
6.2.12	di-Ammoniumphosphat ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	63
6.2.13	Kupfer-II-oxid (nano) (CuO).....	63
6.2.14	Kupfer-II-sulfat (CuSO ₄)	65
6.2.15	D(+)-Laktose Monohydrat (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · H ₂ O).....	66
6.2.16	Natriumfluorophosphat (Na ₂ PO ₃ F)	67
6.2.17	Vanadium-III-oxid (V ₂ O ₃)	68
6.2.18	Wolfram-IV-carbid (WC).....	69
6.2.19	Wolfram-IV-carbid (nano) (WC)	70
6.2.20	Zinkdimethyldithiocarbamat (C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄ Zn)	71
6.3	Expositionsversuche mit den L929-Zellen.....	72
6.3.1	Böhmit (Al(OH)O)	72
6.3.2	β-Cyclodextrin (C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅)	73
6.3.3	Kaliumpyrophosphat (K ₄ O ₇ P ₂)	74
6.3.4	Kupfer-II-hydroxid (Cu(OH) ₂)	75
6.3.5	Natriummetavanadat (NaVO ₃)	76
6.3.6	Natrium-N-lauroylsarcosinat (C ₁₅ H ₂₈ NO ₃ Na).....	77
6.3.7	Neodymoxid (Nd ₂ O ₃)	79
6.3.8	Siliziumdioxid (SiO ₂).....	80
6.3.9	Tetraacetylenhendiämin (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄)	81
6.3.10	Tetrabromphthalsäureanhydrid (C ₈ Br ₄ O ₃)	82
6.3.11	Zusammenfassung der submersen Expositionen mit zehn weiteren Substanzen...	84
7	Diskussion.....	87
7.1	Festlegung des „zytotoxischen Schwellenwerts“	87
7.2	Gegenüberstellung der Expositionsversuche.....	88
7.2.1	<i>Air liquid interface</i> Exposition der A549- und L929-Zellen.....	88
7.2.2	<i>Air liquid interface</i> Exposition und submerse Expositionsbedingung 1	90
7.2.3	<i>Air liquid interface</i> Exposition und submerse Expositionsbedingungen 2 und 3	92
7.3	Eigenarten der Zelllinien	95
7.4	Limitationen des biochemischen Tests (WST-1-Assay)	95
7.5	Zur Vergleichbarkeit beider Expositionsverfahren.....	98
7.6	Diskussion der Substanzauswahl.....	103

8	Ausblick: Etablierung von Alternativmethoden	104
9	Literaturverzeichnis.....	106
10	Anhang	I
10.1	Abkürzungsverzeichnis.....	I
10.2	Abbildungsverzeichnis.....	IV
10.3	Tabellenverzeichnis.....	VII
10.4	Publikationsverzeichnis.....	VIII
10.4.1	Originalarbeiten	VIII
10.4.2	Tagungsbeiträge.....	VIII
10.4.2.1	Vortrag.....	VIII
10.4.2.2	Poster	VIII
10.5	Eidesstattliche Versicherung.....	X
10.6	Danksagung.....	XI

1 Zusammenfassung

Luftgetragene Partikel kommen ubiquitär in der Umwelt und am Arbeitsplatz vor und können ein gesundheitliches Risiko darstellen. In Abhängigkeit von ihren physiko-chemischen Eigenschaften dringen die Partikel unterschiedlich tief in die Lunge ein. Obwohl die Atemwege effiziente Selbstreinigungsmechanismen besitzen, um einen Großteil der eingeatmeten Partikelmenge (ca. 100 Milliarden bis 10 Billionen Partikel/Tag) zu entfernen, konnte in epidemiologischen Studien nachgewiesen werden, dass die Interaktion zwischen Partikeln und Zellen zu chronischen Entzündungsständen und in manchen Fällen zu Malignomen führt. Die nachgewiesene Morbidität und Mortalität durch luftgetragene Partikel stellen nicht zuletzt auch ein erhebliches volkswirtschaftliches Problem dar.

Die Untersuchung der Lungentoxizität durch inhalierbare Stäube ist eine Herausforderung, da es schwierig ist, die in der Lunge ablaufenden Prozesse realitätsnah nachzustellen. Die Durchführung einer *in vitro*-Studie im Bereich der Inhalationstoxizität ist mit hohem technologischen Aufwand verbunden, um die *in vivo*-Situation zu simulieren. In bisherigen *in vitro*-Modellen wurden die Zellen entweder mit einem substanzhaltigen Medium (Submerskultur) oder direkt mit den Partikeln an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (Direktexposition) exponiert. Beide Expositionsmethoden unterscheiden sich hinsichtlich der Versuchsdurchführung und der wissenschaftlichen Aussagen.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei *in vitro*-Methoden (Submers- und Direktexposition) angewandt, um das zytotoxische Potenzial von 19 verschiedenen Substanzen zu bestimmen und miteinander zu vergleichen. Die Substanzauswahl war dabei von verschiedenen Faktoren (z.B. kommerzielle Verfügbarkeit) abhängig.

Für die Direktexposition von Zellen wurde die Expositionsanlage CULTEX® RFS (*Radial Flow System*) genutzt. Als Modelle wurden die Zelllinien A549 (humane Lungenepithelzellen) und L929 (murine Fibroblasten) verwendet. Der Vergleich beider Expositionsverfahren erfolgte durch die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität. Trotz des unterschiedlichen Ursprungs der Zellen waren die Sensitivitätswerte der Zytotoxizität der substanzbehandelten Zellen vergleichbar. Bei gleicher Expositionsdauer (24 h) war die Empfindlichkeit der Zellen bei der Direktexposition im Vergleich zur Submersexposition leicht erhöht. Deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien gab es bei der Spezifität. Die A549-Zellen zeigten eine höhere Spezifität an, d.h. die Quote, dass für „nicht inhalationstoxische“ Substanzen in den Expositionsverfahren negative Testergebnisse gefunden wurden, war höher.

Bei der Direktexposition wird davon ausgegangen, dass die Simulation der physiologischen Bedingungen der *in vivo*-Situation ähnlicher ist. Nachteilig ist der hohe Kosten- und Zeitaufwand bei der Versuchsdurchführung im Vergleich zur Submersexposition. Die Vergleiche der Versuchsergebnisse aus beiden (durchgeführten) *in vitro*-Methoden reichen für eine behördliche Validierung als Alternativmethode bei der Bestimmung der akuten Toxizität von inhalierbaren Substanzpartikeln nicht aus. Dennoch können Ergebnisse aus *in vitro*-Modellen verwendet werden, um eine Vorselektion bei der Festlegung der weitergehenden Expositionsabschätzung vorzunehmen. *In vitro*-Versuche können durch ihre einfache und kostengünstigere Durchführung einen wichtigen Beitrag zur Reduzierung bzw. Vermeidung von Tierversuchen leisten.

2 Summary

Airborne particles are ubiquitous in the environment and in the workplace and can pose a health risk. Depending on their physico-chemical properties, the particles reach different depths of the lung areas. Although the lungs have efficient self-cleaning mechanisms to remove most of the inhaled particles (approximately 100 billion to 10 trillion particles/day), epidemiological studies have shown that the interaction between particles and cells leads to chronic inflammatory states and in some cases to malignancies. The proven morbidity and mortality caused by airborne particles also pose a significant economic problem.

The examination of the lung toxicity due to inhaled dust is a challenge because it is difficult to realistically recreate the processes occurring in the lungs processes. Conducting an *in vitro* study in the field of inhalation toxicity involves a high technological effort to simulate the *in vivo* situation. In previous *in vitro* models, the cells were exposed either with a substance-containing medium (submerged culture) or directly with the particles at the air liquid interface (direct exposure). Both exposure methods differ with regard to the conduct of the experimental procedure and the scientific statements.

For the present work, two *in vitro* methods (submerged and direct exposure) were used to determine and compare the cytotoxic potential of 19 different substances. Substance selection was dependent on several factors (e.g. commercial availability).

For the direct exposure of cells, the exposure system CULTEX® RFS (Radial Flow System) was used. The cell lines A549 (human lung epithelial cells) and L929 (murine fibroblasts) were used as models. The comparison of both exposure methods was carried out by determining the sensitivity and specificity. Despite the different origin of the cells, the sensitivity values of the cytotoxicity of the substance-treated cells were comparable. At the same duration of exposure (24 h), the sensitivity of the cells to direct exposure was slightly higher in comparison to submerged exposure. There were clear differences between the cell lines in terms of specificity. A549 cells showed a higher specificity, i.e. the rate that negative test results were found for "non-inhalation-toxic" substances in the exposure procedure was higher.

For direct exposure it is assumed that the simulation of physiological conditions is more similar to the *in vivo* situation. Here, the high cost and time required in the experiment compared to the submerged exposure is disadvantageous. The comparisons of the test results from both (carried out) *in vitro* methods are not sufficient for official validation as an alternative method in the determination of the acute toxicity of inhalable substance particles. Nevertheless, results from *in vitro* models can be used to provide a preselection in the determination of further exposure assessment. *In vitro* tests can make an important contribution to the reduction or avoidance of animal experiments by their simple and more cost-effective implementation.

3 Einleitung

3.1 Gesundheitliche Schäden durch Partikel in der Atemluft

3.1.1 Aufnahme von Partikel

Luftgetragene Partikel kommen ubiquitär vor und entstehen durch natürliche (in der Umwelt) und anthropogene Einwirkungen. Natürliche Prozesse sind z.B. Waldbrände, Bodenerosionen oder vulkanische Aktivitäten. Die anthropogene Erzeugung von Partikeln ist vor allem durch die Nutzung fossiler Brennstoffe, Transport, Verkehr, Industrie und durch Aktivitäten am Arbeitsplatz bedingt. Gemische von Partikeln in der Luft bezeichnet man als Staub. In den Technischen Regeln für Gefahrstoffe wird dabei die folgende Unterteilung vorgenommen:

„Zu den Schwebstoffen gehören Staub, Rauch und Nebel. Staub ist eine disperse Verteilung fester Stoffe in Luft, entstanden durch mechanische Prozesse oder durch Aufwirbelung. Rauch ist eine disperse Verteilung fester Stoffe in Luft, entstanden durch thermische und/oder durch chemische Prozesse. Nebel ist eine disperse Verteilung flüssiger Stoffe in Luft, entstanden durch Kondensation oder durch Dispersion.“ (TRGS 900 2018)

Unter dem Begriff Exposition versteht man eine äußere oder innere Einwirkung, der ein Organismus ausgesetzt ist (Reichl 2009). Typische Aufnahmewege sind oral (durch Verschlucken), dermal (durch Hautkontakt) und inhalativ (durch Einatmen). Die Wirkung für den Organismus hängt von der Dauer (akut, chronisch), der Intensität der Exposition und der Reaktivität der beteiligten Stoffe ab. Akute Wirkungen zeigen sich kurze Zeit nach einmaligem Kontakt mit einer Substanz, wohingegen chronische Wirkungen nach mehrmaliger, oft monatelanger Exposition auftreten. Luftverschmutzungen und arbeitsplatzbedingte Belastungen (z.B. Feinstaub, Abgase), aber auch Tabakrauch (besonders bei Rauchern) führen eher zur chronischen Exposition. Zu akuten Expositionen kann es durch z.B. Unfälle oder Naturereignisse kommen.

Schätzungen ergaben, dass die Lunge pro Tag mit etwa 10^{11} bis 10^{13} Partikeln belastet wird (Tsuda et al. 2014). Die Konzentration von luftgetragenen Partikeln aller Größenklassen wird zwischen 5.000 und 10.000 Partikel pro cm^3 in ländlicher Umgebung bzw. bis zu 150.000 Partikel pro cm^3 in städtischer und in stark verkehrsbelasteten Umgebungen angegeben. Die Atemwege sind mit wirksamen Selbstreinigungsmechanismen ausgestattet, um mit der enormen Partikelmenge umzugehen und einen Großteil der eingeatmeten Partikel effizient zu eliminieren.

Chemische und physikalische Eigenschaften (Größe, Form, Dichte, etc.) der Partikel sind für die Eindringtiefe in die Lunge entscheidend (Abbildung 3.1). In Abhängigkeit von ihrer Größe erreichen die eingeatmeten Partikel unterschiedliche Abschnitte des Atemtrakts. Bei einem Durchmesser $> 10 \mu\text{m}$ erreichen die Partikel nur die oberen Atemwege, bei $2-10 \mu\text{m}$ gelangen sie in die Bronchien und Bronchiolen und bei $< 2 \mu\text{m}$ in die Alveolen (Aktories et al. 2009). Durch eine längere Wechselwirkung zwischen Partikeln und Zellen steigt die Wahrscheinlichkeit für gesundheitliche Auswirkungen, die sowohl förderlich als auch schädlich sein können.

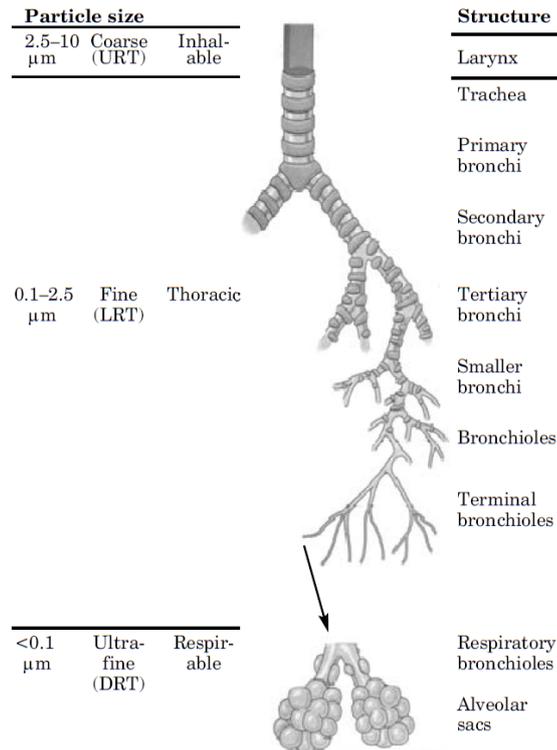


Abbildung 3.1 Eindringtiefe der Partikel in den Atemtrakt in Abhängigkeit von der Partikelgröße (entnommen aus BeruBe et al. 2009)

3.1.2 Aufbau und Funktion der Lunge

Bei Intoxikationen durch Inhalation ist vor allem der Atemtrakt betroffen. Bei Exposition gegenüber verschiedenen Substanzen kann es zu Schädigungen der Atemwegszellen kommen (Castell et al. 2005). Das Atmungssystem unterteilt sich in die luftleitenden (Nasopharynx, Trachea, Bronchen) und die gasaustauschenden Abschnitte (Lunge mit den Alveolen).

Aufgaben der luftleitenden Organe sind der Transport und die Erwärmung der Atemluft. Die Atemwege sind von einer Schleimhaut (Mucosa) mit einem Flimmerepithel, in das zahlreiche Becherzellen und tubulo-alveoläre (seromuköse) Drüsen eingelassen sind, ausgekleidet. Der von den Becherzellen gebildete, viskose Schleim und das von den Drüsen abgesonderte, dünnflüssige Sekret dienen u.a. als Schutz vor Austrocknung. Die auf dem Epithel befindlichen Flimmerhärchen (Kinozilien) unterstützen den Selbstreinigungsprozess, indem sie den Schleim und die darin befindlichen Partikel durch Zilienbewegungen in Richtung der Mundhöhle zum Oropharynx transportieren (Faller 1999, Tackmann 1991).

Die in der Brusthöhle liegenden Lungen unterteilen sich in zwei Lungenflügel, die sich wiederum in Lungenlappen und weiter in Lungensegmente gliedern (Böcker et al. 2004). Innerhalb der Lungensegmente verzweigen sich die Bronchien, die der Leitung der Luft dienen, in immer kleinere Äste (Bronchialbaum). Am Ende der Verzweigung des Bronchialbaums gehen mehrere kleinere Äste ab, die in Alveolengänge mit den Alveolensäcken münden. In den Alveolensäcken befinden sich die

Alveolen (Lungenbläschen), die der Ort des Gasaustauschs zwischen Luft und Blut sind. Bei einem Erwachsenen wird die Gesamtzahl der Alveolen, deren Durchmesser atemabhängig zwischen 50 μm und 250 μm schwankt, auf ungefähr 300 bis 700 Millionen in beiden Lungen geschätzt (BeruBe et al. 2009, Ochs et al. 2004, Weibel 2013). Das entspricht einer dem Gasaustausch dienenden Gesamtoberfläche von etwa 100 bis 140 m^2 (Böcker et al. 2004, Gehr et al. 1978, Knudsen et al. 2018). In der Lunge sind über 60 verschiedene Zelltypen zu finden (Knudsen et al. 2018, Stone et al. 1992). Wichtigste Aufgabe der Lunge ist der Gasaustausch, also die Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidabgabe. Die Alveolen als Ort dieses Gasaustauschs werden daher auch als Atmungskammern bezeichnet. Die Alveolen sind traubenartig aneinandergelagert, wobei sie an den Wänden mit den jeweils benachbarten Alveolen verwachsen sind. Die Alveolenwand wird von kleinen und großen Alveolarepithelzellen ausgekleidet. Man unterscheidet Pneumozyten Typ I und Pneumozyten Typ II. Die kleinen Alveolarepithelzellen (Pneumozyten Typ I) sind lange, dünne Zellen, die auch Deckzellen genannt werden, da sie etwa 97 % der Alveolaroberfläche bilden. Über Interzellularverbindungen (*tight junctions*) sind sie mit den großen Alveolarepithelzellen verbunden (Böcker et al. 2004, Tackmann 1991). Die großen Alveolarepithelzellen (Pneumozyten Typ II), die etwa 3 % der Alveolaroberfläche ausmachen, produzieren das sogenannte *Surfactant*. Das *Surfactant* (*surface active agent*) ist ein oberflächenaktives Gemisch aus 80-90 % Phospholipiden, 5-10 % neutralen Lipiden und 5-10 % Proteinen. Dieses verhindert durch die Reduzierung der Oberflächenspannung ein Zusammenfallen der Alveolen während der Atmung (Böcker et al. 2004, Knudsen et al. 2018, Stone et al. 1992).

Auf der Oberfläche der Alveolen sitzen die Alveolarmakrophagen, auch Fresszellen genannt. Zu deren Aufgabe gehört die Aufnahme von Fremdstoffen (Phagozytose) und der Abtransport sowohl über das Bronchial- und Lymphsystem, teilweise auch über die Blutgefäße. Durch mukoziliäre Clearance (Abscheidemechanismus) und Husten werden die Partikel mundwärts bewegt, nach Vermischung mit Speichel verschluckt und so aus dem Atemtrakt entfernt (Patton et al. 2010). Bei der Arbeit der Makrophagen werden Zytokine freigesetzt, die Entzündungszellen anlocken können. Laufen diese Prozesse über einen längeren Zeitraum ab, können sich in den Alveolen chronische Entzündungen ausbilden (TRGS 900 2018).

3.1.3 Auswirkungen von Partikeln auf die Gesundheit

In epidemiologischen Studien wurden die gesundheitlichen Auswirkungen von inhalierten Partikeln auf den Menschen untersucht. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Partikeln ($\leq 0,5 \mu\text{m}$) aus Industrie- und Umweltverschmutzung und der Beeinträchtigung der menschlichen Gesundheit gezeigt werden (Savi et al. 2008). Die schädigenden Auswirkungen der partikelhaltigen Luft reichten dabei von der Reizung bis zu systemischen Erkrankungen des Menschen (BeruBe et al. 2009). Es sind akute zyto- und genotoxische Effekte aber auch chronische Veränderungen möglich. Die beobachteten morphologischen und funktionellen Änderungen waren dabei teilweise reversibel, teilweise kam es zu persistenten Modifikationen der Luftwege (Aufderheide et al. 2011). In mehreren Studien wurde beim Menschen eine positive Korrelation zwischen Luftverschmutzung und der Verschlimmerung bereits bestehender Atemwegserkrankungen, ein Anstieg von Todesfällen durch kardiovaskuläre und kardiopulmonale Erkrankungen sowie Lungenkrebs nachgewiesen. Erhöhte Partikelbelastung war mit einer Einschränkung der Lungenfunktion bzw. einem Anstieg der Atembeschwerden, wie z.B. chronischer Husten, Dyspnoe,

Bronchitis und Asthmaanfälle, verbunden (Dockery et al. 1993, Dockery et al. 1989, Pope et al. 1991, Seaton et al. 1995). Auch nach der Berücksichtigung von Faktoren, z.B. Alter, Geschlecht, Zigarettenkonsum, berufsbedingte Exposition, blieb die Korrelation zwischen Luftverschmutzung und Erkrankungen bzw. Sterblichkeit auffällig (Dockery et al. 1993). Schätzungen zufolge sind ca. 800.000 vorzeitige Todesfälle und 7,9 Millionen sogenannter DALYs pro Jahr auf Luftschadstoffe zurückzuführen (WHO 2002). DALY (*disability-adjusted life year*) gibt die Anzahl der durch Krankheit, Behinderung oder frühen Tod verlorenen (Lebens-)Jahre an.

3.2 REACH

In der Europäischen Union (EU) trat am 1. Juni 2007 die Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH-Verordnung) in Kraft (Europäische Gemeinschaft 2006). Die Chemikalienverordnung REACH steht für die „Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe“ (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*). Diese Verordnung soll (1) einen Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt sicherstellen und (2) die Wettbewerbsfähigkeit der chemischen Industrie in der EU fördern. REACH gilt für alle chemischen Stoffe, die in der EU hergestellt, importiert, in den Verkehr gebracht oder verwendet werden. Ausgenommen sind Stoffe, die zu anderen gesetzlich geregelten Bereichen, wie z.B. Human- und Tierarzneimittel, Medizinprodukte, gehören. Die Verordnung ist an Unternehmen gerichtet, die Chemikalien herstellen oder importieren, denn nur unter REACH registrierte Stoffe dürfen in der EU hergestellt oder in den Verkehr gebracht werden („*no data – no market*“). Die Unternehmen sind in der Pflicht, die Risiken, die von den Stoffen ausgehen, aufzuzeigen und zu identifizieren sowie durch geeignete Risikomanagementmaßnahmen die Anwender zu informieren und vor Schaden zu bewahren. Zu diesen Informationen gehören u.a. Daten über die (schädigenden) Eigenschaften des Stoffes, Anreicherung im Organismus und Persistenz in der Umwelt als auch die Einschätzung über das Ausmaß der Exposition, d.h. in welchem Umfang der Mensch mit dem Stoff in Kontakt kommen kann. Der Datenumfang und die Prüfanforderungen sind von der jährlichen Produktionsmenge des hergestellten bzw. importierten Stoffs abhängig. Die zuständige Behörde ist die Europäische Chemikalienagentur (*European Chemical Agency, ECHA*) mit Sitz in Helsinki.

3.2.1 Tierschutz unter REACH

Ein wichtiges Ziel unter REACH ist der Tierschutz durch Anwendung des 3R-Prinzips (*replacement, reduction, refinement*) und die damit einhergehende Vermeidung bzw. Begrenzung von Tierversuchen (REACH-Verordnung, Titel III, Kapitel I, Artikel 25, Abs. 1). Das bedeutet, dass Tierversuche nach Möglichkeit durch alternative Methoden ersetzt (*replacement*), die Anzahl der eingesetzten Tiere (*reduction*) verringert wird oder durch intelligente und artgerechte Versuchsplanung bzw. -durchführung Belastung und Leiden (*refinement*) minimiert werden. Das 3R-Prinzip geht auf die wissenschaftlichen Arbeiten des Zoologen William Moy Stratten Russel und des Mikrobiologen Rex Leonard Burch in ihrem Buch „*The Principles of Human Experimental Technique*“ von 1959 zurück (Russell et al. 1959). Unternehmen, die Stoffe unter REACH registrieren müssen, sind angehalten, Tierversuche nur dann durchzuführen, wenn die Daten aus maßgeblichen und verfügbaren

Informationsquellen nicht ausreichen. Zu den Quellen zählen u.a. bestehende Veröffentlichungen und Alternativmethoden (z.B. *in vitro*-Studien oder *in silico*-Methoden).

Bei der Durchführung von *in vitro*-Studien werden Versuche mit kultivierten Zelllinien, isolierten Geweben oder Organen durchgeführt. Mit Hilfe kultivierter Zellen können zelluläre Prozesse, z.B. der Zellstoffwechsel, erforscht werden. Gleichzeitig ist es möglich, durch Manipulation der kultivierten Zellen mechanistische Vorgänge zu untersuchen. Nachteilig bei Zellkulturen ist, dass isolierte Zellen nicht alle biologischen und funktionellen Eigenschaften der *in vivo*-Situation aufzeigen (Rothen-Rutishauser et al. 2008b).

Unter *in silico*-Methoden werden mathematische und computergestützte Techniken und Modelle zusammengefasst, mit denen komplexe Abläufe simuliert und erwartbare Toxizitäten durch Strukturvergleiche vorhergesagt werden. Kern dieser Methoden sind Struktur-Wirkungs-Beziehung (*structure activity relationship*, SAR), d.h. es wird ein Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der biologischen Wirkung eines Moleküls abgeleitet.

Man unterscheidet Expertensysteme und quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*quantitative structure activity relationship*, QSAR). Bei den Expertensystemen erfolgt die Zusammenfügung von Kenntnissen über die Substanz und der entsprechende Strukturinformation in einer Datenbank („*knowledge base*“). Auf Grundlage der Daten können vor allem qualitative Aussagen über den Mechanismus einer Substanz, weniger über das Ausmaß der Effekte getroffen werden (Simon-Hettich et al. 2005). QSAR sind Modelle, die vorhandene Daten einer Substanzgruppe nutzen, um die wahrscheinliche Wirkung einer Substanz mit ähnlichen Strukturmerkmalen vorauszusagen (Taylor et al. 2014). (Halb)quantitative Aussagen sind aufgrund von Korrelationsbetrachtungen möglich. Diese basieren auf der Zuordnung von (physiko)chemischen Eigenschaften (z.B. Elektronendichteverteilung, Polarität, Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) und beobachteten biologischen Effekten (Simon-Hettich et al. 2005). Derzeit ist die Komplexität biologischer (toxischer) Effekte mit computergestützten Programmen nur schlecht vorhersagbar. Diese Vorhersagesysteme werden dennoch zukünftig in Prüfverfahren einen wichtigen Stellenwert haben, da sie eine wertvolle Ergänzung vor allem bei der toxikologischen Einordnung von bislang unbewerteten Stoffen bieten. Die Bedeutung für den Tierschutz besteht laut Simon-Hettich et al. vor allem darin, „eindeutig positiv vorhergesagte und von einem Experten ebenfalls so bewertete Substanz nicht der experimentellen Testung zu unterziehen, sondern nur mehr die als unwirksam, vorhergesagten Substanzen tierexperimentell zu überprüfen“ (Simon-Hettich et al. 2005). Die Anzahl der Tierversuche könnte dadurch drastisch verringert werden.

3.3 Inhalationstoxikologie

Entsprechend der REACH-Verordnung werden die toxikologischen Daten von den registrierungspflichtigen Stoffen unter verschiedenen Expositionsrouten erfasst. Die Methoden zur Toxizitätsprüfung sind in der Verordnung (EG) Nr. 440/2008, Teil B: Methoden zur Bestimmung der Toxizität und sonstiger Auswirkungen auf die Gesundheit, geregelt (Europäische Gemeinschaft 2008a). Eine Toxizitätsprüfung unter dieser Verordnung ist die „Akute Toxizität (Inhalation)“. Diese orientiert

sich an den von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (*Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD) im Rahmen der Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien (*Guidelines for the Testing of Chemicals*) erstellten Prüfrichtlinien (*Test Guidelines*, TG) TG 403 (*Acute Inhalation Toxicity*), TG 433 (*Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure*) und TG 436 (*Acute Inhalation Toxicity - Acute Toxic Class Method*) (OECD 2009a, 2009b, 2018b).

Bei der Prüfung der akuten Toxizität werden Nagetiere (vorzugsweise Ratten) mit der Prüfsubstanz für eine bestimmte Zeit (meist 4 Stunden) exponiert. Für die Untersuchung sind Inhalationskammern zu nutzen, die den ganzen Körper oder nur den Kopf bzw. Kopf-Nase-Bereich betreffen. Bei Ganzkörperexpositionen wird angenommen, die menschliche Situation realistischer nachzustellen, gleichzeitig ist die Stoffabsorption über andere Aufnahmewege möglich (Pauluhn 2003b). In den Prüfkammern muss eine homogene Prüfatmosfera sichergestellt werden. Die Versuchstiere werden nach der Exposition mindestens 14 Tage lang beobachtet, wobei auf körperliche Veränderungen als auch auf Änderungen des Verhaltens geachtet wird. Betrachtet werden u.a. Fell, Haut, Schleimhäute, Augen, Atmung, Salivation, Nervensystem, Motorik, Schlafverhalten und Nahrungsaufnahme. Am Versuchsende erfolgt die Sezierung aller während des Versuchs gestorbener Tiere und der überlebenden Tiere. Tritt innerhalb des Beobachtungszeitraums keine substanzbedingte Mortalität auf, die durch eine vierstündige Exposition nach 5 mg/l (Aerosol, Stäube), 20 mg/l (Dunst) oder 20.000 ppm (Gas) bzw. durch die maximal erreichbare Konzentration bei der Anwendung bestimmt wird, wird die Einstufung als „nicht giftig“ vorgenommen und von weiteren Versuchen abgesehen.

Die einzelnen Prüfrichtlinien unterscheiden sich im Design der Versuchsdurchführung (Tabelle 3.1, (OECD 2018a)). Je nach wissenschaftlichen Erfordernissen wird bei der TG 403 zwischen der traditionellen LC₅₀-Studie und der C x t-Studie (Konzentration x Zeit-Studie) unterschieden. Bei der LC₅₀-Studie werden fünf Tiere pro Geschlecht und Konzentration exponiert. Bei der schrittweisen Abstufung wird angenommen, dass die niedrigste Konzentration die geringste Sterblichkeit bedingt bzw. die höchste Konzentration für die meisten Tiere tödlich ist. Die Konzentration der Prüfsubstanz ist so zu wählen, dass aus der Konzentrations-Mortalitäts-Kurve (Absterbekurve) ein Erwartungswert für die letale Konzentration, die zum Absterben von 50 % der Testpopulation führt (LC₅₀-Wert), angebar ist. In der aktuellen Ausführung sind mindestens drei Dosisgruppen zu wählen. Bei der C x t-Studie werden die Tiere entweder einer Konzentration (*Limit Test*) oder mehreren Expositionszeiträumen pro Konzentration ausgesetzt. Bei der TG 403 basiert die Einstufung der Toxizität auf der Mortalität der Tiere und dem daraus abgeleiteten mittleren letalen Konzentrationswert (LC₅₀). Bei der Studie nach der TG 433 werden Gruppen von fünf (vorzugsweise männlichen) Tieren in festgelegten Konzentrationen exponiert. Für die eindeutige Einstufung der Toxizität können weitere Tiergruppen mit niedrigeren oder höheren Konzentrationen der Prüfsubstanz behandelt werden. Die TG 436 ist der TG 433 im Ablauf ähnlich. Auch hier werden für die Einstufung der Toxizität die Tiere mit festgelegten Konzentrationen behandelt. Die Anzahl der Tiere unterscheidet sich, da bei der TG 436 Gruppen von jeweils drei Tieren pro Geschlecht exponiert werden (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Vergleich der TG 403, TG 433 und TG 436 zur Prüfung der Akuten Toxizität (Inhalation)

	TG 403 (LC₅₀-Studie)	TG 403 (C x t-Studie)	TG 433	TG 436
Test-Konzentrationen	abhängig vom Studiendesign	abhängig vom Studiendesign	Aerosole: 0,05; 0,5; 1,0; 5,0 mg/l Dunst: 0,5; 2,0; 10,0; 20,0 mg/l Gase: 100; 200; 2.500; 20.000 ppm	Aerosole: 0,05; 0,5; 1,0; 5,0 mg/l Dunst: 0,5; 2,0; 10,0; 20,0 mg/l Gase: 100; 200; 2.500; 20.000 ppm
Expositionsdauer	(meist) 4 h	5 Expositionszeiträume pro Konzentration	4 h	4 h
Anzahl der Tiere	5 ♀ und 5 ♂	1-2 ♀ und 1-2 ♂ (je Expositionszeitraum)	5 ♂ (vorzugsweise)	3 ♀ und 3 ♂

3.3.1 Herausforderungen bei der Entwicklung von Alternativmethoden

Auf der einen Seite steigt die Nachfrage nach Untersuchungen zu Gefahren- und Risikobewertungen für die menschliche Gesundheit und Umwelt. Gleichzeitig gilt es, die Forderungen nach Alternativmethoden zu Tierversuchen zu erfüllen. Die Entwicklung, Etablierung und die anschließende Akzeptanz von Alternativmethoden durch Behörden sind langwierig und schwierig (Garthoff 2005). Die Entwicklung alternativer Testansätze in der Inhalationstoxikologie ist durch die Komplexität der *in vivo*-Situation eine methodische Herausforderung.

Nach TG 403, TG 433 und TG 436 werden unter der akuten Inhalationstoxizität alle schädlichen Auswirkungen auf den Atemtrakt und die systemische Schädigung durch inhalierbare Substanzen nach einmaliger Expositionsdauer (< 24 h) zusammengefasst. Die Untersuchung der pathologischen Veränderungen und Störungen des Atemtrakts ist durch unterschiedliche Methoden möglich, wobei die jeweiligen Vor- und Nachteile vor Versuchsdurchführung abzuwägen sind:

- (1) *in vivo*-Studien (Tierversuche)
- (2) *ex vivo*-Studien (Untersuchungen an Zellen, Geweben, Organen außerhalb des Organismus)
- (3) *in vitro*-Studien (Zellkultursysteme)

Versuche mit Tieren imitieren am ehesten die Situation beim Menschen (Pauluhn 2005). Sie bieten den Vorteil der langfristigen Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Prüfsubstanz und Organismus. Die Aussagekraft der *in vivo*-Versuche wird durch die speziesbedingten Unterschiede limitiert. Der Atemtrakt ist aus über 60 verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt, die entsprechend ihrer mannigfaltigen Funktion in verschiedenen Bereichen des Atemtrakts lokalisiert sind (Knudsen et al. 2018, Parent 2015, Stone et al. 1992). Sie sind Angriffspunkt für toxische Wirkungen, so dass aufgrund der Komplexität auf zellulärer Ebene eine Bewertung in der Lungentoxikologie diffizil ist. Speziesbedingte anatomische Abweichungen in der Lungenmorphologie, verschiedene

Atemfrequenzen und -tiefen wirken sich auf die Schadensprofile aus und begrenzen die Übertragbarkeit der aus Tierversuchen gewonnenen Daten auf die menschliche Situation (Parent 2015). Für die Translation der Daten werden spezies-spezifische Extrapolationsfaktoren angewandt, für die es standardisierte Vorgehensweisen gibt. Der Gebrauch solcher Extrapolationsfaktoren bei der Festlegung von Grenzwerten ist immer mit Unsicherheiten verbunden (TRGS 900 2018).

Im Vergleich zu anderen Aufnahmewegen ist die Abschätzung der durch Inhalation aufgenommenen Substanzmenge durch die heterogene Partikelverteilung im Atemtrakt schwierig (Pauluhn 2008). Meist wird die ‚Partikelkonzentration in der Atmosphäre‘ als Dosis bezeichnet. Die inhalativ aufgenommene Menge von Substanzen ist von mehreren Faktoren abhängig wie z.B. Expositionskonzentration und -dauer, Partikelgröße, individuelles Atmungsverhalten. Zudem muss die Kinetik der Partikel, d.h. die Liberation, Absorption, Retention im Atemtrakt, die Verstoffwechslung und Elimination, berücksichtigt werden (Pauluhn 2003a). Der Großteil der Toxizitätsstudien wird mit Einzelsubstanzen durchgeführt, während die Substanzen in der Atmosphäre meist als Gemisch auftreten, wie z.B. bei Umweltkontaminationen, Tabakrauch, Abgasen. Untersuchungen mit Substanzgemischen stellen eine besondere Herausforderung bei der Bewertung der Toxizität dar (Pauluhn 2005). Die Generierung von Aerosolen wird bei den derzeitigen Testmethoden in der Inhalationstoxikologie durch aufwändige Apparate ermöglicht, bei der die gleichmäßige und stabile Partikelgeneration eine technische Herausforderung ist (Pauluhn 2004).

Zellkultursysteme (*in vitro*-Methoden) können dazu beitragen, die Interaktionen der inhalierten Partikel mit den Zellen zu verstehen. Vorteilhaft bei *in vitro*-Versuchen ist die technisch einfache, schnelle und kostengünstige Durchführung. Die Methoden unterscheiden sich durch die verwendeten Zelltypen und durch die Art der Substanzeinbringung bei der Exposition. Die Vorzüge und Beschränkungen der einzelnen Systeme und das Ziel der Untersuchung beeinflussen die Wahl der Versuchsdurchführung. Die für *in vitro*-Versuche verwendeten Zellen sollten in ihrem Verhalten der *in vivo*-Situation so ähnlich wie möglich sein (Emura et al. 1990). Die verschiedenartigen zellulären Mechanismen und biologischen Reaktionen der nativen Zellen, Geweben und Organe werden in *in vitro*-Versuchen rationalisiert. *In vitro*-Kulturen können allerdings die differenzierten funktionellen Charakteristika der entsprechenden Gewebe und Organe nicht vollständig widerspiegeln (Rothen-Rutishauser et al. 2008b).

Gebräuchlich sind menschliche Primärzellen (z.B. humane Bronchialepithelzellen (HBE) oder kleine Atemwegsepithelzellen (SAEC)) oder Zelllinien (z.B. BEAS-2B, Calu-3, A549 oder NCI-H292) (Clippinger et al. 2018a). Durch die Verwendung von nur einem Zelltyp (Monokulturen) können Informationen über zelluläre Signalwege untersucht werden. Beispielsweise werden für die Erforschung von biochemischen und molekularen Mechanismen bei Atemwegserkrankungen wie Asthma, Zystischer Fibrose und chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) epitheliale Zellen verwendet (Mathis et al. 2013). Nachteilig bei Monokulturen ist die fehlende Abbildung der komplexen *in vivo*-Situation (Blank et al. 2006, Kasper et al. 2011, Rothen-Rutishauser et al. 2008a). Der mangelhaften Ähnlichkeit der physiologischen Situation wird durch die parallele/gleichzeitige Kultivierung von verschiedenen Zelltypen (Co-Kulturen) begegnet. In komplexen Kultivierungssystemen ist die Bestimmung der spezifischen Rolle der einzelnen Zelltypen bei der Interaktion mit der Substanz schwierig (Herzog et al. 2013, McMullen et al. 2018). Ein *in vitro*-Testsystem bestehend aus allen Zelltypen ist zum derzeitigen Zeitpunkt nicht umsetzbar (Clippinger et al. 2018a).

Die mono- oder co-kultivierten Zellen der *in vitro*-Modelle werden direkt mit den Partikeln an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (*air liquid interface*, ALI) oder in einem partikelhaltigen Medium (submers, SUB) exponiert (Abbildung 3.2). Die ALI Exposition von Zellen ist eine Methodik, bei der die Zellen direkt mit Gasen, festen oder flüssigen Substanzen in Kontakt treten (Mathis et al. 2013, Paur et al. 2011). Dieses Expositionsverfahren soll die Situation in den Alveolen der Lunge realitätsnäher darstellen und für die Untersuchung der Mechanismen der Toxizität bei Lungenschädigungen geeigneter sein. Für die Durchführung von ALI Expositionen können verschiedene zellbasierte Modellsysteme angewandt werden (Faber et al. 2018). Die Verwendung von Zellkulturinserts ist dabei sehr verbreitet. In diesem Versuchssystem befinden sich die Zellen auf einer semipermeablen Membran. Die Nährstoffversorgung erfolgt durch Poren von der basalen Seite. Auf der apikalen Seite gelangen während der Exposition die Zellen direkt mit dem Gas oder der Substanz in Kontakt. Bei der Durchführung der ALI Expositionen kann die Dosis, d.h. die applizierte Substanzmenge, ermittelt werden (Paur et al. 2011). Eine Alternative zu den Zellkulturinserts bietet das *Hanging Drop*-Verfahren. Hierbei werden auf der Unterseite von sogenannten Hängenden Fallplatten (*hanging drop plates*) geringe Volumina (Tröpfchen) einer Zellsuspension aufgebracht. Durch diese Zellkultivierung bilden sich Sphäroide, die nachfolgend eine langfristige Exposition (bis 20 Tage) ermöglicht (Faber et al. 2018, Liu et al. 2013)

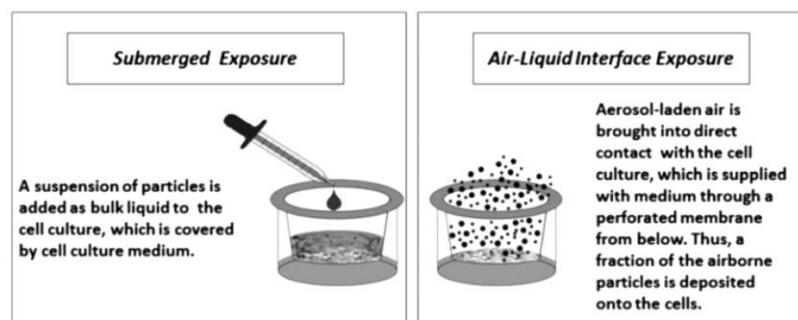


Abbildung 3.2 Vergleich der Partikelexposition von Zellen bei submerser Kulturbedingung (links) und an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (rechts) (entnommen aus Paur et al. 2011)

Bei der SUB Exposition wird die Substanz in Flüssigkeit (meist Medium) dispergiert und zu den Zellen gegeben, d.h. die Zellen sind vollständig mit substanzhaltigem Medium überschichtet. Die auf die Zellen einwirkende Partikelmenge kann abgeschätzt werden, da die Konzentration im Kulturmedium proportional zur Dosis ist (Paur et al. 2011). Eine Interaktion zwischen Partikeln und Medium, z.B. durch Agglomeratbildung, ist nicht auszuschließen, was die biologische Wirkung beeinflussen kann (Paur et al. 2011). Die Entscheidung für das passende Testsystem ist von den physiko-chemischen Eigenschaften der Substanz abhängig (Clippinger et al. 2018a, Paur et al. 2011).

3.3.2 Alternativmethoden in der Inhalationstoxikologie

Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro*-Modelle für die Untersuchung der Toxizität von luftgetragenen Substanzen nützlich sind. Die im Folgenden aufgezeigten Ansätze stellen eine Auswahl von Alternativmethoden in der Inhalationstoxikologie dar. Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden sind u.a. die verwendeten Substanzen und deren spezifische Einbringung in das Testsystem als auch unterschiedliche Zellsysteme und Zelllinien. Die meisten Ansätzen basieren auf der ALI Exposition luftgetragener Partikel. Bei vielen Testsystemen handelt es sich um laborspezifische Konstruktionen und Anwendungen. Es gibt aber auch kommerzielle Expositionssysteme, wie die CULTEX® Expositionstechnologie oder das Vitrocell® System (Paur et al. 2011, Upadhyay et al. 2018).

ALICE

Das *air liquid interface cell exposure system* (ALICE) ist speziell für die Exposition von aerosolisierten Nanopartikeln entwickelt. Im Expositionssystem wird eine Tröpfchenwolke erzeugt, die dann zu den Expositionskammern geleitet wird und sich dort gleichmäßig auf der Zelloberfläche abgelagert (Upadhyay et al. 2018). Dieses Verfahren wurde bei der Untersuchung von co-kultivierten Zellen mit Silbernanopartikeln (Herzog et al. 2013), Zink und Gold (Lenz et al. 2009) verwendet.

XposeALI

Mit dem von Ji et al. entwickelten System XposeALI, das an den *PreciseInhale*-Aerosolgenerator gekoppelt werden kann, können Zellen mit Aerosolen (bes. aerosolisierten Nanopartikeln) behandelt und untersucht werden. Das Expositionssystem wurde in einer von Ji et al. durchgeführten Studie zur Untersuchung der Auswirkungen von Palladium-Nanopartikel auf 3D-Modelle (humane primäre Bronchialepithelzellen und Fibroblasten) verwendet (Ji et al. 2017).

Hanging Drop

Liu et al. entwickelten das *Hanging Drop Air Exposure System*. Die ALI Exposition mit Aerosolen ist für einen Zeitraum von 1 Stunde bis 20 Tage möglich. Als Modellsystem wurden beispielsweise A549-Zellen eingesetzt (Liu et al. 2013).

Vitrocell® System

Dieses *in vitro*-Expositionssystem ist eine Konstruktion, die Aerosole direkt durch Einlassdüsen zu den Zellen führt. Die definierte Abscheidung von Partikel ist durch einen grö ßenselektierenden Einlass an der Zuleitung möglich. Mit dieser Apparatur wurden in mehreren Studien Untersuchungen von Zigarettenrauch, luftgetragenen Schadstoffen und Nanomaterialien als auch mit Aerosolen, die zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden können, durchgeführt (Deschl et al. 2011, Keyser et al. 2019, Majeed et al. 2014).

3.3.3 CULTEX® Radial Flow System

In der vorliegenden Arbeit wurde das patentierte Expositionssystem CULTEX® *Radial Flow System* (CULTEX® RFS, Cultex Laboratories, Hannover; PCT/EP2009/007054) verwendet (Abbildung 3.3) (Mohr 2010). Durch eine hochentwickelte Technik ist dieses Expositionssystem flexibel einsetzbar und für unterschiedliche Expositionsszenarien geeignet. Der Vergleich von Ergebnissen aus Expositionsexperimenten zeigte eine definierte Exposition und eine gute Reproduzierbarkeit sowohl innerhalb eines Labors als auch zwischen verschiedenen Laboren (Steinritz et al. 2013, Tsoutsouloupoulos et al. 2019).

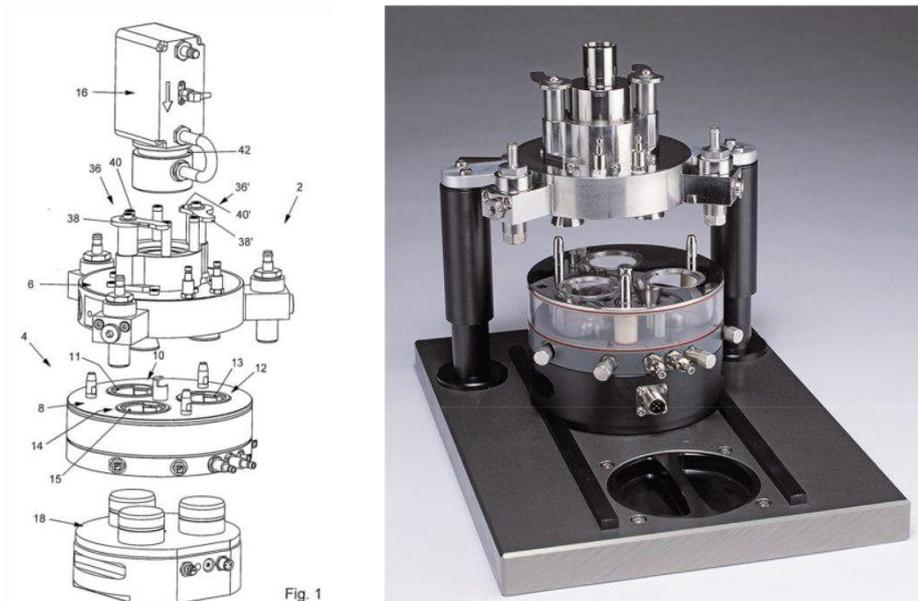


Abbildung 3.3 Darstellung des Expositionssystems CULTEX® RFS (entnommen aus Mohr 2010 (links) bzw. Aufderheide et al. 2017 (rechts))

Das CULTEX® RFS kann für die Untersuchung von Gasen, luftgetragenen Partikeln (Aerosolen) als auch komplexen Gemischen (z.B. Dieselabgase, Zigarettenrauch, flüchtige Substanzen) nach direkter Exposition von Zellen verwendet werden (Aufderheide et al. 2000, Paur et al. 2011). Als zelluläre Testsysteme können kultivierte Zellen (u.a. A549, 16HBE14o-) und Bakterien (z.B. *Salmonella typhimurium*) dienen, die sich in voneinander unabhängigen Expositionskammern befinden (Aufderheide et al. 2013, Aufderheide et al. 2011). Durch die biphasische Kulturtechnik wird die Exposition an der Luft-Flüssigkeits- bzw. Luft-Agar-Grenzschicht ermöglicht. Dabei werden die auf einer mikroporösen Membran kultivierten Zellen von der basalen Seite mit Nährstoffen versorgt. Gleichzeitig treten die Zellen an der apikalen Seite direkt mit den Partikeln in Kontakt, ohne dass diese zuvor im Expositionsmedium solvatisiert werden müssen. Die Expositionskammern des CULTEX® RFS können durch verschiedene Adapter an die individuellen, für das zelluläre Testsystem benötigten Bedingungen sowie für die spezifischen, zu untersuchenden Endpunkte angepasst werden. Je nach Fragestellung können unterschiedliche biologische Effekte, z.B. metabolische Toxizität (als verminderte Formazan-Bildung) oder der ATP- und Glutathiongehalt gemessen werden (Aufderheide et al. 2013, Aufderheide et al. 2017, Aufderheide et al. 2011). Das CULTEX® RFS

ist während der Exposition nicht mit einem Zellkulturinkubator verbunden. Durch die CO₂-unabhängige Ventilation ist der Einsatz auch außerhalb eines Labors, z.B. im Freien zur Untersuchung von Umgebungsluft, durchführbar. Die Möglichkeit, das System mit Varianten der Generierung von Testatmosphären zu verbinden, erhöht die Flexibilität (Aufderheide et al. 2002, Ritter et al. 2001).

Bei den Expositionssystemen gibt es zwei Möglichkeiten für den dynamischen Einlass der Testatmosphäre: lineare und radiale Einspeisung. Das Vorgängermodell CULTEX® *Cell Gravimetric* (CULTEX® CG) nutzte das lineare Strömungssystem. Das Verteilungsmuster der Partikel zeigte eine Instabilität zwischen den einzelnen Kammern. Außerdem waren die Partikel innerhalb der Kammern ungleichmäßig über die Fläche verteilt. Die schwankende Partikeldistribution führte zur Entwicklung der radialen Einleitungs Vorrichtung (Aufderheide et al. 2017). Durch die radiale Einlassdüse wurde die homogene Verteilung der Partikel auf die in den einzelnen Expositionskammern befindlichen Zellen möglich. Eine reproduzierbare homogene Verteilung ist für die Vergleichbarkeit von Effekten in biologischen Testsystemen unerlässlich.

Das CULTEX® RFS ist ein speziell konstruiertes System, das sich vor allem durch die ALI Exposition von Zellen mit unterschiedlichen Testatmosphären auszeichnet. Dadurch wird im Gegensatz zum submersen Verfahren die physiologische Situation in der Lunge realitätsnäher dargestellt. Technologisch ist das radiale Strömungssystem, das eine gleichmäßige Partikeldistribution ermöglicht, hervorzuheben. Die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sprechen für die Verlässlichkeit des Expositionsverfahrens. Im Bereich der Inhalationstoxikologie kann das CULTEX® RFS eine geeignete *in vitro*-Methode darstellen und damit zur Integration von Alternativmethoden beitragen.

3.4 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden als Modelle für die *in vitro*-Versuche die Zelllinien A549 und L929 verwendet. In der Zellkultur wachsen beide Zelllinien bis zur Konfluenz als Monolayer.

Bei den A549-Zellen handelt es sich um eine gut charakterisierte humane Zelllinie. Sie ist ein häufig verwendetes Modellsystem (> 23.000 Einträge in PubMed) in den Bereichen Molekularbiologie, Pharmakologie, Virologie und dabei insbesondere in der Lungenforschung (Foster et al. 1998). Im Jahr 1972 etablierten Giard et al. die Zellen aus dem Adenokarzinom der Lunge eines 58-jährigen Westeuropäers (Giard et al. 1973). Die Zellen ähneln den alveolären Epithelzellen Typ II (Lieber et al. 1976, Shapiro et al. 1978). Sie besitzen typische Lamellarkörperchen, haben schwach ausgeprägte *tight junctions* und eingeschränkte metabolische Kapazitäten (Castell et al. 2005, Lieber et al. 1976, Shapiro et al. 1978, Winton et al. 1998). A549-Zellen werden als pulmonale Epithelzell-Modelle für Studien zur Untersuchung von Wirkstoffmetabolismen verwendet (Foster et al. 1998).

L929-Zellen sind murine Fibroblasten. 1940 entnahmen Earle et al. einer 100 Tage alten männlichen Maus (Stamm C3H/An) subkutanes Fettgewebe. Aus dem Explantat wurde der Stamm L über mehrere Jahre *in vitro* in einem heterologen Kulturmedium kultiviert. Mittels Kapillartechnik für die Einzelzell-Isolierung wurde 1948 eine einzige Zelle aus dem Kulturstamm L entnommen. Der

Klon 929, nach dem die Zelllinie benannt wurde, war die 95. subkultivierte Generation des Kulturstamms (Earle et al. 1943, Ma et al. 2012). Die Zelllinie L929 wird als geeignete Zelllinie zur Untersuchung der Zytotoxizität nach ISO 10993 - *Biological evaluation of medical devices (Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity)* angesehen (ISO 10993-5 2009).

3.5 Testsubstanzen

Bei der im Rahmen einer multizentrischen Evaluation durchgeführten Versuchsreihe war die Auswahl der Testsubstanzen u.a. von den Sicherheitseinrichtungen in einigen Laboren zu berücksichtigen. Es wurden 19 Substanzen ausgewählt, (1) bei denen eine Klassifizierung der akuten Inhalationstoxizität gemäß CLP-Verordnung (Verordnung (EG) Nr. 1272/2008) bereits vorlag (Europäische Gemeinschaft 2008b), (2) die als Staub/Aerosol in *vivo*-Studien nach TG 403 oder TG 436 getestet wurden, (3) kommerziell verfügbar waren und (4) keine brisanten Eigenschaften (z.B. Explosivität, Brennbarkeit) haben. Die Daten zur Beschreibung der Substanzen sind dem ECHA-Dossier entnommen und wurden mit Angaben aus der Literatur ergänzt. Soweit nicht anders angegeben, stammen die Daten zur Bewertung der akuten Inhalationstoxizität aus *in vivo*-Studien, durchgeführt nach TG 403 (Akute Inhalationstoxizität).

3.5.1 Böhmit (Al(OH)O)

Im Jahr 1925 entdeckte der deutsche Geologe Johannes Böhm (1857-1938) die natürliche Form von Al(OH)O und bezeichnete diese als „Bauxit“ (Böhm 1925). Zwei Jahre später wurde das Mineral (orthorhombische Kristallstruktur) von de Lapparent zu Ehren Böhms in Böhmit umbenannt (Sahama et al. 1973). Es kommt weltweit vor, z.B. in Norwegen, Frankreich, Neuseeland und in mehreren amerikanischen Staaten (Anthony et al. 1990). Böhmit wird in der Industrie breitgefächert verwendet (10.000 t/Jahr bis 100.000 t/Jahr in Europa). Es ist in einer Vielzahl von Produkten enthalten, z.B. in Kleb- und Dichtstoffen, Bindemittel/Adsorbentien, Beschichtungsprodukten, Schmirgel- und Schleifpapieren, Tinten und Tonern, Papierchemikalien und -farbstoffen und wird als Hilfsmittel und Katalysator in der Raffinerie und bei chemischen Prozessen eingesetzt (Sasol Germany GmbH 2018, Schimanski 1998). Im Rahmen der REACH-Registrierungen durch Unternehmen wurde der ECHA gemeldet, dass Böhmit „bei Verschlucken und/oder Inhalation gesundheitsschädlich“ ist. Im ECHA-Dossier sind drei *in vivo*-Inhalationsstudien aufgeführt. Die Substanz wurde mit „not classified“ bewertet, d.h. die Substanz wurde keiner Kategorie für die akute Inhalationstoxizität zugeordnet. In allen Studien wurden Ratten (Wistar oder Fischer 344) in Inhalationskammern („whole body“) mit einer Staubatmosphäre exponiert. Zwei Studien hatten Einschränkungen in der Aussagekraft zur Einschätzung und Berechnung der LC₅₀-Werte. Bei der Studie von 1986 wurden nur männliche Tiere eingesetzt. Bei der Studie von 1969 betrug die Expositionszeit nur eine Stunde. In der Studie von 1996 wurde Ratten (♀/♂) mit der Einzelkonzentration (2,3 mg/l) behandelt. Todesfälle traten nach der Exposition nicht auf. Bei den Tieren wurden feuchte Nasen-/ Mundbereiche und ein mit dem Testmaterial beschichtetes Fell beobachtet. Letzteres ist durch die Ganzkörper-Exposition zu erklären. Bei den weiblichen Tieren wurde ein negativer Effekt auf die Gewichtszunahme festgestellt. Bei der Sektion zeigten sich keine Abnormitäten, lediglich die Lungen waren dunkler als normal. Der aus den Ergebnissen bestimmte LC₅₀-Wert lag

> 2,3 mg/l. In der Tierversuchsstudie von 1969 betrug die Konzentration zwischen 0 (Kontrolle) und 8,22 mg/l (maximal erreichbarer Wert). Als klinisches Symptom wurde Atemnot aufgeführt. Bei den Tieren, die mit den höheren Konzentrationen behandelt wurden, traten Todesfälle entweder während oder kurz nach der Exposition auf. Verglichen mit den Kontrolltieren wurde bei den behandelten Tieren an der Oberfläche der Lungen eine stärkere Verfärbung beobachtet. Der anhand dieser Studie (1 h Expositionszeit) geschätzte LC₅₀-Wert betrug 7,6 mg/l. Der Bericht ist unvollständig, denn es fehlen u.a. detaillierte Angaben zur Testsubstanz (Partikelgröße, -form und Reinheit).

3.5.2 Cetylpyridiniumchlorid (C₂₁H₃₈ClN · H₂O)

Die Substanz Cetylpyridiniumchlorid wird in verbrauchernahen und industriellen Produkten verwendet. Durch die antiseptische Wirkung ist es u.a. in Mundspülungen, in Körperpflegeprodukten und Kosmetika enthalten (Asadoorian et al. 2008, Sreenivasan et al. 2013). Ebenfalls wird es in der Land- und Forstwirtschaft, in Fischereien und im Gesundheitswesen verwendet. Cetylpyridiniumchlorid wird als „sehr giftig“, „reizend“ und „umweltgefährlich“ und bei der akuten Toxizität (Inhalation) in Kategorie 2 eingestuft. Lin et al. führten eine *in vivo*-Inhalationsstudie zur Untersuchung der Toxizität mit Fokus auf Schädigungen an den Augen durch (Lin et al. 1991). Für vier Stunden wurden Ratten Aerosolen der Konzentration 0 (Kontrolle), 0,05 mg/l, 0,07 mg/l, 0,13 mg/l und 0,29 mg/l ausgesetzt. Zu den klinischen Anzeichen der Toxizität zählten Atemwegsbeschwerden, Augenreizungen, Nasenausfluss und Gewichtsverlust. Auf den Beobachtungen basierend wurde ein LC₅₀-Wert von 0,09 mg/l berechnet. Unter REACH wurde 2005 eine Untersuchung der akuten Inhalationstoxizität mit Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, die mit Staub (Konzentration 0,05 mg/l und 0,5 mg/l) für vier Stunden exponiert wurden („nose-only“). Bei der höchsten Konzentration starben neun der zehn Tiere innerhalb von drei Tagen. Es wurden bei den Tieren eine abnorme Atmung und Körperhaltung sowie Hypoaktivität bzw. nach Sektion Verfärbungen und Ödeme der Lungen beobachtet. Keine Mortalität und keine klinischen Anomalien zeigten sich bei den Tieren, die mit der niedrigen Konzentration behandelt wurden. Der LC₅₀-Wert wurde für Cetylpyridiniumchlorid bei Inhalation zwischen 0,054 mg/l und 0,51 mg/l angegeben.

3.5.3 β-Cyclodextrin (C₄₂H₇₀O₃₅)

Das Äußere der Cyclodextrine, die zu den zyklischen Oligosacchariden gehören, ist hydrophil während der Hohlraum hydrophob ist. Durch diese molekulare Anordnung können sie hydrophobe Moleküle in ihren Hohlräumen binden. Diese Fähigkeit der Interaktion mit z.B. Proteinen wird bei pharmakologischen Anwendungen genutzt. Weltweit gibt es 30 verschiedene Cyclodextrin-haltige Arzneimittel auf dem Markt (Loftsson et al. 2005). Zu den Cyclodextrinen gehört β-Cyclodextrin (auch Cycloheptapentose), das sieben Glukosemoleküle besitzt. β-Cyclodextrin wird auch als Lebensmittelzusatzstoff E549 verwendet. Der ADI-Wert (*acceptable daily intake*) ist 5 mg/kg Körpergewicht (Mortensen et al. 2016). Die Substanz (Wasserlöslichkeit 14,3 g/l bei 20 °C) ist industriell weit verbreitet (Jahrestonnage in Europa 1.000 t bis 10.000 t). β-Cyclodextrin ist in Wasch- und Reinigungsmitteln, Körperpflegemitteln, Kosmetika und Lufterfrischern enthalten und wird bei der Herstellung von Textilien, Leder, Kartonagen und Papierwaren verwendet. Es liegt keine Einstufung zur akuten Inhalationstoxizität vor. Bei der 1985 durchgeführten Studie (Sprague-Dawley-Ratten, „whole body“-Exposition für 4 h, Konzentration 4,9 mg/l) wurden während als auch nach der Expo-

sition keine Todesfälle beobachtet. Es wurde nach der Exposition bei den Tieren Nasenausfluss festgestellt, der maximal zwei Tage anhielt. Die Nekropsie zeigte keine Auffälligkeiten. Aufgrund der fehlenden Mortalität wurde von einem LC_{50} -Wert von $> 4,9$ mg/l ausgegangen.

3.5.4 di-Ammoniumphosphat ($(NH_4)_2HPO_4$)

Das gut wasserlösliche di-Ammoniumphosphat wird als Düngemittel und als Flammschutzmittel verwendet (Patnaik 2003). Im europäischen Wirtschaftsraum liegen die Herstellung und/oder Import bei über 1.000.000 t pro Jahr. Eine Untersuchung zur akuten Toxizität (Inhalation) wurde 2010 durchgeführt. Bei diesem *Limit-Test* waren Wistar-Ratten einer Staubatmosphäre mit der Konzentration 5,5 mg/l („*nose-only*“) für vier Stunden ausgesetzt. Während und nach der Exposition wurden keine klinischen Veränderungen oder Todesfälle beobachtet. Auch zeigten sich bei der Sektion keine Abnormitäten. Da in der Studie keine Mortalität bei der eingesetzten Konzentration auftrat, wurde angenommen, dass der LC_{50} -Wert > 5 mg/l liegt. Aus den Daten der Studie erfolgte für di-Ammoniumphosphat keine Einstufung als toxisch im untersuchten Dosisbereich („*not classified*“) für die akute Inhalationstoxizität.

3.5.5 Kaliumpyrophosphat ($K_4P_2O_7$)

In der EU wird Kaliumpyrophosphat jährlich zwischen 10.000 t und 100.000 t hergestellt und/oder importiert. Zu den Produkten und Erzeugnissen gehören Wasch- und Reinigungsmittel, Kleb- und Dichtstoffe, Polituren, Wachse und Chemikalien zur Wasserbehandlung. Basierend auf den Ergebnissen einer *in vivo*-Studie wurde Kaliumpyrophosphat nicht als akut inhalativ toxisch bewertet. Sprague-Dawley-Ratten wurden bei einer vierstündigen Exposition („*whole body*“) mit der (maximal erreichbaren) Testkonzentration 28,8 mg/l behandelt. In dem Nachbeobachtungszeitraum (21 Tage) nahmen die klinischen Veränderungen infolge der Exposition, wie z.B. Augenschienen, Tränenfluss, Gewichtsverlust, ab. Am Tag 6 trat ein Todesfall (♀) auf. Bei der Sektion zeigten sich lediglich bei diesem Tier Verfärbungen der Lunge. Bei den anderen Tieren wurden keine Veränderungen festgestellt. Der LC_{50} -Wert für Kaliumpyrophosphat wurde mit $> 1,1$ mg/l angegeben.

3.5.6 Kupfer-II-hydroxid ($Cu(OH)_2$)

In Europa werden jährlich zwischen 100 t und 1.000 t Kupfer-II-hydroxid erzeugt bzw. importiert. Die hellblaue kristalline Substanz wird als Beizmittel und Fungizid, zum Färben von Papier und bei der Herstellung mehrerer Kupfersalze verwendet (Patnaik 2003). Eine Studie wurde durchgeführt, um die akute Inhalationstoxizität von Kupfer-II-hydroxid bei Sprague-Dawley-Ratten nach Staubexposition („*nose-only*“, Konzentrationen 0,206 mg/l, 0,425 mg/l, 0,825 mg/l) zu bestimmen. Alle Tiere der hohen Konzentrationsgruppe starben vorzeitig (< 7 Tage nach Exposition). Die Nekropsie dieser Tiere zeigte dunkelrote Verfärbungen der Lunge. Bei den Tieren der beiden anderen Gruppen wurden leichte Ataxie und leichte Dyspnoe beobachtet. Als Schlussfolgerung aus den Ergebnissen wurde für Kupfer-II-hydroxid ein LC_{50} -Wert von 0,451 mg/l ermittelt und die Einstufung für die akute inhalative Toxizität in die Kategorie 2 festgelegt.

3.5.7 Kupfer-II-oxid (CuO)

Kupfer-II-oxid, obwohl unlöslich in Wasser, wird in der EU mit den Gefahrenhinweisen „sehr giftig für Wasserorganismen“ (H400, H410) gekennzeichnet. Für die akute Inhalationstoxizität sind keine Daten aus *in vivo*-Studien vorhanden. Dennoch sind Hinweise auf gesundheitliche Gefährdung (H335 Kann die Atemwege reizen) vermerkt (io-li-tec nanomaterials 2014). Kupfer-II-oxid kommt in der Natur als Mineral Tenorit (= monokline Kristalle) vor (Anthony et al. 1990, Patnaik 2003). Verwendet wird Kupfer-II-oxid als Pigment zur Einfärbung von Glas, Keramik, Porzellan und künstlichen Edelsteinen, in Antifouling-Farben, in Batterien und Elektroden und zur Herstellung verschiedener Kupferverbindungen (Patnaik 2003). Im europäischen Wirtschaftsraum wird Kupfer-II-oxid mit jährlich über 10.000 t gewonnen und importiert.

3.5.8 Kupfer-II-sulfat (CuSO₄)

Für Kupfer-II-sulfat liegen keine Daten zur akuten Inhalationstoxizität vor. Laut Meldungen von Unternehmen in den REACH-Registrierungen an die ECHA ist Kupfer-II-sulfat sehr giftig für Wasserorganismen, kann Krebs sowie schwere Augen- und Organschäden verursachen und Hautirritationen und allergische Hautreaktionen auslösen. Für die Einstufung und Kennzeichnung liegen mehrere von der EU genehmigte Einträge vor, die eine manuelle Überprüfung für eine abschließende Beurteilung erfordern. Die Herstellung und der Import liegen zwischen 10.000 t/Jahr und 100.000 t/Jahr in Europa. Kupfer-II-sulfat wird in der Literatur als die wahrscheinlich wichtigste aller Kupferverbindungen beschrieben. Es wird in der Landwirtschaft als Fungizid und Bodenzusatz verwendet, um die Ernteerträge zu verbessern. Ebenfalls kommt es als Beizmittel in Textilien, als Holzschutzmittel und in elektrischen Batterien zum Einsatz (Johnson 1935, Patnaik 2003). In der Vergangenheit wurde die gut wasserlösliche Substanz als Brechmittel eingesetzt. Aufgrund der mit Kupfer-II-sulfat verbundenen gesundheitlichen Gefahren ist diese Anwendung obsolet (Holtzman et al. 1968, Olson et al. 2007).

3.5.9 D(+)-Laktose Monohydrat (C₁₂H₂₂O₁₁ · H₂O)

Gemäß der CLP-Verordnung ist Laktose als nicht gefährlich eingestuft. Laktose (Disaccharid aus Glukose und Galaktose) findet breite Anwendung als Lebensmittelzusatz und in pharmazeutischen Zubereitungen. Im Lebensmittelbereich hat Laktose vorteilhafte Eigenschaften. Dazu gehören die relativ niedrige Süßkraft, ein niedriger Brennwert und glykämischer Index. Laktose verbessert durch ballaststoffähnliche und präbiotische Eigenschaften die intestinale Aufnahme von Calcium und Magnesium (Schaafsma 2008).

3.5.10 Natriumfluorophosphat (Na₂PO₃F)

Natriumfluorophosphat (sehr gut wasserlöslich) spielt eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Karies und findet daher Verwendung in Zahnpasta und Mundspüllösungen (Nakajima et al. 2000). Herstellung und Import in Europa liegen zwischen 1.000 t/Jahr und 10.000 t/Jahr. In einer Studie zur Untersuchung der akuten Inhalationstoxizität wurden Wistar-Ratten der Staubatmosphäre (Konzentration 2,1 mg/l, „nose-only“) für vier Stunden ausgesetzt. Bei den behandelten Tieren zeigten sich Fellsträubungen sowie leichter bis mäßiger Speichelfluss. Diese klinischen Anzeichen

klangen ab dem zweiten Tag nach der Exposition wieder ab. In der Sektion zeigten sich keine auffälligen Befunde. Der LC₅₀-Wert für Natriumfluorophosphat wurde auf > 2,1 mg/l geschätzt.

3.5.11 Natriummetavanadat (NaVO₃)

In der Natur kommt Natriummetavanadat im Mineral Metamunirit vor (Evans 1991). Das Pulver (Wasserlöslichkeit 225,2 g/l bei 20 °C) wird in der Industrie verwendet. Die Jahrestonnage liegt bei 100 t bis 1.000 t auf dem europäischen Markt. Die Anwendungsbereiche sind breit gefächert. Natriummetavanadat wird z.B. in der Farbstoff- und Keramikproduktion (u.a. für Lacke), Getränkeindustrie (u.a. als Korrosionsschutz), in der chemischen Industrie als Katalysator für verschiedene Herstellungsprozesse als auch in der pharmazeutischen Industrie (z.B. bei Vitamin-/Mineralientabletten) verwendet (GfE mbH 2014). Die Substanz wurde als inhalativ schädlich bewertet und ihre akute Toxizität in Kategorie 4 eingestuft. Eine Tierstudie mit Sprague-Dawley-Ratten („nose-only“) wurde durchgeführt. Die höchste Konzentration der Testsubstanz, die in der Inhalationskammer erzeugt werden konnte, betrug 4,13 mg/l Luft. Bei allen Dosen (0,48 mg/l bis 4,13 mg/l) zeigten die Tiere u.a. folgende Symptome: Speichelfluss, Rötungen an Nase und Schnauze, Ptosis und Dyspnoe. Keine pathologischen Auffälligkeiten wurden bei den Konzentrationen (0,48 mg/l bis 2,58 mg/l) gefunden. Bei der höchsten Konzentration wurden hämorrhagische Inkrustation und Veränderungen an Dünndarm, Lunge und Leber beobachtet. Diese Veränderungen wurden als unspezifische Effekte betrachtet, die normalerweise nach der Inhalation mit Staub auftreten. Der mittels Regressionsanalyse berechnete LC₅₀-Wert betrug 4,13 mg/l (für beide Geschlechter). Zusätzlich wurden geschlechterspezifische LC₅₀-Werte bestimmt (4,93 mg/l für ♂ und 3,73 mg/l für ♀).

3.5.12 Natrium-N-lauroylsarcosinat (C₁₅H₂₈NO₃Na)

Natrium-N-lauroylsarcosinat (auch Sarkosyl NL) ist leicht löslich in Wasser (456,4 g/l bei 25 °C). In Europa betragen die jährliche Herstellung und der Import zwischen 1.000 t und 10.000 t. Genutzt wird die Substanz sowohl im privaten (Verbraucher) als auch im industriellen (Arbeiter) Umfeld. Sie wird in verbrauchernahen Produkten, z.B. Wasch- und Reinigungsmittel, Kosmetika und Körperpflegeartikel, Polituren und Wachse, Luftpflegemittel verwendet. Am Arbeitsplatz ist Natrium-N-lauroylsarcosinat u.a. Bestandteil von Bioziden (z.B. Desinfektionsmittel, Schädlingsbekämpfungsmittel), Laborchemikalien, Schmiermittel, Kühl- und Hydraulikflüssigkeiten. Wegen der vielseitigen Verwendungen in Innenräumen und im Außenbereich wird die Freisetzung der Substanz in die Umwelt als wahrscheinlich angesehen. Es wurden zwei *in vivo*-Studien zur akuten Inhalationstoxizität an Ratten durchgeführt. Die Daten aus der ersten Studie (2010) zeigten 0,05 mg/l < LC₅₀ < 5 mg/l, so dass die akute Toxizität in die Kategorie 2 gemäß CLP-Verordnung eingestuft wurde. In dieser Studie wurden Wistar-Ratten mit Dosen von 0,05 mg/l bis 5,0 mg/l („nose-only“) behandelt. Bei der niedrigsten Konzentration wurden während und nach der Exposition keine Auffälligkeiten und keine klinischen Anomalien nach der Nekropsie beobachtet. Die Tiere der beiden mittleren Konzentrationen (0,5 mg/l, 1 mg/l) zeigten Lethargie, Atemnot, Rötungen an Mund und Nase. Sie starben 1-2 Tage nach Exposition und es wurden Verfärbungen der Lunge festgestellt. Alle Tiere der höchsten Konzentration starben 1-2 Stunden nach der Exposition. Es wurden Rötungen und Verfärbungen in der Lunge, dem Dünndarm und der Thymusdrüse beobachtet. Der in der zweiten Studie (2013) ermittelte LC₅₀-Wert war zwischen 1 mg/l und 5 mg/l berechnet. Die Einstufung der akuten

Toxizität erfolgte hierbei in die Kategorie 4. Die Studie wurde mit Wistar-Ratten (Dosen 0,5 mg/l bis 5,0 mg/l; „nose-only“) durchgeführt. Hier wurde während der Exposition bei den Tieren aller Konzentrationsgruppen Auswirkungen auf die Atmung (flache Atmung bis Atemnot) beobachtet. Die Nekropsiebefunde bei den mit 5 mg/l behandelten Tieren (u.a. Verfärbungen des Thymus, Lymphknoten) wurden als Marker für eine akute Reizung der Atemwege angesehen. Die Tiere der geringsten Konzentration zeigten keine klinischen Befunde. Es wurde bei ihnen davon ausgegangen, dass keine Schädigung und/oder eine gute Erholung auftrat.

3.5.13 Neodymoxid (Nd₂O₃)

Neodymoxid (nahezu in Wasser unlöslich) wird als Zwischenprodukt bei der Gewinnung von Neodymiummetall erhalten und überwiegend in der Industrie eingesetzt (100 t bis 1.000 t/Jahr in Europa). Verwendung findet Neodymoxid in Herstellungsprozessen von Maschinen, Fahrzeugen und elektrischen Apparaten. Zudem wird es in Glas eingebaut als auch in Schutzfilterlinsen für Schweiß- und Glasbrillen verwendet (Patnaik 2003). Eine Untersuchung zur akuten Toxizität wurde 2012 nach der TG 436 durchgeführt. Wistar-Ratten (drei je Geschlecht) wurden vier Stunden („nose-only“) der Staubatmosphäre mit der (maximal technisch erreichbaren) Konzentration 4,98 mg/l ausgesetzt. Bei Entnahme aus der Inhalationskammer und eine Stunde danach wurde bei allen Tieren eine erhöhte Atemfrequenz beobachtet. Die Tiere erholten sich vom 6. bis 9. Tag nach der Exposition. Alle Tiere zeigten einen Tag nach der Exposition leichte Gewichtsverluste, wiesen allerdings im weiteren Beobachtungszeitraum (14 Tage) normale Körpergewichtszunahme auf. Während der Studie gab es keine Mortalität. Die Sektion der Tiere zeigte keine klinischen Anomalien. Unter den Bedingungen dieser Studie erfordert die Substanz keine Einstufung („no classification“) gemäß den EU-Kriterien.

3.5.14 Siliziumdioxid (SiO₂)

Das praktisch wasserunlösliche Siliziumdioxid kommt in der Natur fast überall auf der Erde vor und macht etwa 60 % der Erdkruste als Kieselsäure selbst oder in Kombination mit anderen Metalloxiden in Silikaten aus. Es findet sich häufig als Sand an den Ufern der Ozeane und Flüsse, in Wüsten, Gesteinen und Mineralien. Siliziumdioxid existiert in verschiedenen strukturellen Formen: polymorphes kristallines Siliziumdioxid, synthetische Quarzkristalle, amorphes Siliziumdioxid und Quarzglas (Patnaik 2003). Quarz ist das am häufigsten vorkommende und bekannte Polymorph. Industriell werden Quarzsand und Kieselsäure häufig als Rohstoffe bei der Herstellung von Glas, Keramik und Silizium verwendet (Flörke et al. 2008). Zudem ist die Substanz als Biozid zur Bekämpfung von Insekten, Ameisen usw. zugelassen. In der EU beträgt die Herstellung und der Import von Siliziumdioxid über 1 Millionen Tonnen im Jahr. Es wurden mehrere Untersuchungen zur akuten Inhalationstoxizität durchgeführt. In einer Studie von 1983 mit Wistar-Ratten (139 mg/l, 4 h, „nose-only“) wurden während der Exposition bei den Tieren Unruhe, jedoch keine Mortalitäten beobachtet. Die Nekropsie zeigte keine Befunde. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde der LC₅₀-Wert als $\geq 0,14$ mg/l angegeben. Die Substanz wurde als „non toxic“ für die Inhalation durch Tierversuche bewertet. Der ECHA wurden Informationen zu möglichen Irritationen der Atemwege (H335) angezeigt.

3.5.15 Tetraacetythyldiamin ($C_{10}H_{16}N_2O_4$)

Tetraacetythyldiamin, auch TAED, ist eine beige bis hellbraune Substanz (Wasserlöslichkeit 1,0 g/l bis 1,2 g/l bei 20 °C) Die Herstellung/Import im europäischen Wirtschaftsraum liegt bei etwa 10.000 t bis 100.000 t/Jahr. Produkte und Erzeugnisse, in denen die Substanz enthalten ist, sind Wasch- und Reinigungsmittel, Kosmetika und Körperpflegemittel und Biozide (z.B. Desinfektions-, Schädlingsbekämpfungsmittel). Zudem wird Tetraacetythyldiamin in der Papier-, Farbstoff- und Textilindustrie verwendet. Entsprechend der Rückmeldungen von Unternehmen in den REACH-Registrierungen an die ECHA wurden keine Gefahren für die Substanz gemeldet („no hazards have been classified“). Eine Tierversuchsstudie wurde mit Sprague-Dawley-Ratten zur Untersuchung der akuten Toxizität nach der Richtlinie EPA OPPTS 870.1300 durchgeführt (U.S. EPA 1998). Bei der vierstündigen Exposition („whole body“) war die Konzentration der Staubatmosphäre 2,0 mg/l Luft. Während der ersten 30 Minuten gab es Auffälligkeiten bei den Tieren, die bis eine Stunde nach der Exposition fortbestanden. Es wurde bei den Tieren Hypoaktivität, gekrümmte Körperhaltung und bei einigen Tieren Augen- und Nasenausfluss beobachtet. Die betroffenen Tiere erholten sich in der Nachbeobachtungszeit. Während der Studie nahmen zudem alle Tiere an Körpergewicht zu. Keine Mortalität wurde während der Studie verzeichnet. Die Sektion der Tiere zeigte keine Anomalien. Basierend auf den Ergebnissen der Studie wurde der LC_{50} -Wert als $> 2,08$ mg/l festgelegt.

3.5.16 Tetrabromphthalsäureanhydrid ($C_8Br_4O_3$)

Tetrabromphthalsäureanhydrid ist ein Flammenschutzmittel, das sowohl als Additiv als auch als reaktives Zwischenprodukt im Bereich der Kunststoff- und Polymerchemie eingesetzt wird. Derivate können für Drahtbeschichtungen, Papiere und Textilien, wie z.B. Wolle, verwendet werden (Pape et al. 1968, Spatz et al. 1969). In Europa wird die Substanz < 100 t/Jahr hergestellt und/oder importiert. Tetrabromphthalsäureanhydrid ist ein gelbliches Pulver und praktisch wasserunlöslich. In einer 1974 durchgeführten Studie wurden Ratten der Konzentration 10,92 mg/l (Staubatmosphäre, „whole body“) für vier Stunden ausgesetzt. Während der Exposition wurden verminderte Aktivität, Dyspnoe, Erythem, nach 10-14 Tagen zusätzlich auch Diarrhöe beobachtet. Der LC_{50} -Wert wurde mit $> 10,92$ mg/l angegeben.

3.5.17 Vanadium-III-oxid (V_2O_3)

Vanadium-III-oxid kommt in der Natur in Form des Minerals Kareljanit, das u.a. in den Outokumpu-Erzlagerstätten im karelischen Schild (Finnland) zu finden ist, vor (Chudoba et al. 2011). Diese Substanz ist als Pulver schwarz, praktisch unlöslich in Wasser (471 mg/l bei 20 °C) und wird für die Herstellung von Metallen und Metallerzeugnissen verwendet. Die jährliche Tonnage in Europa liegt zwischen 100 t und 1.000 t. In den Untersuchungen zur akuten Toxizität (Inhalation) wurden Ratten (Sprague-Dawley) in Inhalationskammern („nose-only“) mit Staubkonzentrationen zwischen 1,58 mg/l und 6,65 mg/l exponiert. Der höchste Wert war hierbei die maximal technisch erzeugbare Konzentration. Unter den Testbedingungen wurden weder klinische Symptome noch Mortalität beobachtet. Die bei der Nekropsie gefundenen histopathologischen Veränderungen in der Lunge wurden als unspezifische Auswirkungen, die gewöhnlich nach inhalativer Staubexposition auftreten, angesehen. Der LC_{50} -Wert wurde mit $> 6,65$ mg/l angegeben. Die Ergebnisse der *in vivo*-Inhalationsstudie erforderte keine Einstufung gemäß den EU-Kriterien für Vanadium-III-oxid.

3.5.18 Wolfram-IV-carbid (WC)

Für die vorliegende Arbeit wurde Wolfram-IV-carbid unterschiedlicher Partikelgröße verwendet (2 µm und 150 nm-200 nm (nano)). Natürliche Vorkommen von Wolfram-IV-carbid sind in Mengyin, (Provinz Shandong) und in Danba (Provinz Sichuan), China beschrieben (Jambor et al. 1989). Die Herstellung von Wolframcarbiden ist aber auch durch verschiedene industrielle Prozesse möglich. Die jährliche Herstellung und der Import in Europa betragen zwischen 10.000 t und 100.000 t. Wolfram-IV-carbid hebt sich durch seinen hohen Härtegrad hervor und wird in der Bau- und Metallindustrie, z.B. als Oberflächenbeschichtung und Korrosionsschutz, eingesetzt (Baumann et al. 1995). Ebenfalls wird es zur Herstellung von chirurgischen Instrumenten (Scheren, Zangen, Greifer, u.a.) verwendet (Reichert et al. 1997). Das schwarze, wasserunlösliche Wolfram-IV-carbid wurde als „nicht gefährlich“ eingestuft. Es ist bekannt, dass Wolfram und Wolframverbindungen sich nach Inhalation im Atemtrakt ablagern. Von dort gelangen sie innerhalb weniger Tage in das Blutssystem (DFG 2007). Die akute Toxizität wurde in einer *in vivo*-Studie untersucht. Die Testatmosphäre, derer die Sprague-Dawley-Ratten während der „nose-only“-Exposition (4 h) ausgesetzt waren, betrug 5,3 mg/l. Während und bis 2 Stunden nach der Exposition wurden schwarze Partikel auf den Köpfen der Tiere beobachtet. Es wurden während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums keine Todesfälle verzeichnet. Für den LC₅₀-Wert der akuten Inhalationstoxizität wurde ein Wert > 5,3 mg/l bestimmt.

3.5.19 Zinkdimethyldithiocarbamat (C₆H₁₂N₂S₄Zn)

Zinkdimethyldithiocarbamat, auch bekannt als Ziram, ist ein weißes bis gelbliches, geruchloses Pulver mit sehr geringer Wasserlöslichkeit (0,065 g/l bei 25 °C). In der EU wird Ziram als „sehr giftig“, „gesundheitsschädlich“, „reizend“ und „umweltgefährlich“ eingestuft. Mit dem MAK-Wert (0,01 mg/cm³) ist Ziram stark reguliert (DFG 2016). Erzeugung und Import in den europäischen Wirtschaftsmarkt liegen zwischen 100 t und 1000 t pro Jahr. Ziram wird als Vulkanisationsbeschleuniger eingesetzt, wobei im Herstellungsprozess karzinogene N-Nitrosodimethylamine entstehen können. Weiterhin wird es als Pflanzenschutzmittel (Blattfungizid) im Obst- und Gemüseanbau eingesetzt. Die Exposition des Menschen kommt in der Gummi- und Kautschukindustrie und bei der Anwendung als Pestizid vor. Die Belastung durch den Verzehr von rückstandhaltigen Lebensmitteln wird als niedrig eingestuft (IARC 1991). Untersuchungen zur Toxizität zeigten bei akuter Exposition Reizungen der Schleimhäute, der Augen und Störungen des Zentralnervensystems. Bei chronischer Exposition kam es zu entzündlichen Hautveränderungen und neuronalen Beeinträchtigungen. Im Tierversuch mit Sprague-Dawley-Ratten in Inhalationskammern („nose-only“) zeigten sich feuchtes/nasses Fell, Blässe, gekrümmte Haltung, Ataxie, Ptosis, Lethargie und Dyspnoe. Alle Tiere der höchsten Expositionskonzentration (0,96 mg/l) starben bzw. mussten getötet werden. Die Nekropsie zeigte hämorrhagische, ödematöse Lungen und Lebern, gerötete und aufgeblähte Därme. Der LC₅₀-Wert wurde mit ca. 0,13 mg/l Luft angegeben.

3.6 Ziel der Arbeit

Die Risiken und Gefahren, die von inhalierbaren Staubpartikeln natürlichen oder anthropogenen Ursprungs ausgehen, wurden fast ausschließlich durch tierexperimentelle Studien untersucht. Die Durchführung von Versuchen zur Inhalation oder intratrachealen Instillation ist experimentell aufwendig und ethisch problematisch. In bisherigen *in vitro*-Untersuchungen wurden mono- oder co-kultivierte Zelllinien entweder in Submerskultur mit den Partikeln, die in Medium suspendiert sind, exponiert oder traten an dem ALI mit dem Partikelaerosol in Kontakt. Ein aussichtsreiches *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Toxizität von Partikelaerosolen ist die patentierte Expositionsanlage CULTEX® RFS, bei der die auf einer mikroporösen Membran kultivierten Zellen direkt an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht mit den generierten Substanzpartikeln in Kontakt treten können.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Etablierung dieser Versuchsanlage bzw. eines Testverfahrens zur Bestimmung der akuten Toxizität von inhalierbaren Staubpartikeln nach direkter Exposition der humanen Lungenepithelzelllinie A549. Dabei spielte die Stabilität des Testverfahrens und Versuchsdurchführung für die Generierung reproduzierbarer Daten eine wichtige Rolle. Im Anschluss sollten die Expositionsversuche mit der Zelllinie L929 wiederholt werden. Die murinen Fibroblastenzelllinie L929 gehört nicht zu den pulmonalen Zelllinien, gilt aber gemäß der ISO 10993 - *Biological evaluation of medical devices (Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity)* unter ISO-Experten (*International Organization for Standardization*) als bewährte Indikatorzelllinie, die eine Gefährlich- oder Schädlichkeit von Prüfsubstanzen empfindlich anzeigt.

Im Folgenden sollte dazu als weitere *in vitro*-Methode die Submersexposition mit den beiden Zelllinien und den jeweiligen Testsubstanzen durchgeführt werden. Die in den ALI Experimenten ermittelten Ergebnisse wurden nachfolgend mit den aus den Submersexpositionen gewonnenen Daten und mit Literaturdaten aus Tierversuchen verglichen, um Übereinstimmungen und Abweichungen herauszustellen.

4 Material

4.1 Geräte

Inkubator HERAcell 240	Heraeus, Hanau
Massenflussmesser/-kontroller EL-Flow und IQ+Flow	Bronkhorst, Ruurlo, Niederlande
Massendurchflussmesser <i>red-y compact regulator</i> GCR	Vögtlin Instrumente, Aesch, Schweiz
Mikroskop Olympus CKX31	Olympus, Hamburg
Mikrozentrifuge Pico 17	Heraeus, Hanau
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
pH-Meter FiveEasy™	Mettler Toledo, Gießen
pH-Meter Orion Star™ A111	Thermo, Dreieich
Pipetten	Gilson, Limburg
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenlesegerät FLUOstar Omega	BMG Labtech, Offenburg
Präzisionswaage Kern EG 620-3NM	Kern, Balingen
Schüttelgerät (Vortexer) Reax 1 DR	Heidolph, Schwabach
Sterilbank HERAsafe KS18	Thermo, Dreieich
(digitale) Stromversorgung Typ E-7500-05	Bronkhorst, Kamen
Tischzentrifuge Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Umwälzthermostat MPC-202C	Huber, Offenburg
Vakuumpumpe LABOPORT®N 86 KT.18	KNF Neuberger, Freiburg
Vakuumpumpsystem BVC 21 NT	Vacuubrand, Wertheim
Wärmeschrank kelvitron®t	Heraeus, Hanau
Wasserbad WNE 14	Memmert, Schwabach
Adapterringe für Costar® <i>Transwell Permeable Supports</i>	Cultex Laboratories, Hannover
CULTEX® <i>Dust Generator</i> (CULTEX® DG)	Cultex Laboratories, Hannover
CULTEX® <i>Hydraulic Press</i> (CULTEX® HyP)	Cultex Laboratories, Hannover
CULTEX® <i>Radial Flow System</i> (CULTEX® RFS)	Cultex Laboratories, Hannover

4.2 Verbrauchsmaterialien

<i>Disposable Inline Adsorber</i> DIA-BN-CG	contec GmbH Industrieausrüstung, Bad Honnef
<i>Disposable Inline Filter</i> DIF-BN-50K	contec GmbH Industrieausrüstung, Bad Honnef
Glasrohr für den Elutriator (KPG-Rohr, Enden planar geschliffen, Innendurchmesser $100 \pm 0,04$ mm, Wandstärke $3,1 \pm 0,6$ mm, Länge $138,0 \pm 0,2$ mm)	Duran Group GmbH, Wertheim
Glasrohr für den Substanzcontainer (Presszylinder) (KPG-Rohr, Enden planar geschliffen, Innendurchmesser $25 \pm 0,01$ mm, Wandstärke $5,1 \pm 0,5$ mm, Länge $52,0 \pm 0,1$ mm)	Duran Group GmbH, Wertheim
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Messerklingen für CULTEX® DG (Typ 1, Typ 2, Typ 3)	Cultex Laboratories, Hannover
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettierspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Filter LP-050	Munktell Filter AB, Falun, Schweden
Zellkulturinserts <i>Costar® Transwell Permeable Supports</i> (Polyester Membran, 24 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, 4,67 cm ² Wachstumsfläche)	Corning Incorporated, Kennebunk, Maine, USA
Zellkulturplatten (6 well)	Corning Incorporated, Kennebunk, Maine, USA
Zellkulturplatten (96 well)	Corning Incorporated, Kennebunk, Maine, USA
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht

4.3 Nährmedien, Pufferlösungen und Zusätze

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>gibco Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1.000 mg/l Glukose)</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4.500 mg/l Glukose)</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1.000 mg/l Glukose, 25 mM HEPES)</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin
HEPES (1 M)	Biowest, Nuaillé, Frankreich
Gentamicin (10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>WST-1 Cell Proliferation Reagent</i>	abcam, Cambridge, UK

Die Zusammensetzung der Medien für die Kultivierung der Zellen (Kulturmedium, KM) und für die Expositionsversuche (Expositionsmedium, EM) ist im Folgenden tabellarisch aufgeführt.

	A549-Zellen	L929-Zellen
KM	DMEM (Glukose 1.000 mg/l) mit Zugabe: - 10 % FBS - Gentamicin (5 µg/ml)	DMEM (Glukose 4.500 mg/l) mit Zugabe: - 10 % FBS - Gentamicin (5 µg/ml)
EM	DMEM (Glukose 1.000 mg/l) mit Zugabe: - Gentamicin (5 µg/ml) - HEPES (Endkonzentration 100 mM)	DMEM (Glukose 4.500 mg/l) mit Zugabe: - Gentamicin (5 µg/ml) - HEPES (Endkonzentration 100 mM)

4.4 Verwendete Testsubstanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden die in der Tabelle 4.1 aufgeführten Substanzen verwendet.

Tabelle 4.1 Übersicht der verwendeten Testsubstanzen für die Expositionsversuche

Testsubstanz	Summenformel	Lieferant (Produktnummer)	CAS-Nummer
Druckluft für Atemschutzgeräte DIN EN 12021		Linde AG, Pullach	
Böhmit	Al(OH)O	Sasol Germany (525101)	1318-23-6
Cetylpyridiniumchlorid	C ₂₁ H ₃₈ ClN · H ₂ O	Sigma-Aldrich (C0732)	6004-24-6
β-Cyclodextrin	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	Sigma-Aldrich (W402826)	7585-39-9
di-Ammoniumphosphat	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (215996)	7783-28-0
Kaliumpyrophosphat	K ₄ P ₂ O ₇	Sigma-Aldrich (322431)	7320-34-5
Kupfer-II-hydroxid	Cu(OH) ₂	Sigma-Aldrich (289787)	20427-59-2
Kupfer-II-oxid (nano)	CuO	IonicLiquidsTechnologies (NO-0031-UP)	1317-38-0
Kupfer-II-sulfat	CuSO ₄	Sigma-Aldrich (451657)	7758-98-7
D(+)-Laktose Monohydrat	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · H ₂ O	Sigma-Aldrich (61341)	64044-51-5
Natriumfluorophosphat	Na ₂ PO ₃ F	Sigma-Aldrich (344443)	10163-15-2
Natriummetavanadat	NaVO ₃	Sigma-Aldrich (72060)	13718-26-8
Natrium-N-lauroylsarcosinat	C ₁₅ H ₂₈ NO ₃ Na	Sigma-Aldrich (61745)	137-16-6
Neodymoxid	Nd ₂ O ₃	BOC Sciences (1313-97-9)	1313-97-9
Siliziumdioxid	SiO ₂	Fluka (S5631)	7631-86-9
Tetraacetylenhendiämin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄	Sigma-Aldrich (86545)	10543-57-4
Tetrabromphthalsäureanhydrid	C ₈ Br ₄ O ₃	BOC Sciences (632-79-1)	632-79-1
Vanadium-III-oxid	V ₂ O ₃	BOC Sciences (1314-34-7)	1314-34-7
Wolfram-IV-carbid (Partikelgröße 2 µm)	WC	Sigma-Aldrich (241881)	12070-12-1
Wolfram-IV-carbid (nano) (Partikelgröße 150-200 nm)	WC	Sigma-Aldrich (778346)	12070-12-1
Zinkdimethyldithiocarbamat	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄ Zn	Sigma-Aldrich (329711)	137-30-4

4.5 Verwendete Zelllinien

Als Modelle für die *in vitro*-Versuche dienen die Zelllinien A549 und L929.

A549-Zellen (ATCC CCL-185) sind humane Alveolarepithelzellen Typ II, die aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen Mannes etabliert wurden. Die Zelllinie A549 wurde freundlicherweise von Frau Prof. Aufderheide (Cultex Laboratories) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie L929 sind murine Fibroblasten und stammen aus dem Fettgewebe einer C3H/An Maus (100 d, ♂). Sie wurde von der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC 85011425) bezogen.

5 Methoden

5.1 Zellkultur

Alle nachfolgend beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilwerkbank mit geeigneter Schutzausrüstung durchgeführt. Die Inkubation der Zellen fand im Inkubator in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ statt.

5.1.1 Kultivierung der untersuchten Zelllinien

Für die Kultivierung der Zelllinien A549 und L929 wurde DMEM verwendet, das L-Glutamin (580 mg/l), Natriumpyruvat (110 mg/l), Natrium Bicarbonat (3.700 mg/l) und Phenolrot enthält. Der Glukoseanteil im Medium betrug 1.000 mg/l für die Zelllinie A549 bzw. 4.500 mg/l für die Zelllinie L929. Die Medien wurden mit 10 % FBS und Gentamicin (0,5 µg/ml) komplementiert.

Die Zelllinien A549 und L929 wurden als adhärenente wachsende Monolayer in Zellkulturflaschen mit dem jeweiligen KM bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Bei einer Zellkonfluenz von 80 bis 90 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Für die Ablösung vom Flaschenboden wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung für 3 bis 5 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgerundet und vom Gefäßboden abgelöst hatten, wurden sie in frischem KM resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde von der Zellsuspension das gewünschte Volumen für Versuche auf Mehrlochplatten oder auf Zellkulturinserts bzw. für die weitere Kultivierung in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen standen nach einer Inkubation von 24 h für Versuche zur Verfügung.

5.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden die Zellen wie im Kapitel 5.1.1 beschrieben von der Wachstumsoberfläche abgelöst und im Medium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurde ein Aliquot von 10 µl in die Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurde durch Auszählen von mindestens vier Quadraten die Gesamtzellzahl berechnet.

5.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie im Kapitel 5.1.1 beschrieben trypsiniert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 500 Umdrehungen/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FBS mit 10 % DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und für 24 h bei -80 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung fand bei -196 °C in flüssigem Stickstoff statt.

Für die Aussaat der kryokonservierten Zellen wurde das Kryoröhrchen im 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt und die Zellen im vorgewärmten KM aufgenommen. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um DMSO-Reste zu entfernen.

5.2 Biochemische Tests

5.2.1 Bestimmung der zellulären Stoffwechselaktivität (WST-1-Assay)

Die Bestimmung der Zellaktivität erfolgte mit Hilfe des WST-1-Assays. Der Test beruht auf der Reduktion des schwach rötlichen, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes WST-1 (*water soluble tetrazolium salt*) in orangefarbenes Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen (Abbildung 5.1).

Eine beeinträchtigte Vitalität zeigt sich durch eine reduzierte mitochondriale Aktivität. Die durch die chemische Umwandlung bedingte Absorptionsänderung wurde fotometrisch quantifiziert. Die Absorptionsänderung korrelierte mit der Stoffwechselaktivität der Zellen und ermöglichte Rückschlüsse auf die Zellvitalität.

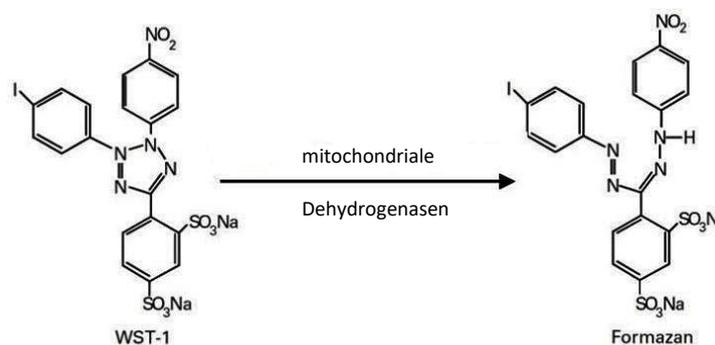


Abbildung 5.1 Chemische Umwandlung des Tetrazoliumsalzes WST-1 zum Formazan

Das WST-1-Reagenz wurde mit KM, wie in den entsprechenden Versuchsbeschreibungen (Kapitel 5.3.1.3 und 5.3.2.3) ausgeführt, verdünnt und zu den Zellen pipettiert. Aliquots des Überstands über den Zellen wurden nach einer einstündigen Inkubationszeit im Zellkulturinkubator in eine 96-Loch-Platte überführt. Die Absorption wurde fotometrisch mit dem Plattenlesegerät FLUOStar Omega bei zwei Wellenlängen (450 nm und 650 nm) bestimmt. Die durch Medium und Lichtstreuung bedingte Hintergrundabsorption wurde bei 650 nm gemessen und bei der Vitalitätsbestimmung berücksichtigt.

5.3 Exposition von Zellen

5.3.1 *Air liquid interface* Exposition

Wurden Zellen an dem ALI exponiert, traten sie direkt mit den Substanzpartikeln in Kontakt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten ALI Versuche wurde eine spezielle Apparatur verwendet. Die Expositionsanlage CULTEX® RFS ermöglichte eine direkte Exposition von auf einer semipermeablen Membran kultivierten Zellen an dem ALI mit Partikeln aus einem definierten Aerosolfluss. Die Versuchsanlage umfasste vier Teilbereiche (Abbildung 5.2):

1. Substanzpresse CULTEX® *Hydraulic Press* (CULTEX® HyP) zur Herstellung der verwendeten Presslinge
2. Partikelgenerator CULTEX® *Dust Generator* (CULTEX® DG) zur Generierung eines Aerosols aus Substanzpartikel
3. Expositionseinheit CULTEX® RFS bestehend aus zwei Modulen mit je drei Expositionskammern
4. elektronische Steuerungsgeräte zur Überwachung und Regelung der Versuchsparameter



Partikelgenerator

Expositionseinheit

Testsubstanz

Druckluft

Abbildung 5.2 Aufbau der Expositionsanlage CULTEX® RFS bestehend aus dem Partikelgenerator (CULTEX® DG) und den zwei Expositionseinheiten (Module) für das Testaerosol (Testsubstanz) bzw. der Kontrolle (Druckluft)

In der CULTEX® HyP (Abbildung 5.3, links) wurden die Presslinge für die Versuche hergestellt. Dafür wurde das Pulver der Testsubstanz in einen sogenannten Presszylinder (Glasrohr in einem Substanzcontainer) gegeben und mit einem definierten Druck in der Presse zu einem Pressling verdichtet. Die CULTEX® HyP stand in einem Abzug. Die Pressung der Testsubstanz fand ebenfalls im Abzug und mit geeigneter Schutzausrüstung statt.

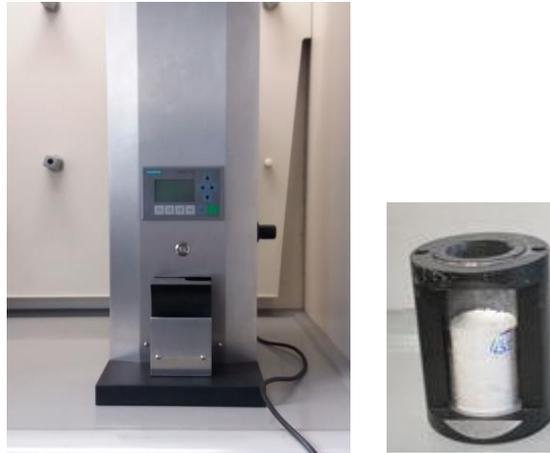


Abbildung 5.3 CULTEX® HyP (links) und Presszylinder mit Pressling (rechts)

Die Presse beruhte auf einem beweglichen pneumatischen Hydraulikzylinder, der eine maximale Presskraft von 6 bar (18 kN) hat. Über einen Regler wurde die Presskraft für jede Substanz individuell im Bereich zwischen 2 bar und 6 bar (5 kN bis 18 kN) eingestellt (Tabelle 5.1). Die einzustellende Presskraft war dabei u.a. von den morphologischen Eigenschaften der Testsubstanzen, z.B. Körnung, abhängig. In vorangegangenen Versuchen hatte die Firma Cultex Laboratories, Hannover die einzustellenden Pressparameter bestimmt und Pressprotokolle für die Durchführung der Expositionsversuche freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Aufbewahrung wurde der Presszylinder mit der gepressten Testsubstanz mit Parafilm zum Schutz vor Austrocknung bzw. Feuchtigkeitsaufnahme verschlossen. Beschriftete und mit Gefahrensymbol gekennzeichnete Presszylinder wurden nach geltenden Sicherheitsbestimmungen gelagert.

Tabelle 5.1 Parameter für die Generierung der Presslinge mit der CULTEX® HyP bzw. der Test-aerosole am CULTEX® DG

Testsubstanz	Presskraft [kN]	Vorschub [mm/h]	Messerklinge
Böhmit	5	1,0	Typ 1
Cetylpyridiniumchlorid	5	15,08	Typ 1
β -Cyclodextrin	5	14,11	Typ 1
di-Ammoniumphosphat	6,5	15,32	Typ 3
Kaliumpyrophosphat	5	5,11	Typ 2
Kupfer-II-hydroxid	5	0,97	Typ 1
Kupfer-II-oxid (nano)	5	2,0	Typ 1
Kupfer-II-sulfat	5	4,5	Typ 1
D(+)-Laktose Monohydrat	5	10,0	Typ 1
Natriumfluorophosphat	7	7,05	Typ 1
Natriummetavanadat	5	3,41	Typ 1
Natrium-N-lauroylsarcosinat	5	6,08	Typ 1
Neodymoxid	5	1,22	Typ 3
Siliziumdioxid	5	2,19	Typ 1
Tetraacetylenhendiämin	5	6,08	Typ 1
Tetrabromphthalsäureanhydrid	5	7,30	Typ 3
Vanadium-III-oxid	5	1,95	Typ 3
Wolfram-IV-carbid	5	0,73	Typ 1
Wolfram-IV-carbid (nano)	5	0,73	Typ 1
Zinkdimethyldithiocarbamat	5	1,7	Typ 1

Der CULTEX® DG besteht aus dem Aerosolgenerator (oberer Teil) und dem Elutriator (unterer Teil) (Abbildung 5.4).

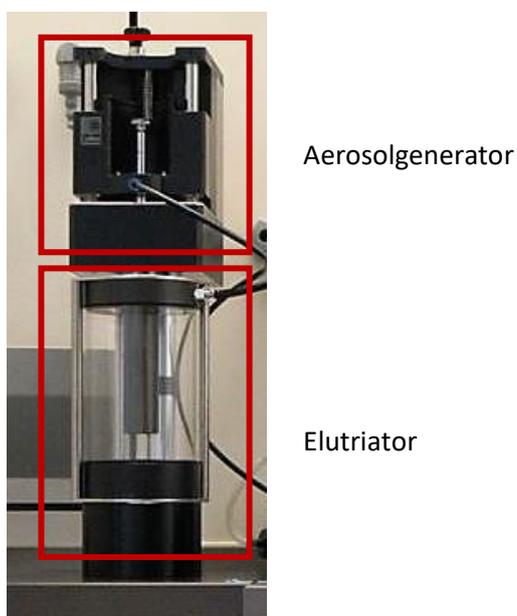


Abbildung 5.4 CULTEX® DG

Der CULTEX® DG ist ein Partikelgenerator, der auf dem Prinzip des *Dust Feeder* nach Wright (Wright 1950) basiert. Der Presszylinder mit der komprimierten Testsubstanz wurde kopfüber in den Aerosolgenerator eingestellt und befestigt. Die Abscheidung des Materials erfolgte mit einer Messerklinge, die im Abstand von ca. 1 mm auf einen rotierenden Schaber verschraubt war (Abbildung 5.5, links). Von den aus rostfreiem Edelstahl gefertigten Messerklingen gab es drei Typen (Abbildung 5.5, rechts), die abhängig von den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Testsubstanz verwendet wurden. Die Messerklinge Typ 1 hatte zwischen den Schraubenlöchern und dem geraden, schlitzförmigen Durchlass eine 1 mm hohe Abschabekante, die direkt dem Presskuchen beim Abscheidvorgang aufsaß. Die Messerklingen Typ 2 und Typ 3 besaßen keine Abschabekante, sondern saßen dem Presskuchen jeweils direkt auf. Der Durchlass war bei Typ 2 in der Messerklingenmitte gebogen, hingegen bei Typ 3 gerade und im Vergleich zum Typ 1 länger.

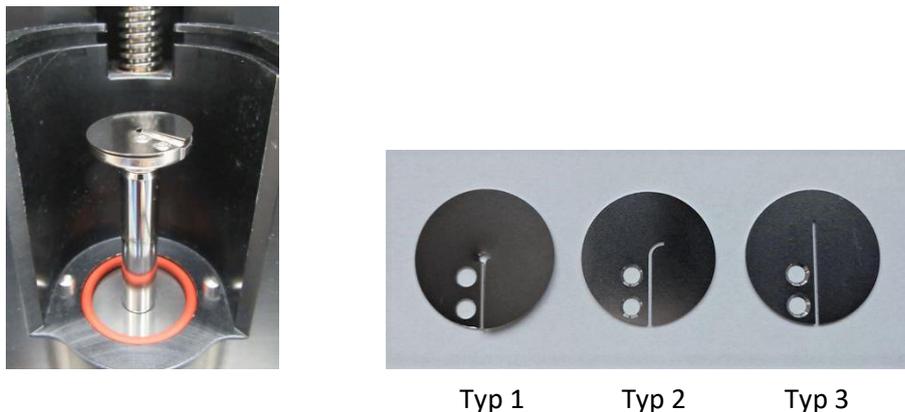


Abbildung 5.5 Schaber mit verschraubter Messerklinge Typ 1 (links); Messerklingen (rechts)

Während des Abscheidvorgangs umströmte ein Trägergas den Schaber mit der Messerklinge. Als Trägergas wurde Druckluft für Atemschutzgeräte nach der DIN EN 12021 verwendet. Die abgeschabten Substanzpartikel wurden durch Aufnahme in den Druckluftstrom in ein Partikel aerosol überführt. Die unterschiedliche Gestaltung der Messerklingen wirkte sich auf die Luftströmung aus, was die Abschabung und den Transport der Partikel beeinflusste. Der verwendete Messertyp war ein Einflussfaktor bei der Partikelgeneration. Zwei weitere Faktoren waren die Parameter Vorschub (mm/h) und Rotation (Umdrehungen/h), die über die zugehörige Software eingestellt und gesteuert wurden (Tabelle 5.1).

Nachdem die generierten Substanzpartikel durch Zuleitung des Trägergases in ein Partikel aerosol überführt worden waren, wurde dieses über eine genau definierte Strömungsgeschwindigkeit (8 l/min) aus dem Aerosolgenerator in den Elutriator transportiert. Der Elutriator diente als Aerosolmischkammer und Abscheider für Partikel unterschiedlicher Größe und war mit einem Modul der Expositionseinheit verbunden. Über eine Vakuumpumpe wurde der Aerosolfluss so eingestellt, dass die Partikel im Elutriator aufwärts strömten. Dazu musste die Saugkraft an der Zuleitung zu dem Modul der Expositionseinheit größer sein als die gewichtsbedingte Sedimentationskraft der Partikel (Gesetz nach Stokes). Bei der Partikelgeneration wurden Partikel unterschiedlicher Größe abgeschieden. Diese wurden durch die Strömungsverhältnisse im Elutriator fraktio-

niert, so dass nur Partikel mit der Größe $< 8 \mu\text{m}$ durch die Zuleitung zu der Expositionseinheit gelangten (Steinritz et al. 2013). Größere Partikel sanken auf den Boden des Elutriators und wurden nicht in dem zur Expositionseinheit führenden Druckluftstrom aufgenommen.

Für die reproduzierbare Durchführung der Expositionsversuche mussten die Bedingungen im System so eingestellt werden, dass eine konstante und gleichmäßige Aerosolgeneration sichergestellt war. Darüber hinaus war es für den Vergleich der Versuchsergebnisse der einzelnen Testsubstanzen wichtig, dass von jeder Substanz die gleiche Partikelgröße und -menge pro Expositionszeit auf die Zellen einwirkte.

Der Zellrasen in den verwendeten Inserts hatte eine annähernd vollständige Konfluenz. Als Grundlage für die Berechnungen wurde die Wachstumsfläche der Inserts ($4,67 \text{ cm}^2$) verwendet. Aus der pro Expositionszeit festgelegten Partikelmenge und der Insertfläche wurde der Partikelmenge-Fläche-Koeffizient errechnet, der nachfolgend als Dosis bezeichnet wird. Des Weiteren wurden die berechneten Werte der Dosis ($26,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - $53,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - $107,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf die Werte $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ „rationalisiert“. In der Tabelle 5.2 sind die vorgegebenen Expositionsparameter zusammengestellt.

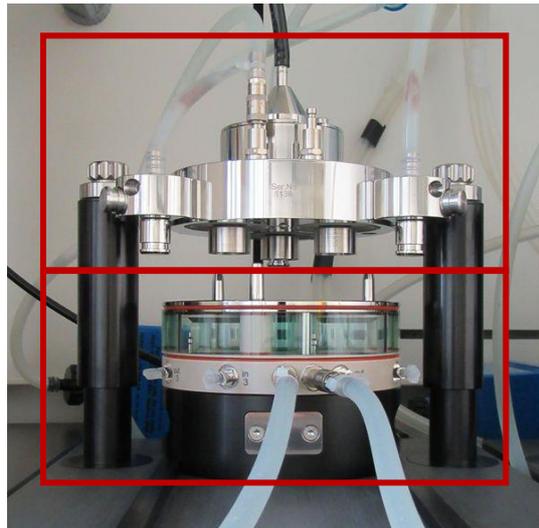
Tabelle 5.2 Expositionsparameter für die Testsubstanzen der ALI Exposition

Expositionszeit [min]	Partikelmenge [μg]	Dosis (*) [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
15	125	26,8 (25)
30	250	53,5 (50)
60	500	107,1 (100)

(*) Die gerundeten Werte der Dosis sind in Klammern angegeben

Die Charakterisierung der verschiedenen Testsubstanzen und Bestimmung der einzelnen Parameter der Partikelgeneration wurde in Vorversuchen durch die Firma Cultex Laboratories, Hannover durchgeführt. In den Vorversuchen wurde die Partikelabscheideeffizienz der einzelnen Testsubstanzen untersucht. Dafür wurde hinter dem Aerosolgenerator ein Partikelanalysegerät (*Aerodynamic Particle Sizer*, APS) geschaltet, das das generierte Aerosol hinsichtlich der Gesamtpartikelzahl, Massenverteilung und Größenverteilung der Partikel bestimmte. Daneben wurden die Strömungsverhältnisse in der Gesamtanlage durch eine *Computational Fluid Dynamics*-Analyse bestimmt. In der Tabelle 5.1 sind die für die einzelnen Testsubstanzen durch Vorversuche ermittelten Parameter für den Vorschub und der jeweilige Typ der Messerklinge angegeben. Für alle Testsubstanzen betrug der Parameter für die Rotation 800 Umdrehungen/h.

Vom Elutriator des CULTEX® DG wurde das Aerosol durch eine Zuleitung zu einem Modul der Expositionseinheit CULTEX® RFS geleitet. Das CULTEX® RFS ist eine Einheit, die aus zwei Modulen mit jeweils drei Expositions-kammern besteht. Jedes Modul besteht aus einem Aerosolführungssegment (oberer Teil) und einem Probeaufnahme-segment (unterer Teil) (Abbildung 5.6). Über einen zirkulierenden Wasserkreislauf durch einen angeschlossenen Umwälzthermostat wurden beide Segmente auf die Temperatur $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert.



Aerosolführungssegment

Probeaufnahme-segment

Abbildung 5.6 Expositionseinheit CULTEX® RFS

Das Aerosolführungssegment war an einer Vorrichtung durch zwei Halterungen fixiert, in denen durch zwei integrierte bewegliche Gleitrohre das Absenken auf das Probeaufnahme-segment ermöglicht wurde. Auf dem Aerosolführungssegment befand sich ein Einlassadapter, durch den der Aerosolstrom zugeleitet wurde. Hinter dem Einlassadapter öffnete sich ein Hauptkanal, der sich in drei radial angeordnete, zu den Expositionskammern leitende Öffnungen (Aerosoldüsen) teilte. Bei geschlossenem Modul befanden sich die trichterförmigen Aerosoldüsen im Abstand von 2 mm über der Membran der Zellkulturinserts. Die radiale Anordnung der Aerosoldüsen ermöglichte eine homogene Verteilung und Ablagerung der Partikel. Von den Expositionskammern wurde der Aerosolstrom durch die über den Düsen befindlichen Absauglöcher abgesaugt. Durch die Absaugung (gesteuert durch einen an einer Vakuumpumpe angelegten Unterdruck) wurde ein konstanter Aerosolstrom erreicht. Der abgesaugte Aerosolstrom wurde nach Passage durch ein Filtersystem, das die Partikel zurückhält, der Abluft zugeleitet.

Im Probeaufnahme-segment waren drei radial angeordnete Expositionskammern, in denen jeweils ein Zellkulturinsert eingesetzt werden konnte. Die Adapterringe dienten der Justierung in den Expositionskammern. Die einzelnen Kammern konnten separat mit Medium über Zu- und Ableitungen befüllt werden. Die Einstellung des Mediumspiegels auf Membranhöhe war über Absaugüberlauf-röhrchen möglich.

Das CULTEX® RFS besteht aus zwei Modulen. Durch das an dem CULTEX® DG angeschlossene Modul wurde der Aerosolstrom aus den generierten Partikeln zu den Zellen geleitet. Es wird im nachfolgenden als Substanzmodul genannt. Das zweite Modul wird als Druckluftmodul bezeichnet und diente als Kontrollmodul. Es war baugleich dem Substanzmodul, so dass die Strömungsverhältnisse innerhalb des Moduls sowie die Zu- und Ableitungen des Trägergases identisch waren. Die Zellen in den Expositionskammern wurden mit testsubstanzpartikelfreier Druckluft exponiert. Im Unterschied zum Substanzmodul wurde hier das Trägergas (Strömungsgeschwindigkeit 3 l/min) nach einer Passage durch eine Woulffsche Flasche über den Einlassadapter eingeleitet. Beim Sub-

stanzmodul wurde das Trägergas mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 8 l/min vom Aerosolgenerator in den Elutriator (CULTEX® DG) geleitet. Der Elutriator diente als Aerosolmischkammer und bremste aufgrund seines Fassungsvermögens die Geschwindigkeit des generierten Partikel-aerosols etwas ab. Als Pendant dazu bildete die Woulffsche Flasche die Formung des Elutriators und die darin erfolgenden Verwirbelungen und Strömungen nach. Die Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases zum Substanzmodul war höher, denn für die Aufnahme und den Transport der Partikel im Trägergasstrom wurde eine höhere Geschwindigkeit benötigt. Zudem wurde der Trägergasstrom im Elutriator stärker abgebremst als in der Woulffschen Flasche. Die beiden Geschwindigkeiten wurden entsprechend der baulichen Konstruktion der einzelnen Anlagenbestandteile und Anforderungen der Partikelgeneration so ausgearbeitet, dass die Strömungsverhältnisse innerhalb der Module gleich waren. Die Strömungsgeschwindigkeit des Partikelaerosols bzw. der Druckluft in den Expositionskammern betrug 30 ml/min.

Der Partikelgenerator CULTEX® DG und das CULTEX® RFS waren mit verschiedenen elektronischen Steuerungsgeräten zur Überwachung und Regelung der Versuchsparameter verbunden. Die Temperierung und die Zirkulation des Wasserkreislaufs in den beiden Modulen wurden durch ein Umwälzwasserbad reguliert. Durch Steckverbindungen an den Wasseranschlüssen der beiden Modulsegmente waren diese mit dem Wasserbad verbunden. Das Trägergas wurde durch eine Vakuumpumpe durch die Expositionsanlage gesaugt. Dabei wurde der Trägergasstrom über ein Verteilerventil in zwei Ströme unterteilt, die entweder (1) über eine Woulffsche Flasche zum Druckluftmodul oder (2) nach Passage des CULTEX® DG zum Substanzmodul geleitet wurden. Die jeweiligen Strömungsgeschwindigkeiten wurden über die Massendurchflussmesser (*red-y compact regulator GCR*) auf 3 l/min (Druckluftmodul) bzw. 8 l/min (Substanzmodul) eingestellt. Die Strömungsgeschwindigkeiten der Druckluft bzw. des Partikelaerosols in den Expositionskammern der Module betrug 30 ml/min und wurde für jede Kammer einzeln über jeweils einen digitalen Massenflussmesser/-kontroller (IQ+Flow) eingestellt. Der Druckluftstrom bzw. Aerosolstrom aus den Expositionskammern der jeweiligen Module wurde mit einem an einer Vakuumpumpe angelegten Unterdruck abgesaugt. Die Absaugströmung von 1,5 l/min wird durch zwei Massenflussmesser/-kontroller (EL-Flow) reguliert. Die Steuerung der Massenflussmesser/-kontroller erfolgte über die zugehörige Software FlowDDE.

Für die Zu- und Ableitung von Gas- und Wasserströmen und für die Verbindung der einzelnen Teilbereiche der Anlage wurden Silikonschläuche verwendet. Die Schlauchverbindung zwischen dem Elutriator und dem Substanzmodul war ein Anti-Statik-Schlauch aus Polyurethan.

5.3.1.1 Vorbereitung der Zellen

Um die Exposition von Zellen an dem ALI mit einer Testsubstanz zu ermöglichen, wurden Zellkulturinserts (Costar® *Transwell Permeable Supports*) verwendet. In der Abbildung 5.7 ist ein Zellkulturinsert schematisch dargestellt. Das Zellkulturinsert, *Transwell* genannt, war ein Plastikeinsatz mit einer durchsichtigen Polyestermembran. Diese Membran hatte eine Fläche von 4,67 cm² und 4 x 10⁶ Poren/cm² (Porengröße 0,4 µm). Das *Transwell* wurde in eine Vertiefung einer Zellkulturplatte eingehängt und unterteilte diese in zwei Segmente. Das untere Segment (basale Seite) war der Bereich unter der Insertmembran; das obere Segment (apikale Seite) war das Areal über der

Membran, auf dem die Zellen kultiviert werden. Durch diese spezielle Konstruktion war eine Kultivierung der Zellen unter submersen Bedingungen als auch an dem ALI möglich.

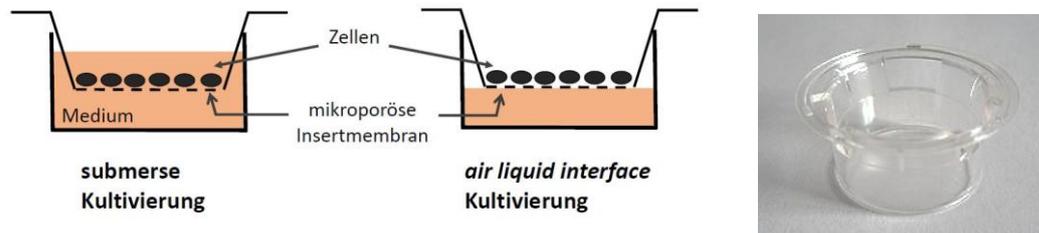


Abbildung 5.7 Schematische Darstellung eines Zellkulturinserts bei submerser und *air liquid interface* Kultivierung (links); Zellkulturinserts Costar® *Transwell Permeable Supports* (rechts)

Die Zellen wurden auf der mikroporösen Membran der Inserts zunächst unter submersen Bedingungen kultiviert. Von einer submersen Kultivierung spricht man, wenn die auf der Membran anhaftenden Zellen mit Medium überschichtet sind, d.h. es befand sich das Medium sowohl auf der basalen als auch auf der apikalen Seite des Inserts. Bei der Kultivierung an dem ALI wurde das apikale Medium aus dem Insert entfernt. Durch die Poren in der Membran ist die Nährstoffversorgung für die Zellen von der basalen Seite des Inserts möglich.

Für die Zellaussaat wurde zunächst die Membran der Zellkulturinserts äquilibriert. Dafür wurden 2,5 ml vorgewärmtes KM in die Plattenvertiefung eingefüllt. Im Anschluss wurde das Insert vorsichtig eingehängt und die Insertmembran mit 1 ml KM gleichmäßig bedeckt. Nach Verschließen der Platte mit einem Deckel wurde diese für mindestens 30 min in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gesetzt.

Die Zellen wurden wie in den Kapiteln 5.1.1 und 5.1.2 beschrieben von der Wachstumsoberfläche abgelöst und ausgezählt. In jedem Versuch wurden für die drei Expositionszeiten (Dosen) jeweils sechs Zellkulturinserts verwendet und daneben drei Kontrollen (unbehandelte Zellen) mitgeführt.

Auf jedem der 21 Zellkulturinserts (4,67 cm²) wurden ca. 187.500 Zellen ausgesät, so dass sich daraus ein Zellzahl-Fläche-Verhältnis von 40.150 Zellen/cm² ergab. Für die Aussaat wurde nach Abnahme des zur Äquilibration verwendeten KM aus den Inserts ein geeignetes Volumen der Zellsuspension in die Zellkulturinserts gegeben und anschließend für 24 h im Zellkulturinkubator (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Damit sich die Zellen aus der Zellsuspension gleichmäßig auf die Membran verteilen und anwachsen konnten, war auf die waagerechte Positionierung der Zellkulturplatten zu achten.

5.3.1.2 Expositionsdurchführung

Vor Versuchsbeginn wurden alle Geräte der Expositionsanlage in Betrieb genommen. Dazu gehörte das Einschalten des Umwälzwasserbads zur Temperierung der Module, der Vakuumpumpe zur Absaugung des Trägergases und der Massenflussmesser/-kontroller zur Einstellung der Strömungen. Die Expositionskammern beider Module wurden mit dem für jede Zelllinie speziell angesetzten EM befüllt. Über die Überlaufröhrchen wurde der Mediumspiegel auf Membranhöhe eingestellt.

Während der Expositionsdurchführung erfolgte keine CO₂-Zufuhr in der Versuchsanlage. Das EM hatte daher einen Zusatz von 100 mM HEPES, um den pH-Wert während der Exposition stabil zu halten.

Der Prozess der Partikelgenerierung wurde als „Vorlauf“ bezeichnet und vor der Exposition durchgeführt. Der Presszylinder wurde kopfüber im Partikelgenerator fixiert. Über die zugehörige Software wurden die Abscheideparameter (Vorschub, Rotation) eingestellt und die Messerklinge an den Presskuchen herangefahren (Tabelle 5.1). Das generierte Partikelaerosol wurde zum Elutriator geleitet. Der Elutriator war mit einem Gummistopfen verschlossen, so dass es keine Verbindung zum Substanzmodul gab. Die Partikelgeneration konnte anhand des gebildeten Staubwölkchen kontrolliert werden.

In das Substanzmodul wurden zellfreie Zellkulturinserts (sogenannte Blindinserts) eingesetzt. Nach Schließen des Substanzmoduls (Absenkung des Aerosolführungssegments auf das Probeaufnahme-segment) wurde über einen Schlauch der Elutriator mit dem Substanzmodul verbunden. Die Partikel des Aerosolflusses gelangten auf die Blindinserts. Der Vorlauf wurde 30 min durchgeführt und diente zum einen dazu, die Partikelgenerierung und die Strömung des Aerosolflusses zu beobachten und auf Stabilität zu überprüfen. Zum anderen war es möglich, durch Rückwaage der Blindinserts Aufschluss über die abgeschiedene Partikelmenge zu erhalten. Nach Beendigung des Vorlaufs wurden die Expositionsversuche durchgeführt. Um den Einfluss unterschiedlicher Expositionszeiten (und die damit verbundenen unterschiedlichen Partikelmengen) zu untersuchen, wurden für jeden Zeitraum jeweils drei Inserte in die Expositions-kammern des Substanzmoduls gesetzt. Als Referenz und Kontrolle dazu wurden parallel jeweils drei Inserte in das Druckluftmodul gesetzt.

Für die ALI Exposition wurde zunächst das für die submerse Kultivierung verwendete apikale Medium aus den Inserten entfernt. Anschließend wurden die Inserte in die Expositions-kammern eingesetzt und für 15 min, 30 min oder 60 min entweder mit dem Aerosol oder mit der Druckluft exponiert (Abbildung 5.8). Während der Exposition wurden die Zellen mit Nährstoffen von der basalen Seite durch die mikroporöse Membran versorgt. Auf der apikalen Seite wurden die Zellen mit dem Aerosol bzw. der Druckluft überströmt. Nach der Expositionszeit wurden die Inserte aus den Kammern entnommen, in neue Zellkulturplatten überführt und für 24 h in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gesetzt. Während dieser Nachinkubationszeit wurden die Zellen an dem ALI gehalten.

Als Kontrollen wurden Zellen bezeichnet, die weder mit der Testsubstanz noch mit Druckluft exponiert wurden (Abbildung 5.8). Die Zellen wurden unter submersen Bedingungen ausgesät und für 24 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf „*air liquid interface*“ gesetzt, d.h. das apikale Medium wurde aus den Inserten entnommen. Nach 24 h im Inkubator wurde mit dem WST-1-Assay die Vitalität bestimmt und als Vergleichswert für die exponierten Zellen verwendet. Die Zellen der Kontrolle wurden während der Versuchsdurchführung nur mit KM versorgt.

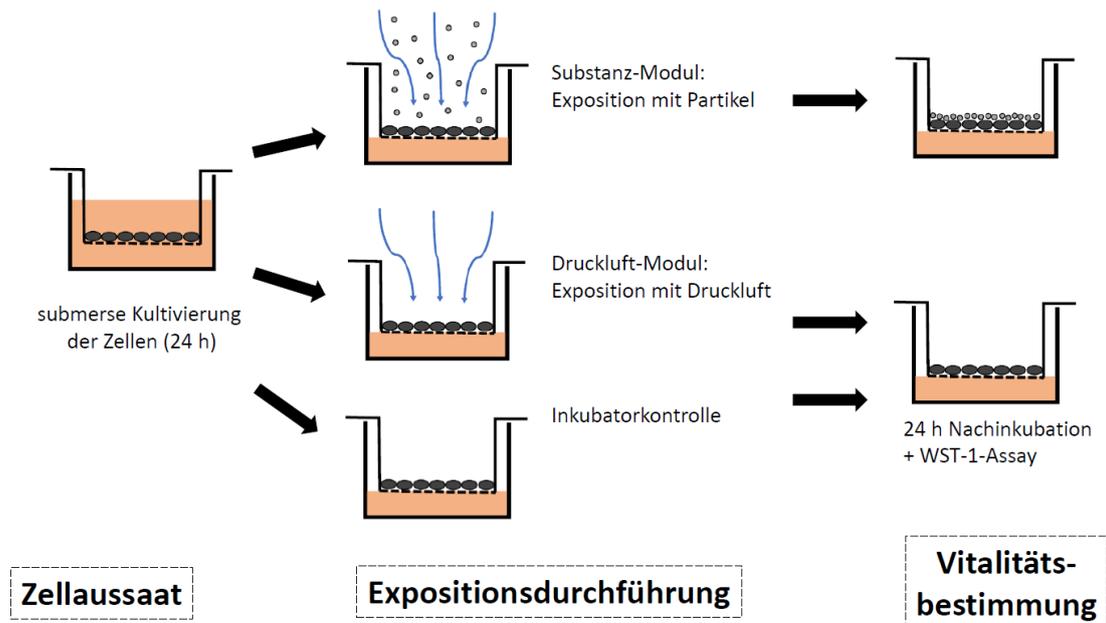


Abbildung 5.8 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung der ALI Exposition

5.3.1.3 Vitalitätsbestimmung

Die Zellaktivität wurde 24 h nach der Exposition mit dem WST-1-Assay bestimmt. Vor der biochemischen Bestimmung wurden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt.

Nach der Nachinkubationsphase wurden die Zellkulturinserts aus der Versuchsplatte entnommen und in eine mit 1,5 ml KM befüllte Vertiefung einer neuen Zellkulturplatte (6 well) gesetzt. Dabei durften sich keine Luftblasen unter der Insertmembran bilden. Das WST-1-Reagenz wurde mit KM 1:7 (A549-Zellen) bzw. 1:10 (L929-Zellen) verdünnt. In jedes Zellkulturinsert wurde 1 ml der WST-1-Reaktionslösung gegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit im Inkubator wurden aus jedem Zellkulturinsert nach kurzer Durchmischung 100 µl des Überstands als Triplikate in Vertiefungen einer Zellkulturplatte (96 well) überführt. Die optische Dichte (OD) der Reaktionslösung in den Plattenvertiefungen wurde bei 450 nm und 650 nm in einem Plattenlesegerät bestimmt.

Die Vitalität der Zellen wurde wie im Folgenden beschrieben berechnet. Von den OD-Werten der Wellenlänge 450 nm wurde die bei 650 nm gemessene Hintergrundabsorption, die durch unspezifische Lichtstreuung verursacht wird, abgezogen. Bei Expositionsversuchen an dem ALI dienten die unbehandelten Zellen (Inkubatorkontrollen, IK) als Referenz, indem diese als 100 % gesetzt wurden. Die OD-Werte der mit Druckluft bzw. der Testsubstanz behandelten Zellen wurden dazu in Relation gesetzt. Der aus dieser Berechnung ermittelte Wert stellte die prozentuale Formazanbildung der mit Druckluft bzw. Testsubstanz behandelten Zellen im Vergleich zur IK dar. Um zu berechnen, welchen Einfluss die Testsubstanz auf die Zellaktivität hat und den Einfluss der Druckluft auf die Zellen auszuschließen, wurden die mit der Testsubstanz behandelten Zellen auf die mit Druckluft behandelten Zellen normiert. Dafür wurden jeweils die prozentualen Werte der

Formazanbildung im Vergleich zur IK zu denselben Expositionszeiten in Relation gesetzt. Nach Subtraktion des Werts von 100 wurde er als „Formazandefizit [%]“ bezeichnet.

5.3.2 Submerse Exposition

Für die submerse Exposition (SUB Exposition) wurden die Zellen auf Zellkulturplatten (96 well) für 24 h kultiviert. Nach Abnahme des KMs wurden die Zellen mit Substanzmedien unterschiedlicher Konzentration überschichtet und unter drei verschiedenen Expositionsbedingungen weiterbehandelt (Abbildung 5.9). Um die Ergebnisse beider Expositionsverfahren miteinander vergleichen zu können, wurden die Versuchsbedingungen (Zellzahl, Dosis) für die SUB Exposition denen der ALI Exposition angepasst.

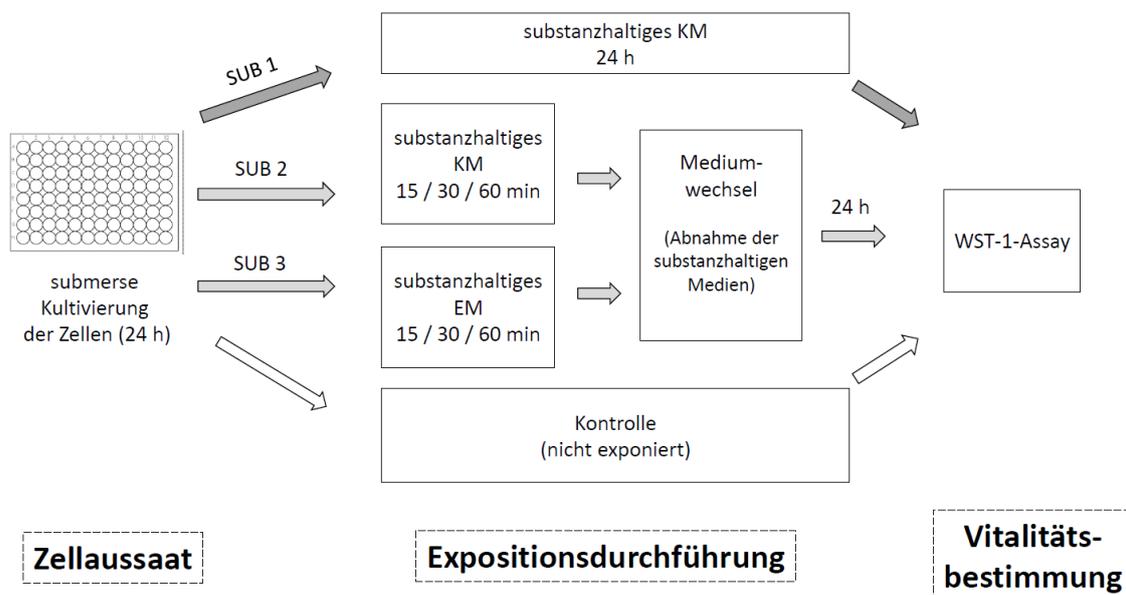


Abbildung 5.9 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung der SUB Exposition

Auf den Zellkulturinserts wurden die Zellen in einem Zellzahl-Fläche-Verhältnis von ca. 40.150 Zellen/cm² ausgesät. Dieses wurde auf die Wachstumsfläche der Vertiefungen der Zellkulturplatte (96 well) umgerechnet. Es ergab sich daraus eine Zellzahl von rund 12.800 Zellen pro Vertiefung mit einer Wachstumsfläche von 0,32 cm².

Aus den Versuchen zur ALI Exposition war die Partikelmenge je Expositionszeit bekannt (Tabelle 5.2). Bezog man die Partikelmenge auf die Fläche des Zellkulturinserts, so ergab sich daraus die folgende Dosis (µg/cm²), deren Werte für ein einfacheres Verständnis rationalisiert wurden (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Expositionsparameter für die Testsubstanzen der SUB Exposition

Partikelmenge (Expositionszeit)	Dosis (*)
125 µg (15 min)	26,8 (25) µg/cm ²
250 µg (30 min)	53,5 (50) µg/cm ²
500 µg (60 min)	107,1 (100) µg/cm ²

(*) Die gerundeten Werte der Dosis sind in Klammern angegeben.

Es wurden bei der SUB Exposition drei verschiedene Bedingungen der Exposition untersucht. Bei den ALI Versuchen waren die Zellen mit den Substanzpartikeln drei verschiedener Dosen exponiert. Die Partikel verblieben für eine 24-stündige Nachinkubationszeit auf den Zellen. Für den direkten Vergleich des Einflusses der Darreichungsform der jeweiligen Testsubstanz beider Expositionsverfahren wurde unter der „submerse Exposition, Bedingung 1“ (SUB 1) die Exposition mit einem Substanzmedium durchgeführt, das für 24 h auf den Zellen verblieb. Da die Zellen während der 24-stündigen Exposition im Inkubator verblieben, wurde die Testsubstanz in das zur jeweiligen Zelllinien gehörige KM gegeben und verteilt.

Ob bereits der einmalige Kontakt der Zellen mit unterschiedlichen Partikelmengen einen Einfluss auf die Zellaktivität hat, wurde als „submerse Exposition, Bedingung 2“ (SUB 2) untersucht. Bei diesen Versuchen wurden die Testsubstanzen in das KM in drei unterschiedlichen Konzentrationen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für die Expositionszeit mit den entsprechend zugehörigen Dosen behandelt. So wurden z.B. Zellen für die Zeit von 15 min mit einem Substanzmedium mit der Konzentration exponiert, die einer Dosis von 25 µg Substanz pro cm² Wachstumsfläche entsprach. Nach der Expositionszeit wurden das Substanzmedium von den Zellen abgenommen. Die Zellen wurden mit KM überschichtet und für 24 h in den Inkubator gesetzt.

Die Expositionsversuche „submerse Exposition, Bedingung 3“ (SUB 3) sind denen der SUB 2 ähnlich. Der Unterschied war, dass hier die Testsubstanz im EM gelöst wurde. Nach der Expositionszeit wurden die Substanzmedien durch KM ersetzt und die Zellen im Inkubator 24 h nachinkubiert. In diesen Versuchen wurde untersucht, welchen Einfluss das EM im Vergleich zum KM während der Expositionsdurchführung hatte.

5.3.2.1 Vorbereitung der Zellen

Für die SUB Exposition wurden pro Testsubstanz und Bedingung vier Vertiefungen einer Zellkulturplatte (96 well) mit den Zellen entsprechend dem Zellzahl-Fläche-Verhältnis von rund 40.150 Zellen/cm² ausgesät und im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) für 24 h kultiviert. Für die A549- und L929-Zellen wurde das passende KM verwendet.

5.3.2.2 Expositionsdurchführung

Für die Versuche wurden die Zellen mit Substanzmedien unterschiedlicher Konzentration entsprechend den Bedingungen exponiert. Aus den Versuchen der ALI Exposition war die Dosis (µg/cm²) bekannt. Für den Vergleich der beiden Verfahren wurden die Konzentrationen der Substanzmedien und die submerse Versuchsdurchführung auf die entsprechende Dosis abgestimmt. Die Zellen sollten mit 100 µl des jeweiligen Substanzmediums pro Bedingung exponiert werden,

d.h. die Substanzmenge im zugegebenen Volumen bezogen auf die Wachstumsfläche der Plattenvertiefung (0,32 cm²) sollte der Dosis entsprechen.

Es wurde von jeder Substanz eine Stammlösung mit der Konzentrationen 34,2 mg/100 ml KM (SUB 1 und SUB 2) bzw. EM (SUB 3) hergestellt. Um die Substanzen im Medium zu lösen bzw. bei unlöslichen Substanzen homogen im Medium zu verteilen, wurde das Substanzmedium geschüttelt. In Tabelle 5.4 sind die Löslichkeiten der Substanzen angegeben. Die Stammlösung wurde 1:2 und 1:4 mit KM (SUB 1 und SUB 2) bzw. EM (SUB 3) verdünnt. Jede Testsubstanz hatte demnach drei Ansätze pro Bedingung, deren Konzentration 8,55 mg/100 ml, 17,1 mg/100 ml und 34,2 mg/100 ml Medium betrug.

Tabelle 5.4 Übersicht der Löslichkeit der Testsubstanzen

Testsubstanz	Löslichkeit [g/l]
Böhmit	unlöslich
Cetylpyridiniumchlorid	111,0
β-Cyclodextrin	14,3
di-Ammoniumphosphat	100,0
Kaliumpyrophosphat	10,0
Kupfer-II-hydroxid	unlöslich
Kupfer-II-oxid (nano)	unlöslich
Kupfer-II-sulfat	203
D(+)-Laktose Monohydrat	161
Natriumfluorophosphat	696,0
Natriummetavanadat	225,2
Natrium-N-lauroylsarcosinat	456,4
Neodymoxid	unlöslich
Siliziumdioxid	unlöslich
Tetraacetylethylendiamin	1,2
Tetrabromphthalsäureanhydrid	unlöslich
Vanadium-III-oxid	0,1
Wolfram-IV-carbid	unlöslich
Wolfram-IV-carbid (nano)	unlöslich
Zinkdimethyldithiocarbamat	0,065

Für die Durchführung der SUB Expositionen wurde das Medium aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl pro Konzentration des jeweiligen Substanzmediums entsprechend der Bedingungen exponiert (Tabelle 5.5). Bei den Kontrollen erfolgte ein Mediumwechsel mit KM.

Tabelle 5.5 Übersicht der drei Versuchsbedingungen bei der SUB Exposition

	Medium	Konzentration [mg/100 ml]	Dosis [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Expositionszeit
SUB 1	KM	8,55	25	24 h
		17,1	50	24 h
		34,2	100	24 h
SUB 2	KM	8,55	25	15 min
		17,1	50	30 min
		34,2	100	60 min
SUB 3	EM	8,55	25	15 min
		17,1	50	30 min
		34,2	100	60 min

5.3.2.3 Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Vitalität wurde mit dem WST-1-Assay durchgeführt und erfolgte 24 h nach Expositionsdurchführung. Wie auch bei der ALI Exposition wurden die Zellen vor der kolorimetrischen Bestimmung unter dem Mikroskop morphologisch beurteilt.

Das WST-1-Reagenz wurde für beide Zelllinien mit KM im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nach Absaugen des Mediums (Kontrollen, SUB 2 und SUB 3) bzw. der Substanzmedien (SUB 1) wurden 100 μl der WST-1-Reaktionslösung in jede Vertiefung der Platte pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubationszeit im Zellkulturinkubator wurden aus jeder Vertiefung jeweils 90 μl des Überstandes in die Vertiefungen einer (neuen) Zellkulturplatte (96 well) überführt. Die OD-Messung erfolgte bei den Wellenlängen 450 nm und 650 nm (vgl. Kapitel 5.3.1.3.).

Für die Vitalitätsberechnung bei Versuchen der SUB Exposition wurden von den OD-Werten der Wellenlänge 450 nm die Hintergrundabsorption bei 650 nm abgezogen. Anschließend wurden die OD-Werte der mit der Testsubstanz behandelten Zellen in Relation zu denen der unbehandelten Zellen (Kontrollen) gesetzt. Der daraus errechnete Wert stellte die prozentuale Formazanbildung der mit der Testsubstanz behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle dar. Gleichzeitig zeigte dieser Wert den Einfluss der Testsubstanz auf die Zellaktivität bzw. Zellvitalität an. Der Wert wurde von 100 subtrahiert und als „Formazandefizit [%]“ bezeichnet.

5.4 Statistik

Bei allen aufgeführten Experimenten wurden, soweit nicht anders vermerkt, mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Dabei wurden Zellen unterschiedlicher Passagenzahl verwendet.

Die Berechnung, statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 7.0 der Fa. GraphPad Software, LaJolla California, USA. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) und der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten angegeben.

Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) und dem Post-Hoc-Signifikanztest nach Bonferroni berechnet. Der Vergleich zwischen Werten einer Bedingung wurde mit der einfaktoriellen (one-way), bei mehreren Bedingungen mit der zweifaktoriellen (two-way) ANOVA durchgeführt. Als Signifikanzschranken wurden vorgegeben:

* $p < 0,5$;

** $p < 0,01$;

*** $p < 0,001$.

6 Ergebnisse

Die Untersuchung der schädigenden Wirkung von verschiedenen inhalierbaren Substanzen auf Zellen ist durch unterschiedliche Expositionsverfahren möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien A549 (humane Lungenepithelzellen) und L929 (murine Fibroblasten) verwendet, die direkt mit den Partikeln an dem ALI oder mit einem substanzhaltigen Medium exponiert wurden. Es wurden 19 verschiedene Substanzen mit insgesamt 20 Modifikationen untersucht, von denen fünf, basierend auf ECHA-Daten, als „gesundheitsgefährdend bei Inhalation“ galten (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1 Übersicht der Testsubstanzen

Testsubstanz	CAS-Nummer	CLP-Beurteilung (*)
Böhmit	1318-23-6	keine Einstufung als toxisch
Cetylpyridiniumchlorid	6004-24-6	Akute Toxizität, Kategorie 2
β -Cyclodextrin	7585-39-9	keine Einstufung als toxisch
di-Ammoniumphosphat	7783-28-0	keine Einstufung als toxisch
Kaliumpyrophosphat	7320-34-5	keine Einstufung als toxisch
Kupfer-II-hydroxid	20427-59-2	Akute Toxizität, Kategorie 2
Kupfer-II-oxid (nano)	1317-38-0	keine Einstufung als toxisch
Kupfer-II-sulfat	7758-98-7	keine Einstufung als toxisch
D(+)-Laktose Monohydrat	64044-51-5	keine Einstufung als toxisch
Natriumfluorophosphat	10163-15-2	keine Einstufung als toxisch
Natriummetavanadat	13718-26-8	Akute Toxizität, Kategorie 4
Natrium-N-lauroylsarcosinat	137-16-6	Akute Toxizität, Kategorie 2 (4)
Neodymoxid	1313-97-9	keine Einstufung als toxisch
Siliziumdioxid	7631-86-9	keine Einstufung als toxisch
Tetraacetylenhendiämin	10543-57-4	keine Einstufung als toxisch
Tetrabromphthalsäureanhydrid	632-79-1	keine Einstufung als toxisch
Vanadium-III-oxid	1314-34-7	keine Einstufung als toxisch
Wolfram-IV-carbid	12070-12-1	keine Einstufung als toxisch
Wolfram-IV-carbid (nano)	12070-12-1	keine Einstufung als toxisch
Zinkdimethyldithiocarbamat	137-30-4	Akute Toxizität, Kategorie 2

(*) Beurteilung der Akuten Toxizität (Inhalation) im jeweils untersuchten Dosisbereich nach Einstufung gemäß der CLP-Verordnung

Die ALI Versuche wurden mit der Expositionsanlage (CULTEX® RFS) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden nach dem Aufbau der Anlage mehrere Versuche zur Validierung der Methodik und Handhabung durchgeführt. Die dabei aufgetretenen Schwierigkeiten konnten durch Anpassung einzelner Parameter behoben werden, so dass nach der Etablierung der Anlage die Expositionsversuche mit den oben genannten Testsubstanzen durchgeführt wurden. Bei der ALI Exposition wurden die Zellen für 15 min, 30 min oder 60 min entweder mit dem Testaerosol oder mit Druckluft exponiert.

Es wurde dabei für jede Expositionszeit eine bestimmte Partikelmenge festgelegt. Die Partikelmenge wurde auf die Wachstumsfläche der Inserts ($4,67 \text{ cm}^2$) bezogen und als Dosis ($15 \text{ min} = 25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $30 \text{ min} = 50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $60 \text{ min} = 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bezeichnet.

Im zweiten Schritt wurden Versuche zur SUB Exposition durchgeführt. In diesem Verfahren wurden die Zellen mit den im Medium dispergierten Substanzen unter drei verschiedenen Bedingungen exponiert. Um einen Vergleich der Ergebnisse beider Verfahren zu ermöglichen, dienten die ALI Versuchsbedingungen (insbesondere die Dosis) als Grundlage für die SUB Exposition. Für die Substanzexpositionen wurden drei verschiedene Bedingungen gewählt. Die „SUB 1“ ist der direkte Vergleich zwischen beiden Verfahren bezogen auf die Verbringung der Substanz. Die Substanz verblieb für 24 h auf den Zellen entweder als Staubpartikel (ALI) oder im KM dispergiert (SUB 1). Bei der „SUB 2“ und „SUB 3“ wurden die Zellen mit substanzhaltigem Medium für unterschiedliche Expositionszeiten behandelt (Kapitel 5.3.2.2, Tabelle 5.5). Die Testsubstanz wurde entweder in KM (SUB 2) oder EM (SUB 3) gelöst bzw. bei unlöslichen Substanzen durch Schütteln homogen im Medium verteilt.

Die Ergebnisse der beiden Expositionsverfahren werden für die Zelllinien A549 und L929 dargestellt. Anschließend werden die Ergebnisse weiterer Substanzexpositionen mit den L929-Zellen beschrieben, die ausschließlich im submersen Expositionsverfahren untersucht wurden.

6.1 Etablierung der Expositionsanlage

Durch die spezielle Apparatur CULTEX® RFS war die direkte Partikelexposition von auf mikroporöser Membran kultivierten Zellen an dem ALI möglich. Die potenziell toxischen Substanzpartikel wurden durch Aufnahme in ein Trägergas (Druckluft) in ein Aerosol überführt, das nachfolgend in direkten Kontakt mit den Zellen kam.

Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass bereits das Trägergas zellschädigend war. Die A549-Zellen wurden wie im Kapitel 5.3.1.1 aufgeführt auf der semipermeablen Membran der Zellkulturinserts ausgesät. Nach einer Wachstumsphase (24 h) wurden diese in die Expositions-kammern der beiden Module eingesetzt und für 15 min, 30 min und 60 min mit partikelfreier Luft exponiert. Als partikelfreie Luft diente das Trägergas „Druckluft für Atemschutzgeräte nach DIN EN 12021“. Im CULTEX® DG wurde ein leerer Presszylinder (d.h. ohne gepresste Substanz) eingesetzt, um die gewünschten Strömungsgeschwindigkeiten des Trägergases in der Anlage zu erhalten. Als EM wurde DMEM (Glukose $1.000 \text{ mg}/\text{l}$, Gentamicin $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) verwendet, das zusätzlich mit 25 mM HEPES gepuffert war. Die Zellvitalität nach der Exposition wurde mit Hilfe des WST-1-Assays durch fotometrische Messung der Absorptionwerte, wie im Kapitel 5.3.1.3 beschrieben, bestimmt.

Die Apparatur CULTEX® RFS hatte eine Expositionseinheit aus zwei baugleichen Modulen, so dass es keine statistischen Unterschiede der mit Druckluft exponierten Zellen zu den jeweiligen Expositionszeiträumen zwischen den Modulen im Vergleich zu der IK geben sollte. Die Module werden daher folgend als Modul 1 und 2 bezeichnet. Alle fotometrisch ermittelten OD-Werte der mit Druckluft exponierten A549-Zellen in den drei Expositionszeiträumen (15 min, 30 min, 60 min) beider

Module waren statistisch signifikant verschieden zu den OD-Werten der Zellen der IK (Abbildung 6.1). Die statistischen Unterschiede wurden über eine one-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni) berechnet.

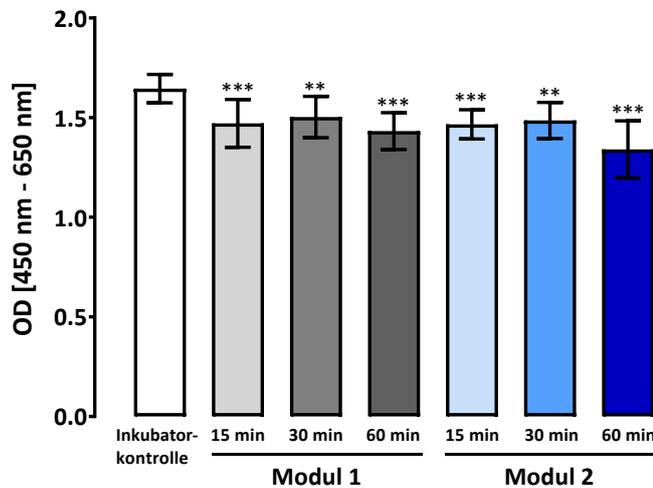


Abbildung 6.1 OD-Werte der A549-Zellen nach Druckluftexposition im CULTEX® RFS (25 mM HEPES EM)

A549-Zellen wurden mit Druckluft in beiden Modulen der Expositionsanlage CULTEX® RFS für 15 min, 30 min und 60 min exponiert (EM mit 25 mM HEPES). Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Alle OD-Werte sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen beziehen sich auf die IK und wurden berechnet mit one-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni).

Die geringeren OD-Werte der druckluftexponierten Zellen zeigten eine geringere Vitalität im Vergleich zur IK an. Als mögliche Ursache wurde die HEPES-Konzentration (25 mM) im EM angenommen. Der HEPES-Zusatz im Medium diente der Stabilisierung des pH-Werts während der Versuchsdurchführung, da während der Exposition keine CO₂-Zufuhr erfolgte. Um festzustellen, ob die HEPES-Konzentration im verwendeten Medium zu gering war, um den pH-Wert konstant zu halten, wurde die HEPES-Konzentration auf 100 mM erhöht. Nach der Änderung dieses Parameters in der Versuchsdurchführung wurden die Experimente wiederholt und die OD-Werte der druckluftexponierten Zellen wie zuvor ermittelt (Abbildung 6.2). Der statistische Vergleich der Mittelwerte ließ keine signifikanten Unterschiede erkennen.

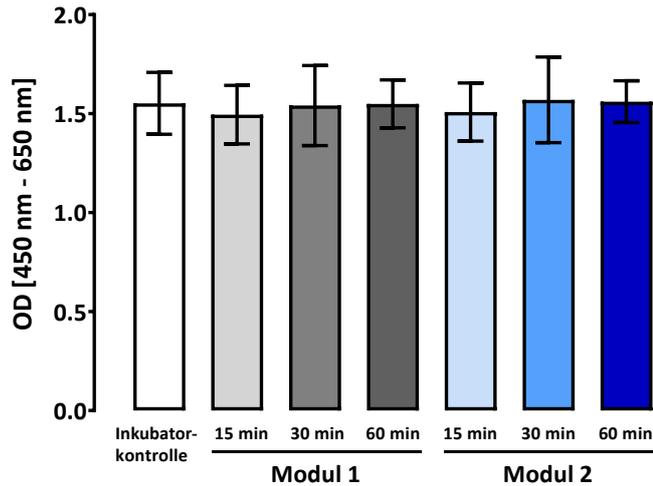


Abbildung 6.2 OD-Werte der A549-Zellen nach Druckluftexposition im CULTEX® RFS (100 mM HEPES EM)

A549-Zellen wurden mit Druckluft in beiden Modulen der Expositionsanlage CULTEX® RFS für 15 min, 30 min und 60 min exponiert (EM mit 100 mM HEPES). Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Alle OD-Werte sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

Für die Auswertung musste sichergestellt werden, dass in jeder Expositions-kammer die gleichen Voraussetzungen gegeben sind. Um auszuschließen, dass es Unterschiede zwischen den Kammern innerhalb bzw. zwischen den Modulen eines jeweiligen Expositionszeitraums gab, wurden die Ergebnisse der in der Abbildung 6.2 dargestellten Versuche noch weiter zergliedert. Die OD-Werte der druckluftexponierten Zellen der einzelnen Kammern wurden mit denen der IK, die als 100 % vital gesetzt wurden, verglichen. Es ließ sich in keinem Expositionszeitraum zwischen den Kammern ein statistischer Unterschied feststellen (Abbildung 6.3). Aufgrund dieser Kongruenz wurden die gemessenen OD- bzw. berechneten Formazanausbeute-Werte der beiden Module der jeweiligen Expositionszeiträume zusammengezogen.

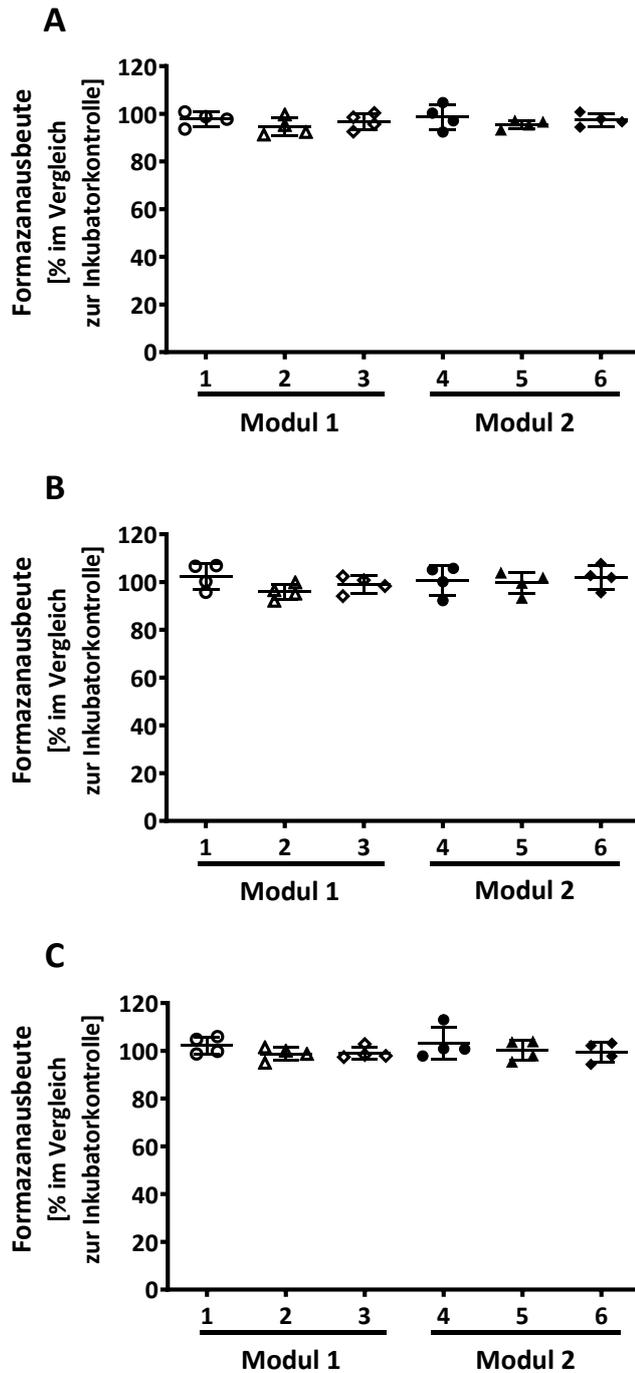


Abbildung 6.3 Vergleich der Formazanausbeute der druckluftexponierten A549-Zellen zwischen den sechs Expositionskammern des CULTEX® RFS

A549-Zellen wurden mit Druckluft in den 6 Expositionskammern (Kammern 1 bis 3 im Modul 1, Kammern 4 bis 6 in Modul 2) der Expositionsanlage CULTEX® RFS für die Zeiträume (A) 15 min, (B) 30 min und (C) 60 min exponiert (EM mit 100 mM HEPES). Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Die OD-Werte der mit Druckluft exponierten Zellen wurden in Relation zu denen der IK gesetzt dargestellt. Alle OD-Werte sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

Zur Untersuchung der Substanzen wurde neben der Zelllinie A549 auch die Zelllinie L929 verwendet. Auch hier wurde überprüft, ob das partikelfreie Trägergas (Druckluft) eine Schädigung der Zellen bewirkt. Die Durchführung dieser Vorversuche erfolgte wie zuvor beschrieben.

Ein Vergleich der Formazanausbeute aus den Versuchen der mit Druckluft exponierten A549- und L929-Zellen ist in der Abbildung 6.4 dargestellt. Da sich bei den L929-Zellen die sechs Kammern zu den einzelnen Expositionszeiträumen nicht signifikant unterschieden, wurden die Werte der beiden Module zusammengezogen. Die OD-Werte der jeweiligen IK wurden als 100 % Vitalität gesetzt. Dazu wurden die OD-Werte der jeweiligen Zelllinien in Relation gesetzt. Aus der Darstellung geht hervor, dass bei allen Expositionszeiträumen die berechneten Formazangehalte der A549-Zellen im Vergleich zu denen der L929-Zellen niedriger waren, sich aber nicht signifikant unterschieden. Die zellschädigende Auswirkung der Druckluft bei der Exposition an dem ALI war bei der Zelllinie A549 im Durchschnitt um 2 % stärker als bei der Zelllinie L929. Bei beiden Zelllinien war ein Anstieg der OD-Werte im Vergleich zur IK mit Zunahme der Expositionszeit erkennbar.

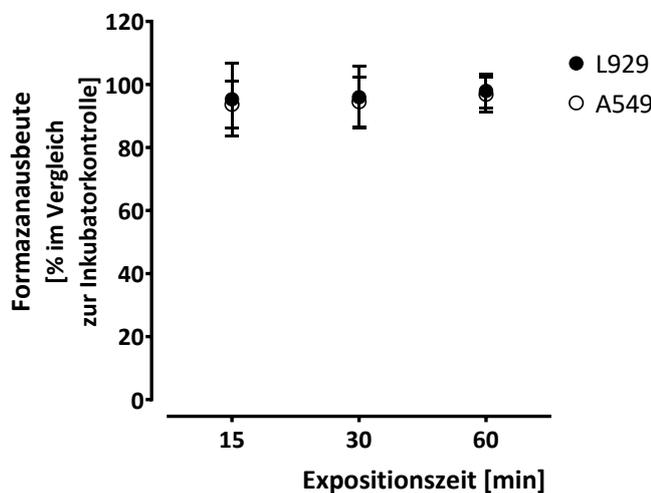


Abbildung 6.4 Vergleich der Formazanausbeute der A549- und L929-Zellen nach Druckluftexposition im CULTEX® RFS

A549- und L929-Zellen wurden mit Druckluft in der Expositionsanlage CULTEX® RFS für 15 min, 30 min und 60 min exponiert (EM mit 100 mM HEPES). Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Die OD-Werte der exponierten Zellen wurden in Relation zu denen der zugehörigen IK gesetzt dargestellt. Alle OD-Werte sind Mittelwerte \pm SD aus 60 (A549-Zellen) bzw. 36 (L929-Zellen) unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

Der Vergleich der OD-Werte zwischen den druckluftexponierten Zellen und der IK ist in der Abbildung 6.5 dargestellt. Bei den A549-Zellen als auch bei den L929-Zellen stiegen die OD-Werte mit der Zunahme der Expositionszeit an, lagen aber bei allen Zeiten unter dem Wert der IK. Die Unterschiede zwischen IK und den 15 min bzw. 30 min mit Druckluft exponierten A549-Zellen waren statistisch signifikant, bei den L929-Zellen nicht.

Die OD-Werte der A549-Zellen lagen bei etwa 1,5 und waren damit fast dreimal so hoch wie bei den L929-Zellen. Aus dem Vergleich ist erkennbar, dass es bei den druckluftexponierten L929-Zellen im Vergleich zur IK keine Schädigung bezüglich ihrer Stoffwechselaktivität durch die Exposition gab.

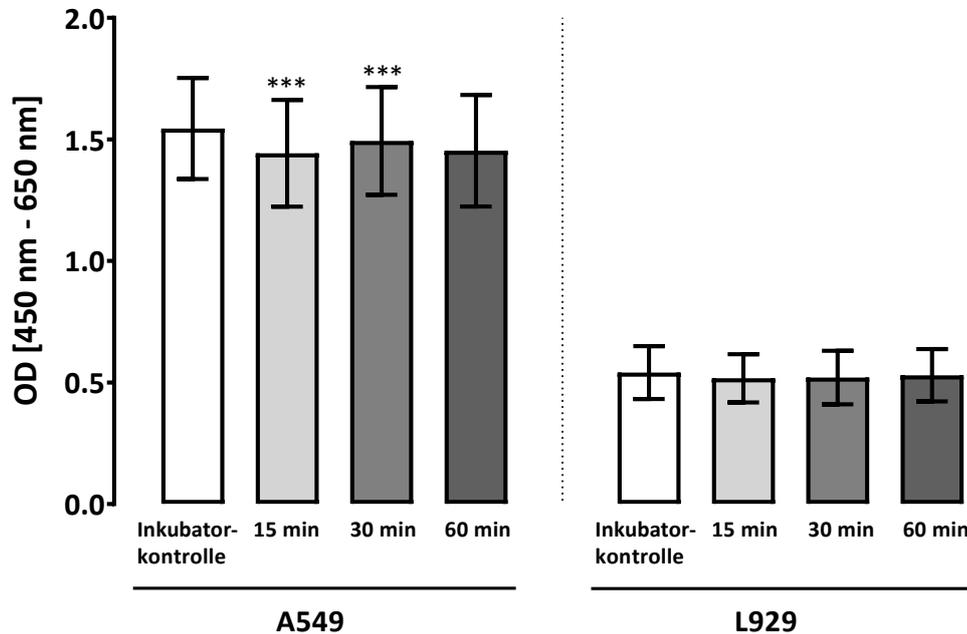


Abbildung 6.5 OD-Werte der A549- und L929-Zellen nach Druckluftexposition im CULTEX® RFS

A549- und L929-Zellen wurden mit Druckluft in beiden Modulen der Expositionsanlage CULTEX® RFS für 15 min, 30 min und 60 min exponiert (EM mit 100 mM HEPES). Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Alle OD-Werte sind Mittelwerte \pm SD aus 60 (A549-Zellen) bzw. 36 (L929-Zellen) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen zwischen den exponierten Zellen und der jeweiligen IK berechnet mit one-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni).

6.2 Expositionsversuche mit A549-Zellen

6.2.1 Böhmit (Al(OH)₃)

In der ALI Exposition traten bei den OD-Werten signifikante Unterschiede zwischen den druckluft- und Böhmit-exponierten A549-Zellen auf (Abbildung 6.6A). Die Werte der druckluftexponierten Zellen fielen verglichen mit der IK (1,7) auf 1,4 (60 min) ab. Hingegen trat bei den mit Böhmit behandelten Zellen ein stärkerer Abfall auf, hier sank der Wert auf 0,8 (60 min). Dazu war im Vergleich bei keiner der drei submersen Bedingungen ein Absinken der OD-Werte sichtbar (Abbildung 6.6B). Die Werte der SUB 2 lagen im Bereich der Kontrolle, die Werte der SUB 1 und SUB 3 vernachlässigbar darunter. Der Einfluss von Böhmit auf die Formazanbildung aus den beiden Expositionsverfahren ist in Abbildung 6.6C dargestellt. Die Unterschiede der beiden Verfahren waren bei allen getesteten Dosen statistisch signifikant. Die Exposition der Zellen mit den Substanzpartikeln von Böhmit an dem ALI führte zu einem höheren Formazandefizit als bei der SUB Exposition unabhängig von deren Bedingungen. Ein Zusammenhang zwischen dem Einfluss des verwendeten Mediums bzw. der Expositionsdauer und der Formazanbildung war nicht erkennbar.

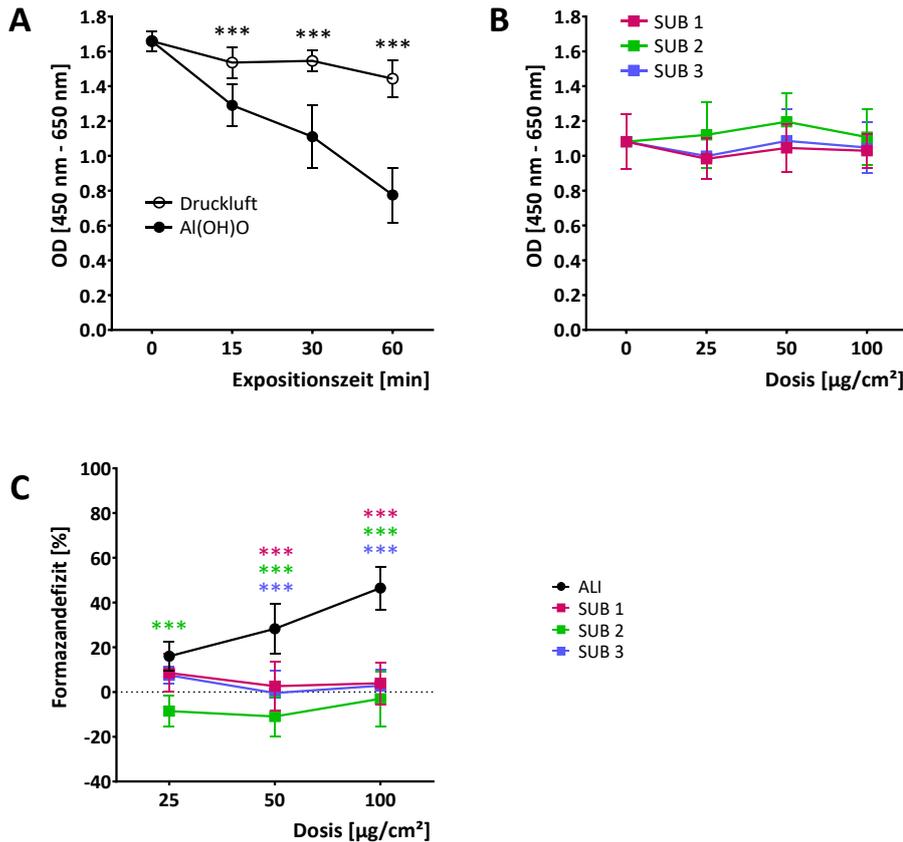


Abbildung 6.6 Exposition der A549-Zellen mit Böhmit

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Böhmit für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 µg/cm² = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus fünf (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Böhmit-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.2 β-Cyclodextrin (C₄₂H₇₀O₃₅)

Die ALI Exposition mit β-Cyclodextrin zeigte bei den OD-Werten gleicher Expositionszeit signifikante Unterschiede zwischen den druckluft- und substanzexponierten A549-Zellen (Abbildung 6.7A). Die OD-Werte der substanzexponierten Zellen sanken von 1,3 (15 min) auf 0,9 (60 min) ab. Die Ergebnisse der SUB unterschieden sich von denen der ALI Expositionen. Bei der SUB 1 war eine Abnahme der OD-Werte ausgehend vom Wert der Kontrolle (1,2) mit Zunahme der Dosis nicht erkennbar, so dass das daraus berechnete Formazandefizit vernachlässigbar war (Abbildung 6.7B und 6.7C). Im Gegensatz dazu schwankten bei der SUB 2 und der SUB 3 die OD-Werte um den Wert der Kontrolle. Die nach beiden Expositionsverfahren berechnete Formazanbildung ist vergleichend in der Abbildung 6.7C dargestellt. Differenzen der Werte zueinander und die Kurvenverläufe veranschaulichen den Einfluss der Darreichungsform der Testsubstanz und der Versuchsbedingungen. Das Formazandefizit war bei allen Dosen der ALI Exposition am höchsten und bei der höchsten Dosis

(100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) statistisch signifikant ($p < 0,001$). Hierbei lag das Formazandefizit 46 % über den SUB Expositionen.

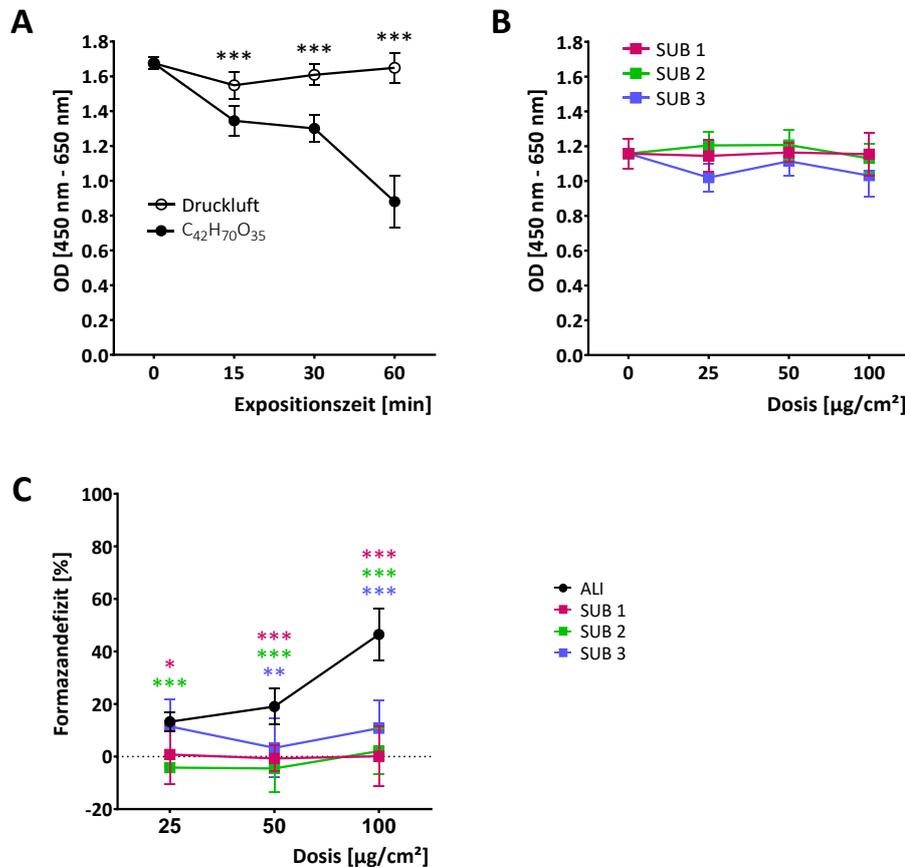


Abbildung 6.7 Exposition der A549-Zellen mit β -Cyclodextrin

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. β -Cyclodextrin für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. β -Cyclodextrin-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.3 Kaliumpyrophosphat ($\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$)

Bei den ALI Expositionen war mit Zunahme der Expositionszeit ein Absinken der OD-Werte bei den mit Kaliumpyrophosphat exponierten A549-Zellen zu sehen (Abbildung 6.8A). Im Vergleich zur IK (1,7) war der OD-Wert der substanzexponierten Zellen bei der 60-minütigen Exposition um etwa zwei Drittel gesunken. Die Unterschiede der OD-Werte zwischen den mit Druckluft bzw. Kaliumpyrophosphat behandelten Zellen waren statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die OD-Werte der drei submersen Expositionsbedingungen schwankten zwischen 1,0 und 1,2, lagen aber um den Wert der Kontrolle (1,2) (Abbildung 6.8B). Die Unterschiede der ermittelten Formazandefizite zwischen den ALI und den SUB Expositionen waren bei allen Dosen statistisch signifikant (Abbildung 6.8C). Während sich das Formazandefizit bei der Vervierfachung der Dosis bei der ALI Exposition nahezu

verdoppelte (von 29 % auf 62 %), blieb es bei der SUB 1 und der SUB 3 konstant etwa 11 %. Das Formazandefizit war bei der SUB 2 am geringsten und lag maximal bei 4 % (Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

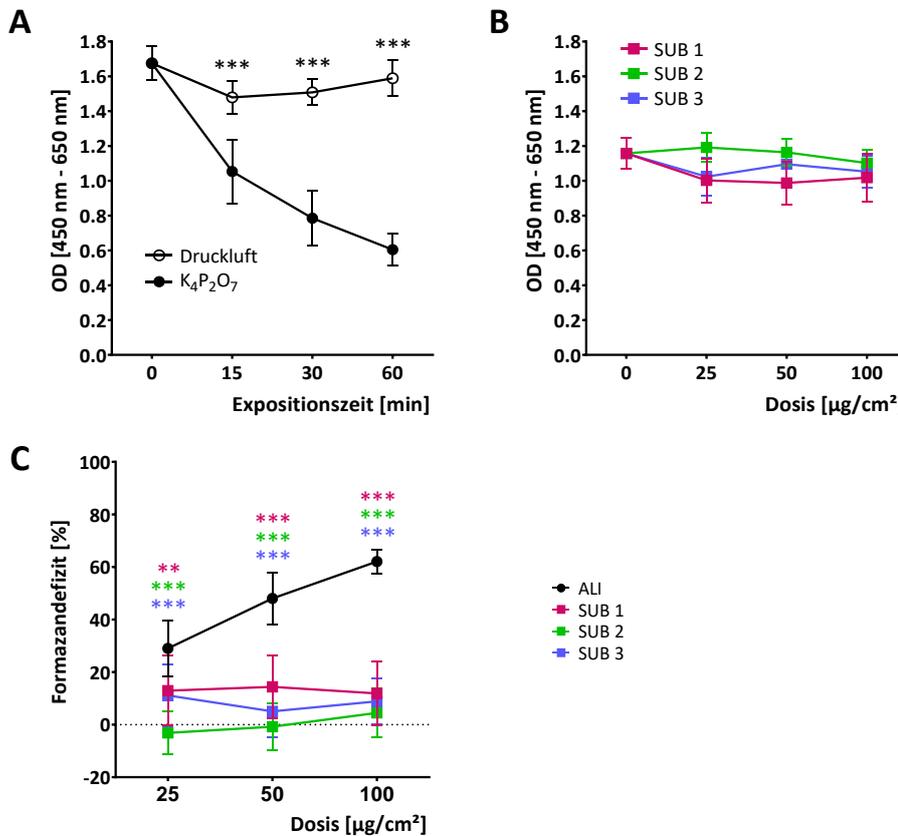


Abbildung 6.8 Exposition der A549-Zellen mit Kaliumpyrophosphat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Kaliumpyrophosphat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus vier (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Kaliumpyrophosphat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.4 Kupfer-II-hydroxid ($\text{Cu}(\text{OH})_2$)

Bei der ALI Exposition mit Kupfer-II-hydroxid wurden im Vergleich zu den mit der Druckluft behandelten A549-Zellen als auch zur IK geringere OD-Werte gemessen (Abbildung 6.9A). Ausgehend vom OD-Wert der IK (1,7) sank der Wert der substanzexponierten Zellen auf 0,2 (60 min), der Wert der druckluftexponierten Zellen blieb nahezu konstant zur IK. Die OD-Werte der exponierten Zellen bei der SUB Exposition zeigten ein ähnliches Bild wie bei der ALI Exposition (Abbildung 6.9B). Mit Zunahme der Dosis sanken die OD-Werte, wobei die Kurvenverläufe der einzelnen submersen Bedingungen unterschiedlich waren. Die SUB 2 und die SUB 3 unterschieden sich von der SUB 1. Die Expositionsdauer pro Dosis schien einen Einfluss auf die OD-Werte bzw. das daraus resultierenden Formazandefizit zu haben (Abbildung 6.9C). Die Expositionszeit betrug 24 h bei der SUB 1 und

15 min, 30 min bzw. 60 min bei der SUB 2 und der SUB 3. In beiden Expositionsverfahren beeinflusste Kupfer-II-hydroxid die Zellen in ihrer Vitalität. Die Exposition mit den Partikeln an dem ALI bedingte die größte Einschränkung der Vitalität, was im Anstieg des Formazandefizits mit Zunahme der Dosis sichtbar wurde. Die SUB 1 und die ALI Exposition waren sich ähnlich; in beiden Versuchsdurchführungen betrug die Expositionsdauer 24 h. Der Kurvenverlauf der berechneten Werte des Formazandefizits hatte einen annähernd gleichen Anstieg, unterschied sich aber zwischen 26 % ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und 10 % ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die Differenzen waren statistisch nicht signifikant. Der größte Unterschied bei der Formazanbildung lag zwischen der ALI Exposition und der SUB 2. Er betrug bei den Dosen $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 59 %.

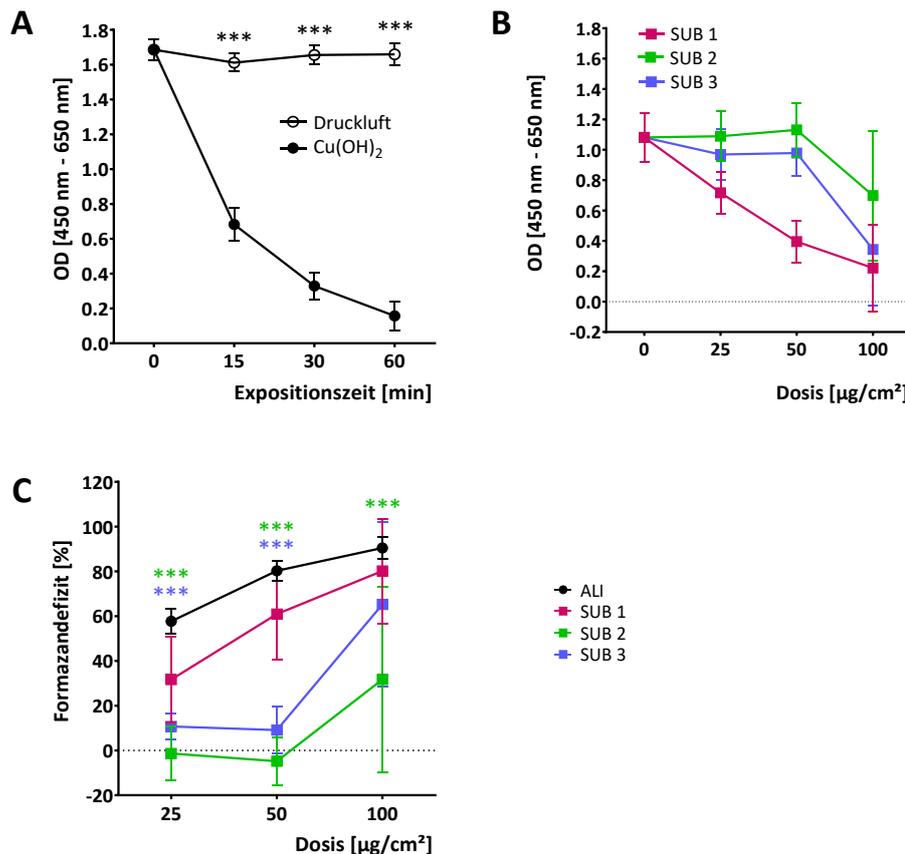


Abbildung 6.9 Exposition der A549-Zellen mit Kupfer-II-hydroxid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Kupfer-II-hydroxid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min → $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min → $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Kupfer-II-hydroxid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.5 Natriummetavanadat (NaVO_3)

Bei der ALI Exposition von A549-Zellen mit Natriummetavanadat sanken die OD-Werte im Vergleich zur IK (Abbildung 6.10A). Nach 15 min war der Unterschied etwa halbiert (0,8 vs. 1,4). Bei der SUB Exposition sanken die OD-Werte mit zunehmender Dosis (Abbildung 6.10B). Bei der SUB 2 und der SUB 3 war der Kurvenverlauf annähernd parallel; es unterschieden sich die Werte bei den gleichen Dosen um 0,2 ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bzw. 0,1 ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Verglichen mit dem OD-Wert der Kontrolle (1,2) fielen die Werte bei der Dosis $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf 0,9 (SUB 2) bzw. 0,8 (SUB 3) ab. Bei der SUB 1 betrug der OD-Wert nur 0,05. Das Absinken der Werte war hier drastisch. Die Darreichungsform hatte einen deutlichen Einfluss auf die Zellvitalität (Abbildung 6.10C). Das Formazandefizit war bei der SUB 1 am stärksten ausgeprägt (95 %). Es war knapp vierfach bzw. dreifach höher als bei der SUB 2 (22 %) bzw. bei der SUB 3 (32 %).

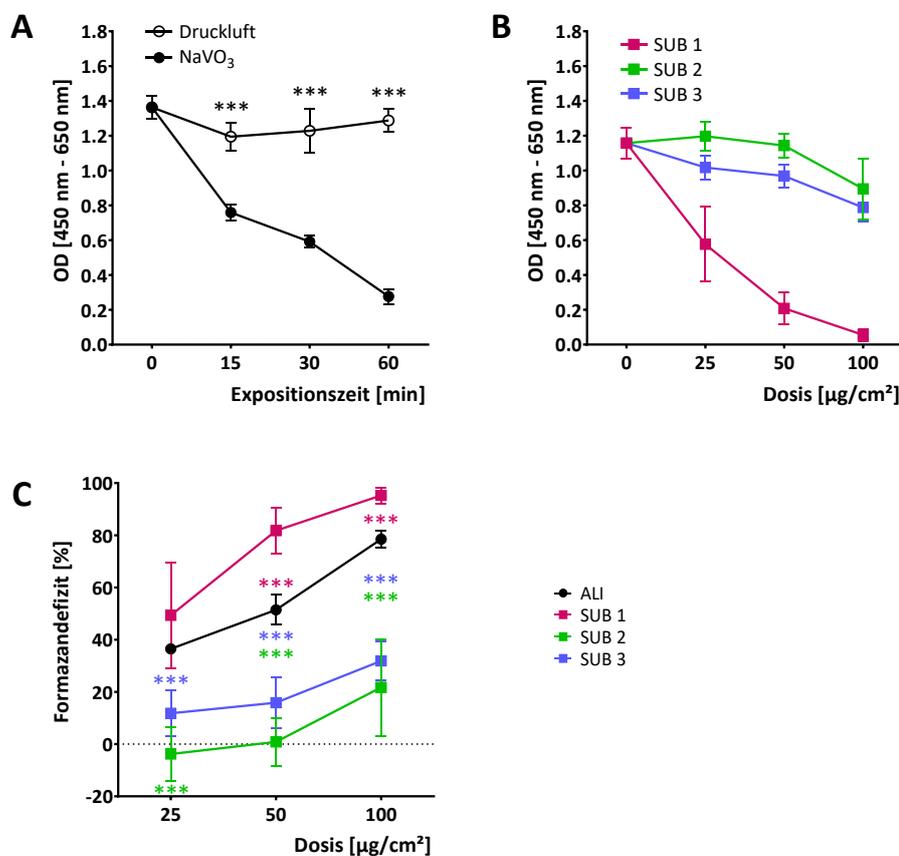


Abbildung 6.10 Exposition der A549-Zellen mit Natriummetavanadat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Natriummetavanadat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Natriummetavanadat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.6 Natrium-N-lauroylsarcosinat ($C_{15}H_{28}NO_3Na$)

Bei der ALI Exposition mit Natrium-N-lauroylsarcosinat lagen die OD-Werte der exponierten A549-Zellen zwischen 0,1 und 0,2, so dass die Substanz einen Einfluss auf die Zellvitalität unabhängig der mit zunehmender Expositionszeit steigenden Partikelmenge hatte (Abbildung 6.11A). Im Vergleich dazu waren die Werte der IK (1,4) und der druckluftexponierten Zellen (1,3) etwa siebenfach höher. Die SUB Exposition zeigte einen anderen Kurvenverlauf der OD-Werte (Abbildung 6.11B). Die Werte der SUB 3 waren bei den Dosen 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ denen der Kontrolle (1,2) nahezu gleich. Verglichen zur Kontrolle sanken die Werte bei der SUB 1 um 0,2 bzw. stiegen bei der SUB 2 um 0,1. Die Werte aller drei Bedingungen sanken bei der höchsten Dosis ab. Der Vergleich der Formazandefizite fasst die Unterschiede beider Expositionsverfahren zusammen (Abbildung 6.11C). Bei den Dosen 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ waren die Unterschiede zwischen der ALI und SUB Exposition am größten und statistisch signifikant. Die Differenz betrug zwischen 78 % (SUB 1) und 98 % (SUB 2). Bei der Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ lag das Formazandefizit bei der ALI Exposition bei 92 %, bei der SUB 1 bei 99 % und bei der SUB 3 bei 101 %, wohingegen die SUB 2 (31 %) eine deutliche Differenz bildete.

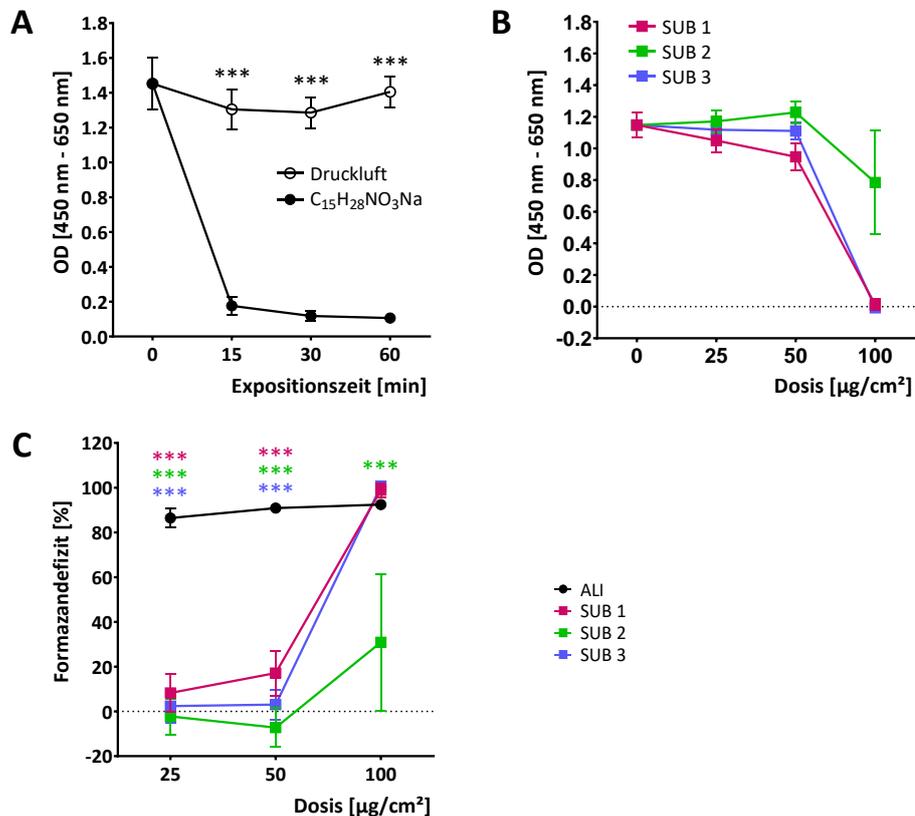


Abbildung 6.11 Exposition der A549-Zellen mit Natrium-N-lauroylsarcosinat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Natrium-N-lauroylsarcosinat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und fünf (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Natrium-N-lauroylsarcosinat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.7 Neodymoxid (Nd_2O_3)

Es zeigten sich bei der ALI Exposition mit Neodymoxid keine signifikanten Unterschiede zwischen den druckluft- und substanzexponierten A549-Zellen (Abbildung 6.12A). Die OD-Werte der druckluftexponierten Zellen glichen denen der IK (1,8), allein nach 15 min sank der Wert auf 1,7. Die Ergebnisse der SUB Exposition unterschieden sich von denen der Ali Exposition gering (Abbildung 6.12B). Die OD-Werte der SUB 2 waren bei allen Dosen vergleichbar mit der Kontrolle. Bei der SUB 1 und der SUB 3 war im Kurvenverlauf ein geringes Absinken die Werte bei den Dosen $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erkennbar. Bei dem Vergleich des durch Neodymoxid bedingten Einflusses auf die Formazanbildung in beiden Verfahren gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6.12C). Die Formazandefizite waren bei der SUB 1 und der SUB 3 etwas höher als bei der ALI Exposition. Bei der SUB 1 und der ALI Exposition wurden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen für je 24 h exponiert. Die SUB 2, d.h. die Exposition der Zellen mit substanzhaltigem KM, das nach unterschiedlichen Zeiträumen wieder von den Zellen entfernt wurde, bedingte im Vergleich zur ALI Exposition ein geringeres Formazandefizit. Die Versuchsdurchführung der SUB 3 war der SUB 2 gleich, jedoch wurde statt KM das EM verwendet.

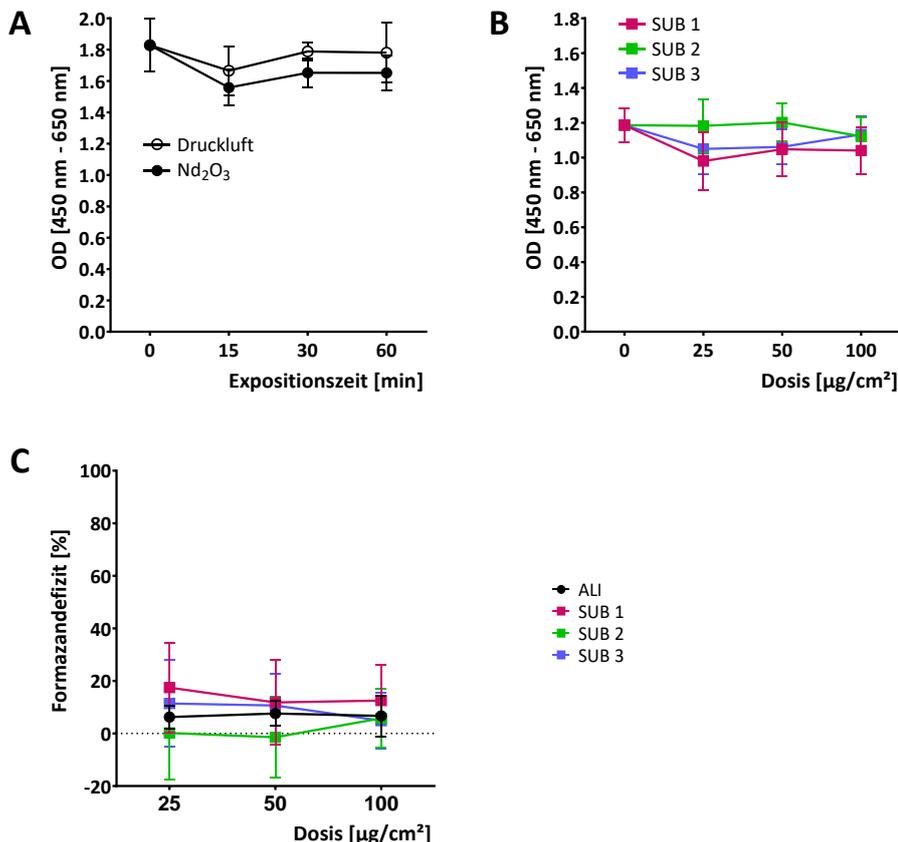


Abbildung 6.12 Exposition der A549-Zellen mit Neodymoxid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Neodymoxid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

6.2.8 Siliziumdioxid (SiO_2)

Die OD-Werte der mit Druckluft bzw. mit Siliziumdioxid exponierten A549-Zellen waren nahezu kongruent bei der ALI Exposition (Abbildung 6.13A). Die Werte der druckluftexponierten Zellen (1,2) als auch der substanzexponierten Zellen (1,1) lagen bei allen Expositionszeiten gering unter dem Wert der IK (1,3). Verglichen zur Kontrolle (1,2) sanken die OD-Werte der SUB 1 und SUB 3 gering auf 1,0, bei der SUB 2 auf 1,1 bei der Dosis $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ab (Abbildung 6.13B). Zwischen den ermittelten Werten der Formazandefizite aus beiden Verfahren zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 6.13C). Anders als bei der SUB 1, bei der mit zunehmender Dosis kein Anstieg der berechneten Werte des Formazandefizits erkennbar war, stiegen sowohl bei der ALI Exposition als auch bei der SUB 2 und der SUB 3 die Werte an. Bei der höchsten Dosis von $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ betrug das Formazandefizit beider Verfahren nicht mehr als 12 %.

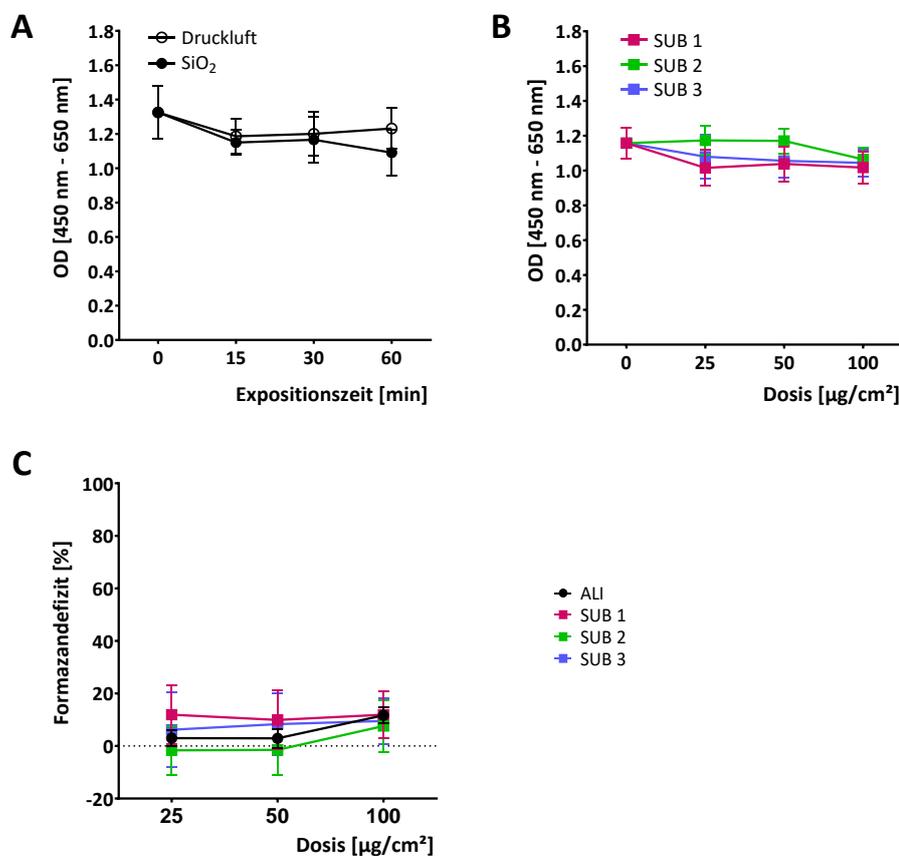


Abbildung 6.13 Exposition der A549-Zellen mit Siliziumdioxid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Siliziumdioxid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

6.2.9 Tetraacetylethylendiamin ($C_{10}H_{16}N_2O_4$)

In der ALI Exposition zeigten sich bei den OD-Werten zwischen den mit der Druckluft bzw. mit Tetraacetylethylendiamin behandelten A549-Zellen der gleichen Expositionszeit keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6.14A). Im Vergleich zur IK nahmen die OD-Werte der behandelten Zellen mit Zunahme der Expositionszeit ab. Bei der SUB Exposition waren die OD-Werte der SUB 1 und SUB 2 nahezu identisch mit dem Wert der Kontrolle (1,2) (Abbildung 6.14B). Die Werte der SUB 2 waren bei den Dosen 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ um den Wert 0,04 minimal höher als die Kontrolle, bei der SUB 3 war eine minimale Abnahme der Werte (1,05 bei 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) erkennbar. Bei der Gegenüberstellung beider Verfahren gab es nur bei der Dosis 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ einen signifikanten Unterschied zwischen der SUB 3 und der ALI Exposition (Abbildung 6.14C). Das Formazandefizit bei der SUB 1 und der SUB 3 lag etwas höher als in der ALI Exposition. Die Differenzen betragen bei 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 7 % (SUB 1) und 10 % (SUB 3) bzw. bei 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 8 % (SUB 1) und 13 % (SUB 3).

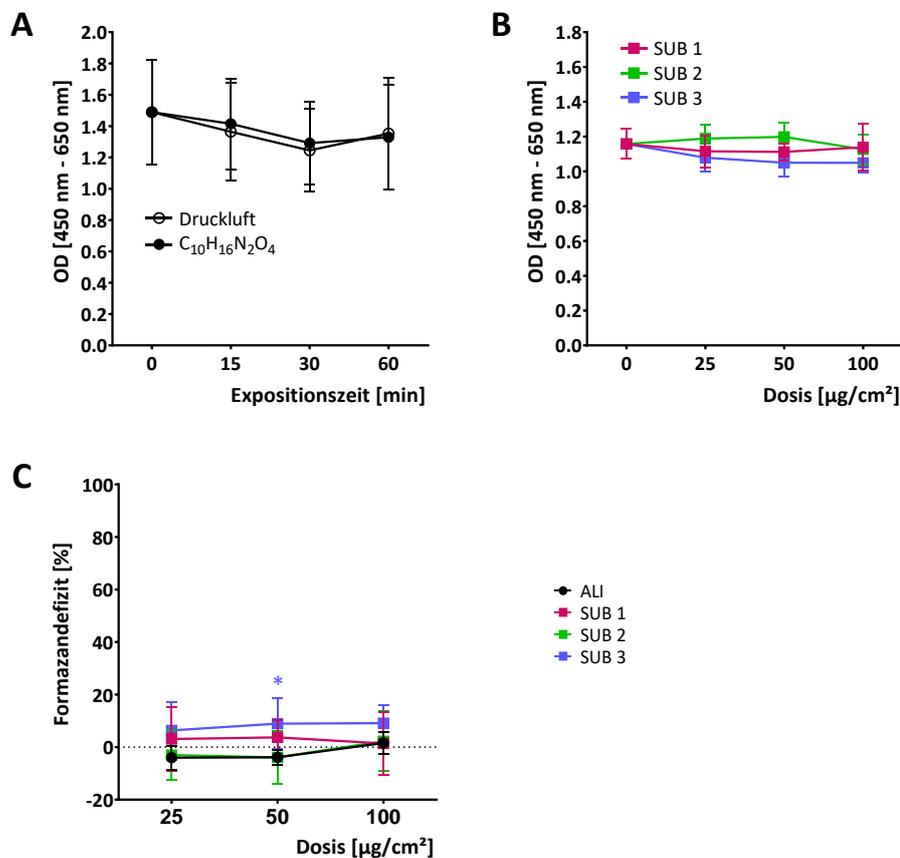


Abbildung 6.14 Exposition der A549-Zellen mit Tetraacetylethylendiamin

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Tetraacetylethylendiamin für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.10 Tetrabromphthalsäureanhydrid ($C_8Br_4O_3$)

Mit Tetrabromphthalsäureanhydrid behandelte A549-Zellen zeigten im Vergleich zu den mit Druckluft behandelten Zellen bei der ALI Exposition signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) bei den OD-Werten (Abbildung 6.15A). Die Werte der druckluftexponierten Zellen lagen im Bereich der IK, die der substanzbehandelten Zellen sanken mit der Expositionszeit ab. Der Kurvenverlauf der OD-Werte der SUB Exposition unterschied sich von dem der ALI Exposition (Abbildung 6.15B). Die OD-Werte der SUB 2 waren gleichauf mit der Kontrolle (1,2). Die Kurven der SUB 1 und SUB 3 verliefen nahezu identisch. Unter beiden Bedingungen waren die gemessenen Werte um 0,2 geringer verglichen mit der Kontrolle. Der Einfluss von Tetrabromphthalsäureanhydrid auf die Formazanbildung der Zellen in beiden Expositionsverfahren ist in der Abbildung 6.15C dargestellt. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ($p < 0,001$). Mit zunehmender Dosis nahmen die Differenzen zwischen der ALI Exposition und den drei submersen Bedingungen zu. Bei der höchsten Dosis (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) betrug die Unterschiede 69 % (SUB 1), 77 % (SUB 2) und 70 % (SUB 3).

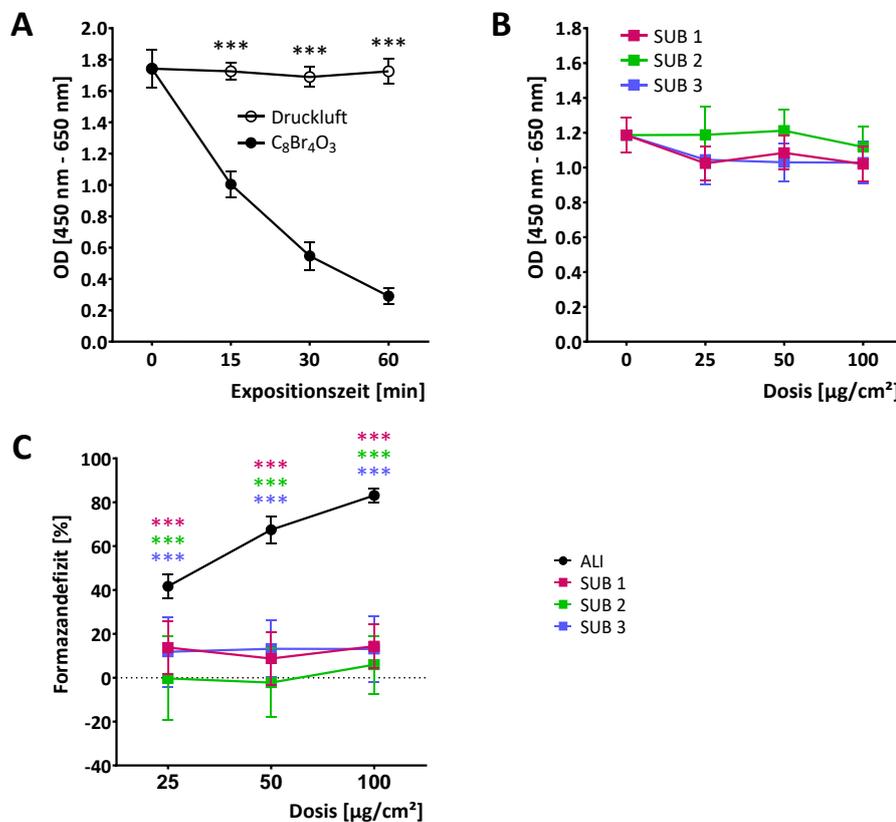


Abbildung 6.15 Exposition der A549-Zellen mit Tetrabromphthalsäureanhydrid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Tetrabromphthalsäureanhydrid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Tetrabromphthalsäureanhydrid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.11 Cetylpyridiniumchlorid ($C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$)

Unter Cetylpyridiniumchlorid zeigten sich bei den OD-Werten signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den druckluft- und substanzexponierten A549-Zellen (Abbildung 6.16A). Die Werte der druckluftexponierten Zellen lagen im Bereich der IK (1,7). Bei den substanzbehandelten Zellen waren die OD-Werte bei allen Expositionszeiten Null. Im Kurvenverlauf der OD-Werte gab es zwischen den behandelten Zellen der SUB und der ALI Exposition keinen Unterschied (Abbildung 6.16B). Auch hier betrug der OD-Wert bei allen drei submersen Bedingungen bei allen Dosen Null. Bei der Berechnung der Werte zu den Formazandefiziten beider Expositionsverfahren gab es keine sichtbaren Unterschiede (Abbildung 6.16C). Die statistische Auswertung zeigte eine Signifikanz zwischen der SUB 3 bei allen Dosen bzw. der SUB 2 bei der höchsten Dosis jeweils zur ALI Exposition an. Die Exposition führte sowohl als Substanzpartikel (ALI) als auch dispergiert in verschiedenen Medien (SUB) zum Absterben der Zellen.

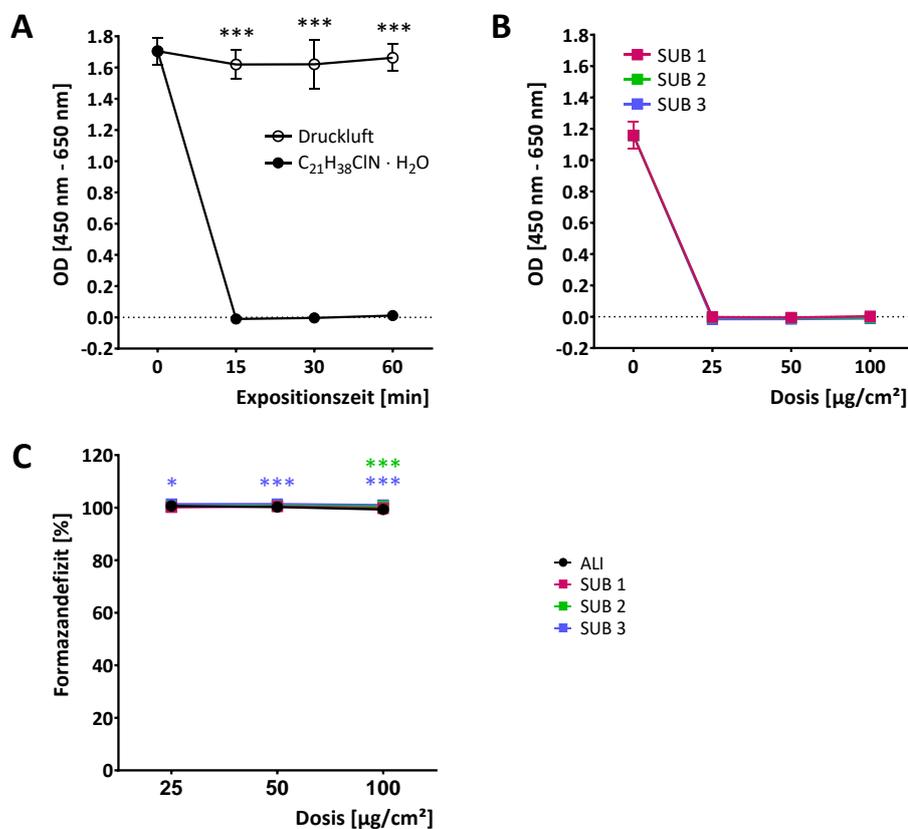


Abbildung 6.16 Exposition der A549-Zellen mit Cetylpyridiniumchlorid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Cetylpyridiniumchlorid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu g/cm^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu g/cm^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu g/cm^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu g/cm^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Cetylpyridiniumchlorid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.12 di-Ammoniumphosphat ((NH₄)₂HPO₄)

Die ALI Exposition mit di-Ammoniumphosphat zeigte eine Kongruenz der OD-Werte der mit Druckluft bzw. der Substanz exponierten A549-Zellen (Abbildung 6.17A). Verglichen zur IK (1,5) wichen die Werte bei der Druckluft (1,46-1,52) bzw. bei der Testsubstanz (1,43-1,47) nur minimal ab. Die OD-Werte der SUB Expositionen (SUB 1: 1,1-1,2; SUB 2: 1,2-1,3; SUB 3: 1,1) unterschieden sich kaum von dem Wert der Kontrolle (1,2) (Abbildung 6.17B). Bei den Formazandefiziten war kein signifikanter Unterschied erkennbar (Abbildung 6.17C).

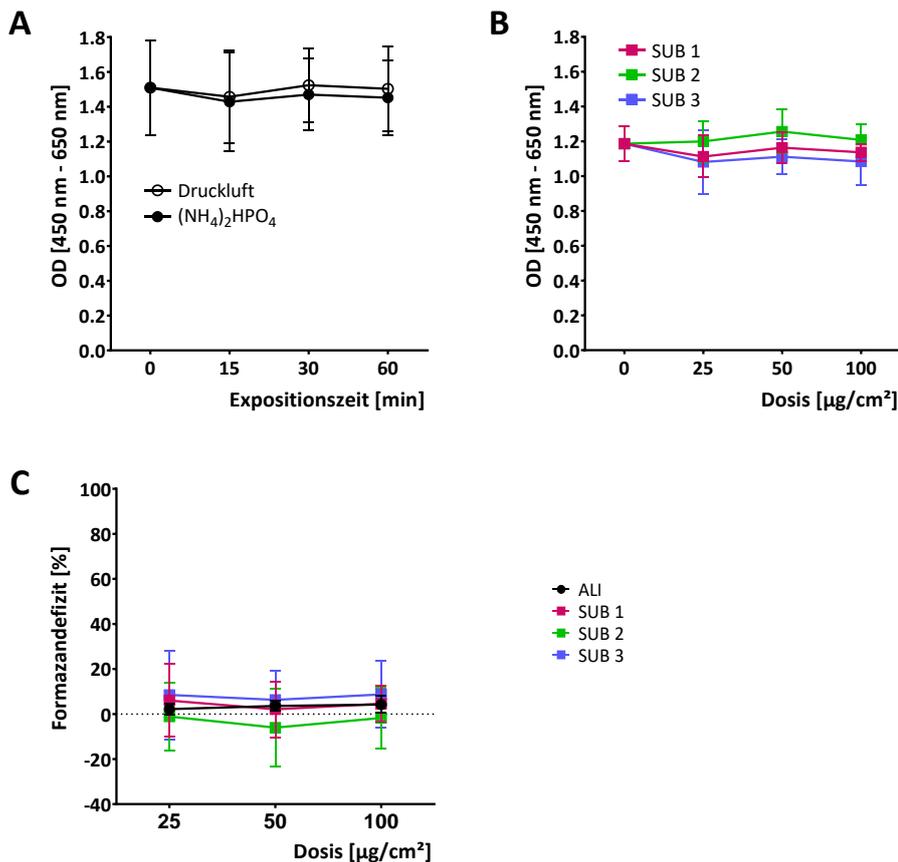


Abbildung 6.17 Exposition der A549-Zellen mit di-Ammoniumphosphat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. di-Ammoniumphosphat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 µg/cm² = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

6.2.13 Kupfer-II-oxid (nano) (CuO)

Zwischen den OD-Werten, die aus den Versuchen der ALI Exposition mit Kupfer-II-oxid (nano) ermittelt wurden, gab es zwischen den druckluft- und substanzexponierten A549-Zellen signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) (Abbildung 6.18A). Verglichen mit dem Wert der IK (1,7) sanken mit Zunahme der Expositionszeit die OD-Werte sowohl bei den mit Druckluft als auch bei den mit Kupfer-

II-oxid (nano) behandelten Zellen. Bei der längsten Expositionszeit war die Abnahme bei den druckluftexponierten Zellen (1,5) deutlich geringer als bei den substanzexponierten Zellen (0,7). Bei der SUB Exposition war bei allen drei Bedingungen eine Abnahme der OD-Werte ermittelt worden (Abbildung 6.18B). Die einzelnen Bedingungen hatten einen fast parallelen Verlauf der Kurven. Die stärkste Abnahme der OD-Werte war bei der SUB 1 sichtbar. Die zusammenfassende Darstellung des Formazandefizits in Abbildung 6.18C zeigt die Unterschiede zwischen den Expositionsverfahren als auch zwischen den einzelnen SUB Expositionen. Die Unterschiede der ALI Exposition zur SUB 3 war bei der mittleren Dosis, zur SUB 2 bei allen Dosen signifikant verschieden. Im Vergleich zur ALI Exposition schienen die unterschiedlichen SUB Expositionen einen geringen Einfluss auf die Formazanbildung der A549-Zellen zu haben.

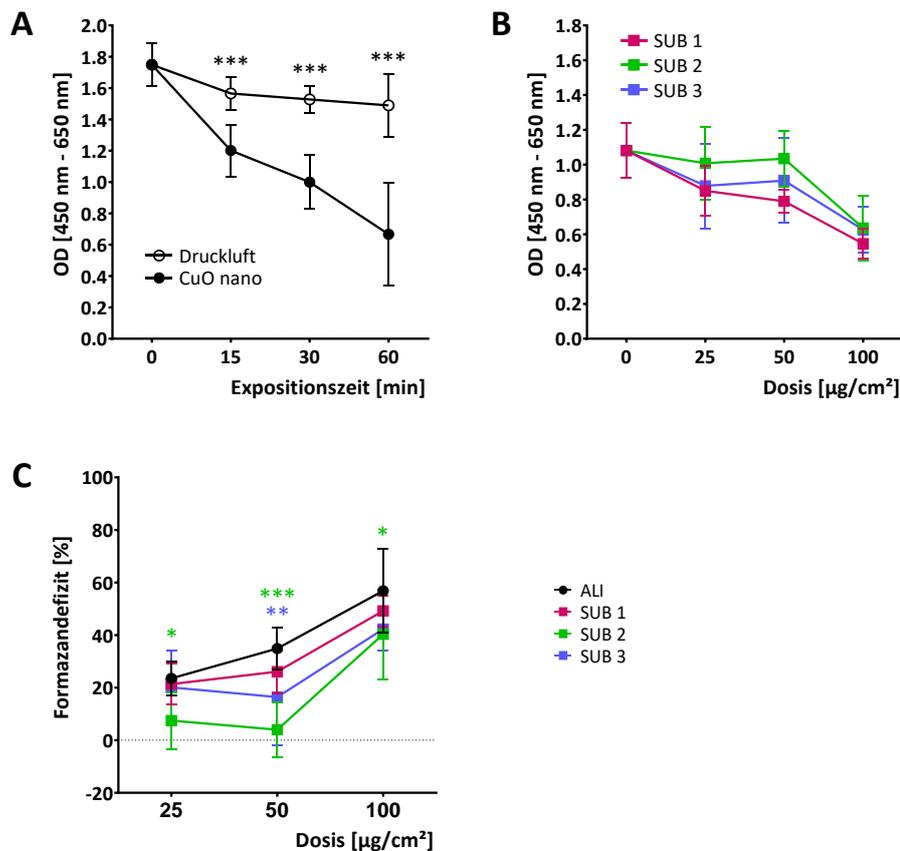


Abbildung 6.18 Exposition der A549-Zellen mit Kupfer-II-oxid (nano)

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Kupfer-II-oxid (nano) für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Kupfer-II-oxid (nano)-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.14 Kupfer-II-sulfat (CuSO_4)

Bei der ALI Exposition gab es zwischen den druckluft- und Kupfer-II-sulfat-behandelten A549-Zellen signifikante Unterschiede bei den OD-Werten gleicher Expositionszeit (Abbildung 6.19A). Mit ansteigender Expositionszeit sanken die Werte, wobei sich die Kurvenverläufe unterschieden. Die Werte der druckluftexponierten Zellen fielen minimal von 1,5 (15 min) auf 1,4 (60 min), bei den substanzexponierten Zellen von 0,3 (15 min) auf 0,1 (60 min). Ebenfalls gab es eine Abnahme der OD-Werte mit zunehmender Dosis bei der SUB Exposition, wobei sich die Kurvenverläufe der Werte zwischen den drei Bedingungen unterschieden (Abbildung 6.19B). Bei der SUB 1 war das Absinken der Absorption im Vergleich zur SUB 2 und SUB 3 am stärksten. Die Formazandefizite der beiden Expositionsverfahren wurden miteinander verglichen (Abbildung 6.19C). Die Darreichungsform der Substanz schien einen Einfluss auf die Zellaktivität und damit auf die Formazanbildung zu haben. Die Werte der Formazandefizite der ALI Exposition waren bei allen Dosen höher als bei der SUB Exposition. Die Unterschiede zwischen beiden Darreichungsformen der Substanz waren signifikant. Lediglich zwischen der ALI Exposition und SUB 1 gab es bei der höchsten Dosis keine Signifikanz.

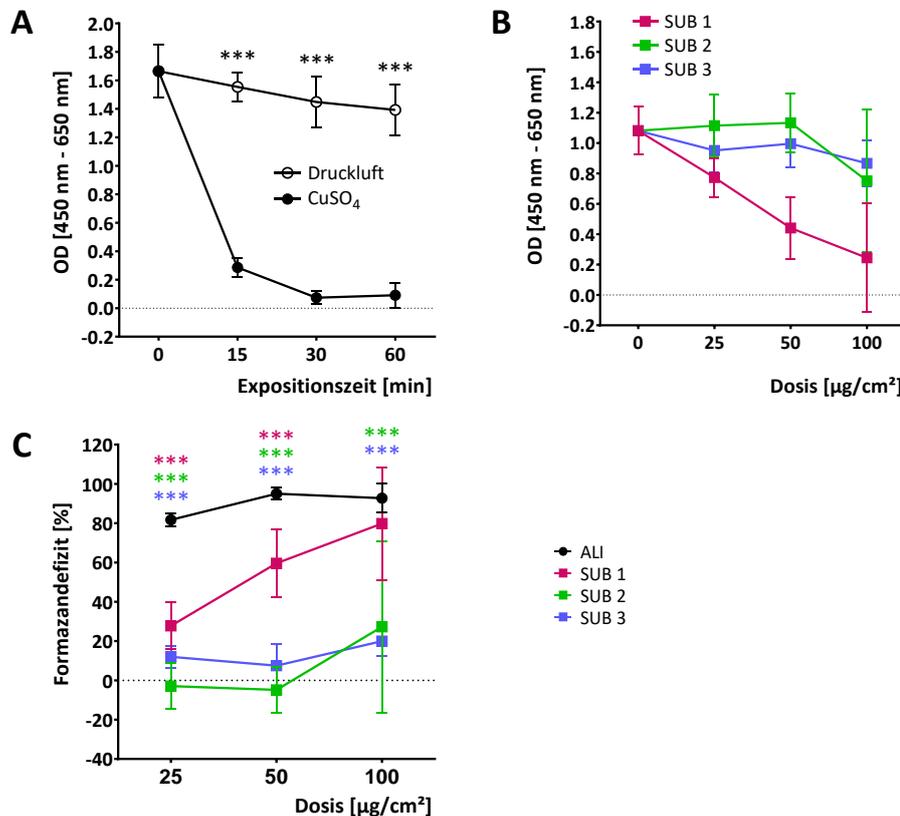


Abbildung 6.19 Exposition der A549-Zellen mit Kupfer-II-sulfat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Kupfer-II-sulfat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Kupfer-II-sulfat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.15 D(+)-Laktose Monohydrat ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)

Die OD-Werte aus der ALI Exposition mit Druckluft bzw. D(+)-Laktose Monohydrat behandelten A549-Zellen zeigt Abbildung 6.20A. Die Werte waren bei den gleichen Expositionszeiten nicht signifikant verschieden. Im Vergleich zur IK (1,6) sanken die OD-Werte sowohl bei den druckluft- als auch bei den substanzexponierten Zellen ab, so dass sie bei der längsten Expositionszeit (60 min) einen Wert von 1,4 (Druckluft) bzw. 1,3 D(+)-Laktose Monohydrat hatten. Die OD-Werte der SUB 1 und der SUB 3 sind kaum verschieden von der Kontrolle, so dass die Kurvenverläufe nahezu parallel waren (Abbildung 6.20B). Im Gegensatz dazu stiegen die Werte der SUB 2 leicht an, wobei lediglich bei der höchsten Dosis (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) die Kurve gering abfiel. Die Formazandefizite sind in Abbildung 6.20C dargestellt. Der Vergleich der Kurvenverläufe der ALI Exposition mit den einzelnen submersen Bedingungen zeigte einen nahezu kongruenten Verlauf zur SUB 3, zur SUB 1 und zur SUB 2 aber die größten Unterschiede. Im Gegensatz zur ALI Exposition waren die Werte der SUB 1 und der SUB 2 negativ. Dabei unterschied sich statistisch die SUB 2 signifikant ($p < 0,001$) von der ALI Exposition.

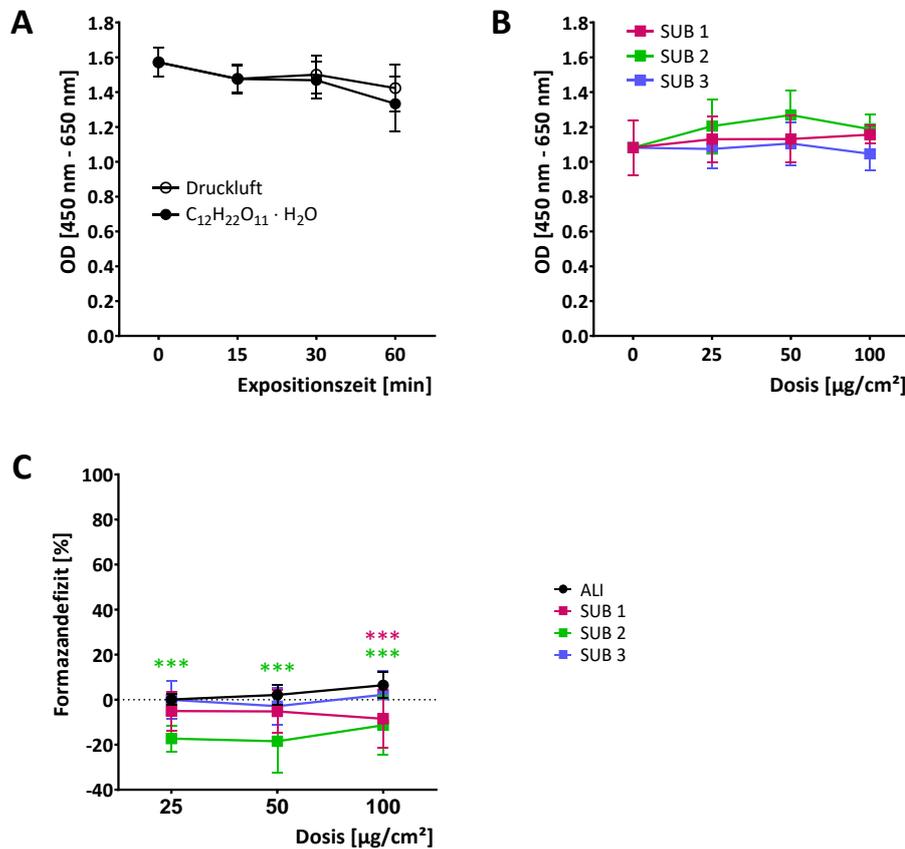


Abbildung 6.20 Exposition der A549-Zellen mit D(+)-Laktose Monohydrat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. D(+)-Laktose Monohydrat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus vier (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.16 Natriumfluorophosphat ($\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$)

Die OD-Werte der mit Druckluft bzw. Natriumfluorophosphat behandelten A549-Zellen sind in der Abbildung 6.21A dargestellt. Ausgehend von der IK (1,4) sanken die Werte der substanzexponierten Zellen nach 60 min auf 1,1 ab. Die Werte der druckluftexponierten Zellen sanken bei den Expositionszeiten 15 min und 30 min ab, stiegen bei 60 min wieder leicht an. Zwischen den OD-Werten der längsten Expositionszeit war der Unterschied signifikant ($p < 0,01$). Der Kurvenverlauf der OD-Werte bei der SUB Exposition war zwischen den einzelnen Bedingungen ähnlich (Abbildung 6.21B). Die OD-Werte unterschieden sich vernachlässigbar vom Wert der Kontrolle. Die Formazandefizite sind veranschaulicht in der Abbildung 6.21C. Die Verläufe der einzelnen Kurven waren sehr ähnlich, unterschieden sich jedoch u.a. durch die negativen Werte für SUB 1 und SUB 2. Signifikante Unterschiede zur ALI Exposition wurden für die SUB 1 bzw. SUB 2 bei $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ berechnet.

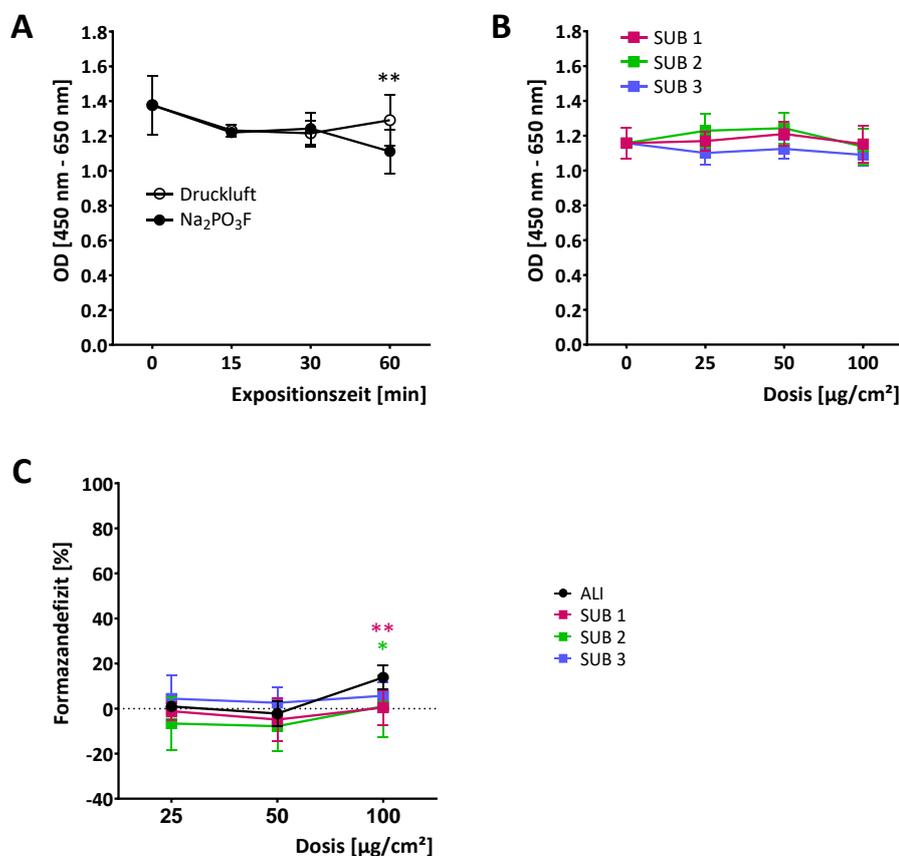


Abbildung 6.21 Exposition der A549-Zellen mit Natriumfluorophosphat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Natriumfluorophosphat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min → 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min → 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Natriumfluorophosphat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.17 Vanadium-III-oxid (V_2O_3)

Bei der ALI Exposition mit Vanadium-III-oxid waren die Unterschiede zwischen den substanz- und druckluftexponierten A549-Zellen gleicher Expositionszeit bei den OD-Werten signifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 6.22A). Die Werte der druckluftexponierten Zellen lagen zwischen 1,7 (15 min) und 1,6 (60 min); die der mit Vanadium-III-oxid behandelten Zellen nahmen von 1,3 (15 min) auf 1,1 (60 min) ab. Die Werte der SUB 1 (1,0-1,1), SUB 2 (1,2) und SUB 3 (1,1) waren dem Wert der Kontrolle (1,2) nahezu gleich (Abbildung 6.22B). Der Vergleich der Formazandefizite aus beiden Expositionsverfahren mit Vanadium-III-oxid zeigte z.T. signifikante Unterschiede (Abbildung 6.22C), die bei der ALI Exposition für alle Dosen höher als bei den SUB Expositionen waren. Es liegt nahe, dass die Darreichungsform einen Einfluss auf das Formazandefizit hat.

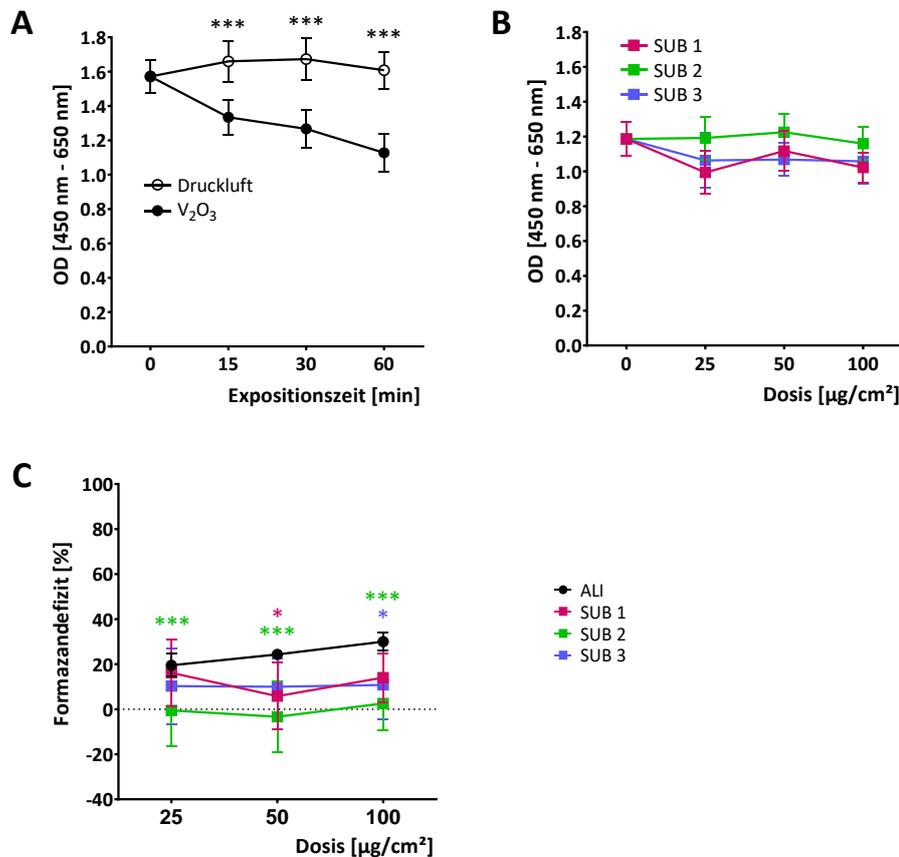


Abbildung 6.22 Exposition der A549-Zellen mit Vanadium-III-oxid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Vanadium-III-oxid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Vanadium-III-oxid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.18 Wolfram-IV-carbid (WC)

Die in der ALI Exposition mit Wolfram-IV-carbid ermittelten OD-Werte der druckluft- bzw. substanz-exponierten A549-Zellen sind in der Abbildung 6.23A dargestellt. Die Kurvenverläufe waren nahezu kongruent; es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den OD-Werten. Sie lagen minimal niedriger unter dem Wert der IK (1,3). Bei der SUB Exposition waren die OD-Werte der SUB 1 (1,0) und der SUB 3 (1,0) gering unter dem Wert der Kontrolle (1,2) (Abbildung 6.23B). Im Gegensatz dazu glichen die Werte der SUB 2 (1,2) dem Kontrollenwert. Die Kurven zur berechneten Formazanbildung beider Expositionsverfahren zeigten einen kongruenten Verlauf der SUB 1 und SUB 3 bzw. der SUB 2 und der ALI Exposition (Abbildung 6.23C). Hierbei unterschieden sich die ALI Exposition und die SUB 1 bei 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ signifikant.

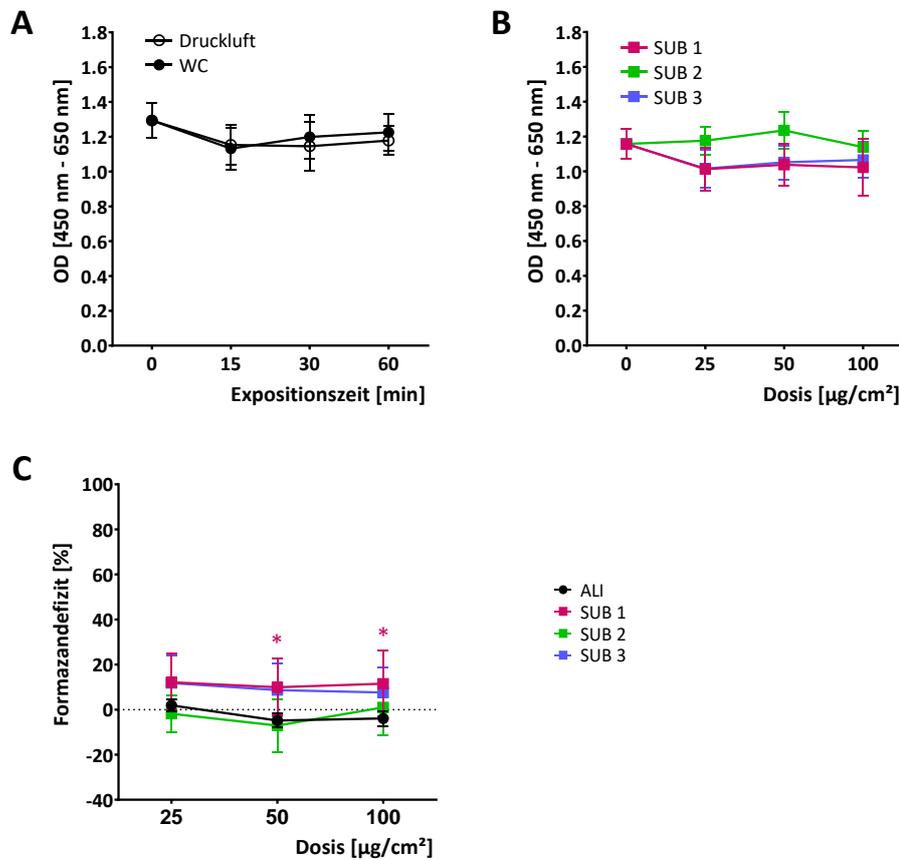


Abbildung 6.23 Exposition der A549-Zellen mit Wolfram-IV-carbid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Wolfram-IV-carbid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.2.19 Wolfram-IV-carbid (nano) (WC)

Bei der ALI Exposition von A549-Zellen mit Wolfram-IV-carbid (nano) gab es eine Kongruenz der Kurvenverläufe bei den OD-Werten (Abbildung 6.24A). Die ermittelten Werte der einzelnen Expositionszeiten unterschieden sich bei den mit Druckluft (1,2) bzw. bei den mit der Substanz (1,1-1,2) exponierten Zellen kaum, lagen aber unter dem Wert der IK (1,3). Bei der SUB Exposition waren die Kurvenverläufe der OD-Werte nicht kongruent (Abbildung 6.24B). Die Werte der SUB 1 waren bei allen Dosen dem Wert der Kontrolle (1,2) nahezu gleich. Die Werte der SUB 2 lagen gering über dem Wert der Kontrolle, die Werte der SUB 3 hingegen minimal unter dem Wert der Kontrolle. Bei den Formazandefiziten gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6.24C). Die Kurvenverläufe bei den ALI und SUB Expositionen waren sehr ähnlich.

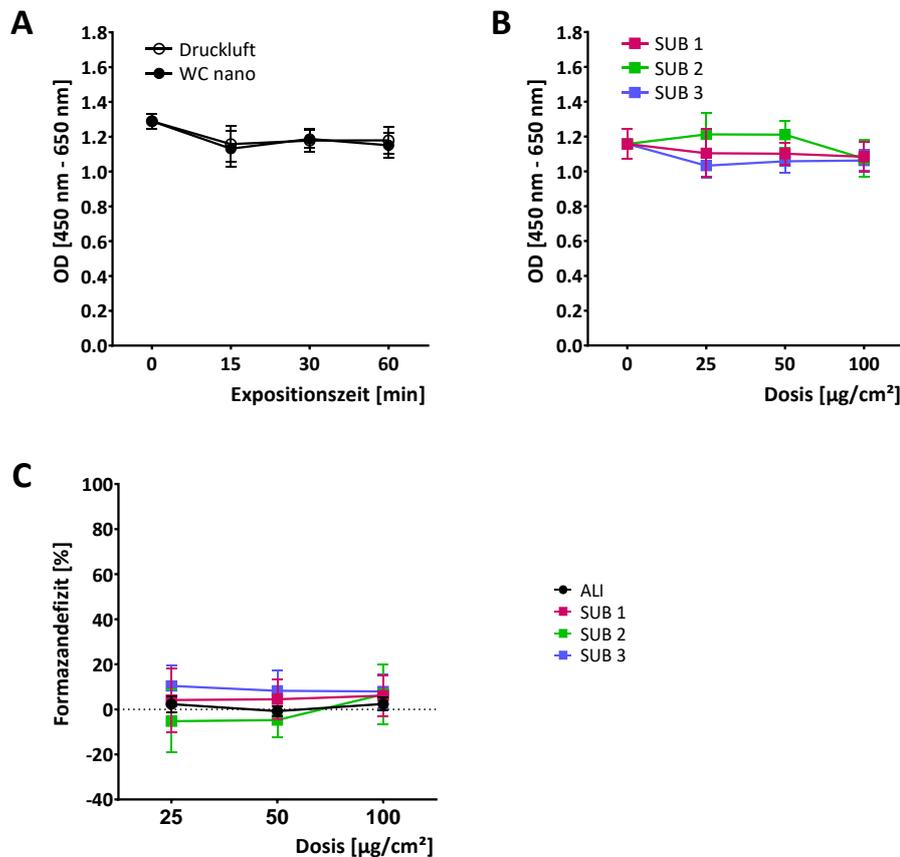


Abbildung 6.24 Exposition der A549-Zellen mit Wolfram-IV-carbid (nano)

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Wolfram-IV-carbid (nano) für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

6.2.20 Zinkdimethyldithiocarbamat ($C_6H_{12}N_2S_4Zn$)

Die OD-Werte bei der ALI Exposition mit Zinkdimethyldithiocarbamat unterschieden sich signifikant zwischen den druckluft- und substanzexponierten A549-Zellen (Abbildung 6.25A). Bei den druckluftbehandelten Zellen waren die Werte (1,4-1,5) der IK (1,5) nahezu gleich. Im Gegensatz dazu waren die substanzbehandelten Zellen metabolisch inaktiv. Bei der SUB Exposition waren bei den einzelnen Bedingungen unterschiedliche Kurvenverläufe der OD-Werte aufgezeigt (Abbildung 6.25B). Die Werte der drei SUB Expositionen sanken, wobei die Kurven der SUB 1 und der SUB 2 einen ähnlichen Verlauf hatten. Während bei der Dosis 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ein Wert von 0,2 (SUB 1) bzw. 0,3 (SUB 2) ermittelt wurde, waren die Werte jeweils bei den anderen Dosen (25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) praktisch Null. Die Formazandefizite beider Expositionsverfahren waren unterschiedlich, aber nur zwischen der ALI Exposition und der SUB 3 bei der Dosis 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ signifikant verschieden ($p < 0,001$) (Abbildung 6.25C). Die Versuche mit substanzhaltigem Medium zeigten keinen Trend in Abhängigkeit der Dosis. Bei der SUB 3 war mit ansteigender Dosis eine Zunahme des Formazandefizits sichtbar. Dagegen waren die Werte der ALI Exposition bei allen Dosen 100 %.

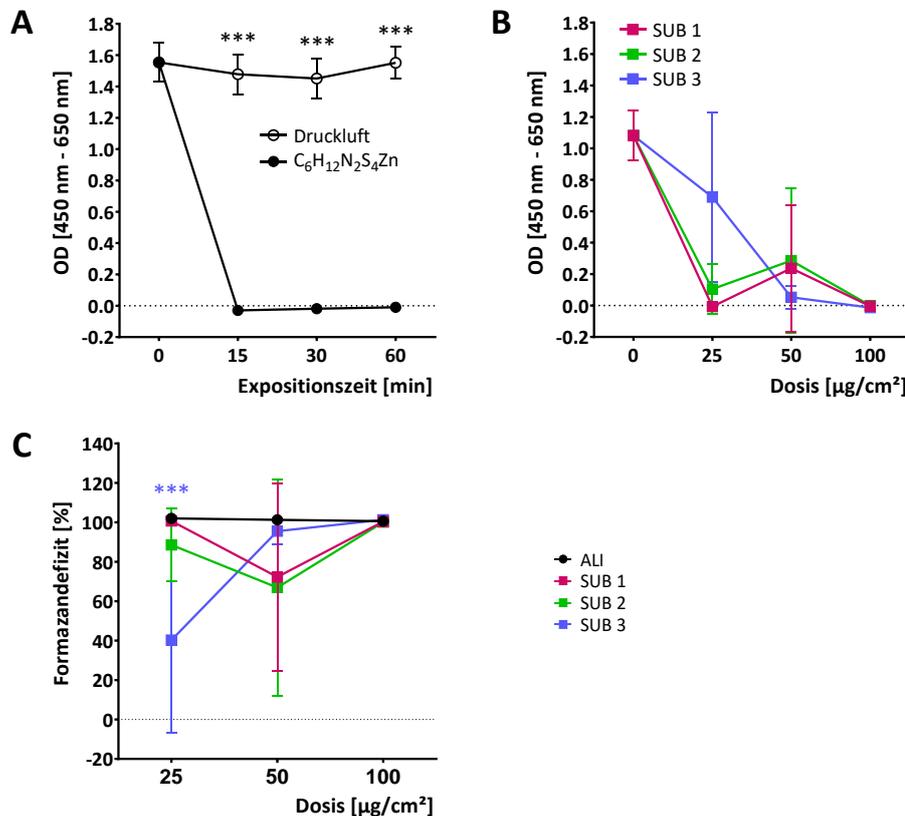


Abbildung 6.25 Exposition der A549-Zellen mit Zinkdimethyldithiocarbamat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Zinkdimethyldithiocarbamat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Zinkdimethyldithiocarbamat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3 Expositionsversuche mit den L929-Zellen

6.3.1 Böhmit (Al(OH)O)

In der ALI Exposition mit den L929-Zellen waren die ermittelten OD-Werte bei 15- und 30-minütiger Expositionszeit mit Druckluft bzw. Böhmit im Vergleich zu der IK kaum verschieden (Abbildung 6.26A). Die Absorptionskurven verliefen parallel, wobei die Werte der druckluftbehandelten Zellen niedriger als bei den substanzbehandelten Zellen waren. Bei der Expositionszeit 60 min waren die Unterschiede signifikant ($p < 0,5$). Bei den SUB Expositionen unterschieden sich die OD-Werte der einzelnen Bedingungen voneinander, wobei die jeweiligen Kurvenverläufe zueinander ähnlich waren (Abbildung 6.26B). Bei allen Bedingungen stiegen die Werte zunächst von der niedrigen ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) zur mittleren ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Dosis an, sanken anschließend ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) aber wieder ab. Die Gegenüberstellung der beiden Verfahren zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei SUB Expositionen jeweils bezogen zur ALI Exposition (Abbildung 6.26C). Die Kurvenverläufe der submersen Bedingungen waren parallel, wenngleich auch die jeweiligen Werte bei der gleichen Dosis voneinander abwichen. Bei Betrachtung der Formazandefizite und deren Verlauf in Abhängigkeit von der Dosis war ein Einfluss des Expositionsverfahrens nicht erkennbar. Sowohl bei der ALI als auch bei der SUB Exposition war mit zunehmender Dosis keine Tendenz der Kurven erkennbar.

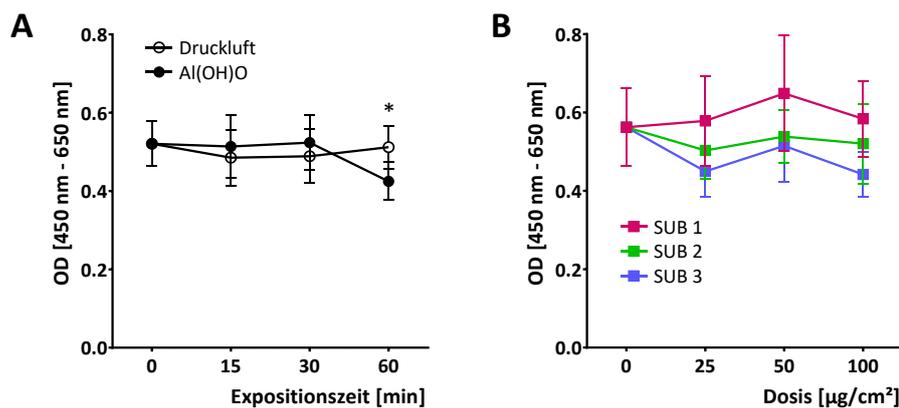


Abbildung 6.26 (Teil 1) Exposition der L929-Zellen mit Böhmit

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Böhmit für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium ($0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min $\rightarrow 25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min $\rightarrow 50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min $\rightarrow 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Böhmit-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

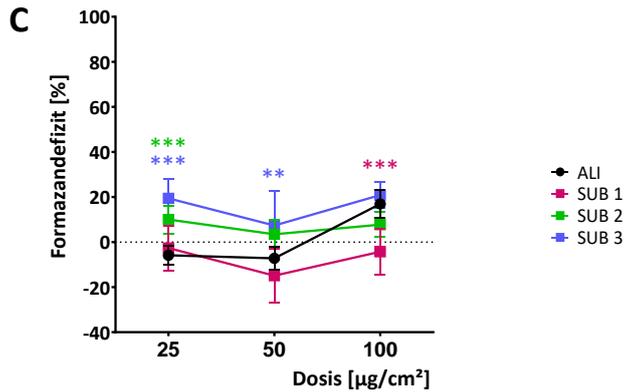


Abbildung 6.26 (Teil 2) Exposition der L929-Zellen mit Böhmit

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Böhmit für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 µg/cm² = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Böhmit-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.2 β-Cyclodextrin (C₄₂H₇₀O₃₅)

Bei der ALI Exposition der L929-Zellen mit β-Cyclodextrin waren die Kurvenverläufe der OD-Werte kongruent (Abbildung 6.27A). Zwischen den drei SUB Expositionen gab es Unterschiede bei den OD-Werten (Abbildung 6.27B). Die Kurven verliefen parallel zueinander, wichen aber in annähernd konstantem Abstand voneinander ab. Die Werte der submersen Bedingungen (SUB 1: 0,5-0,6; SUB 2: 0,4; SUB 3: 0,3-0,4) waren annähernd dem Wert der Kontrolle (0,5) gleich. Bei der Gegenüberstellung der Formazandefizite aus den beiden Expositionsverfahren gab es Differenzen (Abbildung 6.27C). Signifikante Unterschiede zeigten sich bei den Werten der ALI Exposition im Vergleich zu denen der SUB 2 und der SUB 3, nicht aber zur SUB 1. Die Werte der ALI Exposition waren zwischen -3 % und 5 %, ohne dass eine Tendenz mit Zunahme der Dosis erkennbar war. Bei der SUB 1 sank der Wert von 8 % (25 µg/cm²) auf -6 % (100 µg/cm²) ab. Mit Zunahme der Dosis nahmen die bei der SUB 2 berechneten Werte von 25 % (25 µg/cm²) auf 13 % (100 µg/cm²) ab, wohingegen es bei der SUB 3 eine annähernde Konstanz von 33 % (25 µg/cm²) zu 31 % (100 µg/cm²) gab.

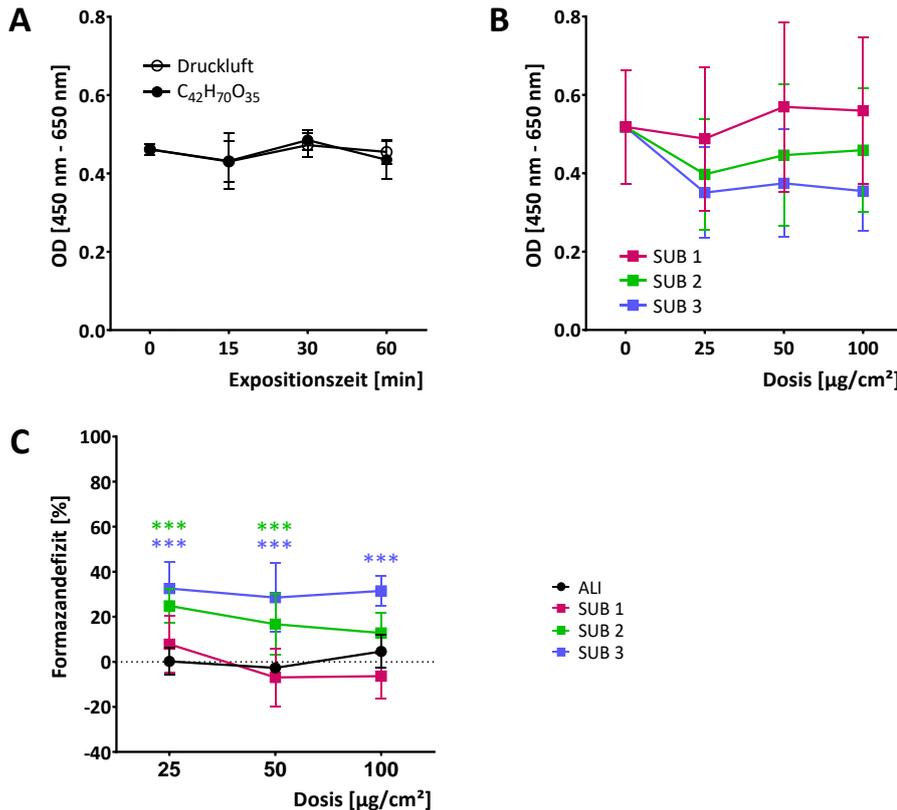


Abbildung 6.27 Exposition der L929-Zellen mit β -Cyclodextrin

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. β -Cyclodextrin für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.3 Kaliumpyrophosphat ($\text{K}_4\text{O}_7\text{P}_2$)

Die OD-Werte bei der ALI Exposition mit Kaliumpyrophosphat unterschieden sich zwischen den druckluft- und substanzexponierten L929-Zellen signifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 6.28A). Während bei zunehmender Expositionszeit von 15 min auf 60 min die OD-Werte der druckluftbehandelten Zellen zwischen 0,4 und 0,5 schwankten und sich nur gering von dem Wert der IK (0,5) unterschieden, sanken die Werte der substanzbehandelten Zellen von 0,3 auf 0,2 ab. Die OD-Werte der SUB Exposition (SUB 1: 0,4-0,5; SUB 2: 0,4; SUB 3: 0,3-0,4) unterschieden sich gering zwischen den einzelnen Bedingungen bzw. zur Kontrolle (0,5) (Abbildung 6.28B). Bezüglich der Formazanbildung zeigten sich zwischen der ALI Exposition und allen drei Bedingungen der SUB Exposition jeweils signifikante Unterschiede (Abbildung 6.28C). Die aus der ALI Exposition berechneten Werte waren verglichen mit denen der SUB Exposition bei allen untersuchten Dosen höher. Sie stiegen mit Zunahme der Dosis von 39 % (25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf 65 % (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) an. Zugleich nahmen die Werte aus der SUB Exposition von 8,5 % auf Null (SUB 1) bzw. von 22 % auf 9 % (SUB 2) ab.

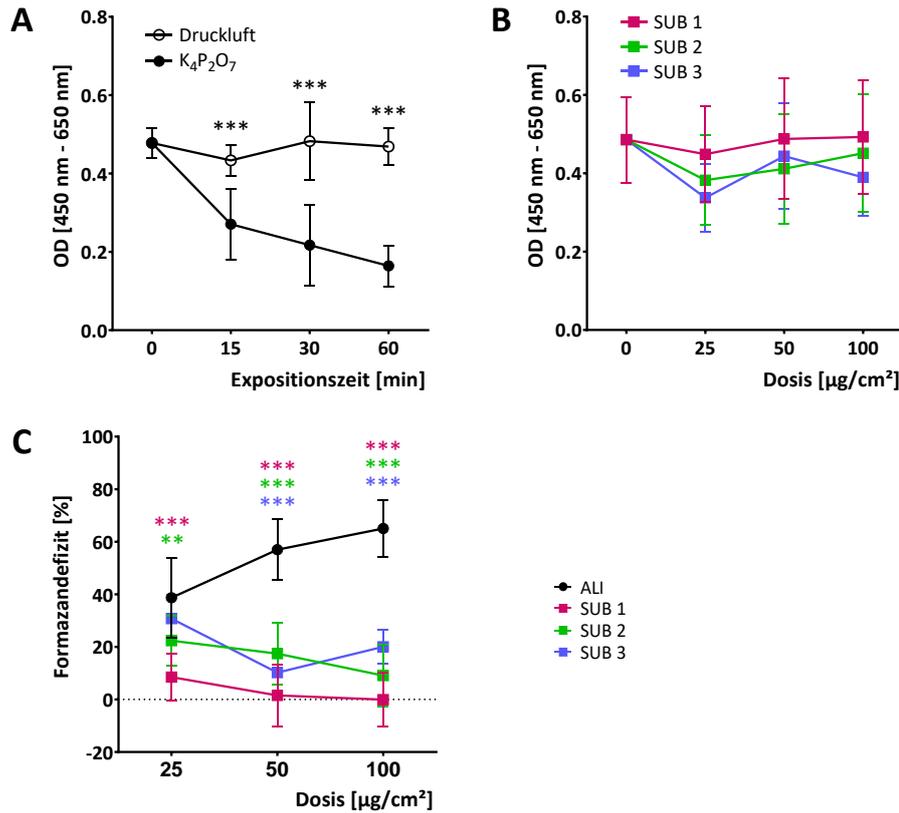


Abbildung 6.28 Exposition der L929-Zellen mit Kaliumpyrophosphat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Kaliumpyrophosphat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 µg/cm² = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Kaliumpyrophosphat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.4 Kupfer-II-hydroxid (Cu(OH)₂)

Die Kurvenverläufe der OD-Werte von den mit Druckluft und mit Kupfer-II-hydroxid behandelten L929-Zellen in der ALI Exposition waren unterschiedlich (Abbildung 6.29A). Die Werte gleicher Expositionszeit wichen signifikant voneinander ab ($p < 0,001$). Bei den substanzexponierten Zellen sanken die Werte mit zunehmender Expositionsdauer auf den Wert Null (60 min) ab. Im Gegensatz dazu waren die Werte der druckluftexponierten Zellen dem Wert der IK (0,4) gleichzusetzen. Mit zunehmender Dosis nahmen die OD-Werte der einzelnen submersen Bedingungen ab, wobei es Unterschiede in den Kurvenverläufen gab (Abbildung 6.29B). Bei der SUB 1 waren die Zellen metabolisch inaktiv. Die Werte der SUB 2 und der SUB 3 fielen mit zunehmender Dosis ab, wobei die Werte der SUB 3 niedriger waren als bei der SUB 2. Die Formazanbildung aus den beiden verschiedenen Expositionsverfahren und den statistischen Signifikanzen ist in Abbildung 6.29C dargestellt. Während sich die einzelnen Werte sowohl bei der niedrigen als auch der mittleren Dosis voneinander unterschieden, konvergierten sie bei der höchsten Dosis. Bei der Dosis 25 µg/cm² und

50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ waren die Werte der ALI Exposition niedriger als bei der SUB 1, aber höher als bei der SUB 2 und der SUB 3.

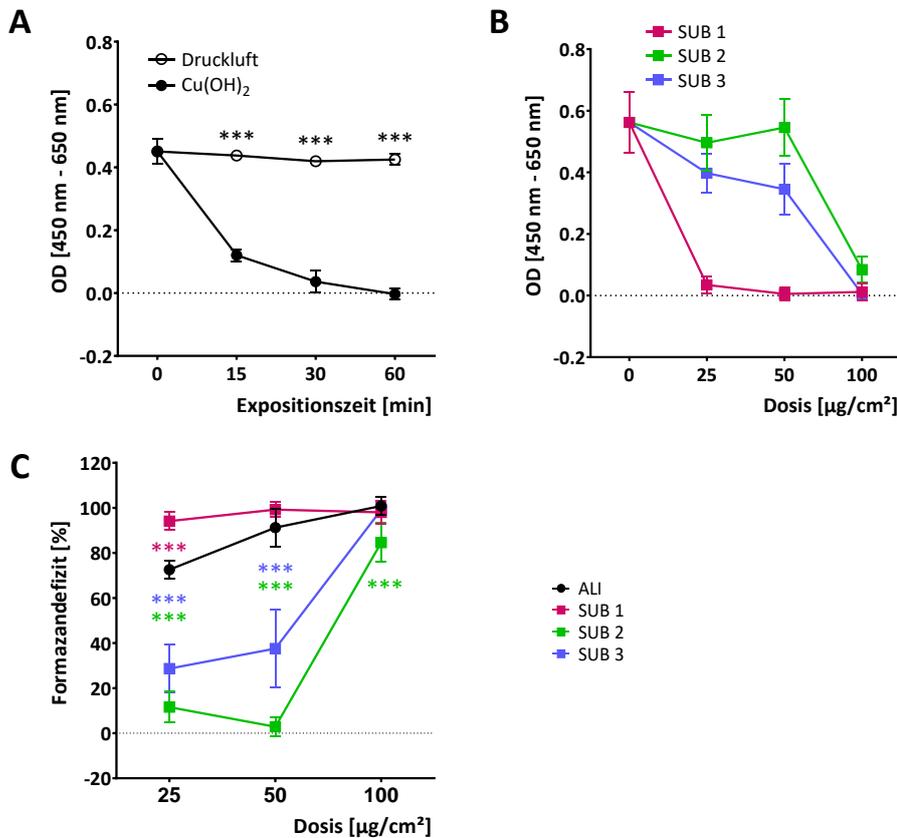


Abbildung 6.29 Exposition der L929-Zellen mit Kupfer-II-hydroxid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Kupfer-II-hydroxid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min → 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min → 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Kupfer-II-hydroxid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.5 Natriummetavanadat (NaVO_3)

Zwischen den OD-Werten, die aus der ALI Exposition mit Natriummetavanadat bei druckluft- und substanzbehandelten L929-Zellen ermittelt wurden, waren die Unterschiede jeweils bei den gleichen Expositionszeiten signifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 6.30A). Für die mit der Druckluft behandelten Zellen waren die Werte (0,54-0,56) gleich dem Wert der IK (0,56). Im Vergleich dazu sanken die Werte der substanzexponierten Zellen mit zunehmender Expositionszeit von 0,14 (15 min) auf den Wert Null (60 min) ab. Die Kurven der einzelnen submersen Bedingungen verliefen parallel und die OD-Werte sanken mit zunehmender Dosis (Abbildung 6.30B). Die Werte fielen vom Wert der IK (0,5) auf 0,1 (SUB 2, SUB 3) bzw. auf Null (SUB 1) bei der höchsten Dosis (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ab. Der Vergleich der Formazanbildung aus beiden Expositionsverfahren zeigt, dass die ALI Exposition und die

SUB 1 annäherungsweise gleich und nicht signifikant waren (Abbildung 6.30C). Bei der SUB 2 und der SUB 3 waren die Werte der jeweiligen Dosis im Vergleich zur ALI Exposition geringer und signifikant verschieden ($p < 0,001$).

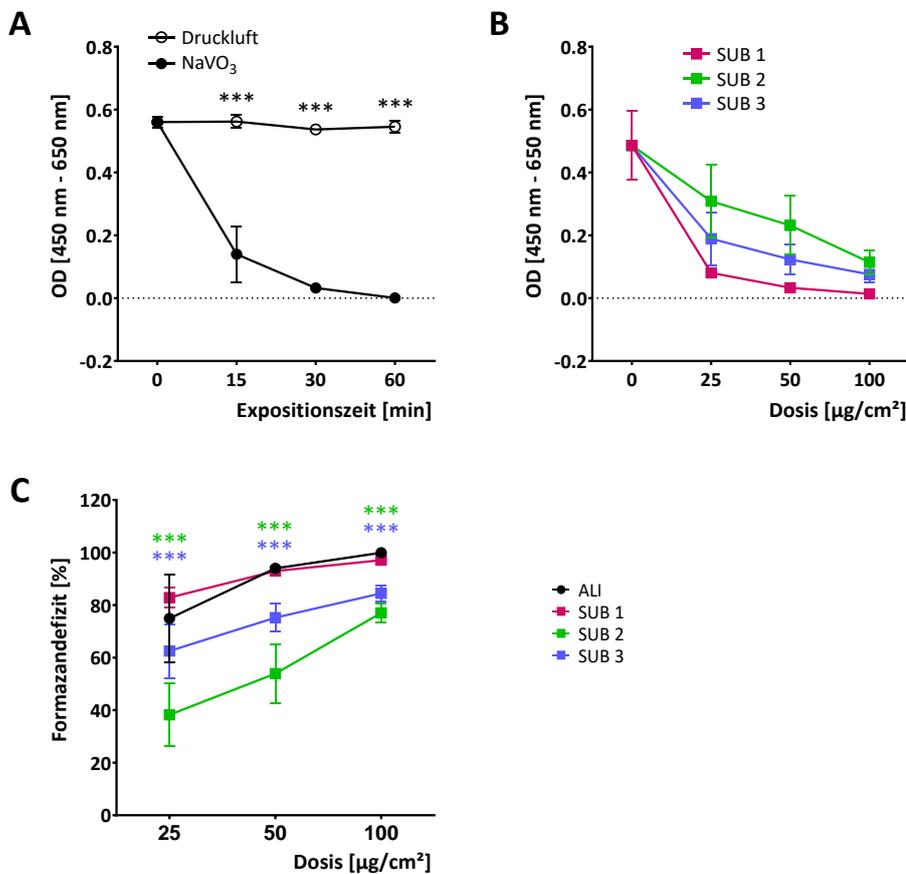


Abbildung 6.30 Exposition der L929-Zellen mit Natriummetavanadat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Natriummetavanadat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 µg/cm² = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Natriummetavanadat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.6 Natrium-N-lauroylsarcosinat (C₁₅H₂₈NO₃Na)

Bei der ALI Exposition mit Natrium-N-lauroylsarcosinat waren die Unterschiede der OD-Werte zwischen den druckluft- und substanzbehandelten L929-Zellen signifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 6.31A). Die Werte der für unterschiedliche Zeiten mit Druckluft exponierten Zellen waren dem Wert der IK (0,55) gleich. Im Vergleich dazu waren die Differenzen der Werte zwischen den substanzexponierten Zellen und der IK deutlich größer. Hier sanken die Werte auf nahezu Null (15 min: 0,05 zu 60 min: 0,01) ab. Im submersen Expositionsverfahren nahmen die OD-Werte mit der Dosis ab (Abbildung 6.31B). Ausgehend vom Wert der Kontrolle (0,6) fielen mit Zunahme der Dosis die

Werte der SUB 1 und SUB 3 beinahe gleich stark auf den Wert Null ab. Hingegen sanken die OD-Werte bei der SUB 2 erst ab der mittleren Dosis (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf Null ab. Die Formazanbildung der ALI Exposition und der SUB Exposition wurde in der Abbildung 6.31C zusammengefasst. Zwischen den Werten der ALI Exposition und allen drei submersen Bedingungen gab es signifikante Unterschiede bei der 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Dosis. Die Werte bei den drei SUB Expositionen schwankten zwischen 95 % und 101 % bei der höchsten Dosis (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) und waren damit vergleichbar mit dem Wert aus der ALI Exposition. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Verfahren war, dass in der ALI Exposition bereits bei den Dosis 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ein Wert von 90 % bzw. 95 % berechnet wurde. Die Partikelexposition an dem ALI schien einen höheren Einfluss auf die Zellaktivität im Vergleich zur Exposition mit substanzhaltigen Medien, besonders bei 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, zu haben.

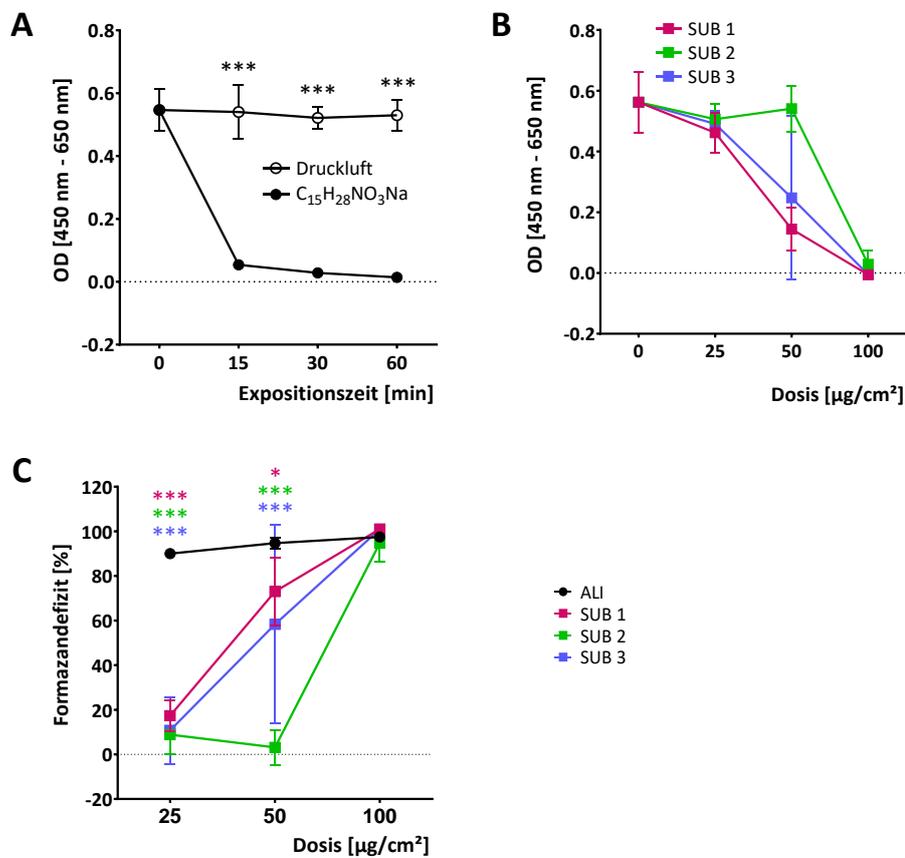


Abbildung 6.31 Exposition der L929-Zellen mit Natrium-N-lauroylsarcosinat

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Natrium-N-lauroylsarcosinat für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Natrium-N-lauroylsarcosinat-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.7 Neodymoxid (Nd_2O_3)

In der ALI Exposition mit Neodymoxid gab es für die OD-Werte bei gleicher Expositionszeit zwischen druckluft- und substanzexponierten L929-Zellen signifikante Unterschiede (Abbildung 6.32A). Für die druckluftexponierten Zellen lagen die Werte mit 0,5 bis 0,6 etwas höher als der Wert der IK (0,5). Bei den mit Neodymoxid behandelten Zellen sanken die Werte auf 0,3 (60 min) ab. Die OD-Werte der exponierten Zellen aus den drei submersen Bedingungen waren im Kurvenverlauf unterschiedlich (Abbildung 6.32B). Die Werte der SUB 1 und SUB 2 verliefen zueinander kongruent und sanken von 0,2 ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf 0,1 ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ab. Im Gegensatz dazu schwankten die Werte der SUB 3 zwischen 0,3 und 0,4. Die Zellen wurden mit Neodymoxid in zwei verschiedenen Expositionsverfahren behandelt (Abbildung 6.32C). Dabei hatte die Substanz in beiden Verfahren Auswirkung auf die Zellvitalität, die über die Formazanbildung ermittelt wurde. Diese schien von der Darreichungsform der Substanz (Staubpartikel bzw. dispergiert in Medium) unabhängig zu sein. Zwischen den Werten der ALI und der SUB Exposition gab es Unterschiede, die z.T. signifikant waren. Die durch Neodymoxid bedingten Formazandefizite waren bei jeweils gleicher Dosis bei der SUB 1 und der SUB 2 höher, bei der SUB 3 niedriger als bei der ALI Exposition.

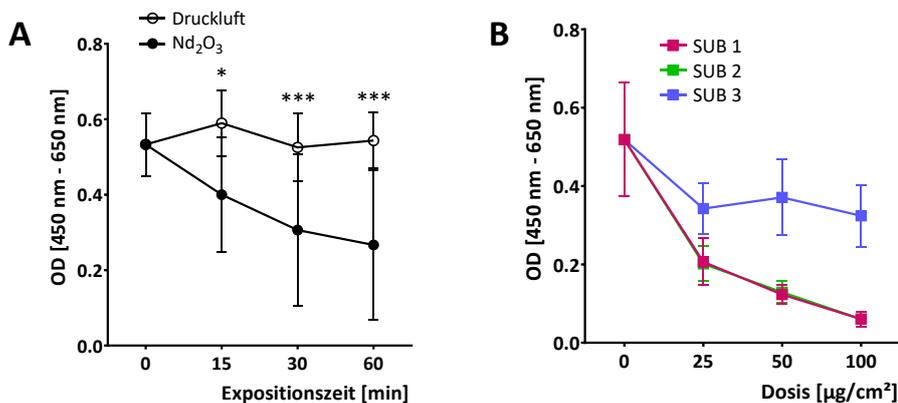


Abbildung 6.32 (Teil 1) Exposition der L929-Zellen mit Neodymoxid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Neodymoxid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Neodymoxid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

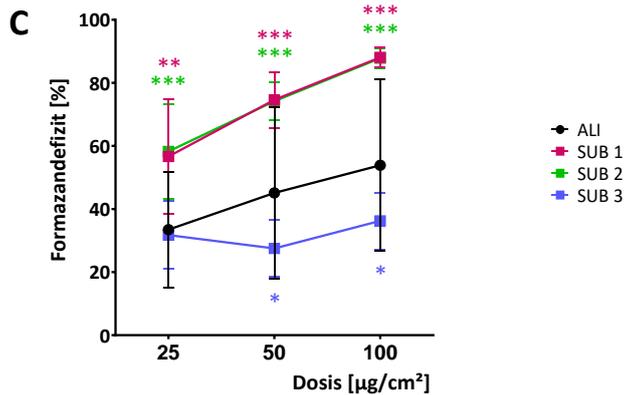


Abbildung 6.32 (Teil 2) Exposition der L929-Zellen mit Neodymoxid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Neodymoxid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Neodymoxid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.8 Siliziumdioxid (SiO_2)

In der ALI Exposition unterschieden sich die ermittelten OD-Werte der druckluft- und substanz-exponierten L929-Zellen gleicher Expositionszeit z.T. signifikant voneinander (Abbildung 6.33A). Ausgehend vom Wert der IK (0,5) schwankten die Werte der druckluftbehandelten Zellen zwischen 0,4 (30 min) und 0,5 (60 min). Die Werte der mit Siliziumdioxid behandelten Zellen nahmen mit zunehmender Expositionszeit verglichen zur IK um etwa 30 % auf 0,35 (60 min) ab. Die Kurvenverläufe der OD-Werte der SUB Exposition waren ähnlich, denn bei allen Bedingungen sanken diese mit Zunahme der Dosis ab (Abbildung 6.33B). Die Werte waren bei der SUB 1 und der SUB 2 annähernd gleich. Merklich niedriger waren die Werte der SUB 3, denn hier sanken diese auf 0,3 (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). In Abbildung 6.33C wurden die Werte zur Formazanbildung in Abhängigkeit der Dosis dargestellt. Die Werte der ALI und der SUB Exposition unterschieden sich, wobei der Kurvenverlauf nahezu parallel war. Die durch Siliziumdioxid bedingten Formazandefizite waren bei der SUB 3 höher, bei der SUB 1 und der SUB 2 niedriger als bei der ALI Exposition.

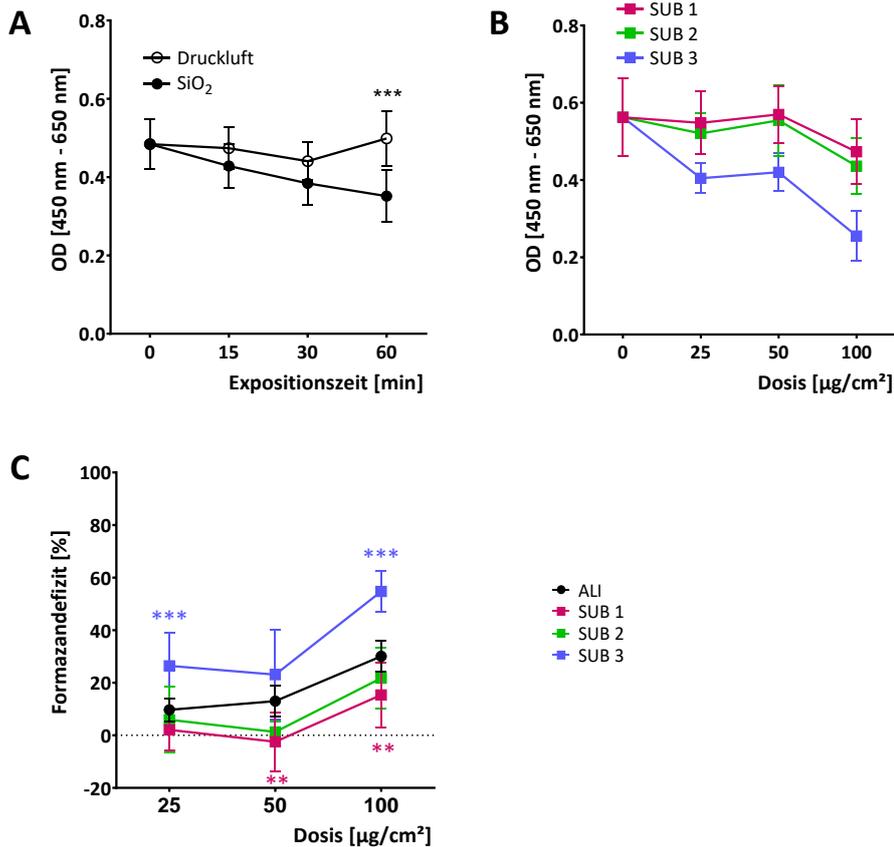


Abbildung 6.33 Exposition der L929-Zellen mit Siliziumdioxid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Siliziumdioxid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 µg/cm² = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus vier (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Siliziumdioxid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.9 Tetraacetylethylendiamin (C₁₀H₁₆N₂O₄)

Im Expositionsverfahren mit Tetraacetylethylendiamin an dem ALI war der Kurvenverlauf der OD-Werte der druckluft- und substanzexponierten L929-Zellen kongruent (Abbildung 6.34A). Die OD-Werte blieben bei zunehmender Expositionszeit konstant zwischen 0,49 und 0,51 (Druckluft) bzw. 0,47 und 0,51 (Tetraacetylethylendiamin). Sie waren nur gering unter dem Wert der IK (0,55). Bei der SUB Exposition verliefen die Absorptionskurven parallel zueinander (Abbildung 6.34B). Im Vergleich zum Wert der Kontrolle (0,5) lagen die Werte der SUB 1 (0,4-0,5), SUB 2 (0,4) und SUB 3 (0,3-0,4) nur gering darunter. Der Vergleich der Formazandefizite aus beiden Expositionsverfahren zeigte signifikante Differenzen (Abbildung 6.34C). Die ermittelten Werte aus der ALI Exposition waren deutlich geringer als die der drei Bedingungen der SUB Exposition. Es schien einen Einfluss zu haben, ob die Substanz als Partikelstaub (ALI) oder in Medium dispergiert (SUB) die L929-Zellen erreichte. Während bei der ALI Exposition das Formazandefizit einen maximalen Wert von 3 %

hatte, waren die Werte der SUB Exposition z.T. zehnfach höher. Zugleich schien es, dass bei den SUB Expositionen das verwendete Medium einen Einfluss auf die Werte hatte. Die Werte der SUB 3, bei der die Substanz in EM dispergiert wurde, waren höher als die der SUB 1 und der SUB 2, bei denen jeweils Kulturmedium verwendet wurde.

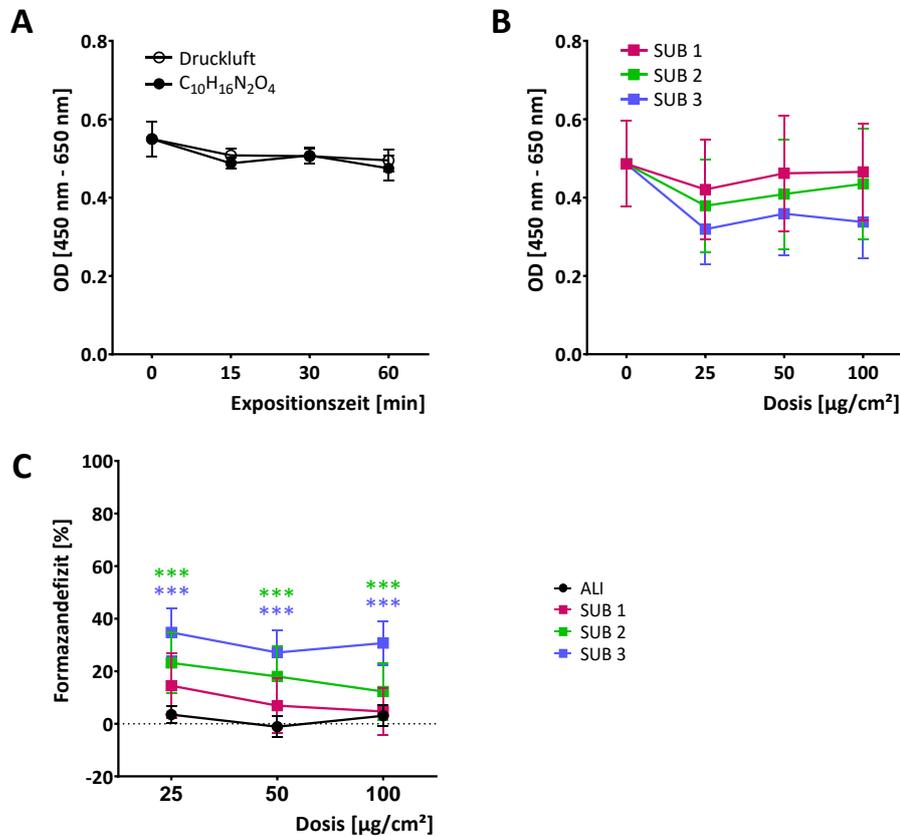


Abbildung 6.34 Exposition der L929-Zellen mit Tetraacetylethylendiamin

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Tetraacetylethylendiamin für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 µg/cm² = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.10 Tetrabromphthalsäureanhydrid (C₈Br₄O₃)

Bei der ALI Exposition unterschieden sich die OD-Werte signifikant ($p < 0,001$) zwischen den druckluft- und substanzexponierten L929-Zellen (Abbildung 6.35A). Die Werte der mit Tetrabromphthalsäureanhydrid exponierten Zellen verringerten sich mit Zunahme der Expositionszeit von 0,3 (15 min) auf 0,1 (60 min). Bei der SUB Exposition fielen die gleichlaufenden Kurven der Absorption der einzelnen Bedingungen ab (Abbildung 6.35B). Zwischen den einzelnen Bedingungen unterschieden sich die Werte der Absorption. Das Absinken der Werte der SUB 1 (von 0,44 auf 0,32) waren im Vergleich zur SUB 2 (0,37 auf 0,30) bzw. zur SUB 3 (0,34 auf 0,25) am höchsten. Die Formazandefizite beider Expositionsverfahren unterschieden sich (z.T. signifikant) bei der vergleichenden

Darstellung (Abbildung 6.35C). Die Werte aus der ALI Exposition waren bei allen Dosen über den Werten der SUB Exposition. Die Darreichungsform der Substanz schien bei der Exposition einen Einfluss auf die Vitalität der L929-Zellen zu haben. Die Exposition mit Staubpartikeln an dem ALI bedingte ein höheres Formazandefizit als bei der Exposition mit substanzhaltigen Medien. Beim Vergleich der submersen Bedingungen untereinander zeigten sich Unterschiede. Während bei der SUB 1 das substanzhaltige Medium für 24 h auf den Zellen verblieb, wurde es bei der SUB 2 und der SUB 3 nach kürzeren Zeiträumen (15 min, 30 min, 60 min) wieder entfernt.

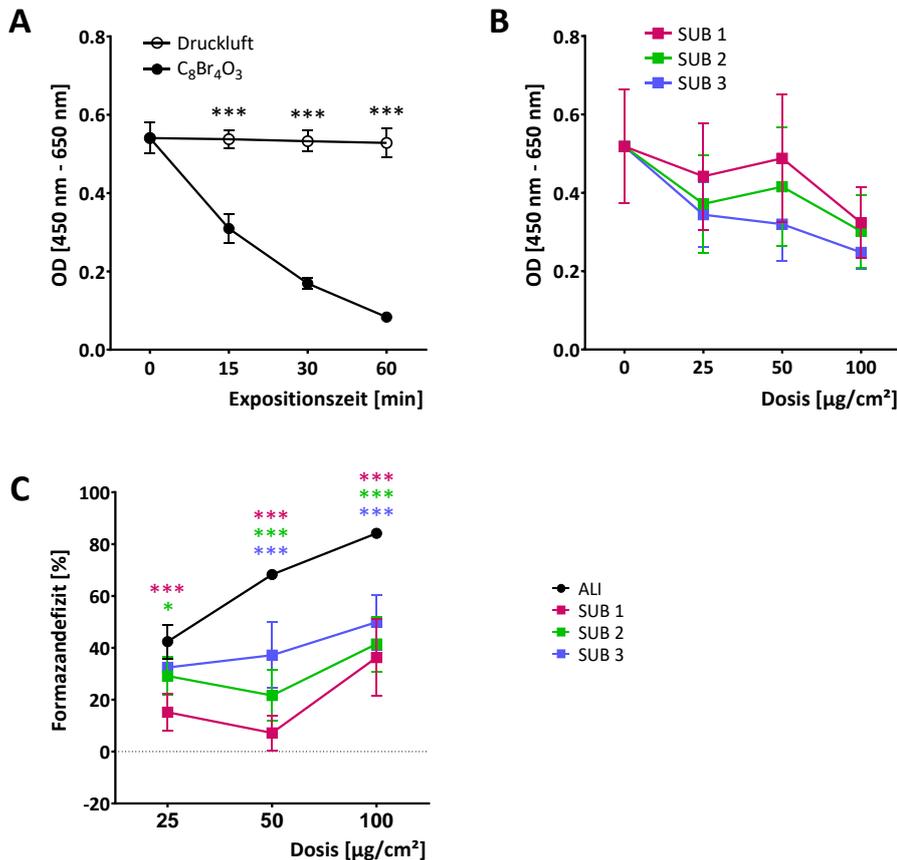


Abbildung 6.35 Exposition der L929-Zellen mit Tetrabromphthalsäureanhydrid

(A) OD-Werte nach ALI Exposition mit Druckluft bzw. Tetrabromphthalsäureanhydrid für 15 min, 30 min und 60 min (0 min = IK). (B) OD-Werte nach SUB Exposition mit substanzhaltigem Medium (0 µg/cm² = Kontrolle); SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). (C) Formazandefizite bei ALI und SUB. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus drei (ALI) und vier (SUB) unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen berechnet mit two-way ANOVA (Post-Hoc-Test nach Bonferroni). Signifikanzen beziehen sich auf die Werte (A) bei gleicher Expositionszeit zwischen den druckluft- bzw. Tetrabromphthalsäureanhydrid-exponierten Zellen, (C) bei gleicher Dosis zwischen SUB und ALI.

6.3.11 Zusammenfassung der submersen Expositionen mit zehn weiteren Substanzen

Im Folgenden werden die Ergebnisse weiterer Expositionsversuche mit L929-Zellen beschrieben. Die Zellen wurden dabei ausschließlich mit Substanzen im submersen Verfahren exponiert. Die Formazandefizite der submersen Bedingungen sind in den Abbildungen gezeigt. Versuche mit ähnlichen Kurvenverläufen der Formazanwerte wurden zusammengefasst.

Bei der SUB Exposition der L929-Zellen mit Cetylpyridiniumchlorid bzw. Zinkdimethyldithiocarbamat waren die jeweiligen berechneten Werte der Formazandefizite unabhängig der Dosis zwischen 98 % und 103 % (Abbildung 6.36A bis B). Ausnahme war der Wert (85 %), der bei der SUB 3 mit Zinkdimethyldithiocarbamat ermittelt wurde. Bei den jeweiligen submersen Versuchsdurchführungen hatten die Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen (Medium, Expositionszeit) keinen Einfluss.

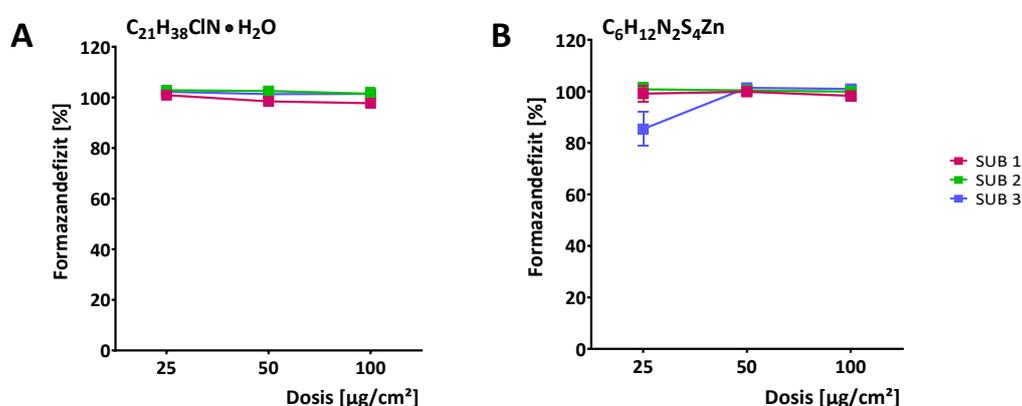


Abbildung 6.36 SUB Exposition der L929-Zellen mit Cetylpyridiniumchlorid bzw. Zinkdimethyldithiocarbamat

Formazandefizite bei SUB Exposition (substanzhaltiges Medium) mit (A) Cetylpyridiniumchlorid bzw. (B) Zinkdimethyldithiocarbamat bei 25 µg/cm², 50 µg/cm² und 100 µg/cm² (0 µg/cm² = Kontrolle). SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus vier unabhängigen Versuchen.

Die bei der SUB Exposition mit Kupfer-II-oxid (nano) ermittelten Formazandefizite stiegen mit zunehmender Dosis an (Abbildung 6.37A). Die Kurven der einzelnen Bedingungen verliefen nahezu parallel. Zudem waren sich die Werte im Anstieg von der Dosis 25 µg/cm² zu 100 µg/cm² ähnlich: SUB 1: 84 % auf 96 %; SUB 2: 72 % auf 95 %; SUB 3: 65 % auf 91 %. Bei der SUB 1 verblieb die Substanz für 24 h auf den Zellen. Hingegen wurden die Medien bei der SUB 2 und der SUB 3 nach drei unterschiedlichen Zeiträumen (15 min, 30 min, 60 min) wieder von den Zellen abgenommen. Bei der SUB Exposition mit Kupfer-II-sulfat war ebenfalls mit zunehmender Dosis ein Anstieg der Formazandefizite ermittelt worden (Abbildung 6.37B). Während bei den Werten der SUB 1 ein steiler Anstieg von 22 % (25 µg/cm²) auf 99 % (50 µg/cm² bzw. 100 µg/cm²) erkennbar war, war der Anstieg bei der SUB 2 sehr flach 12 % (25 µg/cm²) auf 16 % (100 µg/cm²). Bei der SUB 3 stiegen die Werte von 26 % (25 µg/cm²) nach absinken auf 18 % (50 µg/cm²) auf 76 % (100 µg/cm²) an. Beim

Vergleich der Werte schien die Unterschiede der einzelnen SUB Expositionen einen Einfluss auf den Kurvenverlauf zu haben.

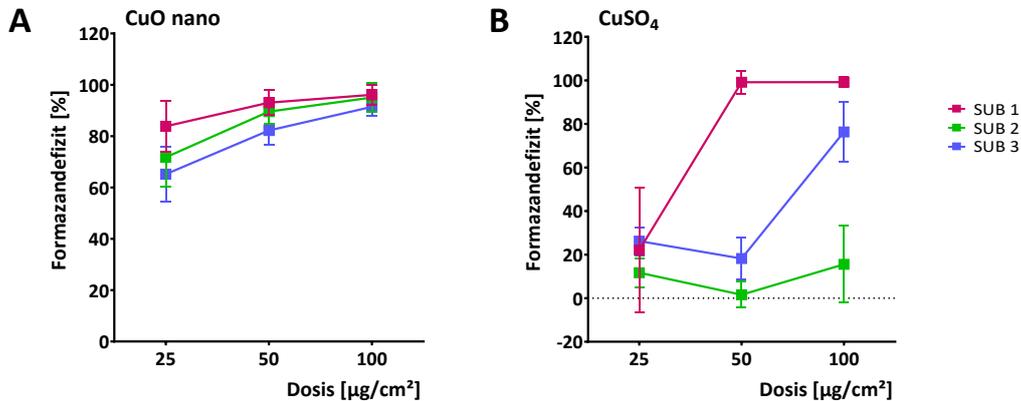


Abbildung 6.37 SUB Exposition der L929-Zellen mit Kupfer-II-oxid (nano) bzw. Kupfer-II-sulfat

Formazandefizite bei SUB Exposition (substanzhaltiges Medium) mit (A) Kupfer-II-oxid (nano) bzw. (B) Kupfer-II-sulfat bei 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ = Kontrolle). SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Versuchen.

Die Kurvenverläufe der Formazandefizite, die in den submersen Versuchen mit den Substanzen di-Ammoniumphosphat, D(+)-Laktose Monohydrat, Natriumfluorophosphat, Wolfram-IV-carbid und Wolfram-IV-carbid (nano) ermittelt wurden, ähnelten sich zwar, unterschieden sich aber in der Höhe der einzelnen Werte (Abbildung 6.38A bis E). Keiner der Werte lag über 39 %. Gemeinsam war allen Versuchen, dass das Formazandefizit unabhängig von der Dosis bei der SUB 3 am höchsten war. Am niedrigsten waren die Werte der SUB 1, die z.T. im negativen Bereich lagen.

Die aus den submersen Versuchen mit Vanadium-III-oxid ermittelten Werte zur Formazanbildung hatten einen ähnlichen Verlauf wie die fünf in der Abbildung 6.38A bis E beschriebenen Substanzen (Abbildung 6.38F). Dennoch waren Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen erkennbar. Bei allen Dosen waren die Werte der SUB 3 höher als bei der SUB 2. Mit zunehmender Dosis (25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sanken die Werte der SUB 2 von 34 % auf 20 % ab, wohingegen die Werte der SUB 3 nahezu konstant blieben (34 % zu 33 %). Der Kurven der SUB 1 stiegen von 25 % (25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf 59 % (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) und unterschieden sich von den entsprechenden Kurven in der Abbildung 6.38A bis E.

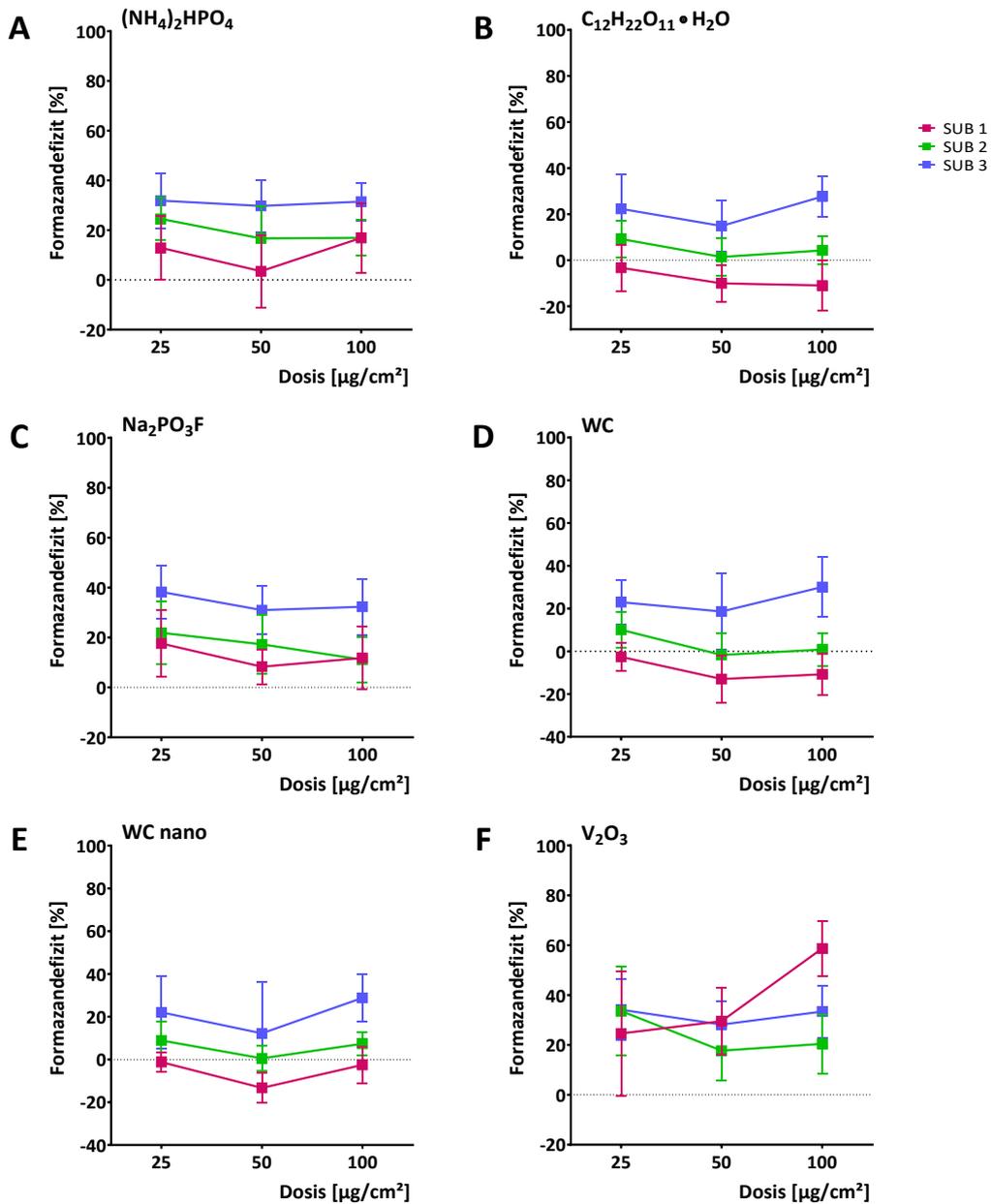


Abbildung 6.38 SUB Exposition der L929-Zellen mit di-Ammoniumphosphat, D(+)-Laktose Monohydrat, Natriumfluorophosphat, Wolfram-IV-carbid, Wolfram-IV-carbid (nano), Vanadium-III-oxid

Formazandefizite bei SUB Exposition (substanzhaltiges Medium) mit (A) di-Ammoniumphosphat, (B) D(+)-Laktose Monohydrat, (C) Natriumfluorophosphat, (D) Wolfram-IV-carbid bzw. (E) Wolfram-IV-carbid (nano), (F) Vanadium-III-oxid bei 25 µg/cm², 50 µg/cm² und 100 µg/cm² (0 µg/cm² = Kontrolle). SUB 1: KM (24 h), SUB 2: KM bzw. SUB 3: EM (Expositionszeit 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm²). Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus vier unabhängigen Versuchen.

7 Diskussion

Inhalationsstudien mit Versuchstieren sind ethisch problematisch und zeit- und/oder kostenintensiv. In den vergangenen Jahren wurden mehrere *in vitro*-Ansätze beschrieben, die als Alternativmethoden eingesetzt werden können/könnten. Diese Ansätze sollen die Zahl der Tierversuche bzw. der eingesetzten Tiere reduzieren. Eine weit verbreitete Praktik ist die SUB Exposition, bei der die Zellen mit einer substanzhaltigen Lösung oder Suspension überschichtet werden. Bei diesem Ansatz wird beanstandet, dass die physiologische Situation in der Lunge bzw. im Atemtrakt nur unzureichend wiedergegeben wird (Fröhlich et al. 2013, Lenz et al. 2009, Paur et al. 2011). Im Gegensatz dazu wird die ALI Exposition als realitätsnäher angesehen. Durch die Deposition der luftgetragenen Partikel auf den Zellen kommt es zum direkten Kontakt zwischen Partikel und Zelloberfläche. Die SUB Exposition als auch die ALI Exposition haben Vor- und Nachteile in der Versuchsdurchführung. In der Literatur sind nur sehr wenige Studien beschrieben, die beide Expositionsmethoden vergleichend untersucht haben. Durch den direkten Vergleich ist es möglich, Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowie Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren genauer zu beschreiben. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien (A549, L929) mit verschiedenen Substanzen mittels der beiden Expositionsmethoden (ALI und SUB Exposition) behandelt. Für die ALI Exposition wurde die Expositionsanlage CULTEX® RFS verwendet.

7.1 Festlegung des „zytotoxischen Schwellenwerts“

Durch die ALI Exposition ist eine direkte Exposition der Zellen mit Partikeln an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen entweder mit reiner Druckluft oder im Luftstrom mit drei verschiedenen Dosen (Partikelmengen) der Testsubstanz exponiert. Es wurde untersucht, ob die partikelfreie Druckluft eine Schädigung der Zellen bewirkte (Kapitel 6.1). Nach 60-minütiger Exposition war die Formazanausbeute der druckluftbehandelten A549-Zellen 3 % niedriger im Vergleich zur IK (Kapitel 6.1, Abbildung 6.4). Bei den L929-Zellen betrug die Verminderung 2 %. Grundlage für die Berechnung der Formazanausbeute waren die nach der Durchführung des Vitalitätstests (WST-1-Assay) gemessenen OD-Werte. Waren die OD-Werte der behandelten Zellen niedriger als die der Kontrolle, zeigte das eine Verringerung der metabolischen Aktivität infolge der Einwirkung der Testsubstanz an. Die Herabsetzung des Stoffwechsels kann als Schädigung der Zellen durch die Testsubstanz interpretiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein „zytotoxischer Schwellenwert“ festgelegt. Dafür wurde der Prozentsatz der Verminderung, d.h. die zellschädigende Auswirkung der Druckluft bei den A549-Zellen, verfünffacht. Nachfolgend wurde eine Substanz als zytotoxisch eingestuft bei der Überschreitung dieses Werts, d.h., wenn das Formazandefizit nach der Exposition mit der Testsubstanz $\geq 15\%$ betrug. Die Höhe des Schwellenwerts wirkte sich auf die Einteilung der Substanzen in (1) Formazandefizit $\geq 15\%$ \rightarrow zytotoxisch im Expositionsverfahren und (2) Formazandefizit $< 15\%$ \rightarrow nicht zytotoxisch im Expositionsverfahren aus. Ebenfalls hat der Wert Einfluss bei der Berechnung von Sensitivität und Spezifität, die für die Vergleichbarkeit der Expositionsverfahren (Kapitel 7.5) bedeutsam sind. Beide Faktoren sind wechselseitig voneinander abhängig. Mit Zunahme des Schwellenwerts sinkt die Sensitivität und steigt die Spezifität. Je höher beide Faktoren sind, desto besser und stabiler ist das Testsystem. Die Festlegung des zytotoxischen Werts erfolgte nach subjektivem Ermessen. Eine Verdopplung oder

Verdreifachung wurde als zu enge, eine Verzehnfachung als zu große Bemessung des Grenzwerts angesehen. Eine Verfünffachung ist daher als Kompromiss anzusehen.

7.2 Gegenüberstellung der Expositionsversuche

7.2.1 *Air liquid interface* Exposition der A549- und L929-Zellen

Bei der ALI Exposition der A549- bzw. L929-Zellen mit zehn ausgewählten Testsubstanzen traten bei den aus den Versuchen berechneten Formazandefiziten zwischen beiden Zelllinien z.T. Unterschiede auf (Abbildung 7.1). Es zeigten sich bei der ALI Exposition mit den Substanzen Kaliumpyrophosphat, Kupfer-II-hydroxid, Natrium-N-lauroylsarcosinat, Tetraacetythyldiamin und Tetrabromphthalsäureanhydrid kaum Unterschiede in der Höhe der Werte zwischen den beiden Zelllinien. Die Formazandefizite lagen annähernd auf der Diagonalen (schwarze Linie). Waren nach Exposition einer Testsubstanz die Formazandefizite bei beiden Zelllinien gleich, lagen die Werte auf der Diagonalen. Bei Werten, die über/links von der Diagonalen lagen, war das Formazandefizit bei den L929-Zellen höher als bei den A549-Zellen. Der Vergleich der Formazandefizite beider Zellen zeigte, dass die Werte bei acht der zehn Testsubstanzen (z.T. sehr gering) über der Diagonalen lagen. Bei den Substanzen Böhmit und β -Cyclodextrin lagen die Werte unter der Diagonalen. Hier war die Beeinträchtigung der Substanzen auf die Zellvitalität der A549-Zellen größer als bei den L929-Zellen.

Bei den Substanzen Böhmit, β -Cyclodextrin, Neodymoxid und Siliziumdioxid unterschieden sich die jeweiligen Werte der Formazandefizite zwischen den A549- und L929-Zellen. Der direkte Vergleich der Werte zeigte, dass sich unter gleichen Expositionsbedingungen einige Substanzen stärker auf die Zellaktivität einer Zelllinie auswirken können. Die Formazandefizite der L929-Zellen nach der ALI Exposition mit Böhmit bzw. β -Cyclodextrin waren bei allen Dosen geringer als bei den A549-Zellen. Die Substanzen schienen auf die Aktivität der L929-Zellen einen geringeren Einfluss zu haben. Der Unterschied wurde bei der höchsten Dosis (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sehr deutlich (Abbildung 7.1C). Hier lagen die Formazandefizite bei 17 % (Böhmit) und 4 % (β -Cyclodextrin) für die L929-Zellen bzw. bei 46 % (beide Substanzen) für die A549-Zellen. Die ALI Expositionen mit Neodymoxid und Siliziumdioxid zeigten ebenfalls Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen den Zellen. Hierbei waren die Formazandefizite der L929-Zellen im Vergleich zu denen der A549-Zellen höher, was auf eine höhere Empfindlichkeit der L929-Zellen schließen lässt.

Für fünf Substanzen lagen die Formazandefizite bei allen Dosen nach der ALI Exposition der beiden Zelllinien $> 15\%$ und folglich über dem festgelegten zytotoxischen Schwellenwert. Drei der Substanzen (Kupfer-II-hydroxid, Natriummetavanadat und Natrium-N-lauroylsarcosinat) wurden als „gesundheitsgefährdend bei Einatmung“ (akute Toxizität (Inhalation)) eingestuft (Kapitel 6, Tabelle 6.1). Das zeigte, dass die Bestimmung der Zytotoxizität nach der ALI Exposition mit A549- und L929-Zellen gut mit der Beurteilung zur akuten Toxizität in den ECHA-Daten übereinstimmt. Für die Substanzen Kaliumpyrophosphat und Tetrabromphthalsäureanhydrid lagen Hinweise für die Gefährdung des Organismus und/oder der Umwelt vor; die gesundheitliche Gefährdung betrifft hierbei aber nicht die Lunge/Inhalation.

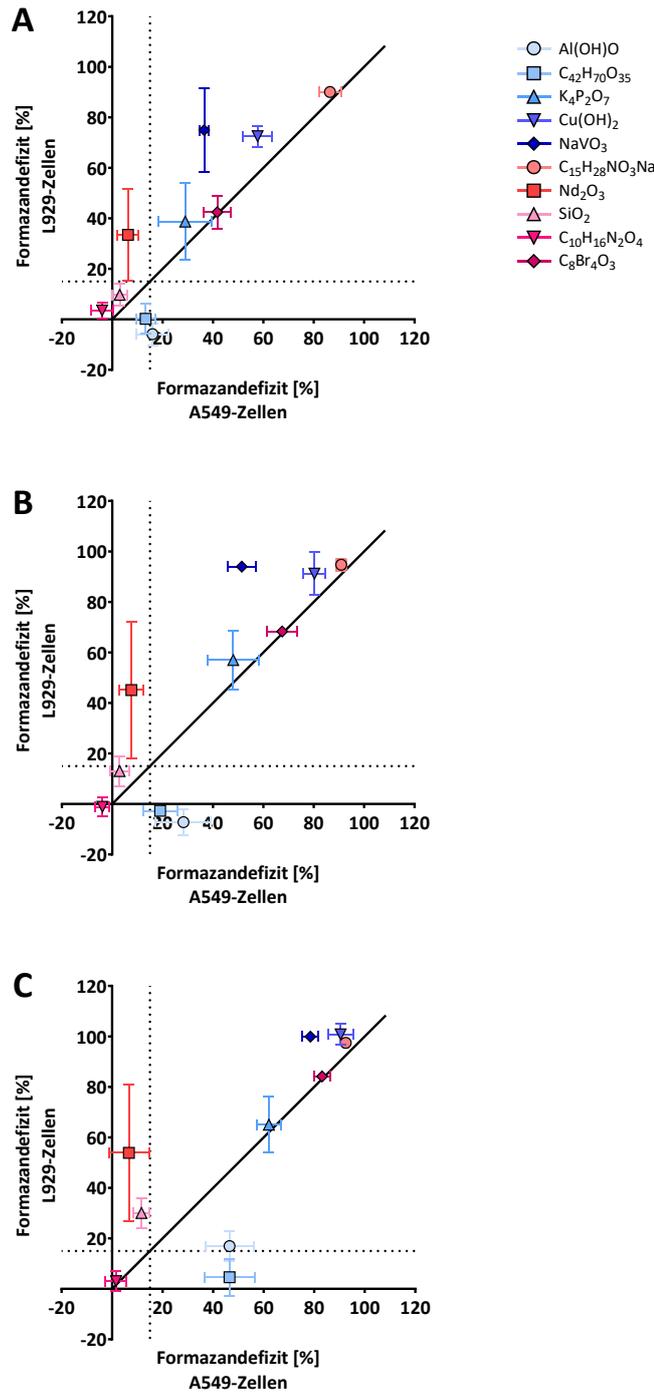


Abbildung 7.1 Formazandefizite nach ALI Exposition der A549- bzw. L929-Zellen mit 10 verschiedenen Substanzen

ALI Exposition der A549-Zellen (X-Achse) und L929-Zellen (Y-Achse) mit der Testsubstanz der Dosis (A) 25 µg/cm², (B) 50 µg/cm², (C) 100 µg/cm² für 24 h. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Die OD-Werte der exponierten Zellen wurden in Relation zu den druckluftbehandelten Zellen gesetzt. Die berechneten Formazandefizite sind Mittelwerte ± SD aus vier bis fünf (A549-Zellen) und vier (L929-Zellen) unabhängigen Versuchen. Die gestrichelte Linie ist der zytotoxische Schwellenwert (15 % Formazandefizit).

7.2.2 *Air liquid interface* Exposition und submerse Expositionsbedingung 1

Bei der ALI Exposition wurden drei Partikeldosen für 24 h auf den Zellen belassen. Um den Einfluss der Darreichungsform zu untersuchen, wurden die Zellen mit der Testsubstanz submers exponiert. Bei der SUB 1 wurden die bei der ALI Exposition untersuchten Partikeldosen in Medium (KM) gegeben und für 24 h auf den Zellen belassen. Die ermittelten Formazandefizite aus den Versuchen zur ALI Exposition und SUB 1 der A549- bzw. der L929-Zellen wurden miteinander verglichen (Abbildung 7.2).

In den Versuchen mit der A549-Zelllinie waren bei der höchsten Dosis ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) die Formazandefizite bei acht der 20 Substanzen unter dem zytotoxischen Schwellenwert bei der ALI Exposition und der SUB 1 (Abbildung 7.2C). Von den sieben der 20 Substanzen, die in beiden Expositionsverfahren über dem zytotoxischen Schwellenwert lagen, waren fünf als „gesundheitsgefährdend bei Inhalation“ eingestuft (Cetylpyridiniumchlorid, Kupfer-II-hydroxid, Natriummetavanadat, Natrium-N-lauroylsarcosinat und Zinkdimethyldithiocarbamat). Für Vanadium-III-oxid lag diese Einstufung nicht vor. Hier war der Wert des Formazandefizits (14 %) geringfügig unter dem festgelegten zytotoxischen Schwellenwert und wurde bei der Exposition mit der Dosis $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (16 %) überschritten (Abbildung 7.2A). Bei der ALI Exposition mit Natrium-N-lauroylsarcosinat lagen die Werte der Formazandefizite (86-92 %) bei allen Partikeldosen deutlich über dem Schwellenwert. Dagegen waren hier die Werte bei der SUB 1 unter (8 % bei $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bzw. über (17 % bei $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) dem Schwellenwert. Bei der SUB 1 mit der höchsten Partikeldosis überschritt das Formazandefizit (99 %) deutlich den Schwellenwert. Bei der höchsten Dosis zeigten die SUB 1 bzw. die ALI Exposition der A549-Zellen eine nahezu gleiche Zellantwort bei sechs der 20 Substanzen, da die Werte der Formazandefizite auf der Diagonalen lagen. Das deutet an, dass keine der beiden Darreichungsformen die metabolische Aktivität der Zellen stärker beeinflusste. Hingegen waren bei zehn Substanzen die Formazandefizite der ALI Exposition höher als bei der SUB 1. Die Exposition der Zellen mit Staubpartikel führte zu einer größeren Beeinträchtigung der Zellvitalität.

Der Vergleich der Formazandefizite der ALI Exposition und der SUB 1 bei L929-Zellen zeigte ein ähnliches Bild wie bei den A549-Zellen. Bei fünf der zehn getesteten Substanzen waren die Formazandefizite bei der Dosis $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach der ALI Exposition höher als bei der SUB 1 (Abbildung 7.2F). Lediglich bei Neodymoxid lagen die Werte bei der ALI Exposition niedriger als bei der SUB 1. Für Neodymoxid sind keine Gefahren für den Organismus und/oder Umwelt beschrieben (Kapitel 6, Tabelle 6.1). Bei allen Dosen lagen hierbei die Formazandefizite sowohl bei der ALI Exposition als auch bei der SUB 1 deutlich über dem zytotoxischen Schwellenwert. Diese Überschreitung trat nur bei den L929-Zellen, nicht aber bei den A549-Zellen auf (Abbildung 7.2). Bei vier Substanzen waren die Werte der Formazandefizite aus beiden Verfahren nahezu gleich. Drei (Kupfer-II-hydroxid, Natriummetavanadat, Natrium-N-lauroylsarcosinat) sind als „gesundheitsgefährdend bei Inhalation“ eingestuft. Die Substanzen führten sowohl bei der ALI Exposition als auch bei der SUB 1 zum Verlust der Zellvitalität (Formazandefizit 100 %).

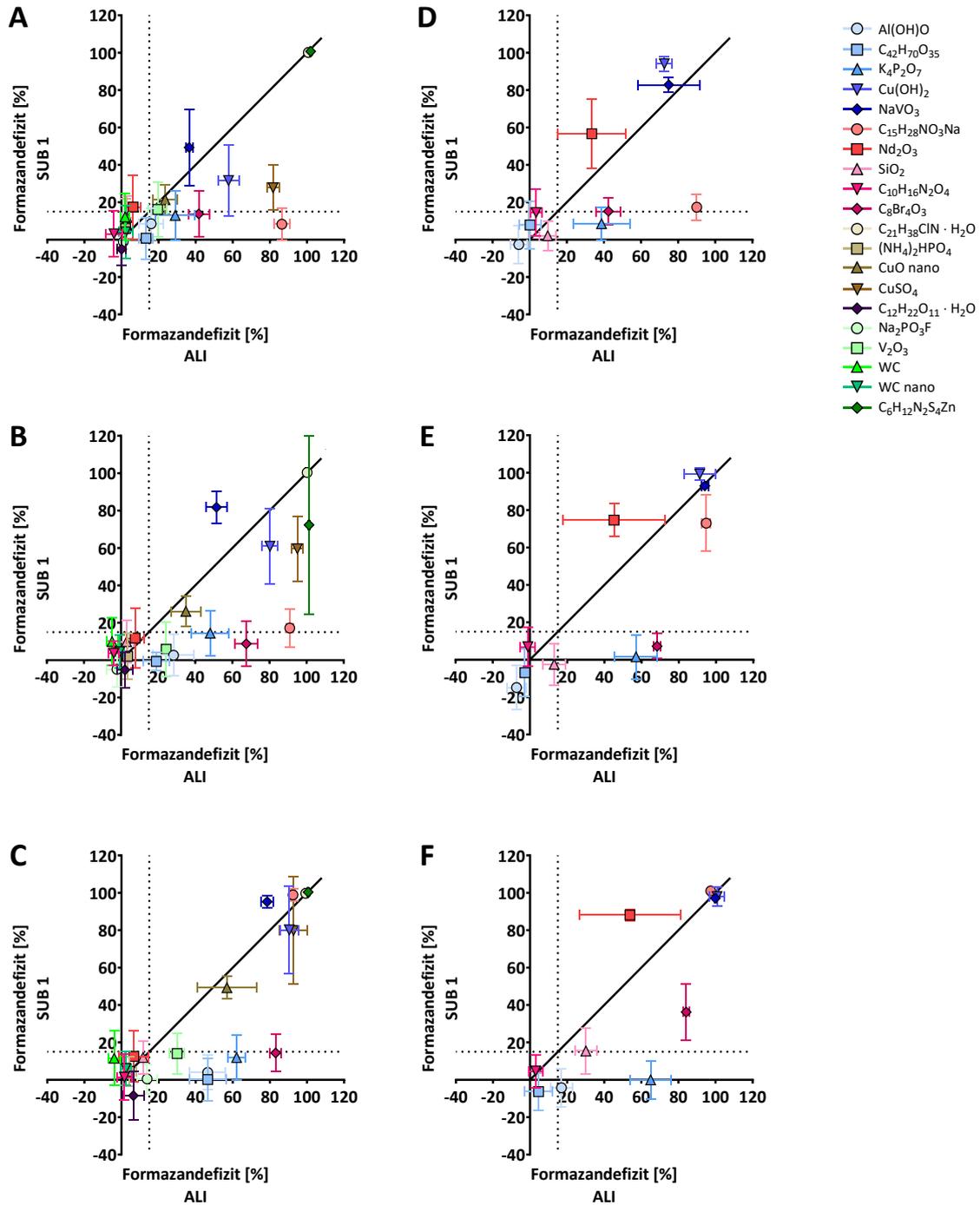


Abbildung 7.2 Formazandefizite nach ALI Exposition bzw. SUB 1 der A549- und L929-Zellen mit verschiedenen Substanzen

A549-Zellen (A-C) und L929-Zellen (D-F) wurden mit Substanzpartikel (ALI, X-Achse) bzw. substanzhaltigem KM (SUB 1, Y-Achse) mit der Dosis (A, D) 25 µg/cm², (B, E) 50 µg/cm², (C, F) 100 µg/cm² für 24 h exponiert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Die OD-Werte der exponierten Zellen wurden in Relation zu den druckluftbehandelten Zellen (ALI) bzw. unbehandelten Zellen (SUB 1) gesetzt. Die berechneten Formazandefizite sind Mittelwerte ± SD aus drei bis fünf (ALI) und vier bis fünf (SUB 1) unabhängigen Versuchen. Die gestrichelte Linie ist der zytotoxische Schwellenwert (15 % Formazandefizit).

7.2.3 *Air liquid interface* Exposition und submerse Expositionsbedingungen 2 und 3

Die SUB 2 und die SUB 3 waren ähnlich der SUB 1. Bei beiden Expositionsbedingungen wurden die Substanzen in Medium gegeben (SUB 2: KM, SUB 3: EM). Der Unterschied zur SUB 1 war, dass das substanzhaltige Medium nach unterschiedlichen Expositionszeiten (15 min, 30 min, 60 min) wieder von den Zellen abgenommen wurde. Der Vergleich der Formazandefizite zwischen der ALI Exposition und der SUB 2 bzw. der SUB 3 der A549-Zellen zeigte, dass bei acht der 20 getesteten Substanzen unabhängig deren Dosen die Werte beider Expositionsverfahren unter dem zytotoxischen Schwellenwert lagen (Abbildung 7.3A bis F). Zudem waren sehr geringe Unterschiede in den einzelnen Werten zwischen der ALI Exposition und den jeweiligen Bedingungen der SUB Exposition zu erkennen. Bei $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zeigten sich keine Differenzen zwischen den Werten der ALI Exposition und der SUB 2 bei Cetylpyridiniumchlorid und Zinkdimethyldithiocarbamat (Abbildung 7.3C) bzw. bei der SUB 3 zusätzlich noch bei Natrium-N-lauroylsarcosinat (Abbildung 7.3F). Bei den anderen Substanzen (SUB 2: 10, SUB 3: 9) waren die Formazandefizite nach der ALI Exposition der A549-Zellen größer als bei den SUB Exposition. Die Exposition mit Staubpartikeln führte im Vergleich zum substanzhaltigen Medium zu einer größeren Beeinträchtigung der Zellvitalität und demnach zu einem höheren Formazandefizit.

Die aus den Expositionsversuchen mit den L929-Zellen ermittelten Formazandefizite für die zehn Testsubstanzen sind in der Abbildung 7.4 dargestellt. Der Vergleich der beiden submersen Expositionsbedingungen zeigte, dass die Formazandefizite bei neun der zehn Substanzen bei der SUB 3 unabhängig der Dosen höher als bei der SUB 2 waren. Lediglich bei der Exposition mit Neodymoxid waren die Werte bei der SUB 2 höher als bei der SUB 3. Für die beiden Substanzen Neodymoxid und Siliziumdioxid wurden keine Gefahren für den Organismus und/oder Umwelt beschrieben (Kapitel 6, Tabelle 6.1). Bei der höchsten Dosis ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) lagen die Formazandefizite der ALI Exposition und der SUB 2 bzw. SUB 3 mit den beiden Substanzen über dem zytotoxischen Schwellenwert (Abbildung 7.4C und F). Der Schwellenwert wurde bei der Exposition mit Neodymoxid ebenfalls bei den beiden geringeren Dosen überschritten (Abbildung 7.4A bis B, D bis E). Da für Neodymoxid keine gesundheitlichen Gefahren bei Inhalation beschrieben wurden, ist von einem falsch positiven Ergebnis auszugehen. Die Formazandefizite der als „gesundheitsgefährdend bei Inhalation“ eingestuft Substanzen (Kupfer-II-hydroxid, Natriummetavanadat, Natrium-N-lauroylsarcosinat) lagen bei den beiden SUB Expositionen und bei der ALI Exposition deutlich über dem Schwellenwert.

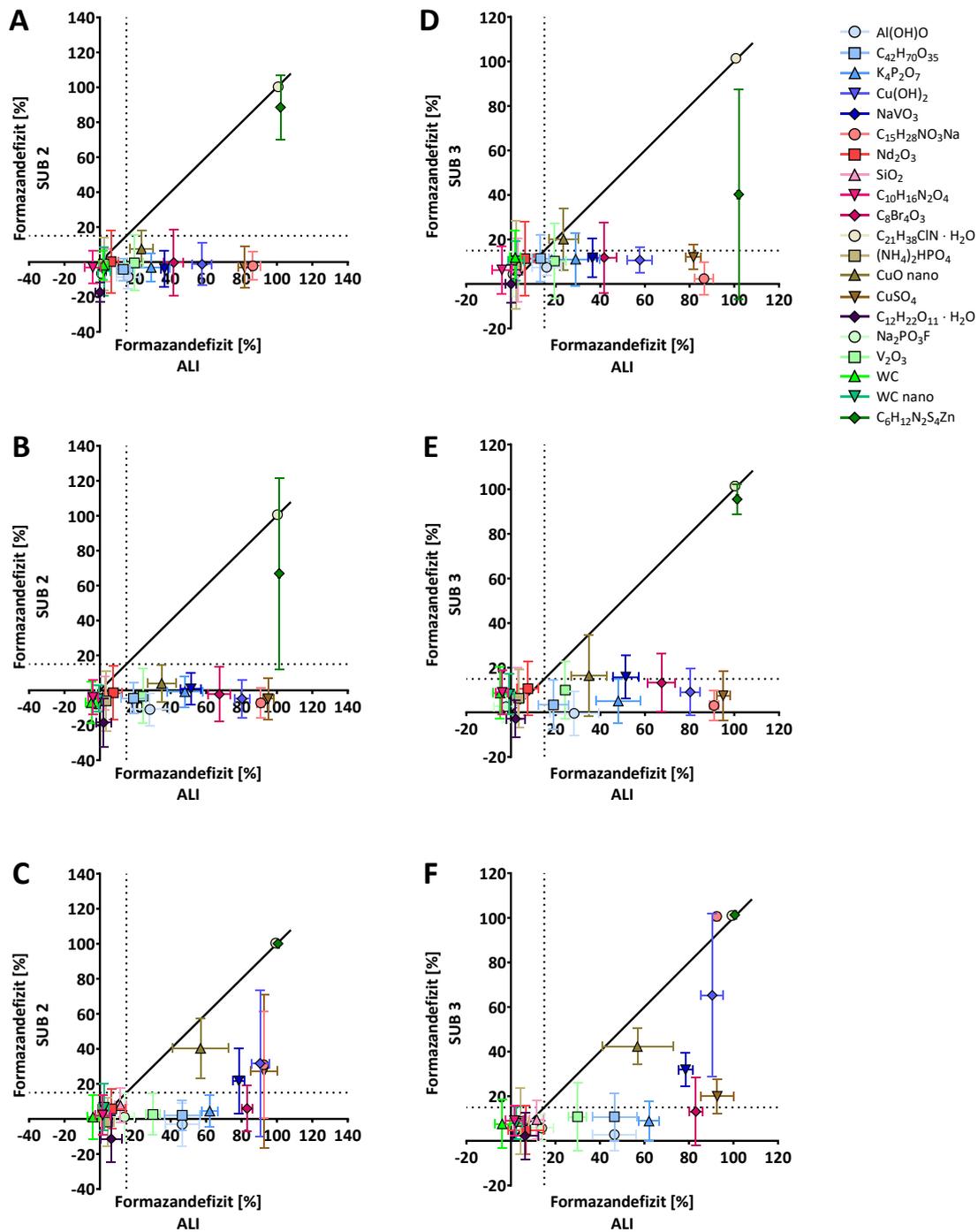


Abbildung 7.3 Formazandefizite nach ALI Exposition bzw. SUB 2 oder SUB 3 der A549-Zellen mit 20 verschiedenen Substanzen

A549-Zellen wurden mit Substanzpartikel (ALI, X-Achse) bzw. substanzhaltigem KM (SUB 2, Y-Achse, A bis C) oder substanzhaltigem EM (SUB 3, Y-Achse, D bis F) mit der Dosis (A, D) 25 µg/cm², (B, E) 50 µg/cm², (C, F) 100 µg/cm². Die Expositionszeit betrug bei ALI: 24 h bzw. bei SUB 2 und SUB 3: 15 min → 25 µg/cm², 30 min → 50 µg/cm², 60 min → 100 µg/cm². Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Die OD-Werte der exponierten Zellen wurden in Relation zu den druckluftbehandelten Zellen (ALI) bzw. unbehandelten Zellen (SUB 2, SUB 3) gesetzt. Die berechneten Formazandefizite sind Mittelwerte ± SD aus drei bis fünf (ALI) und vier bis fünf (SUB 2 bzw. SUB 3) unabhängigen Versuchen. Die gestrichelte Linie ist der zytotoxische Schwellenwert (15 % Formazandefizit).

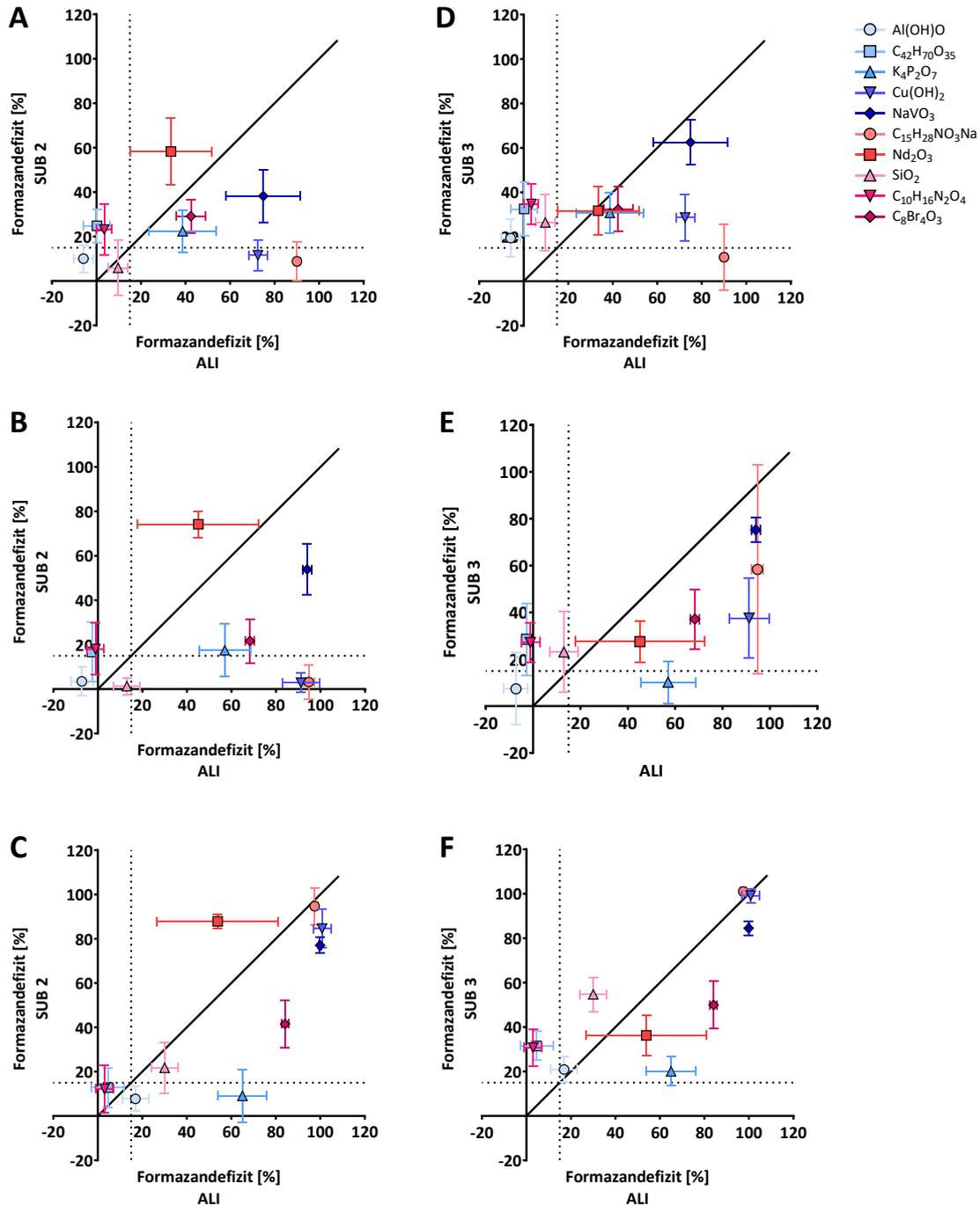


Abbildung 7.4 Formazandefizite nach ALI Exposition bzw. SUB 2 oder SUB 3 der L929-Zellen mit 10 verschiedenen Substanzen

L929-Zellen wurden mit Substanzpartikel (ALI, X-Achse) bzw. substanzhaltigem KM (SUB 2, Y-Achse, A bis C) oder substanzhaltigem EM (SUB 3, Y-Achse, D bis F) mit der Dosis (A, D) 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, (B, E) 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, (C, F) 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die Expositionszeit betrug bei ALI: 24 h bzw. bei SUB 2 und SUB 3: 15 min \rightarrow 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 30 min \rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 60 min \rightarrow 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem WST-1-Assay. Die OD-Werte der exponierten Zellen wurden in Relation zu den druckluftbehandelten Zellen (ALI) bzw. unbehandelten Zellen (SUB 2, SUB 3) gesetzt. Die berechneten Formazandefizite sind Mittelwerte \pm SD aus drei bis vier (ALI) und vier (SUB 2 bzw. SUB 3) unabhängigen Versuchen. Die gestrichelte Linie ist der zytotoxische Schwellenwert (15 % Formazandefizit).

7.3 Eigenarten der Zelllinien

Zellulär basierte Modelle hängen vom Zelltyp ab. Humane Zellen, die vorzugsweise aus dem Atemtrakt stammen, schienen für die Untersuchung im Bereich der Inhalationstoxikologie am nächsten an der realen Situation zu sein (Hiemstra et al. 2018). Bei den meisten der heute in Zellkulturlaboren verwendeten Zelllinien handelt es sich um entartete Zellen, die aus Tumorgeweben entnommen und als Zelllinie etabliert wurden (Schmitz 2011). Im Vergleich zu ‚gesunden‘ Zellen unterscheiden sie sich in ihrem Zellzyklus/-abläufen, haben meist eine veränderte Morphologie und nur noch wenige ihrer typischen *in vivo*-Eigenschaften (Hiemstra et al. 2018, Schmitz 2011). Tumorzellen/Immortalisierte Zellen sind für Toxizitätstests weniger empfindlich als nicht-transformierte Zellen (Landsiedel et al. 2014).

Bei *in vitro*-Modellen ist es nicht möglich, den Transport und den Verbleib (Deposition) der Partikel in der Lunge vorherzusagen (Nel et al. 2013). Beim Einatmen ist die Lunge das betroffene Hauptorgan. Die inhalierbaren Substanzen können zu lokalen und systemischen Wirkungen führen, so dass die Toxizität mitunter an anderen Organen, wie Leber und Niere, beobachtet werden kann (Hess et al. 2016). Infolge der Partikel-(Lungen-)Zell-Interaktion können Zellschäden und/oder Funktionsstörungen (z.B. Freisetzung von Zytokinen, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies) auftreten (Loret et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit war bei den durchgeführten Expositionsverfahren die Verwendung von Einzelzellkulturen (Monokultur) kritisch. Die humanen Alveolarepithelzellen A549 wurden aus einem Adenokarzinom der Lunge etabliert und haben in mancherlei Hinsicht eine ähnliche Charakteristik wie alveoläre Epithelzellen Typ II (Giard et al. 1973, Lieber et al. 1976, Shapiro et al. 1978). Dennoch sind sie als Monokultur nicht repräsentativ für die gesamte Lunge bzw. den bei der Inhalation betroffenen Atemtrakt, da in der Lunge mehr als 60 verschiedene Zelltypen vorhanden sind (Knudsen et al. 2018, Stone et al. 1992). Die Zelllinie L929 sind Fibroblasten, die aus dem subkutanen Fettgewebe einer Maus entnommen sind. Diese Zellen haben offenkundig keinen Bezug zur Lunge bzw. dem Atemtrakt. Jedoch werden sie als bewährte Indikatorzelllinie bei der Untersuchung und Einstufung von Prüfsubstanzen eingesetzt, z.B. bei der Zytotoxizitätsuntersuchung nach ISO 10993 - *Biological evaluation of medical devices (Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity)* angesehen (ISO 10993-5 2009).

7.4 Limitationen des biochemischen Tests (WST-1-Assay)

Die Vitalität der Zellen nach der Exposition mit verschiedenen Substanzen wurde mittels WST-1-Assays (Zytotoxizitätstest) bestimmt. Dieser Assay beruht auf der Fähigkeit metabolisch aktiver Zellen das Tetrazoliumsalz WST-1 in sein Formazan umzuwandeln. In der Zellbiologie werden Tetrazoliumsalze vielfach bei der Bestimmung von Stoffwechselaktivitäten von Zellen eingesetzt (Berridge et al. 2005). Vorteilhaft bei diesem Zytotoxizitätstest sind die einfache und schnelle Handhabung und der relativ hohe Probendurchsatz. Bei der Anwendung sollte bedacht werden, dass der Assay nur lebende, nicht aber tote Zellen erkennt (Mosmann 1983). So wird nicht die Anzahl der lebensfähigen Zellen, sondern die Enzymaktivität des Zellstoffwechsels erfasst (Berridge

et al. 2005). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurde als Ursache für die Reduktion bzw. den Verlust der Zellaktivität die jeweils untersuchte (exponierte) Substanz angenommen. Hierbei wurde die Empfindlichkeit (Sensitivität) der Zellen als Formazandefizit interpretiert. Die metabolische Aktivität kann sich innerhalb und zwischen Zellpopulationen bzw. Zelllinien unterscheiden und auch von den Wachstumsbedingungen der jeweiligen Zellkultur abhängen (Berridge et al. 2005, Marshall et al. 1995, Riss et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit waren die verwendeten Zellzahlen der A549- und L929-Zellen als auch die jeweilige Versuchsdurchführung zur ALI bzw. SUB Exposition gleich. Bei den Kulturbedingungen unterschied sich der Glukosegehalt der verwendeten Medien. Dieser betrug 1.000 mg/l bei den A549- bzw. 4.500 mg/l bei den L929-Zellen. Der Vergleich der gemessenen OD-Werte der IK und der druckluftexponierten Zellen zeigte, dass die OD-Werte der A549-Zellen etwa dreimal höher lagen als bei den L929-Zellen (Kapitel 6.1, Abbildung 6.5). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der SUB Exposition. Hier lagen die OD-Werte der Kontrollen bei den A549-Zellen etwa doppelt so hoch wie bei den L929-Zellen.

Der WST-1-Assay ist eine Möglichkeit zur Beurteilung der biologischen Reaktion von Zellen auf äußere Reize. Die Untersuchung basiert dabei auf der Bestimmung der zellulären Enzymaktivität. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurde die Umsetzung des Tetrazoliumsals zu Formazan durch Absorptionsmessung fotometrisch bestimmt. Eine Absorptionsänderung wurde als Folge der jeweiligen exponierten Testsubstanz auf die Zellen interpretiert. Tetrazoliumsals sind Verbindungen mit einem positiv geladenen quaternären Tetrazolring mit vier Stickstoffatomen, die von drei aromatischen Gruppen umgeben sind (Berridge et al. 2005). Die Nettoladung der Tetrazoliumsals bestimmt die Zellpermeabilität. WST-1, das einen Jodrest und zwei negativ geladene Sulfonatreste enthält, kann die Zellmembran nicht passieren. An der Zelloberfläche, d.h. extrazellulär, wird das Tetrazoliumsals WST-1 durch einen komplexen zellulären Mechanismus zum Formazan reduziert. Die Reduktion erfolgt in Gegenwart eines intermediären Elektronenakzeptors, wie z.B. mPMS (1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat), und hängt von der NAD(H)P-Produktion lebensfähiger Zellen ab (Abbildung 7.5) (Berridge et al. 2005, Kennett 2004, Yin et al. 2013). Daher korreliert die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen mit dem erzeugten Tetrazolium-Formazan-Signal unter definierten Wachstumsbedingungen für einen bestimmten Zelltyp (Berridge et al. 1998). Verschiedene Faktoren (z.B. Änderungen des pH-Werts oder des Glukosegehalts im Medium) können die metabolische Umsetzung von Tetrazoliumsals beeinflussen (Berridge et al. 2005, Marshall et al. 1995, Vistica et al. 1991). Die Umsetzung wird durch intrazelluläre Reduktionsmittel wie NADH und NAD(P)H angetrieben, die hauptsächlich aus dem Glukosestoffwechsel der Zellen stammen (Vistica et al. 1991, Xie et al. 2018). Der Entzug der extrazellulären Glukose(bereitstellung) inhibiert die Umsetzung des Tetrazoliumfarbstoffs. Die erneute Zugabe von Glukose kann diese Hemmung wieder aufheben (Xie et al. 2018).

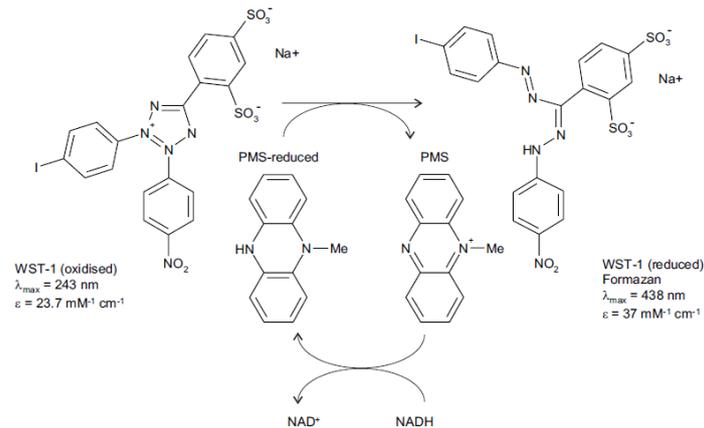


Abbildung 7.5 Reduktion von WST-1 zu Formazan durch mPMS (1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat) (entnommen aus Kennett 2004)

Die Inhibition der Reduktion von Tetrazolium kann u.a. durch SOD (Superoxiddismutase) bedingt sein (Berridge et al. 1998). Superoxiddismutase ist ein Enzym, das für die Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Verfügung steht (Schulz et al. 2000). SOD katalysiert die Dismutation des Superoxidanions zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Superoxid entsteht als Nebenprodukt des Sauerstoffmetabolismus und verursacht, wenn es nicht reguliert wird, viele Arten von Zellschäden. Wasserstoffperoxid ist ebenfalls schädlich und wird durch andere Enzyme wie Katalase abgebaut. ROS können neben DNS-Veränderungen auch Einfluss auf das Zellwachstum und den Zelltod (Apoptose oder Nekrose) haben (Mates et al. 1999). Nach den (ALI bzw. SUB) Expositionen und vor der Durchführung des WST-1-Assays wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Nach optischer Einschätzung waren bei manchen exponierten Zellen morphologische Veränderungen erkennbar. Die Musterung und Beurteilung der Zellen sind rein subjektiv. Mit einer hohen Zellkonfluenz ist nicht automatisch auch eine hohe Stoffwechselaktivität verbunden. Die Bestimmung der Stoffwechselaktivität ist nur ein möglicher Endpunkt. Für die Analyse von zellulären und biochemischen Prozessen gibt es ein breites Portfolio an zellbasierten Tests, die u.a. zur Bestimmung der Lebensfähigkeit, Zytotoxizität, Apoptose genutzt werden können. Für den Vergleich der Zellen bzw. der Auswirkungen der Testsubstanzen auf die Zellen in den beiden Verfahren bedarf es eines erfassbaren Endpunkts. Eine mögliche Ergänzung für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche könnte die Bestimmung weiterer Endpunkte sein. Zytotoxische Aktivität führt zu einer Verringerung der Lebensfähigkeit der Zellen und leitet den Zelltod durch Apoptose und/oder Nekrose ein. Zytotoxizitäts- und Vitalitätstests werden oftmals verwendet, um das toxische Potenzial einer Substanz nachzuweisen. Sind Informationen über den Mechanismus des Zelltods gewünscht, d.h. es soll zwischen apoptotischen und nekrotischen Prozessen unterschieden werden, können Assays verwendet werden, die auf dem Nachweis verschiedener Marker beruhen. Nekrotische Zellen sind durch rasches Anschwellen, Abschaltung des Metabolismus, Verlust der Zellmembranintegrität und der Freisetzung des zytoplasmatischen Zellinhalts gekennzeichnet (Riss et al. 2003). In apoptotischen Prozessen stoppen die Zellen ebenfalls den Metabolismus. Die Zellintegrität bleibt hingegen erhalten und die Zellen werden *in vivo*

durch Phagozyten geklärt. In der Zellkultur sind keine Phagozyten vorhanden, so dass die apoptotischen Zellen ihre Membranintegrität verlieren. Dieser Verlust wird als sekundäre Nekrose bezeichnet und findet zu einem späteren Zeitpunkt statt im Vergleich zu der primären Nekrose, die schnell voranschreitet. Für die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose ist das Verstehen der Kinetik des Zelltods wichtig (Riss et al. 2003). Apoptotische Zellen geben den zytoplasmatischen Inhalt an das Kulturmedium ab. Zudem zeichnen sich die Zellen durch eine Caspase-Aktivierung und DNS-Fragmentierung in charakteristischen Längen aus. Im Vergleich zur Nekrose werden bei der Apoptose keine Entzündungsreaktionen ausgelöst. Die Wahl des Assays ist von den Anforderungen an das Ergebnis des Versuchs abhängig. Bei den durchgeführten Expositionsversuchen wurde davon ausgegangen, dass Zellen, die keine oder nur verringerte Substratumsetzung zeigten, durch die Testsubstanz beeinträchtigt wurden. Es wurde dabei nicht ermittelt, ob die Zellen geschädigt wurden, z.B. durch Verletzung der Zellmembran, oder ob es lediglich zu einer Einschränkung im Stoffwechsel der Zellen kam. Bei der Interpretation von Ergebnissen aus der Zellkultur ist die Frage der Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus zu beachten. Ebenfalls können durch die *in vitro*-Versuche keine sekundären Effekte wie sie *in vivo* durch z.B. Eindringen der Partikel in die Blutbahn auftreten können, untersucht werden.

7.5 Zur Vergleichbarkeit beider Expositionsverfahren

Die Exposition von Submerskulturen mit Substanzen ist für die Untersuchung zur Lungentoxizität nicht physiologisch. Bei submerser Kultivierung erfolgt ein direkter Kontakt der Substanzpartikel mit den Zellen immer über die Solvatation bzw. Dispersion in Medium, was zu einer Unterschätzung der Zytotoxizität führen kann. Als geeigneter werden daher Versuche angesehen, bei denen die Zellen an der ALI kultiviert und mit den Partikeln des Substanz-aerosol interagieren können (Fröhlich et al. 2013). Durch die ALI Kultivierung können die Zellen in einer *in vivo*-ähnlichen apikalen Atmosphäre exponiert werden. Zellen, die hingegen submers kultiviert und exponiert werden, sind durch das überschichtete Medium besser vor äußeren Einflüssen (z.B. Partikel) geschützt. Darüber hinaus kann es zu Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und dem Medium durch die Bildung von Agglomeraten kommen, was die partikelinduzierte Reaktion beeinträchtigen und zur Unterschätzung der Wirkung führen kann (Lenz et al. 2009).

Die in den Versuchen verwendeten Zelllinien sind unterschiedlichen Ursprungs. Dennoch zeigten die A549-Zellen (humane Alveolarepithelzellen) und die L929-Zellen (murine Fibroblasten) eine vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber den Substanzen im jeweils gleichen Expositionsverfahren. Der Vergleich der beiden Verfahren miteinander zeigte, dass die Zellen bei der ALI Exposition tendenziell empfindlicher reagierten als bei der SUB Exposition. Dies tritt besonders bei der Gegenüberstellung zwischen den Werten der ALI Exposition und der SUB 2 bzw. der SUB 3 auf (Abbildung 7.3 und 7.4).

Bei Versuchen zur ALI Exposition wurden bereits bei niedrigen Dosen Formazandefizite beobachtet, die bei der SUB 1 z.T. erst bei höheren Dosen eintraten (Abbildung 7.2). Beispielsweise lagen die Werte des Formazandefizits bei der ALI Exposition der A549-Zellen mit der Substanz Natrium-N-lauroylsarcosinat bei 86-92 % (A549) bzw. 90-97 % (L929). Diese Werte wurden bei der SUB 1 nur

bei der höchsten Dosis ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ermittelt. Natrium-N-lauroylsarcosinat ist als „gesundheitsgefährdend bei Inhalation“ eingestuft. Bei dem Vergleich der Ergebnisse der ALI Exposition und SUB 1 zeigte sich, dass die Gefährdung, die von Natrium-N-lauroylsarcosinat ausgehen kann, durch das submerse Expositionsverfahren unterschätzt werden kann.

Die höhere Beeinträchtigung der Zellen könnte auf die direkte Interaktion der Zellen mit den Substanzpartikeln bei der ALI Exposition zurückgeführt werden. Wie oben aufgeführt, gibt es Faktoren, die bei einer SUB Exposition zu einer Unterschätzung der Zytotoxizität führen können. Bei der SUB Exposition erfolgt eine Substanz-Zell-Interaktion immer in Gegenwart der potenziellen Bindungspartner im Medium. Natrium-N-lauroylsarcosinat ist gut löslich (Wasserlöslichkeit $456,4 \text{ g/l}$), so dass von einer gleichmäßigen Verteilung (Solvatation) auszugehen war. Es lässt sich vermuten, dass erst eine höhere Partikeldosis im substanzhaltigen Medium eine Schädigung der Zellen bewirkt.

Um beide Expositionsverfahren miteinander vergleichen zu können, wurde die Sensitivität und Spezifität beider Methoden bestimmt. Dafür wurden in einer Vierfeldertafel die Zahlenwerte der experimentell ermittelten Testergebnisse mit den aus der Literatur entnommenen Toxizitätseinschätzung der Substanzen zusammengestellt (Tabelle 7.1). Die Substanzen wurden als „inhalationstoxisch“ bezeichnet, wenn eine Gesundheitsgefährdung bei der Akuten Toxizität (Inhalation) für die Substanz auf Grundlage der ECHA-Daten vorlag (Kapitel 6, Tabelle 6.1). Die Expositionsversuche (Test) galten als positiv, wenn bei der jeweiligen Methode der zytotoxische Schwellenwert überschritten wurde.

Tabelle 7.1 Aufbau der Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität

	inhalationstoxisch	nicht inhalationstoxisch
Test positiv	A	B
Test negativ	C	D

Die Sensitivität gibt an, zu welchem Prozentsatz die in der Literatur als „inhalationstoxisch“ eingestuft Substanzen im jeweiligen Expositionsverfahren tatsächlich erkannt, d.h. als richtig positiv, erkannt wurden. Sie ist definiert als Quotient aus den richtig positiven Ergebnissen (A) und der Summe aus den richtig positiven (A) und falsch negativen (C) Ergebnissen (Tabelle 7.1).

$$\text{Sensitivität} = \frac{A}{A + C}$$

Die Spezifität hingegen ist als Wahrscheinlichkeit definiert mit der „nicht inhalationstoxische“ Substanzen im Expositionsversuch als richtig negativ, d.h. die Werte liegen unter dem zytotoxischen Schwellenwert, erfasst wurden. Berechnet wird sie als Quotient der richtig negativen Ergebnisse (D) und der Summe aus den richtig negativen (D) und falsch positiven (B) Ergebnissen (Tabelle 7.1).

$$\text{Spezifität} = \frac{D}{B + D}$$

Die Gruppe der „nicht inhalationstoxischen“ Substanzen wurde nochmals unterteilt. Für einige Substanzen sind Gefährdungen für Menschen und/oder Umwelt bekannt, die sich nicht auf die Inhalation beziehen. Beispielweise verursacht Kaliumpyrophosphat schwere Augenreizungen und Tetrabromphthalsäureanhydrid kann zu allergischen Hautreaktionen führen. Daneben sind für mehrere Substanzen keine Gefährdungen für Mensch und/oder Umwelt bekannt. Die Testsubstanzen lassen sich demnach wie folgt in drei Gruppen einteilen (Tabelle 7.2).

Tabelle 7.2 Einteilung der Testsubstanzen nach Gefahrenhinweisen basierend auf ECHA-Daten

inhalationstoxisch	nicht inhalationstoxisch	
Akute Toxizität (Inhalation)	andere Gefährdungen	keine Gefährdungen
Cetylpyridiniumchlorid	Böhmit	β-Cyclodextrin
Kupfer-II-hydroxid	Kaliumpyrophosphat	di-Ammoniumphosphat
Natriummetavanadat	Kupfer-II-oxid (nano)	D(+)-Laktose Monohydrat
Natrium-N-lauroylsarcosinat	Kupfer-II-sulfat	Neodymoxid
Zinkdimethyldithiocarbamat	Natriumfluorophosphat	Siliziumdioxid
	Tetrabromphthalsäureanhydrid	Tetraacetyethylendiamin
	Vanadium-III-oxid	Wolfram-IV-carbid
		Wolfram-IV-carbid (nano)

Die berechneten Werte der Sensitivität sind in der Tabelle 7.3 aufgeführt. Je höher die Werte waren, desto sicherer wurden durch die Expositionsmethode die „inhalationstoxischen“ Substanzen erfasst. Unabhängig der verwendeten Zelllinien wurden bei der ALI Exposition die als „inhalationstoxisch“ eingestuft Substanzen im Testverfahren mit einem Prozentsatz von 100 % als richtig positiv erkannt. Ein ähnliches Bild ergab sich bei dem Vergleich der Werte mit der SUB 1. Hier unterschieden sich die Werte bei der niedrigsten Dosis (25 µg/cm²) zwischen den Zelllinien. Die Sensitivität war bei den L929-Zellen bei 100 %, bei den A549-Zellen bei 80 %. Aus den berechneten Werten von der ALI Exposition und der SUB 1 ist erkennbar, dass beide Expositionsverfahren eine sichere Vorhersage bezogen auf die „inhalationstoxischen“ Substanzen liefern. Bei beiden Expositionsverfahren waren die Zellen für 24 h mit den Substanzen exponiert. Lediglich die Darreichungsform (Partikelstaub, dispergiert in Medium) unterschied sich. Die Expositionszeiträume bei der SUB 2 und der SUB 3 waren mit 15 min, 30 min und 60 min deutlich kürzer als bei der SUB 1. Bei der höchsten Dosis (100 µg/cm²) waren die Prognosewerte sehr hoch (100 %). Bei den niedrigeren Dosen lag die Sensitivität z.T. deutlich darunter. Zusammenfassend schienen die ALI Exposition und die SUB 1 die geeigneteren Verfahren zu sein, um eine gute Vorhersagekraft bezogen auf die Übereinstimmung zwischen Literaturdaten und experimentell ermittelten Daten zu haben.

Tabelle 7.3 Berechnung der Sensitivität [%] aus den Expositionsversuchen mit A549- und L929-Zellen

		25 µg/cm ²	50 µg/cm ²	100 µg/cm ²	Mittelwert
A549	ALI	100	100	100	100
	SUB 1	80	100	100	93
	SUB 2	40	40	100	60
	SUB 3	40	60	100	66
L929	ALI	100	100	100	100
	SUB 1	100	100	100	100
	SUB 2	60	60	100	73
	SUB 3	80	100	100	93

Die Berechnung der Spezifität wurde zunächst für die als „nicht inhalationstoxisch“ eingestuft Substanzen durchgeführt (Tabelle 7.4, oben). Wie oben beschrieben wurden die Substanzen nochmals unterteilt. Im Anschluss wurde die Spezifität für die Substanzgruppe, für die nach Literaturdaten keine Gefährdung vorliegt, ermittelt (Tabelle 7.4, unten). Die Gliederung wurde vorgenommen, da von einigen Substanzen Gefahrenhinweise, die nicht die Lunge betreffen, vorliegen. In der vorliegenden Arbeit sollten die beiden Expositionsmethoden bezüglich der Untersuchung von ‚bei Inhalation toxischer‘ Substanzen verglichen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Substanzen, die als „nicht inhalationstoxisch“ eingestuft sind, aber von denen andere Gefährdungen für Menschen und/oder Umwelt bekannt sind, in den Experimenten falsch positive Ergebnisse zeigen. Im Folgenden wurde daher zunächst dargestellt, inwieweit Substanzen, von denen keine Gefährdung bekannt ist, in den Expositionsverfahren richtig negative Ergebnisse zeigten.

Die Werte der Spezifität unterschieden sich zwischen den Zelllinien. Bei den A549-Zellen lagen die Werte zwischen 87 % und 100 %. Das bedeutet, dass Substanzen ohne Gefährdung in den beiden Expositionsverfahren als richtig negativ erfasst wurden. Die L929-Zellen waren sowohl bei der ALI Exposition als auch bei der SUB Exposition unspezifischer. Die niedrigsten Werte (0-50 %) wurden bei den SUB 2 und SUB 3 ermittelt. Die SUB 1 war um 12 % spezifischer als die ALI Exposition. Bei beiden Verfahren lag die Spezifität bei der höchsten Dosis unter denen der beiden anderen Dosen. Die Werte der L929-Zellen betragen maximal 87 % und lagen unter denen der A549-Zellen.

Die Spezifität für alle „nicht inhalationstoxischen“ Substanzen ist ebenfalls in der Tabelle 7.4 aufgeführt. Hier zeigte sich, dass die Werte für die Spezifität bei beiden Zelllinien und in beiden Expositionsverfahren geringer waren. Wird keine Untergliederung dieser Substanzgruppe gemacht, ist die Spezifität geringer. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit mit der „nicht inhalationstoxische“ Substanzen in den Testverfahren als richtig negativ erfasst werden, gering ist. Die Einbeziehung von Substanzen mit anderen Gefährdungen für Menschen und/oder Umwelt zeigte mehr falsch positive Ergebnisse. Die Spezifität des Testverfahrens sinkt ab, was zu einer Überschätzung des gesundheitlichen Gefährdungsrisikos der Substanzen bezogen auf die Inhalation führen kann.

Tabelle 7.4 Berechnung der Spezifität [%] aus den Expositionsversuchen mit A549- und L929-Zellen

alle ‚nicht inhalationstoxischen‘ Substanzen

		25 µg/cm ²	50 µg/cm ²	100 µg/cm ²	Mittelwert
A549	ALI	60	53	53	55
	SUB 1	73	86	86	82
	SUB 2	100	100	86	95
	SUB 3	93	93	86	91
L929	ALI	57	57	28	47
	SUB 1	60	73	53	62
	SUB 2	40	40	46	42
	SUB 3	0	26	0	9

‚nicht inhalationstoxische‘ Substanzen, ohne Gefährdung für Menschen und/oder Umwelt

		25 µg/cm ²	50 µg/cm ²	100 µg/cm ²	Mittelwert
A549	ALI	100	87	87	91
	SUB 1	87	100	100	96
	SUB 2	100	100	100	100
	SUB 3	100	100	100	100
L929	ALI	75	75	50	67
	SUB 1	87	87	62	79
	SUB 2	50	50	50	50
	SUB 3	0	25	0	8

Basierend auf den Berechnungen der Sensitivität und Spezifität lässt sich zusammenfassen:

Unabhängig von der Zelllinie ist die Sensitivität bei der ALI Exposition und bei der SUB 1 höher als bei der SUB 2 und der SUB 3. Durch die vernachlässigbar kleinen Differenzen schien es keinen Unterschied zu machen, ob die ALI Exposition und die SUB 1 bei den Versuchsdurchführungen angewandt wurde. Bei der Abwägung ist die SUB Exposition im Hinblick auf Kosten, Zeitaufwand und höheren Durchsatz der ALI Exposition vorzuziehen.

Bei der Spezifität gab es zwischen den Zelllinien Unterschiede. Unabhängig ob für die Berechnung alle „nicht inhalationstoxischen“ Substanzen oder nur die Unterkategorie mit allen Substanzen ohne Gefährdung verwendet wurden, waren die A549-Zellen spezifischer als die L929-Zellen. Bei der Durchführung von *in vitro*-Versuchen ist die Verwendung verschiedener Zelllinien vorteilhaft, da Zellen unterschiedliche Empfindlichkeiten zeigen können.

7.6 Diskussion der Substanzwahl

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden Substanzen gewählt, für die entsprechend der CLP-Verordnung eine Bewertung der akuten Inhalationstoxikologie basierend auf mindestens einer *in vivo*-Studie nach TG 403 oder TG 436 vorlag (Kapitel 3.5). Um die Substanzen für die ALI Exposition zu verwenden, mussten die Substanzen pressbar sein. Die Pressbarkeit hing u.a. von den morphologischen Beschaffenheiten der Substanz ab. Zudem führten gefährliche Eigenschaften (z.B. Explosivität, Brennbarkeit) zum Ausschluss bei der Auswahl der Substanzen. In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst die ALI Exposition und nachfolgend die Versuche zur SUB Exposition mit den Substanzen durchgeführt. Bei der Submersexposition spielte die Substanzlöslichkeit in den Medien eine Rolle (Kapitel 5.3.2.2, Tabelle 5.4). Nur die Hälfte der als Pulver vorliegenden Testsubstanzen konnte in eine Suspension überführt werden. Die Löslichkeit einer Substanz war bei der Durchführung der SUB Exposition ein wichtiger Punkt. Er spielte hingegen bei der ALI Exposition primär keine Rolle. Die auf die Zellen einwirkende Partikelmenge (Dosis) konnte bei der ALI Exposition bestimmt werden (Paur et al. 2011). Bei der SUB Exposition war die Abschätzung der Partikelmenge ebenfalls möglich. Es wurde davon ausgegangen, dass die Substanzkonzentration im Medium proportional der Dosis ist (Paur et al. 2011). Die Unlöslichkeit und die Wechselwirkung zwischen Stoffmolekülen und Medium konnten die substanzinduzierten Effekte an den Zellen beeinflussen. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche waren die Unterschiede der zytotoxischen Auswirkungen bei der ALI Exposition und der SUB 1 sehr gering. Die Substanzlöslichkeit schien hierbei keinen Einfluss auf den gemessenen biologischen Endpunkt zu haben. Die Wahl eines geeigneten *in vitro*-Testsystem wird u.a. von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Substanz bestimmt (Clippinger et al. 2018a, Paur et al. 2011).

8 Ausblick: Etablierung von Alternativmethoden

Das Ersetzen von Tierversuchen durch Alternativmethoden sollte Priorität haben, jedoch ist die Suche nach einer tierversuchsfreien Methode schwierig. Nach jetzigem Stand gibt es keine validierte *in vitro*-Methode in der Inhalationstoxikologie (Costa 2008, Hess et al. 2016). Derzeit sind Tierversuche immer noch das entscheidende Mittel, die Gefährdung und das Risiko, das von einer Substanz ausgeht, zu bewerten. Tierversuche stellen einen Kompromiss dar, da keine Tierart den Menschen in jeder Hinsicht nachahmt. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen ist schwierig, da hier verschiedene Faktoren, wie z.B. Anatomie und Zellbiologie, bei der Extrapolation einbezogen werden müssen (Clippinger et al. 2018c). Es gibt erhebliche anatomische Unterschiede zwischen der Lunge des Menschen und der Tiere, was Auswirkungen auf die Deposition der Partikel hat und damit eine Extrapolation von Tier auf den Menschen erschwert (Lacroix et al. 2018). Ein weiterer Unterschied zwischen Mensch und Tier ist beispielsweise das Atmungsmuster. Während Menschen eher durch den Mund atmen, sind die meisten Labortiere Nasenatmer. Bei der Mundatmung wird im Vergleich zur Nasenatmung die Partikelpenetration durch den Tracheobronchialbaum und in die Lungen erleichtert (Warheit 1989). Allgemein fehlt bei *in vitro*-Methoden der in der Lunge vorhandene Luftfluss vollkommen (Clippinger et al. 2018b).

Kritisch muss hinterfragt werden, inwieweit *in vitro*-Methoden, die weit von der *in vivo*-Situation entfernt sind, dazu beitragen können als Alternativmethode eingesetzt zu werden. *In vitro*-Methoden können im Gegensatz zu *in vivo*-Versuchen die Komplexität des Atemtrakts nicht darstellen. Dennoch können diese Methoden für die Toxizitätsbewertung bei Inhalationsstudien nützliche Hinweise geben.

Das Ziel ist es, Tiermodelle nach dem 3R-Prinzip zu reduzieren, zu verfeinern und/oder zu ersetzen. In verschiedenen Richtlinien (u.a. REACH-Verordnung) wird ausdrücklich gefordert, Tierversuche zu reduzieren und/oder zu verfeinern (Beken et al. 2016). Die Reduzierung bzw. Verfeinerung beziehen sich dabei nicht nur primär auf die Anzahl der Tierversuche, sondern auch auf die Anzahl der eingesetzten Tiere bzw. das Leid der eingesetzten Tiere.

In vitro-Modellen könnten bei der toxikologischen Bewertung als Screeningverfahren eingesetzt werden. *In vitro*-Versuche sind mit ihrer einfachen, schnellen, kostengünstigen und platzsparenden Handhabung gegenüber *in vivo*-Versuchen vorteilig. Aus den ermittelten Daten könnte eine Vorauswahl getroffen werden, die als Basis für die weitere Vorgehensweise dienen kann. Die Zahl der in den Tierversuchen verwendeten Tiere könnte dadurch erheblich reduziert werden. Ebenso könnten die gewonnenen Informationen zur Ablehnung von Tierversuchen führen.

Die Abschätzung potenzieller Risiken einer inhalativen Exposition gegenüber verschiedenen Substanzpartikeln kann durch die Kombination von biologischen Daten, die durch verschiedene Methoden (*in silico*, *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) ermittelt worden, erfolgen (Fröhlich et al. 2014). Bei der Implementierung der Alternativmethoden ist deren Anwendbarkeit und Einschränkung durch z.B. physikalisch-chemische Eigenschaften der Prüfsubstanzen (z.B. Löslichkeit) zu berücksichtigen (Dal Negro et al. 2018). Validierung ist ein Prozess, der die Angemessenheit, Nützlichkeit und Zuverlässigkeit einer Methode, Geräts, Systems etc. für den beabsichtigten Zweck prüft und bewer-

tet (Griesinger et al. 2016). Dabei ist wichtig, inwieweit die Testmethode den maßgebenden biologischen Effekt tatsächlich misst oder prognostiziert (Kandarova et al. 2011). Im Hinblick auf Alternativmethoden, die Tierversuche ersetzen sollen, muss gezeigt werden, dass diese zweckdienlich sind, da die aus diesen Methoden ermittelten Daten in öffentlichen Gesundheits- und Umweltschutzbereichen als Entscheidungshilfe eingesetzt werden (Griesinger et al. 2016). Die Gültigkeit des Modells muss durch verschiedene Kriterien (Robustheit, Reproduzierbarkeit, Vorhersagekraft) nachgewiesen werden, um in der behördlichen oder industriellen Umgebung bestehen zu können (Faber et al. 2018). Auf Grundlage der Daten aus Tierversuchen wurde oftmals ein Schwellenwert für den Menschen festgelegt. Dies stellt eine große Herausforderung dar. Als ‚falsch negativ‘ eingestufte Ergebnisse gefährden die Sicherheit des Menschen und sollten daher vermieden werden. Auf der anderen Seite sind ‚falsch positive‘ Ergebnisse aus industrieller Sicht unerwünscht, da dadurch aussichtsreiche Substanzen ohne Notwendigkeit eliminiert werden (Roggen 2011). Eine Herausforderung in der Wissenschaft ist die Schwierigkeit zu entscheiden, wann eine Testmethode ausreichend für die Risikobewertung ist (Roggen 2011). Zu den Validierungskriterien gehören u.a. Sensitivität und Spezifität (Kandarova et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden beide Kriterien für die beiden Expositionsverfahren mit den beiden Zelllinien A549 und L929 berechnet (Kapitel 7.5).

9 Literaturverzeichnis

- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F.B. und Starke, K.** (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker, 10. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München, München.
- Anthony, J.W., Bideaux, R.A., Bladh, K.W. und Nichols, M.C.** (1990) Handbook of mineralogy, Vol. 1: Elements, sulfides, sulfosalts, Mineral Data Publishing, Tucson, Arizona.
- Asadoorian, J. und Williams, K.B.** (2008) Cetylpyridinium chloride mouth rinse on gingivitis and plaque. American Dental Hygienists Association 82: 42-42.
- Aufderheide, M., Halter, B., Möhle, N. und Hochrainer, D.** (2013) The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the in vitro exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface. Biomed Res Int 2013: 734137.
- Aufderheide, M., Heller, W.D., Krischenowski, O., Möhle, N. und Hochrainer, D.** (2017) Improvement of the CULTEX® exposure technology by radial distribution of the test aerosol. Exp Toxicol Pathol 69: 359-365.
- Aufderheide, M., Knebel, J.W. und Ritter, D.** (2002) A method for the in vitro exposure of human cells to environmental and complex gaseous mixtures: application to various types of atmosphere. Altern Lab Anim 30: 433-441.
- Aufderheide, M. und Mohr, U.** (2000) CULTEX-an alternative technique for cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne pollutants at the air/liquid interface. Exp Toxicol Pathol 52: 265-270.
- Aufderheide, M., Scheffler, S., Möhle, N., Halter, B. und Hochrainer, D.** (2011) Analytical in vitro approach for studying cyto- and genotoxic effects of particulate airborne material. Anal Bioanal Chem 401: 3213-3220.
- Baumann, W. und Herberg-Liedtke, B.** (1995) Chemikalien in der Metallbearbeitung: Daten und Fakten zum Umweltschutz, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo.
- Beken, S., Kasper, P. und van der Laan, J.W.** (2016) Regulatory Acceptance of Alternative Methods in the Development and Approval of Pharmaceuticals. Adv Exp Med Biol 856: 33-64.
- Berridge, M. und Tan, A.** (1998) Trans-plasma membrane electron transport: a cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. Protoplasma 205: 74-82.
- Berridge, M.V., Herst, P.M. und Tan, A.S.** (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev 11: 127-152.
- Berube, K., Aufderheide, M., Breheny, D., Clothier, R., Combes, R., Duffin, R., Forbes, B., Gaca, M., Gray, A., Hall, I., Kelly, M., Lethem, M., Liebsch, M., Merolla, L., Morin, J.P., Seagrave, J., Swartz, M.A., Tetley, T.D. und Umachandran, M.** (2009) In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. Altern Lab Anim 37: 89-141.
- Blank, F., Rothen-Rutishauser, B.M., Schurch, S. und Gehr, P.** (2006) An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. J Aerosol Med 19: 392-405.

- Böcker, W., Denk, H. und Heitz, P.K.** (2004) Repetitorium Pathologie, 1. Auflage, Urban & Fischer Verlag/Elsevier, München, Jena.
- Böhm, J.** (1925) Über Aluminium-und Eisenhydroxyde. I. Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie 149: 203-216.
- Castell, J.V., Donato, M.T. und Gomez-Lechon, M.J.** (2005) Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. Exp Toxicol Pathol 57 Suppl 1: 189-204.
- Chudoba, K.F. und Hintze, C.** (2011) Neue Mineralien und neue Mineralnamen (mit Nachträgen, Richtigstellungen und Ergänzungen), De Gruyter.
- Clippinger, A.J., Allen, D., Behrsing, H., BeruBe, K.A., Bolger, M.B., Casey, W., DeLorme, M., Gaca, M., Gehen, S.C., Glover, K., Hayden, P., Hinderliter, P., Hotchkiss, J.A., Iskandar, A., Keyser, B., Luettich, K., Ma-Hock, L., Maione, A.G., Makena, P., Melbourne, J., Milchak, L., Ng, S.P., Paini, A., Page, K., Patlewicz, G., Prieto, P., Raabe, H., Reinke, E.N., Roper, C., Rose, J., Sharma, M., Spoo, W., Thorne, P.S., Wilson, D.M. und Jarabek, A.M.** (2018a) Pathway-based predictive approaches for non-animal assessment of acute inhalation toxicity. Toxicol In Vitro 52: 131-145.
- Clippinger, A.J., Allen, D., Behrsing, H., Hinderliter, P.M., Landsiedel, R., Reinke, E.N. und Stone, V.** (2018b) Nonanimal Approaches to Assessing the Toxicity of Inhaled Substances: Current Progress and Future Promise. Appl In Vitro Toxicol 4: 82-88.
- Clippinger, A.J., Allen, D., Jarabek, A.M., Corvaro, M., Gaca, M., Gehen, S., Hotchkiss, J.A., Patlewicz, G., Melbourne, J., Hinderliter, P., Yoon, M., Huh, D., Lowit, A., Buckley, B., Bartels, M., BeruBe, K., Wilson, D.M., Indans, I. und Vinken, M.** (2018c) Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: An international workshop report. Toxicol In Vitro 48: 53-70.
- Costa, D.L.** (2008) Alternative test methods in inhalation toxicology: challenges and opportunities. Exp Toxicol Pathol 60: 105-109.
- Dal Negro, G., Eskes, C., Belz, S., Bertein, C., Chlebus, M., Corvaro, M., Corvi, R., Dhalluin, S., Halder, M., Harvey, J., Hermann, M., Hoffmann-Dörr, S., Kilian, K., Lambrigts, D., Laroche, C., Louhimies, S., Mahony, C., Manou, I., McNamee, P., Prieto, P., Reid, K., Roggen, E., Schutte, K., Stirling, C., Uhlrich, S., Weissenhorn, R. und Whelan, M.** (2018) One science-driven approach for the regulatory implementation of alternative methods: A multi-sector perspective. Regul Toxicol Pharmacol 99: 33-49.
- Deschl, U., Vogel, J. und Aufderheide, M.** (2011) Development of an in vitro exposure model for investigating the biological effects of therapeutic aerosols on human cells from the respiratory tract. Exp Toxicol Pathol 63: 593-598.
- DFG.** (2007) Tungsten and its compounds (with the exception of fibres and hard metals), pp. 245-263. In Greim, H. (ed.), The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, Part I: MAK Value Documentations (Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)), vol. 23. Wiley-VCH, Weinheim.
- DFG.** (2016) Ziram [MAK Value Documentation, 2015], pp. 2614-2676. In Hartwig, A. (ed.), Annual Thresholds and Classifications for the Workplace. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dockery, D.W., Pope, C.A., 3rd, Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Jr. und Speizer, F.E.** (1993) An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. N Engl J Med 329: 1753-1759.

- Dockery, D.W., Speizer, F.E., Stram, D.O., Ware, J.H., Spengler, J.D. und Ferris, B.G., Jr.** (1989) Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *Am Rev Respir Dis* 139: 587-594.
- Earle, W.R., Schilling, E.L., Stark, T.H., Straus, N.P., Brown, M.F. und Shelton, E.** (1943) Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J Natl Cancer Inst* 4: 165-212.
- Emura, M., Riebe, M., Ochiai, A., Aufderheide, M., Germann, P. und Mohr, U.** (1990) New functional cell-culture approach to pulmonary carcinogenesis and toxicology. *J Cancer Res Clin Oncol* 116: 557-562.
- Europäische Gemeinschaft.** (2006). Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission.
- Europäische Gemeinschaft.** (2008a). Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethode gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH).
- Europäische Gemeinschaft.** (2008b). Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006.
- Evans, H.T.** (1991) Metavanurite, a new anhydrous sodium metavanadate from San Miguel County, Colorado. *Mineralogical Magazine* 55: 509-513.
- Faber, S.C. und McCullough, S.D.** (2018) Through the Looking Glass: In Vitro Models for Inhalation Toxicology and Interindividual Variability in the Airway. *Appl In Vitro Toxicol* 4: 115-128.
- Faller, A.** (1999) *Der Körper des Menschen: Einführung in Bau und Funktion*, 13. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Flörke, O.W., Graetsch, H.A., Brunk, F., Benda, L., Paschen, S., Bergna, H.E., Roberts, W.O., Welsh, W.A., Libanati, C., Ettlinger, M., Kerner, D., Maier, M., Meon, W., Schmoll, R., Gies, H. und Schiffmann, D.** (2008) Silica, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Ed.).
- Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L. und Audus, K.L.** (1998) Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 243: 359-366.
- Fröhlich, E., Bonstingl, G., Hofler, A., Meindl, C., Leitinger, G., Pieber, T.R. und Roblegg, E.** (2013) Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicol In Vitro* 27: 409-417.
- Fröhlich, E. und Salar-Behzadi, S.** (2014) Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *Int J Mol Sci* 15: 4795-4822.
- Garthoff, B.** (2005) Alternatives to animal experimentation: the regulatory background. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 388-392.

- Gehr, P., Bachofen, M. und Weibel, E.R.** (1978) The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol* 32: 121-140.
- GfE mbH.** *Data sheet* Sodium Metavanadate, GfE Article no. 2008 796. (2014) GfE (Gesellschaft für Elektrometallurgie mbH) Metalle und Materialien GmbH, Nürnberg, Oktober 2014.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. und Parks, W.P.** (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-1423.
- Griesinger, C., Desprez, B., Coecke, S., Casey, W. und Zuang, V.** (2016) Validation of Alternative In Vitro Methods to Animal Testing: Concepts, Challenges, Processes and Tools. *Adv Exp Med Biol* 856: 65-132.
- Herzog, F., Clift, M.J., Piccapietra, F., Behra, R., Schmid, O., Petri-Fink, A. und Rothen-Rutishauser, B.** (2013) Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface. *Part Fibre Toxicol* 10: 11.
- Hess, A., Wang-Lauenstein, L., Braun, A., Kolle, S.N., Landsiedel, R., Liebsch, M., Ma-Hock, L., Pirow, R., Schneider, X., Steinfath, M., Vogel, S., Martin, C. und Sewald, K.** (2016) Prevalidation of the ex-vivo model PCLS for prediction of respiratory toxicity. *Toxicol In Vitro* 32: 347-361.
- Hiemstra, P.S., Grootaers, G., van der Does, A.M., Krul, C.A.M. und Kooter, I.M.** (2018) Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicol In Vitro* 47: 137-146.
- Holtzman, N.A. und Haslam, R.H.** (1968) Elevation of serum copper following copper sulfate as an emetic. *Pediatrics* 42: 189-193.
- IARC.** (1991) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Occupational Exposures in Insecticides Application, and Some Pesticides, vol. 53, IARC, Lyon, France.
- io-li-tec nanomaterials.** *Material Safety Data Sheet* Copper(II)oxide powder. (2014) IonicLiquidsTechnologies GmbH, Revision Date:1/10/2014.
- ISO 10993-5.** (2009). Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests For In Vitro Cytotoxicity.
- Jambor, J.L. und Vanko, D.A.** (1989) New mineral names*. *American Mineralogist* 74: 946-951.
- Ji, J., Hedelin, A., Malmlöf, M., Kessler, V., Seisenbaeva, G., Gerde, P. und Palmberg, L.** (2017) Development of Combining of Human Bronchial Mucosa Models with XposeALI® for Exposure of Air Pollution Nanoparticles. *PLoS One* 12: e0170428.
- Johnson, G.F.** (1935) The Early History of Copper Fungicides. *Agricultural History* 9: 67-79.
- Kandarova, H. und Letasiova, S.** (2011) Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip Toxicol* 4: 107-113.
- Kasper, J., Hermanns, M.I., Bantz, C., Maskos, M., Stauber, R., Pohl, C., Unger, R.E. und Kirkpatrick, J.C.** (2011) Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: comparison with conventional monocultures. *Part Fibre Toxicol* 8: 6.
- Kennett, E.C.** (2004) Transmembrane Electron Transport Systems in Erythrocyte Plasma Membranes. Doctoral Thesis (Doctor of Philosophy), University of Sydney School of Molecular and Microbial Biosciences Sydney.

- Keyser, B.M., Leverette, R., Fowler, K., Fields, W., Hargreaves, V., Reeve, L. und Bombick, B.** (2019) Development of a quantitative method for assessment of dose in in vitro evaluations using a VITROCELL® VC10® smoke exposure system. *Toxicol In Vitro* 56: 19-29.
- Knudsen, L. und Ochs, M.** (2018) The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem Cell Biol* 150: 661-676.
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A.C., Larsen, S.T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., Hiemstra, P.S., Frejafon, E., Hubert, P., Gribaldo, L., Kearns, P., Aublant, J.-M., Diabaté, S., Weiss, C., de Groot, A. und Kooter, I.** (2018) Air-Liquid Interface In Vitro Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Appl In Vitro Toxicol* 4: 91-106.
- Landsiedel, R., Sauer, U.G., Ma-Hock, L., Schneckeburger, J. und Wiemann, M.** (2014) Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. *Nanomedicine (Lond)* 9: 2557-2585.
- Lenz, A.G., Karg, E., Lentner, B., Dittrich, V., Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Schulz, H., Ferron, G.A. und Schmid, O.** (2009) A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 6: 32.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. und Todaro, G.** (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17: 62-70.
- Lin, G.H., Voss, K.A. und Davidson, T.J.** (1991) Acute inhalation toxicity of cetylpyridinium chloride. *Food Chem Toxicol* 29: 851-854.
- Liu, F.F., Peng, C., Escher, B.I., Fantino, E., Giles, C., Were, S., Duffy, L. und Ng, J.C.** (2013) Hanging drop: an in vitro air toxic exposure model using human lung cells in 2D and 3D structures. *J Hazard Mater* 261: 701-710.
- Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M. und Jarvinen, T.** (2005) Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2: 335-351.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C. und Lacroix, G.** (2016) Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part Fibre Toxicol* 13: 58.
- Ma, Z., Hu, Y., Jiang, G., Hou, J., Liu, R., Lu, Y. und Liu, C.** (2012) Spontaneous generation of germline characteristics in mouse fibrosarcoma cells. *Sci Rep* 2: 743.
- Majeed, S., Frentzel, S., Wagner, S., Kuehn, D., Leroy, P., Guy, P.A., Knorr, A., Hoeng, J. und Peitsch, M.C.** (2014) Characterization of the Vitrocell® 24/48 in vitro aerosol exposure system using mainstream cigarette smoke. *Chem Cent J* 8: 62.
- Marshall, N.J., Goodwin, C.J. und Holt, S.J.** (1995) A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 5: 69-84.
- Mates, J.M. und Sanchez-Jimenez, F.** (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* 4: D339-345.
- Mathis, C., Poussin, C., Weisensee, D., Gebel, S., Hengstermann, A., Sewer, A., Belcastro, V., Xiang, Y., Ansari, S., Wagner, S., Hoeng, J. und Peitsch, M.C.** (2013) Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from human smokers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304: L489-503.

- McMullen, P.D., Andersen, M.E., Cholewa, B., Clewell, H.J., 3rd, Dunnick, K.M., Hartman, J.K., Mansouri, K., Minto, M.S., Nicolas, C.I., Phillips, M.B., Slattery, S., Yoon, M. und Clewell, R.A.** (2018) Evaluating opportunities for advancing the use of alternative methods in risk assessment through the development of fit-for-purpose in vitro assays. *Toxicol In Vitro* 48: 310-317.
- Mohr, U., Aufderheide, Michaela, Halter, Beat, inventor Mohr, Ulrich; Aufderheide, Michaela; Halter, Beat, assignee.** 2010. Culture/exposure device, in particular for cell and/or bacteria cultures. International patent PCT/EP2009/007054, 2010 Dec 29.
- Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M.J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Leblanc, J.-C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Parent-Massin, D., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R.A., Wright, M., Younes, M., Boon, P., Chrysafidis, D., Gürtler, R., Tobback, P., Arcella, D., Rincon, A.M. und Lambré, C.** (2016) Re-evaluation of β -cyclodextrin (E 459) as a food additive. *EFSA Journal* 14: e04628.
- Mosmann, T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Nakajima, T., Žemva, B. und Tressaud, A.** (2000) *Advanced inorganic fluorides: synthesis, characterization and applications*, 1. Edition, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- Nel, A., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Lin, S., Ji, Z. und Zhang, H.** (2013) Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc Chem Res* 46: 607-621.
- Ochs, M., Nyengaard, J.R., Jung, A., Knudsen, L., Voigt, M., Wahlers, T., Richter, J. und Gundersen, H.J.** (2004) The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 120-124.
- OECD.** (2009a). Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- OECD.** (2009b). Test No. 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- OECD.** (2018a). Guidance Document on Inhalation Toxicity Studies, Series on Testing and Assessment, No. 39, Paris.
- OECD.** (2018b). Test No. 433: Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- Olson, K.R., Anderson, I.B., Benowitz, N.L., Blanc, P.D., Clark, R.F., Kearney, T.E., Kim-Katz, S.Y. und Wu, A.H.** (2007) *Poisoning & Drug Overdose*, 4. Edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- Pape, P.G., Sanger, J.E. und Nametz, R.C.** (1968) Tetrabromophthalic Anhydride in Flame-Retardant Urethane Foams. *Journal of Cellular Plastics* 4: 438-442.
- Parent, R.A.** (2015) *Comparative Biology of the Normal Lung*, 2. Edition, Academic Press.
- Patnaik, P.** (2003) *Handbook of inorganic chemicals*, McGraw-Hill, New York.
- Patton, J.S., Brain, J.D., Davies, L.A., Fiegel, J., Gumbleton, M., Kim, K.J., Sakagami, M., Vanbever, R. und Ehrhardt, C.** (2010) The particle has landed-characterizing the fate of inhaled pharmaceuticals. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23 Suppl 2: S71-87.

- Pauluhn, J.** (2003a) Issues of dosimetry in inhalation toxicity. *Toxicol Lett* 140-141: 229-238.
- Pauluhn, J.** (2003b) Overview of testing methods used in inhalation toxicity: from facts to artifacts. *Toxicol Lett* 140-141: 183-193.
- Pauluhn, J.** (2004) Acute inhalation studies with irritant aerosols: technical issues and relevance for risk characterization. *Arch Toxicol* 78: 243-251.
- Pauluhn, J.** (2005) Overview of inhalation exposure techniques: strengths and weaknesses. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 1: 111-128.
- Pauluhn, J.** (2008) Inhalation toxicology: methodological and regulatory challenges. *Exp Toxicol Pathol* 60: 111-124.
- Paur, H.-R., Cassee, F.R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., Kreyling, W.G., Hänninen, O., Kasper, G. und Riediker, M.** (2011) In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung-A dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science* 42: 668-692.
- Pope, C.A., 3rd, Dockery, D.W., Spengler, J.D. und Raizenne, M.E.** (1991) Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. *Am Rev Respir Dis* 144: 668-674.
- Reichert, M. und Young, J.H.** (1997) *Sterilization technology for the health care facility*, 2. Edition, Aspen Publishers Inc., U.S.
- Reichl, F.-X.** (2009) *Taschenatlas Toxikologie*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Riss, T., O'Brien, M. und Moravec, R.** (2003) Choosing the right cell-based assay for your research. *Cell notes* 6: 6.
- Ritter, D., Knebel, J.W. und Aufderheide, M.** (2001) In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds-development and validation of an optimized system for human lung cells. *Exp Toxicol Pathol* 53: 373-386.
- Roggen, E.L.** (2011) In vitro Toxicity Testing in the Twenty-First Century. *Front Pharmacol* 2: 3.
- Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Mühlfeld, C. und Gehr, P.** (2008a) In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4: 1075-1089.
- Rothen-Rutishauser, B., Müller, L., Blank, F., Brandenberger, C., Mühlfeld, C. und Gehr, P.** (2008b) A newly developed in vitro model of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of nanoparticles. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* 25: 191-196.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L. und Hume, C.W.** (1959) *The principles of humane experimental technique*, vol. 238, Methuen London.
- Sahama, T.G., Lehtinen, M. und Rehtijärvi, P.** (1973) Natural boehmite single crystals from Ceylon. *Contr. Mineral. and Petrol.* 39: 171-174.
- Sasol Germany GmbH.** *Brochure PURAL® CATAPAL® High-Purity Alumina Hydrates 09/18* (2018) Sasol Germany GmbH, Hamburg, 2018.
- Savi, M., Kalberer, M., Lang, D., Ryser, M., Fierz, M., Gaschen, A., Ricka, J. und Geiser, M.** (2008) A novel exposure system for the efficient and controlled deposition of aerosol particles onto cell cultures. *Environ Sci Technol* 42: 5667-5674.
- Schaafsma, G.** (2008) Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal* 18: 458-465.

- Schimanski, J.** (1998) Production of dispersible aluminas and their use in different applications. *Key Engineering Materials* 150: 161-170.
- Schmitz, S.** (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J. und Dichgans, J.** (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267: 4904-4911.
- Seaton, A., MacNee, W., Donaldson, K. und Godden, D.** (1995) Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345: 176-178.
- Shapiro, D.L., Nardone, L.L., Rooney, S.A., Motoyama, E.K. und Munoz, J.L.** (1978) Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 530: 197-207.
- Simon-Hettich, B., Steger-Hartmann, T., Foth, H., Kahl, R., Kramer, P.-J., Lilienblum, W., Schrenk, D., Schulz, T. und Schweinfurth, H.** (2005) Computersysteme zur Vorhersage toxischer Effekte. Stellungnahme der Beratungskommission der Gesellschaft für Toxikologie in der DGPT zum Einsatz von Computersystemen zur Vorhersage und Beurteilung toxischer Effekte von chemischen Stoffen.
- Spatz, S.M., Stone, H., Koral, M., Steiner, R.I. und Ackerman, H.W.** (1969) Use of Tetrabromophthalic Anhydride (TBPA) in the Construction of Fire-Retardant Polyester and Epoxy Resins. *Product R&D* 8: 381-391.
- Sreenivasan, P.K., Haraszthy, V.I. und Zambon, J.J.** (2013) Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Lett Appl Microbiol* 56: 14-20.
- Steinritz, D., Möhle, N., Pohl, C., Papritz, M., Stenger, B., Schmidt, A., Kirkpatrick, C.J., Thiermann, H., Vogel, R., Hoffmann, S. und Aufderheide, M.** (2013) Use of the Cultex® Radial Flow System as an in vitro exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility. *Chem Biol Interact* 206: 479-490.
- Stone, K.C., Mercer, R.R., Gehr, P., Stockstill, B. und Crapo, J.D.** (1992) Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 235-243.
- Tackmann, W.** (1991) *Auxilium Repetitorium - Repetitorium der Histologie 2: Organe und Systeme*, 4. Auflage, Auxilium-Repetitorien, Berlin.
- Taylor, K., Stengel, W., Casalegno, C. und Andrew, D.** (2014) Experiences of the REACH testing proposals system to reduce animal testing. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* 31: 107-128.
- TRGS 900.** (2018). Technische Regeln für Gefahrstoffe Arbeitsplatzgrenzwerte (TRGS 900), Fassung vom 07.06.2018.
- Tsoutsouloupoulos, A., Gohlsch, K., Möhle, N., Breit, A., Hoffmann, S., Krischenowski, O., Mückter, H., Gudermann, T., Thiermann, H., Aufderheide, M. und Steinritz, D.** (2019) Validation of the CULTEX® Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles. *Toxicol In Vitro* 58: 245-255.
- Tsuda, A. und Gehr, P.** (2014) *Nanoparticles in the lung: environmental exposure and drug delivery*, CRC Press.
- U.S. EPA.** (1998). United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1300 Acute Inhalation Toxicity [EPA 712-C-98-193]

- Upadhyay, S. und Palmberg, L.** (2018) Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicol Sci* 164: 21-30.
- Vistica, D.T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. und Boyd, M.R.** (1991) Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 51: 2515-2520.
- Warheit, D.B.** (1989) Interspecies comparisons of lung responses to inhaled particles and gases. *Crit Rev Toxicol* 20: 1-29.
- Weibel, E.R.** (2013) A retrospective of lung morphometry: from 1963 to present. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305: L405-408.
- WHO.** (2002) The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Winton, H.L., Wan, H., Cannell, M.B., Gruenert, D.C., Thompson, P.J., Garrod, D.R., Stewart, G.A. und Robinson, C.** (1998) Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability. *Clin Exp Allergy* 28: 1273-1285.
- Wright, B.M.** (1950) A New Dust-Feed Mechanism. *Journal of Scientific Instruments* 27: 12-15.
- Xie, L., Dai, Z., Pang, C., Lin, D. und Zheng, M.** (2018) Cellular glucose metabolism is essential for the reduction of cell-impermeable water-soluble tetrazolium (WST) dyes. *Int J Biol Sci* 14: 1535-1544.
- Yin, L.M., Wei, Y., Wang, Y., Xu, Y.D. und Yang, Y.Q.** (2013) Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *Int J Med Sci* 10: 68-72.

Tabelle 9.1 Übersicht der ECHA Dossiers der Testsubstanzen

Testsubstanz	ECHA Dossier
Böhmit	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15111/7/3/3 (vom 06/08/2018)
Cetylpyridiniumchlorid	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/17221/7/3/3 (vom 04/10/2018)
β-Cyclodextrin	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/1942/7/3/3 (vom 13/06/2018)
di-Ammoniumphosphat	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15555/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Kaliumpyrophosphat	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14700/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Kupfer-II-hydroxid	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14119/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Kupfer-II-oxid (nano)	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15443/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Kupfer-II-sulfat	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15416/7/3/3 (vom 04/10/2018)
D(+)-Laktose Monohydrat	https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.133.265 (vom 13/05/2017)
Natriumfluorophosphat	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/2125/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Natriummetavanadat	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/10973/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Natrium-N-lauroylsarcosinat	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14123/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Neodymoxid	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14946/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Siliziumdioxid	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15556/7/3/3 (vom 21/03/2019)
Tetraacetyethylendiamin	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14315/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Tetrabromphthalsäureanhydrid	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/2076/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Vanadium-III-oxid	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/13629/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Wolfram-IV-carbid	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15382/7/3/3 (vom 04/10/2018)
Zinkdimethyldithiocarbamat	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/2153/7/3/3 (vom 04/10/2018)

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

3R	Vermeidung, Verringerung, Verfeinerung (<i>replacement, reduction, refinement</i>)
3D	3-dimensional
%	Prozent
♂	männlich
♀	weiblich
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
ADI	erlaubte Tagesdosis (<i>acceptable daily intake</i>)
ALI	<i>air liquid interface</i>
ALICE	<i>air liquid interface cell exposure system</i>
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
APS	<i>Aerodynamic Particle Sizer</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CLP	Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung (<i>Classification, Labelling and Packaging</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CULTEX® CG	CULTEX® <i>Cell Gravimetric</i>
CULTEX® DG	CULTEX® <i>Dust Generator</i>
CULTEX® HyP	CULTEX® <i>Hydraulic Press</i>
CULTEX® RFS	CULTEX® <i>Radial Flow System</i>
DALY	<i>disability-adjusted life year</i>
DIN EN	Deutsches Institut für Normung Europäische Norm
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECHA	Europäische Chemikalienagentur (<i>European Chemical Agency</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
EM	Expositionsmedium
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
g	Gramm
h	Stunde
HBE	humane Bronchialepithelzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IK	Inkubatorkontrolle
ISO	Internationale Organisation für Normung
KM	Kulturmedium
l	Liter
LC	letale Konzentration (<i>lethal concentration</i>)
M	Mol
m	Meter
MAK	maximale Arbeitsplatz-Konzentration
min	Minute
mPMS	1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat
N	Newton
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAD(H)P	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD	optische Dichte
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>)
ppm	<i>parts per million</i>

QSAR	quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung (<i>quantitative structure activity relationship</i>)
REACH	Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SAEC	kleine Atemwegsepithelzellen (<i>small airway epithelial cells</i>)
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehung (<i>structure activity relationship</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SOD	Superoxiddismutase
SUB	submers
t	Tonne
TAED	Tetraacetylenylendiamin
TG	Prüfrichtlinie (<i>Test Guideline</i>)
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
u.a.	unter anderem
WST	wasserlösliches Tetrazoliumsalz (<i>water soluble tetrazolium salt</i>)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Eindringtiefe der Partikel in den Atemtrakt in Abhängigkeit von der Partikelgröße (entnommen aus BeruBe et al. 2009)	4
Abbildung 3.2 Vergleich der Partikelexposition von Zellen bei submerser Kulturbedingung (links) und an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (rechts) (entnommen aus Paur et al. 2011).....	11
Abbildung 3.3 Darstellung des Expositionssystems CULTEX® RFS (entnommen aus Mohr 2010 (links) bzw. Aufderheide et al. 2017 (rechts)).....	13
Abbildung 5.1 Chemische Umwandlung des Tetrazoliums Salzes WST-1 zum Formazan.....	29
Abbildung 5.2 Aufbau der Expositionsanlage CULTEX® RFS bestehend aus dem Partikelgenerator (CULTEX® DG) und den zwei Expositionseinheiten (Module) für das Testaerosol (Testsubstanz) bzw. der Kontrolle (Druckluft)	30
Abbildung 5.3 CULTEX® HyP (links) und Presszylinder mit Pressling (rechts).....	31
Abbildung 5.4 CULTEX® DG	32
Abbildung 5.5 Schaber mit verschraubter Messerklinge Typ 1 (links); Messerklingen (rechts).....	33
Abbildung 5.6 Expositionseinheit CULTEX® RFS.....	35
Abbildung 5.7 Schematische Darstellung eines Zellkulturinsets bei submerser und <i>air liquid interface</i> Kultivierung (links); Zellkulturinsets Costar® <i>Transwell Permeable Supports</i> (rechts)....	37
Abbildung 5.8 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung der ALI Exposition.....	39
Abbildung 5.9 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung der SUB Exposition	40
Abbildung 6.1 OD-Werte der A549-Zellen nach Druckluftexposition im CULTEX® RFS (25 mM HEPES EM)	47
Abbildung 6.2 OD-Werte der A549-Zellen nach Druckluftexposition im CULTEX® RFS (100 mM HEPES EM)	48
Abbildung 6.3 Vergleich der Formazanausbeute der druckluftexponierten A549-Zellen zwischen den sechs Expositionskammern des CULTEX® RFS	49
Abbildung 6.4 Vergleich der Formazanausbeute der A549- und L929-Zellen nach Druckluftexposition im CULTEX® RFS.....	50
Abbildung 6.5 OD-Werte der A549- und L929-Zellen nach Druckluftexposition im CULTEX® RFS..	51
Abbildung 6.6 Exposition der A549-Zellen mit Böhmit.....	52
Abbildung 6.7 Exposition der A549-Zellen mit β -Cyclodextrin	53
Abbildung 6.8 Exposition der A549-Zellen mit Kaliumpyrophosphat	54
Abbildung 6.9 Exposition der A549-Zellen mit Kupfer-II-hydroxid	55
Abbildung 6.10 Exposition der A549-Zellen mit Natriummetavanadat.....	56
Abbildung 6.11 Exposition der A549-Zellen mit Natrium-N-lauroylsarcosinat.....	57
Abbildung 6.12 Exposition der A549-Zellen mit Neodymoxid	58
Abbildung 6.13 Exposition der A549-Zellen mit Siliziumdioxid.....	59
Abbildung 6.14 Exposition der A549-Zellen mit Tetraacetylenylendiamin	60

Abbildung 6.15 Exposition der A549-Zellen mit Tetrabromphthalsäureanhydrid.....	61
Abbildung 6.16 Exposition der A549-Zellen mit Cetylpyridiniumchlorid.....	62
Abbildung 6.17 Exposition der A549-Zellen mit di-Ammoniumphosphat	63
Abbildung 6.18 Exposition der A549-Zellen mit Kupfer-II-oxid (nano)	64
Abbildung 6.19 Exposition der A549-Zellen mit Kupfer-II-sulfat	65
Abbildung 6.20 Exposition der A549-Zellen mit D(+)-Laktose Monohydrat	66
Abbildung 6.21 Exposition der A549-Zellen mit Natriumfluorophosphat	67
Abbildung 6.22 Exposition der A549-Zellen mit Vanadium-III-oxid	68
Abbildung 6.23 Exposition der A549-Zellen mit Wolfram-IV-carbid.....	69
Abbildung 6.24 Exposition der A549-Zellen mit Wolfram-IV-carbid (nano)	70
Abbildung 6.25 Exposition der A549-Zellen mit Zinkdimethyldithiocarbamat.....	71
Abbildung 6.26 (Teil 1) Exposition der L929-Zellen mit Böhmit.....	72
Abbildung 6.26 (Teil 2) Exposition der L929-Zellen mit Böhmit.....	73
Abbildung 6.27 Exposition der L929-Zellen mit β -Cyclodextrin.....	74
Abbildung 6.28 Exposition der L929-Zellen mit Kaliumpyrophosphat.....	75
Abbildung 6.29 Exposition der L929-Zellen mit Kupfer-II-hydroxid.....	76
Abbildung 6.30 Exposition der L929-Zellen mit Natriummetavanadat	77
Abbildung 6.31 Exposition der L929-Zellen mit Natrium-N-lauroylsarcosinat	78
Abbildung 6.32 (Teil 1) Exposition der L929-Zellen mit Neodymoxid.....	79
Abbildung 6.32 (Teil 2) Exposition der L929-Zellen mit Neodymoxid.....	80
Abbildung 6.33 Exposition der L929-Zellen mit Siliziumdioxid	81
Abbildung 6.34 Exposition der L929-Zellen mit Tetraacetylenhendiämin.....	82
Abbildung 6.35 Exposition der L929-Zellen mit Tetrabromphthalsäureanhydrid	83
Abbildung 6.36 SUB Exposition der L929-Zellen mit Cetylpyridiniumchlorid bzw. Zinkdimethyldithiocarbamat.....	84
Abbildung 6.37 SUB Exposition der L929-Zellen mit Kupfer-II-oxid (nano) bzw. Kupfer-II-sulfat....	85
Abbildung 6.38 SUB Exposition der L929-Zellen mit di-Ammoniumphosphat, D(+)-Laktose Monohydrat, Natriumfluorophosphat, Wolfram-IV-carbid, Wolfram-IV-carbid (nano), Vanadium-III-oxid.....	86
Abbildung 7.1 Formazandefizite nach ALI Exposition der A549- bzw. L929-Zellen mit 10 verschiedenen Substanzen.....	89
Abbildung 7.2 Formazandefizite nach ALI Exposition bzw. SUB 1 der A549- und L929-Zellen mit verschiedenen Substanzen.....	91
Abbildung 7.3 Formazandefizite nach ALI Exposition bzw. SUB 2 oder SUB 3 der A549-Zellen mit 20 verschiedenen Substanzen.....	93
Abbildung 7.4 Formazandefizite nach ALI Exposition bzw. SUB 2 oder SUB 3 der L929-Zellen mit 10 verschiedenen Substanzen.....	94

Abbildung 7.5 Reduktion von WST-1 zu Formazan durch mPMS (1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat) (entnommen aus Kennett 2004) 97

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Vergleich der TG 403, TG 433 und TG 436 zur Prüfung der Akuten Toxizität (Inhalation)	9
Tabelle 4.1 Übersicht der verwendeten Testsubstanzen für die Expositionsversuche	27
Tabelle 5.1 Parameter für die Generierung der Presslinge mit der CULTEX® HyP bzw. der Testaerosole am CULTEX® DG.....	32
Tabelle 5.2 Expositionsparameter für die Testsubstanzen der ALI Exposition	34
Tabelle 5.3 Expositionsparameter für die Testsubstanzen der SUB Exposition.....	41
Tabelle 5.4 Übersicht der Löslichkeit der Testsubstanzen	42
Tabelle 5.5 Übersicht der drei Versuchsbedingungen bei der SUB Exposition.....	43
Tabelle 6.1 Übersicht der Testsubstanzen	45
Tabelle 7.1 Aufbau der Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität	99
Tabelle 7.2 Einteilung der Testsubstanzen nach Gefahrenhinweisen basierend auf ECHA-Daten	100
Tabelle 7.3 Berechnung der Sensitivität [%] aus den Expositionsversuchen mit A549- und L929-Zellen.....	101
Tabelle 7.4 Berechnung der Spezifität [%] aus den Expositionsversuchen mit A549- und L929-Zellen	102
Tabelle 9.1 Übersicht der ECHA Dossiers der Testsubstanzen.....	115

10.4 Publikationsverzeichnis

10.4.1 Originalarbeiten

Gohlsch, K., Mückter, H., Steinritz, D., Aufderheide, M., Hoffmann, S., Gudermann, T. und Breit, A. (2019) Exposure of 19 substances to lung A549 cells at the air liquid interface or under submerged conditions reveals high correlation between cytotoxicity *in vitro* and CLP classifications for acute lung toxicity. *Toxicol Lett* 316: 119-126.

Tsoutsoulopoulos, A., **Gohlsch, K.**, Möhle, N., Breit, A., Hoffmann, S., Krischenowski, O., Mückter, H., Gudermann, T., Thiermann, H., Aufderheide, M. und Steinritz, D. (2019) Validation of the CULTEX® Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles. *Toxicol In Vitro* 58: 245-255.

Halwachs, S., Kneuer, C., **Gohlsch, K.**, Müller, M., Ritz, V. und Honscha, W. (2016) The ABCG2 efflux transporter from rabbit placenta: Cloning and functional characterization. *Placenta* 38: 8-15.

10.4.2 Tagungsbeiträge

10.4.2.1 Vortrag

Gohlsch, K. „Keine Tierversuche in der Inhalationstoxikologie – Tausende Tiere können aufatmen“. 1. Science Slam, Forum Junge Wissenschaft, 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Göttingen, 26.02.-01.03.2018

10.4.2.2 Poster

Aufderheide, M., Möhle, N., Tsoutsoulopoulos, A., **Gohlsch, K.**, Krischenowski, O., Breit, A., Mückter, H., Gudermann, T., Hoffmann, S., Thiermann, H. und Steinritz, D. „The Cultex® RFS based validated alternative method for screening acute toxicity of inhalable dusts *in vitro*“. 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Stuttgart, 25.02.-28.02.2019

Hoffmann, S., Tsoutsoulopoulos, A., **Gohlsch, K.**, Möhle, N., Breit, A., Krischenowski, O., Steinritz, D. und Aufderheide, M. „Validation of the CULTEX® Radial Flow System as an *in vitro* method to screen chemical dusts for their acute inhalation toxicity“. 20th International Congress on In Vitro Toxicology (ESTIV 2018), Berlin, 15.10.-18.10.2018

Gohlsch, K., Gudermann, T., Mückter, H. und Breit, A. „Toxicity in A549 cells: a head to head comparison of air liquid interface and submerged exposure“. 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Göttingen, 26.02.-01.03.2018

Tsoutsoulopoulos, A., **Gohlsch, K.**, Möhle, N., Breit, A., Mückter, H., Gudermann, T., Krischenowski, O., Hoffmann, S., Thiermann, H., Aufderheide, M. und Steinritz, D. „The CULTEX® Radial Flow System (RFS) as *in vitro* screening approach to analyze the acute toxicity of inhalable substances”. 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Göttingen, 26.02.-01.03.2018

Tsoutsoulopoulos, A., Möhle, N., **Gohlsch, K.**, Breit, A., Mückter, H., Gudermann, T., Krischenowski, O., Hoffmann, S., Thiermann, H., Steinritz, D. und Aufderheide, M. „The CULTEX® Radial Flow System as *in vitro* model for the assessment of lung toxicity”. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Bratislava (Slowakei), 10.09.-13.09.2017

Tsoutsoulopoulos, A., Möhle, N., **Gohlsch, K.**, Breit, A., Mückter, H., Gudermann, T., Krischenowski, O., Hoffmann, S., Thiermann, H., Steinritz, D. und Aufderheide, M. „Further validation of the CULTEX® RFS method and optimization of a prediction model to evaluate the acute toxicity of inhalable dusts”. 10th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Seattle (WA, USA), 20.08.-24.08.2017

Gohlsch, K., Tsoutsoulopoulos, A., Steinritz, D., Thiermann, H., Breit, A., Mückter, H., Gudermann, T., Krischenowski, O., Möhle, N., Hoffmann, S., und Aufderheide, M. „The CULTEX® Radial Flow System (RFS): an innovative 3R-conform future *in vitro* model for the assessment of acute lung toxicity”. 16th Medical Chemical Defense Conference 2017, München, 05.04.-06.04.2017

Tsoutsoulopoulos, A., **Gohlsch, K.**, Krischenowski, O., Möhle, N., Hoffmann, S., Breit, A., Mückter, H., Gudermann, T., Thiermann, H., Steinritz, D. und Aufderheide, M. „Progress Report – Ongoing Validation of the CULTEX® Radial Flow System (RFS)”. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Heidelberg, 06.03.-09.03.2017

10.5 Eidesstattliche Versicherung

Gohlsch, Katrin

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Untersuchung der Zytotoxizität von Stäuben auf A549 und L929 Zellen“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, 16.10.2020

Katrin Gohlsch

10.6 Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mich während der Zeit meiner Dissertation unterstützend begleitet und so entscheidend zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Thomas Gudermann für die Ermöglichung der Promotion am Walther-Straub-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Dr. Harald Mückter, der die fachliche Betreuung übernahm und mich durch viele konstruktive Anregungen, wertvolle Ratschläge und wissenschaftliche Diskussionen bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützte.

Ein großes Dankeschön geht an meine Doktormutter Frau Professorin Dr. Ingrid Boekhoff, die die Betreuung meiner Dissertation weiterführte und mich durch viele fachliche Diskussionen, persönliche Worte und bestärkende Gespräche hilfreich zur Seite stand.

Im Voraus möchte ich mich herzlich bei den weiteren Gutachtern der Prüfungskommission für die Mühe bei der Begutachtung der Dissertation bedanken.

Mein freundschaftlicher Dank geht an die im Rahmen des Verbundprojekts beteiligten Kooperationspartner für die gute Zusammenarbeit:

Frau Professorin Dr. Michaela Aufderheide, Herrn Dr. Niklas Möhle und Herrn Olaf Krischenowski von Cultex Laboratories, Hannover (jetzt Cultex Technology, Hannover)

Herrn Dr. Sebastian Hoffmann von seh consulting + services, Paderborn

Herrn Dr. Dirk Steinritz und Frau (alsbald Dr.) Amelie Tsoutsouloupoulos vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr München

Ein großes Dankeschön geht an:

Herrn Dr. Andreas Breit für die praktische Betreuung im Labor und der freien Hand bei der (Ver-) Planung und Durchführung der Experimente in „meinem“ Labor im 1.Stock.

Frau Ute Künzel-Mulas für die netten Gespräche, aufmunternden Worte, Unterstützung bei den kleinen und großen Versuchen und der Verlässlichkeit mit dem Motto „auf die Minute Ute“.

Frau Irimi Bassios für die vielen bestärkenden Gespräche und das gemeinsame Basteln am weihnachtlichen Sternenhimmel.

Frau Jutta Schreier, Frau Monika Krämer und Frau Josephine Lakatos für die Hilfe bei bürokratischen Dramen und den erheiternden Erkenntnissen im Verwaltungsalltag.

Frau Doris Estermann für die morgendlichen Schwätzchen zwischen Tee- und Spülküche, die den Start in den Laboralltag stets mit einem Lächeln beginnen ließen.

Herrn Peter Mann für die handwerklichen Ratschläge, Reparaturarbeiten, wenn bei „mir“ mal wieder eine Schraube locker war und die Verlässlichkeit, dass mir nie die (Labor-)Luft ausging.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiter*innen des Walther-Straubs-Instituts für die Aufnahme in den Arbeitskreis, die kollegiale Zusammenarbeit und die über den Laboralltag hinausgehenden Gespräche.

Meiner Familie für die Stärkung und das Freihalten des Rückens, für Zuspruch, Trost und dem kakaohaltigen Labsal. Ein ganz besonders herzliches Dankeschön an Bine: Du bist der Baldrian für meine Seele. Danke für das Aufspannen des Regenschirms bei Wolkenbrüchen des Lebens, die Erinnerung an „es gibt immer noch das KaSaKu!“ und der Gewissheit, dass du immer da bist - egal wie viele Kilometer uns trennen.

Annett für die Jahrzehnte lange, durch Höhen und Tiefen gehende und alle Widrigkeiten überdauernde Freundschaft, für die offenen Ohren und den vielen Gedankenaustauschen über alle Themen der Welt, für die stets offenen Türen (insbesondere bei Spontanübernachtungen bei „bombigen“ Ereignissen) und nicht zu vergessen den vierpfotigen Therapeuten.

Sarah für die Ablenkungen vom Ernst des Lebens, für die unzähligen „wir sind dafür nicht zu alt“-Momente, das Gedankenfunken ohne Antenne, den Tränen der Freude und des Leids, dem FlyInn bei MacDragon und der Feststellung den 2-Stunden-Timer nicht besiegen zu können.

Veronika für die langjährige Freundschaft in der Aufrichtigkeit, Klarheit, Verlässlichkeit, eine helfende Hand und die offenen Ohren stets eine feste Basis für die innere Stärkung, den Optimismus und die Hoffnung in das Gute im Leben bilden.

Mein größtes Dankeschön geht an mein Karlchen. Ich danke dir für dein Vertrauen und den Glauben an das Positive im Leben, das (manchmal) auch auf mich überschwappte, die Gewissheit dich immer (selbst jetzt noch) an meiner Seite zu haben, die James Blunt-CD, die mich auf ewig mit dir verbindet und mich überall hinbegleitet und nicht zuletzt die Motivation „In 10 Jahren, wenn wir...“. Danke für die vielen gemeinsamen Jahre und die schöne Zeit, die ich mit dir verbringen durfte.