

**Etablierung und Charakterisierung eines Systems
zur toxikologischen Untersuchung von Feststoffpartikelaerosolen
an Zellen des menschlichen Respirationstraktes**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. Niklas Möhle
geboren am 11.09.1978 in Hannover**

2013

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Kasper
Institut für Angewandte Mikrobiologie
Universität für Bodenkultur (BOKU)
Wien, Österreich

Tag der Promotion: 14.06.2013

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, Januar 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	20
2. Aufgabenstellung	22
3. Theoretische Grundlagen	23
3.1. Spannungsfeld <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	23
3.2. Gesetzliche Grundlage im Rahmen der EG-Verordnung „REACH“.....	24
3.3. Inhalationstoxikologie.....	25
3.4. Prinzip der Direktexposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht.....	26
3.5. Alternative Methoden.....	27
3.6. Cultex® Technologie	29
3.6.1. Einsatzmöglichkeiten der Direktexposition bei der Testung von Zigarettenrauch und Gasen	31
3.6.2. Einsatzmöglichkeiten der Direktexposition bei der Testung von Partikel	32
3.7. Aerosole und Nanopartikel-aerosol.....	33
3.8. Möglichkeiten der Aerosolgeneration.....	35
3.8.1. Methoden zur Bestimmung der Partikelanzahl und -masse	36
3.9. Zellsysteme des menschlichen Respirationstrakts	38
3.10. A549-Zelllinie	40
3.11. Zellkultur	41
3.12. Zellbiologische Endpunkte.....	42
4. Experimenteller Teil	45
4.1. Entwicklung und Etablierung eines ersten experimentellen Aufbaus zur Exposition mit Partikeln aus Feststoff-aerosolen.....	45
4.2. Weiterentwicklung der Cultex® CG Glasmodule zum Cultex® <i>Radial Flow System</i> ... 47	
4.2.1. Aerosolführungsmodul	49
4.2.2. Probenaufnahme- und Sockelmodul.....	51

4.2.3. Hebevorrichtung	54
4.3. Entwicklung des Cultex [®] DG - <i>Dust Generators</i>	56
4.3.1. Partikelgenerator.....	57
4.3.2. Elutriator (Selektionsgefäß).....	58
4.3.3. Gesamtaufbau der Expositionsanlage.....	62
4.4. Erste Serie von Abscheideexperimenten mit dem Cultex [®] RFS.....	63
4.4.1. Erhöhung des Volumenstromes.....	66
4.4.2. Analyse der Strömungsmuster.....	68
4.5. CFD-Analyse zur Verteilung der Partikel im System.....	70
1. Annahme: Weg der Partikel in die Kammern	70
2. Annahme: Herkunft der Partikel in den Kammern	71
3. Annahme: Größenabhängige Verteilung der Partikel	73
4. Annahme: Strömung im Elutriator.....	75
4.6. Strömungstechnische Optimierung des Cultex [®] RFS	78
4.7. Berechnung der Abscheideeffizienz durch Sedimentation und Diffusion.....	81
4.7.1. Sedimentation	82
4.7.2. Diffusion.....	83
4.8. Exposition von Zellen	86
4.8.1. Vorbereitung der Exposition	86
4.8.2. Expositionsdurchführung.....	87
4.9. Exposition von Zellen mit Druckluft aus dem Kompressor.....	88
4.9.1. Theoretische Berechnung der Abgabe von Wasserdampf von den Zellkulturen	90
4.10. Exposition von Zellen mit Atemluft aus Gasflaschen.....	92
4.11. Exposition von Zellen mit verstäubten Feststoffen	94
4.11.1. Herstellung der Substanzpresslinge	94
4.11.2. Bestimmung der Eigenschaften der Testsubstanzen.....	96

4.12.	Durchführung der Exposition	97
4.12.1.	Disperal®	97
4.12.2.	Pural 200®	99
4.12.3.	Bariumsulfat.....	101
4.12.4.	Kupfer(II)sulfat	103
4.12.5.	Laktose Monohydrat	105
4.12.6.	Kupfer(II)oxid.....	108
4.12.7.	LDH-Assay nach der Exposition mit ausgewählten Substanzen.....	110
4.12.8.	Aktin- Immunfluoreszenzfärbung (Phalloidin).....	113
4.13.	Erweiterungen am Cultex® RFS	115
4.13.1.	Einsatz eines Impaktors zur Eingrenzung der Partikelgröße	115
4.13.2.	Einsatz einer elektrostatischen Abscheidung.....	118
4.13.3.	Einsatz von Temperatur- und Feuchte-Sensoren	124
5.	Zusammenfassung und Ausblick	126
6.	Anhang.....	130
6.1.	Statistik.....	130
6.2.	Technische Zeichnungen.....	130
6.3.	CFD-Analysen	130
6.4.	Charakterisierung der abgeschiedenen Partikelmasse.....	131
6.4.1.	Bestimmung der Partikelanzahl und -masse mit einem <i>Aerodynamic Particle Sizer</i> (APS)	132
6.4.2.	Bestimmung der Partikelanzahl mit einem <i>Laser Aerosol Spectrometer</i> (LAS).....	133
6.5.	Gesetz von Stokes	134
6.6.	Cultex® CG Glasmodule	134
6.7.	<i>Dust Feeder</i> nach Wright	135
6.8.	Druck- und Atemluft	135

6.9.	Temperatur- und Feuchtesensoren	136
6.10.	Zellkultur und Zellkulturführung.....	136
6.10.1.	Vorbereitung von Wachstumsmedium für A549-Zellen	136
6.10.2.	Trypsinierung und Passagierung von A549-Zellen	137
6.10.3.	Bestimmung der Zellzahl mit einem CASY [®] <i>Cell Counter</i>	137
6.10.3.1.	CASY [®] <i>Cell Counter</i> Model TTC	138
6.10.4.	Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen	138
6.10.5.	Aussaat der Zellen in Zellkulturinsets	139
6.10.6.	Vorbereitung von Expositionsmedium für die A549-Zellen	140
6.11.	Cell Proliferation Assay - WST-1	140
6.12.	CytoTox 96 [®] <i>Non-Radioactive</i> Cytotoxicity Assay	141
6.13.	Aktinfärbung mit FITC-Phalloidin.....	141
6.14.	Abkürzungsverzeichnis	143
6.15.	Geräte und Laborausstattung	145
6.16.	Substanzen für die Exposition	147
6.17.	Verbrauchsmaterialien.....	147
6.18.	Reagenzien und Kits	148
6.19.	Nährmedien	149
7.	Literaturverzeichnis	150

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Darstellung eines Cultex [®] CG Glasmodul für 12 mm Zellkulturinserts mit Bodenansicht auf das davor positionierte Oberteil mit den drei Aerosoldüsen und Absauglöchern.....	31
Abbildung 3-2: Single-wall (A) und multi-wall (B) carbon nanotubes (Reilly 2007).	34
Abbildung 3-3: Mikroskopische Aufnahme von A549-Zellen in einer Zellkulturflasche (100fache Vergrößerung).....	41
Abbildung 4-4: Abbildung des Aufbaus mit einem Cultex [®] CC 24mm Modul. Dargestellt sind die Aerosolzuleitung und die Absaugung am Modul.	46
Abbildung 4-5: Abscheidungen auf Filterpapiere in einem Cultex [®] CC 24mm Modul inklusive Auswaage der Filterpapiere.	47
Abbildung 4-6: Gesamter modularer Aufbau des Cultex [®] RFS (Einlassadapter, Aerosolführungs-, Probenaufnahme-, Sockel-Modul und Hebevorrichtung). (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	49
Abbildung 4-7: Aerosolführungs-Modul in der Aufsicht. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	50
Abbildung 4-8: Aerosolführungs-Modul in der Bodenansicht. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	51
Abbildung 4-9: Probenaufnahme-Modul im Querschnitt. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	53
Abbildung 4-10: Probenaufnahme-Modul mit Mediumversorgung im Querschnitt. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	53
Abbildung 4-11: Hebevorrichtung. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	55
Abbildung 4-12: Cultex [®] DG Dust Generator. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	57
Abbildung 4-13: Elutriator im Querschnitt. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)	59
Abbildung 4-14: Aerosolgenerator in Kombination mit dem Elutriator. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	62

Abbildung 4-15: Gesamtaufbau mit zwei Cultex® RFS und dem Aerosolgenerator Cultex® DG.....	63
Abbildung 4-16: Nachbildungen der Zellkulturinserts mit Deckel und Filterpapier. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	64
Abbildung 4-17: Verteilung von Kupferoxid bei aufeinanderfolgenden 60minütigen Expositionen.....	65
Abbildung 4-18: Weg des Aerosols durch das Aerosolführungsmodul mit zwei Messpunkten. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	65
Abbildung 4-19: Aerosoldüse mit Düsenfiltereinsätze und Filterpapier. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	66
Abbildung 4-20: Verteilung von Kupferoxid auf Filterpapieren mit 100 ml/min Kammerstrom.....	67
Abbildung 4-21: Ablagerungen von Partikeln am Kunststoff des Inserts mit 100 ml/min Kammerstrom.....	68
Abbildung 4-22: Strömungsmuster auf Filtern (Natriumfluoreszein). A) Hinter dem Einlassadapter Modul; B) Hinter dem Überschuss.	69
Abbildung 4-23: Strömungslinien von 500 gleichmäßig über den Schlaucheinlassquerschnitt verteilten Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	70
Abbildung 4-24: Skizze der Sekundärströmung in einem Schlauch. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	71
Abbildung 4-25: Strömungslinien von 100 Partikeln mit zufälligen Startpunkten am Auslassquerschnitt. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	72
Abbildung 4-26: Strömungslinien von 100 Partikeln mit zufälligen Startpunkten am Auslassquerschnitt. Zurück verfolgt bis zum Schlauchanfang. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	73
Abbildung 4-27: Strömungslinien von 2 µm Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	74
Abbildung 4-28: Strömungslinien von 10 µm Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).....	74

- Abbildung 4-29:** Strömungslinien von 500 gleichmäßig über den Einlassquerschnitt des Elutriators verteilten Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH) 76
- Abbildung 4-30:** Strömungslinien von 50 gleichmäßig über den Auslassquerschnitt des Elutriators verteilten Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH) 77
- Abbildung 4-31:** Strömungslinien von jeweils 100 gleichmäßig über den Einlassquerschnitt des Elutriators verteilten Partikeln. A) 2 μm ; B) 5 μm ; C) 10 μm . (Zeichnung: Halter Engineering GmbH) 78
- Abbildung 4-32:** Einlassadapter mit eingesetzter Düse. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)..... 79
- Abbildung 4-33:** Abscheideeffizienz von Partikeln durch Einfluss der Sedimentation (blau) und der Diffusion (rot) in Abhängigkeit vom Durchmesser der Partikel..... 85
- Abbildung 4-34:** WST-1 Ergebnisse nach der Exposition mit Druckluft aus dem Kompressor. Dargestellt ist die Schädigung durch die Druckluft (rot) im Vergleich zu nicht exponierten Zellen (grün) in Prozent. 89
- Abbildung 4-35:** Skizze der Volumenelemente (rot) zwischen der Oberfläche der Flüssigkeit und der Aerosoldüse (Deckwand). Der Strömungsverlauf ist parallel zur Oberfläche durch schwarze Pfeile dargestellt. Die Entfernung von der Oberfläche ist durch rote Punkte in den Volumenelementen angezeigt. 91
- Abbildung 4-36:** WST-1 Ergebnisse nach der Exposition mit Atemluft (DIN 12021) aus einer Druckluftflasche. Dargestellt ist die Schädigung durch die Druckluft (rot) im Vergleich zu nicht exponierten Zellen (grün) in Prozent. 93
- Abbildung 4-37:** A) Darstellung der für die Pressung der Pulver verwendeten hydraulischen Presse Cultex[®] HyP - *Hydraulic Press* mit der Druckanzeige B) Darstellung der hydraulischen Presse Cultex[®] HyP - *Hydraulic Press*. (Querschnitt). C) Darstellung der herausgezogenen Pressschublade mit Presszylinder und Presskolben (Querschnitt). D) Darstellung des Presszylinders während eines Pressvorgangs (Querschnitt). 95
- Abbildung 4-38:** Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Disperal. 98

Abbildung 4-39: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Exposition mit Disperal [®] (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.	99
Abbildung 4-40: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Pural 200 [®]	100
Abbildung 4-41: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Exposition mit Pural 200 [®] (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.	101
Abbildung 4-42: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Bariumsulfat.	102
Abbildung 4-43: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Exposition mit Bariumsulfat (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.	103
Abbildung 4-44: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Kupfer(II)sulfat.	104
Abbildung 4-45: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Exposition mit Kupfer(II)sulfat (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.	105
Abbildung 4-46: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Laktose Monohydrat.	106
Abbildung 4-47: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Exposition mit Laktose Monohydrat (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.	107
Abbildung 4-48: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Kupfer(II)oxid.	108

- Abbildung 4-49:** Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Exposition mit Kupfer(II)oxid (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen. 109
- Abbildung 4-50:** Freisetzung von Laktat - Dehydrogenase (LDH) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Exposition mit Bariumsulfat (blau) und Atemluft (rot) und im Vergleich zur Lyse und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die LDH-Konzentration der Lyse dient als Anhaltspunkt für die maximale Freisetzung von Laktat - Dehydrogenase und wurde für die Darstellung als 100% angenommen. 111
- Abbildung 4-51:** Freisetzung von Laktat - Dehydrogenase (LDH) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Exposition mit Kupfer(II)oxid (blau) und Atemluft (rot) und im Vergleich zur Lyse und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die LDH-Konzentration der Lyse dient als Anhaltspunkt für die maximale Freisetzung von Laktat - Dehydrogenase und wurde für die Darstellung als 100% angenommen. 112
- Abbildung 4-52:** Mikroskopische Aufnahme der gefärbten Aktinfilamentstruktur von exponierten A549-Zellen im Vergleich zur Atemluft- und zu nicht exponierten Zellen (400fache Vergrößerung). A) nicht exponierte Zellen, B) Atemluft, C) Kupfer(II)oxid, D) Bariumsulfat. 114
- Abbildung 4-53:** Mehrstufiger Impaktor. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH) 116
- Abbildung 4-54:** Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen mit (rot) und ohne (blau) vorgeschalteten Impaktor. 117
- Abbildung 4-55:** Aufbau der elektrostatischen Abscheidung unterhalb der Membran des Zellkulturinserts im Cultex[®] RFS Modul. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH). 118
- Abbildung 4-56:** Skizze des Aufladungsprozesses im Auflader. Die relevanten Luftionen sind schematisch durch rote Pfeile dargestellt. 119
- Abbildung 4-57:** Abscheideeffizienz von Partikeln durch Einfluss der Sedimentation (blau), der Diffusion (rot) und der elektrischen Kräfte in Abhängigkeit vom Durchmesser der Partikel. 122
- Abbildung 4-58:** Mit dem *Laser Aerosol Spektrometer* bestimmte Partikelanzahl hinter einer Kammer des Cultex[®] RFS mit unterschiedlichen Feldstärken [0V, 100V, 300V, 500V, 700V, 900V]. Die Anzahl [# / cm³ / μm] ist gegen die Partikelgröße [μm] aufgetragen. 123

Abbildung 4-59: Aerosolführungsmodul mit eingebauten Temperatur- und Feuchte-Sensoren
(Zeichnung: Halter Engineering GmbH)..... 124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Mittelwerte der Partikelanzahl der APS-Messungen zu 3 Zeitpunkten an 3 Tagen	56
Tabelle 4-2: Gewichtszunahme der Filter in den einzelnen Kammern nach der Exposition ..	67
Tabelle 4-3: Gewichtszunahme der Filter in den einzelnen Kammern nach 15minütiger Exposition mit variierenden Düsendurchmessern	79
Tabelle 4-4: Gewichtszunahme der Filter in den einzelnen Kammern nach der Exposition mit variierenden Düsenpositionen	80
Tabelle 4-5: Einstellungen des Aerosolgenerators für die einzelnen Testsubstanzen.....	87
Tabelle 4-6: Radien und Sättigungsgrade im vereinfachten Model	91
Tabelle 4-7: Abgeschiedene Massen an Disperal®	98
Tabelle 4-8: Abgeschiedene Massen an Pural 200®	100
Tabelle 4-9: Abgeschiedene Massen an Bariumsulfat	102
Tabelle 4-10: Abgeschiedene Massen an Kupfer(II)sulfat.....	104
Tabelle 4-11: Abgeschiedene Massen an Laktose	106
Tabelle 4-12: Abgeschiedene Massen an Kupfer(II)oxid	108
Tabelle 4-13: Effizienz der Abscheidung in Abhängigkeit vom Durchmesser der Partikel im Vergleich zu Effizienz für die Abscheidung durch Diffusion und Sedimentation.	121
Tabelle 4-14: Temperatur und relative Luftfeuchte während einer 150minütigen Exposition	125
Tabelle 6-15: Anforderungen an die Luft aus Atemflaschen (DIN 12021)	135

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Gewichts eines Partikels aus dem Gesetz von Stokes	60
Formel 2: Gleitkorrekturfaktor für das Gesetz von Stokes	60
Formel 3: Berechnung des Gewichts eines Partikels aus dem Gesetz von Stokes (mit Gleitkorrekturfaktor)	60
Formel 4: Berechnung der mittleren Strömungsgeschwindigkeit.....	61
Formel 5: Berechnung der Querschnittsfläche:.....	61
Formel 6: Berechnung des Grenzdurchmessers	61
Formel 7: Berechnung der Mobilität der Partikel	82
Formel 8: Berechnung des Gewichts der Partikel.....	82
Formel 9: Berechnung der Geschwindigkeit der Partikel	83
Formel 10: Berechnung der Sedimentationsstrecke der Partikel	83
Formel 11: Berechnung des Diffusionskoeffizienten	84
Formel 12: Berechnung der Anzahl an deponierten Partikeln	84
Formel 13: Berechnung der Abscheideeffizienz durch Diffusion	84
Formel 14: Berechnung der Konzentration an Wasserdampf	90
Formel 15: Berechnung der unabhängigen Variable Xi	90
Formel 16: Berechnung des Fehlerintegrals	90
Formel 17: Berechnung der Presskraft.....	95
Formel 18: Berechnung der elektrischen Ladung der Partikel.....	120
Formel 19: Berechnung der Kapazität eines Kugelkondensators	120
Formel 20: Berechnung der Geschwindigkeit der Partikel	120
Formel 21: Berechnung der zurückgelegten Distanz	121
Formel 22: Berechnung des Volumens der Partikel	131
Formel 23: Gesetz von Stokes.....	134
Formel 24: Berechnung des Aussaatvolumens	138

Formel 25: Berechnung des Volumens an benötigter Zellsuspension 139

Formel 26: Berechnung des Volumens an benötigtem Zellkulturmedium 139

Zusammenfassung

Die am 1. Juni 2007 in Kraft getretene EG-Verordnung Nr. 1907/2006 (REACH-Verordnung) schreibt eine Registrierungspflicht für chemische Stoffe im gesamten Gebiet der europäischen Union vor. Unter dem Leitsatz „Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien“ (REACH = **R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemicals) dürfen nur noch chemische Produkte auf den Markt gebracht werden für die eine Registrierungsnummer vorliegt. Neben einem technischen Bericht erfordert die Registrierung einiger Substanzen auch die Erstellung eines Sicherheitsberichts. Für Stoffe mit einem möglichen Gefahrenpotential sind darüber hinaus besondere Expositionsszenarien vorgeschrieben, die eine negative Wirkung einer Dosis der Substanz auf den Menschen und die Umwelt aufzeigen können. Neben dem Einsatz herkömmlicher Tierversuchverfahren schreibt die Verordnung den Einsatz alternativer tierversuchsfreier Testverfahren vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits etablierte Methode weiterentwickelt, unter dosis- und substanzspezifischen Gesichtspunkten charakterisiert und in einem speziellen *in vitro* Verfahren mittels einer Zelllinie getestet. Die Weiterentwicklung der Cultex[®] Glasmodule zum Cultex[®] Radial Flow System (Cultex[®] RFS) und die damit verbundene Optimierung der gerichteten Abscheidung von Partikeln auf in Zellkulturinserts kultivierten A549-Zellen mittels Direktexposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht weist eine starke Abhängigkeit der Ergebnisse von substanzspezifischen Eigenschaften auf. Der Einfluss der Partikelmasse bzw. -größe auf die Stabilität eines solchen Systems konnte genauso aufgezeigt werden wie die Einwirkung von Strömungen und Ladungseffekten auf das Abscheideverhalten bei einer Exposition.

Parallel zur Überarbeitung der Methode wurde mit dem Cultex[®] *Dust Generator* eine neue Aerosolgeneration entwickelt, sowie ein Verfahren zur Charakterisierung der eingesetzten Aerosole und der Bestimmung der abgeschiedenen Partikelmasse erarbeitet und erfolgreich eingesetzt. Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass unter genau kontrollierten Bedingungen eine Abscheidung von Substanzen wie Kupfer(II)oxid, Kupfer(II)sulfat, Bariumsulfat, Aluminiumhydroxid und Laktose Monohydrat mit nur sehr geringen Abweichungen stabil möglich ist. Die Entwicklung dieser optimierten Methode zur reproduzierbaren Abscheidung von Partikeln verschiedener Substanzen ermöglichte somit den zuverlässigen Einsatz des Verfahrens in *in vitro* Zellexperimenten.

Die Bestimmung der Zellvitalität der exponierten A549-Zellen zeigte Dosis-Wirkungsbeziehungen unter dem Einfluss von massen- und substanzspezifischen Effekten

auf. Darüber hinaus ergaben sich zwischen den einzelnen Testsubstanzen, bei gleicher deponierter Masse, deutliche Unterschiede in der zytotoxischen Wirkung.

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass diese Methode als Alternative zu herkömmlichen Tierversuchen einsetzbar sein kann und eine Reihe von zusätzlichen Informationen und Möglichkeiten liefert, die in einem lebenden Organismus nicht ohne Weiteres betrachtet werden können.

Schlagworte: REACH, Cultex[®] RFS, Direktexposition, Aerosolgeneration, Partikel

Abstract

The EU regulation No. 1907/2006 (REACH regulation) became effective on 1 June, 2007 and prescribes mandatory registration of all chemicals in the European Union. Under the guiding principle of REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), chemical products can only be put on the market once a registration number has been assigned. In addition to a technical report, some substances require the issue of a safety report. Furthermore, a special exposure scenario which demonstrates a negative effect for humans and the environment is required for substances with a possible hazard potential. The regulation prescribes the use of animal-free alternative methods in addition to conventional animal testing methods.

Within the scope of the thesis, an already established method was further developed, characterized under dose- and substance-specific conditions and tested using a cell line in a special *in vitro* procedure. The advancement of the CULTEX[®] glass modules to the CULTEX[®] Radial Flow System (CULTEX[®] RFS) and the associated optimization of the deposition of particles on cultivated A549 cells by direct exposure at the air-liquid interface show a high dependence of the results on substance-specific characteristics. The influence of the particle mass and size on the stability of such a system could be demonstrated as well as the impact of flow and charge effects on the deposition behavior during exposure.

A new aerosol generation (CULTEX[®] dust generator) as well as a procedure to characterize the aerosol and to determine the deposited particle mass were developed and successfully tested parallel to the revision of the method. The results presented prove that a stable deposition of substances like copper(II) oxide, copper(II) sulfate, barium sulfate, aluminum hydroxide and lactose monohydrate, with only very little deviation, is possible under controlled conditions. The development of this optimized method for a reproducible deposition of particles of various substances thus enables the reliable use of such a procedure in *in vitro* cell experiments.

The determination of the viability of exposed A549 cells shows a dose-effect relationship influenced by mass- and substance-specific effects. Further distinct differences among the cytotoxic effects of the substance have been revealed with an equal deposited mass.

The presented results show that this method is applicable as an alternative to traditional animal experiments and provides additional information and possibilities which cannot easily be observed in a living organism.

Key words: REACH, CULTEX[®] RFS, direct exposure, aerosol generation, particle

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten erfolgte eine verstärkte Diskussion über die ethische Vertretbarkeit von Versuchen an lebendenden Tieren. Zwar unterliegen diese strengen gesetzlichen Auflagen, aber die Unerlässlichkeit tierexperimenteller Testmethoden für die Forschung sowie bei der Entwicklung und Testung von neuen Wirkstoffen in der Kosmetik- und Pharmaindustrie gilt als fragwürdig. Das wichtigste wissenschaftliche Argument, gravierende Unterschiede in der Physiologie von Mensch und Versuchstier, wird dabei aber trotzdem häufig außer Acht gelassen. So ist seit langem bekannt, dass bei Tieren einige künstlich hervorgerufenen Krankheiten wie Cholera (Koch 1884) oder AIDS (Newmark 1989) einen anderen Verlauf nehmen als bei menschlichen Patienten.

In den letzten Jahren fand, ausgelöst durch neue wissenschaftliche Erkenntnisse (Hartung 2008) und eine veränderte politische Denkweise, ein radikales Umdenken auf diesem Gebiet statt. Das bereits 1959 von Russell und Burch (Russell and Burch 1959) beschriebene 3R-Prinzip „*Replacement, Reduction and Refinement*“ von *in vivo* Experimenten gewinnt dabei immer mehr an Bedeutung. Der Ersatz, die Reduzierung und die Verfeinerung von Versuchen mit lebenden Tieren stehen mehr und mehr im Vordergrund. Neben *in silico* Computersimulationen (Pietikainen, Oravisjarvi et al. 2009; Oravisjarvi, Pietikainen et al. 2011) bietet heute vor allem der Einsatz von *in vitro* Zellkulturmethoden eine nützliche Alternative zum Tierversuch. Einige dieser Zellkulturmethoden sind bereits etabliert, wurden validiert und kommen in einer Reihe von Forschungsgebieten, wie zum Beispiel der Kosmetikindustrie (Cotovio, Grandidier et al. 2005; Bernerd and Asselineau 2008; Landsiedel, Ma-Hock et al. 2010) zur Anwendung.

Im Bereich der Inhalation und des Respirationstraktes ist die Anzahl der vorhandenen *in vitro* Methoden (BeruBe, Aufderheide et al. 2009; May, Jensen et al. 2012) allerdings noch sehr gering. Eine der am häufigsten angewandten Testverfahren sieht die Inkubation von Zellen mit der Testsubstanz unter submersen Bedingungen vor. Die kultivierten Zellen werden dabei für einen definierten Zeitraum mit der in Zellkulturmedium gelösten oder resuspendierten Substanz überschichtet und anschließend die Reaktion der Zellen untersucht.

Die bei dieser Art der Testung von luftgetragenen Partikeln vorliegenden Suspensionen entsprechen allerdings nicht den realistischen Bedingungen in den Atemwegen. Der direkte Kontakt zwischen den Partikeln und den Zellen wird durch die vorhandene Flüssigkeitsschicht verfälscht oder unterbunden. Eine etwaige Bildung von Agglomeraten aus

einzelnen Partikeln innerhalb des Mediums könnte darüber hinaus die biologische Wirkung des Testaerosols verändern. Mit der erstmals Mitte der 1980er Jahre beschriebenen Direktexposition (Zamora, Gregory et al. 1986; Tarkington, Wu et al. 1994) von Zellen an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht existiert eine mehr der Realität entsprechende Alternative, die sich in den letzten Jahren mehr und mehr durchsetzen konnte und an Bedeutung gewonnen hat. In einem kontinuierlichen Aerosolstrom werden die Partikel hierbei direkt über in Zellkulturinserts kultivierte Zellen geleitet und deponiert.

Eine Reihe von Systemen zur sogenannten Direktexposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht sind zu diesem Zweck in den letzten Jahren entwickelt worden (Diabate, Mulhopt et al. 2008; de Bruijne, Ebersviller et al. 2009; Lenz, Karg et al. 2009). Die am besten beschriebene und weitverbreitetste Apparatur ist dabei das Cultex[®] Modul (Aufderheide and Mohr 1999; Knebel, Ritter et al. 2002; Aufderheide, Knebel et al. 2003; Fukano, Ogura et al. 2004), welches als Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Neuentwicklungen diente.

2. Aufgabenstellung

Das Ziel der durchgeführten Arbeit ist die Weiterentwicklung, Etablierung und Testung eines Systems zur Direktexposition von kultivierten Zellen des menschlichen Respirationstraktes mit verstäubten Partikeln diverser Substanzen. Die Generation des Aerosols durch Vernebelung der zu testenden Stoffe und die zelluläre Reaktion der eingesetzten Zellen auf den direkten Kontakt mit den Partikeln bilden dabei die eigentlichen Kernpunkte der Forschungsarbeiten. Zu diesem Zweck soll auf Basis des 1999 von Aufderheide und Mohr entwickelten Cultex[®] Modules (Aufderheide and Mohr 1999) ein neuer Expositionsaufbau konzipiert und realisiert werden. Die Etablierung dieses Systems soll den Grundstein für eine mögliche *in vitro* Alternative zur OECD Richtlinie 403 zur akuten Inhalationstoxikologie im Tierversuch bilden.

Der erste Abschnitt der Laborarbeit beschäftigt sich insofern maßgeblich mit der Entwicklung und Testung eines stabilen Aufbaus sowie der intensiven Charakterisierung ausgewählter Substanzen wie Kupfer(II)oxid oder Kupfer(II)sulfat. Die Aufrechterhaltung der Zellvitalität im System spielt dabei eine entscheidende Rolle. Parallel zu den Expositionen mit den Teststoffen erfolgt zur Absicherung der Daten ein ständiger Vergleich mit Druckluft bzw. Atemluft und nicht exponierten Zellen.

In der Expositionsphase werden die Zellen an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht mit den oben genannten Substanzen beaufschlagt. Die in der Literatur bereits gut beschriebene und hinreichend charakterisierte Epithelzelllinie A549 (Giard, Aaronson et al. 1973; Lieber, Smith et al. 1976; Nardone and Andrews 1979; Foster, Oster et al. 1998; Swain, Kemp et al. 2010) wird auf mikroporösen Membranen in 24 mm Falcon[®] Zellkulturinserts unter submersen Bedingungen angezogen. Kurz vor der Beaufschlagung müssen die Zellen durch Entfernen des apikalen Zellkulturmediums auf die für die Direktexposition notwendigen Luft-Flüssigkeits-Konditionen umgestellt werden.

Die Expositionen erfolgen dosis-abhängig, d.h. mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen. Nach einer 24stündigen Nachinkubation erfolgt die Bestimmung des zytotoxischen Potentials der einzelnen Substanzen mittels der Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen (Ishiyama, Tominaga et al. 1996; Pouli, Hatzinikolaou et al. 2003; Ahamed 2011) und deren Membranintegrität (Pariselli, Sacco et al. 2009; Ahamed 2011).

Diese Resultate sollen eine Einstufung der zytotoxischen Wirkung der Testsubstanzen erlauben und zeigen inwieweit sich ein solcher Aufbau als Alternativmethode anbietet.

3. Theoretische Grundlagen

Der folgende Abschnitt „Theoretische Grundlagen“ ist eine Zusammenstellung des heutigen Wissenstandes auf dem bearbeiteten Gebiet und dient der Bereitstellung von Basisinformationen.

3.1. Spannungsfeld *in vivo* und *in vitro*

Weltweit werden jährlich etwa 100 Millionen Wirbeltiere in Tierversuchen eingesetzt, etwa ein Zehntel davon in den Ländern der Europäischen Union. Im Jahr 2011 betrug die Zahl der Wirbeltiere, die in Tierversuchen und zu anderen wissenschaftlichen Zwecken in Deutschland verwendet wurden, über 2,9 Millionen. Die Anzahl der davon in toxikologischen Untersuchungen oder anderen Sicherheitsprüfungen eingesetzten Tiere betrug laut Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz knapp 175.000.

Die Entwicklung und Validierung neuer alternativer Methoden (Carere, Stamatii et al. 2002) als Ersatz zu den meist kosten- und arbeitsintensiven Tierversuchen hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen. Der wachsende Druck auf Grund der veränderten Gesetzgebung vor allem auf europäische Ebene führt zu einem verstärkten Forschungsaufwand auf diesem Gebiet. So sind alleine die für die Durchsetzung der REACH-Verordnung geschätzten Tierzahlen (Hartung 2008; Rovida and Hartung 2009) durch herkömmliche *in vivo* Methoden kaum zu bewältigen. Der Einsatz einfacherer, kostengünstigerer Screening Methoden als Ergänzung zu herkömmlichen Tierversuchen sowie zur Bewältigung des immensen Arbeitsaufwands wird von Institutionen wie der „Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch“ (ZEBET) und dem *Center For Alternatives To Animal Testing (CAAT)* unterstützt und gefördert. Die zum Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) gehörende ZEBET wurde 1989 gegründet und hat die Aufgabe den Einsatz von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken auf ein unerlässliches Maß zu beschränken und Alternativen zum Tierversuch zu entwickeln.

Seit 1994 wird die ZEBET dabei durch eine Kommission, bestehend aus Vertretern von Industrie, Wissenschaft, Tierschutzorganisationen und Länderbehörden beratend unterstützt.

Darüber hinaus werden in einer entwickelten Datenbank „AnimAlt“ anerkannte Alternativmethoden unter der Bedingung zur Verfügung gestellt, dass diese dem wissenschaftlichen 3R-Prinzip von Russel und Burch (Russell 1959) entsprechen.

Das US amerikanische CAAT an der Bloomberg School of Public Health der Johns Hopkins Universität und der europäische Ableger das CAAT Europe an der Universität Konstanz engagieren sich seit mehr als 30 Jahren erfolgreich im Bereich der Alternativmethoden.

Unabhängig von den vielen Erfolgen im Bereich der Haut- (Cotovio, Grandidier et al. 2005; Bernerd and Asselineau 2008) und Augentoxizität (Okumura, Arashima et al. 1999; Scott, Eskes et al. 2010; Cho, An et al. 2012) verstärkt sich die Diskussion über die Einsetzbarkeit von *in vitro* Testverfahren als Ergänzung oder als Ersatz für etablierte *in vivo* Tierversuchsmethoden auch auf anderen Gebieten. Trotz vieler praktischer und ethischer Vorteile wird dabei immer wieder die Vergleichbarkeit der *in vitro* Systeme mit der *in vivo* Situation im Menschen in Frage gestellt. Eine Kritik, die allerdings auch für den Vergleich zwischen Tier und Mensch zu trifft. Schon Robert Koch musste in den 1980er Jahren bei der Untersuchung von Cholera an Tieren feststellen, dass sich die Krankheit nicht auf diese übertragen ließ (Koch 1884). Auch lässt sich bei dem Menschen nah verwandten Schimpansen trotz einer HIV-Infektion keine AIDS-Erkrankung auslösen (Newmark 1989). Eine unterschiedliche Reaktion des tierischen Organismus, negative Tierversuchsergebnisse und Fehlinterpretationen können somit ein falsches Gefühl der Sicherheit vermitteln.

Im Vergleich dazu ermöglicht eine weniger komplexe aber gezielte *in vitro* Methode mit Zellen vom Menschen eine spezies-spezifische Betrachtung definierter Fragestellungen zur Beurteilung des Gefährdungspotentials von Stoffen.

3.2. Gesetzliche Grundlage im Rahmen der EG-Verordnung „REACH“

Die gesetzliche Grundlage bildet die europäische Chemikalienverordnung Nr. 1907/2006, die im Juni 2007 in Kraft getreten ist. Die sogenannte REACH-Verordnung (Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe) dient der Harmonisierung und Vereinfachung des bis dahin gültigen Chemikalienrechts und basiert auf dem Grundsatz der Eigenverantwortung der Industrie (Foth and Hayes 2008; Grindon and Combes 2008; Williams, Panko et al. 2009).

Primär wird mit der EU-Verordnung eine einheitliche Anpassung der Anforderungen für Stoffe in allen Mitgliedsstaaten sowie die Erschaffung eines hohen Schutzniveaus für die menschliche Gesundheit und die Umwelt mit dem Ziel der nachhaltigen Entwicklung angestrebt.

Die REACH-Verordnung verpflichtet Hersteller, Importeure und Anwender eine Zusicherung zu geben, dass die menschliche Gesundheit und die Umwelt durch die Stoffe nicht nachteilig beeinflusst werden. Zu diesem Zweck muss für jede Substanz, mit einer produzierten oder importierten Menge von über 10 Tonnen im Jahr, eine eigene Registrierungsnummer beantragt werden sowie die Registrierung erfolgen. Die für die Vergabe der Registrierung geforderte Datenmenge ist dabei abhängig vom Gefahrenpotential der jeweiligen Substanz. Neben der Erstellung eines technischen Berichts kann so auch ein Stoffsicherheitsbericht inklusive der Dokumentation aller möglichen Expositionsszenarien für Mensch und Umwelt (bei karzinogenen Substanzen) verlangt werden. Die Dokumentation beinhaltet die quantitative und qualitative Beurteilung einer, gegenüber dem Menschen oder der Umwelt exponierten Dosis einer Substanz von der Herstellung bis zur Entsorgung.

Die Generierung der für die Expositionsbeurteilung erforderlichen toxikologischen Daten durch Tierversuche wird in der REACH-Verordnung gesondert beachtet. Folglich muss der Hersteller alternative Methoden, den tierexperimentiellen Methoden vorziehen und die erzeugten Daten Dritten auf Anfrage zur Verfügung stellen.

3.3. Inhalationstoxikologie

Die Inhalationstoxikologie beschäftigt sich mit der schädigenden Wirkung von luftgetragenen Stoffen auf die Lunge und den Respirationstrakt. Im Allgemeinen wird dabei zwischen der akuten Toxikologie und der chronischen Toxikologie unterschieden.

Eine akut toxische Schädigung basiert im Allgemeinen auf einer Kurzzeitexposition mit einzelnen Dosen, wobei der ausgelöste Effekt zeitnah zu dieser Einwirkung auftritt. Im Gegensatz dazu werden chronisch toxische Effekte meist durch wiederholte Expositionen im Niedrigdosisbereich ausgelöst. Die toxische Wirkung wird dabei stets dosisabhängig geprüft, um Aussagen zu toxikologisch relevanten Schwellenwerten treffen zu können.

Die Testung zur Einstufung der toxischen Wirkung einer Substanz auf den Respirationstrakt erfolgt in den meisten Fällen *in vivo* an Ratten, Meerschweinchen und Hunden (Ferin,

Oberdorster et al. 1992; Barrett, Rudolph et al. 2003; Garcia-Contreras, Fiegel et al. 2007). Getestet werden dabei neben Pharmazeutika (Kuehl, Barrett et al. 2010) auch Gase (Kittelson, Watts et al. 2004) und Zigarettenrauch (Schick and Glantz 2005; Van Miert, Vanscheeuwijck et al. 2008; Dorman, Mokashi et al. 2012). Durch die Entwicklung von neuen *in vitro* Methoden, wie der submersen Inkubation von Zellen mit der Testsubstanz (Rateau-Matton, Ansoberlo et al. 2004; May, Jensen et al. 2012) oder dem Prinzip der Direktexpositionen von Zellen an der Luftflüssigkeitsgrenzschicht (Zamora, Gregory et al. 1986; Tarkington, Wu et al. 1994), gibt es heute mehr und mehr Alternativen.

Insbesondere der stetige Anstieg von chronischen Erkrankungen der Atemwege wie von COPD, einer chronisch obstruktiven Form von Lungenerkrankung (Lopez and Murray 1998; Barnes 2000; Barnes 2004) führte zur Verstärkung der Forschungsaktivität in diesem Bereich. So ergab eine Studie mit 2200 Personen über 40 Jahren von Schirnhofner (Schirnhofner, Lamprecht et al. 2007), dass etwa ein Viertel aller untersuchten Personen zumindest an einer leichten Form von COPD erkrankt war. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten bei der Behandlung von COPD nur mäßige Erfolge erreicht werden (Barnes 2010; Fromer, Barnes et al. 2010; Silverman, Vestbo et al. 2011), die eine Verzögerung der Krankheit aber nicht die Heilung ermöglichen.

Die Direktexposition von Zellen an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht als inhalationstoxikologische *in vitro* Methode ermöglicht sowohl akute wie auch chronische Schäden an Zelllinien oder an Zellkonstrukten zu simulieren. Die Nachstellung der Effekte in Zellkulturversuchen kann so auf kurz oder lang zu einem besseren Verständnis dieser Erkrankungen beitragen.

3.4. Prinzip der Direktexposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht

Das Prinzip der Direktexposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht (*Air-Liquid Interface / ALI*) geht maßgeblich auf die Arbeiten von Zamora *et al.* zurück (Zamora, Gregory et al. 1986). Auf Membranen kultivierte Zellen werden dabei in einem kontinuierlichen Strom apikal mit gasförmigen oder partikelhaltigen Aerosolen exponiert und basal mit Nährlösung versorgt (Tarkington, Wu et al. 1994). Die inzwischen gut etablierte Methode bietet, neben der submersen Untersuchung löslicher Substanzen, eine *in vitro* Alternative zur Klärung der

Reaktivität luftgetragener Wirkstoffe als Alternative zum Einsatz tierexperimentieller Methoden (Bakand and Hayes 2010).

Diese Art der Exposition kommt der *in vivo* Situation sehr nahe und vermeidet störende Interaktionen mit dem Kulturmedium. Die Expositionsbedingungen und der Kontakt zwischen den Zellen mit der Testsubstanzen sind somit effektiver zu kontrollieren (Lenz, Karg et al. 2009; Hein, Bur et al. 2011).

Das Cultex[®] Modul (Aufderheide and Mohr 1999) war eines der ersten Systeme, das kommerziell für die Direktexposition von kultivierten Zellen angeboten und seitdem für eine Vielzahl von Projekten, wie z.B. der Testung von Dieselabgasen (Knebel, Ritter et al. 2002) oder der Exposition mit Zigarettenrauch (Aufderheide, Knebel et al. 2003; Fukano, Ogura et al. 2004) und der Beaufschlagung mit Phosgen (Wijte, Alblas et al. 2011) eingesetzt wurde.

In den letzten Jahren wurden weitere Modelle zur Exposition nach diesem Prinzip entwickelt und veröffentlicht. Neben dem direkt auf dem Cultex[®] Glasmodulen basierenden System der Firma Vitrocell[®] (Tang, Gminski et al. 2012) existieren mit der Expositions-kammer ALICE (Lenz, Karg et al. 2009), dem NACIVT (Savi, Kalberer et al. 2008) und dem EAVES (de Bruijne, Ebersviller et al. 2009) weitere Gerätschaften zur Beaufschlagung von Zellen an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht.

3.5. Alternative Methoden

Die Forderung von gesetzgeberischer Seite, den Einsatz von Alternativmethoden voranzutreiben, hat zu der Entwicklung zahlreicher zellbasierter Testsysteme geführt, die immer stärker Eingang in toxikologische Untersuchungen finden. Die wichtigsten Modelle und Verfahren sind im folgenden Abschnitt aufgeführt.

Exemplarisch für diese Testsysteme ist das EPISKIN[®] Modell (Cohen, Dossou et al. 1994; Roguet, Cohen et al. 1994), ein Hautirritationstest welcher von L'Oréal entwickelt und seit 1989 zur Testung von Kosmetikprodukten eingesetzt wird. Das EPISKIN[®] Modell repräsentiert eine dreidimensionale Nachbildung der Haut wobei die Epidermis durch die Ausdifferenzierung von menschlichen Keratinozyten realisiert wird. Nach der Behandlung der Zellen kann durch die Bestimmung der Zellvitalität eine Aussage zur schädigenden Wirkung der eingesetzten Testsubstanz erfolgen. Im Jahr 2007 erfolgte die Einstufung der Methode

durch die ECVAM (*European Center for the Validation of Alternative Methods*) als vollwertige Ersatzmethode zum Tierversuch (Spielmann, Hoffmann et al. 2007).

Eine weitere alternative Methode ist der 3T3 Neutralrot Fototoxizitätstest (Spielmann, Balls et al. 1998; Jones and King 2003), welcher der Identifizierung von fototoxischen Effekten von Testsubstanzen unter Lichteinfluss dient. Zu diesem Zweck werden kultivierte Balb/c 3T3 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert und anschließend für einen definierten Zeitraum mit UV-Licht bestrahlt. In einem Parallelansatz erfolgt nach der Inkubation die Behandlung ohne UV-Bestrahlung und unter Ausschluss von Licht. Die Bestimmung der Vitalität der Zellen in beiden Testansätzen mittels des standardisierten Neutralrot-Tests (Borenfreund and Puerner 1985) kann somit im Vergleich über die fototoxische Wirkung der eingesetzten Substanzen Aufschluss geben.

Neben dem 3T3 Neutralrot Fototoxizitätstest ermöglicht auch der kombinierte *Photo Red Blood Cell Test* (Pape, Maurer et al. 2001) die Bestimmung der Fototoxizität von Substanzen. Dabei werden die ftohämolytische Wirkung und die met-Hämoglobin (met-Hb) Bildung in Erythrozyten über die Messung der optischen Dichte bei 525nm und 630nm bestimmt. Dieser Test wird ebenfalls als alternatives Verfahren empfohlen (Spielmann, Muller et al. 2000; Pape, Maurer et al. 2001). Darüber hinaus existieren eine Reihe weiterer alternativer *in vitro* Methoden wie z.B. der *Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane Test* (HET CAM) (Spielmann, Kalweit et al. 1993), der *Chorioallantoic Membrane-Trypan Blue Staining Test* (CAM-TBS) (Lawrence, Groom et al. 1986) und der *Fluorescein Leakage Test* (FL) (Tchao 1988).

Als Alternative zum *Draize Rabbit Eye Test* (Draize and Spines 1944; Aust and Maibach 1981) dient das *EpiOcular*TM Gewebemodell, das von Stern *et al.* (Stern, Klausner et al. 1998) entwickelt und bereits an die EU Kosmetikdirektive angepasst sowie validiert wurde (Kaluzhny, Kandarova et al. 2011; Kolle, Kandarova et al. 2011). Der *EpiOcular*TM *in vitro* Test (Mattek Corporation) basiert auf der Bestimmung der zytotoxischen Wirkung einer Testsubstanz auf die epidermalen Zellen der Hornhaut des menschlichen Auges. Das mehrschichtige Zellkonstrukt wird dafür in speziellen Zellkulturinserts angezogen und mit der Testsubstanz an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht bis zu 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wird mittels eines MTT-Tests (Mosmann 1983) die Vitalität der Zellen bestimmt.

Die Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus wird im EST (*embryonic stem cell test*) als Modell zur Untersuchung der Embryotoxizität eingesetzt (Seiler and Spielmann 2011). Im Gegensatz zu herkömmlichen Stammzelltests werden dabei Zelllinien verwendet und keine Primärstammzellen oder Gewebe aus schwangeren Versuchstieren. Die EST-

Methode wurde bereits erfolgreich von der ECVAM validiert (Genschow, Spielmann et al. 2004) und dient der Abklärung von Fragen im Bereich der Zytotoxizität sowie der Differenzierung.

Eine weitere gängige Methoden ist der AMES-Mutagenitätstest (Ames, McCann et al. 1975). Im Vergleich zu den bereits beschriebenen *in vitro* Zellkulturtests basiert diese Methoden auf der Autotrophie eines Bakterienstamms (z.B. *Salmonella typhimurium*) hervorgerufen durch eine Punktmutation in einem Gen zur Synthese einer essentiell notwendigen Aminosäure (z.B. Histidin). Die Bakterien werden dafür auf einem Minimalnährboden ohne diese Aminosäure aufgebracht. Unter normalen Bedingungen könnten die Bakterien nicht überleben. Werden sie jedoch einer mutagenwirkenden Substanz ausgesetzt kann es zu Rückmutationen kommen. Bei der anschließenden Inkubation auf dem Minimalnährboden sind diese entstandenen Revertanten wieder in der Lage die Aminosäure selbst zu synthetisieren. Die Anzahl der Revertantenkolonien macht somit eine Aussage über die mutagenen Eigenschaften einer Substanz möglich.

3.6. Cultex[®] Technologie

Die erstmals 1999 von Aufderheide und Mohr beschriebene Cultex[®] Technologie (Aufderheide and Mohr 1999; Aufderheide and Mohr 2000) basiert auf dem Prinzip der Direktexposition von Zellen oder Bakterien an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht mit luftgetragenen Wirkstoffen wie z.B. Zigarettenrauch, Gasen und partikelhaltigen Atmosphären (Ritter, Knebel et al. 2001; Aufderheide, Knebel et al. 2002; Knebel, Ritter et al. 2002; Aufderheide, Knebel et al. 2003; Fukano, Ogura et al. 2004).

Die aus Glas und Edelstahl gefertigten Module (Abbildung 3-1) bestehen aus einem Oberteil mit jeweils drei Zu- und Ableitungen sowie einem Unterteil, welches drei Probenaufnahmen für Zellkulturinserts oder Petrischalen beinhaltet (Aufderheide and Mohr 1999; Aufderheide and Mohr 2000; Aufderheide and Mohr 2004). Das Oberteil aus Edelstahl dient dabei primär der Verteilung des Testaerosols und dem Verschluss des Systems. Drei linear angeordnete Aerosoldüsen mit kreisförmig angeordneten Absauglöchern ermöglichen die kontinuierliche Zu- bzw. Ableitung der Testatmosphären. Die Aerosoldüsen können dabei je nach Testzweck höhenverstellt oder ausgetauscht werden.

Das Unterteil aus Borosilikatglas dient der gleichzeitigen Aufnahme von je drei Proben. Die dafür vorgesehenen Kammern können je nach Fragestellung drei Zellkulturinserts unterschiedlicher Größe mit kultivierten Zellen oder drei Petrischalen mit Agar aufnehmen. Im Fall von eingesetzten Zellkulturinserts erfolgt eine Versorgung der kultivierten Zellen mit Nährmedium über die drei Kammern unterhalb der Membran. Über eine individuelle Zuleitung können die Kammern bis zur Membranhöhe mit Nährmedium gefüllt werden. Hierdurch wird gleichzeitig bei einem erzeugten Aerosolstrom ein Austrocknen der Zellen verhindert. Die Membranen der eingesetzten Zellkulturinserts bzw. die Oberfläche des Agar befinden sich nach dem Verschließen des Systems etwa 2 mm unterhalb der Öffnungen der Aerosoldüsen. Mit einer Vakuumpumpe kann durch das Anlegen eines definierten Luftstroms an den Ableitungen ein kontinuierlicher Aerosolstrom durch die Aerosoldüsen über die Membran bzw. Agar erzeugt werden. Zur Aufrechterhaltung zellspezifischer Bedingungen können sowohl der untere Glaskörper wie auch das Edelstahlloberteil mit vorgewärmtem Wasser auf 37°C temperiert werden.

Neben der bereits erwähnten Testung von Zigarettenrauch (Aufderheide, Knebel et al. 2003; Fukano, Ogura et al. 2004) und Gasen (Aufderheide, Knebel et al. 2002) an kultivierten Zellen kann in einem speziell adaptierten Cultex[®] B Modul (Firma Cultex Laboratories GmbH, Deutschland) auch die Exposition von Bakterien (Aufderheide and Mohr 2004) für den bereits beschriebenen AMES-Test (Aufderheide and Gressmann 2007; Aufderheide and Gressmann 2008) erfolgen.



Abbildung 3-1: Darstellung eines Cultex® CG Glasmodul für 12 mm Zellkulturinserts mit Bodenansicht auf das davor positionierte Oberteil mit den drei Aerosoldüsen und Absauglöchern.

Neben den bereits erwähnten Cultex® B Modulen existieren spezielle Module für verschiedene Größen von Zellkulturinserts (Cultex® CG 12 und 24mm) sowie für die Exposition mit kontinuierlicher Versorgung von Nährmedium (Cultex® CC 12 und 24mm).

3.6.1. Einsatzmöglichkeiten der Direktexposition bei der Testung von Zigarettenrauch und Gasen

Eine gut etablierte und häufig beschriebene Einsatzmöglichkeit der Direktexposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht ist die Testung von verschiedenen Gasen und komplexen Gemischen wie z.B. Zigarettenrauch oder Dieselabgasen.

Die mit menschlichen Fibroblasten und Lungenepithelzellen durchgeführten Expositionen (Knebel, Ritter et al. 1998; Ritter, Knebel et al. 2001) zeigten im Vergleich zur synthetischen Luft eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung für Stickstoffdioxid und Ozon. Vergleichbare Ergebnisse konnten 2002 auch mit Dieselabgasen und Zigarettenrauch gewonnen werden (Aufderheide, Knebel et al. 2002; Knebel, Ritter et al. 2002). Neben einer zytotoxischen

Schädigung der Zellen konnte darüber hinaus eine Schädigung der DNS mittels eines alkalischen *Comet Assays* nachgewiesen werden (Wolz, Krause et al. 2002).

Die Weiterentwicklung und Etablierung der Direktexposition von kultivierten bronchialen Epithelzellen zur Abschätzung der zytotoxischen Wirkung (Aufderheide, Knebel et al. 2003; Aufderheide, Knebel et al. 2003) bildete die Grundlage für weitere *in vitro* Testungen von Zigarettenrauch (Fukano, Ogura et al. 2004; Ritter, Knebel et al. 2004; Fukano, Yoshimura et al. 2006; Okuwa, Tanaka et al. 2010; Aufderheide, Scheffler et al. 2011).

Die von Pariselli 2009 durchgeführten Expositionen mit leichtflüchtigen organischen Verbindungen wie z.B. Toluol, Benzol und Formaldehyd führte zu reproduzierbaren Veränderungen des Redox-Milieus und zu Entzündungsreaktionen der Zellen (Pariselli, Sacco et al. 2009). Vergleichbare Effekte (Interleukin-6 und Interleukin-8 Sekretion) konnten auch für Trichloramin und für Schwimmbadluft (Schmalz, Wunderlich et al. 2011) sowie für Phosgen nachgewiesen werden (Wijte, Alblas et al. 2011).

3.6.2. Einsatzmöglichkeiten der Direktexposition bei der Testung von Partikel

In den letzten Jahren hat das Interesse an der Wirkung von partikulären Substanzen und luftgetragenen Stoffen immens zugenommen. Ein Grund hierfür sind die weltweit geführten Diskussionen über die Bedeutung von Nanopartikeln für die menschliche Gesundheit (Oberdorster 2010). Insbesondere die Auswirkung von Metalloxidnanopartikeln steht dabei immer häufiger im Vordergrund (Lenz, Karg et al. 2009; Rothen-Rutishauser, Grass et al. 2009; Hackenberg, Scherzed et al. 2011; Tang, Gminski et al. 2012; Xie, Williams et al. 2012).

Im Vergleich zu Gasen und komplexen Gemischen unterliegen diese Stoffe stärker substanzspezifischen Faktoren und physikalischen Gesetzmäßigkeiten. Die Partikelgröße, -masse und -oberfläche sowie die Methode der Herstellung können einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse haben (Aufderheide, Scheffler et al. 2011; Gazzano, Ghiazza et al. 2012; Pilcer, Wauthoz et al. 2012).

So zeigten Baber *et al.*, dass magnetische Nanopartikel mit einem Silica-coating im Vergleich zu den ursprünglichen Partikeln keine zytotoxische Wirkung oder Entzündungseffekte aufweisen (Baber, Jang et al. 2011).

Der Einsatz der Direktexposition zur Beaufschlagung der Zellen verlangt eine kontrollierbarere Aerosolgeneration, eine Überwachung der Expositionsbedingungen und neuere spezifische Systeme zur Exposition (Hein, Bur et al. 2011). Neben dem im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Cultex[®] System (Aufderheide, Scheffler et al. 2011) existieren mit der ALICE Expositions-kammer (Lenz, Karg et al. 2009) und dem EAVES (de Bruijne, Ebersviller et al. 2009) weitere einsatzfähige Systeme zur Exposition mit Feststoffpartikeln. Jedes dieser Systeme ist dabei entscheidend vom jeweiligen Aerosol und der gewählten Methode zur Aerosolgeneration abhängig.

3.7. Aerosole und Nanopartikelaerosol

Ein Aerosol ist als Gemisch von festen oder flüssigen Aerosolteilchen in einem Trägergas definiert. Dabei hängen die Eigenschaften des Aerosols stark von den Charakteristika der Aerosolpartikel und des Gases ab, welche auf Grund von chemischen und physikalischen Vorgängen ständigen Veränderungen unterliegen (Hoffmann, Zetzsch et al. 2007). Dieser Fakt trifft sowohl für natürlich vorkommende wie auch für künstlich im Labor generierte Aerosole zu. Die inhalationstoxikologische Untersuchung derartiger Gemische stellt sowohl für *in vivo* als auch *in vitro* Experimente eine große Herausforderung dar (Pauluhn 2008).

Für eine reproduzierbare Testung der zytotoxischen Einflüsse von Aerosolpartikeln auf kultivierte Zellen sind somit eine stabile und kontrollierte Aerosolgeneration sowie eine sorgsame Charakterisierung der Partikel unumgänglich. Die wichtigsten Eigenschaften sind dabei die Partikelgrößenverteilung, -anzahl, -morphologie, und -oberfläche sowie die Massenkonzentration (Ma-Hock, Gamer et al. 2007; Bello, Wardle et al. 2010; Bakand, Hayes et al. 2012).

Die Generierung, Charakterisierung und Abscheidung von Nanopartikeln, Partikeln mit einer Primärgröße unter 100nm, ist auf Grund von physikalischen Wechselwirkungen erschwert. Mit sinkender Partikelgröße erhöht sich die Abscheidung durch Diffusion (Aufderheide, Scheffler et al. 2011). Die Bildung von reversiblen Agglomeraten oder irreversiblen Aggregaten durch Verbindung von einzelnen Partikeln (Firanescu, Hermsdorf et al. 2006) führen zu Störungen bei der Exposition und können Unterschiede z.B. in ihrer toxikologischen Wirkung oder bei der Interaktion mit den Zellen aufweisen (Johnston, Hutchison et al. 2009; Andersson, Lejon et al. 2011; Bhattacharya, Hoffmann et al. 2012;

Keene, Peters et al. 2012). Insbesondere wenn die generierten Nanopartikel als Grundmaterial für größere Strukturen dienen oder sich durch ablaufende Prozesse verändern, ist z.B. die Bestimmung der Toxizität und die Charakterisierung eines möglichen Aerosols sehr schwierig. Ein aus einer Spraydose generierter Flüssigkeitstropfen mit Nanopartikeln erscheint zuerst sehr groß, kann aber durch Verdunstung auf unter 100nm Größe schrumpfen (Chen, Afshari et al. 2010).

Ein viel diskutiertes Beispiel für solch komplexe Strukturen sind *carbon nanotubes* (CNTs) bzw. *single-wall carbon nanotubes* (SWCNTs) oder *multi-wall carbon nanotubes* (MWCNTs), röhrenförmige Gebilde mit einem Wabenstrukturgerüst aus Kohlenstoff (Reich, Thomsen et al. 2004; Segura, Ibanez et al. 2006).

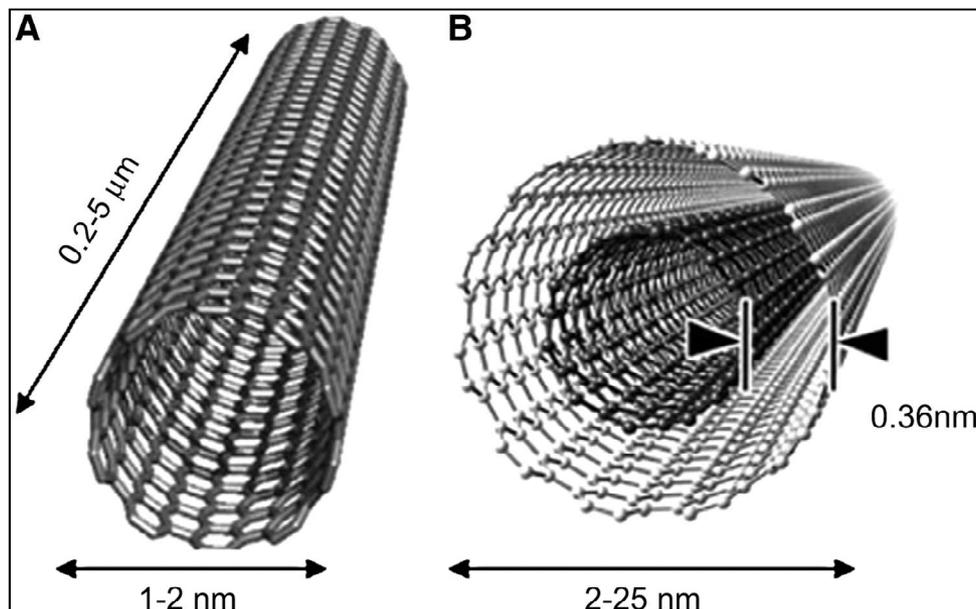


Abbildung 3-2: Single-wall (A) und multi-wall (B) carbon nanotubes (Reilly 2007).

Sie besitzen je nach Anwendungsgebiet eine immens hohe Zugfestigkeit, eine große elektrische oder wärmeleitende Fähigkeit und sind somit für viele Industrie- und Medizinzeige besonders interessant (Yu, Files et al. 2000; Yu, Lourie et al. 2000; Foldvari and Bagonluri 2008 I; Foldvari and Bagonluri 2008 II). Die langen röhrenförmigen Strukturen sind dabei jedoch deutlich größer als 100nm und fallen nicht unter die Definition von Nanopartikeln im herkömmlichen Sinne. Auf Grund ihrer Form erinnern sie stark an Asbestfasern, was zu der Annahme führte, dass beide Strukturen möglicherweise ähnliche Auswirkungen auf die Lunge haben könnten. Tatsächlich gibt es eine Reihe von *in vivo* Studien, die für beide Strukturen vergleichbare Ergebnisse zeigen (Poland, Duffin et al. 2008;

Kim, Song et al. 2012). Häufig lösten CNTs je nach Art der Herstellung und des Metallgehalts in vielen Studien Entzündungen aus und zeigten eine toxische Wirkung (Lam, James et al. 2006).

Das Verhalten und die Wirkung von Nanopartikeln auf die menschliche Lunge ist infolgedessen bis heute noch unzureichend untersucht worden. Ein Risiko durch die Exposition auf den Menschen kann daher nicht ausgeschlossen werden (Oberdorster 2010; Pacurari, Castranova et al. 2010).

3.8. Möglichkeiten der Aerosolgeneration

Die Möglichkeiten zur Generierung von Aerosolen sind auf Grund der Abhängigkeit vom eingesetzten Testmaterial sehr vielseitig. So dienen der *dust feeder* (Wright 1950) und der *fluidized bed* (Marple, Liu et al. 1978) hauptsächlich der Aerosolisierung von Feststoffen. Auf diese Art und Weise können Aerosole mit einer hohen Partikelkonzentration erzeugt werden, wobei die Stabilität des Aerosols eine deutliche Abhängigkeit von der Stopf- bzw. Schüttdichte des Presskuchens aufweist. Bei der Generation mit einem *dust feeder* (Anhang 6.7) werden die generierten Partikel möglicherweise durch die Reibung des Messers stark aufgeladen und neigen zu einer verstärkten Agglomerationsbildung.

Für den Einsatz von Nebulizern (He and Murray 1997; Berlinski, Willis et al. 2010) und Atomizern (Liu and Lee 1975) wird die zu testende Substanz gelöst oder in Suspension gebracht und anschließend vernebelt. Hierbei ist eine reproduzierbare Generation des Aerosols allerdings nur möglich, wenn sich die eingesetzte Substanz homogen lösen bzw. resuspendieren lässt. Des Weiteren sind die generierten Partikel im Aerosol von Flüssigkeitstropfen umgeben. Dies hat zur Folge, dass die Oberfläche nicht der des Ausgangsmaterials entspricht. Durch die Verdunstung der Flüssigkeit nach der Generation besteht darüber hinaus die Gefahr, dass sich alle Partikel innerhalb eines Tropfens zu einem Agglomerat zusammensetzen.

Alternativ zu einem Nebulizer kann auch ein Ultraschallgenerator für die Generation von feinen partikelhaltigen Flüssigkeitsnebeln verwendet werden (Davies, Hudson et al. 1995). Durch die Umwandlung von elektrischer Energie in mechanische Schwingungen werden feinste Tropfen aus der Flüssigkeit herausgerissen und nehmen dabei Partikel der darin gelösten Substanz mit. Derartige Verfahren (Ultraschalltechnik) werden z.B. für die

Verabreichung von Pharmazeutika zur Behandlung von Asthma genutzt (Hrvacic, Bosnjak et al. 2006).

Der auf einem Flammengenerator basierende Generator „VENGES“ dient der Erzeugung von Nanopartikeln mit kontrollierten physikalisch-chemischen Eigenschaften, einer definierten Ausgangspartikelgröße und -struktur. Die kontinuierliche Generation von Partikeln in der Flammenphase ermöglicht einen gleichmäßigen Partikelfluß zu *in vivo* oder *in vitro* Testzwecken mit stabiler Partikelgröße und -morphologie (Demokritou, Buchel et al. 2010).

Der Einsatz eines Elektrospray Generators ermöglicht das Verstäuben von in Flüssigkeiten gelösten oder resuspendierten Substanzen mit einer sehr schmalen Größenverteilung (Jennerjohn, Eiguren-Fernandez et al. 2010). Das zu Grunde liegende physikalische Prinzip basiert auf der Instabilität eines Taylor-Konus (Taylor 1964). Das hierzu benötigte elektrische Feld ist abhängig von der Leitfähigkeit und Oberflächenspannung der Flüssigkeit. Mit der Überschreitung einer kritischen Feldstärke entsteht am Kegel ein sehr dünner Flüssigkeitsfaden, welcher in ein Spray aus unipolar geladenen Tröpfchen zerfällt. Die Erzeugung von monodispersen Aerosolen macht auch die Anwendung der Elektrospray Technik für die Verabreichung von Pharmazeutika möglich (Gomez 2002).

Der Respimat *Soft Inhaler* (Dalby, Spallek et al. 2004; Hochrainer, Holz et al. 2005; Voshaar, Hausen et al. 2005) wird für das Versprühen von Pharmazeutika zur Behandlung von Asthma und COPD eingesetzt. Hierfür wird die in Wasser gelöste Substanz per Knopfdruck über eine Feder mechanisch durch zwei extrem feine Düsen herausgedrückt. Das vollständig ohne Treibmittel, ähnlich wie ein Atomizer arbeitende Gerät, erzeugt dadurch einen gleichmäßigen Sprühnebel.

3.8.1. Methoden zur Bestimmung der Partikelanzahl und -masse

Neben den bereits aufgeführten Methoden zur Bestimmung der Partikelanzahl und -masse existieren eine Reihe weiterer Messtechniken. Der Umstand, dass viele dieser Verfahren nur über eine begrenzte Größenauflösung verfügen, verlangt häufig eine Kombination verschiedener messtechnischer Methoden.

Der *Differential Mobility Analyzer* (DMA) dient je nach Abmessung und angelegter elektrischer Spannung als eine Art größenselektierender Filter, der nur Partikel mit einer bestimmten elektrischen Mobilität passieren lässt. In Kombination mit einem elektrischen

Auflader bzw. Neutralisator und einem nachgeschalteten Kondensationspartikelzähler (CPC) entsteht ein *Scanning Mobility Particle Sizer* (SMPS). Ein SMPS ist in der Lage die Messung der Partikelgrößenverteilung von Nanopartikeln in einem Aerosol auf Grund der elektrischen Mobilität der Partikel durchzuführen. Zu diesem Zweck wird die Spannung im DMA langsam Schritt für Schritt erhöht wodurch eine elektrische Mobilitätsverteilung der gescannten Partikel entsteht. Mit Hilfe einer schwachen radioaktiven Quelle (z-B Krypton 85), welche als Neutralisator dient, wird das Aerosol in ein Ladungsgleichgewicht versetzt. Die durch Ionisation entstehende bipolare Ladungsverteilung ist materialunabhängig und basiert auf der Boltzmann Ladungsverteilung. Durch Rückrechnung lässt sich aus einer solchen bekannten Ladungsverteilung die Mobilitätsverteilung errechnen und somit die Größenverteilung der Partikel bestimmen (Flagan 2011).

Der im SMPS enthaltene *Condensation Particle Counter* (CPC) ist ein optisches Messgerät, welches auf dem Prinzip der Streulichtmessung basiert und Partikel im Größenbereich von wenigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern messen kann (Cheng 2011). Durch gezielte heterogene Kondensation der Partikeloberfläche mit n-Butanol, Isopropanol oder Wasser werden diese vergrößert, so dass eine optische Erfassung mittels Streulichtmessung möglich ist.

Bei dem *Engine Exhaust Particle Sizer* (EEPS) handelt es sich um ein Spectrometer (TSI Incorporated), welches zu den *Differential Mobility Analyzing* Systemen (DEMAS) gehört. Das Gerät besteht aus einem *Differential Electrical Mobility Classifier* (DEMC) in Kombination mit einem Elektrometer und dient hauptsächlich der Ermittlung der Größenverteilung von Partikeln in Abgasen (Stevens, Zahardis et al. 2008).

Neben den beschriebenen *online* Messgeräten auf Basis der Streulichttechnik existieren eine Reihe von mikroskopischen Methoden zur Ermittlung der Partikelgrößenverteilung oder des Agglomerationsverhaltens. Neben Lichtmikroskopen werden zu diesem Zweck häufig ein Rasterelektronenmikroskop (REM) oder ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) eingesetzt. Das von Max Knoll und Ernst Ruska im Jahr 1931 entwickelte und gebaute TEM ermöglicht die Abbildung des betrachteten Objektes mit Hilfe von Elektronen. Der Aufbau unterscheidet sich dabei wenig von dem eines herkömmlichen Lichtmikroskops. Das zu untersuchende Objekt wird mit beschleunigten Elektronen durchstrahlt und mit Hilfe eines Objektivs ein Zwischenbild erzeugt, welches mit speziellen magnetischen Linsen weiter vergrößert und über z.B. CCD-Kameras dargestellt wird. Die benötigten Elektroden werden von einer Glühkatode unter Hochspannung bei 80 - 400 kV emittiert und durch einen Kanal zur positiv geladenen Anode hin beschleunigt. Beim Durchdringen des Objektes werden die

Elektroden je nach Material unterschiedlich abgelenkt. Zur Vermeidung von störenden Streuungen der Elektroden durch Gasmoleküle muss in diesem Kanal ein Hochvakuum vorliegen. Durch Wechselwirkungen mit dem Material der Probe kommt es in dieser zu einer starken Hitzeentwicklung, welcher durch Spülung mit flüssigem Stickstoff entgegengewirkt werden muss.

Auf Grund der hohen Auflösung wird das TEM in vielen Fällen zur Charakterisierung von Nanopartikeln und Nanopartikelagglomeraten verwendet (Park, Cao et al. 2003; Soto, Garza et al. 2007; Geiser, Casaulta et al. 2008; Schulze Isfort and Rochnia 2009; Nazarenko, Zhen et al. 2012).

Eine vollkommen andere Methode zur Ermittlung der Größenverteilung ist der Einsatz eines Kaskadenimpaktors (Cheng, Yeh et al. 1984; de Boer, Gjaltema et al. 2002; Mitchell and Nagel 2003). Der Kaskadenimpaktor ermöglicht die Selektion von Partikeln nach ihrer Größe. Die genaue Geometrie und die Auftrenngrößen lassen sich dafür im Voraus genau berechnen. Das eingeleitete Aerosol strömt mit ansteigender Geschwindigkeit durch in Reihe geschaltete Düsenplatten mit schrittweise kleiner werdenden Düsendurchmessern. Zwischen den einzelnen Düsenplatten befinden sich in den berechneten Abständen sogenannte Prallplatten auf den jene Partikel abgeschieden werden, welche die Platte auf Grund ihrer Masse und der daraus resultierenden Flugbahn nicht passieren können. In Abschnitt 4.13.1 wird ein solcher Impaktor als Ergänzung zum neu entwickelten System dargelegt.

3.9. Zellsysteme des menschlichen Respirationstrakts

Neben der Aerosolgeneration und der Charakterisierung des Aerosols hat die Auswahl des *in vitro* Zellsystems eine entscheidende Bedeutung. Das Spektrum von unterschiedlichen Zellmodellen reicht von einschichtigen bzw. mehrschichtigen Zellsystemen bis hin zu ganzen Gewebestücken.

Die einfachste Methode bildet der Einsatz von etablierten Zelllinien, insbesondere von Krebszelllinien, da diese sich verhältnismäßig schnell vermehren und entsprechend gut kultivieren lassen. Neben den im folgenden Abschnitt beschriebenen A549 Zellen gehören die bronchialen Lungenepithelzelllinien Calu-3 und BEAS-2B zu den am Häufigsten verwendeten *in vitro* Zellmodellen. Die adhärent wachsenden Calu-3 Zellen wurden aus dem Adenokarzinom eines männlichen Patienten isoliert und stammen von bronchotrachealen

Drüsenzellen der Submukosa ab. Sie bilden eine geschlossene einfache Zellschicht aus und weisen im Gegensatz zu A549 einen gut messbaren transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) auf (Foster, Avery et al. 2000).

BEAS-2B Zellen haben ihren Ursprung ebenfalls im menschlichen Bronchialepithel, allerdings stammt diese Zelllinie aus gesundem isoliertem Gewebe. Durch Infektion der bronchialen Epithelzellen mit dem Adenovirus 12-SV 40 Hybridvirus erfolgte die Transformierung zur Zelllinie BEAS-2B, welche weiterhin die Morphologie und viele Eigenschaften der Ursprungszellen aufweisen (Reddel, Ke et al. 1988; Albright, Jones et al. 1990; Kinnula, Yankaskas et al. 1994).

Neben diesen Zelllinien werden immer häufiger auch Primärzellen zur Herstellung von sogenannten 3D- oder Ko-Kulturen eingesetzt. Die Primärzellen zeigen in Anlehnung an die *in vivo* Situation eine vergleichbare Differenzierung und können mit anderen Zelltypen zur Kultivierung von komplexen Ko-Kulturen verwendet werden. Solche Modelle ermöglichen die Analyse von zellspezifischen Reaktionen, Differenzierungsprozessen und Krankheitsabläufen insbesondere unter Berücksichtigung von Zell-Zell-Interaktionen.

Im Bereich der Inhalationstoxikologie sind zwei dieser Modelle bereits gut charakterisiert und für die Direktexposition an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht etabliert. Das mehrschichtige EpiAirway™ Model (Mattek Corporation) besteht aus menschlichen Tracheal- bzw. Bronchialepithelzellen (NHBE oder TBE Zellen), die auf einer Kollagenmatrix kultiviert werden. Das Zellkonstrukt weist typische Charakteristika der menschlichen Bronchialzellen auf, wie Cilienbildung, die Sekretion von Mucin und die Ausbildung von *Tight junctions*. Durch das Wachstum in Zellkulturinserts an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht ist dieses Modell für inhalationstoxikologische Studien und zur Untersuchung von Lungenerkrankungen geeignet.

Das MucilAir™ Modell (Epithelix Sàrl) wird ähnlich wie das EpiAirway™ Model als Nachbildung des Epithelgewebes des menschlichen Respirationstrakts eingesetzt. Die durch Differenzierung aus isolierten Primärzellen gewonnenen Zellkonstrukte zeigen Zell-Zell-Interaktionen, wie die Ausbildung von *Tight junctions* und weisen einen aktiven Ionentransport, Mucusbildung und Cilien auf. Die beschriebene Stabilität der Konstrukte über mehrere Monate ermöglicht sowohl die Simulation von akuten bzw. chronischen Schädigungen als auch die Untersuchung von möglichen Reparaturmechanismen.

Die Entscheidung für eine der Zellsysteme ist dabei immer abhängig von der eigentlichen Fragestellung. Je komplexer das eingesetzte System, desto umfangreicher sind die

Zellkulturarbeiten. Der Einsatz von einfachen Zellsystemen für eine einfache Fragestellung erscheint in diesem Zusammenhang weitaus sinnvoller und auch kostengünstiger.

3.10. A549-Zelllinie

Bei A549 handelt es sich um eine alveolare Lungenepithelzelllinie, die 1972 aus dem Adenokarzinom eines männlichen 58jährigen Patienten isoliert wurde (Giard, Aaronson et al. 1973; Lieber, Smith et al. 1976). *In vitro* wachsen sie adhärent als Monolayer und weisen typische morphologische und biochemische Eigenschaften von Typ II Zellen auf wie *lamellar bodies* (Foster, Oster et al. 1998), Bildung von *surfactant protein* (Balis, Bumgarner et al. 1984) und Phospholipidbiosynthese (Shapiro, Nardone et al. 1978; Nardone and Andrews 1979). Im Gegensatz zu anderen alveolaren Lungenepithelzellen ist bei A549 nahezu kein TEER (*transepithelial electric resistance*) messbar, dies ist auf die Nichtausbildung von *tight junctions* zurückzuführen (Gruenert, Finkbeiner et al. 1995; Winton, Wan et al. 1998). Diese relevanten Membranproteine verbinden die Zellen eng mit ihren Nachbarzellen und stabilisieren so den gesamten Epithelzellverband. Die entstehende parazelluläre Barriere verhindert das Eindringen von Ionen und Molekülen und hält die Polarität der einzelnen Zellen aufrecht.

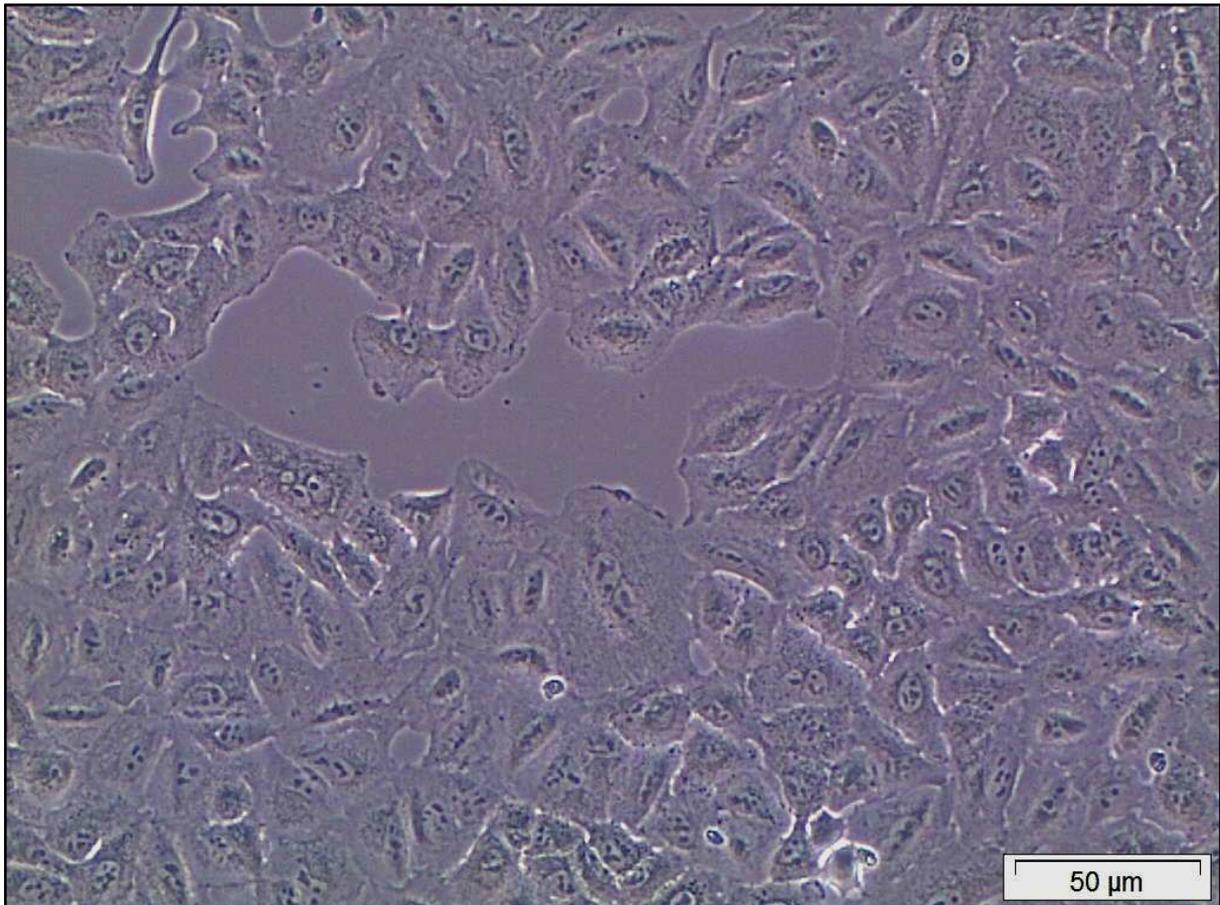


Abbildung 3-3: Mikroskopische Aufnahme von A549-Zellen in einer Zellkulturflasche (100fache Vergrößerung).

A549 ist in der ATCC (*American Type Culture Collection*) mit der Kennung CCL-185 und in der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) mit der ACC-107 gelistet.

3.11. Zellkultur

Der Begriff der Zellkultur beschreibt die Kultivierung von Zellen unter kontrollierten Bedingungen (Nährstoffversorgung, Temperatur, O_2 und CO_2 Gehalt der Inkubatoratmosphäre) außerhalb des Organismus und umfasst alle Prozesse, die mit den damit verbundenen Abläufen im Zusammenhang stehen. Die wichtigsten Grundlagen und gängigsten Methoden sind in einer Reihe von Büchern zusammengestellt (Pollard and Walker 1997; Lindl and Gstraunthaler 2008). Die speziellen Anwendungen für den Einsatz der

Zellkultur im Rahmen dieser Arbeit sind in den entsprechenden Kapiteln und im Anhang beschrieben.

3.12. Zellbiologische Endpunkte

Die Auswahl der zellbiologischen Methoden zur Charakterisierung der zellulären Reaktionen nach der Exposition hängt in erster Linie von der Fragestellung ab. Die Spanne der möglichen Endpunkte reicht dabei von verschiedensten Methoden zur Bestimmung der akuten Toxizität, Genotoxizität bis hin zu komplexeren molekularbiologischen Untersuchungen.

Die im Bereich der Inhalation gängigsten und in der Literatur meist beschriebenen Methoden sind die Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe von fertigen Assays (Roche Diagnostics GmbH 2007; Nassimi, Schleh et al. 2010) sowie die Untersuchung von verschiedenen Endzündungsfaktoren (Steerenberg, Zonnenberg et al. 1998; Bitterle, Karg et al. 2006; Persoz, Achard et al. 2010).

Der deutlichste toxikologische Effekt nach Behandlung mit einer Testsubstanz ist der Rückgang der Zellvitalität. Das Resultat dieser meist irreversiblen Effekte ist die Abnahme enzymatischer Reaktionen in der Zelle oder eine erhöhte Freisetzung von Bestandteilen aus dem Zytoplasma. Eine in den Zellen ablaufende enzymatische Umwandlung eines Substrates, wie beispielsweise eines Tetrazoliums Salzes (WST-1, MTT oder XTT), zu einem Produkt gibt Aufschluss über die Zellvitalität. Der Vergleich der behandelten Proben mit unbehandelten Kontrollen ermöglicht somit die Ermittlung der toxischen Wirkung auf die Vitalität der Zellen (Roche Diagnostics GmbH 2007).

Vergleichbar zu dieser intrazellulären Umwandlung eines Substrates kann eine solche Reaktion auch durch Freisetzung bestimmter Enzyme aus der Zelle erfolgen. Die aus lysierten oder geschädigten Zellen freiwerdende Laktat-Dehydrogenase beispielsweise, dient als Katalysator bei der Umsetzung des Tetrazoliums Salzes INT zu Formazan.

Auf einem ähnlichen Prinzip beruht der Nachweis von Interleukinen, speziellen Botenstoffen, welche von den Zellen als Entzündungsmediatoren gebildet werden und die Entzündungsreaktion des Körpers regulieren. Der Nachweis erfolgt mittels eines ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), einem speziellen antikörperbasierenden Nachweisverfahren (Goldsby, Kindt et al. 2003). Die Wells einer 96-Well Zellkulturplatte werden dafür in einem ersten Schritt mit einem Anti-Zytokin *Capture* Antikörper behandelt. In einem zweiten Schritt erfolgen das Auftragen der eigentlichen Proben und die Bindung der

darin enthaltenen Zytokine an die Antikörper. In mehreren aufeinander folgenden Waschschritten wird der ungebundene Rest der Probe entfernt bevor in zwei aufeinanderfolgenden Schritten ein zweiter *Detection* Antikörper und Avidin-HRP aufgetragen werden. Durch Zugabe eines Substrates (z.B. Tetramethylbenzidine) wird die Reaktion gestartet. Die Auswertung der Tests erfolgt wie bei den vorangegangenen Methoden durch die photometrische Messung des aus der Reaktion resultierenden Farbumschlags. Die Bestimmung von Interleukinen ermöglicht die Bestimmung der Toxizität eines Stoffes bereits bei geringen Dosen. Im Bereich der Interaktion zwischen Partikel mit den Zellen der Lunge findet die Methode besonders häufig bei der Testung von Dieselabgasen (Steerenberg, Sonnenberg et al. 1998; Cooney and Hickey 2011) und Zigarettenrauch (Mio, Romberger et al. 1997; Hellermann, Nagy et al. 2002) Verwendung.

Ein weiterer wichtiger und aussagekräftiger Endpunkt ist die Bestimmung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*), die bei Stoffwechselfvorgängen (Zellatmung) gebildet werden. Zu den *reactive oxygen species* (ROS) gehören neben freien Sauerstoffradikalen auch stabile Verbindungen wie Wasserstoffperoxid oder Ozon, die in den Zellen Proteinoxidation oder Lipidperoxidation bedingen. In hohen Konzentrationen führen diese schädlichen Formen des Sauerstoffs zu Störungen des normalen Reparatur- und Entgiftungsprozesses und somit zur Schädigung der Zellen (Ryter, Kim et al. 2007). Insbesondere viele Umweltgifte, wie Zigarettenrauch und Dieselabgase sind als Quellen für große Mengen von reaktiven Sauerstoffverbindungen bekannt und führen zu einem deutlich messbaren Anstieg von oxidativen Stress in den Zellen (Chio, Chen et al. 2007; Kiziler, Aydemir et al. 2007; Faux, Tai et al. 2009; Valavanidis, Vlachogianni et al. 2009). So belegen Studien eine eindeutige Verbindung zwischen oxidativem Stress und Krankheiten wie Parkinson (Gatto, Carreras et al. 1996; Foley and Riederer 2000; Sutachan, Casas et al. 2012) und Alzheimer (Markesbery 1997; Shi and Gibson 2007).

Die während der Reaktion auf den oxidativen Stress in erhöhter Anzahl auftretenden Enzyme lassen sich somit als Marker für oxidativen Stress einsetzen. Zum Schutz vor oxidativen Stress werden zahlreiche Enzyme wie die Katalase, die Superoxiddismutase und die Glutathionperoxidase (primäre Schutzenzyme) induziert, die somit als Marker dienen können. Daneben kommen auch sekundäre Systeme, wie die Glutathion-S-Transferase und die Glutathion-Reduktase (Burlakova, Zhizhina et al. 2010) zum Einsatz. Weitere Ansatzpunkte sind die Untersuchung des Glutathion Redoxsystem (Chiou and Tzeng 2000) und der Nachweis von Nebenprodukten der Lipidperoxidation, wie Malondialdehyd (Petit, Chancerelle et al. 1995; Orhan, Gurer-Orhan et al. 2006).

Neben der Messung von Farbumschlägen auf Grund von Enzymreaktionen kommen häufig auch eine oder mehrere Methoden zur Färbung bestimmter Zellbausteine zum Einsatz. Die Auswertung dieser Methoden erfolgt vorwiegend visuell mittels verschiedenster mikroskopischer Techniken. Ein Beispiel für den Einsatz einer solchen Methode bildet die optische Untersuchung des bereits angesprochenen oxidativen Stresses.

Der Nachweis von intrazellulärem reaktiven Sauerstoffspezies beruht auf der Umwandlung von nicht-fluoreszierendem 2',7'-Dichlorfluoreszein-Diacetat (DCFH-DA) zu stark fluoreszierendem 2',7'-Dichlorfluoreszein. In einem ersten Schritt werden die Zellen unter Ausschluss von Licht mit DCFH-DA vorinkubiert. In dieser Zeit gelangt die nicht-fluoreszierende Substanz durch Penetration der Membran in die Zellen. Durch intrazelluläre Esterasen erfolgt hierbei die Umwandlung zu nicht-fluoreszierendem 2',7'-Dichlorfluoreszein (DCFH). Die durch freie Sauerstoffradikale aus Oxidation von DCFH zu fluoreszierendem DCF, lässt sich durch Messung der Fluoreszenz bzw. Lumineszenz mittels eines Mikroplattenlesegeräts bestimmen (Cathcart, Schwiers et al. 1983; van der Toorn, Rezayat et al. 2009; Konczol, Ebeling et al. 2011).

Ein weiterer Effekt des oxidativen Stresses ist die Schädigung der DNS, insbesondere der DNS der Mitochondrien. Die freien Radikale oxidieren oder reduzieren dabei die Basen der DNS und führt zur Bildung neuer modifizierter Basen (Wagner and Jahreis 2004). Unter normalen Umständen würden diese oxidativen Schäden durch das Antioxidantien-System zurückgebildet und die DNS repariert. (Cooke, Evans et al. 2003). In großer Anzahl in Dieselabgasen oder Rauch enthaltene Substanzen führen zur übermäßigen Bildung der modifizierten Basen und überfordern somit den Reparaturmechanismus und führen zum Tod der Zellen (Oya, Ovreik et al. 2011; Forchhammer, Loft et al. 2012). Die daraus resultierenden Schäden, wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche, lassen sich mittels Comet Test darstellen (Ostling and Johanson 1984; Tice, Agurell et al. 2000). Dieser Test ermöglicht den Nachweis von Schäden an der DNS durch Gelelektrophorese für einzelne Zellen. Die negativ geladene DNS der in Agarose eingebetteten und lysierten Zellen wandert im angelegten elektrischen Feld zum Pluspol und trennt sich dabei der Größe nach auf. Die im intakten Zustand sehr große chromosomale DNS ist nicht in der Lage den Zellkern der Zellen zu verlassen, so dass nur Bruchstücke der geschädigten DNS im Gel wandern können. Durch Färbung der DNS mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit Ethidiumbromid werden die Bruchstücke als charakteristischer Kometenschweif hinter den Zellen sichtbar.

4. Experimenteller Teil

Das Prinzip der Direktexposition in einem Cultex[®] CG Glasmodul (Kapitel 6.6) ist bereits erfolgreich für die Exposition von Zellen mit Gasen und Zigarettenrauch eingesetzt worden. Die Entwicklung und Etablierung eines vergleichbaren Systems für die Exposition mit Feststoffaerosolen bildet das Kernthema dieser Arbeit. Die Anforderungen an diesen neuen Expositionsaufbau sind im Vergleich zu den bereits getesteten Gasen deutlich komplexer und anspruchsvoller. Wie für alle zur Direktexposition eingesetzten Module muss eine gleichmäßige Verteilung des Aerosols auf die drei Kammern eines Cultex[®] CG Moduls gewährleistet sein. Parallel dazu steht die homogene Verteilung auf der Membran innerhalb einer Kammer im Vordergrund. Der Einfluss der physikalischen und chemischen Charakteristika einer jeden Testsubstanz auf das Verhalten des Aerosols erhöht die Anforderungen an das System im Vergleich zur Exposition mit Gasen oder Zigarettenrauch. Die im Folgenden beschriebenen Experimente zur Abscheidung von Partikeln auf Filterpapieren dienen als Basis für die im Rahmen der Arbeit geplanten Expositionsexperimente mit Zellen.

4.1. Entwicklung und Etablierung eines ersten experimentellen Aufbaus zur Exposition mit Partikeln aus Feststoffaerosolen

Der bereits für Gase und Zigarettenrauch etablierte Aufbau, bei dem das generierte Aerosol durch eine horizontalverlaufenden Glasröhre über ein Cultex[®] CG Glasmodul geleitet wird (Abbildung 4-4), dient als Grundlage für eine erste Versuchsserie. Aus diesem linear verlaufenden Aerosolstrom wird an drei unterschiedlichen Stellen mit Hilfe von Massenflussreglern sowie einer nachgeschalteten Vakuumpumpe eine genau definierte Aerosolmenge von 30 ml/min in jede der drei Expositionskammern abgesaugt. Der auf diese Art und Weise erzeugte und konstant gehaltene Aerosolfluss wird durch speziell entwickelte Aerosoldüsen über die zur Beaufschlagung eingelegten Filterpapiere geleitet.

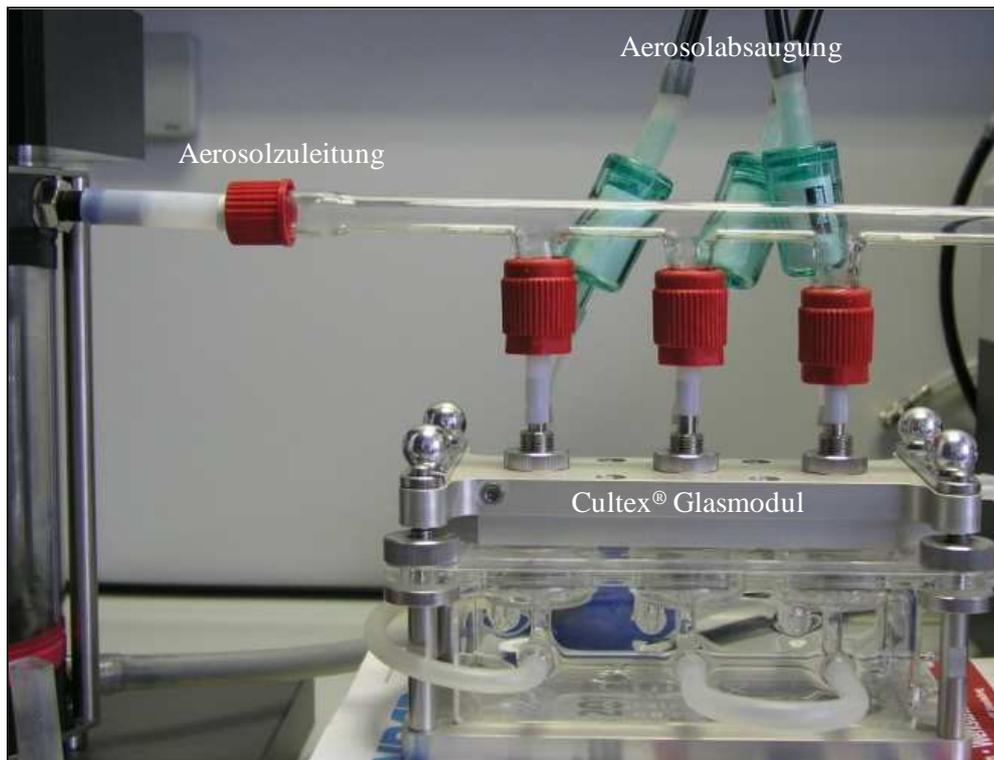


Abbildung 4-4: Abbildung des Aufbaus mit einem Cultex® CC 24mm Modul. Dargestellt sind die Aerosolzuleitung und die Absaugung am Modul.

Das mit einem *Dust Feeder* nach Wright (Wright 1950) unter Druckluftzufuhr erzeugte Aerosol wird innerhalb des Expositionssystems über die eingesetzten Filterpapiere geleitet. Bereits in der ersten Versuchsserie mit Kupfer(II)oxid zeigt sich eine starke Ungleichverteilung über die drei Kammern, dokumentiert durch die abgeschiedene Partikelmasse auf den Filterpapieren (Abbildung 4-5). Die gravimetrische Bestimmung der Masse an abgeschiedenem Kupfer(II)oxid auf den Filter bestätigt diesen ersten optischen Eindruck.

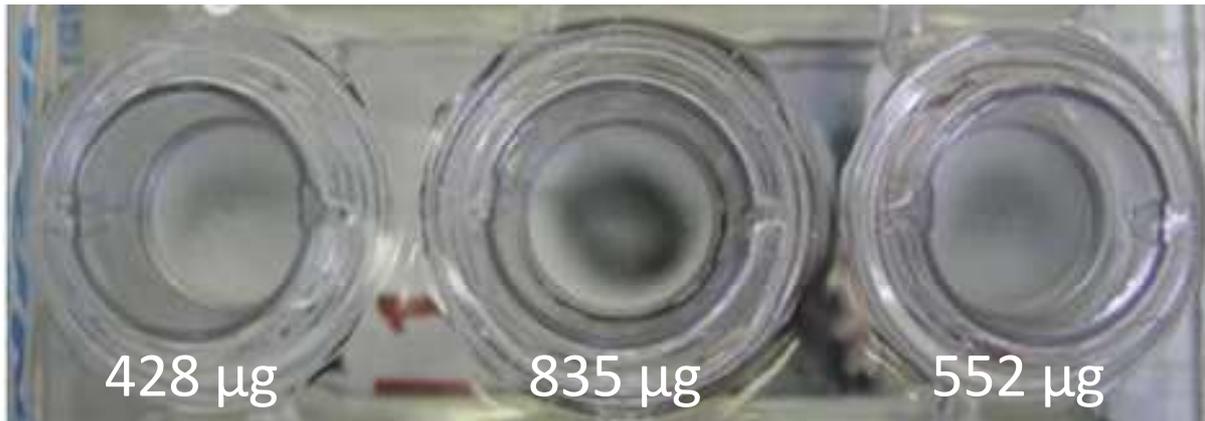


Abbildung 4-5: Abscheidungen auf Filterpapiere in einem Cultex® CC 24mm Modul inklusive Auswaage der Filterpapiere.

Die schlechte und unkontrollierbare Verteilung sowohl zwischen den Kammern als auch innerhalb einer Kammer führt zu der Frage, inwieweit der aktuelle Aufbau bzw. das aktuelle Modul für die geplanten Expositionen einsetzbar ist. Die Tatsache, dass die einzelnen Partikel unter den gegebenen Bedingungen unterschiedliche Weglängen bis zur jeweiligen Membran zurücklegen müssen, deutet darauf hin, dass eine gleichmäßige homogene Verteilung auf die drei Kammern - unter Berücksichtigung der Sedimentation, der Ladungen und des damit verbundenen Agglomerationsverhaltens - fast unmöglich ist.

Dieses Problem sowie eine Reihe weiterer verbesserungsbedürftiger Aspekte der linearen Cultex® CG Glasmodule führen zur Planung und Entwicklung eines Prototypen für ein komplett neues Modul, das Cultex® *Radial Flow System*.

4.2. Weiterentwicklung der Cultex® CG Glasmodule zum Cultex® *Radial Flow System*

Die Entwicklung des neuen Cultex® RFS erfolgt unter Berücksichtigung zweier entscheidender Gesichtspunkte: a) der Optimierung der Strömungsführung als Alternative zur linearen Anordnung im Cultex® CG Modul und b) der Vereinfachung des gesamten Expositionsablaufes.

Das Hauptziel der Neukonstruktion ist die Optimierung, d.h. die Angleichung der von den Partikeln zurückgelegten Wegstrecke von der Aerosolgeneration bis auf die Membranen. Da eine lineare Zuleitung des Aerosols eine inhomogene Verteilung der Partikel fördert, wurde im Cultex® RFS ein zentral liegender Hauptkanal integriert, von dem drei identische

Zuleitungskanäle radiär zu den, um den Hauptkanal angeordneten Expositionskammern führen. Bei der Entwicklung und bei dem Systemneubau wurden weitere Änderungen bezüglich der Materialien vorgenommen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf Merkmalen, wie der Zellverträglich, Autoklavierbarkeit, Medium- wie auch Alkoholresistenz, um die Arbeit unter sterilen Bedingungen sicherzustellen und Schäden an den Zellen durch Wechselwirkungen mit den Materialien zu verhindern. Im Gegensatz zu den Vorgängermodulen aus Glas wurde hierbei auf maschinelle Fertigung mit geringen Toleranzen gegenüber Handarbeit gesetzt.

Das auf diese Art und Weise entstandene System zeichnet sich stark durch einen modularen Aufbau aus (Abbildung 4-6). Direkt oben auf das System wurde ein flexibler und abnehmbarer Einlassadapter mit einem 8 mm Schlauchansatz platziert, der sich mit zwei Flügelschrauben auf dem Aerosolführungsmodul befestigen lässt. Das Aerosolführungsmodul mit dem zentralen Kanal und den radiär angeordneten Zuleitungen zu den Kammern ist das Kernstück des neuen Systems und ist fest an zwei Gleitrohren einer stabilen Hebevorrichtung montiert. Das Probenaufnahmemodul bildet das untere Gegenstück des Cultex[®] RFS und kann in Verbindung mit einem Sockelmodul direkt unter das Aerosolführungsmodul geschoben werden.

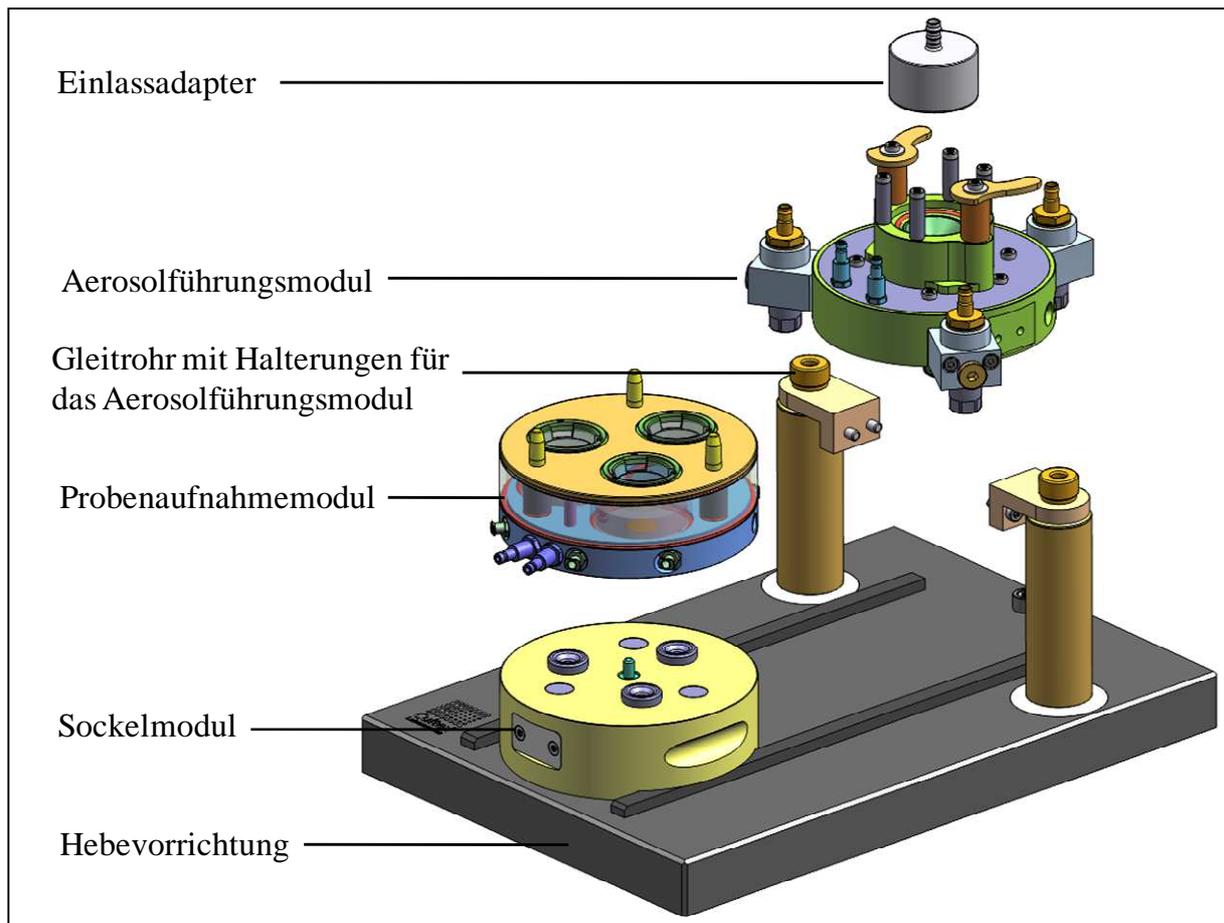


Abbildung 4-6: Gesamter modularer Aufbau des Cultex® RFS (Einlassadapter, Aerosolführungs-, Probenaufnahme-, Sockel-Modul und Hebevorrichtung). (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Die entscheidenden Änderungen für die einzelnen modularen Baugruppen des Systems sind in den folgenden Abschnitten detailliert dargestellt.

4.2.1. Aerosolführungsmodul

Das Aerosolführungsmodul dient in erster Linie der Verteilung des Aerosols, welches durch den Einlassadapter zentral in das System geleitet wird (Abbildung 4-7). Der durch eine Vakuumpumpe angelegte und mittels eines Massenflussreglers gesteuerte Sog am Überschussadapter erzeugt einen konstanten Aerosolfluss durch das obere System. Von diesem Hauptstrom wird an einem zentralen Punkt ein definiertes Volumen des Aerosols in jede der drei Zuleitungen gesaugt. Mit diesem ebenfalls über Massenflussregler gesteuerten Nebenstrom gelangt das Aerosol über speziell konzipierte austauschbare Aerosoldüsen in die

einzelnen Kammern. Durch dieses neue Design konnte die Weglänge vom Einlassadapter zu den Membranen der Zellkulturinsets für alle drei Kammern angepasst werden.

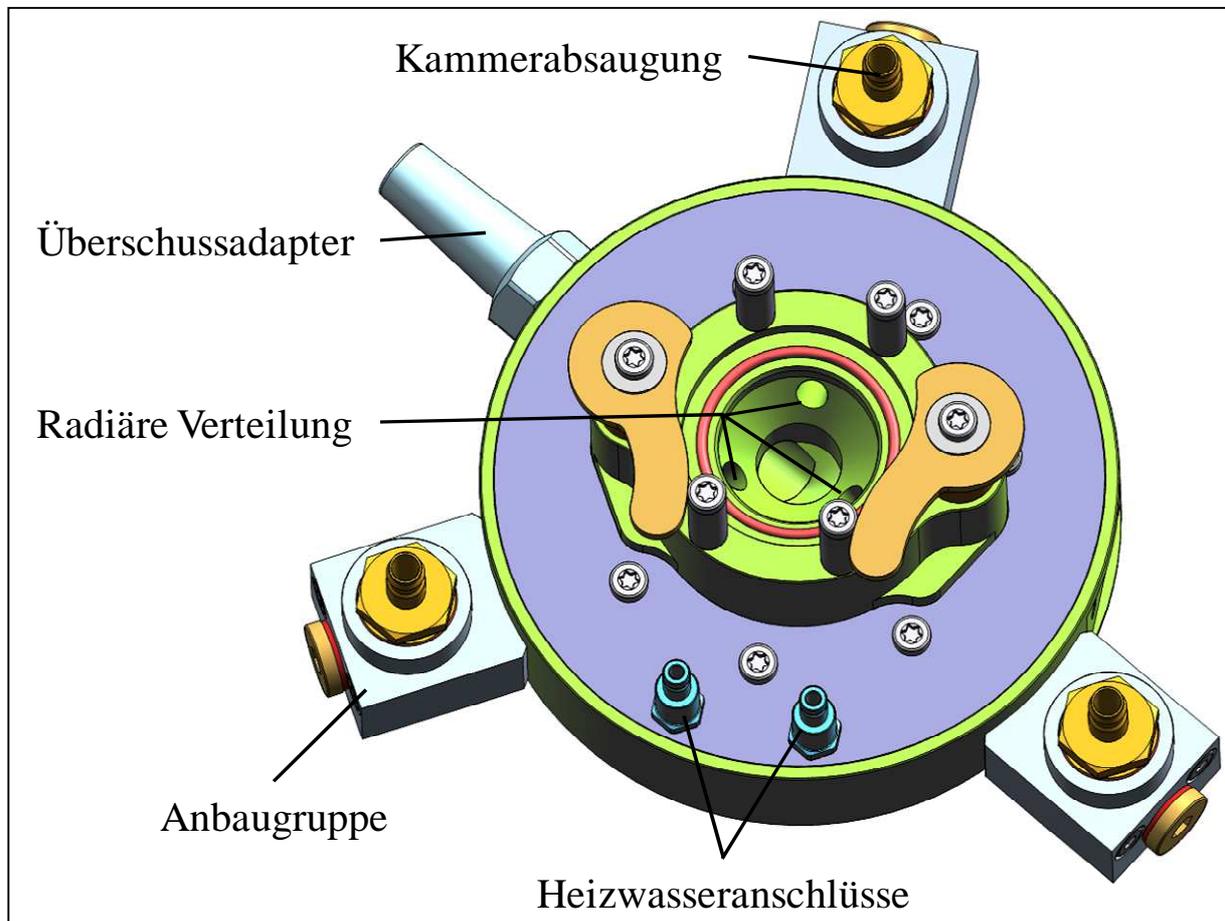


Abbildung 4-7: Aerosolführungs-Modul in der Aufsicht. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Das durch die drei Aerosoldüsen (Abbildung 4-8) eingeleitete Aerosol wird kontinuierlich direkt über die Zellen geleitet und über kreisförmig, um die Düse angeordnete Absauglöcher (Abbildung 4-8) wieder aus der Kammer abtransportiert. Die Absaugung des Aerosols aus dem System erfolgt über spezielle Anbaugruppen, die neben einem Schlauchanschluss für die Absaugung auch mit Kondensatfallen ausgestattet sind (Abbildung 4-8). Diese unterhalb des Schlauchanschlusses platzierten Auffangtöpfe verhindern, dass in den Schläuchen entstandenes Kondensat in das System zurückfließt.

Um Undichtigkeiten zwischen den einzelnen Unterbaugruppen zu verhindern wurden alle Bereiche mit Silikon oder Viton Dichtungen bzw. Dichtringen versehen. Die besonders flexiblen Ringdichtungen um die Aerosoldüsen gewährleisten ein sicheres Verschließen des Aerosolführungsmoduls auf das Probenaufnahmemodul. Beim Schließen des Cultex[®] RFS

mittels der Hebevorrichtung soll somit ein, in sich komplett geschlossenes und luftdichtes System entstehen.

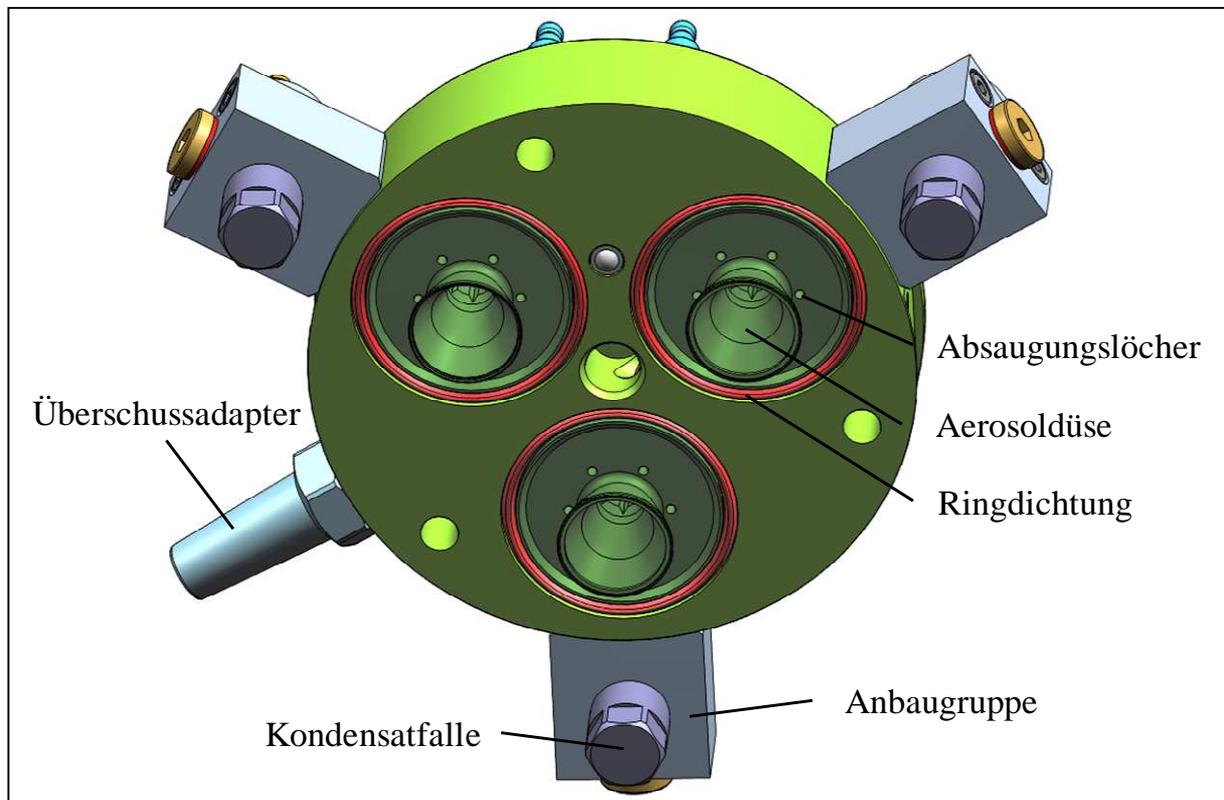


Abbildung 4-8: Aerosolführungs-Modul in der Bodenansicht. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Zur Vermeidung von Kondensationen in den beiden Baugruppen und zur Aufrechterhaltung der Zellvitalität können diese beiden Bereiche mit temperiertem Wasser (37°C) durchströmt werden (Abbildung 4-7). Dieser Aspekt ist für die Exposition der empfindlichen Zellen und deren Vitalität von entscheidender Bedeutung.

Insbesondere die Temperierung des im folgenden Textabschnitt beschriebenen Probenaufnahme- und des darin enthaltenen Nährmediums ist ausschlaggebend für eine erfolgreiche Exposition.

4.2.2. Probenaufnahme- und Sockelmodul

Das komplett neu entwickelte Probenaufnahme- und Sockelmodul - in Verbindung mit dem Sockelmodul - dient neben der Aufnahme der Zellkulturinserts, der Versorgung der Zellen und der Erhaltung der Zellvitalität während der Exposition. Die radiär angeordneten Kammern

können jeweils ein Zellkulturinsert aufnehmen. Bei der Neukonstruktion wurde Wert darauf gelegt, ein flexibles und vielseitig verwendbares Design zu finden, das den Einsatz verschiedener Zellkulturinsertgrößen und -marken gestattet. Zu diesem Zweck in das System integrierte Adapterringe können, wie die bereits angesprochenen Aerosoldüsen (Abbildung 4-8), im Aerosolführungsmodul mit wenigen Handgriffen ausgetauscht werden. Verfügbar sind Adapterringe und Aerosoldüsen für Zellkulturinsert mit einem Durchmesser der Zellkulturmembran von 6,5 mm, 12 mm und 24 mm sowie für Petrischalen (33 mm) zur Exposition von Bakterien im AMES-Test.

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt für das Aerosolführungsmodul beschrieben, dient auf 37°C erwärmtes Wasser der Aufrechterhaltung der Zellvitalität. Über zwei Heizwasseranschlüsse kann der Glaskörper des Probenaufnahmemoduls vollständig mit Wasser gefüllt bzw. durchspült werden (Abbildung 4-9). Das kontinuierlich von einem externen Wärmethermostat durch das Modul gepumpte Wasser ermöglicht somit Expositionen von zwei bis drei Stunden ohne Abkühlung des Nährmediums und der Beeinflussung der Zellvitalität.

Die drei Kammern sind im Vergleich zu den Vorgängermodulen komplett voneinander getrennt und können somit einzeln mit Nährmedium versorgt werden. Da neben der Temperatur auch die Höhe des Nährmediums unter den Membranen der Zellkulturinserts einen entscheidenden Einfluss auf das empfindliche Mikroklima um die Zellen hat, wurden spezielle Überlaufröhrchen entworfen (Abbildung 4-9). Diese Röhrchen halten den Mediumspegel in den Kammern auf einem definierten Level und können wenn nötig durch kürzere oder längere Versionen ausgetauscht werden. Die Kontrolle des Mediumspegels verhindert bei einem konstanten Aerosolfluss eine Austrocknung der Zellen auf der Membran. Ein überhöhter Mediumspegel kann zu einer Übersichtung der Zellen mit Medium und somit zu einer Störung des direkten Kontaktes zwischen den Partikeln und den Zellen führen. Die Nährmediumzuleitung wurde entgegengesetzt zu den Absaugröhrchen installiert, um während eines Mediumwechsels eine bessere Durchmischung mit dem in den Kammern verbliebenem Restmedium zu gewährleisten (Abbildung 4-10). Der Anschluss von Spritzen oder von externen automatischen Schlauchpumpen an die Versorgungsanschlüsse bieten die Möglichkeit, bei einer laufenden Exposition, Nährmedium zu- oder abzupumpen.

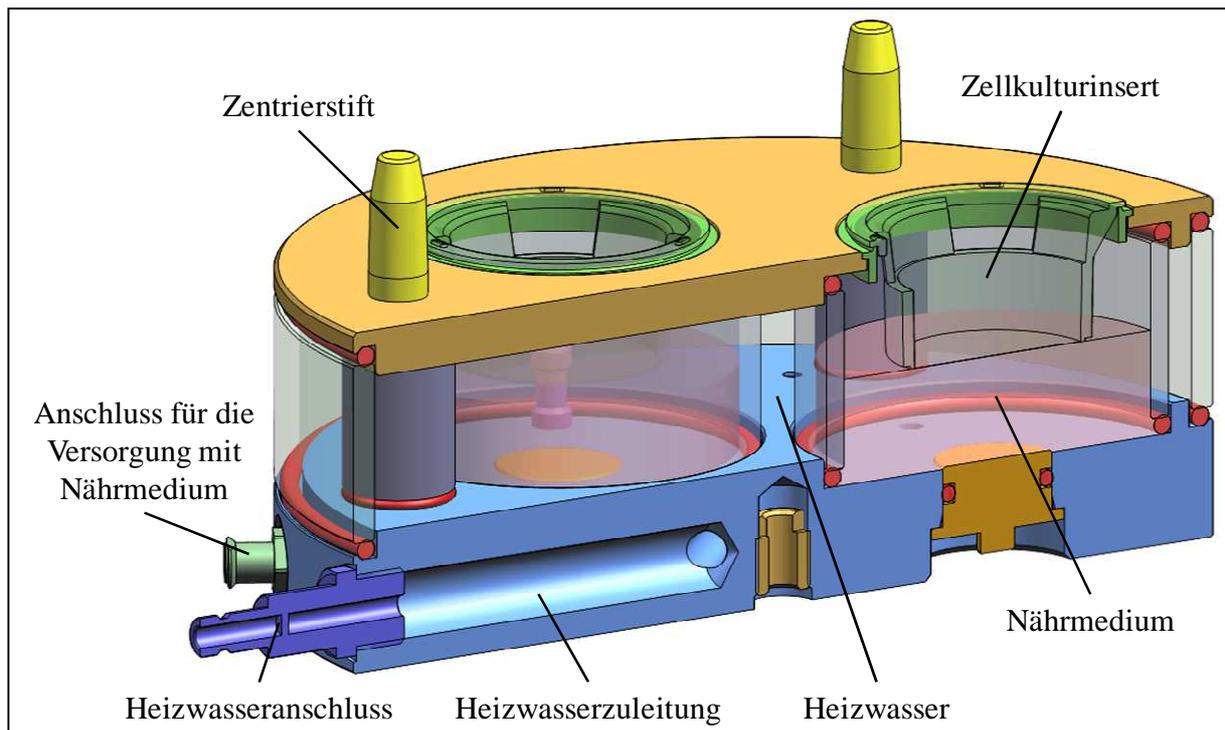


Abbildung 4-9: Probenaufnahme-Modul im Querschnitt. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

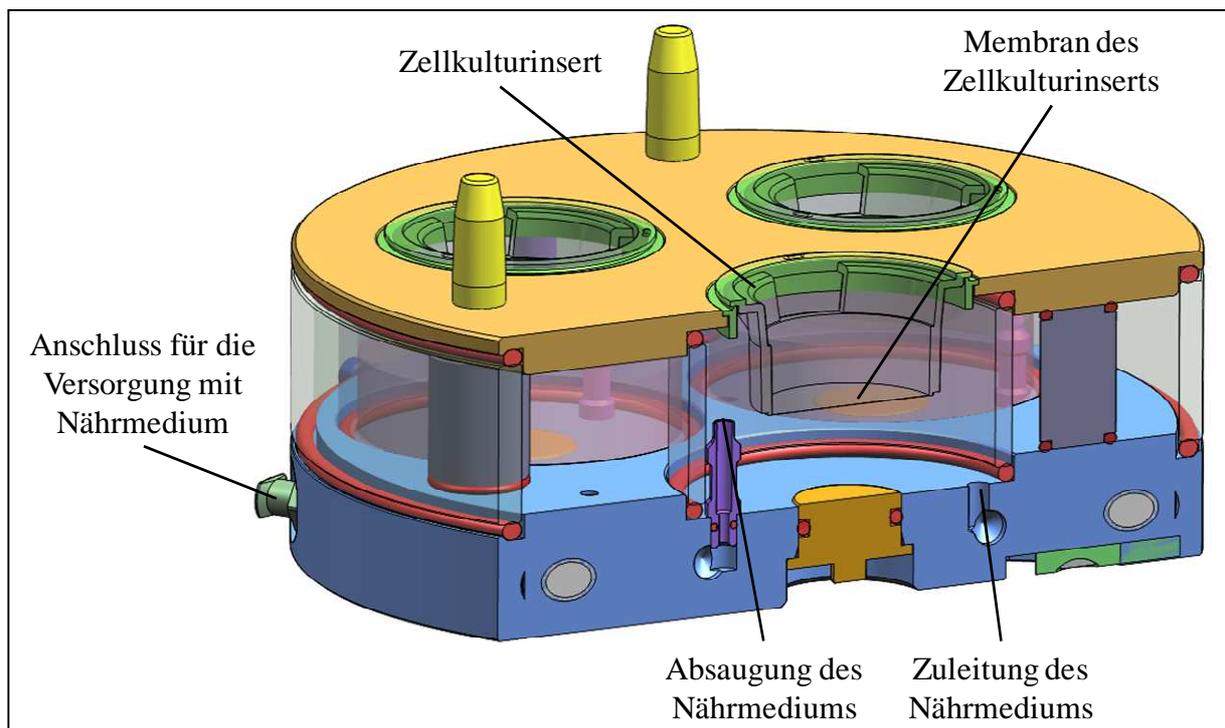


Abbildung 4-10: Probenaufnahme-Modul mit Mediumversorgung im Querschnitt. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Beim Absenken des Aerosolführungsmoduls auf das Probenaufnahmemodul ist eine hohe Präzision erforderlich, um eine Berührung der Aerosoldüsen mit den Zellkulturinserts zu

vermeiden und ein hundertprozentiges Abdichten zu gewährleisten. Die in Abbildung 4-9 dargestellten Zentrierstifte dienen der Fixierung der beiden Bauteile während des Verschließens des Systems. Eine besondere Bedeutung hinsichtlich der Dichtigkeit und der Stabilität des Systems kommt der im Folgenden beschriebenen Hebevorrichtung zu.

4.2.3. Hebevorrichtung

Die Cultex[®] Glasmodule zeichneten sich durch Unzulänglichkeiten in der Handhabung und in der Konstruktion aus. Die mangelnde Stabilität, auftretende Undichtigkeiten und ein Verklemmen des Oberteils mit dem Glasunterteil verhinderten einen schnellen und reibungslosen Wechsel der Zellkulturinserts. Ein für die Cultex[®] Glasmodule eingesetztes Bajonettverschlussystem erwies sich bei der Adaption an das neue System als zu komplex und wenig platzsparend. Ein neu konzipiertes System dient der Beseitigung dieser Mängel.

Eine Hebevorrichtung (Abbildung 4-11) wird über ein stabiles Schienensystem mit einer effektiven und präzisen Absenkvorrichtung kombiniert. Das Aerosolführungsmodul ist dabei mit Halterungen fest an zwei Gleitrohre montiert, die sich mittels eines Drehrades absenken lassen. Das Probenaufnahmemodul mit montiertem Sockelmodul lässt sich über zwei Schienen frei auf der Bodenplatte unter das Aerosolführungsmodul schieben. Ein Stopper am hinteren Ende der Bodenplatte fixiert das Unterteil dabei direkt unter dem absenkbaaren Oberteil.

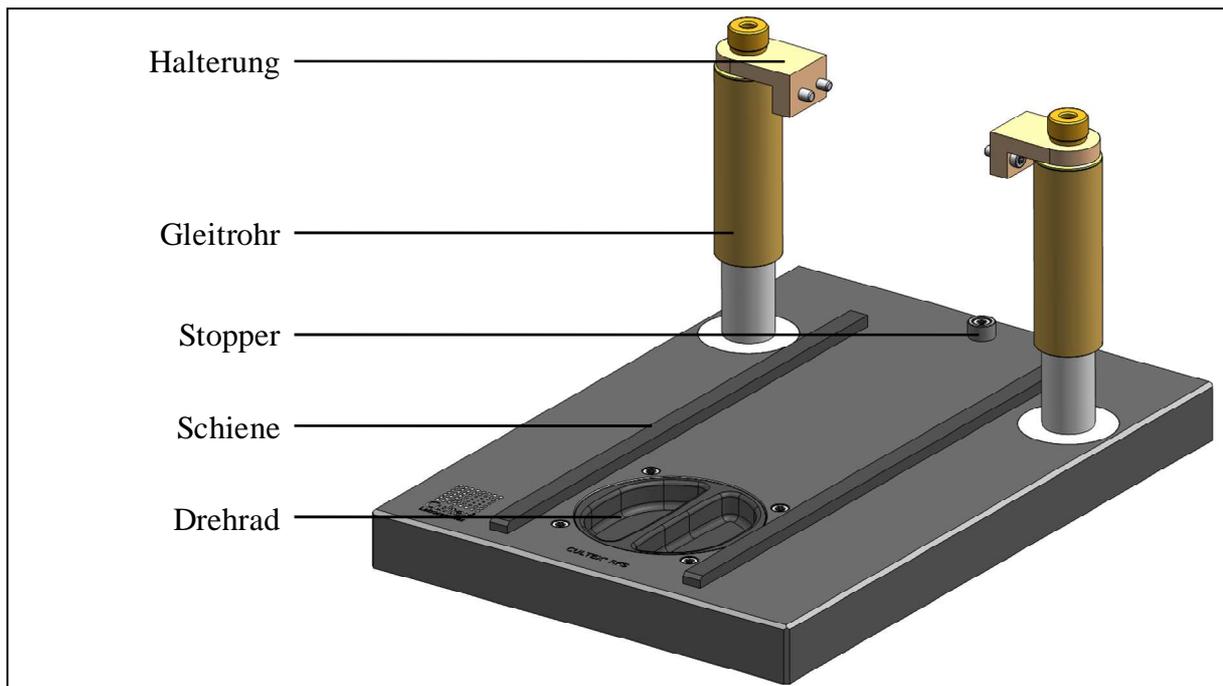


Abbildung 4-11: Hebevorrichtung. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Fazit

Das neu entwickelte Cultex[®] Radial Flow System besteht aus drei voneinander getrennten funktionellen Hauptkomponenten, dem Aerosolführungsmodul, dem Probenaufnahmemodul und der Hebevorrichtung. Die Vitalität der Zellen wird durch einen stabilen Mediumspiegel und durch die Erwärmung auf 37°C gewährleistet. Das gesamte System ist einfach zu bedienen, mit wenigen Handgriffen zu demontieren und gut zu reinigen. Die Wahl der Materialien ermöglicht außerdem die Reinigung in der Spülmaschine sowie die Sterilisation im Autoklaven.

Basierend auf den Erfahrungen der alten Cultex[®] Glasmodule und durch die veränderten Anforderungen bei der Exposition mit Feststoffen ist somit ein extrem flexibles und modulares Präzisionsgerät entstanden, das in den folgenden Abschnitten in Kombination mit der Partikelgeneration genauer charakterisiert wird.

4.3. Entwicklung des Cultex[®] DG - Dust Generators

Begleitende Experimente zur Partikeldeposition während der Weiterentwicklung des RFS zeigen für den aktuell eingesetzten Aerosolgenerator (*Dust Feeder*) bei einer Laufzeit von fünf Stunden starke Schwankungen in der Anzahl der insgesamt generierten Partikel. Die Ermittlung der Daten zur genaueren Charakterisierung erfolgt mit einem APS (*Aerodynamic Particle Sizer*, TSI Inc.). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Partikelanzahl von jeweils drei unabhängigen Messungen (jeweils 2 min) an drei unterschiedlichen Expositionstagen sind in Tabelle 4-1 aufgeführt.

Tabelle 4-1: Mittelwerte der Partikelanzahl der APS-Messungen zu 3 Zeitpunkten an 3 Tagen

Zeitpunkt der Messung [min]		Exposition 1	Exposition 2	Exposition 3
60	Mittelwert	769969	648140	607929
	Standardabweichung	64813	53150	5904
180	Mittelwert	660719	521576	450927
	Standardabweichung	11204	139028	88545
300	Mittelwert	1104959	1036358	931139
	Standardabweichung	231064	124460	109523

Die Ergebnisse der Messungen zeigen starke Schwankungen innerhalb und zwischen den einzelnen Zeitpunkten auf. So hat sich die Anzahl der gemessenen Partikel nach 300 min im Vergleich zur Messung nach 180 min verdoppelt. Die drei aufeinanderfolgenden Messungen (jeweils 2 min) zu einem Zeitpunkt weisen dabei Abweichungen von 1-20% auf.

Auf Grund dieser Daten ist eine Aussage über die Zuverlässigkeit und Genauigkeit des neuen Zellexpositionssystems nur eingeschränkt möglich. Zur Beseitigung dieser Ungenauigkeiten wurde mit der Konstruktion eines verbesserten computergesteuerten Aerosolgenerators begonnen (Abbildung 4-12). Der Aufbau und die besonderen Eigenschaften des neuen Aerosolgenerator basierend auf dem *Dust Feeder* nach Wright (Wright 1950) sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

4.3.1. Partikelgenerator

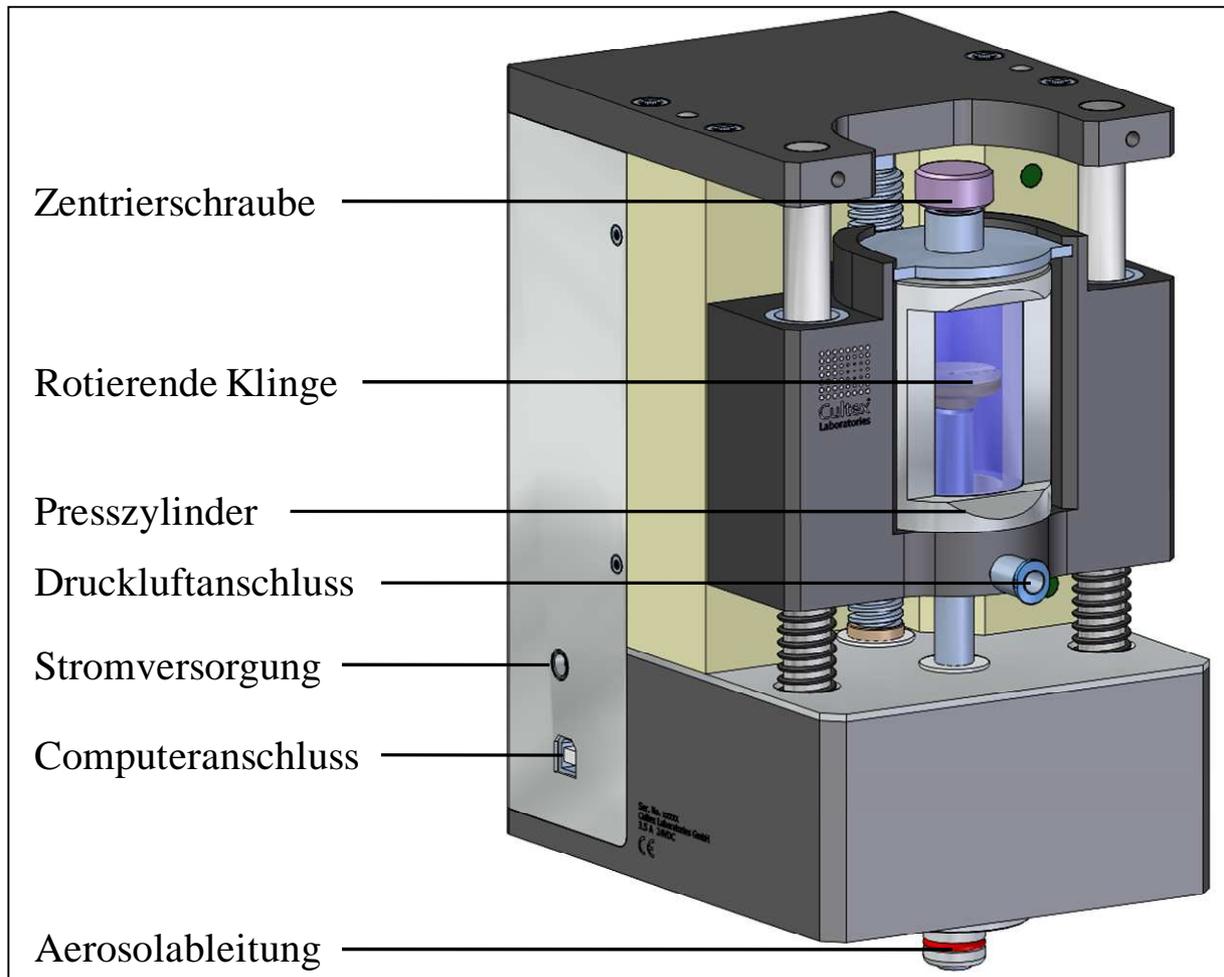


Abbildung 4-12: Cultex[®] DG Dust Generator. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Vor der Exposition wird die Substanz mit einer hydraulischen Presse (Cultex[®] HyP) in einen Presszylinder gepresst (Kapitel 4.11.1). Dieser wird kopfüber in eine spezielle Halterung im Aerosolgenerator platziert und mit einer Zentrierschraube befestigt. Der Zylinder mit der Substanz kann unter Zuleitung von Druckluft gegen eine rotierende Klinge gefahren werden. Die Rotationsgeschwindigkeit (U/Stunde) und der Vorschub (mm/Stunde) werden über eine Steuerungssoftware vorgegeben und überwacht. Die hohe Genauigkeit der Motoren ermöglicht eine präzise Aerosolgeneration auch bei einer Laufzeit von mehreren Stunden. Der Aerosolgenerator wird über eine Aerosolableitung mit dem sogenannten Elutriator verbunden, einem speziellen Selektionsgefäß, welches der Ableitung von überschüssigem Aerosol und der Abscheidung größerer Partikel dient.

4.3.2. Elutriator (Selektionsgefäß)

Der Elutriator dient in erster Linie der Ableitung von nicht benötigtem Aerosol (Abbildung 4-13) und ermöglicht gleichzeitig eine größenspezifische Vorselektion der Partikel. Auf der Grundlage von Berechnungen basierend auf dem Gesetz von Stokes (Anhang 6.5), können nur Partikel mit einem bestimmten Durchmesser die Zuleitung zum Modul erreichen. Durch ein Zentralrohr gelangt das zuvor generierte Aerosol in den Elutriator und trifft dort auf eine Prallplatte. Diese dient der Abscheidung von großen Partikeln und Bruchstücken, die bei der Generation als unerwünschte Artefakte auftreten können. Das an der Modulzuleitung angeschlossene Cultex[®] RFS mit der nachgeschalteten Vakuumpumpe erzeugt einen konstanten Aufwärtsstrom im Elutriator mit dem nur Partikel bis zu einer definierten Größe aufgesaugt werden. Alle anderen Partikel werden mit der restlichen Druckluft durch die Überschussleitung abgeleitet. Unter Standardtestbedingungen erfolgt die Absaugung von 1,590 l/min aus dem Elutriator zum Modul, die restlichen 6,41 l/min verlassen den Elutriator durch den Überschuss in einen Filter.

Diese besonderen Eigenschaften des gesamten Aerosolgenerators inklusive Elutriator ermöglichen die Generation eines Aerosols über eine längere Laufzeit mit einer genau definierten maximalen Partikelgröße.

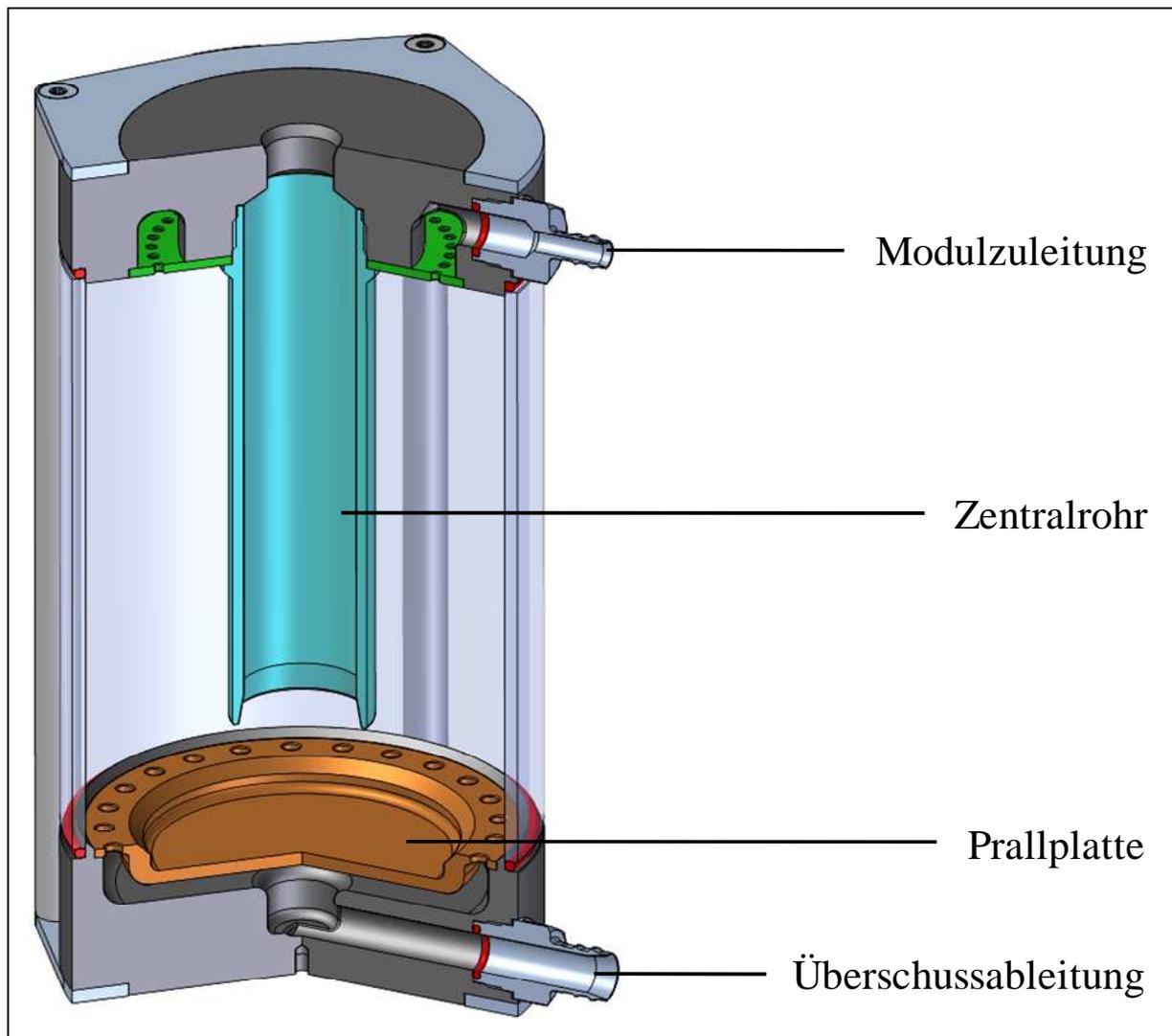


Abbildung 4-13: Elutriator im Querschnitt. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Für die Berechnungen des Trenndurchmessers wird von einem vertikalen Rohr (Elutriator) mit einem definierten Durchmesser ausgegangen. Es können folglich nur Partikel durch den Elutriator geleitet werden, die eine geringere Sedimentationsgeschwindigkeit als die Gasgeschwindigkeit aufweisen. Die Länge des Rohres spielt dabei keine Rolle, es kommt für die Berechnung lediglich auf die geringste Strömungsgeschwindigkeit, die an irgendeinem Querschnitt auftritt, an. Eine genaue Berechnung müsste das Geschwindigkeitsprofil berücksichtigen, näherungsweise kann aber auch mit der mittleren Strömungsgeschwindigkeit gerechnet werden, welche sich aus dem Quotienten aus Volumenstrom (Q) und Querschnittsfläche (A) ergibt.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit (v_{sed}) ergibt sich aus dem Gesetz von Stokes.

Formel 1: Berechnung des Gewichts eines Partikels aus dem Gesetz von Stokes

$$W = \frac{3\pi * \eta * d * v_{\text{sed}}}{C}$$

W	=	Antriebskraft, in diesem Fall das Gewicht des Partikels
π	=	Pi [3,1416]
η	=	Viskosität von Luft [1,8*10 ⁻⁵ kg/ (s m)]
d	=	Durchmesser [m]
v_{sed}	=	Sedimentationsgeschwindigkeit
C	=	Gleitkorrekturfaktor für das Gesetz von Stokes

Für den Fall, dass die in einem Gas sinkenden Kugeln so klein sind, dass sie sich in der Größenordnung wie die mittlere freie Weglänge der Gasmoleküle befinden, wird diese Formel zu ungenau. Durch die Ergänzung des Gesetzes um den Gleitkorrekturfaktor (C) kann dieses Problem umgangen werden.

Formel 2: Gleitkorrekturfaktor für das Gesetz von Stokes

$$C = 1 + \frac{\lambda}{d} \left[2,514 + 0,8 \exp\left(-0,55 \frac{\lambda}{d}\right) \right]$$

C	=	Gleitkorrekturfaktor für das Gesetz von Stokes
λ	=	Mittlere freie Weglänge [6,6*10 ⁻⁸ m]
d	=	Durchmesser [m]

Formel 3: Berechnung des Gewichts eines Partikels aus dem Gesetz von Stokes (mit Gleitkorrekturfaktor)

$$W = \frac{\pi * d^3 * \rho * g}{6}$$

W	=	Gewicht der Partikel
π	=	Pi [3,1416]
d	=	Durchmesser des Mischgefäßes [m]
ρ	=	Dichte der Partikel [angenommener Wert 1000 kg/m ³]
g	=	Gravitationsbeschleunigung [9,81 m/s ²]

Für die benötigte mittlere Strömungsgeschwindigkeit (v_{str}) gilt dabei:

Formel 4: Berechnung der mittleren Strömungsgeschwindigkeit

$$v_{str} = \frac{Q}{A}$$

Formel 5: Berechnung der Querschnittsfläche:

$$A = \frac{\pi * (D2^2 - D1^2)}{4}$$

v_{str}	=	mittlere Strömungsgeschwindigkeit
Q	=	Volumenstrom durch das Rohr des Elutriators [m^3/s]
A	=	Querschnittsfläche [m^2]
π	=	Pi [3,1416]
$D1$	=	Innerer Durchmesser des äußeren Rohres [m]
$D2$	=	Äußerer Durchmesser des inneren Rohres [m]

Durch $v_{sed} = v_{str}$ ergibt sich für den Grenzdurchmesser der Partikel folgende Berechnungsmöglichkeit. Da die Gleitkorrektur den Durchmesser d enthält, ist allerdings nur eine iterative Berechnung möglich.

Formel 6: Berechnung des Grenzdurchmessers

$$d^2 = \frac{72 * \eta * Q}{\pi * \rho * g * C * (D1^2 - D2^2)}$$

Der innere Durchmesser des äußeren Glasrohres beträgt für den Elutriator 10 cm ($D1$) und der äußere Durchmesser des Zentralrohres 3,2 cm ($D2$). In einem Rechenbeispiel mit dem standardmäßig verwendeten Volumenstrom (Q) von 1,5 l/min ergibt sich somit ein Grenzdurchmesser von 10,9 μm .

Der in Abbildung 4-14 dargestellte Aerosolgenerator in Kombination mit dem Elutriator (Cultex[®] DG - Dust Generator) wird im Folgenden für alle Depositionsversuche und Expositionen standardmäßig eingesetzt. Die Einstellungen für die jeweiligen Substanzen sind im entsprechenden Abschnitt und im Anhang aufgeführt (Kapitel 4.11.1).

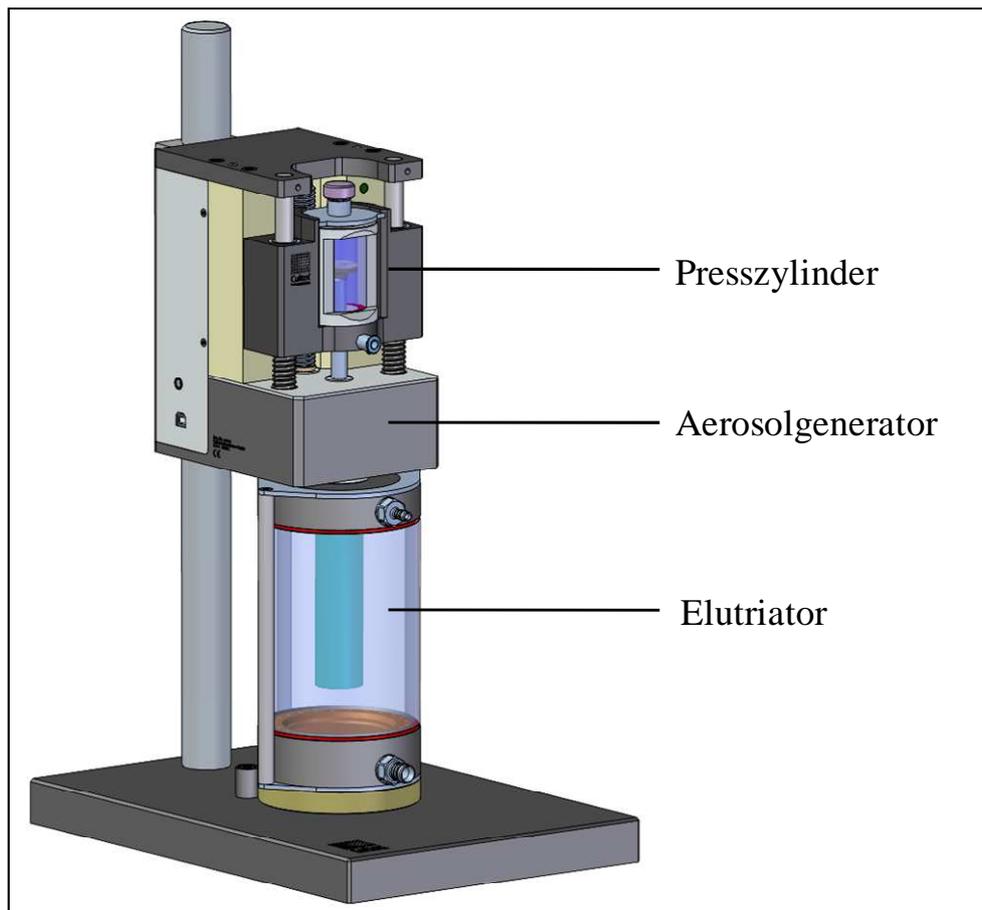


Abbildung 4-14: Aerosolgenerator in Kombination mit dem Elutriator. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

4.3.3. Gesamtaufbau der Expositionsanlage

Der Gesamtaufbau, eine Kombination mit dem Cultex[®] DG (Abbildung 4-15) bildet die Grundlage für die folgenden Depositionsversuche. Neben dem Aerosolgenerator mit der externen Steuerungssoftware gehören je ein Cultex[®] RFS für die Substanz und eines für die Exposition mit Druckluft bzw. Atemluft zu einem Standardaufbau. Die Versorgung und der Austausch von Medium erfolgt aus einem Reservoir über programmierbare Schlauchpumpen.



Abbildung 4-15: Gesamtaufbau mit zwei Cultex® RFS und dem Aerosolgenerator Cultex® DG

Fazit

Die neu entwickelte Aerosolgeneration, basierend auf dem *Dust Feeder* nach Wright, verfügt neben dem eigentlichen Aerosolgenerator über eine externe Steuerungssoftware und über ein spezielles Selektionsgefäß (Elutriator). Auftretende Bruchstücke oder Agglomerate werden direkt im Elutriator auf der Prallplatte abgeschieden. Partikel mit einer Größe von mehr als $10,9\ \mu\text{m}$ können den Elutriator basierend auf dem Gesetz von Stokes nur durch die Überschussleitung verlassen. Je nach eingestellter Absaugung am Ausgang zum Modul ermöglicht der neue Generator eine Vorselektion der Partikel nach ihrer Masse. Das besondere Design des gesamten Gerätes und die präzise Fertigung der Einzelteile ermöglicht die Generation eines stabilen und homogenen Aerosols auch über eine längere Laufzeit.

4.4. Erste Serie von Abscheideexperimenten mit dem Cultex® RFS

Zur Überprüfung der Stabilität des Versuchsaufbaus hinsichtlich der Generation und Deposition werden Experimente mit Kupfer(II)oxid durchgeführt. Das gepresste Pulver wird im neuen Cultex® DG bei einem Vorschub von $2\ \text{mm/Std}$ bei $800\ \text{Umdrehungen/Std}$

kontinuierlich abgeschabt und mit 8 l/min Druckluft in den Elutriator geblasen. Ein eingestellter Fluss von 1,59 l/min des auf diese Weise generierten Aerosols wird in das Modul gesaugt.

Zur genaueren Charakterisierung der Abscheidung werden die herkömmlichen Zellkulturinserts durch spezielle Insertnachbildungen ersetzt. Die ursprüngliche Membran ist bei diesem Zellkulturinserttyp entfernt und durch einen leichten Deckel aus Aluminium ersetzt worden. Für die Zeit der Exposition kann so ein ausgestanztes Stück Filterpapier in diesen Deckel eingesetzt werden (Abbildung 4-16).

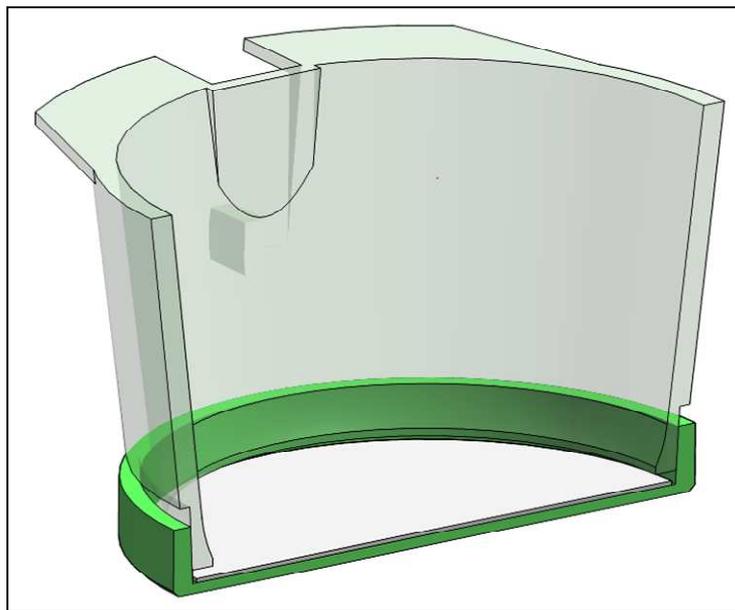


Abbildung 4-16: Nachbildungen der Zellkulturinserts mit Deckel und Filterpapier. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Die durchgeführten Depositionsversuche mit Kupfer(II)oxid zeigen in den ersten Durchgängen rein optisch eine Verbesserung bezüglich der Verteilung auf die Kammern. Bei mehreren aufeinanderfolgenden Versuchsdurchgängen bzw. nach längerer Laufzeit fallen allerdings deutliche Abweichungen in der Verteilung auf (Abbildung 4-17), d.h. es zeigt sich ein jeweils komplett unterschiedliches Abscheidemuster.

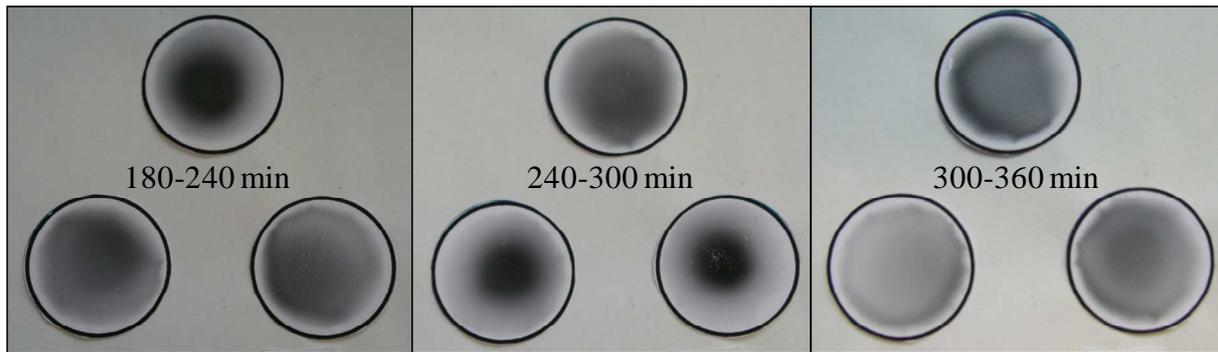


Abbildung 4-17: Verteilung von Kupferoxid bei aufeinanderfolgenden 60minütigen Expositionen.

Die Ursache dieser Ungleichverteilungen soll mit einer Reihe von verschiedenen Versuchsansätzen geklärt werden. Die während einer Exposition deponierte Masse kann durch die Rückwaage der Filter mit einer Ultramikrowaage (Sartorius mechatronics - SE2-F) auf $10\ \mu\text{g}$ exakt gemessen werden. Zu diesem Zweck wird die Masse auf den Filtern gravimetrisch bestimmt (Messpunkt 1 - Abbildung 4-18).

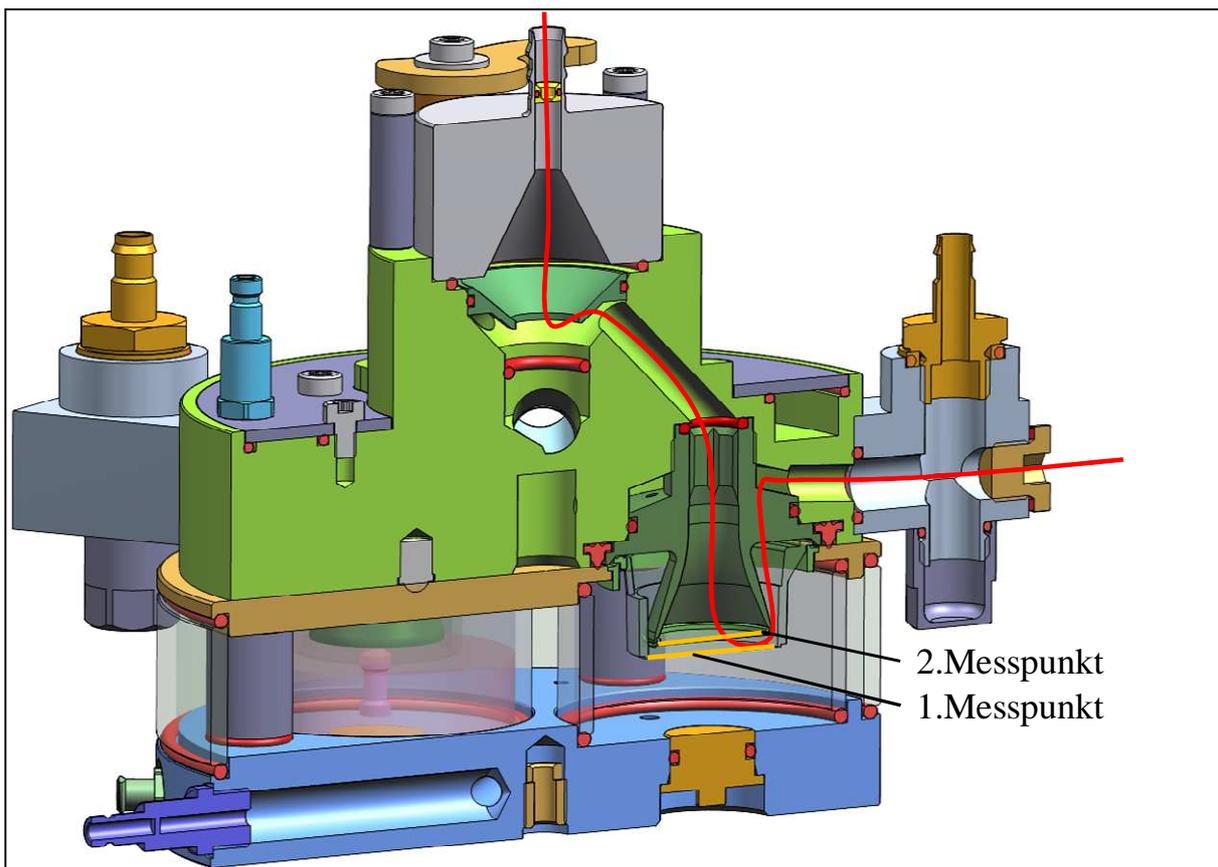


Abbildung 4-18: Weg des Aerosols durch das Aerosolführungsmodul mit zwei Messpunkten. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Zur weiteren Charakterisierung der partikelhaltigen Atmosphäre werden die Aerosoldüsen mit einem Filterhaltereinsatz (Abbildung 4-19) verschlossen, um die totale Partikelmasse zu bestimmen, welche in einem definierten Zeitraum in die Kammern gelangt (Messpunkt 2 - Abbildung 4-18).

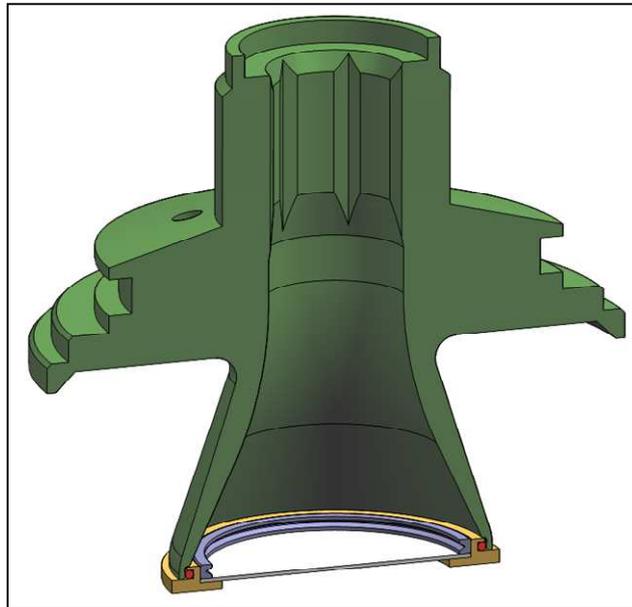


Abbildung 4-19: Aerosoldüse mit Düsenfiltereinsätze und Filterpapier. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Die Ergebnisse erlauben nicht nur die Bestimmung der abgeschiedenen Massen, sondern ermöglichen darüber hinaus auch die Berechnung der Abscheideeffizienz.

4.4.1. Erhöhung des Volumenstromes

Zur weiteren Analyse der Partikelungleichverteilung innerhalb des Systems und der Kammern wird der Aerosolfluss über den Zellen von 30 ml/min auf 100 ml/min erhöht.

Die abgeschiedene Masse an Kupfer(II)oxid wird gravimetrisch auf Filtern (Messpunkt 1) bestimmt. Durch die Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit und der damit verbundenen Strömungsbedingungen sollen Aussagen zum Einfluss der Strömung auf die Ungleichverteilung möglich werden.

Die Auswertung dieser Experimente zeigt zum Einen eine große Abweichung in der abgeschiedenen Masse auf den drei Filtern eines Durchgangs, zum Anderen stieg die Masse von Exposition zu Exposition stark an (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Gewichtszunahme der Filter in den einzelnen Kammern nach der Exposition

Durchgang	Expositionszeit [min]	Filter in Kammer 1 [μg]	Filter in Kammer 2 [μg]	Filter in Kammer 3 [μg]
1	60	371	443	426
2	60	661	572	678
3	60	771	934	692
4	60	1510	1581	1718

Nach der Erhöhung des Aerosolflusses von 30 ml/min auf 100 ml/min verändert sich deutlich das Abscheidemuster der Partikel auf den Filterpapieren (Abbildung 4-20). Die komplette Fläche ist dabei scheinbar gleichmäßig mit Kupfer(II)oxid belegt.

**Abbildung 4-20:** Verteilung von Kupferoxid auf Filterpapieren mit 100 ml/min Kammerstrom.

Bei genauerer Betrachtung zeigt sich aber eine erhebliche Ablagerung von Partikeln in der Kante zwischen den einzelnen Filterpapieren und den Inserts. Darüber hinaus sind die Wände der Inserts und die Düsen deutlich sichtbar mit großen Agglomeraten besetzt (Abbildung 4-21).



Abbildung 4-21: Ablagerungen von Partikeln am Kunststoff des Inserts mit 100 ml/min Kammerstrom.

Die in vorangegangenen Experimenten aufgetretenen Ungleichverteilungen auf den Membranen sind durch die Volumenstromerhöhung sichtbar verschwunden. Dies deutet auf einen Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit und der daraus resultierenden Strömungsbedingungen auf die Abscheidung hin. Die genaue Charakterisierung der Strömungsverhältnisse im gesamten Expositionsaufbau ist das Ziel der im nächsten Abschnitt beschriebenen Experimente.

4.4.2. Analyse der Strömungsmuster

Um weitere aussagekräftige Informationen über den Strömungsverlauf und die Strömungsmuster zu erhalten, konzentrieren sich die Experimente auf den Einlassadapter und den weiteren Verlauf des Testaerosols durch den zentralen Kanal des Systems.

An zwei unterschiedlichen Stellen werden Filterhalter mit Filterpapieren eingebaut und verschiedene Expositionen mit Natriumfluoreszein durchgeführt. Der erste Filter wird dabei direkt hinter den Einlassadapter vor der radiären Verteilung platziert. In einem zweiten Durchgang erfolgt der Einsatz des Filters in einem Filterhalter direkt hinter dem Überschusskanal. Bei einer gleichmäßigen Strömung sollte sich auf beiden Filtern eine homogene Verteilung des Natriumfluoreszeins abbilden lassen.

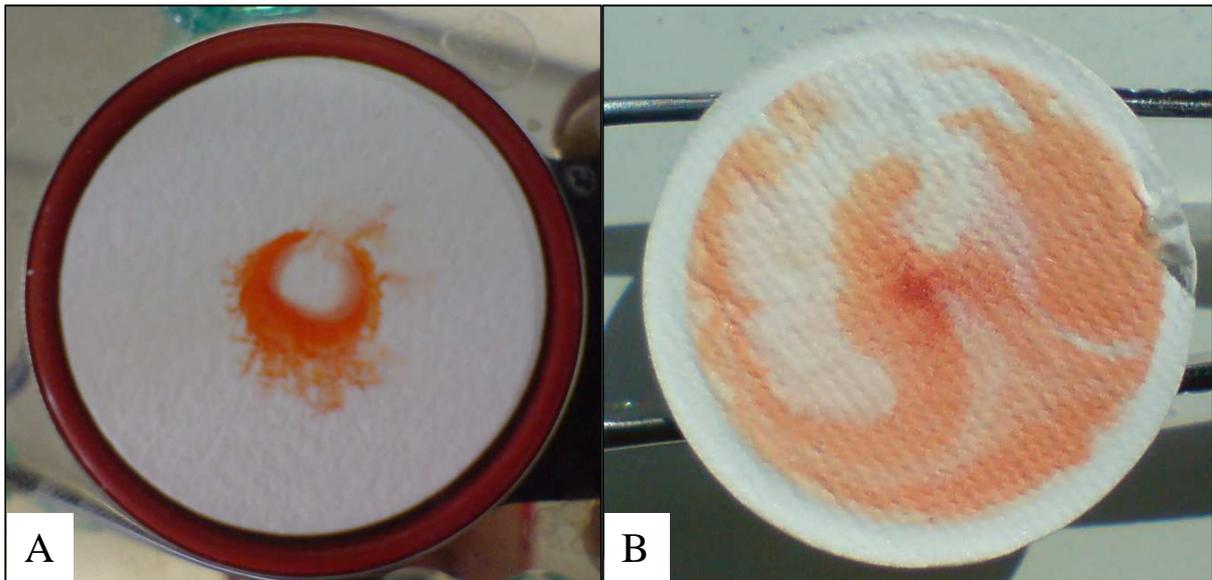


Abbildung 4-22: Strömungsmuster auf Filtern (Natriumfluoreszein). A) Hinter dem Einlassadapter Modul; B) Hinter dem Überschuss.

Die Filter sind nach der Exposition mit Natriumfluoreszein durch gut sichtbare Strömungsmuster gekennzeichnet. Das inhomogene Muster auf dem ersten Filter lässt ein starkes Ungleichgewicht der Partikelverteilung bereits am Einlassadapter vermuten (Abbildung 4-22 - A). Die Tatsache, dass auch auf dem zweiten Filter hinter dem Überschussadapter ähnliche Muster auftreten (Abbildung 4-22 - B) deutet auf prinzipielle Probleme in den strömungs-physikalischen Eigenschaften des Systems hin.

Fazit

Die ersten Abscheideexperimente mit den speziellen Nachbildungen der Inserts bestätigen auf den ersten Blick die Verbesserungen der Neukonstruktion. Dennoch sind die Ergebnisse auf Grund ihrer hohen Streuung, einer wiederholt auftretenden Ungleichverteilung über die drei Kammern und der punktuellen Abscheidung noch nicht zufriedenstellend. Die Beobachtungen nach der Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit von 30 ml/min auf 100 ml/min pro Kammer deutet darauf hin, dass die Strömungsgeschwindigkeit einen relevanten Einfluss auf die Verteilung im Modul und die Abscheidung besitzt.

Untersuchungen der Strömungsmechanik mittels CFD-Analysen (*Computational fluid dynamics*) sollen in diesem Zusammenhang Aufschluss über mögliche Ursachen liefern.

4.5. CFD-Analyse zur Verteilung der Partikel im System

1. Annahme: Weg der Partikel in die Kammern

Die erste Annahme für eine CFD-Analyse geht davon aus, dass die Partikel am Anfang des Zuleitungsschlauchs gleichmäßig über den kompletten Querschnitt verteilt sind. Auf Grundlage der Berechnungen kann somit der theoretische Weg von 500 Partikeln vom Schlauchanfang bis in die Kammern simuliert werden (Abbildung 4-23).

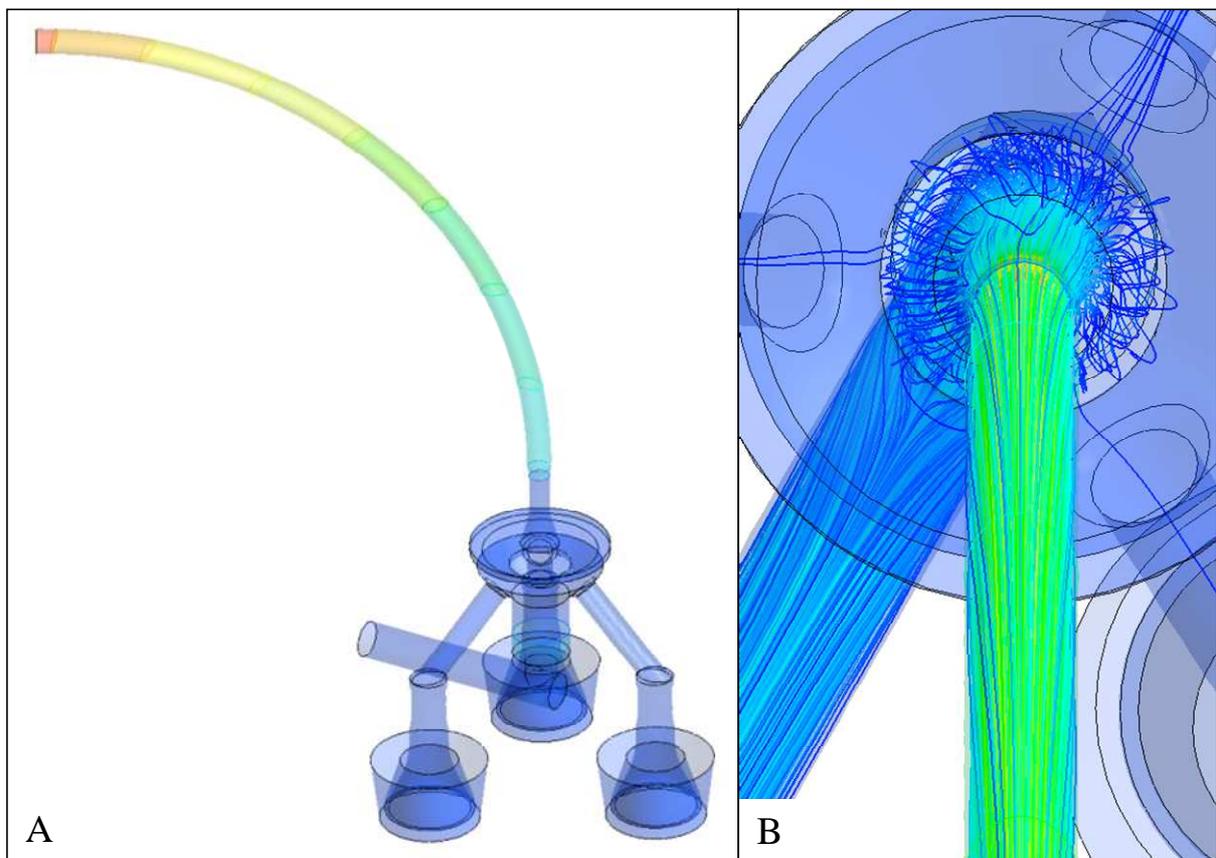


Abbildung 4-23: Strömungslinien von 500 gleichmäßig über den Schlaucheinlassquerschnitt verteilten Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)



Abbildung 4-24: Skizze der Sekundärströmung in einem Schlauch. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Die Simulation der Strömungslinien zeigt im Schlauch eine ungleichmäßige Fortbewegung der Partikel mit einer deutlich erkennbaren Sekundärströmung. In Abbildung 4-24 ist diese schematisch dargestellt. Partikel, die sich mehr an der Außenwand des Schlauches befinden können im Modul an anderen Punkten wieder gefunden werden als Partikel aus dem zentralen Strom. Des Weiteren weisen die Strömungslinien nach Eintritt in das Modul stark ausgeprägte Turbulenzen auf. Insgesamt gelangt so nur eine sehr geringe Anzahl der Ausgangspartikel in die Kammern des Moduls.

Fazit

Die erste CFD-Analyse weist ein generelles Problem bei der Zuleitung der Partikel zum Modul auf. Die am Anfang noch einheitlich über den Schlauchquerschnitt verteilten Partikel bewegen sich auf Grund von Laminar- und Sekundärströmungen sehr ungleichmäßig durch den Schlauch. Der Aerosolstrom wird infolge von Reibung an der Schlauchwand nach außen hin deutlich langsamer. Partikel in diesem Bereich bewegen sich deshalb mit einer geringeren Geschwindigkeit als die Partikel in der Schlauchmitte. Das Ergebnis ist, dass sich diese Partikel quer zur eigentlichen Strömungsrichtung bewegen und es zur Bildung von Turbulenzen kommen kann.

2. Annahme: Herkunft der Partikel in den Kammern

Für eine weitere Simulation werden jeweils 100 zufällig verteilte Partikel in jeder der Kammern ausgewählt und ihre Wege zurückverfolgt. Bereits nach Verlassen der

Zuleitungsbohrungen zu den Kammern zeigt sich eine eindeutige Trennung der drei Strömungslinienbündel. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse der CFD-Analyse sind die Strömungslinien der einzelnen Kammern verschiedenfarbig dargestellt (Abbildung 4-25). Diese Trennung lässt sich bis zum Anfang des Zuleitungsschlauches bzw. bis zum Ausgang des Elutriators zurückverfolgen. Alle Partikel einer Kammer stammen also aus einem eng begrenzten Bereich am Anfang des Schlauches (Abbildung 4-26).

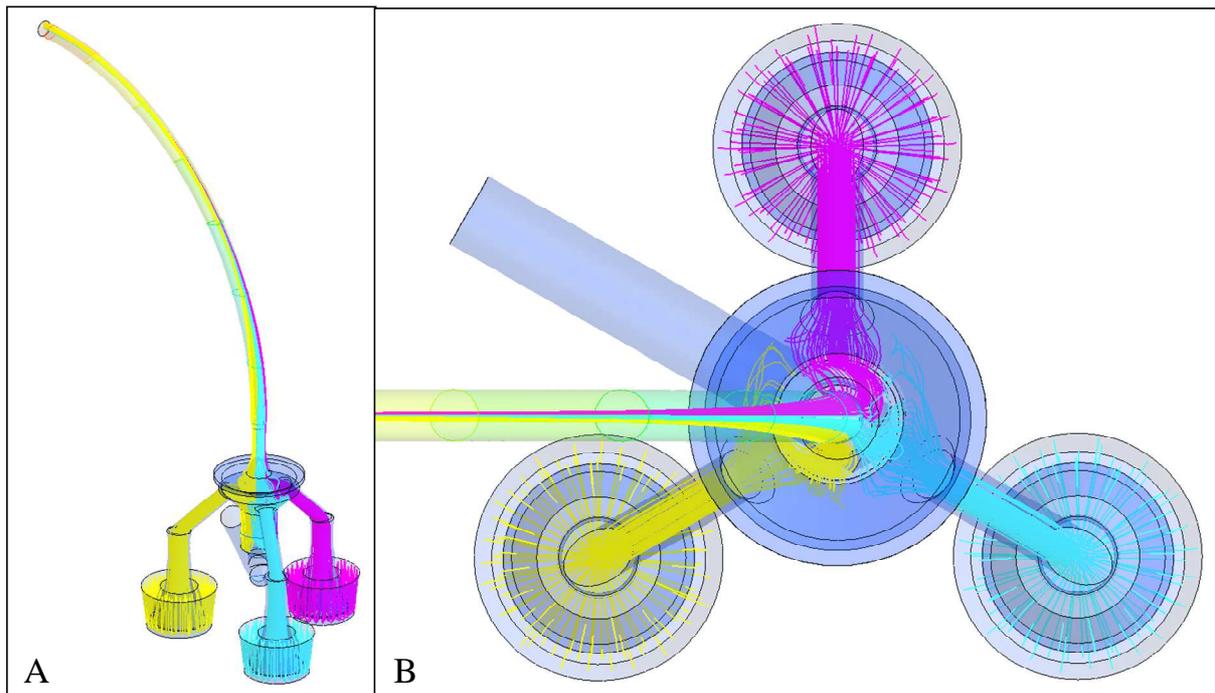


Abbildung 4-25: Strömungslinien von 100 Partikeln mit zufälligen Startpunkten am Auslassquerschnitt. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

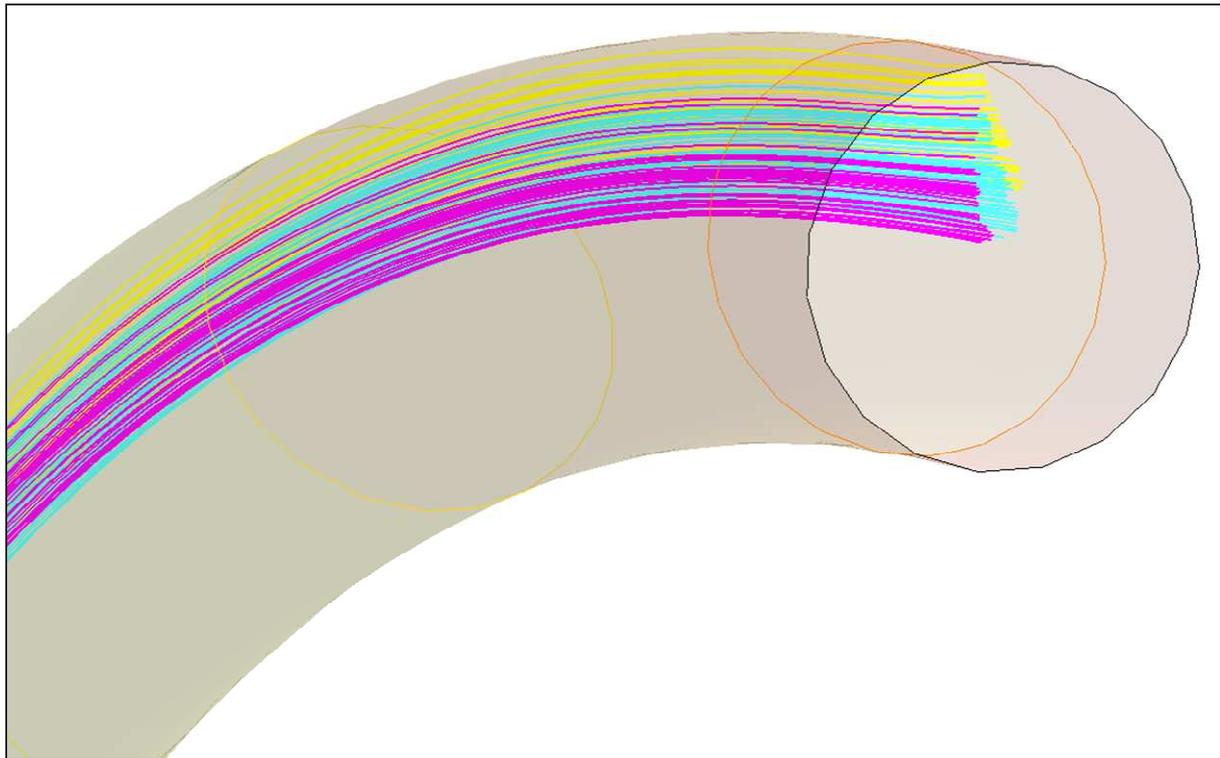


Abbildung 4-26: Strömungslinien von 100 Partikeln mit zufälligen Startpunkten am Auslassquerschnitt. Zurück verfolgt bis zum Schlauchanfang. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Fazit

Die Ergebnisse der zweiten CFD Analyse veranschaulichen ein weiteres Phänomen bei der Zuleitung der Partikel durch einen Schlauch. Die in den drei Kammern ausgewählten Partikel stammen aus eng begrenzten Zonen im Schlauch. Eine Ungleichverteilung der Partikel am Anfang des Schlauches setzt sich scheinbar bis in die Kammern des Cultex[®] RFS fort. Die vorliegenden Ergebnisse der CFD-Analyse verdeutlichen, dass die Probleme bereits im Schlauch vor dem Eingang ins System entstehen.

3. Annahme: Größenabhängige Verteilung der Partikel

Eine partikelgrößenabhängige Verteilung der Partikel wird in einer dritten CFD-Analyse simuliert. Dieser Ansatz dient der Klärung der Probleme bei den ersten Experimenten, bei denen sich wiederholt eine zentrale Abscheidung auf den Filterpapieren zeigte. Die Tatsache, dass dieses Phänomen nicht reproduzierbar in allen drei Kammern auftritt, wird am Beispiel von 2 μm und 10 μm großen Partikeln in Abbildung 4-27 und Abbildung 4-28 dargestellt.

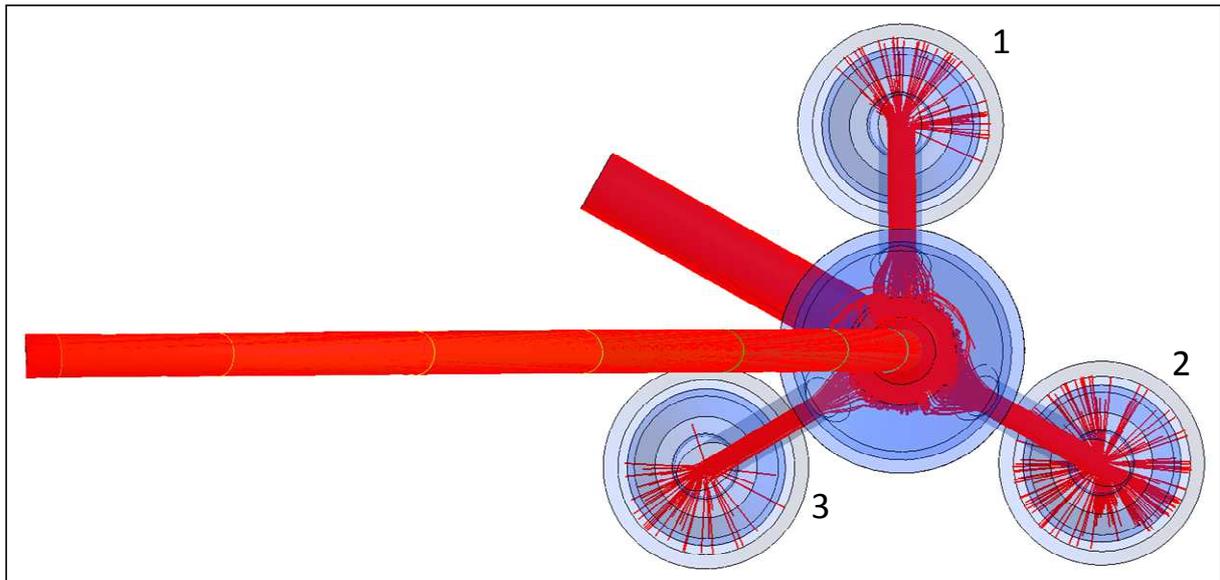


Abbildung 4-27: Strömungslinien von 2 µm Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

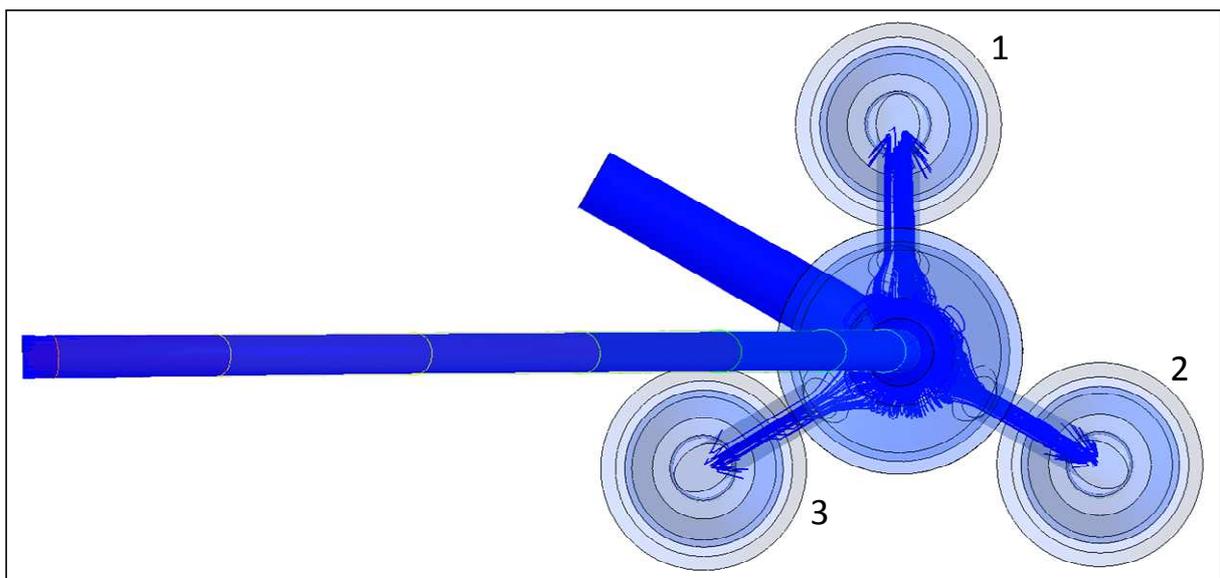


Abbildung 4-28: Strömungslinien von 10 µm Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Die Ergebnisse dieser Simulation zeigen deutliche Unterschiede im Abscheideverhalten der beiden Partikelgrößen. Die größeren 10 µm Partikel (blau - Abbildung 4-28) werden zentral auf den Filterpapieren abgeschieden, während die 2 µm großen Partikel (rot - Abbildung 4-27) über die komplette Membran verteilt sind. Darüber hinaus bestätigt sich die ungleichmäßige Verteilung der Partikel auf die drei Kammern innerhalb eines Moduls. So wird z.B. ein großer Anteil der dargestellten 10 µm Partikel vorrangig in Kammer 1 abgeschieden (Abbildung 4-28).

Fazit

Die CFD-Analyse bestätigt die ungleichmäßige Verteilung der Partikel auf die drei Kammern eines Expositionsmoduls. Die unterschiedliche Abscheidung in Abhängigkeit von der Partikelgröße lässt sich nicht alleine mit Störungen in der Strömung erklären, sondern weist auch auf einen Einfluss der Größe bzw. Masse auf das Verhalten der Partikel im System hin. Die Verteilung im System und die Abscheideeffizienz der Substanzen hängen also maßgeblich von Sedimentationsverhalten der verschiedenen Partikel ab.

Die CFD-Analyse geht von einer homogenen Verteilung am Anfang des Schlauches über den Schlauchquerschnitt aus, eine Annahme die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht der realen Situation entspricht. Aufschluss über die genaue Herkunft der Strömung und der Verteilung der Partikel im Schlauch sollen Simulationen zur Strömung im Aerosolgenerator, im Elutriator und dem abführenden Schlauch geben.

4. Annahme: Strömung im Elutriator

Die im Elutriator durchgeführte Simulation geht von 500 gleichmäßig über den Einlassquerschnitt der Zuleitung zum Elutriator verteilten Partikeln aus (Abbildung 4-29).

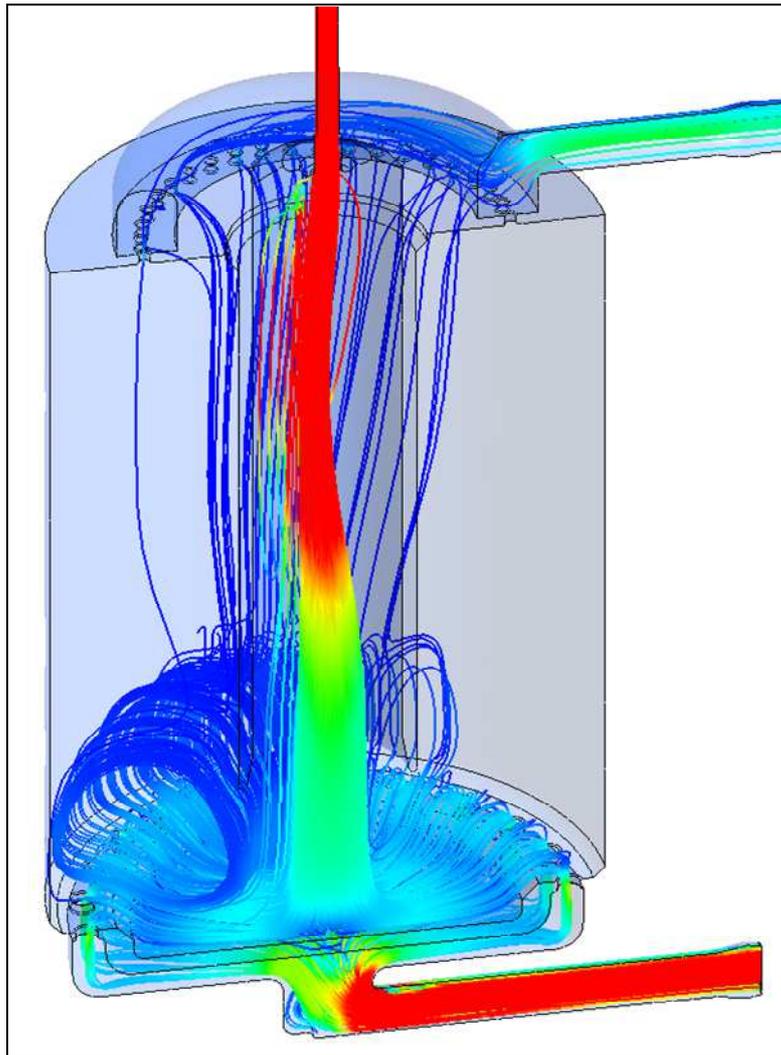


Abbildung 4-29: Strömungslinien von 500 gleichmäßig über den Einlassquerschnitt des Elutriators verteilten Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Wie bereits in den vorangegangenen CFD-Analysen zeigen sich auch hier unkontrollierbare Strömungsphänomene. Das Zuleitungsrohr vom Aerosolgenerator in den Elutriator weist ein dichtes Bündel an Strömungslinien auf, das sich durch leichte Schwankungen in der Druckluftzufuhr in der Röhre hin und her bewegen kann. Unabhängig von der Lage und Form des Strömungslinienbündels erscheint die Strömung in der Simulation am Ausgang des Elutriator gleichmäßig (Abbildung 4-30).

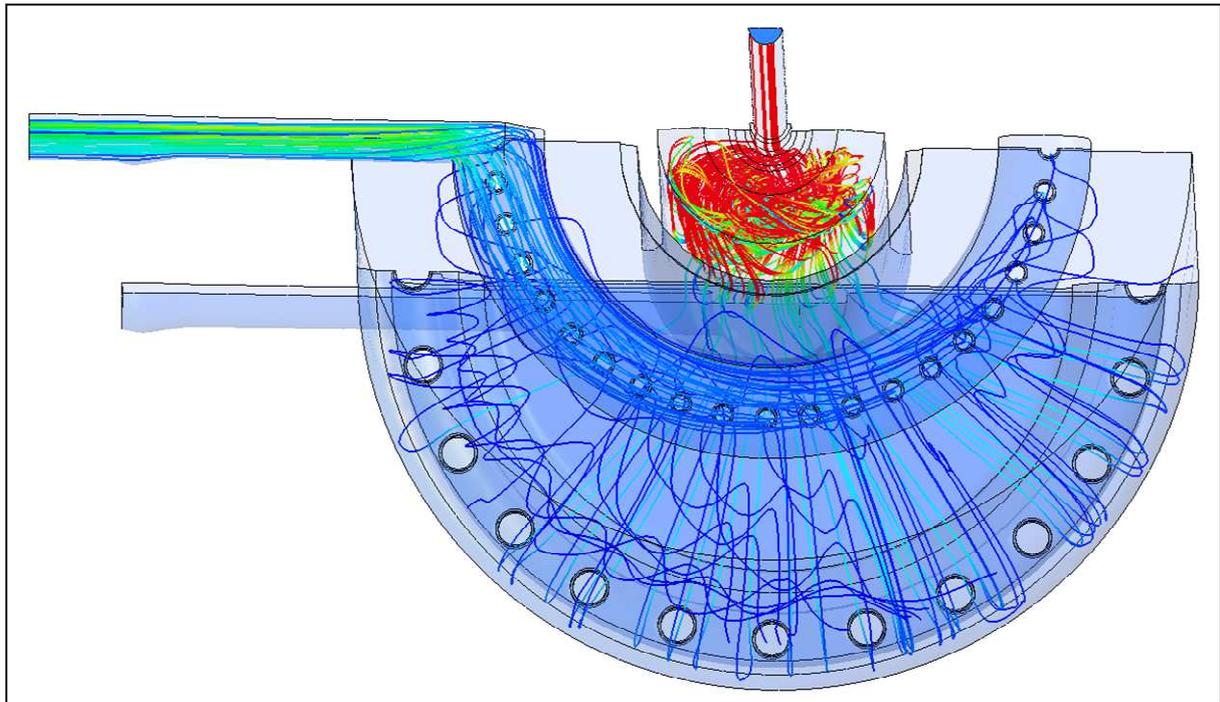


Abbildung 4-30: Strömungslinien von 50 gleichmäßig über den Auslassquerschnitt des Elutriators verteilten Partikeln. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Die abschließende Betrachtung der Strömungslinien unter Expositionsbedingungen (Absaugung von 1,59 l/min) für 2 μm , 5 μm und 10 μm große Partikeln stellt ein größenabhängiges Verhalten der Partikel dar (Abbildung 4-31 A - C).

Die Simulation bestätigt dabei die Funktionalität des Elutriators hinsichtlich der Selektion von Partikeln größer als 10 μm aus dem Testaerosol (Abbildung 4-31 - C).

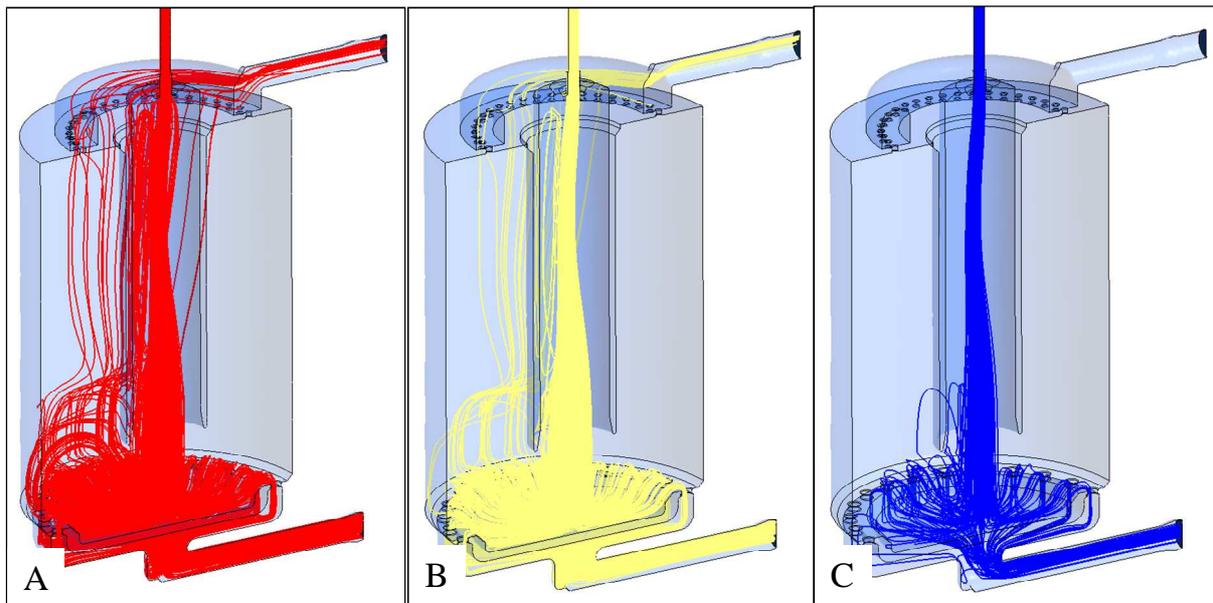


Abbildung 4-31: Strömungslinien von jeweils 100 gleichmäßig über den Einlassquerschnitt des Elutriators verteilten Partikeln. A) 2 µm; B) 5 µm; C) 10 µm. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Fazit

Der gesamte Weg eines Partikels von der Aerosolgeneration bis zur Abscheidung in den Kammern des Moduls zeigt in der CFD-Analyse eine systemimmanente Abhängigkeit der Strömungen und deren Beeinflussung durch die Größe bzw. Masse der Partikel.

Da eine permanente Kontrolle dieser Faktoren im Gesamtaufbau nicht möglich ist, soll eine bautechnische Veränderung am Einlassadapter die Strömungsbedingungen zumindest im Aerosolführungsmodul beim Eintritt in das System optimieren, d. h. einen homogenen Partikelstrom für die Beaufschlagung der Zellen erzeugen.

4.6. Strömungstechnische Optimierung des Cultex[®] RFS

Die Optimierung konzentriert sich auf den Einlassadapter als Eintrittspunkt des Aerosols in das System. Das Ziel dieser Änderung ist das Aufbrechen der laminaren Strömungen und die Schaffung einer turbulenten Strömung beim Eintritt in das System. Hierfür wird eine Düse (Patent angemeldet) mit einem genau definierten Durchmesser eingesetzt, die flexibel in unterschiedliche Positionen in den Kanal des Adapters eingeschoben werden kann (Abbildung 4-32).



Abbildung 4-32: Einlassadapter mit eingesetzter Düse. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Zur Charakterisierung dieser Düse sowie zur Auswahl der optimalen Düsengröße und -position werden wiederum Filter mit Kupfer(II)oxid in den speziellen Insertnachbildungen exponiert. Der Durchmesser des Düsenkanals variiert dabei zwischen 0,7 mm und 2,0 mm. Die Ergebnisse der Abscheidungsexperimente sind in Tabelle 4-3 dargestellt.

Tabelle 4-3: Gewichtszunahme der Filter in den einzelnen Kammern nach 15minütiger Exposition mit variierenden Düsendurchmessern

Durchmesser der Düse [mm]	Filter in Kammer 1 [µg]	Filter in Kammer 2 [µg]	Filter in Kammer 3 [µg]	Differenz [%]	Mittelwert der Differenzen [%]
0,7	169,0	166,9	183,1	18,92	16,84
0,7	136,8	158,5	176,7	17,51	
0,7	189,3	225,0	218,9	14,09	
1,2	262,9	256,2	250,1	5,12	6,73
1,2	243,8	229,4	247,9	7,46	
1,2	216,1	209,5	200,8	7,62	
2,0	241,2	293,1	297,5	8,85	15,91
2,0	287,4	347,1	348,4	22,58	
2,0	304,0	353,3	349,9	16,31	

Änderungen im Düsendurchmesser führen zu deutlichen Unterschieden in der abgeschiedenen Partikelmasse und deren Gleichverteilung über die drei Kammern eines Cultex® RFS. Mit der kleinsten Düse (Durchmesser der Öffnung 0,7 mm) wurden durchschnittlich 180 µg (Abweichung 17%) abgeschieden. Mit Zunahme des Düsendurchmessers erhöht sich gleichzeitig die abgeschiedene Partikelmasse auf den Filtern (Tabelle 4-3). Bei einem Düsendurchmesser von 2,0 mm zeigt sich mit 314 µg die höchste abgeschiedene Masse, allerdings weichen die Einzelwerte sehr weit voneinander ab (Tabelle 4-3).

Die Ergebnisse mit der geringsten Abweichung liefern die Versuche mit der mittleren Düsengröße (1,2 mm). Hier liegt die abgeschiedene Masse mit im Schnitt etwa 235 µg zwar kaum höher als bei der 0,7 mm Düse, allerdings ist die Abweichung zwischen den Kammern eines Durchgangs mit weniger als 7% deutlich geringer als bei den anderen Düsen.

Zusätzlich zur Größe des Düsendurchmessers soll in einem weiteren Experiment die Position der Düse im Einlassadapter überprüft werden. Hierzu wird der Abstand der 1,2 mm Düse von der Oberkante des zentralen Kanals im Einlassadapter gemessen und in 5 mm Schritten variiert. Die Gewichtszunahme der Filterpapiere bei den Abscheideexperimenten ist in den beiden folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 4-4: Gewichtszunahme der Filter in den einzelnen Kammern nach der Exposition mit variierenden Düsenpositionen

Abstand [mm]	Filter in Kammer 1 [µg]	Filter in Kammer 2 [µg]	Filter in Kammer 3 [µg]	Differenz [%]	Mittelwert der Differenzen [%]
20	262,9	256,2	250,1	5,12	6,47
20	243,8	229,4	247,9	7,46	
20	216,1	209,5	200,8	7,62	
20	213,3	225,8	219,5	5,69	
15	248,0	265,0	253,2	6,71	7,90
15	241,3	267,4	249,0	10,48	
15	224,1	239,2	231,6	6,52	
10	198,4	200,9	201,4	1,49	3,16
10	211,0	218,1	213,2	3,33	
10	211,4	221,5	216,8	4,66	

Die in Tabelle 4-4 aufgeführten Daten weisen bei variierender Position der eingesetzten 1,2 mm Düse nur noch geringe Abweichungen zwischen den einzelnen Kammern auf. Dennoch zeigt sich eine Abhängigkeit der Gleichverteilung von der Position der Düse im

Einlassadapter. Der Mittelwert der Differenzen bei einem Abstand von 20 mm liegt mit 6,47% etwas unter dem Niveau des 15 mm Abstandes (7,90%), allerdings fällt bei diesem Abstand eine Messung heraus. Betrachtet man die beiden anderen Messungen ergibt sich für die Abstände 15 mm (6,61%) und 20 mm eine vergleichbare Abweichung zwischen den Kammern. Bei der kleinsten getesteten Distanz (10 mm) sind die Abweichungen im Vergleich mit 3,16% nur noch etwa halb so hoch.

Fazit

Die eingebaute Düse hat eine deutliche Auswirkung auf das Abscheideverhalten der Partikel. Das Aufbrechen der Strömung am Eintritt in das Aerosolführungsmodul hat einen Einfluss auf die Partikelverteilung sowie auf die Abscheideeffizienz. Die unterschiedlichen Resultate mit den drei verschiedenen Düsendurchmessern in variierenden Positionen belegen, dass die Strömungseffekte beim Eintritt in das System einen wichtigen Einfluss auf das weitere Verhalten der luftgetragenen Partikel besitzen. Insgesamt lässt sich mit der neuen Einlassdüse die abgeschiedene Masse erhöhen und die Verteilung verbessern. Eine CFD-Analyse um eine genauere Aussage über den Einfluss der Düse auf die Strömung zu machen, ist auf Grund der schwer zu berechnenden Turbulenzen und Druckverhältnisse an der Düsenöffnung derzeit nicht möglich.

In allen folgenden Abscheideexperimenten und Zellexpositionen wird die Düse standardmäßig verwendet.

4.7. Berechnung der Abscheideeffizienz durch Sedimentation und Diffusion

Ebenso entscheidend wie der Einfluss der Strömungen im Elutriator und Cultex[®] RFS sind die physikalischen Gesetzmäßigkeiten, denen die einzelnen Partikel auf Grund ihrer Größe bzw. ihrer Masse unterliegen. Zwei wichtige Einflussgrößen auf das Verhalten der Partikel und auf die damit verbundene Abscheideeffizienz bilden dabei die Sedimentation auf Grund der Schwerkraft und die Diffusion auf Grund von Wechselwirkungen. Beide Phänomene werden im Folgenden intensiver betrachtet und für das Cultex[®] RFS an Hand einer Exposition unter genau definierten Bedingungen berechnet.

4.7.1. Sedimentation

Die Abscheidung von Partikeln durch Sedimentation hängt von der Mobilität [B] und vom Gewicht der Partikel ab. Die Mobilität berechnet sich dabei wie folgt:

Formel 7: Berechnung der Mobilität der Partikel

$$B = \frac{C}{3\pi * \eta * d}$$

B	=	Mobilität
C	=	Gleitkorrekturfaktor für das Gesetz von Stokes
π	=	Pi [3,1416]
η	=	Viskosität von Luft [1,8*10 ⁻⁵ kg/ (s m)]
d	=	Durchmesser

Das darüber hinaus für die Berechnung der Sedimentation benötigte Gewicht von Partikeln [W] in einem Aerosol ergibt sich aus der folgenden Formel. Hierbei fließt die Dichte [ρ] der Partikel und die Gravitationsbeschleunigung [g] mit in die Berechnung ein.

Formel 8: Berechnung des Gewichts der Partikel

$$W = \frac{\pi}{6} * d^3 * \rho * g$$

W	=	Gewicht der Partikel
π	=	Pi [3,1416]
d	=	Durchmesser
ρ	=	Dichte der Partikel [angenommener Wert 1000 kg/m ³]
g	=	Gravitationsbeschleunigung [9,81 m/s ²]

Die Sedimentation wird aus der Mobilität [B], dem Gewicht der Partikel [W] und der Geschwindigkeit der Partikel [v] berechnet.

Formel 9: Berechnung der Geschwindigkeit der Partikel

$$v = B * W$$

v	=	Geschwindigkeit der Partikel
B	=	Mobilität
W	=	Gewicht der Partikel

Die mit dieser Geschwindigkeit in der Zeit [t] zurückgelegte Sedimentationsstrecke [s] ermöglicht im Vergleich zur Höhe [h] die Bewertung, ob ein Partikel abgeschieden wird [$s > h$] oder nicht [$s < h$]. Die zur Berechnung der Distanz benötigte Formel ergibt sich dabei wie folgt:

Formel 10: Berechnung der Sedimentationsstrecke der Partikel

$$s = v * t$$

s	=	Sedimentationsstrecke
v	=	Geschwindigkeit der Partikel
t	=	Zeit

Die Ergebnisse für die Berechnungen der Abscheideeffizienz durch die Sedimentation [blau] sind in Abbildung 4-33 im Vergleich zur im Folgenden beschriebenen Diffusion [rot] dargestellt.

4.7.2. Diffusion

Der wichtigste Parameter für die Abscheidung von Partikeln durch Diffusion ist der Diffusionskoeffizient [D]. Dieser berechnet sich aus der Mobilität [B], der sogenannten Boltzmann Konstante [k] und der Temperatur [T].

Formel 11: Berechnung des Diffusionskoeffizienten

$$D = B * k * T$$

D	=	Diffusionskoeffizient
B	=	Mobilität
k	=	Boltzmann Konstante [$1,38 \cdot 10^{-23} \text{ W*s/°K}$]
T	=	Temperatur

Mittels des Diffusionskoeffizienten [D] lässt sich die Anzahl der deponierten Partikel [N] während einer definierten Zeit [t] auf einer Fläche berechnen. Hierbei fließt die Konzentration an Partikeln im betrachteten Aerosol [n_0] mit in die Berechnung ein.

Formel 12: Berechnung der Anzahl an deponierten Partikeln

$$N = 2 * n_0 * \sqrt{\frac{D * t}{\pi}}$$

N	=	Anzahl der deponierten Partikel
n_0	=	Partikelkonzentration des Aerosols
D	=	Diffusionskoeffizient
t	=	Zeit
π	=	Pi [3,1416]

Die Abscheideeffizienz durch Diffusion berechnet sich aus der Anzahl der deponierten Partikel [N] im Verhältnis zur Konzentration an Partikeln im betrachteten Aerosol [n_0] und der Höhe [h].

Formel 13: Berechnung der Abscheideeffizienz durch Diffusion

$$\text{Effizienz} = \frac{N}{n_0 * h}$$

N	=	Anzahl der deponierten Partikel
n_0	=	Partikelkonzentration des Aerosols
h	=	Höhe

Die Ergebnisse für die Berechnungen der Abscheideeffizienz durch die Diffusion [rot] sind in Abbildung 4-33 im Vergleich zur bereits beschriebenen Sedimentation [blau] abgebildet.

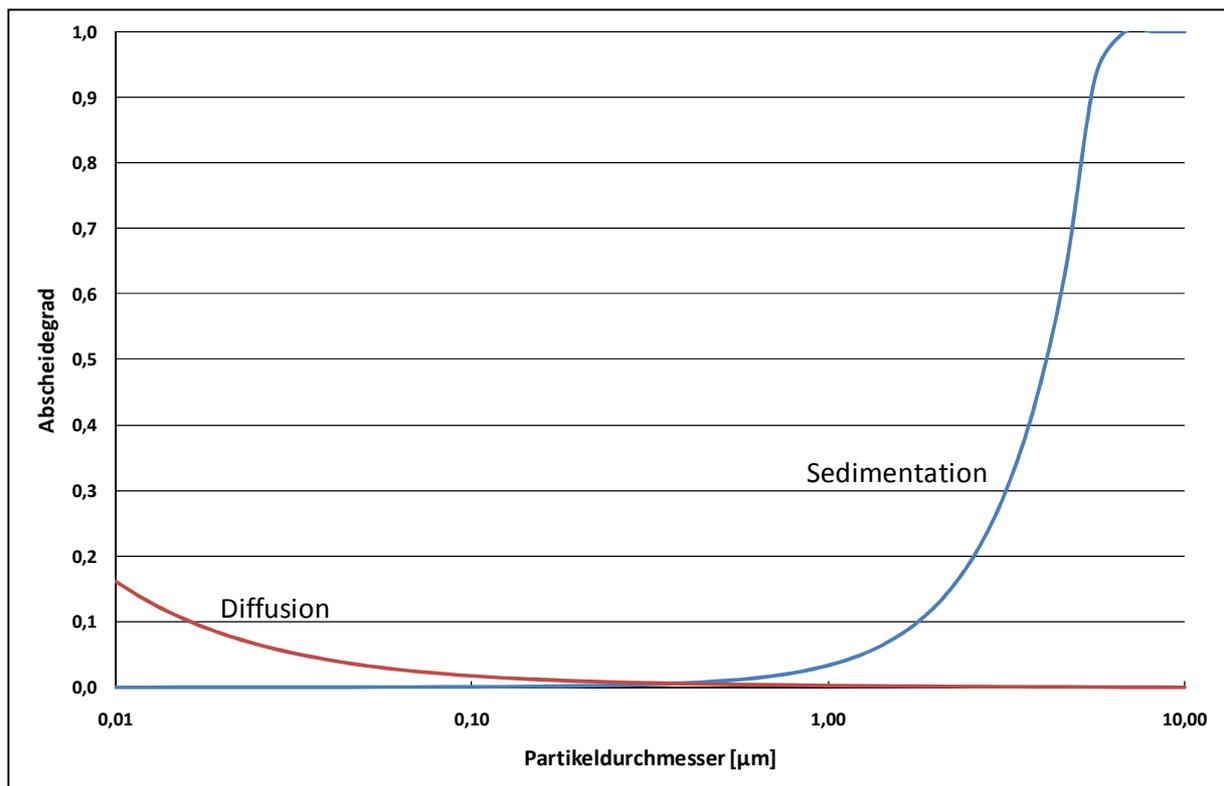


Abbildung 4-33: Abscheideeffizienz von Partikeln durch Einfluss der Sedimentation (blau) und der Diffusion (rot) in Abhängigkeit vom Durchmesser der Partikel.

Die in Abbildung 4-33 dargestellte Abscheideeffizienz durch Diffusion und Sedimentation in Abhängigkeit vom Durchmesser der Partikel veranschaulicht, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Abscheidung von Partikeln mit einem Durchmesser unter $1 \mu\text{m}$ nur sehr begrenzt möglich ist. Die als blaue Linie abgebildete Sedimentation führt zwar zu einer 100% Abscheidung aller Partikel über $6,5 \mu\text{m}$ hat aber im Gegensatz zur Diffusion unterhalb von etwa $0,7 \mu\text{m}$ keinen Einfluss mehr auf die Effizienz der Abscheidung. Die Diffusion hat insgesamt betrachtet mit maximal 16% zwar nur eine sehr geringe Abscheideeffizienz allerdings ermöglicht sie die Abscheidung von Partikeln mit einem Durchmesser von bis unter $0,1 \mu\text{m}$.

Im Gegensatz zur Abscheideeffizienz durch die Sedimentation nimmt die Effizienz durch Diffusion mit sinkendem Durchmesser zu.

Fazit

Die auf theoretischen Berechnungen basierenden Ergebnisse dieses Abschnittes legen ein Problem des Cultex[®] RFS offen, welches durch einfache Änderungen im Aufbau nicht zu beheben ist. Der Einfluss von physikalischen Gesetzmäßigkeiten wie der Sedimentation schränkt die Nutzbarkeit des Systems für Partikel mit einem Durchmesser unter 1 µm deutlich ein. In diesem Bereich besteht also noch ein eindeutiger Optimierungsbedarf zur Erhöhung der Abscheideeffizienz. Ein möglicher Ansatz zur Erhöhung wird erst zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgegriffen (Kapitel 4.13.2). Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Expositionen wurden unter den gegebenen Bedingungen und ohne weitere bauliche Veränderungen durchgeführt.

4.8. Exposition von Zellen

Nach der Charakterisierung und erfolgreichen Optimierung des Cultex[®] RFS Moduls folgt in der nächsten Projektphase die Exposition kultivierter Zellen mit Druckluft und einer Reihe von unterschiedlichen Substanzen. Neben der Aerosolgeneration und der Abscheidung der Partikel soll in diesem Abschnitt auch der Einfluss des Trägergases (Druckluft) auf die Zellen analysiert werden. Eventuelle Einflüsse des Expositionsprozesses können somit bei der Bestimmung der Substanzwirkung berücksichtigt werden.

4.8.1. Vorbereitung der Exposition

Zur Vorbereitung der Exposition werden exakt 24 Stunden vor dem Start der Exposition die Zellen in die Zellkulturinserts ausgesät (Kapitel 6.10.5) und unter zellspezifischen Bedingungen angezogen.

Zu Beginn des Expositionstages erfolgt die Vorbereitung der benötigten 6-well Zellkulturplatten für die Abholung der Zellkulturinserts nach der Exposition (1,5 ml Wachstumsmedium pro Well). Die gefüllten 6-Zellkulturplatten werden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rH für mindestens eine Stunde im Brutschrank erwärmt. Parallel dazu wird eine

Flasche mit Expositionsmedium (Kapitel 6.10.6) im Brutschrank bereitgestellt (Richtwert: 40 ml pro Kammer).

Die Montage des Aerosolgenerators und der Expositionsmodule erfolgt nach Angaben des Herstellers (Cultex Laboratories GmbH, Deutschland). Die Einstellungen der Flüsse und des Aerosolgenerators erfolgen nach den in Tabelle 4-5 aufgeführten expositions- und substanzspezifischen Vorgaben.

Tabelle 4-5: Einstellungen des Aerosolgenerators für die einzelnen Testsubstanzen

Substanz	Vorschub pro Stunde [mm]	Umdrehungen pro Stunde
Kupfer(II)sulfat	4,5	800
Disperal [®]	2	800
Pural 200 [®]	1	800
Laktose	10	800
Bariumsulfat	1,5	800
Kupfer(II)oxid	2,5	800

Eine Stunde vor der Exposition wird die Vakuumpumpe gestartet, um eine ausreichende Vorwärmzeit für die Massenflussregler sicherzustellen. Im Anschluss daran erfolgt die Verbindung sämtlicher Leitungen für die Druckluft-, die Warmwasser- und die Mediumversorgung an die Expositionsanlage. Die Überprüfung der Anschlüsse für die Absaugung der Kammern (inklusive Filter) und des Modulflusses erfolgt erneut kurz vor Start des Vorlaufs.

Eine halbe Stunde vor Start der Exposition wird der Aerosolgenerator gestartet und das geschlossene Modul über den Zuleitungsschlauch mit dem Elutriator verbunden. Während dieses Vorlaufs sind zur Einhaltung der Strömungen bereits Zellkulturinserts ohne Zellen in die Kammern des Moduls eingesetzt. Nach der 30minütigen Einlaufphase erfolgt das Füllen der Kammern mit jeweils 25 ml Expositionsmediums, das Einsetzen der Zellkulturinserts und das Absaugen des Mediums auf ein definiertes Level.

4.8.2. Expositionsdurchführung

Zum Start der Exposition wird das Modul mit Expositionsmedium gefüllt und die Zellkulturinserts in die Kammern eingesetzt. Das in den Zellkulturinsert befindliche apikale Wachstumsmedium muss zu diesem Zweck ausgegossen und eventuelle restliche Tropfen

vorsichtig mit einer Mikroliterpipette abgenommen werden. Vor dem Schließen des Systems mit dem Handrad an der Hebevorrichtung erfolgt durch Absaugung des überschüssigen Expositionsmediums, ein Absenken des Mediumspiegels auf Membranhöhe. Um mit der Exposition beginnen zu können, wird der Zuleitungsschlauch mit dem Elutriator bzw. mit dem Mischgefäß beim Kontrollmodul (Exposition mit Druckluft bzw. Atemluft) verbunden. Die intensive Überprüfung der Einstellungen vor der Exposition und die exakte Einhaltung der Expositionszeit ist dabei entscheidend für eine erfolgreiche Durchführung.

Nach erfolgter Exposition werden zuerst die Zuleitungen für das Aerosol und die Druckluft getrennt und im Anschluss die Module geöffnet. Im Weiteren erfolgt die Entnahme der Zellkulturinserts mit einer Pinzette sowie das Umsetzen in die vorbereiteten 6-well Zellkulturplatten mit vorgewärmten 1,5 ml Wachstumsmedium. Die unbehandelte Vergleichsprobe wird parallel zu den exponierten Zellen ebenfalls in 6-well Zellkulturplatten umgesetzt (1,5 ml Wachstumsmedium).

Bis zur Auswertung der Exposition mittels eines *Cell Proliferation Assays* oder eines Laktat-Dehydrogenase-Tests werden die Zellkulturplatten mit den exponierten Zellkulturinserts für genau 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rH nachinkubiert.

Bei mehreren aufeinanderfolgenden Expositionen mit gering- oder unlöslichen Substanzen erfolgt zwischen den einzelnen Durchgängen der Austausch eines Teils des Expositionsmediums. Bei der Exposition mit gut löslichen Substanzen sollte nach einem Durchgang das komplette Nährmedium ausgetauscht werden. Diese Maßnahme verhindert eine Verfälschung der Ergebnisse durch ein indirektes Einwirken der Substanzen aus dem Expositionsmedium.

4.9. Exposition von Zellen mit Druckluft aus dem Kompressor

Zur Erarbeitung einer standardisierten Arbeitsanweisung, welche die Handhabung der Zellenarbeiten und den Expositionsablauf definiert, werden zahlreiche Vorversuche mit Druckluft durchgeführt. Die Expositionen der A549-Zellen erfolgten für jeweils 15, 30 und 60 min. Die Zufuhr der Druckluft geschieht, in Analogie zu den geplanten Expositionen mit den Testsubstanzen, durch den Aerosolgenerator und den Elutriator, aus welchem ein konstanter Fluss von 1,59 l/min durch das angeschlossene Cultex[®] RFS Modul gesaugt wird. Der Kammerstrom ist für die Expositionen wie bereits in den vorangegangenen

Abscheideexperimenten mit Massenflussreglern auf exakt 30 ml/min eingestellt. Unter diesen Versuchsbedingungen ergeben sich je nach Länge der Exposition Gesamtdruckluftmengen von 450, 900 und 1800 ml.

Expositionen mit gefilterter Kompressordruckluft (Medic Air Type 300-50 Silent / Schneider Druckluft GmbH) und einer anschließenden 24stündigen Nachinkubation zeigen wiederholt im *Cell Proliferation Assay* WST-1 eine starke Abnahme der Vitalität der exponierten Zellen. Im Vergleich zu den nicht exponierten Zellen im Brutschrank weisen die für 30 und 60 min, exponierten Zellen deutlich niedrigere Werte bei der Bestimmung der optischen Dichte auf (Abbildung 4-34).

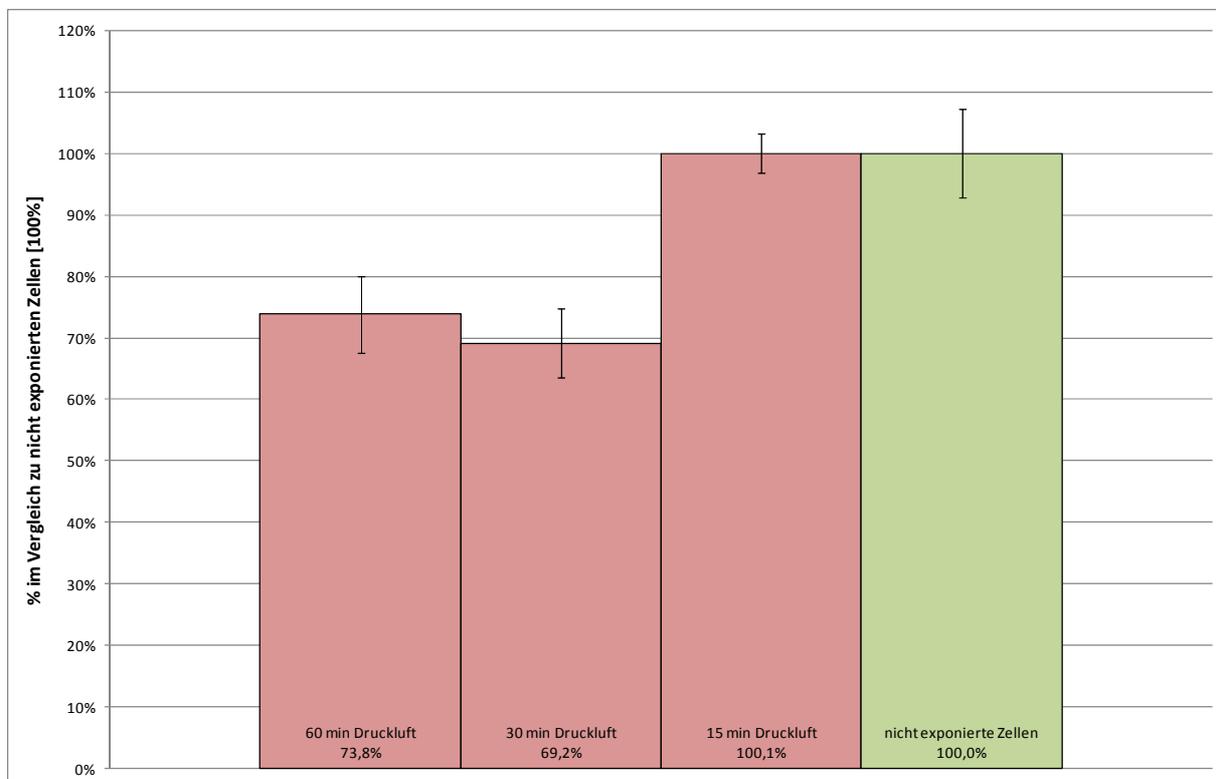


Abbildung 4-34: WST-1 Ergebnisse nach der Exposition mit Druckluft aus dem Kompressor. Dargestellt ist die Schädigung durch die Druckluft (rot) im Vergleich zu nicht exponierten Zellen (grün) in Prozent.

Die Reduzierung der Zellvitalität deutet auf eine Schädigung durch die Kompressorluft unter den gegebenen Versuchsbedingungen hin, die entweder auf eine zu geringe Temperatur oder relative Luftfeuchtigkeit zurückzuführen ist. Die theoretische Berechnung der Luftfeuchtigkeit soll Aufschluss darüber geben, inwieweit dieser Einflussfaktor für die Reduktion der Zellvitalität, z.B. durch Austrocknung, verantwortlich sein kann.

4.9.1. Theoretische Berechnung der Abgabe von Wasserdampf von den Zellkulturen

Als Grundlage für die Berechnung der Abgabe von Wasserdampf an der Oberfläche der Zellkulturmembranen und der damit verbundenen Sättigung der Luft über den Zellen wird ein vereinfachtes Model angenommen. Hierbei verläuft die Strömung in einer Schicht mit einer ebenen Deckwand, die parallel zur Membran des Zellkulturinserts in einer Höhe von 2,2 mm angebracht ist. Die Oberfläche, die Wasser abgeben kann, entspricht dabei mit 4,2 cm² der Fläche einer Membran eines Zellkulturinserts. Es wird angenommen, dass die einströmende Luft keinen Wasserdampf enthält und an der Wasseroberfläche stets der Sättigungsdampfdruck herrscht.

Für die Wasserdampfkonzentration c in der Entfernung x von der Oberfläche gilt zum Zeitpunkt t :

Formel 14: Berechnung der Konzentration an Wasserdampf

$$c(x, t) = c_0 (1 - \psi(\xi))$$

Formel 15: Berechnung der unabhängigen Variable Xi

$$\xi = \frac{x}{2 * \sqrt{D * t}}$$

Formel 16: Berechnung des Fehlerintegrals

$$\psi(\xi) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\xi} \exp(-u^2) du$$

c_0 Wasserdampfkonzentration an der Oberfläche

D Diffusionskoeffizient für Wasserdampf in Luft

t Zeit

ξ unabhängige Variable Xi

ψ Fehlerintegral

Die Berechnungen werden schrittweise durchgeführt, indem ringförmige Volumenelemente angenommen werden, die den Raum zwischen Membran und Deckwand ausfüllen. Zu diesen Volumenelementen ergeben sich Radien, zu denen die Sättigung mit Wasserdampf in den

Entfernungen 0,1; 0,2; 0,5; 1 und 2 mm berechnet werden kann (Abbildung 4-35). Die Radien und die relative Wasserdampfsättigung sind in Tabelle 4-6 aufgeführt.

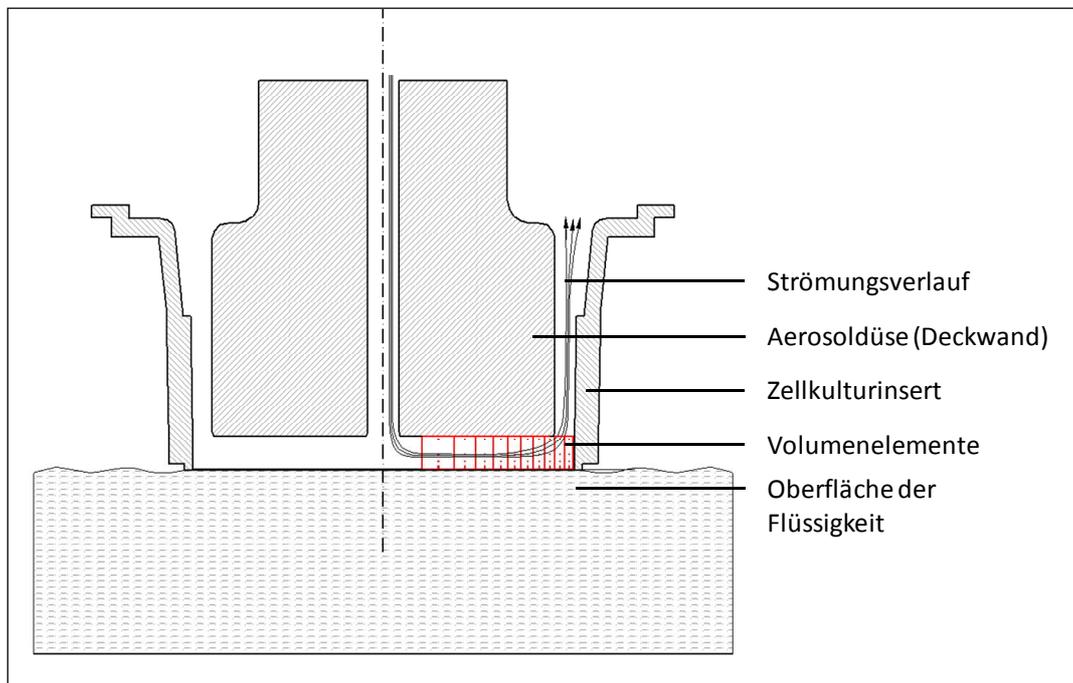


Abbildung 4-35: Skizze der Volumenelemente (rot) zwischen der Oberfläche der Flüssigkeit und der Aerosoldüse (Deckwand). Der Strömungsverlauf ist parallel zur Oberfläche durch schwarze Pfeile dargestellt. Die Entfernung von der Oberfläche ist durch rote Punkte in den Volumenelementen angezeigt.

Tabelle 4-6: Radien und Sättigungsgrade im vereinfachten Model

Radius [mm]	Sättigungsgrad [%]				
	0,1 mm	0,2 mm	0,5 mm	1 mm	2 mm
3,80	98,3	96,6	91,6	83,3	67,4
5,38	98,8	97,6	94,1	88,2	76,6
6,59	99,0	98,1	95,1	90,3	80,8
7,61	99,2	98,3	95,8	91,6	83,3
8,51	99,3	98,5	96,2	92,5	85,1
9,32	99,3	98,6	96,6	93,2	86,4
10,06	99,4	98,7	96,8	93,7	87,4
10,76	99,4	98,8	97,0	94,1	88,2
11,41	99,4	98,9	97,2	94,4	88,8
12,03	99,5	98,9	97,3	94,7	89,4

Die Tabelle zeigt, dass die relative Sättigung im inneren Radius geringer ist als in den äußeren Radien. Dabei nimmt der Sättigungsgrad mit größerer Entfernung ab. Die Tatsache, dass der Sättigungsgrad in der Nähe der Membran für jeden der 10 Radien über 80% liegt, spricht

gegen einen Einfluss der Luftfeuchtigkeit als Fehlerquelle. Eine Ausnahme bilden hier lediglich die inneren zwei Radien bei einem Abstand von 2 mm. Diese Entfernung sollte allerdings keinen Einfluss auf die Zellen haben.

Zusätzlich zu den Berechnungen werden die Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit der mit dem Kompressor generierten Druckluft bestimmt. Hierbei zeigen sich starke Schwankungen besonders bei der relativen Luftfeuchtigkeit (4-23%). Auf Grund der sich ständig wechselnden Bedingungen bei der Generierung der Druckluft und der nicht auszuschließenden Möglichkeit von Kontaminationen in der Druckluft durch Öl, wird für eine weitere Versuchsreihe die Druckluftversorgung auf Atemluft aus Flaschen umgestellt (DIN 12021 / Linde AG).

4.10. Exposition von Zellen mit Atemluft aus Gasflaschen

Die Umstellung auf Atemluft soll alle äußeren Einflussfaktoren eliminieren und eine Exposition unter standardisierten Bedingungen gewährleisten. Der Anschluss an die Luftleitung erfolgt dabei vergleichbar zur Kompressorluft mit einem regulierten Eingangsdruck von 3 bar zur Druckluftregelung und einem eingestellten Fluss von 8 l/min zum Aerosolgenerator.

Die Ergebnisse der unter identischen Versuchsbedingungen mit Atemluft durchgeführten Expositionen sind in Abbildung 4-36 dargestellt. Die Resultate des *Cell Proliferation Assay* WST-1 zeigen im Vergleich zur Kompressorluft eine deutliche Verbesserung der Werte für die Vitalität der Zellen nach der Exposition, unabhängig von der Länge der Exposition.

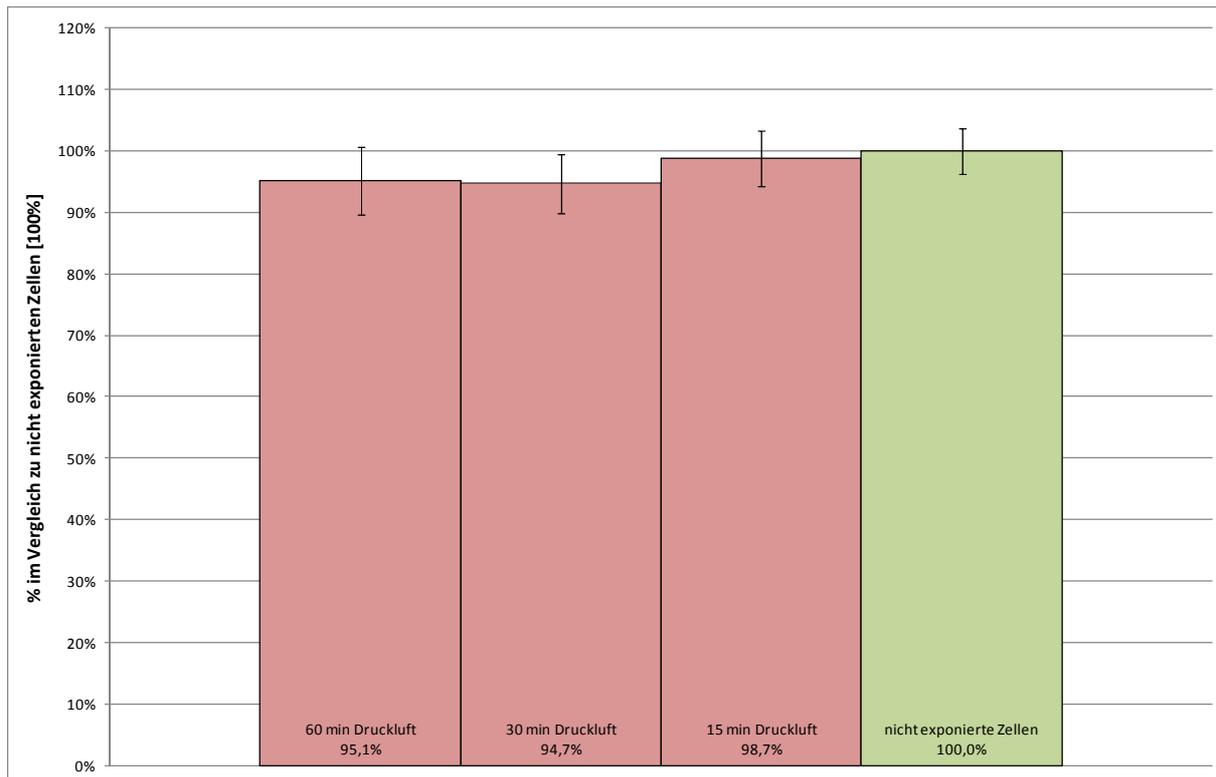


Abbildung 4-36: WST-1 Ergebnisse nach der Exposition mit Atemluft (DIN 12021) aus einer Druckluftflasche. Dargestellt ist die Schädigung durch die Druckluft (rot) im Vergleich zu nicht exponierten Zellen (grün) in Prozent.

Fazit

Auf Grundlage der Ergebnisse der Expositionen ist die definierte Atemluft als Vergleich für die Substanztestung der Druckluft aus dem Kompressor vorzuziehen. Die deutliche Abhängigkeit der Luftqualität von schwer zu kontrollierenden Faktoren wie der Umgebungstemperatur, der relativen Luftfeuchtigkeit und der Reinheit der Druckluft spricht für eine vollständige Umstellung der Versorgung auf Atemluft aus Druckluftflaschen. Für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Expositionen von Zellen mit verschiedensten verstäubten Feststoffen wird ausschließlich definierte Atemluft nach DIN 12021 (Linde AG) verwendet.

4.11. Exposition von Zellen mit verstäubten Feststoffen

Nach der Optimierung der Druckluftexposition erfolgt die Beaufschlagung von Zellen mit partikelhaltiger Luft aus dem Aerosolgenerator. Im Gegensatz zum Einsatz reiner Druckluft als Testaerosol setzt die Exposition mit einem Feststoff eine gründliche Beschreibung der Eigenschaften der Substanzen voraus. Neben der Abscheidung auf der Membran werden hierbei auch die Press- und Generierungseigenschaften der Stoffe intensiver betrachtet und die Einstellungen dementsprechend angepasst. Dieser Prozess verlangt eine genaue Einhaltung der Durchführung der einzelnen Teilschritte und eine Vorcharakterisierung der zu testenden Stoffe, welche im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

4.11.1. Herstellung der Substanzpresslinge

Die Herstellung des Substanzpresslings erfolgt nach substanzspezifischen Vorgaben mit einer hydraulischen Presse (Cultex[®] HyP - *Hydraulic Press* / Cultex Laboratories GmbH) in einen speziellen Presszylinder. Vor Beginn des eigentlichen Pressvorgangs müssen die Presszeit (in Sekunden) und der Pressdruck (Öldruck in bar) eingestellt werden (Abbildung 4-37).

Die Presszeit wird über einen Zeitregler an der Stirnseite der Presse geregelt und kann in Sekundenschritten variiert werden. Der genaue Pressdruck wird über den Druck und die Menge der zugeführten Druckluft geregelt und kann ebenfalls an der Stirnseite des Gerätes eingestellt werden. Zum Ablesen des aktuellen Pressdrucks muss die Schublade im unteren Teil der Presse herausgezogen und der „Press“-Knopf betätigt werden. Der Öldruck des Pressstempels (in bar) ist auf einer Digitalanzeige ablesbar.

Für einen Pressschritt wird eine definierte Menge an Substanz in einen Presszylinder gefüllt, ein Pressstößel in den Presszylinder eingesetzt und beides in die dafür vorgesehene Aussparung in der Schublade positioniert. Die Schublade mit dem Presszylinder muss vollständig in die Presse eingeschoben werden bevor der Pressvorgang durch erneute Betätigung des „Press“-Knopfes ausgelöst werden kann. Nach Ablauf der eingestellten Presszeit fährt die Presse wieder in ihre Ausgangsposition zurück. Nach Herausziehen der Schublade kann der Presszylinder entnommen und für einen weiteren Pressschritt gefüllt werden. Die Pressprozedur wird so lange wiederholt bis 2/3 des Zylinders mit Substanz gefüllt ist.

Formel 17: Berechnung der Presskraft

$$\text{Presskraft [kg]} = ((0,053 * \text{Öldruck [bar]} + 0,1899) * 100$$

Standardmäßig wurde für alle Substanzen ein Pressdruck von 450 kg [82 bar] bei einer Presszeit von drei Sekunden festgelegt. Bei der Generation von Laktose Monohydrat resultierte aus diesen Einstellungen allerdings eine zu geringe abgeschiedene Masse auf den Membranen. Zur Erhöhung der generierten Masse je Millimeter gepressten Materials im Presszylinder wurde der Wert auf 600 kg [110 bar] hochgesetzt.

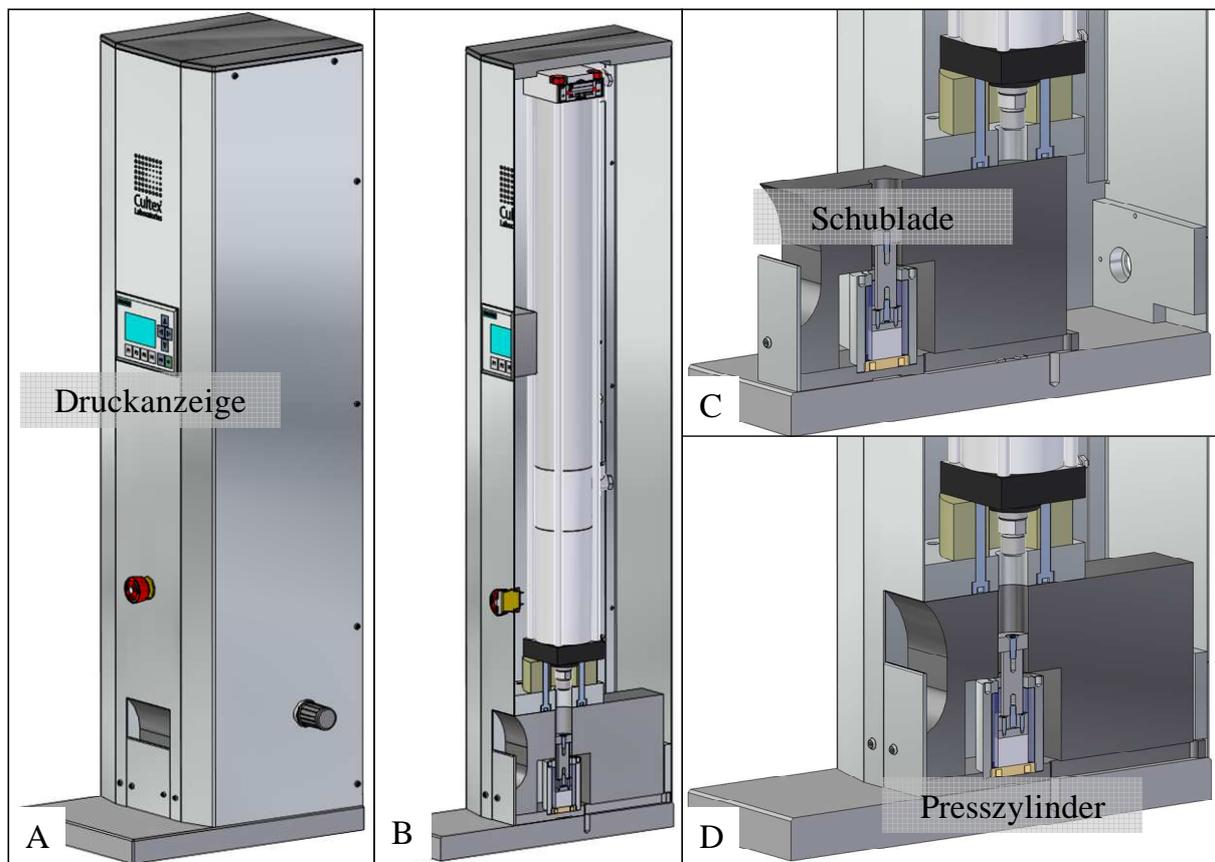


Abbildung 4-37: A) Darstellung der für die Pressung der Pulver verwendeten hydraulischen Presse Cultex® HyP - Hydraulic Press mit der Druckanzeige B) Darstellung der hydraulischen Presse Cultex® HyP - Hydraulic Press. (Querschnitt). C) Darstellung der herausgezogenen Pressschublade mit Presszylinder und Presskolben (Querschnitt). D) Darstellung des Presszylinders während eines Pressvorgangs (Querschnitt).

4.11.2. Bestimmung der Eigenschaften der Testsubstanzen

Der Ablauf zur genaueren Bestimmung des Verhaltens der Substanzen ist nahezu identisch zu einer normalen Exposition mit Zellen. Dabei werden die Zellkulturinserts durch die bereits beschriebenen Insertnachbildungen ersetzt. Die Beobachtungen während der Durchführung der einzelnen Schritte der Pressung und der Aerosolgeneration dienen der Auswahl des Pressdrucks und der Presszeit sowie des Vorschubs und der Anzahl an Umdrehungen des Schabers.

Die folgenden Eigenschaften der Substanzen sind dabei insbesondere zu beachten:

- Verhalten bei der Pressung
- Verhalten bei der Aerosolgeneration
- Aussehen des Aerosols im Elutriator
- Partikel- und Massenverteilung
- Verteilung auf die drei Kammern
- Verteilung innerhalb einer Kammer

Die Pressung (Kapitel 4.11.1) der Substanzen erfolgt standardmäßig mit 450 kg (82 bar) bzw. 600 kg (110 bar). Während des Pressvorgangs liegt das Hauptaugenmerk auf der Verdichtung des Materials sowie auf der Stabilität des Presskuchens. Bei den einzelnen Pressschritten dürfen sich keine separaten Einzelschichten bilden, der Presskuchen sollte aber auch nicht aus dem Zylinder fallen. Gegebenenfalls wird die Substanz mit zwei verschiedenen Presseinstellungen gepresst und die Anwendbarkeit der Einstellungen verglichen.

Im zweiten Schritt erfolgt die Festlegung des Vorschubs und der Umdrehungsgeschwindigkeit des Aerosolgenerators. Hierfür wird der Zylinder in den Aerosolgenerator eingespannt und mit Standardeinstellungen von 2 mm/Std bei 800 Umdrehungen pro Stunde gestartet. Während einer 30minütigen Einlaufphase wird das Aerosol im Mischgefäß mit einer Halogenlampe beobachtet. Das Abscheideverhalten der mit dem Auge sichtbaren großen Partikel oder Bruchstücke gibt einen ersten Anhaltspunkt über die Verwendbarkeit der Einstellungen. Ein zu hoher Vorschub kann größere Substanzstücke aus dem Presskuchen herausbrechen und diesen unbrauchbar machen. Im schlimmsten Fall verstopft die Klinge des Aerosolgenerators vollständig. Zur genaueren Bewertung wird eine Exposition mit

Filterpapieren in den Insertnachbildungen durchgeführt und dabei die Verteilung über die Kammern untereinander gravimetrisch bewertet.

Die Wahl der Einstellungen des Aerosolgenerators für die einzelnen Zellexpositionen erfolgt nach dieser Filterbeaufschlagung so, dass bei einer 30minütigen Exposition 200 µg der zu testenden Substanz pro Zellkulturinsert (4,2 cm²) abgeschieden werden. Dies entspricht einer deponierten Masse von etwa 50 µg/cm² für ein 6-well Zellkulturinsert. Die Einstellungen der Masse werden auf Grund von vergleichbaren Submersexpositionen ausgewählt (NanoCare_Project_Partners 2009; Nau and Krug 2009) bei denen der minimale Effektleve bei etwa 25-50 µg/cm² lag.

4.12. Durchführung der Exposition

Nach einer intensiven Charakterisierung der Testsubstanzen wird für jede Substanz ein spezifisches Protokoll für die Pressung und Generierung des Aerosols erstellt. Die nach diesen Protokollen durchgeführten Expositionen und die daraus resultierenden Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt für die einzelnen Substanzen aufgeführt.

Vor Beginn jeder Zellexposition erfolgt ein Vorlauf von 30 min zur Gewährleistung einer glatten Schnittfläche im Presszylinder und somit einer gleichmäßigen Aerosolgenerierung. Die vorbereiteten Zellkulturinserts mit den kultivierten Zellen werden im Anschluss an die Einlaufphase in das Modul eingesetzt und exponiert. Nach der Exposition und einer 24stündigen Nachinkubation erfolgt die Auswertung der schädigenden Wirkung mittels eines *Cell Proliferation Assays* WST-1.

Für alle Substanzen wird darüber hinaus eine Expositionsreihenfolge von 60 min, 30 min und 15 min mit einem Mediaustausch von 2,5 ml zwischen den einzelnen Expositionsdurchgängen festgelegt.

4.12.1. Disperal[®]

Das Aluminiumhydroxid-Pulver Disperal[®] (Sasol Germany GmbH) wird für die Exposition mit 450 kg (82 bar) gepresst und mit 800 Umdrehungen bei einem Vorschub von 2 mm/Std generiert. Die daraus resultierenden abgeschiedenen Massen sind in Tabelle 4-7 aufgeführt.

Die ausgewogene Masse liegt dabei mit durchschnittlich 231 µg bei einer 30minütigen Exposition leicht über den angestrebten 200 µg. Unabhängig davon ist eine Linearität über die Zeit zu erkennen mit der sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung erstellen lässt.

Tabelle 4-7: Abgeschiedene Massen an Disperal®

Durchgang	Expositionszeit [min]	Filter in Kammer 1 [µg]	Filter in Kammer 2 [µg]	Filter in Kammer 3 [µg]
1	60	444	445	441
2	30	229	231	232
3	15	85	102	93

Die nach den Abscheideexperimenten mit Disperal® mittels APS hinter dem Elutriator bestimmte Partikelanzahlverteilung (blau) und die Partikelmassenverteilung (rot) sind in Abbildung 4-38 gegen die Partikelgröße (linearisierte x-Achse) aufgetragen.

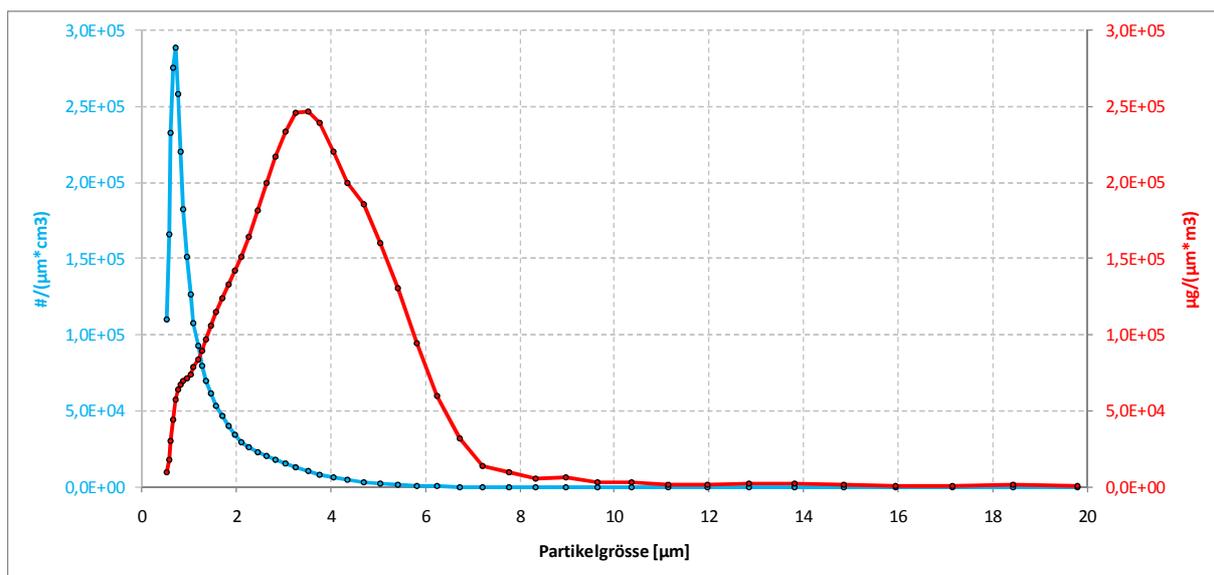


Abbildung 4-38: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Disperal.

Bei der Betrachtung der Größenverteilung für Disperal® zeigt sich ein deutlicher Peak bei etwa 0,7 µm [$2,9 \times 10^5$ Partikel/($\mu\text{m}^3 \cdot \text{cm}^3$)]. Damit liegt der Hauptanteil der generierten Partikel in einem Größenbereich, welcher unter den gegebenen Bedingungen nicht durch Sedimentation abgeschieden wird. Diese Submikrometerpartikel machen jedoch bei der Massenverteilung nur einen sehr geringen Teil der Gesamtmasse aus. Der massenmäßig größte Anteil entfällt auf Partikel im Bereich zwischen 2 und 5 µm.

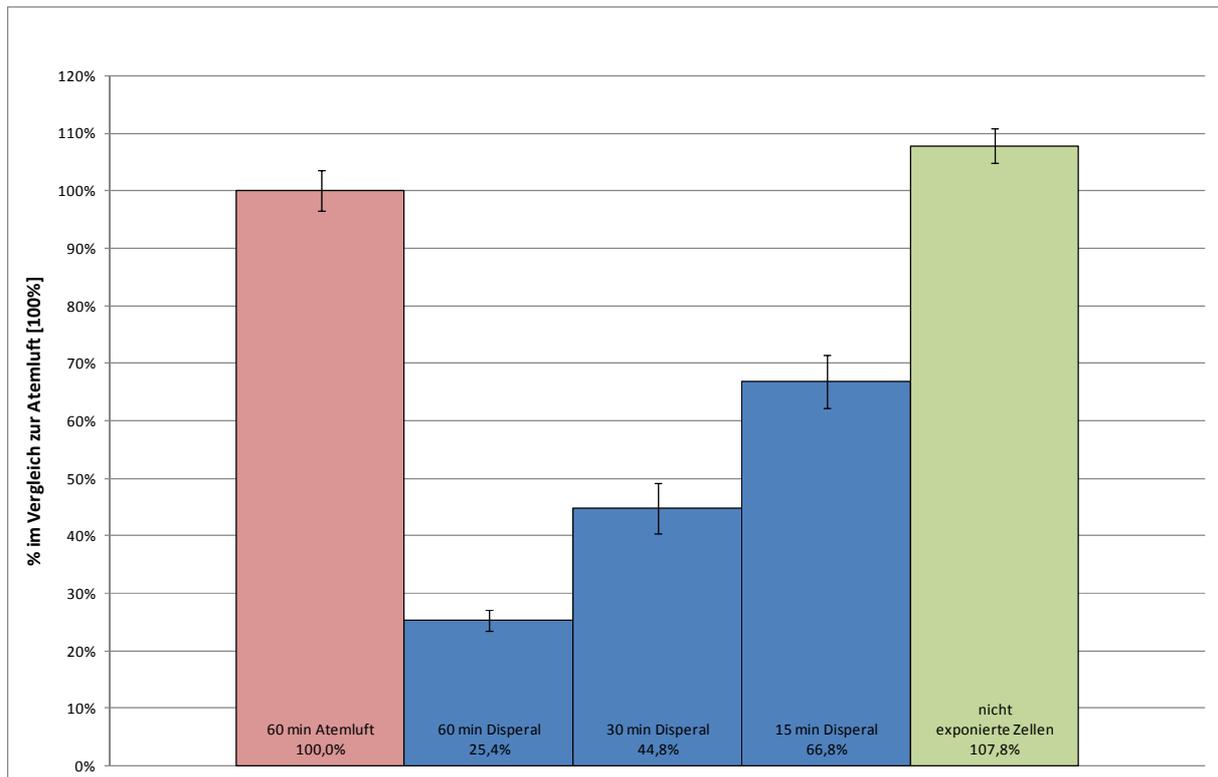


Abbildung 4-39: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Expositionen mit Disperal[®] (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.

Die Vitalität der eingesetzten Zellen nimmt nach der Exposition mit Disperal[®] stark ab (Abbildung 4-39). Bei einer 60minütigen Exposition mit einer Gesamtmasse von $\sim 443 \mu\text{g}$ ($106 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) zeigt sich so eine deutliche Reduktion von 75% im Vergleich zu den parallel den mit Atemluft exponierten Zellen. Bereits mit etwa $93 \mu\text{g}$ pro Well ($22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) während einer 15minütigen Exposition liegt eine deutliche Reduktion der Vitalität um ein Drittel zur Vergleichsvitalität vor.

4.12.2. Pural 200[®]

Pural 200[®] (Sasol Germany GmbH) ist ebenfalls ein Aluminiumhydroxid-Pulver mit vergleichbaren Eigenschaften wie das im Abschnitt 4.12.1 getestete Disperal[®]. Das Pulver wird ebenso wie Disperal[®] mit 450 kg (82 bar) gepresst und mit 800 Umdrehungen bei einem Vorschub von 1 mm/Std generiert. Die abgeschiedenen Massen sind in Tabelle 4-8 aufgeführt. Die ausgewogene Masse liegt mit durchschnittlich $232 \mu\text{g}$ während einer Exposition von 30 min ebenfalls über $200 \mu\text{g}$. Eine Linearität über die drei Zeitpunkte war im

Vergleich zum Disperal[®] nicht zu erkennen. Die bei einer 60minütigen Exposition abgeschiedene Menge an Pural 200[®] ist mit 509 µg deutlich über den angestrebten 400 µg.

Tabelle 4-8: Abgeschiedene Massen an Pural 200[®]

Durchgang	Expositionszeit [min]	Filter in Kammer 1 [µg]	Filter in Kammer 2 [µg]	Filter in Kammer 3 [µg]
1	60	506	486	535
2	30	238	214	244
3	15	142	153	131

Die mit dem APS hinter dem Elutriator bestimmte Partikelanzahlverteilung (blau) und die Partikelmassenverteilung (rot) bei der Generation von Pural 200[®] sind in Abbildung 4-40 gegen die Partikelgröße (linearisierte x-Achse) aufgetragen. Die Skalierung der beiden y-Achsen wurde im Vergleich zum Disperal[®] angepasst.

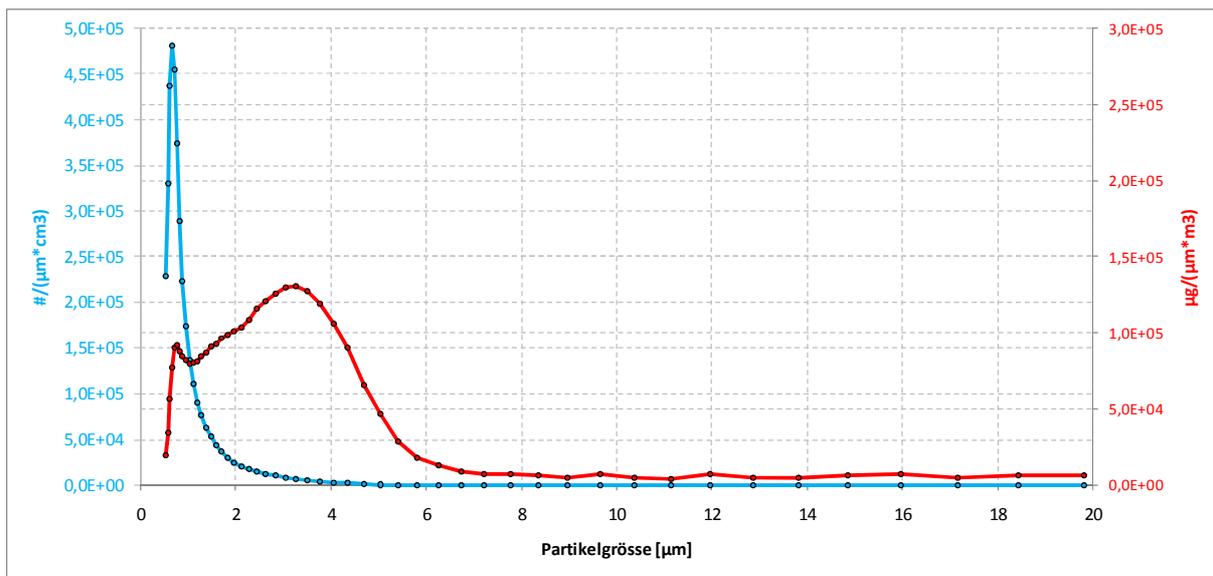


Abbildung 4-40: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Pural 200[®].

Im Vergleich zum Disperal[®] besitzt auch Pural 200[®] in der Größenverteilung einen deutlichen Peak bei 0,7 µm. Die Anzahl der Partikel in diesem Bereich liegt mit $4,8 \times 10^5$ Partikel/(µm*cm³) weit über dem von Disperal[®]. Die Verteilung der Masse weist auch für Pural 200[®] einen Peak von deutlich über 1 µm auf, für diesen liegt die Masse mit $1,3 \times 10^5$ µg/(µm*m³) aber nur bei etwa 50% im Vergleich zum Disperal [$2,5 \times 10^5$ µg/(µm*m³)]. Der massenmäßig größte Anteil entfällt auf Partikel im Bereich zwischen 0,7 und 4,5 µm.

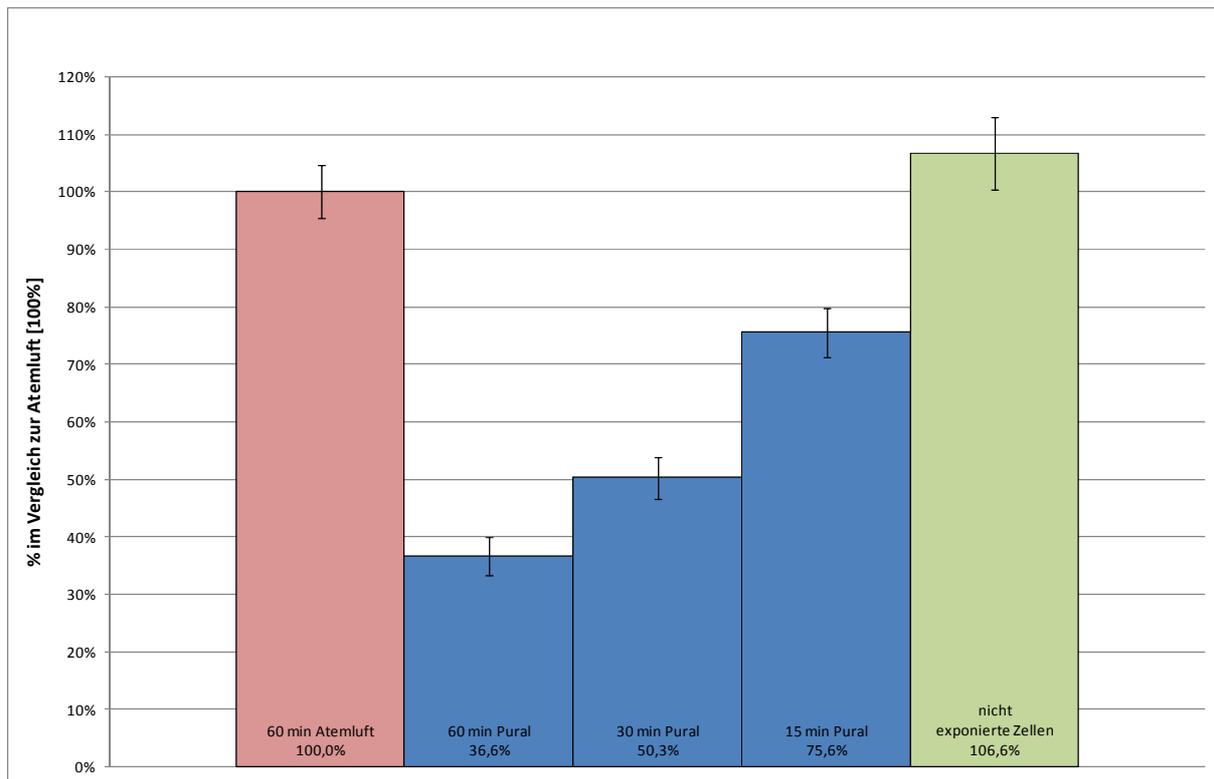


Abbildung 4-41: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Expositionen mit Pural 200[®] (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.

Ebenso wie beim Disperal[®] nimmt die Vitalität der Zellen nach der Exposition mit Pural 200[®] ab (Abbildung 4-41). Bei einer 60minütigen Exposition ist der Rückgang trotz einer höheren Gesamtmasse von $\sim 509 \mu\text{g}$ ($121 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) mit etwa 60% geringer als bei einer vergleichbaren Exposition mit Disperal[®] ($443 \mu\text{g}$). Während einer 15minütigen Exposition liegt die Reduktion der Vitalität mit etwa $142 \mu\text{g}$ pro Well ($34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) nur bei 25% im Vergleich zu den mit Atemluft exponierten Zellen.

4.12.3. Bariumsulfat

Bariumsulfat (Sachtleben Chemie GmbH) wird mit 450 kg (82 bar) gepresst und mit 800 Umdrehungen bei einem Vorschub von 1,5 mm/Std generiert. Die daraus resultierenden abgeschiedenen Massen sind in Tabelle 4-9 aufgeführt. Die Werte liegen nach 30 min, mit durchschnittlich $206 \mu\text{g}$ nur geringfügig über den angestrebten $200 \mu\text{g}$, allerdings weisen die Werte der drei Kammern untereinander eine große Streuung auf.

Tabelle 4-9: Abgeschiedene Massen an Bariumsulfat

Durchgang	Expositionszeit [min]	Filter in Kammer 1 [μg]	Filter in Kammer 2 [μg]	Filter in Kammer 3 [μg]
1	60	476	459	452
2	30	219	191	209
3	15	98	90	100

Die Partikelanzahlverteilung (blau) und die Partikelmassenverteilung (rot) bei der Generation von Bariumsulfat sind in Abbildung 4-42 dargestellt. Die beiden y-Achsen wurden zur besseren Darstellung der Daten angepasst.

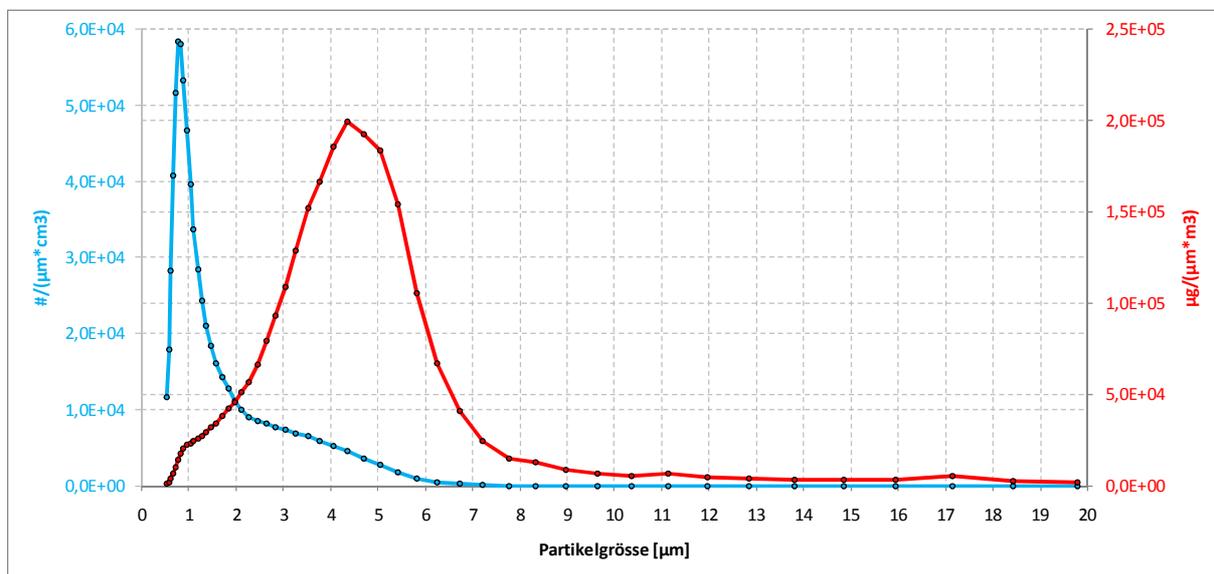


Abbildung 4-42: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Bariumsulfat.

Die Partikelanzahl- und die Partikelmassenverteilung von Bariumsulfat zeigen ein dem Disperal[®] vergleichbares Bild. Der Hauptanteil an Partikeln liegt dabei größtmäßig wiederum deutlich unter 1 μm . Der vergleichsweise höhere Anteil von Partikeln im Bereich von 2-6 μm führte zu einem Peak in der Massenverteilung im Bereich über 4 μm Partikelgröße. Der Großteil der durch Sedimentation auf den Membranen abgeschiedenen Partikel entfällt auf den Mikrometerbereich. Im Vergleich zum Disperal[®] und Pural 200[®] ist somit kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

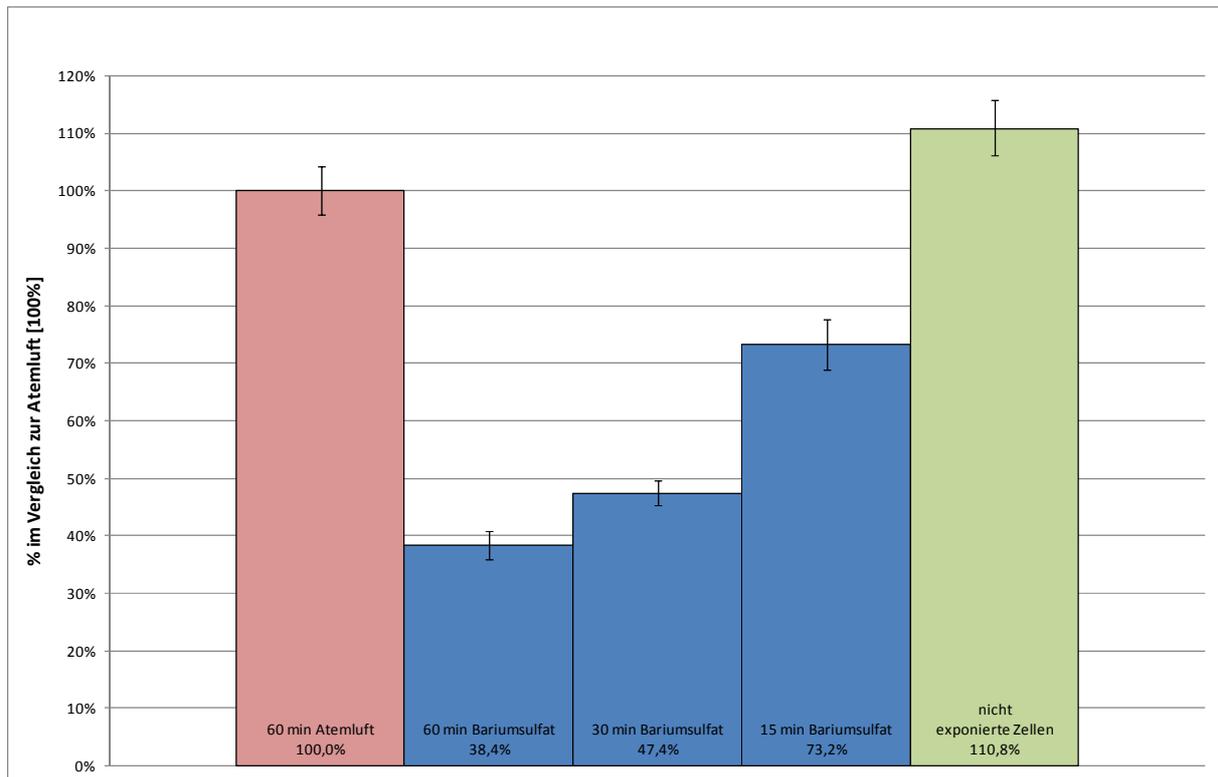


Abbildung 4-43: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Expositionen mit Bariumsulfat (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.

Die WST-1 Ergebnisse nach der Exposition mit Bariumsulfat zeigen eine ähnliche Abstufung in der Vitalität der Zellen wie bereits nach den Expositionen mit Pural 200[®]. Eine dosisabhängige Wirkung von Bariumsulfat auf die Zellen ist bei der Verdopplung der abgeschiedenen Masse nur zwischen der 15minütigen ($23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und der 30minütigen Exposition ($49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) zu erkennen. Bei der 60minütigen Exposition ist die Schädigung trotz einer vergleichbar höheren Gesamtmasse von $110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ im Vergleich zur 30minütigen Exposition nur noch minimal verstärkt.

4.12.4. Kupfer(II)sulfat

Die Exposition mit Kupfer(II)sulfat (Sigma Aldrich GmbH) wird mit einem Vorschub von 4,5 mm/Std bei 800 Umdrehungen pro Stunde durchgeführt. Die daraus resultierenden abgeschiedenen Massen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 4-10). Die ausgewogene Masse liegt mit einem Mittelwert von $203 \mu\text{g}$ während einer 30minütigen Exposition genau im angestrebten Bereich und weist nur eine geringe Streuung über die drei

Kammern auf. Eine Verdopplung der Expositionszeit von 15 min auf 30 min führt zu einer Verdopplung der abgeschiedenen Masse. Die Masse nach 60 min liegt mit 454 µg wieder höher als der erwartete Wert von 400 µg.

Tabelle 4-10: Abgeschiedene Massen an Kupfer(II)sulfat

Durchgang	Expositionszeit [min]	Filter in Kammer 1 [µg]	Filter in Kammer 2 [µg]	Filter in Kammer 3 [µg]
1	60	456	454	453
2	30	200	205	204
3	15	101	94	98

Die Partikelanzahl (blau) und die Partikelmassenverteilung (rot) bei der Generation von Kupfer(II)sulfat sind in Abbildung 4-44 dargestellt. Die beiden y-Achsen wurden zur besseren Darstellung der Daten angepasst.

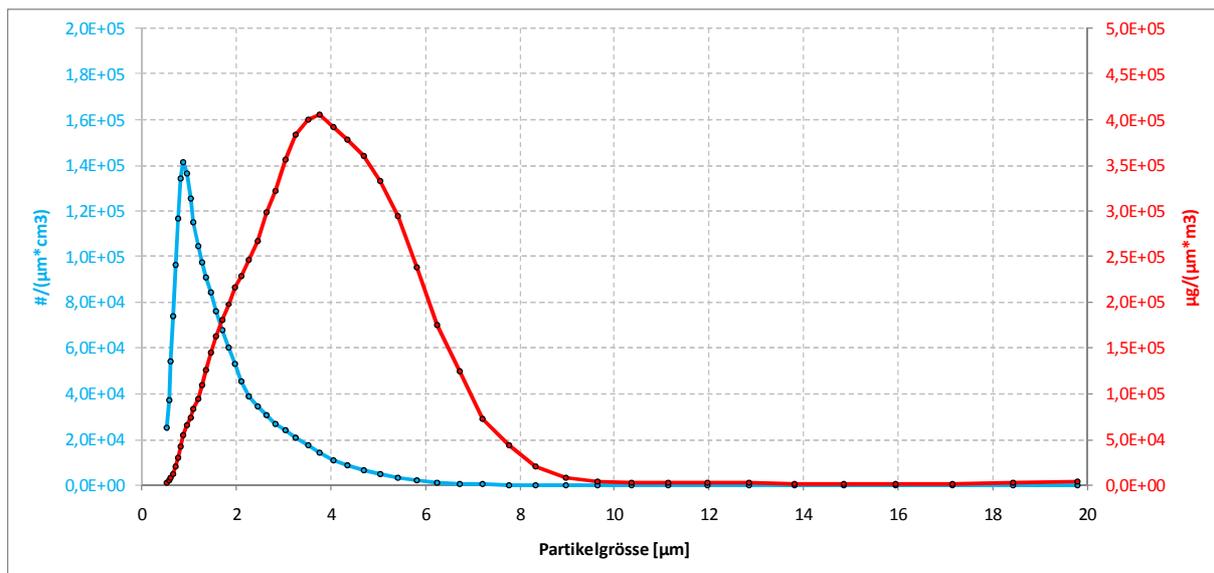


Abbildung 4-44: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Kupfer(II)sulfat.

Die Messung der Partikelgrößenverteilung zeigt für Kupfer(II)oxid einen deutlichen Peak bei 0,9 µm und liegt damit höher als bei den vorangegangenen Substanzen. Die, mit steigender Partikelgröße abfallende Kurve weist keine Partikel größer als 9,8 µm auf. Hieraus resultiert eine deutliche Kurve bei der Massenverteilung im Bereich von 0,5 µm bis 9,8 µm mit einem Peak bei etwa 3,8 µm.

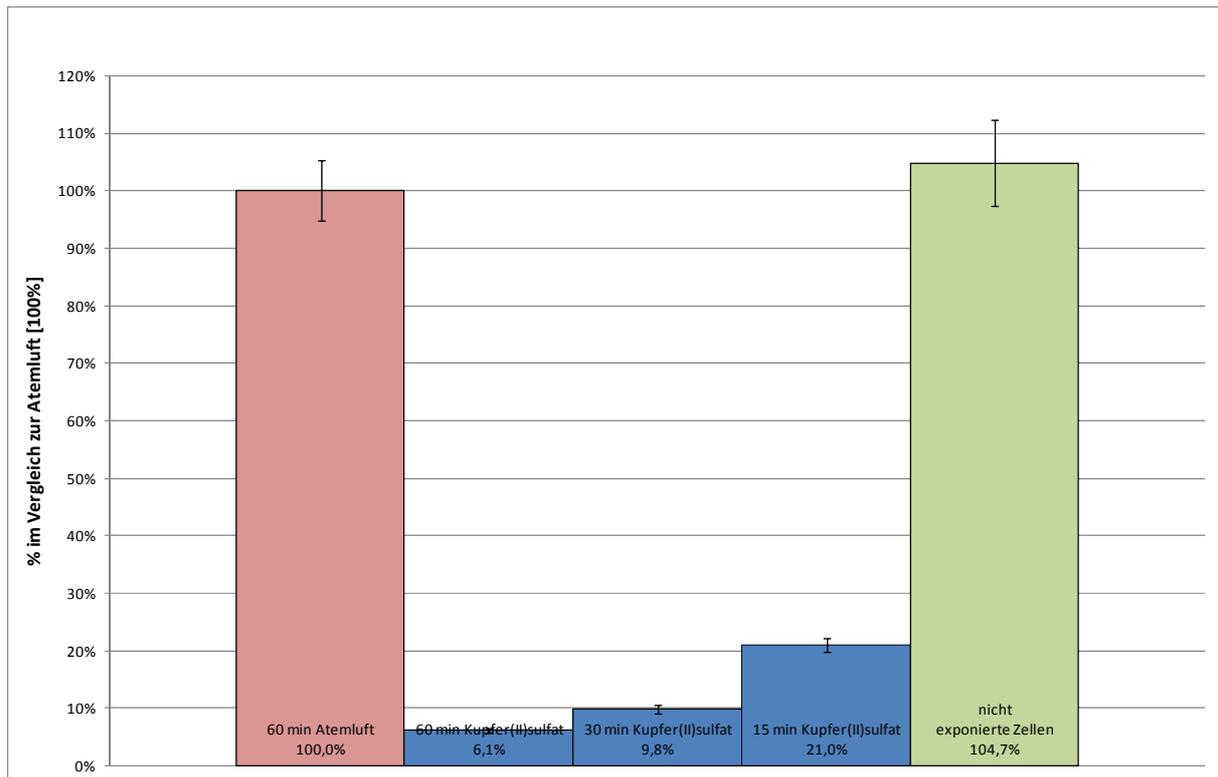


Abbildung 4-45: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Expositionen mit Kupfer(II)sulfat (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.

Die Analyse der metabolischen Aktivität der Zellen mittels des WST-1 Tests zeigt bereits nach 15 min eine starke Abnahme der Zellvitalität um 80% im Vergleich zur Atemluft (Abbildung 4-45). Mit fortschreitender Expositionsdauer sinkt die Vitalität auf 6% (60 min) des Ausgangswerts ab. Diese starke zytotoxische Wirkung hebt Kupfer(II)sulfat von den anderen Substanzen ab, eine Tatsache die womöglich auf die gute Löslichkeit der Substanz zurückzuführen ist. Eine weitere lösliche Substanz ist Laktose, die in der Testreihe als Negativsubstanz eingesetzt wird und keine Schädigung aufweisen sollte.

4.12.5. Laktose Monohydrat

Die Generation des Aerosols aus gepresstem (600 kg) Laktose Monohydrat (Fluka) erfolgt mit einem Vorschub von 10,0 mm/Std bei 800 Umdrehungen pro Stunde. Damit unterscheidet sich die Substanz sowohl in der benötigten Presskraft als auch im Vorschub deutlich von den weiteren Testsubstanzen. Die aus der Generation resultierenden abgeschiedenen Massen sind in Tabelle 4-11 dargestellt. Der Mittelwert der ausgewogenen Masse liegt während einer

30minütigen Exposition mit 181 µg unter den geplanten 200 µg und lässt sich auch mit einer Verdopplung des Vorschubs nicht signifikant erhöhen. Die Tatsache, dass die Werte nach einer 15minütigen Beaufschlagung mit durchschnittlich 114 µg über den erwarteten 100 µg liegen, lässt ein generelles Problem bei der Abscheidung von Laktose Monohydrat vermuten. Dass die mehrfache Wiederholung der Abscheidungen vergleichbare Ergebnissen liefert, zeigt dass auch mit Laktose Monohydrat eine reproduzierbare Exposition möglich ist.

Tabelle 4-11: Abgeschiedene Massen an Laktose

Durchgang	Expositionszeit [min]	Filter in Kammer 1 [µg]	Filter in Kammer 2 [µg]	Filter in Kammer 3 [µg]
1	60	351	364	346
2	30	195	173	175
3	15	116	119	108

Die Partikelanzahlverteilung (blau) und die Partikelmassenverteilung (rot) bei der Generation von Laktose Monohydrat sind in Abbildung 4-46 dargestellt. Die beiden y-Achsen wurden zur besseren Darstellung der Daten angepasst.

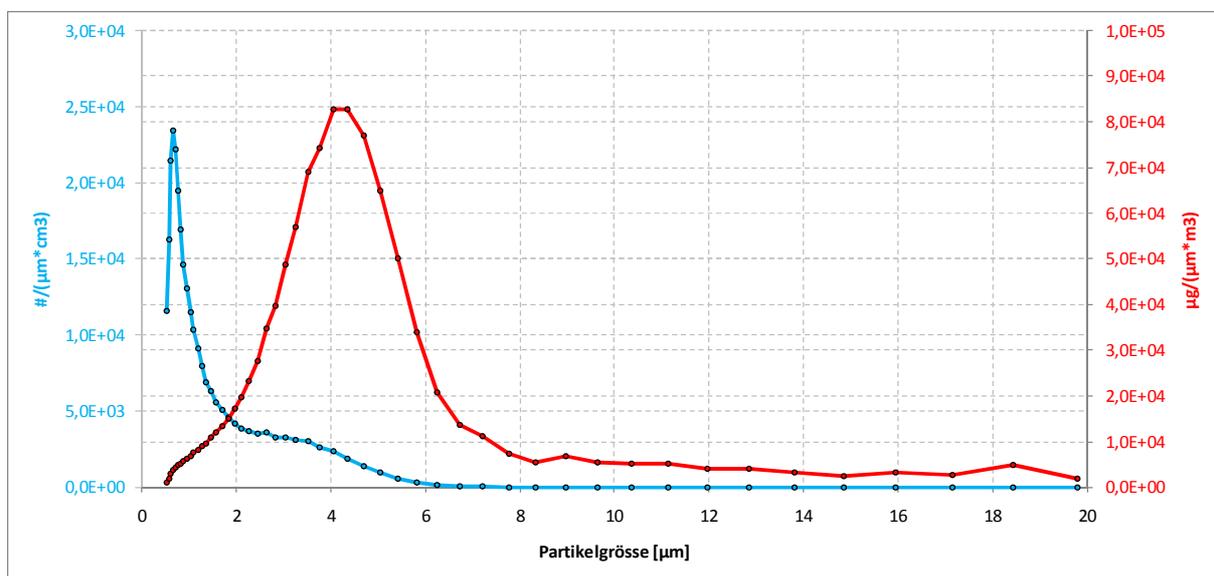


Abbildung 4-46: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Laktose Monohydrat.

Die Messergebnisse des APS weisen im Bereich unter 10 µm für eine Laktose Monohydrat eine dem Kupfer(II)sulfat ähnliche Größenverteilung auf. Im Größenbereich über 10 µm finden sich wie bei Pural 200® einige wenige Partikel, welche bei der Beaufschlagung auf Grund ihrer Masse zu 100% abgeschieden werden. Die Partikelanzahlverteilung weist wie

Pural 200[®] und Disperal[®] einen Peak bei 0,7 μm auf und weicht somit vom vorangegangenen Kupfer(II)sulfat ab. Der Hauptpeak für die Massenverteilung liegt bei einer Partikelgröße von 2,5 μm bis 6 μm .

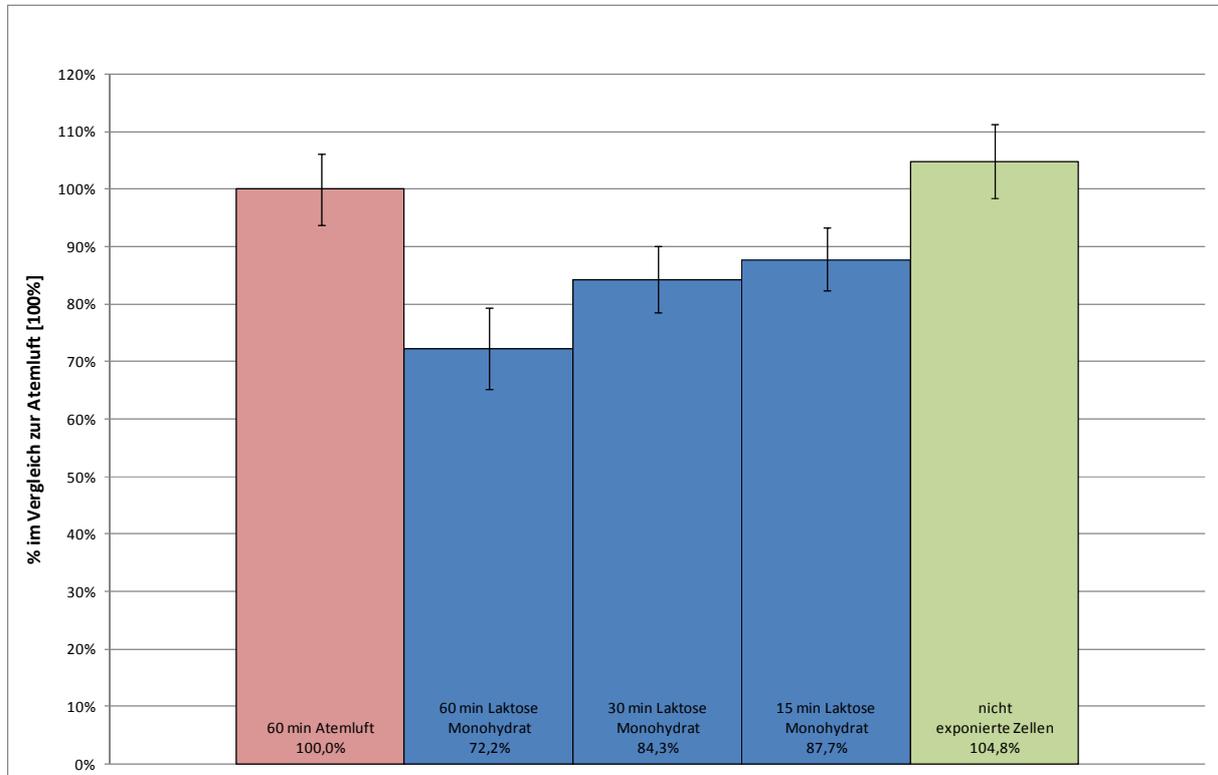


Abbildung 4-47: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Expositionen mit Laktose Monohydrat (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.

Die Bestimmung der metabolischen Aktivität nach der Beaufschlagung von A549-Zellen mit Laktose Monohydrat weist auch für diese Substanz eine geringe Schädigung auf (Abbildung 4-47). Allerdings liegt diese nach der maximalen Expositionszeit von 60 min nur bei etwa 28% im Vergleich zur Atemluft. Da eine Schädigung der Zellen durch Laktose Monohydrat auf Grund von Vergleichsdaten nicht zu erwarten gewesen ist, deutet alles auf einen Überdosis- oder Überladungseffekt hin. Eine Tatsache, die durch die genauere Betrachtung der Membranen nach der Beaufschlagung in einem Wiederholungsexperiment untermauert wird. Hierbei zeigt sich nach der 60minütigen Exposition eine geschlossene Schicht an Laktose Monohydrat über den Zellen.

4.12.6. Kupfer(II)oxid

Das eingesetzte Kupfer(II)oxid (Sigma Aldrich) wird mit 450 kg (82 bar) gepresst und mit 800 Umdrehungen bei einem Vorschub von 2,5 mm/Std generiert. Die daraus resultierenden abgeschiedenen Massen sind in Tabelle 4-12 aufgeführt. Die ausgewogenen Massen liegen nach 30 min mit durchschnittlich 189 μg geringfügig unter den angestrebten 200 μg . Insgesamt ist die Verteilung über die drei Kammern mit etwa 2% Abweichung sehr gleichmäßig.

Tabelle 4-12: Abgeschiedene Massen an Kupfer(II)oxid

Durchgang	Expositionszeit [min]	Filter in Kammer 1 [μg]	Filter in Kammer 2 [μg]	Filter in Kammer 3 [μg]
1	60	461	443	453
2	30	191	187	190
3	15	90	85	92

Die Partikelanzahlverteilung (blau) und die Partikelmassenverteilung (rot) bei der Generation von Kupfer(II)oxid sind in Abbildung 4-48 dargestellt. Die beiden y-Achsen wurden zur besseren Darstellung der Daten angepasst.

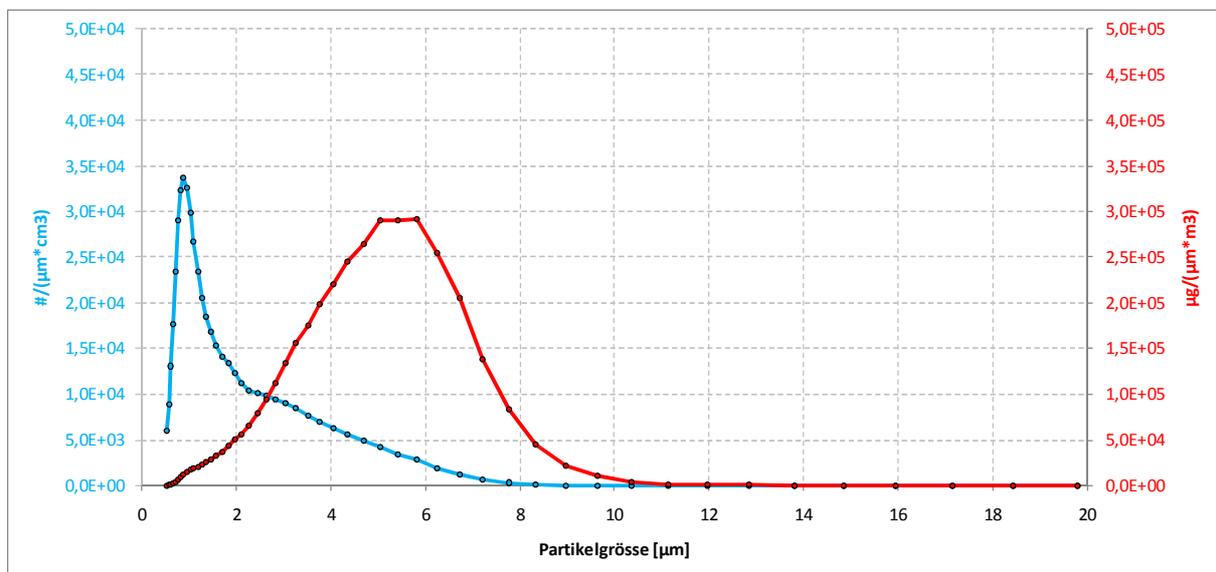


Abbildung 4-48: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen (blau) und -massenverteilung (rot) von Kupfer(II)oxid

Die Partikelanzahl- und die Partikelmassenverteilung von Kupfer(II)oxid zeigen ein ähnliches Bild wie die bis hierhin getesteten Substanzen. Der deutliche Peak im Bereich unter einem Mikrometer ist mit $2,4E+10^4$ sehr viel niedriger als z.B. bei Disperal[®] und Pural 200[®]. Neben diesem Hauptpeak ist ein kleinerer Nebenpeak von 3-5 μm zu erkennen. In diesem Bereich befindet sich auch der Hauptanteil der Partikelmassenverteilung.

Insgesamt zeigt sich auch für die Massenverteilung ein ähnliches Bild wie für die anderen bisher beschriebenen Substanzen.

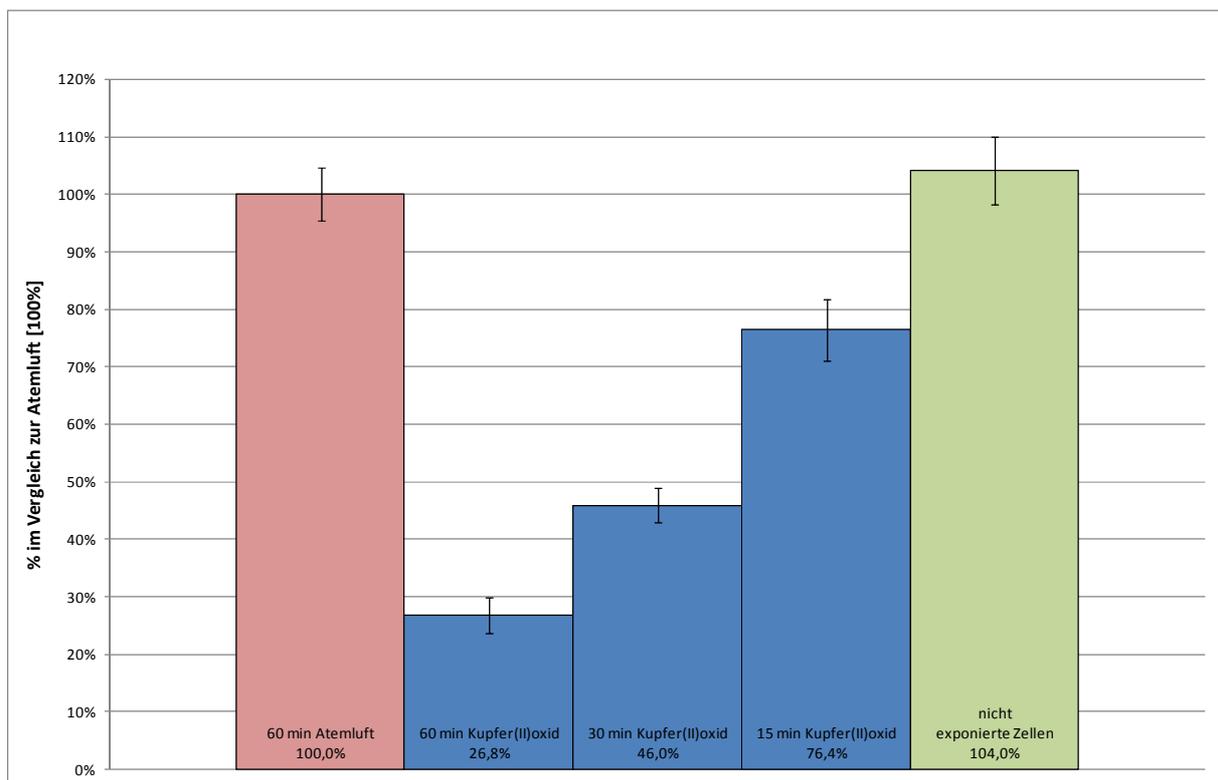


Abbildung 4-49: Vitalität (WST-1) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Expositionen mit Kupfer(II)oxid (blau) im Vergleich zur Atemluft (rot) und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die Vitalität der mit Atemluft exponierten Zellen wurde für die Darstellung als 100% angenommen.

Die Ergebnisse des WST-1 Tests nach der Exposition mit Kupfer(II)oxid weisen eine dosisabhängige Abnahme der Vitalität auf. Eine Verdopplung der Expositionszeit und somit auch der Dosis resultiert in einer Verdopplung der Schädigung der exponierten Zellen. Insgesamt nimmt die Vitalität bei der maximalen Expositionszeit von 60 min um etwa 73% ab, ein vergleichbares Ergebnis zeigten die Ergebnisse nach der Exposition mit Disperal[®]. Nach Kupfer(II)sulfat besitzt Kupfer(II)oxid zusammen mit Disperal[®] das höchste toxische Potential.

Fazit

Die Ergebnisse der Experimente zeigen, dass mit dem Cultex[®] RFS und dem entwickelten Aufbau eine stabile Exposition sowie reproduzierbare Beaufschlagung von kultivierten Zellen unter definierten Bedingungen möglich ist. Eine dosisabhängige Schädigung der Zellen durch die Substanzen konnte dabei nachgewiesen werden. Eine vergleichbare Exposition mit unterschiedlichen Substanzen zur Untersuchung der akut toxischen Wirkung ist realisiert worden und soll als Grundlage für die Untersuchung von weiteren Endpunkten dienen.

Die Daten zeigen darüber hinaus auch, dass eine Substanz spezifische Größenverteilung des Ausgangsmaterials bei der Generation mit einem *Dust Feeder* nach Wright nur begrenzt eine Rolle spielt. So weisen Pural 200[®] und Disperal[®] trotz einer Ausgangspartikelgröße von 25 µm bzw. 40 µm eine vergleichbare Partikelgrößenverteilung auf wie z.B. Kupfer(II)oxid (5 µm). Da eine genaue Aussage über den Einfluss der Partikelgröße unter diesen Versuchsbedingungen nicht möglich erscheint, muss der Aufbau diesbezüglich erweitert werden. Im Kapitel 4.13.1 soll zu diesem Zweck ein Kaskadenimpaktor in den bestehenden Aufbau integriert werden, um eine Separierung der Partikel nach ihrer Größe zu ermöglichen. Da mit sinkender Partikelgröße die Effizienz der Abscheidung stark abnimmt soll in diesem Zusammenhang auch eine Methode zur gerichteten Deposition installiert werden (Kapitel 4.13.2).

Die Tatsache, dass bis auf Kupfer(II)sulfat und Laktose alle anderen Substanzen vergleichbare Werte im WST-1 aufweisen, führt zu der Frage der Sensitivität des WST-1 Tests bzw. seiner Trennschärfe, um kleine Unterschiede in der toxischen Wirkung von Substanzen sinnvoll darzustellen. Es werden deshalb im Folgenden an Hand von zwei weiteren Endpunkten die schädigende Wirkung von Kupfer(II)oxid und Bariumsulfat genauer betrachtet.

4.12.7. LDH-Assay nach der Exposition mit ausgewählten Substanzen

In einer weiteren Versuchsreihe werden Expositionen mit Bariumsulfat und Kupfer(II)oxid durchgeführt. Ziel dieser Experimente ist die Bestimmung der freigesetzten Laktat-Dehydrogenase mit dem *CytoTox 96[®] Assay* LDH.

Die Durchführung der Exposition der Zellen erfolgt dabei wie bereits beschrieben. Nach der 24stündigen Nachinkubation wird im basalen Medium unterhalb der Zellkulturinsets die Konzentration an Laktat-Dehydrogenase mittels des in Kapitel 6.12, beschriebenen Tests bestimmt. Eine größere Schädigung der Zellmembran oder eine erhöhte Anzahl zerstörter Zellen resultiert in einem erhöhten Messwert bei der Bestimmung der optischen Dichte (490 nm).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die in Abbildung 4-50 und Abbildung 4-51 dargestellten Daten in Prozent zur Lyse, der maximal möglichen LDH-Freisetzung, angegeben. Ein Wert von 100% entspricht somit einer vollständigen Schädigung oder Zerstörung aller Zellen eines Zellkulturinsets.

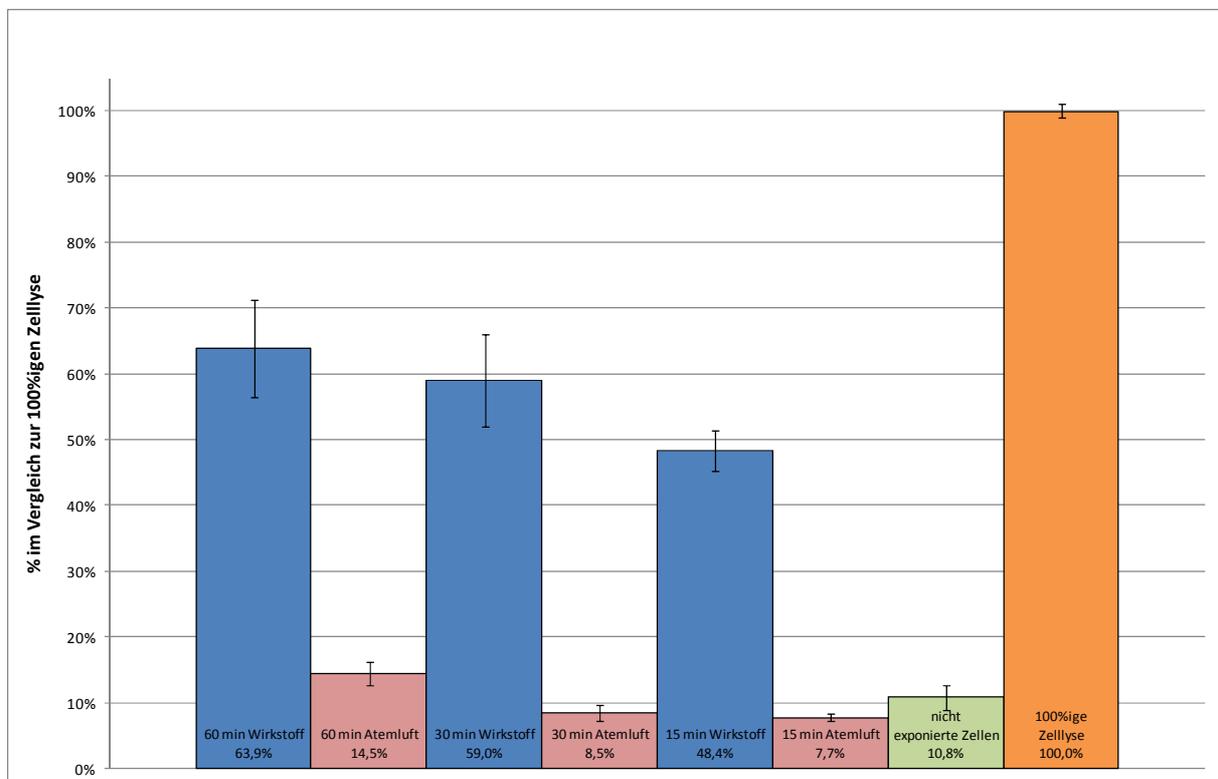


Abbildung 4-50: Freisetzung von Laktat - Dehydrogenase (LDH) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Expositionen mit Bariumsulfat (blau) und Atemluft (rot) und im Vergleich zur Lyse und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die LDH-Konzentration der Lyse dient als Anhaltspunkt für die maximale Freisetzung von Laktat - Dehydrogenase und wurde für die Darstellung als 100% angenommen.

Die Daten der Expositionen mit Bariumsulfat (drei unabhängige Experimente) belegen eine deutlich verstärkte Freisetzung an LDH im Vergleich zu den mit Atemluft exponierten Zellen. Über die Zeit gesehen, ist darüber hinaus eine leichte Abstufung von der 60minütigen (64%), über die 30minütige (59%) bis hin zur 15minütigen Exposition (49%) zu erkennen. Eine

deutlich erkennbare Schädigung durch die Atemluft im Vergleich zu den nicht exponierten Zellen liegt nicht vor.

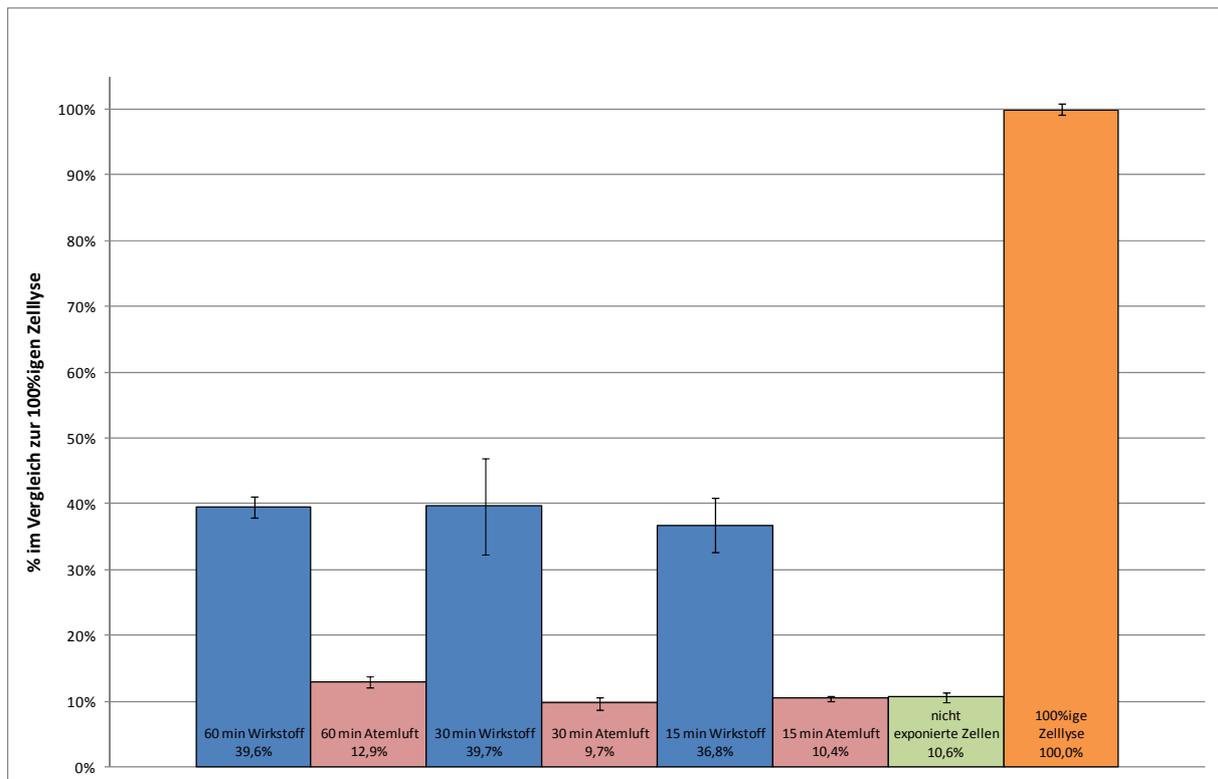


Abbildung 4-51: Freisetzung von Laktat - Dehydrogenase (LDH) der eingesetzten Zellen nach unterschiedlich langen Expositionen mit Kupfer(II)oxid (blau) und Atemluft (rot) und im Vergleich zur Lyse und zu nicht exponierten Zellen (grün). Die LDH-Konzentration der Lyse dient als Anhaltspunkt für die maximale Freisetzung von Laktat - Dehydrogenase und wurde für die Darstellung als 100% angenommen.

Die Konzentration an Laktat-Dehydrogenase im basalen Medium der mit Kupfer(II)oxid exponierten Zellen weist nach der 24stündigen Nachinkubation einen deutlichen Anstieg im Vergleich zur Atemluft und zu den nicht exponierten Zellen auf. Die Schädigung liegt im Vergleich zu Bariumsulfat deutlich niedriger (etwa 40% der Lyse) und es erfolgt kein erkennbarer Anstieg über die drei Expositionszeiten.

Auch bei den Expositionen mit Kupfer(II)oxid ist keine erkennbare Schädigung durch die Atemluft im Vergleich zu den nicht exponierten Zellen erkennbar.

Die mit Hilfe des *CytoTox 96*[®] Assay gewonnen Daten zeigen im Vergleich zum *Cell Proliferation Assay* WST-1 einen erkennbaren Unterschied in der toxikologischen Wirkung der beiden Testsubstanzen auf. Die Ergebnisse des LDH Tests weisen dabei ähnlich stabile und gut reproduzierbare Daten auf wie bereits der WST-1. Diese Tatsache unterstützt die

Aussage, dass das entwickelte System eine stabile Methode zur Direktexposition von Zellen an der Luftflüssigkeitsgrenzschicht darstellt.

Die erkennbare Abstufung zwischen der toxischen Wirkung von Kupfer(II)oxid und Bariumsulfat im LDH im Gegensatz zu den WST-1 Daten, lässt darauf schließen, dass die Untersuchung nur eines Endpunktes für die Charakterisierung des toxischen Potentials einer Substanz unzureichend ist. Vielmehr muss eine Kombination von mehreren Endpunkten zur Erstellung eines Gesamtbildes in Betracht gezogen werden. Bei der Testung der restlichen Substanzen wurde nachgewiesen, dass Bestandteile des Assays mit den Substanzen reagieren. In Folge dessen zeigte sich nach dem LDH Test mit Laktose Monohydrat eine vollständige Entfärbung des Testansatzes.

Da sowohl der *Cell Proliferation Assay* als auch der *CytoTox 96[®] Assay* als reine akut-toxische Endpunkte nur ein Ja oder Nein-Ergebnis liefern, soll in einem weiteren Expositionsdurchgang eine Methode eingesetzt werden, die bereits frühe Anzeichen einer Schädigung der Zellen aufzeigen kann.

4.12.8. Aktin- Immunfluoreszenzfärbung (Phalloidin)

Ein sensitiverer Sensor für Schadstoffwirkungen ist das Zytoskelett mit seinen verschiedenen Komponenten (Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten). Durch Färbung der Aktinfilamente und anschließender Fluoreszenzmikroskopie soll speziell diese Struktur des Zytoskeletts näher untersucht werden. Die Tatsache, dass der Laktat-Dehydrogenase Test mit basalem Medium aus den 6-Well Zellkulturplatten durchgeführt wird, ermöglicht die weitere Verwendung der Zellen aus einem einzigen Expositionsdurchgang in einer Immunfluoreszenzfärbung. Die ausgeschnittenen Membranen werden zu diesem Zweck mit fluoreszenzmarkiertem (FITC) Phalloidin inkubiert und unter Ausschluss von Licht mikroskopiert. Das aus der Gruppe der Phallotoxine stammende Phalloidin bindet während des Inkubationsschrittes an das Aktin der Zellen und ermöglicht so die Betrachtung der Strukturen mittels eines Fluoreszenzmikroskops.

Die mit den Substanzen Kupfer(II)oxid und Bariumsulfat exponierten Zellen werden nach der 24stündigen Nachinkubation an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht gefärbt (Anhang 6.13) und ausgewertet. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 4-52 im Vergleich zu den mit Atemluft exponierten Zellen und zu nicht exponierten Zellen dargestellt.

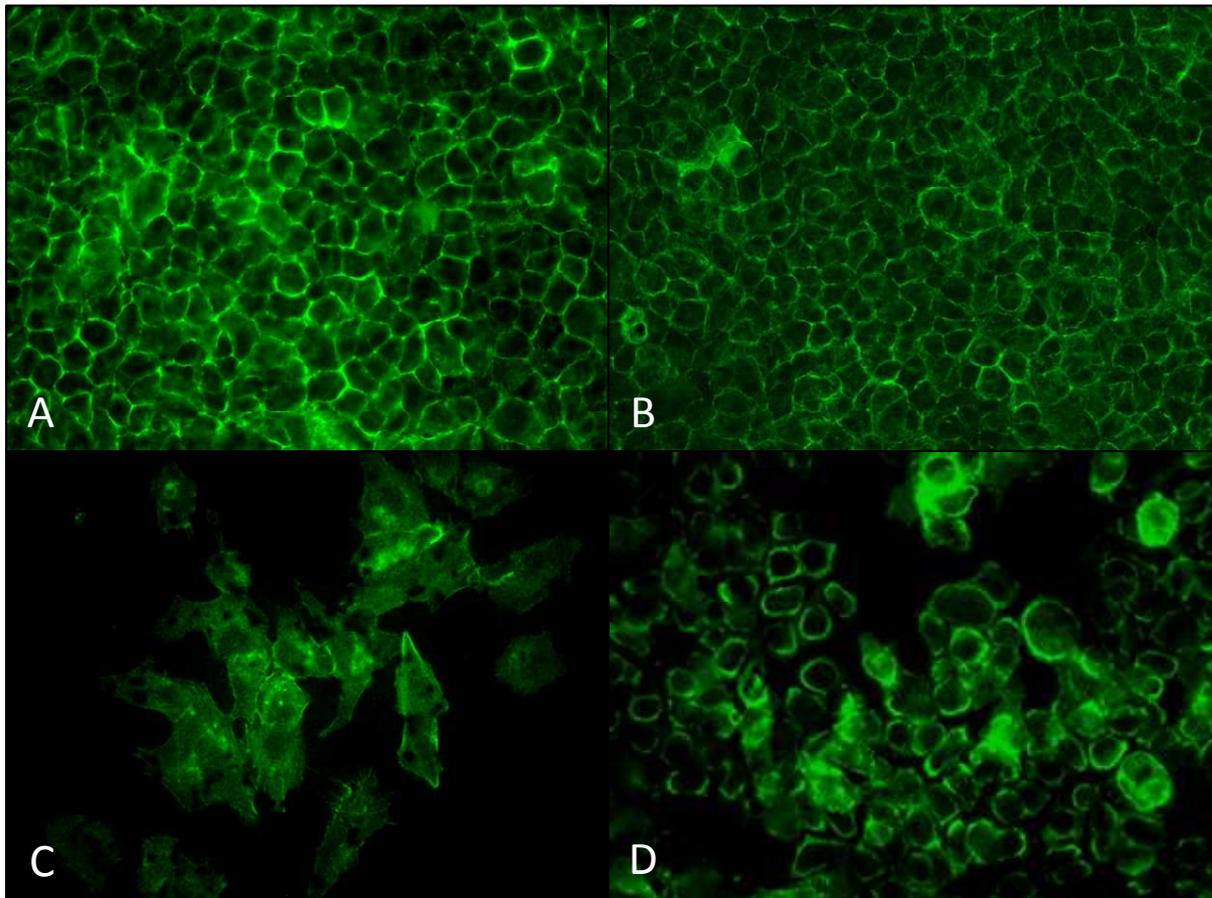


Abbildung 4-52: Mikroskopische Aufnahme der gefärbten Aktinfilamentstruktur von exponierten A549-Zellen im Vergleich zur Atemluft- und zu nicht exponierten Zellen (400fache Vergrößerung). A) nicht exponierte Zellen, B) Atemluft, C) Kupfer(II)oxid, D) Bariumsulfat.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Präparate belegen deutliche Unterschiede in der Aktinstruktur der mit den Substanzen exponierten Zellen. Die nicht exponierten Zellen sowie die mit Atemluft exponierten Zellen weisen eine einheitliche Zellanordnung mit einer deutlichen Abgrenzung der Zellen auf. Die Aktinfilamentstruktur der Zellen ist in diesem Bereich deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zu den nicht mit Substanz behandelten Zellen besitzen nach der Exposition mit Bariumsulfat nur noch wenige Zellen diese Struktur. Ein Großteil, der jetzt überwiegend einzeln vorliegenden Zellen, hat die gleichmäßige Aktinfilamentstruktur und somit auch die einheitliche Zellstruktur verloren. Eine Reihe der mit Bariumsulfat exponierten Zellen weist darüber hinaus eine stark veränderte Form mit deutlich angefärbten Pseudopodien auf. Die deutlichsten Veränderungen zeigen die Zellen nach der Exposition mit Kupfer(II)oxid. Die Anzahl der Zellen sowie auch die Aktinkonzentration im Zellwandbereich sind im Vergleich zu den mit Atemluft exponierten bzw. nicht exponierten Zellen deutlich reduziert. Die wenigen angefärbten

Aktinfilamentstrukturen sind ungleichmäßig über die Zelle verteilt und haben die normale Struktur der nicht mit Substanz exponierten Zellen verloren. Auch nach der Exposition mit Kupfer(II)oxid zeigen die Zellen deutlich Pseudopodien. Diese sind im Vergleich zu den mit Bariumsulfat exponierten Zellen jedoch deutlich weniger gefärbt.

Fazit

Die Ergebnisse aller drei Analysemethoden (Cell Proliferation Assay, Laktat-Dehydrogenase-Assay und Aktin-Immunfluoreszenzfärbung) belegen, dass das gesamte System reproduzierbare Ergebnisse liefern kann. Die Daten des LDH- und des Aktin-Immunfluoreszenz Tests bestätigen die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung mittels WST-1 Tests und ergänzen diese um wichtige Informationen über die unterschiedliche Wirkungsweise der Substanzen. Darüber hinaus veranschaulichen die gewonnenen Daten welches Potential in der Methode steckt und wo die Schwachstellen liegen. Die starke Abhängigkeit von den Charakteristika des Aerosols erfordert eine genauere Untersuchung der Eigenschaften der Partikel und den Einfluss der physikalischen Gesetze auf die Effizienz der Abscheidung.

4.13. Erweiterungen am Cultex[®] RFS

In Ergänzung zu den zuvor beschriebenen Umbauten am Cultex[®] RFS wird eine Reihe von zusätzlichen Erweiterungen in Form von Peripheriegeräten mit speziellen Anforderungen entwickelt. Diese dienen der Anpassung an zusätzliche Einsatzgebiete und der besseren Überwachung während der Exposition. Insbesondere die Generierung und Abscheidung von Partikeln im Submikrometerbereich steht im Vordergrund bei den geplanten Erweiterungen.

4.13.1. Einsatz eines Impaktors zur Eingrenzung der Partikelgröße

Die Inhomogenität der generierten Aerosole hinsichtlich der Partikelgröße führen zur Entwicklung eines mehrstufigen Impaktors. Dies soll eine Selektion großer Partikel ermöglichen, die auf Grund ihrer großen Masse durch Sedimentation abgeschieden werden

und deren Eintrag an Masse, die Masse der Partikel im Bereich unter einem Mikrometer überlagern. Der Einsatz eines mehrstufigen Impaktors soll deshalb die Zuleitung eines Aerosols ohne Agglomerate und größere Partikel gewährleisten. Die Selektion der Partikel erfolgt dabei durch hohe Beschleunigung der Partikel mittels einer Düse und anschließender Abscheidung auf Grund von Sedimentation auf Prallplatten. Durch die Auswahl der Düsengröße (10 / 5 / 1 / 1 μm) soll die Partikelanzahl im Bereich über 1 μm deutlich reduziert werden.

Der dargestellte Impaktor (Abbildung 4-53) besitzt eine feste obere Trenngröße, die Partikel mit einer Größe von 10 μm und größer selektiert. Die weiteren Stufen lassen sich durch die Aneinanderreihung verschiedener Prallplatten variieren.

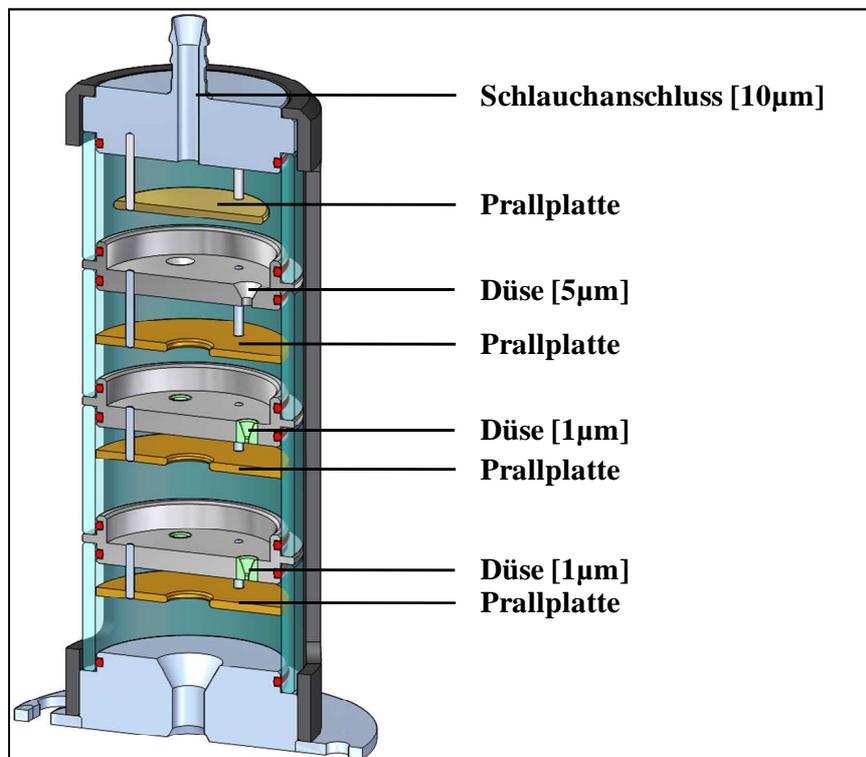


Abbildung 4-53: Mehrstufiger Impaktor. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH)

Expositionen zur Überprüfung der Effizienz des neuen Impaktors mit vier Trennstufen bei 10 / 5 / 1 / 1 μm zeigen eine deutliche Verschiebung in der Anzahl- und Massenverteilung der Partikel (Abbildung 4-54). Die Expositionen wurden mit Quarz bei 800 Umdrehungen und einem Vorschub von 3,89 mm/Std. durchgeführt.

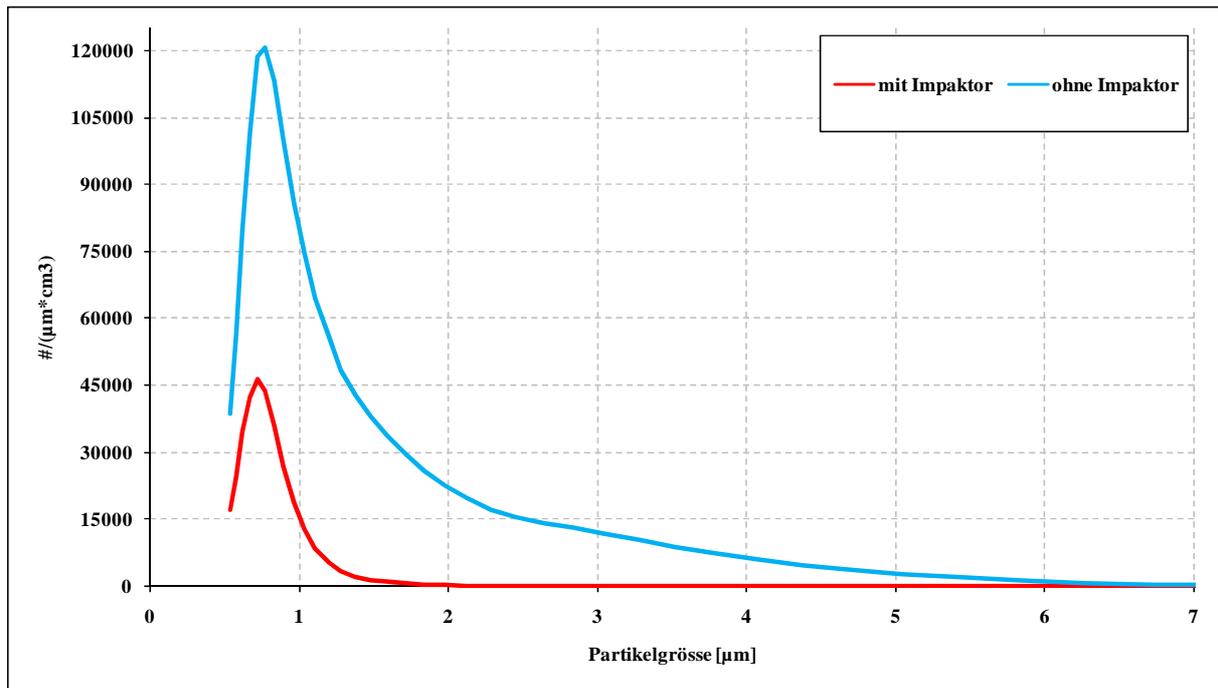


Abbildung 4-54: Aus der APS-Messung berechnete Partikelgrößen mit (rot) und ohne (blau) vorgeschalteten Impaktor.

Die APS-Messungen mit Impaktor zeigen eine deutliche Abnahme der Partikelanzahl im gesamten Messbereich. Die Anzahl der Partikel über 1 μm ist dabei wie erwartet deutlich gesenkt worden. Die sehr niedrig gewählten Trennstufen, mit zwei 1 μm Düsen sollten die Partikelanzahl in diesem Bereich auf etwa ein Viertel reduzieren. Bei einer Ausgangspartikelanzahl von 75.000 konnte dieser Wert mit resultierenden 15.000 Partikeln sogar übertroffen werden. Eine Tatsache, die mit hoher Wahrscheinlichkeit aus Verlusten in den zwei vorangegangenen Trennstufen resultiert.

Die Daten belegen, dass der Impaktor in dieser Bauform gut geeignet ist, die Partikelanzahl im Bereich der 100%igen Abscheidung durch Sedimentation zu reduzieren. So ergibt sich die Möglichkeit, die toxische Wirkung von Partikeln unter einem Mikrometer gesondert zu betrachten. Die Reduzierung der Anzahl an größeren Partikeln führt parallel zu einem deutlichen Absinken der abgeschiedenen Partikel durch Sedimentation. Zur Erhöhung der Abscheideeffizienz, insbesondere bei den Partikeln im Größenbereich unter 700 nm, wird in das RFS eine auf einem elektrischen Feld basierende, gerichtete Abscheidung integriert. Der Aufbau und die Funktion dieser elektrostatischen Abscheidung sind im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

4.13.2. Einsatz einer elektrostatischen Abscheidung

Aerosole mit einer geringen Partikelanzahl oder Partikeln deutlich unter $1\ \mu\text{m}$ weisen eine sehr niedrige Abscheideeffizienz auf Grund von Sedimentation auf. Dies hat einen erheblichen negativen Einfluss auf die Länge der Expositionszeit, die dementsprechend verlängert werden muss. Partikel, bei denen die Sedimentation keinen Einfluss hat, können nur begrenzt oder gar nicht abgeschieden werden. Eine deutliche Erhöhung der Abscheideeffizienz wird in diesem Fall nur durch einen äußeren Einfluss erreicht. Eine Methode zur Verstärkung der Abscheideeffizienz bildet der Einsatz einer elektrostatischen Abscheidung, bei der die Partikel auf Grund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld abgeschieden werden.

Das Anlegen einer Spannung im Nährmedium unterhalb der Membran des Zellkulturinsets führt zur Ausbildung eines elektrischen Feldes im Bereich zwischen Membran und Aerosoldüse. Geladene Partikel, welche dieses elektrische Feld passieren, werden je nach Ladungszustand angezogen oder abgestoßen (Abbildung 4-55).

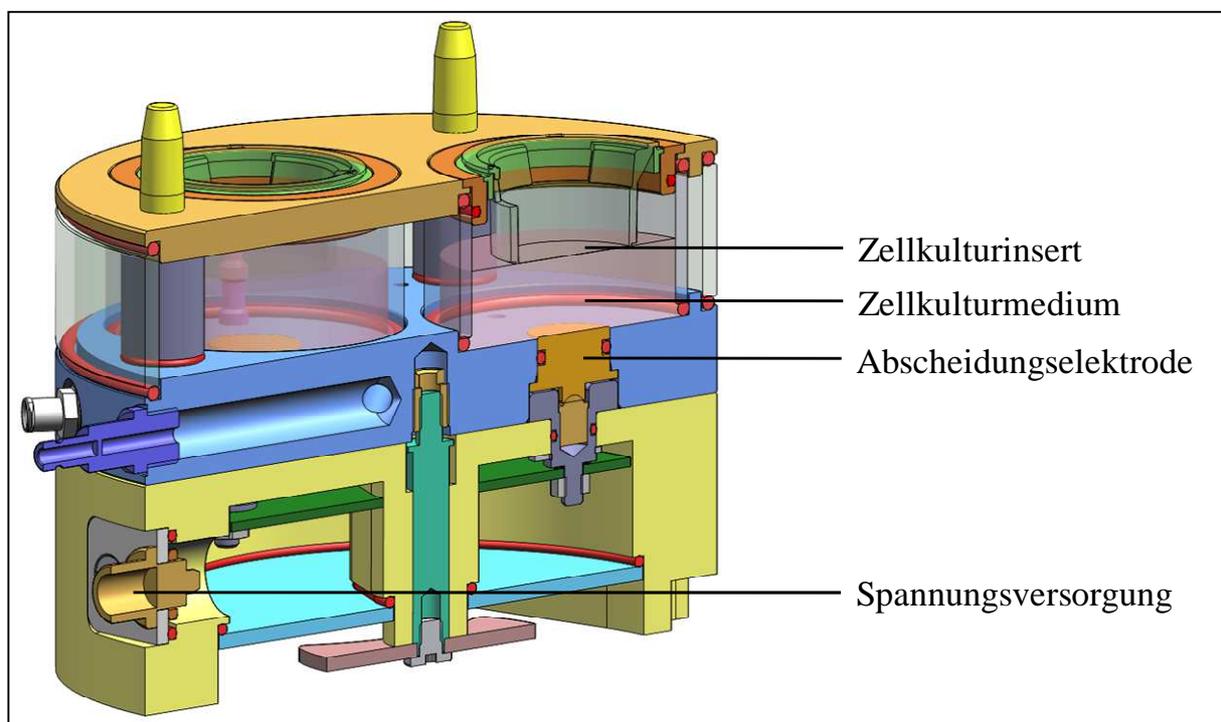


Abbildung 4-55: Aufbau der elektrostatischen Abscheidung unterhalb der Membran des Zellkulturinsets im Cultex[®] RFS Modul. (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).

Für eine optimale Ausnutzung der gerichteten Abscheidung muss der Ladungszustand der Partikel vor dem Eintritt in die Kammer für alle Partikel gleich sein. Zu diesem Zweck wird ein spezieller Auflader auf das Cultex[®] RFS aufgesetzt, durch welchen das Aerosol geleitet wird. Eine an drei goldbeschichteten Wolframkoronadrähten angelegte Hochspannung führt im Inneren des Aufladers zur Ionisierung der Luft und somit zur Bildung von negativen Luftionen. Diese Luftionen werden von einer goldbeschichteten Elektrode (-18 V) angezogen und passieren dabei den Aerosolstrom mit den eingeleiteten Partikeln (Abbildung 4-56). Durch das Aufeinandertreffen der vorbeifliegenden Partikel mit den negativen Luftionen werden diese aufgeladen. Überschüssige Ionen, die keine Partikel treffen, gelangen auf die rückseitige Elektrode und ermöglichen eine Regelung des Ionisationsprozesses an Koronadrähten wodurch konstante Aufladeverhältnisse gewährleistet werden können.

Da Koronaentladungen ein starkes elektrisches Feld erzeugen, welches nach der Aufladung gleich wieder zur sofortigen Abscheidung der gerade geladenen Partikel führen würde, ist der Bereich der Koronaentladung vom Aerosolkanal durch ein Gitter getrennt.

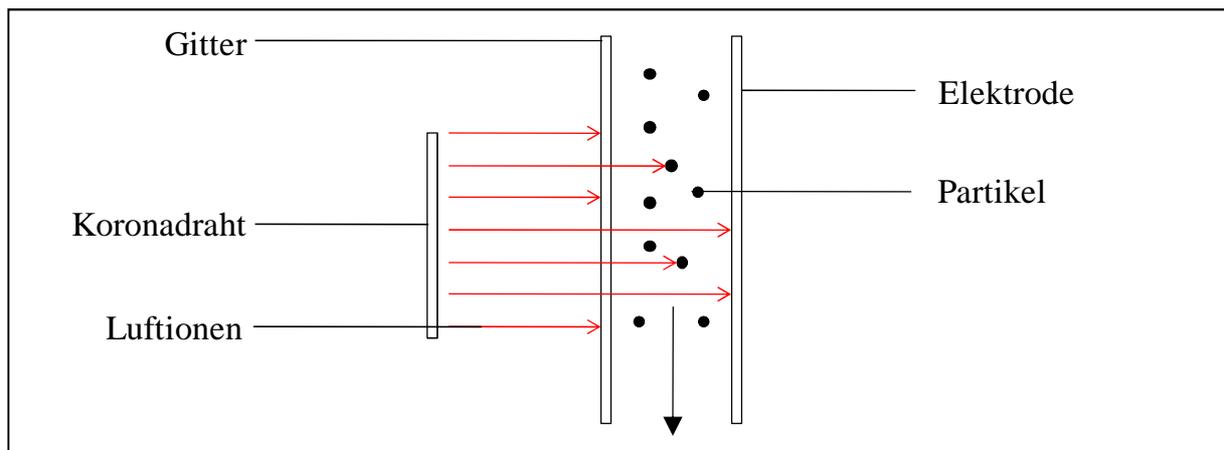


Abbildung 4-56: Skizze des Aufladungsprozesses im Auflader. Die relevanten Luftionen sind schematisch durch rote Pfeile dargestellt.

Die in Abbildung 4-33 (Kapitel 4.7) dargestellte Effizienz für die Abscheidung durch Diffusion und Sedimentation soll im Folgenden durch die Abscheideeffizienz mittels eines elektrischen Feldes ergänzt werden. Die Berechnung der Abscheidung erfolgt vergleichbar zur Berechnung der Abscheidung durch Sedimentation. Das Gewicht der Partikel wird dabei durch die elektrische Kraft ersetzt, welches sich als Produkt aus der elektrischen Ladung der Partikel $[e]$ und der elektrischen Feldstärke $[E]$ ergibt.

Die elektrische Ladung der Partikel [e] errechnet sich als Produkt aus der Kapazität [Kap] und der Spannung [U].

Formel 18: Berechnung der elektrischen Ladung der Partikel

$$\mathbf{e = Kap * U}$$

e	=	elektrische Ladung
Kap	=	Kapazität
U	=	Spannung

Zur Berechnung der Kapazität wird in einem vereinfachten Modell angenommen, dass alle Partikel die Form einer Kugel besitzen. Die Formel für die Berechnung der Kapazität eines Kugelkondensators ist wie folgt:

Formel 19: Berechnung der Kapazität eines Kugelkondensators

$$\mathbf{Kap = 2 * \pi * \epsilon_0 * d}$$

Kap	=	Kapazität
π	=	Pi [3,1416]
ϵ_0	=	dielektrische Feldkonstante von Vakuum
d	=	Durchmesser

Die Geschwindigkeit [v_{el}] mit der sich die Partikel auf Grund der elektrischen Kraft bewegen ergibt sich aus dem Produkt der Mobilität [B], der elektrischen Ladung [e] und der elektrischen Feldstärke [E].

Formel 20: Berechnung der Geschwindigkeit der Partikel

$$\mathbf{v_{el} = B * e * E}$$

v_{el}	=	Geschwindigkeit
B	=	Mobilität
e	=	elektrische Ladung
E	=	elektrischen Feldstärke

Die mit dieser Geschwindigkeit in der Zeit [t] zurückgelegte Distanz [s_{el}] ermöglicht im Vergleich zur Höhe [h] die Bewertung ob ein Partikel abgeschieden wird [s_{el} > h] oder nicht [s_{el} < h]. Die zur Berechnung der Distanz benötigte Formel ergibt sich dabei wie folgt:

Formel 21: Berechnung der zurückgelegten Distanz

$$s_{el} = v_{el} * t$$

- s_{el} = Distanz
- v_{el} = Geschwindigkeit
- t = Zeit

Für die Berechnung der Abscheideeffizienz wurden die Werte für die elektrische Ladung, die elektrische Spannung, die elektrische Feldstärke und der Durchmesser wie folgt angenommen:

- Elektrische Ladung: = 1,6*10⁻¹⁹ Coulomb (minimale elektrische Ladung)
- Elektrische Spannung: = 0,05 V
- Elektrische Feldstärke: = 40 kV/m (entspricht 100 V für 2,5 mm)
- Durchmesser: = Tabelle 4-13

Tabelle 4-13: Effizienz der Abscheidung in Abhängigkeit vom Durchmesser der Partikel im Vergleich zu Effizienz für die Abscheidung durch Diffusion und Sedimentation.

Durchmesser der Partikel [µm]	Effizienz der Abscheidung durch elektrische Kräfte	Effizienz der Abscheidung durch Diffusion	Effizienz der Abscheidung durch Sedimentation
0,01	0,173	0,162	0,000
0,02	0,347	0,082	0,000
0,05	0,867	0,034	0,000
0,1	1,000	0,018	0,001
0,2	1,000	0,011	0,002
0,5	0,825	0,006	0,010
1	0,722	0,004	0,033
2	0,670	0,003	0,124
5	0,639	0,002	0,740
10	0,629	0,001	1000

publiziert durch Aufderheide *et al.*, 2011 (Aufderheide, Scheffler *et al.* 2011)

Die Ergebnisse in Tabelle 4-13 zeigen eine deutliche Steigerung der Effizienz der Abscheidung durch den Einfluss der elektrischen Kräfte, insbesondere im Bereich zwischen 0,05 und 0,5 μm . In der nachstehenden Abbildung ist die Effizienz der Abscheidung durch die elektrischen Kräfte als Ergänzung zur Abscheideeffizienz durch Diffusion und Sedimentation (Abbildung 4-33) dargestellt.

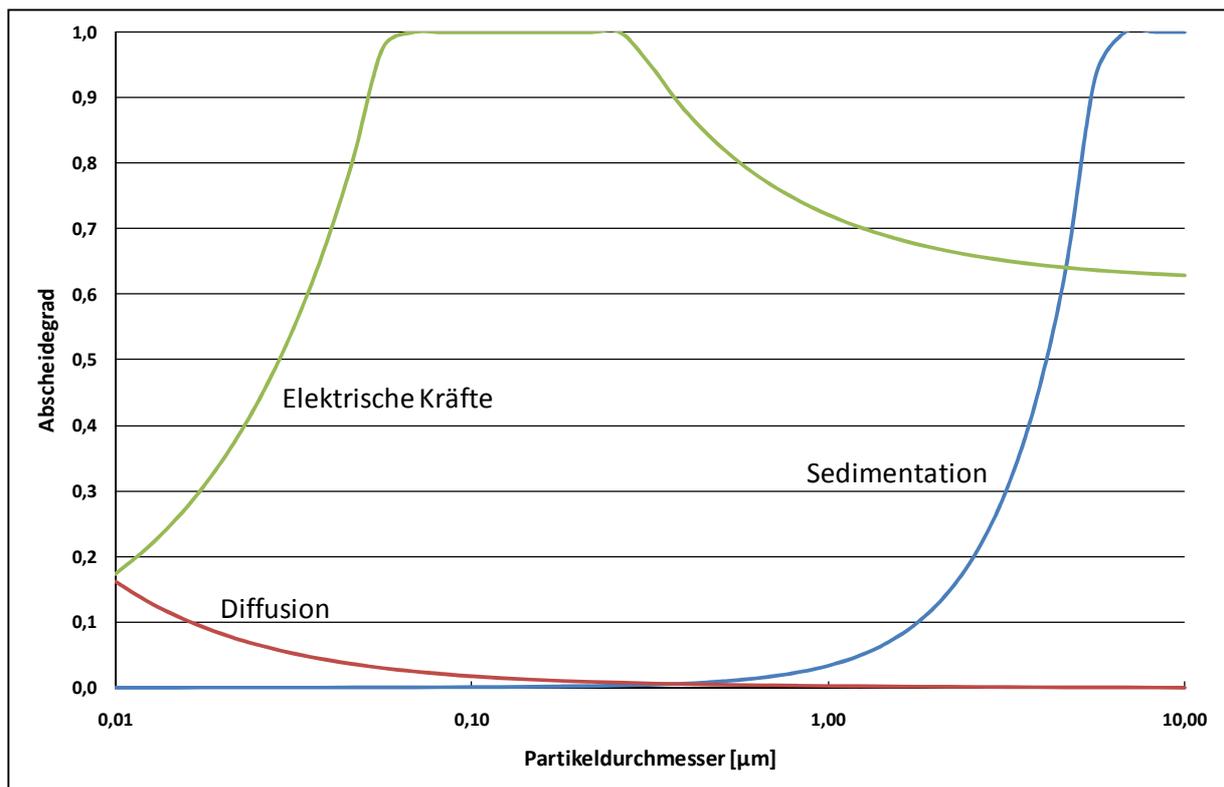


Abbildung 4-57: Abscheideeffizienz von Partikeln durch Einfluss der Sedimentation (blau), der Diffusion (rot) und der elektrischen Kräfte in Abhängigkeit vom Durchmesser der Partikel.

Mit dem *Laser Aerosol Spectrometer* (TSI Incorporated) kann durch Messung hinter der Kammer die Partikelanzahl bestimmt werden. Die Messung ohne bzw. mit elektrischem Feld und unterschiedlichen Feldstärken ermöglicht eine schnelle Aussage über die Verbesserung der Abscheideeffizienz. Die folgenden Abscheideexperimente wurden mit Pural 200[®] ohne vorgeschalteten Auflader unter standardmäßigen Expositionsbedingungen durchgeführt. Die Partikelzahlen bei einer 1minütigen Messung mit 0, 100, 300, 500, 700 und 900 V Spannung an der Abscheideelektrode sind in Abbildung 4-58 dargestellt.

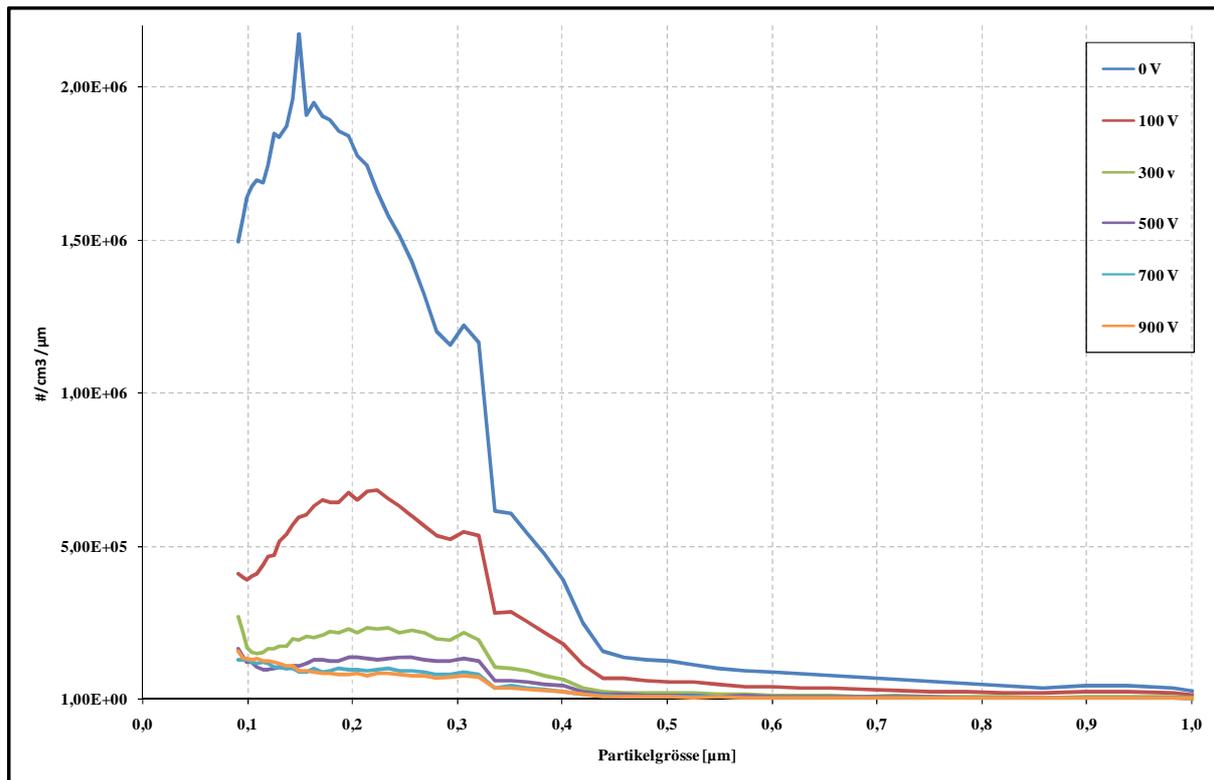


Abbildung 4-58: Mit dem *Laser Aerosol Spektrometer* bestimmte Partikelanzahl hinter einer Kammer des Cultex[®] RFS mit unterschiedlichen Feldstärken [0V, 100V, 300V, 500V, 700V, 900V]. Die Anzahl [$\#/\text{cm}^3/\mu\text{m}$] ist gegen die Partikelgröße [μm] aufgetragen.

Die in Abbildung 4-58 abgebildeten Daten belegen, dass bei steigender Spannung weniger Partikel die Kammer des Cultex[®] RFS verlassen. Insbesondere bei Partikeln, die nicht durch Sedimentation oder Diffusion abgeschieden werden, zeigt sich eine deutliche Abnahme der Anzahl hinter der Kammer. Betrachtet man z.B. die Partikel mit einer Größe von etwa 180 nm so sinkt die Partikelanzahl bei 100 V auf etwa ein Drittel und bei 300 V auf ein Zehntel des Ausgangswertes (0 V).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Abscheidung von Partikeln unter 500 nm durch ein elektrisches Feld unterhalb der Membran deutlich verbessern lässt. Die getestete Erweiterung des Cultex[®] RFS kann die Effizienz der Abscheidung also maßgeblich verbessern und ermöglicht zudem die Abscheidung von Partikeln, welche auf Grund von Diffusion und Sedimentation nicht abgeschieden werden können.

Die abschließend durchgeführten Expositionen von A549-Zellen mit Atemluft haben, unabhängig davon ob das elektrische Feld ein- oder ausgeschaltet war, keine Veränderung der Vitalität aufgewiesen.

4.13.3. Einsatz von Temperatur- und Feuchte-Sensoren

Die Eigenschaften der zugeleiteten Druckluft, wie z.B. die Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit, haben einen entscheidenden Einfluss auf die Vitalität der exponierten Zellen. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Exposition mit Kompressor- und Flaschenluft führten zur Einführung einer zusätzlichen Überwachung mittels spezieller Temperatur- und Feuchte-Sensoren (SHT75 / Sensirion AG). Die RH&T-Fühler werden hierzu in eine eigens dafür konstruierte Halterung eingesetzt, die sich seitlich in die Anbaugruppen einschieben lässt (Abbildung 4-59). Die Messfühler der einzelnen Sensoren befinden sich somit direkt im Aerosolweg zwischen dem Einlassadapter, der Expositionskammer und der Absaugung. Die aktuelle Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit können während der Exposition über ein, mit einem Kabel verbundenen, externes Messgerät aufgezeichnet oder abgelesen werden. Ein vierter Sensor kann bei Bedarf für einzelne Messungen in der Zuleitung für die Atemluft oder im Mischgefäß platziert werden.

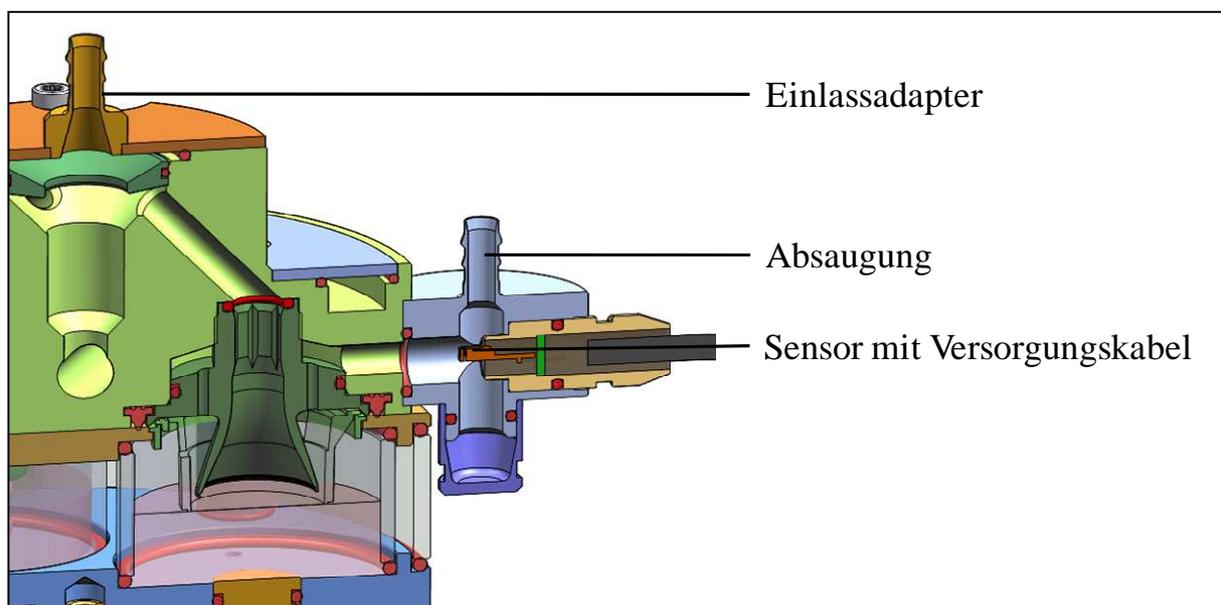


Abbildung 4-59: Aerosolführungsmodul mit eingebauten Temperatur- und Feuchte-Sensoren (Zeichnung: Halter Engineering GmbH).

Die während einer Einlaufphase und einer 150minütigen Exposition im Modul mit Atemluft gemessenen Werte für die rel. Luftfeuchtigkeit (rH%) und die Temperatur (°C) sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4-14: Temperatur und relative Luftfeuchte während einer 150minütigen Exposition

Zeitpunkt der Messung [min]	Kammer 1		Kammer 2		Kammer 3	
	rH%	°C	rH%	°C	rH%	°C
Start / Einlaufphase	83,38	24,32	83,86	24,24	83,84	24,56
30	97,44	34,44	97,62	34,24	97,37	34,38
60	96,82	34,60	97,55	34,20	97,03	34,52
90	97,88	34,52	97,99	34,28	97,10	34,64
120	98,00	34,36	98,14	34,40	98,04	34,56
150	98,12	34,72	97,57	34,56	98,06	34,60

Die Resultate der Messungen belegen wie beständig das gesamte System und insbesondere die Durchspülung mit erwärmtem Wasser arbeiten. Bereits nach einer kurzen Einlaufphase von 30 min liegt am Ausgang aller drei Kammern eine relative Luftfeuchtigkeit von ~97% vor. Einer möglichen Abkühlung durch die Verdunstung wird durch die ständige Zufuhr von Warmwasser entgegen gewirkt. Die Luftfeuchtigkeit in Aerosolstrom bleibt somit über eine Expositionszeit von 150 min ebenso stabil wie die Temperatur des Nährmediums unter der Membran der Zellkulturinsert (~37°C). Der exakt eingestellte Mediumspiegel hat dabei eine ebenso entscheidende Bedeutung für das empfindliche Mikroklima wie auch die Temperatur und die Luftfeuchte der eingesetzten Druckluft.

Fazit

Die im Abschnitt 4.13 dargestellten Erweiterungen erweisen sich als sinnvolle Ergänzungen zum standardmäßigen Expositionseinsatz des Cultex[®] Radial Flow Systems. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Aerosole und die hohe Sensitivität der Zellen in Kombination mit der Empfindlichkeit des gesamten Systems machen den Einsatz spezifischer erweiternder Gerätschaften unumgänglich. Diese müssen allerdings so an das bestehende System adaptiert werden, dass der normale Expositionsablauf im Cultex[®] RFS davon nicht beeinflusst wird. Zur Durchführung einer reproduzierbaren Exposition müssen insbesondere die Stabilität und die Vergleichbarkeit der eingesetzten Endpunkte gewährleistet bleiben.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der Arbeiten war die Weiterentwicklung und Etablierung eines Systems zur Untersuchung und Einstufung der toxischen Wirkung von Partikeln verschiedener Feststoffaerosole auf Zellen des menschlichen Respirationstraktes. Die Basis für die dargestellten Entwicklungen bildete dabei das Cultex[®] Glasmodul (Cultex Laboratories GmbH), ein gut beschriebenes und für viele Fragestellungen im Bereich der Inhalationstoxikologie etabliertes System.

Auf Grundlage der Glasmodule, welche für die Exposition mit Zigarettenrauch und Gasen entwickelt wurden, erfolgte die Weiterentwicklung zum Cultex[®] Radial Flow System (Cultex[®] RFS). Die wichtigsten Neuerungen dieses modularen Systems bildeten die veränderte Verteilung durch ein radiäres Zuleitungssystem zu den Kammern und die Verbesserung der Mediumversorgung. Diese Neuerungen dienten der Optimierung der Deposition der Partikel auf den Membranen und der Stabilisierung der darin kultivierten Zellen während der Exposition.

Das aus drei Modulen bestehende System wurde im Rahmen der Arbeit ausführlich beschrieben und auf Grund von neu gewonnenen Erkenntnissen weiter optimiert. Das Aerosolführungsmodul dient der Verteilung des eintretenden Aerosols in die Kammern des Probenaufnahmemoduls, welches die Zellkulturinserts mit den Zellen enthält. Die Versorgung der für die Exposition eingesetzten A549-Zellen mit Nährmedium erfolgte über ein neues Zuleitungs- und Absaugungssystem im unteren Teil des Probenaufnahmemoduls. Spezielle Absaugröhrchen zur präzisen Einstellung des Nährmediumspiegels unter den Membranen der Zellkulturinserts bilden den Kernpunkt dieses Versorgungssystems.

Diese beiden Module (Aerosolführungsmodul und Probenaufnahmemodul) sind auf einer stabilen Hebevorrichtung fixiert, die ein einfaches und sicheres Verschließen der Module mittels eines Handrads ermöglicht. Die maschinelle Fertigung der einzelnen Bauteile im Vergleich zu den handgefertigten Cultex[®] Glasmodulen trägt zusätzlich zur Optimierung der Funktion des Expositionssystems bei.

Neben der Optimierung des Expositionssystems wurde ein neuer Aerosolgenerator (Cultex[®] DG - *Dust Generator*) basierend auf dem 1950 von Wright entwickelten *Dust Feeder* gebaut. Das computergestützte Generationssystem ermöglicht die Exposition mit einer definierten Masse der Testsubstanz durch die Einstellung des Vorschubs (mm) und der Umdrehungsanzahl (U) pro Stunde auch bei mehrstündigen Expositionen. Ein Neues, in dem

Aerosolgenerator integriertes Selektionsgefäß (Elutriator), sollte eine konstante Partikelgrößen- und Partikelmassenverteilung gewährleisten und so die Verteilung auf die Kammern durch ein definierteres Aerosol zusätzlich verbessern.

Die Ergebnisse der ersten, mit dem radiären Cultex[®] RFS durchgeführten Abscheidungen zeigten eine sichtbare Verbesserung der Partikelverteilung im Vergleich zu den linearen Cultex[®] Glasmodulen. Allerdings wiesen die Verteilung auf die Kammern und die Deposition auf den Membranen immer noch deutlichere Streuungen auf, als theoretisch angenommen.

Die Simulation der Flugbahn der generierten Partikel vom Aerosolgenerator bis in das System mit Hilfe von CFD-Analysen zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Verteilung und der Abscheidung von laminaren Strömungen. Insbesondere die im Zuleitungsschlauch vom Elutriator zum Modul verlaufenden Strömungslinien wirkten sich negativ auf die Abscheidung der Partikel aus. Zur Beseitigung dieser undefinierten Bedingungen, durch ein Aufbrechen der Strömungslinien, wurde eine Düse in den zentralen Kanal des Einlassadapters eingebaut und die Expositionen wiederholt. Die Wiederholung der vorangegangenen Versuche ergab eine signifikante Verbesserung der Abscheidung in Abhängigkeit von der Position und der Größe der Düsenöffnung.

Auf Grundlage der aus den Experimenten gewonnenen Resultate und Informationen erfolgte die Festlegung auf einen Standardaufbau und die Erstellung von Standardarbeitsanweisungen. Diese Arbeitsanweisungen wurden darüber hinaus innerhalb einer Prävalidierungsstudie zur Prüfung der Effizienz dieser Direktexpositionsmethode eingesetzt (Projektnummer: 0315710, Bundesministerium für Bildung und Forschung). Die Durchführung der Expositionen mit den einzelnen Substanzen erfolgte somit unter klar definierten Bedingungen zur Gewährleistung einer stabilen Ergebnislage.

Bei den ersten Expositionen mit Druckluft aus dem Kompressor zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Zellvitalität. Die Ergebnisse dieser Experimente führten zu einer genaueren Untersuchung eines möglichen Einflusses der Druckluft auf die Zellen. Basierend auf den Ergebnissen von theoretischen Berechnungen der relativen Luftfeuchtigkeit an der Oberfläche der Membranen konnten diese als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Daten, die darüber hinaus im Rahmen des erwähnten BMBF-Projektes gewonnen wurden, verstärkten die Hinweise, dass Verunreinigungen der Luft die Expositionen negativ beeinflussen können. Auf Grund der Tatsache, dass die Probleme nicht abschließend geklärt werden konnten erfolgte für alle weiteren Expositionen die Umstellung der Luftversorgung auf Atemluft (DIN 12021) aus Flaschen.

Bei der, im Anschluss durchgeführten Testungen der verschiedenen Substanzen zeigte sich, dass die Umstellung die Stabilität der Ergebnisse des Cell Proliferation-Assay deutlich verbesserten. Darüber hinaus belegten die Daten eine Reproduzierbarkeit hinsichtlich der dosisabhängigen Beeinflussung der Vitalität der Zellen. Die geringste Schädigung trat dabei wie erwartet bei dem als Vergleichssubstanz eingesetzten Laktose Monohydrat auf. Im Gegensatz hierzu wies Kupfer(II)sulfat die mit Abstand stärkste Schädigung aller getesteten Substanzen auf. Alle weiteren Testsubstanzen zeigten in Abhängigkeit von der deponierten Dosis eine reproduzierbare Beeinflussung der Zellvitalität, allerdings waren im direkten Vergleich keine klar erkennbaren substanzspezifischen Unterschiede zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bestimmung der Zellvitalität mittels des WST-1 Assays als Kriterium für eine zuverlässige Bewertung der toxikologischen Wirkungsweise der Stoffe nicht sensitiv genug ist.

Zur besseren Einstufung des toxischen Potentials der Substanzen wurden in der Folge zwei weitere zellbiologische Methoden in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Integrität der Zellmembrane wurde mittels der Bestimmung der freigesetzten Laktat Dehydrogenase überprüft und lieferte nur im Fall von Bariumsulfat und Kupfer(II)oxid verwertbare Ergebnisse. Die nicht nachvollziehbaren und auch nicht reproduzierbaren Resultate für die weiteren Substanzen deuten auf eine Interaktion der Stoffe mit den Testlösungen hin. Die Einsatzmöglichkeiten des LDH Assays sind somit limitiert.

Die zweite Methode bezieht sich auf Veränderungen in der Aktinfilamentstruktur nach Substanzeinwirkung. Die mikroskopische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen zeigte gut erkennbare Unterschiede zwischen Bariumsulfat und Kupfer(II)oxid im Vergleich zu den nicht mit Substanz exponierten Zellen. Die Resultate der Aktinanalyse bestätigten die Beobachtungen im LDH-Assay und könnten so als sinnvolle Ergänzung zum WST-1 Assay herangezogen werden, ebenso wie die Untersuchung der anderen Bestandteile des Zytoskeletts (Intermediärfilamente und Mikrotubuli).

Zusammengefasst belegen die dargestellten Daten, dass es gelungen ist, ein stabiles System zur reproduzierbaren Testung der toxikologischen Wirkung von Partikeln zu entwickeln, dieses aber stark von der Peripherie abhängig ist. In zukünftigen Experimenten soll das Cultex[®] RFS zur Exposition von komplexen Zellsystemen wie Ko-Kulturen oder Primärzellen eingesetzt, sowie weitere Endpunkten etabliert werden, um das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern. Ein weiterer Arbeitsschwerpunkt soll in der intensiven Charakterisierung von partikulären Stoffen liegen. Der Vergleich zwischen Mikro-

und Nanopartikeln einer Substanz könnte Aufschluss über den Einfluss der Partikelgröße auf Zellen geben.

6. Anhang

6.1. Statistik

Alle Ergebnisse der *Cell Proliferation Assays* (WST-1) und der *CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assays* (LDH) sind Mittelwerte aus mindestens drei einzelnen Messwerten. Zum besseren Verständnis sind diese in Prozent zu den mit Atemluft exponierten Zellen aufgetragen. Die Darstellung der Streuung der einzelnen Messwerte untereinander erfolgt durch die Angabe der Standardabweichung über die drei betrachteten Einzelmesswerte.

6.2. Technische Zeichnungen

Die Spezifikation der einzelnen Bauteile in Form von technischen Zeichnungen erfolgt durch die Firma Halter Engineering GmbH aus der Schweiz. Für die Konstruktion und Zeichnungserstellung wird die 3D CAD Software *Solid Edge* (Siemens PLM) verwendet. Damit wird der Entwurf von einzelnen Bauteilen bis hin zu komplexen Bauteilgruppen mit mehreren tausend Teilen ermöglicht.

6.3. CFD-Analysen

CFD ist die Abkürzung für *Computational Fluid Dynamics*, der seit 1973 international gebräuchlichen englischen Kurzform für die numerische Strömungsmechanik. Diese erfolgreich etablierte Methode, welche auch im Bereich des theoretischen Maschinenbaus Anwendung findet, hat das Ziel, strömungsmechanische Probleme mit vereinfachten numerischen Methoden zu lösen. Dabei wird das physikalische Verhalten eines Fluids unter Berücksichtigung der gegebenen physikalischen Gesetzmäßigkeiten modelliert. Die verwendeten Modellgleichungen sind dabei meist Euler-Gleichungen, Navier-Stokes-Gleichungen oder Potentialgleichungen.

Die Durchführung der Strömungsberechnungen mit der ANSYS CFX-Software (ANSYS Incorporated) erfolgt durch die Firma Halter Engineering GmbH aus der Schweiz.

6.4. Charakterisierung der abgeschiedenen Partikelmasse

Die Charakterisierung der abgeschiedenen Partikelmasse erfolgt gravimetrisch durch Rückwaage zuvor exponierter Filterpapiere (MN GF-1 / Macherey-Nagel GmbH). Ausgestanzte Filterrondelle z.B. mit einem Durchmesser von 23 mm werden mit einer Ultramikrowaage ausgewogen (SE2-F / Sartorius mechatronics) und in Zellkulturinserts eingelegt. Die auf diese Art und Weise vorbereiteten Zellkulturinserts werden im Anschluss für 15, 30 oder 60 min im Modul exponiert. Nach der Exposition werden die Filterrondelle vorsichtig entnommen und erneut ausgewogen. Über die Differenz der beiden Wäageergebnisse kann so näherungsweise die deponierte Masse der Substanz bestimmt werden. Diese Methode zur Bestimmung der Partikelmasse ist nur begrenzt einsetzbar und ermöglicht keine Aussage über die Größenverteilung der Partikel im getesteten Aerosol. Die geringe Masse von Partikeln im submikrometer Bereich wird dabei stark durch die Masse von größeren Partikeln überlagert. Die Verdoppelung des Durchmessers eines angenommenen kugelförmigen Partikels führt zum achtfachen Volumen. Bei gleicher Dichte resultiert daraus die achtfache Masse.

Rechenbeispiel (ohne Einheiten):

Formel 22: Berechnung des Volumens der Partikel

$$V = \frac{4 * \pi * r^3}{3}$$

*Masse = Dichte * Volumen*

V = Volumen

r = Radius

$\pi = 3,142$

z.B. Durchmesser von 2

$$4,2 = \frac{4 * \pi * 1}{3}$$

$$4,2 = 1 * 4,2$$

z.B. Durchmesser von 4

$$33,5 = \frac{4 * \pi * 8}{3}$$

$$33,5 = 1 * 33,5$$

Eine genaue Aussage über die abgeschiedenen Partikeln kann aus diesem Grund nur in Verbindung mit der Messung der Partikelgröße durch spezielle Messgeräte erfolgen. Die Verbesserung der gravimetrischen Massenbestimmung ist Teil dieser Arbeit.

6.4.1. Bestimmung der Partikelanzahl und -masse mit einem *Aerodynamic Particle Sizer* (APS)

Der *Aerodynamic Particle Sizer* (3321 / TSI Incorporated), kurz APS, wird für die Bestimmung der Partikelanzahl und -masse in einem Größenbereich von etwa 0,5 - 20 μm eingesetzt (Agarwal and Remiarz 1981). Das Gerät basiert auf der Bestimmung des aerodynamischen Durchmessers der Partikel in Echtzeit nach der *time-of-flight* Methode. Nach der Definition gibt der aerodynamische Durchmesser den Durchmesser einer Kugel mit der normierten Dichte von 1 g/cm^3 an, welche die gleiche Sinkgeschwindigkeit in ruhender bzw. strömungsfreier Luft besitzt wie das Partikel selbst.

Aerosol wird mit einem Fluss von 5 l/min in das APS gesaugt und dort in einen Hauptstrom (1 l/min) und einen Nebenstrom (4 l/min) aufgeteilt. Der Nebenstrom wird gefiltert und als Schleierluft zur Stabilisierung des Hauptstroms vor dem Messpunkt zurückgeführt. Der Hauptstrom des Aerosols wird mittels einer Düse beschleunigt und durch einen Lasergeschwindigkeitsmesser geschickt (Baron 1986). Ein Partikel erzeugt beim Flug durch diesen Strahl ein Streulichtsignal, welches von einem Fotodetektor in einen elektrischen Impuls umgewandelt wird. Durch Messung mit zwei überlappenden Laserstrahlen ergibt sich eine einzelne Kurve mit zwei aufeinanderfolgenden Scheitelpunkten. Durch Messung des Abstands zwischen den beiden Scheitelpunkten erfolgt die Berechnung des aerodynamischen Durchmessers. Auf Grund dieses Messverfahrens entspricht der gemessene Wert des APS nicht exakt dem nach der Definition erwarteten Durchmesser.

Bei der Messung werden die Partikel ihrer Größe nach in 51 Größenbereiche zwischen 0,523 und 20 μm einsortiert. Für das APS nicht einzuordnende Partikel oder Partikel $<0,523 \mu\text{m}$ werden in einem Bereich zusammengefasst. Als Ergebnis ergibt sich somit die Anzahl an Partikeln pro Größenintervall. Für die Bestimmung der Partikelanzahl im Aerosol hinter dem Aerosolgenerator wird das APS um eine 1:100 Verdünnungsstufe (3302 A / TSI Incorporated) erweitert. Der benötigte Volumenstrom von 5 l/min setzt sich dabei aus 1,5 l partikelhaltigem Aerosol und 3,5 l partikelfreier Druckluft zusammen. Daraus ergibt sich während einer

Messung eine Gesamtverdünnung von 1:333. Für einen Messdurchgang werden fünf 2minütige Messungen hintereinander durchgeführt bei denen das APS jede Sekunde die Partikelanzahl pro Intervall bestimmt und aufsummiert.

Für die Darstellung der Partikelanzahl und -masse pro Intervall wird in einem ersten Schritt die gemessene Anzahl gegen den Mittelwert des entsprechenden Bereiches aufgetragen. Da diese Darstellung auf Grund der unterschiedlichen Spannen der Intervalle das Ergebnis horizontal verzerrt, werden die berechneten Werte zum besseren Verständnis normiert, d.h. durch die Spanne dividiert. Dadurch entsteht eine linearisierte Darstellung mit $\# / (\mu\text{m} \cdot \text{cm}^3)$ für die Anzahl- bzw. $\mu\text{g} / (\mu\text{m} \cdot \text{m}^3)$ für die Massenverteilung. Damit ergibt sich als Ergebnis die Anzahl an Partikeln innerhalb eines definierten Bereiches von $1\mu\text{m}$.

6.4.2. Bestimmung der Partikelanzahl mit einem *Laser Aerosol Spectrometer (LAS)*

Die Bestimmung der Partikelanzahl mit einem Laser Aerosol Spektrometer (LAS / 3340 / TSI Incorporated) erfolgt direkt hinter dem Aerosolgenerator oder hinter den einzelnen Kammern. Das hochauflösende Messinstrument erlaubt die Bestimmung der Partikelgröße im Bereich von 90 nm bis $10\mu\text{m}$. Die Einstufung der einzelnen Partikel auf 100 frei wählbare Größenintervalle erfolgt durch die Bestimmung der dynamischen Lichtstreuung im Strahl eines Helium-Neon Lasers. Je nach Einstellungen kann der gemessene Volumenstrom 10 bis 115 ml/min betragen. Dies ermöglicht die direkte Messung der Partikelanzahl vor und hinter den Expositionskammern. Ein spezielles Verdünnungssystem (3332-100 / TSI Incorporated) zur 1:100 Verdünnung des Aerosols kann dem LAS ergänzend vorgeschaltet werden. Dies ermöglicht die Zählung von bis zu 1,8 Millionen Partikeln pro cm^3 .

Die Ausgabe der Daten erfolgt für jeden der Größenintervalle über Microsoft Excel[®]. Für die Darstellung der Partikelanzahlverteilung wird die gemessene Anzahl gegen den Mittelwert der eingestellten Größenintervalle aufgetragen. Ähnlich wie auch bei der Messung mit dem APS werden die Intervalle zur besseren Darstellung der Daten normiert. Daraus ergibt sich als Ergebnis die Anzahl an Partikeln innerhalb eines definierten Bereiches von $1\mu\text{m}$.

6.5. Gesetz von Stokes

Das Gesetz nach Stokes (Stokes 1851) beschreibt die Abhängigkeit der Reibungskraft sphärischer Körper von ihrem Radius, der Geschwindigkeit und der Viskosität des Fluids in dem sich der Körper befindet. Bei nichtsphärischen Körpern wird der Radius durch die Hälfte eines vergleichbaren Äquivalentdurchmessers ersetzt.

Durch die im Folgenden aufgeschlüsselte Formel kann auf diese Art und Weise die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Körper bzw. Partikels berechnet werden.

Formel 23: Gesetz von Stokes

$$F_R = 6 * \pi * r * \eta * v$$

F_R	=	Reibungskraft
π	=	Pi [3,14159]
r	=	Radius des Körpers
η	=	Viskosität des Fluids
v	=	Geschwindigkeit des Körpers

6.6. Cultex[®] CG Glasmodule

Die verwendeten Cultex[®] CG Glasmodule stammen von der Firma Cultex Laboratories GmbH (Aufderheide and Mohr 1999) und basieren auf dem Prinzip der Direktexposition an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (Zamora, Gregory et al. 1986; Tarkington, Wu et al. 1994). Die komplett aus Borosilkatglas und Edelstahl gefertigten Module bestehen aus einem Basismodul mit drei separaten Kammern zur Aufnahme von Zellkulturinserts und einem Oberteil mit der Aerosolzuleitung bzw. -ableitung. Das Anlegen eines konstanten und genau definierten Aerosolflusses durch die Kammern und somit über die Zellen ermöglicht einen direkten Kontakt der Zellen mit einer Testsubstanz.

Die Zuleitung von Nährmedium zu den Kammern erfolgt über einen gemeinsamen Einlass und versorgt die Zellen in den Zellkulturinserts basal mit den benötigten Nährstoffen. Die Temperatur des Nährmediums in den Kammern wird über ein externes Umwälzthermostat, welches 37°C warmes Wasser durch die beiden Teile des Moduls pumpt, konstante gehalten.

Nach dem Einsetzen der Zellkulturinsets und dem Verschließen des Moduls entsteht so ein optimales Mikroklima über den kultivierten Zellen.

6.7. *Dust Feeder* nach Wright

Bei dem *Dust Feeder* nach Wright (Wright 1950) handelt es sich um einen mechanisch arbeitenden Aerosolgenerator zur Verstäubung von Feststoffen. Die pulverförmigen Substanzen werden zu diesem Zweck in einen Zylinder gepresst, welcher auf den *Dust Feeder* aufgesetzt wird. Eine rotierende Klinge schabt unter Zuleitung von Druckluft das Material gleichmäßig ab. Das auf diese Weise generierte Aerosol kann für die Exposition eingesetzt werden.

6.8. Druck- und Atemluft

Die für die Pressung der Substanzen und die Expositionen verwendete Druckluft wird mit einem Kompressor (Medic Air Type 300-50 Silent / Schneider Druckluft GmbH) erzeugt. Die Regelung der Druckluft erfolgt über Präzisionsdruckregler (FDR 02-4 / Denk Drucklufttechnik GmbH) und Massenflussregler (GCR-C3SA-BA20 / Vögtlin Instruments AG). Für die Expositionen mit Zellen wurde spezielle Atemluft (DIN 12021) aus Druckluftflaschen (Linde AG) verwendet. Alle Expositionen nach der Umstellung auf Atemluft aus Flaschen sind gesondert gekennzeichnet.

Tabelle 6-15: Anforderungen an die Luft aus Atemflaschen (DIN 12021)

Sauerstoffgehalt [Vol-%]	21 ± 2
CO ₂ -Gehalt [ml/m ³]	500
CO-Gehalt [ml/m ³]	15
Wassergehalt [mg/m ³]	≤ 35
Ölrückstände [mg/m ³]	≤ 0,5

6.9. Temperatur- und Feuchtesensoren

Die verwendeten Temperatur- und Feuchtesensoren SHT75 (Sensirion AG) befinden sich in Halterungen, welche speziell für den Einbau in die Anbaugruppen der Cultex[®] RFS Module entworfen und gebaut wurden. In Verbindung mit einem *Evaluation Kit* EK-H4 (Sensirion AG) kann während einer laufenden Exposition am Ausgang jeder Kammer die Temperatur (°C) und die relative Luftfeuchtigkeit (rH%) bestimmt werden.

6.10. Zellkultur und Zellkulturführung

Die kompletten Zellkulturarbeiten zur Passagierung, Kultivierung und Anzucht der A549-Zellen für die Exposition erfolgen unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank (Herasafe / Thermo Scientific). Sämtliche für die Zellkulturarbeiten verwendeten Materialien werden vor dem Kontakt mit Wachstumsmedium im Autoklaven sterilisiert oder steril verpackt gekauft. Alle weiteren Gerätschaften müssen vor der Verwendung mit einem 70%igen Gemisch aus Ethanol in destilliertem Wasser oberflächlich gereinigt werden. Zur Vermeidung von Kontaminationen insbesondere bei der unsterilen Überführung der Zellkulturen in und aus der Expositionsanlage, wird dem für A549 eingesetzten Nährmedium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) das Aminoglycosidantibiotikum Gentamycin zugesetzt.

Die Kultivierung der A549-Zellen erfolgt für bis zu 35 Passagen im Brutschrank bei 37°C, 95% rH und 5% CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen (Falcon™ BD Biosciences). Da mit höheren Passagen eine Veränderung der Zellen nicht auszuschließen ist, werden diese verworfen und eine neue Passage aufgetaut. Zur Langzeitlagerung werden die Zellen tiefgefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Passagierung, Kultivierung und Verwendung der A549-Zellen wird im Kapitel 6.10.2 genauer beschrieben.

6.10.1. Vorbereitung von Wachstumsmedium für A549-Zellen

Als Nährmedium für die Anzucht und Kultivierung der A549-Zellen wird DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Biochrome AG) mit 10% FBS (v/v) (*Fetal Bovine Serum* / PAA Laboratories GmbH) und 0,05% Gentamycin (Stammlösung 10 mg/ml /

Biochrome AG) verwendet. Das DME-Medium und die Zusätze werden unter sterilen Arbeitsbedingungen (sterile Werkbank / Herasafe / Thermo Scientific) in der Mediumflasche zusammengemischt und bei 4°C für maximal zwei Wochen im Kühlschrank gelagert.

6.10.2. Trypsinierung und Passagierung von A549-Zellen

Die Trypsinierung ist ein entscheidender Aspekt bei der Passagierung von A549-Zellen. Zu diesem Zweck werden zunächst 8 ml Wachstumsmedium, 8 ml PBS (*Phosphate-Buffered-Saline* / Biochrome AG) und 2 ml einer 0,25%igen Trypsin/1mM EDTA-Lösung (Gibco-Invitrogen) bei 37°C bereitgestellt. Die mit A549-Zellen bewachsenen Zellkulturflaschen (75 cm² / BD Biosciences) werden unter sterilen Arbeitsbedingungen (sterile Werkbank / Herasafe / Thermo Scientific) geöffnet und das enthaltene Medium mit einer serologischen Pipette entnommen. Die Zellkulturflasche wird vorsichtig mit dem vorgewärmten PBS gespült bevor die Trypsin/EDTA-Lösung direkt auf die Wachstumsfläche gegeben wird. Während eines Inkubationsschritts von 6 min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rH im Brutschrank werden durch die zugegebene Trypsin/EDTA-Lösung die Proteinbindungen der Zellen mit der Zellkulturflasche aufgebrochen. Durch leichtes seitliches Klopfen an die Zellkulturflasche können die Zellen nun vollständig abgelöst werden. Durch Zugaben von 8 ml Wachstumsmedium wird die Trypsin/EDTA-Reaktion gestoppt. Die durch diese Prozedur entstehende 10 ml Zellsuspension kann nun für die Aussaat in neue Zellkulturflaschen (Kapitel 6.10.4) oder für die Aussaat in Zellkulturinserts (Kapitel 6.10.5) eingesetzt werden. Die genaue benötigte Zellzahl wird durch Messung mit einem CASY[®] *Cell Counter* (Model TTC / Innovatis-Roche) bestimmt und berechnet (Kapitel 6.10.3).

6.10.3. Bestimmung der Zellzahl mit einem CASY[®] *Cell Counter*

Für die Berechnung der benötigten Zellsuspension zur Aussaat in Zellkulturflaschen und Zellkulturinserts wird mit einem CASY[®] *Cell Counter* (Model TTC / Innovatis-Roche) die Zellzahl pro ml Zellsuspension bestimmt. Zu diesem Zweck werden 100 µl Zellsuspension in einem CASY[®] *Cup* (Innovatis-Roche) mit 9900 µl CASY[®] *Ton* (Innovatis-Roche) verdünnt. Mit dem CASY[®] *Cell Counter* wird aus dieser Lösung nach Herstellerangaben die

Lebendzellzahl pro ml gemessen. Das genaue Aussaatvolumen für Zellkulturflaschen und Inserts errechnet sich mit den in den Abschnitten „Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen“ und „Aussaat der Zellen in Inserts“ angegebenen Formeln (Kapitel 6.10.4 und Kapitel 6.10.5).

6.10.3.1. CASY[®] Cell Counter Model TTC

Der CASY[®] Cell Counter ist ein Mehrkanalzellzählgerät, welches 1998 von der Firma Schärfe System GmbH entwickelt wurde. Es ermöglicht die exakte und schnelle Bestimmung der Zellzahl, des Zellvolumens und der Zellvitalität. Für die Messung werden die Zellen in einer Elektrolytlösung (CASY[®] Ton / Innovatis-Roche) suspendiert. Mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit werden die Zellen einzeln über eine Kapillare durch eine Präzisionsmesspore mit einer konstanten angelegten Spannung gesaugt. In der Kapillare verdrängen die Zellen die Elektrolytlösung entsprechend ihres Volumens. Eine intakte Zellmembran von lebenden Zellen wirkt dabei im Spannungsfeld als Isolator und es kommt zu einer Erhöhung des elektrischen Widerstands. Diese Widerstandserhöhung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Ist die Membran beschädigt steigt die Leitfähigkeit der Zelle und der elektrische Widerstand sinkt. Die Größe des Zellkerns bestimmt dabei das kleinstmögliche Volumen der Zelle, welches als Kennzeichen für eine tote Zelle eingesetzt wird.

6.10.4. Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen

Die Aussaat in 75 cm² Zellkulturflaschen erfolgt unter sterilen Arbeitsbedingungen mit einem definierten Aussaatvolumen an Zellsuspension, welches mit auf 37°C vorgewärmtem Wachstumsmedium auf ein Gesamtvolumen von 14 ml aufgefüllt wird. Das Aussaatvolumen ergibt sich rechnerisch als Quotient aus der Passagierungszellzahl und der mit dem CASY[®] Cell Counter bestimmten Zellkonzentration. Die folgende Formel dient als Grundlage für die Berechnung des Aussaatvolumens.

Formel 24: Berechnung des Aussaatvolumens

$$V = \frac{N}{c}$$

V = Aussaatvolumen

N = Passagierungszellzahl

c = Zellkonzentration

Die Passagierungszellzahl ergibt sich aus der Länge des Wachstumszeitraums bis zur nächsten Passagierung. Bei einem Wachstumszeitraum von zwei Tagen wird eine Zellzahl von $3,0 \times 10^6$ Zellen, bei drei Tagen eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen angenommen. Die neuen Zellkulturflaschen werden bis zur nächsten Passagierung für die geplante Wachstumszeit bei 37°C , 5% CO_2 und 95 % rH inkubiert.

6.10.5. Aussaat der Zellen in Zellkulturinserts

Die Aussaat in $4,2 \text{ cm}^2$ Zellkulturinserts (6-well, BD Falcon™ / BD Biosciences) erfolgt unter sterilen Arbeitsbedingungen mit einer definierten Zellzahl pro Milliliter. Vor der Aussaat werden leere Zellkulturinserts in 6-well Zellkulturplatten (6-well, BD Falcon™ / BD Biosciences) eingesetzt. In den einzelnen Kammern der 6-well Zellkulturplatten werden hierzu mit einer Mikroliterpipette jeweils 2,5 ml Wachstumsmedium vorgelegt und die Zellkulturinserts eingesetzt. In jedes Insert wird im Anschluss 1 ml Wachstumsmedium pipettiert bevor in den Zellkulturplatten eine Vorinkubation für 30 min bei 37°C , 5% CO_2 und 95 % rH erfolgt.

Die für die Aussaat von jeweils 10 Zellkulturinserts benötigten Volumina der Zellsuspension und des Wachstumsmedium ergeben sich aus den folgenden Formeln.

Formel 25: Berechnung des Volumens an benötigter Zellsuspension

$$V_{\text{Susp}} = \frac{4,4 \cdot 10^6 \text{ Zellen}}{c}$$

V_{Susp} = Suspensionsvolumen
 c = Zellkonzentration
 V_{Medium} = Mediumvolumen

Formel 26: Berechnung des Volumens an benötigtem Zellkulturmedium

$$V_{\text{Medium}} = 11\text{ml} - V_{\text{Susp}}$$

Die für die Aussaat benötigte Zellsuspension wird mit serologischen Pipetten durch Mischung der beiden berechneten Volumina hergestellt. Zur Überprüfung der Zellzahl kann eine Kontrollmessung mit dem CASY® *Cell Counter* durchgeführt werden (Kapitel 6.10.3). Vor der Aussaat von jeweils 1 ml erfolgt das Absaugen des vorgelegten Wachstumsmediums aus den Zellkulturinserts und die mehrfache Durchmischung der erstellten Zellsuspension. Die

Zellkulturinserts werden bis zur Exposition für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % rH inkubiert.

6.10.6. Vorbereitung von Expositionsmedium für die A549-Zellen

Als Nährmedium für die Exposition von A549-Zellen wird Hepes-gepuffertes DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Gibco-Invitrogen) mit 0,05% Gentamycin (Stammlösung 10 mg/ml / Biochrome AG) verwendet. Das DME-Medium und das Gentamycin werden unter sterilen Arbeitsbedingungen in der Mediumflasche zusammengemischt und bei 4°C für maximal zwei Wochen im Kühlschrank gelagert. Im Vergleich zum Kultivierungsmedium enthält dieses Medium kein Serum.

6.11. Cell Proliferation Assay - WST-1

Der eingesetzte *Cell Proliferation Assay* (Roche Diagnostics) dient dem Nachweis der intakten Atmungskette der A549 Zellen nach der Exposition. Zellen mit einem aktiven mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase System wandeln das Tetrazoliumsalz WST-1 in einer enzymatischen Reaktion in Formazan um (Herstellerangaben). Der damit verbundene Farbumschlag wird über die Messung der optischen Dichte mit einem Spektralphotometer (Spectramax 340PC / *Molecular Devices*) bei 450 nm bestimmt.

Die Durchführung des WST-1 erfolgt genau 24 Stunden nach der Exposition in den Zellkulturinserts. Zu diesem Zweck erfolgt die Umsetzung der Zellkulturinserts in neue 6-well Zellkulturplatten (mit 2,5 ml Wachstumsmedium pro Well). Jeweils 100 µl WST-1-Lösung und 900 µl Wachstumsmedium werden in den Zellkulturinserts vorsichtig vermischt. Nach einer exakt 30minütigen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % rH erfolgt die Übertragung von jeweils 3x100 µl aus jedem Zellkulturinsert in die Kammern einer 96-well Zellkulturplatte (BD Biosciences) und die Bestimmung der OD bei 450 nm und 620 nm (Kontrolle).

6.12. CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay

Der eingesetzte *Cytotoxicity Assay* (Promega Corporation) dient dem quantitativen Nachweis von Laktat Dehydrogenase (LDH) nach der Exposition der A549-Zellen. Die Menge an durch lysierte Zellen freigegebener LDH wird in einem 30minütigen enzymatischen Test bestimmt. Hierbei wird das Tetrazoliumsalz INT in Formazan umgewandelt. Die eingesetzten Lösungen sind im *CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit* (Promega Corporation, Bestellnummer: G1780) enthalten.

Die Durchführung des LDH erfolgt genau 24 Stunden nach der Exposition in einer 96-well Zellkulturplatte (BD Biosciences). Zum Start der Nachinkubation werden 150 µl LDH-Lysispuffer zu den vorhandenen 1,5 ml Wachstumsmedium in das Well von nicht exponierten Zellen unter das Zellkulturinsert gegeben und gemischt. 150 µl dieses Gemisches werden wieder entnommen und direkt in das Zellkulturinsert überführt (Lyse).

Aus dem Unterstand aller anderen Zellkulturinserts werden jeweils 3x50 µl in die Kammern einer 96-well Zellkulturplatte (BD Biosciences) überführt. Parallel hierzu kommen zusätzlich 3x50 µl der Positivkontrolle und der 100%igen Lyse in die vorhandene 96-well Zellkulturplatte. In jede der Kammern wird zum Start der Reaktion mit einer Mehrkanalpipette jeweils 50 µl LDH-Substratmix hineingegeben bevor eine 30minütige Inkubation bei RT im Dunkeln erfolgt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden zum Abstoppen der Reaktion in jedes Well 50 µl LDH-Stoplösung hinzugefügt und im Spektralphotometer die OD bei 490 nm bestimmt. Eventuell auftretende Luftblasen müssen vor der Messung mit einer Kanüle oder einer Pipettenspitze zerstochen werden.

6.13. Aktinfärbung mit FITC-Phalloidin

Die Struktur des Zytoskeletts wird mittels Immunfluoreszenzfärbung des Strukturproteins Aktin in den Zellen dargestellt. Die dynamischen Aktinfilamente dienen als Bestandteil des Zytoskeletts der Stabilisierung der Zellstruktur. Das zur Gruppe der Phallotoxine des Knollenblätterpilzes gehörende Phalloidin bindet irreversible an F-Aktin, eine fibrillär organisierte Form des Aktins. Die Markierung des Phalloidin mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ermöglicht es diese Struktur des Zytoskeletts sichtbar zu

machen. Zu diesem Zweck werden die Zellen nach der Exposition zuerst dreimal mit 37°C warmen PBS gewaschen und im Anschluss für 15 min mit 3,7%iger Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Nach einem wiederholten Waschschrift mit PBS erfolgt die Permeabilisierung der Zellen für 10 min mit 0,25%iger Triton X-100/PBS-Lösung. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS findet eine Blocking-Phase mit 1%iger BSA/PBS-Lösung bei 4°C über Nacht statt.

Am nächsten Tag werden die Membranen zuerst ausgeschnitten und im Anschluss unter Ausschluss von Licht mit FITC-Phalloidin-Lösung für 40 min inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift können die Membranstücke auf Objektträgern unter dem Fluoreszenzmikroskopie (Axiophot / Carl Zeiss AG) mit dem Filtersatz 09 *shift free* (Ex BP 450-490 / Em LP 515) betrachtet werden.

Die fertigen Membranstücke können unter Vermeidung von Fotooxidation bei 4°C für maximal sechs Monate gelagert werden.

Die im Folgenden aufgeführten Lösungen müssen hergestellt werden:

3,7%ige Formaldehyd/PBS-Lösung:

10 ml Formaldehyd (37%)

90 ml PBS (pH 7,4)

0,25%ige Triton X-100/PBS-Lösung:

2,5 µl Triton X-100

1000 µl PBS

1%ige BSA/PBS-Lösung:

0,2 g BSA

20 ml PBS

FITC-Phalloidin-Lösung:

100 µl Phalloidin

4900 µl 1%ige BSA/PBS-Lösung

6.14. Abkürzungsverzeichnis

% rH	Prozent relative Luftfeuchtigkeit
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AG	Aktiengesellschaft
AMES	Testverfahren nach Bruce Ames
APS	<i>Aerodynamic Particle Sizer</i> (TSI Incorporated)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B	Mobilität
BD	Becton Dickinson GmbH
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Gleitkoeffizient für das Gesetz von Stokes
CAD	<i>computer aided design</i> (rechnerunterstütztes Zeichnen)
CASY	<i>Cell Counter + Analyzer System</i> (Roche Applied Science)
CFD	<i>Computational fluid dynamics</i> (numerische Strömungsmechanik)
cm ²	Quadratcentimeter
CNTs	<i>Carbon nanotubes</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cultex [®] CG	Cultex [®] Glasmodul für Zellen mit gravimetrischer Mediumversorgung
Cultex [®] HyP	Cultex [®] <i>Hydraulic Press</i>
Cultex [®] RFS	Cultex [®] <i>Radial Flow System</i>
D	Diffusionskoeffizient
d	Durchmesser
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
e	elektrische Ladung

EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	und andere (lateinisch)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gravitationsbeschleunigung [9,81 m/s ²]
GmbH	Gesellschaft mit begrenzter Haftung
h	Höhe
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
IL-8	Interleukin-8
k	Boltzmann Konstante [1,38*10 ⁻²³ W*s/°K]
Kap	Kapazität
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
LAS	<i>Laser Aerosol Spectrometer</i> (Laser Aerosol Spektrometer)
LDH	Laktat-Dehydrogenase
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MWCNTs	<i>Multi-wall carbon nanotubes</i>
N	Anzahl der deponierten Partikel
n ₀	Partikelkonzentration des Aerosols
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat gepufferte Saline)
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
s	Sedimentationsstrecke
Sek.	Sekunden

s_{el}	Distanz
SMPS	<i>Scanning Mobility Particle Sizer</i>
Std	Stunde
SWCNTs	Single-wall carbon nanotubes
t	Zeit
TEER	<i>transepithelial electric resistance</i>
U	Spannung [V]
v	Geschwindigkeit
V	Volt
v_{el}	Geschwindigkeit durch elektrische Kräfte
W	Gewicht
WST-1	<i>Water Soluble Tetrazolium</i>
z.B.	zum Beispiel
ϵ_0	dielektrische Feldkonstante von Vakuum
η	Viskosität
π	Pi = 3,1416
ρ	Dichte

6.15. Geräte und Laborausstattung

Massenflussregler	Model: Strömungsregler GFC Hersteller: Analyt-MTC GmbH
Massenflussregler	Model: red-y compact regulator GCR-C3SA-BA20 Hersteller: Vögtlin Instruments AG
Massenflussmesser	Model: 35806 Hersteller: Analyt-MTC GmbH
Massenflussmesser	Model: 4140 Hersteller: TSI Incorporated
Vakuumpumpe	Model: KnF Laboport [®] N86 KT.18 Hersteller: KnF Neuberger
Kompressor	Model: Medic Air Type 300-50 Silent Hersteller: Schneider Druckluft GmbH

Präzisionsdruckregler	Model: FDR 02-4 Hersteller: Denk Drucklufttechnik GmbH
Schlauchpumpen	Model: MCP Hersteller: IDEX Health & Science GmbH
Cultex [®] CG	Model: Cultex [®] CG für 6-well Zellkulturinsert Hersteller: Cultex Laboratories GmbH
Cultex [®] HyP	Model: Cultex [®] Hydraulic Press Hersteller: Cultex Laboratories GmbH
Umwälzthermostat	Model: ME-4 Hersteller: Julabo Labortechnik GmbH
Partikelzählgerät	Model: Aerodynamic Particle Sizer 3321 Hersteller: TSI Incorporated
Verdünnungsstufe	Model: 3302 A (APS) Hersteller: TSI Incorporated
Partikelzählgerät	Model: Laser Aerosol Spectrometer 3340 Hersteller: TSI Incorporated
Verdünnungsstufe	Model: 3332-100 (LAS) Hersteller: TSI Incorporated
Spektralphotometer	Model: Spectramax 340PC Hersteller: Molecular Devices
Ultramikrowaage	Model: SE2-F Hersteller: Sartorius mechatronics
Henkellocheisen	19 mm und 25 mm (nach DIN 7200) Hersteller: www.locheisen.com
Sterile Werkbank	Model: Herasafe Hersteller: Thermo Scientific
Mikroskop	Model: Axiophot Hersteller: Carl Zeiss AG
Mikroskopkamera	Model: AxioCam Hersteller: Carl Zeiss AG
Mikroskopfilter	Model: 488009-9901-000 Wellenlängen: EX BP 450-490, BS FT 510, EM LP 515 Hersteller: Carl Zeiss AG

6.16. Substanzen für die Exposition

Kupfer(II)sulfat	Bestellnummer: 12852 Hersteller: Sigma Aldrich
Disperal®	Bestellnummer: 535100 Hersteller: Sasol Germany GmbH
Pural 200®	Bestellnummer: 525101 Hersteller: Sasol Germany GmbH
D(+) Laktose Monohydrat	Bestellnummer: 61341 Hersteller: Fluka
Bariumsulfat	Bestellnummer: 311050136 Hersteller: Sachtleben Chemie GmbH
Kupfer(II)oxid	Bestellnummer: 208841 Hersteller: Sigma Aldrich
Natriumfluoreszein (Uranin)	Bestellnummer: 28803 Hersteller: Riedel-de Haën

6.17. Verbrauchsmaterialien

6-well Zellkulturinserts Falcon™	Bestellnummer: 353090
6-well Zellkulturplatten Falcon™	Bestellnummer: 353502
96-well Zellkulturplatten Falcon™	Bestellnummer: 353075
75 cm ² Zellkulturflasche Falcon™	Bestellnummer: 353135
PP-Röhrchen 50 ml Falcon™	Bestellnummer: 352070
PP-Röhrchen 15 ml Falcon™	Bestellnummer: 352096 Hersteller (alle): BD Biosciences
Mikroliter Pipette 500-5000 µl	Bestellnummer: 725080
Mikroliter Pipette 100-1000 µl	Bestellnummer: 725070
Mikroliter Pipette 20-200 µl	Bestellnummer: 725060
Mikroliter Pipette 0,5-10 µl	Bestellnummer: 725020 Hersteller (alle): Sartorius Biohit

Pipettenspitzen 5000 μ l	Bestellnummer: 780300
Pipettenspitzen 1000 μ l	Bestellnummer: 780016
Pipettenspitzen 300 μ l	Bestellnummer: 780011
Pipettenspitzen 10 μ l	Bestellnummer: 781349
	Hersteller (alle): Sartorius Biohit

Mehrkanalpipette	Bestellnummer: 705454
	Hersteller: Brand

Serologische Pipette 50 ml	Bestellnummer: 86.1689.001
Serologische Pipette 25 ml	Bestellnummer: 86.1685.001
Serologische Pipette 10 ml	Bestellnummer: 86.1254.001
Serologische Pipette 5 ml	Bestellnummer: 86.1253.001
	Hersteller (alle): Sarstedt AG

Filterpapier (MN-GF-1)	Bestellnummer: 411009
	Hersteller: Macherey-Nagel GmbH

6.18. Reagenzien und Kits

PBS	L 1825
	Hersteller: Biochrome AG
0,25%ige Trypsin/1mM EDTA-Lösung	L 2143
	Hersteller: Biochrome AG
<i>Fetal Bovine Serum</i>	A15-151
	Hersteller: PAA Laboratories GmbH
Gentamycin (10 mg/ml)	A 2710
	Hersteller: Biochrom AG
Ethanol (vergällt)	K928.4
	Hersteller: Carl Roth GmbH
2-Propanol (Isopropanol)	A0995
	Hersteller: AppliChem

WST-1	<i>Cell Proliferation Assay</i> Hersteller: Roche Diagnostics
LDH	<i>CytoTox One 96[®]</i> Hersteller: Promega Corporation
Formaldehyd	A3592 Hersteller: AppliChem
FITC-Phalloidin	P5282 Hersteller: Sigma Aldrich
Triton X-100	A1388 Hersteller: AppliChem
BSA	A-2153 Hersteller: Sigma Aldrich

6.19. Nährmedien

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Hersteller: Biochrome AG
DMEM + Hepes	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Hersteller: Gibco-Invitrogen

7. Literaturverzeichnis

Agarwal, J. K. and Remiarz, R. J. (1981). "USDHEW-NIOSH Contract report No. 210-80-0080."

Ahamed, M. (2011). "Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells." *Toxicol In Vitro* 25(4): 930-6.

Albright, C. D., Jones, R. T., et al. (1990). "Transformed human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) alter the growth and morphology of normal human bronchial epithelial cells in vitro." *Cell Biol Toxicol* 6(4): 379-98.

Ames, B. N., McCann, J., et al. (1975). "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test." *Mutat Res* 31(6): 347-64.

Andersson, P. O., Lejon, C., et al. (2011). "Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of TiO(2) nanoparticles in living lung epithelial cells." *Small* 7(4): 514-23.

Aufderheide, M. and Gressmann, H. (2007). "A modified Ames assay reveals the mutagenicity of native cigarette mainstream smoke and its gas vapour phase." *Exp Toxicol Pathol* 58(6): 383-92.

Aufderheide, M. and Gressmann, H. (2008). "Mutagenicity of native cigarette mainstream smoke and its gas/vapour phase by use of different tester strains and cigarettes in a modified Ames assay." *Mutat Res* 656(1-2): 82-7.

Aufderheide, M., Knebel, J. W., et al. (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(4): 433-41.

Aufderheide, M., Knebel, J. W., et al. (2003). "An improved in vitro model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke." *Exp Toxicol Pathol* 55(1): 51-7.

Aufderheide, M., Knebel, J. W., et al. (2003). "Novel approaches for studying pulmonary toxicity in vitro." *Toxicol Lett* 140-141: 205-11.

Aufderheide, M. and Mohr, U. (1999). "CULTEX--a new system and technique for the cultivation and exposure of cells at the air/liquid interface." *Exp Toxicol Pathol* 51(6): 489-90.

Aufderheide, M. and 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(3): 265-70.

Aufderheide, M. and Mohr, U. (2004). "A modified CULTEX system for the direct exposure of bacteria to inhalable substances." *Exp Toxicol Pathol* 55(6): 451-4.

Aufderheide, M., Scheffler, S., et al. (2011). "Analytical in vitro approach for studying cyto- and genotoxic effects of particulate airborne material." *Anal Bioanal Chem* 401(10): 3213-20.

Aust, L. B. and Maibach, H. I. (1981). "Modified Draize sensitization test with D&C yellow no. 10 in combination dye systems." *Contact Dermatitis* 7(6): 357.

Baber, O., Jang, M., et al. (2011). "Amorphous silica coatings on magnetic nanoparticles enhance stability and reduce toxicity to in vitro BEAS-2B cells." *Inhal Toxicol* 23(9): 532-43.

Bakand, S. and Hayes, A. (2010). "Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro." *J Pharmacol Toxicol Methods* 61(2): 76-85.

Bakand, S., Hayes, A., et al. (2012). "Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure." *Inhal Toxicol* 24(2): 125-35.

Balis, J. U., Bumgarner, S. D., et al. (1984). "Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction." *Exp Lung Res* 6(3-4): 197-213.

Barnes, P. J. (2000). "Chronic obstructive pulmonary disease." *N Engl J Med* 343(4): 269-80.

Barnes, P. J. (2004). "Small airways in COPD." *N Engl J Med* 350(26): 2635-7.

Barnes, P. J. (2010). "New therapies for chronic obstructive pulmonary disease." *Med Princ Pract* 19(5): 330-8.

Baron, P. A. (1986). "Calibration and Use of the Aerodynamic Particle Sizer." *Aerosol Science and Technology* 5(1).

Barrett, E. G., Rudolph, K., et al. (2003). "Effect of inhaled ultrafine carbon particles on the allergic airway response in ragweed-sensitized dogs." *Inhal Toxicol* 15(2): 151-65.

Bello, D., Wardle, B. L., et al. (2010). "Characterization of exposures to nanoscale particles and fibers during solid core drilling of hybrid carbon nanotube advanced composites." *Int J Occup Environ Health* 16(4): 434-50.

Berlinski, A., Willis, J. R., et al. (2010). "In-vitro comparison of 4 large-volume nebulizers in 8 hours of continuous nebulization." *Respir Care* 55(12): 1671-9.

Berner, F. and Asselineau, D. (2008). "An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro." *J Am Acad Dermatol* 58(5 Suppl 2): S155-9.

BeruBe, K., Aufderheide, M., et al. (2009). "In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop." *Altern Lab Anim* 37(1): 89-141.

Bhattacharya, K., Hoffmann, E., et al. (2012). "Comparison of micro- and nanoscale Fe⁺³-containing (Hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells in vitro." *Toxicol Sci* 126(1): 173-82.

Bitterle, E., Karg, E., et al. (2006). "Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles." *Chemosphere* 65(10): 1784-90.

Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985). "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption." *Toxicol Lett* 24(2-3): 119-24.

- Burlakova, E. B., Zhizhina, G. P., et al.** (2010). "Biomarkers of oxidative stress and smoking in cancer patients." *J Cancer Res Ther* 6(1): 47-53.
- Carere, A., Stamatii, A., et al.** (2002). "In vitro toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements." *Toxicol Lett* 127(1-3): 153-60.
- Cathcart, R., Schwieters, E., et al.** (1983). "Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay." *Anal Biochem* 134(1): 111-6.
- Chen, B. T., Afshari, A., et al.** (2010). "Nanoparticles-containing spray can aerosol: characterization, exposure assessment, and generator design." *Inhal Toxicol* 22(13): 1072-82.
- Cheng, Y. S.** (2011). "Condensation Particle Counters." *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*(3): 381-392.
- Cheng, Y. S., Yeh, H. C., et al.** (1984). "Characterization of diesel exhaust in a chronic inhalation study." *Am Ind Hyg Assoc J* 45(8): 547-55.
- Chio, C. P., Chen, S. C., et al.** (2007). "Oxidative stress risk analysis for exposure to diesel exhaust particle-induced reactive oxygen species." *Sci Total Environ* 387(1-3): 113-27.
- Chiou, T. J. and Tzeng, W. F.** (2000). "The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress." *Toxicology* 154(1-3): 75-84.
- Cho, S. A., An, S., et al.** (2012). "A new cell-based method for assessing the eye irritation potential of chemicals: An alternative to the Draize test." *Toxicol Lett*.
- Cohen, C., Dossou, K. G., et al.** (1994). "Episkin: An in vitro model for the evaluation of phototoxicity and sunscreen photoprotective properties." *Toxicol In Vitro* 8(4): 669-71.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., et al.** (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." *FASEB J* 17(10): 1195-214.

Cooney, D. J. and Hickey, A. J. (2011). "Cellular response to the deposition of diesel exhaust particle aerosols onto human lung cells grown at the air-liquid interface by inertial impaction." *Toxicol In Vitro* 25(8): 1953-65.

Cotovio, J., Grandidier, M. H., et al. (2005). "The in vitro skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process." *Altern Lab Anim* 33(4): 329-49.

Dalby, R., Spallek, M., et al. (2004). "A review of the development of Respimat Soft Mist Inhaler." *Int J Pharm* 283(1-2): 1-9.

Davies, A., Hudson, N., et al. (1995). "A novel ultrasonic aerosol generator." *Med Eng Phys* 17(5): 387-9.

de Boer, A. H., Gjaltema, D., et al. (2002). "Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique." *Int J Pharm* 249(1-2): 219-31.

de Bruijne, K., Ebersviller, S., et al. (2009). "Design and testing of Electrostatic Aerosol in Vitro Exposure System (EAVES): an alternative exposure system for particles." *Inhal Toxicol* 21(2): 91-101.

Demokritou, P., Buchel, R., et al. (2010). "Development and characterization of a Versatile Engineered Nanomaterial Generation System (VENGES) suitable for toxicological studies." *Inhal Toxicol* 22 Suppl 2: 107-16.

Diabate, S., Mulhopt, S., et al. (2008). "The response of a co-culture lung model to fine and ultrafine particles of incinerator fly ash at the air-liquid interface." *Altern Lab Anim* 36(3): 285-98.

Dorman, D. C., Mokashi, V., et al. (2012). "Biological responses in rats exposed to cigarette smoke and Middle East sand (dust)." *Inhal Toxicol* 24(2): 109-24.

Draize, J. H. and Spines, J. M. (1944). *Food and Drug Administration.*

Faux, S. P., Tai, T., et al. (2009). "The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke." *Biomarkers* 14 Suppl 1: 90-6.

Ferin, J., Oberdorster, G., et al. (1992). "Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats." *Am J Respir Cell Mol Biol* 6(5): 535-42.

Firanesu, G., Hermsdorf, D., et al. (2006). "Large molecular aggregates: From atmospheric aerosols to drug nanoparticles." *Phys Chem Chem Phys* 8(36): 4149-65.

Flagan, R. C. (2011). "Electrical mobility methods for submicrometer particle characterization." *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*(3).

Foldvari, M. and Bagonluri, M. (2008). "Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties." *Nanomedicine* 4(3): 173-82.

Foldvari, M. and Bagonluri, M. (2008). "Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues." *Nanomedicine* 4(3): 183-200.

Foley, P. and Riederer, P. (2000). "Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease." *J Neurol* 247 Suppl 2: II82-94.

Forchhammer, L., Loft, S., et al. (2012). "Expression of adhesion molecules, monocyte interactions and oxidative stress in human endothelial cells exposed to wood smoke and diesel exhaust particulate matter." *Toxicol Lett* 209(2): 121-8.

Foster, K. A., Avery, M. L., et al. (2000). "Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery." *Int J Pharm* 208(1-2): 1-11.

Foster, K. A., Oster, C. G., et al. (1998). "Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism." *Exp Cell Res* 243(2): 359-66.

Foth, H. and Hayes, A. (2008). "Background of REACH in EU regulations on evaluation of chemicals." *Hum Exp Toxicol* 27(6): 443-61.

Fromer, L., Barnes, T., et al. (2010). "Innovations to achieve excellence in COPD diagnosis and treatment in primary care." *Postgrad Med* 122(5): 150-64.

Fukano, Y., Ogura, M., et al. (2004). "Modified procedure of a direct in vitro exposure system for mammalian cells to whole cigarette smoke." *Exp Toxicol Pathol* 55(5): 317-23.

Fukano, Y., Yoshimura, H., et al. (2006). "Heme oxygenase-1 gene expression in human alveolar epithelial cells (A549) following exposure to whole cigarette smoke on a direct in vitro exposure system." *Exp Toxicol Pathol* 57(5-6): 411-8.

Garcia-Contreras, L., Fiegel, J., et al. (2007). "Inhaled large porous particles of capreomycin for treatment of tuberculosis in a guinea pig model." *Antimicrob Agents Chemother* 51(8): 2830-6.

Gatto, E. M., Carreras, M. C., et al. (1996). "Neutrophil function, nitric oxide, and blood oxidative stress in Parkinson's disease." *Mov Disord* 11(3): 261-7.

Gazzano, E., Ghiazza, M., et al. (2012). "Physico-chemical determinants in the cellular responses to nanostructured amorphous silicas." *Toxicol Sci*.

Geiser, M., Casaulta, M., et al. (2008). "The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles." *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(3): 371-6.

Genschow, E., Spielmann, H., et al. (2004). "Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests." *Altern Lab Anim* 32(3): 209-44.

Giard, D. J., Aaronson, S. A., et al. (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1417-23.

Goldsby, R. A., Kindt, T. J., et al. (2003). "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay." *Immunology* 5: 148-150.

- Gomez, A.** (2002). "The electrospray and its application to targeted drug inhalation." *Respir Care* 47(12): 1419-31; discussion 1431-3.
- Grindon, C. and Combes, R.** (2008). "Introduction to the EU REACH legislation." *Altern Lab Anim* 36 Suppl 1: 1-6.
- Gruenert, D. C., Finkbeiner, W. E., et al.** (1995). "Culture and transformation of human airway epithelial cells." *Am J Physiol* 268(3 Pt 1): L347-60.
- Hackenberg, S., Scherzed, A., et al.** (2011). "Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro." *Toxicol In Vitro* 25(3): 657-63.
- Hartung, T.** (2008). "Thoughts on limitations of animal models." *Parkinsonism Relat Disord* 14 Suppl 2: S81-3.
- He, L. and Murray, K. K.** (1997). "A Laminar Flow Nebulizer for Aerosol MALDI." *Anal Chem* 69(17): 3613-6.
- Hein, S., Bur, M., et al.** (2011). "A new Pharmaceutical Aerosol Deposition Device on Cell Cultures (PADD OCC) to evaluate pulmonary drug absorption for metered dose dry powder formulations." *Eur J Pharm Biopharm* 77(1): 132-8.
- Hellermann, G. R., Nagy, S. B., et al.** (2002). "Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells." *Respir Res* 3: 22.
- Hochrainer, D., Holz, H., et al.** (2005). "Comparison of the aerosol velocity and spray duration of Respimat Soft Mist inhaler and pressurized metered dose inhalers." *J Aerosol Med* 18(3): 273-82.
- Hoffmann, T., Zetzsch, C., et al.** (2007). "Chemie von Aerosolen." *Chemie in unserer Zeit* 41(3): 232-246.

Hrvacic, B., Bosnjak, B., et al. (2006). "Applicability of an ultrasonic nebulization system for the airways delivery of beclomethasone dipropionate in a murine model of asthma." *Pharm Res* 23(8): 1765-75.

Ishiyama, M., Tominaga, H., et al. (1996). "A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet." *Biol Pharm Bull* 19(11): 1518-20.

Jennerjohn, N., Eiguren-Fernandez, A., et al. (2010). "Design, demonstration and performance of a versatile electrospray aerosol generator for nanomaterial research and applications." *Nanotechnology* 21(25): 255603.

Johnston, H. J., Hutchison, G. R., et al. (2009). "Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics." *Part Fibre Toxicol* 6: 33.

Jones, P. A. and King, A. V. (2003). "High throughput screening (HTS) for phototoxicity hazard using the in vitro 3T3 neutral red uptake assay." *Toxicol In Vitro* 17(5-6): 703-8.

Kaluzhny, Y., Kandarova, H., et al. (2011). "Development of the EpiOcular(TM) eye irritation test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals in response to the requirements of the EU cosmetics directive and REACH legislation." *Altern Lab Anim* 39(4): 339-64.

Keene, A. M., Peters, D., et al. (2012). "Tissue and cellular distribution of gold nanoparticles varies based on aggregation/agglomeration status." *Nanomedicine (Lond)* 7(2): 199-209.

Kim, J. S., Song, K. S., et al. (2012). "Toxicogenomic comparison of multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) and asbestos." *Arch Toxicol* 86(4): 553-62.

Kinnula, V. L., Yankaskas, J. R., et al. (1994). "Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in vitro." *Am J Respir Cell Mol Biol* 11(5): 568-76.

Kittelson, D. B., Watts, W. F., et al. (2004). "On-road exposure to highway aerosols. 1. Aerosol and gas measurements." *Inhal Toxicol* 16 Suppl 1: 31-9.

Kiziler, A. R., Aydemir, B., et al. (2007). "High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects." *Biol Trace Elem Res* 120(1-3): 82-91.

Knebel, J. W., Ritter, D., et al. (1998). "Development of an in vitro system for studying effects of native and photochemically transformed gaseous compounds using an air/liquid culture technique." *Toxicol Lett* 96-97: 1-11.

Knebel, J. W., Ritter, D., et al. (2002). "Exposure of human lung cells to native diesel motor exhaust--development of an optimized in vitro test strategy." *Toxicol In Vitro* 16(2): 185-92.

Koch, R. (1884). "An Address on Cholera and its Bacillus." *Br Med J* 2(1236): 453-9.

Kolle, S. N., Kandarova, H., et al. (2011). "In-house validation of the EpiOcular(TM) eye irritation test and its combination with the bovine corneal opacity and permeability test for the assessment of ocular irritation." *Altern Lab Anim* 39(4): 365-87.

Konczol, M., Ebeling, S., et al. (2011). "Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF-kappaB." *Chem Res Toxicol* 24(9): 1460-75.

Kuehl, P. J., Barrett, E. G., et al. (2010). "Formulation development and in vivo evaluation of a new dry powder formulation of albuterol sulphate in beagle dogs." *Pharm Res* 27(5): 894-904.

Lam, C. W., James, J. T., et al. (2006). "A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks." *Crit Rev Toxicol* 36(3): 189-217.

Landsiedel, R., Ma-Hock, L., et al. (2010). "Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations." *Nanotoxicology* 4: 364-81.

Lawrence, R. S., Groom, M. H., et al. (1986). "The chorioallantoic membrane in irritation testing." *Food Chem Toxicol* 24(6-7): 497-502.

Lenz, A. G., Karg, E., et al. (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., et al. (1976). "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells." *Int J Cancer* 17(1): 62-70.

Lindl, T. and Gstraunthaler, G. (2008). "Zell- und Gewebekultur." *Spektrum Akademischer Verlag*(6).

Liu, B. Y. and Lee, K. W. (1975). "An aerosol generator of high stability." *Am Ind Hyg Assoc J* 36(12): 861-5.

Lopez, A. D. and Murray, C. C. (1998). "The global burden of disease, 1990-2020." *Nat Med* 4(11): 1241-3.

Ma-Hock, L., Gamer, A. O., et al. (2007). "Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials." *Inhal Toxicol* 19(10): 833-48.

Markesbery, W. R. (1997). "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease." *Free Radic Biol Med* 23(1): 134-47.

Marple, V. A., Liu, B. Y., et al. (1978). "A dust generator for laboratory use." *Am Ind Hyg Assoc J* 39(1): 26-32.

May, S., Jensen, B., et al. (2012). "Dissolution Techniques for In Vitro Testing of Dry Powders for Inhalation." *Pharm Res.*

Mio, T., Romberger, D. J., et al. (1997). "Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells." *Am J Respir Crit Care Med* 155(5): 1770-6.

Mitchell, J. P. and Nagel, M. W. (2003). "Cascade impactors for the size characterization of aerosols from medical inhalers: their uses and limitations." *J Aerosol Med* 16(4): 341-77.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.

NanoCare_Project_Partners (2009). "NanoCare - Health related Aspects of Nanomaterials."

Nardone, L. L. and Andrews, S. B. (1979). "Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors." *Biochim Biophys Acta* 573(2): 276-95.

Nassimi, M., Schleh, C., et al. (2010). "A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung." *Eur J Pharm Biopharm* 75(2): 107-16.

Nau, K. and Krug, H. F. (2009). "The NanoCare project: A German initiative on health aspects of synthetic nanoparticles." *Journal of Physics: Conference Series* 170.

Nazarenko, Y., Zhen, H., et al. (2012). "Potential for inhalation exposure to engineered nanoparticles from nanotechnology-based cosmetic powders." *Environ Health Perspect* 120(6): 885-92.

Newmark, P. (1989). "AIDS. Complexities and strategies." *Nature* 341(6243): 566-7.

Oberdorster, G. (2010). "Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology." *J Intern Med* 267(1): 89-105.

Okumura, H., Arashima, M., et al. (1999). "Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) Evaluation of cytotoxicity test on CHL cells." *Toxicol In Vitro* 13(1): 199-208.

Okuwa, K., Tanaka, M., et al. (2010). "In vitro micronucleus assay for cigarette smoke using a whole smoke exposure system: a comparison of smoking regimens." *Exp Toxicol Pathol* 62(4): 433-40.

Oravisjarvi, K., Pietikainen, M., et al. (2011). "Effects of physical activity on the deposition of traffic-related particles into the human lungs in silico." *Sci Total Environ* 409(21): 4511-8.

Orhan, H., Gurer-Orhan, H., et al. (2006). "Application of lipid peroxidation and protein oxidation biomarkers for oxidative damage in mammalian cells. A comparison with two fluorescent probes." *Toxicol In Vitro* 20(6): 1005-13.

Ostling, O. and Johanson, K. J. (1984). "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 291-8.

Oya, E., Ovrevik, J., et al. (2011). "DNA damage and DNA damage response in human bronchial epithelial BEAS-2B cells following exposure to 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone: role in apoptosis." *Mutagenesis* 26(6): 697-708.

Pacurari, M., Castranova, V., et al. (2010). "Single- and multi-wall carbon nanotubes versus asbestos: are the carbon nanotubes a new health risk to humans?" *J Toxicol Environ Health A* 73(5): 378-95.

Pape, W. J., Maurer, T., et al. (2001). "The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation programme on phototoxicity (phase II)." *Altern Lab Anim* 29(2): 145-62.

Pariselli, F., Sacco, M. G., et al. (2009). "Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549)." *Exp Toxicol Pathol* 61(4): 381-6.

Pariselli, F., Sacco, M. G., et al. (2009). "An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals." *Exp Toxicol Pathol* 61(1): 33-9.

Park, K., Cao, F., et al. (2003). "Relationship between particle mass and mobility for diesel exhaust particles." *Environ Sci Technol* 37(3): 577-83.

Pauluhn, J. (2008). "Inhalation toxicology: methodological and regulatory challenges." *Exp Toxicol Pathol* 60(2-3): 111-24.

Perso, C., Achard, S., et al. (2010). "An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells." *Toxicol Lett* 195(2-3): 99-105.

Petit, E., Chancerelle, Y., et al. (1995). "Polyclonal antibodies against malondialdehyde-modified proteins: characterization and application in study of in vitro lipid peroxidation of cellular membranes." *Biochem Mol Biol Int* 36(2): 355-64.

Pietikainen, M., Oravisjarvi, K., et al. (2009). "Exposure assessment of particulates of diesel and natural gas fuelled buses in silico." *Sci Total Environ* 408(1): 163-8.

Pilcer, G., Wauthoz, N., et al. (2012). "Lactose characteristics and the generation of the aerosol." *Adv Drug Deliv Rev* 64(3): 233-56.

Poland, C. A., Duffin, R., et al. (2008). "Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study." *Nat Nanotechnol* 3(7): 423-8.

Pollard, J. W. and Walker, J. M. (1997). "Basic Cell Culture Protocols." *Methods in Molecular Biology* 75(2).

Pouli, A. E., Hatzinikolaou, D. G., et al. (2003). "The cytotoxic effect of volatile organic compounds of the gas phase of cigarette smoke on lung epithelial cells." *Free Radic Biol Med* 34(3): 345-55.

Rateau-Matton, S., Ansoberlo, E., et al. (2004). "Comparative absorption parameters of Pu and Am from PuO₂ and mixed oxide aerosols measured after in vitro dissolution test and inhalation in rats." *Int J Radiat Biol* 80(10): 777-85.

Reddel, R. R., Ke, Y., et al. (1988). "Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes." *Cancer Res* 48(7): 1904-9.

Reich, S., Thomsen, C., et al. (2004). "Carbon Nanotubes: Basic Concepts and Physical Properties." *WILEY-VCH*.

Reilly, R. M. (2007). "Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine." *J Nucl Med* 48(7): 1039-1042.

Ritter, D., Knebel, J., et al. (2004). "Comparative assessment of toxicities of mainstream smoke from commercial cigarettes." *Inhal Toxicol* 16(10): 691-700.

Ritter, D., Knebel, J. W., et al. (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(5): 373-86.

Roche, D. G. (2007). "Cell Proliferation Reagent WST-1."

Roguet, R., Cohen, C., et al. (1994). "Episkin, a reconstituted human epidermis for assessing in vitro the irritancy of topically applied compounds." *Toxicol In Vitro* 8(2): 283-91.

Rothen-Rutishauser, B., Grass, R. N., et al. (2009). "Direct combination of nanoparticle fabrication and exposure to lung cell cultures in a closed setup as a method to simulate accidental nanoparticle exposure of humans." *Environ Sci Technol* 43(7): 2634-40.

Rovida, C. and Hartung, T. (2009). "Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t(4))." *ALTEX* 26(3): 187-208.

Russell, W. M. S. a. B., R.L. (1959). "The Principles of Humane Experimental Technique." *Methuen*.

Ryter, S. W., Kim, H. P., et al. (2007). "Mechanisms of cell death in oxidative stress." *Antioxid Redox Signal* 9(1): 49-89.

Savi, M., Kalberer, M., et al. (2008). "A novel exposure system for the efficient and controlled deposition of aerosol particles onto cell cultures." *Environ Sci Technol* 42(15): 5667-74.

Schick, S. and Glantz, S. (2005). "Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke." *Tob Control* 14(6): 396-404.

Schirnhof, L., Lamprecht, B., et al. (2007). "COPD prevalence in Salzburg, Austria: results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study." *Chest* 131(1): 29-36.

Schmalz, C., Wunderlich, H. G., et al. (2011). "Application of an optimized system for the well-defined exposure of human lung cells to trichloramine and indoor pool air." *J Water Health* 9(3): 586-96.

Schulze Isfort, C. and Rochnia, M. (2009). "Production and physico-chemical characterisation of nanoparticles." *Toxicol Lett* 186(3): 148-51.

Scott, L., Eskes, C., et al. (2010). "A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches." *Toxicol In Vitro* 24(1): 1-9.

Segura, R. A., Ibanez, W., et al. (2006). "Growth morphology and spectroscopy of multiwall carbon nanotubes synthesized by pyrolysis of iron phthalocyanine." *J Nanosci Nanotechnol* 6(7): 1945-53.

Seiler, A. E. and Spielmann, H. (2011). "The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro." *Nat Protoc* 6(7): 961-78.

Shapiro, D. L., Nardone, L. L., et al. (1978). "Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells." *Biochim Biophys Acta* 530(2): 197-207.

Shi, Q. and Gibson, G. E. (2007). "Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease." *Alzheimer Dis Assoc Disord* 21(4): 276-91.

Silverman, E. K., Vestbo, J., et al. (2011). "Opportunities and challenges in the genetics of COPD 2010: an International COPD Genetics Conference report." *COPD* 8(2): 121-35.

Soto, K., Garza, K. M., et al. (2007). "Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials." *Acta Biomater* 3(3): 351-8.

Spielmann, H., Balls, M., et al. (1998). "The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test." *Toxicol In Vitro* 12(3): 305-27.

Spielmann, H., Hoffmann, S., et al. (2007). "The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test." *Altern Lab Anim* 35(6): 559-601.

Spielmann, H., Kalweit, S., et al. (1993). "Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals." *Toxicol In Vitro* 7(4): 505-10.

Spielmann, H., Muller, L., et al. (2000). "The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 42." *Altern Lab Anim* 28(6): 777-814.

Steerenberg, P. A., Zonnenberg, J. A., et al. (1998). "Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro." *Exp Lung Res* 24(1): 85-100.

Stern, M., Klausner, M., et al. (1998). "Evaluation of the EpiOcular(TM) Tissue Model as an Alternative to the Draize Eye Irritation Test." *Toxicol In Vitro* 12(4): 455-61.

Stevens, J. P., Zahardis, J., et al. (2008). "A new method for quantifiable and controlled dosage of particulate matter for in vitro studies: the electrostatic particulate dosage and exposure system (EPDExS)." *Toxicol In Vitro* 22(7): 1768-74.

Stokes, G. G. (1851). *Trans. Cambridge Philos. Soc.* 9(8).

Sutachan, J. J., Casas, Z., et al. (2012). "Cellular and molecular mechanisms of antioxidants in Parkinson's disease." *Nutr Neurosci* 15(3): 120-6.

Swain, R. J., Kemp, S. J., et al. (2010). "Assessment of cell line models of primary human cells by Raman spectral phenotyping." *Biophys J* 98(8): 1703-11.

Tang, T., Gminski, R., et al. (2012). "Investigations on cytotoxic and genotoxic effects of laser printer emissions in human epithelial A549 lung cells using an air/liquid exposure system." *Environ Mol Mutagen* 53(2): 125-35.

Tarkington, B. K., Wu, R., et al. (1994). "In vitro exposure of tracheobronchial epithelial cells and of tracheal explants to ozone." *Toxicology* 88(1-3): 51-68.

Taylor, G. (1964). "Desintegration of water drops in an electric field." *Proceedings of the Royal Society* 280(1382): 383-397.

Tchao, R. (1988). "Trans-epithelial permeability of fluorescein in vitro as an assay to determine eye irritants." *Alternative Methods in Toxicology* 6.

Tice, R. R., Agurell, E., et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." *Environ Mol Mutagen* 35(3): 206-21.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., et al. (2009). "Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles." *Int J Environ Res Public Health* 6(2): 445-62.

van der Toorn, M., Rezayat, D., et al. (2009). "Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(1): L109-14.

Van Miert, E., Vanscheeuwijck, P., et al. (2008). "Evaluation of the micronucleus assay in bone marrow and peripheral blood of rats for the determination of cigarette mainstream-smoke activity." *Mutat Res* 652(2): 131-8.

Voshaar, T., Hausen, T., et al. (2005). "[Inhalation therapy with Respimat soft inhaler in patients with COPD and asthma]." *Pneumologie* 59(1): 25-32.

Wagner, A. and Jahreis, G. (2004). "Nachweis von DNA-Schäden mittels Analyse von oxidierten Nukleosiden und deren Anwendung als Biomarker." *Ernährungs-Umschau* 51(5).

Wijte, D., Alblas, M. J., et al. (2011). "Toxic effects following phosgene exposure of human epithelial lung cells in vitro using a CULTEX(R) system." *Toxicol In Vitro* 25(8): 2080-7.

Williams, E. S., Panko, J., et al. (2009). "The European Union's REACH regulation: a review of its history and requirements." *Crit Rev Toxicol* 39(7): 553-75.

Winton, H. L., Wan, H., et al. (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(10): 1273-85.

Wolz, L., Krause, G., et al. (2002). "In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line." *Food Chem Toxicol* 40(6): 845-50.

Wright, B. M. (1950). "A New Dust-Feed Mechanism." *J. Sci. Instrum.* 27(1).

Xie, Y., Williams, N. G., et al. (2012). "Aerosolized ZnO nanoparticles induce toxicity in alveolar type II epithelial cells at the air-liquid interface." *Toxicol Sci* 125(2): 450-61.

Yu, M. F., Files, B. S., et al. (2000). "Tensile loading of ropes of single wall carbon nanotubes and their mechanical properties." *Phys Rev Lett* 84(24): 5552-5.

Yu, M. F., Lourie, O., et al. (2000). "Strength and breaking mechanism of multiwalled carbon nanotubes under tensile load." *Science* 287(5453): 637-40.

Zamora, P. O., Gregory, R. E., et al. (1986). "An in vitro model for the exposure of lung alveolar epithelial cells to toxic gases." *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 7(1-2): 159-68.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Niklas Möhle
Geburtstag: 11.09.1978
Geburtsort: Hannover
Nationalität: Deutsch

Schulbildung

1985-1986 Peter-Petersen-Schule, Hannover (Vorschule)
1986-1990 Peter-Petersen-Schule, Hannover (Grundschule)
1990-1992 Peter-Petersen-Schule, Hannover (Orientierungsstufe)
1992-1999 Elsa-Brändström-Schule, Hannover (Gymnasium)
Abschluss: Abitur

Studium und Arbeitserfahrung

2000-2006 Studium der Biologie, Universität Hannover
Abschluss: Diplom der Biologie
2006-2007 Volontär an der *School of Chemistry and Molecular Biosciences* der
University of Queensland, Brisbane, Australien
2007-heute Angestellter der Firma Cultex Laboratories GmbH
2011-2013 Promotion am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen:

“Analytical in vitro approach for studying cyto- and genotoxic effects of particulate airborne material”

M. Aufderheide, S. Scheffler, N. Möhle, B. Halter, D. Hochrainer

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011; Volume 401, Number 10

BMBF-Forschungsvorhaben: 03 157 10 (Teilprojekte A, B und C)

Prävalidierung und Validierung der CULTEX-Methode: In-vitro-Bestimmung der akuten Toxizität inhalativ wirkender Feinstäube und Nanopartikel nach Direktexposition kultivierter Zellen vom Respirationstrakt des Menschen

Poster:

2009

“An Efficient Direct Exposure Method for Studying the Effects of Native Atmospheres – The CULTEX[®] (RFS) System”

N. Möhle and M. Aufderheide

EuroTox 2009, Dresden

2011

“Pre-validation of the CULTEX[®] system: Assessing the acute inhalation toxicity of nanoparticles by direct exposure of cells via the air-liquid interface”

S. Hoffmann, N. Möhle, M. Papritz, C. Pohl, M. Aufderheide

The 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal

2011

“Need and Perspectives for the Implementation of Relevant In Vitro Methods in the Field of Inhalation Toxicology”

N. Möhle, J. Rach, S. Scheffler, D.-J. Budde, M. Aufderheide

The 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal

2011

“Experimental study of aerosol cell exposure with an air-liquid interface”

M. Deutscher, N. Möhle, H. Bresch, S. Seeger, M. Aufderheide

EuroTox 2011, Paris

2011

“Prevalidation of the CULTEX[®] method: *In-vitro* analysis of the acute toxicity of inhalable fine dusts and nanoparticles after direct exposure of cultivated human cells from the respiratory tract”

N. Möhle, C. Pohl, M. Papritz, D. Steinritz, U. Mohr, S. Hoffmann, C.J. Kirkpatrick, M. Aufderheide

European Aerosol Conference, Manchester

Vorträge:

2011

“The CULTEX[®] approach for studying particles and other airborne material *in-vitro*”

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Frankfurt

2011

“The technical approach for studying particles and other airborne material *in vitro*”

Cultex Workshop, Hannover

2012

„In vitro Bestimmung der akuten Toxizität“

Arbeitstagung medizinischer C-Schutz, Bundeswehr München