

Etablierung eines Testsystems zum Nachweis einer pulmonalen Schädigung durch eingeatmete Nanopartikel

Impressum

Medieninhaber, Verleger und Herausgeber:

Bundesministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie, Mobilität, Innovation und
Technologie, Radetzkystraße 2, 1030 Wien

Autorinnen und Autoren: XXX

Gesamtumsetzung: XXX

Fotonachweis:

Druck: XXX

Wien, 2020. Stand: 31. Jänner 2021

Copyright und Haftung:

Auszugsweiser Abdruck ist nur mit Quellenangabe gestattet, alle sonstigen Rechte sind ohne schriftliche Zustimmung des Medieninhabers unzulässig.

Es wird darauf verwiesen, dass alle Angaben in dieser Publikation trotz sorgfältiger Bearbeitung ohne Gewähr erfolgen und eine Haftung des Bundeskanzleramtes und der Autorin/des Autors ausgeschlossen ist. Rechtausführungen stellen die unverbindliche Meinung der Autorin/des Autors dar und können der Rechtsprechung der unabhängigen Gerichte keinesfalls vorgreifen.

Rückmeldungen: Ihre Überlegungen zu vorliegender Publikation übermitteln Sie bitte an empfaenger@bmk.gv.at.

Vorwort

Gesundheitliche Folgen einer Exposition mit Nanopartikeln wurden vor allem für die Aufnahme über die Atemluft beschrieben. Selbst wenn die in der Luft vorhandenen Mengen nicht sehr hoch sind, könnte die wiederholte Exposition mit diesen geringen Mengen zu einer Schädigung der Lunge führen, welche sich möglicherweise durch die Einführung geeigneter Schutzmaßnahmen verhindern ließe. Es existieren unterschiedliche Arten von Nanopartikel. Im vorliegenden Projekt werden Nanostäube von TiO₂, SiO₂) und ZnO behandelt. Diese industriell verwendeten Nanopartikel kommen beispielsweise in der Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie zum Einsatz. Das Ziel des im Schwerpunkt 1 des Nano EHS Programms die Bereitstellung von „Systemen und Testmethoden zur Messung der inhalativen Belastung durch Feinstaub aus anthropogenen Nanomaterialien“ geförderten Projektes „NanoLunCh“ war die Entwicklung von zwei unterschiedlichen physiologisch relevanten biologischen Testsystemen, die sich zur Erfassung der pulmonalen Wirkungen einer inhalativen Partikelexposition nutzen lassen.

Inhalt

Vorwort	3
Einleitung	5
Voraussetzungen für die physiologisch relevante Testung	7
Charakterisierung der Partikel	9
Hydrodynamischer Durchmesser	11
Oxidatives Potential der Partikelsuspensionen	14
Zusammenfassung der Charakterisierung der Nanopartikel	16
Etablierung und Charakterisierung der zellulären Modelle	17
Darstellung des stationären System	17
Wahl der Partikelkonzentration	18
Etablierung des statischen Co-Kultursystems	18
Bestimmung der Kurzzeit-Zytotoxizität der Partikel in konventioneller Kultivierung	20
Beschreibung des dynamischen Systems – Lunge am Chip	21
Aufbau der Lunge am Chip mittels Rapid Prototyping	23
Biosensorik	26
Integration der Co-Kultur	28
Validierung des Systems: Ergebnisse der Partikeltestung	29
Ergebnisse der Testung im statischen System	29
Ergebnisse der Testung im dynamischen System	32
Schlussfolgerungen und Ausblick	39
Tabellenverzeichnis	41
Abbildungsverzeichnis	42
Literaturverzeichnis	44
Abkürzungen	48

Einleitung

Zur Abschätzung einer eventuellen Gefährdung durch Inhalation von Partikeln sind nicht nur die physikochemischen Eigenschaften der Partikel und deren Konzentration in der Atemluft, sondern auch die Dauer der Exposition, das Ausmaß der Deposition in der Lunge, und deren zelluläre Wirkung entscheidend. Manche dieser Parameter lassen sich nur abschätzen. Da die Bestimmung über Tierversuche nicht nur ethisch bedenklich, sondern auch beschränkt repräsentativ für die Situation beim Menschen ist, gewinnen zelluläre Systeme für die Beurteilung der pulmonalen Toxizität an Bedeutung.

Die Schädigung von Lunge und Kreislauf durch erhöhte Exposition mit Stäuben ist seit einigen Jahren bekannt. Epidemiologische Studien ergaben, dass in Gegenden mit hoher Staubbelastung nicht nur die Inzidenz von Lungenerkrankungen, wie Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, und Lungenentzündung, erhöht ist, sondern auch Herz-Kreislaufkrankungen, wie Arteriosklerose, Herzinfarkt, und Schlaganfall, häufiger auftraten (Terzano et al., 2010).

Es liegen wenige Daten zu den, in der Lunge vorliegenden, Partikeldosen vor. Messungen an Arbeitsplätzen in der Luft, kombiniert mit Simulationen der Partikeldeposition gehen von 2.8 ng/cm² - 2.4 µg/cm² Lungenoberfläche aus (Chortarea et al., 2015). Auf die gesamte Lebensarbeitszeit wird von einer in der Lunge deponierten Dosis von 12.4 - 46.5 µg/cm² (Gangwal et al., 2011) ausgegangen.

In der vorliegenden Studie wurden Partikel mit unterschiedlichem Zytotoxizitätspotential verwendet, wobei, bei ähnlicher Größe, ZnO als das am meisten zytotoxische Material gilt (Zhang et al., 2011). Diese Partikel haben unterschiedliche pro-inflammatorische Wirkungen, wobei die Bestimmung der Interleukine 6 und 8 als sensitiver Parameter zur Bestimmung von Nanotoxizität gilt (Elsabahy et al., 2012). Die Induktion von oxidativem Stress ist eine der Hauptursachen für die zytotoxische Wirkung von Nanopartikeln, wobei Zinkoxid (ZnO) eine größere Menge dieser reaktiven Spezies produzieren als Titandioxid (TiO₂) und Siliziumdioxid (SiO₂) Partikel (Setyawati et al., 2015).

Der Bericht des von der Europäischen Union geförderten Projektes PATROLS (H2020-NMBP-2017) beschreibt, dass bei wiederholter intratrachealer Administration von ZnO Nanopartikeln die entzündlichen Veränderungen in der Lunge gegenüber der akuten Reaktion abgeschwächt waren. Bei TiO₂ wurden progrediente strukturelle Veränderungen in der Lunge beobachtet und bei Behandlung mit amorphen SiO₂ Nanopartikeln entstand eine Fibrosierung der Lunge (https://www.patrols-h2020.eu/about-us/downloads/D2.1_NRCWE.pdf).

Voraussetzungen für die physiologisch relevante Testung

Die zelluläre Testung, welche eine Aussage über die Situation im lebenden Menschen hat, erfordert die Präsentation der Partikel in realistischer Art und die Verwendung eines geeigneten biologischen Testsystems.

Obwohl die Testung von Pharmaka, Toxinen und Partikeln in Tieren, üblicherweise Ratten oder Mäusen, nach wie vor Standard in der Toxizitätstestung ist, sprechen mehrere Gründe für die Verwendung zellulärer Systeme. Zum einen sind dies die Unterschiede im Aufbau und der Funktion der Atmung zwischen Nagern und Menschen. Nager haben nicht nur eine wesentlich höhere Atemfrequenz (Ratte: 85/min; Maus: 150/min; Mensch: 12-15/min), welche die Partikeldeposition in der Lunge mitbestimmt, sie atmen auch ausschließlich durch die Nase, während bei Menschen eine Kombination von Mund- und Nasenatmung vorliegt (Fröhlich et al., 2014). Auch die Verzweigung des Bronchialtraktes zeigt entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Spezies. Zum anderen fordert die Europäische Union mit ihrer Direktive (Directive 2010/63/EU) von 2010 die Umsetzung des 3Rs Prinzips (reduction, replacement, refinement) in ihren Mitgliedsstaaten mit dem Fernziel, in der Zukunft ganz auf Tierversuche zu verzichten. Diese Entwicklungen werden gefördert durch die Verfügbarkeit verbesserter Zellkulturmodelle. Die ersten Abschätzungen der pulmonalen Toxizität von Nanopartikeln erfolgten mittels Untersuchung von in Plastischalen submers wachsenden Zellen, welche mit hohen Konzentrationen von in einer großen Menge Zellkulturmedium suspendierten Partikeln für 24 – 72h in Kontakt gebracht wurden. Auch wenn diese ersten Testungen wertvolle Information über die Wirkungen von inhalierten Partikeln lieferten, war ihr prädiktiver Wert für die menschliche Exposition aus heutiger Sicht gering. In der Zwischenzeit wurden die Zellkulturmodelle verfeinert und es zeigte sich, dass die Einführung von Polarität, Strömung und mechanischen Kräften zu einer deutlichen größeren Ähnlichkeit dieser kultivierten Zellen mit der Reaktion im Körper führte (Jensen et al., 2020). Eine Einschränkung der routinemäßig eingesetzten Zellkultivierung ist die Verwendung lediglich eines Zelltyps, während im Körper mehrere Zelltypen zusammen die Reaktion eines Toxins bestimmen. In der Lunge sind neben den Epithelzellen des Respirationstraktes alveoläre Makrophagen für die pulmonale Reaktion entscheidend. Auch wenn sie nur 10-mal

seltener vorkommen als die alveolaren Epithelzellen, haben sie eine herausragende Funktion in der gesunden Lunge, da sie dafür sorgen, dass es zu keinen Entzündungen in der Lunge kommt (Jantzen et al., 2012). Die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führt, wie man gut bei chronischen Lungenerkrankungen sehen kann, zu einer strukturellen Veränderung der Lunge mit progredienter Einschränkung der Lungenfunktion.

Bezüglich des Konzentrationsbereiches der Partikel wurde bekannt, dass, im Gegensatz zu Chemikalien, das Ergebnis der Testung höherer Partikelkonzentrationen keinen Rückschluss auf die Wirkung geringer Dosen zulässt und dass es bei Partikeln zu einer Anhäufung in Körperzellen kommen kann. Ebenfalls wurde klar, dass sich Partikeleigenschaften im Kontakt mit Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, wesentlich verändern (Lundqvist et al., 2011). In der Pharmazie werden simulierte Körperflüssigkeiten mit standardisierter Zusammensetzung zur Untersuchung der Arzneimittelfreisetzung verwendet (Radivojev et al., 2019).

Aus diesen Gründen muss ein physiologisch relevantes Testsystem für die Lungenexposition folgende Eigenschaften haben:

- Präsentation der Partikel als Aerosol oder in der Flüssigkeit, mit der sie als erstes in Kontakt kommen
- Verwendung eines Kultursystems, in dem die Zellen an der Luft-Flüssigkeitsgrenze wachsen
- Testung eines Systems, welches Epithelzellen und Makrophagen beinhaltet

Basierend auf diesen Voraussetzungen wurden zwei Systeme, beide basierend auf der Co-Kultivierung von alveolären Epithelzellen und Makrophagen auf Membranen an der Luft-Flüssigkeitsgrenze etabliert. Das dynamische Modell (Lungenchip) enthält überdies einen Medienfluss an der basalen Seite der Zellen, welcher die Effekte des vorbeiströmenden Blutes im Lungenkreislauf simuliert.

Zur realistischen Darbietung wurden die Partikel in einem geringen Volumen simulierter Lungenflüssigkeit suspendiert. Hiermit kann der Partikelverlust durch variable Adhäsion der Partikel an den Wänden der Expositionseinrichtung vermieden werden und eine konstante Menge an Partikeln appliziert werden. Diese sind in einem Zustand, in dem sie auch nach Kontakt mit körpereigener Lungenflüssigkeit wären.

Charakterisierung der Partikel

Um die Testung in einem geeigneten biologischen Testsystem repräsentativ durchzuführen, müssen Protokolle zur Herstellung definierte Partikelsuspensionen entwickelt werden. Darstellung der oxidierenden Eigenschaften der Partikel über azelluläre Test ergänzt diese Charakterisierung.

Die eingesetzten Nanopartikel wurden über das Nanomaterials Repository des JRC (Joint Research Centre) bezogen. Es handelte sich um die Materialien Titandioxid (TiO₂; NM 101), Zinkoxid (ZnO; NM 110) und Siliziumdioxid (SiO₂; NM 200). Die Auswahl dieser Stäube hatte den Vorteil, dass bereits Arbeiten zu deren Charakterisierung vorliegen, die im Rahmen früherer Projekte entstanden sind (NANOGENOTOX; <https://www.anses.fr/en/content/nanogenotox-project>). So bestand bereits eine Referenz für die Messungen im Projekt NanoLunCh.

Zunächst wurde eine Aerosolmessstrecke aufgebaut, die eine Charakterisierung der Stäube im luftgetragenen Zustand ermöglichte. Dabei wurde die Größenverteilung über die Anzahlkonzentration beschrieben. In der Folge wurden die Partikel ausgewaschen, da für die zellulären Tests Suspensionen benötigt wurden. Die Versuche zum Auswaschen der Partikel sollten darstellen, ob dieser Prozess zu einer anderen Größenverteilung der Nanopartikel in der flüssigen Phase führt als die direkte Herstellung der Partikelsuspensionen durch das Einwiegen der Nanopartikel in das flüssige Medium.

Die Aerosolmessstrecke umfasste einen Aerosolgenerator, der den Partikelstrom in einen Aerosolkanal dosiert, der mit Reinluft durchströmt wird. Der Aerosolkanal hatte 1,7 m Länge und einen Durchmesser von 24 cm. Aus diesem Aerosolkanal kann an zwei Entnahmestellen Probe abgezogen werden, um diese über Teilchenzähler zu charakterisieren, beziehungsweise die Partikel in ein flüssiges Sammelmedium auszuwaschen. Die Reinluft wird aus der Raumluft, durch Reinigung über einen Absolutfilter hergestellt. Auch der, aus dem Aerosolkanal austretende, Luftstrom wird über entsprechende Filter aufgereinigt. Die Apparatur wird im Detail bei Strasser (2020) beschrieben. Abbildung 1 zeigt ein Schema der Aerosolteststrecke.

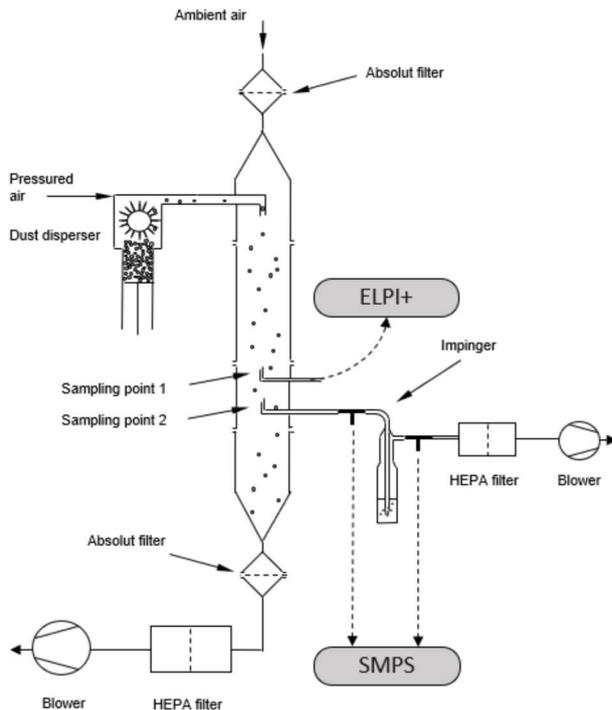


Abbildung 1 Aerosolteststrecke (aus: Strasser 2020)

Als Aerosolgenerator wurde wahlweise ein Palas RBG 2000 zum Dispergieren trockener Partikel und ein Palas AGF 2.0 zum Dispergieren von Partikeln aus einer Flüssigkeit verwendet. Für die Bestimmung der Anzahlgrößenverteilung wurden ein SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer, TSI 3080) und ein ELPI+ (Electrical Low Pressure Impactor, Dekati) verwendet. So konnte der Größenbereich von 10 nm bis 1000 nm dargestellt werden. Das Auswaschen der Partikel aus einem Teilstrom erfolgte über Impinger, wobei zwei Einheiten in Serie geschaltet wurden und die Abscheidung durch die Zugabe von Glaskugeln erhöht wurde.

In Abbildung 2 wird exemplarisch eine Anzahlgrößenverteilung für TiO₂ dargestellt, die mit dem SMPS bestimmt wurde. Das Konzentrationsmaximum lag im Größenkanal, der den Bereich von 51 – 53 nm darstellt. Für die Materialien SiO₂ und ZnO lagen die entsprechenden Durchmesser bei 69 – 71 nm und 79 – 82 nm. Auffällig war, dass die Größenverteilungen für SiO₂ und ZnO breiter waren als für TiO₂.

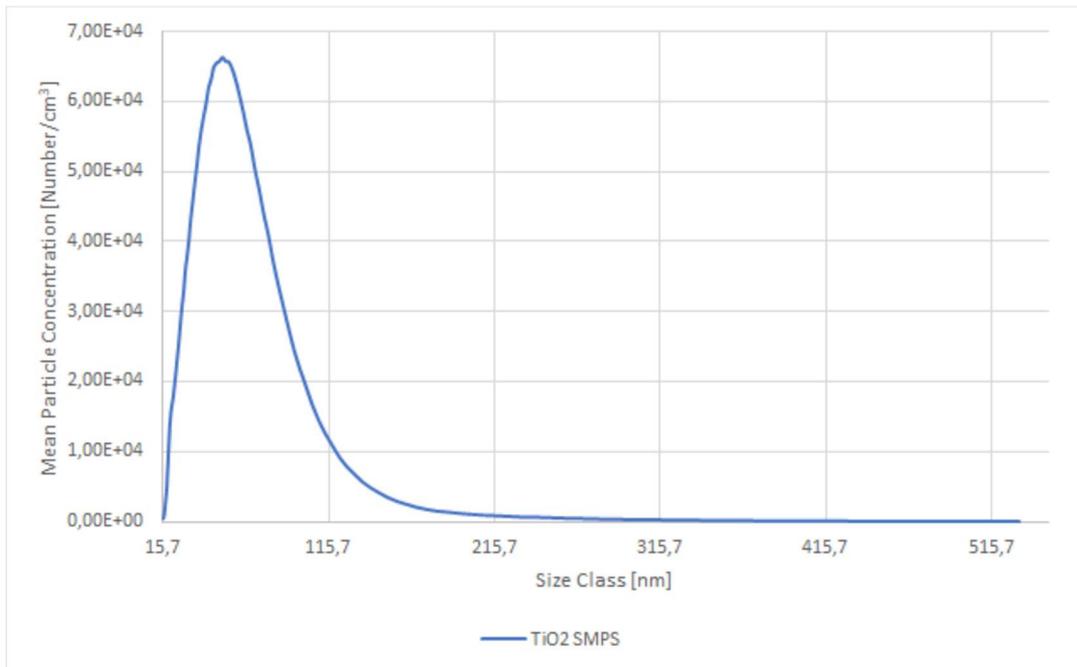


Abbildung 2 Anzahlgrößenverteilung für TiO₂, dargestellt mittels SMPS (aus: Strasser 2020)

Die Versuche mit dem Impinger zeigten, dass für Partikel unter 115 nm eine gute Abscheidung (> 80%) erzielt wurde. Im Bereich größerer Partikel, die verstärkt zur Massenkonzentration beitragen, nahm dieser Wert allerdings deutlich ab. Die Bestimmung der Massenkonzentration der Nanopartikel in der Flüssigkeit ist somit nicht eindeutig zu bestimmen. Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel, die nun in Suspension vorlagen, wurde mit einem LiteSizer (LiteSizer 500 der Fa. Anton Paar) ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Partikel sofort Agglomerate bildeten und die Flüssigkeiten im Impinger nicht von händisch hergestellten Suspensionen zu unterscheiden waren. Aus diesen beiden Gründen wurde in der Folge darauf verzichtet, die Suspensionen durch das Auswaschen der luftgetragenen Partikel herzustellen. Stattdessen wurden die Nanomaterialien direkt in die Flüssigkeiten eingewogen.

Hydrodynamischer Durchmesser

Die Suspendierung der Partikel wurde in Anlehnung an die Suspendierungsprotokolle des JRC- und NANOGENOTOX-Projektes durchgeführt, wobei diese für die Notwendigkeiten des Projektes abgewandelt wurden.

Das simulierte Lungenfluid (SLF) wurde als Mischung aus einem PBS-Puffer (pH 7,4; phosphate-buffered saline) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) hergestellt. Der PBS-Puffer wurde über eine Chelex-Säule aufbereitet, um Metalle, wie beispielsweise Eisen und Kupfer, aus dem Puffer zu entfernen. Als Ersatz für das Surfactant wurde der Pufferlösung DPPC mit einem Anteil von 0,02 % zugesetzt. Die eingewogenen Partikel wurden mit dem SLF versetzt und im Ultraschallbad suspendiert (20 min).

Zur Beurteilung der Qualität der Suspensionen wurde der hydrodynamische Durchmesser der Partikel in der Suspension nach dem Dispergieren bzw. Re-Dispergieren gemessen. Die Partikel wurden hierzu direkt nach der Homogenisierung im Ultraschallbad, und nach 90 Minuten und Re-Suspendierung mit Schütteln und mittels Vortexmischer analysiert. Zur Darstellung der Langzeitstabilität wurde der Prozess des Re-Suspendierens im Ultraschallbad sowie über Schütteln und Vortexmischer verglichen. Der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel wurde mit einem LiteSizer 500 der Fa. Anton Paar bestimmt. Das zugrundeliegende Messprinzip ist die Dynamische Lichtstreuung (DLS). Es wurden die Konzentrationen von 1000 µg/mL und 2500 µg/mL betrachtet. Zur Darstellung der Langzeitstabilität wurde am Tag 1, sowie nach 7 und 30 Tagen gemessen.

Die Titandioxidnanopartikel wurden sowohl in Suspension mit simuliertem Lungenfluid als auch mit ultrareinem Wasser (MilliQ, 18 MOhm) gemessen, um die Vergleichbarkeit zu den Messungen des JRC- und NANOGENOTOX-Projektes zu gewährleisten. Die hydrodynamischen Durchmesser der Titandioxidpartikel in einer Suspension mit ultrareinem Wasser sind bei einer Konzentration von 2500 µg/mL kleiner als bei 1000 µg/mL. Aufgrund der Varianz der Messungen ist dieser Unterschied nicht bei allen Messserien signifikant. Im Allgemeinen liegen die Partikelgrößen im Bereich zwischen 400 und 700 nm. Dies ist auf eine Aggregation der Nanopartikel in Suspension zurückzuführen. Mit den vorhandenen Probenvorbereitungsmethoden (Ultraschallbad, Schütteln und Vortexmischer) ist eine Zerstörung der Agglomerate nicht möglich. Hierfür wären leistungsstärkere Ultraschallsonden notwendig. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkung konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse mit den Literaturdaten vergleichbar waren. (Joint Research Centre, 2014)

Der hydrodynamische Durchmesser der Titandioxidnanopartikel im simulierten Lungenfluid ist in Abbildung 3 dargestellt und liegt für beide Konzentrationswerte (1000 und 2500 µg/mL) über den Ergebnissen für ultrareines Wasser. Dies entspricht der Erwartung, dass bei höherer Ionenstärke größere Agglomerate gebildet werden. Außerdem zeigt sich, dass die unterschiedlichen Probenvorbereitungsarten vergleichbar

sind und die Suspension nach Re-Suspendierung stabile Agglomeratgrößen zeigt. Messungen ohne Re-Suspendierung zeigen, dass eine Sedimentation der großen Agglomerate stattgefunden hat und lediglich die kleineren Partikel in Schwebelage und damit detektierbar bleiben. Auf eine Homogenisierung der Probe vor der Entnahme einer Teilmenge ist daher zu achten.

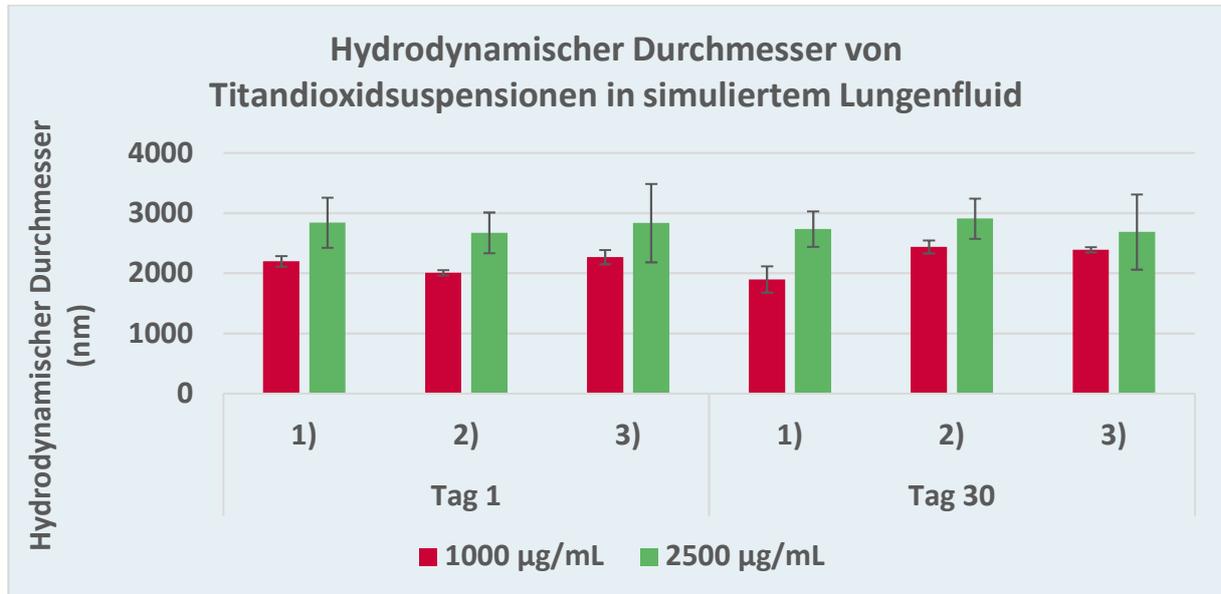


Abbildung 3 Hydrodynamische Durchmesser von Titandioxidsuspensionen in simuliertem Lungenfluid mit den Konzentrationen 1000 und 2500 µg/mL an zwei verschiedenen Tagen; 1) Ultraschallbad, 2) Schütteln, 3) Vortexmischen

Zinkoxidpartikel zeigen, als Suspension im simulierten Lungenfluid, eine Agglomeration zu Partikelagglomerate im Bereich zwischen 1000 und 2000 nm. Die Suspensionen zeigen allerdings keine Langzeitstabilität. Nach 30 Tagen konnte die ursprüngliche Partikelgröße mit keinem Re-Suspendierungsverfahren erreicht werden. Im Vergleich mit den Titandioxidpartikeln ist zwischen den unterschiedlichen Suspendierungsarten eine größere Varianz gegeben. Für die Siliziumdioxidnanopartikel konnte auf Basis der hier angewandten Methode kein hydrodynamischer Durchmesser ermittelt werden, da die Bildung sehr großer Agglomerate (einige µm) beobachtet wurde, welche mit den hier verwendeten Homogenisierungsverfahren nicht zerstört werden konnten.

Oxidatives Potential der Partikelsuspensionen

Das „oxidative Potential“ einer Substanz kann als Fähigkeit definiert werden Zielmoleküle, wie Antioxidantien, zu oxidieren und reaktive Sauerstoffspezies (ROS – reactive oxygen species) katalytisch zu generieren. (Bates et al., 2019) Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und dem gleichzeitigen Abbau von Antioxidantien verursachen Substanzen mit einem hohen oxidativen Potential auch oxidativen Stress. Dieser entsteht, wenn mehr oxidierende Substanzen, beispielsweise in Form von ROS, als antioxidative Agentien vorliegen. ROS können an Partikel gebunden inhaled, im Körper intrinsisch oder zellvermittelt gebildet werden. (Bates et al., 2019; Molina et al., 2020). Das oxidative Potential wurde mit dem Dithiothreitol- (DTT-) Assay und dem Ascorbic Acid- (AA-) Assay ermittelt. Beide Assays werden häufig für die Bestimmung des oxidativen Potentials von Feinstaubproben genutzt. Außerdem wurden sie bereits mit Nanopartikelsuspensionen eingesetzt.

Dithiothreitol wirkt durch die beiden vorliegenden Thiolgruppen als Reduktionsmittel und ist ein Analogon zu körpereigenen Antioxidantien, wie beispielsweise Glutathion oder dem Zelloxidant NADPH. (Pietrogrande et al., 2019a) Durch die Anwesenheit von Metallen oder organischen Spezies, im Speziellen Phenanthrenchinon, kann Dithiothreitol katalytisch zum Disulfid oxidiert werden. Über eine zweite Reaktion mit dem Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB) wird das verbleibende DTT zu dem Disulfid und 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) umgesetzt, welches ein Absorptionsmaximum bei 412 nm hat und dadurch mittels UV/Vis-Detektion quantifizierbar ist. (Li et al., 2009)

Ascorbinsäure stellt ein körpereigenes Antioxidant dar. Der Abbau der Ascorbinsäure erfolgt über Elektronenübertragung zwischen Ascorbinsäure und Sauerstoff, wobei dieser Prozess durch redoxaktive Spezies katalysiert wird. (Pietrogrande et al., 2019b) Die Proben wurden auf 37 °C in einem Schüttelinkubator temperiert, anschließend Ascorbinsäure zugegeben, sodass die Konzentration in der Probe mit 35 mg/L dem physiologischen Zustand von 200 µM entsprach. Nach maximal 180 Minuten wurden Proben gezogen und die verbleibende Ascorbinsäure mittels einer chromatographischen Methode und UV-Detektion bei 260 nm bestimmt. (Godri, 2011)

In **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** sind die Ascorbinsäurekonzentrationen (in µmol/L) der drei Nanopartikelsuspensionen bei den Zeitpunkten 0, 60, 120 und 180 Minuten gegeben. Die Stäube TiO₂ und SiO₂ zeigten keinen signifikanten Abbau. Die Ergebnisse entsprechen, bei hoher Varianz, dem

Blindwert. Lediglich ZnO zeigt eine signifikante Abnahme der Ascorbinsäurekonzentrationswerte. Arbeiten von Fukui et al. haben gezeigt, dass ZnO – Nanopartikel und Ascorbinsäure in Wechselwirkung treten, indem Zn^{2+} -Ionen aus den Partikeln ins Medium gelangen und dort mit Ascorbinsäure einen Komplex bilden. (Fukui et al., 2012; Fukui et al., 2017) Es gibt jedoch keinen Hinweis darauf, dass der Zn-Ascorbinsäure-Komplex eine Absorptionsänderung bewirkt. Die Arbeit von Peijnenburg et.al. zeigen ebenfalls einen Einfluss von Zn^{2+} -Ionen. (Peijnenburg et al., 2020)

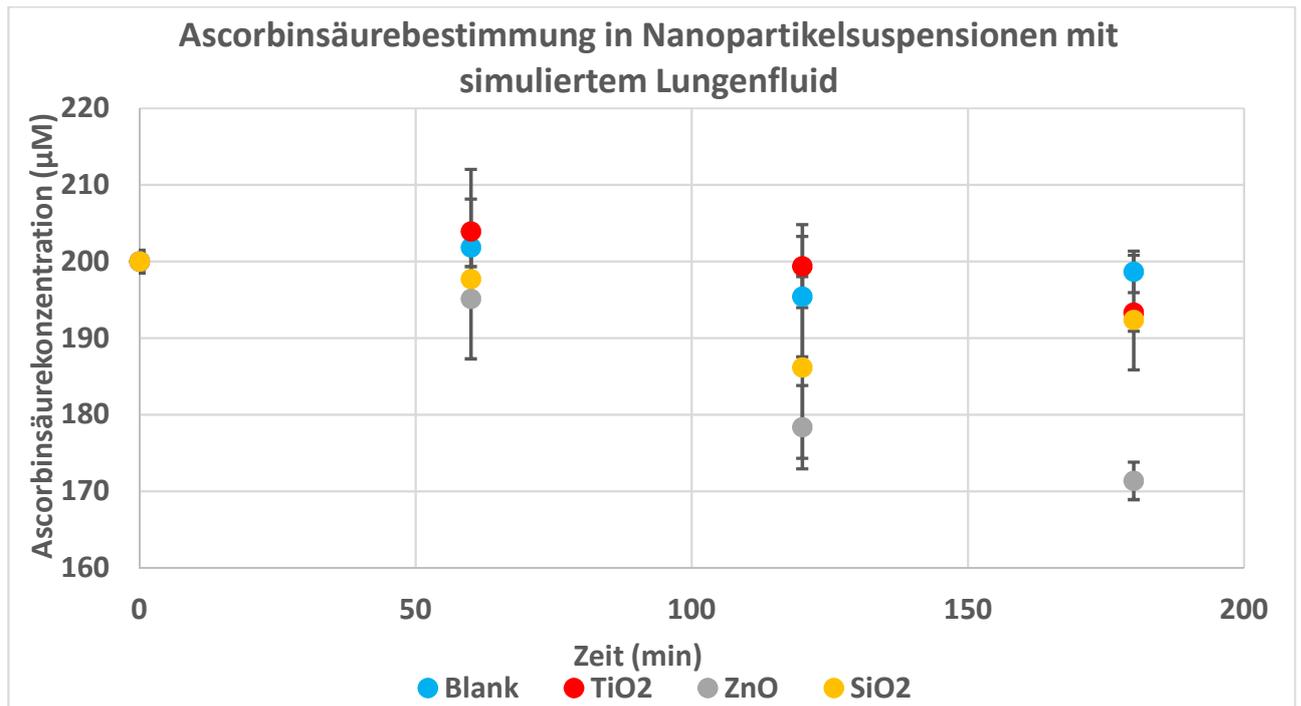


Abbildung 4 Konzentration von Ascorbinsäure im Kontakt mit den jeweiligen Nanopartikeln in einer Konzentration von 2500 µg/mL in simuliertem Lungenfluid

Auch für den DTT-Assay konnte, wie aus Abbildung 5 ersichtlich, kein Abbau des Antioxidans in den Nanopartikelsuspensionen dargestellt werden. Allerdings lagen die Konzentrationswerte von DTT, die in den Suspensionen von ZnO bestimmt wurden, deutlich geringer als erwartet. Dies ist vermutlich auf eine Komplexierung durch Zn^{2+} -Ionen zurückzuführen, die auch von Sauvain et.al. (2013) beschrieben wird. Der Einsatz der ZnO-Nanopartikel, die als Positivkontrolle für die zellulären Tests ausgewählt wurden, zeigte somit auch bei den azellulären Tests zur Bestimmung des Oxidativen Potentials ein anderes Verhalten als die TiO₂ und SiO₂ Partikel.

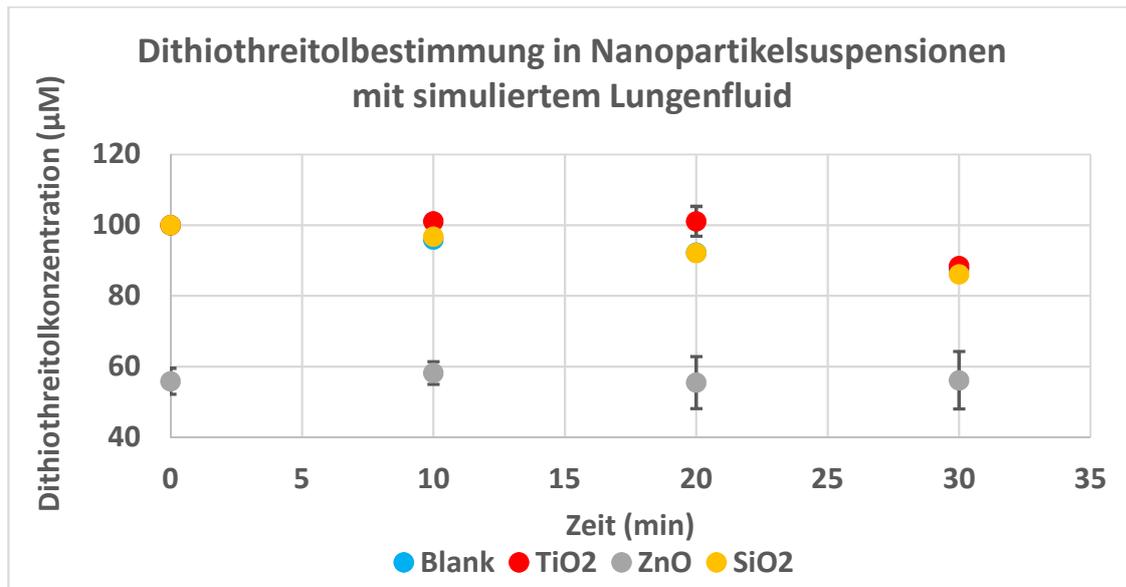


Abbildung 5: Darstellung der Konzentration von DTT im Kontakt mit den jeweiligen Nanopartikeln in einer Konzentration von 2500 µg/mL in simuliertem Lungenfluid

Zusammenfassung der Charakterisierung der Nanopartikel

Die Nanopartikel Titandioxid, Zinkoxid und Siliciumdioxid wurden vom JRC repository bezogen. Die Nanopartikel neigen im simuliertem Lungenfluid zur Aggregation, wodurch Partikelagglomerate in der Größe eines oder weniger Mikrometer entstehen. Die Zinkoxidsuspensionen zeigten keine Langzeitstabilität, weshalb die Suspensionen frisch hergestellt werden mussten. Dieser Ansatz wurde zum Zwecke der Vergleichbarkeit auch für die Suspensionen von Titandioxid- und Siliciumdioxid übernommen. Als Resuspendierungsverfahren ist das Mischen mittels Vortexmischer besonders geeignet. Zur Herstellung der Suspensionen wurde von allen Projektpartnern ein einheitliches Protokoll verwendet, wobei die Partikel 20 Minuten im Ultraschallbad behandelt wurden und direkt vor der weiteren Verwendung im Vortexmischer resuspendiert wurden. Da nicht alle Suspensionen eine Langzeitstabilität zeigten, wurden, um gleiche Bedingungen zu wählen, alle Partikelsuspensionen für jede Messung neu hergestellt.

Das oxidative Potential der drei Nanopartikel wurde mit zwei azellulären Assays auf Basis von Dithiothreitol und Ascorbinsäure bestimmt. Für TiO₂ und SiO₂ zeigten bei beiden Tests keine Unterschiede zu den Blindwerten. Für Zinkoxid konnte eine Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration und eine Veränderung der Anfangskonzentration von DTT festgestellt werden. Beide Effekte können mit dem Auftreten von Zn²⁺ Ionen in Zusammenhang gebracht werden.

Etablierung und Charakterisierung der zellulären Modelle

Es wurden zwei Testmodelle entwickelt, ein statisches und ein dynamisches. Beide wurden in Monokulturen von A549 Zellen, welche als statisches Modell bereits etabliert war, und in Co-Kulturen mit THP-1 Makrophagen eingesetzt. Zur Validierung der Modelle dienten die drei Referenzpartikel, welche vom Joint Research Center zur Verfügung gestellt wurden.

Darstellung des stationären Systems

Das statische Co-Kultursystem besteht aus A549 Zellen, die auf Polyethylenterephthalat Membranen mit 0,4 µm Porendurchmesser kommerzieller Transwell inserts kultiviert werden und auf deren Oberfläche sich THP-1 Makrophagen befinden. In einem physiologisch relevanten Modell sollte die Relation von Lungenepithelzellen zu Makrophagen 9:1 betragen (Jantzen et al., 2012). Die Exposition zu den Partikeln erfolgte in simulierter Lungenflüssigkeit, deren Bestandteile Phosphatpuffer und 0,02% Dipalmitoylphosphatidylcholin sind.

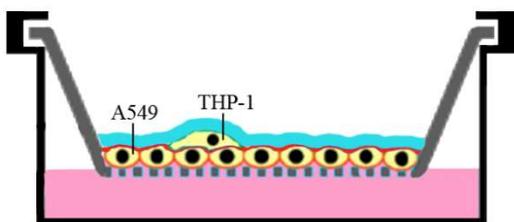


Abbildung 5 A549/THP-1 Co-Kulturmodell. Die Partikel befinden sich in der simulierten Lungenflüssigkeit (türkis) auf den Zellen. Die Versorgung der Zellen mit Nährmedium (rosa) erfolgt von unten.

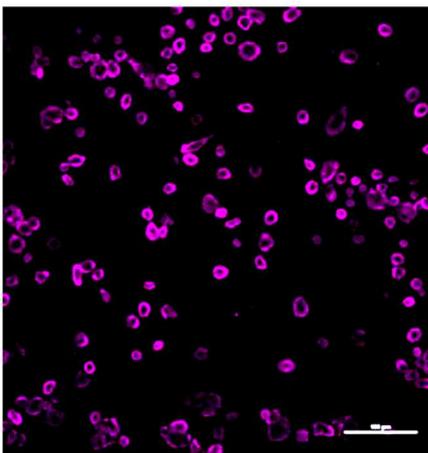
Wahl der Partikelkonzentration

Die einzusetzende Konzentration für die chronische Testung wurde durch konventionelle Testung der einzelnen Zellen bestimmt. Erwünscht war eine Konzentration, welche in der konventionellen Testung über 24h keine Zytotoxizität in einer der beiden Zelltypen auslöst. Die Konzentration sollte auch deshalb nicht zu hoch sein, da Konzentrationen > 50 µg/cm² als Gesamtdosis über das ganze Berufsleben als unrealistisch erachtet werden (Gangwal et al., 2011).

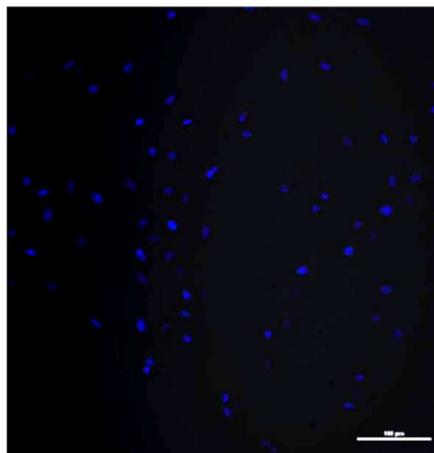
Etablierung des statischen Co-Kultursystems

Wahl eines geeigneten Markers zur Identifikation der Makrophagendifferenzierung und zur Markierung der THP-1 Makrophagen in der Co-Kultur mit A549 Zellen

Zum Nachweis der Makrophagendifferenzierung der THP-1 Zellen nach Behandlung mit 10 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat wurden verschiedene CD Marker (CD68, CD14, CD36, CD45) ausprobiert. Einen deutlichen Anstieg im Anteil positiver Zellen von 38,97 auf 60,78% zeigte sich bei der Verwendung des anti-CD36 Antikörpers. Dieser Antikörper eignete sich allerdings nicht für die Charakterisierung der zellulären Verhältnisse in den Co-Kulturen. Hierzu war nur der anti-CD45 Antikörper geeignet. Dieser ermöglichte eine selektive Färbung der THP-1 Makrophagen, während die restlichen Antikörper auch schwach (CD36) bis stark (CD14, CD68) mit den A549 Zellen reagierten.



THP-1



A549

Abbildung 6 Immunhistochemische CD45-Färbung zur Illustration der selektiven Färbung der THP-1 Makrophagen mit anti-CD45 Antikörper (pink). Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt. Scale Bar: 100 µm

Zur Bestimmung der geeigneten Zahlenverhältnisse für die Zellaussaat, um eine Kultur mit einem stabilen A549/THP-1 Verhältnis zu erhalten, wurden verschiedene Verhältnisse von A549 zu THP-1 Zellen (1:0,5 bis 1:2) gewählt und verschiedene Medienzusammensetzungen im basalen Kompartiment des Transwells verwendet. Auswertung der Zellverhältnisse (CD45-positive Zellen/Gesamtzellzahl) in verschiedenen Inserts erfolgte nach 2 Tagen und nach 7 Tagen (Tabelle 1). Konstante Zellverhältnisse ließen sich bei einer Aussaat der Zellen im Verhältnis 1:1 erzielen.

Tabelle 1 Verhältnisse von CD45-positiven Zellen zu Gesamtzahl nach 7 Tagen Kultur in Abhängigkeit vom Verhältnis der Zelle bei Aussaat.

Aussaat	Nach 7 Tagen Region 1	Nach 7 Tagen Region2	Nach 7 Tagen Region 3	Nach 7 Tagen Region 4
1:0,5	8:1	9:1	9:1	9,5:1
1:1	10:1	11:1	11:1	13:1
1:1,5	17:1	9:1		
1:2	9:1	8:1		

Bestimmung von Morphologie und basaler und stimulierter Sekretion der Interleukine 6 und 8 ergaben die folgenden Veränderungen. Nach 21 Tagen kam es vermehrt zur Anreicherung von toten Zellen über dem vitalen Zellschicht (Abbildung 7). Die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 war relativ stabil bis Tag 21, am Tag 28 allerdings nicht mehr detektierbar (Tabelle 2).

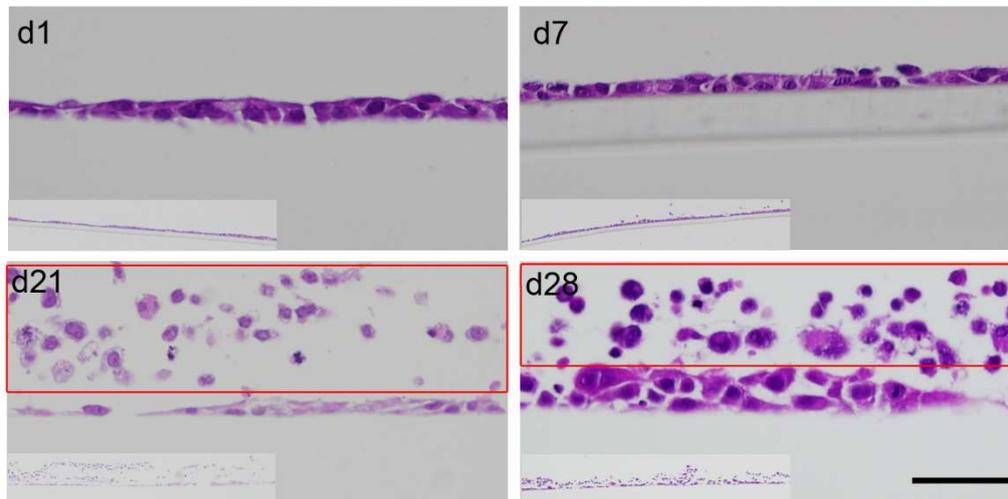


Abbildung 7 Im Laufe der Kultivierung (d21 und d28) kam es in den A549/THP-1 Co-Kulturen zu der Anreicherung von mehrheitlich toten Zellen (Rahmen) auf dem Zelllayer. Scale bar: 50 μ m

Tabelle 2 Sekretion der Co-Kulturen im nicht stimulierten Zustand (basal) und nach Stimulation mit dem Entzündung-auslösenden Lipopolysaccharid (LPS).

Parameter	Tag 1	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
IL-6 basal (pg/ml)	0.04 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01	0.04 \pm 0.002	0 \pm 0.14
IL-8 basal (ng/ml)	7.97 \pm 2.35	20.24 \pm 0.42	5.98 \pm 3.76	19.94 \pm 11.75	0 \pm 0.05
IL-6_LPS (ng/ml)	2.30 \pm 0.13	3.18 \pm 0.19	4.70 \pm 0.05	5.24 \pm 0.68	0 \pm 0.01
IL-8_LPS (ng/ml)	376.77 \pm 35.2	348.34 \pm 2.11	436.63 \pm 9.87	497.38 \pm 92.47	0 \pm 16.39

Bestimmung der Kurzzeit-Zytotoxizität der Partikel in konventioneller Kultivierung

Die Kurzzeittoxizität der zu testenden Partikeln wurde in A549 und in THP-1 Makrophagen in konventioneller Kultivierung, also auf Plastikböden ausgesäten Zellen, bestimmt. A549 und THP-1 Makrophagen wurden hierzu in in 96-well Platten ausgesät und mit in Medium

suspendierten Nanopartikeln für 24h exponiert. Danach wurde die Vitalität der Zellen mittels Bestimmung der zellulären Dehydrogenaseaktivität bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die Makrophagen wesentlich sensibler auf die Partikelexposition reagierten, und eine Konzentration von 100 µg/ml ZnO zu einem Abfall der Vitalität führte (Abbildung 8a), während dies bei den A549 Zellen erst ab 200 µg/ml ZnO zu beobachten war (Abbildung 8b).

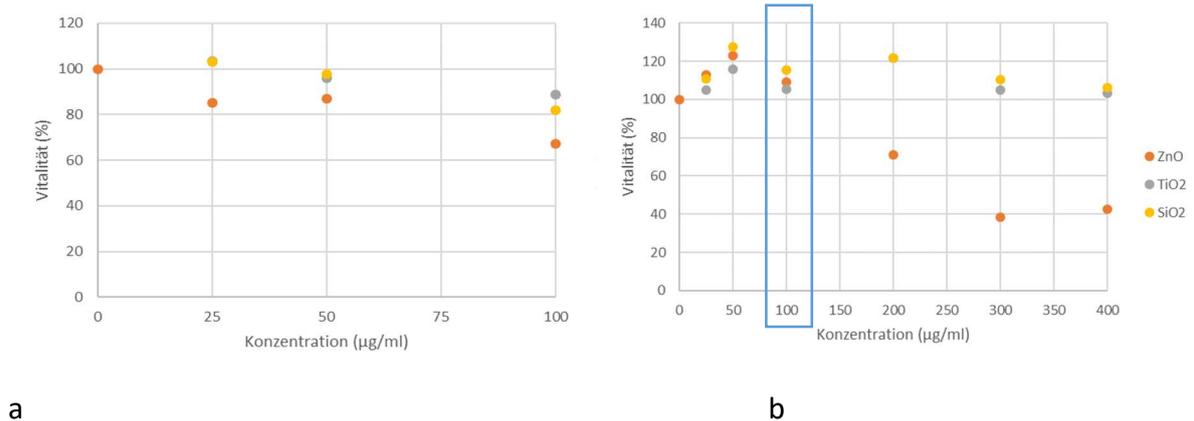


Abbildung 8 Vitalität von THP-1 Makrophagen (a) und A549 Zellen (b) und nach Exposition zu den Testpartikeln ZnO, TiO₂, SiO₂.

Beschreibung des dynamischen Systems – Lunge am Chip

Organs-on-a-Chip (OOCs) sind 3D Mikrogewebe in mikrofluidischen Chips, die die native Gewebearchitektur und die mechanochemische Umgebung eines Organs simulieren. OOCs entstanden aus parallelen Fortschritten der Mikrostrukturierung der Halbleiterindustrie, der Stammzelltechnologie und des humanen Gewebezüchtung. Die Mikroumgebung innerhalb eines OOCs umfasst mehrere Zelltypen, die Gewebe-Gewebe-Grenzflächen ermöglichen und den kontrollierbaren Einsatz mechanischer Kräfte wie Dehnung und Scherung, Flüssigkeitsfluss, biochemischer Faktoren und elektrischer oder optischer Signale (Nawroth et al. 2019, Ronaldson-Bouchard et al. 2018, Huh et al. 2010). Das Design von OOCs orientiert sich an der finalen Anwendung, für die das Organmodell dienen soll, z. B. die Simulation wichtiger physiologischer Funktionen und Messungen mit räumlich-zeitlicher Auflösung. Daher wird nicht versucht, ein volles Organ nachzuahmen. Ziel ist es vielmehr, ein komplexes physiologisches Modell bereitzustellen, das einfach genug ist, um Reproduzierbarkeit, Manipulation und Kontrolle zu gewährleisten. Innerhalb

der Chips wachsen Zellen auf porösen Membranen in Grenzflächen zwischen Mikrofluidikkanälen. Dies ermöglicht die Etablierung von Zell-Zell- und anschließend Gewebe-Gewebe-Wechselwirkungen, die der menschlichen Physiologie ähnlicher sind als herkömmliche 2D-Kulturmodelle.

Die Fähigkeit, OOCs zu perfundieren, ermöglicht den dynamischen Fluss von nährstoffhaltigen Flüssigkeiten und Gasen und ahmt somit die mechanische Umgebung und den Stoffaustausch des Gewebes nach (Nawroth et al. 2019). Es wurde gezeigt, dass geringe Scherbeanspruchungen die epitheliale Barrierefunktion verbessern (Sidhaye et al. 2008) und dass die mechanischen Kräfte, die das Epithel erfährt, Schlüsselregulatoren während der Lungenentwicklung sind (Varner et al 2015).

Die im Rahmen von NanoLunCh entworfene „Lunge am Chip“ besteht aus einem perfundierbaren Fluidkanal, mit einer darüberliegenden Zellkulturkammer und einer PET Membran mit 0.4 μm Porengröße, die Kanal und Kammer trennt. In der Membran ist eine interdigitale Elektrode für Impedanzmessungen integriert (Schuller et al. 2020).

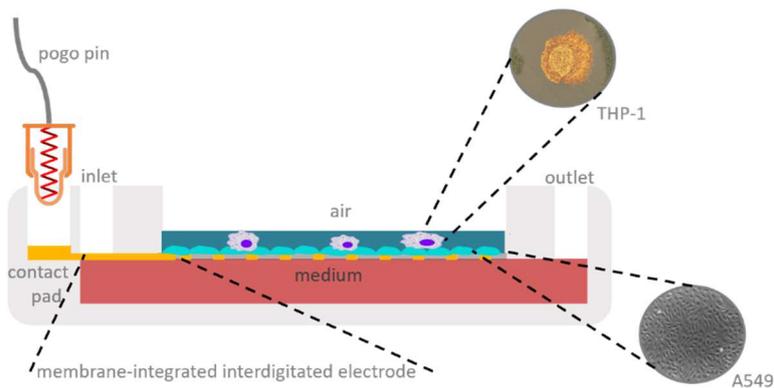


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Co-Kultur aus A549 und THP-1 auf der "Lunge am Chip"

Die Entwicklung der Lunge am Chip war in 3 Hauptaufgaben gegliedert. Der Aufbau des „Lunge am Chip“ mittels Rapid Prototyping, die Integration der Biosensorik und die Integration der optimierten Co-Kultur aus dem statischen Model.

Aufbau der Lunge am Chip mittels Rapid Prototyping

Zum Aufbau des „Lunge am Chip“ wurden mehrere CAD Modelle des Chips erstellt und in Design Iterationen optimiert, sowie unterschiedliche Materialien und Materialverbindungen zur Integration der Membranen evaluiert (Abb. 10). Für die Herstellung des Chips wurde „soft replica molding“, ein Verfahren der Soft Lithography, gewählt. Hier wird ein flüssiges Polymer in eine Gussform mit dem Negativ der Strukturen gegossen und anschließend ausgehärtet. Zur Chip-Herstellung wurden daher 3D Drucke der Gussformen aus Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) und später Harz, wegen höherer Hitzebeständigkeit, angefertigt.

Der Chip hat die Dimensionen eines herkömmlichen Objektträgers (75mmx25mm) und verfügt über 6 runde Aussparungen für die ALI Kultur, angepasst an die Zellkulturfläche einer 96 Mikrotiterplatte (0,3 cm²). Die Zellkulturoberflächen des Chips bilden, wie auch in der statischen Kultur, zellkulturbehandelte PET Membranen mit 0.4 µm Porengröße. Unter der Membran befindet sich jeweils ein Fluidkanal zur Versorgung der Zellkulturen mit Medium, der durch ein Inlet und Outlet mit der darüberliegenden Schicht des Chips verbunden ist. Diese Pforten können mit Pumpsystemen verbunden werden, um kontinuierlichen Mediumfluss zu ermöglichen. Alternativ verfügt die oberste Schicht des Chips über größere Medienreservoirire mit 6 mm Durchmesser und 5mm Höhe, um einen hydrostatisch-getriebenen Mediumfluss zu ermöglichen. Die Schicht kann bei der Herstellung entfallen, wenn mit Pumpen gearbeitet wird. Die so entstehenden 6 Lungenkultureinheiten befinden sich in einem Abstand von 9 mm, so dass Messungen in einem Platerreader auf dem Chip durchgeführt werden können. Der Mediumkanal hält ein Volumen von 75 µl und die Zellkulturkammer ein Volumen von 100 µl.

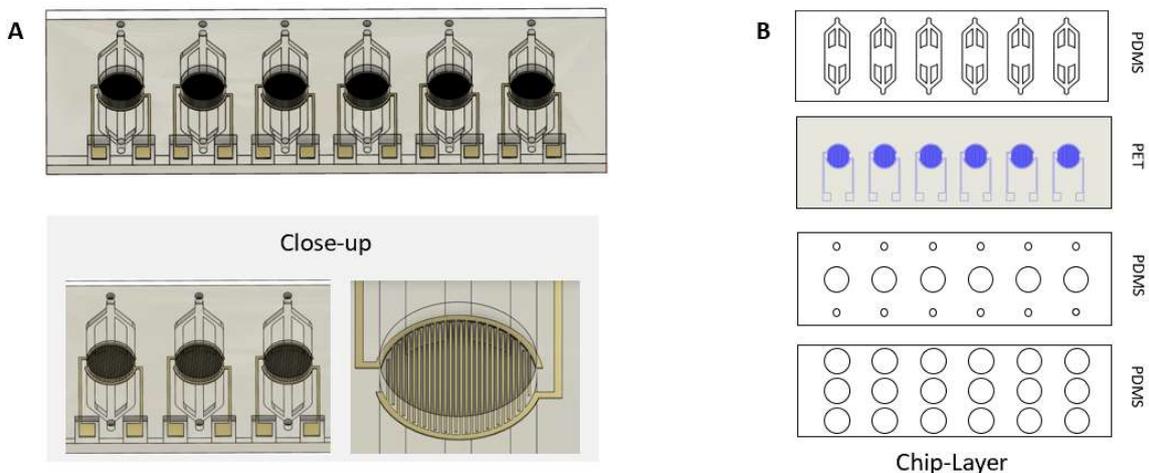


Abbildung 10 A CAD Model des Chips (oben) mit Membran-integrierter Impedanzsensorik und 6 Kultureinheiten. In den Close-ups ist die Unterteilung in Fluidkanal und Kulturkammer sichtbar, so wie die interdigitierten Elektroden. B Schematische Darstellung der einzelnen

Für die Charakterisierung des Mediumflusses in unterschiedlichen Designoptionen des Fluidkanals, wurden CFD Modelle erstellt und anschließend mit grün-fluoreszierenden Latexkugeln validiert (Abb. 11). Die Modellierung zeigt eine gleichmäßige Verteilung von Partikeln im gesamten Mediumkanal des Chips, wenn das Design so gewählt ist, dass es drei Zuflüsse und Abflüsse, zu und weg, von dem Zellkulturbereich gibt.

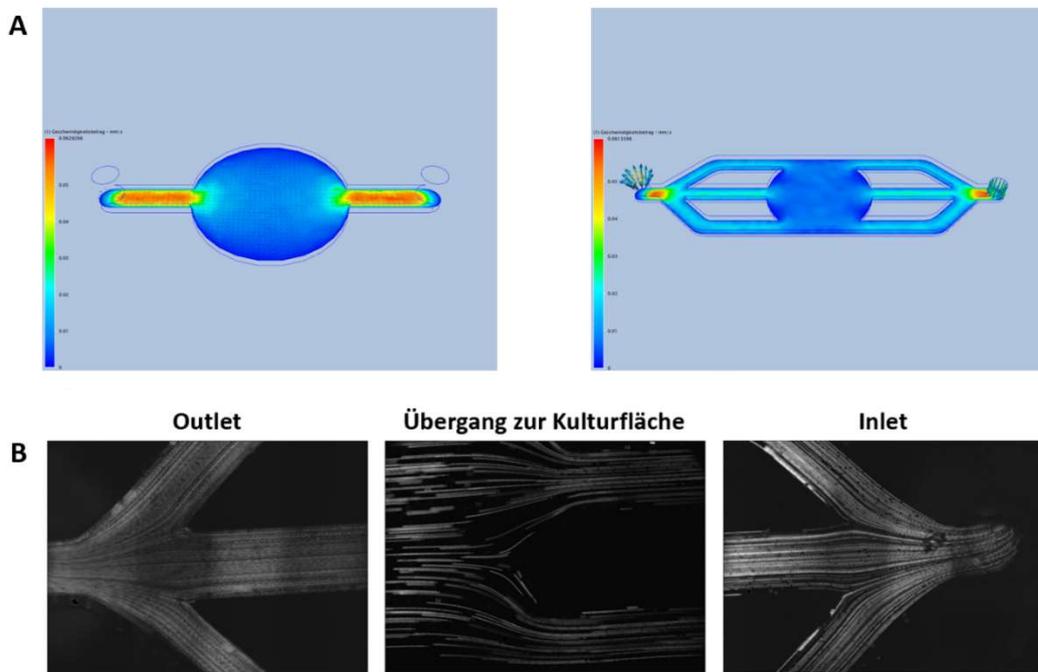


Abbildung 11 A CFD Modellierungen der Chipdesigns und Darstellung der Geschwindigkeitsprofile bei einem Volumensstrom vom 60 $\mu\text{l/h}$. B Standardabebildungsbilder des Durchflusses von Latexkugeln im finalen Chip Design

Bei der Wahl des Chip-Materials standen sich das Thermoset OSTEMER 322 und Polydimethylsiloxan (PDMS) gegenüber. OSTEMER 322 bietet den Vorteil, dass sich das Material, durch SH- und Epoxygruppen an der Oberfläche, die nach dem ersten Härtungsschritt präsent sind, leicht mit anderen Materialien verbinden lässt und so, die PET Membran einfach nach dem ersten Härtungsschritt auf die Chipschichten aufgelegt werden muss. Bei PDMS hingegen muss die Oberfläche mittels Silanisierung, Klebeband

oder „PDMS Mortar“ (1:1 PDMS:Toluol) modifiziert werden um die Zellkulturmembran in den Chip integrieren zu können. Chips aus OSTEMER 322 sind nach dem zweiten Polymerisationsschritt jedoch gelblich verfärbt und erfahren teilweise eine Volumensreduktion von bis zu 10%, was zu einer Faltenbildung der PET-Membran führt (Abb. 12). Somit wurde PDMS, ein Standardmaterial für Organ-on-a-Chip Systeme, da es biologisch inert und Sauerstoff-permeabel ist, als Chipmaterial gewählt.

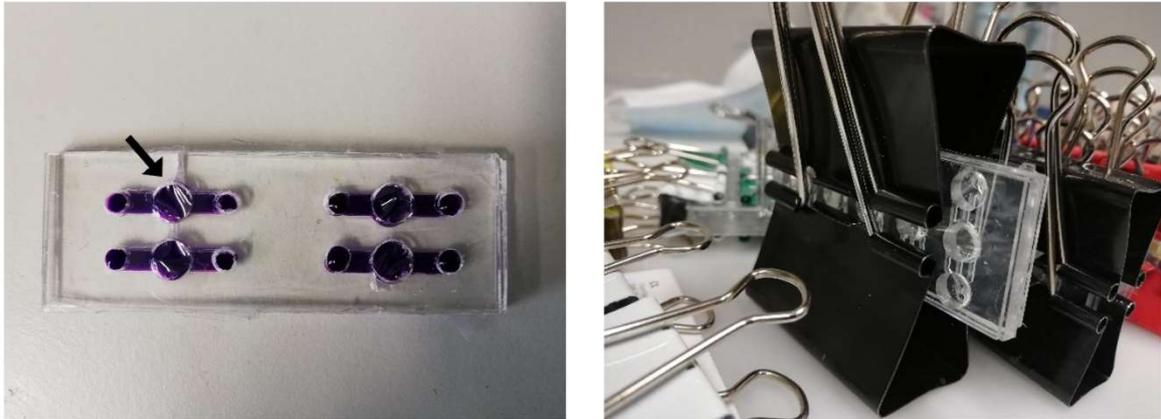


Abbildung 12 Links ein Chip aus OSTEMER 322 bei dem eine klare Faltenbildung der Membran sichtbar ist. Rechts ein Chip aus PDMS.

Zur schnellen und reproduzierbaren Verbindung der Membran mit den PDMS Teilen wurde das druckempfindliche doppelseitige Klebeband ARseal 90880, das aus einer beidseitig mit Silikonkleber beschichteten Polypropylen Folie besteht, verwendet (Kratz et al. 2019). Mittels Xerographie wurde das Klebeband im Design der jeweiligen Schichten zugeschnitten. Anschließend wurden die einzelnen Chip-Schichten verklebt und die PET-Membran zwischen Kulturkammer und Fluidkanal eingelegt. So konnten an einem Tag bis zu 8 Chips zusammengesetzt werden.

Das Klebeband kann allerdings nur schwer an die Säulen im Fluidkanal angebracht werden und somit kann keine homogene Grenzschicht zwischen Säulen, Membran und freiem Kanal entstehen. Die daraus resultierenden Klebeband-freien Stellen können als Nukleationsstellen wirken. Eine vermehrte Anhäufung von Blasen während des händischen Befüllens des Kanals mit Medium oder im Laufe der Zeit (über Nacht) konnte in 52% der Kultureinheiten beobachtet werden. Um dieser Blasenbildung entgegen zu wirken, wurde „PDMS Mortar“, eine Mischung aus PDMS und Toluol im Verhältnis 1:1, gewählt. Der Vorteil besteht hier darin, dass eine dünne Schicht des „Mortars“ mittels

Rotationsbeschichtung auf ein Glasträger aufgetragen werden kann und die Chipteile durch Auflegen auf diese Schicht, gleichmäßig benetzt werden. Die Bindungsstärke wurde mittels Kraftmessungen bestimmt, in dem zwei rechteckige PDMS Stücke auf Glas aufgebracht, und eine PET Membran mit PDMS Mortar zwischen den beiden PDMS Stücken verklebt wurde (Abb.13). Bei den Messungen von Scher- und Zugkräften brachen die Glasträger vor der PDMS-PET-PDMS Verbindung, was nahelegt, dass die Zug- und Scherfestigkeit der Verbindung über der eines Objektträgers liegt (84 N Zugbelastung und 1000 N Scherbelastung). Da Toluol, zwar im Bonding-Prozess verdampft, aber dennoch höchst toxisch ist, wurden Toxizitätsmessungen mit submersen A549 Kulturen durchgeführt. Hier konnte keine Toxizität nach 7 Tagen Kultur nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass das Toluol vollständig verdampft ist oder zumindest in nicht zytotoxischen Konzentrationen vorliegt (Abb.13). Weiters wurde während der Testkultur kein Mediumverlust durch den Chipaufbau beobachtet.

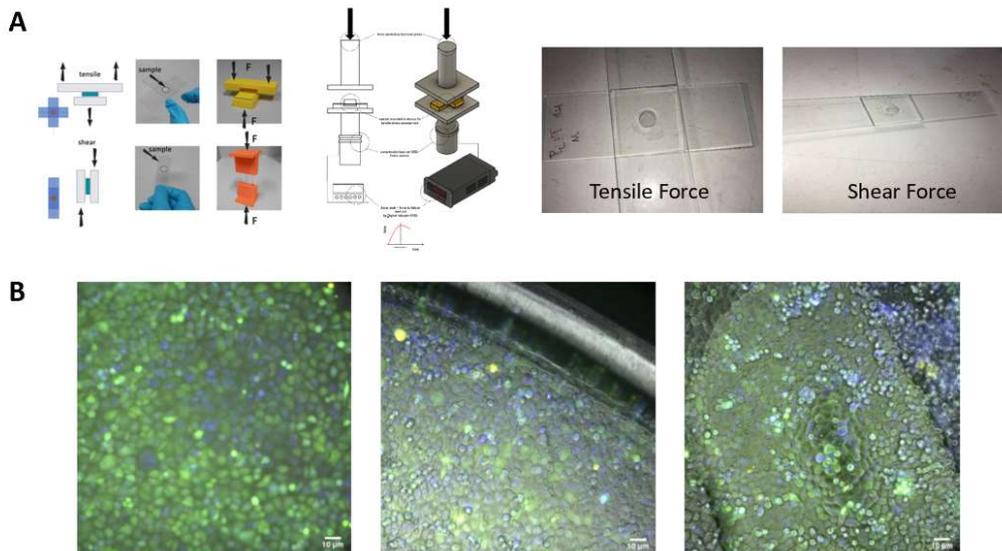


Abbildung 13 A Versuchsaufbau zur Messung der Zug- und Scherfestigkeit der PDMS-PET-PDMS Verbindung mit „PDMS Mortar“. B Life/Dead Färbung der A549 Kultur nach 7 Tagen auf dem, mit „PDMS Mortar“ verbundenen PDMS-PET-PDMS Chip.

Biosensorik

Um die Zellkultur über den gesamten Versuchszeitraum auf Air Liquid Interface mittels Impedanzsensorik in Echtzeit beobachten zu können, wurden interdigitale

Elektrodenstrukturen, mit einem Elektrodenfingerabstand von 100 μm , auf PET Membranen aufgebracht. Hierzu wurde erst ein CAD Modell einer Fotomaske erstellt (Negativ der Elektrodenstrukturen aus Photoresist) und diese anschließend angefertigt. Schließlich wurde ein Bilayer-Lift Off Prozess, ein photolithographisches Verfahren, verwendet, um Photoresiststrukturen basierend auf der angefertigten Fotomaske auf immobilisierten Zellkulturmembranen aufzubringen (Abb.14).

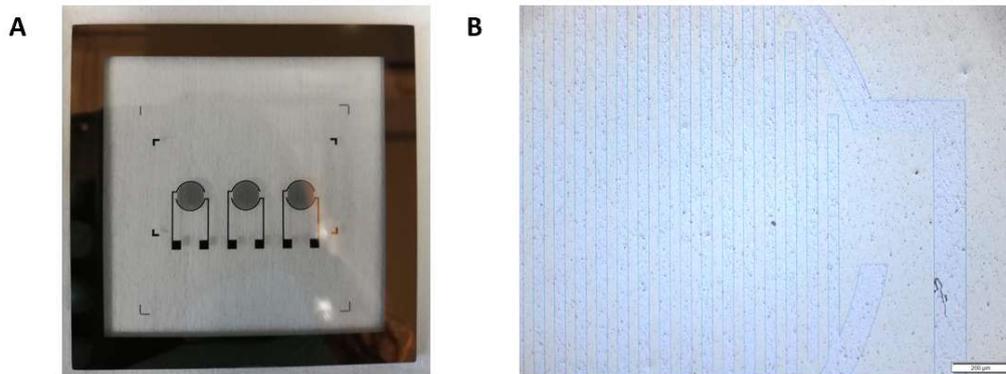


Abbildung 14 A Fotomaske mit 3 interdigitierten Elektrodenstrukturen mit 100 μm gap. B Mikroskopische Aufnahme der Photoresiststrukturen auf einer PET Membran mit 0.4 μm Porengröße.

In einem weiteren Versuch wurden die immobilisierten PET Membranen mit Gold besputtert, um zu zeigen, dass eine Gold Schicht auf die Membranen aufgetragen werden kann (Abb.15). Weitere Schritte in der Elektrodenentwicklung konnten bedauerlicherweise nicht umgesetzt werden, da bedingt durch die Corona-Krise, die Maschinen zur Umsetzung nicht zugänglich waren.



Abbildung 15 Gold besputterte PET Membran immobilisiert auf einem Objektträger in der Sputterdepositionsanlage

Integration der Co-Kultur

Das etablierte Co-Kultur Modell und die daraus entstandenen Protokollschritte konnten unverändert aus dem statischen Modell übernommen werden. Lediglich die Volumina mussten an den Lungen-Chip angepasst werden. Nach der Aussaat der Zellen im Verhältnis 1:1 konnte auch noch nach 11 Tagen eine Co-Kultur auf dem Lungen-Chip mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden (Abb. 16).

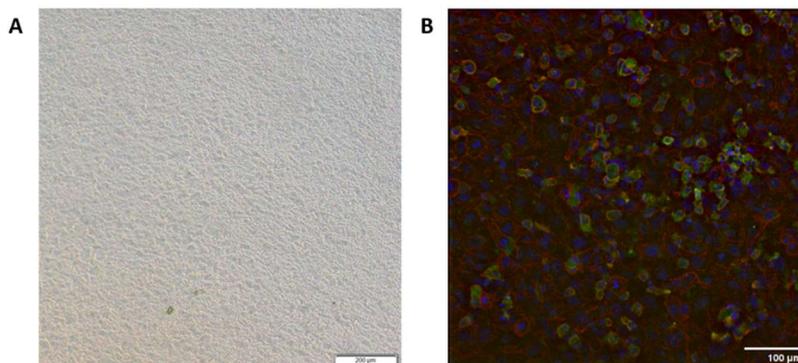


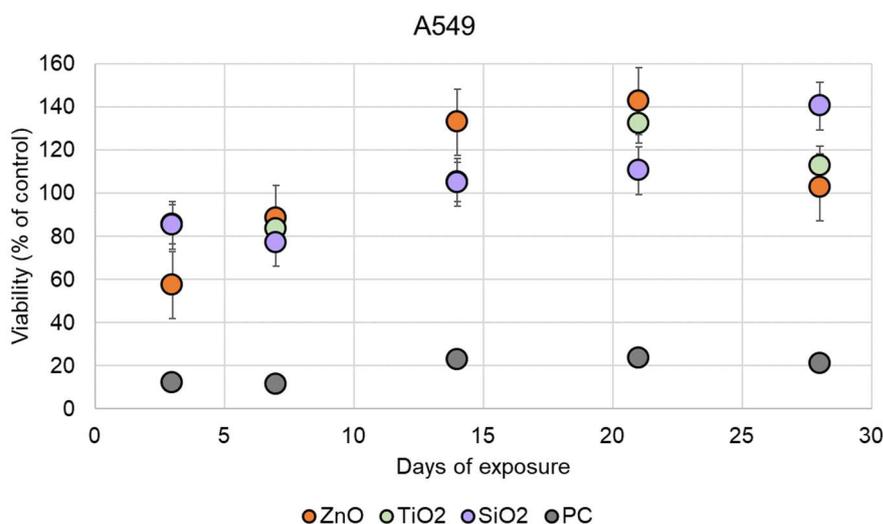
Abbildung 16 A Durchlichtmikroskopische Aufnahme der konfluenten Zellsicht einer A549 Monokultur; Zeitpunkt: 5 Tage auf Air Liquid Interface B A549 THP-1 Co-Kultur 11 Tage auf ALI (grün THP-1, blau DAPI, rot Phalloidin)

Validierung des Systems: Ergebnisse der Partikeltestung

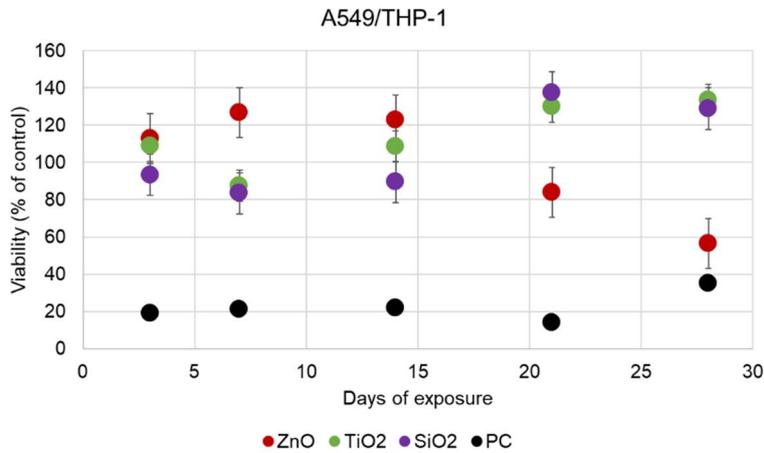
Die erfolgreiche Etablierung der Modelle stellt die Voraussetzung für die weitere Validierung dar. Hier geht es darum zu schauen, ob die verwendeten Referenzpartikel eine Reaktion liefern, welche auch im Menschen zu erwarten wäre. Da derartige Daten nicht vorliegen, kann man bei der Beurteilung der Partikeltestung nur auf in Tieren generierte Daten zurückgreifen.

Ergebnisse der Testung im statischen System

Im statischen System erfolgte die Untersuchung der Zytotoxizität und der Sekretion der Interleukine 6 und 8 nach wiederholter Exposition mit 50 µg/cm² Nanopartikeln über einen Zeitraum von insgesamt 28 Tagen. Die gewählten Dosen sind deutlich höher als für die menschliche inhalative Exposition relevant und es wurde, zumindest für die ZnO Partikel, eine toxische Reaktion erwartet. Entgegen der Erwartung war der Abfall der Vitalität nach 3-tägiger Exposition von A549 Monokulturen mit ZnO Partikeln stärker als zu den späteren Zeitpunkten (Abb. 17a). Bei den A549/THP-1 Co-Kulturen fand ein Abfall der Vitalität erst nach 21 Tagen statt (Abb. 17b).



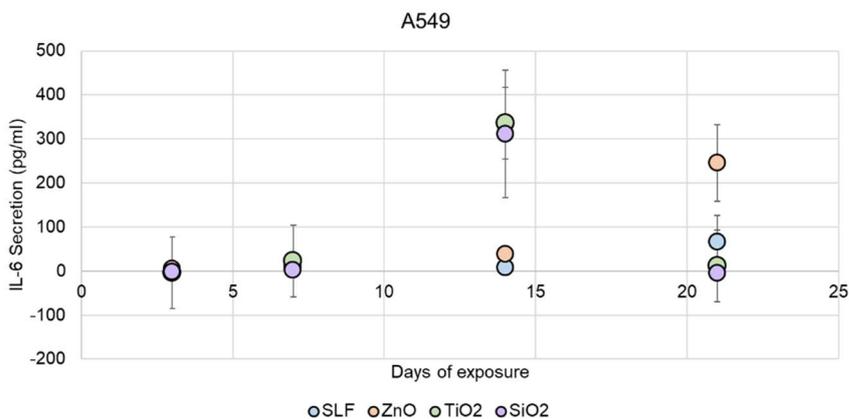
a



b

Abbildung 17 Veränderungen der Vitalität in A459 Monokulturen (a) und A549/THP-1 Co-Kulturen (b) nach wiederholter Exposition mit ZnO, TiO2 und SiO2 Partikeln oder Positivkontrolle (Behandlung mit Triton X100)

Der Verlauf der IL-6 und IL-8 Sekretion über die Zeit zeigte ein etwas anderes Muster mit einem Anstieg der IL-6 Sekretion an Tag 14 für Exposition mit SiO2 und TiO2 und einem erhöhten Wert für SiO2 an Tag 21 (Abbildung 18a). Auch IL-8 war an Tag 14 bei SiO2 und TiO2 Exposition erhöht (Abbildung 18b).



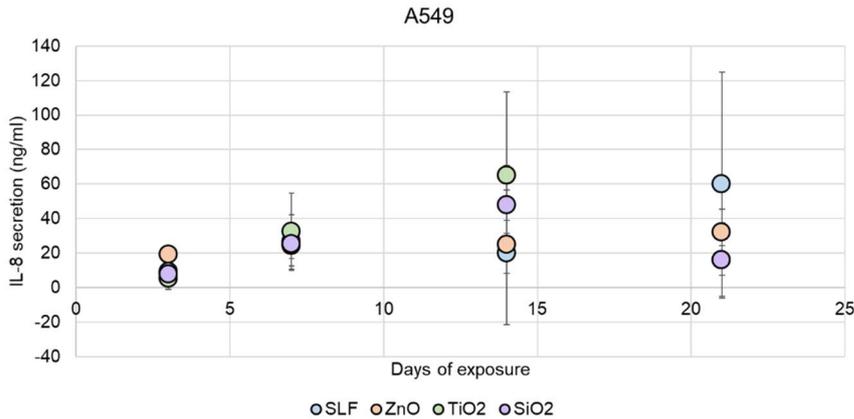
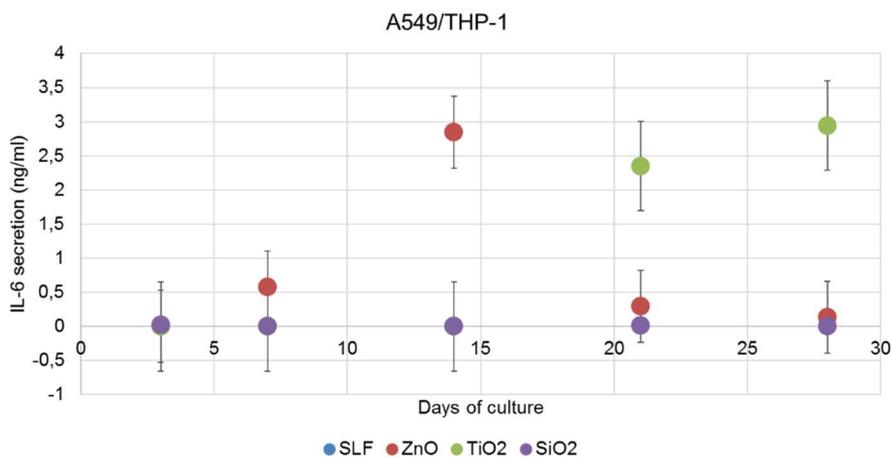


Abbildung 18 Zeitabhängige Veränderung der Interleukinsekretion nach Exposition mit den Partikeln in A549 Monokulturen

Die Zytokinprofile der A549 Monokulturen legen eine pro-inflammatorische Wirkung der ZnO, TiO₂ und SiO₂ Partikel nahe. Am Tag 21 kam es zu einer gesteigerten Sekretion beider Zytokine in der Anwesenheit von SLF ohne Nanopartikel. Diese Reaktion scheint auf einen Verfall der Kulturen hinzudeuten, da gleichzeitig der Anstieg der Zytokinausschüttung auf Stimulation mit LPS versagt.

Bei den Co-Kulturen waren die IL-6 Konzentrationen an Tag 14 für ZnO und an Tag 21 für TiO₂ Nanopartikel deutlich erhöht (Abbildung 19a). Ein ähnliches Muster findet sich bei der IL-8 Sekretion (Abbildung 19b).



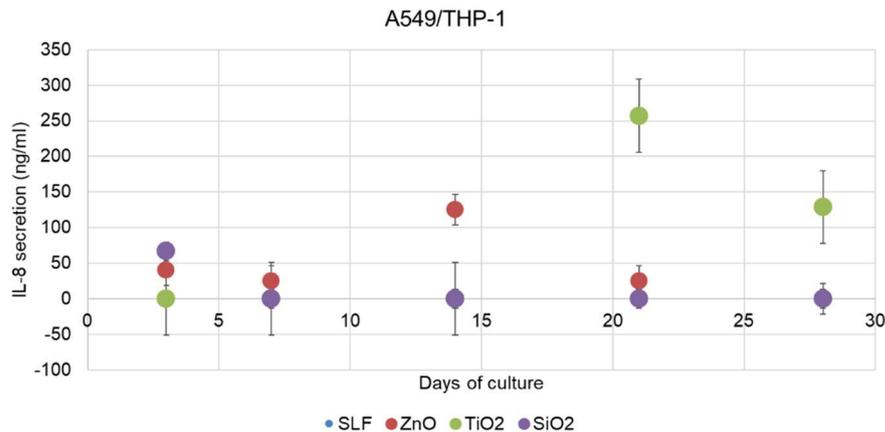


Abbildung 19 Zeitabhängige Veränderung der Interleukinsekretion in den A549/THP-1 Co-Kulturen

Die Zytokinsekretion der A549/THP-1 Co-Kulturen legt eine pro-inflammatorische Wirkung der getesteten ZnO und TiO₂ Partikel nahe. Diese scheint nach Exposition mit ZnO Partikeln vorübergehend zu sein und bei TiO₂ Partikeln anhaltend.

Ergebnisse der Testung im dynamischen System

Basierend auf den Versuchen der statischen Kultur, wurde für die Bestimmung der Toxizität der Nanopartikel-Konzentrationsbereich jeweils auf 100 µg/mL und 50 µg/mL eingeschränkt. Zur Anpassung an den Chip wurden die Konzentrationen basierend auf der Kulturfläche des statischen Modells zu 100 µg/mm² bzw. 50 µg/mm² umgerechnet um dieselbe Exposition zu gewährleisten. Außerdem wurde die Messung von Lactatdehydrogenase im Überstand gegenüber der ursprünglich geplanten Messung des mitochondrialen Potentials zur Bestimmung der Viabilität bevorzugt, da bei der LDH Messung nur geringe Mengen des Überstands entnommen werden müssen. So ist es möglich bei stark reduziertem Volumen des Überstands im Vergleich zur statischen Kultur, trotzdem dieselbe Kultur mit gewisser statistischer Genauigkeit über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Für die Viabilitätsbestimmung wurde zu Kontrollkulturen Triton-X hinzugegeben, um einen Wert für 100% LDH Freisetzung zu bestimmen. Wegen der hohen biologischen Variabilität wurde der zytotoxische Effekt der Nanopartikel bei Kurzzeitexposition als relative Änderung der LDH Versetzung vor und nach der Nanopartikel-Exposition angegeben.

Eine toxische Reaktion konnte im Kurzzeitversuch auf dem Chip nur bei ZnO₂ Partikeln in SLF auf der Monokultur beobachtet werden (Abb. 20). Entgegen der Erwartung konnte bei der Kurzzeiteexposition der Co-Kultur kein Abfall der Viabilität beobachtet werden (Abb. 21)

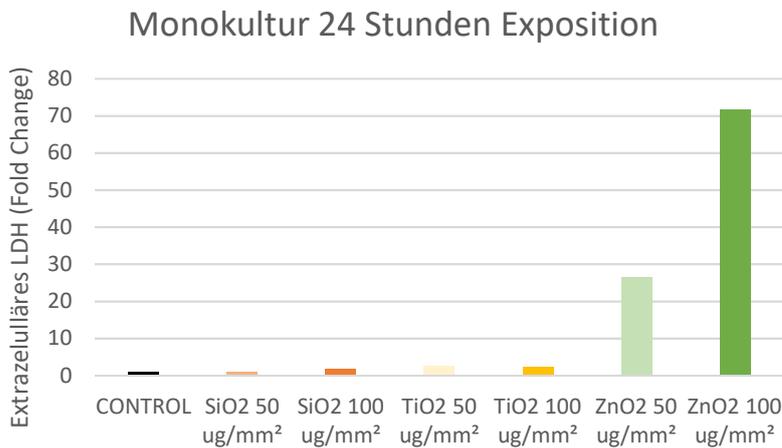


Abbildung 20 Extrazelluläres LDH (fold change) im Überstand der A549 Monokultur nach Exposition mit je 50 µg/mm² und 100 µg/mm² SiO₂, TiO₂ und ZnO₂

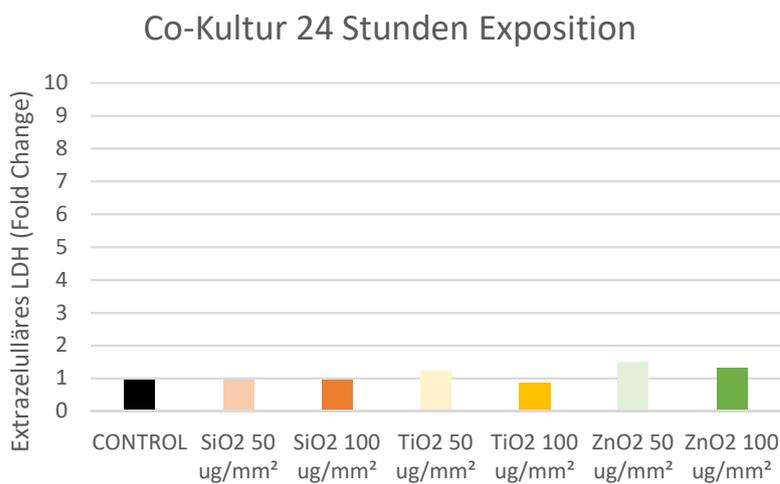


Abbildung 21 Extrazelluläres LDH (fold change) im Überstand der A549/THP-1 Co-Kultur nach Exposition mit je 50 µg/mm² und 100 µg/mm² SiO₂, TiO₂ und ZnO₂

Die Messung von IL-6 und IL-8 der ZnO₂ exponierten Co-Kultur zeigt auch einen nur leichten Anstieg von IL-8 (Abb. 22).

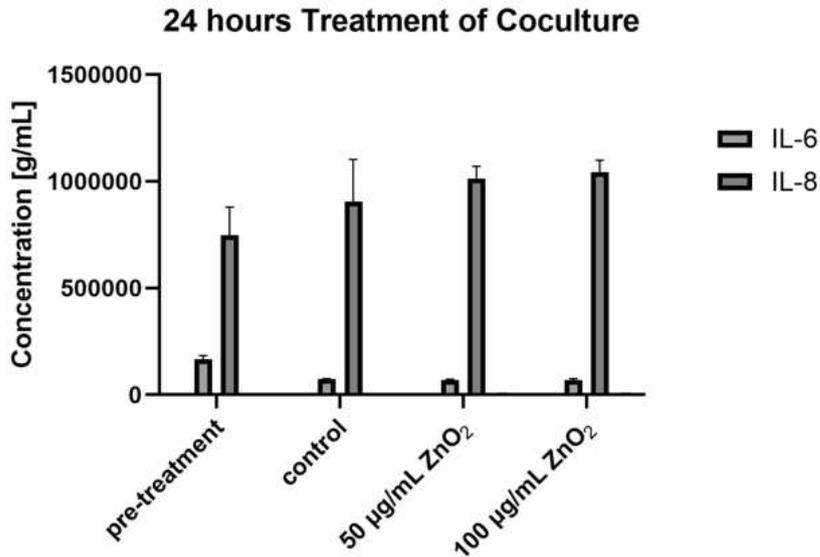


Abbildung 22 IL-6 und IL-8 Ausschüttung der Co-Kultur vor und nach der ZnO₂ Exposition

Bei der Durchführung der Langzeitexposition auf der „Lunge am Chip“ konnte in der Monokultur nur bei ZnO₂ Partikeln eine deutliche Toxizität beobachtet werden, die im Falle der höheren Partikelkonzentration bei 3 Tagen (Abb.23) beobachtet wird und dann zurückging und bei der geringeren Konzentration erst nach 7 Tagen (Abb.24) vergleichbare Werte annimmt. Die darauffolgenden erhöhten Viabilitätswerte sind dadurch bedingt, dass weniger Zellen in Kultur verbleiben und somit weniger LDH abgegeben werden kann. Interessanterweise, kann bei der Langzeit-Exposition von 50 µg/mm² SiO₂ eine Reduktion der Viabilität nach 3 Tagen beobachtet werden. Dabei handelt es sich vermutlich aber nur um ein Artefakt, das durch die händische Manipulation der Zellen auftreten kann. Ansonsten verhalten sich TiO₂ und SiO₂ exponierte Kulturen ähnlich zur Kontrolle mit SLF.

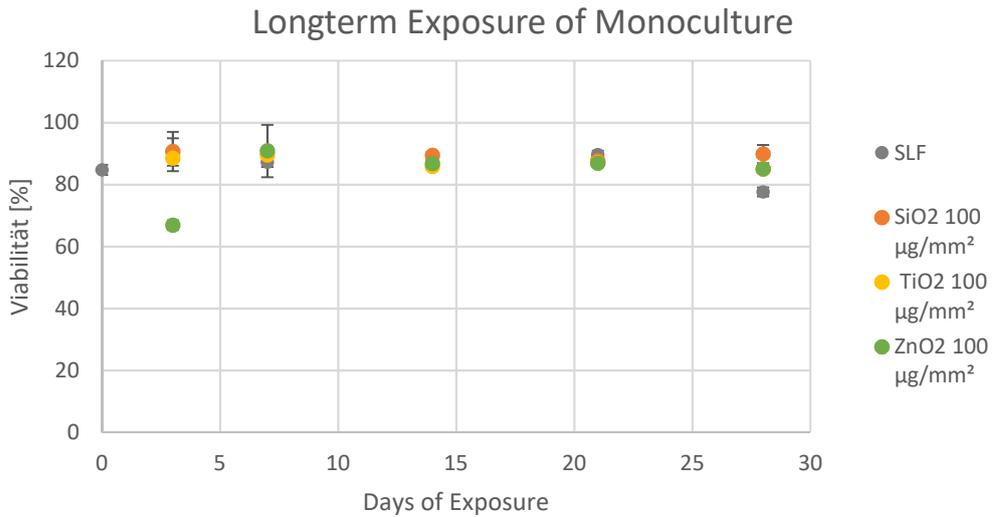


Abbildung 23 Zeitlicher Verlauf der Viabilität der Monokultur, berechnet basierend auf Triton-X Werte (100% LDH Freisetzung), nach Exposition der Kulturen mit 100 µg/mm² SiO₂, TiO₂ und ZnO₂. SLF dient als Kontrolle.

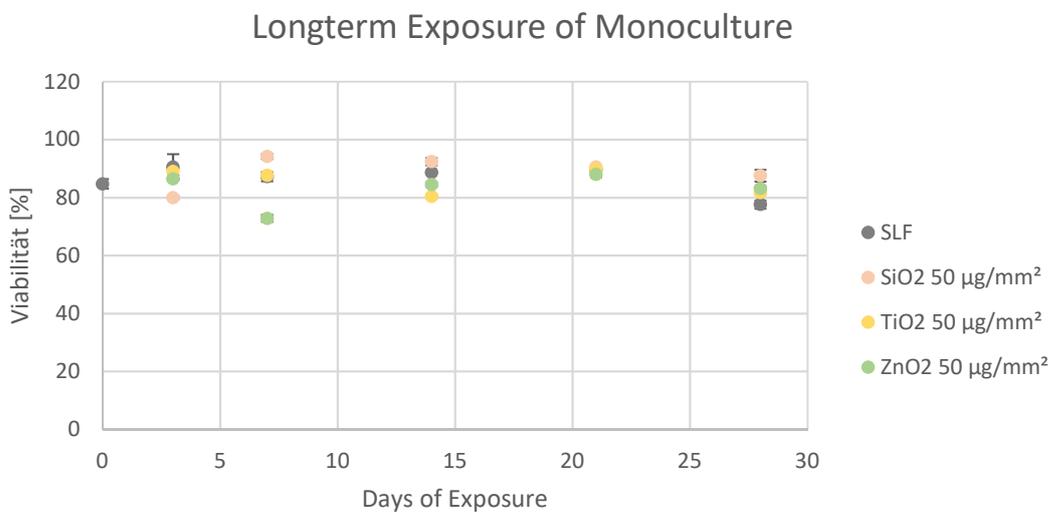


Abbildung 24 Zeitlicher Verlauf der Viabilität der Monokultur, berechnet basierend auf Triton-X Werte (100% LDH Freisetzung), nach Exposition der Kulturen mit 50 µg/mm² SiO₂, TiO₂ und ZnO. SLF dient als Kontrolle

Bei der Beobachtung der Langzeittoxizität der Nanopartikelsuspensionen in SLF sind die Viabilitätswerte der Co-Kultur in der niedrigen Konzentration vergleichbar zur Monokultur

im Bezug auf ZnO (Abb.25). Bei Exposition mit 100 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ tritt der zytotoxische Effekt jedoch zeitverzögert erst am Tag 7 auf (Abb.26). Die TiO₂ exponierten Kulturen zeigen am Tag 7 in beide Konzentrationen stärker abweichende Viabilitätswerte im Vergleich zur SLF benetzten Kontrolle, was möglicherweise auf die anwesenden Makrophagen zurückzuführen ist. Die SiO₂ Kulturen verhalten sich wie zu erwarten sehr ähnlich zur SLF Kontrolle. Die Werte nach dem Tag 14 der Exposition können für die Bestimmung der toxischen Wirkung der Nanopartikel auf die Co-Kultur nicht mehr herangezogen werden, da lediglich die SLF Kontrolle ohne Verlust der Integrität des Zellrasens weiter kultiviert werden konnte, dies aber auch nur teilweise. Mittels Mikroskopie, konnte beobachtet werden, dass bei Tag 16 Löcher im Zellrasen in allen Kulturen sichtbar sind. Diese sind dann auch am Tag 28 der SLF Kontrolle sichtbar, was sich in der erhöhten LDH Freisetzung widerspiegelt.

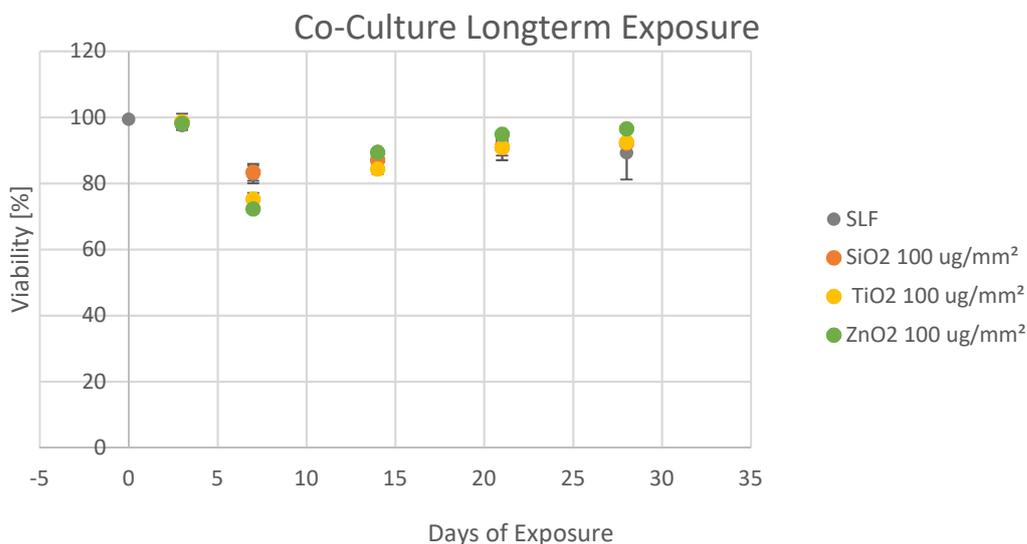


Abbildung 25 Zeitlicher Verlauf der Viabilität der Co-Kultur, berechnet basierend auf Triton-X Werte (100% LDH Freisetzung), nach Exposition der Kulturen mit 100 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ SiO₂, TiO₂ und ZnO. SLF dient als Kontrolle

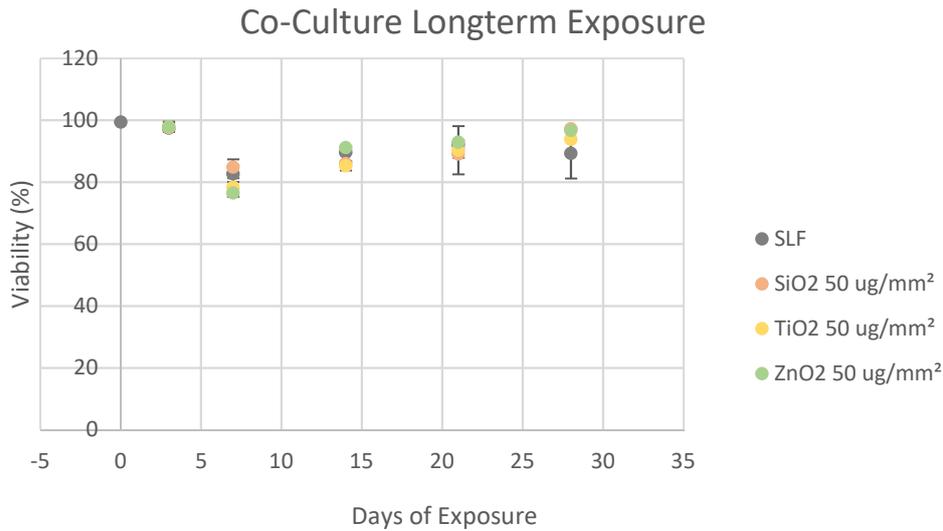


Abbildung 26 Zeitlicher Verlauf der Viabilität der Co-Kultur, berechnet basierend auf Triton-X Werte (100% LDH Freisetzung), nach Exposition der Kulturen mit 50 µg/mm² SiO₂, TiO₂ und ZnO. SLF dient als Kontrolle

Für die Bestimmung der inflammatorischen Marker IL-6 und IL-8 wurde zur Stimulation der Interleukinausschüttung bei Entzündung, Entzündungs-auslösendes Lippopolysaccharid (LPS) am Tag 0 zu den Kulturen hinzugegeben um der basalen Expression von IL-6 und IL-8 eine Entzündungs-induzierte IL-6 und IL-8 Ausschüttung gegenüber zu stellen (Abb.27). Generell ist zu beobachten, dass wie auch in der statischen Kultur, vermehrt IL-6 ausgeschüttet wird. Anders als bei der statischen Kultur, wird in den Kontrollkulturen und SiO₂ exponierten Kulturen, mehr IL-6 ausgeschüttet. Diese Ausschüttung ist am Tag 28 am höchsten, was vergleichbar mit der statischen Kultur, auf den Verfall der Kulturen deuten kann. Am Tag 14 sind die Interleukinwerte der TiO₂ exponierten Kulturen deutlich erhöht, was auf eine pro-Inflammatorische Wirkung hindeutet. Die ZnO exponierten Kulturen zeigen nur leicht erhöhte Werte. Die pro-Inflammatorische Wirkung, die die Viabilitätsmessungen und die Interleukinmessungen der statischen Kultur nahelegen, tritt vermutlich vor 14 Tagen ein und wird bei gesteigerter zeitlicher Auflösung sichtbar.

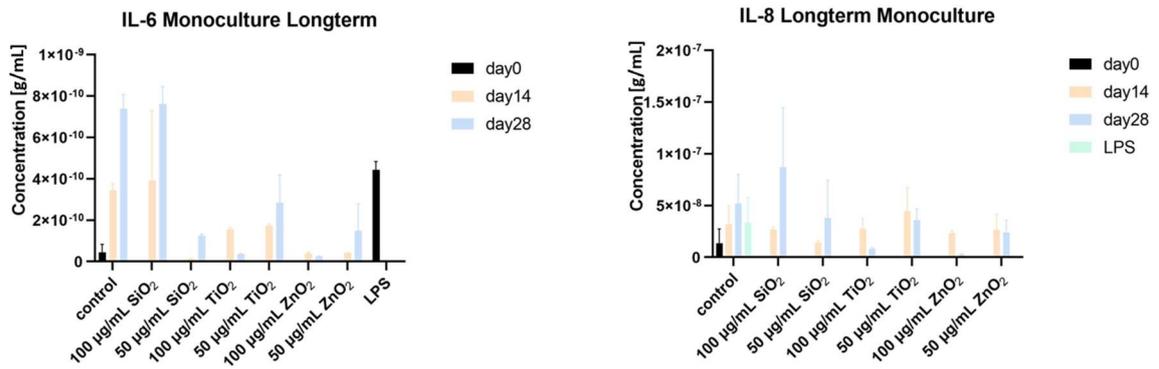


Abbildung 27 Zeitlich aufgelöste IL-6 und IL-8 Ausschüttung der A549 Monokultur

Schlussfolgerungen und Ausblick

In diesem Kapitel erfolgt die Bewertung der Versuchsergebnisse und der Vergleich mit in der Literatur vorhandenen Daten sowie ein Ausblick auf weitere Versuche.

Die Bestimmung der Partikelgrößen bestätigte die Aggregation der Partikel in physiologischen Medien, wobei die exakten unterschiedlichen dynamischen Durchmesser abhängig vom Medium sind. Zur Beurteilung der Zytotoxizität in der konventionellen Testung der A549 Zellen und THP-1 Makrophagen stehen für die A549 Zellen nach Exposition mit NM-101 (TiO₂ Partikel) Vergleichswerte in der Literatur zur Verfügung. Ein leichter Abfall (5%) der Zellvitalität sowie ein Anstieg pro-inflammatorischer Cytokine wurde in der Arbeit bei einer Dosis von 10 µg/cm² gefunden (Loret et al., 2018). Für die Referenzpartikel NM-110 (ZnO) und NM-200 (SiO₂) wurde in Mausmakrophagen ein Abfall auf 50% der unbehandelten Zellen (IC₅₀) bei 12-18 µg/ml (ZnO) bzw. >100 µg/ml (SiO₂) veröffentlicht (Farcal et al., 2015). Als respiratorische Zellen wurden in der Arbeit Calu-3 Zellen verwendet, welche auf beide Partikel im getesteten Dosisbereich (0-200 µg/ml) keine zytotoxische Reaktion zeigten. Die unterschiedliche Empfindlichkeit entspricht den hier beobachteten Verhältnissen, während im Fall der Reaktion auf TiO₂ in A549 Zellen in unseren Untersuchungen eine geringe Empfindlichkeit festgestellt wurde. Für die Membrankulturen (statisch und dynamisch) liegen keine Vergleichswerte aus der Literatur vor, es lässt sich aber feststellen, dass die akute Zytotoxizität mit vorübergehendem Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine, im Vergleich zu der langsam ansteigenden und anhaltenden Stimulation der Interleukinausschüttung dem Verhalten der Partikel in vivo entspricht. Auch hier waren bei wiederholter intratrachealer Administration von ZnO Nanopartikeln die entzündlichen Veränderungen in der Lunge gegenüber der akuten Reaktion abgeschwächt waren. Dagegen wurden bei der Behandlung mit TiO₂ Partikeln progrediente strukturelle Veränderungen in der Lunge beobachtet und bei Behandlung mit amorphen SiO₂ Nanopartikeln entstand eine Fibrosierung der Lunge (https://www.patrols-h2020.eu/about-us/downloads/D2.1_NRCWE.pdf). Somit lässt sich schlussfolgern, dass das etablierte System die Vorhersage der Reaktion im Organismus, in diesem Fall von Nagern bei intratrachealer Administration, voraussagen kann. Hierzu sind sowohl das statische, als auch das dynamische Modell geeignet. Bei kurzer Inkubation (24h in der dynamischen und 3d in der statischen Kultivierung) scheinen die THP-1 Makrophagen gegenüber der Exposition mit ZnO Partikeln einen Schutz darzustellen. Die

Reaktion in Mono- und Co-Kulturen auf die Partikelexposition zeigt leicht Unterschiede. Auf TiO₂ Partikel ist die Ausschüttung der Zellen in Co-Kultur stärker, auf SiO₂ die Spiegel der Monokulturen.

In der Zukunft sind sowohl noch kleinere Optimierungen für das dynamische Modell als auch bestätigende Wiederholungen der Versuche notwendig. Beispielsweise ist nicht geklärt, warum die Kultursysteme weitgehend konstant auf den inflammatorischen Stimulus LPS reagierten, sich aber größere Variationen in den unter Partikelstimulation bestimmten Zytokinmengen zeigten. Es wäre wichtig, die Quelle dieser Schwankungen zu identifizieren. Zur umfassenden Validierung der beiden Modelle ist weiterhin die Testung anderer Referenzpartikel und gesammelter Proben notwendig.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verhältnisse von CD45-positiven Zellen zu Gesamtzahl nach 7 Tagen Kultur in Abhängigkeit vom Verhältnis der Zelle bei Aussaat.....	19
Tabelle 2 Sekretion der Co-Kulturen im nicht stimulierten Zustand (basal) und nach Stimulation mit dem Entzündung-auslösenden Lipopolysaccharid (LPS).....	20

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aerosolteststrecke (aus: Strasser 2020)	10
Abbildung 2 Anzahlgrößenverteilung für TiO ₂ , dargestellt mittels SMPS (aus: Strasser 2020).....	11
Abbildung 3 Hydrodynamische Durchmesser von Titandioxidsuspensionen in simuliertem Lungenfluid mit den Konzentrationen 1000 und 2500 µg/mL an zwei verschiedenen Tagen; 1) Ultraschallbad, 2) Schütteln, 3) Vortexmischen.....	13
Abbildung 4 Konzentration von Ascorbinsäure im Kontakt mit den jeweiligen Nanopartikeln in einer Konzentration von 2500 µg/mL in simuliertem Lungenfluid	15
Abbildung 5 A549/THP-1 Co-Kulturmodell. Die Partikel befinden sich in der simulierten Lungenflüssigkeit (türkis) auf den Zellen. Die Versorgung der Zellen mit Nährmedium (rosa) erfolgt von unten.	17
Abbildung 6 Immunhistochemische CD45-Färbung zur Illustration der selektiven Färbung der THP-1 Makrophagen mit anti-CD45 Antikörper (pink). Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt. Scale Bar: 100 µm.....	19
Abbildung 7 Im Laufe der Kultivierung (d21 und d28) kam es in den A549/THP-1 Co-Kulturen zu der Anreicherung von mehrheitlich toten Zellen (Rahmen) auf dem Zelllayer. Scale bar: 50 µm	20
Abbildung 8 Vitalität von THP-1 Makrophagen (a) und A549 Zellen (b) und nach Exposition zu den Testpartikeln ZnO, TiO ₂ , SiO ₂	21
Abbildung 9 Schematische Darstellung der Co-Kultur aus A549 und THP-1 auf der "Lunge am Chip"	22
Abbildung 10 A CAD Model des Chips (oben) mit Membran-integrierter Impedanzsensorik und 6 Kultureinheiten. In den Close-ups ist die Unterteilung in Fluidkanal und Kulturkammer sichtbar, so wie die interdigitierten Elektroden. B Schematische Darstellung der einzelnen	24
Abbildung 11 A CFD Modellierungen der Chipdesigns und Darstellung der Geschwindigkeitsprofile bei einem Volumensstrom vom 60 µl/h. B Standardabbildungsbilder des Durchflusses von Latexkugeln im finalen Chip Design	24
Abbildung 12 Links ein Chip aus OSTEMER 322 bei dem eine klare Faltenbildung der Membran sichtbar ist. Rechts ein Chip aus PDMS.	25
Abbildung 13 A Versuchsaufbau zur Messung der Zug- und Scherfestigkeit der PDMS-PET-PDMS Verbindung mit „PDMS Mortar“. B Life/Dead Färbung der A549 Kultur nach 7 Tagen auf dem, mit „PDMS Mortar“ verbundenen PDMS-PET-PDMS Chip.	26

Abbildung 14 A Fotomaske mit 3 interdigitierten Elektrodenstrukturen mit 100 um gap. B Mikroskopische Aufnahme der Photoresiststrukturen auf einer PET Membran mit 0.4 um Porengröße.....	27
Abbildung 15 Gold besputterte PET Membran immobilisiert auf einem Objektträger in der Sputterdepositionsanlage	28
Abbildung 16 A Durchlichtmikroskopische Aufnahme der konfluenten Zellsicht einer A549 Monokultur; Zeitpunkt: 5 Tage auf Air Liquid Interface B A549 THP-1 Co-Kultur 11 Tage auf ALI (grün THP-1, blau DAPI, rot Phalloidin)	28
Abbildung 17 Veränderungen der Vitalität in A459 Monokulturen (a) und A549/THP-1 Co-Kulturen (b) nach wiederholter Exposition mit ZnO, TiO ₂ und SiO ₂ Partikeln oder Positivkontrolle (Behandlung mit Triton X100)	30
Abbildung 18 Zeitabhängige Veränderung der Interleukinsekretion nach Exposition mit den Partikeln in A549 Monokulturen.....	31
Abbildung 19 Zeitabhängige Veränderung der Interleukinsekretion in den A549/THP-1 Co-Kulturen	32
Abbildung 20 Extrazelluläres LDH (fold change) im Überstand der A549 Monokultur nach Exposition mit je 50 µg/mm ² und 100 µg/mm ² SiO ₂ , TiO ₂ und ZnO ₂	33
Abbildung 21 Extrazelluläres LDH (fold change) im Überstand der A549/THP-1 Co-Kultur nach Exposition mit je 50 µg/mm ² und 100 µg/mm ² SiO ₂ , TiO ₂ und ZnO.....	33
Abbildung 22 IL-6 und IL-8 Ausschüttung der Co-Kultur vor und nach der ZnO Exposition	34
Abbildung 23 Zeitlicher Verlauf der Viabilität der Monokultur, berechnet basierend auf Triton-X Werte (100% LDH Freisetzung), nach Exposition der Kulturen mit 100 µg/mm ² SiO ₂ , TiO ₂ und ZnO. SLF dient als Kontrolle.....	35
Abbildung 24 Zeitlicher Verlauf der Viabilität der Monokultur, berechnet basierend auf Triton-X Werte (100% LDH Freisetzung), nach Exposition der Kulturen mit 50 µg/mm ² SiO ₂ , TiO ₂ und ZnO. SLF dient als Kontrolle.....	35
Abbildung 25 Zeitlicher Verlauf der Viabilität der Co-Kultur, berechnet basierend auf Triton-X Werte (100% LDH Freisetzung), nach Exposition der Kulturen mit 100 µg/mm ² SiO ₂ , TiO ₂ und ZnO. SLF dient als Kontrolle.....	36
Abbildung 26 Zeitlicher Verlauf der Viabilität der Co-Kultur, berechnet basierend auf Triton-X Werte (100% LDH Freisetzung), nach Exposition der Kulturen mit 50 µg/mm ² SiO ₂ , TiO ₂ und ZnO. SLF dient als Kontrolle.....	37
Abbildung 27 Zeitlich aufgelöste IL-6 und IL-8 Ausschüttung der A549 Monokultur.....	38

Literaturverzeichnis

Bates, J. T., Fang, T., Verma, V., Zeng, L., Weber, R. J., Tolbert, P. E., Abrams, J. Y., Sarnat, S. E., Klein, M., Mulholland, J. A. & Russell, A. G. 2019. Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects. *Environ Sci Technol*, 53, 4003-4019.

Centre, E. C. J. R. 2014. Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: Characterisation and Physico-Chemical Properties. JRC Science and Policy Report.

Chortarea, S., Clift, M. J., Vanhecke, D., Endes, C., Wick, P., Petri-Fink, A. & Rothen-Rutishauser, B. 2015. Repeated exposure to carbon nanotube-based aerosols does not affect the functional properties of a 3D human epithelial airway model. *Nanotoxicology*, 9, 983-993.

Elsabahy, M. & Wooley, K. L. 2012. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem Soc Rev*, 41, 2545-2561.

Farcas, L., Torres Andón, F., Di Cristo, L., Rotoli, B. M., Bussolati, O., Bergamaschi, E., Mech, A., Hartmann, N. B., Rasmussen, K., Riego-Sintes, J., Ponti, J., Kinsner-Ovaskainen, A., Rossi, F., Oomen, A., Bos, P., Chen, R., Bai, R., Chen, C., Rocks, L., Fulton, N., Ross, B., Hutchison, G., Tran, L., Mues, S., Ossig, R., Schnekenburger, J., Campagnolo, L., Vecchione, L., Pietroiusti, A. & Fadeel, B. 2015. Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy. *PLoS One*, 10, e0127174.

Fröhlich, E. & Salar-Behzadi, S. 2014. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *Int J Mol Sci*, 15, 4795-4822.

Fukui, H., Horie, M., Endoh, S., Kato, H., Fujita, K., Nishio, K., Komaba, L. K., Maru, J., Miyauhi, A., Nakamura, A., Kinugasa, S., Yoshida, Y., Hagihara, Y. & Iwahashi, H. 2012. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chem Biol Interact*, 198, 29-37.

Fukui, H., Iwahashi, H., Nishio, K., Hagihara, Y., Yoshida, Y. & Horie, M. 2017. Ascorbic acid prevents zinc oxide nanoparticle-induced intracellular oxidative stress and inflammatory responses. *Toxicol Ind Health*, 33, 687-695.

Gangwal, S., Brown, J. S., Wang, A., Houck, K. A., Dix, D. J., Kavlock, R. J. & Hubal, E. A. 2011. Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential. *Environmental health perspectives*, 119, 1539-1546.

Huh, D., Matthews, B., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. & Ingber, E. 2010. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science (New York, N.Y.)*, 328, 1662-1668.

Jantzen, K., Roursgaard, M., Desler, C., Loft, S., Rasmussen, L. J. & Møller, P. 2012. Oxidative damage to DNA by diesel exhaust particle exposure in co-cultures of human lung epithelial cells and macrophages. *Mutagenesis*, 27, 693-701.

Jensen, C. & Teng, Y. 2020. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*, 7, 33.

Li, Q., Wyatt, A. & Kamens, R. M. 2009. Oxidant generation and toxicity enhancement of aged-diesel exhaust. *Atmospheric Environment*, 43, 1037-1042.

Loret, T., Rogerieux, F., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C. & Lacroix, G. 2018. Predicting the in vivo pulmonary toxicity induced by acute exposure to poorly soluble nanomaterials by using advanced in vitro methods. *Part Fibre Toxicol*, 15, 25.

Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Berggard, T., Flanagan, M. B., Lynch, I., Elia, G. & Dawson, K. 2011. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*, 5, 7503-7509.

Molina, C., Andrade, C., Manzano, C. A., Richard Toro, A., Verma, V. & Leiva-Guzman, M. A. 2020. Dithiothreitol-based oxidative potential for airborne particulate matter: an estimation of the associated uncertainty. *Environ Sci Pollut Res Int*, 27, 29672-29680.

Nawroth, J., Barrile, R., Conegliano, D., van Riet, S., Hiemstra, P. & Villenave, R. 2019. Stem cell-based Lung-on-Chips: The best of both worlds? *Adv Drug Deliv Rev*, 140:12-32.

Peijnenburg, W., Ruggiero, E., Boyles, M., Murphy, F., Stone, V., Elam, D. A., Werle, K. & Wohlleben, W. 2020. A Method to Assess the Relevance of Nanomaterial Dissolution During Reactivity Testing. *Materials (Basel)*, 13.

Pietrogrande, Russo & Zagatti. 2019a. Review of PM Oxidative Potential Measured with Acellular Assays in Urban and Rural Sites across Italy. *Atmosphere*, 10.

Pietrogrande, M. C., Bertoli, I., Manarini, F. & Russo, M. 2019b. Ascorbate assay as a measure of oxidative potential for ambient particles: Evidence for the importance of cell-free surrogate lung fluid composition. *Atmospheric Environment*, 211, 103-112.

Radivojevic, S., Zellnitz, S., Paudel, A. & Fröhlich, E. 2019. Searching for physiologically relevant in vitro dissolution techniques for orally inhaled drugs. *Int J Pharm*, 556, 45-56.

Ronaldson-Bouchard, K. & Vunjak-Novakovic, G. 2018. Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. *Cell stem cell*, 22, 310-324.

Schuller, P., Rothbauer, M., Kratz, S. R. A., Höll, G., Taus, P., Schinnerl, M., Genser, J., Bastus, N., Moriones, O., Puntès, V., Huppertz, B., Siwetz, M., Wanzenböck, H. & Ertl, P. 2020. A lab-on-a-chip system with an embedded porous membrane-based impedance biosensor array for nanoparticle risk assessment on placental Bewo trophoblast cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 312, 127946.

Setyawati, M. I., Tay, C. Y. & Leong, D. T. 2015. Mechanistic Investigation of the Biological Effects of SiO₂, TiO₂, and ZnO Nanoparticles on Intestinal Cells. *Small*, 11, 3458-3468.

Sidhaye, V., Schweitzer, K., Caterina, M., Shimoda, L. & King, L. 2008. Shear stress regulates aquaporin-5 and airway epithelial barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 3345-3350.

Terzano, C., Di Stefano, F., Conti, V., Graziani, E. & Petroianni, A. 2010. Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 14, 809-821.

Varner, V., Gleghorn, J., Miller, E., Radisky, D. & Nelson, C. 2015. Mechanically patterning the embryonic airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 9230.

Zhang, X. Q., Yin, L. H., Tang, M. & Pu, Y. P. 2011. ZnO, TiO₂, SiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts. *Biomed Environ Sci*, 24, 661-669.

Abkürzungen

AA	Ascorbic Acid
ALI	Air liquid interface
CAD	Computer-aided design
CFD	Computational Fluid Dynamic
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindol
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
ELPI+	Electrical Low Pressure Impactor
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
OOCc	Organs-on-a-Chip
PBS	Phosphat-Saline Puffer
PDMS	Polydimethylsiloxan
PET	Polyethylenterephthalat
ROS	Reactive oxygen species
SLF	Smulated lung fluid
SMPS	Scanning Mobility Particle Sizer

**Bundesministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie, Mobilität, Innovation und
Technologie**

Radetzkystraße 2, 1030 Wien

+43 1 711 62 65-0

email@bmk.gv.at

bmk.gv.at