

Abschlussbericht zum Vorhaben

**Projekt 6: TLK01L-77347 „Toxikologische und funktionelle Bewertung UFP“
für den Projektverbund
BayUFP
„Messung, Charakterisierung und Bewertung ultrafeiner Partikel“**

an das

Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz

Rosenkavalierplatz 2

81925 München

Laufzeit:

01.01.2021 – 31.03.2024

Berichtszeitraum:

01.01.2021 – 31.03.2024

Verfasser des Berichts:

Univ.-Prof. Dr. med. Stephan Hackenberg

Priv.-Doz. Dr. med. Till Meyer

Dr. rer. nat. Totta Ehret Kasemo

Apl.-Prof. Dr. med. Agmal Scherzad

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen

Universitätsklinikum Würzburg

Josef-Schneider-Str. 11

97080 Würzburg

Hinweis:

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in diesem Abschlussbericht bei Personenbezeichnungen und personenbezogenen Hauptwörtern die männliche Sprachform verwendet. Entsprechende Begriffe gelten im Sinne der Gleichbehandlung selbstverständlich für alle Geschlechter. Die verkürzte Sprachform dient nur der redaktionellen Vereinfachung und beinhaltet keinerlei Wertung



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



i. Inhaltsverzeichnis

i.	Inhaltsverzeichnis	1
ii.	Abkürzungsverzeichnis	0
iii.	Tabellenverzeichnis	0
iv.	Abbildungsverzeichnis	2
1.	Kurzzusammenfassung	5
2.	Einführung	7
3.	Zielstellung	8
4.	Ergebnisse und Diskussion	10
i.	Etablierung eines Expositionssystems mit ultrafeinen Referenzpartikeln auf primärer, humaner Atemwegsmukosa – Stufe 1: Carbon Black	10
	Hauptexperimente und Ergebnisse, Carbon black	11
ii.	Modelletablierung in München – Stufe 2: online-UFP	17
	Transport	17
	Expositionsparameter	17
	Toxikologische Parameter	19
iii.	Toxikologische und funktionelle Bewertung ultrafeiner Partikel in einem Primärzellmodell der oberen Atemwegen – Ergebnisse aus online-Versuchen in München	22
	LDH-Freisetzung als Hinweis auf Zellschädigung oder Zytotoxizität	22
	Genotoxizität nach UFP-Exposition	24
	Barriereuntersuchung nach online UFP-Exposition (München)	25
	Zytokine und Hinweise für Einfluss auf das Immunsystem	27



iv.	Transmissionselektronmikroskopie für die Ultrastrukturanalyse und Partikeldetektion in Zellen – Carbon Black und online-UFP	29
	Morphologie	29
	Partikeldetektion in Zellen (Carbon black)	31
	Intrazelluläres Carbon Black	32
5.	Darstellung und Bewertung der bisherigen Ergebnisse und praktische Anwendbarkeit	34
6.	Fazit und Ausblick	36
v.	Literaturverzeichnis	38



ii. Abkürzungsverzeichnis

Air-Liquid Interface	ALI
Clean air („Luft“)	CA
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase	FPG
Innate Lymphoid Cells	ILC
Interleukin	IL
Laktatdehydrogenase	LDH
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-DiphenylTetrazoliumbromid	MTT
Positivkontrolle	PC
transepithelialen Widerstand	TEER
ultrafeine Partikel	UFP

iii. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Die Tabelle zeigt theoretische Konzentrationen für Carbon Black-Deposition im „Cloud“-System. Zahlen basieren auf Vereinfachungen und Annahmen und können nicht für Vergleiche mit anderen Studien oder Umweltdaten verwendet werden. Konzentrationen dienen für Vergleiche innerhalb dieser Studie und geben Hinweise auf Größenordnungen, bei denen Effekte auftreten könnten.

12

Tabelle 2. Parameteroptimierung für ALI-Expositionen der Primärzellmodelle aus Würzburg in München. Assay-Daten für 100ml Luft /min wurden nicht erhoben, da



diese Modelle nach 2 und 4 Stunden Exposition makroskopisch beschädigt waren (Loch in der Mitte und ausgetrocknete Oberfläche).

19



iv. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. In der Etablierungsphase wurden relevante ausgeschüttete Zytokine in Atemwegmodellen im DotBlot-Assay gemessen. Von links wurden besonders relevante Zytokine eingekreist: GM-CSF, IL-6, IL-8 und MCP-1. 11

Abbildung 2. LDH-Messung 2 Stunden (links) und 24 Stunden (rechts) nach Exposition. Ein signifikanter Unterschied ist im Vergleich zwischen der Negativkontrolle und $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ vorhanden (Welch's T-Test p-Wert = 0.012, n Spender = 5). Bei $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ war kein Unterschied zur Negativkontrolle. Nach 24 Stunden waren einzelne Werte so hoch, dass man hier von Zytotoxizität sprechen könnte, allerdings ist der Varianz gestiegen und die Replikatzahlen geringer, sodass eine statistische Auswertung (oder Verwendung von sogenannten "Boxplots" wie im Abbildung links) nicht empfohlen ist. 13

Abbildung 3. Barriereintegrität mittels TEER, 2 und 24 Stunden nach Carbon Black-Exposition gemessen. Ergebnisse von den niedrigsten Konzentrationen $0.01\text{-}1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ wurden für bessere Übersichtlichkeit zusammengefügt. 2 Stunden nach Exposition war der durchschnittliche TEER-Wert $1034 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$. Bei den Konzentrationen 0.01-1, 4, und $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ waren die Mittelwerte 1153, 1120, und $1059 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ (im Vergleich mit Welch's T-Test zwischen 4 oder $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mit der Negativkontrolle nach 2 Stunden ergab $p = 0.62$ und 0.88 , $n=5$). Nach 24 Stunden war der TEER-Mittelwert bei der Negativkontrolle $723 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$, bei 0.01-1, 4, und $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 622, 500, und $595 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ (im Vergleich mit Welch's T-Test zwischen $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mit der Negativkontrolle ergab $p = 0.02$ und zwischen 4 und $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ergab $p = 0.3$, $n=4\text{-}8$ für die getestete Bedingungen). PC = Positivkontrolle (Staurosporin). 13

Abbildung 4. Zytokinexpression von oben: IL-6 (links) und IL-8 (rechts), mitte: IL-1 β (links) und TNF α (rechts), und unten IL-10, mit einem so genannten „Bead assay“ quantifiziert. Eine Spender-Varianz wird angedeutet. Kein Einfluss der Partikelexposition kann festgestellt werden. 16

Abbildung 5. Zytotoxizität als % von einer Positivkontrolle (100%) im LDH-Assay. 20 ml/min (blau), 10 ml/min (grün) und Inkubatorkontrollen ohne Exposition (rot) wurden analysiert. „na“ = keine Angabe; Inkubatorkontrolle. 20

Abbildung 6. Die Zellvitalität wurde mit Trypanblau-Färbung den toten Zellen und Zählung tote und die Gesamtanzahl Zellen im Neubauerkammer durchgeführt 2 Stunden nach Exposition im Anschluss zum Comet Assay (siehe unten). $n=2$. 21



Abbildung 7. Ein höherer Anteil GSSG zu GSH ist ein Hinweis auf Zelluläre Antworten auf oxidativen Stress 2 Stunden nach Exposition. Tendenziell weist ein Spender eine höhere GSSG-GSH-Ratio nach UFP-Exposition auf (Spender 20).

22

Abbildung 8. LDH-Freisetzung relativ zum Mittelwert allen Negativkontrollen. LDH wurde in allen Proben nachgewiesen und kein Unterschied zwischen exponierten Proben und Negativkontrollen im Inkubator („IC_NC“) konnte nachgewiesen werden. Ein exponiertes Insert (ein Replikat) zeigt einen sehr hohen Wert, was eventuell als Hinweis auf Probleme sein kann. Ein anderes Replikat vom selben Spender deutet an, dass dies kein Spenderspezifischer Effekt ist.

24

Abbildung 9. Im Comet Assay wurden DNA-Schädigungen untersucht. Nur in der Positivkontrolle konnte ein Effekt der Mittelwert nachgewiesen werden. Welch's two sample t-Test zwischen der Inkubatorkontrolle und UFP: $p = 0.32$.

25

Abbildung 10. Die Integrität der epithelialen Barriere für Modelle 2 Stunden nach Exposition. Gezeigt werden nur im Inkubator kultivierte Modelle („IC_NC“) und Modelle, die im ALI-System mit strömender Luft („clean air“, 20 ml/Minute), oder mit online-generierten Partikel (UFP) exponiert wurden. Im Vergleich zwischen allen Gruppen wurde ein signifikanter Unterschied der Verteilungen festgestellt (Kruskal-Wallis rank Test, $p = 0.003$). Spender: $n = 7-10$ pro Bedingung.

26

Abbildung 11. Die Integrität der epithelialen Barriere für Modelle 24 Stunden nach Exposition. Gezeigt werden nur im Inkubator kultivierte Modelle („IC_NC“) und Modelle, die im ALI-System mit strömender Luft („clean air“, 20 ml/Minute), oder mit online-generierten Partikel (UFP) exponiert wurden. Die Spenderzahl ist hier zu gering für eine statistische Auswertung. Spender: $n = 2-4$ pro Bedingung.

27

Abbildung 12. Pro-inflammatorische Zytokine IL-8 (links) und IL-6 (rechts) wurden in Mukosamodellen mit und ohne UFP-Exposition detektiert. Keine Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten Mukosamodelle wurden detektiert. $n=5-9$. Die Nachweisgrenze für diese Zytokine in diesem Assay war ~ 25 (IL-8) und ~ 4 pg/ml (IL-6).

28

Abbildung 13. Pro-inflammatorische Zytokine IL-1 β (links) und TNF α (mitte) und entzündungshemmender IL-10 wurden in den meisten Proben nicht detektiert. In einzelnen Modellen wurden TNF α und IL-10 detektiert. Der niedrigste Wert (~ 100 pg/ml) zeigt die Nachweisgrenze für die jeweiligen Zytokinen in diesem Assay.

29

Abbildung 14. A) Unten kann die Oberfläche eines Modells erkannt werden. Runde Strukturen zeigen quer geschnittene Kinozilien mit dem typischen 2+9 Mikrotubulistruktur. Kleinere Strukturen sind Mikrovilli. B) Zwei Kinozilien in einer Epithelzelle verankert. C) Becherzelle ohne Kinozilien und mit Expansion in die apikale Richtung. Weiße



Arealen sind wahrscheinlich mukusgefüllte Vesikeln. D) Tight junction-Komplex mit markierten Strukturen: „zona occludens“ (Z.O.)/„tight junction“, „zona adherens“ (Z.A.) und der „Desmosom“. 30

Abbildung 15. Primärzellmodell mit Carbon Black unter Submergebedingungen exponiert. Das Ziel in dem Experiment war es, methodologisch auszuwerten ob nicht kontrastierte Proben in der TEM-Analyse so starke Signale zeigen, dass sie nur von Carbon Black/UFP stammen können. Der weiße Pfeil zeigt ein Beispiel solche Partikelaggregate/Akkumulate. 31

Abbildung 16. Carbon Black vorbereitet als für Expositionen in einer Stocklösung mit 2mg/ml in destilliertem Wasser. A) Negativkontrolle ohne Partikel, B-D) Partikel und Partikelagglomerate oder -akkumulate in verschiedene Vergrößerungen. Der Primärgröße liegt wie erwartet bei ca. 20 nm. 32

Abbildung 17. Intrazelluläre Carbon Black Partikelaggregate/Akkumulate, hier in einem Modell, das mit $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ exponiert wurde. Das Beispiel zeigt, dass Partikeln in Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden sind. A, B und C zeigen verschiedene Vergrößerungen des gleichen Bereiches. 33

Abbildung 18. Intrazelluläre Partikel waren mit verschiedenen Zellstrukturen assoziiert. A) Befestigungspunkt eines Kinoziliums („Basal body“), B), extrazellulär im Vesikel, C), mit Mitochondrion assoziiert, D) in Struktur den wir als Mukusvesikel beurteilen. 34



1. Kurzzusammenfassung

Das Projekt hat die Wechselwirkung von ultrafeinen Partikeln (UFP) mit der Schleimhaut und den Schleimhautzellen der oberen Atemwege untersucht. Es knüpfte damit optimal an die Untersuchungen an Modellen der unteren Atemwege an, die im Verbund von den Arbeitsgruppen Erlangen/ München bearbeitet wurden. Testmodelle aus primären humanen Nasenschleimhautzellen wurden in Co-Kultur mit Epithelzellen und Fibroblasten als dreidimensionales Konstrukt aufgebaut. Die sogenannte Air-Liquid Interface (ALI) Kultivierungsmethode stellt eine Technik dar, bei der die Epithelzellen in Kontakt mit Luft stehen, was zu einer hohen Differenzierung der Zellen beiträgt. Die derzeit etablierten und verwendeten ALI-Nasenschleimhaut-Co-Kulturmodelle bieten die Möglichkeit einer sowohl submerged als auch luftgebundenen Exposition.

In der ersten Projektphase wurde dieses Modell für den erforderlichen Versuchsaufbau optimiert und an Standardpartikeln mit einer Primärgröße von ca. 20 nm validiert, sodass nun ein UFP-Testsystem für den oberen Atemtrakt mit hoher *in vivo/in vitro*-Korrelation zur Verfügung stand (Projektstufe 1). Die Aussagekraft solcher Modelle ist entsprechend hoch. Online-Expositionen mit generierten Partikeln wurden am Helmholtz Zentrum München erfolgreich durchgeführt (Projektstufe 2). In den Stufen 1 und 2 wurden die Auswirkungen der UFP-Exposition auf die Barrierefunktion der Schleimhaut, toxikologische Parameter sowie die Entzündungsmediatoren untersucht. Um diese Endpunkte aussagekräftig untersuchen zu können, ist eine reproduzierbar hohe Epithelbarriere in den Modellen eine Grundvoraussetzung für die Durchführung der Versuche in Projektphase 2. Das optimierte Co-Kulturmodell hat diese Voraussetzung erfüllt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine relevanten Akuteffekte detektiert wurden. Hinweise auf eine leichte Barrierestörung des Atemwegepithels werden hier beschrieben, sowie Hinweise auf individuelle Reaktionen der verschiedenen Zellspender, was wenn es sich in weiteren Studien bestätigen lassen würde, auf unterschiedliche Reaktionen in der menschliche Population hinweisen würde.

Ein weiterer Projektinhalt war die Analyse des sogenannten Transkriptoms durch unsere Kooperationspartner. Im Rahmen der Expositionsversuche mit generierten UFP wurde eine enge Kooperation mit den Projektpartnern am Helmholtz Zentrum München und mit der Erlanger Gruppe etabliert. Dabei wurden die verwendeten Testverfahren und



experimentellen Methoden zwischen den *in vitro*-Verbundpartnern standardisiert. Dies hat eine gewisse Vergleichbarkeit der Ergebnisse an den Standorten Würzburg und Erlangen/München ermöglicht.



2. Einführung

Hauptziel des Projekts war die Bewertung der Funktionalität des respiratorischen Epithels unter dem Einfluss von definierten und möglichst gut charakterisierten UFP. Der Oberbegriff Funktionalität umfasst im konkreten Fall

- **die Analyse der Integrität der epithelialen Barriere.** Die Bedeutung einer intakten Schleimhautbarriere ist vor allem in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Störungen der Barriere stellen eine Prädisposition für virale und bakterielle Infektionen dar. Ebenso begünstigen sie die Entstehung allergischer Erkrankungen sowie die Chronifizierung von Atemwegserkrankungen (Yuksel & Turkeli, 2017; Zhang et al., 2016). Hierzu zählen unter anderem die chronische Nasennebenhöhlenentzündung sowie chronische Erkrankungen der unteren Atemwege wie Asthma bronchiale oder COPD. Dabei stellt die gestörte Barrierefunktion häufig einen Auslöser für die Chronifizierung der Erkrankung dar, die mit einer deutlich schlechteren Langzeitprognose verbunden ist. Zur Untersuchung der Barrierefunktion wird ein Testmodell benötigt, das von sich aus bereits eine ausreichende Barriere darstellt und im besten Fall die *in vivo*-Situation gut widerspiegelt (Hiemstra et al., 2018; Lacroix et al., 2018; Lodes et al., 2020; Upadhyay & Palmberg, 2018). Es ist möglich, dass eine Barrieredysfunktion bereits bei subtoxischen Partikeldosen auftritt. Für eine Exposition im Helmholtz Zentrum (Phase 2) war ein Transport der Modelle von Würzburg nach München erforderlich. Hierbei musste untersucht werden, ob die Modelle nach dem Transport und der Inkubation in München noch eine ausreichend hohe Barriere aufwiesen
- **Analyse der durch UFP-induzierten Zyto- und Genotoxizität.** Dieses Projektziel ergänzt in idealer Weise das Projekt der Arbeitsgruppe Schmitz-Spanke/Zimmermann. Die Untersuchung funktioneller Parameter ist nur nach Partikelexposition im nicht-toxischen Konzentrationsbereich sinnvoll, d.h. in dem Bereich, in dem Zellen nur subtil geschädigt werden, aber ohne signifikanten Einfluss auf die Vitalität (nicht > 50%). Daher muss im Projekt detailliert nachgewiesen werden, dass die verwendeten Konzentrationen weder eine solche toxische Wirkung auf die im Modell eingebrachten Zellen haben, noch zu signifikanten DNA-Schäden führen. Somit war eine Dosisfindung der einsetzbaren Partikelkonzentrationen bzw. ALI-Expositionseinstellungen in München in Abstimmung mit den anderen Arbeitsgruppen erforderlich. Idealerweise sollten die subtoxischen Konzentrationsbereiche für beide



Arbeitsgruppen (AG Hackenberg und AG Zimmermann/Schmitz-Spanke) identisch sein, um in den verschiedenen Zellkulturmodellen die gleichen Partikelkonzentrationen einzusetzen. Letzteres würde die beste Vergleichbarkeit zwischen Untersuchungen an den oberen und unteren Atemwegen ermöglichen. Die Analyse der in der menschlichen Population vorhandenen biologischen Varianz in Bezug auf toxische Effekte ist wertvoll und das Primärzellmodell ist für diese Fragestellung geeignet. Auf der anderen Seite werden dadurch Modelle von vielen Spendern benötigt, um die Ergebnisse der Untersuchungen statistisch auswerten zu können.

- **die Analyse von Entzündungsmediatoren.** Es ist bekannt, dass exogene Schadstoffe über die epitheliale Ausschüttung bestimmter Interleukinen (IL, z.B. IL-33) sogenannte Innate Lymphoid Cells (ILC) unseres Immunsystems aktivieren, die dann in hohem Maße weitere Zytokine ausschütten. Insbesondere IL-4, IL-5 und IL-13 spielen dabei eine zentrale Rolle. Diese Entzündungsmediatoren rekrutieren und aktivieren eosinophile Granulozyten und führen schließlich zu einer nicht-allergischen eosinophilen Entzündung der Atemwege (Typ II Inflammation). Dieser Prozess ist das pathologische Korrelat von schwerem Asthma bronchiale oder chronischer Sinusitis. Die Zytokine IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-10 und TNF α sind ebenfalls relevant, da sie an frühen Entzündungsprozessen beteiligt sind. Eine mögliche Korrelation zwischen UFP-Exposition und Auslösung der oben beschriebenen Zytokinkaskade wurde analysiert aber konnte nicht bestätigt werden.

3. Zielstellung

An dieser Stelle wird auf das Arbeitsprogramm im Vollantrag verwiesen. Die Arbeiten gliederten sich in zwei Stufen, die teilweise parallel durchgeführt wurden und sich gegenseitig ergänzt haben.

Stufe 1: Charakterisierung der Wechselwirkung von UFP mit Zellen des Respirationstraktes im Offline-Experiment unter Verwendung standardisierter Partikel

Zeitplan: Für dieses Arbeitspaket waren 10 Monate vorgesehen. Die Projektbearbeitung konnte mit der Einstellung von Frau Dr. Ehret Kasemo im April 2021 beginnen und wurde im Wesentlichen Ende Februar 2022 abgeschlossen.

Inhalt: Konkret umfasste Stufe 1 die Etablierung des Testsystems für UFP. Dazu wurden wie geplant standardisierte Partikelsysteme eingesetzt. In Abstimmung mit dem Helmholtz



Zentrum, München und dem Institut für Arbeitsmedizin in Erlangen wurden Carbon Black (Printex 90; siehe z.B. (Ema et al., 2016) und Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT) 401 (siehe z.B. (Louro et al., 2016)) für diese Versuche initial eingesetzt. Nach ersten Auswertungen wurde eine Standardisierung der verwendeten Testmethoden und die Definition der Ziele und Kriterien für Toxizität und DNA-Schädigung durchgeführt. Ziel war es einen subtoxischen Konzentrationsbereich zu definieren, in dem die funktionellen Testverfahren in dieser Projektphase sinnvoll eingesetzt werden konnten. Zur Vereinfachung und weitestgehenden Standardisierung wurden diese Offline-Expositionen in Stufe 1 in Zellkulturmedium, quasi unter Wasser (submerged) oder mit einem „Cloud-System“ durchgeführt (Verneblung von in Flüssigkeit gelösten Partikeln). Darüber hinaus musste in dieser Testphase die Integrität und Qualität der Epithelbarriere im *in vitro*-System nachgewiesen und ggf. optimiert werden. Dies war eine Voraussetzung für die Untersuchung der barriereschädigenden Eigenschaften von UFP. Schließlich war in Stufe 1 der Nachweis einer ausreichenden Schleimproduktion im Modell erforderlich. Dies wurde durch die Färbung von Proteinen auf der Zelloberfläche und in schleimproduzierenden Zellen erreicht.

Stufe 2: Charakterisierung der Interaktion von UFP mit Zellen des Respirationstraktes im Online-Versuch unter Verwendung eines Verbrennungsgenerators (CAST/mini-CAST) mit den entsprechenden Kooperationspartnern des Verbundes

Zeitplan: Für dieses Arbeitspaket waren 2 Jahre veranschlagt

Inhalt: Im Rahmen einer gemeinsamen Versuchsreihe mit dem Helmholtz Zentrum, München und dem Institut für Arbeitsmedizin, Erlangen wurden Online-Expositionen der optimierten und etablierten Zellkultursysteme durchgeführt. Die Partikelgenerierung wurde mit dem am Helmholtz Zentrum, München vorhandenen und etablierten Gerät „mini-CAST“ durchgeführt. Die exakte Erarbeitung eines Expositionsprotokolls wurde hierbei interdisziplinär etabliert, und erste Expositionen fanden im Mai 2022 im Helmholtz Zentrum, München statt. Transportversuche der Zellkulturmodelle, entsprechende Protokolle für die nach der Exposition anschließenden Funktionsuntersuchungen und toxikologischen Evaluationen wurden damit in diesem Online-Setting in vier Expositionskampagnen evaluiert. Gemeinsam wurden zudem Proben für eine initiale Transkriptomanalyse gesammelt. Diese Analysen wurden federführend durch das Helmholtz Zentrum, München durchgeführt.



4. Ergebnisse und Diskussion

i. Etablierung eines Expositionssystems mit ultrafeinen Referenzpartikeln auf primärer, humaner Atemwegsmukosa – Stufe 1: Carbon Black

In der erste Projektphase wurden in engem Austausch mit den *in vitro*-Toxikologiegruppen Schmitz-Spanke/Zimmermann Referenzpartikel (vor allem Carbon black) ausgewählt und Assays zur Auswertung (Endpoints) evaluiert. Als Vorbereitung für Stufe 2 (online-Versuche) waren die Methoden und die Handhabung/Logistik von primärer Bedeutung, und diese Ziele wurden, wie bereits berichtet, im Jahr 2022 fristgerecht erreicht. Rein technisch wurde evaluiert, ob das Modell auf ein Zellkulturformat größeren Durchmessers umgestellt werden konnte, um mit den etwas differierenden Expositionsvorrichtungen in München kompatibel zu sein (Umstellung von 12-Well-System auf ein 6-Well-System). Obwohl wichtige Zellkultur-Parameter wie z.B. das Verhältnis zwischen Epithelzellen und Fibroblasten gründlich evaluiert wurden, konnte kein Protokoll identifiziert werden, das es erlaubt hätte, das größere Zellkulturformat (6-Well) zu verwenden und trotzdem einen mukoziliären Phänotyp (Mukus und schlagende Zilien) zu erreichen. Als alternative Lösung wurden Adapter für das Expositionssystem in München angeschafft, die Expositionen mit anderen Modellgrößen erlauben. Daher wurden weitere Versuche auch in Stufe 1 im kleineren Zellkulturformat (12-Well) durchgeführt, in der Mukus und schlagende Zilien reproduzierbar vorhanden waren. Auch qualitative Ausschüttung im Modell von vor allem IL-6 und IL-8, wichtige epitheliale



Zytokine, wurde bestätigt (Abbildung 1).

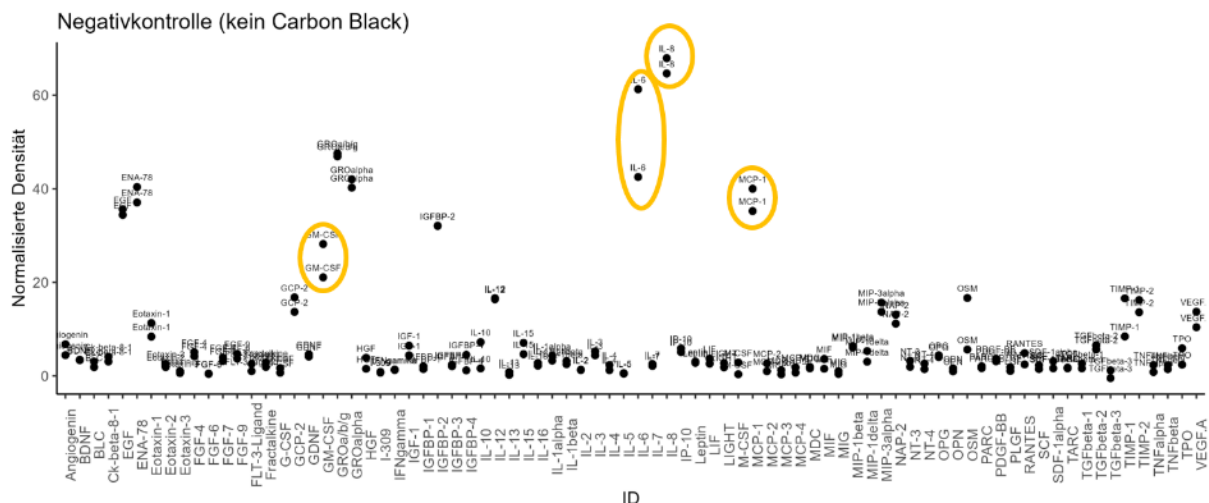


Abbildung 1. In der Etablierungsphase wurden relevante ausgeschüttete Zytokine in Atemwegmodellen im DotBlot-Assay gemessen. Von links wurden besonders relevante Zytokine eingekreist: GM-CSF, IL-6, IL-8 und MCP-1.

Hauptexperimente und Ergebnisse, Carbon black

Die Experimente wurden 2023 fortgesetzt, um die biologischen Effekte der Referenzpartikel in unserem *in vitro*-Modell zu bestimmen und statistisch auszuwerten. Diese Ergebnisse und komplementäre Partikeluntersuchungen werden derzeit für eine Publikation zusammengestellt, die im 2. - 3. Quartal 2024 eingereicht werden soll. Zusammenfassend wurde unerwartet beobachtet, dass die größten messbaren Effekte in manchen Assays nicht bei der höchsten, sondern bei der zweithöchsten Konzentration auftraten. Dieses Verhältnis wurde beim **LDH-Test** (als Indikator für Zytotoxizität; Abbildung 2) nach Carbon black-Exposition beobachtet. An dieser Stelle ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass Konzentrationen in dieser Studie fast ausschließlich für Vergleiche innerhalb unserer Studien dienen können. Sie sind nicht für Vergleiche mit anderen Studien oder Umweltdaten geeignet. Für Konzentrationsberechnungen und Expositionen mit dem Nebulizer (Vitrocell) wurden folgende vereinfachende Annahmen gemacht: 1.) eine 100% Deposition findet statt (siehe Tabelle 1 für Umrechnung), 2.) keine Partikel bleiben an Wänden des Kammers oder Kontaktoberflächen des Nebulizers hängen, und 3.) nach jeder Exposition kann die Kammer und der Nebulizer komplett von Partikeln gesäubert werden. Es ist bekannt, dass Partikeldepositionen sich zwischen z.B. Laboren, Studien, Medien und Partikeln stark unterscheiden (Bannuscher et al., 2022). Diese vergleichende Studie zeigte ein Mittelwert von ~65% Deposition, mit sehr hoher Varianz. Eine Umrechnung unserer Konzentrationen zu



65% wird in Tabelle 1 gezeigt. Da wir kein Messgerät (Quartz Crystal Microbalance (QCM)) für tatsächliche Depositionsbestimmung zur Verfügung hatten, wurde mit den oben gelisteten Annahmen gearbeitet. Eine Folge dieser Annahmen ist, dass eine Umrechnung von Masse pro Areal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in Masse pro Volumen ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) keine Veränderung der Zahl (sondern bloß die Einheit; cm^2 in cm^3 umgeschrieben) ergibt, weil wir von einer 100%-ige Deposition ausgegangen sind. Bei Umrechnungen dieser beiden Einheiten wären sonst zusätzliche Annahmen (physikalisch und chemisch) notwendig, um z.B. Diffusionsverhalten versus Sedimentierung, oder Interaktionsstärke mit der Zelloberfläche (um Bindung/Freisetzungsratios einzuschätzen) einschätzen zu können. Solche Berechnungen waren nicht Bestandteil des Projektes und sind uns für die hier verwendeten Partikeln auch nicht als veröffentlichte Daten bekannt.

Tabelle 1. Die Tabelle zeigt theoretische Konzentrationen für Carbon Black-Deposition im „Cloud“-System. Zahlen basieren auf Vereinfachungen und Annahmen und können nicht für Vergleiche mit anderen Studien oder Umweltdaten verwendet werden. Konzentrationen dienen für Vergleiche innerhalb dieser Studie und geben Hinweise auf Größenordnungen, bei denen Effekte auftreten könnten.

Konzentration in Abbildungen [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	65%-ige Deposition* [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Masse pro Volumen [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]
0	0	0
0,1	0,065	0,1
1	0,65	1
4	2,6	4
8	5,2	8

*(Bannuscher et al., 2022)

Abbildung 2 zeigt die LDH-Werte 2 und 24 Stunden nach Exposition mit Carbon Black-UFP. Nach 2 Stunden (links) zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und der zweithöchsten Carbon Black-Konzentration ($4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die Achsen sind bei dieser Messung standardmäßig mit „Zytotoxizität“ beschriftet, obwohl man normalerweise erst ab ca. 50%-iger Einschränkung der Vitalität von Zytotoxizität spricht. In unseren Experimenten lagen alle Werte nach 2 Stunden in einem relativ niedrigen Bereich von <30% der Positivkontrolle und können nicht ohne weiteres als Zytotoxizität bezeichnet werden. Wir interpretieren dieses Ergebnis als Hinweis auf eine Membranschädigung, die zur Freisetzung von LDH führt, aber nicht zwangsläufig zum Zelltod. Alternativ sind im Gewebemodell nur wenige Zellen, möglicherweise bestimmte Zelltypen, betroffen, sodass der Gesamteffekt



gering bleibt. Nach 24 Stunden liegen im LDH-Assay wenige Replikate vor und eine eindeutige Aussage ist nicht möglich.

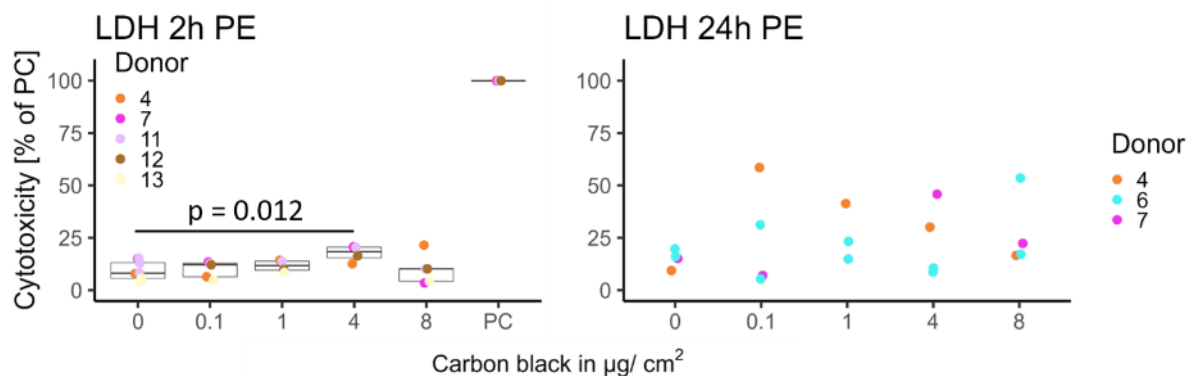


Abbildung 2. LDH-Messung 2 Stunden (links) und 24 Stunden (rechts) nach Exposition. Ein signifikanter Unterschied ist im Vergleich zwischen der Negativkontrolle und 4 µg/cm² vorhanden (Welch's T-Test p-Wert = 0.012, n Spender = 5). Bei 8 µg/cm² war kein Unterschied zur Negativkontrolle. Nach 24 Stunden waren einzelne Werte so hoch, dass man hier von Zytotoxizität sprechen könnte, allerdings ist der Varianz gestiegen und die Replikatzahlen geringer, sodass eine statistische Auswertung (oder Verwendung von sogenannten "Boxplots" wie im Abbildung links) nicht empfohlen ist.

In Einzelfällen würde man nach 24 Stunden von Zytotoxizität sprechen, ein Ergebnis, dem man in zukünftigen Versuchen nachgehen könnte. Die Korrelation zwischen einem Anstieg der LDH nach 2 Stunden und einer Schädigung der Barriere (Abbildung 3) nach 24 Stunden deutet darauf hin, dass der geringe Anstieg der LDH nach 2 Stunden biologisch relevant ist.

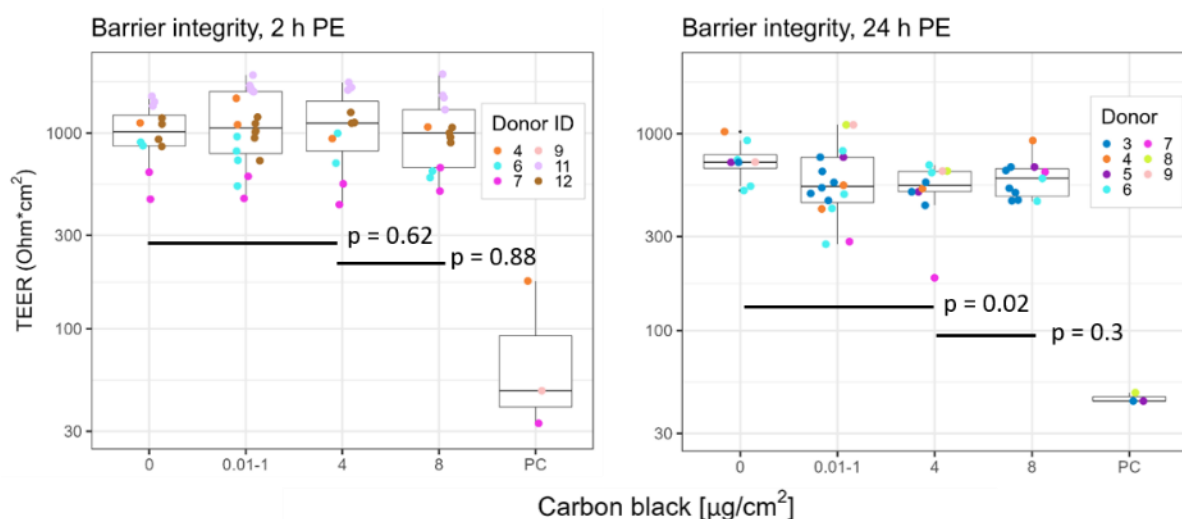


Abbildung 3. Barriereintegrität mittels TEER, 2 und 24 Stunden nach Carbon Black-Exposition gemessen. Ergebnisse von den niedrigsten Konzentrationen 0.01-1 µg/cm² wurden für bessere Übersichtlichkeit



*zusammengefügt. 2 Stunden nach Exposition war der durchschnittliche TEER-Wert 1034 Ohm*cm². Bei den Konzentrationen 0.01-1, 4, and 8 µg/cm² waren die Mittelwerte 1153, 1120, und 1059 Ohm*cm² (im Vergleich mit Welch's T-Test zwischen 4 oder 8 µg/cm² mit der Negativkontrolle nach 2 Stunden ergab p = 0.62 und 0.88, n=5). Nach 24 Stunden war der TEER-Mittelwert bei der Negativkontrolle 723 Ohm*cm², bei 0.01-1, 4, und 8 µg/cm² 622, 500, und 595 Ohm*cm² (im Vergleich mit Welch's T-Test zwischen 4 µg/cm² mit der Negativkontrolle ergab p = 0.02 und zwischen 4 und 8 µg/cm² ergab p = 0.3, n=4-8 für die getestete Bedingungen). PC = Positivkontrolle (Staurosporin).*

Es wäre von wissenschaftlichem Interesse zu analysieren, ob auch solche geringen LDH-Veränderungen, die typischerweise als nicht relevant interpretiert werden, eine langfristige biologische Bedeutung haben. Auch quantitative Zytokinmessungen wurden in Hauptexperimenten durchgeführt. Quantifizierungen weisen darauf hin, dass **IL-8 und IL-6**



wie erwartet hoch exprimiert sind (Abbildung 4).

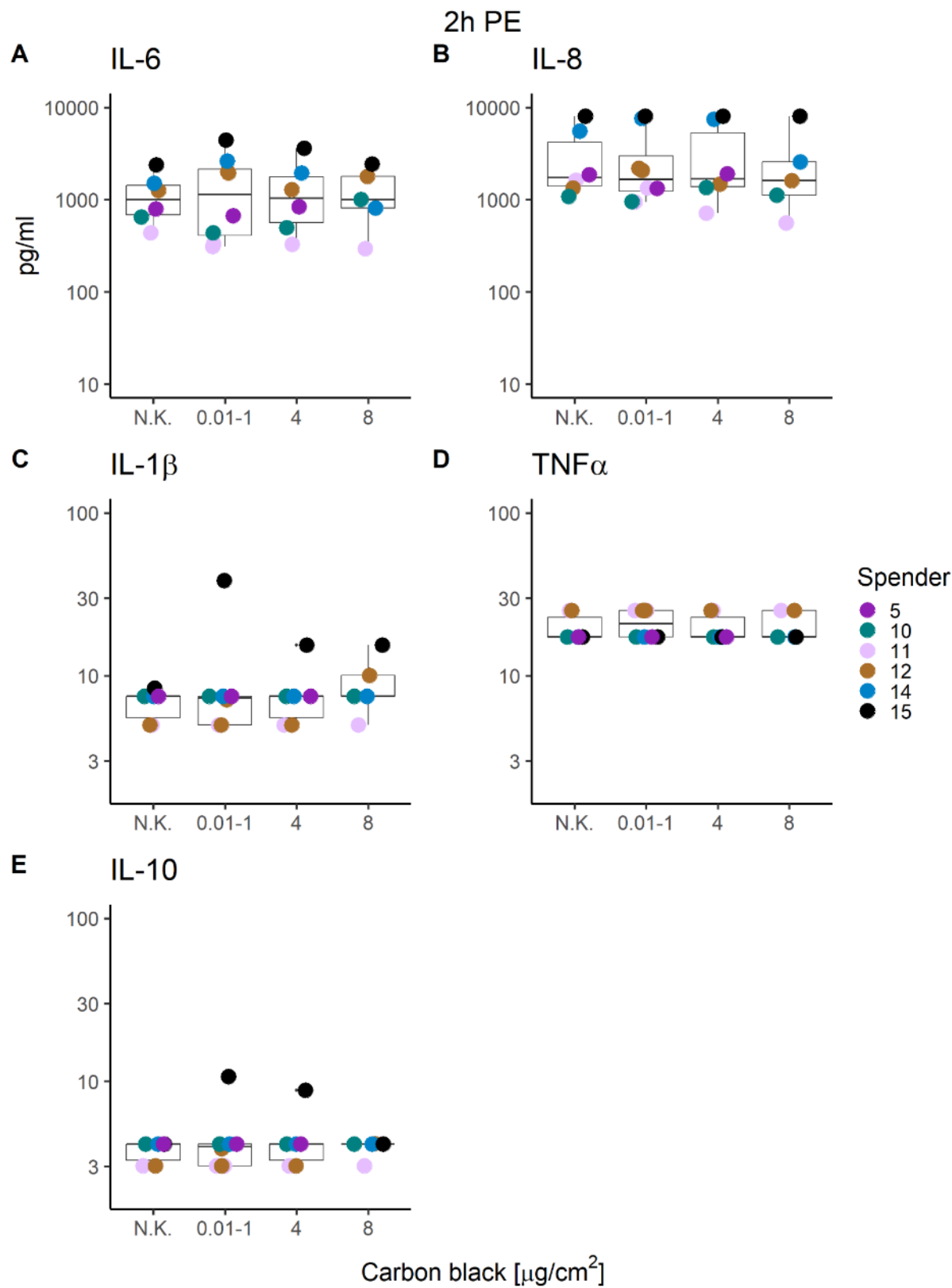


Abbildung 4. Zytokinexpression von oben: IL-6 (links) und IL-8 (rechts), mitte: IL-1 β (links) und TNF α (rechts), und unten IL-10, mit einem so genannten „Bead assay“ quantifiziert. Eine Spender-Varianz wird angedeutet. Kein Einfluss der Partikelexposition kann festgestellt werden.

Weiter wurden auch IL-1 β , TNF α und IL-10 bei den gleichen 2 Spendern analysiert und quantifiziert. In den meisten Proben waren diese Zytokine auf der Nachweisgrenze. Spendervarianz wird bei mehreren Zytokinen angedeutet. Kein Einfluss durch Partikelexposition wurde in den 2 Spendern detektiert.

Zukünftige Forschungsarbeiten könnten Methoden wie RNA-Sequenzierung und Untersuchungen zum oxidativen Stress durch GSH/GSSG-Messungen nach Carbon Black-Exposition nutzen, um tiefergehende Einblicke in die biologischen Prozesse zu gewinnen, die hinter der Korrelation zwischen LDH-Veränderungen und Schäden an der Schutzbarriere der Atemwege eventuell stehen. Das Ziel dieser Studien wäre es, über die einfache Feststellung einer Korrelation hinauszugehen und eine mögliche Kausalität zwischen diesen Phänomenen zu verstehen.

24 Stunden nach der Exposition verhielten sich die Modelle in der LDH-Messung, die mit den niedrigsten Konzentrationen exponiert wurden, ähnlich wie die Modelle, die mit der höchsten Konzentration behandelt wurden. In der Barriereanalyse ist ebenfalls ein Effekt bei den niedrigsten und höchsten Konzentrationen zu erkennen, die auch in der Größe vergleichbar sind (Abbildung 3). Wie im LDH-Assay ist der stärkste Effekt bei der zweithöchsten Konzentration zu beobachten, obwohl in der TEER-Messung kein signifikanter Unterschied zur höchsten Konzentration festgestellt wurde. In unserem Manuskript nehmen wir an, dass die Modelle, die bei der niedrigsten und der höchsten Konzentration exponiert wurden, in der Realität intrazellulär ähnlichen Dosen (Anzahl) UFP ausgesetzt waren. Physikalische Prinzipien erklären, warum hohe Partikelkonzentrationen in der Regel zu Partikelagglomeration oder –akkumulation (siehe Definitionen in Barlow et al., 2009) führen (Gudkov et al., 2020; Zook et al., 2011). Wenn UFP agglomerieren, bleibt praktisch eine geringere Anzahl kleinerer Partikel (UFP) übrig, da die Partikel in größeren Agglomeraten oder akkumulierten (größeren) Strukturen vorliegen und nicht mehr im UFP-Größenbereich. Wenn dies der Fall ist, ist es möglich, dass Zellen, die eine Mukusschicht und schlagende Zilien besitzen, besser gegen solche größeren Agglomerate/Akkumulationen geschützt sind als gegen UFP (Bruinink et al., 2015). Bereits abgeschlossene Partikeltests haben zusätzliche Partikeldaten generiert, um diese Hypothese auf Partikelebene zu untersuchen. Die untersuchten Bedingungen konnten die Hypothese nicht bestätigen – es gab keine konzentrationsabhängigen Größenunterschiede der Partikel. Allerdings wären längere



Partikelinkubationszeiten auch relevant, sowie die Mischung von Partikeln und Mukus, wie in unseren Expositionen. Solche Experimente sind zurzeit nicht vorgesehen, sondern könnten Teile von Folgeprojekten darstellen. Zusätzliche biologische Untersuchungen sind nicht geplant.

ii. Modelletablierung in München – Stufe 2: online-UFP

Transport

Der Transport der Zellen nach München erfolgte nach einem zuvor evaluierten Protokoll. Anstelle des normalen, flüssigen Zellkulturmediums wurde dieses mit Agarose gemischt, so dass die Zellen in einem Gel eingebettet transportiert werden konnten. Dieses Protokoll wurde zunächst im Würzburger Labor validiert. Dort wurden die Modelle bei wechselnden Temperaturen (25-30°C) und leichtem Schütteln für mindestens 6 Stunden gelagert, bevor sie wieder unter normalen Zellkulturbedingungen (37°C und 5% CO₂) kultiviert wurden. Bei diesen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Modelle eine normale Funktion (mukoziliärer Phänotyp) aufrechterhalten. Konkret wurde eine regelrechte Mukusproduktion und ein normaler Zilienschlag beobachtet (Beobachtung mittels Lichtmikroskopie). Nach den Vorversuchen in Würzburg erfolgte der eigentliche Transport nach München. Auch dort wurden die Kulturen unmittelbar nach der Ankunft unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Agarose-Transportprotokoll unter den getesteten Bedingungen valide ist und problemlos eingesetzt werden kann. Für die Transportuntersuchungen in den Wintermonaten wurde die Temperatur mit Wärme-Kompresse konstant gehalten.

Expositionsparameter

Um eine ALI-Exposition in München zu etablieren, haben wir zwei Expositionsparameter bewertet: A) die Geschwindigkeit, mit der die Luft über die Zellen transportiert wird (Luftvolumen pro Minute), und B) den Abstand zwischen der sogenannten Trompete, aus der die Luft auf die Zellen strömt und der Zelloberfläche. Aufgrund der



unterschiedlichen Volumina von Expositionskammer und Zellkulturschale musste außerdem das basale Mediumvolumen angepasst werden. Unsere Verbundpartner arbeiten mit größeren Modellen, was zu einem höheren Zellzahl/Medium-Verhältnis in der Exposition führt. Konkret konnten wir im basalen Medium des Expositionssystems kein LDH nachweisen, was wahrscheinlich auf das großen Mediumvolumen und damit auf die starke Verdünnung des LDH zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden unsere LDH-Experimente nach der Exposition ausschließlich mit dem sogenannten „apical wash“, d.h. der Flüssigkeit, mit der die Zelloberfläche gewaschen wurde, durchgeführt.

Die für die Experimente gewählten variablen Bedingungen (Luftstrom und Trompetenabstand) sind in



Tabelle 2 zusammengefasst. Eine erste Exposition wurde unter den Arbeitsbedingungen der Zimmermann-Gruppe durchgeführt (100 ml Luft/min und 3 mm Abstand zur Zelloberfläche). Dies führte zu einer makroskopisch sichtbaren Schädigung des Modells. Es wurde eine ringförmige Aussparung von Mukus beobachtet. Die TEER-Werte (transepithelialer Widerstand) waren nach dieser Exposition entsprechend niedrig, vergleichbar sogar mit leeren, d.h. zellfreien Zellkultureinsätzen (Daten werden nicht gezeigt). Aufgrund dieser Erfahrung wurde mit deutlich geringeren Luftvolumina pro Minute gearbeitet, es wurden 20 ml/min und 10 ml/min ausgewertet. Auch bei 20 ml/min war im Modell in Einzelfällen ein Ring sichtbar und der Zilienschlag war kurz nach der Exposition nicht wie in der Kontrolle gleichmäßig verteilt, obwohl die TEER-Werte noch im normalen Bereich lagen. Der Abstand der Trompete zur Zelloberfläche sollte so gering wie möglich sein, um die UFP-Exposition und -Konzentration so gut wie möglich zu kontrollieren. Allerdings führte die niedrigste Einstellung mit einem Abstand von 2 mm zu einem sichtbaren Ring im Mukus/Modell. Bei einem Luftstrom von 20 ml/min und einem Abstand von 2,5 mm zwischen Trompete und Zelloberfläche war der Ring im Modell 2 Stunden nach der Exposition nicht mehr sichtbar, und die TEER-Werte blieben im normalen Bereich (über 200 Ohm*cm²).



Tabelle 2. Parameteroptimierung für ALI-Expositionen der Primärzellmodelle aus Würzburg in München. Assay-Daten für 100ml Luft /min wurden nicht erhoben, da diese Modelle nach 2 und 4 Stunden Exposition makroskopisch beschädigt waren (Loch in der Mitte und ausgetrocknete Oberfläche).

Parameter getestet	Ausgewertete Einstellungen	Experimentell festgelegte Bedingung
<i>Luftgeschwindigkeit [ml/min]</i>	100, 20, 10	20
<i>Abstand Trompete – Zelloberfläche [mm]</i>	3, 2.5, 2	2.5
<i>Mediumvolumen (basal) [ml]</i>	Nachgefüllt bis eine mit normalen Bedingungen vergleichbaren Volumen (mm über Insertboden) erreicht war	17

Toxikologische Parameter

Für die Etablierung des Modells in München wurden vier toxikologische Parameter untersucht: das Vorkommen von Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturmedium als Indikator für Zytotoxizität, DNA-Strangbrüche, analysiert mittels Einzelzellelektrophorese (Comet Assay) und die relative Anzahl avitaler Zellen in einer Vitalitätsfärbung. Zusätzlich wurde in Zusammenarbeit mit der AG Zimmermann, Helmholtz Zentrum, München, oxidativer Stress untersucht. Die LDH-Analyse hat uns auf geeignete Abstands- und Fluss-Parameter im Online-Setting hingewiesen, der Comet-Assay hat bestätigt, dass zu den untersuchten Zeitpunkten keine genotoxischen Bedingungen vorlagen (siehe Zwischenbericht 3/2022).

Der **LDH-Assay** (Ishiyama et al., 1995) wurde dem früher verwendeten 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-DiphenylTetrazoliumbromid (MTT)-Assay vorgezogen, weil er die Analyse von Mediumüberständen und die Verwendung der Zellen für andere Assays ermöglicht. Dies erlaubt eine effizientere Nutzung der Modelle. LDH ist ein stabiles Enzym, das im Zellkulturmedium schnell nachweisbar ist, wenn Zellen z.B. geschädigt, nekrotisch oder apoptotisch werden. Aufgrund der begrenzten Probengröße konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen 10 ml/min und 20 ml/min ermittelt werden. Abbildung 5 zeigt zudem



eine singuläre Exposition eines Modells, das mit 10 ml/min und zusätzlich mit UFP exponiert wurde (alle anderen wurden in dieser Testphase nur mit sauberer Luft exponiert). Da sich nach 2 Stunden post Inkubation Zilienschlag und Mukus wieder normal verhielten, wurde für weitere Versuche 20 ml/min gewählt. Der Vorteil der höheren Flussrate ist, dass sie zu einer höheren Konzentration von UFP führt und damit in einer Etablierungsstudie bessere Möglichkeiten zu Nachweis von Effekten bietet.

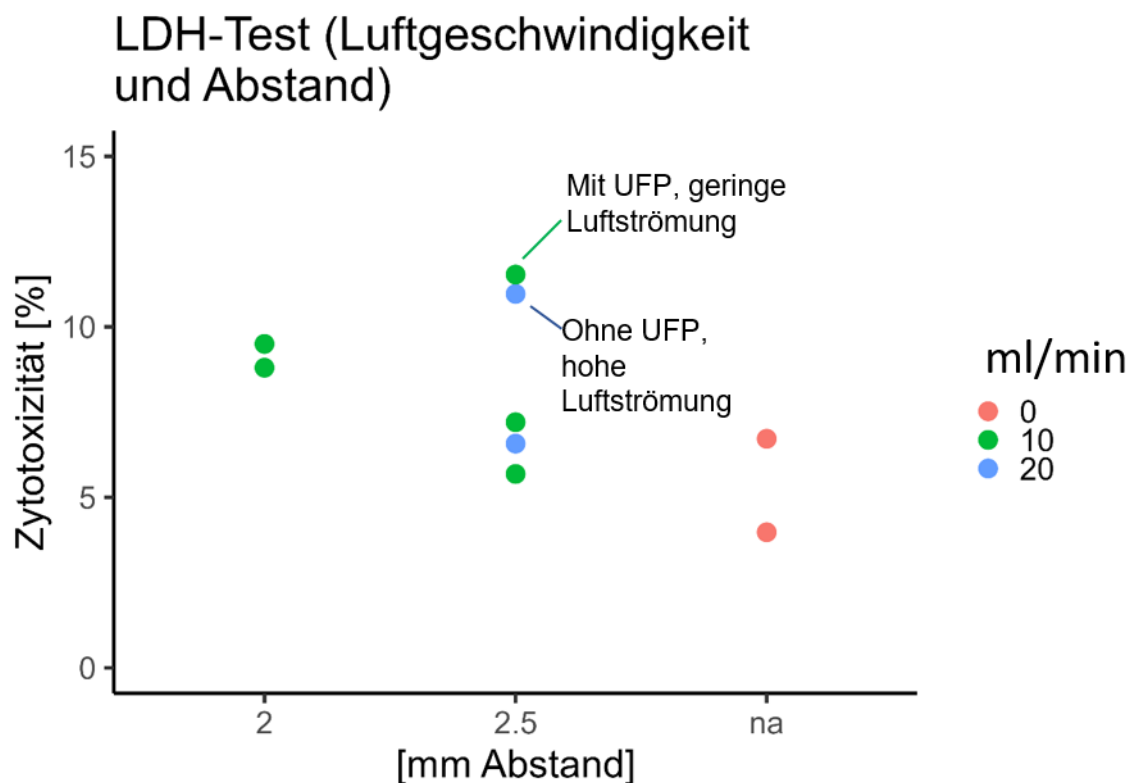


Abbildung 5. Zytotoxizität als % von einer Positivkontrolle (100%) im LDH-Assay. 20 ml/min (blau), 10 ml/min (grün) und Inkubatorcontrollen ohne Exposition (rot) wurden analysiert. „na“ = keine Angabe; Inkubatorkontrolle.

Als Qualitätskontrolle für den Comet Assay (siehe unten) wurde die **Trypanblau-Färbung** durchgeführt, bei der nicht intakte (tote) Zellen gefärbt und mit nicht gefärbten lebenden Zellen verglichen werden (Abbildung 6). Es wurden keine Unterschiede in der Zellvitalität zwischen Inkubatorcontrollen, Luft-Exposition und UFP-Exposition gefunden.

Die Verbundpartner fanden Hinweise darauf, dass die Exposition der Zelllinien mit UFP zu **oxidativem Stress** führt. In Zusammenarbeit mit der AG Zimmermann wurde eine Analyse des Verhältnisses von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) bei zwei Spendern durchgeführt (Abbildung 7). Ein Spender zeigte eine tendenziell höhere Konzentration von GSSG im Vergleich zu GSH (Spender 20 in Abbildung 7), ein Hinweis auf



oxidativen Stress in der Zelle, während bei den anderen Spendern kein Unterschied zu erkennen war. Wir konnten also zeigen, dass GSH/GSSG mit dem implementierten Setup und dem von der AG Zimmermann verwendeten Protokoll detektiert und analysiert werden kann. In drei untersuchten Spendern waren keine Veränderungen 2 Stunden nach Exposition zu sehen, während ein vierter Spender tendenziell erhöhten oxidativen Stress nach UFP-Exposition aufwies.

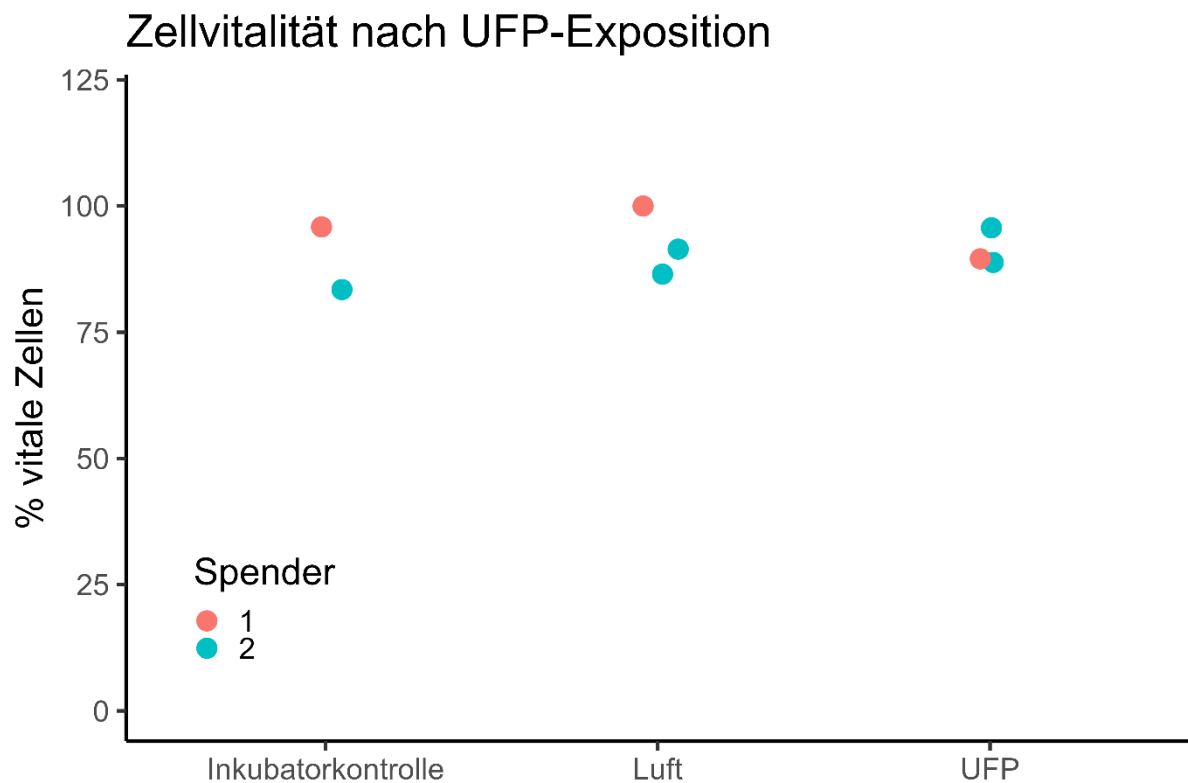


Abbildung 6. Die Zellvitalität wurde mit Trypanblau-Färbung den toten Zellen und Zählung tote und die Gesamtanzahl Zellen im Neubauerkammer durchgeführt 2 Stunden nach Exposition im Anschluss zum Comet Assay (siehe unten). $n=2$.



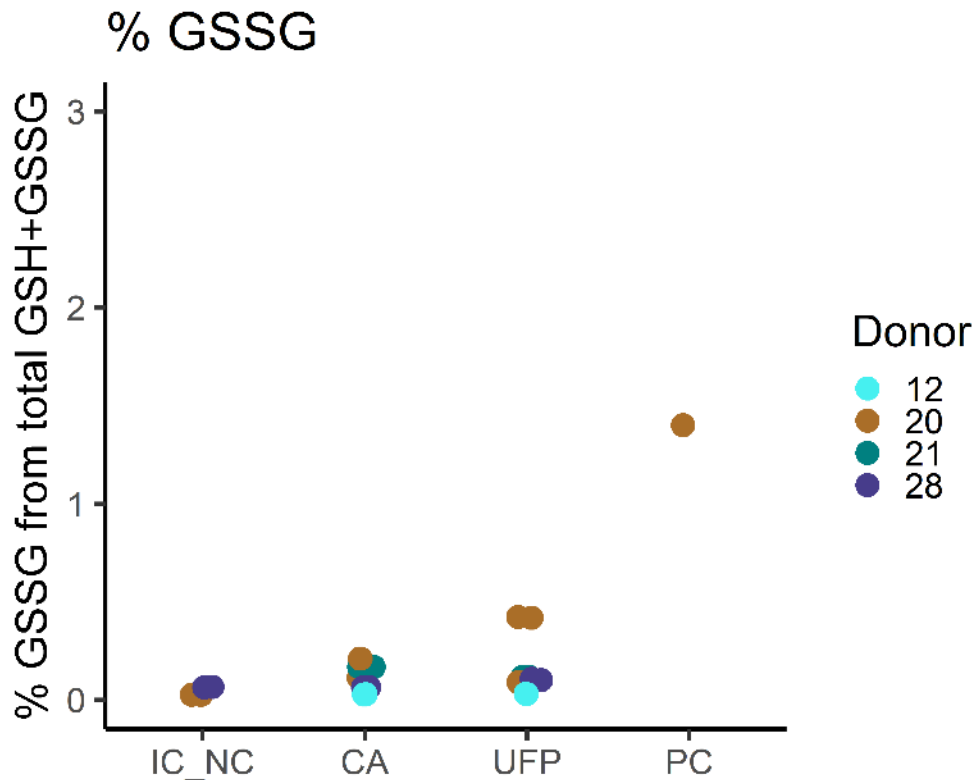


Abbildung 7. Ein höherer Anteil GSSG zu GSH ist ein Hinweis auf Zelluläre Antwort auf oxidativen Stress 2 Stunden nach Exposition. Tendenziell weist ein Spender eine höhere GSSG-GSH-Ratio nach UFP-Exposition auf (Spender 20).

iii. Toxikologische und funktionelle Bewertung ultrafeiner Partikel in einem Primärzellmodell der oberen Atemwegen – Ergebnisse aus online-Versuchen in München

LDH-Freisetzung als Hinweis auf Zellschädigung oder Zytotoxizität

LDH-Freisetzung findet statt, wenn Zellen nicht intakt sind. Eine hohe Freisetzung kann ein klarer Hinweis auf Zelltod sein, während kleinere Veränderungen der LDH-Freisetzung auf Membranschädigung hinweisen könnten. Letztere können von Zellen häufig repariert werden. Positivkontrollen, in denen Zellmembranen mit zum Beispiel Surfactant-Faktoren zerstört werden, werden häufig als Referenzpunkt („100 % Toxizität“) im LDH-



Assay definiert. Dieser Assay wurde nicht in den ersten Vorversuchen mit Carbon Black verwendet, sondern erst später eingeführt, weil es eine sehr Ressource-sparende Analyse ist (die Zellen/das Modell kann in anderen Untersuchungen verwendet werden). Aufgrund von Problemen mit nicht funktionierenden Positivkontrollen in unseren ersten Versuchen, die nicht planmäßig LDH freigesetzt haben, wurde eine alternative Daten-Analyse verwendet um trotzdem möglichst viel aus den durchgeführten Versuchen zu verwerten. In Wiederholungsversuchen im Carbon Black-Projekt, siehe oben, konnte die Methode früh genug optimiert werden, damit eine ausreichende Anzahl Replikate nach der erste Etablierungsphase mit funktionierenden Kontrollen/optimiertem Protokoll durchgeführt werden konnten. Da die Anzahl Expositionsmöglichkeiten in Onlineversuchen mit UFP sehr limitiert war, war dasselbe in diesem Projektteil nicht möglich. Als Lösung im UFP-Teil wurden zuverlässige Negativkontrollen als „Normalwerte“ definiert, und der Mittelwert allen solchen Proben als Referenzwert (Wert 1) verwendet (Abbildung 8). Der Mittelwert des „LDH Fold changes“ ist zwar etwas höher nach UFP-Exposition, aber es handelt sich um sehr kleine Veränderungen, die wir als nicht biologisch relevant einschätzen. Eine von den UFP-exponierten Replikaten vom Spender 21 weist hohe Werte auf. In diesem Fall könnte das Ergebnis ein Zeichen für Probleme mit dieser Probe sein (z.B. im Expositionssystem oder eine Kontamination). Zusammenfassend sehen wir keine Hinweise auf Zytotoxizität oder Membranschädigung im Epithel nach der 4-stündigen Exposition und 2 Stunden Post-Inkubation. Die Varianz ist gering und spenderspezifische Antworten sind nicht eindeutig zu



sehen.

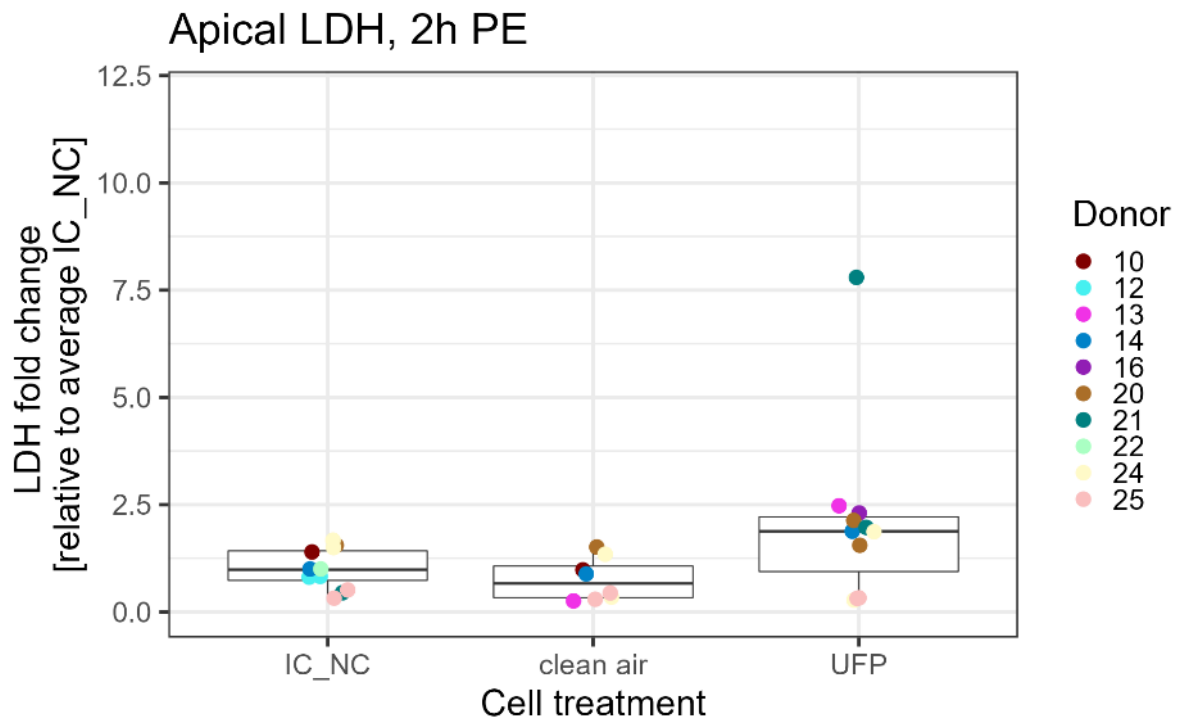


Abbildung 8. LDH-Freisetzung relativ zum Mittelwert allen Negativkontrollen. LDH wurde in allen Proben nachgewiesen und kein Unterschied zwischen exponierten Proben und Negativkontrollen im Inkubator („IC_NC“) konnte nachgewiesen werden. Ein exponiertes Insert (ein Replikat) zeigt einen sehr hohen Wert, was eventuell als Hinweis auf Probleme sein kann. Ein anderes Replikat vom selben Spender deutet an, dass dies kein Spenderspezifischer Effekt ist.

Genotoxizität nach UFP-Exposition

Genotoxische Substanzen können Schäden am Erbgut verursachen. Dies wurde mit dem **Comet Assay** untersucht. Einzelstrangbrüche und die spezifische Oxidation der Purine (mit dem Enzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase, FPG) wurden in der Etablierungsphase analysiert (siehe Bericht 3). DNA-Schäden wurden weder durch normale Luftexposition noch durch UFP-Exposition induziert (Abbildung 9). Damit konnten wir zeigen, dass die Expositionsbedingungen an sich keine DNA-Schäden verursachen, d.h. die Luftexposition ohne UFP verursacht keine genotoxischen Effekte. Die Positivkontrolle (Methylmethansulphonat, MMS, 500µM für 2 Stunden) induzierte wie erwartet Strangbrüche. Darüber hinaus wurden in Vorversuchen keine Purin-spezifischen DNA-Schäden detektiert. In den Hauptexperimenten wurden insgesamt 5 Spender 2 Stunden nach Exposition im Comet-Assay auf DNA-Schäden untersucht (Abbildung 9). Im Mittel gab es keinen



Unterschied zwischen Inkubatorkontrollen und den UFP-exponierten Schleimhautmodellen ($p = 0.32$). Tendenziell scheinen einige Spender höhere Basalwerte aufzuweisen (Nr. 19, 20 und 21), die sich auch zwischen Inkubatorkontrolle und behandelten Proben geringfügig unterscheiden (keine statistische Auswertung möglich). Diese spenderspezifischen Reaktionen/Unterschiede werden am Ende dieses Kapitels im Zusammenhang mit anderen Datensätzen diskutiert.

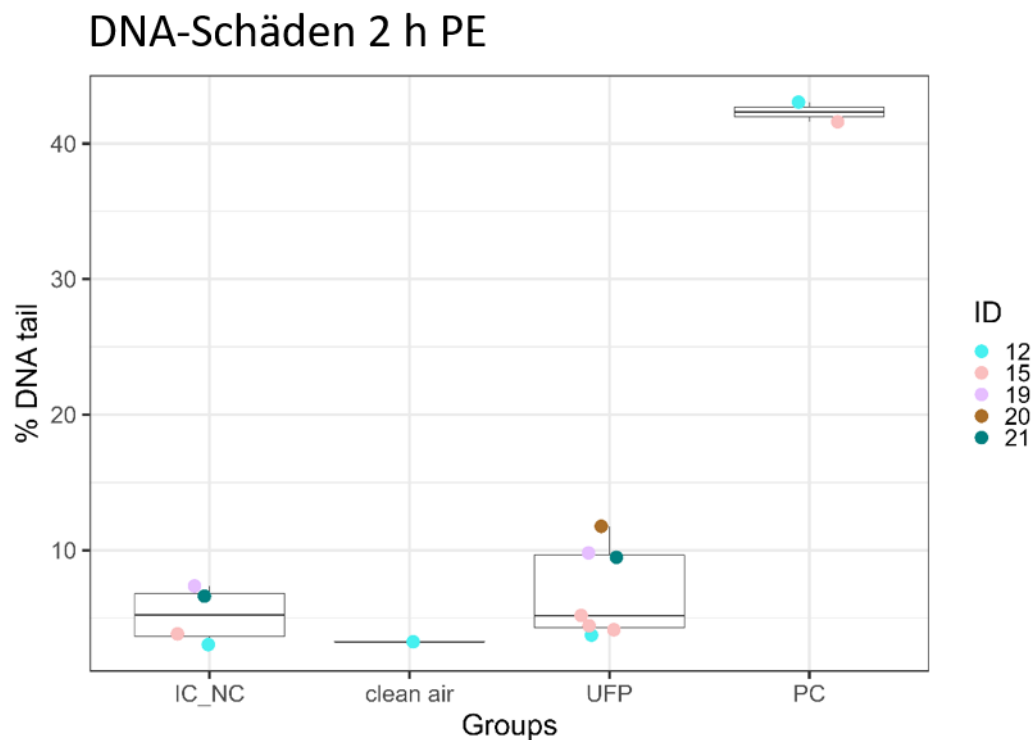


Abbildung 9. Im Comet Assay wurden DNA-Schädigungen untersucht. Nur in der Positivkontrolle konnte einen Effekt der Mittelwert nachgewiesen werden. Welch's two sample t-Test zwischen der Inkubatorkontrolle und UFP: $p = 0.32$.

Barriereuntersuchung nach online UFP-Exposition (München)

In Abbildung 10 werden die TEER-Werte, d.h. der elektrische Widerstand des Modellepithels, bei den Inkubatorkontrollen, den luftexponierten (Clean Air) und den UFP-exponierten Modellen 2 Stunden nach der Exposition verglichen. Der TEER-Mittelwert für die luftexponierten Modelle ($603 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$) ist vergleichbar mit dem Mittelwert der Inkubatorkontrollen ($589 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$). Wir sehen daher keinen Hinweis auf eine Schädigung als Folge der Luftexposition. Der TEER-Mittelwert in der UFP-exponierten ($410 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$)



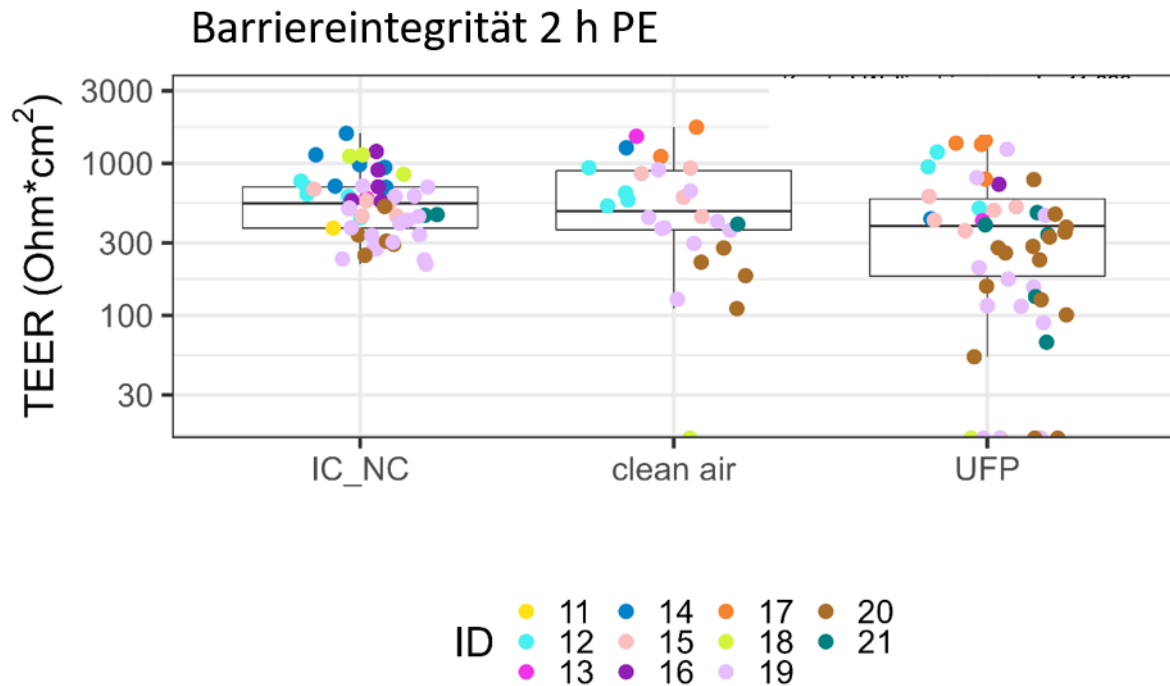


Abbildung 10. Die Integrität der epithelialen Barriere für Modelle 2 Stunden nach Exposition. Gezeigt werden nur im Inkubator kultivierte Modelle („IC_NC“) und Modelle, die im ALI-System mit strömender Luft („clean air“, 20 ml/Minute), oder mit online-generierten Partikel (UFP) exponiert wurden. Im Vergleich zwischen allen Gruppen wurde ein signifikanter Unterschied der Verteilungen festgestellt (Kruskal-Wallis rank Test, $p = 0.003$). Spender: $n = 7-10$ pro Bedingung.

Gruppe ist niedriger als in der Kontrollgruppe ($p = 0.003$), wobei es Unterschiede zwischen den Spendern gibt. Einige Spender zeigten keine Anzeichen einer Barrierschädigung, während andere tendenziell niedrigere Werte und damit eine Schädigung aufwiesen. Diese Ergebnisse müssen aufgrund der hohen Spendervarianz mit Vorsicht interpretiert werden. Nach 24 Stunden wurden insgesamt 6 Spender bewertet (Abbildung 11), jedoch nicht unter allen Bedingungen. Tendenziell deutet die längere Postinkubation auf eine Schädigung nach UFP-Exposition, nicht aber nach Luftexposition hin. Auch hier müssen die einzelnen Spender berücksichtigt werden. Der einzige Spender, der in allen Bedingungen vertreten war (Nr. 15, rosa), zeigt keine Veränderung nach UFP-Exposition. Die beiden Spender mit den niedrigsten Werten nach UFP-Exposition (Nr. 19 und 20) blieben auch nach 2 Stunden tendenziell im niedrigeren Bereich, obwohl die Inkubatorkontrollen immer über den Grenzwert $200 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ lag. Hier wird deutlich, dass für ein besseres Verständnis mehr



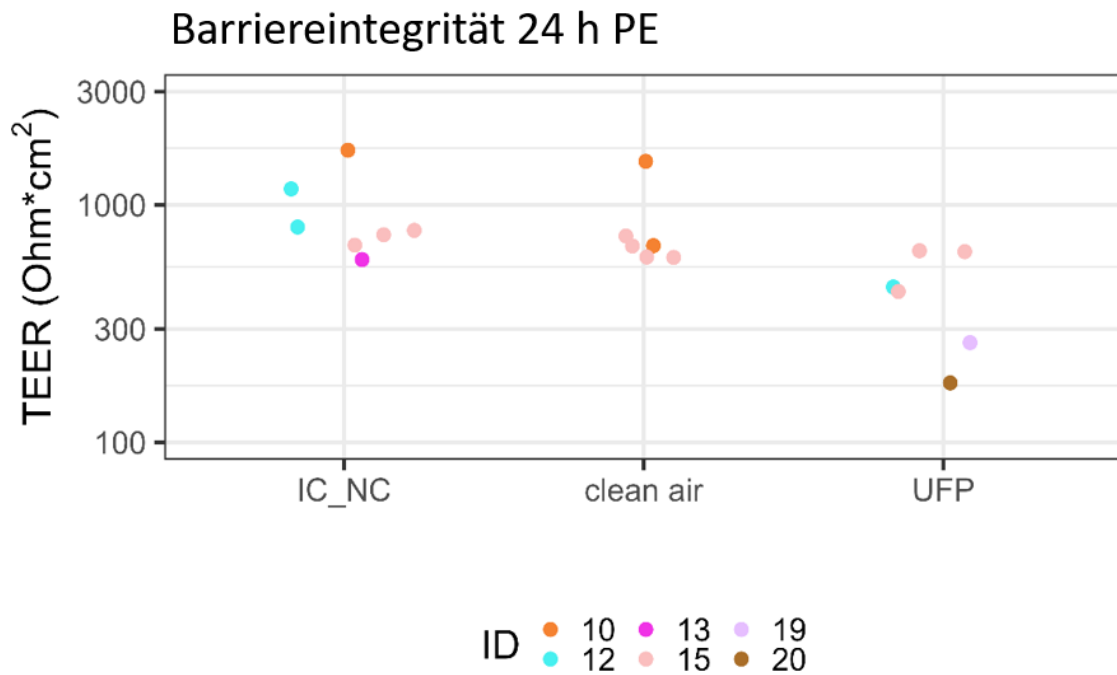


Abbildung 11. Die Integrität der epithelialen Barriere für Modelle 24 Stunden nach Exposition. Gezeigt werden nur im Inkubator kultivierte Modelle („IC_NC“) und Modelle, die im ALI-System mit strömender Luft („clean air“, 20 ml/Minute), oder mit online-generierten Partikel (UFP) exponiert wurden. Die Spenderzahl ist hier zu gering für eine statistische Auswertung. Spender: n = 2-4 pro Bedingung.

Spenderreplikate benötigt werden. Es ist wichtig zu erwähnen, dass der hier generierte Datensatz einer strukturierten zukünftigen Versuchsplanung dienen kann. Wir haben die Möglichkeit, die Spendervarianz sowohl im TEER-, LDH-, als auch im Comet-Assay im Detail zu analysieren und uns auf bestimmte Patientenkollektive oder Krankheiten zu fokussieren, um unkontrollierte Varianzen zu vermeiden und die Anzahl der benötigten Spender im Voraus genauer abzuschätzen. Damit sind nach Abschluss des Projektes gute Voraussetzungen für UFP Online-Studien im humanen Primärzellmodell mit komplexeren Fragestellungen geschaffen.

Zytokine und Hinweise für Einfluss auf das Immunsystem

Um erste Einblicke in mechanistische Wechselwirkungen nach UFP-Expositionen zu bekommen wurden freigesetzte Zytokine – Signalmoleküle, die das Immunsystem regulieren – untersucht. Im jetzigen Modell sind zwar keine Immunzellen vorhanden, aber auch das respiratorische Epithel produziert solche Moleküle um z.B. „Gefäßungssignale“



vom apikalen Epithel an das Immunsystem weiterzugeben, beispielsweise nach Kontakt mit Pathogene oder andere Fremdkörper wie Partikeln. Hier wurden basal freigesetzter IL-6, IL-8, TNF α , IL-1 β und IL-10 gemessen. **IL-8** wird im respiratorischen Epithel stark exprimiert (Mills et al., 2012) und er wird auch von Becherzellen im Epithel freigesetzt (Tanabe et al., 2014). IL-8 ist pro-inflammatorisch und rekrutiert z.B. Neutrophile Zellen. **IL-6** wird auch im gesunden Gewebe freigesetzt, und von mehrere externe Anregungen zusätzlich exprimiert. Er unterstütz dabei Antikörperproduktion (IgA) und B-Zell-differenzierung. (Proud & Leigh, 2011). Um das respiratorische Epithel in vitro zu modellieren war es also wichtig, dass die Expression dieser Proteine nachgewiesen werden konnte (Abbildung 12). Beide Zytokine wurden in sämtlichen untersuchten Spender hoch exprimiert (zum Teil bei IL-8 über den quantifizierbaren Bereich). Nach UFP-Exposition war kein eindeutiger Effekt zu sehen, außer dass auch in diesem Assay Spenderspezifische Grundniveaus angedeutet werden können (z.B. Spender 20 und 25 IL-8 niedrig und Spender 24 IL-8 hoch).

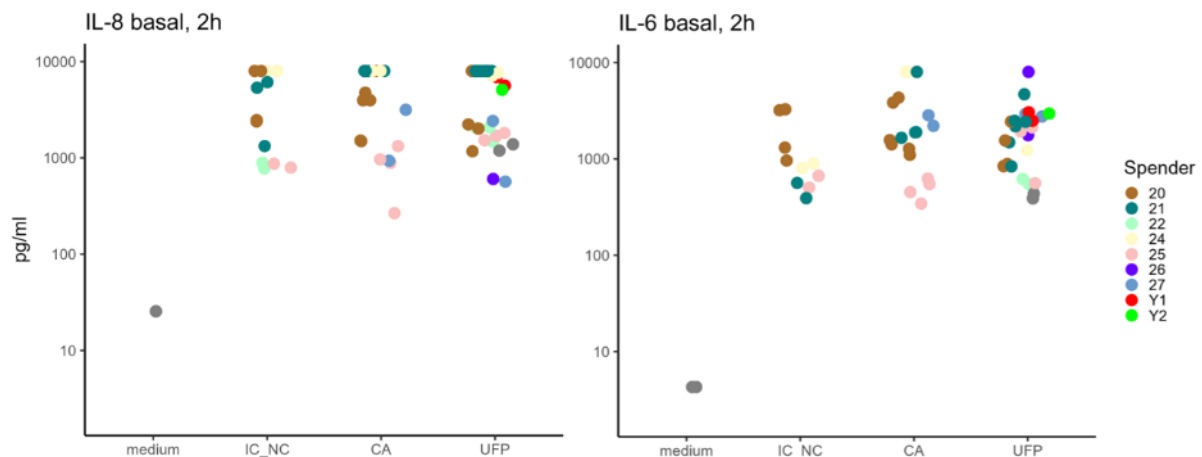


Abbildung 12. Pro-inflammatorische Zytokine IL-8 (links) und IL-6 (rechts) wurden in Mukosamodellen mit und ohne UFP-Exposition detektiert. Keine Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten Mukosamodelle wurden detektiert. n=5-9. Die Nachweisgrenze für diese Zytokine in diesem Assay war ~25 (IL-8) und ~4 pg/ml (IL-6).



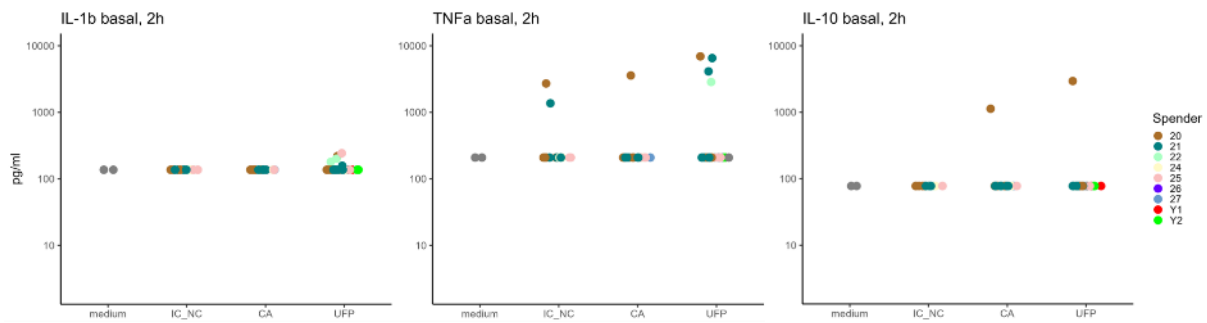


Abbildung 13. Pro-inflammatorische Zytokine IL-1 β (links) und TNF α (mitte) und entzündungshemmender IL-10 wurden in den meisten Proben nicht detektiert. In einzelnen Modellen wurden TNF α und IL-10 detektiert. Der niedrigste Wert (~100 pg/ml) zeigt die Nachweisgrenze für die jeweiligen Zytokinen in diesem Assay.

Pro-inflammatorischer **IL-1 β** wird hauptsächlich von Immunzellen freigesetzt, aber wurde auch im Darmepithel und respiratorischen Epithel (z.B. Ioannidis et al., 2012) nachgewiesen. Unsere Modelle zeigten keine IL-1 β –Expression (Abbildung 13). Das Profil des pro-inflammatorischen **TNF α** war ähnlich, mit dem Unterschied, dass einzelne Spender in allen Bedingungen hier ein hohes Signal aufwiesen. Das war auch der Fall für entzündungshemmender **IL-10** (Abbildung 13). IL-10 wird im respiratorischen Epithel exprimiert, eventuell um Immunantworten gegen natürlich vorkommende Keimen zu dämpfen (Muller et al., 2007). Interessanterweise war der Spender, der bei TNF α und IL-10 hohe Konzentrationen aufwies der/dieselbe, der auch im Genotoxizitätstest einen hohen Basalwert aufwies, und in der Barriermessung eher im niedrigen Bereich lag.

iv. Transmissionselektronmikroskopie für die Ultrastrukturanalyse und Partikeldetektion in Zellen – Carbon Black und online-UFP

Morphologie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine etablierte Methode zur Darstellung der Ultrastruktur von Zellen. Sehr hohe Vergrößerungen sind möglich und Strukturen wie die Doppelmembran um den Zellkern, Mitochondrien oder Tight junctions (Zell-Zell-



Kontakte im Epithel) können mit guter Auflösung dargestellt werden. Schnitte von Inkubatorkontrollen wurden kontrastiert und Übersichtsaufnahmen der Modelle erstellt (Abbildung 14). Mikrovilli und Kinozilien waren über die Oberfläche verteilt. Becherzellen sind vorhanden, haben aber eine etwas untypische Morphologie. Ganz apikal sind kleine, typische Mukuskompartimente zu sehen (C, grauer Pfeil). Wie *in vivo* besitzen diese Zellen keine Kinozilien. Alle in diesem Experiment verwendeten Modelle produzierten Mukus. Die Hauptkomponenten des Tight junction Komplexes sind in Abbildung 14D dargestellt.

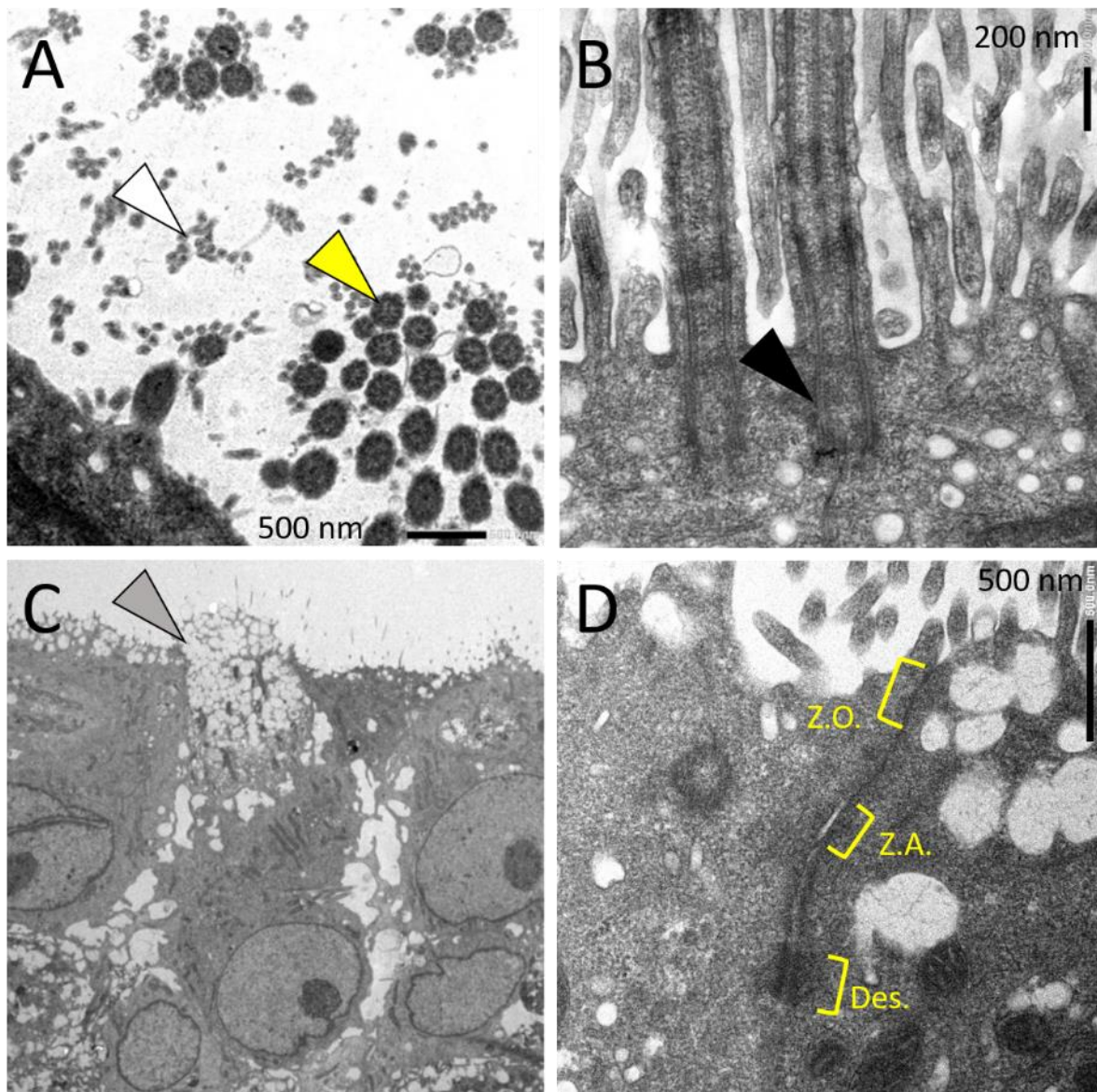


Abbildung 14. A) Unten kann die Oberfläche eines Modells erkannt werden. Runde Strukturen zeigen quer geschnittene Kinozilien mit dem typischen 2+9 Mikrotubulistruktur. Kleinere Strukturen sind Mikrovilli. B) Zwei Kinozilien in einer Epithelzelle verankert. C) Becherzelle ohne Kinozilien und mit Expansion in die apikale



Richtung. Weiße Arealen sind wahrscheinlich mukusgefüllte Vesikeln. D) Tight junction-Komplex mit markierten Strukturen: „zona occludens“ (Z.O.)/„tight junction“, „zona adherens“ (Z.A.) und der „Desmosom“.

Partikeldetektion in Zellen (Carbon black)

Um zelluläre Details besser erkennen zu können, werden TEM-Proben häufig mit einer Schwermetallfärbung kontrastiert. Dies ist für zellmorphologische Untersuchungen sehr hilfreich. Allerdings können kohlenstoffreiche Strukturen, wie z.B. UFP aus Verbrennungsmotoren, die in diesem Experiment erzeugten Partikel, Carbon Black oder viele biologische Moleküle nach einer Farbkontrastierung ähnlich intensiv erscheinen. Dies könnte zu einer falschen Identifizierung der Partikel führen. Daher wurden nicht kontrastierte Proben analysiert, um zu untersuchen, ob partikelähnliche Strukturen auch ohne Kontrastierung vorhanden sind und somit sicher als Partikel beschrieben werden können. Abbildung 15 zeigt ein solches Beispiel, bei dem intrazelluläres Carbon Black detektiert wurde. Daher kann auch bei kontrastierten Proben davon ausgegangen werden, dass wenn eine typische Partikelmorphologie (Abbildung 16) erkannt werden kann, es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Carbon Black/UFP handelt.

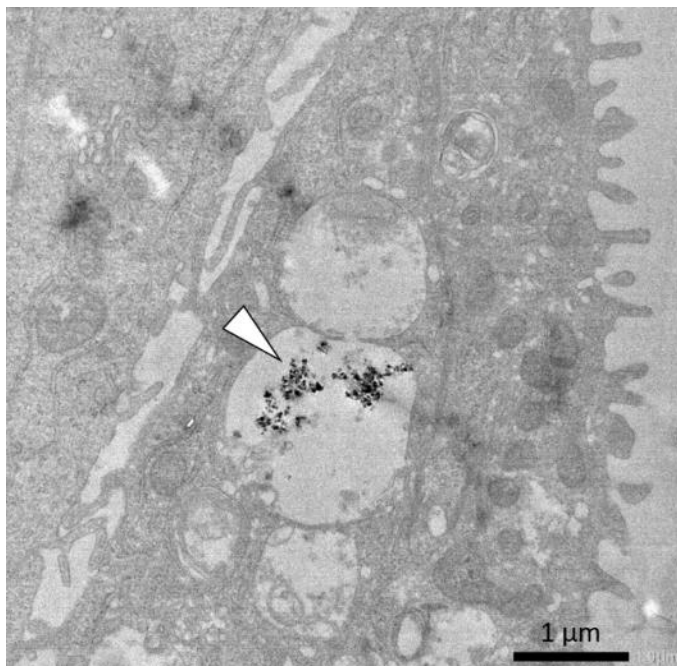


Abbildung 15. Primärzellmodell mit Carbon Black unter Submergebedingungen exponiert. Das Ziel in dem Experiment war es, methodologisch auszuwerten ob nicht kontrastierte Proben in der TEM-Analyse so starke Signale zeigen, dass sie nur von Carbon Black/UFP stammen können. Der weiße Pfeil zeigt ein Beispiel solche Partikelaggregate/Akkumulate.



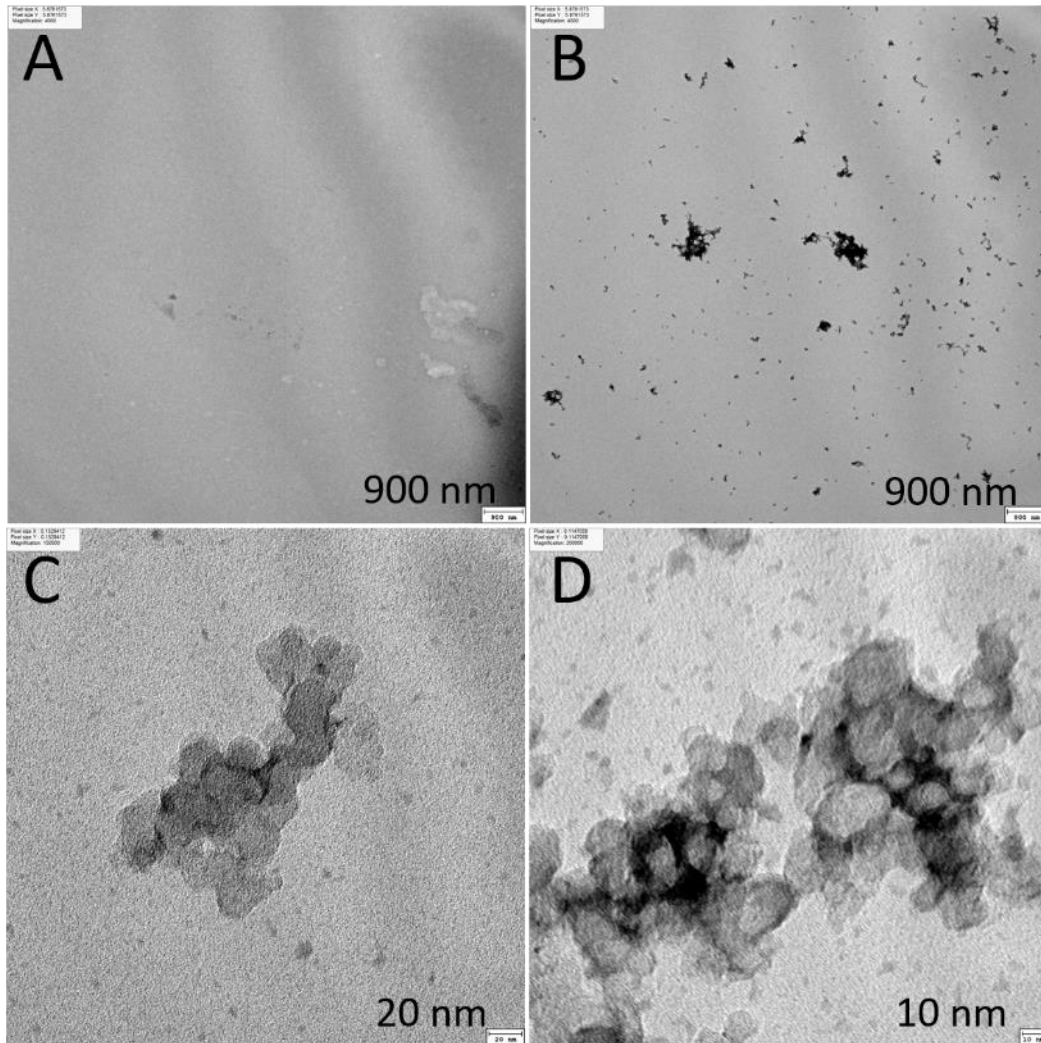


Abbildung 16. Carbon Black vorbereitet als für Expositionen in einer Stocklösung mit 2mg/ml in destilliertem Wasser. A) Negativkontrolle ohne Partikel, B-D) Partikel und Partikelagglomerate oder -akkumulate in verschiedene Vergrößerungen. Der Primärgröße liegt wie erwartet bei ca. 20 nm.

Intrazelluläres Carbon Black

Wenn Effekte einer Partikelexposition vorliegen, wie im Fall der Carbon Black-Studie (Stufe 1), ist es hilfreich zu wissen, wo sich die Partikeln in der Zelle befinden. Häufig werden Partikel in intrazellulären Strukturen gefunden, die für die Beseitigung oder Zerstörung von Fremdstoffen verantwortlich sind. Dies sind z.B. Lysosomen: Membrangebundene, rundliche Strukturen, manchmal mit mehreren Schichten Lipidmembran, die Fremdkörper vom Rest der Zelle trennen. Obwohl Lysosomen in den Zellen unserer Modelle vorhanden sind, wurden keine Partikel in ihnen gefunden. Carbon Black wurde sowohl im



Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen (Abbildung 17). Es konnte keine spezifische Lokalisation festgestellt werden; Partikel wurden extrazellulär in Vesikeln und intrazellulär in Mitochondrien, Kinozilien und Mukuskompartementen gefunden (Abbildung 18). Die fehlende organell- oder strukturspezifische Lokalisierung und Abwesenheit von eingekapselten Partikeln deuten darauf hin, dass die Zellen die Anwesenheit der Partikel nicht erkennen. Es sollte auch erwähnt werden, dass diese Daten keine Aussage darüber zulassen, ob Partikelagglomerate/Akkumulationen aufgenommen werden oder ob die Partikel nach der Aufnahme in der Zelle agglomerieren.

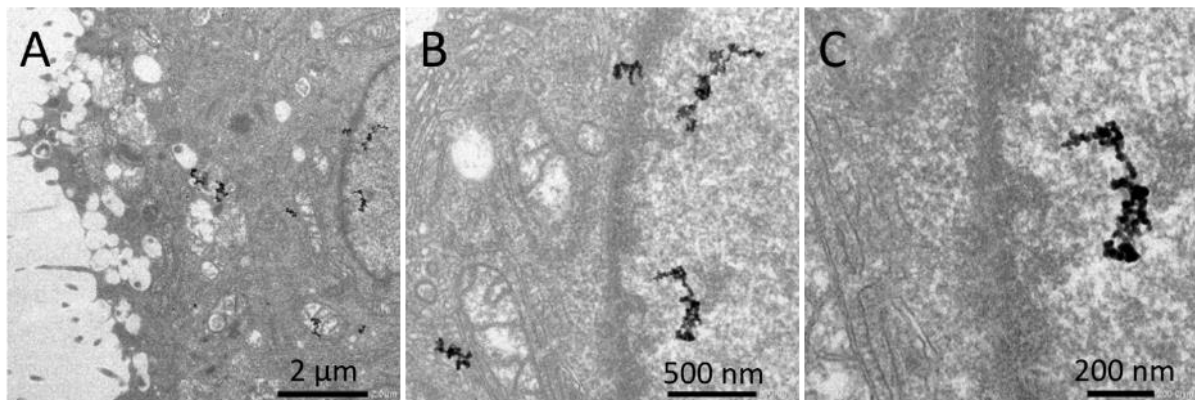


Abbildung 17. Intrazelluläre Carbon Black Partikelaggregate/Akkumulate, hier in einem Modell, das mit $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ exponiert wurde. Das Beispiel zeigt, dass Partikeln in Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden sind. A, B und C zeigen verschiedene Vergrößerungen des gleichen Bereiches.



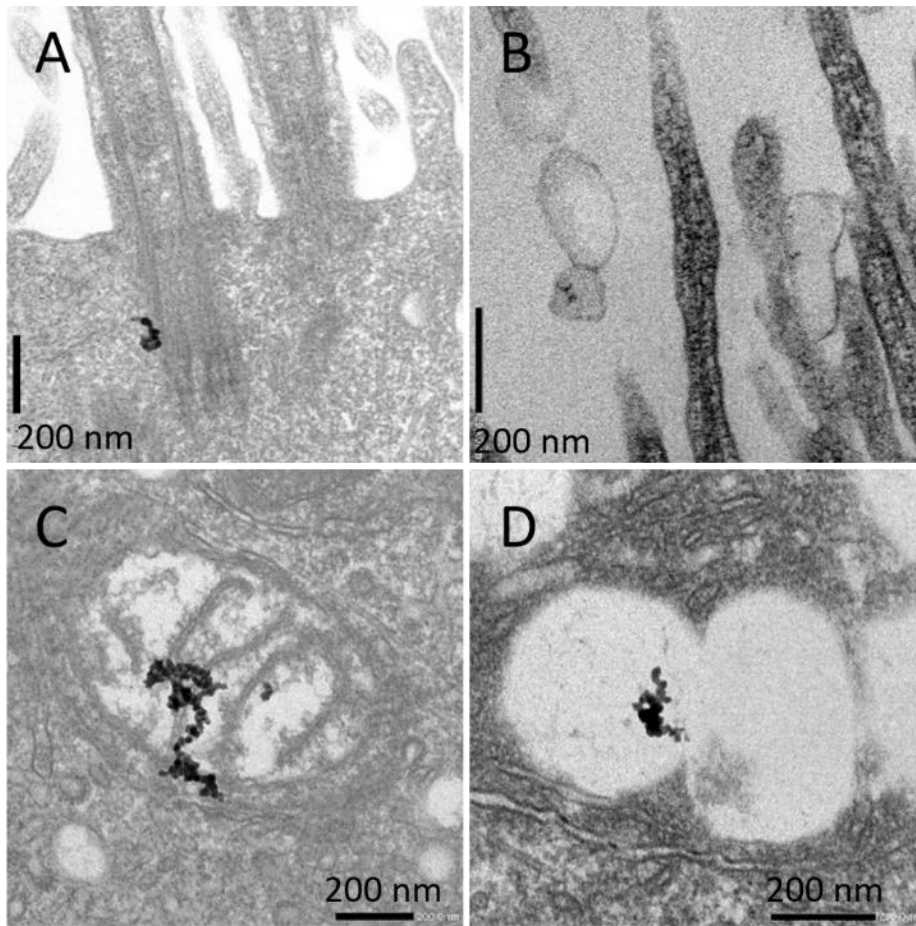


Abbildung 18. Intrazelluläre Partikel waren mit verschiedenen Zellstrukturen assoziiert. A) Befestigungspunkt eines Kinoziliums („Basal body“, B), extrazellulär im Vesikel, C), mit Mitochondrion assoziiert, D) in Struktur den wir als Mukusvesikel beurteilen.

5. Darstellung und Bewertung der bisherigen Ergebnisse und praktische Anwendbarkeit

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein zuverlässiges Testmodell für die spezifischen Anforderungen des UFP Online-Expositionsprojekts etabliert wurde. Vorversuche mit Modellpartikeln (Carbon Black) aus Stufe 1 werden demnächst veröffentlicht. Die konkrete Anwendung im Online-Setting (Helmholtz Zentrum, München) der Stufe 2 wurde in Testläufen im Mai 2022 evaluiert. Die Akquise von Material und die ursprünglich geplanten personellen Kapazitäten waren angemessen und bildeten eine gute



Grundlage auch für die Hauptversuche in Stufe 2. Diese wurden in drei zusätzlichen Versuchen im Helmholtz Zentrum, München (2022 und 2023) durchgeführt.

Die toxikologischen und genotoxikologischen Basisexperimente mit den in München generierten UFP („Online-Experimente“) wurden im Mai 2022 begonnen und im Q3 2023 abgeschlossen. Die Ergebnisse sind in diesem Bericht dargestellt. Kurzlich wurden Messungen zum oxidativen Stress abgeschlossen, die von den Partnern im Helmholtz Zentrum, München durchgeführt wurden. Die zentrale Analytik hat damit bei der Verfassung dieser Bericht stattgefunden und erste Daten konnten gezeigt werden. Zusätzlich wurden Proben für die Sequenzierung des Transkriptoms innerhalb des Projekts nach UFP-Exposition von denselben Partnern erhoben, aufbereitet und versandt. Die nachfolgende statistische Analyse wird mit anderen Fördermitteln zur Zeit in Zusammenarbeit mit den Partnern im Helmholtz Zentrum, München durchgeführt (2024) und Validierungen sind für 2025 geplant. Auf der genotoxischen und zytotoxischen Ebene sehen wir keine konsistenten Hinweise auf Zellschäden nach den Online-Versuchen. Anders sieht es bei der Untersuchung der epithelialen Barriere aus. Nach zwei Stunden zeigten die Atemwegmodelle im Mittel subtile Veränderungen der epithelialen Barriere. In wenigen Replikaten konnte auch der Zeitpunkt 24 Stunden untersucht werden, was auf etwas stärkere Effekte hindeutet. Für eine statistische Auswertung liegen hier jedoch nicht genügend Replikate vor. Keine starke Effekte auf Entzündungsmediatoren (Zytokine) wurden gefunden. Hinweise auf Spender-spezifische Reaktionen sind vorhanden; eine formale Auswertung erfordert aber gezielt geplante Versuche, um solche Unterschiede genauer zu analysieren und ist im Rahmen der vorliegenden Auswertung statistisch nicht möglich. Eine Veröffentlichung der bis dahin vorliegenden Daten aus den Online-Experimenten ist für Q3 2024 geplant.

Revue passierend ist anzumerken, dass hinter dem Online-Expositionssystem in München eine hochkomplexe Technologie steckt. Die Partikelgenerierung und -charakterisierung, der Betrieb und die Pflege der Expositionsanlage, die für jede Online-Exposition benötigt wird, gehen mit einem hohen personellen und zeitlichen Aufwand einher. Die Expositionsanlage ist technisch einzigartig und extrem diffizil in der Handhabung. Zudem müssen alle Einzelschritte des Expositionsprotokolls perfekt funktionieren, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die Zellkulturen, die im Vorfeld im Durchschnitt 6 Wochen bis zur kompletten Ausdifferenzierung kultiviert werden mussten, sind ebenfalls sehr anfällig auf äußere Einflüsse, insbesondere angesichts der durchaus subtilen Endpunkte (Funktionalität



und Barriereintegrität). Beispielsweise sind in Einzelfällen minimale Abweichungen an der Anlage aufgetreten, die zu nicht verwendbaren Ergebnissen geführt haben (z.B. Fehler bei den Temperatursensoren, die zu einer Temperatur über 38°C anstatt 37°C der Zellkulturinsets geführt hat). Nur perfekt abgestimmte Durchläufe, sowohl seitens der Reife der Kulturmodelle, als auch seitens der Anlage und des Expositionsablaufs, konnten für die Ergebnisaufnahme verwendet werden. Dies stellt eine gewisse Limitierung des experimentellen Setups dar. Durch die außerordentliche Komplexität des Versuchsaufbaus resultierten multiple kleine Variablen, die gewissenhaft beobachtet und eliminiert werden mussten und im Zweifelsfall bei Eintritt von Prozessabweichungen den Ausschluss der entsprechenden Ergebnisse implizierten. Die Generierung einer entsprechend hohen Anzahl an Versuchsreplikaten war durch diesen Umstand eingeschränkt. Zudem mussten vorgegebene Zeit-Slots für die Versuche eingehalten werden, in denen die Anlage in München für das Projekt zur Verfügung stand. Der Ausschussanteil der exponierten Modelle lag im Vergleich zu den erfolgreichen Expositionen bei ca. 20%. Zukünftige Projekte in ähnlichem Setting müssten einen zeitlichen oder personellen Puffer für solche beschriebenen Abweichungen beinhalten, die aufgrund der Komplexität des Gesamtversuchs nicht vermeidbar sind.

Die standardisierten Arbeitsabläufe im Umgang mit primärem Gewebematerial sind von großer Bedeutung für die Qualität der Ergebnisse. Der große Vorteil, mit humanem Primärmaterial arbeiten zu können, stellt ein Alleinstellungsmerkmal unseres Projektes dar. Die einrichtungsinterne Logistik der Gewebebiopsieentnahme und des Transports ins Labor mit jederzeitiger Erreichbarkeit des verarbeitenden Laborteams und adäquater Weiterverarbeitung des Gewebes konnte in unserem Labor zufriedenstellend gelöst werden.

6. Fazit und Ausblick

In diesem Projekt wurden Ergebnisse von differenzierten humanen Primärzell-Mukosamodellen, die mit Carbon Black und online erzeugten UFP exponiert wurden, generiert und ausgewertet. Unseres Wissens gibt es bisher keine vergleichbaren Studien über die Wirkung von UFP auf menschliche Zellen und Gewebe. Der Datensatz wird kurz nach Berichtabgabe als publikationsreif eingeschätzt. Die Etablierung und Durchführung derartiger Experimente und die Generierung qualitativ hochwertiger Daten innerhalb eines kurzen Förderzeitraums (3 Jahre) sind als Erfolg zu werten. Es wurde deutlich, dass



multidisziplinäre Partnerschaften von hohem Wert, sogar unverzichtbar sind. Ebenso relevant sind etablierte Forschungsinfrastrukturen, wie die Logistik rund um unsere Gewebebehandlung und Zellisolation in der HNO, Würzburg und die Expositionsanlage im Helmholtz Zentrum, München mit den entsprechenden Expertinnen und Experten, die in diesem Projekt Partner waren. Es ist zu erwarten, dass die Produktivität nach der ersten Etablierungsphase (3 Jahre) und Kompetenzaufbau deutlich gesteigert werden kann. Die hier etablierten Methoden bieten die Möglichkeit, in Zukunft sowohl submerged Expositionen als auch – wie in den Online-Experimenten in diesem Projekt – luftgebundene Expositionen durchzuführen, je nach Fragestellung und praktischen Möglichkeiten. Daher werden die hier etablierten Ergebnisse und Methoden auch für andere Forschungsgruppen und unsere eigenen zukünftigen Projekte wertvoll sein.



v. Literaturverzeichnis

- Bannuscher, A., Schmid, O., Drasler, B., Rohrbasser, A., Braakhuis, H. M., Meldrum, K., Zwart, E. P., Gremmer, E. R., Birk, B., Rissel, M., Landsiedel, R., Moschini, E., Evans, S. J., Kumar, P., Orak, S., Doryab, A., Erdem, J. S., Serchi, T., Vandebriel, R. J., ... Rothen-Rutishauser, B. (2022). An inter-laboratory effort to harmonize the cell-delivered in vitro dose of aerosolized materials. *NanoImpact*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100439>
- Barlow, S., Chesson, A., Collins, J. D., Flynn, A., Hardy, A., Jany, K. D., Knaap, A., Kuiper, H., Larsen, J. C., Le Neindre, P., & Schans, J. (2009). The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety. In *EFSA Journal* (Vol. 7, Issue 3). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.958>
- Bruinink, A., Wang, J., & Wick, P. (2015). Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. *Arch Toxicol*, 3, 659–675. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1460-6>
- Ema, M., Hougaard, K. S., Kishimoto, A., & Honda, K. (2016). Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: A literature review. *Nanotoxicology*, 10(4), 391–412. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1073811>
- Gudkov, S. V., Baimler, I. V., Uvarov, O. V., Smirnova, V. V., Volkov, M. Y., Semenova, A. A., & Lisitsyn, A. B. (2020). Influence of the Concentration of Fe and Cu Nanoparticles on the Dynamics of the Size Distribution of Nanoparticles. *Frontiers in Physics*, 8, 622551. <https://doi.org/10.3389/FPHY.2020.622551/BIBTEX>
- Hiemstra, P. S., Grootaers, G., van der Does, A. M., Krul, C. A. M., & Kooter, I. M. (2018). Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicology in Vitro*, 47, 137–146. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2017.11.005>
- Ioannidis, I., McNally, B., Willette, M., Peeples, M. E., Chaussabel, D., Durbin, J. E., Ramilo, O., Mejias, A., & Flaño, E. (2012). Plasticity and Virus Specificity of the Airway Epithelial Cell Immune Response during Respiratory Virus Infection. *Journal of Virology*, 86(10), 5422–5436. https://doi.org/10.1128/JVI.06757-11/SUPPL_FILE/TABLES6.PDF



- Ishiyama, M., Sasamoto, K., Shiga, M., Ohkura, Y., Ueno, K., Nishiyama, K., & Taniguchi, I. (1995). Novel disulfonated tetrazolium salt that can be reduced to a water-soluble formazan and its application to the assay of lactate dehydrogenase. *Analyst*, 120(1), 113–116. <https://doi.org/10.1039/AN9952000113>
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A. C., Larsen, S. T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., Hiemstra, P. S., Frejafon, E., Hubert, P., Gribaldo, L., Kearns, P., Aublant, J. M., Diabaté, S., Weiss, C., De Groot, A., & Kooter, I. (2018). Air-Liquid Interface in Vitro Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Applied In Vitro Toxicology*, 4(2), 91–106. <https://doi.org/10.1089/AIVT.2017.0034/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE4.JPEG>
- Lodes, N., Seidensticker, K., Perniss, A., Nietzer, S., Oberwinkler, H., May, T., Walles, T., Hebestreit, H., Hackenberg, S., & Steinke, M. (2020). Investigation on Ciliary Functionality of Different Airway Epithelial Cell Lines in Three-Dimensional Cell Culture. *Tissue Engineering*, 26(7 & 8). <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0188>
- Louro, H., Pinhão, M., Santos, J., Tavares, A., Vital, N., & Silva, M. J. (2016). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. *Toxicology Letters*, 262, 123–134. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2016.09.016>
- Mills, P. R., Davies, R. J., & Devalia, J. L. (2012). Airway Epithelial Cells, Cytokines, and Pollutants. *https://doi.org/10.1164/Ajrcm.160.Supplement_1.11*, 160(5 II), 38–43. https://doi.org/10.1164/AJRCCM.160.SUPPLEMENT_1.11
- Muller, B., De Groot, E. J. J., Kortekaas, I. J. M., Fokkens, W. J., & Van Drunen, C. M. (2007). Nasal epithelial cells express IL-10 at levels that negatively correlate with clinical symptoms in patients with house dust mite allergy. *Allergy*, 62(9), 1014–1022. <https://doi.org/10.1111/J.1398-9995.2007.01419.X>
- Proud, D., & Leigh, R. (2011). Epithelial cells and airway diseases. *Immunological Reviews*, 242(1), 186–204. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2011.01033.X>
- Tanabe, T., Shimokawaji, T., Kanoh, S., & Rubin, B. K. (2014). IL-33 stimulates CXCL8/IL-8 secretion in goblet cells but not normally differentiated airway cells. *Clinical & Experimental Allergy*, 44(4), 540–552. <https://doi.org/10.1111/CEA.12283>



- Upadhyay, S., & Palmberg, L. (2018). Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicological Sciences*, 164(1), 21–30. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFY053>
- Yuksel, H., & Turkeli, A. (2017). Airway epithelial barrier dysfunction in the pathogenesis and prognosis of respiratory tract diseases in childhood and adulthood. *Tissue Barriers*, 5(4). <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1367458>
- Zhang, N., Van Crombruggen, K., Gevaert, E., & Bachert, C. (2016). Barrier function of the nasal mucosa in health and type-2 biased airway diseases. *Allergy*, 71(3), 295–307. <https://doi.org/10.1111/ALL.12809>
- Zook, J. M., MacCuspie, R. I., Locascio, L. E., Halter, M. D., & Elliott, J. T. (2011). Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 5(4), 517–530. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.536615>

