



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

**In vitro Untersuchungen zur Wirkung von
nanostrukturiertem Carbon Black an Lungenepithelzellen**

Bachelor-Arbeit

Im Studiengang Biotechnologie

Vorgelegt von

Saskia Knickmeier

2078951

Hannover

Am 10. Dezember 2015

Gutachter: Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)

Gutachterin: Frau Dr. Tanja Hansen (Fraunhofer ITEM)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Fraunhofer Institutes für
Toxikologie und experimentelle Medizin in Zusammenarbeit mit dem
Bundesministerium für Bildung und Forschung

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Tanja Hansen für die Bereitstellung des Themas meiner Bachelorarbeit, sowie die freundliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. J. Knebel für die Unterstützung bei der Planung und Umsetzung meiner Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Dr. D. Ritter für die Einführung in die Zellexposition und Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen.

Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Anne, Ines und Martin für ihre enorme und freundliche Unterstützung im Labor, die Hilfsbereitschaft und den guten Rat bei allen aufkommenden Fragen. Es war eine großartige Zeit bei euch.

Ich danke dem gesamten IVMT Team und dem Fraunhofer ITEM für den spannenden und rundum positiven Einblick ins Institut.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt ein besonderer Dank für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums.

Vielen herzlichen Dank!

Inhalt

Danksagung.....	II
Inhalt	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung.....	IX
Abstract.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Eigenschaften von Carbon Black.....	1
1.2 Herstellung und Anwendung von Carbon Black	3
1.3 Der Respirationstrakt	4
1.4 Aufnahme und biologische Wirkung der Carbon Black Partikel	5
1.5 Vorschädigung von Lungenzellen durch LPS und NO ₂	7
1.6 Interleukin 8.....	7
1.7 Zielsetzung	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Material.....	9
2.1.1 Geräte	9
2.1.2 Carbon Black	10
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.4 Chemikalien und Substanzen	12
2.1.5 Medium, Puffer und Lösungen	13
2.2 Methoden	15
2.2.1 Herstellung der nanostrukturierten Carbon Black Suspensionen	15
2.2.2 Kultivierung von A549 als Dauerkultur	15
2.2.3 Kultivierung von THP-1 als Dauerkultur	17
2.2.4 Konditionierung von mikroporösen Membranen zur Exposition von A549 Zellen	18
2.2.5 Aussaat von Zellen auf mikroporösen Membranen	18
2.2.6 Vorkultivierung adhärenter Zellen auf Membranen.....	19
2.2.7 Vorbereitung der Zellen auf air/lifted Bedingungen.....	19

2.2.8	Exposition gegen Modellnoxe.....	19
2.2.9	Behandlung mit nanostrukturierten Carbon Black	20
2.2.10	Endpunktmessungen.....	21
2.2.11	Statistik.....	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Air-Liquid-Interface- Exposition	26
3.2	Submerse Behandlung mit Carbon Black Partikeln	27
3.3	Vorschädigung mit NO ₂ und anschließende Behandlung mit Carbon Black	32
3.4	Vorschädigung mit LPS und anschließende Behandlung mit Carbon Black.....	38
4	Diskussion	43
5	Literaturverzeichnis	46
6	Anhang.....	49

Abkürzungsverzeichnis

BK	Brutschrankkontrolle
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Bovine Serum Albumin
CB	Carbon Black
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
IL-8	Interleukin-8
ITEM	Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
LPS	Lipopolysaccharid
LZZ	Lebendzellzahl
NO ₂	Stickstoffdioxid
P.R.I.T. [®] ALI	Professional In-Vitro Technologies Air/Liquid Interface
PBS	Phosphate Buffered Saline
P90	Printex [®] 90
P90-Bap	Printex [®] 90-Benzo(a)pyren
P90-Nitro	Printex [®] 90-Nitroanthracen
RL	Reinluft
WST, WST-1	Water Soluble Tetrazolium (2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Carbon Black Partikel	2
Abbildung 2: Furnace-Black-Verfahren zur Herstellung von Carbon Black Rußen	3
Abbildung 3: Plattenlayout für eine Exposition	21
Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurve verschiedener NO ₂ Konzentrationen	27
Abbildung 5a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer submersen Behandlung mit Printex®90	28
Abbildung 6a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer submersen Behandlung mit Printex®90-Nitroanthracen	29
Abbildung 7a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer submersen Behandlung mit Acetylenruß	30
Abbildung 8a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer submersen Behandlung mit Printex®90-Benzo(a)pyren	31
Abbildung 9: Behandlungsplan der A549 Zellen mit verdünnten Partikelsuspensionen	33
Abbildung 10a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer Exposition mit 3 ppm NO ₂ und anschließender Behandlung mit Printex®90 und Acetylenruß	34
Abbildung 11a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer Exposition mit 3 ppm NO ₂ und anschließender Behandlung mit Printex®90-Nitroanthracen und Printex®90-Benzo(a)pyren	35
Abbildung 12a und b: Interleukin 8 Konzentrationen der A549 Zellen nach einer Exposition mit 3 ppm NO ₂ und anschließender Behandlung mit Printex®90 und Printex®90-Benzo(a)pyren	36
Abbildung 13a und b: Interleukin 8 Konzentrationen der A549 Zellen nach einer Exposition mit 3 ppm NO ₂ und anschließender Behandlung mit Acetylenruß und Printex®90-Nitranthracen	37
Abbildung 14a und b: Viabilität der A549 Zellen nach der Vorschädigung mit 0,1 µg/ml LPS und anschließender Behandlung mit Printex®90 und Printex®90-Nitroanthracen	39
Abbildung 15a und b: Viabilität der A549 Zellen nach der Vorschädigung mit 0,1 µg/ml LPS und anschließender Behandlung mit Acetylenruß und Printex®90-Benzo(a)pyren	40
Abbildung 16a und b: Interleukin 8 Konzentrationen der A549 Zellen nach einer Behandlung mit 0,1 µg/ml LPS und Carbon Black	41
Abbildung 17a und b: Interleukin 8 Konzentrationen der A549 Zellen nach einer Behandlung mit 0,1 µg/ml LPS und Carbon Black	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Charakteristika der verwendeten Nanopartikel	11
Tabelle 2:	Behandlungslayout der A549 Zellen mit 0,1 µg/ml LPS-Lösung in Medium C	38
Tabelle 3:	Behandlungslayout der A549 Zellen mit 0,1 µg/ml LPS-Lösung in Medium A und jeweils der negativen Kontrolle, 10 µg/ml Carbon Black und 50 µg/ml Carbon Black	38

Zusammenfassung

Carbon Black ist ein nanostrukturiertes Material, das durch unvollständige Verbrennung entsteht und heute zu den meistproduzierten Industriechemikalien gehört. Sein Anwendungsspektrum ist äußerst breit und umfasst vor allem die Industrie für Gummiformteile und andere Gummiwaren. Carbon Black ist aber nicht nur in Reifen, sondern auch in unzähligen anderen Produkten wie Lacken, Farben, Hygieneartikeln, Medizin und Kosmetik zu finden. Durch zahlreiche Untersuchungen auf eine mögliche toxikologische Wirkung wurde Carbon Black von der Weltgesundheitsorganisation als potentiell kanzerogen eingestuft. Ihre geringe Größe von wenigen Nanometern lässt die Partikel in die Lunge und damit auch in die tiefen Alveolen gelangen. Da durch Umweltbelastungen viele Menschen unter Lungenerkrankungen wie Asthma leiden, soll dies durch eine Vorschädigung mit Stickstoffdioxid (NO₂) und Lipopolysaccharid (LPS) nachgestellt werden.

In dieser Arbeit wurden vier Industrieruße mit unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten auf ihr toxikologisches Potential untersucht. Bei drei der vier Partikel handelte es sich um Acetylenruß, Printex[®]90 und Modifikationen dieses Rußes. Die modifizierten Printex[®]90 Ruße haben auf ihrer Oberfläche gebundene polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAK), Benzo(a)pyren und Nitroanthracen. Um ihr Potential auf die Lunge zu untersuchen, griff man auf die Alveolarepithelzellen A549 zurück. Zur Untersuchung der Wirkung der nanostrukturierten Carbon Black wurden zwei Testmethoden eingesetzt. Um die mögliche Toxizität auf die Zelle zu messen, wurde ein Viabilitätstest gemacht und die ausgeschüttete Interleukin 8 Konzentration der Zellen untersucht. Beim Viabilitätstest sowie bei der Auswertung des ausgeschütteten Interleukin 8 wies keins der verwendeten Ruße große Effekte bei den Lungenepithelzellen hervor.

Anhand der aufgezeichneten Ergebnisse lässt sich sagen, dass bei den verwendeten Konzentrationen der Ruße kaum eine toxikologische Wirkung vorliegt. Der geringe Effekt von Printex[®]90 ist auf die spezifische Oberfläche zurückzuführen.

Schlüsselwörter: Carbon Black; Stickstoffdioxid; Lipopolysaccharid; Lungenepithelzellen; Viabilitätstest; Interleukin 8

Abstract

Carbon Black is a nanostructured material, which arises through incomplete combustion and ranks among the industrial chemicals with the highest production rates.

It has a quite wide range of applications and comprises mainly the rubber industry. Carbon Black is not only found in tires, but also in countless other products such as varnishes, paints, hygiene items, medicine and cosmetics. Numerous studies on the possible toxicological effects of Carbon black lead to the classification potentially carcinogenic by the World Health Organization.

Due to their small size of a few nanometers the particles can reach the lungs and thus also the deep alveoli. Through environmental pollution many people have to deal with lung diseases such as asthma, which should be reconstructed through a pre-damage with nitrogen dioxide (NO₂) and lipopolysaccharide (LPS).

In this work, four industrial carbon black particles with different surface conditions were examined on their toxicological potential. Three of the four particles were acetylene soot, Printex[®]90 and modifications of this carbon black. The modified carbon black particles have polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) Benzo(a)pyrene and nitroanthracene bound to their surface.

In order to investigate their potential in the lungs the alveolar epithelial cells A549 were used. To investigate the effect of the nanostructured carbon black two test methods have been used. To measure the potential toxicity to the cell, a viability assay was taken and distributed interleukin 8 concentration of the cells was examined. The viability assay and the evaluation of distributed interleukin 8 revealed that none of the carbon black particles showed large effects in lung epithelial cells.

Based on the recorded results it can be said that toxicological effects at the used concentrations of carbon black particles hardly exist. The small effect of Printex[®]90 is due to the specific surface area.

Keywords: Carbon Black; nitrogen oxide; lipopolysaccharide; Pulmonary epithelial cells; viability assay; interleukin 8;

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften von Carbon Black

Die industriell hergestellten Ruße, auch Carbon Black genannt, sind gezielt hergestellte und fest definierte Produkte. Nanostrukturierte Materialien müssen definitionsgemäß in mindestens einer Dimension nanoskalig, also kleiner als 100 Nanometer sein. Carbon Black kann mit anderen Partikeln Aggregate und Agglomerate bilden. Der Ruß ist als feines schwarzes Pulver zu erkennen, das bei unvollständigen Verbrennungsprozessen oder bei thermischer Zersetzung gebildet wird [DaNa2.0 2015].

Die Carbon Black Primärpartikel können ketten- und traubenartige Aggregate bilden, die kleinen kugelförmigen Teilchen von ca. 85 bis 800 nm ähneln [International Carbon Black Association 2015]. Verketteten sich dann auch die Aggregate, bilden sich noch größere Agglomerate mit einer Größenordnung von bis zu 100 µm. Einmal gebildete Aggregate halten durch elektrische Kräfte fest zusammen, können aber in Lösung durch schwache Mechanik wieder getrennt werden. Die einzelnen Primärpartikel sind nach der Herstellung nur noch im Verbrennungsofen zu finden und liegen sonst als Aggregate vor. Zur Handhabung werden die Ruße meist als Pellets ausgeliefert, um das Auftreten von Stäuben zu vermeiden [DaNa2.0 2015]. Seine besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften machen den Ruß zu einem begehrten Produkt, das zu den weltweit meistproduzierten Chemikalien gehört.

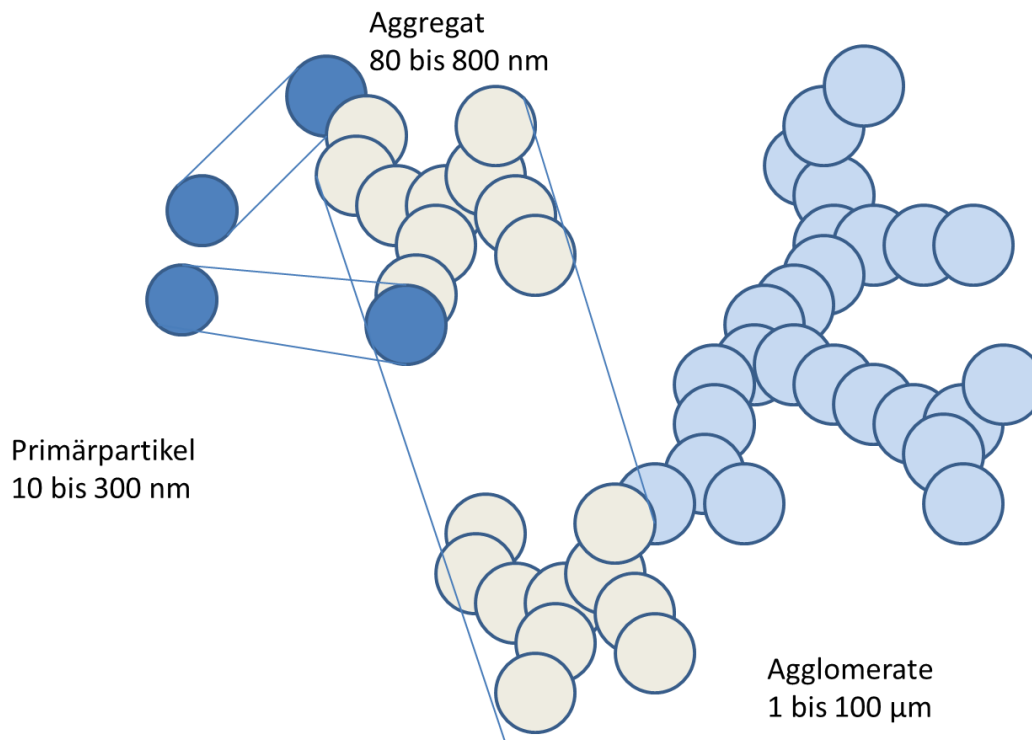


Abbildung 1: Carbon Black Partikel. Ein Carbon Black Aggregat ist aus zusammengelagerten Primärpartikeln zusammengesetzt. Aus dem Aggregat kann sich ein Agglomerat bilden.

Carbon Black weist viele Ähnlichkeiten zu Kamin- und Dieselruß auf. Auch diese Ruße bestehen aus Kohlenstoff und sind bei Verbrennungsprozessen entstanden. Anders als Carbon Black sind sie aber nicht gezielt hergestellt und fallen als ein undefiniertes Nebenprodukt bei der Kohleverbrennung an [International Carbon Black Association 2015].

Die hergestellten Partikel bestehen aus 96% aus amorphen Kohlenstoffen, Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel. Diese Stoffe können meist an der Oberfläche der Partikel gefunden werden. Durch Oxidation kann der Sauerstoffgehalt der Ruße erhöht werden und so Werte von bis zu 15 % erreichen [DaNa2.0 2015].

Unabhängig von ihrer Größe reagieren die geladenen Partikel mit Zellmembranen oder anderen Zellbausteinen bei Kontakt. Außerdem spielen chemische Reaktionen eine wichtige Rolle bei Reaktionen zwischen Partikeln und interzellulären Molekülen [Yang, W.; Peters, J.I. Williams III, R.O. 2008]. Für die Toxikologie liegt das Augenmerk vor allem auf der Größe und der Oberflächenbeschaffenheit der Carbon Black Partikel. Beide Parameter beeinflussen die biologische Wirkung auf Zellen und Gewebe. Es ist möglich, dass sich nach der Reaktion zwischen Carbon Black und Zellen ein Tumor bildet [Yang, W.; Peters, J.I., Williams III, R.O. 2008]. Weitere Parameter, die in Zusammenhang mit der Toxizität in den Zellen stehen, sind Oberflächenchemie, Anzahl der Partikel, biologische Abbaubarkeit, Form und Löslichkeit [Yang, W.; Peters, J.I. Williams III, R.O. 2008].

1.2 Herstellung und Anwendung von Carbon Black

Die heutigen Carbon Black Ruße werden hauptsächlich durch das Furnace-Black-Verfahren hergestellt. Es ist ein relativ junges Verfahren, das aber mehr als 98% des weltweit erzeugten Carbon Black ausmacht [KG Deutsche Gasrußwerke GmbH & Co. 2015]. Weltweit wird in einem Jahr eine Menge von circa 6 Millionen Tonnen Carbon Black produziert [KG Deutsche Gasrußwerke GmbH & Co. 2015]. Das Furnace -Verfahren arbeitet kontinuierlich und kann sowohl flüssige als auch gasförmige Kohlenwasserstoffe verarbeiten. Flüssige Kohlenwasserstoffe werden in eine Flamme gesprüht, die sich in einem keramischen Ofen befindet. Dieser Ofen (Furnace) hat dem Verfahren seinen Namen gegeben. Sobald sich die Carbon Black Ruße gebildet haben, wird der Prozess durch eine schlagartige Abkühlung unterbrochen. Durch einen Filter werden die Ruße vom Abgas getrennt und anschließend für den Endverbraucher granuliert.

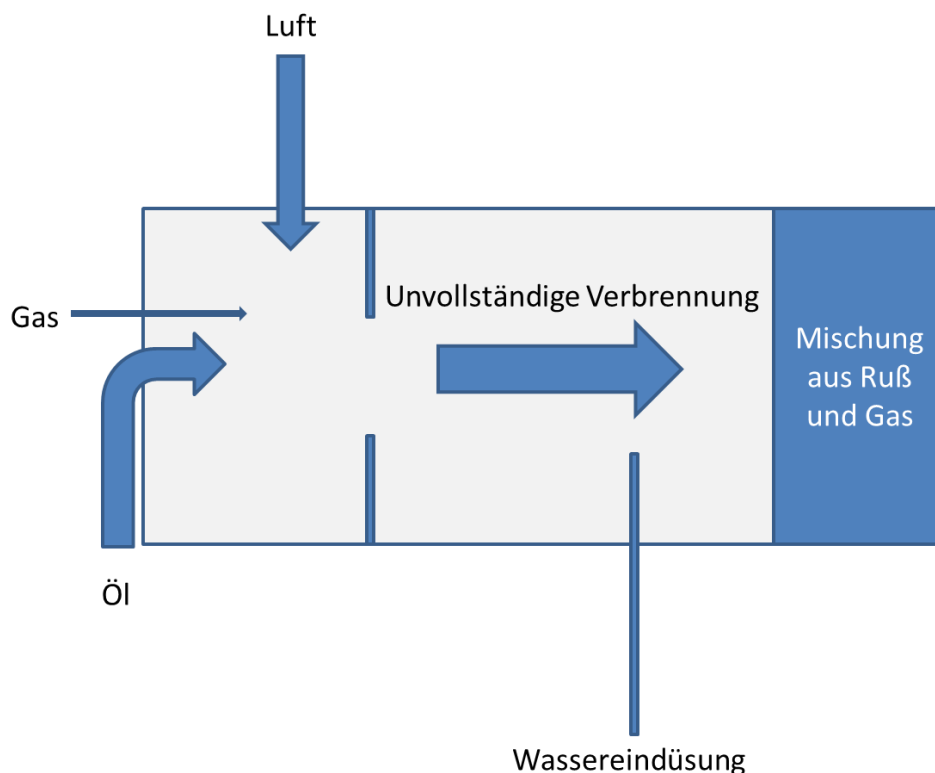


Abbildung 2: Furnace-Black-Verfahren zur Herstellung von Carbon Black Rußen. Flüssige Kohlenwasserstoffe werden in eine Flamme eingedüst und dann durch Wasser abrupt abgekühlt. Die Kohlenwasserstoffe verbrennen nicht vollständig und werden so oxidativ gespalten.

Carbon Black ist durch eine hohe Anwendungsvielfalt in der heutigen Industrie gekennzeichnet. Die Partikel, Tubes oder Fasern können maßgeschneidert auf die jeweiligen Anwendungsgebiete hergestellt werden. Es ist möglich Leitfähigkeitsruße für die antistatische Ausrüstung in

Kunststoffanwendungen zu entwickeln, sowie veredelte Ruße für spezielle hochfarbtiefe Lacke und Farben [DaNa2.0 2015]. Die Leitfähigkeitsruße werden außerdem für Elektroden oder Kohlebürsten verwendet. Einen weiteren Nutzen erhalten leitfähigkeitsverbessernde Ruße in den Hochspannungsleitungen.

Die Carbon Black Partikel werden aber auch noch in vielen anderen Gebieten eingesetzt. Ein weiteres Beispiel ist hier die Gummiindustrie, in der die Partikel für Reifen, technische Gummiartikel, Fördergurte, Schläuche und ähnliches eingesetzt werden [DaNa2.0 2015]. Die Rußpartikel stecken in Alltagsgegenständen, wie Druckerfarbe, Tuschen und Kunststoffen. Auch in Hygieneartikeln, Sportartikeln, Medizin und Kosmetik werden sie eingesetzt [Yang, W.; Peters, J.I. Williams III, R.O. 2008]. Der handelsübliche Mascara bekommt durch die Ruße erst seine unverwechselbare schwarze Farbe [DaNa2.0 2015]. Des Weiteren landen die Partikel in vielen Produkten aus den Bereichen der Life Sciences.

Der meiste Anteil der heute verwendeten Carbon Black Ruße landet in der Verarbeitung zu formstabilen, elastischen Kunststoffen, die auch Elastomere genannt werden. Die Teile werden in der Automobilindustrie verarbeitet und finden sich dort in den Autoreifen wieder.

1.3 Der Respirationstrakt

Der Respirationstrakt des Menschen ist im direkten Kontakt zu der Umwelt. Die Lunge ist der ideale Eingang auch für die nanostrukturierten Carbon Black Partikel. Sie können als kleine nanoskalige Partikel mit der Einatemungsluft leicht in die Atemwege gelangen.

Die humane Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln, die jeweils von einer Hülle, der Pleura visceralis, überzogen sind [Mutschler, E. et al 2001]. Während sich die Lungenflügel wiederum in Lungenlappen unterteilen lassen, hat der rechte Lungenflügel drei und der linke Lungenflügel nur zwei Lungenlappen. Die eingeatmete Luft gelangt durch die Nase oder den Mund in den Rachen und gelangt von dort durch die Trachea, Luftröhre, und die Stammbronchien in den verästelten Bronchialbaum [Mutschler, E. et al 2001]. Unter physiologischen Bedingungen wird die Luft beim Passieren der Nase erwärmt, befeuchtet und auch teilweise vorgereinigt.

Die Luftröhre ist ein weitleumiges, bindegewebiges Rohr, das in die beiden Stammbronchien führt und von dort weiter in den jeweiligen Lungenflügel [Mutschler, E. et al 2001]. Der Stammbronchus ist wie ein Baum aufgebaut und gliedert sich in viele Äste auf. Die Innenwand

der Trachea, sowie die Bronchien sind aus einem Respirationsepithel aufgebaut. In der Luftröhre befinden sich Flimmerhaare, die die Partikel in der eingeatmeten Luft filtern und durch Bewegungen und Abhusten wieder aus der Lunge befördern.

In den tieferen Bronchien, die sich in die Bronchioli aufteilen, kommen keine Flimmerhaare mehr vor. Dort beginnen die Alveolargänge und es gibt Verbindungen zu den Alveolen, den Lungenbläschen [Mutschler, E. et al 2001]. Die Alveolen sind rund und haben einen Durchmesser von circa 200 bis 300 μm . Die gesamte Lunge hat eine Oberfläche von 80 bis 90 m^2 und um die 300 Millionen Alveolen. Um den Gasaustausch zu gewährleisten, werden die Alveolen von einem dichten Kapillarnetz umgeben, das von venösem Blut durchflossen wird [Mutschler, E. et al 2001]. Die Alveolen haben nur eine dünne Zellschicht, die sie kaum von den Partikeln trennen kann. Dagegen hat die bronchiale Region eine dickere Schleimschicht, die die Partikel einschließen und aus der Lunge transportieren kann [Yang, W.; Peters, J.I. Williams III, R.O. 2008].

Es gibt drei unterschiedliche Wege der Carbon Black Ruße sich in der Lunge zu bewegen. Die träge Impaktion ist ein Weg der Partikel in die Lunge zu gelangen. Dabei tritt diese Art der Absetzung meist bei einem Durchmesser von mehr als 5 μm auf und kann nur in den weiteren Atemwegen beobachtet werden [Yang, W.; Peters, J.I. Williams III, R.O. 2008]. Bei einer Partikelgröße von 1 bis 5 μm tritt die Sedimentation auf Grund der Gravitation auf und betrifft die tieferen Atemwege. Noch kleiner Partikel mit einer Größe von weniger als 1 μm bewegen sich meist durch Diffusion. Eine optimale Absetzung in der Lunge wird bei nanoskaligen Carbon Black von 1 bis 3 μm beobachtet [Yang, W.; Peters, J.I. Williams III, R.O. 2008]. Sie sind klein genug um in die tiefen Atemwege zu gelangen und groß genug um nicht ausgehustet zu werden.

1.4 Aufnahme und biologische Wirkung der Carbon Black Partikel

Verglichen mit dem Anstieg an Anwendungsmöglichkeiten von Nanopartikeln ist das Feld der Risiken noch wenig erforscht. Generell haben die Ruße eine höhere Absetzungseffektivität im Respirationstrakt, was die Toxizität in diesem Bereich stark erhöht [Yang, W.; Peters, J.I. Williams III, R.O. 2008]. Nanostrukturierte Partikel gelangen auf unterschiedlichen Wegen in den Körper. Durch den Respirationstrakt, der im direkten Kontakt zur Umwelt steht, gelangen die Partikel in den Körper. Des Weiteren können sie aber auch durch Haut oder Magen

aufgenommen werden. Die Nanopartikel werden sowohl durch Phagozyten, wie Makrophagen, als auch durch epitheliale Zellen aufgenommen.

Carbon Black Partikel zeigen meist die Fähigkeit einer starken Adsorption von Proteinen [Horie, M. et al 2014]. So können zum Beispiel BSA und Kalziumsalze aus dem Zellmedium an die Partikeloberfläche binden und dann durch Endozytose in die Zellen gelangen. Dies führt bei den Zellen durch künstliche Reize zu zellulären Stoffwechselprozessen [Horie, M. 2014]. Die Carbon Black Partikel können auf vielfache Weise Einfluss auf das Zellverhalten ausüben. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass Nanopartikel eine Rolle bei der Entstehung von schweren Lungenkrankheiten, wie Asthma, Lungenkrebs, Lungenfibrose und auch kardiovaskulären Krankheiten, spielen und diese auch weiter verschlimmern [Hussain, S. et al 2009]. Über den Eintritt in die Lunge hinaus gelangen die Nanopartikel auch in andere Organe. Dort rufen sie Entzündungen hervor und können am Herzen zu Herzrhythmusstörungen und Anomalien führen [Hussain, S. et al 2010]. Carbon Black wurde auf Grund verschiedener Studien in die Gruppe 2 B der möglicherweise krebserregenden Stoffe von der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) aufgenommen [International Agency on Research on Cancer 2010].

Die Aufnahme von Carbon Black kann bei den Zellen zu Störungen im zellulären Ablauf und damit auch zum Zelltod führen. Der Zelltod kann einerseits schnell als Nekrose eintreten oder andererseits langsam als programmierter Prozess der Apoptose stattfinden [Hussain, S. et al 2010]. Die herbeigeführte Apoptose spielt wiederum bei den Krankheiten Asthma oder Lungenemphysemen eine wichtige Rolle [Hussain, S. et al 2010].

In vielen Inhalationsstudien wurden bereits in vivo Ergebnisse zu Carbon Black veröffentlicht. Dabei zeigte sich, dass bei mit Nanopartikeln exponierten Ratten Tumorraten innerhalb von Wochen anstiegen [Heinrich et al 1994]. Die Studie des Fraunhofer ITEM, die die Wirkung von Dieselruß und Carbon Black Ruß auf Rattenlungen untersuchte, wies nach, dass die Konzentration von 3,5 mg Carbon Black Ruß pro m^3 zu erhöhten Lungentumorraten führte [Heinrich et al 1994]. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Tumorentwicklung vor allem auf die Größe ($270 \text{ m}^2/\text{g}$) und die Oberflächenbeschaffenheit zurückzuführen ist.

1.5 Vorschädigung von Lungenzellen durch LPS und NO₂

Durch die heutigen Lebensweisen treten immer wieder Vorbelastungen und chronische Atemwegskrankheiten bei den Menschen auf. Eine Vorbelastung kann durch das Rauchen einer Zigarette, sowie auch durch eine vermehrte Luftverschmutzung entstehen. Es ist daher auch zu untersuchen ob vorbelastete Lungen sensitiver auf die Carbon Black Ruße reagieren.

Um eine potentielle toxische Wirkung der Carbon Black Partikel auch an vorgeschädigten Zellen zu untersuchen, werden in dieser Arbeit die Zellen jeweils mit Lipopolysaccharid (LPS) und Stickstoffdioxid (NO₂) geschädigt. NO₂ spiegelt eine Luftverschmutzung nach, während LPS (Bakterium *Escherichia coli* 0111:B4) eine Entzündung durch Endotoxine der gramnegativen Bakterien darstellt.

Luftverschmutzung wird vor allem durch Verkehr, Industrie und Heizen verursacht. Grenzwerte und Maßnahmen zur Reduzierung der Abgase sollen die Luftverschmutzung in Deutschland eingrenzen. Die Luftschadstoffe können chronische Krankheiten, wie Asthma oder chronische Bronchitis beim Menschen hervorrufen.

Lipopolysaccharide sind Endotoxine, die von gramnegativen Bakterien stammen. LPS ist ein Teil der Zellwand und zeigt eine endotoxische Wirkung bei den meisten Lebewesen. Die Ursache der Toxizität liegt bei einem Bestandteil der Zellwand, dem Lipid A [Madigan et al 2015]. Wenn gramnegative Bakterien sterben, wird LPS in die Umgebung abgegeben. Im Darm des Menschen kommen üblicherweise viele Bakterien vor, aber es ist kein Endotoxin im Körper nachzuweisen. Die Beseitigung des LPS übernehmen im Körper meist Monozyten und Makrophagen. Der Mensch reagiert sehr empfindlich auf kleinste Mengen von Endotoxinen. Eine Konzentration von 0,1 µg LPS reicht aus, um Fieber hervorzurufen und später zu Leukopenie oder Leukozytose zu führen [Fey, Hans 1977].

1.6 Interleukin 8

Interleukin 8 (IL-8) gehört zu der Familie der Chemokine und wird von den CXCL 8 Genen kodiert [Jundi et al 2015]. Es spielt eine bedeutende Rolle in vielen entzündlichen Wirkungswegen, die durch Gewebsverletzungen, Infektionen, Trauma oder autoimmunen Krankheiten hervorgerufen werden. Chemokine regulieren den Ablauf dieser Wirkungswege und

die Interaktionen zwischen Leukozyten und transmembranen Rezeptoren [Jundi, K. Greene, C.M. 2015]. Offizieller Name des Interleukin 8 ist laut Chemokin Nomenklatur CXCL 8. IL-8 ist eines von 15 Mitgliedern der CXC Chemokin Familie, ist 3211 Basen lang und kodiert auf 4 Exons [Jundi, K., Greene, C.M. 2015]. Die Masse der Chemokine ist klein und beträgt 7 bis 15 kDa [Torres Palomino, D.C; Cavalheiro Marti, L. 2015].

Zu den Zellen die IL-8 produzieren können gehören, Makrophagen, epitheliale Zellen, glatte Muskelzellen und auch endotheliale Zellen. Während endotheliale Zellen eine Isoform mit 72 Aminosäuren hervorbringen, haben Makrophagen eine Form mit 77 Aminosäuren [Jundi, K., Greene, C.M. 2015]. Interleukin 8 interagiert mit G-Protein-gekoppelten Transmembran-Rezeptoren und kann von einer Vielzahl an Mechanismen während der Expression reguliert werden.

IL-8 reichert sich bei einer Immunantwort auf entzündliche Zytokine wie Tumornekrosefaktoren (TNF), bakteriellen Faktoren und oxidativem Stress im Gewebe an [Jundi, K., Greene, C.M. 2015]. Es kann zu einer Neuordnung des Zytoskeletts führen, aber auch den intrazellulären Kalziumgehalt ändern. Ist das Chemokin überexprimiert, so hat dies meist mit einer chronisch-entzündlichen Krankheit zu tun. Auch nach einem septischen Schock ist ein hoher IL- 8 Wert zu beobachten.

1.7 Zielsetzung

In dieser Bachelorarbeit werden die in vitro Untersuchungen von nanostrukturierten Carbon Black an Lungenepithelzellen durchgeführt. Vier verschiedene Ruße mit unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten sollen auf ihre mögliche zytotoxische Wirkung untersucht werden. Die in der Arbeit verwendeten Ruße stammen aus dem Karlsruher Engler-Bunte-Institut für Technologie und sollen in Anlehnung an das Verbundprojekt „Carbon Black“ untersucht werden. Bei den vier verwendeten Carbon Black Partikeln handelt es sich um Printex[®]90, Acetylenruß, Printex[®]90 mit jeweils einer Verbindung von Nitroanthracen, sowie Benzo(a)pyren. Als Konzentrationen wurden 10 µg/ml und 50 µg/ml Ruß gewählt. Alle Versuche werden mit der etablierten Zelllinie A549, einer Alveolarepithelzelle, durchgeführt. Die A549 Zellen werden durch ein Vorschädigungsmodell durch Stickstoffdioxid und LPS sensibilisiert und dann mit den Carbon Black Partikeln behandelt. Dies soll unter anderem klären, ob vorbelastete Lungen sensitiver auf Carbon Black Partikel reagieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In den nachfolgenden Tabellen sind alle verwendeten Materialien, Geräte, Substanzen, Chemikalien, Test-Kits und die angewendete Software dargestellt. Im Folgenden werden sowohl die Zelllinien als auch die Carbon Black Partikel charakterisiert.

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
CASY Modell TT	Schärfe-System GmbH (Reutlingen, Deutschland)
Analysenwaage	Sartorius mechatronics (Göttingen, Deutschland)
Badthermostat	Haake W19 (Karlsruhe, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments (Deutschland)
Kühlschrank	Liebherr (Deutschland)
Pipette	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Integra Bioscience (Schweiz)
Inverses Mikroskop	Olympus (Japan)
P.R.I.T. Expositionssystem	Fraunhofer Institut (FHG) (Hannover, Deutschland)
Photometer	Molekular Devices (Kalifornien, USA)
SpectroMax Gemini EM	Molekular Devices (Kalifornien, USA)
Rauchroboter	Scireq (Montreal, Kanada)
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH (Keilheim, Deutschland)
Zetasizer Nano series ZS	Malvern Instruments (Herrenberg, Deutschland)

2.1.2 Carbon Black

Bei allen verwendeten Rußen handelt es sich um nanostrukturiertes Carbon Black. Die Primärpartikel lagern sich zu Aggregaten zusammen und verbleiben auch als Aggregate in den angesetzten Suspensionen.

Durch das Karlsruher Engler-Bunte-Institut für Technologie wurden Mithilfe von Synthese und unter Anwendung von Modifikationen einige Eigenschaften der Carbon Black Partikel verändert. Dies betraf zum Beispiel den Primärpartikeldurchmesser, den Graphitisierungsgrad, die spezifische Oberfläche und den hydrodynamischen Durchmesser. Des Weiteren wurden Anteile und Art von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) an den Partikeln verändert.

Carbon Black Ruß	Hersteller
Printex [®] 90	Evonik Carbon Black GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Printex [®] 90 ge-coated mit Benzo[a]pyren	Karlsruher Engler-Bunte-Institut für Technologie (Karlsruhe, Deutschland)
Printex [®] 90 ge-coated mit 9-Nitroanthracen	Karlsruher Engler-Bunte-Institut für Technologie (Karlsruhe, Deutschland)
Acetylenruß	Karlsruher Engler-Bunte-Institut für Technologie (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 1: **Charakteristika der verwendeten Nanopartikel.** Abgebildet sind primärer Partikeldurchmesser, Massenabnahme bis 1000°C, spezifische Oberfläche, hydrodynamischer Durchmesser und Zeta Potential in Suspension der untersuchten Partikelsorten. Es wurden die Durchmesser von je 200 Partikeln jeder Art auf fünf REM Aufnahmen mit der Software ImageJ vermessen. Alle vermessenen Partikel hatten keine PAKs auf ihrer Oberfläche. Quelle: Karlsruher Engler-Bunte-Institut für Technologie

Probe	Partikeldurchmesser [nm]/ Standardabweichung[nm] (REM)	Massenabnahme bis 1000°C (TG) [%]	Oberfläche (BET) [m ² /g]	z-average (mit 0,5 g/l BSA) [nm]	Zeta-potential (mit 0,5 g/l BSA) [mV]
Printex [®] 90	16.53 ± 0.42/ 0.30 ± 0.04	0.5 ± 0.4	302 ± 16	155 ± 1	-34 ± 5
Acetylenruß	14.16 ± 0.09 /0.14 ± 0.01	19.0 ± 0.7	115 ± 3	174 ± 5	-36 ± 3
Printex [®] 90 gecoated mit 9- Nitroanthracen	16.53 ± 0.42 / 0.30 ± 0.04	14.6 ± 0.1	91	176 ± 5	-38 ± 4
Printex [®] 90 gecoated mit Benzo[a]pyren	16.53 ± 0.42 / 0.30 ± 0.04	16.1 ± 0.5	91 ± 2	172 ± 7	-37 ± 3

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96 Well-Platte	TTP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Einweg-Plastikpipetten (5, 10, 25 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht, Deutschland)
Falconröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht, Deutschland)
Laborflaschen mit Schraubverschluss (50 ml, 100 ml, 500 ml und 1000 ml)	Schott Duran (Mitterteich, Deutschland)
Labortücher	Kimtech Science (Reigate, UK)
Nitrilhandschuhe	MaiMed GmbH (Neunkirchen, Deutschland)
Pipettenspitzen, steril	Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zellkulturflaschen (T75)	TTP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)

2.1.4 Chemikalien und Substanzen

Chemikalien	Hersteller
Alamar Blue	ThermoFisher Scientific (USA)
Bovine Serum Albumin (BSA), 10 mg/ml	New England Biolabs ® Inc. (Frankfurt, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Gentamycin, 50 mg/ml	Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
Lipopolysaccharid von <i>Escherichia coli</i> 0111:B4	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Paraquat	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)

Purasept	Merz Hygiene GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Triton® X-100	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Trypsin EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Human CXCL8/IL-8 ELISA	R&D Systems (Minneapolis, USA)

2.1.5 Medium, Puffer und Lösungen

Medium, Puffer, Lösungen	Hersteller
<p>Medium Typ A (Vorkonditionierungsmedium)</p> <p>500 ml DMEM mit Glutamax, Seromed FG0415</p> <p>56 ml FCS</p> <p>56 µl Gentamycin (50 mg/ml)</p>	<p>Biochrom AG (Berlin, Deutschland)</p> <p>Biochrom AG (Berlin, Deutschland)</p> <p>Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)</p>
<p>Medium Typ B (Vorkultur Medium)</p> <p>500 ml DMEM mit Glutamax, Seromed FG0415</p> <p>28 ml Serum, hitzeinaktiviert</p> <p>550 mg/l Na-Pyruvat</p> <p>0,1 µM Na-Selenit</p> <p>56 µl Gentamycin (50 mg/ml)</p>	<p>Biochrom AG (Berlin, Deutschland)</p> <p>Biochrom AG (Berlin, Deutschland)</p> <p>Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)</p> <p>Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)</p>
<p>Medium Typ C (air lifted/ Expositionsmedium)</p> <p>Dulbecco's MEM mit Glutamax, GIBCO- BRL</p> <p>550 mg/l Na-Pyruvat</p> <p>0,1 µM Na-Selenit</p> <p>56 µl Gentamycin (50 mg/ml)</p>	<p>Gibco by life technologies</p> <p>Sigma Aldrich Laborchemikalien</p> <p>Sigma Aldrich Laborchemikalien</p> <p>Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)</p>
Medium THP-1 Zellen	

500 ml DMEM mit Glutamax, Seromed FG0415	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
56 ml Serum, hitzeinaktiviert	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
56 µl Gentamycin (50 mg/ml)	Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
0,1 µM Na-Selenit	Sigma Aldrich Laborchemikalien
2 fach Medium für Behandlung mit Carbon Black	
80 ml DMEM (435)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
10 ml 10 fach konz. DMEM (455)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
11 mg Natrium Pyruvat	Sigma Aldrich Laborchemikalien
0,37 g Natrium bicarbonate	Sigma Aldrich Laborchemikalien
1,8 ml PenStrep	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
18 ml Serum (FCS)	Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der nanostrukturierten Carbon Black Suspensionen

Zur Herstellung der Carbon Black Suspensionen mussten zu aller Erst die benötigten Ruße in sterilen Eppendorf Gefäßen abgewogen werden. Dazu wog man von dem benutzen Ruß 0,01 g auf einer Analysenwaage ab und gab den Ruß anschließend in eine sterile 100 ml Schott Duran Flasche. Das leere Eppendorf Gefäß wurde nochmals nachgewogen, um die exakte Gewichtsangabe in der Schott Flasche zu ermitteln. Die Differenz aus eingewogenem und ausgewogenem Eppendorf Gefäß ergab die in der Schott Flasche befindliche Menge an Ruß. Um eine 0,1 g/l Suspension anzusetzen, wurden auf 0,01 g Ruß 100 ml Flüssigkeit gegeben. Die Hälfte des berechneten Volumens wurde in Form von autoklaviertem Aqua bidest in die Schott Flasche überführt und so lange geschüttelt, bis der Ruß sich im Wasser verteilt hatte. Die andere Hälfte des berechneten Volumens pipettierte man in Form von 1 %iger BSA-Aqua bidest Lösung in die Glasflasche. Dabei sollte eine eventuelle Schaumbildung möglichst vermieden werden. Für die anschließende Ultraschallbehandlung musste die Glasflasche in ein Eisbad gestellt werden. Die Sonotrode wurde bis ca. 1 cm unter die Oberfläche der Suspension in der Glasflasche eingeführt und die Amplitude auf 100 % gestellt. Es folgte eine 40 minütige Ultraschallbehandlung mit einem Wechsel aus 30 Sekunden Beschallen und 90 Sekunden Ruhephase.

2.2.2 Kultivierung von A549 als Dauerkultur

Bei den Zellen in den verwendeten Versuchen hat es sich immer um die Zelllinie A549 gehandelt. Sie stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig. Es handelt sich um humane Zellen, welche im Jahr 1972 aus dem Lungentumor eines 58 Jahre alten kaukasischen Mannes entnommen und kultiviert wurden. Die A549 sind Alveolarepithelzellen und wachsen adhärent als Monolayer. Nach [Foster et al 1998] handelt es sich um Typ-II-Zellen des alveolaren Epithels der Lunge. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 40 Stunden und inkubiert werden die Zellen bei 37 °C, 5% CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

2.2.1.1 Medienwechsel

Am Montag und Donnerstag erfolgte ein Mediumwechsel, um eine ausreichende Menge an Nährstoffen für die Zellen bereitzustellen. Dazu wurde 15 ml Medium A pro 75 cm² Kulturflasche in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Das alte Medium wurde entfernt und durch das Neue ersetzt. Im Begasungsschrank inkubierte die Kulturflasche dann bis zur Passage bei 37 °C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

2.2.1.2 Passagieren von A549

Benötigte Materialien für die Passage:

- 8 ml PBS
- ml Trypsin/ EDTA
- 8 ml Wachstumsmedium
- 15 ml Wachstumsmedium in einer 75 cm² Kulturflasche

PBS, Trypsin und das Medium wurden jeweils in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen portioniert und im Wasserbad erwärmt. Eine frische Kulturflasche wurde mit 15 ml Medium befüllt und bei 37 °C im Brutschrank für mindestens eine halbe Stunde erwärmt. Das Medium aus der alten Kulturflasche entfernte man und spülte zweimal mit 4 ml PBS. Danach wurde 2 ml Trypsin dazugegeben und die Flasche 5 min in den Brutschrank gestellt, damit sich die Zellen ablösen. Nach 5 min hatten sich die Zellen soweit abgelöst, dass sie mit 4 ml Medium abgespült werden konnten. Damit wurde auch die Wirkung von Trypsin gestoppt und die Zellen konnten im Anschluss in einem Behältnis aufgefangen und mit weiteren 4 ml die Flasche noch einmal gespült werden. Nach einem Resuspendieren mit einer 10 ml Pipette konnte 100 µl Probe zur Zellzahlbestimmung entnommen werden. Die Zellzahlbestimmung erfolgt wie unter „Messung der Lebendzellzahl“ erklärt.

Nach der Zellzahlbestimmung wurde die benötigte Zellzahl in die vorkonditionierte Kulturflasche gegeben. Am Dienstag mussten zwei Millionen Zellen und am Freitag eine Millionen Zellen ausgesät werden. Anschließend wurden die Zellen nochmal mikroskopisch untersucht.

2.2.3 Kultivierung von THP-1 als Dauerkultur

Die THP-1 Zellen sind Monozyten und stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig. Sie wurden aus dem Blut eines 1-Jahr alten Jungen mit akuter Monozyten Leukämie gewonnen. Die THP-1 Zellen weisen die typischen Eigenschaften bezüglich der Morphologie, sekretorischer Produkte und auch Expression von Genen auf.

2.2.3.1 Medienwechsel

Bei einem Mediumwechsel wurden 15 ml THP-1-Medium im Wasserbad erwärmt und die Zellen aus der Kulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen in die Beckmann Zentrifuge gestellt und bei 800 g 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das am Boden befindliche Pellet befreite man vom Überstand und resuspendierte im neuen Medium. Anschließend wurden die THP-1-Zellen in eine neue Kulturflasche gegeben, die im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert wurde.

2.2.3.2 Passagieren von THP-1

Am Montag, Mittwoch und Freitag erfolgte jeweils ein Split der Dauerkultur. Dazu wurde zuerst in eine 75 cm² Kulturflasche 10 ml THP-1-Medium gegeben und bei 37 °C im Inkubator erwärmt. Ein Zentrifugenröhrchen wurde mit 5 ml THP-1-Medium bestückt und ins Wasserbad gestellt. Nun konnten die THP-1-Zellen in der alten Kulturflasche resuspendiert und hieraus ein Aliquot aus 100 µl zur Zellzahlbestimmung verwendet werden.

Nach der Zellzahlbestimmung wurde die benötigte Menge an Zellen in die vorkonditionierte Kulturflasche pipettiert. Am Montag und Mittwoch säte man jeweils fünf Millionen Zellen und am Freitag zwei Millionen Zellen aus, um im Anschluss die Zellen mikroskopisch untersuchen zu können.

2.2.4 Konditionierung von mikroporösen Membranen zur Exposition von A549 Zellen

Minimal 3 bis maximal 72 Stunden vor Aussaat der Zellen auf die Membranträger erfolgte die Vorkonditionierung der Membranen. Dafür wurden 1,5 ml eines zellspezifischen Vorkonditionierungs-Mediums (Medium Typ A) in jeweils einem Well der Trägerplatte vorgelegt. Im Anschluss erfolgte eine aseptische Entnahme der Membranen aus ihrer Verpackung mittels einer Pinzette, welche in je ein Well der vorbereiteten Trägerplatte eingehängt wurden. Dabei war eine Luftblasenbildung unterhalb der Membran möglichst zu vermeiden, ggf. durch eine erneute Positionierung. Weitere 0,5 ml vom Medium Typ A wurden auf jede Membran gegeben. Die Platten wurden dann mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen und zur Konditionierung in einen Begasungsbrutschrank überführt.

2.2.5 Aussaat von Zellen auf mikroporösen Membranen

Nach erfolgreicher Vorkonditionierung wurden die Membranen in neue, sterile Trägerplatten verbracht. Zuvor wurden 1ml pro Well des Mediums Typ A ausschließlich im Randbereich der Platte aufgetragen. Eine Positionierung der Membranen erfolgte ausschließlich im Randbereich der Platte um mögliche Verdunstungseffekte für alle Zellen vergleichbar zu gestalten. Darauf folgte eine weitere Konditionierung des Mediums für mindestens 30 Minuten im Begasungsschrank.

Im Anschluss wurde eine definierte Anzahl von 30.000 A549-Zellen in einem Volumen von 200 µl mittels einer Einkanalpipette in jedes Insert pipettiert. Nach der Bestückung von jeweils fünf Membranen mit Zellen, ist eine anschließende Resuspendierung mit einer Einwegpipette (10 ml) erforderlich. Nachdem die Einsaat stichprobenartig mikroskopisch kontrolliert wurde können die Zellen auf den Membranen unter zelltypspezifischen Bedingungen im Begasungsbrutschrank für 72 Stunden inkubiert werden.

2.2.6 Vorkultivierung adhärenter Zellen auf Membranen

Nach 72 Stunden wurden Anheftungs- und Wachstumsfortschritt der A549 Zellen auf den Membranen mikroskopisch kontrolliert. Darauf folgte ein Mediumwechsel zum Vorkulturmedium (Medium Typ B). Neue Trägerplatten wurden mit 2 ml Medium Typ B je Well im Randbereich bestückt und für 30 Minuten im Begasungsbrutschrank vorkonditioniert. Anschließend wurden die Membranen mittels Pinzette aus den bisherigen Trägerplatten entnommen, mit 500 µl des vorkonditionierten Mediums Typ B mittels einer Pipette am Rand des Inserts bestückt und in die Wells eingehängt. Dabei war eine Luftblasenbildung möglichst zu vermeiden, ggf. durch eine erneute Positionierung. Bei einer längeren Kultivierung der Zellen auf den Membranen war ein weiterer Mediumwechsel nach 48 Stunden notwendig und wie bereits beschrieben durchzuführen.

2.2.7 Vorbereitung der Zellen auf air/lifted Bedingungen

16 bis 22 Stunden vor der Exposition wurden die A549 Zellen zunächst auf air/lifted Bedingungen eingestellt. Dafür fand ein Mediumwechsel zum Medium Typ C statt, wofür neue, sterile Trägerplatten mit 1 ml pro Well dieses Mediums im Randbereich bestückt und für 30 Minuten vorkonditioniert wurden. Aus den mit Zellen bewachsenen Membranen wurde das vorhandene Medium entfernt, worauf der Zellrasen zweimal mit jeweils 250 µl auf 37 °C vorgewärmten PBS gespült wurde. Die Membranen wurden anschließend luftblasenfrei in die vorbereiteten Trägerplatten gehängt. Die bestückten Trägerplatten wurden anschließend in einen Begasungsbrutschrank ohne Feuchterege lung verbracht.

2.2.8 Exposition gegen Modellnoxe

Als Modellnoxe in den verschiedenen Versuchen wurde NO₂ verwendet. Für die Generierung wurde auf ein zertifiziertes Gas zurückgegriffen.

Bevor mit einer Exposition gestartet werden konnte, mussten einige Vorbereitungen getroffen werden. Als erstes wurden die einzelnen Komponenten gestartet und Anschlüsse mit der Steuereinheit verbunden. Für den Betrieb wurde der Expocube aufgeheizt. Das Oberteil des

Cubes sollte 37 °C und das Unterteil 35 °C erreichen. Die ganze Aufheizphase betrug 30 Minuten. Hatte sich die Temperatur eingestellt, konnte die Exposition starten. Die Vorbereitungen umfassten auch noch das Starten des Aufzeichnungsprogrammes und die Kontrolle der Anschlüsse auf Dichtigkeit.

Die Zellkulturinserts mit den A549 Zellen wurden auf Zellwachstum, Zelldichte und den Zustand des Inserts kontrolliert. Inserts die Beschädigungen aufwiesen oder ein zu geringes Wachstum der Zellen, wurden entfernt. Markierte Inserts konnten durch Ersatzinserts ausgetauscht werden. Des Weiteren wurden die intakten Inserts vom über den Zellen befindlichen Medium befreit.

Die vorbereiteten Zellkulturinserts wurden auf den korrekten Sitz innerhalb der Trägerplatte kontrolliert und in den Expocube eingesetzt. Das Aufzeichnungsprogramm konnte gestartet und die Startzeit notiert werden. Für jede Exposition schrieb man ein eigenes Protokoll mit. Falls es zu Störungen kam, konnten diese aufgezeichnet werden. Die ganze Exposition verlief über eine Dauer von 60 Minuten. Nach Beenden des Aufzeichnungsprogrammes wurden die Anschlüsse entfernt und die Trägerplatte aus dem Expocube herausgenommen. Eine Leerplatte ersetzte die exponierte Trägerplatte mit den Zellen. Nach der Exposition konnte die behandelte Platte mit den Zellen nun weiter verarbeitet werden.

Für eine weitere Exposition wurden alle Anschlüsse wieder angebracht und die Temperatur erhalten. Eventuelle Schäden, die während der Exposition entstanden sein könnten, wurden unter einem Mikroskop untersucht und notiert. Nach Beendigung der Expositionen am jeweiligen Tag wurde das gesamte Expositionssystem heruntergefahren und gereinigt.

2.2.9 Behandlung mit nanostrukturierten Carbon Black

Nach der Exposition wurden die Zellen in den Inserts auf Schäden und Veränderungen unter dem Durchlichtmikroskop untersucht. In eine vorgeheizte neue 12-Well Platte, mit Medium A und PBs als Verdunstungsschutz, wurden die Inserts A1, A2, A3, C1, C2 und C3 umgehängt (Abbildung 3). Diese wurden zur Adaption an das Medium für 10 Minuten in den 37°C warmen Inkubator gestellt. Währenddessen wurden die verbleibenden 4 Inserts in der exponierten Platte für die alamar Blue Behandlung vorbereitet (siehe dazu 2.2.10.3).

Nach 10 Minuten konnte man dann die vorbereiteten Carbon Black Suspensionen in die jeweiligen Inserts geben und sie für die nächsten 24 Stunden in den Inkubator stellen.

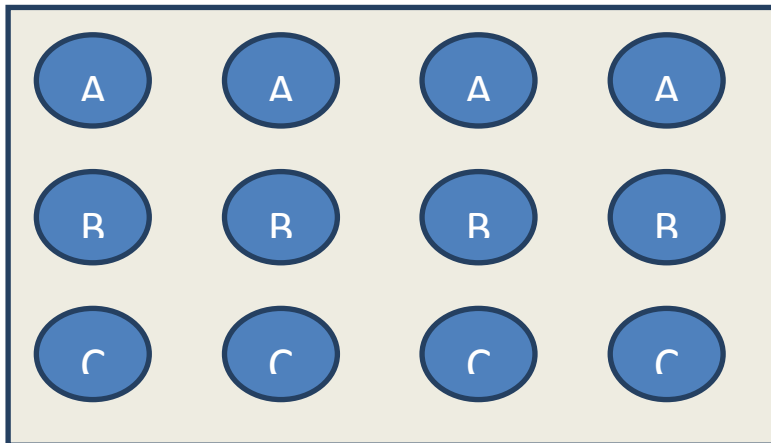


Abbildung 3: Plattenlayout für eine Exposition

2.2.10 Endpunktmessungen

2.2.10.1 IL-8 Assay Prinzip

IL-8, auch bekannt unter dem Namen NAP-1 für Neutrophil-Activating Peptide, ist ein Peptid und besitzt circa 80 Aminosäuren. Die Cytokine gehören zur Familie der Chemokine. Diese werden von verschiedenen Zellen sekretiert, wie zum Beispiel Monozyten. Der IL-8 Assay ist ein Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) [Invitrogen Corporation 2010]. Ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch ist für IL-8, ist an Wells einer Mikrotiterplatte geheftet. Proben werden in die Wells gegeben und diese binden mit einem zweiten biotinylierten monoklonalen Antikörper. Während der ersten Inkubation bindet das IL-8 Antigen an die Antikörper zu beiden Seiten. Nachdem der zweite Antikörper entfernt wurde, wird Streptavidin-Peroxidase hinzugefügt. Dieses bindet den biotinylierten Antikörper. Nach einer zweiten Inkubation und anschließendem Waschen, werden alle ungebundenen Enzyme entfernt. Sobald die Substrat Lösung hinzugefügt wird, produziert es eine Farbe. Die Intensität des Produkts ist direkt proportional zur Konzentration von IL-8 [Invitrogen Corporation 2010].

2.2.10.2 IL-8 Probengewinnung

Für den Behandlungsplan zur IL-8 Bestimmung wurden zunächst die Eppendorf-Gefäße beschriftet und zum späteren Auffangen der Proben bereitgestellt.

Es wurden jeweils in eine Trägerplatte in 10 Wells 2,25 Millionen THP-1 in 1,5 ml Medium C mit und ohne LPS ausgesät.

Die wie oben beschrieben exponierten A549 Zellen in ihren Inserts wurden in die Trägerplatte mit den THP-1 Zellen umgehängt.

Nun befanden sich die Membranen über den THP-1 Zellen. Nach der Zusammenführung der Zellen wurden die Platten für 24 Stunden in den Brutschrank bei 37 °C gestellt.

Kurz vor der Entnahme wurden die Eppendorf-Gefäße bereitgestellt, Eis zum Kühlen und flüssiger Stickstoff zum Einfrieren geholt. Außerdem wurde PBS warmgestellt und eine Platte mit Medium C vorbereitet, in dem jedes Well 2 ml enthält.

Zunächst wurde jeder der Zellrasen der A549 in den Inserts mit dreimal 100 µl warmen PBS gespült. Die Überstände wurden weggefroren. Anschließend wurde jedes Insert in eine neue Trägerplatte mit Medium C gehängt. Aus dem Unterstand wurden 500 µl Medium C, sowie 50 µl WST-1 Reagenz in jedes Insert gegeben. Die Platte kam dann für eine Stunde in den Brutschrank. Danach wurde mit 500 µl aus dem Unterstand der THP-1 Zellen resuspendiert und in eine 48 Well Platte gegeben. In jedes Well mit 500 µl Zellsuspension gab man 50 µl WST-1 Reagenz und überführte diese dann für 30 Minuten in den Brutschrank.

Die restlichen 1 ml Zellsuspension wurden in Eppendorf-Gefäße gefüllt und bei 800 g und 4 °C 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder weggefroren.

Anschließend erfolgte dann die Messung des WST-1 nach 30 Minuten am Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm und 630 nm.

Nach einer Stunde schloss sich auch die Messung der A549 Platte mit WST-1 an.

2.2.10.3 Alamar Blue Assay Prinzip

Alamar Blue ist ein Redoxindikator, der colorimetrische Veränderungen und ein Fluoreszenzsignal bei einer metabolischen Aktivität ausgibt. Er ist sicher und nicht toxisch und somit für quantitative Analysen der Zellviabilität sehr gut geeignet. Sind die Zellen metabolisch aktiv, so wird der Farbstoff in einen Fluoreszenzindikator umgewandelt. Resazurin wird zu Resorufin reduziert. Beschädigte Zellen weisen eine niedrigere metabolische Aktivität auf und generieren daher ein schwächeres Signal. Der Farbstoff kann für jegliche Zellen verwendet werden [Life Technologies 2015].

2.2.10.4 Alamar Blue Durchführung

Nach der gewünschten Behandlungsdauer einer Exposition bzw. Wachstumsdauer wurden 50 µl alamar Blue Reagenz auf 500 µl Medium gegeben. Dieses Gemisch gab man dann auf ein Insert in der Trägerplatte. Die behandelte Platte wurde für eine Stunde bei 37 °C im dunklen Brutschrank inkubiert.

Die Inkubationszeit konnte bis zu 4 Stunden verlängert werden, um die Sensitivität zu steigern. Bei geringen Zellzahlen konnte auch bis auf 24 Stunden verlängert werden.

Nach einer Stunde entnahm man die Platte aus dem Brutschrank und gab das Reagenz mit einer Pipette in den Unterstand. Dieser wurde durchmischt und anschließend mit einer Mehrkanalpipette in eine weiße 96 Wellplatte gegeben. Zum Entfernen von Luftblasen konnte 20 µl Ethanol in die Wells gegeben werden. Die Messung erfolgte mit Fluoreszenz im Mikrotiterplatten-Reader „SpectraMax Gemini EM“ bei einer Extinktion von 560 nm und einer Emission von 590 nm.

Die Werte wurden ausgedruckt und außerdem später mit Microsoft Excel verarbeitet.

2.2.10.5 WST-1 Assay Prinzip

Das stabile Tetrazolium Salz WST-1 wird in lösliches Formazan bei einem komplexen Mechanismus in der Zelle umgesetzt. Die Reduktion findet durch zelluläre Dehydroxinasen statt. Das heißt WST-1 wird in Abhängigkeit an der gebildeten Menge von NADH in der Stoffwechsel betreibenden Zelle zu Formazan reduziert. WST-1 zeigt durch eine Veränderung der Farbe, dass eine Zelle metabolisch aktiv ist.

2.2.10.6 WST-1 Assay Durchführung

Die Zellen wurden zuerst in gewünschter Konzentration in einem Volumen von maximal 100 µl pro Well ausgesät und unter zelltypspezifischen Kulturbedingungen kultiviert. Bei der Belegung der Platte war darauf zu achten, dass alle Wells im Randbereich mit Medium gefüllt sind. Nachdem der WST-Farbstoff 15 Minuten vor Gebrauch bei 37 °C auftauen konnte, wurden 10 µl dieses Reagenzes pro 100 µl Medium unter Vermeidung von Luftblasen mit der Mehrkanalpipette zu dem Medium in die Wells gegeben. Darauf folgte im Brutschrank eine 1-stündige Inkubation unter zelltypspezifischen Standardbedingungen. Nach anschließender Suspendierung mit der Mehrkanalpipette wurden 20 µl Ethanol pro Well hinzugegeben, um bestehende Luftblasen zu entfernen. Die folgende Messung wurde im Mikrotiterplatten-Reader „SpectraMAX 340 PC 384“ bei einer Wellenlänge von 450 nm und 630 nm durchgeführt.

2.2.10.7 Prinzip der Lebendzellzahlbestimmung mit dem CASY-System

Für die Lebendzellzahlbestimmung wurde der Zellzähler CASY TT verwendet. Es verfügt über einen Messbereich von 3,2 bis 120 µm und kann die Zellzahl und Größenverteilung einer Probe mit Hilfe der Messung des Widerstandes der Zellsuspension berechnen. Dazu dient eine elektronische Pulsflächenanalyse mit einer Millionen Messungen pro Sekunde und mehreren 100 Messpunkten pro Zelle. Der Messbereich wurde so gewählt, dass eine Verfälschung durch Fremdpartikel weitgehend vermieden werden kann. Für eine Zellzahlbestimmung werden 100 µl Zellsuspension mit 10 ml Casyton gemischt, was eine Verdünnung von 1:100 darstellt.

2.2.10.8 Lebendzellzahlbestimmung Durchführung

Die Inserts wurden in eine vorbereitete Trägerplatte, die mit 1 ml auf 37°C vorgewärmtes Trypsin pro Well bestückt war, eingehängt. Mit einer Pipette überführte man 500 µl aus dem Unterstand in jedes Insert. Nach 5 Minuten im Brutschrank sollten sich alle Zellen vom Insert abgelöst haben. Zum Neutralisieren des Trypsins wurde 50 µl Trypsininhibitor dazugegeben. Nach Überführung der Zellen in Wells konnte eine Zellzählung erfolgen.

2.2.11 Statistik

Es wurde ein Student's-t-Test (ungepaart, zweiseitig, Welch-correlation (nicht parametrische Untersuchung)) mit der Microsoft Excel Version 2010 durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant, kleiner als 0,01 als sehr signifikant und kleiner als 0,001 als hochsignifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Air-Liquid-Interface- Exposition

Für die Vorversuche wurden die A549 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an NO_2 exponiert, um zu untersuchen bei welchen Konzentrationen die Zellen geschädigt werden. Dazu wurden die Zellen im Air-Lifted-Interface Expocube gegen das Modellnoxo NO_2 getestet. Für eine Stunde wurden die A549 Zellen in der Companion Plate dem NO_2 ausgesetzt. Die Zellen befanden sich während der Exposition auf Inserts unter zelltypischen Bedingungen, 37 °C und basal umgeben von Medium C.

Durch die Ergebnisse der Vorversuche sollte eine optimale Vorschädigung der Zellen erreicht werden, bei der sie gering geschädigt werden und noch bis zu 90 % Viabilität der Zellen gewährleistet ist. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an NO_2 getestet und aus den gesammelten Ergebnissen eine Dosis-Wirkungskurve erstellt.

In Abbildung 4 sieht man die Dosis-Wirkungskurve aller NO_2 Werte. Zwischen den Konzentrationen von 0,1 ppm bis 2 ppm wird eine Viabilität von 100 % bei den Zellen erreicht. Je höher man die NO_2 Konzentration wählt, desto weiter sinkt die Viabilität der Zellen ab. Durch die Dosis-Wirkungskurve ist es möglich aus der Effektivdosis des verabreichten NO_2 eine daraus resultierende Viabilität zu beschreiben. Der Maximalwert der Kurve spiegelt eine 100%ige Viabilität der Zellen wieder. Der Verlauf der Kurve ist sigmoidal und nähert sich der X-Achse an. Erreicht die Kurve die X-Achse, sinkt die Viabilität der Zellen auf 0 %.

Um nun eine Viabilität von 90 % zu erreichen, würde aus der Abbildung 4 folgend eine Konzentration von 3 ppm genügen.

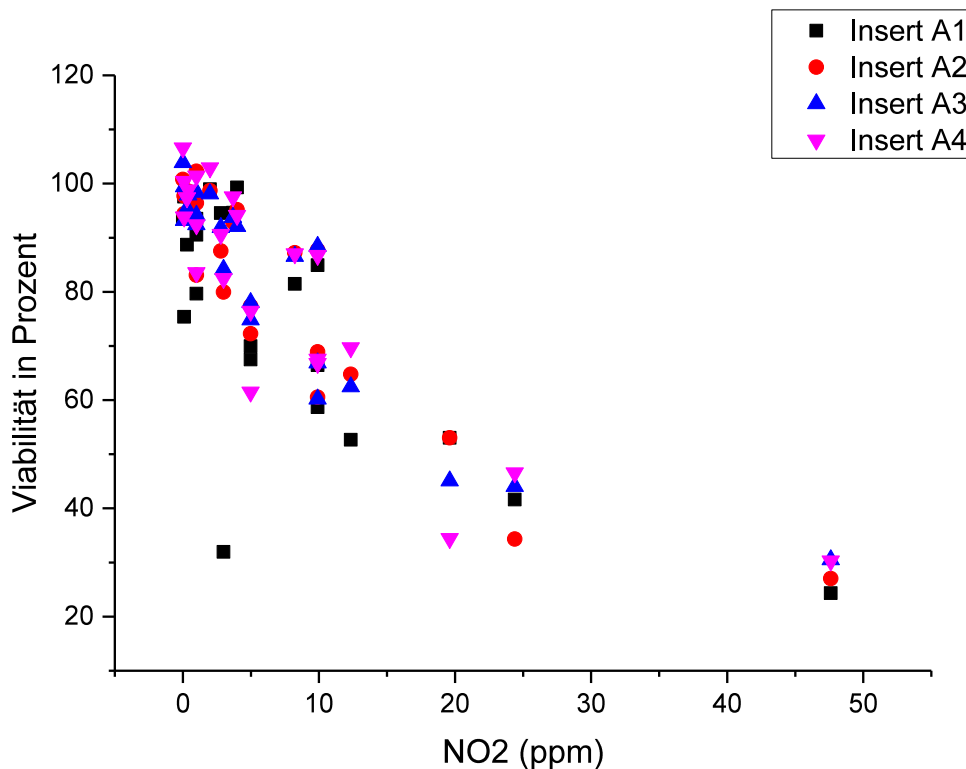


Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurve verschiedener NO₂ Konzentrationen. Die NO₂ Exposition wurde im A.L.I. Expocube bei 37°C durchgeführt. Die Expositionsdauer betrug eine Stunde und es schloss sich eine Behandlung mit alamar Blue an, bei der die Proben für eine weitere Stunde bei 37°C im Brutschrank verblieben. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzreader Spectramax Gemini XS.

3.2 Submerse Behandlung mit Carbon Black Partikeln

Ein weiterer Vorversuch wurde mit den Carbon Black Partikeln realisiert. Dabei wurden A549 Zellen 24 Stunden und 48 Stunden mit vier verschiedenen Partikeln submers behandelt.

Die A549 Zellen wurden am Dienstag mit 25.000 Zellen pro Well in eine 12 Well Companion Plate ausgesät und am folgenden Tag mit den jeweiligen Partikeln behandelt. Es wurden vier verschiedene Konzentrationen an Carbon Black (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml), sowie eine Negativkontrolle mit ausschließlich Medium und eine Positivkontrolle mit 10 mM Paraquat verwendet.

Nach 24 Stunden konnte die erste 12 Well Platte mit WST-8 angefärbt und anschließend vermessen werden. Am darauffolgenden Tag wurde die zweite 12 Well Platte mit WST-8 angefärbt und wieder vermessen.

Insgesamt wurden so vier Ruße nach 24 Stunden und nach 48 Stunden untersucht.

In Abbildung 5a und b sieht man die Viabilität der A549 Zellen nach der Behandlung mit Printex[®]90 nach 24 Stunden und 48 Stunden. Es ist eine leichte konzentrationsabhängige negative Tendenz der Viabilität zu beobachten. So zeigen die Zellen bei 25 µg/ml Ruß nur noch eine Viabilität von 80 % an. Die Positivkontrolle mit 10 mM Paraquat lässt die Viabilität auf fast 20 % sinken. Im Vergleich mit den 24 Stunden Werten, sind die Werte nach 48 Stunden nicht weiter gesunken. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml Ruß liegt der Wert bei 100 % Viabilität. Allein die Positivkontrolle sank auf unter 20 %.

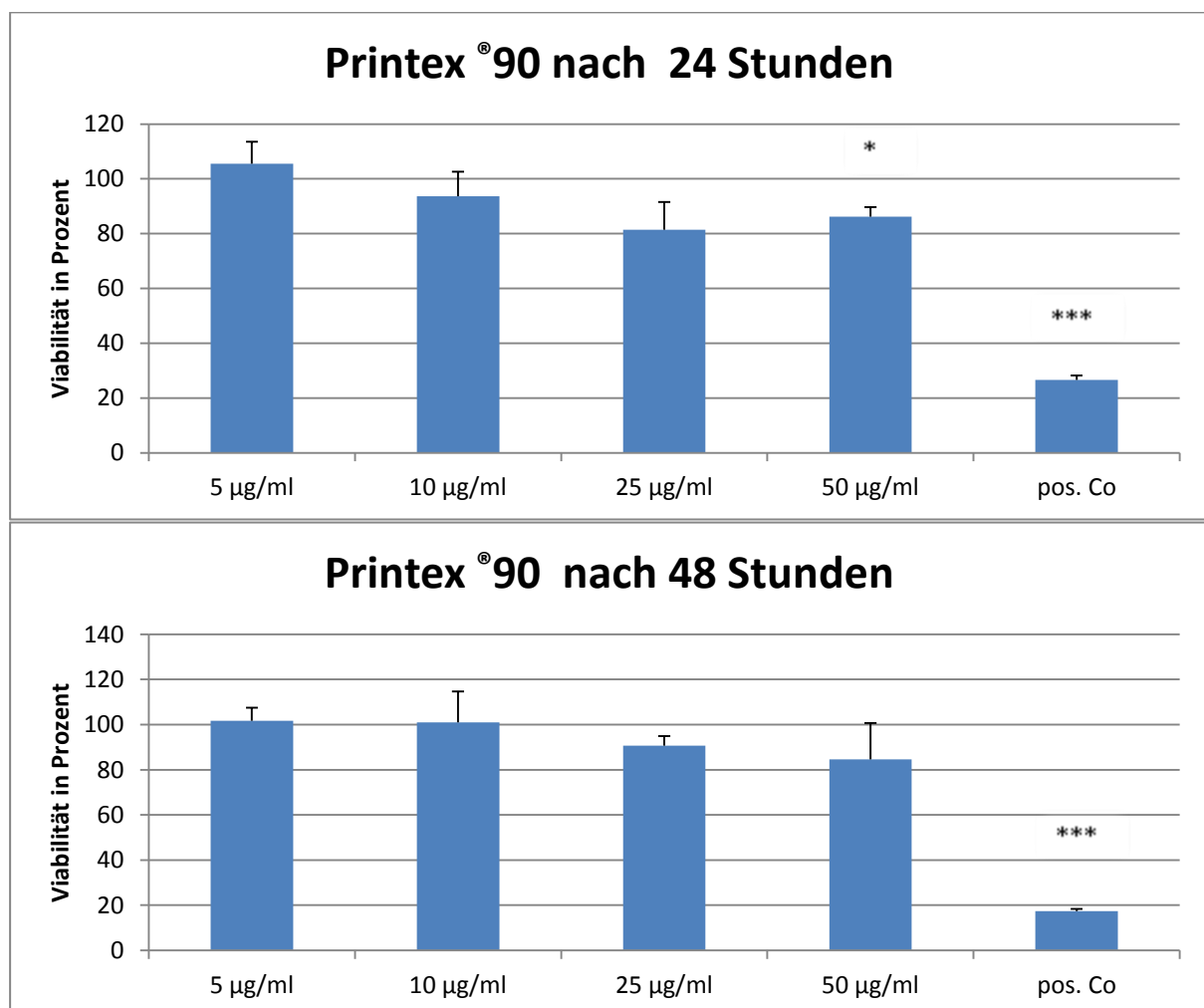


Abbildung 5a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer submersen Behandlung mit Printex[®]90. Aussaat der Zellen fand am Dienstag und die Behandlung der Zellen mit CB am darauffolgenden Tag statt. Nach 24 sowie 48 Stunden wurden die Zellen mit WST-8 angefärbt und vermessen. Es wurde eine Negativkontrolle, die aufsteigenden Konzentrationen der Ruße mit 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und eine Positivkontrolle mit 10 mM Paraquat (pos.Co) verwendet. In drei unabhängigen Versuchen wurden zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden Kontrollen mit den verwendeten Carbon Black Konzentrationen verglichen.

In Abbildung 6a und b sieht man die Viabilität der Zellen nach einer Behandlungsdauer von 24 und 48 Stunden mit dem Ruß Printex[®]90-Nitroanthracen. Es ist zu erkennen, dass die Viabilität nach 24 Stunden bei 5 µg/ml Ruß bei 100 % liegt, während sie bei den restlichen Konzentrationen minimal absinkt. Nach 48 Stunden liegen alle Werte um 80 % und haben sich bis auf die 5 µg/ml Ruß Probe minimal verändert.

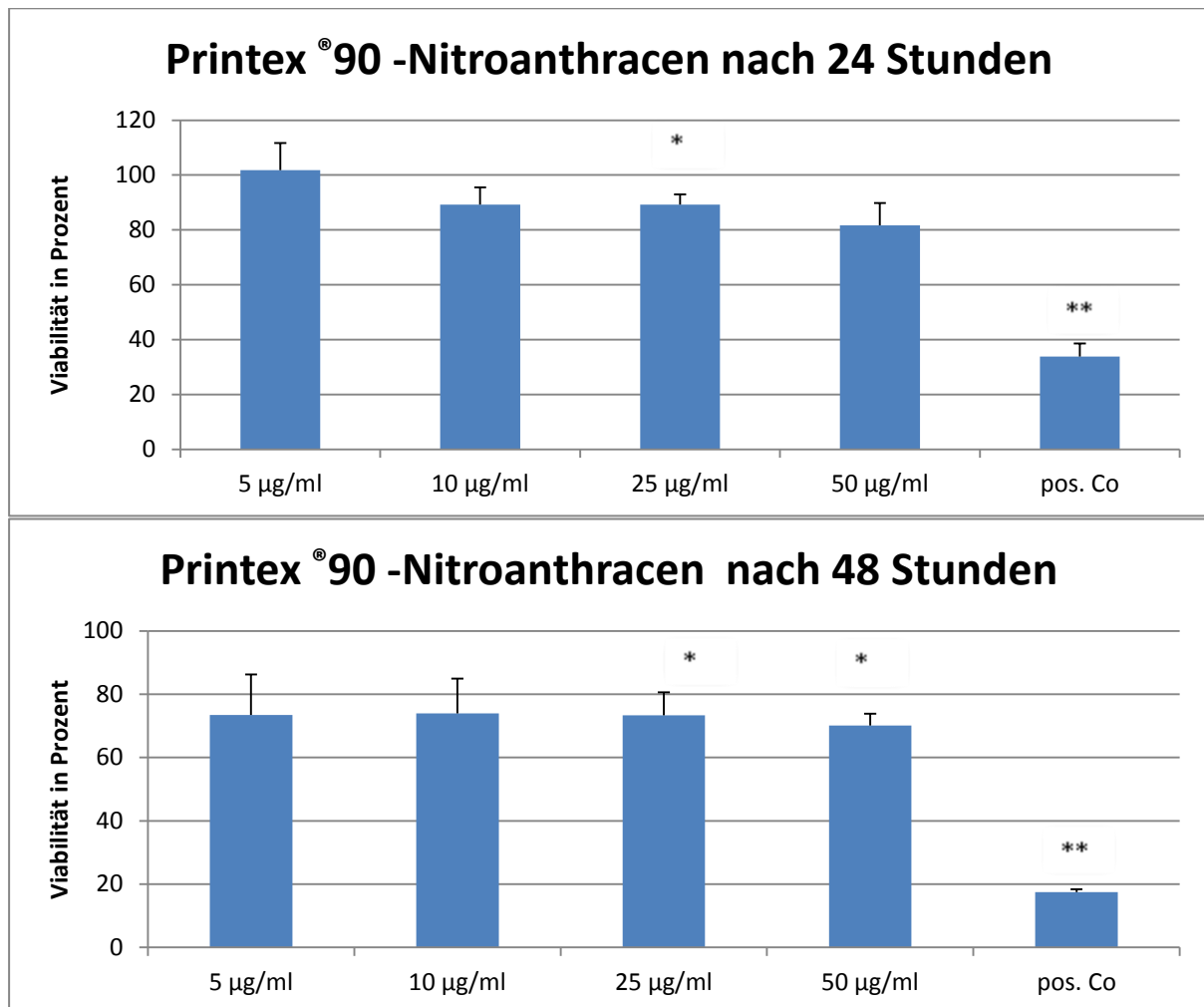


Abbildung 6a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer submersen Behandlung mit Printex[®]90-Nitroanthracen. Aussaat der Zellen fand am Dienstag und die Behandlung der Zellen mit CB am darauffolgenden Tag statt. Nach 24 sowie 48 Stunden wurden die Zellen mit WST-8 angefärbt und vermessen. Es wurde eine Negativkontrolle, die aufsteigenden Konzentrationen der Ruße mit 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und eine Positivkontrolle mit 10 mM Paraquat (pos.Co) verwendet. In drei unabhängigen Versuchen wurden zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden Kontrollen mit den verwendeten Carbon Black Konzentrationen verglichen.

Abbildung 7a und b zeigt die Ergebnisse der Viabilität in Abhängigkeit zur Partikelkonzentration des Acetylenrußes nach je 24 und 48 Stunden. Nach 24 sowie nach 48 Stunden ist keine konzentrationsabhängige negative Tendenz zu erkennen.

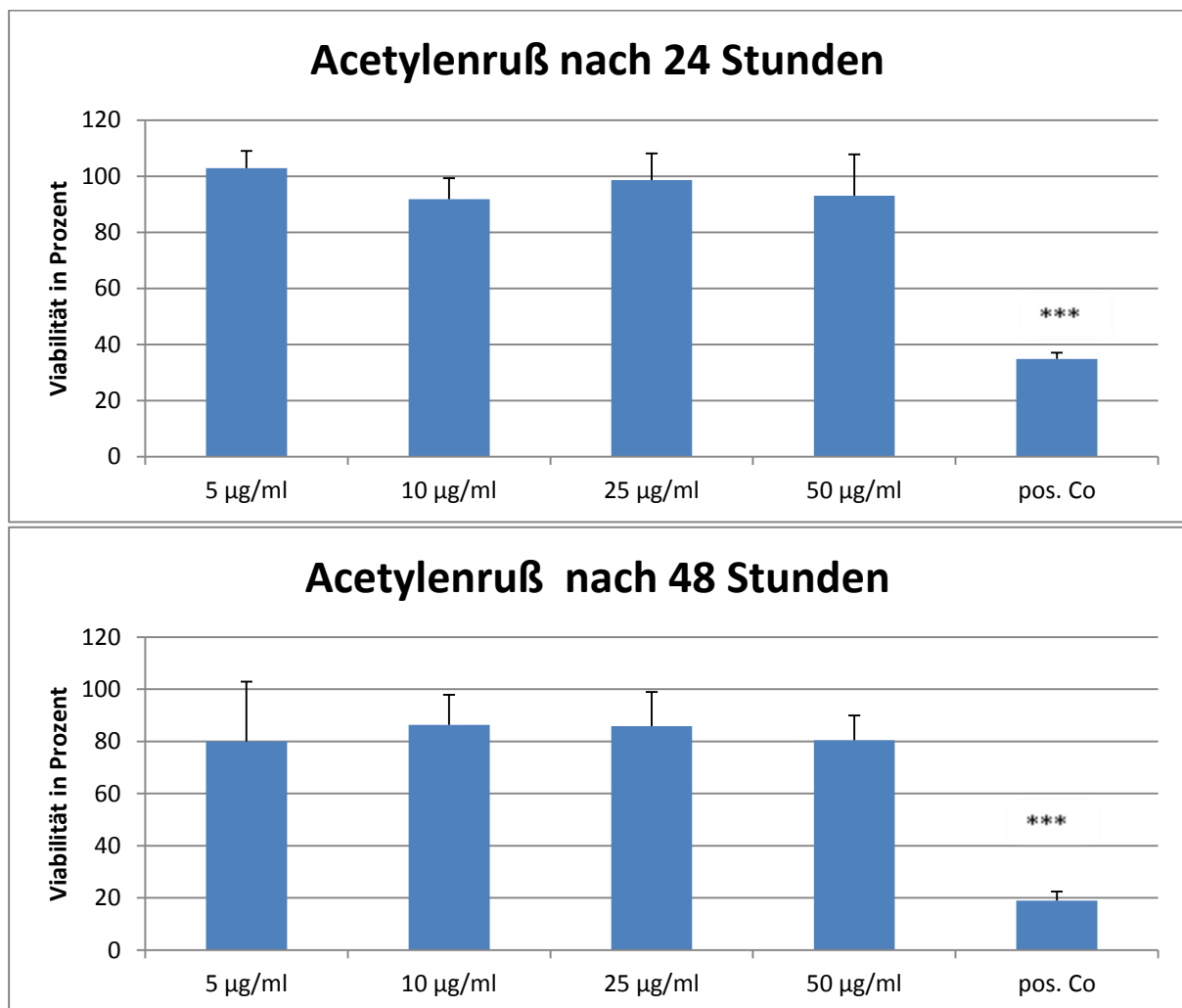


Abbildung 7a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer submersen Behandlung mit Acetylenruß. Aussaat der Zellen fand am Dienstag und die Behandlung der Zellen mit CB am darauffolgenden Tag statt. Nach 24 sowie 48 Stunden wurden die Zellen mit WST-8 angefärbt und vermessen. Es wurde eine Negativkontrolle, die aufsteigenden Konzentrationen der Ruße mit 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und eine Positivkontrolle mit 10 mM Paraquat (pos.Co) verwendet. In drei unabhängigen Versuchen wurden zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden Kontrollen mit den verwendeten Carbon Black Konzentrationen verglichen.

In Abbildung 8a und b sieht man die Viabilität der A549 Zellen nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden mit dem Carbon Black Printex®90-Benzo(a)pyren. Man erkennt nach 24 Stunden keine Schädigung der Zellen. Nach 48 Stunden Behandlung mit Printex®90-Benzo(a)pyren sind die Werte um 10 % gesunken.

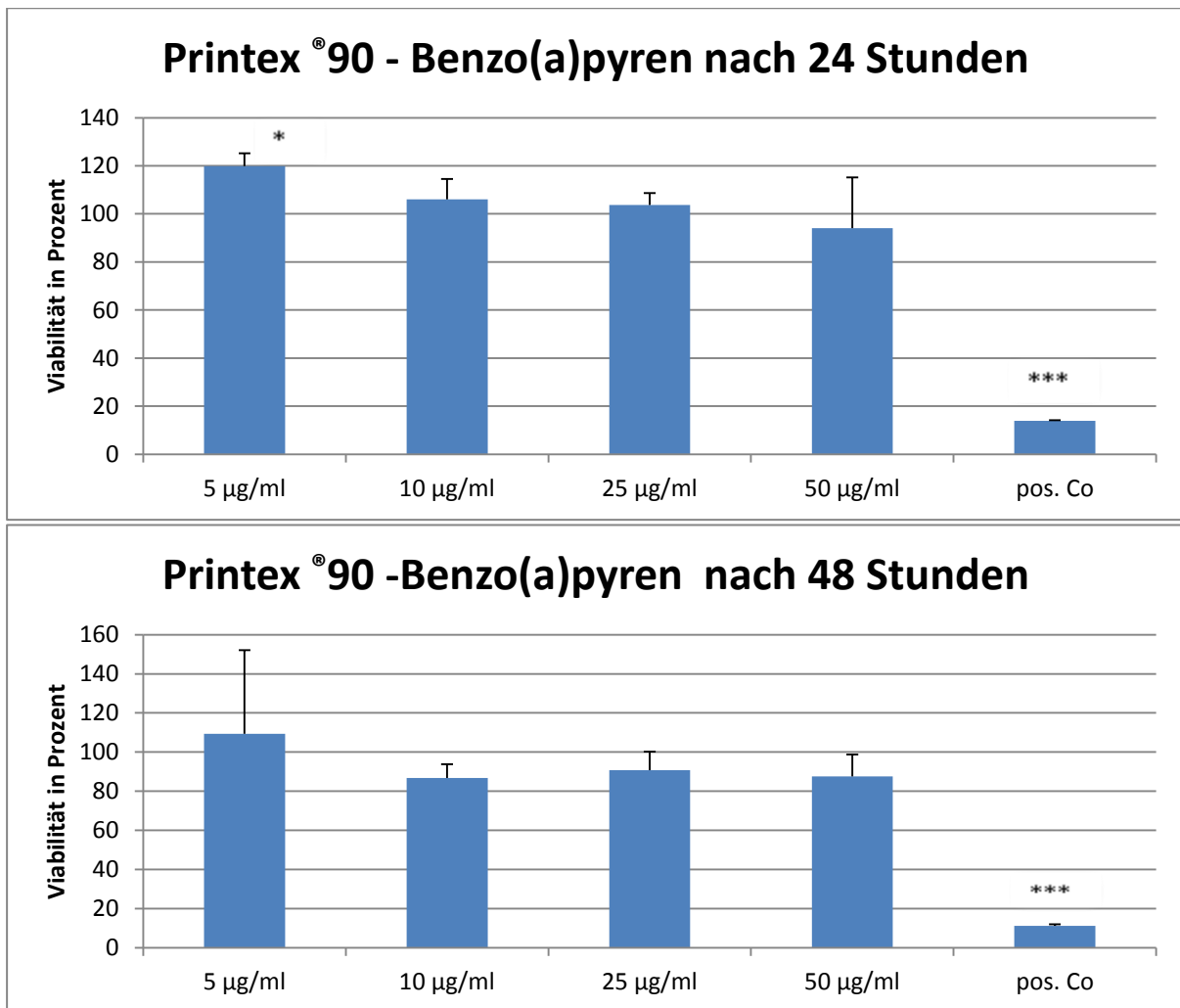


Abbildung 8a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer submersen Behandlung mit Printex[®]90-Benzo(a)pyren. Aussaat der Zellen fand am Dienstag und die Behandlung der Zellen mit CB am darauffolgenden Tag statt. Nach 24 sowie 48 Stunden wurden die Zellen mit WST-8 angefärbt und vermessen. Es wurde eine Negativkontrolle, die aufsteigenden Konzentrationen der Ruße mit 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und eine Positivkontrolle mit 10 mM Paraquat (pos.Co) verwendet. In drei unabhängigen Versuchen wurden zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden Kontrollen mit den verwendeten Carbon Black Konzentrationen verglichen.

3.3 Vorschädigung mit NO₂ und anschließende Behandlung mit Carbon Black

Durch die Air-Lifted-Interface Exposition konnte erfolgreich eine Dosis-Wirkungskurve (Abbildung 4) erstellt werden. Da die Viabilität in Abhängigkeit zu der effektiven Dosis an NO₂ steht, kann man aus der Kurve eine Konzentration und die daraus resultierende Viabilität der Zellen ablesen. Um eine Viabilität von 90 % zu erreichen, müssen die A549 Zellen mit einer NO₂ Konzentration von circa 3 ppm behandelt werden.

Zunächst waren die Expositionen für dienstags und mittwochs angesetzt, um immer den gleichen Tagesrhythmus zu gewährleisten. Pro Versuchstag liefen zwei Expositionen bei einer Konzentration von 3 ppm NO₂. Nach den Expositionen wurden die Inserts mit Zellen zunächst im Durchlichtmikroskop untersucht und dann in eine vorbereitete Platte mit Medium A überführt. Dabei blieben die Inserts A4, C4, B1 und B4 in der exponierten Platte mit Medium C, um zu untersuchen, ob die beabsichtigten 90 % Viabilität bei der Exposition erreicht wurden. Nach der Zugabe von 500 µl warmen Medium C und 50 µl alamar blue, wurden diese vier Inserts für eine Stunde in den 37 °C warmen Inkubator gestellt.

In die Platte mit Medium A und den sechs überführten Inserts wurden verdünnte Partikelsuspensionen gegeben. Diese wurden wie in der Abbildung 9 hergestellt.

Behandlung Plattenlayout					
	1	2	3	4	
A	Neg. Kontrolle	10 µg/ml	50 µg/ml	PBS	Ruß
B	PBS	PBS	PBS	PBS	
C	Neg. Kontrolle	10 µg/ml	50 µg/ml	PBS	
Herstellung Verdünnungsreihe					
Endkonzentration pro ml	µl der nächst höheren konzentrierten Verdünnung	µl 2 fach konz. DMEM+ Zusätze	A. bidest + 0,5 % BSA	Ansatz pro Endkonzentration Gesamtvolumen	
50 µl/ml	Stammsuspension	2000	2000	/	4000
10 µl/ml		600	1200	1200	3000
Kontrollen:					
Neg. Kontrolle	/		500	500	1000
Neg. Kontrolle	negative Kontrolle, DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin -Streptomycin, 1% L-Glutamin				

Abbildung 9: Behandlungsplan der A549 Zellen mit verdünnten Partikelsuspensionen. Es ist das Plattenlayout der 12 Well-Platte mit den verschiedenen Konzentrationen der Carbon Black Partikel und PBS als Verdunstungsschutz dargestellt. Der Herstellungsplan der Verdünnungsreihen mit den Konzentrationen 50 µg/ml und 10 µg/ml Carbon Black, sowie der negativen Kontrolle aus DMEM und Zusätzen ist zu erkennen. Bei der Stammsuspension handelt es sich um 100 µg/ml Carbon Black.

Nachdem die Partikelsuspensionen erwärmt wurden, konnten wie im Plattenlayout (Abbildung 9) zu sehen, 250 µl in jedes Insert pipettiert werden. Sobald jedes Insert die Partikelsuspension enthielt, verblieb die Platte anschließend für 24 Stunden im Inkubator (37°C).

Die exponierte Platte wurde nach einer Stunde aus dem Inkubator geholt und jeweils 100 µl aus den Inserts in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert. Die Auswertung erfolgte im Spectramax Gemini EM bei 560 und 590 nm.

In Abbildung 10a und b sowie 11a und b ist die Viabilität der A549 Zellen nach der Exposition mit 3ppm NO₂ und der anschließenden Behandlung mit dem Carbon Black Partikeln dargestellt. Man erkennt, dass die Viabilität der Zellen mit Reinluft-Behandlung und Printex[®]90 Behandlung keine Unterschiede aufweisen. Die Partikel Acetylenruß und Printex[®]90-Nitroanthracen zeigen wie zuvor Printex[®]90 keine Effekte auf die A549 Zellen. Nach der Behandlung mit Printex[®]90-Benzo(a)pyren zeigen die Zellen eine weniger metabolische Aktivität von nur circa 70%. Konzentrationsabhängige Effekte lassen sich bei keinem der verwendeten Ruße erkennen.

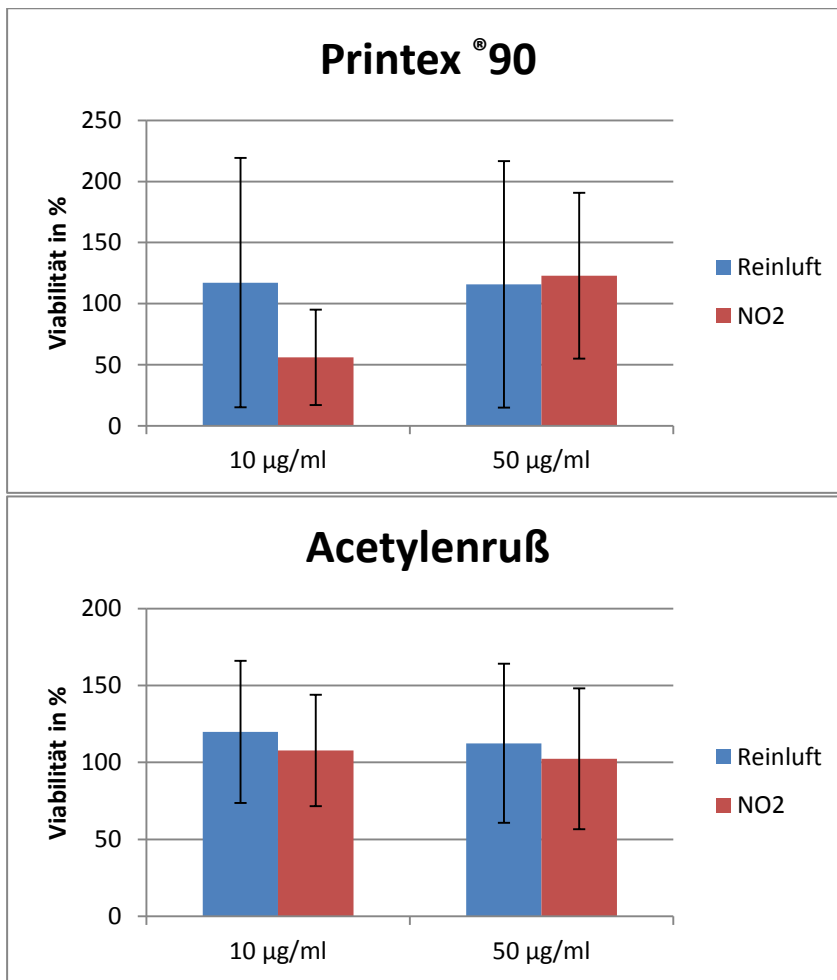


Abbildung 10a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer Exposition mit 3 ppm NO₂ und anschließender Behandlung mit Printex[®]90 und Acetylenruß . Die Zellen wurden eine Stunde bei 3ppm NO₂ und Reinluft exponiert und dann 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml Carbon Black und einer negativen Kontrolle bei 37°C inkubiert. Es folgte die Auswertung nach 24 Stunden mit alamar Blue durch den SpectraMAX Gemini EM. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach der Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

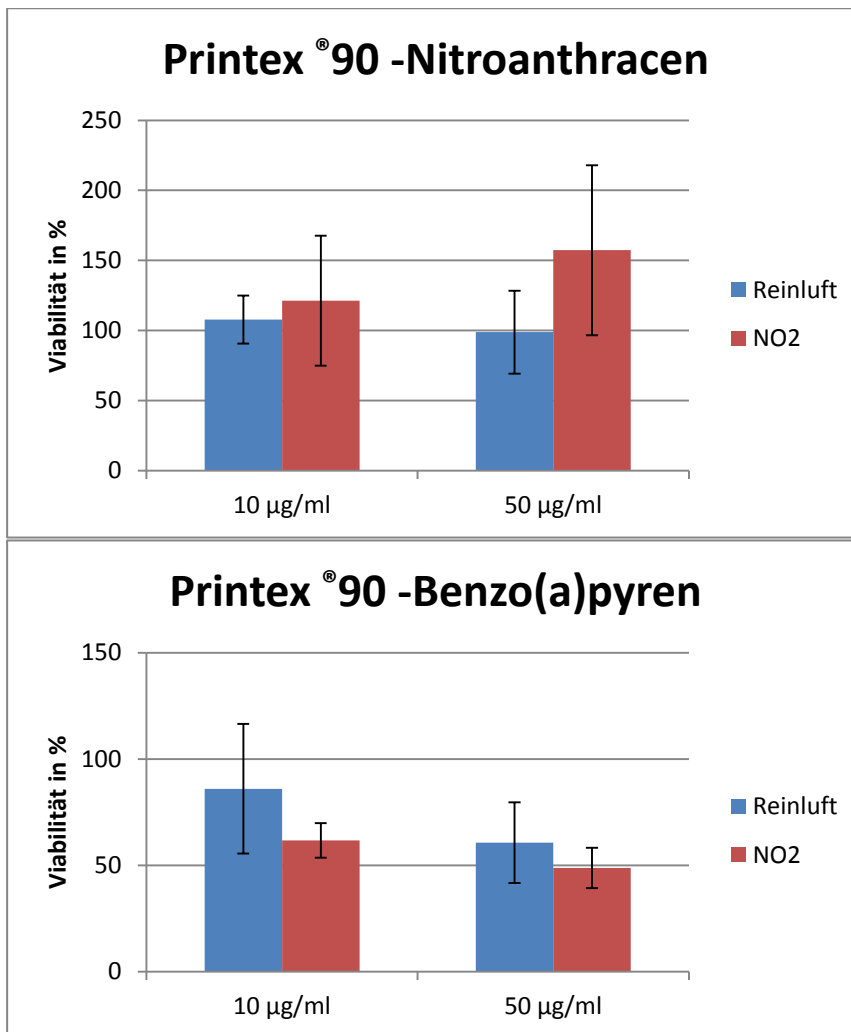


Abbildung 11a und b: Viabilität der A549 Zellen nach einer Exposition mit 3 ppm NO₂ und anschließender Behandlung mit Printex[®]90-Nitroanthracen und Printex[®]90-Benzo(a)pyren. Die Zellen wurden eine Stunde bei 3ppm NO₂ und Reinluft exponiert und dann 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml Carbon Black und einer negativen Kontrolle bei 37°C inkubiert. Es folgte die Auswertung nach 24 Stunden mit alamar Blue durch den SpectraMAX Gemini EM. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach der Anwendung des Student´s-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

In Abbildung 12a und b sowie 13a und b sind die verdichteten Ergebnisse betreffend Interleukin 8 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die IL-8 Werte nach der Behandlung mit Acetylenruß bei circa 700 pg/ml liegen. Es gibt keine konzentrationsabhängigen Effekte des Rußes und auch die mit NO₂ behandelten Zellen zeigen keine Veränderungen der IL-8 Konzentrationen. Das Ruß Printex[®]90-Nitroanthracen zeigt IL-8 Werte zwischen 1000 und 800 pg/ml. Durch die Behandlung mit 50 µg/ml Ruß zeigen sich Werte um 1000 pg/ml, während die Werte für 10 µg/ml Ruß um 200 pg/ml darunter liegen. Die IL-8 Werte nach der Behandlung mit Printex[®]90-Benzo(a)pyren sind ähnlich denen von Acetylenruß. Sie liegen um 600 pg/ml IL-8. Es lässt sich kein konzentrationsabhängiger Effekt beobachten. Die Werte von Printex[®]90 liegen in einem Bereich von 700 bis 1000 pg/ml IL-8. Die mit Reinluft und 10 µg/ml Ruß behandelten

Zellen haben einen um circa 200 pg/ml erhöhten IL-8 Wert als die mit der gleichen Konzentration an Ruß und NO₂ behandelten Zellen. Nach der Behandlung mit 50 µg/ml Ruß zeigen sich keine Unterschiede zwischen Reinluft und NO₂.

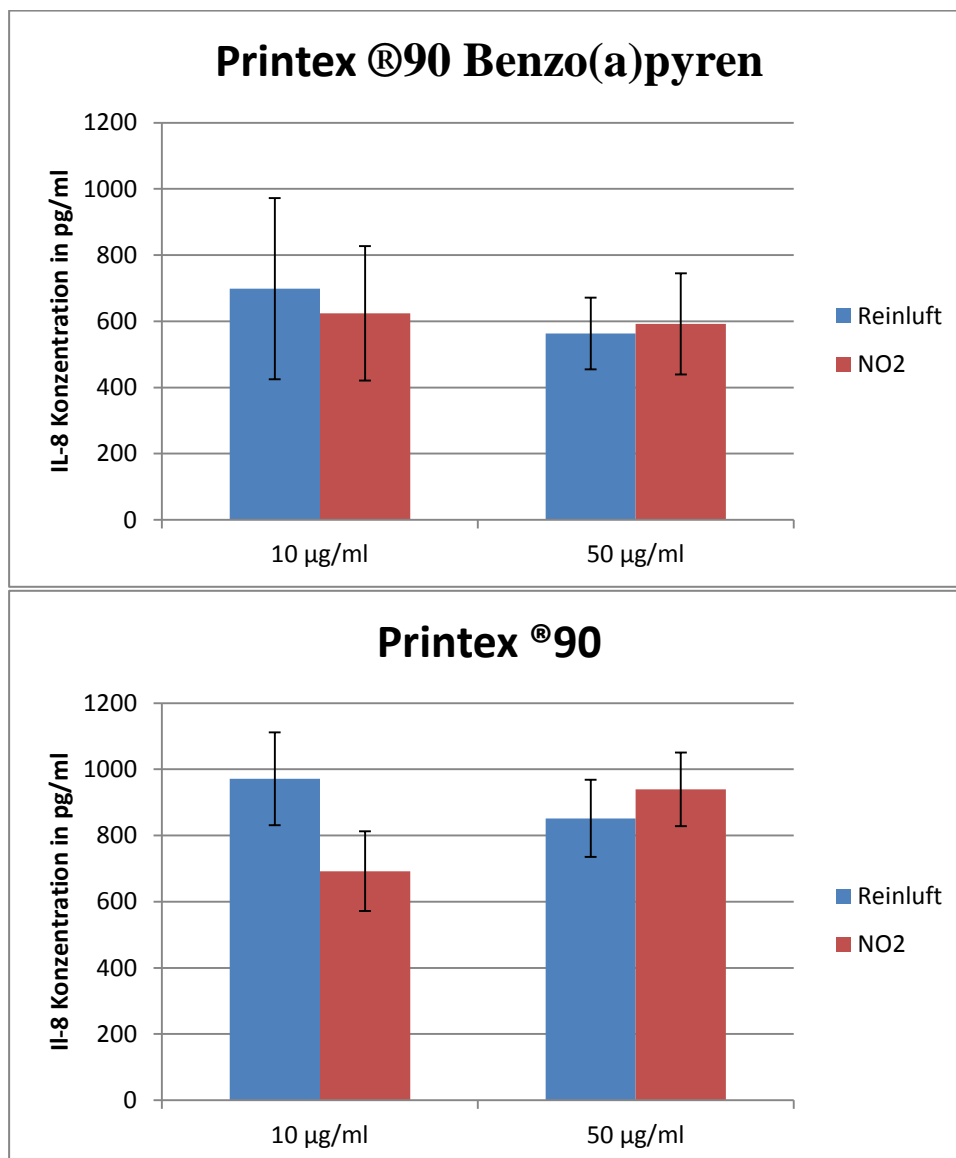


Abbildung 12a und b: Interleukin 8 Konzentrationen der A549 Zellen nach einer Exposition mit 3 ppm NO₂ und anschließender Behandlung mit Printex®90 und Printex®90-Benzo(a)pyren. Die Zellen wurden eine Stunde bei 3ppm NO₂ und Reinluft exponiert und dann 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml Carbon Black und einer negativen Kontrolle bei 37°C inkubiert. Die Unterstände wurden gesammelt und mit einem humanen CXCL8/IL-8 ELISA Kit ausgewertet. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach der Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden die Matrizen der Reinluft- und NO₂-exponierten Zellen miteinander verglichen.

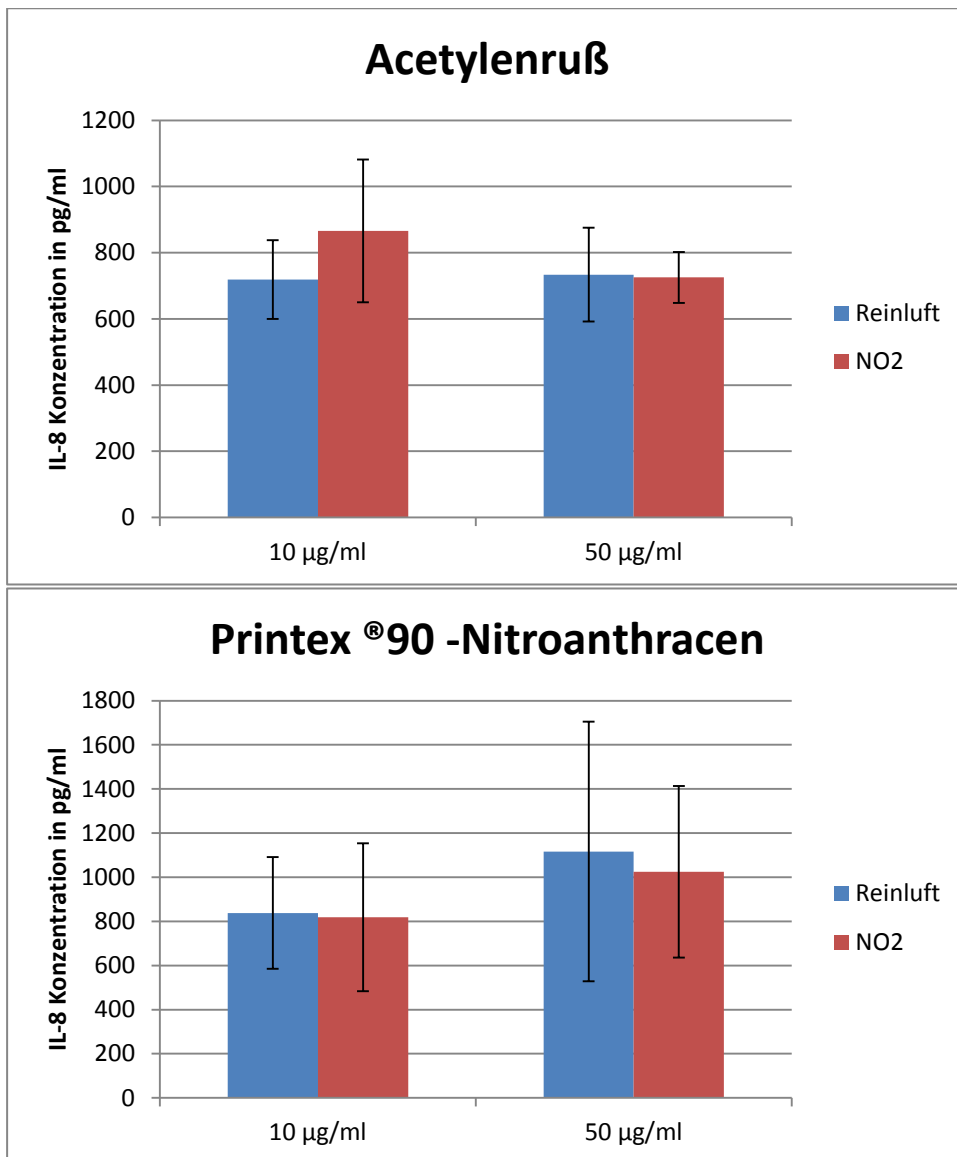


Abbildung 13a und b: Interleukin 8 Konzentrationen der A549 Zellen nach einer Exposition mit 3 ppm NO₂ und anschließender Behandlung mit Acetylenruß und Printex®90-Nitroanthracen. Die Zellen wurden eine Stunde bei 3ppm NO₂ und Reinluft exponiert und dann 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml Carbon Black und einer negativen Kontrolle bei 37°C inkubiert. Die Unterstände wurden gesammelt und mit einem humanen CXCL8/IL-8 ELISA Kit ausgewertet. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach der Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden die Matrizen der Reinluft- und NO₂- exponierten Zellen miteinander verglichen.

3.4 Vorschädigung mit LPS und anschließende Behandlung mit Carbon Black

Für die Vorschädigung mit LPS wurden die A549 Zellen zunächst wieder in Inserts und in die dazugehörige Companion Plate ausgesät. Am Montag erfolgte der Medienwechsel der Zellen erst auf Medium B und anschließend auf Medium C. Dienstag wurde zu den Zellen 0,1 µg/ml LPS-Lösung hinzugegeben und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden erhielten die Zellen einen weiteren Medienwechsel auf Medium A, in dem sich wieder wie im Behandlungslayout (Tabelle 2) LPS in den jeweiligen Inserts befand.

Tabelle 2: Behandlungslayout der A549 Zellen mit 0,1 µg/ml LPS-Lösung in Medium C.

	1	2	3	4
A	-LPS	-LPS	+LPS	+LPS
B	-LPS	-LPS	+LPS	+LPS
C	-LPS	-LPS	+LPS	+LPS

Des Weiteren wurden am Mittwoch Carbon Black Suspensionen in den Konzentrationen 10 µg/ml (Reihe B) und 50 µg/ml (Reihe C) sowie eine Negativ-Kontrolle (Reihe A) angesetzt und in die entsprechenden Inserts pipettiert (Tabelle 3). Die mit LPS und Carbon Black behandelten Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden in den Inkubator überführt.

Tabelle 3: Behandlungslayout der A549 Zellen mit 0,1 µg/ml LPS-Lösung in Medium A und jeweils der negativen Kontrolle, 10 µg/ml Carbon Black und 50 µg/ml Carbon Black.

	1	2	3	4	
A	-LPS	-LPS	+LPS	+LPS	<- neg. Kontrolle
B	-LPS	-LPS	+LPS	+LPS	<- 10 µg/ml
C	-LPS	-LPS	+LPS	+LPS	<- 50 µg/ml

Am nächsten Tag wurden die Partikelsuspensionen von den Zellen entfernt und Interleukin 8 Proben gesammelt. Um die Zellviabilität zu vermessen, wurde der Viabilitätstest mit alamar Blue durchgeführt.

In der folgenden Abbildung 14a und b sowie 15a und b sind die Ergebnisse aus den Versuchen mit 0,1 µg/ml LPS und der Behandlung mit Carbon Black Partikeln dargestellt. Die Viabilität der A549 Zellen ist in Abhängigkeit zu der Partikelkonzentration und in Bezug zur negativen

Kontrolle dargestellt. Nach der Behandlung mit Printex[®]90, Printex[®]90-Nitroanthracen, Acetylenruß sowie Printex[®]90-Benzo(a)pyren erkennt man weder einen konzentrationsabhängigen Effekt noch einen Effekt auf die Vorschädigung mit LPS.

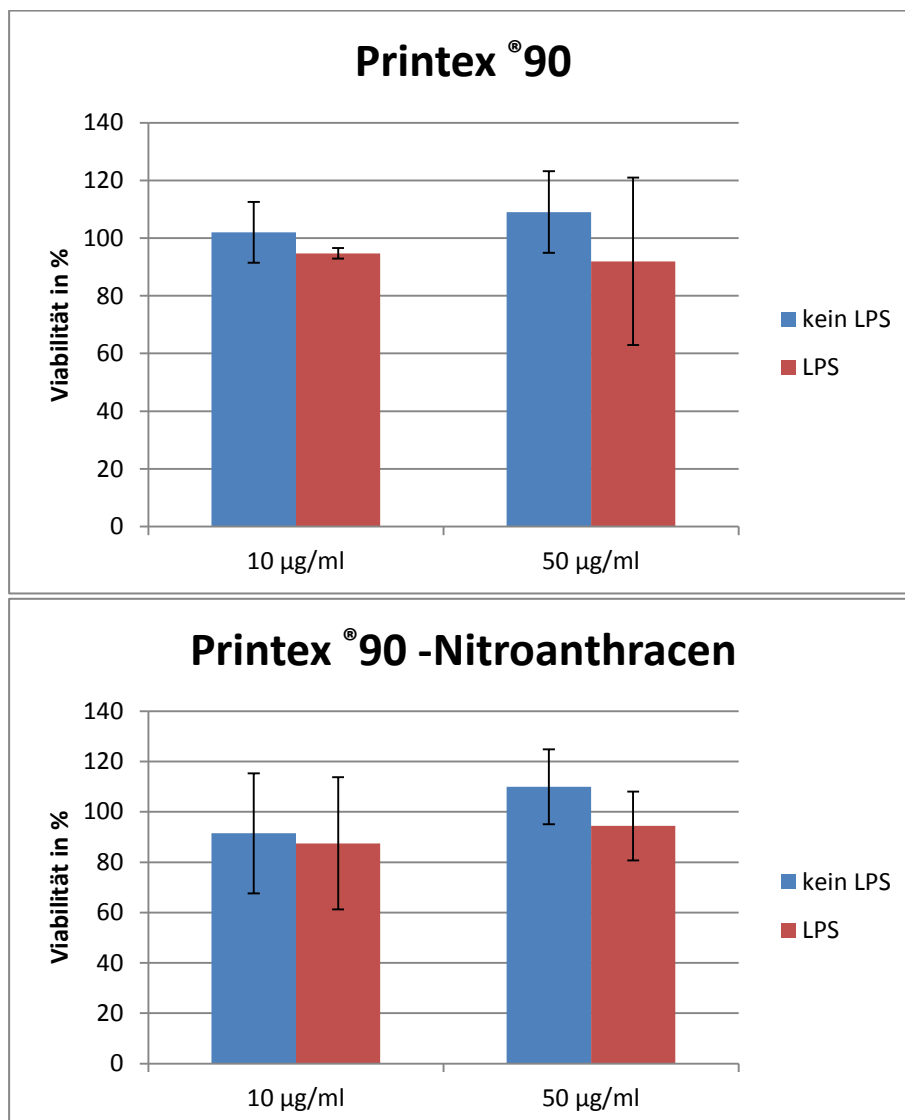


Abbildung 14a und b: Viabilität der A549 Zellen nach der Vorschädigung mit 0,1 µg/ml LPS und anschließender Behandlung mit Printex[®]90 und Printex[®]90-Nitroanthracen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 0,1 µg/ml LPS inkubiert und dann weitere 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml Carbon Black und einer negativen Kontrolle bei 37°C inkubiert. Es folgte die Auswertung nach 24 Stunden mit alamar Blue durch den SpectraMAX Gemini EM. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden die Matrizen mit und ohne LPS miteinander verglichen.

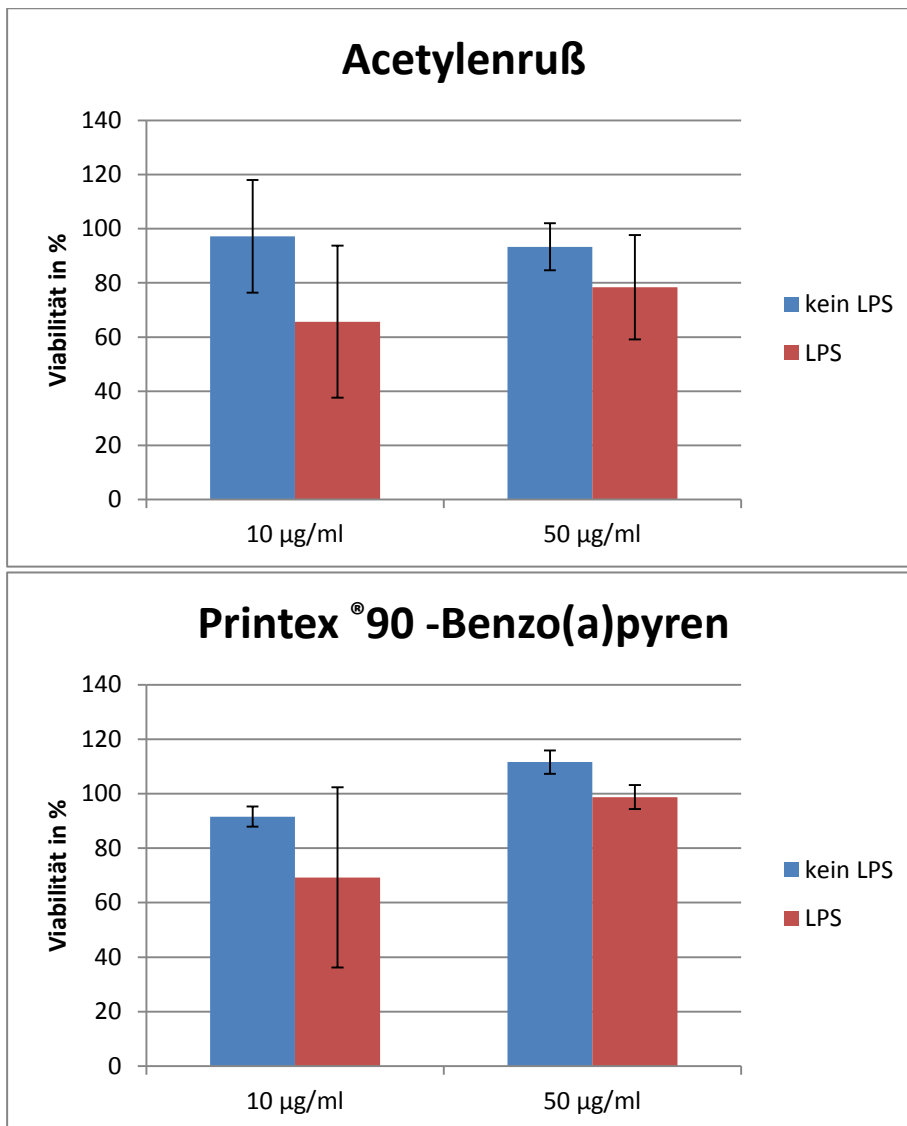


Abbildung 15a und b: Viabilität der A549 Zellen nach der Vorschädigung mit 0,1 µg/ml LPS und anschließender Behandlung mit Acetylenruß und Printex®90-Benzo(a)pyren. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 0,1 µg/ml LPS inkubiert und dann weitere 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml Carbon Black und einer negativen Kontrolle bei 37°C inkubiert. Es folgte die Auswertung nach 24 Stunden mit alamar Blue durch den SpectraMAX Gemini EM. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach Anwendung des Student's-t-Tests konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden die Matrizen mit und ohne LPS miteinander verglichen.

In Abbildung 16a und b sowie 17a und b sind die Interleukin 8 Werte nach der Behandlung der A549 Zellen mit 0,1 µg/ml LPS und Carbon Black dargestellt. Die Interleukin Konzentration in µg/ml steht in Abhängigkeit zu der verwendeten Konzentration an Carbon Black. Bei Printex®90 erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen den Interleukin Werten der LPS- sowie ohne LPS behandelten Proben. Die LPS-unbehandelten Proben weisen Werte um 500 pg/ml auf, während die Werte der LPS-behandelten Proben bei 2500 pg/ml liegen. Die restlichen drei Carbon Black Proben zeigen ein ähnliches Bild wie Printex®90. Auch ihre Werte

liegen bei den LPS-behandelten Zellen um 2500 pg/ml Interleukin 8. Man kann bei keinem der vier Partikel eine konzentrationsabhängige Tendenz erkennen.

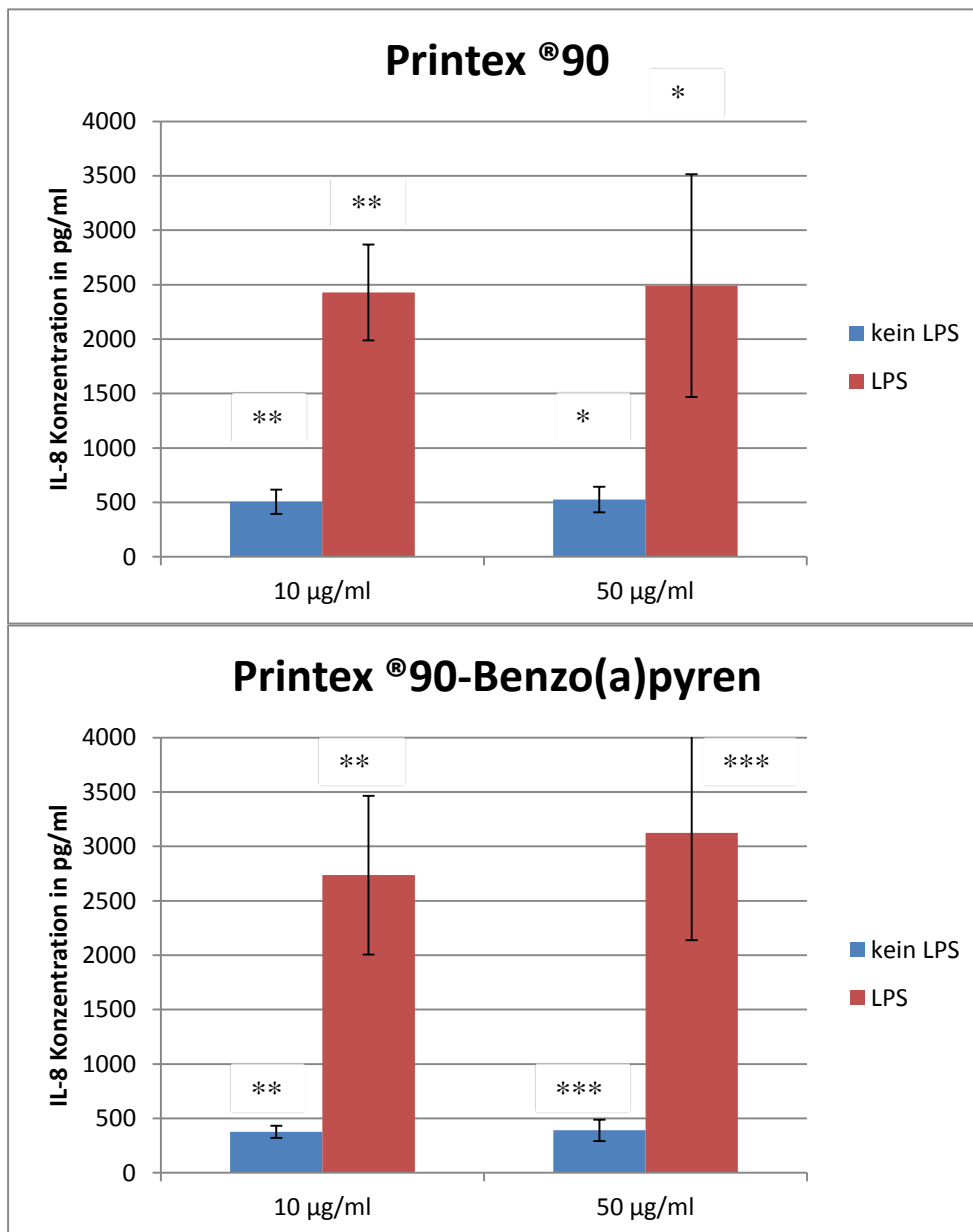


Abbildung 16a und b: Interleukin 8 Konzentrationen der A549 Zellen nach einer Behandlung mit 0,1 µg/ml LPS und Carbon Black. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 0,1 µg/ml LPS inkubiert und dann weitere 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml Carbon Black und einer negativen Kontrolle bei 37°C inkubiert. Die Unterstände wurden gesammelt und mit einem humanen CXCL8/IL-8 ELISA Kit ausgewertet. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach Anwendung des Student's t-Tests konnte Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden die Matrizen mit und ohne LPS miteinander verglichen.

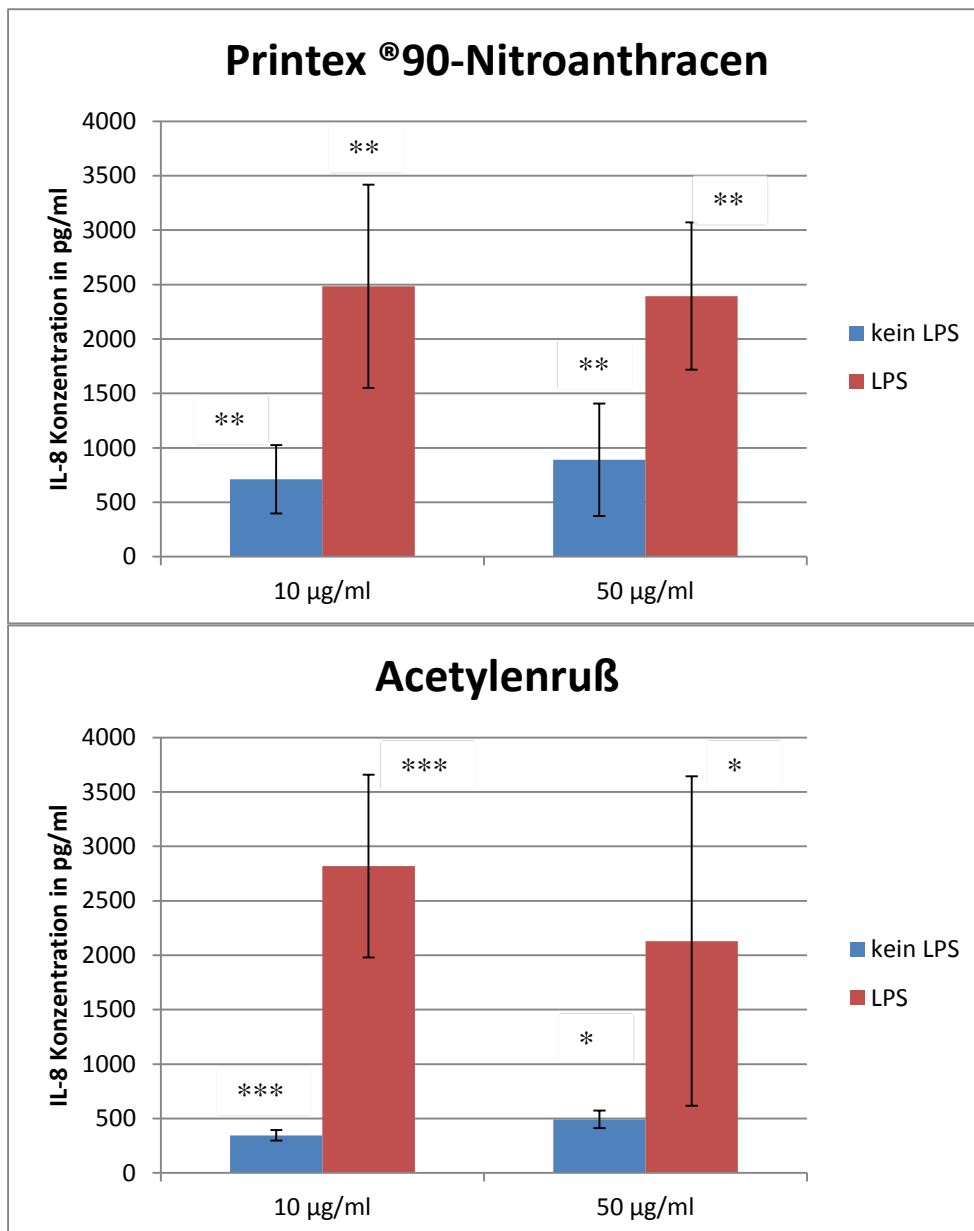


Abbildung 17a und b: Interleukin 8 Konzentrationen der A549 Zellen nach einer Behandlung mit 0,1 µg/ml LPS und Carbon Black. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 0,1 µg/ml LPS inkubiert und dann weitere 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10 und 50 µg/ml Carbon Black und einer negativen Kontrolle bei 37°C inkubiert. Die Unterstände wurden gesammelt und mit einem humanen CXCL8/IL-8 ELISA Kit ausgewertet. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils zwei biologische und sechs technische Replikate untersucht. Nach Anwendung des Student's t-Tests konnte Signifikanz festgestellt werden. Ein p-Wert < 0,05 wurde mit einem *, < 0,01 mit zwei ** und < 0,001 als drei *** dargestellt. Für die Signifikanz wurden die Matrizen mit und ohne LPS miteinander verglichen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Zytotoxizität von Carbon Black Partikeln an vorgeschädigten A549 Zellen durchgeführt. Dies sollte die Frage beantworten, ob die Sensitivität der Alveolarepithelzellen gegenüber nanostrukturierten Carbon Black Partikeln nach einer Behandlung mit Stickstoffdioxid oder Lipopolysaccharid verändert ist. NO₂ als gasförmiger Luftschadstoff wird durch Verkehr und Industrie in die Umwelt abgegeben. In zahlreichen Studien wurde bereits gezeigt, dass NO₂ zu allergischen Lungenerkrankungen führen kann [Layachi 2012]. Grenzwerte der Emission sollen vor einer starken Luftschadstoffbelastung schützen. In Deutschland treten im Jahresmittel zwischen 30 bis 60 Mikrogramm pro Kubikmeter NO₂ auf, während in Großstädten auch vereinzelt höhere Werte aufgezeichnet werden [Umwelt Bundesamt 2015]. Als Grenzwert der NO₂ Emission wurde eine Konzentration von nicht mehr als 40 µg/m³ im Jahresmittel festgelegt [Umwelt Bundesamt 2015]. In dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 3 ppm oder umgerechnet 5,7 mg/m³ NO₂ verwendet. Die Zellen sollten durch diese angepasste Konzentration nur vorgeschädigt werden. In der erstellten Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4 lässt sich das toxikologische Potential von NO₂ gut verdeutlichen. Bereits ab einer Konzentration von 20 ppm (38,3 mg/m³) sind 50% der A549 Zellen geschädigt. Erhöht man die Konzentration um das Doppelte auf 50 ppm (95,7 mg/m³), so sind nur noch 30 % der Zellen metabolisch aktiv.

Des Weiteren wurde eine Vorschädigung mit Lipopolysaccharid (LPS) vom gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* (LPS 0111:B4) erreicht. LPS ist ein Endotoxin, das beim Menschen zu Fieber und Leukozytose führen kann. Bereits Konzentrationen ab 0,1 µg LPS pro kg Körpergewicht reichen aus um toxisch zu sein. Die A549 Zellen wurden mit 0,1 µg/ml LPS behandelt.

Vorherige Studien haben bereits gezeigt, dass chronische Inhalation der Carbon Black Partikel zu Entzündungen, Fibrose und Lungentumoren in Ratten führt [Heinrich et al. 1994]. Um diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können, werden in dieser Arbeit die Carbon Black Partikel an humanen Lungenepithelzellen untersucht. Die Carbon Black Ruße verblieben im Medium der A549 Zellen für 24 und 48 Stunden. Jedes der vier Ruße wurde in vier Konzentrationen von 5, 10, 25 und 50 µg/ml auf die A549 Zellen pipettiert. Die Ruße Acetylenruß und Printex[®]90-Benzo(a)pyren zeigten in den Versuchen zur submersen Behandlung der A549 Zellen keine konzentrationsabhängige Tendenz auf die Viabilität, jedoch eine Abnahme von 10 % nach 48 Stunden. Bei Printex[®]90 konnte man wiederum keinen

konzentrationsabhängigen Effekt auf die Viabilität beobachten. Nach der Behandlung mit Printex[®]90-Nitroanthracen sind die Zellen nach 48 Stunden noch zu 70% metabolisch aktiv (Abbildung 6). Keines der verwendeten Partikel hatte eine große biologische Wirkung auf die A549 Zellen. Die Abnahme der metabolischen Aktivität bei allen Konzentrationen von Printex[®]90-Nitroanthracen lässt sich nicht mit einem konzentrationsabhängigen Effekt der Carbon Black Partikel erklären.

Um einen Unterschied zwischen gesunden und vorgeschädigten Lungen zu analysieren, wurden in den weiteren Untersuchungen die A549 Zellen vor der Behandlung mit Carbon Black mit NO₂ oder als Kontrolle mit Reinluft exponiert (Abbildungen 10 und 11). Bei keinem der Carbon Black Partikel war ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Viabilität zu erkennen. Durch eine fehlende Signifikanz in den Ergebnissen und eine hohe Standardabweichung lässt sich keine biologische Wirkung feststellen. Printex[®]90, Acetylenruß, Printex[®]90-Benzo(a)pyren und Printex[®]90 Nitroanthracen zeigen keine konzentrationsabhängigen Effekte und auch keine Unterschiede zwischen NO₂- und Reinluft- behandelten Zellen. Die mit Reinluft und 10 µg/ml Printex[®]90 behandelten Zellen haben einen um circa 200 pg/ml erhöhten IL-8 Wert als die mit der gleichen Konzentration an Ruß und NO₂ behandelten Zellen (Abbildungen 12 und 13). Generell lässt sich aber kaum ein großer Effekt der verwendeten Ruße erkennen. Ergebnisse aus den Studien von Layachi et al [2012] und Horie et al [2014] zeigen, dass die Carbon Black Partikel meist keine biologische Wirkung auf die Zellen haben. Eine siebenstündige Inhalation mit ultrafeinen Partikeln zeigte eine neutrophile Verstärkung in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit [Layachi et al 2012]. Eine Vorschädigung mit NO₂ und die anschließende Behandlung mit Carbon Black ließ die Zahlen der Neutrophilen und Makrophagen steigen [Layachi et al 2012]. Wurden die Ratten in den Versuchen von Layachi et al [2012] aber mit Ovalbumin sensibilisiert und mit NO₂ sowie Carbon Black exponiert, so zeigte sich eine Reduktion der TH2 Zytokine. Diese Reduktion der TH2 Zytokine weisen darauf hin, dass es einen Effekt der Carbon Black Partikel auf das Immunsystem gibt. Des Weiteren haben Horie et al [2014] bei hydrophoben Carbon Black Partikeln kaum einen Effekt auf die mitochondriale Aktivität sowie auf das Reaktive Sauerstoffspezies-Level (ROS) beobachtet.

Weder die Vorschädigung mit LPS, noch die vorherige Exposition zu NO₂ führten zu einer veränderten Sensitivität der Zellen gegenüber Carbon Black Partikeln. Bei allen Proben und den verwendeten Rußen Printex[®]90, Printex[®]90-Nitroanthracen, Printex[®]90-Benzo(a)pyren und Acetylenruß gibt es keine Tendenz der Zellaktivität durch LPS (Abbildungen 14 und 15). Des Weiteren zeigt sich auch kein konzentrationsabhängiger Effekt der Carbon Black Partikel. Dieses Bild zeigt sich auch in den Interleukin 8 Werten in Abbildung 16 und 17. Es tritt eine

deutliche Stimulation der A549 Zellen mit LPS auf, da die mit LPS-behandelten Proben fünfmal höhere IL-8 Werte aufweisen als LPS-unbehandelte Proben. Es zeigt sich aber auch in den Interleukin Werten kein konzentrationsabhängiger Effekt der Carbon Black Partikel. Die A549 Zellen zeigen keine Veränderung durch eine mögliche biologische Wirkung der Carbon Black Ruße.

Die Studie um Monteiller et al [2007] hat ebenfalls Carbon Black Partikel in vitro an A549 Zellen getestet. Sie behandelten die Zellen mit 15, 31, 62, 125 und 250 µg/ml für 4, 6, 12 und 24 Stunden. Wie in dieser Arbeit wurden auch bei Monteiller et al [2007] sowohl Interleukin 8 Konzentrationen als auch die Zytotoxizität analysiert. Es zeigt sich, dass die Carbon Black Partikel keine wesentliche Zytotoxizität aufwiesen. Während bei den kleineren verwendeten Konzentrationen der Partikel (15, 31, 62 µg/ml) geringe Effekte auftraten, gab es bei den höheren Konzentrationen (125, 250 µg/ml) keine Zytotoxizität. Die Interleukin 8 Abgabe der Zellen wies bei Monteiller et al [2007] auf einen dosisabhängigen Anstieg hin. Bei höheren Konzentrationen der Carbon Black Partikel zeigte sich jedoch ein Abfall der Interleukin 8 Abgabe. Monteiller et al [2007] schloss eine Interferenz mit dem Assay nicht aus und wies auch auf eine mögliche Adsorption der IL-8 Proteine durch die Oberfläche der Carbon Black Partikel hin.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit A549 Zellen konnten weder nach Vorschädigung mit LPS noch nach NO₂ Exposition einen additiven Effekt auf die Zytotoxizität von Carbon Black Partikeln nachweisen.

Ob eine Vorschädigung des Lungenepithels die Toxizität von Carbon Black Partikeln erhöht, kann auf der Basis dieser Untersuchungen nicht abschließend beurteilt werden.

5 Literaturverzeichnis

DaNa2.0. (2015)

„Informationen zu Nanomaterialien und Nano-Sicherheitsforschung.“
[<http://www.nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/industrieruss/uebersicht-industrieruss>], abgerufen am 17.09.15

Doenecke, D.; Koolmann, J.; Fuchs, G.; Gerok, W. (2005).

„Biochemie und Pathobiochemie.“ Stuttgart. Georg Thieme Verlag KG.

Fey, Hans (1977)

„Kompendium der allgemeinen medizinischen Bakteriologie.“ Berlin, Hamburg: Parey (Pareys Studentexte, Nr. 19)

Foster, K.A.; Oster, C.G.; Mayer, M.M.; Avery, M. L.; Audus, K. L. (1998)

„Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial.“
Experimental Cell Research Vol. 243. 359-366.

Heinrich, U.; Dunworth, D.L.; Pott, F.; Peters, L.; Dasenbrock, C.; Levsen, K.; Koch, W.; Creutzenberg, O.; Schulte, A. (1994)

„The carcinogenic effects of carbon black particles and tar-pitch condensation aerosol after inhalation exposure of rats.“ Hannover, Deutschland: Elsevier Science Ltd. 351-356

Horie, M.; Kato, H.; Endoh, S.; Fujita, K.; Komaba, L.K.; Nishio, K.; Nakamura, A.; Miyauchi, A.; Yamamoto, K.; Kinugasa, S.; Hagihara, Y.; Yoshida, Y.; Iwahashi, H. (2014)

„Cellular effects of industrial metal nanoparticles and hydrophilic carbon black dispersion.“ The journal of Toxicological Sciences. 897-907.

Hussain, S.; Boland, S.; Baeza-Squiban, A.; Hamel, R.; Thomassen, L.C.J.; Martens, J.A.; Billon-Galland, M.A.; Fleury-Feith, J.; Moisan, F.; Pairon, J.C.; Marano, F. (2009)

„Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount.“
Toxicology. 142-149

Hussain, S.; Thomassen, L.C.J.; Ferecatu, I.; Borot, M.C.; Andreau, K.; Martens, J.A.; Fleury, J.; Baeza-Squiban, A.; Marano, F.; Boland, S. (2010)

„Carbon Black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells.“ Paris: BioMed Central Ltd.

International Carbon Black Association (2015)

„Carbon Black.“

[<http://www.carbon-black.org/index.php/faqs/physical-characteristics>], abgerufen am 18.11.2015

International Agency on Research on Cancer (2010)

„Carbon Black (Group 2B).“

[<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/mono93.pdf>], abgerufen am 02.12.15

Invitrogen Corporation (2010)

„ELISA Kit Human IL-8.“ Kalifornien

[<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/KHC0081C>], abgerufen am 30.11.15

Jundi, K.; Greene, C.M. (2015)

„Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease.“ Basel, Switzerland: Biomolecules.

KG Deutsche Gasrußwerke GmbH & Co. (2015)

„Deutsche Gasrußwerke GmbH.“

[[http://www.gasruss.de/index.php?module=viewer&index\[viewer\]\[page\]=products_furnace_black](http://www.gasruss.de/index.php?module=viewer&index[viewer][page]=products_furnace_black)], abgerufen am 10.11.15

Layachi, S.; Rogerieux, F.; Robidel, F.; Lacroix, G.; Bayat, S. (2012)

„Effect of combined Nitrogen Dioxide and Carbon Nanoparticle Exposure on Lung Function during Ovalbumin Sensitization in Brown Norway Rat.“ PLoS One.

Life Technologies (2015)

„AlamarBlue Assay.“

[http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TI%20AlamarBlue%20Rev%201.1.pdf], abgerufen am 12.10.2015

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Stahl, D.A.; Clark, D.P. (2015)

„Brock. Mikrobiologie kompakt.“ Pearson Deutschland GmbH

Monteiller, C.; Tran, L.; MacNee, W.; Faux, S.; Jones, A.; Miller, B.; Donaldson, K. (2007)

„The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area.“ Occup Environ Med; 609-615

Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Schäfer-Korting, M. (2001)

„Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.“ Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Torres Palomino, D.C.; Cavalheiro Marti, L. (2015)

„Chemokines and immunity.“ Brazil: Hospital Israelita Albert Einstein.

Umwelt Bundesamt (2015)

„Stickstoffdioxid-Belastung“

[<http://www.umweltbundesamt.de/daten/luftbelastung/stickstoffdioxid-belastung>], abgerufen am 01.12.15

Yang, W.; Peters, J.I.; Williams III, R.O. (2008)

„Inhaled nanoparticles –A current review.“ Texas, USA: International Journal of
Pharmaceutics.

6 Anhang

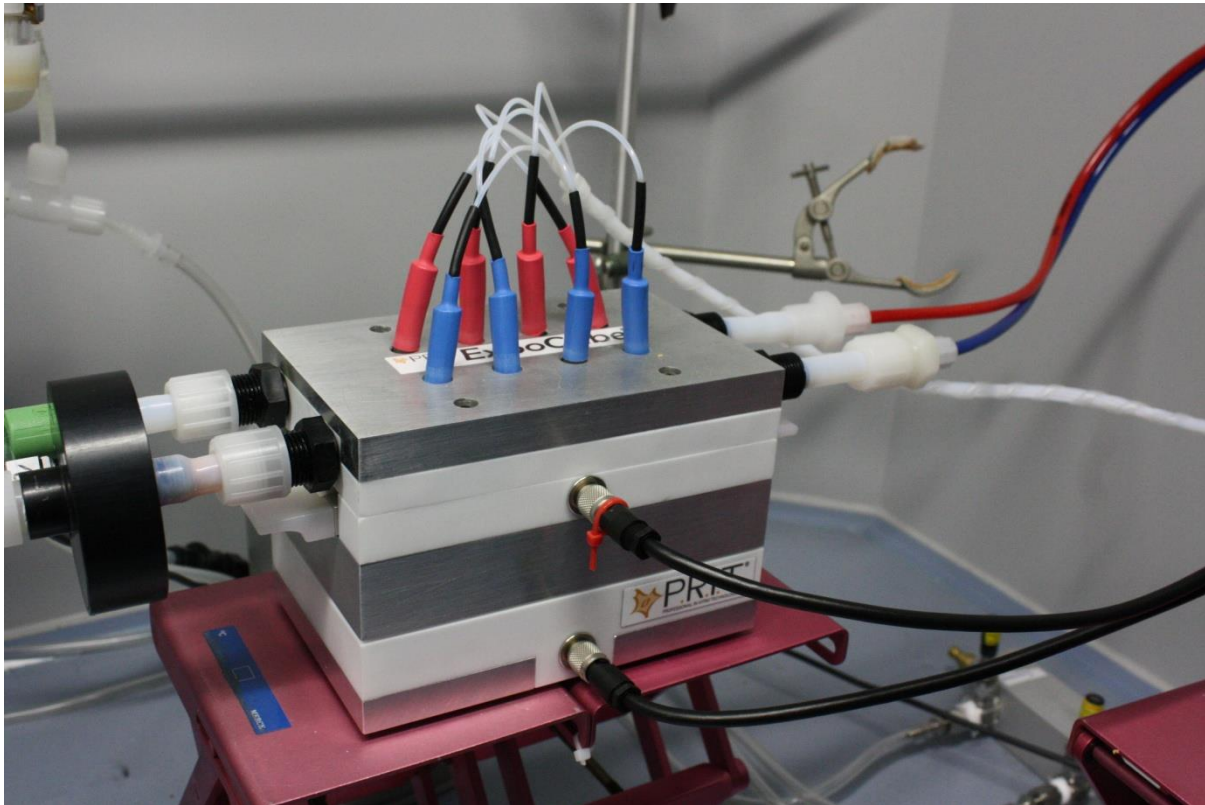


Abbildung 18: ExpoCube des Fraunhofer Instituts für Toxikologie und experimentelle Medizin. Die hinteren vier Anschlüsse auf dem Deckel zeigen den Weg des Gases, die vorderen vier Anschlüsse den der Reinluft. Quelle: Fraunhofer Institut ITEM