

Abschlussbericht zum Vorhaben

Projekt 2: TLK01L-77228 „Biologische Antwort auf Partikel in einem Lungenmodell“

für den Projektverbund BayUFP

„Messung, Charakterisierung und Bewertung ultrafeiner Partikel“

an das

Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz

Rosenkavalierplatz 2

81925 München

Laufzeit:

01.11.2020 – 31.03.2024

Berichtszeitraum:

01.11.2020 – 31.03.2024

Verfasserin des Berichts:

Prof. Dr. med. Simone Schmitz-Spanke

Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,

Henkestr. 9-11



Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------|----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| I. Abkürzungsverzeichnis..... | II |
| II. Tabellenverzeichnis..... | IV |
| III. Abbildungsverzeichnis..... | V |
| 1. Kurzzusammenfassung..... | 1 |
| 2. Einführung..... | 2 |
| 3. Zielstellung..... | 8 |
| 4. Ergebnisse und Diskussion..... | 12 |
| 4.1. Generierung und Charakterisierung der UFPs (MIE)..... | 12 |
| 4.1. Freisetzung von genotoxischen Substanzen (KE1C)..... | 15 |
| 4.2. Oxidativer Stress (KE1A)..... | 18 |
| 4.3. Entzündung (KE1B)..... | 22 |
| 4.4. Gewebeschädigung (KE2)..... | 26 |
| 4.5. Kollagen (KE3A)..... | 29 |
| 4.6. Primäre und sekundäre DNA-Schädigung (KE3C, KE3B)..... | 31 |
| 4.7. Proliferation, Mutagenese (KE4)..... | 33 |
| 4.7 Adverse Outcome (AO1-3)..... | 34 |
| 5. Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts..... | 36 |
| 6. Fazit und Ausblick..... | 38 |
| IV. Literaturverzeichnis..... | 41 |

I. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|-------------------------------------------------------|
| ADH | <i>Alkohol Dehydrogenase</i> |
| Ala-Asp-Glu | <i>Alanin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Signalweg</i> |
| ALI | <i>air-liquid-interface</i> |
| ALOX5 | <i>Arachidonat-Lipoxygenase</i> |
| AO | <i>adverse outcome</i> |
| AOP | <i>adverse outcome pathway</i> |
| APRT | <i>Adenin-Phosphoribosyltransferase</i> |
| Arg | <i>Argenin</i> |
| Arg-Pro | <i>Arginin-prolin-Signalweg</i> |
| BC | <i>Carbon Black</i> |
| BROD | <i>7-benzyloxyresorufin-O-dealkylase</i> |
| CAST | <i>combustion aerosol standard</i> |
| Comet | <i>single cell gel electrophoresis)</i> |
| COPD | <i>chronisch obstruktive Lungenerkrankung</i> |
| CYP450 | <i>ytochrom-P450</i> |
| Cys Met | <i>Cystein-Methionin-Metabolsimus</i> |
| DAMPs | <i>danger-associated molecular patterns</i> |
| DCFH | <i>Diacetyldichlorofluorescein</i> |
| D-Gln-Glu | <i>Glutamin-Glutaminsäure-Signalweg</i> |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| EROD | <i>enzymatic reactive oxygen species</i> |
| Fpg | <i>formamido pyrimidine glycosylase</i> |
| G1P | <i>Glukose-1-Phosphat</i> |
| GLUL | <i>Glutamat</i> |
| Gly-Ser-Thr | <i>Glycin-Serin-Threonin-Signalweg</i> |
| GSH | <i>Glutathion</i> |
| GSSG | <i>Glutathiondisulfid</i> |
| HPRT | <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> |
| IL | <i>Interleukin</i> |
| KE | <i>key event</i> |
| LDH | <i>Laktatdehydrogenase</i> |
| LOQ | <i>Bestimmungsgrenze</i> |
| MDA | <i>Malondialdehyd</i> |
| MIE | <i>molecular initiating event</i> |
| MTAP | <i>S-Methyl-5'-thioadenosine Phosphorylase</i> |
| NADPH | <i>Nicotinamidadenindinukleotidphospha</i> |
| NF-κβ | <i>Nuklearfaktor-κβ</i> |
| NLRP3 | <i>NLR family pyrin domain containing 3</i> |
| NO ₂ | <i>Stickoxid</i> |
| O ₃ | <i>Ozon</i> |
| PAH | <i>polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff</i> |
| PCA | <i>principal component analysis</i> |
| PLAG1B | <i>Phospholipase A" Gruppe 1B</i> |
| PNP | <i>Purin-Nukleosid-Phosphorylase</i> |
| PPP | <i>Pentose-Phosphat-Weg</i> |
| PTGS | <i>Prostaglandinsynthase</i> |
| RNA | <i>Ribonukleinsäure</i> |
| ROS | <i>reaktive Sauerstoffspezies</i> |
| SMA | <i>glattes Muskelaktin</i> |
| SMPS | <i>scanning mobility particle sizer</i> |
| SVOC | <i>semi-volatile organische Komponenten</i> |
| TCA | <i>Zitronensäure-Zyklus</i> |

| | |
|------------------|-------------------------------------------------------|
| TEM | <i>Transmissionselektronenmikroskopie</i> |
| TEOM | <i>tapered element oscillating microbalance</i> |
| TGF- β 1 | <i>transforming growth factor β1</i> |
| TiO ₂ | <i>Titandioxid</i> |
| TNF- α | <i>Tumornekrosefaktor-α</i> |
| tRNA | <i>transfer-RNA</i> |
| Trp | <i>Tryptophan</i> |
| UDP-GlcNAc | <i>Uridindiphosphat N-Acetylglucosamin</i> |
| UFP | <i>ultrafeine Partikel</i> |

II. Tabellenverzeichnis

| | |
|------------------------------------------------------|----|
| Tab. 1: UFP-Aerosol Parameter (2. Messkampagne)..... | 14 |
|------------------------------------------------------|----|

III. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Die Abbildung A stellt den im Projekt entwickelten AOP dar, der die hypothetische Beziehung zwischen der Deposition und Retention von nanoskaligen Partikeln in der Lunge und spezifischen pulmonalen Effekten beschreibt (modifiziert nach (Braakhuis et al. 2021; Halappanavar et al. 2020; Nymark et al. 2021)). In Abbildung B werden die im Projekt verwendeten Testsysteme zur Überprüfung der Ereignisse dargestellt. KE, Key Event; AO, Adverse Outcome; UFP, ultrafeine Partikel; TEM, Transmissionselektronenmikroskopie; CYP450, Cytochrom P450; DCFH, Diacetyldichlorofluorescein Fpg, Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase. LDH, Laktatdehydrogenase; HPRT, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase..... 3
- Abb. 2: Schema der Versuchsanlage mit Aerosolproduktion/-charakterisierung und dem ALI-System (Zellexpositionssystem). 8
- Abb. 3: Dreifachkultur; im apikalen Kompartiment wurden alveolare Zellen (A549) und Makrophagen (THP-1), im basalen Kompartiment Fibroblasten (MRC5) kultiviert. Nachdem die Zellen im apikalen Kompartiment angewachsen waren, wurde das Medium entfernt, damit die Zellen Lunge-ähnliche Strukturen ausbilden konnten (nach Altorki et al. doi: 10.1038/s41568-018-0081-9)..... 9
- Abb. 4: Studiendesign der ersten und zweiten Messkampagne. SVOC, semi-volatile organische Komponenten10
- Abb. 5: Schematische Darstellung der Produktion der UFP-Aerosole mit unterschiedlichem organischem Gehalt.12
- Abb. 6: Produktion und Charakterisierung der UFP-Aerosole mit unterschiedlichen organischen Gehalten. TEOM: Kontinuierliche Erfassung der Partikelmasse mit tapered element oscillating microbalance, SMPS: kontinuierliche Erfassung der Partikelgrößenverteilung mit scanning mobility particle sizer, AE33: kontinuierliche Erfassung von Carbon Black13
- Abb. 7: Konzentrationen der PAHs in den UFPs. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Konzentrationen in den wiederholten Expositionen an. LOQ: Bestimmungsgrenze.....14
- Abb. 8: Auswirkungen auf den Fremdstoffmetabolismus durch UFPs in A549-Zellen. EROD und BROD repräsentieren die Enzymaktivitäten von CYP 450-Monooxygenasen.....15

- Abb. 9: Änderung der EROD/BROD-Enzymaktivität durch UFPs in apikalen Zellen (volles Muster) und basalen Zellen (gestricheltes Muster), die 4 Stunden lang gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) exponiert wurden.....16
- Abb. 10: Änderung der EROD/BROD-Enzymaktivität in der Dreifachkultur 24 Stunden nach Exposition gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC)
16
- Abb. 11: Oxidativer Stress wurde durch Messung des zellulären Verhältnisses von oxidiertem Glutathion (GSSG) zum gesamten Glutathion, der MDA-Freisetzung und der intrazellulären ROS (DCFH-Assay) Exposition gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) bewertet.....18
- Abb. 12: Oxidative Stressreaktion von apikalen und basalen Zellen, die 4 Stunden lang gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) exponiert wurden. Oxidativer Stress wurde durch Messung der intrazellulären ROS (DCFH-Assay), des zellulären GSSG/GSH-Verhältnisses und der Konzentration an Malondialdehyd (MDA) bewertet.....19
- Abb. 13: Gehalt an MDA nach Exposition gegen die verdünnten und unverdünnten UFP-Aerosole mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) und anschließender 24-stündiger Inkubation19
- Abb. 14: Signalweganalyse der signifikant regulierten Metabolite in apikalen Zellen. Die Zellen wurden für 4 Stunden gegen UFPs mit hohem organischem Gehalt (SVOC, verdünnt/unverdünnt) exponiert, bevor sie für 24 Stunden nach-inkubiert wurden. Cys Met, Cystein-Methionin-Metabolismus; TCA, Zitronensäure-Zyklus; tRNA, transfer-RNA (Ribonukleinsäure); GSH, Glutathion; Arg; Argenin; PPP, Pentose-Phosphat-Weg; Trp, Tryptophan; Gly-Ser-Thr, Glycin-Serin-Threonin-Signalweg; Ala-Asp-Glu, Alanin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Signalweg; D-Gln-Glu, Glutamin-Glutaminsäure-Signalweg; Arg-Pro, Arginin-Prolin-Signalweg
20
- Abb. 15: Entzündliche Wirkungen von UFPs auf A549-Zellen. Die Freisetzung der Zytokine IL-8 und IL-6 in das Medium wurde nach 4-stündiger Exposition bestimmt.....22
- Abb. 16: Entzündungseffekte von UFP auf apikale und basale Zellen, die gegen UFPs mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) exponiert wurden. Die Freisetzung der Zytokine IL-1 β (a), IL-6 (b) und IL-8 (c) durch alle Zelltypen in

- das Probenmedium wurde nach 4-stündiger Exposition (links) und 24-stündiger Nach-Inkubation (rechts) bestimmt.23
- Abb. 17: Darstellung des mit STITCH erstellten Netzwerks der identifizierten, signifikant regulierten Metaboliten nach Exposition (4 h + 24 h Inkubation) gegen UFP-Aerosol mit hohem SVOC. Ovale: identifizierte Metabolite, Kreise: Metabolite, die von STITCH aufgrund von Datenbanken zu dem Netzwerk hinzugefügt wurden. Der markierte Bereich zeigt das Netzwerk um die Arachidonsäure. GLUL, Glutamat; ADH, Alkohol Dehydrogenase; MTAP, S-Methyl-5'-thioadenosine Phosphorylase; APRT, Adenin-Phosphoribosyltransferase; PNP, Purin-Nukleosid-Phosphorylase; PTGS, Prostaglandinsynthase; ALOX5, Arachidonat-5-Lipoxygenase; PLAG1B, Phospholipase A2 Gruppe 1B24
- Abb. 18: Zytotoxizität von UFP auf Alveolarepithelzellen. Die Zytotoxizität wurde durch Messung der LDH-Freisetzung und die Stoffwechselaktivität mit dem Alamar-Blue-Assay bewertet. Als Negativkontrolle wurde Reinluft (Clean Air) verwendet.26
- Abb. 19: Auswirkungen von UFPs mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) auf die Zytotoxizität (a, LDH-Freisetzung), die Stoffwechselaktivität (b, Alamar-Blue-Assay) und die Anzahl lebender Zellen (c) nach 4-stündiger Exposition. .27
- Abb. 20: Effekt der 24-stündigen Nach-Inkubation auf die Zytotoxizität (gestrichelte Linie) und Stoffwechselaktivität (durchgezogene Linie). Die Zellen wurden gegen unverdünnte und verdünnte Aerosole exponiert. Die Zellen hatten eine basale LDH-Freisetzung von 14,5% nach der Nach-Exposition gegenüber den Bedingungen im Inkubator (im Vergleich zu etwa 10% nach 4-stündiger Exposition).....27
- Abb. 21: Darstellung des Tryptophan-Metabolismus mit den Regulationen der Metaboliten nach allen Expositionen in apikalen Zellen.....29
- Abb. 22: Die primäre DNA-Schädigung (links) und oxidative, sekundäre DNA-Schädigung (rechts) wurden mit dem Comet-Assay, mit oder ohne Fpg-Enzym, gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) bewertet. Als Negativkontrolle wurde Reinluft (Clean Air) verwendet.....31
- Abb. 23: Primäre (a) und sekundäre DNA-schädigende Wirkungen (b) von UFP auf apikalen und basalen Zellen die 4 Stunden lang gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) exponiert wurden. DNA-Schäden (a) und oxidative/alkylierende DNA-Schäden (b) wurden mit dem Comet-Assay bewertet, der für die Bestimmung von Fpg-Stellen enzymatisch modifiziert wurde.32

Abb. 24: Principal component analysis (PCA) der apikalen Zellen nach 4-stündiger Exposition gegen alle UFP-Aerosole mit anschließender 24-stündiger Ruhephase. Die Kontrollzellen wurden gegen Reinluft exponiert.39

1. Kurzzusammenfassung

In diesem Projekt wurde der kausale Zusammenhang zwischen ultrafeinen Partikeln (UFPs) und negativen Gesundheitseffekten in der Lunge mithilfe eines Adverse Outcome Pathways (AOP) untersucht. Um realitätsnahe Bedingungen zu simulieren, wurden die dosis- und zeitabhängigen Auswirkungen von zwei UFP-Aerosolen mit unterschiedlicher organischer Beladung auf verschiedene Schlüsselereignisse des AOP in einer Dreifachkultur in einem Air-Liquid-System untersucht. Die Aerosole wurden chemisch und physikalisch charakterisiert. Metabolomische Analysen ergänzten die Untersuchungen, um die molekularen Mechanismen aufzuklären. Die Metabolitenprofile wurden mit Daten von Patienten und Tierversuchen verglichen, um Hinweise auf pulmonale Erkrankungen zu erhalten.

Ergebnisse:

- UFP-Expositionen führten zu nachhaltigen Veränderungen in allen untersuchten Schlüsselereignissen des AOPs.
- Selbst niedrige UFP-Dosierungen und geringe organische Beladungen zeigten negative Auswirkungen.
- Es wurden DNA-Schäden beobachtet, die mit einem erhöhten Risiko für Lungenkrebs verbunden sind.
- Die Metabolitenprofile gaben Hinweisen auf ein erhöhtes Risiko für negative Gesundheitseffekte in der Lunge hin.

Die Studie liefert starke Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für negative Gesundheitseffekte in der Lunge nach UFP-Exposition. Die Ergebnisse sind relevant für die öffentliche Gesundheit und Politik.

2. Einführung

Ultrafeine Partikel (UFP) mit einem Durchmesser von 1 bis 100 nm sind in städtischen Lufträumen in hohen Konzentrationen vorhanden. Durch Inhalation können sie die Alveolarregion der Lunge erreichen, wo sie aufgrund der geringen Clearance-Rate länger verweilen und mit biologischen Systemen interagieren. Dies kann zu potenziellen Auswirkungen auf die Gesundheit führen. Die große Oberfläche und die hohe Oberflächenreaktivität von UFPs führen dazu, dass sie große Mengen an Metallen und organischen Verbindungen adsorbieren können. Diese adsorbierten Stoffe können toxische Wirkungen haben, die ebenfalls zu Gesundheitsproblemen führen können (2023). In den letzten Jahren wurde in der Forschung ein Fokus auf die gesundheitlichen Auswirkungen von Feinstäuben mit einem Durchmesser von 2,5 µm und 10 µm gelegt. Allerdings ist unklar, ob die Ergebnisse auf UFPs übertragbar sind.

Die Wirkung von inhalierten nanoskaligen Partikeln wurde in verschiedenen *adverse outcome pathways* (AOPs) zusammengefasst (z.B. (Halappanavar et al. 2020; Nymark et al. 2021)). Das AOP-Konzept ist ein mechanistischer Rahmen, der die Verknüpfung von chemischen Expositionen mit nachteiligen Gesundheitseffekten auf der Grundlage der zugrundeliegenden biologischen Prozesse ermöglicht. Dieses innovative Konzept beschreibt einen kausalen Zusammenhang zwischen molekularen Initiationsereignissen (molecular initiating event, MIE) und Schlüsselereignissen (key events, KEs), die zu einem adversen gesundheitlichen Effekt (adverse outcome, AO) führen. AOPs dienen der strukturierten Aufbereitung toxikologischer Daten, um Entscheidungen von Behörden zu erleichtern und gelten als wertvolle Werkzeuge für diverse Bereiche der Risikobewertung (Halappanavar et al. 2019).

Abb. 1A beschreibt einen AOP, der – bezogen auf das Projekt - die wichtigsten Ereignisse nach der Inhalation von nanoskaligen Partikeln in der Lunge darstellt. Der AOP wurde im Projekt basierend auf Publikationen und den Ergebnissen des Projektes entwickelt (Braakhuis et al. 2021; Halappanavar et al. 2020; Nymark et al. 2021). Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte, beginnend mit der Deposition der Partikel in der Lunge, über ihre Aufnahme in die Zellen, bis hin zu möglichen gesundheitsbeeinträchtigenden Lungeneffekten. In Abb. 1B werden die im Projekt verwendeten Testsysteme zur Überprüfung der einzelnen Ereignisse dargestellt.

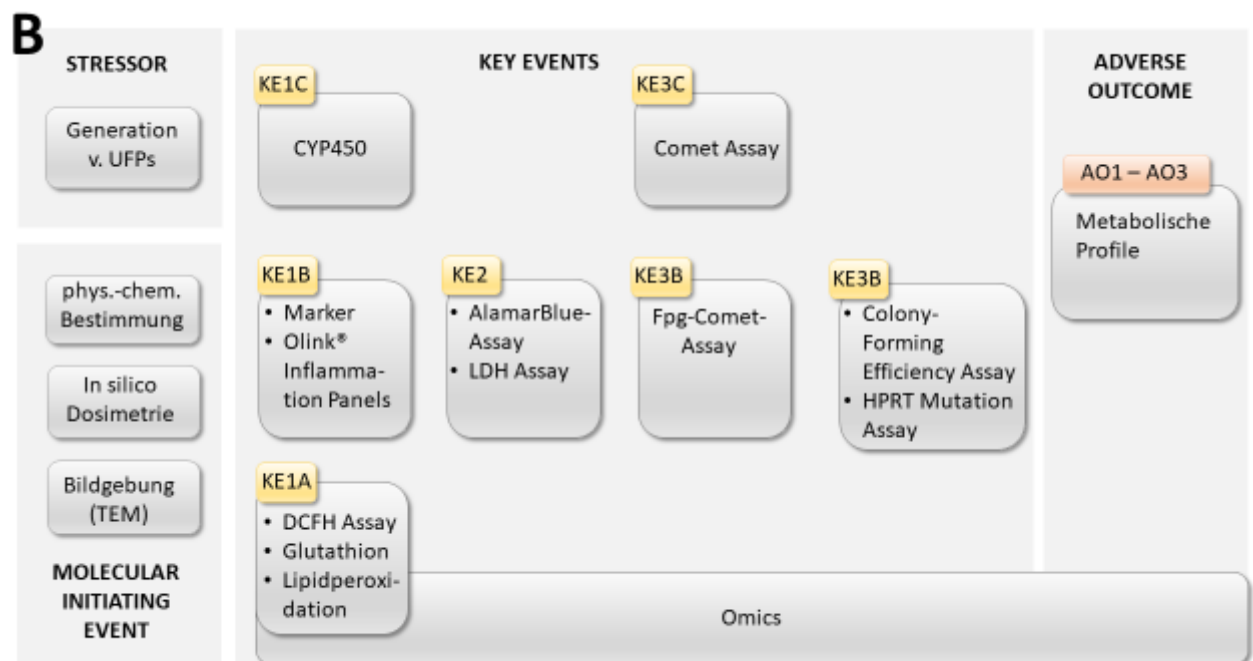
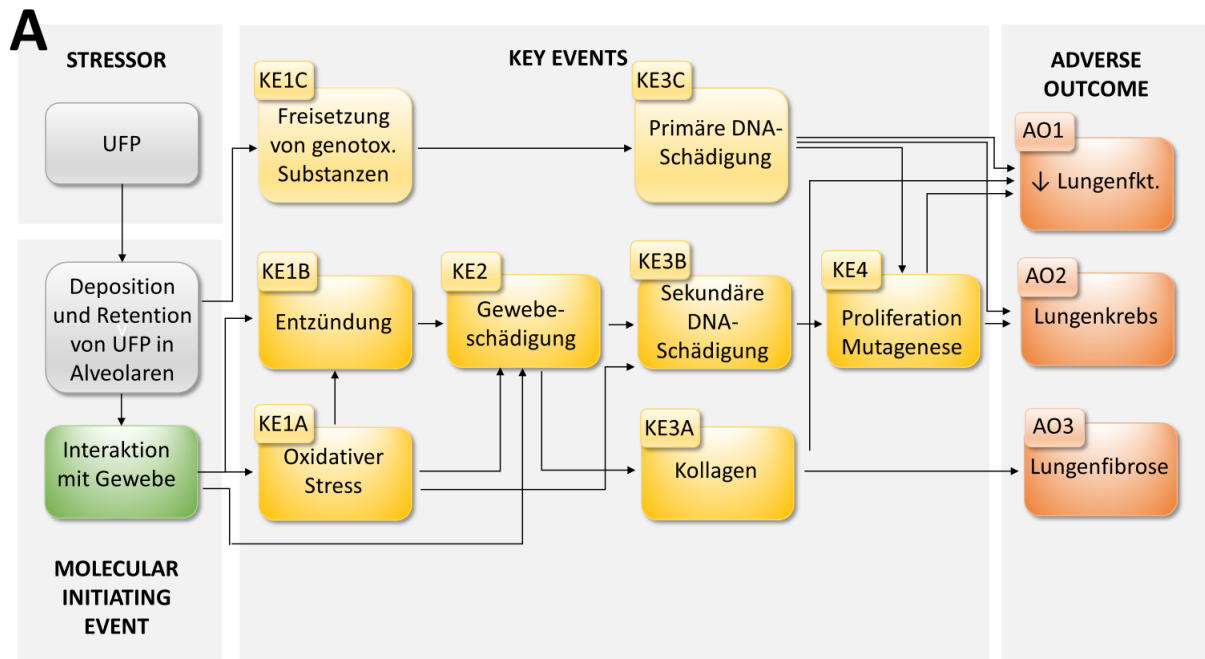


Abb. 1: Die Abbildung A stellt den im Projekt entwickelten AOP dar, der die hypothetische Beziehung zwischen der Deposition und Retention von nanoskaligen Partikeln in der Lunge und spezifischen pulmonalen Effekten beschreibt (modifiziert nach (Braakhuis et al. 2021; Halappanavar et al. 2020; Nymark et al. 2021)). In Abbildung B werden die im Projekt verwendeten Testsysteme zur Überprüfung der Ereignisse dargestellt. KE, Key Event; AO, Adverse Outcome; UFP, ultrafeine Partikel; TEM, Transmissionselektronenmikroskopie; CYP450, Cytochrom P450; DCFH, Diacetyldichlorofluorescein Fpg, Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase. LDH, Laktatdehydrogenase; HPRT, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.

MIE:

Nanopartikel interagieren im Alveolarraum mit den dortigen Zellen (z.B. alveolare Makrophagen, verschiedene Pneumozyten). In Abhängigkeit von Faktoren wie Dosis, Expositionsdauer oder physikalisch-chemischen Eigenschaften können sie Gewebe schädigen (KE2). Die Gewebeschädigung setzt Mediatoren frei wie u.a. Interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Diese Mediatoren werden als *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet. Allen DAMPs ist gemeinsam, dass sie eine durch den Nuklearfaktor- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) vermittelte verstärkte Expression von Schlüsselproteinen des Inflammasoms, einschließlich pro-IL-1 β und NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3), auslösen, was wiederum den Übergang zu den Schlüsselereignissen oxidativer Stress (KE1A) zusammen mit akuter Entzündung (KE1B) markiert (Rabolli et al. 2016).

Um das MIE und die nachfolgenden KEs besser verstehen zu können, wurden die im Projekt generierten UFPs physikalisch-chemisch charakterisiert. Die Abscheidungsrate wurde mit einem Modell nach Lucci abgeschätzt (Lucci et al. 2018).

Eine qualitative Bestimmung und Lokalisation der UFPs sollte mittels Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM) erfolgen.

KE1C, KE3C (Freisetzung genotoxischer Substanzen):

Viele UFPs in der Umwelt enthalten polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) und nitro-PAHs. Diese Schadstoffe können aus den UFPs freigesetzt werden und bereits in geringen Konzentrationen die Zellen in der Lunge schädigen (KE1C). PAHs sind genotoxisch, das heißt, sie können die DNA schädigen (KE3C). Sie können auch oxidativen Stress auslösen, der die Zellen zusätzlich schädigt. PAHs interagieren außerdem mit Rezeptoren in den Zellen und beeinflussen so verschiedene zelluläre Prozesse.

Die Freisetzung von PAHs (KE1C) wurde indirekt durch die Messung der Cytochrom-P450 (CYP450)-Aktivität überprüft. CYP450 ist ein Enzym, das durch PAHs aktiviert wird. Daher kann eine erhöhte CYP450-Aktivität auf eine Freisetzung von PAHs hindeuten.

KE1A, KE1B (oxidativer Stress, [chronische] Entzündung):

Die Aktivierung des Inflammasoms spielt eine zentrale Rolle in der pulmonalen Entzündungsreaktion. Die freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren verstärken die Entzündung und tragen zur Rekrutierung von Immunzellen bei. Zusätzlich können nanoskalige

Partikel direkt oxidativen Stress auslösen. Dies geschieht durch verschiedene Mechanismen, wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch NADPH-Oxidasen oder die Depletion von antioxidativen Schutzsystemen wie Glutathion. Die verschiedenen Ursachen für oxidativen Stress sind miteinander verbunden und verstärken sich gegenseitig. So kann die Entzündung zur Produktion von ROS führen, während ROS wiederum die Entzündungsreaktion verstärken kann. Dieser Teufelskreis kann zu einer chronischen Entzündung und zu Lungenschäden führen (Leso et al. 2018) (Rabolli et al. 2016).

Oxidativer Stress wurde im Projekt mit verschiedenen Assays untersucht: ROS-Gehalt (DCFH-Assay), Glutathion-Redox-Verhältnis und Lipidperoxidation.

Die Entzündung wurde durch die Bestimmung von Inflammationsmarkern (IL-6, IL-8) und mit dem Olink Inflammation Panel untersucht.

KE2 ([chronische] Gewebeschädigung):

In Abhängigkeit von der Konzentration, der Expositionsdauer und der Zusammensetzung können nanoskalige Partikel u.a. durch oxidativen Stress (KE1A) und Entzündung (KE1B) das Gewebe schädigen (KE2). Durch chronische Gewebeschäden werden nachfolgende adverse Effekte begünstigt. Mechanismen der (direkten) Schädigung wurden unter MIE beschrieben.

Um die Zytotoxizität zu beurteilen, wurden verschiedene Assays eingesetzt. Der Alamar-Blue-Assay und der LDH-Assay messen die Stoffwechselaktivität bzw. Zellmembranintegrität. Außerdem wurde die Zahl der lebenden Zellen gemessen.

KE3A (Kollagen):

Infolge von Gewebeschädigung werden reparaturfördernde Moleküle freigesetzt, die die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten stimulieren. Diese Myofibroblasten synthetisieren und lagern extrazelluläre Matrix bzw. Kollagen an, um die Wunde zu heilen (Halappanavar et al. 2020). Unter physiologischen Bedingungen dämpfen immunsuppressive Aktivitäten die Gewebereparatur nach einer Schädigung, um eine überschießende Narbenbildung und Fibrose zu verhindern. Bei anhaltender Exposition kann die Reparatur fortgesetzt aktiviert und die Immunsuppression inaktiviert werden. Dadurch werden proinflammatorische Mediatoren, wie TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) und IL-13 weiter freigesetzt, was zur unkontrollierten Reparatur und der Entwicklung einer Fibrose führen kann (Gieseck et al. 2018).

Obwohl die direkte Untersuchung der Kollagen- bzw. extrazellulären Matrixbildung im Rahmen des Projekts nicht stattfand, liefern die erhobenen Metabolomik-Daten Hinweise auf Regulationsvorgänge in den relevanten Stoffwechselwegen. Darüber hinaus erfolgte die Analyse verschiedener inflammatorischer Marker.

KE3B, KE3C (sekundäre, primäre DNA-Schädigung):

Wie unter KE1C beschrieben, können genotoxische Substanzen freigesetzt werden, die die DNA primär schädigen.

Oxidative freie Radikale können ebenfalls DNA-Schäden verursachen, die, wenn sie nicht korrekt repariert werden, zu sekundären DNA-Schäden führen können, wie z.B. Chromosomenbrüchen oder Mutationen. In Studien mit Umweltpartikel, wie Dieselabgaspartikel, korreliert die ROS-Bildungskapazität mit dem Auftreten von DNA-Strangbrüchen und Mutagenität in vivo und in vitro (Bendtsen et al. 2020; Jacobsen et al. 2008).

Die primäre DNA-Schädigung wurde mit dem Comet-Assay untersucht. Der Comet-Assay ist ein Verfahren, um DNA-Strangbrüche zu messen, die durch verschiedene Einflüsse, wie z. B. PAHs, verursacht werden können.

Die oxidative DNA-Schädigung wurde im Fpg-Comet-Assay überprüft.

KE4 (Proliferation, Mutagenese):

Sowohl nanoskalige Partikel als auch Entzündungszellen können die DNA von Zielzellen, wie Typ-II-Pneumozyten, schädigen und deren Proliferation fördern. Dies geschieht u.a. durch die Produktion bzw. Freisetzung von Oxidantien, Zytokinen oder anderen Mediatoren. Wenn in proliferierenden Zellen genotoxische Ereignisse auftreten und diese fehlerhaft repariert werden, können irreversible genetische Veränderungen (Mutationen) entstehen. Diese Mutationen können zur zellulären Transformation und Lungenkrebs (AO2) führen (Knaapen et al. 2004).

Im Projekt sollten die Fähigkeit der exponierten Zellen, Kolonien zu bilden, mit dem Colony-Efficiency-Assay untersucht werden. Dieser Assay misst die Klonogenität der Zellen, also ihre Fähigkeit, sich zu teilen und neue Kolonien zu bilden. Mutationen können die Klonogenität beeinflussen, indem sie die DNA-Reparaturkapazität oder andere wichtige zelluläre Prozesse beeinträchtigen. Als weiteren Test sollte der HPRT-Mutationstest durchgeführt werden. Kommt es zu Mutationen in der DNA, ist häufig das HPRT-Gen betroffen. Dieses Gen kodiert für ein

Enzym, das für den Stoffwechsel von Purinen, wichtigen Bausteinen der DNA, notwendig ist. Die Assays konnten nicht während der Projektzeit durchgeführt werden.

Metabolomische Analysen ergänzten die Untersuchungen der Schlüsselereignisse im AOP. Das Metabolom umfasst alle Metabolite in einer Probe, also die Produkte und Zwischenprodukte des zellulären Stoffwechsels. Veränderungen im Metabolom spiegeln daher veränderte Stoffwechselprozesse wider. Die Analyse liefert ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen, die den untersuchten Prozessen zugrunde liegen.

AO1, AO3 (verschlechterte Lungenfunktion, Lungenfibrose):

Luftverschmutzung steht im Zusammenhang mit einer verschlechterten Lungenfunktion und Verschlimmerungen bei idiopathischer Lungenfibrose. Die Häufigkeit von Hypersensitivitätspneumonitis und der Nachweis von Lungenfibrose bei gesunden Erwachsenen und Kindern werden ebenfalls mit Luftverschmutzung in Verbindung gebracht. Feinstaub, NO₂ und O₃ gelten als ursächliche Faktoren (Singh and Singh 2021).

AO2 (Lungenkrebs):

Dieselabgase werden beim Menschen dosisabhängig mit einem erhöhten Risiko für Lungenkrebs in Verbindung gebracht. Dieselabgase, TiO₂ und Ruß (Carbon Black) induzieren im Tiermodell dosisabhängig Lungenkrebs (Nymark et al. 2021).

Die direkte Prüfung der AO1-3 war mit den verwendeten Modellen nicht möglich, da diese Tierversuche und/oder epidemiologische Untersuchungen benötigt. Die im Projekt durchgeführten metabolomischen Untersuchungen ermöglichen jedoch eine indirekte Beurteilung. Durch den Vergleich der Metabolitenprofile der exponierten Zellen mit Profilen von erkrankten Tieren und Patientenpopulationen lassen sich Hinweise auf mögliche Gesundheitsbeeinträchtigungen ableiten.

3. Zielstellung

Das Projekt verfolgte das Ziel, die einzelnen Ereignisse des entwickelten AOPs (Abb. 1) zu überprüfen, um Hinweise auf zu erwartende Gesundheitsbeeinträchtigungen durch UFP-Exposition zu erhalten. Dafür wurden die in der Einführung beschriebenen Testsysteme eingesetzt. In Mono-/Dreifachkulturen und einem komplexen Studiendesign wurden die Auswirkungen von UFPs auf verschiedene Zelltypen untersucht. Ziel war es, Bedingungen zu schaffen, die der Exposition des Menschen in der Umwelt so nahe wie möglich kommen, soweit dies ein in vitro-System zulässt. Dazu wurden verschiedene Faktoren berücksichtigt, die im Weiteren beschrieben werden.

Partikelgenerierung:

Die UFPs sollten so generiert werden, dass sie in Größe und Zusammensetzung den realen Umweltbedingungen weitgehend entsprechen.

Exposition im Air-Liquid-Interface (ALI)-System:

Die Bedingung in dem in vitro-System sollten den realen Bedingungen so ähnlich wie möglich sein. Darum wurden die Zellmodelle in einem ALI-System exponiert (Abb. 2). Dieses System simuliert die Atemwege des Menschen und ermöglicht es, die Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche zu exponieren. Dies führt zu einer höheren Relevanz der Ergebnisse aus ALI-Experimenten für die in vivo-Situation.

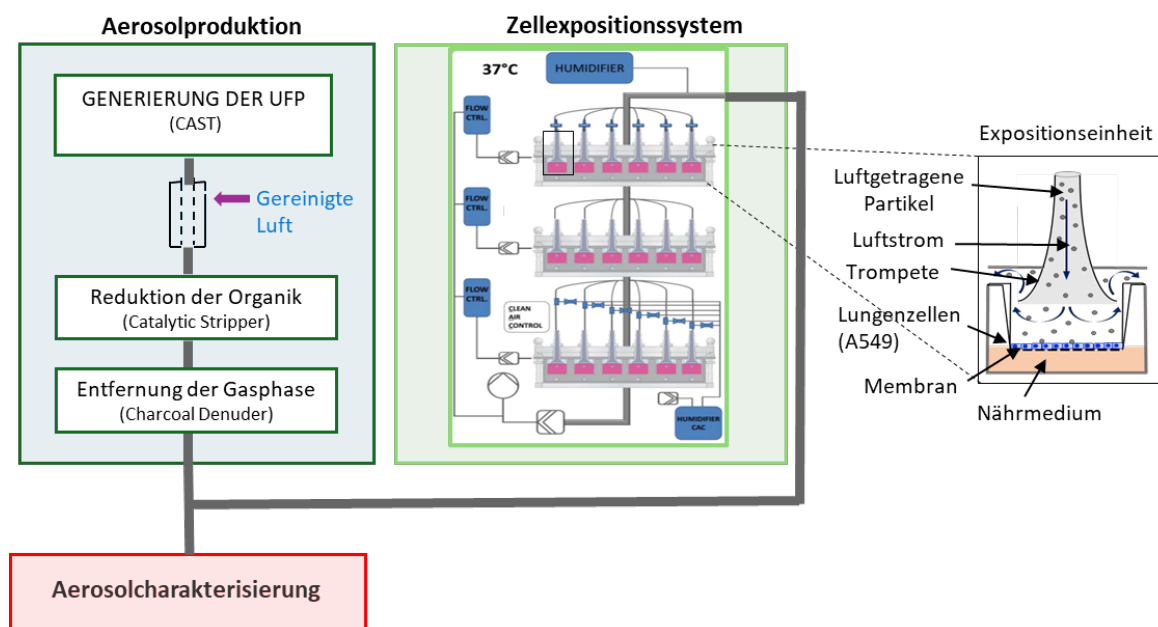


Abb. 2: Schema der Versuchsanlage mit Aerosolproduktion/-charakterisierung und dem ALI-System (Zellexpositionssystem).

Zellmodelle:

Um die Bedingungen im Alveolarraum optimal zu simulieren, sollten die verwendeten Zellmodelle diese Bedingungen bestmöglich widerspiegeln. Hierfür wurden Zellmodelle eingesetzt, die die verschiedenen Zelltypen der Lunge repräsentieren. *A549-Zellen* sind eine menschliche Lungenepithellinie. Sie exprimieren verschiedene Marker für Pneumozyten Typ II. Pneumozyten Typ II sind spezialisierte Epithelzellen, die in den Alveolen der Lunge zu finden sind.

THP-1-Zellen sind eine humanisierte Monozyten-Zelllinie. Stimulierte THP-1-Zellen setzen verschiedene Zytokine und Chemokine frei, die an der Entzündungsreaktion der Lunge beteiligt sind. Außerdem können sie in Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren, die wichtige Rollen im Immunsystem der Lunge spielen

MRC5-Zellen sind eine epitheloide Zelllinie, d.h. sie haben Eigenschaften sowohl von Epithelzellen als auch von Fibroblasten. Sie teilen viele Eigenschaften von Lungenfibroblasten und werden verwendet, um die Zell-Zell-Interaktionen und molekularen Mechanismen zu untersuchen, die zu Lungenerkrankungen einschließlich der Lungenfibrose führen können.

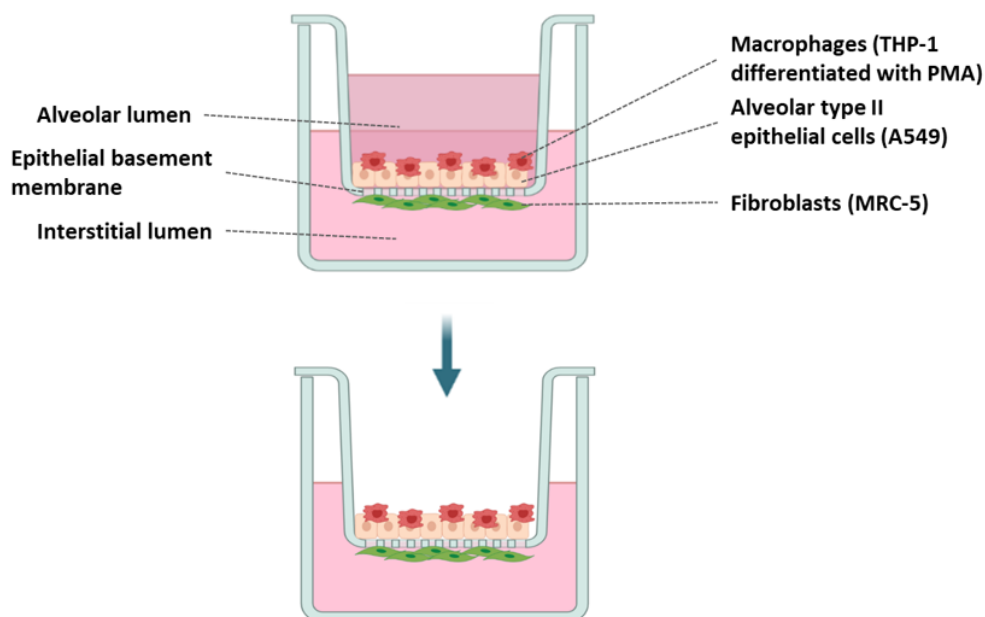


Abb. 3: Dreifachkultur; im apikalen Kompartiment wurden alveolare Zellen (A549) und Makrophagen (THP-1), im basalen Kompartiment Fibroblasten (MRC5) kultiviert. Nachdem die Zellen im apikalen Kompartiment angewachsen waren, wurde das Medium entfernt, damit die Zellen Lunge-ähnliche Strukturen ausbilden konnten (nach Altorki et al. doi: 10.1038/s41568-018-0081-9).

Die Untersuchungen wurden in der ersten Kampagne an einer Monokultur mit A549-Zellen durchgeführt. An diesem einfachen und reproduzierbaren System wurden erste Untersuchungen zu den toxikologischen Wirkungen und deren molekularen Mechanismen durchgeführt. In der zweiten Kampagne wurden die beschriebenen Zelltypen in einer

Dreifachkultur gezüchtet (Abb. 3). Die apikale Position von A549 und THP-1 Zellen simuliert die Epithelschicht der Alveolen, während die basale Position von MRC5 Zellen die darunter liegende Fibroblastenschicht simuliert. Dieses komplexere Modell ermöglicht die Untersuchung der Interaktionen zwischen Epithelzellen, Monozyten und Fibroblasten, die für die Lungenfunktion und -pathologie wichtig sind. Bei allen Untersuchungen wurden mindestens 3 biologische Replikate verwendet.

Studiendesign:

Das Studiendesign sollte die Untersuchung der möglichen Toxizität von UFPs und den Einfluss der organischen Beladung mit PAHs ermöglichen. Hierbei sollte sowohl die Toxizität selbst als auch die Dosis- und Zeitabhängigkeit der Reaktion sowie die Toxikokinetik untersucht werden (Abb. 4).

| Messkampagne | 2021 | | 2022 | | | |
|---------------------------------|-------------------|--|---------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Modell für ALI | Monokultur (A549) | | Dreifachkultur (A549+THP1/MRC5) | | | |
| Probentypen f. Toxizitätspunkte | cells | | A549+THP1 (apikal) | | MRC5 (basal) | |
| Zeitpkt. | 4 h | | 4 h | 24 h | 4 h | 24 h |
| UFPs | Low/high SVOC | | Low/high SVOC | Low/high SVOC | Low/high SVOC | Low/high SVOC |
| | | | Low/high SVOC dil. | Low/high SVOC dil. | Low/high SVOC | Low/high SVOC dil. |
| Probentyp f. Metabolomics | Medium | | Medium | | Cell lysates apical | Cell lysates basal |
| Zeitpkt. | 4 h | | 4 h | 24 h | 24 h | 24 h |
| UFPs | Low/high SVOC | | Low/high SVOC | Low/high SVOC | Low/high SVOC | Low/high SVOC |
| | | | Low/high SVOC dil. | Low/high SVOC dil. | Low/high SVOC dil. | Low/high SVOC dil. |

Abb. 4: Studiendesign der ersten und zweiten Messkampagne. SVOC, semi-volatile organische Komponenten

Dafür wurden folgende Aspekte beachtet:

UFPs mit unterschiedlichem organischem Gehalt (low/high SVOC): Die an UFP gebundenen PAHs können, wie im AOP beschrieben, sich von den UFPs lösen und direkt mit der DNA interagieren. Darum wurden im Projekt UFPs mit einem niedrigen (low) und einem hohen (high) Anteil an semi-volatilen organischen Komponenten (low SVOC, high SVOC) eingesetzt.

Konzentrationsunterschiede (Dosis-Wirkungs-Beziehung): Die Toxizität steigt in der Regel mit der Dosis. Die low/high SVOCs wurden deswegen unverdünnt und 1:10 verdünnt (SVOC dil.) in das ALI System eingebracht.

Expositionsdauer: Ziel der Untersuchung war die Erfassung der akuten und verzögerten Toxizität von UFPs. In der 1. und 2. Messkampagne wurden die Auswirkungen nach einer 4-stündigen Exposition untersucht. In der 2. Messkampagne wurden für einige Parameter zusätzliche Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach der 4-stündigen Exposition im ALI-System für 24 Stunden im Inkubator belassen, ohne die UFP abzuwaschen. Dadurch sollten akute von verzögerten toxischen oder evtl. reversiblen Effekten abgegrenzt werden, was zu einem besseren Verständnis der Toxikokinetik beiträgt.

Kompartimente: Die Untersuchungen wurden in verschiedenen Kompartimenten (Medium, apikale und basale Zellen) durchgeführt, um ein differenziertes Verständnis über die Toxizität der eingesetzten UFPs zu erhalten. Die metabolomischen Untersuchungen des Mediums ermöglichten beispielsweise Aussagen zur Zell-Zell-Kommunikation. Die apikalen Zellen waren die erste Kontaktstelle und daher besonders anfällig für toxische Effekte. Die basalen Zellen wurden indirekt exponiert, konnten aber dennoch durch parakrine Signalwege betroffen sein.

Im Rahmen des Projekts sollten mögliche Gesundheitseffekte durch UFPs in einem Lungenmodell untersucht werden. Dazu wurde ein AOP entwickelt, der die hypothetischen Zusammenhänge zwischen der Inhalation von UFPs und nachteiligen Gesundheitseffekten beschreibt. Die einzelnen Schritte des AOPs sollten in einer in vitro-Studie mit unterschiedlichen Expositionszeiträumen und Dosierungen in verschiedenen Kompartimenten untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss von PAHs auf die Toxizität der UFPs untersucht werden. Der Ansatz sollte die Komplexität der UFPs berücksichtigen und eine Risikowahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines nachteiligen Gesundheitseffekts beschreiben.

4. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse der Ereignisse des AOPs beschrieben. Die A549- und THP-1-Zellen werden als apikale Zellen, die Fibroblasten als basale Zellen beschrieben. Bei der Beschreibung der Ergebnisse zu den Key Events werden zuerst die Ergebnisse der 1. Messkampagne (Monokultur) und dann die Ergebnisse der 2. Messkampagne (Dreifachkultur) dargestellt.

4.1. Generierung und Charakterisierung der UFPs (MIE)

Für das Projekt wurden UFPs als Modellverbrennungspartikel mittels eines miniCAST (Combustion Aerosol Standard) Generators produziert. Im miniCast wird eine sauerstoffarme Propanflamme mittels Stickstoff gequenchet. Dadurch entsteht ein Aerosol mit hohen Konzentrationen an Carbon Black (BC) und organischen Komponenten.

Für die toxikologischen Untersuchungen wurden zwei UFP-Aerosole mit unterschiedlicher organischer Beladung aber identischen physikalischen Eigenschaften der Partikel erzeugt. Zur Erzeugung des Aerosols mit einer hohen Beladung der UFPs mit organischen Komponenten (high SVOC) wurde nur die organische Gasphase in einem Aktivkohle-Denuder entfernt. Dieser Schritt war notwendig, da die Expositionen nur mit der Partikelphase des Aerosols durchgeführt werden sollte. Für die Erzeugung der UFPs mit geringer organischer Beladung wurde der Aerosolstrom aus dem miniCAST durch einen katalytischen Stripper geleitet. In diesem wurden partikelgebundene mittelflüchtige organische Verbindungen (SVOC) bei 350 °C thermisch extrahiert und an einem Katalysator zersetzt. Etwaige verbliebene organische Komponenten in der Gasphase wurden in einem nachgeschalteten Aktivkohle-Denuder entfernt. Abb. 5 zeigt ein vereinfachtes Schema der UFP-Produktion.

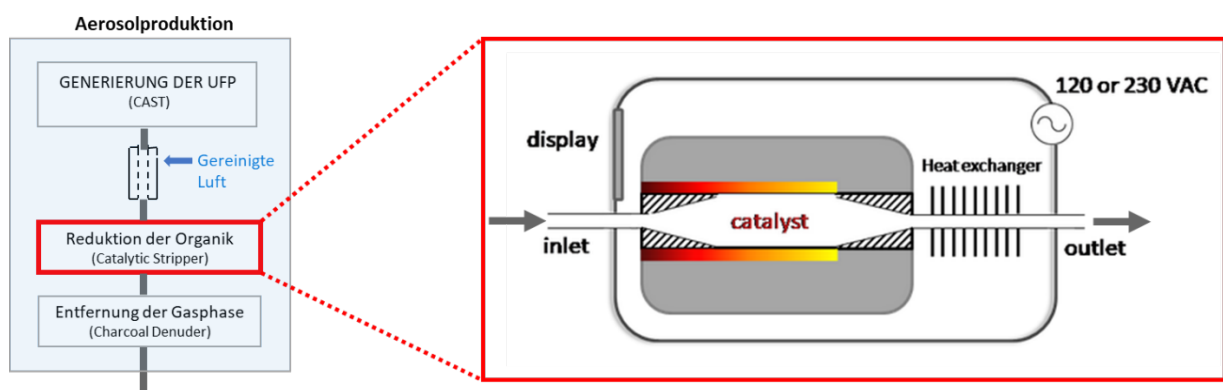


Abb. 5: Schematische Darstellung der Produktion der UFP-Aerosole mit unterschiedlichem organischem Gehalt.

Die UFP-Aerosole wurden online charakterisiert und direkt in das ALI-System eingebracht (Abb. 6). Die Konstanz der physikalischen Aerosolparameter (Partikeldurchmesser, -anzahl und -masse, Carbon Black) wurden mit online Messgeräten überwacht (Abb. 6).

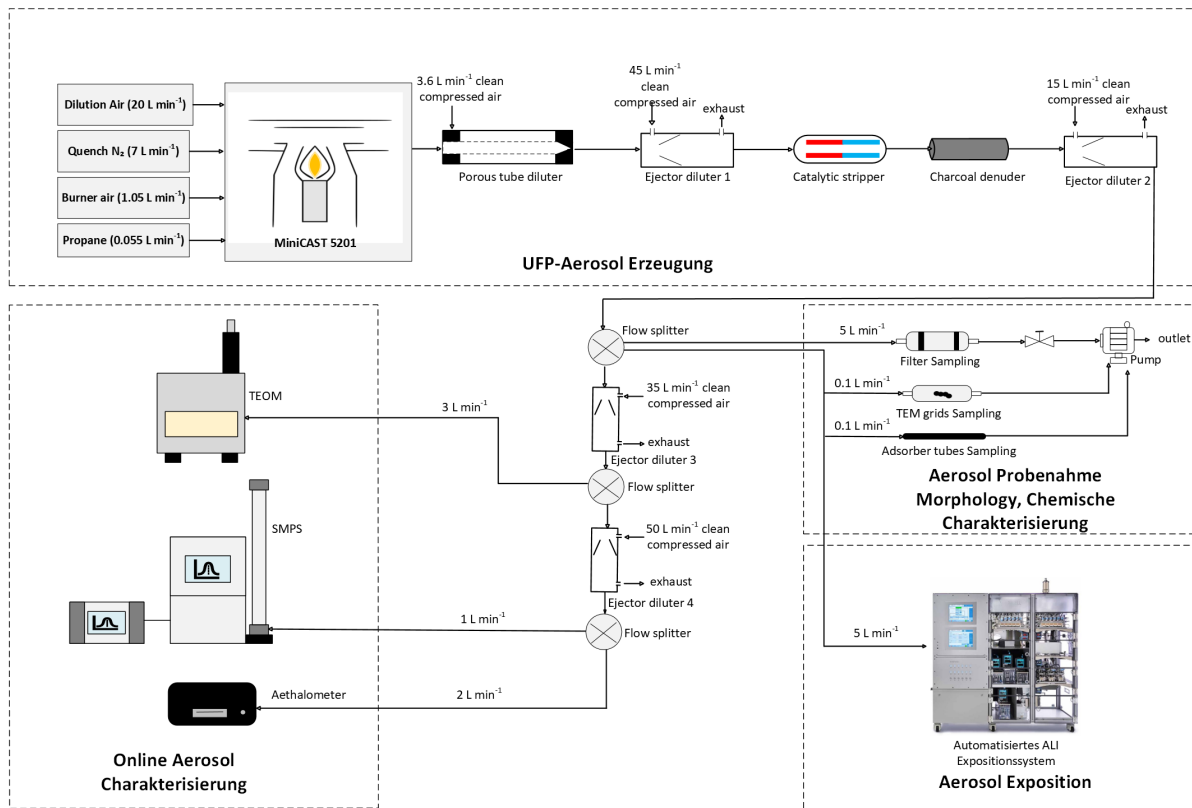


Abb. 6: Produktion und Charakterisierung der UFP-Aerosole mit unterschiedlichen organischen Gehalten. TEOM: Kontinuierliche Erfassung der Partikelmasse mit tapered element oscillating microbalance, SMPS: kontinuierliche Erfassung der Partikelgrößenverteilung mit scanning mobility particle sizer, AE33: kontinuierliche Erfassung von Carbon Black

Die Vergleichbarkeit dieser Parameter zwischen den beiden UFP-Aerosolen ist entscheidend, um die Bedeutung der organischen Beladung für die Wirkung von UFPs zu untersuchen (Tab. 1). Für die detaillierte Untersuchung der organischen Komponenten der Partikel und die Untersuchung der Partikelmorphologie mittels Elektronenmikroskopie wurden Proben genommen. Die Summe der Konzentrationen der mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie quantifizierten PAHs lag im high SVOC-Aerosol bei $2,7 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Im low SVOC-Aerosol lagen die PAH-Konzentrationen unterhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze ($\leq 1 \text{ ng}/\text{m}^3$).

Tab. 1: UFP-Aerosol Parameter (2. Messkampagne)

| Parameter | Low SVOC (n=4) | High SVOC (n=7) |
|--------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| Mittlerer Mobilitätswachstumskoeffizient [nm] | 40 ± 0,2 | 43 ± 1 |
| Anzahl [#/cm ³] | 4e05 ± 1e04 | 6e05 ± 4e04 |
| Massenkonzentration [µg/m ³] | 102 ± 1 | 128 ± 7 |
| Konzentration an schwarzem Kohlenstoff [µg/m ³] | 67 ± 3 | 60 ± 6 |
| Deponierte UFP Masse im ALI [ng/cm ²] | 1,4 ± 0,2 | 1.5 ± 0,2 |
| Summe PAH [µg/m ³] | 2,7 ± 0,4 | < 0,01 |

Abb. 7 zeigt die Beladung der UFPs mit PAHs. High SVOCs enthalten u.a. kanzerogene Substanzen wie Benzo[a]pyren.

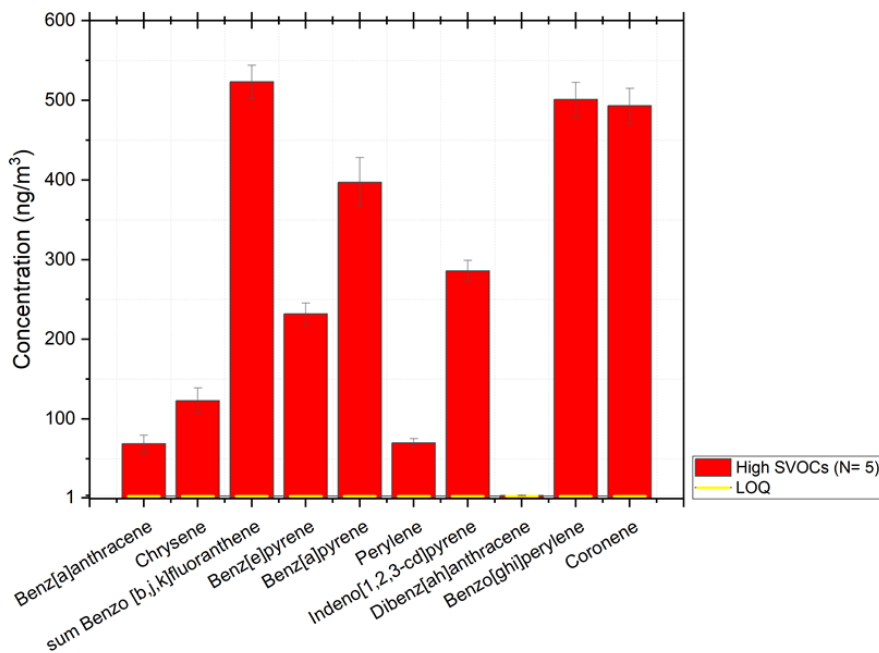


Abb. 7: Konzentrationen der PAHs in den UFPs. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Konzentrationen in den wiederholten Expositionen an. LOQ: Bestimmungsgrenze.

4.1. Freisetzung von genotoxischen Substanzen (KE1C)

Monokultur:

Im EROD-Assay wird die CYP1A-Aktivität und im BROD-Assay die CYP2B-Aktivität gemessen. Beide Enzymfamilien werden durch PAHs aktiviert. Die Exposition gegenüber organischen UFPs mit einem hohen organischen Gehalt induzierte einen signifikanten Anstieg der CYP1A-Aktivität und einen leichten Anstieg der CYP2B-Aktivität. UFPs mit einem niedrigen organischen Gehalt haben die Aktivitäten nicht erhöht (Abb. 8). Als Kontrolle diente bei allen Versuchen die Exposition gegen Reinfluft.

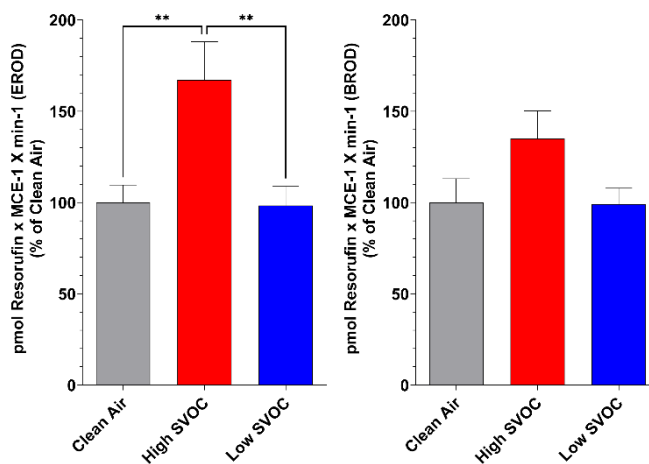


Abb. 8: Auswirkungen auf den Fremdstoffmetabolismus durch UFPs in A549-Zellen. EROD und BROD repräsentieren die Enzymaktivitäten von CYP 450-Monooxygenasen.

Dreifachkultur:

4-stündige Exposition:

Die 4-stündige Exposition führt nur nach Exposition gegen low SVOC-Aerosolen zu einem nicht-signifikanten, doch tendenziellen Anstieg der EROD-Aktivität (Abb. 9) in den apikalen (volles Muster) und basalen Zellen (gestricheltes Muster). Ein gleicher Trend wurde für die BROD-Aktivität beobachtet.

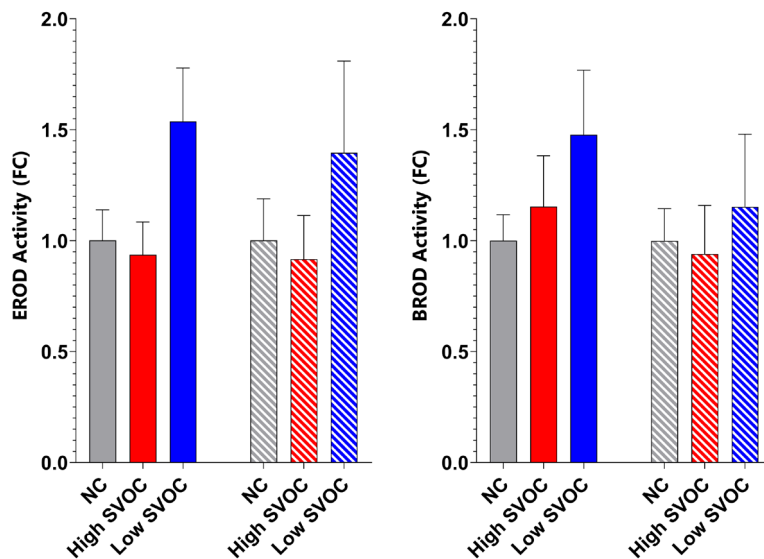


Abb. 9: Änderung der EROD/BROD-Enzymaktivität durch UFPs in apikalen Zellen (volles Muster) und basalen Zellen (gestricheltes Muster), die 4 Stunden lang gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) exponiert wurden.

4-stündige Exposition + 24-stündige Inkubation:

24 Stunden nach der Exposition zeigten nur die UFPs mit niedrigem SVOC-Gehalt eine dosisabhängige Induktion der Enzyme, speziell in den basalen Zellen (Abb. 10).

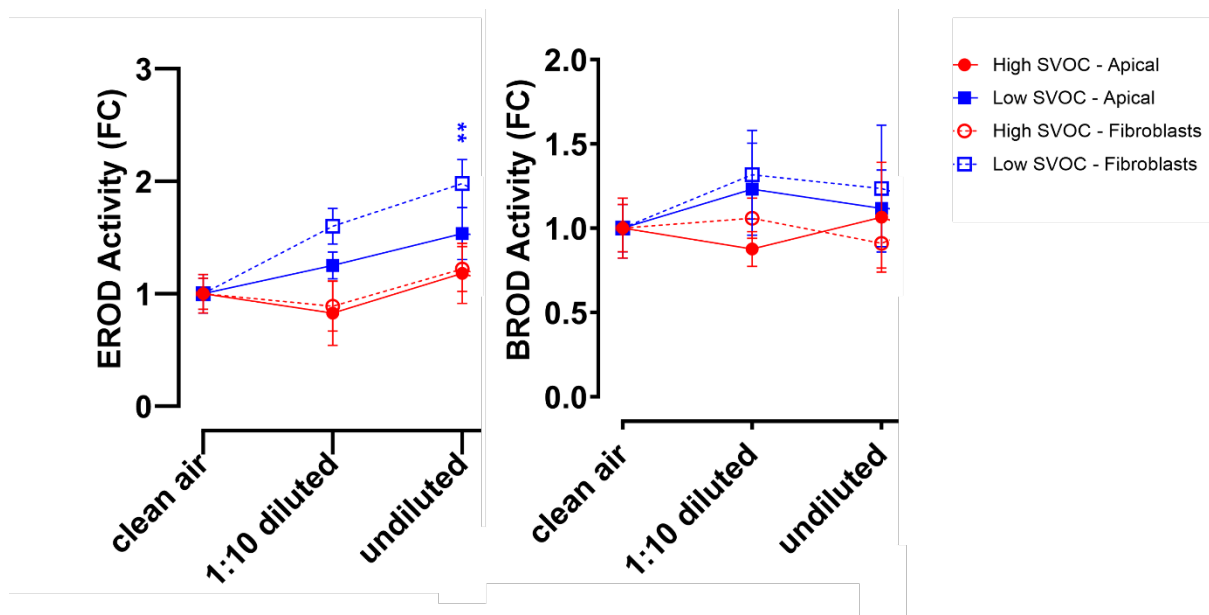


Abb. 10: Änderung der EROD/BROD-Enzymaktivität in der Dreifachkultur 24 Stunden nach Exposition gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC)

Monokultur:

Nur Aktivitätssteigerung nach UFPs mit **hohem** SVOC-Gehalt

Dreifachkultur:

Nach akuter und verlängerter Exposition dosisabhängiger Anstieg nur nach UFPs mit **niedrigem** SVOC-Gehalt.

4.2. Oxidativer Stress (KE1A)

Monokultur:

Oxidativer Stress wurde durch Messung des zellulären oxidierten Glutathions, der MDA-Freisetzung als Marker der Lipidperoxidation und der intrazellulären ROS mit dem DCFH-Assay bewertet. Die Ergebnisse deuten bei low SVOC-Aerosolen auf einen ausgeprägten oxidativen Stress hin. High SVOC-Aerosole lassen keinen signifikanten oxidativen Stress erkennen (Abb. 11).

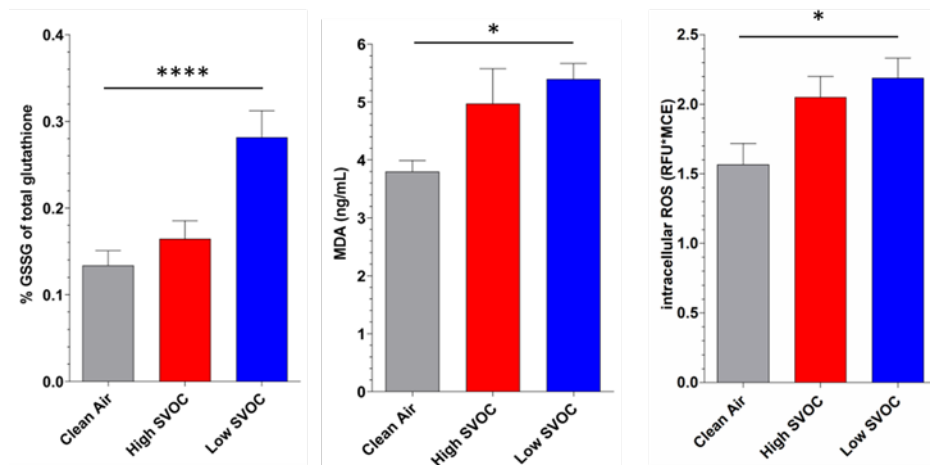


Abb. 11: Oxidativer Stress wurde durch Messung des zellulären Verhältnisses von oxidiertem Glutathion (GSSG) zum gesamten Glutathion, der MDA-Freisetzung und der intrazellulären ROS (DCFH-Assay) Exposition gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) bewertet.

Dreifachkultur:

4-stündige Exposition:

UFPs mit niedrigem organischem Anteil induzierten eine stärkere ROS-Produktion in apikalen und basalen Zellen, was zu einem Verbrauch von Glutathion (erhöhte GSSG-Werte) und oxidativem Stress führte. Dies spiegelte sich auch in der erhöhten, wenn auch nicht signifikant, Lipidperoxidation wider. UFPs mit hohem organischem Anteil zeigten keine derartigen Effekte (Abb. 12). Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen in der Monokultur überein.

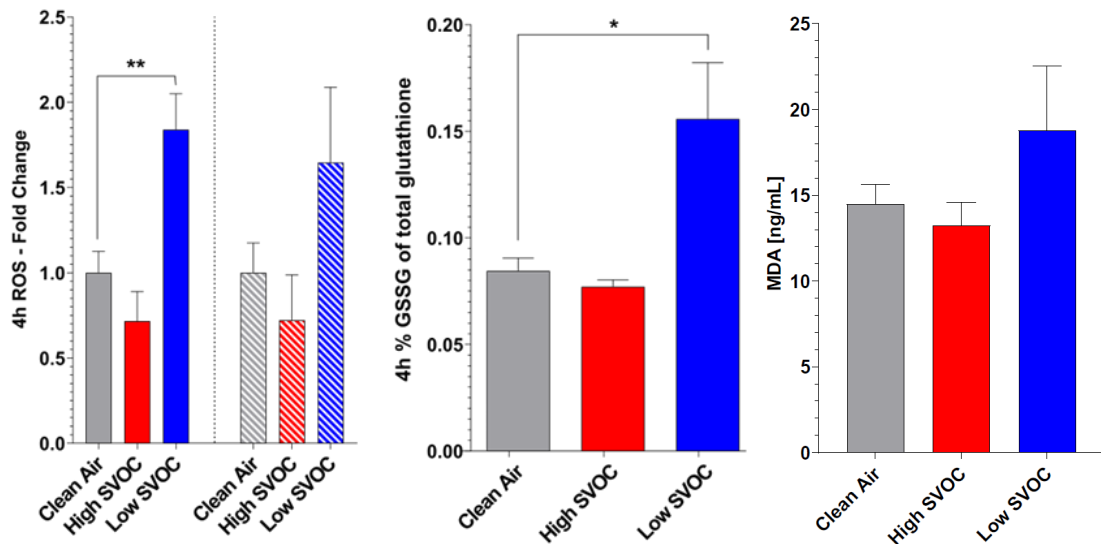


Abb. 12: Oxidative Stressreaktion von apikalen und basalen Zellen, die 4 Stunden lang gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) exponiert wurden. Oxidativer Stress wurde durch Messung der intrazellulären ROS (DCFH-Assay), des zellulären GSSG/GSH-Verhältnisses und der Konzentration an Malondialdehyd (MDA) bewertet.

4-stündige Exposition + 24-stündige Inkubation:

24 Stunden nach der Exposition war der MDA-Gehalt nach Exposition gegen die verdünnten UFP-Aerosole vermindert, gegen die unverdünnten unverändert (Abb. 13)

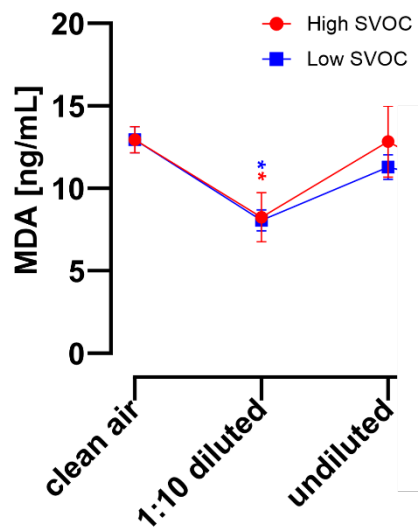


Abb. 13: Gehalt an MDA nach Exposition gegen die verdünnten und unverdünnten UFP-Aerosole mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) und anschließender 24-stündiger Inkubation

Metabolomics:

Das Medium sowie die apikalen und basalen Zellen wurden metabolomisch untersucht. In allen biologischen Proben wurde das Metabolom nach Exposition (4 Stunden plus 24 Stunden Inkubation) gegen unverdünnte/verdünnte UFPs mit low/high SVOC untersucht. Damit ermöglichen die metabolomischen Daten eine Einschätzung der verzögerten toxikologischen Wirkung. Für die bessere Übersicht werden nachfolgend nur die wichtigsten Ergebnisse beschrieben. Abb. 14 zeigt repräsentativ die Signalweganalyse mit MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca), die nach Exposition gegen unverdünnte und verdünnte UFP-Aerosole mit hohem organischem Gehalt (high SVOC) in den apikalen Zellen reguliert wurden.

Eine Hochregulierung der GSH- und Glycin-Signalwege wurde v.a. nach der Exposition gegen high-SVOC-Aerosole in den apikalen Zellen beobachtet. Glycin ist ein Vorläufermetabolit von Glutathion (GSH), welches die wichtigste zelluläre Abwehr gegen oxidativen Stress darstellt.

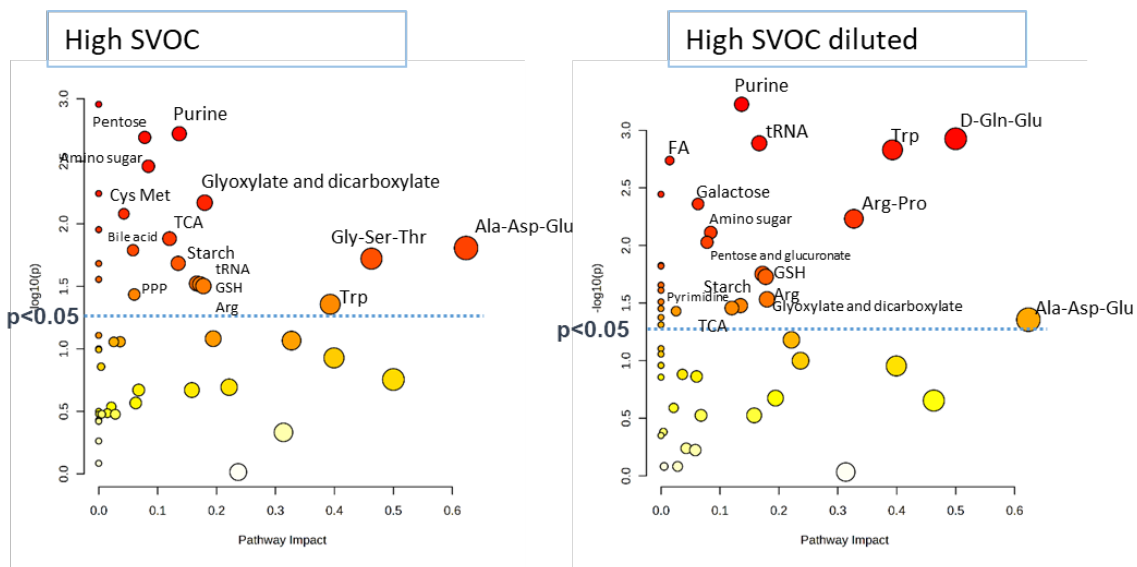


Abb. 14: Signalweganalyse der signifikant regulierten Metabolite in apikalen Zellen. Die Zellen wurden für 4 Stunden gegen UFPs mit hohem organischem Gehalt (SVOC, verdünnt/unverdünnt) exponiert, bevor sie für 24 Stunden nach-inkubiert wurden. Cys Met, Cystein-Methionin-Metabolismus; TCA, Zitronensäure-Zyklus; tRNA, transfer-RNA (Ribonukleinsäure); GSH, Glutathion; Arg; Argenin; PPP, Pentose-Phosphat-Weg; Trp, Tryptophan; Gly-Ser-Thr, Glycin-Serin-Threonin-Signalweg; Ala-Asp-Glu, Alanin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Signalweg; D-Gln-Glu, Glutamin-Glutaminsäure-Signalweg; Arg-Pro, Arginin-Prolin-Signalweg

Monokultur:

- ↑ oxidativer Stress nur nach UFPs mit **niedrigem** SVOC-Gehalt

Dreifachkultur:

- ↑ akuter oxidativer Stress nur nach UFPs mit **niedrigem** SVOC-Gehalt
- Keinen verzögerten Effekt auf Lipidperoxidation nach beiden UFP-Aerosolen
- Metabolomics:
UFPs mit **hohem** SVOC-Gehalt: Hinweis auf verzögerten oxidativen Stress in apikalen Zellen

4.3. Entzündung (KE1B)

Monokultur:

Die Exposition gegenüber low oder high SVOCs führte zu keiner Freisetzung der Entzündungsmarker IL-8 oder IL-6 (Abb. 15).

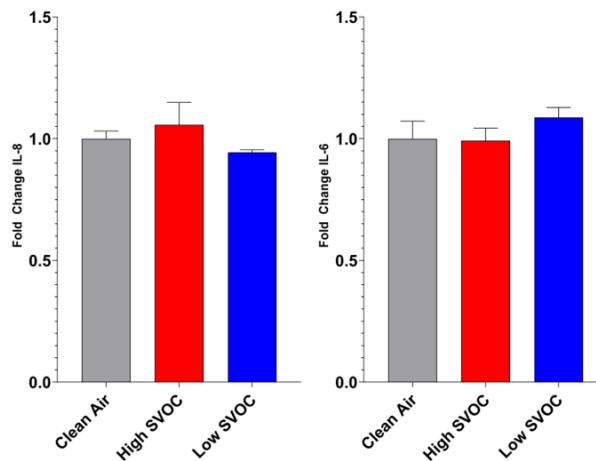


Abb. 15: Entzündliche Wirkungen von UFPs auf A549-Zellen. Die Freisetzung der Zytokine IL-8 und IL-6 in das Medium wurde nach 4-stündiger Exposition bestimmt.

Dreifachkultur:

4-stündige Exposition:

Die 4-stündige Exposition hat keine Effekte auf die proinflammatorischen Marker IL-1 β , IL-6 und IL-8 gegenüber Kontrollbedingungen (Abb. 15).

4-stündige Exposition + 24-stündige Inkubation:

Beide UFPs hatten keinen Effekt auf die IL-1 β -Freisetzung. IL-1 β ist ein zentraler Faktor bei akuten Entzündungen. Low SVOC-Aerosole führten zu einer deutlich geringeren Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 gegenüber Kontrollbedingungen. High SVOC-Aerosole erhöhten die Freisetzung des Chemokins IL-8, das hauptsächlich Neutrophile anlockt und aktiviert (Abb. 16).

Eine umfassende Analyse, auch dosisabhängig, der (pro-)inflammatorischen Zytokinwerte wurde zusätzlich mit Olink Inflammation Panels durchgeführt. Die Ergebnisse geben Hinweise auf deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten, aber auch zwischen den einzelnen Bedingungen.

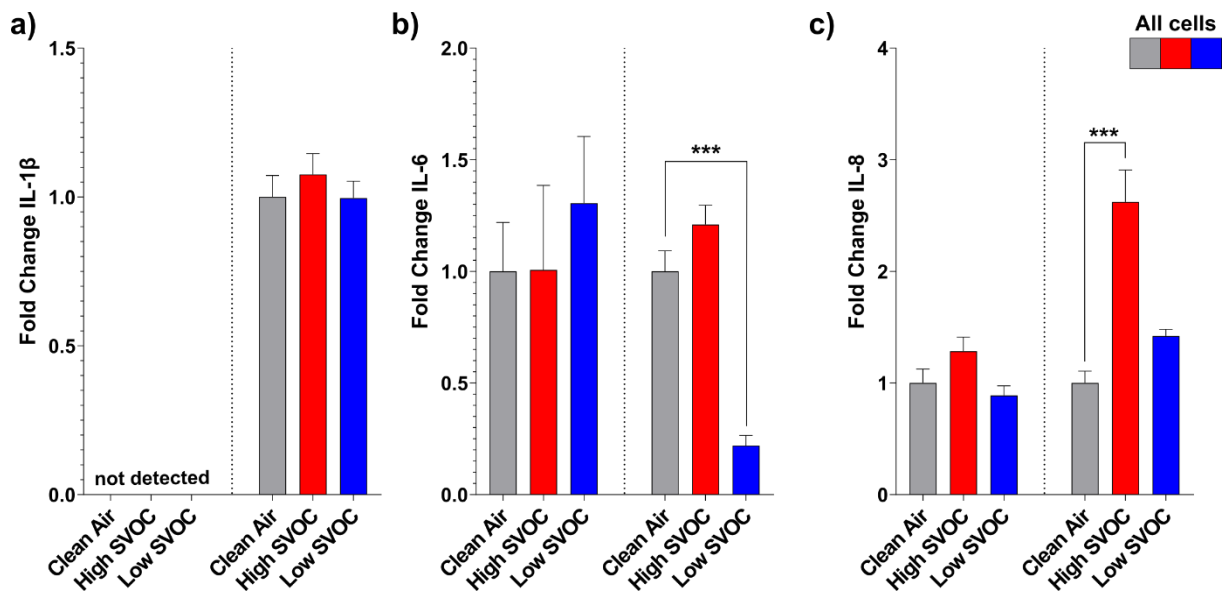


Abb. 16: Entzündungseffekte von UFP auf apikale und basale Zellen, die gegen UFPs mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) exponiert wurden. Die Freisetzung der Zytokine IL-1 β (a), IL-6 (b) und IL-8 (c) durch alle Zelltypen in das Probenmedium wurde nach 4-stündiger Exposition (links) und 24-stündiger Nach-Inkubation (rechts) bestimmt.

Metabolomics:

In basalen Zellen zeigten sich signifikante Veränderungen im Arachidonsäurestoffwechsel, Glycerolipidstoffwechsel und der Fettsäurebiosynthese. Die Netzwerkvisualisierung und -analyse mit STITCH (<http://stitch.embl.de/>) ergab eine Anreicherung der ungesättigten Fettsäurebiosynthese und des Eicosanoid-Biosyntheseprozesses (Abb. 17). Die Anreicherung war nach der Exposition gegenüber allen UFP-Aerosolen zu beobachten, jedoch war sie nach der Exposition gegenüber high SVOC-Aerosolen deutlich ausgeprägter. Eicosanoide sind Lipidmediatoren, die aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidon-, Eicosapentaen- und Dihomogamma-Linolensäure gebildet werden. Sie haben vielfältige Funktionen und können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen entfalten.

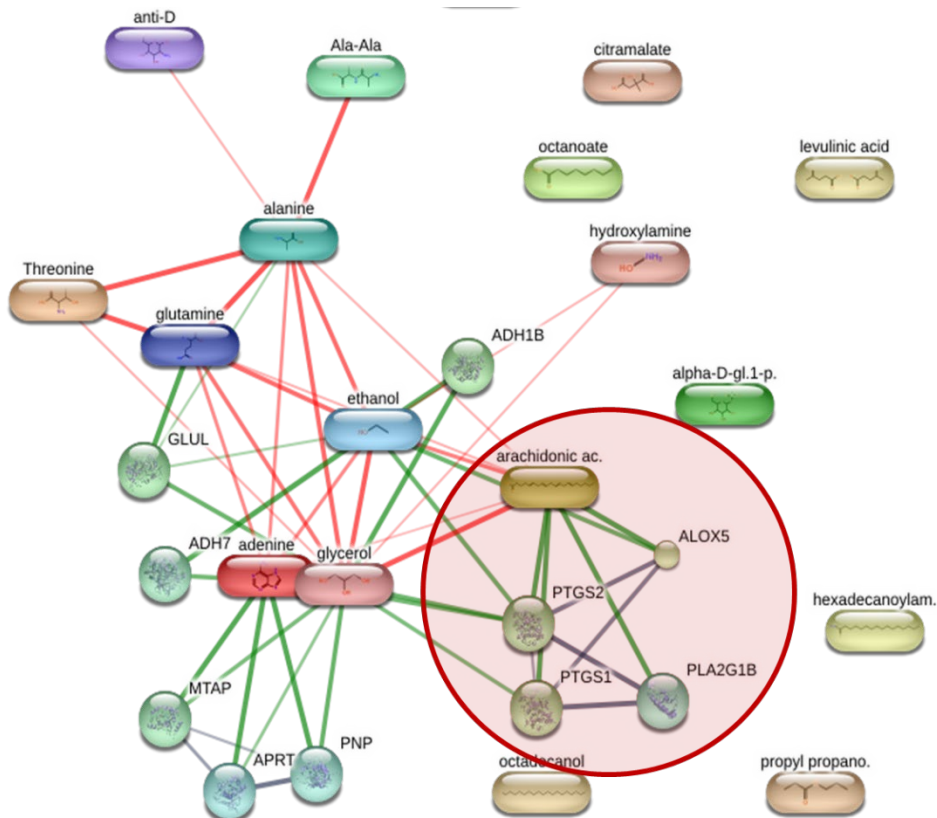


Abb. 17: Darstellung des mit STITCH erstellten Netzwerks der identifizierten, signifikant regulierten Metaboliten nach Exposition (4 h + 24 h Inkubation) gegen UFP-Aerosol mit hohem SVOC. Ovale: identifizierte Metabolite, Kreise: Metabolite, die von STITCH aufgrund von Datenbanken zu dem Netzwerk hinzugefügt wurden. Der markierte Bereich zeigt das Netzwerk um die Arachidonsäure. GLUL, Glutamat; ADH, Alkohol Dehydrogenase; MTAP, S-Methyl-5'-thioadenosine Phosphorylase; APRT, Adenin-Phosphoribosyltransferase; PNP, Purin-Nukleosid-Phosphorylase; PTGS, Prostaglandinsynthase; ALOX5, Arachidonat-5-Lipoxygenase; PLA2G1B, Phospholipase A2 Gruppe 1B

Monokultur:

- **Beide UFP-Arten setzen weder IL-8 noch IL-6 frei.**

Dreifachkultur:

- Keine akute/verzögerte IL-1 β -Freisetzung nach **beiden** UFP-Arten
- Keine akute IL-6/IL-8-Freisetzung nach **beiden** UFP-Arten
- Mögliche verzögerte antiinflammatorische Wirkung (\downarrow IL-6) nach UFPs mit **niedrigem** SVOC-Gehalt
- Mögliche verzögerte inflammatorische Wirkung (\uparrow IL-8) nach UFPs mit **hohem** SVOC-Gehalt
- Metabolomics:
Hinweise auf verzögerte pro-/antiinflammatorische Regulation in basalen Zellen nach allen Expositionen (besonders ausgeprägt nach high-SVOC-Aerosolen).

4.4. Gewebeschädigung (KE2)

Monokultur:

Unabhängig von der organischen Beladung führten beide UFPs zu vermehrten Zellmembranschäden (LDH, Abb. 18) und verminderter Stoffwechselaktivität (Alamar-Blue-Assay) gegenüber Kontrollbedingungen (Abb. 18).

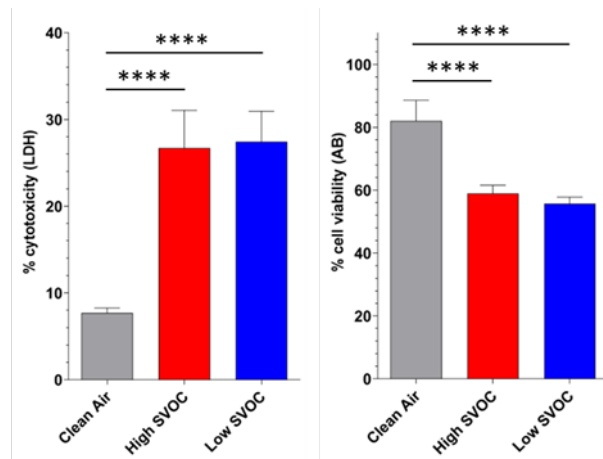


Abb. 18: Zytotoxizität von UFP auf Alveolarepithelzellen. Die Zytotoxizität wurde durch Messung der LDH-Freisetzung und die Stoffwechselaktivität mit dem Alamar-Blue-Assay bewertet. Als Negativkontrolle wurde Reinluft (Clean Air) verwendet.

Dreifachkultur:

4-stündige Exposition:

Low SVOC-Aerosole induzierten Zytotoxizität in allen Zellarten (Abb. 19, a) und verringerten die Anzahl lebender apikaler Zellen (Abb. 19 c). High SVOC-Aerosole induzierten keine akute Zytotoxizität und keine signifikante Beeinträchtigung der Viabilität. Beide Aerosole hatten keine akute Auswirkung auf die Stoffwechselaktivität (Abb. 19).

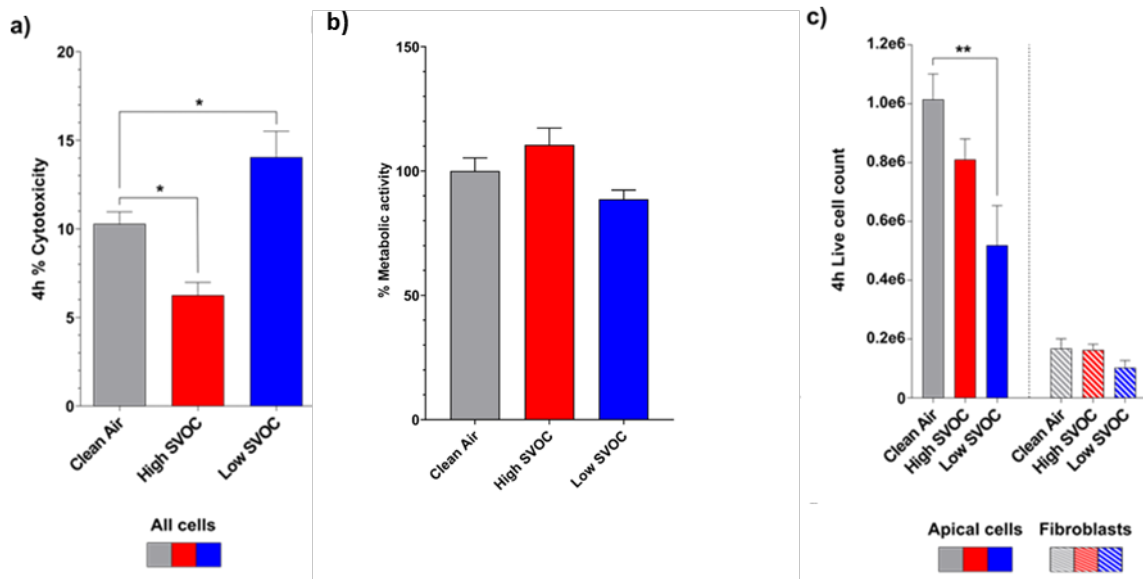


Abb. 19: Auswirkungen von UFPs mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) auf die Zytotoxizität (a, LDH-Freisetzung), die Stoffwechselaktivität (b, Alamar-Blue-Assay) und die Anzahl lebender Zellen (c) nach 4-stündiger Exposition.

4-stündige Exposition + 24-stündige Inkubation:

Beide unverdünnte UFP-Aerosole hatten keinen Einfluss auf die Zytotoxizität und Stoffwechselaktivität nach 24-stündiger Nach-Inkubation (Abb. 20). Beide verdünnten Aerosole erniedrigen die Stoffwechselaktivität (durchgezogene Linie). Verdünntes high SVOC-Aerosol erhöhte die Zytotoxizität (gestrichelte Linie).

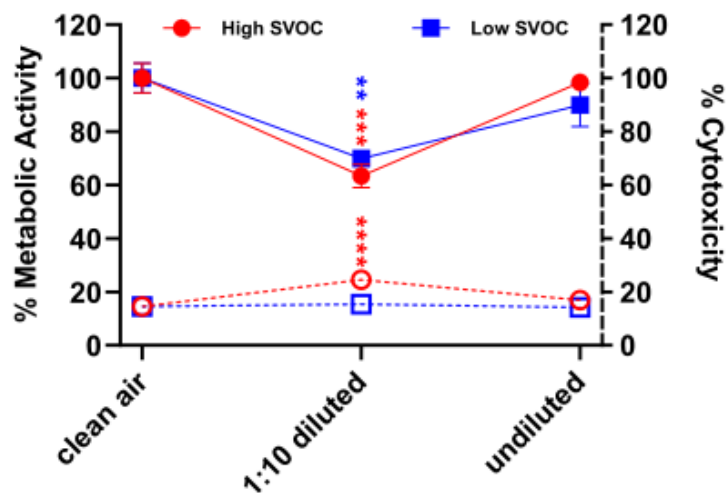


Abb. 20: Effekt der 24-stündigen Nach-Inkubation auf die Zytotoxizität (gestrichelte Linie) und Stoffwechselaktivität (durchgezogene Linie). Die Zellen wurden gegen unverdünnte und verdünnte Aerosole exponiert. Die Zellen hatten eine basale LDH-Freisetzung von 14,5% nach der Nach-Exposition gegenüber den Bedingungen im Inkubator (im Vergleich zu etwa 10% nach 4-stündiger Exposition)

Metabolomics:

Die metabolomischen Daten ermöglichen keine direkten Aussagen zur Zytotoxizität. Die Signalweganalysen weisen in apikalen und basalen Zellen jedoch auf eine Regulation des Zitronensäurezyklus nach allen Expositionen hin (Abb. 14). Der Zyklus ist ein wichtiger Bestandteil des zellulären Energiestoffwechsels. Außerdem war nach den meisten Expositionen Glukose-1-phosphat (G1P) in den apikalen Zellen signifikant erniedrigt. Glukose-1-Phosphat ist ein Substrat für die Glycogenphosphorylase, ein Enzym, das Glycogen in Glucose abbaut. Ein erniedrigtes G1P kann daher zu einer verminderten Energiegewinnung in den Zellen führen. Außerdem ist G1P ein wichtiger Baustein für die Nukleinsäuresynthese. Ein erniedrigtes G1P kann daher auch zu einer verminderten DNA- und RNA-Synthese führen.

Monokultur:

- Zytotoxizität nach **beiden UFP-Arten**

Dreifachkultur:

- **Akute Zytotoxizität:** nur nach UFPs mit niedrigem SVOC-Gehalt
- **Anzahl lebender Zellen (akut):** ↓ nach UFPs mit niedrigem SVOC-Gehalt
- **Verzögerte Zytotoxizität + Stoffwechselaktivität:** kein Effekt beider unverdünnter UFP-Arten; Effekt beider verdünnter UFP-Arten
- Metabolomics: indirekte Hinweise auf verzögerten Effekt auf Stoffwechsel in apikalen/basalen Zellen nach allen Expositionen.

4.5. Kollagen (KE3A)

Dreifachkultur (Metabolomics):

Wie in der Einführung beschrieben, wurde dieses Schlüsselereignis nicht direkt durch ein Testsystem überprüft, sondern indirekt durch metabolomische Analysen.

Signalweganalysen der signifikant regulierten Metaboliten in apikalen und basalen Zellen deuten auf eine Aktivierung des Tryptophan-Stoffwechsels nach Expositionen gegen alle SVOC-Aerosole hin. Abb. 21 veranschaulicht die Regulationen der einzelnen Metaboliten nach Exposition gegen alle UFP-Aerosole in apikalen Zellen.

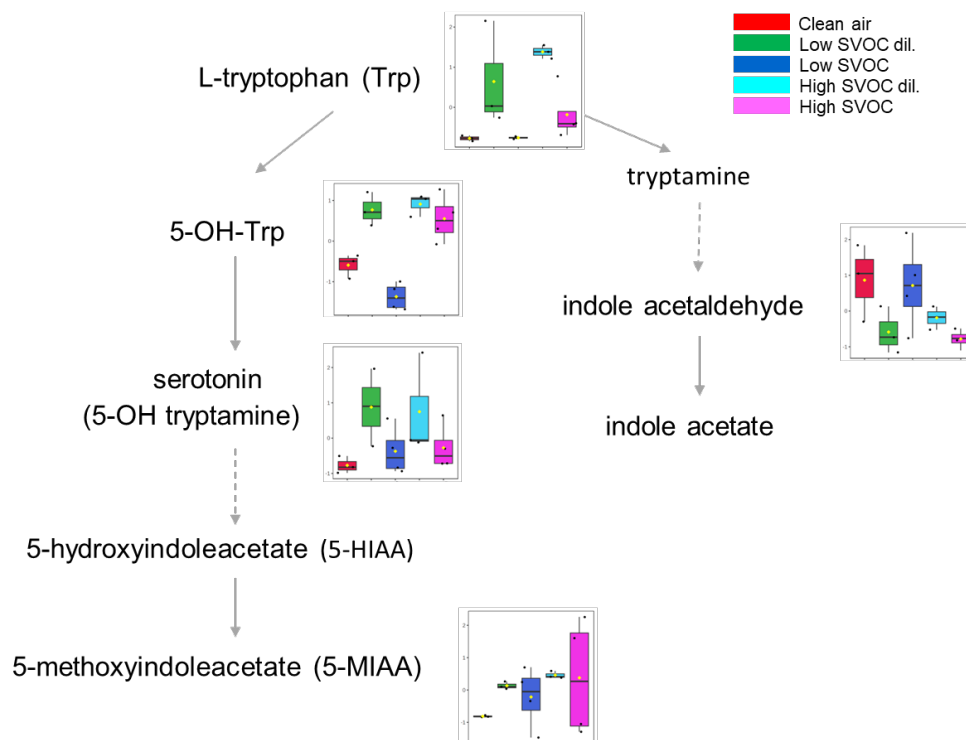


Abb. 21: Darstellung des Tryptophan-Metabolismus mit den Regulationen der Metaboliten nach allen Expositionen in apikalen Zellen.

Im Fokus steht der Metabolit **Serotonin** (5-Hydroxytryptamin), der aus Tryptophan gebildet wird. Serotonin fungiert als biochemischer Botenstoff und kann von Lungenepithel- und Immunzellen sezerniert werden. Klinische Hinweise deuten auf eine Beteiligung von Serotonin an der Entstehung von Fibrose hin. Die pro-fibrotische Wirkung von Serotonin in vivo lässt sich zumindest teilweise durch seine direkte Wirkung auf Fibroblasten (in unserem Modell die basalen Zellen) und/oder Myofibroblasten erklären. Serotonin stimuliert Fibroblasten, vermehrt glattes Muskelaktin (SMA), Fibronectin und TGF- β zu exprimieren und vermehrt Kollagen abzulagern. Diese Effekte können zur Lungenfibrose (AO3) führen.

Der Tryptophan-Metabolismus kann über den Indol-Weg verschiedene Metaboliten, wie z. B. Indol-Acetaldehyd, bilden. Nach der Exposition gegenüber allen SVOC-Aerosolen war dieser Metabolit verringert. Eine Hypothese besagt, dass Tryptophan tendenziell stärker über den 5-HT-Weg auf Kosten des Indol-Wegs katabolisiert wird, was zu einer vermehrten Serotoninproduktion führt.

Dreifachkultur, Metabolomics:

- ↑ Serotonin-Spiegel **nach allen Expositionen** in apikalen/basalen Zellen
- Hinweis auf Induktion der Fibrosebildung nach verzögerter Exposition.

4.6. Primäre und sekundäre DNA-Schädigung (KE3C, KE3B)

Monokultur:

Beide UFP-Arten schädigten nach 4-stündiger Exposition primär die DNA, low SVOC-Aerosole in einem höheren Umfang als high SVOC-Aerosole (Abb. 22, links). Interessanterweise induzierten nur high SVOC-Aerosole DNA-Schäden über oxidative Mechanismen (sekundäre DNA-Schädigung) (Abb. 22, rechts).

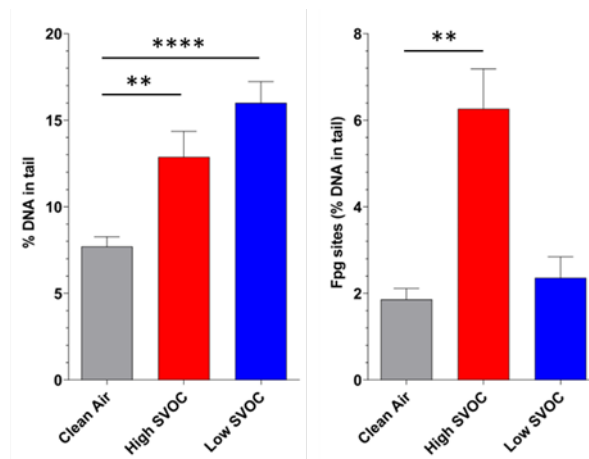


Abb. 22: Die primäre DNA-Schädigung (links) und oxidative, sekundäre DNA-Schädigung (rechts) wurden mit dem Comet-Assay, mit oder ohne Fpg-Enzym, gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) bewertet. Als Negativkontrolle wurde Reinluft (Clean Air) verwendet.

Metabolomics Monokultur:

Im Medium wurden durch die Exposition nur wenige Metabolite signifikant reguliert. Dies könnte auf das verwendete einfache Lungenmodell zurückzuführen sein, in dem die Zell-Zell-Kommunikation fehlte. Guanin, ein Bestandteil der DNA, war in beiden Gruppen nach der Exposition signifikant erhöht. Die Signalweganalyse zeigte eine signifikante Regulation des Purinstoffwechsels, in dem die Hauptbestandteile der DNA, die Purin-Nukleotide synthetisiert und abgebaut werden. Hypoxanthin, Adenin und Guanin sind Vorläufer der Purin-Nukleotiden. Die Spiegel dieser Vorläufermetaboliten waren nach der Exposition gegenüber den UVPs erhöht. Dies könnte auf einen erhöhten DNA-Abbau hindeuten oder darauf, dass die Lungenzellen mehr DNA benötigen, um entweder DNA-Schäden zu reparieren oder um zu proliferieren.

Dreifachkultur:

4-stündige Exposition:

UFPs mit geringer organischer Belastung (low SVOC) schädigten direkt die DNA der basalen Zellen und indirekt die DNA der apikalen Zellen. UFPs mit einem hohen organischen Gehalt (high SVOC) schädigen nur direkt die DNA der apikalen Zellen (Abb. 23).

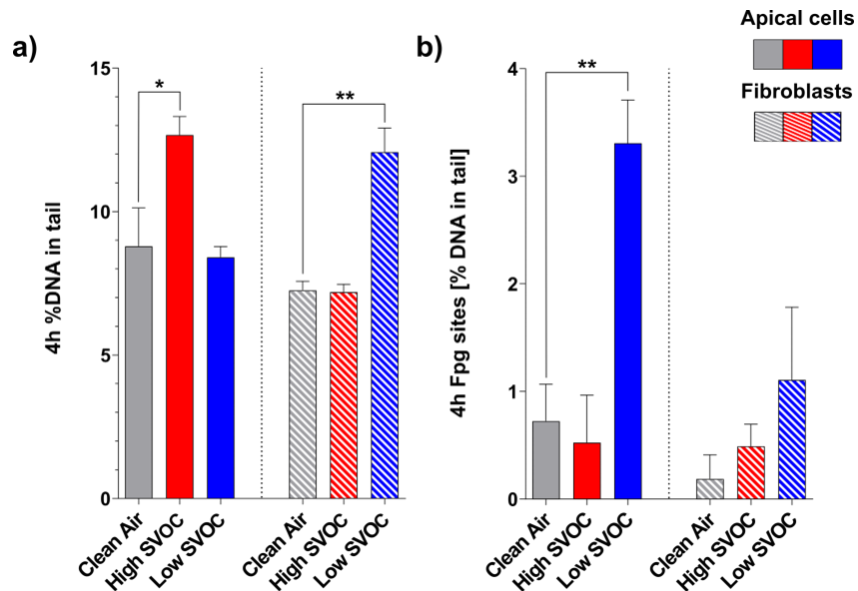


Abb. 23: Primäre (a) und sekundäre DNA-schädigende Wirkungen (b) von UFP auf apikalen und basalen Zellen die 4 Stunden lang gegen UFP mit hohem/niedrigen organischen Gehalt (high/low SVOC) exponiert wurden. DNA-Schäden (a) und oxidative/alkylierende DNA-Schäden (b) wurden mit dem Comet-Assay bewertet, der für die Bestimmung von Fpg-Stellen enzymatisch modifiziert wurde.

Metabolomics:

Die metabolomischen Analysen der apikalen/basalen Zellen und des Mediums ergaben nach 4-stündiger Exposition mit anschließender 24-stündiger Inkubation übereinstimmend mit den Ergebnissen der Monokultur-Exposition eine Anreicherung des Purinstoffwechsels.

Besonders ausgeprägt waren die Regulationen in den apikalen Zellen nach allen Expositionen und in den basalen Zellen nach der Exposition gegenüber dem high SVOC-Aerosol (siehe Abbildung 14 als Beispiel für die Regulationen nach verdünnten/unverdünnten high SVOC-Aerosolen in apikalen Zellen).

Monokultur:

- Primäre DNA-Schäden nach **beiden** UFP-Arten
- Sekundäre DNA-Schäden nur nach UFPs mit **hohem** SVOC-Gehalt
- Metabolomics: Regulation der DNA-Synthese

Dreifachkultur:

- Primäre akute DNA-Schäden in apikalen Zellen nur nach UFPs mit **hohem** SVOC-Gehalt
- Primäre akute DNA-Schäden in basalen Zellen nur nach UFPs mit **niedrigem** SVOC-Gehalt
- Sekundäre akute DNA-Schäden in apikalen Zellen nur nach UFPs mit **niedrigem** SVOC-Gehalt.
- Metabolomics: Verzögerte Regulation des Purinstoffwechsels in allen Zellen; besonders in basalen Zellen nach UFPs mit **hohem** SVOC-Gehalt

4.7 Adverse Outcome (AO1-3)

Die möglichen Gesundheitsbeeinträchtigungen durch die untersuchten UFPs können in den verwendeten Zellmodellen nicht direkt erfasst werden. Ein Ansatz ist der Vergleich der metabolomischen Profile mit Profilen von Patienten oder aus Tierversuchen.

Vier Metabolite wurden in apikalen Zellen nach Expositionen gegenüber allen SVOP-Arten nach 4-stündiger Exposition und 24-stündiger Inkubation signifikant reguliert: Glucosamin, Iminodiessigsäure, Phenylglyoxylsäure wurden hoch- und Pipecolinsäure herunterreguliert.

Glucosamin scheint zumindest teilweise über den NF-κB-Signalwegs entzündungshemmend zu wirken (Chuang et al. 2013). Außerdem wurde beschrieben, dass Glucosamin in vivo den durch chronische Zigarettenrauchexposition verursachten oxidativen Stress und die Lungenentzündung lindern und in vitro die durch Zigarettenrauchextrakt induzierte IL-8-Produktion unterdrücken kann (Wu et al. 2014). Außerdem entsteht aus Glucosamin der Nukleotidzucker Uridindiphosphat N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Erhöhte Spiegel an UDP-GlcNAc wurden im Tumorgewebe von Rauchern nachgewiesen (Wikoff et al. 2015; Yu et al. 2017)

Iminodiessigsäure wird mit Hypoxie assoziiert und wurde als Biomarker für die Schwere eines akuten Atemnotsyndroms bei Erwachsenen identifiziert (Lin et al. 2019).

Phenylglyoxylsäure ist ein direkter Vorläufermetabolit von Benzoesäure. Über die biologische Funktion von Phenylglyoxylsäure ist wenig bekannt. Erhöhte Benzoesäure-Spiegel wurden in Lungenkrebs-Patienten gemessen (Musharraf et al. 2015; Yu et al. 2017).

Erhöhte *Pipecolinsäure* Spiegel wurden in Patienten mit Plattenepithelkarzinome der Speiseröhre gemessen. Diese Zellen benötigen Pipecolinsäure um das Redox-Gleichgewicht aufrechtzuerhalten und den durch oxidativen Stress verursachten DNA-Schaden und den Stillstand der Zellteilung zu verhindern (Liu et al. 2022). In unserem Projekt waren die Spiegel nach der 24-stündigen Inkubation signifikant verringert. Dies kann auf eine Erschöpfung dieses Systems durch (vorausgegangenen) oxidativen Stress hinweisen.

Weitere Hinweise auf mögliche negative Auswirkungen der untersuchten UFPs auf die Gesundheit ergeben sich aus den bereits unter den Schlüsselereignissen beschriebenen Regulationen bzw. Aktivierungen von Signalwegen oder Metaboliten. Erhöhte *Serotonin*-Spiegel wurden im Zusammenhang mit verschiedenen Lungenerkrankungen wie Asthma, pulmonale arterielle Hypertonie, COPD, Lungenkrebs und Fibrose beobachtet (Berger et al. 2009; Distler et al. 2021; Pirina et al. 2018). Erhöhte Spiegel von *Adenin* wurden als Biomarker zur Unterscheidung von Lungenkrebs-Patienten von Kontrollpersonen diskutiert (Callejon-Leblic et al. 2016).

Somit lässt sich zusammen, dass der Vergleich der metabolomischen Profile aus dem Projekt mit den Daten von Patienten und Tierversuchen auf negative Auswirkungen der untersuchten UFPs auf die Lunge hindeutet.

Aus dem **Profilvergleich** der von UFPs regulierten Metaboliten mit erkrankten Menschen/Tiermodellen ergeben sich u.a. **Hinweise** auf:

- Lungenkrebs
- Lungenfibrose
- Asthma
- COPD
- Pulmonale arterielle Hypertonie
- Akutes Atemnotsyndrom

5. Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

Vorträge:

- *Generation and characterization of ultrafine soot particles with similar physical but varying chemical properties enabling differential toxicological assessment in human lung cells*
A Das, J Pantzke, E Hartner, S Jeong, G Jakobi, T Gröger, S Öder, S Di Bucchianico¹, M Sklorz, R Zimmermann
ETH Nanoparticles Conference 2022, Zürich
- *An alternative in vitro model considering cell-cell interactions in fiber-induced pulmonary fibrosis*
J Pantzke, S Offer, E Zimmermann, E Kuhn, S Di Bucchianico, S Oeder, R Zimmermann
Lung In Vitro event 2022, Nice
- *Modulated Metabolites of a Lung Model after Exposing to Different Ultrafine Particles (UFP) Aerosols*
R Alsaleh, C Kersch, J Pantzke, A Das, M N Delaval, M Sklorz, S Di Bucchianico, R Zimmermann, S Schmitz-Spanke
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeits-, Sozial-, Umweltmedizin 2023, Jena
- *Impact of Exposure to Different Ultrafine Particles (UFP) Aerosols on the Metabolome of a Lung Model*
R Alsaleh, C Kersch, J Pantzke, A Das, M N Delaval, M Sklorz, S Di Bucchianico, R Zimmermann, S Schmitz-Spanke
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2023, Ulm
- *Metabolomics study of a lung model exposed to different ultrafine particles (UFP) aerosols*
R Alsaleh, C Kersch, J Pantzke, A Das, M N Delaval, M Sklorz, S Di Bucchianico, R Zimmermann, S Schmitz-Spanke
Inhaled Particles / NanOEK Conference 2023, Manchester
- *Using metabolomics to get a deeper insight on the effects of ultrafine particles on a human lung model*
R Alsaleh, C Kersch, J Pantzke, A Das, M N Delaval, M Sklorz, S Di Bucchianico, R Zimmermann, S Schmitz-Spanke
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2024, München

Publikationen:

An alternative in vitro model considering cell-cell interactions in fiber-induced pulmonary fibrosis

Pantzke et al. 2022: Toxicology Mechanisms and Methods.
10.1080/15376516.2022.2156008

Poster:

- On the role of chemical identity over the size of model ultrafine particles driven (geno-)toxicity
J Pantzke, A Das, E Zimmermann, S Offer, S Jeong, M Delaval, J Schnelle-Kreis, M Sklorz, S Di Bucchianico, R Zimmermann
Inhaled Particles / NanOEH Conference 2023, Manchester
- Generation and Characterization of Reference Ultrafine Soot Particles to Carry Out Toxicological Assessments at the Air-Liquid Interface System
A DaS, J Pantzke, S Jeong, E Hartner, M Bauer, A Meščeriakovas, N Ivleva, H Czech, M Delaval, S Schmitz-Spanke, S Di Bucchianico, J Schnelle-Kreis, M Sklorz, R Zimmermann
American Association for Aerosol Research Annual Conference 2023, Oregon

6. Fazit und Ausblick

Fazit

Ein kausaler Zusammenhang zwischen UFPs und negativen Gesundheitseffekten in der Lunge wurde im Rahmen des Projekts mithilfe eines AOPs beschrieben. Der AOP verdeutlicht die einzelnen Schritte dieses Zusammenhangs, beginnend mit der Exposition gegenüber UFPs bis hin zu den resultierenden möglichen Gesundheitsschäden an der Lunge. Der AOP basiert auf Daten zu nanoskaligen Partikeln und wurde im Projekt auf UFPs übertragen. Für jedes Ereignis im AOP kamen Testsysteme und/oder Omics-Analysen zum Einsatz, um die spezifischen Auswirkungen von UFPs zu untersuchen. Zwei UFP-Aerosole mit unterschiedlicher organischer Beladung, aber identischen physikalischen Eigenschaften, wurden hergestellt und physikalisch-chemisch charakterisiert. In Monokulturen und einer komplexeren Dreifachkultur wurden die Effekte dieser UFPs auf die einzelnen Ereignisse des AOPs untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Dosis- und Zeitabhängigkeit der beobachteten Effekte.

Die UFP-Expositionen führten zu nachhaltigen Veränderungen in allen untersuchten Schlüsselereignissen des AOPs (KE1-3). KE4 befindet sich noch in der Analyse. Diese Ergebnisse deuten auf ein hohes Risiko für negative Folgen für die Gesundheit hin.

Vergleiche der Metabolitenprofile der Zellmodelle mit Daten von Patienten und Tierversuchen erhärteten dieses Risiko für verschiedene pulmonale Erkrankungen nach UFP-Exposition. Bemerkenswert ist, dass selbst die niedrigsten UFP-Dosierungen und auch die Beladungsvarianten mit niedrigem organischem Gehalt keine unbedenklichen Auswirkungen im untersuchten Modell zeigten.

Besonders relevant für die Gesundheitsbeeinträchtigung ist die verzögerte Reaktion der Zellen. Dies zeigte sich besonders deutlich bei den regulierten Metaboliten. Eine Hauptkomponentenanalyse (englisch: principal component analysis, PCA) trennte die Metabolite der exponierten Zellen nach beiden Expositionsdauern klar von denen der Kontrollzellen; d.h., nach akuter und verlängerter Exposition waren die Signalwege der exponierten Zellen verändert (Abb. 24 zeigt exemplarisch die Analyse für apikale Zellen). Menschen, die am Arbeitsplatz exponiert werden oder in Wohngebieten mit hoher UFP-Belastung leben, sind einer deutlich längeren Exposition ausgesetzt

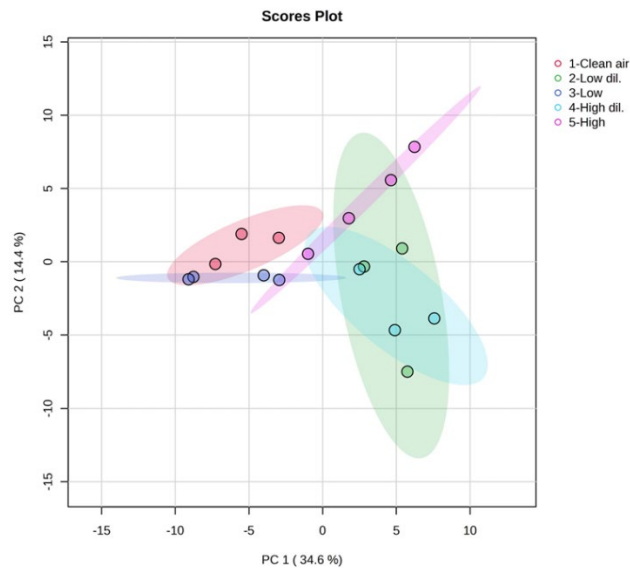


Abb. 24: Principal component analysis (PCA) der apikalen Zellen nach 4-stündiger Exposition gegen alle UFP-Aerosole mit anschließender 24-stündiger Ruhephase. Die Kontrollzellen wurden gegen Reinluft exponiert.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten auf ein erhöhtes Risiko für Lungenfibrose, COPD und andere pulmonale Erkrankungen hin. Für die Entstehung von Lungenkrebs sind die Untersuchungen zu DNA-Schäden besonders relevant. Alle untersuchten UFP-Aerosole führten zu akuten primären und/oder sekundären DNA-Schäden in apikalen und basalen Zellen; d.h. die DNA-Schädigung wurde nicht nur durch oxidative Prozesse ausgelöst.

Die metabolomischen Analysen zeigten aktivierte Reparaturprozesse. Dies lässt sich an den Regulationen im Purinstoffwechsel erkennen. Nicht reparierte DNA-Schäden können zu Mutationen und folglich zur Entwicklung von Krebs führen.

Aus den vorliegenden Daten dieses in vitro-Projekts kann auf ein erhöhtes Risiko für negative Gesundheitseffekte in der Lunge nach UFP-Exposition geschlossen werden. Die beobachteten Veränderungen in allen Schlüsselereignissen des AOPs, die DNA-Schäden und die vergleichenden Metabolitenprofile unterstreichen dieses Risiko.

Bemerkenswert ist, dass selbst niedrige UFP-Dosierungen und geringe organische Beladungen negative Auswirkungen zeigten. Die Ergebnisse der Studie sind relevant für die öffentliche Gesundheit und Politik.

Ausblick

Das vorliegende Projekt nutzte innovative Ansätze, um die Auswirkungen von UFPs auf die Lunge in einem in vitro-System zu untersuchen. Das AOP-Konzept ermöglichte die Identifizierung der wichtigsten Schritte, die zu negativen Gesundheitseffekten führen. Moderne Methoden wie Omics-Analysen und das ALI-System mit Dreifachkultur lieferten detaillierte Einblicke in die molekularen und zellulären Mechanismen.

In dem Projekt konnte zwar nur eingeschränkt Langzeiteffekte untersucht werden, aber die Ergebnisse liefern dennoch wichtige Hinweise auf die potenziellen Gesundheitsrisiken von UFPs.

Zukünftige Forschung sollte sich auf die Untersuchung der Langzeiteffekte von UFP-Expositionen und auf die Validierung der Ergebnisse in vivo konzentrieren.

Das vorliegende Projekt hat einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Gesundheitsrisiken von UFPs geleistet.

IV. Literaturverzeichnis

- (2023) MAK- und BAT-Werte-Liste 2023. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 59. German Medical Science, Düsseldorf
- Bendtsen KM, Gren L, Malmberg VB, et al. (2020) Particle characterization and toxicity in C57BL/6 mice following instillation of five different diesel exhaust particles designed to differ in physicochemical properties. *Particle and fibre toxicology* 17(1):38 doi:10.1186/s12989-020-00369-9
- Berger M, Gray JA, Roth BL (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60:355-66 doi:10.1146/annurev.med.60.042307.110802
- Braakhuis HM, Gosens I, Heringa MB, et al. (2021) Mechanism of Action of TiO₂: Recommendations to Reduce Uncertainties Related to Carcinogenic Potential. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 61:203-223 doi:10.1146/annurev-pharmtox-101419-100049
- Callejon-Leblic B, Garcia-Barrera T, Gravalos-Guzman J, Pereira-Vega A, Gomez-Ariza JL (2016) Metabolic profiling of potential lung cancer biomarkers using bronchoalveolar lavage fluid and the integrated direct infusion/ gas chromatography mass spectrometry platform. *Journal of proteomics* 145:197-206 doi:10.1016/j.jprot.2016.05.030
- Chuang KH, Peng YC, Chien HY, Lu ML, Du HI, Wu YL (2013) Attenuation of LPS-induced lung inflammation by glucosamine in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49(6):1110-9 doi:10.1165/rcmb.2013-0022OC
- Distler O, Neidhart M, Błyszczuk P (2021) Serotonin and Fibrosis. In: Maroteaux L, Monassier L (eds) 5-HT_{2B} Receptors. The Receptors. Springer International Publishing, Cham, p 231-246
- Gieseck RL, 3rd, Wilson MS, Wynn TA (2018) Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nature reviews Immunology* 18(1):62-76 doi:10.1038/nri.2017.90
- Halappanavar S, Ede JD, Shatkin JA, Krug HF (2019) A systematic process for identifying key events for advancing the development of nanomaterial relevant adverse outcome pathways. *Nanoimpact* 15:100178 doi:UNSP 100178
- Halappanavar S, van den Brule S, Nymark P, et al. (2020) Adverse outcome pathways as a tool for the design of testing strategies to support the safety assessment of emerging advanced materials at the nanoscale. *Particle and fibre toxicology* 17(1):16 doi:10.1186/s12989-020-00344-4
- Jacobsen NR, Moller P, Cohn CA, Loft S, Vogel U, Wallin H (2008) Diesel exhaust particles are mutagenic in FE1-MutaMouse lung epithelial cells. *Mutation research* 641(1-2):54-7 doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.03.001
- Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP (2004) Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *International journal of cancer Journal international du cancer* 109(6):799-809 doi:10.1002/ijc.11708
- Leso V, Fontana L, Iavicoli I (2018) Nanomaterial exposure and sterile inflammatory reactions. *Toxicol Appl Pharmacol* 355:80-92 doi:10.1016/j.taap.2018.06.021
- Lin S, Yue X, Wu H, et al. (2019) Explore potential plasma biomarkers of acute respiratory distress syndrome (ARDS) using GC-MS metabolomics analysis. *Clin Biochem* 66:49-56 doi:10.1016/j.clinbiochem.2019.02.009
- Liu L, Wu J, Shi M, et al. (2022) New Metabolic Alterations and A Predictive Marker Pipecolic Acid in Sera for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 20(4):670-687 doi:10.1016/j.gpb.2021.08.016
- Lucci F, Castro ND, Rostami AA, et al. (2018) Characterization and modeling of aerosol deposition in Vitrocell® exposure systems - exposure well chamber deposition efficiency. *Journal of Aerosol Science* 123:141-160 doi:10.1016/j.jaerosci.2018.06.015
- Musharraf SG, Mazhar S, Choudhary MI, Rizi N, Atta ur R (2015) Plasma metabolite profiling and chemometric analyses of lung cancer along with three controls through gas chromatography-mass spectrometry. *Sci Rep* 5(1):8607 doi:10.1038/srep08607

- Nymark P, Karlsson HL, Halappanavar S, Vogel U (2021) Adverse Outcome Pathway Development for Assessment of Lung Carcinogenicity by Nanoparticles. *Front Toxicol* 3:653386 doi:10.3389/ftox.2021.653386
- Pirina P, Zinellu E, Paliogiannis P, et al. (2018) Circulating serotonin levels in COPD patients: a pilot study. *BMC Pulm Med* 18(1):167 doi:10.1186/s12890-018-0730-5
- Rabolli V, Lison D, Huaux F (2016) The complex cascade of cellular events governing inflammasome activation and IL-1beta processing in response to inhaled particles. *Particle and fibre toxicology* 13(1):40 doi:10.1186/s12989-016-0150-8
- Singh N, Singh S (2021) Interstitial Lung Diseases and Air Pollution: Narrative Review of Literature. *Pulm Ther* 7(1):89-100 doi:10.1007/s41030-021-00148-7
- Wikoff WR, Grapov D, Fahrman JF, et al. (2015) Metabolomic markers of altered nucleotide metabolism in early stage adenocarcinoma. *Cancer prevention research* 8(5):410-8 doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0329
- Wu YL, Lin AH, Chen CH, et al. (2014) Glucosamine attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling. *Free radical biology & medicine* 69:208-18 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.026
- Yu L, Li K, Zhang X (2017) Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget* 8(70):115774-115786 doi:10.18632/oncotarget.22404