

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

***In vitro* Untersuchungen
zur Toxizität luftgetragener Partikel
an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht**

***In vitro* studies
on the toxicity of airborne particles
at the air-liquid interface**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Amelie Brigitte Poluxene Tsoutsouloupoulos

aus

München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Silke Meiners

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2020

Abstract

Industrial developments and new technologies contribute significantly to air pollution that represents a risk to human health. However, information about the potential toxic properties and the underlying pathomechanisms are lacking for a wide range of inhalable substances. Thus, the European chemicals legislation REACH (registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals) demands since 2006 the allocation of toxicological data for already existing and newly introduced chemicals, taking into account the route of exposure and the implementation of the 3R principle (replacement, reduction and refinement of animal testing). REACH aims to reduce human health risks arising from potential toxic inhalation hazards. Although *in vitro* exposure models represent a valuable alternative for explorative toxicological *in vivo* inhalation studies, internationally recognised testing procedures such as the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) guidelines are still based upon animal experiments. No alternative methods to animal testing have been validated and officially accepted so far. In recent years, a variety of *in vitro* models have been suggested for the exposure of cells at the air-liquid interface (ALI), as they mimic the interface situation and the physiological conditions of the human alveolar region with a higher similarity than submerged exposure techniques. The CULTEX[®] Radial Flow System (RFS) is a modular and novel *in vitro* exposure system that enables the direct and homogenous exposure of cultivated cells to gases, particles or dusts at the ALI. The applicability of such new methods, however, has to be verified by validation studies before being used for regulatory recognized toxicological risk assessments.

Aim of this PhD thesis was the establishment, harmonization and validation of the CULTEX[®] RFS as a standardized *in vitro* test procedure for the evaluation of the acute inhalation toxicity of airborne particles after direct exposure of cultivated human lung cells at the ALI. Cell vitality was assessed after exposure to 20 pre-selected test substances at the ALI and used as an indicator of toxicity. Test substances that led to a decrease in cell vitality below 75% (prediction model 75% = PM 75%) or 50% (PM 50%) after one of the three exposure doses (25, 50 or 100 µg/cm²) were considered to exert an acute inhalation hazard. Evaluation and interpretation with existing *in vivo* data revealed an overall concordance of 85% with a specificity of 83% and a sensitivity of 88%. The intra- and inter-laboratory reproducibility ranged from 90 to 100%, depending on the applied PM. The validation study demonstrated that the CULTEX[®] RFS is a robust, transferable and predictive test system for the assessment of the acute toxicity of inhalable substances. Thus, our results pave the road for the establishment of the CULTEX[®] RFS as an animal replacement and screening method for human risk assessment of airborne particles which is appropriate to be accepted and recognized by the OECD. In addition, the application of the CULTEX[®] methodology was extended to other chemical atmospheres in the field of military medical research and diagnostics in order to enable the aerosolization of highly toxic liquids. The modification of the CULTEX[®] RFS demonstrated for the first time the successful exposure of cultivated cells to sulfur mustard (SM) aerosols at the ALI. Due to the safe applicability of the modified CULTEX[®] system and the reproducible and stable generation of nebulized SM aerosols, the principle of SM aerosolization is already being applied in the development of a biosensor aimed for the rapid and real-time detection and intervention of SM exposure.

Zusammenfassung

Industrielle Entwicklungen und neuartige Technologien tragen wesentlich zur Schadstoffbelastung der Luft und somit zur Gefährdung der menschlichen Gesundheit bei. Da Informationen über potenzielle toxische Eigenschaften und die zugrunde liegenden Pathomechanismen für viele inhalierbare Substanzen fehlen, fordert das europäische Chemikalienrecht REACH (registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals) seit 2006 die Erhebung toxikologischer Daten für alle neuen und bereits auf dem Markt befindlichen Substanzen unter Berücksichtigung der Expositionsrouten und der Anwendung des 3R-Prinzips (d.h. Vermeidung, Verringerung und Verbesserung von Tierversuchen). Dies soll einen besseren Schutz der menschlichen Gesundheit vor Risiken, die durch Chemikalien entstehen können, ermöglichen. Obwohl *in vitro* Expositionsmodelle einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der akuten pulmonalen Toxizität leisten, basieren international anerkannte Prüfmethode wie die Richtlinien der OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) bislang noch auf Tierversuchen, da validierte Alternativmethoden zum Tierversuch fehlen. Um die Inhalation von luftgetragenen Partikeln und die physiologische Situation der humanen Alveole besser imitieren zu können, wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl an *in vitro* Modellen entwickelt, welche die Zellen nicht unter submersen Bedingungen, sondern an der sogenannten Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (air-liquid interface, ALI) exponieren. Auf diesem Expositionsprinzip basiert auch das CULTEX[®] Radial Flow Systems (RFS). Es ist ein modular gestaltetes *in vitro* Expositionssystem, das die Direktexposition von kultivierten Zellen am ALI gegenüber Gasen, Partikeln oder Stäuben erlaubt. Damit ein solches System für regulativ anerkannte toxikologische Risikobewertungen herangezogen werden kann, muss es zuvor durch Validierungsstudien auf seine Anwendbarkeit überprüft werden.

Ziel dieser Promotion war die Etablierung, Harmonisierung und Validierung des CULTEX[®] RFS als ein standardisiertes *in vitro* Screening-Verfahren zur Bewertung der akuten inhalativen Toxizität von luftgetragenen Partikeln nach Direktexposition kultivierter humaner Lungenzellen am ALI. Hierfür wurde die Vitalität der Zellen nach Exposition mit 20 ausgewählten Testsubstanzen bestimmt und als Indikator für die Toxizität verwendet. Substanzen, die nach einer der drei Expositionsdosen (25, 50 oder 100 µg/cm²) zu einer Abnahme der Zellvitalität unter 75% (Prädiktionsmodell 75% = PM 75%) oder 50% (PM 50%) führten, wurden als akut inhalationstoxisch eingestuft. Die Bewertung und Interpretation der Ergebnisse im Kontext vorhandener *in vivo* Daten zeigte eine Gesamtkonkordanz von 85% mit einer Spezifität von 83% und einer Sensitivität von 88%. Die Intra- und Interlabor Reproduzierbarkeit rangierte je nach angewendetem PM zwischen 90 und 100%. Die Validierungsstudie konnte belegen, dass das CULTEX[®] RFS als ein robustes, transferierbares und prädiktives Testverfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität inhalierbarer Substanzen eingesetzt werden kann. Langfristig soll das CULTEX[®] RFS als eine durch die OECD akzeptierte und anerkannte Tierersatz- und Screening-Methode für die humane Risikobewertung von luftgetragenen Partikeln etabliert werden. Zusätzlich sollte die Anwendung der CULTEX[®] Methode für den Bereich der wehrmedizinischen Forschung und Diagnostik auf andere chemische Atmosphären erweitert werden, um eine Aerosolisierung von (hoch-)toxischen Flüssigkeiten zu ermöglichen. Durch Modifizierung des CULTEX[®] Systems wurde zum ersten Mal die erfolgreiche Exposition der Zellen mit S-Lost (Schwefel-Lost) Aerosolen am ALI durchgeführt. Aufgrund der stabilen Reproduzierbarkeit und der eingehaltenen Sicherheitsanforderungen findet das Prinzip der S-Lost Aerosolisierung bereits eine erste Anwendung bei der Entwicklung eines Schnelldetektors zur frühzeitigen Erkennung und Intervention einer S-Lost Exposition.

Erklärung über den Eigenanteil an den Veröffentlichungen

Publikation 1

Tsoutsoulopoulos A, Gohlsch K, Möhle N, Breit A, Hoffmann S, Krischenowski O, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H, Aufderheide M, Steinritz D (2019). Validation of the CULTEX® Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles. *Toxicology in Vitro*, 58, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.020>

Listung im „Web of Science“ des Thomson Reuters-Institute for Scientific Information (ISI) (2018), **Kategorie „Toxicology“**:

Toxicology in Vitro: Platz 36 von 93 gelisteten Zeitschriften.

Im Rahmen meiner Dissertation habe ich u. a. ein **Zellkultur-basiertes Testsystem** für die **toxikologische Bewertung von Stäuben und Aerosolen** als 3R-konformes Ersatzverfahren zum Tierversuch eigenständig validiert (s. dazu auch Publikation 2). Meine dabei gesammelten Befunde zum Etablierungsprozess des Zellkultursystems in der CULTEX®-Expositionsanlage sowie meine Ergebnisse zur Überprüfung der Akzeptanzkriterien der Expositionsanlage („Reproduzierbarkeit im praktischen Einsatz“) sind wesentlicher Bestandteil der Publikation in *Toxicology in Vitro*.

Befunde zum Validierungsprozess der CULTEX®-Expositionsanlage, die nur von den anderen Kooperationspartnern des BMBF-Verbundprojektes erhoben wurden (Cultex® Technology GmbH („CUL“), Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie („WSI“)), sind bereits in den Abbildungen des publizierten Artikels durch entsprechende Abkürzungen, die die **Zugehörigkeit zu den beteiligten Laboren anzeigen („CUL“, „WSI“)**, gekennzeichnet. Die **nur von mir erarbeiteten Ergebnisse** sind im Manuskript durch den **Index „IPT“** markiert.

Im Folgenden ist mein Eigenanteil an der Publikation im Fachjournal *Toxicology in Vitro* stichwortartig aufgelistet:

1. Aufbau, Inbetriebnahme und Wartung der CULTEX® Expositionsanlage
 - Durchführung von Optimierungsprozessen des Zellkultur-basierten toxikologischen Testsystems inkl.
 - Testen zweier verschiedener Zellkultureinsätze
 - Optimierung der Zellzählung und Aussaat (automatisches Zellzählungsgerät Casy vs. manuelle Zählung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer)
 - Vergleich verschiedener Vitalitäts-Testmethoden (z.B. WST-1, XTT, Presto-blue, Alamarblue, oder CellTiter-Glo) und anschließende Optimierung des verwendeten WST-1-Assays
 - Analysen zur Stabilisierung des pH-Wertes des Expositionsmediums
2. Planung, Koordination und Durchführung der Toxizitäts-Analysen
 - Kultivierung der Zellen

-
- Zellaussaat für die Expositionsversuche
 - Pressen der Testsubstanzen
 - Durchführung der Expositionen
 - Durchführung der Vitalitätsuntersuchungen, einschließlich photometrischer Bestimmung und Etablierungsstudien (s. dazu auch Supplement Table 1 und Supplement Figur 2)
3. Auswertung und Interpretation der Ergebnisse
4. Abfassung des Manuskripts („corresponding author“) inkl.
- Visualisierung der Daten (Programmiersprache „R“)
 - Bearbeitung und Koordination des Revisionsprozesses

Folgende Arbeiten wurden von den Ko-Autoren des Manuskriptes Tsoutsouloupoulos *et al.*, *Toxicology in Vitro*, 2019 durchgeführt:

- Autoren: Möhle, Krischenowski und Aufderheide (Projektpartner I des Verbundprojektes, Cultex[®] Technology, Hannover, abgekürzt mit „CUL“)
 - Eigenständige Projektplanung und Erstellung des Studiendesigns und der Planung und Durchführung der Expositionsversuche bei Cultex[®] Technology GmbH
 - Charakterisierung der Press- und Abscheideparameter in Vorversuchen
- Autoren: Gohlsch und Breit (Projektpartner III des Verbundprojektes, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU, München, abgekürzt mit „WSI“)
 - Eigenständige Planung und Durchführung der Expositionsversuche zur Validierung der Cultex[®]-Expositionsanlage am Walther-Straub Institut für Pharmakologie und Toxikologie
- Autor: Hoffmann (Projektpartner V des Verbundprojektes, seh consulting + services, Paderborn, abgekürzt mit „SEH“)
 - Auswahl der Testsubstanzen nach speziell definierten Kriterien
 - statistische Auswertung der erhobenen Vitalitätsdaten nach Exposition
 - Verblindung der Testsubstanzen
- Weitere Ko-Autoren
 - Gudermann, Thiermann, Steinritz: Projektaufsicht und Beratung
 - Mückter: Projektaufsicht, Beratung und Diskussion der Ergebnisse

Publikation 2

Tsoutsouloupoulos A, Siegert M, John H, Zubel T, Mangerich A, Schmidt A, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H, Steinritz D & Popp T (2019). A novel exposure system generating nebulized aerosol of sulfur mustard in comparison to the standard submerse exposure. *Chemico-Biological Interactions*, 298, 121-128.

Listung im „Web of Science“ des Thomson Reuters-Institute for Scientific Information (ISI) (2018), **Kategorie „Toxicology“**:

Chemico-Biological Interactions: Platz 30 von 93 gelisteten Zeitschriften.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die eigenständige Etablierung der CULTEX[®]-Expositionsanlage für die spezial-analytische Diagnostik bei einer Exposition eines hochtoxischen aerosolen Kampfstoffs. Dazu wurde das CULTEX[®]-Expositionssystem, das primär für Partikel-Expositionen ausgelegt ist, von mir an die Exposition mit dem **Flüssig-Aerosol S-Lost** angepasst. Dabei lag neben der reproduzierbaren und gleichmäßigen Verteilung des S-Lost Aerosols auf die Zellen ein weiterer Schwerpunkt der Etablierungsarbeiten darin, die Exposition so zu standardisieren, dass die erforderlichen Sicherheitsanforderungen zur Vermeidung einer Vergiftung erfüllt wurden. Zudem habe ich untersucht, ob die Exposition von Zellen mit S-Lost unter „air-liquid interface“ (ALI) Bedingungen gegenüber der klassischen submersen S-Lost Exposition zu bevorzugen ist.

Im Folgenden ist mein Eigentel an der Publikation im Fachjournal *Chemico-Biological Interactions* stichwortartig aufgelistet:

- Literaturrecherche
- Planung der Machbarkeitsstudie
- Adaption des CULTEX[®] Testsystems für die Exposition von Zellen mit hochtoxischen Flüssig-Aerosolen (Austausch des Aerosolgenerators durch ein geeignetes Vernebler-System)
- Planung und Umsetzung notwendiger Sicherheitsvorkehrungen (z.B. Einsatz des Detektionsgerät LCD3.3 zum Aufspüren von chemischen Kampfstoffen, Verwendung eines Edelstahlmoduls, etc.)
- Vorversuche mit verschiedenen Vernebler-Systemen (z.B. Pari, eFlow) inkl. der Überprüfung der Homogenität und Reproduzierbarkeit der Exposition der Zellen mit Flüssig-Aerosolen
- Durchführung von Optimierungsprozessen (z.B. Handling des Vernebler-Systems, Zuleitung des Flüssig-Aerosols an die Zellen, etc.)
- Koordination und Durchführung der experimentellen Versuche, z.B.
 - Kultivierung der Zellen
 - Optimierung der Zellaussaat für die Expositionsversuche
 - Durchführung der S-Lost Expositionen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht und unter submersen Bedingungen
 - Messung der Zellvitalität (WST-1-Assay)
- Durchführung verschiedener biochemischer und molekular-biologischer Untersuchungen z.B.
 - immunzytochemischer Nachweis von S-Lost-DNA-Addukten mit Hilfe des 2F8-Antikörpers; dieser Primärantikörper bindet hochspezifisch an S-Lost-

Addukte, wobei er an Guanin-Moleküle der DNA bindet. Der 2F8-AK ist weltweit der einzige Antikörper, der S-Lost-induzierte Addukte erkennt.

- Probenaufbereitung für die massenspektrometrischen Analysen
- Interpretation der massenspektrometrischen Daten und statistische Auswertung aller Daten
- Verfassen des Manuskripts inkl.
 - Visualisierung der Daten (Programmiersprache „R“)
 - Praktische und theoretische Bearbeitung und Koordination des Review-Prozesses

Folgende Arbeiten wurden von den Ko-Autoren des Manuskriptes Tsoutsoulopoulos *et al.*, *Chemico-Biological Interactions*, 2019 durchgeführt:

- Popp: Sicherheitstechnische Überwachung der S-Lost Expositionen (ALI/submers)
- Mangerich, Zubel, Schmidt: Entwicklung und Beschreibung einer neuen massenspektrometrischen Methode zur Detektion von DNA-Addukten nach S-Lost-Exposition
- Siegert, John: Durchführung der massenspektrometrischen Analysen
- Gudermann, Thiermann, Steinritz, Mückter: Beratung und Korrekturlesen des Manuskripts

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „*In vitro* Untersuchungen zur Toxizität luftgetragener Partikel an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 08.10.2019

(Amelie Tsoutsouloupoulos)

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	II
Erklärung über den Eigenanteil an den Veröffentlichungen	III
Eidesstattliche Versicherung	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
Publikationen	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Erkrankungen der Atemwege und der Lunge	2
1.2 Anatomie und Physiologie der Atmung	2
1.3 Inhalation von luftgetragenen Partikeln	4
1.4 Daten zur inhalativen Toxizität	4
1.4.1 EU Chemikalienverordnung REACH	4
1.4.2 OECD-Richtlinien zur Bewertung des akuten toxischen Inhalationspotenzials	5
1.5 Alternative Tierersatzmethoden zur Bewertung der akuten Toxizität inhalierbarer Substanzen	5
1.6 <i>In vitro</i> Expositionstechniken	7
1.7 CULTEX [®] Radial Flow System (RFS)	8
1.8 Prävalidierungsstudie des CULTEX [®] RFS	10
2 Zielsetzung	12
2.1 Weiterführende Validierung des CULTEX [®] RFS Verfahrens und Optimierung eines Prädiktionsmodells zur Bewertung der akuten inhalativen Toxizität von Stäuben	12
2.2 Anpassung und Anwendung der CULTEX [®] Methode für die Exposition von Zellen mit Flüssig-Aerosolen am ALI	12
3 Zusammenfassung der kumulativen Arbeiten	14
3.1 Validierung des CULTEX [®] RFS für die Bewertung der akuten inhalierbaren Toxizität von luftgetragenen Partikeln	14
3.2 Herausforderungen bei der S-Lost Exposition von humanen Lungenzellen am ALI	33
4 Zusammenfassung und Ausblick	44
5 Literaturverzeichnis	48
6 Danksagung	55

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zahl der Überschreitungen des PM ₁₀ -Tagesmittelwertes (2012-2015). . .	1
1.2	Der humane Respirationstrakt.	3
1.3	Vergleich der <i>in vitro</i> Expositionstechniken.	8
1.4	Aufbau der CULTEX [®] RFS Anlage.	9
1.5	Schematische Darstellung des CULTEX [®] RFS.	10
1.6	Vergleich der Zellkultureinsätze von BD Falcon [®] und Corning [®]	11
2.1	Inhalative Expositionsgefahren mit wehrmedizinischer Relevanz.	13
3.1	Schwankende Reinluftvitalitäten zu Beginn der Validierungsstudie.	15
4.1	Exposition des Biosensors mit S-Lost in der Aerosolphase.	46

Tabellenverzeichnis

3.1	pH-Werte des Expositionsmediums vor und nach Exposition	15
-----	---	----

Abkürzungsverzeichnis

3R	replacement, reduction and refinement (Vermeidung, Verringerung und Verbesserung)
ALI	air-liquid interface (Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht)
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
Ade	Adenin
AOK	Allgemeine Ortskrankenkasse
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CWÜ	Chemiewaffenübereinkommen
ECHA	European Chemicals Agency (Europäische Chemikalienagentur)
ESI	electrospray ionization (Elektrosprayionisation)
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
EURL-ECVAM	European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (Europäisches Referenzlabor für Alternativen zum Tierversuch)
Gua	Guanin
HETE	Hydroxyethylthioethyl
InstPharmToxBw	Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MS/HR MS	high resolution tandem-mass spectrometry (hochauflösende-Tandem-Massenspektrometrie)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung)
PCLS	precision cut lung slices (Lungenpräzisionsschnitte)
PM₁₀	particulate matter (Partikelmasse mit einem Durchmesser von maximal 10 µm)
PM	prediction model (Prädiktionsmodell)
QSAR	quantitative structure-activity relationship (Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung)
REACH	registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals (Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe)
RFS	Radial Flow System

TG	test guideline (Testleitlinie)
S-Lost	Schwefel-Lost
SM	sulfur mustard (Schwefel-Lost)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
μLC	microbore liquid chromatography (Mikro-Flüssigchromatographie)

Publikationen

Publikationen der kumulativen Dissertation

Tsoutsoulopoulos A, Gohlsch K, Möhle N, Breit A, Hoffmann S, Krischenowski O, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H, Aufderheide M & Steinritz D (2019). Validation of the CULTEX[®] Radial Flow System for the assessment of the acute pulmonary toxicity of airborne particles. *Toxicology in Vitro*, 58, 245-255.

Tsoutsoulopoulos A, Siegert M, John H, Zubel T, Mangerich A, Schmidt A, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H, Steinritz D & Popp T (2019). A novel exposure system generating nebulized aerosol of sulfur mustard in comparison to the standard submerse exposure. *Chemico-Biological Interactions*, 298, 121-128.

Weitere Publikationen

Tsoutsoulopoulos A, Möhle N, Aufderheide M, Schmidt A, Thiermann H & Steinritz D (2016). Optimization of the CULTEX[®] radial flow system for *in vitro* investigation of lung damaging agents. *Toxicology Letters*, 244, 28-34

Stenger B, Popp T, John H, Siegert M, **Tsoutsoulopoulos A**, Schmidt A, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H & Steinritz D (2017). N-Acetyl-L-cysteine inhibits sulfur mustard-induced and TRPA1-dependent calcium influx. *Archives of Toxicology*, 91(5), 2179-2189

Colozza N, Kehe K, Dionisi G, Popp T, **Tsoutsoulopoulos A**, Steinritz D, Moscone D & Arduini F (2019). A wearable origami-like paper-based electrochemical biosensor for sulfur mustard detection in liquid and gas phase. *Biosensors and Bioelectronics*, 129, 15-23

Tsoutsoulopoulos A, Gohlsch K, Möhle N, Breit A, Hoffmann S, Krischenowski O, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H, Aufderheide M & Steinritz D. Assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles by exposing cultivated human lung cells at the air-liquid interface. *Journal of Visualized Experiments* (accepted)

Vorträge

Tsoutsoulopoulos A, Gohlsch K, Breit A, Mückter H, Gudermann T, Krischenowski O, Möhle N, Hoffmann S, Aufderheide M, Thiermann H & Steinritz D. Air-liquid interface exposure systems for *in vitro* investigation of pulmonary toxicity of chemical warfare agents. *16th Medical Chemical Defence Conference, München 2017*

Tsoutsoulopoulos A, Thiermann H & Steinritz D. Validierung der CULTEX® RFS – Methode zur toxikologischen Bewertung von Stäuben als Alternative zum Tierversuch (Sachstandsbericht). *7te Sitzung des Wissenschaftlichen Beirates für die Institute des Medizinischen ABC-Schutzes, München 2017*

Tsoutsoulopoulos A & Steinritz D. Entwicklungsvorhaben: Lateral-Flow-Assay zum Nachweis von Schwefel-Lost. *Große Forschungskonferenz des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, München 2018*

Tsoutsoulopoulos A, Popp T, Siegert M, Zubel T, John H, Mangerich A, Schmidt A, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H & Steinritz D. Evaluation of a novel air-liquid interface exposure system for the aerosolization of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Poster Award Competition, 17th Medical Chemical Defence Conference, München 2019*

Posterpräsentationen

Tsoutsoulopoulos *et al.*, Optimisation of the CULTEX® RFS method and establishment of a co-culture model to assess acute pulmonary toxicity of inhalable substances. *15th Medical Chemical Defence Conference, München 2015*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, Improvement of the CULTEX® exposure system as an *in vitro* model for the assessment of pulmonary toxicity. *Deutsche Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie, Oldenburg 2015*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, The CULTEX® RFS method as an *in vitro* model for the assessment of pulmonary toxicity of inhalable substances. *82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Berlin 2016*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, TRPA1-Aktivierung durch alkylierende Verbindungen. *Deutsche Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie, Neu-Ulm 2016*

Stenger *et al.*, Alkylating agents activate chemosensing Transient Receptor Potential A1 cation channels. *52nd European Congress of the European Societies of the Toxicology, Seville 2016*

(„Short-listed“ für den Posterpreis “Early Career Award best poster presentation”)

Tsoutsoulopoulos *et al.*, Progress Report – Ongoing Validation of the CULTEX® Radial Flow System (RFS). *83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Heidelberg 2017*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, Further validation of the CULTEX[®] RFS method and optimization of a prediction model to evaluate the acute toxicity of inhalable dusts. *10th Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Seattle 2017*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, The CULTEX[®] Radial Flow System as *in vitro* model for the assessment of lung toxicity. *53rd Congress of the European Societies of Toxicology, Bratislava 2017*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, The CULTEX[®] Radial Flow System (RFS) as *in vitro* screening approach to analyze the acute toxicity of inhalable substances. *84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Göttingen 2018*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, Herausforderungen bei der *in vitro* Exposition von humanen Lungenzellen mit S-Lost am „Air-Liquid Interface“. *Deutsche Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie, Würzburg 2018*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, Challenges of exposing human lung cells to sulfur mustard (SM) at the air-liquid interface (ALI) *in vitro*. *85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Stuttgart 2019*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, Evaluation of a novel air-liquid interface exposure system for the aerosolization of the chemical warfare agent sulfur mustard. *17th Medical Chemical Defence Conference, München 2019*

Tsoutsoulopoulos *et al.*, Identification of toxic inhalation hazards using the *in vitro* CULTEX[®] Radial Flow System (RFS). *39th Congress of the European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists, Neapel 2019*

Auszeichnung

Posterpreis (Platz 1) auf der *17th Medical Chemical Defence Conference, München 2019*

1 Einleitung

Die Belastung der Luft durch Schadstoffe beeinflusst und gefährdet täglich die Gesundheit des Menschen. Nach Schätzungen der WHO (World Health Organisation) sterben weltweit jedes Jahr allein aufgrund der Luftverschmutzung und der Belastung durch erhöhte Feinstaubwerte etwa 7 Millionen Menschen an Herzkrankungen, Schlaganfällen, chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen oder akuten Atemwegsinfektionen [24, 116]. Lungen- und Atemwegserkrankungen zählen dabei zu den häufigsten Krankheitsgruppen [4]. Nach Angaben der OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) wird die Luftverschmutzung bis 2050 weltweit die größte umweltbedingte Ursache für vorzeitige Todesfälle sein [67]. In Deutschland hat sich die Luftqualität in den letzten Jahrzehnten zwar deutlich verbessert, doch sind insbesondere die Tagesmittelwertkonzentrationen von Stickstoffdioxid und Feinstaub an mehr als 35 Tagen im Kalenderjahr über dem zugelassenen Grenzwert von $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Abbildung 1.1) [110].

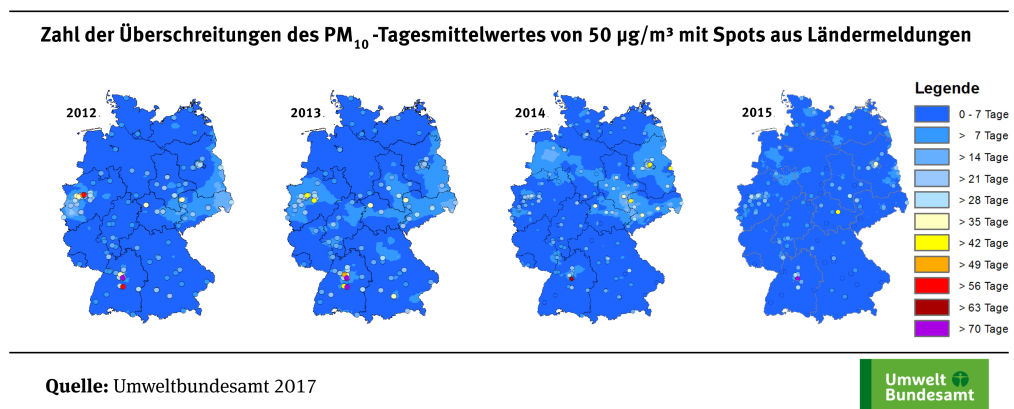


Abbildung 1.1: Zahl der Überschreitungen des PM_{10} -Tagesmittelwertes (2012-2015). Eine PM_{10} -Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ darf in Deutschland im Tagesmittel nur an höchstens 35 Tagen im Kalenderjahr überschritten werden. Überschreitungen des Tageswertes werden vor allem vom Verkehr beeinflussten Stationen in Ballungsräumen gemessen [108]. (PM_{10} = particulate matter, d.h. Partikel mit einem Durchmesser von maximal $10 \mu\text{m}$)

In Deutschland waren Atemwegserkrankungen nach Statistiken des AOK (Allgemeine Ortskrankenkasse) Bundesverbandes und des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2015 der häufigste Grund für Arbeitsausfälle und die dritthäufigste Todesursache [57, 96]. Nach Prognosen der WHO werden Atemwegserkrankungen auch in den kommenden Jahrzehnten eine große Belastung für die europäische Gesellschaft bleiben und bis 2030 weltweit für etwa jeden fünften Todesfall verantwortlich sein [28].

1.1 Erkrankungen der Atemwege und der Lunge

Jüngste technologische Entwicklungen (z.B. Ausweitung der Biotechnologie auf eine Vielzahl von Industriezweigen, Entwicklung neuartiger synthetischer Nanopartikel) und der verstärkte Bedarf an Energie, Industrie-, Landwirtschafts- und Konsumerzeugnissen tragen wesentlich zur Entstehung von Luftschadstoffen und der Gefährdung der menschlichen Gesundheit bei [16, 50, 64, 109]. Zusätzlich zeigen Ereignisse aus jüngster Vergangenheit, dass auch von chemischen Kampfstoffen noch immer eine beträchtliche Inhalationstoxizität ausgeht. So wurde beispielsweise der chemische Hautkampfstoff S-Lost (Schwefel-Lost) trotz des Verbots durch das CWÜ (Chemiewaffenübereinkommen) in aktuellen Konflikten (z.B. Syrien 2015) wiederholt eingesetzt [71, 73]. Durch die kostengünstige und leichte Herstellung von S-Lost ist die Gefahr weiterer Anwendung durch Terroristen äußerst hoch [87]. Nach S-Lost Exposition können neben der Haut akute oder chronische Schäden an Augen, Atemwegen und inneren Organen auftreten [27, 55, 75]. Die Mortalität nach S-Lost Exposition ist mit 2-3% zwar gering, jedoch in erster Linie auf S-Lost-induzierte Lungenschäden zurückzuführen, die je nach Expositionsdosis alle Abschnitte des Respirationstraktes einschließlich der Alveolen betreffen [15, 26, 76, 79]. Trotz langjähriger Forschung fehlen aufgrund der noch nicht vollständig aufgeklärten Pathophysiologie von S-Lost bis heute kausale Therapieansätze [55, 86, 84].

Die Exposition gegenüber luftgetragenen festen und flüssigen Schwebeteilchen gewinnt im Hinblick auf die Frage der gesundheitlichen Risiken nach inhalativer Belastung immer stärker an Bedeutung [1, 11, 54, 13]. Je nach Substanzart und inhalativer Belastung können die respiratorischen Erkrankungen ein breites Spektrum akuter und chronischer Erkrankungen der Atemwege (z.B. Infektionen oder Entzündungen), sowie bösartige Tumore an den Atmungsorganen umfassen [4].

1.2 Anatomie und Physiologie der Atmung

Das humane respiratorische System setzt sich aus dem Respirationstrakt (Atemungsapparat) und der Atemmuskulatur (Zwerchfell und Rippenmuskulatur) zusammen. Der Respirationstrakt wiederum lässt sich in das Luftleitungssystem (obere und untere Atemwege) und das Gasaustauschsystem (Lunge) unterteilen (Abbildung 1.2) [6, 8, 10, 66, 113, 115].

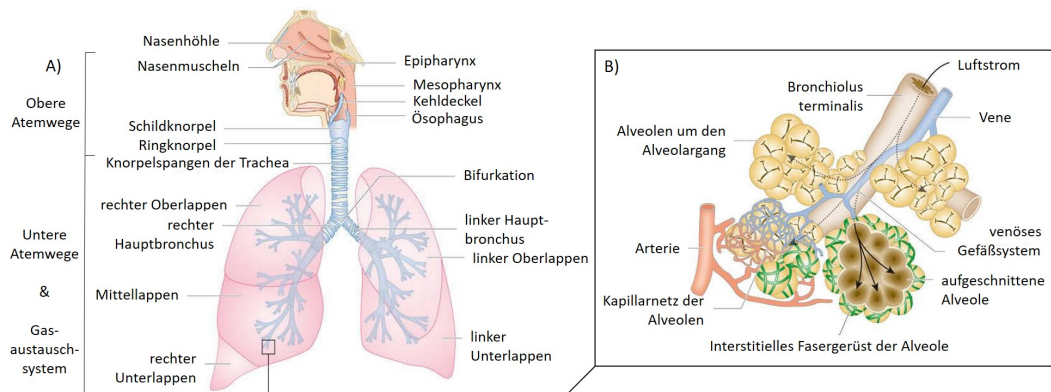


Abbildung 1.2: Der humane Respirationstrakt. A) Schematische Darstellung des Luftleitungssystems, bestehend aus den oberen und unteren Atemwegen, und dem Gasaustauschsystem. B) Detaillierte Ansicht des Gasaustauschsystems. Modifiziert von [115].

Die oberen Atemwege bestehen aus der Mund-, Nasenhöhle und den Nasennebenhöhlen, dem Rachen (Pharynx) und Kehlkopf (Larynx) und dienen hauptsächlich dem Geruchssinn und Temperaturengleich, d.h. der Erwärmung und Anfeuchtung der eingeatmeten Luft. Flimmerhärchen im Nasenraum tragen durch das Abfangen und den Abtransport von kleinen Fremdkörpern zur mechanischen Reinigung bei [8, 10, 66]. Die unteren Atemwege bestehen aus dem Tracheobronchialsystem. Die röhrenförmige, durch Knorpelringe stabilisierte Trachea geht an der Bifurcatio tracheae in die beiden Hauptbronchien (Bronchi principales) über, die in beide Lungenflügel eintreten und sich in immer feinere Verzweigungen des luftleitenden Bronchialbaums (Lappenbronchien, Segmentbronchien und Subsegmentbronchien) aufteilen. Insgesamt umfasst der gesamte Bronchialbaum 23 Verzweigungsgenerationen. Mit dem Übergang der Endbronchiolen (Bronchioli terminales) in die respiratorischen Bronchiolen (Bronchioli respiratorii) endet das luftleitende System und die gasaustauschenden Abschnitte beginnen. Die respiratorischen Bronchiolen, die in ihren Wänden vereinzelt schon Alveolen aufweisen, enden in den Alveolargängen (Ductus alveolares), wo sich die Alveolen weintraubenartig zu Alveolarsäckchen (Sacculi alveolares) zusammenfinden [8, 10, 101, 102, 113]. Mit einer absoluten Gesamtoberfläche von 80-120 m² und einer geschätzten Anzahl von 300-400 Millionen zählen die Alveolen zum funktionell wichtigsten Element der Lunge [10, 101]. Benachbarte Alveolen sind durch Septen voneinander getrennt und eng mit dem Kapillarsystem der Lunge vernetzt. Die Basalmembran der Alveolarepithelzellen und des Kapillarendothels sind größtenteils miteinander verschmolzen, wodurch die Diffusion der Atemgase durch eine sehr dünne Diffusionsbarriere (ca. 2,2 µm) erfolgt und ein optimierter Gasaustausch ermöglicht wird. Die Alveolen werden von zwei morphologisch und funktionell verschiedenen Alveolarepithelzellarten ausgekleidet, den Pneumozyten des Typ I (Deckzellen) und Typ II (Surfactantproduzenten). Pneumozyten vom Typ I sind große, flache und nicht mehr proliferationsfähige Zellen. Sie bedecken in etwa 95% der Alveolaroberfläche und dienen dem Gasaustausch. Die kleinen kubischen Zellen des Typs II sind mitotisch aktiv und können beschädigte Zellen des Typ I durch Zellvermehrung und Differenzierung ersetzen. Zudem produzieren sie das aus Phospholipiden und Glykoproteinen zusammengesetzte Surfactant, das die Innenseite der Alveolarwand auskleidet und durch Herabsetzung der Oberflächenspannung ein Zusammenfallen der Lungenbläschen verhindert [6, 8, 10, 92,

102].

Der Respirationstrakt dient als Eintrittspforte für sämtliche in der Atemluft enthaltene luftgetragene Partikel. Die Hauptaufgabe des respiratorischen Systems besteht im Gasaustausch, d.h. die Aufnahme von Sauerstoff (O_2) aus der Atemluft ins Blut und die Abgabe von Kohlendioxid (CO_2) aus dem Blut an die auszuatmende Luft [6, 10, 113]. Für die Entfernung abgelagerter Partikel verfügt das respiratorische System über ein breites Abwehrsystem der mukoziliären Clearance für die oberen und unteren Atemwege, sowie der Makrophagen-Clearance für die Alveolen [59, 66, 102, 113]. Die Grundlage der mukoziliären Clearance bildet das Flimmerepithel, das mit Zilien und schleimproduzierenden Becherzellen (goblet cells) ausgestattet ist [10]. Die Zilien, bewegliche Ausstülpungen der Zellmembran, entfernen durch koordinierte Bewegungen den Bronchialschleim und eingedrungene Fremdpartikel, Mikroorganismen oder Allergene aus den Atemwegen. Der Bronchialschleim wird vor allem von Becherzellen und subepithelialen Drüsen produziert und dient der Befeuchtung der Atemluft und der Bindung von Fremdpartikeln. Mit steigender Verzweigung des Bronchialsystems nimmt die Dicke des Flimmerepithels und die Anzahl der Zilien ab und die Becherzellen werden nach und nach durch Club-Zellen (ehemals Clara-Zellen) ersetzt, welche eine sekretorische und regenerierende Funktion besitzen. Fremdpartikel, die durch Inspiration bis in die Alveolen gelangen und die mukoziliäre Clearance überwunden haben, werden durch Alveolarmakrophagen phagozytiert (Makrophagen-Clearance) [8, 9, 10, 17, 59, 65, 66, 92, 102, 113].

1.3 Inhalation von luftgetragenen Partikeln

Abhängig von ihrer Größe können Partikel durch Impaktion, Sedimentation und Diffusion definierte Bereiche des Respirationstraktes erreichen [8, 44, 56, 107]. Partikel mit einer Größe von 2,5-10 μm lagern sich hauptsächlich in den oberen Atemwegen ab, wohingegen kleinere Partikel (0,1-2,5 μm) die unteren Atemwege oder sogar die Alveolen (Partikel $< 0,1\mu m$) erreichen können [6, 114]. Abhängig von der Substanzart und der inhalativen Belastung können akute, chronische oder verzögert einsetzende Lungen- und Atemwegsschäden in unterschiedlichen Schweregraden auftreten. Für ein breites Spektrum der inhalierbaren Substanzen fehlen jedoch noch Informationen über potenzielle toxische Eigenschaften und die zugrunde liegenden Pathomechanismen [2, 45, 125].

1.4 Daten zur inhalativen Toxizität

Aufgrund der aktuellen Umweltsituation (z.B. Feinstaubproblematik), industrieller Entwicklungen und neuartiger Konsumerzeugnisse ist die Gefahr einer Exposition gegenüber inhalativen Schadstoffen allgegenwärtig [24, 99, 120]. Durch die steigende Zahl der Lungenerkrankungen ist das Verständnis und die Aufklärung der gesundheitlichen Risiken nach inhalativer Belastung von großer Bedeutung und aktuell ein Schwerpunkt inhalationstoxikologischer Studien [7, 13]. Um das Gesundheitsrisiko möglichst gering zu halten, werden Informationen bezüglich des inhalativen Gefahrenpotenzials luftgetragener Substanzen benötigt.

1.4.1 EU Chemikalienverordnung REACH

Aus diesem Grund trat am 1. Juni 2007 die Chemikalienverordnung der EU (Europäischen Union) (Nr. 1907/2006) REACH (registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals) in Kraft, die die Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe regelt [23]. Ziel ist es, den Schutz der menschlichen Gesundheit und Umwelt vor Risiken, die durch Chemikalien entstehen können, zu verbessern und die

Wettbewerbsfähigkeit der chemischen Industrie innerhalb der EU zu steigern. Nach dem Prinzip „no data, no market“ mussten bis 2018 alle neu zugelassenen oder bereits auf dem europäischen Markt befindlichen Substanzen, die mit mehr als einer Tonne pro Jahr in Verkehr gebracht werden, einer toxikologischen Risikobewertung unter Berücksichtigung der Expositionsrouten unterzogen werden. Dabei gilt REACH für alle chemischen Stoffe, die als Reinstoff oder Bestandteil eines Gemisches sowohl in industriellen Verfahren als auch im täglichen Leben (z.B. Reinigungsprodukte, Farben, Kosmetika) Anwendung finden. REACH dient der Harmonisierung und Vereinfachung des bis dahin gültigen Chemikalienrechts und basiert auf dem Grundsatz der Eigenverantwortung der Industrie und des Handels. Die Organisation und Kontrolle im Prozess von REACH wird von der ECHA (European Chemicals Agency) als zentrale Schaltstelle mit Sitz in Finnland übernommen [21, 23].

1.4.2 OECD-Richtlinien zur Bewertung des akuten toxischen Inhalationspotenzials

Die REACH-Verordnung basiert auf den sogenannten OECD-Richtlinien, den international anerkannten Prüfmethoden zur Ermittlung und Charakterisierung potenzieller chemischer Gefahrenquellen für die menschliche Gesundheit und Umwelt [20]. Für die Bewertung der akuten inhalativen Toxizität von Substanzen existieren derzeit drei gelistete OECD-Richtlinien (TG (test guideline) 403, TG 433 und TG 436), die alle auf Tierversuchsexperimenten basieren [68, 69, 70]. Schätzungen zufolge werden ca. 1-2% aller Versuchstiere (ca. 100.000-200.000 Tiere) für inhalationstoxikologische Untersuchungen benötigt [37]. Tiere weisen signifikante anatomische und physiologische Unterschiede in Bezug auf den humanen Respirationstrakt auf, wodurch Extrapolationen der *in vivo* Ergebnisse (z.B. Dosis-Wirkungsbeziehungen, toxikologische Interpretationen) auf den Menschen limitiert sind [6, 48, 97]. Ethische Bedenken, ein hoher Kosten- und Zeitaufwand, sowie die Berücksichtigung des 3R-Prinzips (replacement, reduction and refinement, d.h. Vermeidung, Verringerung und Verbesserung von Tierversuchen) führten dazu, dass sich die Forschung in den letzten Jahren auf die Entwicklung alternativer Testsysteme konzentrierte [6, 32, 82, 83]. Dieser Aspekt wird auch in der REACH-Verordnung berücksichtigt, indem Alternativmethoden zum Tierversuch gefördert werden [82, 94]. Als ein erster Schritt zur stärkeren Berücksichtigung des Tierschutzes wurde beispielsweise 2017 die OECD TG 433 eingeführt, die im Gegensatz zu den TG 403 und TG 436 für die Untersuchung der akuten Toxizität nicht den Tod des Tieres als Endpunkt festlegt, sondern offensichtliche klinische Anzeichen einer Toxizität [13, 20, 94]. Dies soll zur Reduzierung und Verbesserung von Tierversuchen beitragen.

Validierte Alternativmethoden zum Tierversuch für die Untersuchung der akuten Toxizität inhalierbarer Substanzen werden daher für REACH und andere regulatorische Maßnahmen dringend benötigt, sind aber derzeit für den Bereich der Lungentoxikologie nicht verfügbar [13, 20, 48].

1.5 Alternative Tierersatzmethoden zur Bewertung der akuten Toxizität inhalierbarer Substanzen

Aufgrund der intensiven Forschungsarbeiten in den letzten Jahren sind derzeit diverse *ex vivo*, *in vitro* und *in silico* Modellsysteme und Techniken für (akute) inhalationstoxikologische Studien verfügbar [6].

Zu den *ex vivo* Modellen zählen beispielsweise die PCLS (precision cut lung slices), dünne Lungengewebeschnitte, die aus tierischen oder humanen Spenderlungen (gesund oder krank) hergestellt werden können [13]. Sie haben den Vorteil, dass die histiotypische Anordnung und die strukturelle Mikroumgebung aller in der Lunge vorhandenen Zelltypen erhalten bleibt, einschließlich derjenigen, die mit dem Immunsystem (d.h. dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen) und der interzellulären Kommunikation verbunden sind [25, 33]. Aus einer Lunge können mehrere Schnitte für eine Reihe an Experimenten generiert werden, wodurch die Anzahl an Versuchstieren stark reduziert werden kann [6, 33, 93, 53].

Im Bereich der klassischen, zellkulturbasierten *in vitro* Modelle gibt es für die Untersuchung der akuten pulmonalen Zytotoxizität bereits seit Jahren eine Vielzahl verschiedener Testsysteme, die stark in ihrer Komplexität variieren können. Neben der Wahl des Zellkulturmodells (z.B. Mono- oder Ko-Kulturen, primäre oder immortalisierte Zelllinien, induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen)) spielt auch die Expositionstechnik, d.h. ob die Zellen unter submersen Bedingungen oder an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (air-liquid interface; ALI) exponiert werden, eine entscheidende Rolle [13, 24, 48, 97, 112].

Zu den neueren Entwicklungen der *in vitro* Modellsysteme zählt die „organ-on-a-chip“-Technologie. Diese Chips stellen eine Art künstliches Organ dar und simulieren die Aktivitäten, die Mechanik und die physiologischen Reaktionen von einzelnen Organen oder Organsystemen [119, 122]. Seit 2010 gibt es die sogenannten „lung-on-a-chip“-Modelle, die die 3-dimensionale Mikroarchitektur der menschlichen Lunge in miniaturisierter Form nachahmen [43, 60]. Diese Chips enthalten winzige Kanäle, Pumpen oder Ventile, über die Lungen- und Blutgefäßzellen, kultiviert auf einer dünnen Membran, mit Blut oder Nährlösung versorgt werden können. Über ein Vakuum und durch eine zyklische mechanische Ausdehnung der Membran wird die dynamische Mikroumgebung und Atmung der Lunge simuliert [13, 43, 63]. Mit Hilfe dieser Chips lassen sich so beispielsweise die Auswirkungen von inhalierten Schadstoffen auf die Lunge, die Absorption von aerosolisierten Therapeutika und die Sicherheit und Wirksamkeit neuer Medikamente testen [42, 47, 100, 124]. Zudem können „lung-on-a-chip“-Modelle mit von Patienten-abgeleiteten iPS-Zellen für die personalisierte Arzneimittelentwicklung eingesetzt werden [111, 61, 80].

Stammzellen finden jedoch nicht nur Anwendung in „lung-on-a-chip“-Modellen, sondern bilden auch den Ausgangspunkt für die Herstellung von Organoiden, *in vitro* generierte zelluläre 3D-Strukturen mit organ- oder gewebespezifischen morphogenetischen und histologischen Eigenschaften [29, 41, 49, 121]. Je nach Art des Organoides können entweder pluripotente Stammzellen (z.B. embryonale Stammzellen, iPS-Zellen), adulte multipotente Stammzellen, aus Organen des Patienten gewonnene Stammzellen oder Vorläuferzellen zum Einsatz kommen, die zur Differenzierung in spezialisierte Zelltypen und zur Selbstorganisation in eine 3D-Struktur fähig sind [12, 30, 62, 85, 123].

Lungen-Organoiden (z.B. bronchiolare Organoiden, alveolare Sphäroide) besitzen ein großes Potenzial, spezifische und entwicklungsbiologische Prozesse (z.B. Entwicklung, Differenzierung, Regeneration), Wirt-Pathogen-Interaktionen und menschliche Lungenkrankheiten zu modellieren und die Wirksamkeit und Toxizität von Wirkstoffkomponenten zu testen [30, 18, 36, 52]. Durch eine genauere Imitation der Lungenmorphologie schafft das organoide Kultursystem eine relevantere Mikroumgebung im Vergleich zu 2D-Kulturen. Hohe Kosten, eine zeitaufwendige und anspruchsvolle Modellentwicklung, sowie Ergebnisschwankungen, die trotz hoher Standardisierung durch unterschiedliche Differenzierungsgrade in einzelnen Organoiden auftreten können, müssen hierbei jedoch noch berücksichtigt werden [36]. Zudem können Lungen-Organoiden bislang nicht der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht ausge-

setzt werden und somit keinen Beitrag zur Untersuchungen der pulmonalen Zytotoxizität von Luftschadstoffen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht leisten [90].

In silico Verfahren, wie z.B. die QSAR-Methoden (quantitative structure-activity relationship), versuchen biologische Effekte aufgrund von quantitativen physiko-chemischen und quantenmechanischen Beziehungen zwischen der Struktur eines Moleküls und dessen Wirkungen (z.B. chemisch, biologisch oder pharmakologisch) vorherzusagen [5, 13]. Die OECD QSAR-Toolbox ist eine Softwareanwendung, die eine Vielzahl von struktur- und aktivitätsbezogenen Profilerstellungstools (z.B. Multi-CASE, TOPKAT und DEREK) kombiniert, um die Identifizierung toxikologisch relevanter Strukturmerkmale, potentielle Wirkungsweisen und bislang fehlende Toxizitätsdaten für die Gefährdungsbeurteilung chemischer Substanzen zu ermitteln [19, 37, 103]. Hierbei werden Informationen aus verschiedensten Datenbanken integriert, Moleküle anhand ihrer chemischen Struktur oder ihres spezifischen Wirkmechanismus profiliert, Transformationen von Chemikalien durch verschiedene Organismen oder Organe simuliert und fehlende experimentelle Werte durch Read-Across- und Trendanalysen vorhergesagt [19]. Bislang existieren jedoch nur wenige QSAR-Modelle für die Vorhersage der inhalativen Toxizität [20].

1.6 *In vitro* Expositionstechniken

In der Mehrzahl aller klassischen *in vitro* Studien werden isolierte Zellen unter submersen Bedingungen exponiert, d.h. die zu untersuchende Substanz wird in einem Expositionsmedium gelöst (Abbildung 1.3 B). Die Aussagekraft dieser Studien ist jedoch im Hinblick auf die Bewertung von luftgetragenen Partikeln als limitiert zu betrachten. Zum einen entspricht die submerse Expositionstechnik nicht der humanen *in vivo* Situation, zum anderen können durch das Lösen der zu untersuchenden Substanz im Expositionsmedium charakteristische physiko-chemische und somit auch toxische Substanzeigenschaften verändert werden. Daher wurden in den letzten Jahren vermehrt verschiedene Testsysteme für die Exposition von Lungenzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht entwickelt [48, 51, 88]. ALI Inhalationsmodelle erlauben die direkte Exposition von Zellen mit der zu untersuchenden Substanz an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht ohne Interaktion der Testpartikel mit Komponenten des Expositionsmediums (Abbildung 1.3 A). Verglichen mit der klassischen, submersen Expositionstechnik wird die biologische und physiologische Situation der humanen Alveole und der Erstkontakt von luftgetragenen Partikeln auf diese Weise besser imitiert [6].

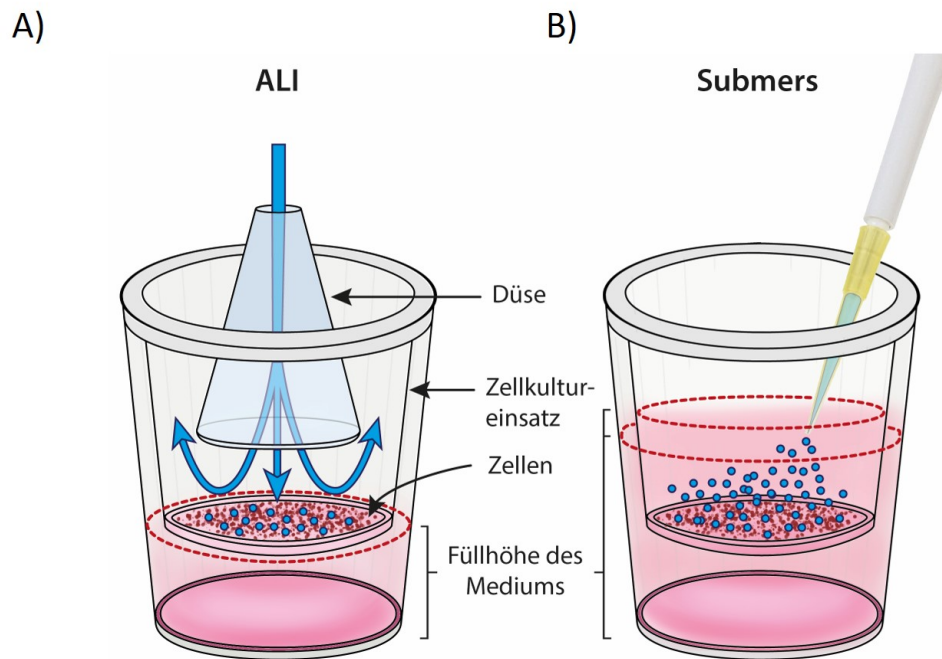


Abbildung 1.3: Vergleich der *in vitro* Expositionstechniken. Exposition von kultivierten Zellen A) am ALI (air-liquid interface) und B) unter submersen Bedingungen. Modifiziert von [106].

Aerosolexpositionen sind wesentlich komplexer als Expositionen von reinen Gasen [78, 98]. Gase bestehen aus einem homogenen Gemisch von Teilchen, die bei Standardbedingungen, d.h. einer Temperatur von 20 °C und einem Druck von 1 bar im gasförmigen Aggregatzustand vorliegen. Die Teilchen können sich im großen Abstand voneinander vollkommen frei bewegen und den zur Verfügung stehenden Raum vollständig und gleichmäßig ausfüllen [117]. Im Gegensatz dazu sind Aerosole als Gemische aus festen oder flüssigen Aerosolteilchen in einem Trägergas definiert. Das Aerosolverhalten wird dabei durch die Eigenschaften der Teilchen und des Trägergases bestimmt, wobei aufgrund der zwei vorhandenen Aggregatzustände (fest/gasförmig bzw. flüssig/gasförmig) von keiner homogenen Verteilung der Teilchen ausgegangen werden kann [35]. Aufgrund der inhomogenen Verteilung stellen sie für Expositionsversuche eine große Herausforderung dar [39].

1.7 CULTEX[®] Radial Flow System (RFS)

Das CULTEX[®] System ist ein modular gestaltetes *in vitro* Expositionssystem, das die Direktexposition von kultivierten Zellen am ALI gegenüber Gasen, Partikeln oder komplexen Atmosphären (z.B. Zigarettenrauch, Dieselabgase) erlaubt [6, 81]. Im Gegensatz zu sequenziellen Expositionsmodellen mit linearer Aerosolführung ermöglicht der modulare Aufbau der CULTEX[®] Methode eine radiale Zuleitung mit einer homogenen Gleichverteilung des Aerosols auf die Zellen.

Der komplette Aufbau des CULTEX[®] RFS (Radial Flow Systems) besteht aus dem CULTEX[®] Aerosolgenerator zur Erzeugung der Testatmosphäre, zwei CULTEX[®] RFS Modulen zur parallelen Exposition der Zellen mit Reinluft und der zu testenden Substanz, und einer Vakuumeinheit einschließlich computergesteuerter Massenflussregler (Abbildung 1.4). Die Testsubstanzen für die Aerosolgeneration werden über eine steuerbare, hydraulische Presse zu Substanzpresslingen verdichtet. Durch optimale Einstellung der

Presszeit (in Sekunden) und des Pressdrucks (in bar) werden die Partikel der Testsubstanz in einem sogenannten Presszylinder schichtweise zu einem stabilen Presskuchen komprimiert [3, 81].

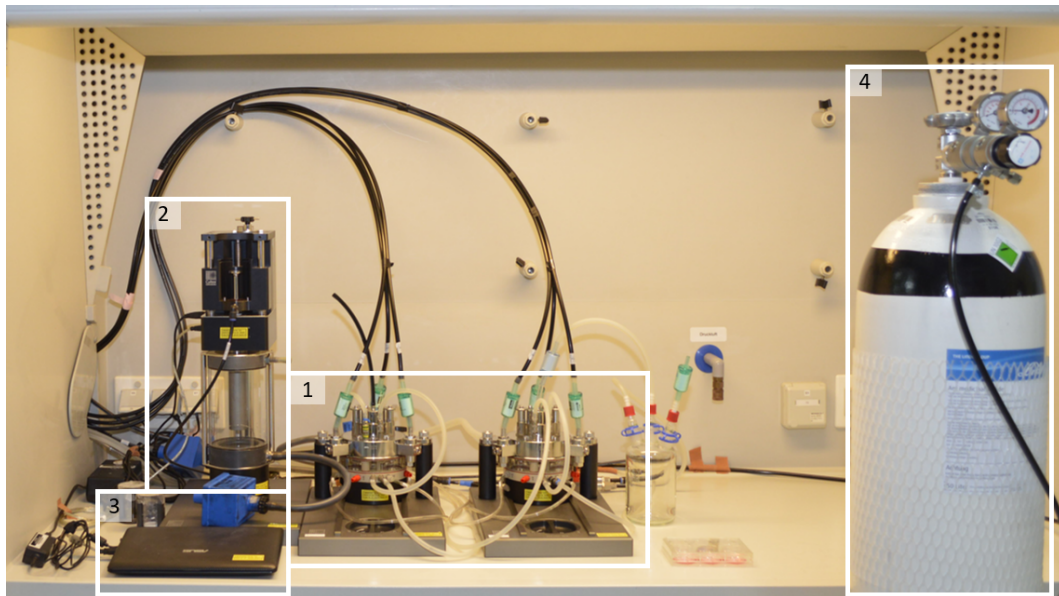


Abbildung 1.4: Aufbau der CULTEX® RFS Anlage. Das Setup besteht aus zwei CULTEX® Modulen für die Reinluft- und Partikelexposition (1), einem CULTEX® Aerosolgenerator inklusive Elutriator (2), einer Steuereinheit (3) und Reinluft (4). Modifiziert von [104].

Der Aerosolgenerator, basierend auf dem *Dust Feeder* nach Wright, erzeugt die Testatmosphäre durch kontrollierte Abschabung der Partikel aus dem zuvor generierten Substanzpressling [118]. Die Partikel werden durch Zuleitung von Druckluft über den Elutriator, ein spezielles Selektionsgefäß für die Ableitung von überschüssigem Aerosol und der gleichzeitigen größenspezifischen Vorselektion der Partikel in einem kontinuierlichen Fluss, zu dem CULTEX® RFS Modul geleitet [3, 58].

Das CULTEX® RFS Modul besteht aus dem Aerosolführungs- und Probenaufnahmemodul (Abbildung 1.5 A). Letzteres besitzt drei Expositionskammern, in denen die Zellkultureinsätze mit den kultivierten Zellen eingesetzt werden. Für die Exposition werden die Zellen durch Entfernen des apikalen Mediums auf eine biphasische Kulturführung umgestellt, so dass die Zellen nur noch basal mit Nährstoffen des Expositionsmediums versorgt werden und apikal in direktem Kontakt zur umgebenden Testatmosphäre stehen (Abbildung 1.5 B). Die Aufrechterhaltung der Zellvitalität wird durch einen stabilen und auf 37 °C erwärmten Mediumspiegel gewährleistet. Ein definierter Anteil des Aerosols wird mittels Vakuumpumpe und Massenflussregler durch die radial um einen Hauptkanal angeordneten Zuleitungen in die drei Expositionskammern gesaugt. Dadurch wird sichergestellt, dass die komplexe Testatmosphäre homogen und in einem kontinuierlichen Fluss über die Zellen geleitet wird, wobei die Partikel aufgrund von Sedimentation und Diffusion auf die Zellen abgeschieden werden. Durch das Mitführen von Inkubator-Kontrollen (nicht exponierte Zellen im Inkubator) und der parallelen Exposition der Zellen mit Reinluft und der zu testenden Substanz lassen sich nach Messung der Zellvitalität Aussagen über das akute Toxizitätspotential einer Substanz treffen [3, 6, 58, 81].

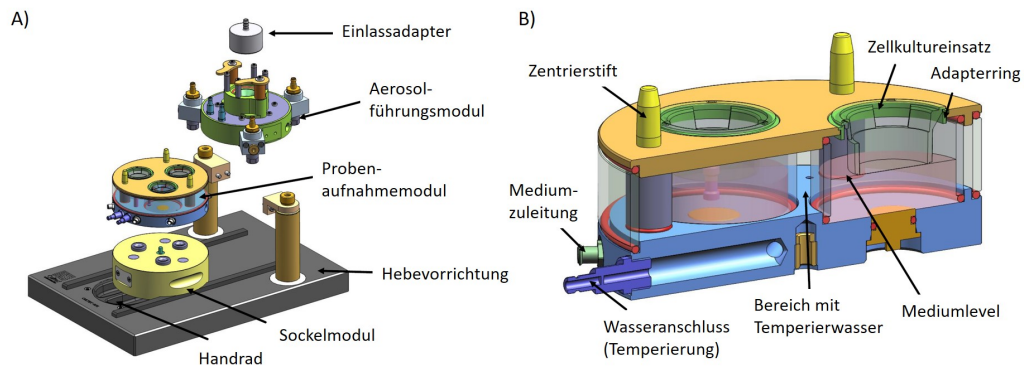


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des CULTEX® RFS. A) Gesamtaufbau des CULTEX® RFS. B) Querschnitt durch das Probenaufnahmemodul. Modifiziert von [3].

1.8 Prävalidierungsstudie des CULTEX® RFS

Im Allgemeinen leisten *in vitro* Modelle einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der akuten Toxizität von inhalierbaren Partikeln. Damit solche Systeme für regulativ anerkannte toxikologische Risikobewertungen, z.B. für die EU Chemikalienverordnung REACH genutzt werden können, müssen sie zuvor durch Validierungsstudien auf ihre Anwendbarkeit überprüft werden [22].

Das CULTEX® RFS wurde in einem durch das BMBF-geförderten Drittmittelprojekt (Bundesministerium für Bildung und Forschung; FKZ 0315710 A-C) im Rahmen einer Prävalidierungsstudie auf die von der EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) vorgegebenen Anforderungen untersucht [98]. EURL-ECVAM ist in Europa für die Validierung und Entwicklung von alternativen Testmethoden im Sinne des 3R-Prinzips zuständig. Zur Feststellung der Validität von *in vitro* Systemen werden sieben ECVAM Module herangezogen, die eine genaue Beschreibung bezüglich Entwicklung, Optimierung und Validierung eines Testsystems erlauben [22]. In der Prävalidierungsstudie konnte die allgemeine Anwendbarkeit des CULTEX® RFS, seine Transferierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Stabilität gezeigt werden. Das Verfahren wurde im Hinblick auf die technische Etablierung und Durchführung in verschiedenen Laboren getestet. Die ECVAM Module 1-4 (Definition der Testmethodik, Reproduzierbarkeit des Verfahrens innerhalb und zwischen den Laboratorien sowie seine Transferierbarkeit) wurden erfolgreich abgeschlossen. Die ECVAM Module 5-7 (Erstellung eines Prädiktionsmodells, Definition des Test-Anwendungsbereiches und der Leistungsanforderungen) konnten innerhalb dieser Studie nicht abschließend bearbeitet werden. Zudem traten inkonsistente und teilweise stark streuende Zellvitalitätsdaten innerhalb der Reinluftkontrollgruppen zwischen den Laboren auf, deren Ursache im Rahmen dieser Prävalidierungsstudie nicht geklärt werden konnte [98]. Anschließende Untersuchungen zur Methodenoptimierung (z.B. Modulreinigung zur Reduzierung partikulärer Bestandteile, Verringerung der Luftstromraten, Reduzierung des Systemvordrucks (auf 3 bar) oder Anpassung der Handhabung der Inkubatorkontrollen) verbesserten die Zellvitalität der Reinluftkontrollen geringfügig. Erst der Austausch der bisher verwendeten Zellkultureinsätze mit geschlossenen Seitenwänden gegen Einsätze mit einer höheren Porendichte und drei Seitenwandöffnungen führte zu einer Erhöhung der Luftfeuchtigkeit innerhalb der Einsätze und zu einer signifikanten Verbesserung der Zellvitalität und -morphologie (Abbildung 1.6). Geringfügige Schwankungen der Zellvitalität traten nur noch bei späteren Expositionszeitpunkten (60 min) auf [104].

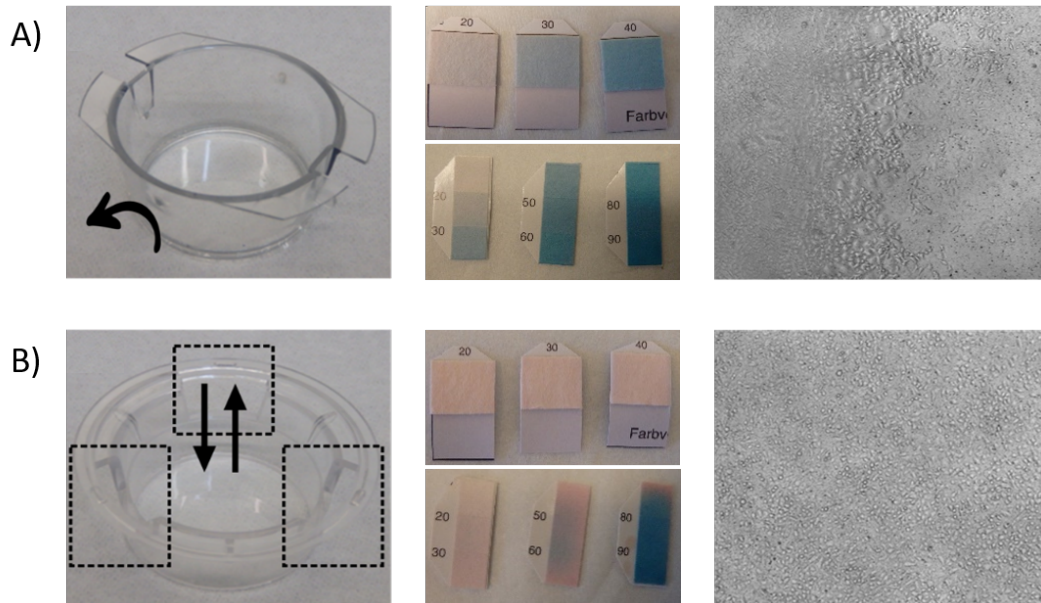


Abbildung 1.6: Vergleich der Zellkultureinsätze von BD Falcon[®] und Corning[®]. A) Verwendung der BD Falcon[®] Zellkultureinsätze mit geschlossenen Seitenwänden resultierten in einer geringen Luftfeuchtigkeit innerhalb der Einsätze während der Exposition und in einer veränderten Zellmorphologie. B) Corning[®] Transwell Zellkultureinsätze mit drei Seitenwandöffnungen führten zu einer signifikanten Verbesserung der Luftfeuchtigkeit innerhalb der Einsätze und der Zellmorphologie. Modifiziert von [104].

2 Zielsetzung

2.1 Weiterführende Validierung des CULTEX[®] RFS Verfahrens und Optimierung eines Prädiktionsmodells zur Bewertung der akuten inhalativen Toxizität von Stäuben

Ziel dieser Arbeit war die abschließende Validierung des CULTEX[®] RFS unter Berücksichtigung aller ECVAM Module und die Optimierung und Verfeinerung des Prädiktionsmodells zur Bewertung der akuten inhalativen Toxizität luftgetragener Partikel. Das Forschungsvorhaben wurde als Verbundprojekt mit vier Kooperationspartnern durchgeführt und auf drei Projektphasen aufgeteilt. In der Konsolidierungsphase erfolgte die Harmonisierung der Versuchsbedingungen, die Optimierung der Reinluftkontrollen (Wechsel der Zellkultureinsätze, Stabilisierung des pH-Wertes des Expositionsmediums) und die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten aus der Prävalidierungsstudie. In den zwei darauffolgenden Blindphasen wurden 20 kodierte Substanzen in unabhängigen, aber identischen Experimenten mittels Vitalitätsassays in allen drei Laboren auf ihre akute Zytotoxizität untersucht.

Für die Validierung der Testmethode wurden zwei binäre Vorhersagemodelle (prediction model (PM) 50% und 75%) zur Bewertung und Interpretation der Testsubstanzen, sowie für den Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Referenzdaten herangezogen. Im Allgemeinen fokussiert sich der validierungsformelle Ansatz auf die Wahl eines bestimmten PM, das aufgrund der guten Diskriminierung der Substanzen oftmals bei 50% festgesetzt wird (= PM 50%) [38, 95]. Im Rahmen dieser Studie wurde der formelle Ansatz ausgedehnt, indem zusätzlich noch ein etwas empfindlicheres, aber weniger spezifischeres PM 75% festgelegt wurde.

2.2 Anpassung und Anwendung der CULTEX[®] Methode für die Exposition von Zellen mit Flüssig-Aerosolen am ALI

Die Anwendung des CULTEX[®] RFS als Tierersatzmodell zur Bewertung der akuten Toxizität von inhalierbaren Substanzen ist auch für den Bereich der Wehrmedizin von großem Interesse. Durch den militärischen Einsatz von z.B. Hand- und Rauchgranaten werden hohe Mengen an Partikeln freigesetzt, die beim Einatmen gesundheitsschädigende Wirkungen haben können und dahingehend noch genauer untersucht werden müssen (Abbildung 2.1 A). Die Exposition gegenüber Flüssig-Aerosolen stellt sowohl für Soldaten als auch Zivilisten ein großes Gesundheitsrisiko dar, wie der Einsatz von S-Lost befüllten Granaten im syrischen Marea 2015 zeigt (Abbildung 2.1 B) [31, 72].

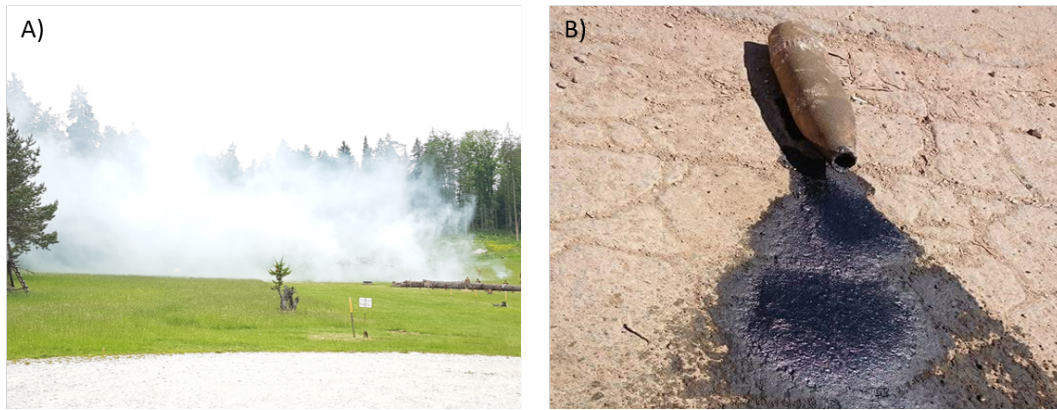


Abbildung 2.1: Inhalative Expositionsgefahren mit wehrmedizinischer Relevanz. A) Rauchgranate, aufgenommen auf einem Truppenübungsplatz der Bundeswehr. B) S-Lost befüllte Granate [31].

Aufgrund der noch unvollständig aufgeklärten Pathophysiologie von S-Lost existiert bis heute keine kausale Therapie [55, 126]. Zellkultur-basierte *in vitro* Modelle können einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung und Untersuchung potenzieller Therapeutika und Antidota nach S-Lost Exposition leisten [74]. Die Aerosolbildung des hochtoxischen S-Lost stellt jedoch aufgrund der einzuhaltenden Sicherheitsvorkehrungen eine große Herausforderung dar, weswegen bislang keine geeigneten Systeme für die Untersuchung der Toxizität von S-Lost Aerosolen am ALI vorhanden sind [46].

Ziel dieser Arbeit war die Anpassung und Anwendung der CULTEX[®] Methode für die Exposition kultivierter Lungenzellen mit S-Lost Aerosolen am ALI. Da das CULTEX[®] RFS in erster Linie für die Untersuchung von Partikel-Expositionen ausgelegt ist, musste das Setup für die Exposition mit Flüssig-Aerosolen angepasst und modifiziert werden. Hierfür wurde nach einer geeigneten Alternative gesucht, die eine reproduzierbare und gleichmäßige Verteilung des S-Lost Aerosols auf die Zellen gewährleistet und dabei alle erforderlichen Sicherheitsanforderungen erfüllt. Zudem wurde untersucht, ob die Exposition von Zellen mit S-Lost am ALI gegenüber der klassischen submersen S-Lost Exposition zu bevorzugen ist.

3 Zusammenfassung der kumulativen Arbeiten

3.1 Validierung des CULTEX[®] RFS für die Bewertung der akuten inhalierbaren Toxizität von luftgetragenen Partikeln

Das CULTEX[®] RFS ist ein modulares *in vitro* Testsystem für die homogene Direktexposition von kultivierten Zellen am ALI gegenüber den zu untersuchenden Substanzen. Im Rahmen einer Prävalidierungsstudie konnte der prinzipielle Einsatz der CULTEX[®] Methode hinsichtlich Reproduzierbarkeit, Stabilität und Transferierbarkeit erfolgreich gezeigt werden [98].

In einem durch das BMBF-geförderten Forschungsvorhaben wurde durch Optimierung des CULTEX[®] RFS eine erfolgreiche Validierung und Verfeinerung des Prädiktionsmodells erzielt. Für die Validierungsstudie wurden initial die Endpunkte, Parameter und Geräteeinstellungen der Prävalidierungsstudie übernommen.

Ergebnisse der Prävalidierungsstudie belegten, dass die Bestimmung der Zellmembrantegrität und somit der Zellletalität mit Hilfe des Laktat-Dehydrogenase-(LDH)-Assays für dieses Studiendesign nicht geeignet ist, da es zu Wechselwirkungen der Substanzen mit Bestandteilen des LDH-Assays kommen kann und die ablaufenden Reaktionen somit falsch negativ bzw. falsch positiv beeinflusst werden [40, 91]. Als Endpunktbestimmung und zur Einstufung der verwendeten Substanzen bezüglich ihrer akuten Toxizität wurde in der Validierungsstudie die metabolische Aktivität der Zellen nur mit Hilfe des Vitalitätstest WST-1 gemessen und auf die Durchführung eines LDH-Assays verzichtet.

Zu Beginn des Projektes traten jedoch starke und unregelmäßige Schwankungen der Zellvitalitäten innerhalb der Reinluftkontrollgruppen zwischen und innerhalb der Labore auf (Abbildung 3.1 A). Zudem wurde eine sporadisch auftretende Tröpfchenbildung auf den Zellen nach Exposition und eine unzureichende Membranqualität der Zellkultureinsätze beobachtet (Abbildung 3.1 B-D).

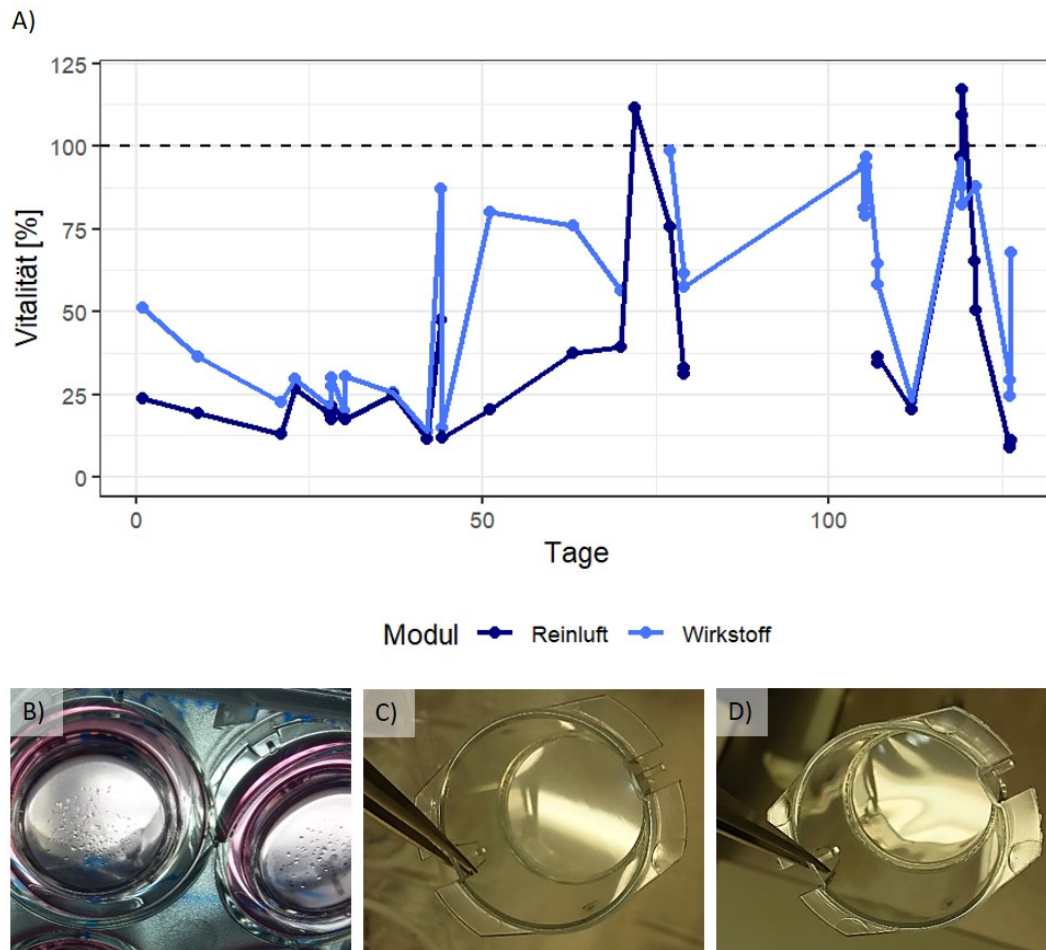


Abbildung 3.1: Schwankende Reinluftvitalitäten zu Beginn der Validierungsstudie. A) Mittelwert der Zellvitalitäten nach Reinluftexposition zu Beginn des Projektes. Der zeitliche Verlauf der Reinluftexpositionen unter Verwendung der Falcon® Zellkultureinsätze zeigte starke Schwankungen der Zellvitalitäten. B) Tröpfchenbildung auf den Membranen innerhalb der Zellkultureinsätze nach Reinluftexposition (Ansicht von unten). C) Glatte und D) wellige Membranbeschaffenheit der Falcon® Zellkultureinsätze.

Nach intensiver Fehlersuche und Optimierung der methodischen Grundlagen führte ein Wechsel der Zellkultureinsätze und des Herstellers von BD Falcon® zu Corning® zu einer signifikanten Verbesserung der Reinluftvitalitäten. Gelegentliche Schwankungen der Vitalitäten nach längeren Expositionszeiten traten aufgrund von Änderungen in der Zusammensetzung der Reinluft auf und konnten durch Stabilisierung des pH-Wertes des Expositionsmediums durch Erhöhung der HEPES-Konzentration von 25 mM auf 100 mM behoben werden (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: pH-Werte des Expositionsmediums vor und nach Exposition
(t = Dauer der Exposition, n = 4, ± = Standardabweichung)

	Expositionsmedium	
	25 mM HEPES	100 mM HEPES
pH (t = 0 h)	7,24 ± 0,09	7,10 ± 0,10
pH (t = 2 h)	7,72 ± 0,03	7,30 ± 0,09

Weitere Harmonisierungen (Entwicklung spezieller CULTEX® Manschetten, Optimierung

der Zellzahl und Anpassung des Zellvitalitätsassays WST-1) erzielten nachhaltige und sehr stabile Reinluftvitalitäten von ca. 95-100%. Nach erfolgreichem Abschluss der Konsolidierungsphase (Methodenoptimierung und Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten der Prävalidierungsstudie) begann die eigentliche Validierung des CULTEX[®] RFS. Die Vitalität der humanen Lungenepithelzellen A549 wurde nach Direktexposition am ALI mit 20 ausgewählten und kodierten Testsubstanzen in drei Laboren unabhängig voneinander untersucht. Die Auswahl der Substanzen erfolgte dabei unabhängig und nach speziell ausgewählten und definierten Kriterien [105]. Als Quelle und Grundlage für die Substanzauswahl dienten REACH-Dossiers aus der ECHA-Datenbank und Literaturangaben. Mit insgesamt 46 Experimenten pro Labor wurden 13 Substanzen dreifach und sieben Substanzen einfach getestet. Die akute Zytotoxizität der Testsubstanzen wurde mit den jeweiligen Inkubator-Kontrollen (nicht exponierte Zellen) verglichen und als Indikator für die Toxizität verwendet. Testsubstanzen, die zu einer Abnahme der Zellvitalität unter 75% (PM 75%) oder 50% (PM 50%) bei einer der drei Expositionsdosen (25, 50 oder 100 µg/cm²) führten, wurden als akut inhalationsgefährlich eingestuft. Mittels zweifaktorieller ANOVA wurden die validen Testergebnisse (131 von 138 = 95%) auf statistisch signifikante Variabilität zwischen den Experimenten untersucht. Die Interpretation der Bewertung der Testsubstanzen erfolgte anschließend mit zwei binären Vorhersagemodellen (PM 75% und PM 50%).

Der Vergleich der Ergebnisse mit den vorhandenen *in vivo* Daten zeigte eine Gesamtkonkordanz von 85% (17/20), eine Spezifität von 83% (10/12) und eine Sensitivität von 88% (7/8). In Abhängigkeit des angewandten PM lag die Reproduzierbarkeit innerhalb und zwischen den Laboren bei 90-100%. Faktoren, die zu den drei nicht-übereinstimmenden Ergebnissen geführt haben können, wurden im Detail diskutiert.

Die Ergebnisse dieser Validierungsstudie zeigten, dass sich das CULTEX[®] RFS als ein robustes, transferierbares und prädiktives Screening-Verfahren für die qualitative Bewertung von Substanzen hinsichtlich ihres akuten toxischen Inhalationspotenzials bewährte und eine vielversprechende Alternativmethode zum Tierversuch darstellte.



Validation of the CULTEX® Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles



Amelie Tsoutsouloupoulos^{a,*}, Katrin Gohlsch^b, Niklas Möhle^c, Andreas Breit^b, Sebastian Hoffmann^e, Olaf Krischenowski^{c,d}, Harald Mückter^b, Thomas Gudermann^b, Horst Thiermann^a, Michaela Aufderheide^{c,d}, Dirk Steinritz^{a,b}

^a Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Munich, Germany

^b Walther-Straub-Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

^c Cultex® Laboratories GmbH, Hannover, Germany

^d Cultex® Technology GmbH (formerly Cultex® Laboratories GmbH), Hannover, Germany

^e seh consulting + services, Paderborn, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

CULTEX® RFS

Acute inhalation toxicity

In vitro

Air-liquid interface

Validation

ABSTRACT

The CULTEX® Radial Flow System (RFS) is a modular *in vitro* system for the homogenous exposure of cells to airborne particles at the air-liquid interface (ALI). A former pre-validation study successfully demonstrated the general applicability of the CULTEX® RFS and its transferability, stability and reproducibility. Based on these results, the methodology was optimized, validated and prediction models for acute inhalation hazards were established. Cell viability of A549 cells after ALI exposure to 20 pre-selected test substances was assessed in three independent laboratories. Cytotoxicity of test substances was compared to the respective incubator controls and used as an indicator of toxicity. Substances were considered to exert an acute inhalation hazard when viability decreased below 50% (prediction model (PM) 50%) or 75% (PM 75%) at any of three exposure doses (25, 50 or 100 µg/cm²). Results were then compared to existing *in vivo* data and revealed an overall concordance of 85%, with a specificity of 83% and a sensitivity of 88%. Depending on the applied PM, the within-laboratory and between-laboratory reproducibility ranged from 90 to 100%.

In summary, the CULTEX® RFS was proven as a transferable, reproducible and well predictive screening method for the qualitative assessment of the acute pulmonary cytotoxicity of airborne particles.

1. Introduction

About seven million deaths from air pollution are reported annually, showing that exposure to inhaled toxicants still remains a major public health concern (Faber and McCullough, 2018; World Health Organization, 2016). Knowledge of the acute inhalation toxicity provides therefore the basis for hazard assessment and risk management of inhalable substances (Clippinger et al., 2018a) which is compulsory in regulatory processes worldwide. For example, in Europe, chemicals with substantial inhalation exposure that are manufactured or imported with ≥10 tons per year should be tested for their acute inhalation toxicity in accordance with the requirements of the EU legislation REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) (European Chemicals Agency, 2016). The commonly accepted test guidelines (TG) (TG 403, TG 436, and TG 433), adopted by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD),

rely on animal models to assess the acute inhalation toxicity. No alternative *in vitro* methods have been sufficiently validated so far (Clippinger et al., 2018a; Jackson et al., 2018; OECD, 2009; Lacroix et al., 2018). In recent years, however, research focused on reducing or refining animal experiments, an aspect that is also respected in the REACH guidelines. The TG 433, for instance, was introduced in 2017 and is based on evident clinical signs of toxicity, replacing lethality as an endpoint (Clippinger et al., 2018a; Da Silva and Sorli, 2018; European Chemicals Agency, 2017a). Animal studies are, however, ethically, scientifically and economically questionable. They are time and cost consuming, showing anatomical and physiological differences compared to the e.g. human lung, and thus, making a translation from animals to humans difficult (Faber and McCullough, 2018; Lacroix et al., 2018; Da Silva and Sorli, 2018). Therefore, significant research efforts have been invested to develop adequate non-animal inhalation toxicity testing models (e.g. *in vitro* cell cultures, lung-on-a-chip models,

* Corresponding author.

E-mail address: amelie1tsoutsouloupoulos@bundeswehr.org (A. Tsoutsouloupoulos).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.020>

Received 10 December 2018; Received in revised form 8 March 2019; Accepted 15 March 2019

Available online 16 March 2019

0887-2333/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ex vivo human precision cut lung slices) or computer-based approaches that predict the biological effects based on the structure of a chemical or the deposition pattern of a substance in the respiratory tract, e.g. QSAR (quantitative structure-activity relationship) or CFD (computational fluid dynamic) models (Clippinger et al., 2018a; Huh et al., 2010; Clippinger et al., 2018b; Clippinger, 2018; Sewald and Braun, 2013; Veith et al., 2009; Aufderheide, 2005). In terms of *in vitro* cell culture methods, test systems can vary in complexity from submerged mono- or co-cultures to aerosol systems exposing cell cultures at the air-liquid interface (ALI) (Clippinger et al., 2018a; Thorne et al., 2018). In the last years, many ALI *in vitro* inhalation models have been used in research as they mimic the human exposure with higher biological and physiological similarity than submerged exposure experiments (Lacroix et al., 2018; Sayes and Singal, 2018). Exposure of cells under submerged conditions may affect and alter the physico-chemical properties of a test substance and thus, the toxic properties of a test substance (Lenz et al., 2013).

The CULTEX® Radial Flow System (RFS) is a modular *in vitro* exposure system that enables homogenous exposure of cultivated human lung cell lines to dusts and aerosols at the ALI, showing substantial similarity to the physiological conditions in the human alveolar region and the inhalation situation (Rach et al., 2014). Within a pre-validation study, substantial progress was made to optimize this methodology (Steinritz et al., 2013). The results of the pre-validation study demonstrated the general applicability, robustness and transferability of the CULTEX® RFS. In particular, the quality of the clean air controls was identified to be a critical parameter to allow sound interpretation of the results.

This study is a continuation of the pre-validation study and focuses on the optimization and validation of the CULTEX® RFS for acute inhalation cytotoxicity testing using a set of 20 dusty substances with *in vivo* reference results.

2. Materials and methods

2.1. CULTEX® Radial Flow System (RFS)

The CULTEX® RFS was used as described in previously published articles (Steinritz et al., 2013; Aufderheide et al., 2013). The complete setup of the CULTEX® RFS (Cultex® Technology GmbH, Hannover, Germany) consists of i) the CULTEX® Dust Generator (DG) (Cultex® Technology GmbH, Hannover, Germany) for generating the test aerosol, ii) two CULTEX® RFS modules for the parallel exposure of cells with clean air and test substance, and iii) the vacuum unit including computer controlled mass flow controllers (MCFs, Bronkhorst Deutschland Nord, Kamen, Germany) and filters. Test substances were pressed into powder cakes using the fully controllable CULTEX® HyP - Hydraulic Press (Cultex® Technology GmbH, Hannover, Germany).

2.2. Chemicals and test substances

All laboratories acquired the chemicals and test substances from the same manufacturer and with same lot numbers to ensure full comparability between laboratories. Dulbecco's Minimum Essential Medium (D-MEM, growth medium without HEPES), fetal bovine serum (FBS Superior), phosphate buffered saline (PBS), gentamycin, and trypsin/EDTA (0.05%/0.02%) were purchased from Biochrom (Berlin, Germany). D-MEM used for the exposure medium (containing 25 mM HEPES) was obtained from Gibco-Invitrogen (Darmstadt, Germany). HEPES buffer was acquired from Th. Geyer (Renningen, Germany) and WST-1 assay was purchased from Abcam (Cambridge, United Kingdom). Cell culture inserts were obtained from Corning (Wiesbaden, Germany). The test substances were purchased from several distributors or directly from the manufacturer (see Table 1). Cadmium telluride was kindly provided by 5N Plus.

2.3. Study design

Three laboratories located in Germany (two labs in Munich and one lab in Hannover) tested independently 20 substances for their acute inhalation hazard according to detailed standard operating procedures (SOPs). The study was divided into three parts to confirm the results of the former pre-validation study (consolidation phase) (Steinritz et al., 2013), and to assess the transferability, reproducibility and accuracy of the CULTEX® RFS procedure (blind phases I and II) according to international requirements (Hartung et al., 2004; OECD, 2005). Within phase I, 13 coded substances were tested in three independent experiments by each laboratory in a blind manner. Phase II was performed by testing seven coded substances in one exposure experiment, also in a blind manner. Test substances with relevant available *in vivo* reference data were independently selected based on pre-defined criteria (e.g. available *in vivo* reference data, unambiguous CLP (Classification, Labelling and Packaging) classification of acute inhaled toxicity, selection between toxic and non-toxic compounds, press ability and generation of a dust atmosphere) by screening REACH registration dossiers (for ECHA data source details see Table S2) and the literature.

2.4. Test method optimizations

At the beginning of the validation study several protocol optimizations were implemented to link the results to the pre-validation study and to improve the results, respectively (see Table 2 for details). The optimizations included the change from side wall closed inserts from BD Falcon to Corning® Transwell® cell culture inserts with three side wall openings. These inserts have been proven to be more appropriate for exposure experiments at the ALI due to the high density and homogenous distribution of the membrane pores (Tsoutsouloupoulos et al., 2016). The three side wall openings of the inserts had to be covered during exposure in order to avoid a leakage of test particles through the side wall openings and thus, a possibly contamination of the medium. For this purpose, special CULTEX® insert sleeves (Fig. 1) were developed by use of a 3D printer. The cell number was adjusted and reduced from $4 \cdot 10^5$ cells to $3 \cdot 10^5$ cells/insert. Besides, pH of the exposure medium was stabilized by increasing the HEPES concentration from 25 mM to 100 mM. Furthermore, the performance of the WST-1 assays was adjusted regarding the dilution rate and incubation time.

After successful optimization of the experimental setup, the final parameters for exposure experiments of the consolidation phase and blind phase I and II were defined (Table 3).

2.5. Aerosol generation

Dry powder atmospheres were generated from the 20 test substances listed in Table 1. Test compounds were pressed into powder cakes by the CULTEX® HyP press according to the settings given in Table 1. Using the CULTEX® DG, the highly compressed test compounds were scraped off by a rotating scraper with predefined parameters (rotation speed 800 U/min, air-flow 8 L/min), generating an aerosol according to Wright (Wright, 1959).

In preliminary experiments the doses for the exposure of the cells were estimated according to the methods described in (Aufderheide et al., 2017). Briefly, the deposition of the particles within the system was estimated on glass fiber filters (Type: MNGF-1; Machery-Nagel, Germany) fixed via a clip fit to a metal copy of the transwell inserts (insert dummy, Fig. 2). Such “dummy insert” with a filter was used to collect the deposited particle mass, which was analyzed by an ultramicrobalance (SE2F Microbalance, readability: 0.1 mg; Sartorius GmbH, Germany).

The deposition rate of the test substances was adjusted to $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ per 15 min of exposure, resulting in total deposited doses of $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, and $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ at the end of 15, 30, and 60 min of particle deposition time, respectively. Press conditions of the respective test substances were established and characterized by Cultex® Technology

Table 1

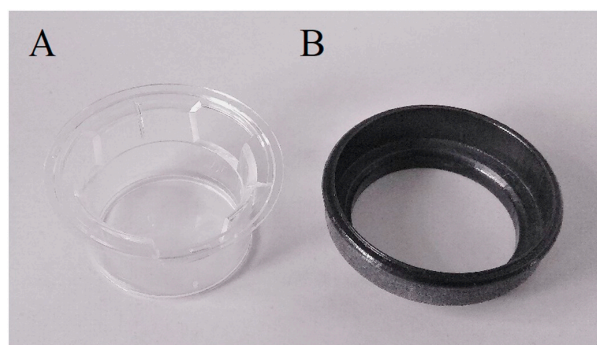
Test substances, pressing conditions and scraping parameters for the generation of dry powder atmospheres.

Test substance	CAS number	Distributor	Pressure for pressing [kg]	Press plunger	Blade type	Feed rate [mm/h]	Phase of study
D(+)-lactose monohydrate	5989-81-1	Fluka	500	Stainless steel	1	9.97	Consolidation Phase
	7758-98-7,	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	1	4.50	
	10124-44-4						
copper(II) sulfate	1317-38-0	io-li-tec	500	Stainless steel	1	1.95	
	1318-23-6	Sasol	500	Stainless steel	1	0.98	
tetrapotassium pyrophosphate	7320-34-5	Sigma-Aldrich	500	Plastic	2	5.11	Blind Phase I
tungsten(IV) carbide	12070-12-1	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	1	0.73	
tungsten(IV) carbide nano	12070-12-1	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	1	0.73	
N,N'-ethylenebis(N-acetylacetamide)	10543-57-4	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	3	6.08	
sodium metavanadate	13718-26-8	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	2	3.41	
cetylpyridinium chloride	123-03-5,	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	1	15.08	
	6004-24-6						
N-lauroylsarcosine sodium salt	137-16-6	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	1	6.08	
cycloheptapentylolose	7585-39-9	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	2	14.11	
zinc dimethyldithiocarbamate	137-30-4	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	1	1.70	
copper(II) hydroxide	20427-59-2	Sigma-Aldrich	500	Plastic	1	0.97	
silicon dioxide	7631-86-9	Sigma-Aldrich	500	Stainless steel	1	2.19	
diammonium hydrogenorthophosphate	7783-28-0,	Sigma-Aldrich	650	Stainless steel	3	15.32	
	14265-44-2						
disodium fluorophosphate	10163-15-2	Sigma-Aldrich	700	Stainless steel	1	7.05	
zinc selenite	13597-46-1	Alfa Aesar	500	Plastic	3	1.46	Blind Phase II
neodymium oxide	1313-97-9	BOC Sciences	500	Stainless steel	3	1.22	
tetrabromophthalic anhydride	632-79-1	BOC Sciences	500	Stainless steel	3	7.30	
vanadium(III) oxide	1314-34-7	BOC Sciences	500	Plastic	3	1.95	
divanadium pentaoxide	1314-62-1	Sigma-Aldrich	500	Plastic	1	7.54	
cadmium telluride	1306-25-8	5N Plus	650	Plastic	1	17.76	
potassium hydrogen monopersulfate	70693-62-8	Merck	750	Plastic	3	12.89	

Table 2

Experimental setup of the validation study.

	Pre-validation study	Validation study
Type of insert	BD Falcon®	Corning® Transwell® (with purpose-built sleeves)
Cell number	4·10 ⁵ cells/insert	3·10 ⁵ cells/insert
Exposure medium	D-MEM with 25 mM HEPES and antibiotics	D-MEM with 100 mM HEPES and antibiotics
Cell viability assay	WST-1 assay from Roche Dilution rate = 1:10 Incubation time = 30 min	WST-1 assay from Abcam Dilution rate = 1:7 Incubation time = 60 min

**Fig. 1.** Type of cell culture insert and insert sleeve. (A) Corning® Transwell® cell culture insert with three side wall openings; (B) purpose-built insert sleeve.

GmbH. Depending on the press properties, two different kinds of press plunger made of either plastic or stainless steel (Fig. 3), distinct types of scraping blades (Fig. 4) and individual feed rates (Table 1) were used. The choice of knife und plunger depends on the physical and chemical

properties of the material (for example: strength, sticky, dry, coarse or fine) and was determined in preliminary tests. Most compounds could be scraped by all three blade types. In this case, no difference between the respective blade designs was observed with regard to particle size and distribution. Some compounds, however, were found to be very delicate during pressing and scraping and thus only one of the blade designs turned out to be appropriate. Knives with blades were used for substances pressed at high pressure, while very fine-grained materials pressed at low pressure were processed with knives without blades to avoid breaking out pieces of particles. Compressed air in accordance with DIN EN 12021 (Linde Group, Germany) was used as carrier gas.

The generated particle mass was guided into the Elutriator by a constant airflow of 8 L/min, a reservoir for the generated particulate atmosphere, designed in such a way that particles bigger than 7 µm were deposited within the reservoir, whereas smaller particles were transported to the module to interact with the cells. For general characterization of the particles (particle number and mass distribution) an analysis with an Aerodynamic Particle Sizer APS (#3321, TSI Incorporated) was performed once by the reference laboratory (Steinritz et al., 2013).

2.6. Cell culture

The human lung epithelial cell line A549 (ATCC number CCL-185) was used for exposure experiments (Lieber et al., 1976; Giard et al., 1973). Cultivation and seeding of cells were performed according to detailed and harmonized SOPs in order to guarantee an equal handling of cells in each laboratory. A549 cells were cultivated in growth medium (D-MEM supplemented with 10% FBS Superior and 5 µg/mL gentamycin) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Passage of cells was done every 2–3 days.

2.7. Exposure experiments

A549 cells (passage 5–35) were seeded in Corning® Transwell® cell

Table 3
Final setup conditions for exposure experiments.

Medium	Growth medium (D-MEM without HEPES, FBS, and antibiotics) Exposure medium (D-MEM containing 100 mM HEPES and antibiotics)
Type of insert	Corning® Transwell® inserts (with purpose-built sleeves)
Cell number	3×10^5 cells per insert
Gas flow	30 mL/min
Carrier gas	Compressed air (DIN EN 12021)
Deposited particle dose (deposition time)	25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (over 15 min) 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (over 30 min) 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (over 60 min)
Final readout	WST-1 assay (dilution 1:7, 1 h incubation time)
Study design	Consolidation phase (Optimization of test conditions to confirm results of the pre-validation study) Blind phase I (Blinding of experiments; three experiments per test substance and laboratory) Blind phase II (Blinding of experiments; one experiments per test substance and laboratory)

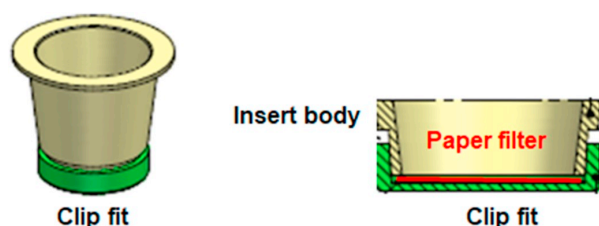


Fig. 2. Insert dummy for analyzing the deposited particle mass within the insert position of the CULTEX® RFS (Aufderheide et al., 2017).

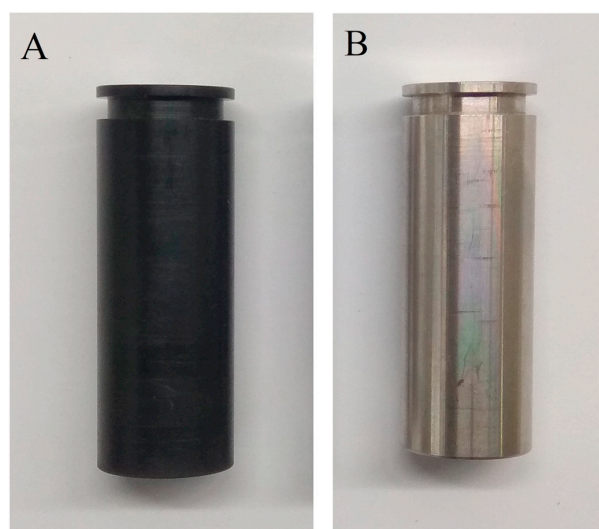


Fig. 3. Types of press plungers. Press plunger (A) made of plastic or (B) stainless steel.

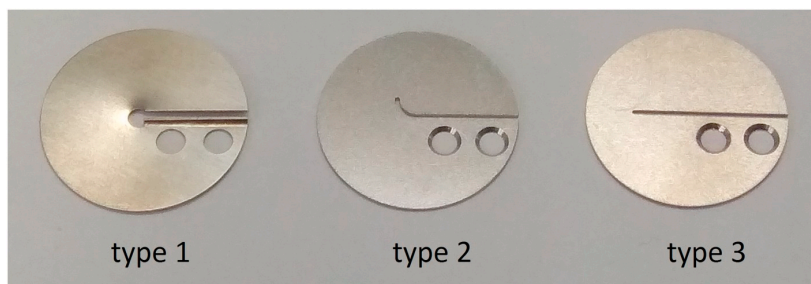


Fig. 4. Types of scraping blades. Type 1 = straight slot with cutting edge; type 2 = curved slot without cutting edge; type 3 = straight slot without cutting edge.

culture inserts (6-well, PET membrane, 4.67 cm^2 , pore size 0.4 mm, pore density 4.0×10^5) with a density of 3.0×10^5 cells per insert and cultivated under submerged conditions for 24 h at 37 °C and 5% CO_2 . Cells were then exposed to test particles (25, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) or clean air (process control) at the ALI using a gas flow of 30 mL/min. In our experimental setup, dosing is correlated to the deposition time. To achieve the indicated doses, cells were loaded with a constant rate of 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/15$ min over 15, 30 or 60 min. During particle exposure, cells were supplied from the lower compartment with exposure medium containing 100 mM HEPES in order to stabilize the pH. After particle deposition, exposed cells were transferred without further washing steps to growth medium and incubated for 24 h (37 °C, 5% CO_2) in total at the ALI. Incubator controls were cultivated for 24 h under submerged conditions as described before and lifted to the ALI under the same conditions as the exposed cell culture inserts.

2.8. Cell viability assay

Cell viability was determined 24 h after particle deposition by measuring the mitochondrial activity using the WST-1 assay. The assay was performed according to the manufacturer's protocol. Medium in the bottom well of the 6-well plates was renewed 24 h after exposure with 2.5 mL growth medium, and 1 mL WST-1 solution (freshly diluted 1:7 in growth medium) was added to each cell culture insert and incubated for 1 h (37 °C, 5% CO_2). Then, 100 μL of the supernatant was transferred in triplicates from each well to a 96-well plate and absorbance was measured at 450 nm with a reference wavelength of 650 nm using a microplate reader.

2.9. Statistics and acceptance criteria

Experiments were conducted independently in three laboratories. Test substances were encoded and sent to each laboratory to ensure an independent testing. Raw data were transferred into a template (see Supplement Fig. S1) and analyzed. Data were analyzed regarding the validity of the experiments, the inherent variability of the test system, the reproducibility within and between the laboratories and the predictivity of the test method.

As already introduced for the pre-validation study, same quality criteria in form of different variation coefficients (CV) were defined for further evaluation and had to be 0.2 or below to be accepted:

1. $CV_{\text{triplicate}}$: survey of the variation due to technical errors (e.g. pipetting errors, error of measurement)
2. CV_{icc} : measure of the biological variance of the incubator controls
3. CV_{cac} : measure of the biological variance of the clean air controls
4. $CV_{\text{cac/time}}$: measure of the mean clean air controls over time (15, 30 or 60 min)
5. $CV_{\text{sample/time}}$: measure of the biological variance of the investigated samples over time (15, 30 or 60 min)

Valid results that fulfilled all quality criteria were analyzed independent from the testing laboratories. Reproducibility within laboratories was evaluated using a two-way ANOVA applying a significance level of 0.01 with GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla, USA) and by the concordance of predictions. Also, the between-laboratory reproducibility was described by the concordance of predictions, selecting the mode prediction in case of discordant prediction in a laboratory. The predictive capacity was analyzed by the two prediction model (PM) versions, i.e. positive if any of the three exposure doses reduced cell viability below 50% and 75%, respectively, and negative otherwise, against the *in vivo* reference results.

3. Results

3.1. Consolidation phase - clean air controls and reproducibility of the pre-validation study

At the beginning of the validation study, test parameters with special focus on the clean air controls were optimized and harmonized, as these controls turned out to be a critical parameter within the pre-validation study (Steinritz et al., 2013). The change to Corning® Transwell® cell culture inserts (Tsoutsouloupoulos et al., 2016) and the stabilization of the pH of the exposure medium by increasing the HEPES concentration from 25 mM to 100 mM resulted in highly stable and reproducible results across all three laboratories. Viability of clean air controls of at least 75% compared to the incubator controls was set as the acceptance threshold.

Moreover, part of the consolidation phase was the repetition of exposure experiments with chosen substances of the pre-validation phase (D(+)-lactose monohydrate with no toxicity, and copper(II) sulfate, copper(II) oxide and Pural 200® Boehmite with intermediate or high toxicity) under optimized and standardized test conditions to examine whether the findings of the pre-validation study could be confirmed.

Fig. 5 presents the overall results of the consolidation phase, which are in line with the results of the pre-validation study. Further experiments, additionally comparing exposure medium containing 25 mM or 100 mM HEPES, revealed that 100 mM HEPES had no effect on the toxicity of the test substances but a positive influence on cell viability of clean air controls by stabilizing the pH of the exposure medium, especially after 60 min of particle deposition (Fig. 5B). As a consequence, the SOPs were amended to the final test parameters, use of Corning® Transwell® cell culture inserts and exposure medium containing 100 mM HEPES.

Fig. 6, a summary of all clean air control viability data of the three laboratories from the blind phases shows that there was no decrease of cell viability of clean air controls over time, revealing a substantial improvement of clean air viability data compared to the pre-validation study.

3.2. Blind phase I

During blind phase I, 13 coded substances were tested per

laboratory, using the optimized SOPs with the aim to obtain three valid experiments per test substance that meet all defined quality criteria. Of the total of 117 experiments (13 substances tested in triplicates per laboratory) only seven experiments, i.e. 6%, failed at least one validity criterion and had to be repeated. Exemplary for the 13 substances, individual results of the test substances with no, variable, or high toxicity are shown (for more information, see supplemental material Fig. S2, Table S1 and S2).

3.2.1. Non-cytotoxic substances: example tungsten(IV) carbide

The test substance tungsten(IV) carbide showed no decrease in cell viability for the three different exposure doses in reference to the clean air control for all three laboratories (Fig. 7A). A similar response pattern was observed for tungsten(IV) carbide nano, silicon dioxide, *N,N*-ethylenebis(*N*-acetylacetamide), disodium fluorophosphate, and diammonium hydrogenorthophosphate (see Fig. S2).

3.2.2. Substances with variable cytotoxicity: sodium metavanadate, cycloheptapentylose and tetrapotassium pyrophosphate

Exposure of cells to sodium metavanadate exhibited a clear dose-effect relation over all three exposure doses (Fig. 7B). With increasing exposure dose, the overall average decreased substantial. All laboratories confirmed this finding although one laboratory showed less toxic effects at exposure doses of 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Exposure to cycloheptapentylose resulted in a very moderate decrease in cell viability in two of the laboratories, whereas it was clearly cytotoxic after an exposure dose of 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the third laboratory (Fig. 7C). Tetrapotassium pyrophosphate exhibited a medium toxicity with some variability between the laboratories after an exposure dose of 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 7D).

3.2.3. Highly cytotoxic substances: example *N*-lauroylsarcosine sodium salt

Exposure to *N*-lauroylsarcosine sodium salt led to a substantial decrease in cell viability already after a deposited dose of 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ which then declined only marginally with increasing exposure doses (Fig. 7E). This result was confirmed by every laboratory. Zinc dimethyldithiocarbamate, cetylpyridinium chloride, and copper(II) hydroxide were also highly cytotoxic (see Fig. S2).

3.3. Blind phase II

In order to obtain a conclusive dataset for between-laboratory reproducibility and additional data informing the predictivity, each of the three laboratories conducted single experiments with additional seven coded compounds. All 21 experiments (seven substances per laboratory) were valid. Exemplary for all single tested substances, individual results of the substances with no, low, intermediate, and high toxicity are shown (for additional information see supplemental material Table S1 and S2).

3.3.1. Non-cytotoxic substances: example cadmium telluride

Exposure of cells to cadmium telluride appeared to be non-toxic in our system (Fig. 8A). All laboratories detected no significant decrease of cell viability at any of the three exposure doses with only a marginal variance at the lowest deposited dose. A similar response pattern was observed for potassium hydrogen monopersulfate and neodymium oxide (Fig. 8A).

3.3.2. Substances with low toxicity: vanadium(III) oxide

Exposure to vanadium(III) oxide led to a moderate but significant decrease in cell viability (Fig. 8B). All three laboratories showed a very similar trend towards a dose-relationship. Two laboratories revealed a very similar cytotoxicity pattern for all three exposure doses, while vanadium(III) oxide was slightly more cytotoxic in the third laboratory.

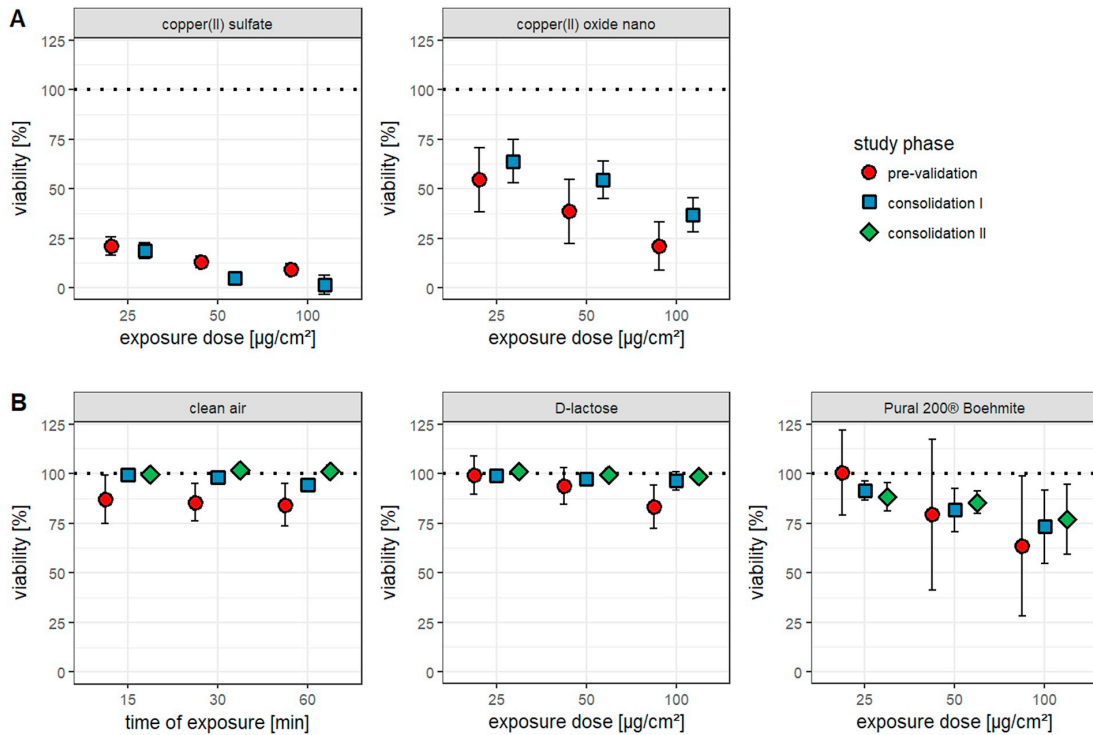


Fig. 5. Comparison of relative cell viability (means of the experiments across all laboratories \pm standard deviation) of the pre-validation study and the consolidation phase. (A) Confirmation of the pre-validation results for copper(II) sulfate and copper(II) oxide nano. (B) Substantial improvement (clean air, D-lactose) or confirmation (Pural 200® Boehmite) of viability data after exposure. Exposure medium with 100 mM instead of 25 mM HEPES revealed an additional improvement of cell viability.

3.3.3. Substance with intermediate toxicity: zinc selenite

The test substance zinc selenite exhibited a moderate toxicity which did not significantly declined with increasing exposure doses for all three laboratories (Fig. 8C).

3.3.4. Highly cytotoxic substances: tetrabromophthalic anhydride and divanadium pentaoxide

Exposure of cells with tetrabromophthalic anhydride achieved a

significant decrease in cell viability with only a marginal variance. The overall average followed a dose-effect relationship (Fig. 8D). No substantial differences between all laboratories were observable.

The test substance divanadium pentaoxide showed a distinct decrease of viability which declined with increasing exposure doses (Fig. 8D). Already a deposited dose of $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ resulted in an overall average decrease of cell viability of at least 50%. However, cell viability was consistently higher in one laboratory.

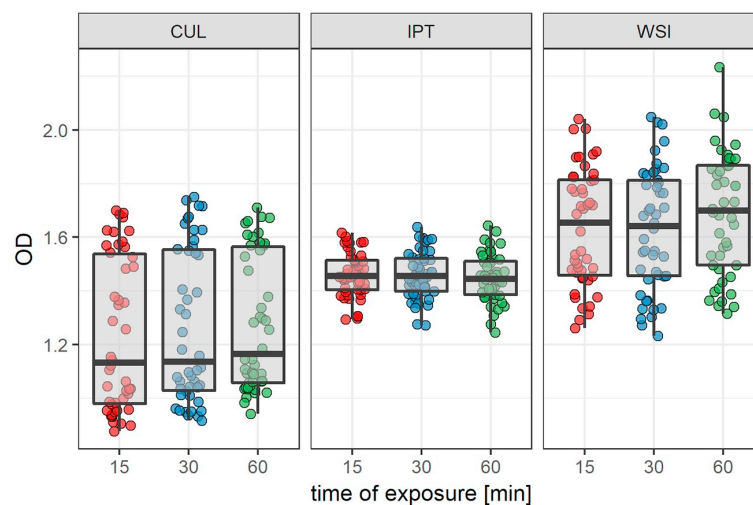


Fig. 6. Summary of viability data of all clean air controls with the optimized protocol. All clean air control data were pooled for each laboratory and exposure time ($n = 46$ per laboratory and point in time) and displayed as boxplots (with a median line and the range indicated by whiskers).

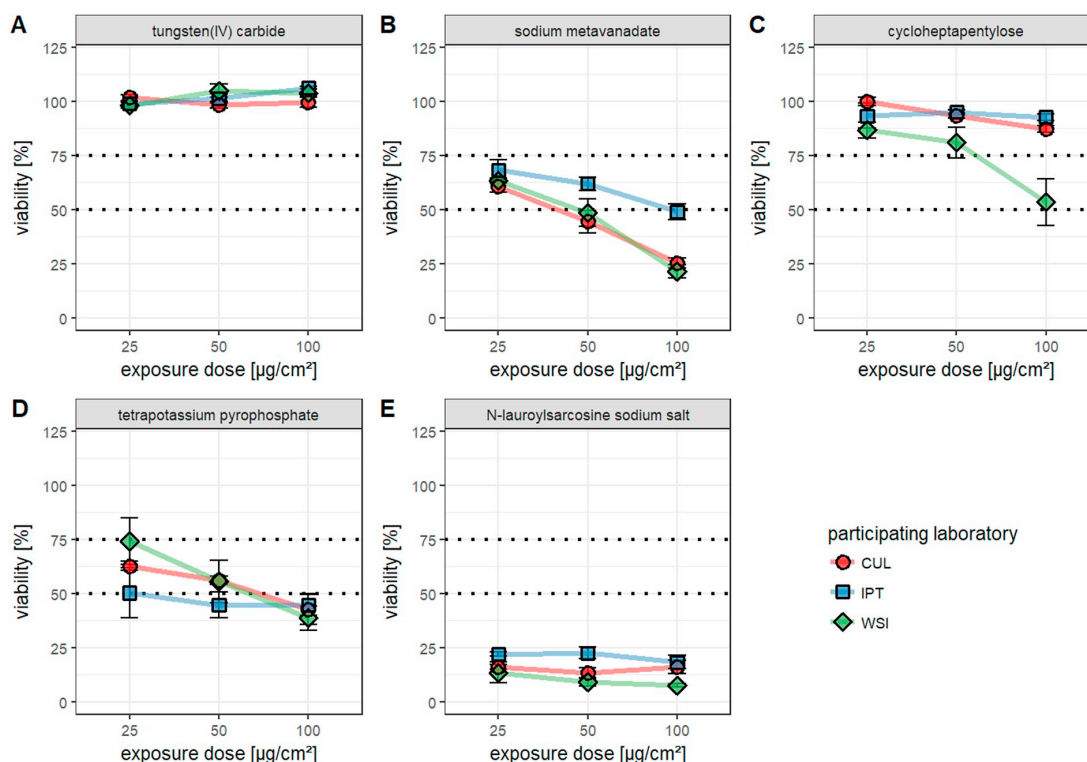


Fig. 7. Relative viability data of blind phase I. Diagrams represent the mean lab results ($n = 3$ per laboratory and point in time). Error bars represent standard deviations.

3.4. Within-laboratory reproducibility

Reproducibility of the results within the laboratories was evaluated based on the calculated p -values by two-way ANOVA considering p -values equal or below 0.01 as statistically significant. The 13 substances being tested in three independent experiments were concordant for the PM 75%. The three substances sodium metavanadate, cycloheptapentyllose, and tetrapotassium pyrophosphate were not concordant for the PM 50%. Thus, within-laboratory reproducibility was on average between 92% and 100%, depending on the respective PM.

3.5. Between-laboratory reproducibility

For the evaluation of the between-laboratory reproducibility, 20 test compounds were tested in three laboratories, 13 in three independent experiments per laboratory and 7 only once per laboratory. Between-laboratory reproducibility was assessed based on the concordance of predictions, regardless of the reference result. For the PM 50% all substances were classified concordantly, resulting in a between-laboratory reproducibility of 100%. For the PM 75% cycloheptapentyllose and vanadium(III) oxide were classified as positive in one laboratory and negative in the two other laboratories, resulting in a between-laboratory reproducibility of 90%.

3.6. Predictivity

The *in vivo* reference results of the 20 test compounds were determined according to their acute toxicity hazard categories and the underlying *in vivo* acute inhalation toxicity data. Eight substances were not classified (negative). The other twelve substances were classified for acute inhalation toxicity according to CLP Regulation (for

“Classification, Labelling and Packaging”) (European Chemicals Agency, 2017b). As shown in Table 4, our results classified ten substances correctly negative and seven substances correctly as positive, resulting in a concordance of 85% (17/20). Two test compounds were classified falsely as positive and one compound as falsely negative, resulting in a specificity of 83% (10/12) and a sensitivity of 88% (7/8).

4. Discussion

Knowledge, screening and evaluation of airborne particles for their acute inhalation hazard is an important step for establishing safe handling, packaging, labelling and usage of chemicals (Jackson et al., 2018). Although many efforts have been undertaken to develop non-animal approaches to replace or reduce animal tests for the simpler human health endpoints, the acute inhalation toxicity is still being assessed with animal experiments. However, several initiatives are ongoing to reduce or replace animal experiments by establishing adequate *in vitro* test systems (Clippinger et al., 2018a; Jackson et al., 2018; Costa, 2008; Fröhlich and Salar-Behzadi, 2014; Latvala et al., 2016). The general applicability of the *in vitro* exposure system CULTEX® RFS was already proven within a pre-validation study (Steinritz et al., 2013). Results of the successful characterization and improvement of the test system underlined its robustness and stability. However, clean air controls turned out to be a critical parameter for a rational interpretation of the results and further studies had to be conducted for the conclusive validation and the confirmation of a prediction model. Thus, based on the pre-validation study, further validation and refinement of the CULTEX® RFS procedure for the screening and evaluation of acute inhalation hazards according to international requirements was to be achieved.

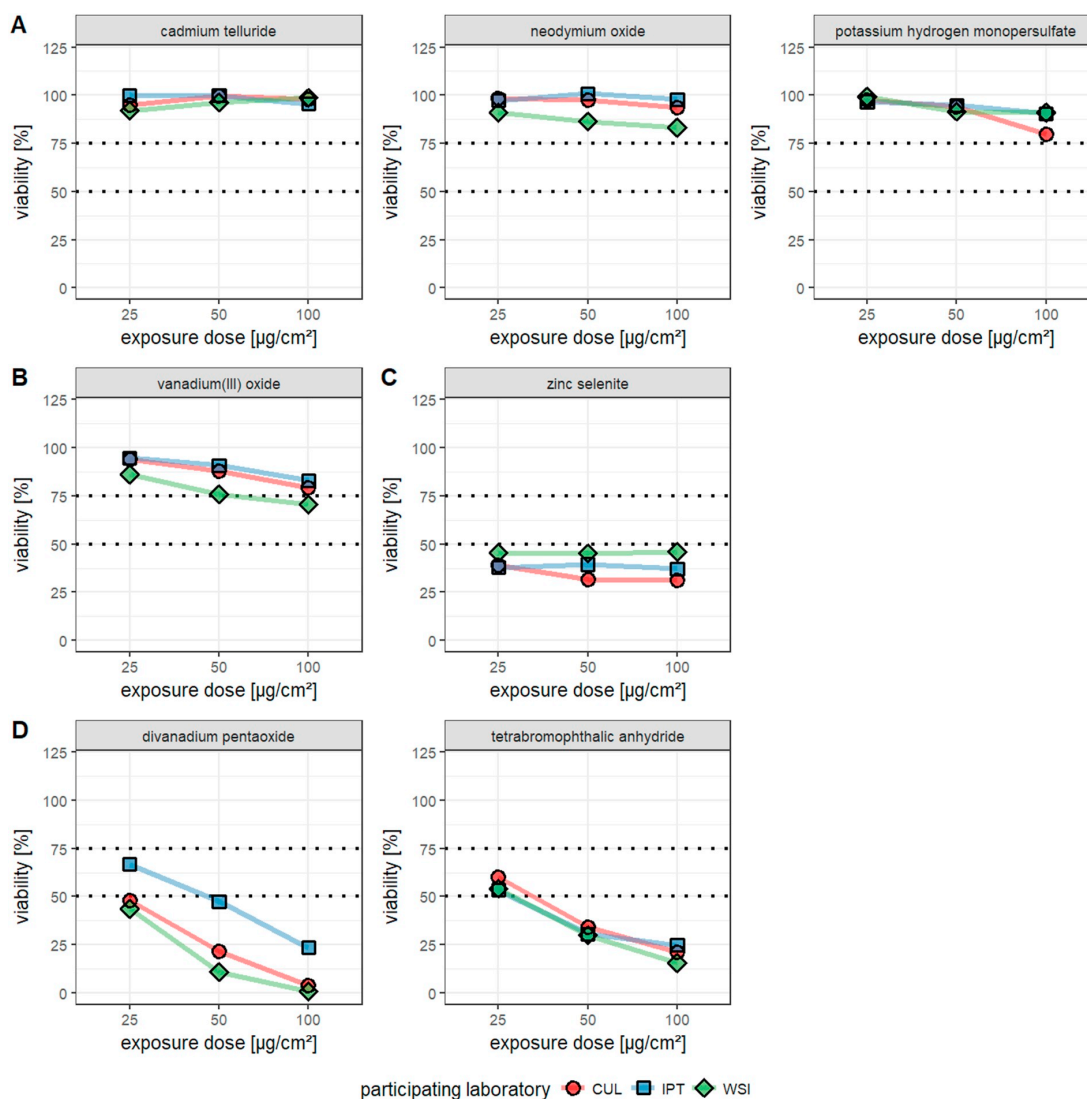


Fig. 8. Viability data of blind phase II. Cell viability is expressed in % in relation to the viability of the corresponding incubator controls which was normalized to 100%. Diagrams represent the results of the individual laboratories ($n = 1$ per laboratory and point in time). Viability data after exposure of cells to (A) non-cytotoxic substances, (B) substance with low toxicity, (C) substance with intermediate toxicity, and (D) highly toxic substances.

4.1. Selection of test substances

As no publicly available database of reference chemicals and data for acute inhalation toxicity were available, the creation of such a database was initiated by adhering to widely agreed selection criteria. Substances were selected based on pre-defined criteria, such as i) available *in vivo* reference data sufficient for C&L purposes, ii) unambiguous CLP classification of acute inhalation toxicity, based on at least one reliable study according to OECD TG 403 or TG 436, iii) non-crystalline solids, iv) balanced selection of acute inhalable toxic and non-toxic compounds, and v) commercial availability. REACH dossiers from the ECHA database served as the primary source for the substance selection, containing a detailed summary of information on intrinsic, environmental and human health hazard properties of a substance (ECHA - European Chemicals Agency, n.d.). Level of the inhalative toxicity, indicated by the CLP classification (H330 = fatal if inhaled, H331 = toxic if inhaled, H332 = harmful if inhaled) was recorded to

ensure, that the substances cover a broad toxicity spectrum. In addition, CMR (carcinogenic, mutagenic, and reprotoxic) substances or chemicals with explosive properties were excluded due to safety reasons.

From the substances obtained by a screening exercise, 20 substances were selected for exposure experiments. From these, eight were classified acutely toxic by inhalation and twelve as non-toxic. Identification of suitable reference chemicals was a major challenge, because this endpoint was investigated experimentally only for some of the registered substances, e.g. due to lack of inhalation exposure and because no dusty atmosphere was or could be generated. Moreover, crystalline substances were excluded because they could not be sufficiently compressed with the usual pressure of 450 kg up to 1000 kg by the CULTEX® HyP press. The maximum pressing pressure for the device was 1000 kg and represented at the same time the load limit for the glass press cylinders. A press with higher pressing force might offer a solution to extend the applicability of the Cultex® method to crystalline substances.

Table 4
Predictivity (PM 50%, PM 75%) and accordance between *in vivo* and *in vitro* results.

Substance	OECD TG	Reference results <i>in vivo</i>		PM 50%	PM 75%	Accordance <i>in vivo/in vitro</i>
		CLP Regulation	Toxicity			
tungsten(IV) carbide	403	n. c.	0	0	0	Yes
tungsten(IV) carbide nano	–	n. c.	0	0	0	Yes
<i>N,N'</i> -ethylenebis(<i>N</i> -acetylacetamide)	EPA OPPTS 870.1300	n. c.	0	0	0	Yes
silicon dioxide	403	n. c.	0	0	0	Yes
diammonium hydrogenorthophosphate	403	n. c.	0	0	0	Yes
disodium fluorophosphate	403	n. c.	0	0	0	Yes
neodymium oxide	436	n. c.	0	0	0	Yes
potassium hydrogen monopersulfate	403	n. c.	0	0	0	Yes
cycloheptapentyllose	403	n. c.	0	0	0(2×)/1(1×)	(Yes)
vanadium(III) oxide	403	n. c.	0	0	0(2×)/1(1×)	(Yes)
tetrapotassium pyrophosphate	403	n. c.	0	1	1	No
tetrabromophthalic anhydride	403 (similar)	n. c.	0	1	1	No
cetylpyridinium chloride	403	Acute Tox. 2	1	1	1	Yes
<i>N</i> -lauroylsarcosine sodium salt	403	Acute Tox. 2	1	1	1	Yes
zinc dimethyldithiocarbamate	403	Acute Tox. 2	1	1	1	Yes
copper(II) hydroxide	403	Acute Tox. 2	1	1	1	Yes
zinc selenite	436	Acute Tox. 3	1	1	1	Yes
sodium metavanadate	403	Acute Tox. 4	1	1	1	Yes
divanadium pentaoxide	403	Acute Tox. 4	1	1	1	Yes
cadmium telluride	403	Acute Tox. 4 (n. c.) ^a	1	0	0	No

n. c. = not classified; 0 = non-toxic; 1 = toxic; CLP = Classification, Labelling and Packaging.

^a see discussion.

4.2. Validation of experiments

In general, the frequency of non-valid tests is a measure of the robustness and transferability of a test method. From a total of 138 experiments, only seven experiments were not valid. In one case, the degree of variability at 100 µg/cm² particle deposition was too high, leading to a CV > 0.2. In the other case, viability of clean air exposed cells was < 75% compared to the viability of the incubator controls. The remaining non-valid experiments were mainly due to handling errors and had to be repeated, even though they would have fulfilled the criteria of acceptance. This low rate of non-valid experiments (7/138 = 5%) is strong evidence of robustness and transferability of the CULTEx® RFS procedure.

4.3. Evaluation of data

Only valid experiments were further analyzed. By using two-way ANOVA, the factors “experiment” and “exposure dose” were modeled, focusing the interpretation on the factor “experiment” as an indicator for within-laboratory reproducibility. In this sensitive approach, *p*-values equal or below 0.01 were considered statistically significant and as variability between experiments. In addition, interpretation of test chemicals was done using a binary prediction model (PM). The PM 50% defined substances as positive or toxic, if cell viability was < 50% (threshold) in one experiment at one of the three particle deposition doses compared to the viability of the respective incubator controls. For a successful validation of the Cultex® method, evaluation of the *in vitro* data using the PM 50% would be sufficient. A more conservative or biologically relevant evaluation, however, is provided by the PM 75%, whereby both PMs were used for the evaluation. The PM 75% used a viability threshold of 75%, leading to a more sensitive but less specific PM than the PM 50%.

4.4. Reproducibility

Results were investigated regarding their within- and between-laboratory reproducibility. Evaluation of the within-laboratory reproducibility revealed that all test substances were concordant for the PM 75% resulting in a reproducibility of 100%. Only the three substances - sodium metavanadate, cycloheptapentyllose and tetrapotassium

pyrophosphate - were not concordant in one laboratory for the PM 50%, resulting in a within-laboratory reproducibility of 92%.

Using two-way ANOVA, significant differences for the factor “experiment” were only observable for copper(II) hydroxide with a *p*-value lower than 0.01 (see Fig. S2). This result had, however, no biological relevance and was only due to the extreme small standard deviation (SD).

The between-laboratory reproducibility was assessed based on the concordance of prediction and was 100% for PM 50% and 90% for PM 75%. In summary, the method's robustness and transferability was demonstrated by high reproducibility of results within and across laboratories.

4.5. Comparison of *in vivo* and *in vitro* reference data

Most of the test substances obtained in our experiments were in a very good overall agreement with existing reference data, resulting in an overall concordance of 85% (17/20). Only two substances were classified as falsely positive, and one as falsely negative in our model, leading to a specificity of 83% (10/12) and a sensitivity of 88% (7/8).

In the following paragraphs, factors that may have caused a wrong prediction for the non-matching results are discussed:

The chemical tetrapotassium pyrophosphate has widespread applications in the field of food processing (e.g. emulsifier, dispersant), cosmetics (e.g. ingredient of toothpastes), industry (e.g. soap and detergents builder), and agriculture (e.g. component of liquid fertilizers) (Tanzer et al., 2003; REACH, 2018a; United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) and International Fertilizer Development Center (Ed.), 1998; Hart and Beumel, 1975; Zoller, 2009). *In vitro* exposure of A549 cells to tetrapotassium pyrophosphate clearly demonstrated medium toxic effects that followed a dose-effect relationship (Fig. 7D). Eight of nine experiments revealed cytotoxicity at an exposure dose of 100 µg/cm² (PM 50%), and at an exposure dose of 25 µg/cm² (PM 75%), respectively. According to the REACH dossier, tetrapotassium pyrophosphate is not considered to be acutely toxic via the inhalation route (REACH, 2018a). A whole-body exposure of rats to dust of tetrapotassium pyrophosphate was performed in 1993 according to the OECD TG 403. The study was reported to be of high reliability. When administered for 4 h, the maximum attainable concentration was limited to 28.8 mg/L, representing a gravimetric concentration of

1.1 mg/L. The substance led to some mortality, but to an extent, that did not result in a classification as toxic compound. Its LC_{50} is considered to be > 1.10 mg/L. Classification of tetrapotassium pyrophosphate as medium toxic by the *in vitro* CULTEX® RFS confirms the higher sensitivity of this methodology compared to the *in vivo* experiment and that it fulfills the requirements as a screening method.

Tetrabromophthalic anhydride is an effective reactive flame-retardant and used to reduce flammability of plastics, textiles, and electronics (Pape et al., 1968; Usenko et al., 2016). The *in vivo* study of tetrabromophthalic anhydride is a poorly documented study from 1974, where rats were whole-body exposed to a single concentration of the test material for 4 h and observed for 14 days afterwards. The reliability of this study is limited because it was performed prior to international guidelines and good laboratory practices (REACH, 2018b). Although some clinical effects were observed (e.g. decreased activity, eye squint, slight dyspnea, erythema, and diarrhea), the interpretation of the study resulted in the classification non-toxic (not classified). Moreover, a micronized form of the commercial product was used which could impact the potential for toxicity (REACH, 2018b). This could explain why exposure of A549 cells to tetrabromophthalic anhydride revealed a cytotoxic potential with a clear dose-effect relationship (Fig. 8D) in contrast to the *in vivo* study.

Cadmium telluride is used as semiconducting material for the solar cell (photovoltaic) industry as well as for the medical use to manufacture infrared and radiation detectors (Maguire et al., 2014; Prasad et al., 2010; Zeng et al., 2015; Zayed and Philippe, 2009; Atamanuk et al., 2018). The REACH dossier of cadmium telluride provides information about an *in vivo* study that was performed in 2008 using rats as test animals (Zayed and Philippe, 2009; REACH, 2018c). Purpose of the study was the assessment of the acute inhalation toxicity of cadmium telluride when administered to rats for a single continuous 4 h period (nose only). This study was performed according to the OECD TG 403. According to the interpretation of the *in vivo* results cadmium telluride was categorized as harmful (Acute Tox. 4, H332). *In vitro* exposure of A549 cells to cadmium telluride, however, revealed absolutely no cytotoxic potential, even at the highest particle exposure dose of 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 8A), leading to an apparently false negative result. Although reliability of the animal study was without restriction, interpretation and comparison of the *in vivo/in vitro* results have to be critically scrutinized. One important indication for the mismatch could be the granulometry of cadmium telluride. The characterizing properties of a substance go far beyond the particle size and include properties such as charge, polymorphism, shape and texture (Limbach et al., 2005). A discussion with the suppliers of cadmium telluride for both, the *in vivo* test and our validation study, revealed that the physico-chemical properties of the tested substance did probably not correspond with the marketed substance, thus eventually leading to different results concerning the acute inhalation toxicity. Due to the lack of specific data and missing information about cadmium telluride's toxicological profile until now, further studies are needed to examine the compound's acute pulmonary toxicity effectively.

In summary, the results of our validation study demonstrated that the CULTEX® RFS procedure is a very robust, transferable and well predictive test system for the monitoring of airborne particles concerning their acute inhalation cytotoxicity which has the potential to be expanded to other chemical atmospheres. This methodology is therefore well suited as an *in vitro* screening method for the qualitative assessment of substances regarding their acute pulmonary cytotoxicity, thereby potentially reducing or replacing animal experiments.

Funding source

This work was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF, Germany (Grant 031A581, sub-project A-C) and by

the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgesellschaft, DFG, Research Training Group GRK 2338).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.020>.

References

- Atamanuk, K., Luria, J., Huey, B.D., 2018. Direct AFM-based nanoscale mapping and tomography of open-circuit voltages for photovoltaics. *Beilstein J. Nanotechnol.* 9, 1802–1808. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.171>.
- Aufderheide, M., 2005. Direct exposure methods for testing native atmospheres. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57 (Suppl. 1), 213–226.
- Aufderheide, M., Halter, B., Möhle, N., Hochrainer, D., 2013. The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the *in vitro* exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface. *Biomed. Res. Int.* 2013 <https://doi.org/10.1155/2013/734137>.
- Aufderheide, M., Heller, W.-D., Krischenowski, O., Möhle, N., Hochrainer, D., 2017. Improvement of the CULTEX® exposure technology by radial distribution of the test aerosol. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69 (6), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.02.004>.
- Clippinger, A.J., 2018. Application of *in Silico* and *in vitro* approaches to assess the toxicity of inhaled substances. *Appl. In Vitro Toxicol.* 4 (2), 81. <https://doi.org/10.1089/aivt.2018.29016.ajc>.
- Clippinger, A.J., Allen, D., Jarabek, A.M., Corvaro, M., Gaça, M., Gehen, S., Hotchkiss, J.A., Patlewicz, G., Melbourne, J., Hinderliter, P., Yoon, M., Huh, D., Lowit, A., Buckley, B., Bartels, M., Bérubé, K., Wilson, D.M., Indans, I., Vinken, M., 2018a. Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: an international workshop report. *Toxicol. in Vitro* 48, 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.011>.
- Clippinger, A.J., Allen, D., Behrsing, H., Hinderliter, P.M., Landsiedel, R., Reinke, E.N., Stone, V., 2018b. Nonanimal approaches to assessing the toxicity of inhaled substances: current progress and future promise. *Appl. In Vitro Toxicol.* 4 (2), 82–88. <https://doi.org/10.1089/aivt.2018.29015.rtl>.
- Costa, D.L., 2008. Alternative test methods in inhalation toxicology: challenges and opportunities. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60 (2–3), 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.01.001>.
- Da Silva, E., Sorli, J.B., 2018. Animal testing for acute inhalation toxicity: a thing of the past? *Appl. In Vitro Toxicol.* 4 (2), 89–90. <https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0037>.
- ECHA - European Chemicals Agency <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/registered-substances> (accessed 15 August 2018).
- European Chemicals Agency, 2016. *Guidance on Registration: Report No.: Version 3.0*.
- Faber, S.C., McCullough, S.D., 2018. Through the looking glass: *in vitro* models for inhalation toxicology and interindividual variability in the airway. *Appl. In Vitro Toxicol.* 4 (2), 115–128. <https://doi.org/10.1089/aivt.2018.0002>.
- Fröhlich, E., Salar-Behzadi, S., 2014. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* studies. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (3), 4795–4822. <https://doi.org/10.3390/ijms15034795>.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P., 1973. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (5), 1417–1423.
- European Chemicals Agency, 2017a. *Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a Endpoint Specific Guidance*. ECHA, Helsinki.
- European Chemicals Agency, 2017b. *Guidance on the Application of the CLP Criteria. Guidance to Regulation (EC) no 1272/2008 on Classification, Labelling and Packaging (CLP) of Substances and Mixtures*. ECHA, Helsinki.
- Hart, W.A., Beumel, O.F., 1975. *Comprehensive Inorganic Chemistry*. Pergamon Press, Oxford.
- Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Roi, A.J., Prieto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A., Zang, V., 2004. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *Altern. Lab. Anim.* 32 (5), 467–472.
- Huh, D., Matthews, B.D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H.Y., Ingber, D.E., 2010. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 328 (5986), 1662–1668. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>.
- Jackson, G.R., Maione, A.G., Klausner, M., Hayden, P.J., 2018. Prevalidation of an acute inhalation toxicity test using the EpiAirway *in vitro* human airway model. *Appl. In Vitro Toxicol.* 4 (2), 149–158. <https://doi.org/10.1089/aivt.2018.0004>.
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A.C., Larsen, S.T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., Hiemstra, P.S., Frejafon, E., Hubert, P., Gribaldo, L., Kearns, P., Aublant, J.-M., Diabaté, S., Weiss, C., de Groot, A., Kooter, I., 2018. Air-liquid interface *in vitro* models for respiratory toxicology research: consensus workshop and recommendations. *Appl. In Vitro Toxicol.* 4 (2), 91–106.

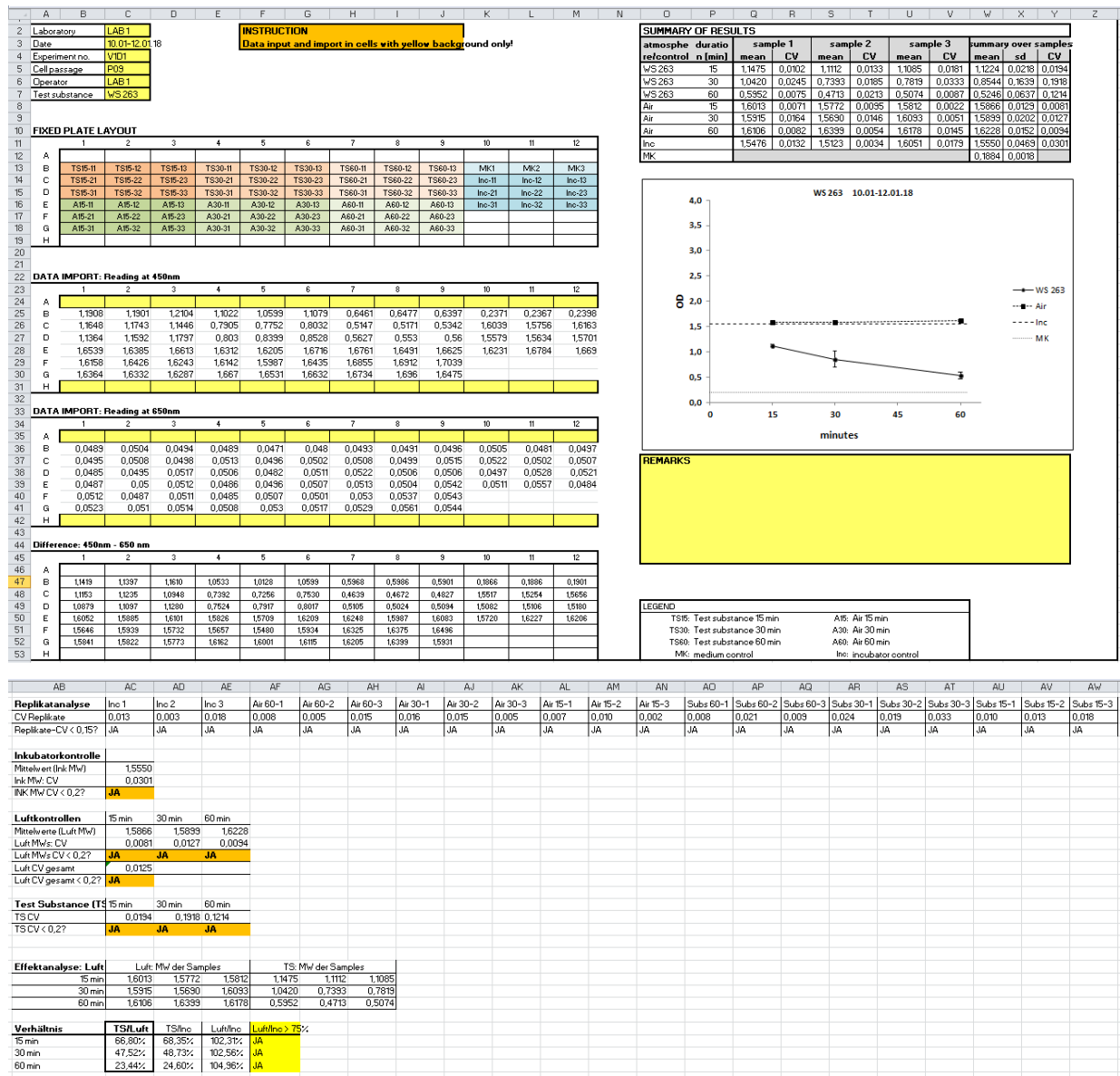
- <https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0034>.
- Latvala, S., Hedberg, J., Möller, L., Odnevall Wallinder, I., Karlsson, H.L., Elihn, K., 2016. Optimization of an air-liquid interface exposure system for assessing toxicity of airborne nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 36 (10), 1294–1301. <https://doi.org/10.1002/jat.3304>.
- Lenz, A.-G., Karg, E., Brendel, E., Hinze-Heyn, H., Maier, K.L., Eickelberg, O., Stoeger, T., Schmid, O., 2013. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. *Biomed. Res. Int.* 2013 <https://doi.org/10.1155/2013/652632>. 652632.
- Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* 17 (1), 62–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910170110>.
- Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J., Hintermann, M.A., Muller, M., Gunther, D., Stark, W.J., 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 39 (23), 9370–9376. <https://doi.org/10.1021/es051043o>.
- Maguire, C.M., Mahfoud, O.K., Rakovich, T., Gerard, V.A., Prina-Mello, A., Gun'ko, Y., Volkov, Y., 2014. Heparin conjugated quantum dots for in vitro imaging applications. *Nanomedicine* 10 (8), 1853–1861. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.04.009>.
- OECD, 2005. Guidance Document on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2005\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2005)14&doclanguage=en), Accessed date: 12 October 2018.
- OECD, 2009. Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 2009 OECD Publishing, Paris.
- Pape, P.G., Sanger, J.E., Nametz, R.C., 1968. Tetrabromophthalic anhydride in flame-retardant urethane foams. *J. Cell. Plast.* 4 (11), 438–442. <https://doi.org/10.1177/0021955X6800401107>.
- Prasad, B.R., Nikolskaya, N., Connolly, D., Smith, T.J., Byrne, S.J., Gerard, V.A., Gun'ko, Y.K., Rochev, Y., 2010. Long-term exposure of CdTe quantum dots on PC12 cellular activity and the determination of optimum non-toxic concentrations for biological use. *J. Nanobiotechnol.* 8, 7. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-7>.
- Rach, J., Budde, J., Möhle, N., Aufderheide, M., 2014. Direct exposure at the air-liquid interface: evaluation of an in vitro approach for simulating inhalation of airborne substances. *J. Appl. Toxicol.* 34 (5), 506–515. <https://doi.org/10.1002/jat.2899>.
- REACH, 2018a. Registration Dossier - Tetrapotassium Pyrophosphate. <https://www.echa.europa.eu/web/guest/registration-dossier/-/registered-dossier/14700/7/3/3>, Accessed date: 19 August 2018.
- REACH, 2018b. Registration Dossier - Tetrabromophthalic Anhydride. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/2076>, Accessed date: 19 August 2018.
- REACH, 2018c. Registration dossier - Cadmium telluride. <https://echa.europa.eu/brief-profile/-/briefprofile/100.013.773>, Accessed date: 19 August 2018.
- Sayes, C.M., Singal, M., 2018. Optimizing a test bed system to assess human respiratory safety after exposure to chemical and particle Aerosolization. *Appl. In Vitro Toxicol.* 4 (2), 193–201. <https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0043>.
- Sewald, K., Braun, A., 2013. Assessment of immunotoxicity using precision-cut tissue slices. *Xenobiotica* 43 (1), 84–97. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.731543>.
- Steinritz, D., Möhle, N., Pohl, C., Papritz, M., Stenger, B., Schmidt, A., Kirkpatrick, C.J., Thiermann, H., Vogel, R., Hoffmann, S., Aufderheide, M., 2013. Use of the CULTEX Radial Flow System as an in vitro exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility. *Chem. Biol. Interact.* 206 (3), 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.05.001>.
- Tanzer, J.M., Pellegrino, J., Thompson, A.M., Buch, R.M., 2003. Verification of caries inhibition by a tartar control toothpaste. *J. Clin. Dent.* 14 (3), 74–76.
- Thorne, D., Bishop, E., Haswell, L., Gaça, M., 2018. A case study for the comparison of in vitro data across multiple aerosol exposure studies with extrapolation to human dose. *Appl. In Vitro Toxicol.* 4 (2), 167–179. <https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0042>.
- Tsoutsouloupoulos, A., Möhle, N., Aufderheide, M., Schmidt, A., Thiermann, H., Steinritz, D., 2016. Optimization of the CULTEX® Radial Flow System for in vitro investigation of lung damaging agents. *Toxicol. Lett.* 244, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.003>.
- United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) and International Fertilizer Development Center (Ed.), 1998. Fertilizer Manual, 3rd ed. Kluwer Academic Publ, Dordrecht.
- Usenko, C.Y., Abel, E.L., Hopkins, A., Martinez, G., Tijerina, J., Kudela, M., Norris, N., Joudeh, L., Bruce, E.D., 2016. Evaluation of common use brominated flame retardant (BFR) toxicity using a Zebrafish embryo model. *Toxicol.* 4 (3). <https://doi.org/10.3390/toxics4030021>.
- Veith, G.D., Petkova, E.P., Wallace, K.B., 2009. A baseline inhalation toxicity model for narcosis in mammals. *SAR QSAR Environ. Res.* 20 (5–6), 567–578. <https://doi.org/10.1080/10629360903278669>.
- World Health Organization, 2016. Ambient Air Pollution: A Global Assessment of Exposure and Burden of Disease. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250141/9789241511353-eng.pdf?sequence=1>, Accessed date: 24 August 2018.
- Wright, B.M., 1959. A new dust-feed mechanism. *J. Sci. Instrum.* 27, 12–15.
- Zayed, J., Philippe, S., 2009. Acute oral and inhalation toxicities in rats with cadmium telluride. *Int. J. Toxicol.* 28 (4), 259–265. <https://doi.org/10.1177/1091581809337630>.
- Zeng, C., Ramos-Ruiz, A., Field, J.A., Sierra-Alvarez, R., 2015. Cadmium telluride (CdTe) and cadmium selenide (CdSe) leaching behavior and surface chemistry in response to pH and O₂. *J. Environ. Manag.* 154, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.033>.
- Handbook of detergents: Part F: Production, CRC press, Boca Raton. In: Zoller, U. (Ed.), Fla..

Supplementary Data

Validation of the CULTEX® Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles (2019), *Toxicology in Vitro*.

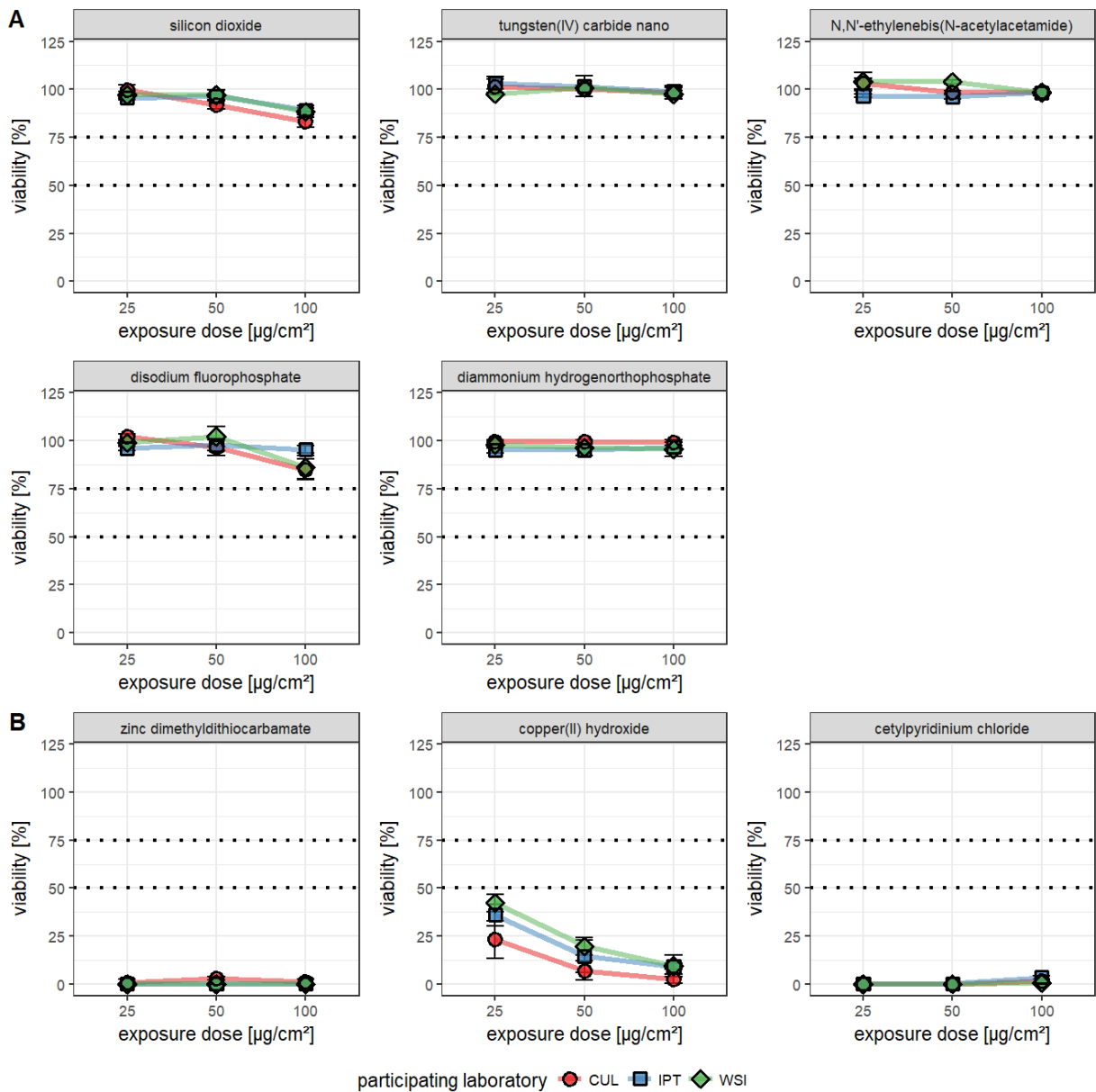
A. Tsoutsoulopoulos, K. Gohlsch, N. Möhle, A. Breit, S. Hoffmann, O. Krischenowski, H. Mückter, T. Gudermann, H. Thiermann, M. Aufderheide, D. Steinritz

Supplement Figure 1



Template for viability raw data after WST-1 measurement. Optical density (OD) values, measured at 450 nm and 650 nm (reference wavelength) were transferred into the template. OD values of the incubator controls represented 100% cell viability, hence, OD values obtained for each test compound can be used to calculate a percentage viability relative to the incubator controls. Different variation coefficients (CV) were used as quality criteria.

Supplement Figure 2



Relative viability data of blind phase I. Diagrams represent the mean lab results ($n = 3$ per laboratory and point in time) after exposure of cells to (A) non-toxic substances or (B) highly toxic substances. Error bars represent standard deviations.

Supplement Table 1

Summary of cell viability data after ALI exposure to 20 test substances

Test substance	Number of experiments	CUL			IPT			WSI		
		25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]
tetrapotassium pyrophosphate	1	60.43	55.55	35.60	43.63	40.80	40.82	72.24	57.15	44.91
	2	62.97	58.33	42.57	63.51	51.56	50.49	85.73	64.38	37.27
	3	64.65	54.71	49.68	43.82	41.78	43.10	64.52	45.17	34.02
tungsten(IV) carbide	1	103.13	99.53	102.29	100.02	103.51	106.95	98.11	105.16	102.16
	2	101.05	96.51	99.16	98.57	99.26	105.81	99.41	101.61	106.04
	3	100.81	98.96	97.53	98.11	101.26	105.89	96.75	107.73	103.53
tungsten(IV) carbide nano	1	101.61	99.34	95.10	105.52	105.09	96.61	97.97	100.68	97.92
	2	97.99	100.21	101.90	99.65	95.26	99.34	96.94	99.61	95.88
	3	105.19	100.92	98.53	104.71	104.26	100.48	98.18	102.09	98.97
N,N'- ethylenebis(N-acetylacetamide)	1	100.85	99.03	98.09	96.22	97.27	97.64	109.29	103.33	97.20
	2	102.08	98.59	100.29	96.06	94.84	98.54	102.03	105.15	100.41
	3	105.93	97.81	97.52	97.71	96.16	48.38	100.70	103.21	97.63
sodium metavanadate	1	60.05	50.39	28.10	65.41	65.41	48.38	63.23	55.16	22.50
	2	58.48	41.56	24.64	66.10	59.29	45.84	62.51	42.71	18.05
	3	63.66	41.27	23.51	73.54	61.28	53.12	64.84	47.84	23.98
cetylpyridinium chloride	1	0	0	2.65	0	0	2.82	0	0	0.49
	2	0	0	1.67	0	0	4.50	0	0.30	0.56
	3	0	0	0.54	0	1.01	3.26	0	0	1.01
N-lauroylsarcosine sodium salt	1	17.36	14.38	19.40	23.18	19.41	14.93	10.92	10.29	6.94
	2	15.25	10.32	15.17	21.33	24.11	19.38	19.17	10.18	8.51
	3	15.78	15.02	13.40	21.51	23.90	20.77	10.62	6.86	7.22
cycloheptapentylolose	1	98.31	91.98	88.6	87.22	94.03	94.36	83.19	76.17	41.28
	2	101.86	94.06	87.57	98.82	94.84	91.53	86.46	77.70	57.98
	3	99.38	93.75	85.72	94.05	96.32	92.20	90.63	89.06	61.34

Supplement Table 1 continued

Test substance	Number of experiments	CUL			IPT			WSI		
		25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%]
zinc dimethyldithiocarbamate	1	2.80	3.75	2.46	0.26	0.30	0	0	0	0
	2	0	2.88	0.95	0	0	0	0	0	0
	3	0.01	2.23	0.03	0	0	0.11	0	0	0.05
copper(II) hydroxide	1	23.51	3.87	4.61	30.36	12.05	8.93	45.75	20.85	9.54
	2	13.44	4.86	0	36.11	23.85	7.64	43.94	23.68	15.06
	3	32.70	12.59	3.51	41.71	7.75	10.67	37.23	14.71	4.020
silicon dioxide	1	101.84	92.31	83.11	94.63	95.57	89.69	97.77	98.53	85.66
	2	100.44	89.70	86.78	96.63	97.43	88.13	98.36	94.06	87.60
	3	96.30	94.10	80.29	94.97	96.83	89.66	94.97	98.64	91.82
diammonium hydrogenorthophosphate	1	100.45	99.82	99.96	94.58	93.33	97.71	95.94	96.34	93.14
	2	98.97	98.16	97.23	97.21	98.82	96.16	97.94	95.95	99.50
	3	99.83	100.39	99.71	93.86	93.55	95.94	99.56	96.98	93.86
disodium fluorophosphate	1	103.94	100.28	84.17	96.24	100.45	97.07	99.48	97.14	87.17
	2	101.07	97.40	90.71	96.89	97.81	93.28	97.80	102.02	79.65
	3	101.23	91.77	79.97	94.74	94.73	95.60	99.91	107.54	91.68
zinc selenite	1	39.02	31.79	31.05	37.76	39.45	37.23	45.67	45.28	46.10
neodymium oxide	1	98.37	97.55	93.61	97.12	100.83	97.77	90.99	86.36	83.21
tetrabromophthalic anhydride	1	59.98	33.98	21.18	53.37	30.63	24.67	54.16	29.96	15.62
vanadium(III) oxide	1	93.92	88.06	79.36	94.74	90.82	83.00	86.26	75.91	70.58
divanadium pentaoxide	1	48.02	21.59	3.76	66.80	47.52	23.44	43.64	10.87	0.90
cadmium telluride	1	95.00	99.83	97.97	100.02	99.80	95.41	92.08	96.36	98.66
potassium hydrogen monopersulfate	1	97.38	94.13	79.90	96.66	94.77	90.54	99.23	91.64	91.06

Supplement Table 2

Test substances and the corresponding ECHA data source

Test substance	ECHA data source
tetrapotassium pyrophosphate	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14700/7/3/3
tungsten (IV) carbide	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15382/7/3/3
tungsten (IV) carbide nano	-
N,N'-ethylenebis(N-acetylacetamide)	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14315/7/3/3
sodium metavanadate	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/10973/7/3/3
cetylpyridinium chloride	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/17221/7/3/3
N-lauroylsarcosine sodium salt	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14123/7/3/3/?documentUUID=cb70b22d-1842-40ce-9a12-5c38fb43d358
cycloheptapentolose	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/1942/7/3/3
zinc dimethyldithiocarbamate	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/2153/7/3/3
copper(II) hydroxide	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14119/7/3/3/?documentUUID=0c15d801-401d-4759-afe2-aac4d370633c
silicon dioxide	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15556/7/3/3/?documentUUID=0ee70779-23d5-4340-9884-d3387179d7ed
diammonium hydrogenorthophosphate	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15555/7/3/3
disodium fluorophosphate	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/2125/7/3/3
zinc selenite	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/5197/7/3/3
neodymium oxide	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14946/7/3/3
tetrabromophthalic anhydride	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/2076/7/3/3
vanadium (III) oxide	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/13629/7/3/3
divanadium pentaoxide	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15418/7/3/3/?documentUUID=cf346e78-aea8-4675-99ac-21a436e680e0
cadmium telluride	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/12227/7/3/3
potassium hydrogen monopersulfate	https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15990/7/3/3/?documentUUID=331d60fd-72d5-4fb1-a0f3-a65db672c905

3.2 Herausforderungen bei der S-Lost Exposition von humanen Lungenzellen am ALI

Der wiederholte Einsatz von S-Lost in aktuellen Konflikten (z.B. Syrien 2015) zeigt, wie hoch das Risiko einer S-Lost Exposition heutzutage noch ist. Wegen der noch unvollständig aufgeklärten Pathophysiologie und fehlender kausaler Therapieansätze stellen S-Lost-induzierte akute oder chronische Atemwegserkrankungen medizinisch gesehen eine große Herausforderung dar. Aufgrund der limitierten humanen Expositionsdaten und dem starken Bestreben der Bundeswehr, Alternativen zum Tierversuch im Forschungsbereich Medizinischer ABC-Schutz zu entwickeln und zu fördern, werden zellkultur-basierte *in vitro* Expositionsmodelle für toxikologische Untersuchungen von S-Lost auf zellulärer Ebene immer relevanter. Expositionssysteme, welche die Zellen am ALI exponieren, imitieren im Vergleich zur submersen Exposition die humane Alveole besser und sind damit biologisch und physiologisch aussagekräftiger. Die Aerosolisierung von hochtoxischen Substanzen wie S-Lost stellt aufgrund der einzuhaltenden Sicherheitsvorkehrungen jedoch eine große Herausforderung dar, weswegen bislang geeignete Expositionssysteme für die Untersuchung der Toxizität von S-Lost Aerosolen am ALI fehlen.

Ziel war daher die Evaluierung, Validierung und Anwendung eines geeigneten *in vitro* Expositionssystems, das alle notwendigen Sicherheitsanforderungen für die Exposition von Zellen gegenüber dem hochtoxischen S-Lost am ALI erfüllt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die erhöhte Komplexität der ALI-Expositionstechnik gegenüber der submersen Expositionstechnik bevorzugt ist. Der komplette Versuchsaufbau der Anlage wurde gezielt für Expositionsexperimente mit S-Lost angepasst und optimiert. Durch den Austausch des CULTEX[®] Aerosolgenerators mit einem geeigneten Verneblungssystem war die Aerosolisierung von Flüssigkeiten gegeben. Die Möglichkeit der thermischen Verdampfung für die Aerosolbildung von S-Lost erwies sich für unser System als ungeeignet. S-Lost wird in dem organischen Lösungsmittel Ethanol (EtOH) verdünnt, wodurch bei Verdampfung die Gefahr einer Entzündung oder Explosion gegeben ist. Andere kommerziell erhältliche Verneblungssysteme, wie z.B. der PariBoy[®] oder der eFlow[®] erzeugen Aerosole mittels Druckluft oder perforierter Schwingmembran und somit ohne thermische Verdampfung [77]. Aufgrund der hohen reproduzierbaren Leistung und der einfachen und sicheren Handhabung wurde der eFlow[®] als Aerosolvernebler für den Versuchsaufbau gewählt. Aus Sicherheitsgründen mussten alle Systemkomponenten, die mit S-Lost in Berührung kamen, mit Natriumhypochlorit dekontaminiert werden. Da das ursprüngliche CULTEX[®] Modul zu Teilen aus Kunststoff besteht, wurde ein ebenfalls kommerziell erhältliches Edelstahlmodul verwendet. Alle anderen Zusatzkomponenten konnten entweder mit Natriumhypochlorit dekontaminiert (z.B. Membran oder Flüssigkeitsbehälter des eFlow[®]) oder nach Gebrauch (z.B. Schläuche) entsorgt werden. Die homogene Verteilung des Aerosols innerhalb der Expositionsanlage wurde mittels Coomassie-Blue untersucht und bestätigt. Anschließend wurden die humanen Lungenepithelzellen A549 unter submersen Bedingungen oder am ALI mit verschiedenen S-Lost Konzentrationen exponiert. Dabei wurden die Expositionszeit und -konzentration zwischen beiden Expositionsrouten identisch gehalten, um beide Expositionstechniken miteinander vergleichen zu können. Die Zellvitalität und Bildung von S-Lost-spezifischen DNA-Addukten wurden anschließend untersucht und miteinander verglichen. Der Nachweis der DNA-Addukte erfolgte qualitativ durch immunzytochemische 2F8-Antikörperfärbung. Dieser weltweit einzig verfügbare Antikörper bindet spezifisch an S-Lost-Addukte am Guanin, wodurch ein inhomogenes Antikörper-Signal und somit hohe Standardabweichungen innerhalb des Zellkerns auftreten können [89]. Eine zusätzliche Überprüfung der Ergebnisse erfolgte daher quantitativ durch μ LC-ESI MS/HR MS (Mikro-Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisation mit hochauflösender-Tandem-Massenspektrometrie).

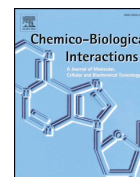
Diese Studie zeigte zum aller ersten Mal die erfolgreiche Exposition von Zellen mit S-Lost Aerosolen am ALI. Die Exposition mit dem gewählten Versuchsaufbau war sicher und reproduzierbar durchführbar und es konnten klare Dosis-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Mit steigenden S-Lost Konzentrationen wurde eine Erhöhung der Zytotoxizität und der Bildung S-Lost-spezifischer DNA-Addukte beobachtet, die jedoch in der ALI-Gruppe signifikant geringer ausfielen, verglichen zur submersen Expositionstechnik. Bedingt durch das technische Prinzip des CULTEX[®] RFS ist die exakte Expositionsdosis nicht direkt messbar. Das in einem Hauptluftstrom in die Apparatur geleitete Aerosol wird partiell auf drei Nebenluftströme verteilt, die dann zur Exposition der Zellen genutzt werden. Dabei sedimentiert nur ein geringer Anteil des zu untersuchenden Aerosols. Die Alkylierung der DNA durch Nachweis von HETE-Gua (Hydroxyethylthioethyl-Guanin) und HETE-Ade (Hydroxyethylthioethyl-Adenin) Basen konnte hierfür als Normierungsgröße genutzt werden.

Dieses Expositionsverfahren hat sich als ein System für die Untersuchung der akuten Toxizität von inhalierbaren und hochtoxischen Flüssig-Aerosolen am ALI unter biologisch und physiologisch relevanteren Bedingungen bewährt.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

A novel exposure system generating nebulized aerosol of sulfur mustard in comparison to the standard submerge exposure

Amelie Tsoutsouloupoulos^a, Markus Siegert^{a,b}, Harald John^a, Tabea Zübel^d, Aswin Mangerich^d, Annette Schmidt^{a,e}, Harald Mückter^c, Thomas Gudermann^c, Horst Thiermann^a, Dirk Steinritz^{a,c}, Tanja Popp^{a,c,*}^a Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, 80937, Munich, Germany^b Department of Chemistry, Humboldt-Universität zu Berlin, 12489, Berlin, Germany^c Walther Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Munich, 80336, Munich, Germany^d Molecular Toxicology Group, Department of Biology, University of Konstanz, 78457, Konstanz, Germany^e Universität der Bundeswehr München, Faculty of Human Sciences, Department for Sports Sciences, 85577, Neubiberg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Inhalation
eFlow[®]
CULTEX[®] RFS
Toxicology
In vitro, lung

ABSTRACT

Inhalation of the chemical warfare agent sulfur mustard (SM) is associated with severe acute and long-term pulmonary dysfunctions and health effects. The still not completely elucidated molecular toxicology and a missing targeted therapy emphasize the need for further research. However, appropriate human data are extremely rare. *In vivo* animal experiments are often regarded as gold standard in toxicology but may exhibit significant differences compared to the human pulmonary anatomy and physiology. Thus, alternative *in vitro* exposure methods, adapted to the human *in vivo* situation by exposing cells at the air-liquid interface (ALI), are complementary approaches at a cellular level. So far, it is unclear whether the enhanced experimental complexity of ALI exposure, that is potentially biologically more meaningful, is superior to submerged exposures which are typically performed.

Aim of our study was the evaluation of an appropriate *in vitro* exposure system (CULTEX[®] Radial Flow System (RFS) equipped with an eFlow[®] membrane nebulizer) for the exposure of cultivated human lung cells (A549) with SM under ALI conditions. Cellular responses (i.e. cell viability) and formation of SM-specific DNA-adducts were investigated and compared between ALI and submerge SM exposures.

Our results proved the safe applicability of our ALI exposure system setup. The aerosol generation and subsequent deposition at the ALI were stable and uniform. The technical CULTEX[®] RFS setup is based on ALI exposure with excess of aerosol from that only some is deposited on the cell layer. As expected, a lower cytotoxicity and DNA-adduct formation were detected when identical SM concentrations were used compared to experiments under submerged conditions. A distinct advantage of SM-ALI compared to SM-submerge exposures could not be found in our experiments. Though, the CULTEX[®] RFS was found suitable for SM-ALI exposures.

1. Introduction

The first military use of the chemical warfare agent sulfur mustard (2,2'-dichloroethyl sulfide; SM) dates back over 100 years, when it was deployed by German troops in Ypres on July 12, 1917 during World War I [1–4]. Although the use of SM has been banned since 1997 by the Chemical Weapons Convention (CWC) [5], the threat is still present, as shown by the recent SM attacks in e.g. Syria in August 2015 [6]. The clinical signs and symptoms of SM poisoning are well known [7–9]: ocular, dermal and pulmonary symptoms, followed by manifold

systemic effects, including the hematopoietic, gastrointestinal and central nervous system, are frequently observed after contact with liquid, vaporous or nebulized SM [8,10,11]. While skin affections can be adequately handled in most cases, respiratory effects are extremely challenging from a medical perspective. Depending on dose and time of exposure, coughing and respiration disorders may occur in the first hours after SM inhalation. Leakage of a fibrin-rich exudate and pseudo-membrane formation are indicators for acute toxic lung injury [12]. Fatalities after SM exposure were reported in only 3% of the cases [13,14]. If death occurs, SM-caused pulmonary complications are,

* Corresponding author. Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, 80937, Munich, Germany.
E-mail address: tanjapopp@bundeswehr.org (T. Popp).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.025>

Received 9 October 2018; Received in revised form 10 November 2018; Accepted 27 November 2018

Available online 28 November 2018

0009-2797/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

however, the main reason [15,16]. In addition, SM-induced delayed and chronic pulmonary health effects have severe impact on life quality [4,15,17,18]. The underlying molecular toxicology after inhalation of SM is in the spotlight of current research [19]. However, controlled human trials in toxicology, especially in the field of medical SM research, cannot be conducted for ethical reasons. Moreover, human exposures are rare for most chemicals including SM resulting in only very limited data on human inhalation exposures [19–22]. Thus, *in vivo* animal studies are usually conducted to close this gap. Animal experiments are often regarded as gold standard in toxicology, but may exhibit several critical differences (e.g. respiratory physiology, anatomy and biochemistry) compared to the human respiratory tract [23,24], thus making a translation of experimental inhalation data to the human situation at least difficult or even flawed. Moreover, moral and ethical issues demand the reduction or even the complete abolition of *in vivo* experiments following the 3R principles (Replacement, Reduction, and Refinement of animal experiments) of Russell and Burch [25,26]. To overcome these difficulties and to cope with the ethical demands, recent research has focused on the development, establishment and validation of *in vitro* exposure methods that can be used for assessment of toxic inhalations hazards (TIH) [23,27–29]. Such *in vitro* methods represent a valuable alternative for explorative toxicological *in vivo* studies. The assessment of TIH in *in vitro* studies is typically performed using cell cultures exposed under submerged conditions, in which TIHs are dissolved or suspended directly in the cell culture medium covering the cells [21,30]. This approach, which is experimentally very simple and less challenging, may be flawed because (i) submerged cell-culture conditions do not correspond to the physiological conditions in the alveolar region and the inhalation situation *in vivo* and (ii) alterations of chemical and toxicological properties of compounds in solution cannot be excluded. Exposure of cells at the ALI, allowing a direct contact between cells and the TIH without interference of the cell culture medium and thereby mimicking the *in vivo* exposure conditions more realistically and physiologically, may overcome both issues [31].

In recent years, various ALI exposure systems have been developed for the exposure of cell cultures with gases and aerosols generated from liquids or dry powders [21,25]. The exposure of *in vitro* models to gases can be considered as less challenging because gases represent a homogenous mixture of compounds with the same aggregate state. In contrast, aerosols are heterogenous mixtures of particulate materials or droplets in a carrier gas. A homogenous distribution of the latter is still a demanding task [20]. Moreover, aerosolization of highly toxic compounds is a major challenge regarding safety precautions. Due to these difficulties described above and the extreme toxicity of SM, experiments with aerosolized SM pose a major challenge to scientists. Therefore, only one publication reports about the exposure of cells to nitrogen mustard (HN2), a functional analog of SM, under ALI-like conditions so far. However, they dissolved HN2 in small amounts of medium and did not administered HN2 as an aerosol [32].

Aim of our study was therefore to evaluate whether ALI exposure of cultivated human lung cells to SM using the CULTEX[®] RFS methodology is feasible, applicable and favorable compared to the classic submerge SM exposure. Using both techniques, cell viability and formation of SM-specific DNA-adducts were compared after ALI and submerge SM exposure.

2. Materials and methods

2.1. Media, reagents and chemicals

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS Superior), phosphate buffered saline (PBS), gentamycin, and trypsin/EDTA (0.05%/0.02%) were obtained from Biochrom (Berlin, Germany). Cell culture inserts from Corning (Wiesbaden, Germany) were used and WST-1 Cell Proliferation Reagent was purchased from Abcam (Cambridge, United Kingdom). Antibody diluent and protein

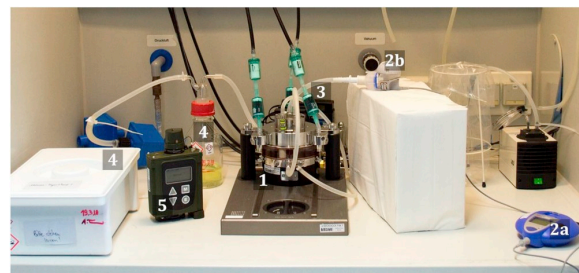


Fig. 1. Overview of the exposure setup: (1) CULTEX[®] RFS (exposure module containing the cell culture inserts); (2) eFlow[®] rapid nebulizer system consisting of (a) the control unit and (b) the nebulizer; (3) activated carbon filters and (4) sodium hypochlorite as decontamination units; (5) chemical warning device LCD3.3.

block were delivered from Dako North America Inc (Carpinteria, USA). Ethanol (EtOH), tris-(hydroxymethyl)-aminomethane ($\geq 99.9\%$), sodium acetate ($\geq 99\%$), and acetic acid were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). 2'-deoxyguanosine monohydrate and 2'-deoxyadenosine monohydrate (dG, dA, $\geq 99\%$), methanol, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, and sodium dihydrogen citrate were purchased from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany). Acetonitrile (LC-MS grade), magnesium chloride hexahydrate (for analysis, 99.0–101.0%), water (LC-MS grade), formic acid (FA, $> 98\%$), and formamide were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Sulfur mustard (SM, bis-(2-chloroethyl) sulfide, purity $> 99\%$, confirmed by NMR) was made available by the German Ministry of Defense. SM-Adenine (HETE-Ade) and SM-Guanine (HETE-Gua) chemical standards for mass spectrometric analyses were synthesized and purified as described in Ref. [33].

2.2. *In vitro* exposure system

The CULTEX[®] Radial Flow System (RFS) from Cultex[®] Technology GmbH (Hannover, Germany) and the eFlow[®] rapid nebulizer system from PARI GmbH (Starnberg, Germany) were used for SM exposure experiments under ALI conditions (Fig. 1). The CULTEX[®] RFS, previously described in Ref. [21], is primarily designed for the investigation of airborne particle exposure. Therefore, it was necessary to adapt the Cultex[®] method for the exposure of cells to liquid aerosols by exchanging the Dust Generator (Cultex[®] Technology GmbH, Hannover, Germany) with the eFlow[®]. Cells were exposed using a gas flow of 30 mL/min (central air flow of 1.5 L/min). The eFlow[®] is a commercially available vibrating membrane generator that creates aerosols from liquids. The nebulizer utilizes a piezoelectrically-driven vibrating membrane to induce acoustic pressure waves, which periodically extrudes the liquid through the laser drilled perforated membrane, thus dispersing it into an aerosol of fine regularly sized droplets of approx. 4 μm in diameter according to the data provided by the manufacturer.

2.3. Cell culture

For exposure experiments we used the human lung adenocarcinoma cell line A549 (CCL185, ATCC; exhibiting characteristics of alveolar epithelial type II). This cell line is a standard *in vitro* model in toxicology [34]. A549 cells were cultivated in growth medium (DMEM supplemented with 10% FBS Superior and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ (standard conditions). For passaging, A549 cells were detached with trypsin/EDTA for 6 min and resuspended in fresh growth medium every 2–3 days. The cell number was determined using the Casy[®] Cell Counter (OLS OMNI Life Science GmbH, Bremen, Germany).

2.4. Assessment of liquid aerosol distribution

The distribution of liquid aerosol inside the CULTEX® RFS during exposure was evaluated by the help of polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and Coomassie blue staining. The PVDF membranes were positioned in all three chambers inside the cell-free cell culture inserts and exposed to a solution of growth medium, containing Coomassie blue (0.01% in DMEM). The distribution of the dye was visualized at an excitation wavelength of 680 nm using the Odyssey CLx scanner (Li-Cor, Bad Homburg, Germany).

2.5. Exposure to SM

All experiments were performed in a fume hood to meet the required safety regulations. For exposure experiments, A549 cells were seeded in Corning® Transwell® cell culture inserts (6-well, PET membrane, 4.67 cm², pore size 0.4 mm, pore density 4.0×10^6) with a density of 3.0×10^5 cells per insert. Cells were cultivated in growth medium for 24 h under submerged standard conditions before exposure. Prior to the exposure experiments, SM stock solutions (400 mM) were prepared by diluting neat SM (8 M) in 100% ethanol (EtOH). Immediately before exposure, final SM dilutions were prepared in exposure medium (DMEM supplemented with 5 µg/mL gentamycin) with a maximum EtOH volume of 2.5%. Exposure experiments with DMEM or 2.5% EtOH served as negative controls.

2.5.1. SM exposure under ALI conditions

The experimental setup of the SM exposure experiments under ALI conditions using the CULTEX® RFS combined with the eFlow® is illustrated in Fig. 1. To meet all safety aspects, activated carbon filters and sodium hypochlorite solution (12%) were used as decontamination units for the contaminated air. Furthermore, a chemical warning device (LCD3.3, Smiths Detection, USA, provided by the German Armed Forces) was positioned in the fume hood to detect any leakages. All materials that had contact with SM were decontaminated with sodium hypochlorite solution (12%) afterwards.

Cells were exposed at the ALI using a gas flow of 30 mL/min (see Fig. 2 left). During exposure, cells were supplied from beneath the cell culture membrane with exposure medium. Typically, exposure experiments lasted between 10 and 20 min (required time of the eFlow® to

nebulize one filling quantity of 6 mL). Cells were exposed to pure exposure medium, EtOH control (exposure medium with a maximum EtOH volume of 2.5%), 100% EtOH and four final SM concentrations of 0.1 mM, 1 mM, 5 mM, and 10 mM. After exposure, inserts were transferred into new 6-well plates with 1.5 mL growth medium per well and - depending on further treatment - cultivated for 30 min (detection of DNA-adducts) or 24 h (viability assay) under ALI standard conditions. For incubator controls, cells were cultivated 24 h under submerged conditions before they were transferred to a 6-well plate with 1.5 mL basal growth medium and incubated for additional 30 min or 24 h under ALI standard conditions.

2.5.2. SM exposure under submerged conditions

The cell culture inserts were transferred into 6-well plates with 1.5 mL exposure medium per well and exposed to 0.5 mL of the same solutions, as described under 2.5.1 (see Fig. 2 right). After an exposure time of 15 min under standard conditions, the exposure solutions above the cells were removed, the inserts were transferred into new 6-well plates with 1.5 mL basal growth medium and incubated for additional 30 min (detection of DNA-adducts) or 24 h (viability assay) under ALI standard conditions. Incubator controls were treated as described under 2.5.1.

2.6. Detection of DNA-adducts

2.6.1. Immunocytochemistry staining of DNA-adducts

DNA-adducts were visualized by 2F8 antibody staining, which selectively detects SM-guanosine mono adducts (N7 HETE-Gua) [35].

Exposed cells were fixed with 5% acetic acid in methanol for 20 min at 4 °C. After several washing steps with PBS, cell membranes were cut out and transferred into new 6-well plates. Fixed cells were subjected to 0.3% Triton X-100 for permeabilization (10 min, 4 °C), washed with PBS and treated with protein block for 20 min at room temperature. After treatment with 80% formamide in PBS for 30 min at 75 °C, cells were cooled for 5 min at 4 °C and incubated with the primary antibody 2F8 (2 mg/mL, 1:5000 diluted in antibody diluent) overnight at 4 °C. After several washing steps with PBS, DAPI (Invitrogen, USA, diluted 1:80,000) and the secondary antibody goat anti-mouse DyLight 648 (Vector Laboratories, USA, 1:500 diluted in antibody diluent) were added and incubated for 1.5 h at room temperature in the dark. Cells were washed with purified water and embedded with ProLong antifade (Molecular Probes, Eugene, USA). Fluorescence intensity was visualized by laser scanning microscopy (LSM710, Zeiss, Germany). The same parameter settings were used for all acquired images to allow direct comparison. The software ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA) was used for densitometric evaluation.

2.6.2. Measurement of DNA-adducts using µLC-ESI MS/HR MS

2.6.2.1. Sample preparation. Cells were trypsinized and detached from the membrane of the cell culture inserts by gentle scraping. The cell suspension of three inserts from a total of two independent experiments (same exposure conditions and SM concentration) were pooled. Before centrifugation (5 min, 462 rcf, 4 °C), concentrations of the pooled cell suspensions were determined using the Casy® Cell Counter. The cell pellets were resuspended with PBS and centrifuged (10 min, 462 rcf, 4 °C). Cellular DNA was purified as described in Ref. [33].

2.6.2.2. Chromatography. Chromatographic separation of analytes was conducted based on methods and protocols as developed in Ref. [33], with some modifications.

For the separation of analytes, a microbore liquid chromatography (µLC) system consisting of a microLC 200 pump (Eksigent Technologies LLC, Dublin, CA, USA), an HTC xt DLW autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland, sample tray kept at 15 °C) with a 20 µL sample loop (Sunchrom, Friedrichsdorf, Germany) was applied and controlled

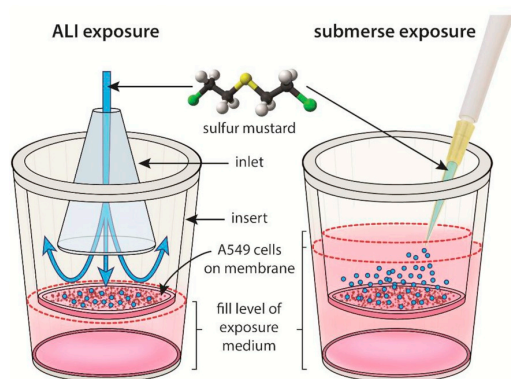


Fig. 2. Scheme of the experimental setup for SM ALI (left) or SM submerge (right) exposure experiments. A549 cells were either exposed with a SM aerosol (blue arrows) at the ALI (left) or with SM diluted directly in exposure medium (blue dots) creating submerge conditions (right). Red dotted lines represent the fill levels of exposure medium (bright red) in the respective experimental setup. During ALI exposures, medium is only provided in the lower compartment, supplying the cells from below. During submerge exposures, the inserts are additionally filled with exposure medium that contains SM thereby completely surrounding the cells with medium.

using the Eksigent control 4.2 (Eksigent) software. As stationary phase an ACQUITY UPLC HSS T3 column (50 mm × 1.0 mm I.D., 1.8 μm, 100 Å) protected by a security guard ultra-cartridge (C18, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) was applied. For separation of 20 μL sample the following gradient of eluent A (0.05% v/v FA) and eluent B (ACN/H₂O 80/20% v/v, 0.05% v/v FA) with a flow of 40 μL/min was used: t [min]/B [%]: 0/2; 3/60; 4.9/60; 5/2; 6/2 including an initial equilibration phase of 3 min with 2% eluent B and a flow of 80 μL/min. The column oven was kept at 60 °C.

2.6.2.3. Mass spectrometry. Mass spectrometric analyses were conducted essentially as described in Ref. [33], with some modifications. The high-resolving TripleTOF 5600⁺ (TT5600⁺, AB Sciex, Darmstadt, Germany) mass spectrometer was controlled by the Analyst TF 1.7.1 (AB Sciex) software and simultaneously coupled online to the μLC via the electrospray ionization (ESI) interface and the calibrant delivery system (CDS, AB Sciex) via the atmospheric pressure chemical ionization interface. To ensure highest mass accuracy, a CDS run with a flow of 500 μL/min was performed after every 10th μLC run. Therefore, collision-induced dissociation (CID) fragment ions of reserpine, present in the “APCI positive calibration solution” (AB Sciex) were used to calibrate the time-of-flight mass analyzer. The TT5600⁺ operated in the positive product ion scan mode (high sensitivity) in a mass range from *m/z* 50 to *m/z* 700 detecting CID product ions of the following precursor ions with an accumulation time of 75 ms, respectively: HETE-Ade ([M+H]⁺, *m/z* 240.1), HETE-Gua ([M+H]⁺, *m/z* 256.1), dA ([M+H]⁺, *m/z* 252.1), and dG ([M+H]⁺, *m/z* 268.1). The following parameters were set for all experiments: ion spray voltage floating 5000 V, declustering potential 65 V (reserpine: 80 V), collision energy 20 V (HETE-Gua: 22 V, reserpine: 45 V), collision energy spread 5 V, ion release delay 67 ms, ion release width 25 ms, heater gas 50 psi (3.45·10⁵ Pa), turbo ion spray gas 50 psi (3.45·10⁵ Pa), curtain gas 30 psi (2.07·10⁵ Pa), and temperature 300 °C. Resulting data was processed and analyzed using PeakView 2.1 and MultiQuant 2.1.1 software (both AB Sciex). For peak integration, extracted ion chromatograms (XICs; HETE-Ade and HETE-Gua: *m/z* 105.037, dA: *m/z* 136.062, dG: *m/z* 152.057) were generated from the total ion chromatogram (TIC) with a ± 0.005 Th mass tolerance.

For absolute quantification of HETE-Ade, HETE-Gua, dA, and dG, external calibration curves of the respective chemicals, serial dilutions between 50,000 pM and 6 pM in purified water were analyzed in duplicates.

2.7. Cell proliferation assay

Cell viability as a parameter of toxicity was determined 24 h after exposure by measuring the mitochondrial activity using the WST-1 Cell Proliferation Reagent. The cell proliferation assay was performed according to the manufacturer's protocol. Inserts were transferred 24 h after exposure into new 6-well plates with 2.5 mL growth medium per well and 1 mL WST-1 solution (diluted 1:7 in growth medium, prepared freshly) was added to each cell culture insert and incubated for 1 h under standard conditions. Afterwards, 100 μL of the supernatant was transferred in triplicates from each well to a 96-well plate. Absorbance of the formazan solution was measured at 450 nm with a reference wavelength of 650 nm using the plate reader infinite M200 Pro (Tecan).

2.8. Statistical analysis

The statistic software RStudio (Version 1.1.383) was used for statistical analysis and graphic presentation (RStudio, Inc., Boston, USA). After the descriptive statistics, normal distribution of the data and verification of the variance were analyzed using the Shapiro-Wilk test and the Levene's test, respectively. Significant changes (*p* < 0.01) were determined by the non-parametrical Wilcoxon test.

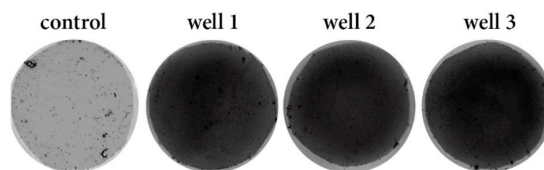


Fig. 3. Homogenous distribution of the liquid aerosol inside the CULTEX[®] RFS module.

3. Results

3.1. Homogenous distribution of liquid aerosol

To verify a comparable deposition of the nebulized aerosol in the three exposure chambers, exposure of PVDF membranes to Coomassie blue should reveal whether a homogenous distribution of the liquid aerosol can be achieved using our exposure system, combining the CULTEX[®] RFS with the membrane nebulizer eFlow[®]. The visualization of Coomassie blue on PVDF membranes after exposure showed both, a homogenous distribution of the liquid aerosol to all three chambers and on the respective membranes (Fig. 3).

Exposure of PVDF membranes placed into the respective inserts resulted in a homogeneous distribution of the liquid aerosol containing Coomassie blue (0.01%), both on the individual membranes and between the three membranes (well 1–3, Coomassie staining shown in black). The unexposed control PVDF membrane does not exhibit any specific Coomassie staining.

The distribution of Coomassie blue was visualized at an excitation wavelength of 680 nm using an Odyssey Scanner.

3.2. Effect of SM exposure on cell viability

A549 cells were exposed to SM under submerged as well as ALI conditions. In order to compare the two experimental approaches, exposure times and SM concentrations were kept identical between ALI and submerge exposure experiments.

Exposure of A549 cells to DMEM or EtOH solvent control (2.5%) showed only very minor effects on cell viability for both, ALI and submerged exposure conditions (Fig. 4). The positive control EtOH (100%) resulted in a complete loss of cell viability in both ALI and submerge exposures.

In general, exposure of A549 cells with SM caused a significant and dose-dependent decrease of cell viability with effects being more pronounced in submerge exposure experiments (Fig. 4).

ALI exposure with 0.1 mM, 1 mM, 5 mM or 10 mM SM resulted in viabilities of 84%, 74%, 60%, and 49%. No complete loss of cell viability was achieved even after exposure to the highest concentration of SM (10 mM) in our experiments. Submerge exposures followed also a dose-response relationship but led to a significantly greater loss of viability. Exposure to 0.1 mM SM led to a cell viability of 72%. Approaches with 1 mM and 5 mM SM resulted in a viability of 56% and 32%, respectively. The highest concentration (10 mM SM) even led to a decrease of almost 100%, resulting in only 5% cell viability.

3.3. Homogenous deposition of SM

The deposition of SM after 30 min of exposure of cells was investigated by immunocytochemical staining of the DNA-adducts using the 2F8 antibody. At this timepoint there is no significant loss of cell viability. DNA-adducts were visualized per nuclei as relative fluorescence intensity (rFI). Staining of DNA-adducts showed a homogenous exposure of the cells with SM, both under submerged as well as under ALI conditions (Fig. 5A). More detailed zoom images of representative membranes are given in Supplement Figure S1. DNA-adducts were

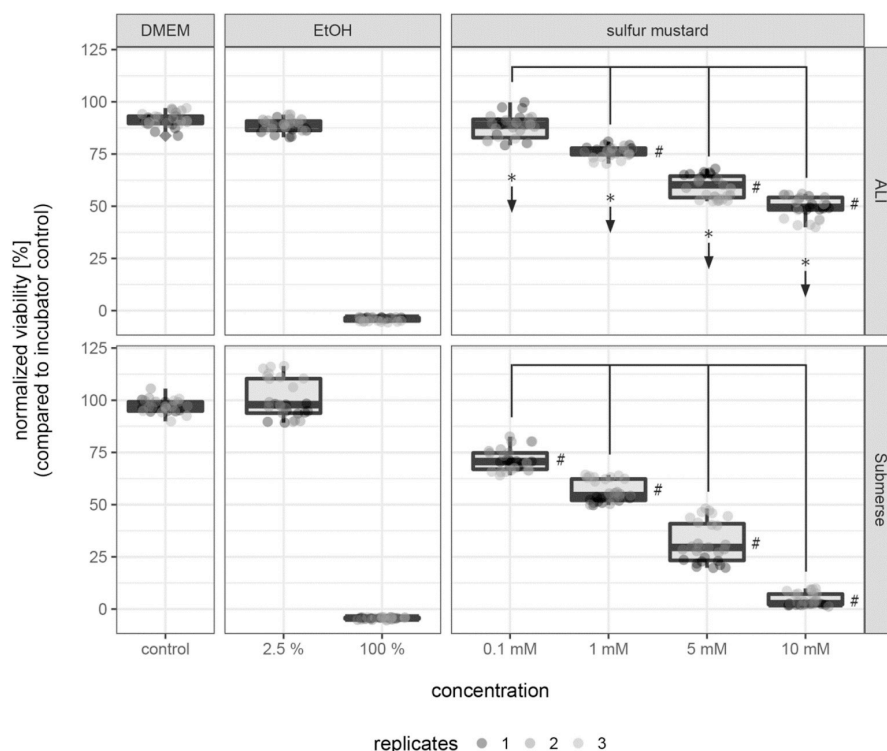


Fig. 4. Viability of A549 cells after ALI and submerge SM exposure. Cell viability is expressed in % in relation to the incubator controls, that were normalized to 100%. The upper boxplots represent the mean results of the cells exposed to SM under ALI conditions (4 exposure experiments, each with 3 inserts per condition, resulting in $n = 12$). The lower boxplots show the mean results of cells exposed under submerged conditions (3 exposure experiments, each with 3 inserts per condition, resulting in $n = 9$). Viability data after SM exposure under ALI conditions: DMEM ($91.8\% \pm 3.3\%$), 2.5% EtOH ($84.5\% \pm 7.9\%$), 100% EtOH ($0\% \pm 0.7\%$), 0.1 mM SM ($83.6\% \pm 9.2\%$), 1 mM SM ($74.3\% \pm 4.6\%$), 5 mM SM ($59.7\% \pm 4.9\%$) and 10 mM SM ($49.4\% \pm 4.3$). Viability data after SM exposure under submerged conditions: DMEM ($97.1\% \pm 3.1$), 2.5% EtOH ($100\% \pm 9.1$), 100% EtOH ($0\% \pm 0.4\%$), 0.1 mM SM ($71.5\% \pm 5.2\%$), 1 mM SM ($56.3\% \pm 5.2\%$), 5 mM SM ($31.9\% \pm 9.7\%$) and 10 mM SM ($4.67\% \pm 3.0\%$). # indicates significant differences ($p < 0.01$) between SM concentrations and DMEM control; lines indicate significant differences ($p < 0.01$) between SM concentrations, and asterisks/arrows between ALI and submerge groups.

found in all samples, even at the lowest SM concentration of 0.1 mM. The relative fluorescence intensity of DNA-adducts, however, was SM concentration-dependent and significantly higher in submerged samples than in ALI samples. Even though the cell viability was not significantly reduced at the lowest SM concentration compared to the viability of the incubator control, DNA-adducts were already detectable. Fig. 5B reveals that the saturation of the relative fluorescence intensity was achieved after 5 mM SM exposure (submerge), leading to no further increase in relative fluorescence after 10 mM SM exposure. Cell confluency was below 100% and 2F8 staining was located in the nuclei. Thus, a distinct variation of fluorescence intensities over the membrane area was measured. The observed standard deviation does not interfere with the homogeneity of the DNA-adducts.

3.4. Detection of SM-specific DNA-adducts

SM-induced DNA alkylation as a marker for cell damage was analyzed by μ LC-ESI MS/HR MS-based detection of HETE-Gua and HETE-Ade DNA-adducts. The methods used are based on a recently developed mass spectrometric platform for the analysis of SM nucleic acid adducts in cells and tissues [33]. Quantitative detection of SM-specific DNA-adducts was conducted 30 min after SM-exposure. DNA-adduct formation was proven in A549 cells exposed to all SM concentrations under submerged as well as under ALI conditions (Fig. 6). Comparing the amount of DNA alkylation per 1×10^6 base pairs between ALI-exposed and submerge-exposed cells revealed a distinct higher DNA damage in submerged exposed cells. In line with the viability data and the immunocytochemical staining, increasing SM concentrations led to increasing amounts of DNA-adducts (HETE-Ade and HETE-Gua).

4. Discussion

Human *in vivo* exposure scenarios are highly complex with regard to aerosol composition and respiratory distribution and are almost

impossible to mimic in *in vitro* settings. However, exposure of cells under ALI conditions resemble the physiological situation more closely than submerge exposures. Aim of our study was (i) to evaluate if a modified CULTEX[®] RFS in combination with the membrane nebulizer eFlow[®] is suitable for exposure experiments with SM under ALI conditions and (ii) to compare ALI and submerge SM exposure designs.

First, SM aerosol generation had to be established. An aerosolization of liquids can technically be achieved by using different nebulizers. Thermal evaporators were found inappropriate in our setup, as SM is diluted in organic and flammable solvents, thus causing the risk of ignition and explosion. Other systems, such as the air-flow nebulizer Pari Boy[®] or the membrane nebulizer eFlow[®] operate without thermal evaporation and do not bear that risk. We have chosen the eFlow[®] nebulizer for our ALI exposure experiments due to the following reasons: (i) the eFlow[®] is characterized by a highly reproducible performance [36], (ii) for safety reasons the control unit can be stored separately outside the fume hood, and (iii) the eFlow[®] switches off automatically with an audible signal after the liquid reservoir filled with a defined volume has been emptied. Nevertheless, ALI exposure using the Pari Boy[®] may be also feasible but was not further investigated in the presented study because of the mentioned benefits provided by the eFlow[®]. After choosing the eFlow[®] for aerosol generation, its applicability in combination with the CULTEX[®] RFS was proven. Initial exposure tests with Coomassie blue revealed that our exposure system is well suited for exposures to liquid aerosols. Indeed, our results demonstrated that the eFlow[®] is suitable to generate an aerosol of cell culture medium and Coomassie blue that was homogeneously distributed inside the CULTEX[®] RFS to all three chambers with a stable and homogenous deposition on all three inserts. This finding is in line with previous results regarding the even distribution of airborne particles to the three exposure chambers [21]. Next, the experimental setup was prepared and optimized for SM exposure experiments. In general, all system components that may have contact to SM had to be decontaminated with sodium hypochlorite at the end of the experiment. The original Cultex[®] module is made of plastic and

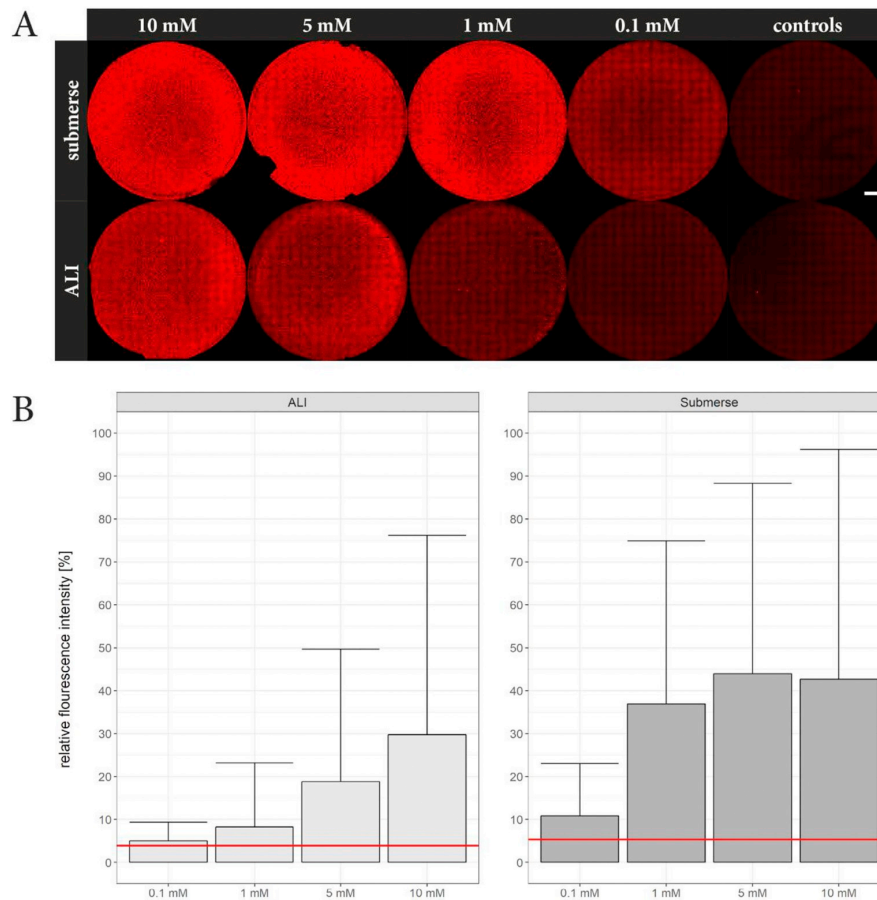


Fig. 5. Detection of DNA-adducts after SM exposure by immunocytochemical staining using the 2F8 antibody. A) Homogenous distribution of DNA-adducts, visualized on all SM-exposed cell membranes. Fluorescence intensity of DNA-adducts was visualized by laser scanning microscopy. B) Relative fluorescence intensities increased with increasing SM concentrations, whereby submerged SM-exposed cells showed higher fluorescence intensities than cells exposed to the same SM concentrations at the ALI. Horizontal lines indicate background fluorescence levels, error bars represent standard deviations (representative result from $n = 3$).

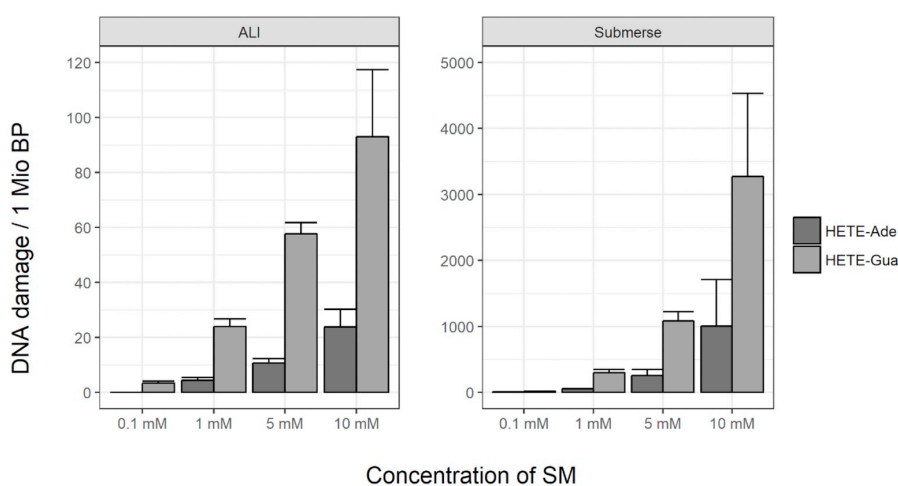


Fig. 6. Detection of DNA-adducts after SM exposure using the μ LC-ESI MS/HR MS. Amount of DNA damage per 1×10^6 bases increased with increasing SM concentrations. Significant differences in DNA damage were measurable between cells exposed to SM under submerged conditions or at the ALI. Cells from three independent experiments (with three inserts per experiment) were pooled per SM concentration and exposure route ($n = 9$). DNA damage per 1×10^6 dG (HETE-Gua) and 1×10^6 dA (HETE-Ade), respectively, after SM exposure at the ALI: 0.1 mM SM ($3.4 \pm 0.8/-$), 1 mM SM ($24 \pm 2.8/4.4 \pm 1.1$), 5 mM SM ($58 \pm 4.1/11 \pm 1.5$) and 10 mM SM ($93 \pm 24/24 \pm 6.5$). DNA damage per 1×10^6 dG (HETE-Gua) and 1×10^6 dA (HETE-Ade), respectively, after SM exposure under submerged conditions: 0.1 mM SM ($21.5 \pm 1.2/4.7 \pm 0.7$), 1 mM SM ($298 \pm 52/56 \pm 1.6$), 5 mM SM

($1084 \pm 143/255 \pm 93$) and 10 mM SM ($3272 \pm 1262/1004 \pm 706$). The methods used are based on a recently developed mass spectrometric platform for the quantitation of SM induced nucleic acid adducts as described in Ref. [33]. Error bars represent standard deviations.

thus inappropriate for decontamination. The also commercially available stainless-steel module of the CULTEX[®] RFS was proven to resist highly aggressive sodium hypochlorite. All other additional components were either decontaminated (e.g. membrane or liquid reservoir of the eFlow[®]) or disposed after use (e.g. hoses). Negative pressure tests before each experiment were conducted to prove tightness of the assembled CULTEX[®] RFS. For safety reasons, an ion mobility spectrometry chemical warfare agent detector was placed close to the module under the fume hood to alarm in case of a leakage. Our system fulfilled the occupational safety requirements and proved to be reliable in all conducted experiments with SM. The concentration range of SM was set between 0.1 mM and 10 mM for exposure experiments. ALI exposure of cells with 0.1 mM SM revealed no significant differences in cell viability compared to the DMEM control, whereas exposure under submerged conditions with 10 mM SM led to a total loss of cell viability, indicating that further lower or higher SM concentrations were not required. Aerosol formation of the various SM concentrations diluted in 6 mL of exposure medium was always constant with some minor variations in time until complete aerosolization of the exposure liquid. This, however, had no effect on the experimental procedure or the results. SM exposure at the ALI resulted in a dose-dependent decrease of cell viability which was normalized to unexposed incubator controls. Although high SM concentrations were used, no complete loss of cell viability was achieved. Exposure to the highest SM concentration of 10 mM decreased cell viability to only 50%. In contrast, submerge SM-exposed cells showed already a slight decrease of viability at 0.1 mM and a complete loss of viability at 10 mM SM. Cytotoxicity of SM, especially in the lower concentration range, was in both ALI and submerge exposures lower than expected. In previous submerge exposure experiments, SM was added to the cell culture medium and SM-containing medium was not changed until final read-out (usually 24 h after exposure) [37,38]. In the presented study, exposure times were adjusted to the time the eFlow[®] device required for a complete aerosolization which was between 10 and 20 min. Time for submerge exposures was chosen to be 15 min which represented the mean eFlow[®] exposure time. Inserts were then also transferred to fresh medium and cultivated under ALI conditions in order to ensure identical culture conditions for both ALI and submerge groups. This approach, however, terminates SM exposure in all groups resulting in smaller exposure concentration-time products in this study and explaining the observed lower cytotoxic effects. Moreover, the absolute amount of SM, which is deposited on the cell surface area is higher in submerged groups due to higher exposure volumes and is administered at once, whereas SM accumulated in ALI groups over time. The functional principle of the CULTEX[®] RFS is probably the main reason for the significant variation between submerge and ALI exposures. The aerosol is drawn into the CULTEX[®] RFS by a vacuum to avoid any positive pressure that may affect cell viability by itself. As a consequence of this technical approach, only a fraction of the aerosol will be deposited on the membranes while the major volume passes the system into the decontamination unit. Thus, precise determination of the SM deposition cannot be done because a significant loss of aerosol has to be expected. This assumption was proven by our results showing a significantly lower cytotoxicity in ALI experiments compared to submerged exposures. A direct translation between CULTEX[®] RFS and results from submerge experiments is not feasible. It appears that the effect is approx. 1/10 in ALI groups. Probably, a non-complete nebulization, which has been described for the classical nebulization techniques [39], may contribute to this observation. Thus, we assessed SM-induced DNA alkylation as reference for the estimation of the absolute SM exposure dose and to compare ALI and submerge results. DNA-adducts were visualized by immunocytochemical staining and analysis by μ LC-ESI MS/HR MS. Very similar to the Coomassie blue experiments, staining of DNA-adducts showed a very homogenous distribution on the cell membranes in both submerge and ALI experiments. In both cases, a SM concentration-dependent adduct formation was detected starting already at the lowest SM concentration of 0.1 mM (ALI). In line with the viability data, relative fluorescence intensity signals of DNA-adducts were much higher in the

submerged groups compared to the ALI samples. Fluorescence intensity reached a saturation at 5 mM SM in submerge groups. To address this shortcoming, mass spectrometry experiments were conducted. The quantitative determination of DNA-adducts by μ LC-ESI MS/HR MS was much more sensitive and accurate and confirmed the results of the viability data and the evaluation of adduct staining. Using this method, finally a distinct difference in DNA damage per 1×10^6 base pairs could be resolved between cells submerged exposed to 5 mM and 10 mM SM, respectively.

5. Conclusion

To the best of our knowledge, this study presents the first exposure of cultivated human lung cells to SM aerosol at the ALI. Our results proved the applicability of our exposure system and the reproducible generation and uniform distribution of a liquid SM aerosol. Lower doses of SM reached the cells during ALI exposure in our setup compared to the submerged exposure but were sufficient to cause cytotoxicity and DNA-adduct formation. Both methods have their advantages and disadvantages and should be used depending on the question posed. The ALI system allows the exposure of cells with SM as nebulized aerosol representing a scenario which is closer to the physiological conditions after an *in vivo* exposure to the agent. In addition, this setup is also useful and appropriate for the exposure of e.g. precision cut lung slices, an efficient tool for *in vitro* lung studies to observe and assess lung functions under more physiological cell culture conditions. Therefore, our system is a promising tool to address many unresolved biological questions in the field of inhalation toxicity. However, the experimental procedure is elaborated, and high doses of SM have to be used in order to achieve similar results compared to submerged exposure. A definite advantage of SM-ALI exposure compared to SM-submerge exposures has not turned out in our experiments so far. However, it must be noted that we assessed cell viability as sole parameter. If other endpoints (e.g. release of pro-inflammatory cytokines) could show a different response was not subject of the present study but is not assumed. Finally, we have presented a new method, based on nebulized SM exposure at the ALI, which is physiologically more relevant and can be used for further studies.

Funding source

This work was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF, Germany (Grant 031A581B), the German Ministry of Defense (Bundesministerium der Verteidigung (Grant E/U2CB/EA199/EF552) and by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgesellschaft, DFG, Research Training Group GRK 2338). TZ was supported by a fellowship of the DFG-funded Konstanz Research School Chemical Biology (KoRS-CB).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.025>.

References

- [1] L.F. Haber, *The Poisonous Cloud Chemical Warfare in the First World War*, Oxford University Press, Oxford, 2002.
- [2] V. Pitschmann, Overall view of chemical and biochemical weapons, *Toxins (Basel)* 6 (6) (2014) 1761–1784 <https://doi.org/10.3390/toxins6061761>.
- [3] B. Friedrich, D. Hoffmann, J. Renn, F. Schmaltz, M. Wolf, *One Hundred Years of Chemical Warfare: Research, Deployment, Consequences*, Springer International Publishing, Cham, 2017.

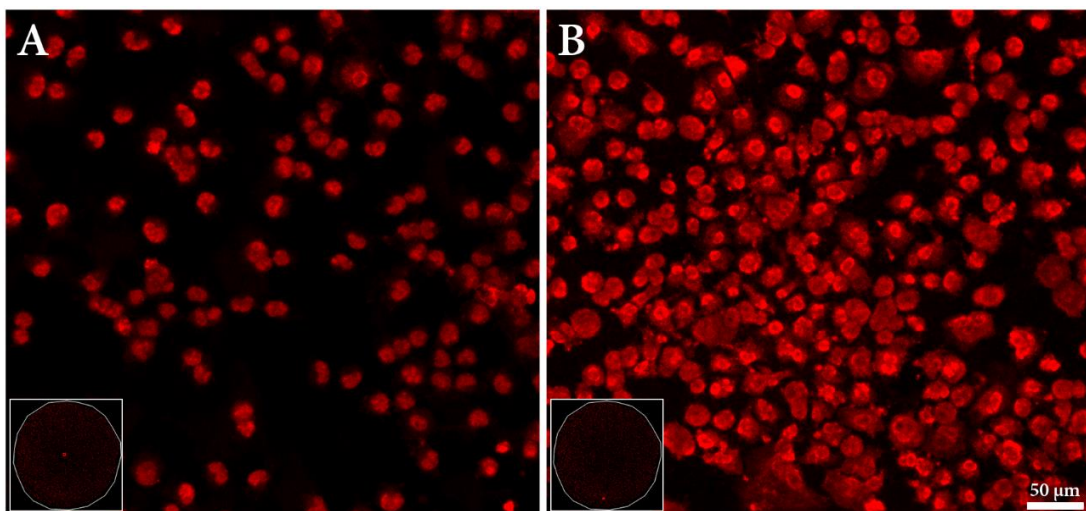
- [4] C.M. Pechura, D.P. Rall (Eds.), *Veterans at Risk: the Health Effects of Mustard Gas and Lewisite*, National Academy Press, Washington, D.C., 1993.
- [5] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction. <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/download-the-cwc/> (accessed May 2018).
- [6] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, Report of the OPCW Fact-Finding Mission in Syria Regarding Alleged Incidents in MAREA, Syrian Arab Republic. https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/Fact_Finding_Mission/s-1320-2015_e.pdf (accessed May 2018).
- [7] K. Kehe, F. Balszuweit, D. Steinritz, H. Thiermann, Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering, *Toxicology* 263 (1) (2009) 12–19 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.019>.
- [8] K. Kehe, L. Szinicz, Medical aspects of sulphur mustard poisoning, *Toxicology* 214 (3) (2005) 198–209 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.014>.
- [9] M. Pohanka, P. Martinkova, M. Brtnicky, J. Kynicky, Changes in the oxidative stress/anti-oxidant system after exposure to sulfur mustard and antioxidant strategies in the therapy, a review, *Toxicol. Mech. Methods* 27 (6) (2017) 408–416 <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1320695>.
- [10] H. Thiermann, F. Worek, K. Kehe, Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning, *Chem. Biol. Interact.* 206 (3) (2013) 435–443 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.09.015>.
- [11] K. Kehe, H. Thiermann, F. Balszuweit, F. Eyer, D. Steinritz, T. Zilker, Acute effects of sulfur mustard injury - Munich experiences, *Toxicology* 263 (1) (2009) 3–8 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.060>.
- [12] M.D. McGraw, M.M. Dysart, T.B. Hendry-Hofer, P.R. Houin, J.S. Rioux, R.B. Garlick, J.E. Loader, R. Smith, D.C. Paradiso, W.W. Holmes, D.R. Anderson, C.W. White, L.A. Veress, Bronchiolitis obliterans and pulmonary fibrosis after sulfur mustard inhalation in rats, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58 (6) (2018) 696–705 <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0168OC>.
- [13] S. Mansour Razavi, P. Salamat, M. Saghafinia, M. Abdollahi, A review on delayed toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans, *Daru* 20 (1) (2012) 51 <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-51>.
- [14] J. Borak, F.R. Sidell, Agents of chemical warfare: Sulfur mustard, *Ann. Emerg. Med.* 21 (3) (1992) 303–308 [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(05\)80892-3](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(05)80892-3).
- [15] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, Types of Chemical Agent - Mustard Agents. <https://www.opcw.org/about-chemical-weapons/types-of-chemical-agent/mustard-agents/> (accessed 4 June 2018).
- [16] Alfred M. Sciuto, Urmila P. Kodavanti, Chapter 36 - the respiratory toxicity of chemical warfare agents, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Elsevier, 2015, pp. 489–518.
- [17] K. Zarchi, A. Akbar, K.H. Naieni, Long-term pulmonary complications in combatants exposed to mustard gas: a historical cohort study, *Int. J. Epidemiol.* 33 (3) (2004) 579–581 <https://doi.org/10.1093/ije/dyh068>.
- [18] M. Balali-Mood, M. Hefazi, Comparison of early and late toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 99 (4) (2006) 273–282 <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto.429.x>.
- [19] J. Seagrave, W.M. Weber, G.R. Grotendorst, Sulfur mustard vapor effects on differentiated human lung cells, *Inhal. Toxicol.* 22 (11) (2010) 896–902 <https://doi.org/10.3109/08958378.2010.493901>.
- [20] D. Steinritz, N. Möhle, C. Pohl, M. Papritz, B. Stenger, A. Schmidt, C.J. Kirkpatrick, H. Thiermann, R. Vogel, S. Hoffmann, M. Aufderheide, Use of the CULTEX Radial Flow System as an in vitro exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility, *Chem. Biol. Interact.* 206 (3) (2013) 479–490 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.05.001>.
- [21] M. Aufderheide, B. Halter, N. Möhle, D. Hochrainer, The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the in vitro exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface, *BioMed Res. Int.* 2013 (2013) 734137 <https://doi.org/10.1155/2013/734137>.
- [22] M.R. Agrawal, C. Winder, Frequency and occurrence of LD50 values for materials in the workplace, *J. Appl. Toxicol.* 16 (5) (1996) 407–422, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199609\)16:5<407:AID-JAT365>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199609)16:5<407:AID-JAT365>3.0.CO;2-V).
- [23] A.J. Clippinger, D. Allen, A.M. Jarabek, M. Corvaro, M. Gaça, S. Gehen, J.A. Hotchkiss, G. Patlewicz, J. Melbourne, P. Hinderliter, M. Yoon, D. Huh, A. Lowit, B. Buckley, M. Bartels, K. Bérubé, D.M. Wilson, I. Indans, M. Vinken, Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: an international workshop report, *Toxicol. In Vitro* 48 (2018) 53–70 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.011>.
- [24] J.W. Haycock, A. Ahluwalia, J.M. Wilkinson, *Cellular In Vitro Testing: Methods and Protocols*, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd, Singapore, 2015.
- [25] D.L. Costa, Alternative test methods in inhalation toxicology: challenges and opportunities, *Exp. Toxicol. Pathol.* 60 (2–3) (2008) 105–109 <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.01.001>.
- [26] W.M.S. Russell, R.L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*, (1959) http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc, Accessed date: 28 August 2018.
- [27] E. Loizou, M. Spendiff, H.A. Barton, J. Bessems, F.Y. Bois, M.B. d'Yvoire, H. Buist, H.J. Clewell, B. Meek, U. Gundert-Remy, G. Goerlitz, W. Schmitt, Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: the first steps, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 50 (3) (2008) 400–411 <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.01.011>.
- [28] E. Fröhlich, S. Salar-Behzadi, Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (3) (2014) 4795–4822 <https://doi.org/10.3390/ijms15034795>.
- [29] S. Bakand, A. Hayes, Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 61 (2) (2010) 76–85 <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.01.010>.
- [30] D.O. Raemy, R.N. Grass, W.J. Stark, C.M. Schumacher, M.J.D. Clift, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, Effects of flame made zinc oxide particles in human lung cells - a comparison of aerosol and suspension exposures, *Part. Fibre Toxicol.* 9 (2012) 33 <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-33>.
- [31] A.-G. Lenz, E. Karg, E. Brendel, H. Hinze-Heyn, K.L. Maier, O. Eickelberg, T. Stoeger, O. Schmid, Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions, *BioMed Res. Int.* 2013 (2013) 652632 <https://doi.org/10.1155/2013/652632>.
- [32] C. Karacsonyi, N. Shanmugam, E. Kagan, A clinically relevant in vitro model for evaluating the effects of aerosolized vesicants, *Toxicol. Lett.* 185 (1) (2009) 38–44 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.11.015>.
- [33] T. Zübel, S. Kurzeja, H. John, D. Steinritz, A. Schmidt, A. Bürkle, A. Mangerich, A mass spectrometric platform for the quantitation of sulfur mustard-induced nucleic acid adducts as mechanistically relevant biomarkers of exposure, *Arch. Toxicol.* (2018), <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2324-7> (in press), pubmed ID: 30324314.
- [34] K.A. Foster, C.G. Oster, M.M. Mayer, M.L. Avery, K.L. Audus, Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism, *Exp. Cell Res.* 243 (2) (1998) 359–366 <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4172>.
- [35] G.P. van der Schans, A.G. Scheffer, R.H. Mars-Groenendijk, A. Fidler, H.P. Benschop, R.A. Baan, Immunochemical detection of adducts of sulfur mustard to DNA of calf thymus and human white blood cells, *Chem. Res. Toxicol.* 7 (3) (1994) 408–413 <https://doi.org/10.1021/tx00039a019>.
- [36] A.G. Lenz, E. Karg, B. Lentner, V. Ditttrich, C. Brandenberger, B. Rothen-Rutishauser, H. Schulz, G.A. Ferron, O. Schmid, A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles, *Part. Fibre Toxicol.* 6 (32) (2009) 1–17 <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-32>.
- [37] S. Rothmiller, S. Schröder, R. Strobel, M. Wolf, J. Wang, X. Jiang, F. Worek, D. Steinritz, H. Thiermann, A. Schmidt, Sulfur mustard resistant keratinocytes obtained elevated glutathione levels and other changes in the antioxidative defense mechanism, *Toxicol. Lett.* 293 (2018) 51–61 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.024>.
- [38] F. Balszuweit, G. Menacher, B. Bloemeke, A. Schmidt, F. Worek, H. Thiermann, D. Steinritz, Development of a co-culture of keratinocytes and immune cells for in vitro investigation of cutaneous sulfur mustard toxicity, *Chem. Biol. Interact.* 223 (2014) 117–124 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.002>.
- [39] A. Bauer, P. McGlynn, L.L. Bovet, P.L. Mims, L.A. Curry, J.P. Hanrahan, Output and aerosol properties of 5 nebulizer/compressor systems with arformoterol inhalation solution, *Respir. Care* 54 (10) (2009) 1342.

Supplementary Data

A novel exposure system generating nebulized aerosol of sulfur mustard in comparison to the standard submerse exposure (2019), *Chemico-Biological Interactions*.

A. Tsoutsouloupoulos, M. Siegert, H. John, T. Zubel, A. Mangerich, A. Schmidt, H. Mückter, T. Gudermann, H. Thiermann, D. Steinritz, T. Popp

Supplement Figure 1



Exemplary presentation of detailed zoom images of SM-exposed cell membrane. Fluorescence intensity of DNA-adducts was detected by immunocytochemical staining using the 2F8 antibody and visualized by laser scanning microscopy. Red rectangles represent the zoomed area of the membrane. Submerse exposure of cells to 10 mM SM resulted in a homogenous distribution of DNA-adducts. Fluorescence intensity appears slightly higher at the edge of the membrane. This is only due to a slightly lower cell density in the middle of the membrane (A), compared to the cell density at the edge of the membrane, as shown in B).

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Validierungsstudie hat mit ihren umfangreichen Experimenten, den generierten Datensätzen und deren statistischer Analyse gezeigt, dass das CULTEX[®] RFS als ein robustes, übertragbares und prädiktives Testsystem für die Bewertung der akuten Toxizität inhalierbarer Partikel angewendet werden kann. Für die Validierung wurden die von der EURL-ECVAM geforderten sieben ECVAM Module (Definition der Testmethodik, Reproduzierbarkeit des Verfahrens innerhalb und zwischen den Prüflaboren, Transferierbarkeit, Erstellung eines Prädiktionsmodells, Definition des Test-Anwendungsbereiches und der Leistungsanforderungen) herangezogen und erfolgreich abgeschlossen [22]. Die Bewertung und Interpretation der *in vitro* Ergebnisse im Kontext existierender *in vivo* Daten ergaben eine Gesamtkonkordanz von 85% mit einer Spezifität von 83% und einer Sensitivität von 88%. In Abhängigkeit des jeweiligen Prädiktionsmodells (PM 50%, PM 75%) rangierte die Intra- und Interlabor Reproduzierbarkeit zwischen 90 und 100% [106]. Das CULTEX[®] RFS trägt als *in vitro* Alternativmethode zum Tierversuch zur Umsetzung des 3R-Prinzips bei und könnte daher als vielversprechende Screening-Methode unter der EU Chemikalienrichtlinie REACH und den Richtlinien der OECD für die Prüfung von inhalierbaren Partikeln unter besonderer Berücksichtigung der realen Expositionssituation Verwendung finden. Bislang bezieht sich der Großteil der in den OECD-Testrichtlinien vorgegeben Testmethoden noch auf Tierversuche, da bis heute keine validierten Alternativmethoden zur Verfügung stehen. Durch die Anwendung des CULTEX[®] RFS als Prädiktionsmodell könnten inhalative Substanzen auf ihre akute Toxizität gescreent und für die Beurteilung des Gefährdungspotentials in Toxizitätsklassen kategorisiert werden. Zukünftig könnte solch ein Screening beispielsweise die Sichtungsstudie der TG 433 ersetzen, deren Hauptzweck die Ermittlung einer geeigneten Anfangsdosis für die anschließende Hauptstudie ist [70]. Für eine genauere Risikobewertung und Einstufung der Substanzen würden toxikologische Prüfungen nur im Rahmen der Hauptstudie mit Versuchstieren durchgeführt werden. Dies würde zu einer geringeren Zahl und Belastung der Versuchstiere führen und somit einen wichtigen Beitrag zum Tierschutz leisten. Durch das CULTEX[®] RFS wird eine deutliche Reduktion der Versuchstierzahlen bei gleichzeitiger Steigerung der Effizienz in der Bereitstellung toxikologischer Daten sowie der Wirtschaftlichkeit erwartet. Die erfolgreiche Validierung des CULTEX[®] RFS Verfahrens erfüllt die Voraussetzung für eine Akzeptanz dieser Methode auf internationaler Ebene, d.h. die Zulassung bzw. Akkreditierung als ein im Regelwerk der OECD-Richtlinien akzeptiertes und regulatorisches Tierersatzverfahren zur Bewertung der akuten inhalativen Toxizität von partikulär luftgetragenen Stoffen.

Die Robustheit des experimentellen Aufbaus zur Generation reproduzierbarer und stabiler Daten führte zur Fragestellung, ob das CULTEX[®] RFS Verfahren auch für die Analyse anderer chemischer Atmosphären angewendet werden kann. Im Rahmen der zweiten Studie hat die erfolgreiche Anpassung der CULTEX[®] Anlage für Expositionen mit S-Lost am ALI gezeigt, dass das CULTEX[®] RFS auch für die Untersuchung hochtoxischer Flüssig-Aerosole geeignet ist.

Die Anwendung des modifizierten CULTEX[®] RFS für Expositionen mit toxischen Flüssig-Aerosolen wird nun vor allem im Bereich der wehrmedizinischen Forschung und Diagnostik Verwendung finden. Wiederholte Einsätze von S-Lost in aktuellen Konflikten zeigen, wie hoch das Risiko einer S-Lost Exposition trotz des Verbots durch das CWÜ heutzutage

noch ist. Zellkultur-basierte *in vitro* Expositionsmodele können einen wichtigen Beitrag zur toxikologischen Untersuchung und der bislang noch unaufgeklärten Pathophysiologie von S-Lost leisten. Bislang gab es jedoch aufgrund der hohen Sicherheitsvorkehrungen bei der Aerosolisierung von hochtoxischen Substanzen wie S-Lost noch keine geeigneten Expositionssysteme. Das CULTEX[®] RFS schließt diese Lücke und ermöglicht zum ersten Mal die Exposition von humanen Lungenzellen mit S-Lost Aerosolen am ALI.

Des Weiteren kann das CULTEX[®] System aufgrund der stabilen Reproduzierbarkeit und der eingehaltenen Sicherheitsanforderungen auf die Anwendung und Untersuchung von wehrmedizinisch relevanten Organophosphat-Expositionen ausgeweitet werden.

Da die Bundeswehr die Entwicklung, Validierung und Zulassung von Tierersatzmethoden mit Nachdruck verfolgt, wird das CULTEX[®] RFS für die Untersuchung toxischer Flüssig-Aerosole als Alternativmethode zum Tierversuch zukünftig Verwendung finden.

Eine erste Anwendung fand das System der Aerosolisierung von S-Lost bereits im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Frau Professor Arduini aus Italien. Die Arbeitsgruppe Arduini beschäftigt sich mit der Entwicklung von Biosensorsystemen, elektrochemischen oder papierbasierten (Bio)Sensoren, der Herstellung und Modifizierung von Screenprint-Elektroden und mit Nanomaterialien modifizierten (Bio)Sensoren. Reale Anwendungen finden diese Systeme bereits im Bereich der Lebensmittelchemie und in der klinischen und umweltanalytischen Chemie.

Ziel des gemeinsamen Projektes ist nun die Entwicklung eines elektrochemischen, origami-ähnlichen Biosensors, der für die Detektion von S-Lost sowohl in der Flüssig- als auch Aerosolphase angewendet werden kann [14].

Hierfür wurden die Elektroden mittels Siebdruckes auf Filterpapier gedruckt. Die Porosität des Papiers ermöglicht, dass alle für den Sensorprozess erforderlichen Reagenzien einfach und ohne Immobilisierungsschritt in das Zellulose-Netzwerk integriert werden. Der Sensor basiert auf einem enzymatisch amperometrischen Verfahren. Die Reagenzien Cholin und Cholinoxidase werden durch Adsorption auf getrennte Bereiche des Sensors aufgetragen. Durch Zusammenfalten des Papiersensors wird die katalytische Umsetzung von Cholin gestartet, wodurch das enzymatische Nebenprodukt Wasserstoffperoxid entsteht, welches amperometrisch gemessen werden kann. Der Nachweis von S-Lost erfolgt dann durch Messung der inhibitorischen Wirkung auf das Cholinoxidase-Enzym durch amperometrische Messung des enzymatischen Nebenprodukts Wasserstoffperoxid.

Für die Detektion und den Nachweis von S-Lost in der Aerosolphase wurde hierbei das etablierte eFlow[®] Verneblungssystem erfolgreich zum Einsatz gebracht (Abbildung 4.1).

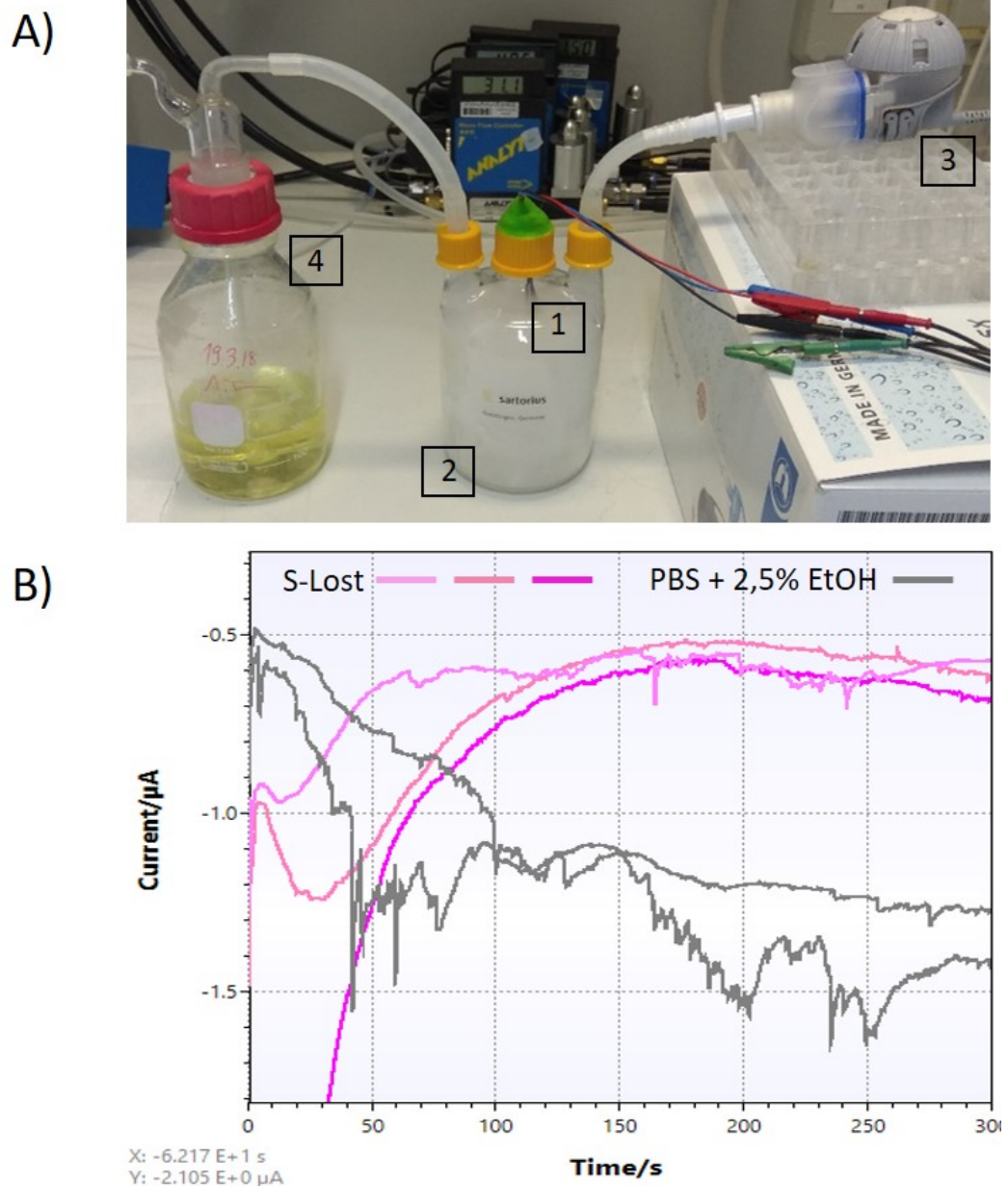


Abbildung 4.1: Exposition des Biosensors mit S-Lost in der Aerosolphase. A) Der Sensor (1) wurde in einer Dreihalsflasche (2) fixiert und mit S-Lost Aerosolen verschiedener Konzentrationen exponiert. Das Aerosol wurde dabei über den Vernebler eFlow[®] (3) in die Dreihalsflasche mit dem Sensor und anschließend in eine Dekontaminationsflasche mit Natriumhypochlorit (4) geleitet. B) Amperometrische Messung des enzymatischen Nebenprodukts Wasserstoffperoxid in An- und Abwesenheit von S-Lost Aerosolen (PBS + 2,5% EtOH = graue Linien; 4 mM S-Lost = pinke Linien). Das Funktionsprinzip beruht auf der Hemmung des Enzyms Cholinoxidase in Anwesenheit von S-Lost. Durch die Hemmung des Enzyms kam es zu einer verminderten Bildung des enzymatischen Nebenprodukts Wasserstoffperoxid und zu einer Verringerung des Stroms von negativen Werten gegen Null. Je näher der Wert gegen Null führte, desto weniger Wasserstoffperoxid wurde gebildet. Aufgrund einer Konvention werden elektrochemische Reduktionsprozesse mit negativen Stromwerten dargestellt.

Dieser Sensor soll in naher Zukunft durch Integration in militärische Uniformen als tragbarer Schnelltest zur Echtzeit-Detektion von S-Lost Aerosolen fungieren und somit zur frühzeitigen Erkennung und Intervention einer S-Lost Exposition beitragen.

Zukünftig soll das CULTEX[®] RFS am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr (InstPharmToxBw) für toxikologische Studien mit murinen PCLS herangezogen werden. Die Exposition der PCLS mittels des jetzt validierten CULTEX-Systems an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht gegenüber Organophosphorverbindungen (z.B. Nervenkampfstoff VX) dient als sinnvolle Ergänzung zu submersen Expositionsversuchen *ex vivo*, um eine reale Expositionssituation besser abbilden zu können. Mittels Videomikroskopie wurden bereits Veränderungen im Bereich der Atemwege in VX-vergifteten Ratten-PCLS nach Acetylcholin-induzierter Atemwegskontraktion und anschließender Applikation ausgewählter Anticholinergika / β 2-Agonisten analysiert [34]. Das CULTEX[®] RFS stellt hierbei nun eine wertvolle Ergänzung dar, indem Expositionsversuche der PCLS mit VX an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht und anschließender Applikation von COPD- und Asthmatherapeutika durchgeführt werden können. Erste Vorversuche am InstPharmToxBw haben bereits gezeigt, dass es zu keiner Abnahme der Zellvitalität der PCLS, sowohl nach längerer Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (3-4 Tage) als auch nach Reinluft-Exposition im CULTEX[®] RFS gekommen ist.

Die hier vorgestellten Arbeiten zeigen die finale Validierung des CULTEX[®] RFS als Tierersatzmethode zur *in vitro* Untersuchung der Toxizität luftgetragener Partikel am ALI, die erfolgreiche Anpassung dieser Testmethode auf andere chemische Atmosphären (z.B. hochtoxische Flüssig-Aerosole wie S-Lost) und bereits die erste Anwendung der S-Lost Aerosolisierung für die Entwicklung eines Biosensors zur S-Lost Detektion.

5 Literaturverzeichnis

1. Anderson H. Air pollution and mortality: a history. *Atmospheric Environment* 2009;43:142–52.
2. Arts JH, Muijser H, Jonker D, Sandt J van de, Bos P und Feron V. Inhalation toxicity studies: OECD guidelines in relation to REACH and scientific developments. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2008;60:125–33.
3. Aufderheide M, Halter B, Möhle N und Hochrainer D. The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the *in vitro* exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface. *BioMed Research International* 2013, Article ID 734137:1–15.
4. Aumann I, Prenzler A und Graf v. d. Schulenburg J. Lungen- und Atemwegserkrankungen in Deutschland. In: *Weißbuch Lunge 2014. Die Lunge und ihre Erkrankungen: Zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland*. Hrsg. von Gillissen A und Welte T. 4. Aufl. Herne: Frischtexte Verlag, 2014. Kap. 1:15–8. ISBN: 978-3-933059-49-9.
5. Benfenati E. Predicting toxicity through computers: a changing world. *Chemistry Central Journal* 2007;1:1–7.
6. Berube K, Aufderheide M, Breheny D, Clothier R, Combes R, Forbes B, Gaça M, Gray A, Hall I, Kelly M, Lethem M, Liebsch M, Merolla L, Morin Jp, Seagrave J und Swartz M. *In vitro* models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *ATLA* 2009;37:89–141.
7. Bérubé K, Jones T und Jones C. Environmental particles: a breath of fresh air? *Royal Microscopical Society* 2008:6–18.
8. Bonner J. Respiratory toxicity. In: *Molecular and biochemical toxicology*. Hrsg. von Smart R und Hodgson E. 4. Aufl. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008. Kap. 27:639–70.
9. Borm P und Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles - potential implications for drug delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2004;4:521–31.
10. Bösch D. Anatomie und Physiologie der Lunge und Atemwege. In: *Lunge und Atemwege*. Hrsg. von Steffel J und Lüscher T. Berlin: Springer Verlag, 2014. Kap. 1:1–8. ISBN: 9783642282225.
11. Brunekreef B und Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet* 2002;360:1233–42.
12. Chen YW, Huang S, Toste de Carvalho A, Ho Sh, Islam M, Volpi S, Notarangelo L, Ciancanelli M, Casanova JL, Bhattacharya J, Liang A, Palermo L, Porotto M, Moscona A und Snoeck HW. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology* 2018;19:542–9.
13. Clippinger A, Allen D, Jarabek A, Corvaro M, Gaça M, Gehen S, Hotchkiss J, Patlewicz G, Melbourne J, Hinderliter P, Yoon M, Huh D, Lowit A, Buckley B, Bartels M, Bérubé K, Wilson D, Indans I und Vinken M. Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: an international workshop report. *Toxicology in Vitro* 2018;48:53–70.
14. Colozza N, Kehe K, Dionisi G, Popp T, Tsoutsoulopoulos A, Steinritz D, Moscone D und Arduini F. A wearable origami-like paper-based electrochemical biosensor for sulfur mustard detection. *Biosensors and Bioelectronics* 2019:15–23.
15. Darchini-Maragheh E, Blain P und Balali-Mood M. Delayed complications and long-term effects of SM poisonings: experience of Iran-Iraq War. In: *Basic and clinical toxicology of mustard compounds*. Hrsg. von Balali-Mood M und Abdollahi M. Heidelberg: Springer International Publishing, 2015. Kap. 5:101–34. ISBN: 9783319238739.

16. De Matteis S, Heederik D, Burdorf A, Colosio C, Cullinan P, Henneberger P, Olsson A, Raynal A, Rooijackers J, Santonen T, Sastre J, Schlünssen V, Van Tongeren M und Sigsgaard T. Current and new challenges in occupational lung diseases. *European Respiratory Review* 2017;26(146).
17. Dickey B, Knowles M und Boucher R. Mucociliary clearance. In: *Fishman's pulmonary diseases and disorders*. Hrsg. von Grippi M, Elias J, Fishman J, Kotloff R, Pack A und Senior R. 5. Aufl. London: McGraw-Hill Education, 2015. Kap. Section 1 - 6:93–103. ISBN: 9781259589126.
18. Dye B, Hill D, Ferguson M, Tsai Yh, Nagy M, Dyal R, Wells J, Mayhew C, Nattiv R, Klein O, White E, Deutsch G und Spence J. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *elife* 2015;4:e05:1–25.
19. ECHA. Illustrative example with the OECD QSAR Toolbox workflow. Part 1: Introductory note. 2014. ISBN: 978-92-9244-432-7.
20. ECHA. Guidance on information requirements and chemical safety assessment - Chapter R.7a: Endpoint specific guidance. 2017. ISBN: 978-92-9495-970-6.
21. ECHA. Reach verstehen. 2019. URL: (<https://echa.europa.eu/de/regulations/reach/understanding-reach>) (besucht am 16.04.2019).
22. Eskes C und Whelan M, Hrsg. Validation of alternative methods for toxicity testing. *Advances in Experimental Medicine and Biology (Volume 856)*. Springer International Publishing Switzerland, 2016:1–418. ISBN: 9783319338248.
23. EU. Amtsblatt der Europäischen Union. Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates L 396. 2006:1–860.
24. Faber S und McCullough S. Through the looking glass: *in vitro* models for inhalation toxicology and interindividual variability in the airway. *Applied In Vitro Toxicology* 2018;4:115–28.
25. Fisher R, Smith M, Hasal S, Hasal K, Gandolfi AJ und Brendel K. The use of human lung slices in toxicology. *Human & Experimental Toxicology* 1994;13:466–71.
26. Ghabili K, Agutter P, Ghanei M, Ansarin K und Shoja M. Mustard gas toxicity: the acute and chronic pathological effects. *Journal of Applied Toxicology* 2010;30:627–43.
27. Ghanei M und Harandi A. Mustard lung. Diagnosis and treatment of respiratory disorders in sulfur mustard-injured patients. Heidelberg: Academic Press, 2016:1–162. ISBN: 978-0-12-803952-6.
28. Gibson G, Loddenkemper R, Lundbäck Y und Lundbäck B. The European Lung White Book. European Respiratory Society, 2013. ISBN: 978-1-84984-042-2.
29. Gjorevski N, Ranga A und Lutolf M. Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis. *Development* 2014;141:1794–804.
30. Gotoh S, Ito I, Nagasaki T, Yamamoto Y, Konishi S, Korogi Y, Matsumoto H, Muro S, Hirai T, Funato M, Mae Si, Toyoda T, Sato-otsubo A, Ogawa S, Osafune K und Mishima M. Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2014;3:394–403.
31. Grayson C. Syria: OPCW secret report confirms my september post regarding alleged use of chemical weapons in marea. 2015. URL: (<https://activist1.blog/2015/11/07/syria-opcw-secret-report-confirms-my-september-post-regarding-alleged-use-of-chemical-weapons-in-marea/%20>) (besucht am 16.04.2019).
32. Hartung T. Thoughts on limitations of animal models. *Parkinsonism and Related Disorders* 2008;14:81–3.
33. Henjakovic M, Martin C, Hoymann H, Sewald K, Ressemeyer A, Dassow C, Pohlmann G, Krug N, Uhlig S und Braun A. *Ex vivo* lung function measurements in precision-cut lung slices (PCLS) from chemical allergen-sensitized mice represent a suitable alternative to *in vivo* studies. *Toxicological Sciences* 2008;106:444–53.
34. Herbert J, Thiermann H, Worek F und Wille T. COPD and asthma therapeutics for supportive treatment in organophosphate poisoning. *Clinical Toxicology* 2019;57:644–51.

35. Hinds W. Aerosol technology. Properties, behavior, and measurement of airborne particles. 2. Aufl. Weinheim: Wiley-Interscience, 1999:1–504. ISBN: 0-471-19410-7.
36. Ho B, Min N, Pek Q und Soh Bs. Disease modeling using 3D organoids derived from human induced pluripotent stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19:1–17.
37. Höfer T, Gerner I, Gundert-Remy U, Liebsch M, Schulte A, Spielmann H, Vogel R und Wettig K. Animal testing and alternative approaches for health risk assessment under the proposed new european chemicals regulation. *Archives of Toxicology* 2004;78:549–64.
38. Hoffmann S und Hartung T. Diagnosis: Toxic! - trying to apply approaches of clinical diagnostics and prevalence in toxicology considerations. *Toxicological Sciences* 2005;85:422–8.
39. Hoffmann T, Zetzsch C und Rossi M. Chemie von Aerosolen. *Chemie in unserer Zeit* 2007;41:232–46.
40. Holder A, Goth-Goldstein R, Lucas D und Koshland C. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chemical Research in Toxicology* 2012;25:1885–92.
41. Huch M und Koo Bk. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 2015;142:3113–25.
42. Huh D. A human breathing lung-on-a-chip. *Annals of the American Thoracic Society* 2015;12:42–4.
43. Huh D, Matthews B, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin H und Ingber D. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 2010;328:1662–8.
44. International Commission on Radiological Protection. Human respiratory tract model for radiological protection. *Annals of the ICRP* 1-3. 1994:1–462.
45. Judson R, Richard A, Dix D, Houck K, Martin M, Kavlock R, Dellarco V, Henry T, Holderman T, Sayre P, Tan S, Carpenter T und Smith E. The toxicity data landscape for environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives* 2009;117:685–95.
46. Karacsonyi C, Shanmugam N und Kagan E. A clinically relevant *in vitro* model for evaluating the effects of aerosolized vesicants. *Toxicology Letters* 2009;185:38–44.
47. Konar D, Devarasetty M, Yildiz D, Atala A und Murphy S. Lung-on-a-chip technologies for disease modeling and drug development. *Biomedical Engineering and Computational Biology* 2016;7:17–27.
48. Lacroix G, Koch W, Ritter D, Gutleb A, Larsen ST, Loret T, Zanetti F, Constant S, Chortarea S, Rothen-Rutishauser B, Hiemstra P, Frejafon E, Hubert P, Gribaldo L, Kearns P, Aublant JM, Diabaté S, Weiss C, Groot A und Kooter I. Air-liquid interface *in vitro* models for respiratory toxicology research: consensus workshop and recommendations. *Applied In Vitro Toxicology* 2018;4:91–106.
49. Lancaster M und Knoblich J. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science (New York, N.Y.)* 2014;345:1247125.
50. Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen. Gesundheitliche Risiken von Nanomaterialien nach inhalativer Aufnahme. LANUV-Fachbericht 16. Recklinghausen, 2009:1–86.
51. Lenz AG, Karg E, Brendel E, Hinze-Heyn H, Maier K, Eickelberg O, Stöger T und Schmid O. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell culture conditions. *BioMed Research International* 2013:1–12.
52. Li Y, Wu Q, Sun X, Shen J und Chen H. Organoids as a powerful model for respiratory diseases. *Stem Cells International* 2020;2020:8.
53. Liu G, Betts C, Cunoosamy D, Åberg P, Hornberg J, Sivars K und Cohen T. Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology. *Respiratory Research* 2019;20:1–14.
54. Mannucci P, Harari S, Martinelli I und Franchini M. Effects on health of air pollution: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine* 2015;10:657–62.

55. Maynard R. Mustard gas. In: *Chemical warfare agents: Toxicology and treatment*. Hrsg. von Marrs T, Maynard R und Sidell F. 2. Aufl. Weinheim: Wiley, 2007. Kap. 19:375–407. ISBN: 978-0-470-01359-5.
56. Maynard R. The physicochemical properties and general toxicology of chemical warfare agents. In: *Chemical warfare agents: Toxicology and treatment*. Hrsg. von Marrs T, Maynard R und Sidell F. 2. Aufl. Weinheim: Wiley, 2007. Kap. 02:21–65. ISBN: 978-0-470-01359-5.
57. Meyer M, Wenzel J und Schenke A. Krankheitsbedingte Fehlzeiten in der deutschen Wirtschaft im Jahr 2017. In: *Fehlzeiten-Report 2018. Sinn erleben - Arbeit und Gesundheit*. Hrsg. von Badura B, Ducki A, Schröder H, Klose J und Meyer M. Berlin: Springer-Verlag, 2018. Kap. 29:331–536. ISBN: 978-3-662-57387-7.
58. Möhle N. Etablierung und Charakterisierung eines Systems zur toxikologischen Untersuchung von Feststoffpartikel-aerosolen an Zellen des menschlichen Respirationstraktes. Dissertation. Hannover: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, 2013.
59. Morgenroth K. Lungenentzündungen. In: *Pathologie der Lunge I. Band 16/1*. Hrsg. von Doerr W und Uehlinger E. Berlin: Springer-Verlag, 1983. Kap. 8:395–472. ISBN: 9783642685903.
60. Nalayandaa D, Wanga Q, Fultona W, Wang TH und Abdullaha F. Engineering an artificial alveolar-capillary membrane: a novel continuously-perfused model within microchannels. *Journal of Pediatric Surgery* 2010;45:45–51.
61. Nawroth J, Barrile R, Conegliano D, Riet SV, Hiemstra P und Villenave R. Stem cell-based lung-on-chips: the best of both worlds? *Advanced Drug Delivery Reviews* 2019;140:12–32.
62. Nikolic´ M, Caritg O, Jeng Q, Johnson Ja, Sun D, Howell KJ, Brady JL, Laresgoiti U, Allen G, Butler R, Zilbauer M, Giangreco A und Rawlins E. Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded *in vitro* as long-term self-renewing organoids. *elife* 2017;6:e26575:1–33.
63. Novak R, Didier M, Calamari E, Ng C, Choe Y, Clauson S, Nestor B, Puerta J, Fleming R, Firoozinezhad S und Ingber D. Scalable fabrication of stretchable, dual channel, microfluidic organ chips. *Journal of Visualized Experiments* 2018;140:e58151.
64. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D und Yang H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* 2005;2:1–35.
65. Oberdörster G, Oberdörster E und Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 2005;113:823–39.
66. Oczenski W, Hrsg. *Atmen - Atemhilfen. Atemphysiologie und Beatmungstechnik*. 8. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 2007:1–672. ISBN: 3-13-137698-5.
67. OECD. OECD environmental outlook. Paris: OECD Publishing, 2001. ISBN: 9789264186156. DOI: 10.1787/9789264188563-en. URL: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-environmental-outlook%7B%5C_%7D9789264188563-en.
68. OECD. Test No. 403: Acute inhalation toxicity. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris, 2009. DOI: 10.1787/9789264070608-en.
69. OECD. Test No. 436: Acute inhalation toxicity – acute toxic class method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris, 2009. DOI: 10.1787/9789264076037-en.
70. OECD. Test No. 433: Acute inhalation toxicity - fixed concentration procedure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris, 2018. DOI: 10.1787/9789264284166-en.
71. OPCW. Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction. The Hague: OPCW Technical Secretariat, 2005.
72. OPCW. Report of the OPCW fact-finding mission in Syria regarding alleged incidents in Marea, Syrian Arab Republic, August 2015 (S/1320/2015). The Hague: OPCW Technical Secretariat, 2015.

73. OPCW. Atrocities in Syria: reports of the fact-finding mission concluding that sarin and sulfur mustard have been used in the Syrian Arab Republic (EC-M-55/NAT.1/Rev.2). The Hague: OPCW Executive Council, 2017. DOI: 10.17077/0003-4827.5229.
74. Papirmeister B, Feister A, Robinson S und Ford R. Experimental models of sulfur mustard injury. Boca Raton: CRC Press, 1991. Kap. 10:297–347. ISBN: 0-8493-4257-0.
75. Papirmeister B, Feister A, Robinson S und Ford R. The sulfur mustard injury: description of lesions and resulting incapacitation. Boca Raton: CRC Press, 1991. Kap. 2:13–42. ISBN: 0-8493-4257-0.
76. Pappenheimer A. Pathological action of war gases. In: *The medical department of the United States Army in the World War Volume 14: medical aspects of gas warfare World War*. Hrsg. von Weed F. Washington: US Government Printing Office, 1926. Kap. Section II - Clinical Features (VI):87–249.
77. PARI. Datenblätter und Produktinformationen des PariBoy® und eFlow®. 2019. URL: (<https://www.pari.com/de/home/>) (besucht am 15. 04. 2019).
78. Pauluhn J. Inhalation toxicology: methodological and regulatory challenges. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2008;60:111–24.
79. Pechura C und Rall D, Hrsg. Veterans at risk. The health effects of mustard gas and lewisite. Washington, D.C.: National Academy Press, 1993:1–448. ISBN: 0-309-55736-4.
80. Pollard BS und Pollard HB. Induced pluripotent stem cells for treating cystic fibrosis: State of the science. *Pediatric Pulmonology* 2018;53:12–29.
81. Rach J, Budde J, Möhle N und Aufderheide M. Direct exposure at the air-liquid interface - evaluation of an *in vitro* approach for simulating inhalation of airborne substances. *Journal of Applied Toxicology* 2014;34:506–15.
82. Rovida C und Hartung T. Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t⁴). *ALTEX* 2009;26:187–208.
83. Russell W und Burch R. The principles of humane experimental technique. London: Methuen, 1959:1–238.
84. Ruszkiewicz J, Bürkle A und Mangerich A. NAD⁺ in sulfur mustard toxicity. *Toxicology Letters* 2020;324:95–103.
85. Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen D, Heo I, Böttinger L, Klay D, Weeber F, Huelsz-Prince G, Iakobachvili N, Amatngalim G, De Ligt J, Van Hoeck A, Proost N, Viveen M, Lyubimova A, Teeven L, Derakhshan S, Korving J, Begthel H, Dekkers J, Kumawat K, Ramos E, Van Oosterhout M, Offerhaus J, Wiener D, Olimpio E, Dijkstra K, Smit E, Van Der Linden M, Jaksani S, Van De Ven M, Jonkers J, Rios A, Voest E, Van Moorsel C, Van Der Ent C, Cuppen E, Van Oudenaarden A, Coenjaerts F, Meygaard L, Bont L, Peters P, Tans S, Van Zon J, Boj S, Vries R, Beekman, Jeffrey und Clevers H. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *The EMBO Journal* 2019;38:1–20.
86. Sadeghi M und Balali-Mood B. Chemistry of mustard compounds. In: *Basic and clinical toxicology of mustard compounds*. Hrsg. von Balali-Mood M und Abdollahi M. Heidelberg: Springer International Publishing, 2015. Kap. 1:2–27. ISBN: 978-3-319-23874-6.
87. Saladi R, Smith E und Persaud A. Mustard: a potential agent of chemical warfare and terrorism. *Clinical and Experimental Dermatology* 2006;31:1–5.
88. Sayes C und Singal M. Optimizing a test bed system to assess human and particle aerosolization. *Applied In Vitro Toxicology* 2018;4:193–201.
89. Schans G van der, Scheffer A, Mars-Groenendijk R, Fidder A, Benschop H und Baan R. Immunochemical Detection of Adducts of Sulfur Mustard to DNA of Calf Thymus and Human White Blood Cells. *Chemical Research in Toxicology* 1994;7:408–13.
90. Schilders K, Eenjes E, Riet SV, Poot AA, Stamatialis D, Truckenmüller R, Hiemstra P und Rottier R. Regeneration of the lung: lung stem cells and the development of lung mimicking devices. *Respiratory Research* 2016;17:1–16.

91. Schlussbericht zum Forschungsvorhaben FKZ0315710. Prävalidierung und Validierung der CULTEX-Methode: *In vitro*-Bestimmung der akuten Toxizität inhalativ wirkender Feinstäube und Nanopartikel nach Direktexposition kultivierter Zellen vom Respirationstrakt des Menschen. Diss. 2013:1–196.
92. Schulz V. Anatomie und Physiologie der Lunge. In: *Management des Lungenkarzinoms*. Hrsg. von Drings P, Dienemann H und Wannemacher M. Berlin: Springer-Verlag, 2003. Kap. 1:3–10. ISBN: 9783642627743.
93. Sewald K und Braun A. Assessment of immunotoxicity using precision-cut tissue slices. *Xenobiotica* 2013;43:84–97.
94. Sewell F, Ragan I, Indans I, Marczylo T, Stallard N, Gri D, Holmes T, Smith P und Horgan G. An evaluation of the fixed concentration procedure for assessment of acute inhalation toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2018;94:22–32.
95. Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, Botham P, Fentem J, Eskes C, Roguet R, Cotovio J, Cole T, Worth A, Heylings J, Jones P, Robles C, Kandarova H, Gamer A, Remmele M, Curren R, Raabe H, Cockshott A und Zuang V. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: report in the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. *ATLA* 2007;35:559–601.
96. Statistisches Bundesamt. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2015. Fachserie Reihe 4. 2017:1–51.
97. Steinritz D. Therapeutische Targets bei Schwefel-Lost-induzierten Haut- und Lungenschäden. Habilitationsschrift. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2016.
98. Steinritz D, Möhle N, Pohl C, Papritz M, Stenger B, Schmidt A, Kirkpatrick CJ, Thiermann H, Vogel R, Hoffmann S und Aufderheide M. Use of the CULTEX[®] Radial Flow System as an *in vitro* exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility. *Chemico-Biological Interactions* 2013;206:479–90.
99. Stone V. Environmental air pollution. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000;162:44–7.
100. Stucki J, Hobi N, Galimov A, Stucki A, Schneider N, Lehr Cm, Huwer H, Frick M und Funke-chambour M. Medium throughput breathing human primary cell alveolus-on-chip model. *Scientific Reports* 2018;8:14359:1–13.
101. Thews G und Thews O. Lungenatmung. In: *Physiologie des Menschen*. Hrsg. von Schmidt R und Lang F. 30. Aufl. Berlin: Springer Lehrbuch, 2007. Kap. 32:756–85. ISBN: 3540329080.
102. Tillmann B und Schumacher U. Organe der Atmung. In: *Anatomie*. Hrsg. von Zilles K und Tillmann B. 1. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010. Kap. 9:393–422. ISBN: 9783540694816.
103. Tralau T, Oelgeschläger M, Gürtler R, Heinemeyer G, Herzler M, Höfer T, Itter H, Kuhl T, Lange N, Lorenz N, Müller-Graf C, Pabel U, Pirow R, Ritz V, Schafft H, Schneider H, Schulz T, Schumacher D, Zellmer S, Fleur-Böl G, Greiner M, Lahrssen-Wiederholt M, Lampen A, Luch A, Schönfelder G, Solecki R, Wittkowski R und Hensel A. Regulatory toxicology in the twenty-first century: challenges, perspectives and possible solutions. *Archives of Toxicology* 2015;89:823–50.
104. Tsoutsouloupoulos A, Möhle N, Aufderheide M, Schmidt A, Thiermann H und Steinritz D. Optimization of the CULTEX[®] Radial Flow System for *in vitro* investigation of lung damaging agents. *Toxicology Letters* 2015;244:28–34.
105. Tsoutsouloupoulos A, Gohlsch K, Möhle N, Breit A, Hoffmann S, Krischenowski O, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H, Aufderheide M und Steinritz D. Validation of the CULTEX[®] Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles. *Toxicology in Vitro* 2019;58:245–55.
106. Tsoutsouloupoulos A, Siegert M, John H, Zubeil T, Mangerich A, Schmidt A, Mückter H, Gudermann T, Thiermann H, Steinritz D und Popp T. A novel exposure system generating nebulized aerosol of sulfur mustard in comparison to the standard submerge exposure. *Chemico-Biological Interactions* 2019;298:121–8.

107. U.S. Environmental Protection Agency. Methods for the derivation of inhalation reference concentrations and application of inhaled dosimetry. Technical Report EPA/600/8-90/066F. North Carolina, 1994:1–409.
108. Umweltbundesamt. Feinstaub-Belastung. 2018. URL: (<https://www.umweltbundesamt.de/daten/luft/feinstaub-belastung#textpart-2>) (besucht am 31.05.2019).
109. Umweltbundesamt. Umwelteinflüsse auf den Menschen. 2018. URL: (<https://www.umweltbundesamt.de/themen/gesundheits/umwelteinfluesse-auf-den-menschen>) (besucht am 31.05.2019).
110. Umweltbundesamt. Wirkungen auf die Gesundheit. 2019. URL: (<https://www.umweltbundesamt.de/themen/luft/wirkungen-von-luftschadstoffen/wirkungen-auf-die-gesundheit#textpart-1>) (besucht am 31.05.2019).
111. Van den Berg A, Mummery C, Passier R und Van der Meer A. Personalised organs-on-chips: functional testing for precision medicine. *Lab on a Chip* 2019;19:198–205.
112. Van Riet S, Ninaber D, Mikkers H, Tetley T, Jost C, Mulder A, Pasman T, Baptista D, Poot AA, Truckenmüller R, Mummery C, Freund C, Rottier R und Hiemstra P. In vitro modelling of alveolar repair at the air-liquid interface using alveolar epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports* 2020;10:1–12.
113. Vaupel P, Schaible HG und Mutschler E, Hrsg. *Respirationstrakt und Atmung*. 7. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2015. Kap. 10:313–68. ISBN: 9783135930084.
114. Voigt R. *Pharmazeutische Technologie*. Hrsg. von Fahr A. 9. Aufl. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2000:1–691. ISBN: 978-3-7692-6194-3.
115. Wagner H. Krankheiten der Atmungsorgane. In: *Innere Medizin für Pflegeberufe*. Hrsg. von Gerlach U, Wagner H und Wirth W. 8. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 2015. Kap. 16:564–623. ISBN: 978-3-13-593008-4.
116. WHO. 9 out of 10 people worldwide breathe polluted air, but more countries are taking action. 2018. URL: (<https://www.who.int/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action>) (besucht am 31.05.2019).
117. Wiegand G. Physikalische Eigenschaften von Gasen. In: *Gasmesstechnik in Theorie und Praxis*. Wiesbaden: Springer Fachmedien, 2016. Kap. 2:7–118. ISBN: 9783658106867.
118. Wright BM. A new dust-feed mechanism. *Journal of Scientific Instruments* 1949;27:12–5.
119. Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X und Wen W. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *BioMedical Engineering OnLine* 2020;19:1–19.
120. Yah C, Simate G und Iyuke S. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science* 2012;25:477–91.
121. Yin X, Mead B, Safaee H, Langer R und Karp J. Engineering stem cell organoids. *Cell Stem Cell* 2016;18:25–38.
122. Yum K, Hong S und Lee L. Physiologically relevant organs on chips. *Biotechnology Journal* 2014;9:16–27.
123. Zacharias W, Frank D, Zepp J, Morley M, Alkhaleel F, Kong J, Zhou S, Cantu E und Morrissey E. Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor. *Nature* 2018;555:251–5.
124. Zamprogno P, Wüthrich S, Achenbach S, Stucki J, Hobi N, Schneider-Daum N, Lehr CM, Huwer H, Geiser T, Schmid R und Guenat O. Second-generation lung-on-a-chip array with a stretchable biological membrane. *bioRxiv* 2019;608919.
125. Zavala J, Freedman A, Szilagyi J, Jaspers I, Wambaugh J, Higuchi M und Rager J. New approach methods to evaluate health risks of air pollutants: critical design considerations for in vitro exposure testing. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020;17.
126. Zojaji R und Mazloum Farsi Baf M. Upper respiratory complications of sulfur mustard (SM) poisoning. In: *Basic and clinical toxicology of mustard compounds*. Hrsg. von Balali-Mood M und Abdollahi M. Heidelberg: Springer International Publishing, 2015. Kap. 6:136–70. ISBN: 9783319238739.

6 Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wäre in dieser Form nicht realisierbar gewesen, hätten mir nicht einige Menschen mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Mein Dank gilt daher all denjenigen, die mich stets unterstützt haben und ohne deren Hilfe ich mein Ziel nicht erreicht hätte.

An erster Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Betreuer und Mentor Herrn Privatdozenten Dr. Dirk Steinritz bedanken.

Ich bin ihm unendlich dankbar, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, im Anschluss an meine Masterarbeit auch meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich danke ihm für die hervorragende Betreuung, sein starkes Engagement, das Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat und seine großartige Unterstützung. Danke für die vielen fachlichen Ratschläge, seine Förderung und Motivation, das Ermöglichen von Dienstreisen und seine unermüdliche Hilfe bei der Nutzung der LaTeX-Software oder der Programmiersprache R.

Danke - ich hätte mir keinen besseren Chef wünschen können!

Bei meinem Doktorvater Herrn Privatdozenten Dr. Dr. Harald Mückter bedanke ich mich für seine Betreuung, seine intensive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und das zügige Korrekturlesen.

Σ' ευχαριστώ θερμά για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσες για μένα, και μάλιστα σε μια τόσο δύσκολη και απαιτητική χρονική περίοδο της ζωής σου. Αισθανόμουν ότι ήσουν δίπλα μου όποτε σε χρειαζόμουν, έχοντας πάντοτε την αμέριστη συμπαράστασή σου, και αυτό, πραγματικά, το εκτιμώ βαθύτατα. Εύχομαι να έχεις πάντα δύναμη, αισιοδοξία και, μέσα από την καρδιά μου, σου εύχομαι περαστικά!

Weiter danke ich Herrn Professor Dr. Horst Thiermann, Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, für die Möglichkeit, meine Dissertation unter diesen ausgezeichneten Arbeitsbedingungen anzufertigen zu können.

Frau Dr. Tanja Popp danke ich von ganzem Herzen für die immer vorhandene Zeit und Diskussionsbereitschaft, die fachlichen Gespräche und die enge Zusammenarbeit im Labor, auch zu später Stunde. Es war mir immer eine sehr große Freude mit ihr zusammen arbeiten zu dürfen.

Weiterhin gilt mein Dank vor allem allen Projektteilnehmern unseres Forschungsvorhabens: Frau Professor Dr. Michaela Aufderheide, Dr. Niklas Möhle und Olaf Krischenowski von Cultex Technologies GmbH, Dr. Andreas Breit und Katrin Gohlsch vom Walther-Straub Institut für Pharmakologie und Toxikologie, sowie Herrn Dr. Sebastian Hoffmann von seh consulting + services.

Vielen Dank für die konstruktive, gute und angenehme Zusammenarbeit und die umfangreiche Unterstützung, sei es vor Ort, per E-Mail oder am Telefon!

Des Weiteren danke ich der gesamten AG Steinritz, namentlich Frau Professor Dr. Annette Schmidt, Dr. Tanja Popp, Conny Muschik, Emine Cukur, Mina Zarrabi, Ram

Prasad und Steffen Müller für das absolut freundschaftliche und kollegiale Arbeitsklima!

Danke an meine Kollegen und Kameraden Andreas K., Andi W., Anne, Anja, Bernd, Cathy, Christoph, Corinna, Flo, Georg, Jens, Katha, Robert, Robin, Sebastian, Sonja, Tamy, Tilo und Wolfi. Besonders erwähnen möchte ich dabei Simone, Markus und Simon ... wie schön, dass aus Arbeitskollegen wahre Freunde geworden sind.

Sie haben die Zeit hier für mich am Institut einfach unvergesslich gemacht und ich werde in toller Erinnerung an wissenschaftliche Diskussionen, Ratschläge und Unterstützung, vor allem aber an unterhaltsame Mittagspausen, gemeinsame Ausflüge und unvergessliche Weihnachtsfeiern zurückdenken.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Meinen Mädels danke ich, dass sie stets mit mir mitgefiebert und sich über all die kleinen und großen Fortschritte gefreut haben. Ihr seid tief in meinem Herzen!

Und zu guter Letzt möchte ich in tiefster Verbundenheit meinen Eltern, Andrea und Christos, und meinem Bruder Philipp Dank sagen.

Sie haben mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und mir gezeigt, wie wichtig es ist, trotz aller Herausforderungen und Hürden nie den Blick auf das Leben und die Mitmenschen zu verlieren. Sie haben mich in allen Situationen uneingeschränkt und von ganzem Herzen unterstützt und motiviert, mir unendlich viel Liebe, Rückhalt und Vertrauen geschenkt – dafür bin ich ihnen unendlich dankbar, denn ohne sie hätte ich das nicht geschafft.

Ich liebe Euch!

„Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.“ (Franz Kafka)

... ich bin dankbar, dass so viele tolle Menschen mit mir zusammen diesen wundervollen Weg gegangen sind.