

## *Abschlussbericht zum Vorhaben*

„Synthetische Mineralfasern zur Vorhersage  
der inflammatorischen Wirkung natürlicher  
Fasern“ (Forschungsvorhaben FP474)

## *Laufzeit*

01.01.2022 – 31.12.2024

Bericht vom 31.03.2025

## *Autorin / Autor*

Prof. Dr. rer. nat. Matthias Epple (Essen)

## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Anhang/Anhänge

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

## Kurzfassung deutsch

### Ziele:

Die chemische Synthese von definierten Fasern mit diskreten Abmessungen wird zum ersten Mal die gezielte Untersuchung bestimmter Fasereigenschaften im Zellkulturmodell erlauben und Rückschlüsse ermöglichen, die die toxikologische und arbeitsmedizinische Gefährdungsbeurteilung von anorganischen Fasern erleichtert. Speziell soll dabei geprüft werden, ob besonders die Unter- oder Überschreitung bestimmter Durchmesser, d.h. ein stark nadelförmiger Charakter, sowie eine hohe Rigidität, die entzündliche Wirkung der Fasern bei ansonsten gleichbleibender chemischer Zusammensetzung fördern. Es wird angenommen, dass besonders dünne Fasern im unteren nm Bereich möglicherweise wegen fehlender Rigidität keine ausgeprägten Entzündungen bewirken, während relativ dicke Fasern (wenige  $\mu\text{m}$ ) wegen ihrer fehlenden nadelförmigen Eigenschaften geringer wirksam sind.

### Aktivitäten/Methoden:

Mittels unterschiedlicher Synthesansätze (Mikroemulsions-, Polyol- und Hydrothermalsynthese) wurden oxidische Mineralfasern (Silica und Titandioxid) mit definierten Längen und diskreten Variationen im Durchmesser synthetisiert und eingehend chemisch-physikalisch u.a. mittels Rasterelektronenmikroskopie, Energiedispersiver Röntgenspektroskopie, Röntgenpulverdiffraktometrie, Thermogravimetrie, Elementaranalyse und ICP-MS charakterisiert. Des Weiteren wurde die Zellaufnahme der Fasern mittels Rasterelektronenmikroskopie und Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie sowohl in humanen monozytären Makrophagen (THP1-Zellen) als auch in Ratten-Alveolarmakrophagen (NR8383-Zellen) untersucht. Die zytotoxische Wirkung der Fasern wurde mit Hilfe von etablierten Toxizitätstest (MTT- und AlamarBlue™-Assay) bestimmt. Deren inflammatorische Wirkung wurde systematisch mit einem etablierten Zellkulturmodell untersucht werden, welches die Faser-induzierte Einwanderung von Entzündungszellen in die Lunge abbildet, bestehend aus Lungenmakrophagen und einer Modellzelllinie für neutrophile Granulozyten. Ergänzend zum PICMA-Test wird die Genexpression untersucht. Aus den exponierten und nicht-exponierten NR8383-Zellen wird die RNA isoliert und anschließend die Menge und ggf. die Integrität der isolierten RNA bestimmt. Auf Proteinebene wird die Expression von Biomarkern der Chemotaxis und der Entzündung aus Zellüberständen mittels ELISA quantifiziert.

### Ergebnisse:

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von langen Mikrofasern aus Silica und Titandioxid möglich ist. Eine Dotierung mit Fremdionen wie Aluminium oder Eisen gelang nicht, so dass keine synthetischen Asbestfasern erhalten werden konnten. Gleichwohl zeigten sich deutliche pro-inflammatorische Effekte der synthetisierten Fasern, die von Länge und Morphologie (z.B. gerade gegenüber gelockt) abhingen. Diese konnten mit bekannten inflammatorisch aktiven Stoffen (Asbest und Carbon Nanotubes) korreliert werden, was die Anwendbarkeit des PICMA-Tests zur in-vitro-Abschätzung einer subtoxischen Wirkung bestätigt. Insofern konnten die Projektziele in vollem Umfang erreicht werden, auch wenn das chemische System gewechselt wurde (Titandioxid statt Silikat). Letztlich ist die Fasermorphologie von größerer Bedeutung als die chemische Zusammensetzung, sofern es sich um unlösliche Fasern handelt. Es wird jedoch auch deutlich, dass die synthetisierten Fasern die Stärke der biologischen Wirkungen von Krokydolith-Asbestfasern nicht erreichen. Die vergleichende elektronenmikroskopische Analyse zeigt, dass Krokydolith-Asbest zu einer Membranschädigung führt, indem die aufgespleißten Faserenden die Membranen durchstechen. Eine solche nadelförmige Wirkung erzielen die synthetisierten Silica- und Titandioxidfasern nicht. Neben Länge und Dicke bzw. dem Verhältnis beider wirkt sich demnach der nadelförmige Charakter der Fasern deutlich aus.

## Kurzfassung englisch

### Objectives:

The chemical synthesis of defined fibers with discrete dimensions will, for the first time, enable targeted investigation of specific fiber properties in a cell culture model. This will allow conclusions to be drawn that facilitate toxicological and occupational health risk assessment of inorganic fibers. Specifically, the study aims to determine whether the under- or exceeding of certain diameters—i.e., a pronounced needle-like shape—as well as high rigidity, promote the pro-inflammatory effects of fibers, assuming a consistent chemical composition. It is hypothesized that very thin fibers in the lower nanometer range may induce minimal inflammatory responses due to a lack of rigidity, whereas relatively thick fibers (in the micrometer range) may exhibit reduced effects due to their less needle-like morphology.

### Activities/Methods:

Using various synthesis approaches (microemulsion, polyol, and hydrothermal synthesis), oxide-based mineral fibers (silica and titanium dioxide) with defined lengths and controlled variations in diameter were synthesized. These were thoroughly characterized using techniques such as scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), X-ray powder diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), elemental analysis, and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Fiber uptake by cells was analyzed via SEM and confocal laser scanning microscopy in both human monocytic macrophages (THP-1 cells) and rat alveolar macrophages (NR8383 cells). Cytotoxic effects were assessed using established toxicity assays (MTT and AlamarBlue™). The pro-inflammatory effects were systematically studied using an established in vitro co-culture model that simulates fiber-induced recruitment of inflammatory cells to the lung, consisting of lung macrophages and a model cell line for neutrophilic granulocytes. In addition to the PICMA assay, gene expression analysis was conducted. RNA was isolated from both exposed and non-exposed NR8383 cells, followed by quantification and quality assessment. At the protein level, expression of chemotaxis and inflammation biomarkers was quantified from cell supernatants using ELISA.

### Results:

It was demonstrated that the synthesis of long microfibers composed of silica and titanium dioxide is feasible. However, doping with foreign ions such as aluminum or iron was unsuccessful, preventing the generation of synthetic asbestos-like fibers. Nevertheless, the synthesized fibers exhibited clear pro-inflammatory effects dependent on their length and morphology (e.g., straight versus curly). These effects correlated with those induced by known pro-inflammatory materials (asbestos and carbon nanotubes), supporting the applicability of the PICMA assay for in vitro estimation of subtoxic biological responses. Thus, the project goals were fully achieved, even though the chemical system was changed (titanium dioxide instead of silicate). Ultimately, fiber morphology proved to be more critical than chemical composition, provided the fibers are insoluble. However, it also became evident that the synthesized fibers did not reach the level of biological activity observed with crocidolite asbestos fibers. Comparative electron microscopy revealed that crocidolite asbestos causes membrane damage by piercing cell membranes with split fiber ends—a needle-like mechanism that was not replicated by the synthetic silica and titanium dioxide fibers. Therefore, beyond fiber length and diameter (or their ratio), the needle-like morphology plays a decisive role in fiber-induced effects.

## 1. Problemstellung

Der größte Teil der Gesundheitsschädigungen mit Todesfolge unter den Berufskrankheiten wird durch die inhalative Exposition gegenüber faserförmigen Materialien verursacht. Dabei korreliert die Wirkung der Fasern überwiegend mit ihrer faserartigen Mikrostruktur, die zunächst eine akute Entzündung in der Lunge verursacht. So wird am prominenten Beispiel von Asbest deutlich, dass längliche, rigide und nadelförmige Fasern besonders entzündlich wirken. Andere Mineralfasern mit vergleichbaren Abmessungen haben Eigenschaften mit Asbest gemeinsam: Alle sind verdächtig, krebserzeugend zu sein. Mit dem im IPA entwickelten PICMA sind Vergleichsstudien auf der Basis eines in vitro-Tests möglich, der die Chemotaxis von Entzündungszellen als funktionellen toxikologischen Endpunkt in einem zentralen Punkt der Pathogenese abbildet. Vergleichende Studien an synthetisierten Fasern im PICMA können Grundlagen schaffen, um die Gefährdungsbeurteilung von anorganischen Mineralfasern deutlich zu verbessern.

## 2. Forschungszweck/-ziel

Die Freisetzung von Partikeln in industriellen Prozessen sowie bei der Verarbeitung und Handhabung von Rohstoffen stellt eine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Besonders gefährlich sind kleine Partikel (Nano- und Mikropartikel) mit länglicher Morphologie (stäbchen- und faserartig), die sich beim Einatmen irreversibel im menschlichen Respirationstrakt (RT) ablagern. Eine Langzeitexposition gegenüber diesen Partikeln und ihre Ansammlung in RT-Geweben kann zur Entwicklung lokaler und chronischer Gewebeentzündungen führen. Als Folge davon kann es zu schweren Krankheiten, einschließlich Krebs, kommen.

Es wird angenommen, dass die Größe und Morphologie von Partikeln (insbesondere das Verhältnis von Länge zu Breite) sowie ihre oberflächliche Reaktivität, entscheidende Parameter bei der Bestimmung der Zytotoxizität von Partikeln und der Bewertung möglicher Gefahren im Zusammenhang mit ihrer Exposition sind. Dies ist ein wichtiger Aspekt für arbeitsmedizinische Studien und die Gesundheitsversorgung.

Im Rahmen dieses Projektes werden synthetische Mineralpartikel (stäbchen- und faserförmig) mit definierter Morphologie und Dimension auf reproduzierbare Weise synthetisiert ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  u.a.). Die Partikel werden im Detail chemisch und physikalisch charakterisiert und auf ihre mögliche Zytotoxizität *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse sollen eine Bewertung der Korrelation zwischen physikalisch-chemischen Parametern der Partikel und in Zellen verschiedene biologische Wirkungen ermöglichen. Ein besonderes Augenmerk wird auf die Partikeldicke und -steifigkeit gelegt, da angenommen wird, dass diese Parameter das Entzündungspotential von Partikeln bestimmen und den größten Teil der Zellreaktion stimulieren. Diese Ergebnisse könnten auch wertvolle Informationen für die Risikobewertung im Zusammenhang mit der Mineralfaserexposition liefern.

### 3. Methodik

**Tab. 1:** Überblick über die Einzelschritte des Arbeitsprogramms. (grau: durchgeführt; blau: aufgrund der Änderung des Arbeitsprogramms (s.u.) nicht bearbeitet).

	Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
Arbeitspaket 1: Silica-Fasern												
Synthese und Charakterisierung von Silica-Fasern (Epple)												
AlamarBlue Test-Test an Silica-Fasern (Bünger, Westphal)		X	X	X								
PICMA-Test an Silica-Fasern (Bünger, Westphal)			X	X								
ELISA Analysen in den Zellüberständen (Bünger, Westphal)												
Untersuchungen zur Genexpression (Johnen, Weber)												
Arbeitspaket 2: Titandioxid-Fasern												
Synthese und Charakterisierung von Titandioxid-Fasern (Epple)												
AlamarBlue Test-Test an Titandioxid-Fasern (Bünger, Westphal)				X								
PICMA-Test an Titandioxid-Fasern (Bünger, Westphal)												
ELISA Analysen in den Zellüberständen (Bünger, Westphal)												
Untersuchungen zur Genexpression (Johnen, Weber)												
Arbeitspaket 3: Asbest-Fasern der Serpentina-Klasse												
Synthese und Charakterisierung von Asbest-Fasern (Epple)												
AlamarBlue Test-Test an Asbest-Fasern (Bünger, Westphal)												
PICMA-Test an Asbest-Fasern (Bünger, Westphal)												
ELISA Analysen in den Zellüberständen (Bünger, Westphal)												
Untersuchungen zur Genexpression (Johnen, Weber)												
Arbeitspaket 4: Asbest-Fasern der Amphibolgruppe												
Synthese und Charakterisierung von Asbest-Fasern (Epple)												
AlamarBlue Test-Test an Asbest-Fasern (Bünger, Westphal)												
PICMA-Test an Asbest-Fasern (Bünger, Westphal)												
ELISA Analysen in den Zellüberständen (Bünger, Westphal)												
Untersuchungen zur Genexpression (Johnen, Weber)												
Arbeitspaket 5: Aluminiumoxid-Fasern												

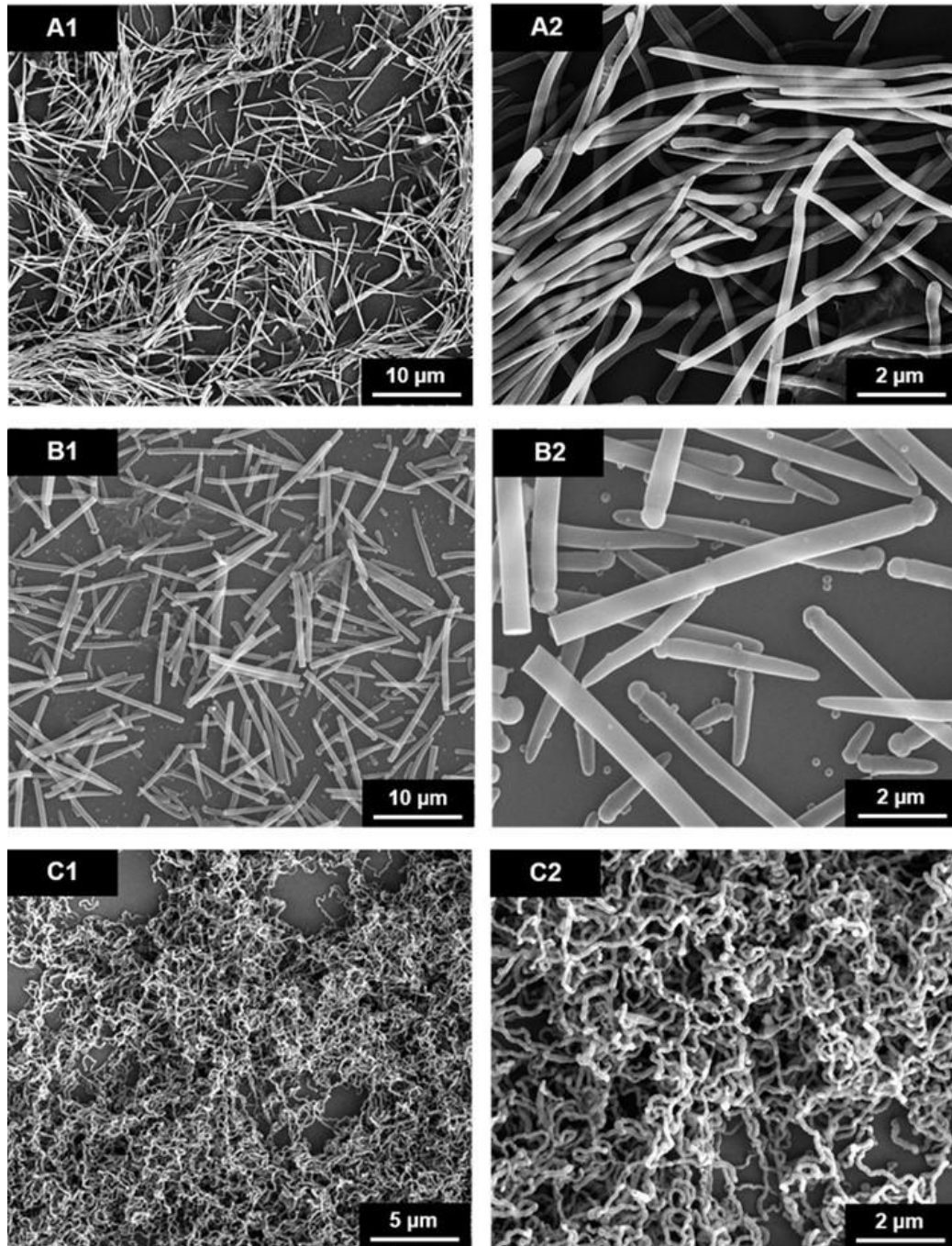




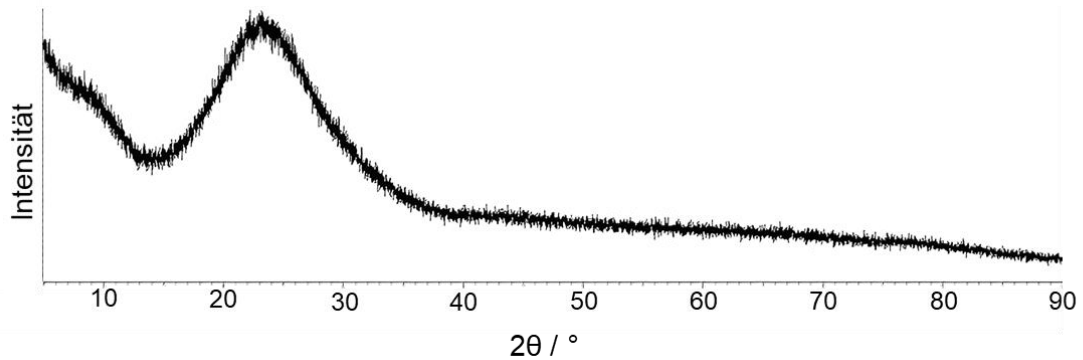
## 4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

### 4.1. Charakterisierung von Silica-Fasern mit unterschiedlicher Morphologie

Mittels einer etablierten Mikroemulsionssynthese konnten gerade und dickere (Länge:  $\sim 6\ \mu\text{m}$ , Durchmesser:  $0.35\ \mu\text{m}$ , Aspektverhältnis: 17:1), gerade und dünnere (Länge:  $\sim 8\ \mu\text{m}$ , Durchmesser:  $0.25\ \mu\text{m}$ , Aspektverhältnis: 32:1) und lockige und dünne (Länge:  $\sim 9\ \mu\text{m}$ , Durchmesser:  $0.13\ \mu\text{m}$ , Aspektverhältnis: 70:1) Silica-Fasern synthetisiert werden (**Abb. 1**). Die Silica-Fasern waren röntgenamorph (**Abb. 2**) und pyrogenfrei ( $<0,1\ \text{EU mL}^{-1}$ ). Die Produktausbeute einer Einzelsynthese betrug ca. 30 mg (für gerade Fasern) und ca. 10 mg (für lockige Fasern). Die Syntheseergebnisse waren gut reproduzierbar.

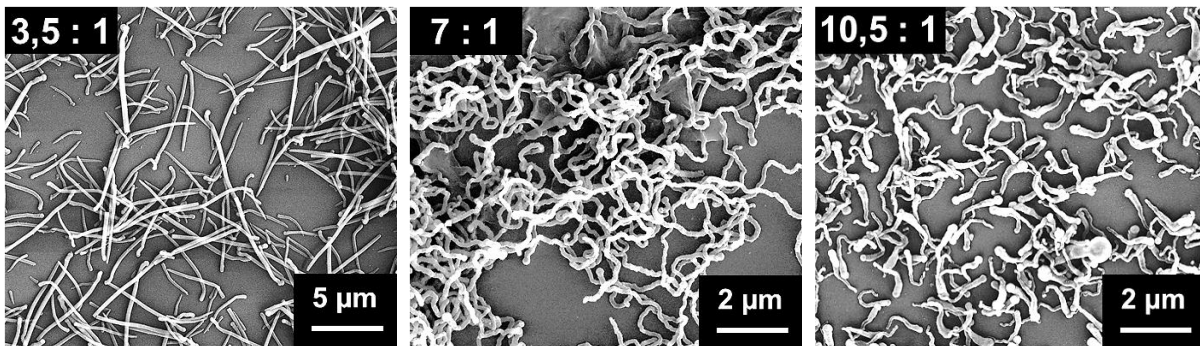


**Abb. 1:** REM-Aufnahmen von geraden dünneren (**A1, A2**), geraden dickeren (**B1, B2**) und lockigen dünnen (**C1, C2**) Silica-Fasern, die in einer Mikroemulsionsreaktion synthetisiert wurden. Bilder in zwei verschiedenen Vergrößerungen.



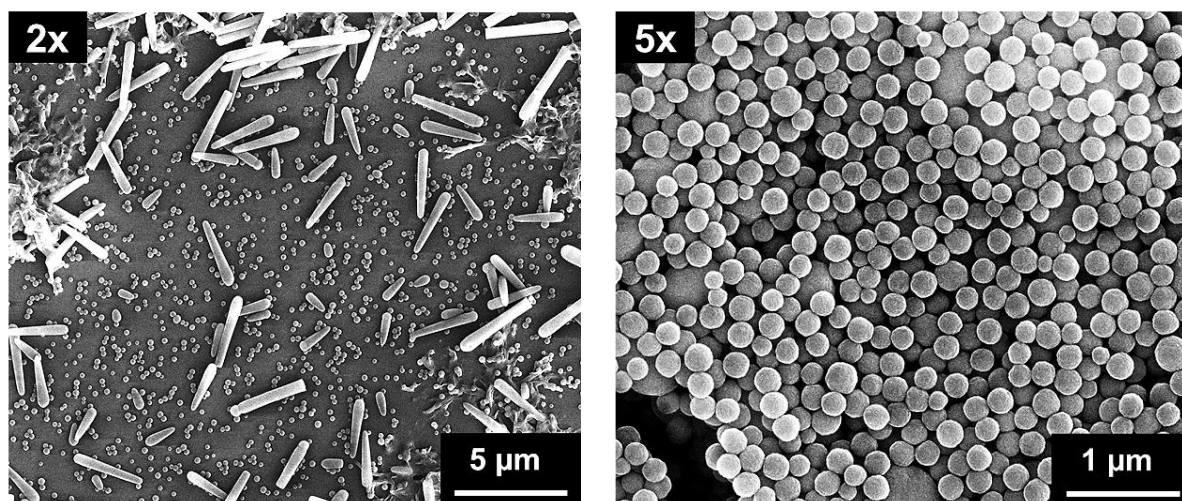
**Abb. 2:** Typisches Röntgenpulverdiffraktogramm von Silica-Fasern, die in einer Mikroemulsionsreaktion synthetisiert wurden. Der amorphe "Halo"-Peak zwischen 15-30 ° 2θ ist deutlich sichtbar

Bei der Durchführung der Experimente zum Einfluss der Syntheseparameter auf die Fasermorphologie wurde beobachtet, dass das Verhältnis von Ethanol zu Wasser im Mikroemulsionssystem entscheidend für die Synthese von geraden und langen Silica-Fasern war. Das optimale Verhältnis von Ethanol zu Wasser während der Synthese betrug 3,5:1 (v/v). Mit einem zunehmenden Verhältnis von Ethanol zu Wasser waren die Silica-Fasern nicht mehr gerade und zeigten eine Tendenz zur Krümmung (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Veränderung der Silica-Fasermorphologie mit zunehmendem Verhältnis von Ethanol zu Wasser. Verhältnisse von Ethanol zu Wasser von 3,5:1 (**links**), 7:1 (**Mitte**) und 10,5:1 (**rechts**) wurden untersucht.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Hochskalierung der Mikroemulsionssynthese von Silica-Fasern zu einer höheren Ausbeute des Syntheseprodukts führen würde. Nach der proportionalen Erhöhung der Volumina an Reaktionssubstraten stellte sich heraus, dass das Syntheseprodukt entweder eine heterogene Mischung aus Stäbchen und Kugeln (bei 2-facher Hochskalierung) oder eine homogene Suspension aus Kugeln (bei 5-facher Hochskalierung) war (**Abb. 4**). Um eine höhere Ausbeute des Silica-Faserprodukts zu erhalten, ist es daher notwendig, parallele Synthesen durchzuführen. Die Synthese ist nicht zur Hochskalierung geeignet. Die Syntheseergebnisse waren reproduzierbar, mit einer Ausbeute jeder einzelnen Reaktion von ca. 30-40 mg.



**Abb. 4:** Veränderung des Syntheseprodukts durch die Hochskalierung der Mikroemulsionsreaktion. Zweifache (**links**) und fünffache (**rechts**) Hochskalierung der Synthese. Eine Hochskalierung führt zur Veränderung der Partikelmorphologie bis hin zum völligen Verlust der Stäbchenform.

## 4.2. Löslichkeitsuntersuchungen der synthetisierten Silica-Fasern

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Freisetzungsrate von Silica-Ionen bei Silica-Fasern unterschiedlicher Morphologie (gerade, lockig) beobachtet werden. Für alle untersuchten Fasermorphologien war die Ionenfreisetzungsrate vergleichbar (ca. 20-25 ppm) und nahe dem beobachteten Wert für Silica-Nanosphären (das Referenzmaterial). Nach 7 Tagen Inkubationszeit in DPBS wurden zwischen 4,7 und 5,8 Gew.-% der gesamten Kieselsäure aus den Fasern freigesetzt. Die Freisetzungsrate von Silica-Ionen aus der Modellquarzprobe war etwa dreimal niedriger als aus den Silica-Fasern, was offensichtlich auf die geringere Löslichkeit der kristallinen Phase mit ihrer höheren Gitterenergie zurückzuführen ist. Als zusätzliche Kontrollprobe wurde der Inkubationspuffer (DPBS) auf das Vorhandensein von Silica-Ionen getestet (**Tab. 2**).

**Tab. 2:** Ergebnisse der Ionenfreisetzung aus Silica-Partikeln unterschiedlicher Morphologie.

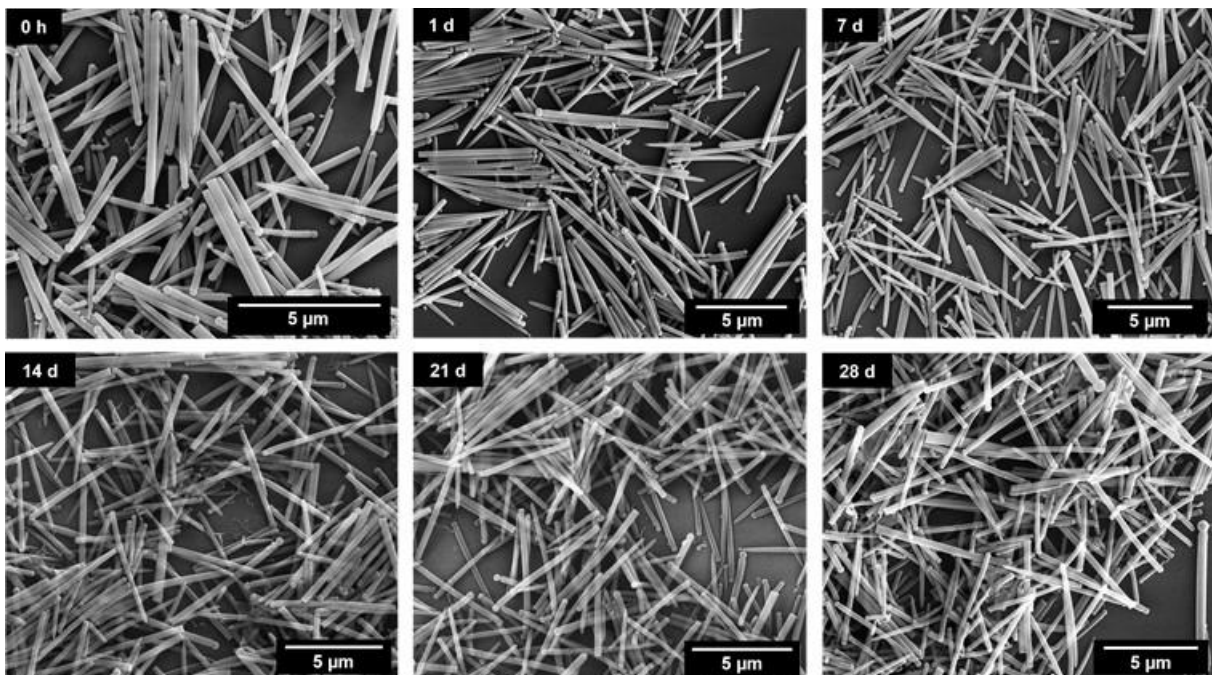
Probe	Si-Konzentration im DPBS Puffer / ppm*	Gelöster Anteil der Probe / Gew. %	Gelöster Anteil / Gew. % pro Tag
Dünnere gerade Silica-Fasern	20,4 (46,9)	4,7	0,67
Dickere gerade Silica-Fasern	22,2 (51,1)	5,1	0,73
Dünne lockige Silica-Fasern	25,3 (58,2)	5,8	0,83
Sphärische Silica-Nanopartikel	19,5 (44,9)	4,5	0,64
SH500 Quarz	9,1 (19,5)	2,0	0,28
DPBS (negative Kontrolle)	2,5	-	-

\*Die Werte in Klammern geben den berechneten Gewichtsverlust der Proben an. Dies basiert auf dem stöchiometrischen Gewichtsverhältnis von Silicium zu Sauerstoff in amorpher Kieselsäure, d. h. 1:2,3 für Fasern und Nanosphären, wie zuvor mit EDX bestimmt, und 1:2,14 für Quarz (Siliciumdioxid,  $\text{SiO}_2$ ; stöchiometrisches Massenverhältnis).

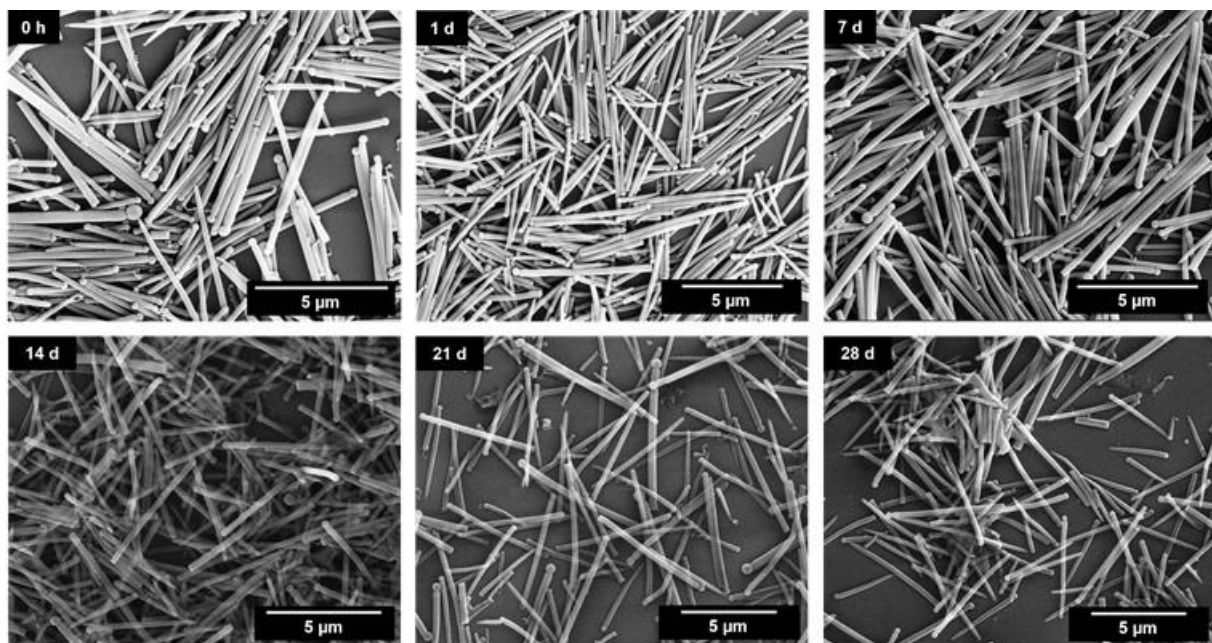


### 4.3. Untersuchungen der Langzeitstabilität von Silica-Fasern

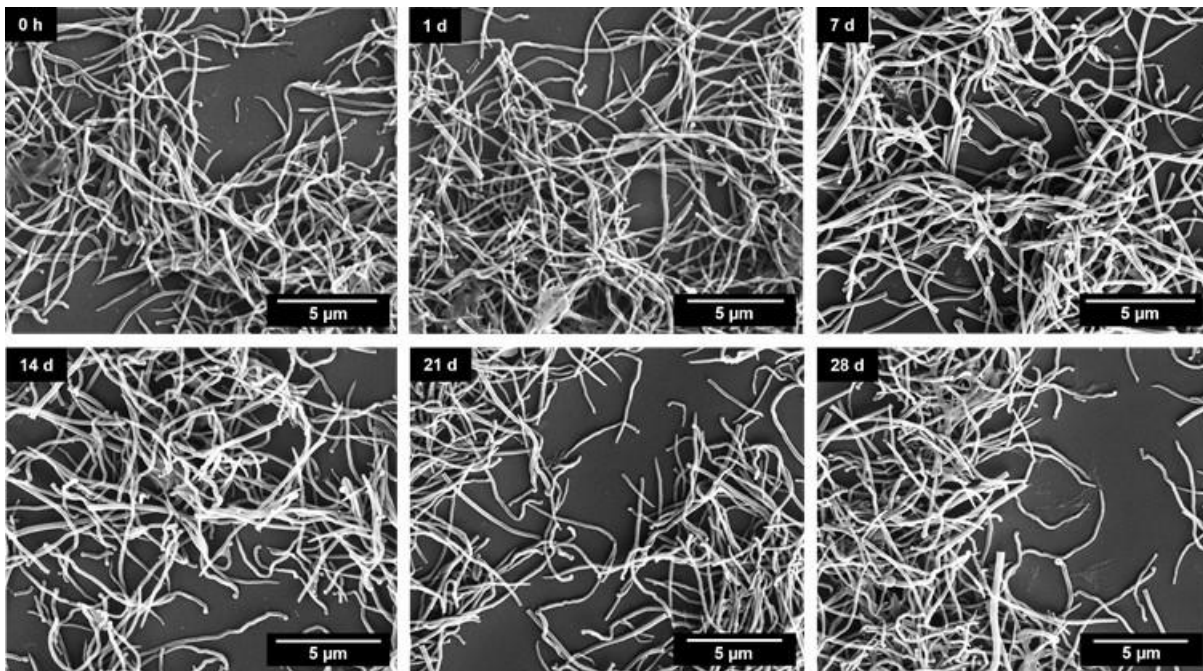
Unabhängig ihrer Morphologie (gerade und dick, gerade und dünner, lockig und dünn) konnten die Silica-Fasern nach der Redisperion in Wasser als kolloidale Suspensionen für 28 Tage ohne signifikante Veränderungen der Fasermorphologie gelagert werden (**Abb. 5, 6, 7**).



**Abb. 5:** REM-Aufnahmen der Silica-Fasern (gerade und dick) direkt nach der Redisperion (0 h) und nach 1 d, 7 d, 14 d, 21 d und 28 d Inkubation in Wasser.



**Abb. 6:** REM-Aufnahmen der Silica-Fasern (gerade und dünner) direkt nach der Redisperion (0 h) und nach 1 d, 7 d, 14 d, 21 d und 28 d Inkubation in Wasser.



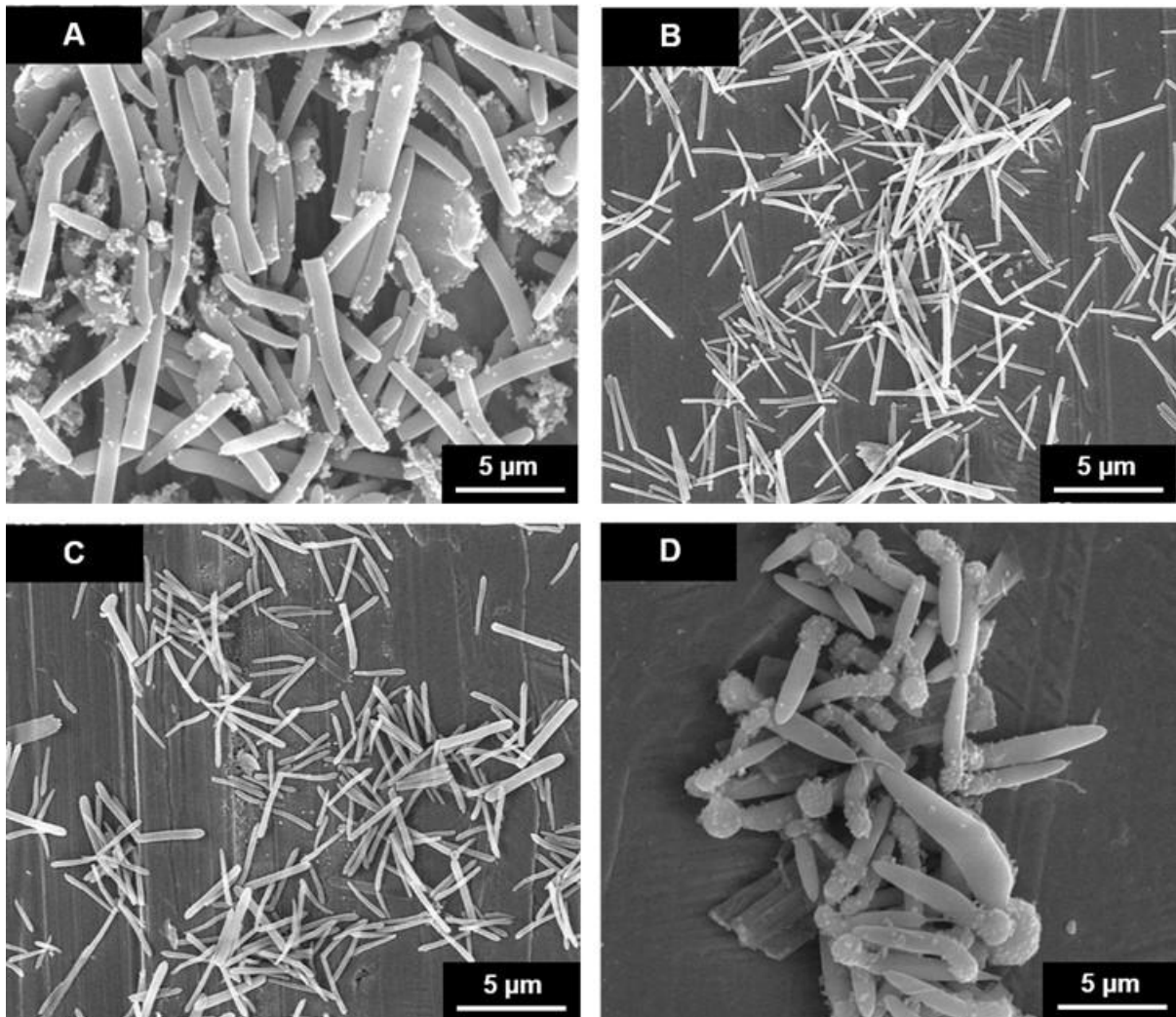
**Abb. 7:** REM-Aufnahmen der Silica-Fasern (lockig und dünn) direkt nach der Redispersion (0 h) und nach 1 d, 7 d, 14 d, 21 d und 28 d Inkubation in Wasser.

#### 4.4. Synthese und Charakterisierung von aluminiumdotierten Silica-Partikeln

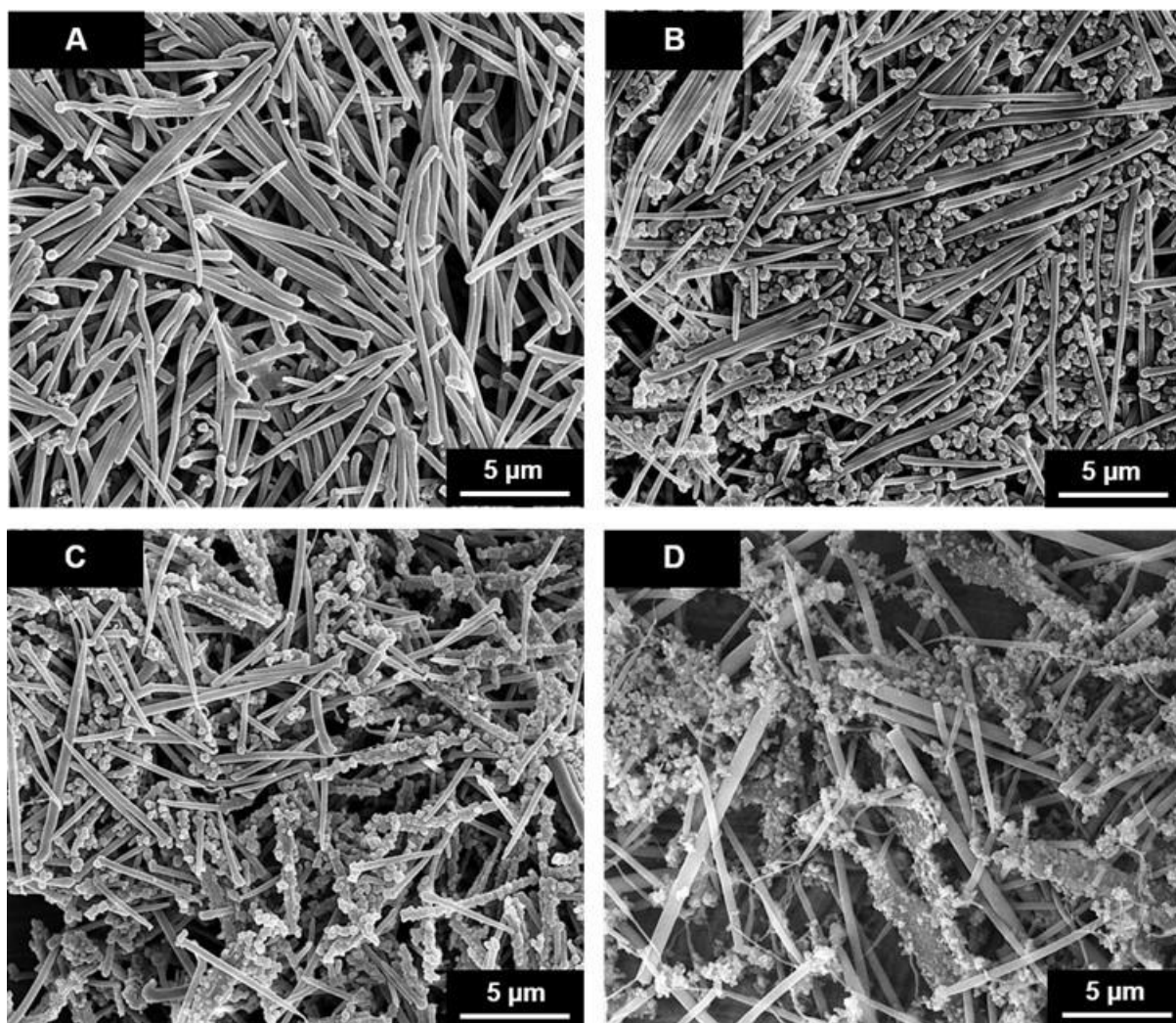
Es wurden ausgedehnte Versuche zur Synthese von aluminiumdotierten Silica-Fasern mit drei verschiedenen Aluminiumvorstufenverbindungen (Präkursoren) durchgeführt. Diese waren: Aluminium-sec.-butoxid (Probe A), Aluminiummethoxid (Probe B) und Aluminiumisopropoxid (Probe C). Probe D waren Partikel, dotiert mit 1 % Aluminium(III)acetylacetonat. Im Vergleich zu den Kontroll-Silica-Fasern wurde beobachtet, dass das Vorhandensein der Aluminiumquelle in der Reaktionsmischung (für die Proben A und B) zu einer Verringerung der Partikellänge auf etwa 4-4,5 µm und gleichzeitig zu einer Zunahme des Partikeldurchmessers auf etwa 0,7-0,9 µm führte. Es wurde auch eine Abnahme der Produktausbeute für die Proben A und B beobachtet. Im Falle einer Dotierung mit Aluminiumisopropoxid (Probe C) änderte sich die Morphologie der Partikel vollständig zu kleinen Kugeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 24 nm (**Abb. 8**). Das Produkt war gelartig mit einer hohen Ausbeute von etwa 120 mg. Die höchste Aluminiumdotierung wurde für die Probe C (Kugeln) beobachtet.

Für die länglichen Partikeln wurde dafür die höchste Einbaurate von Aluminium in Silica-Partikeln für die Probe A (dotiert mit Aluminiumbutoxid) bestimmt, die nahe bei 1 % lag (**Tab. 3**).





**Abb. 8:** REM-Aufnahmen von aluminiumdotierten Silica-Partikeln, die in einer Mikroemulsionsreaktion synthetisiert wurden. Die Zugabe der Aluminiumpräkursoren zur Reaktionslösung erfolgte in Ethanol. **Probe A:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminium-Sec.-Butoxid. **Probe B:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminiummethoxid. **Probe C:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminiumisopropoxid und **Probe D:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminium(III)acetylacetonat.

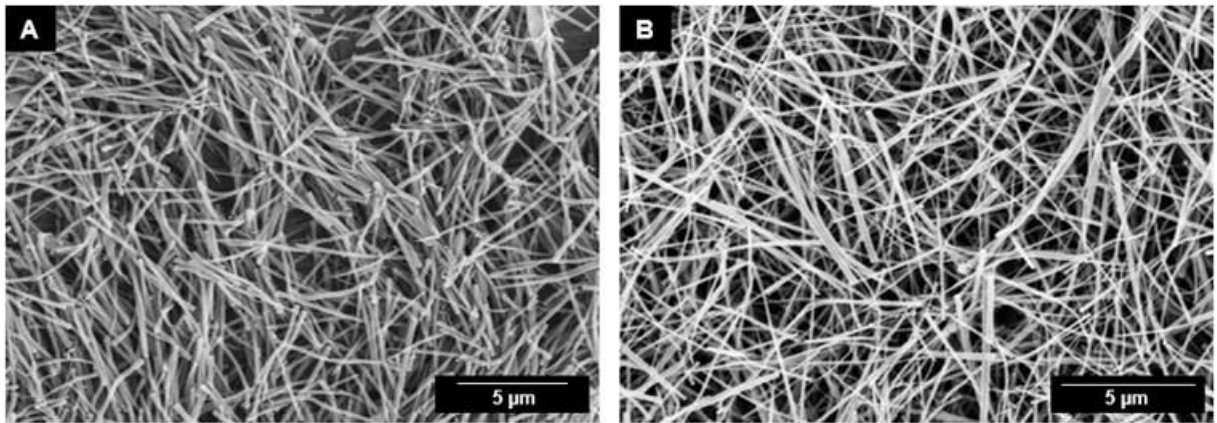


**Abb. 9:** REM-Aufnahmen von aluminiumdotierten Silica-Partikeln, die in einer Mikroemulsionsreaktion synthetisiert wurden. Die Zugabe der Aluminiumpräkursoren zur Reaktionslösung erfolgte in TEOS. **Probe A:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminium-Sec.-Butoxid. **Probe B:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminiummethoxid. **Probe C:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminiumisopropoxid und **Probe D:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminium(III)acetylacetonat.

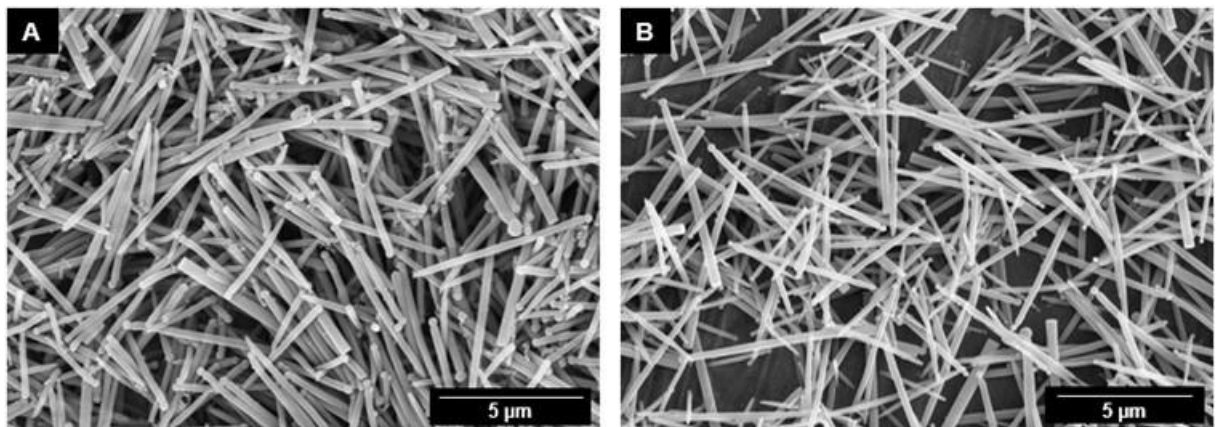
**Tab. 3:** EDX-Ergebnisse zur elementaren Zusammensetzung von aluminiumdotierten Silica-Partikeln aller Synthesen. **Probe A:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminium-Sec.-Butoxid. **Probe B:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminiummethoxid. **Probe C:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminiumisopropoxid und **Probe D:** Partikel dotiert mit 1 % Aluminium(III)acetylacetonat.

Element:	Gew. %:							
	A		B		C		D	
	Zugabe in EtOH	Zugabe in TEOS	Zugabe in EtOH	Zugabe in TEOS	Zugabe in EtOH	Zugabe in TEOS	Zugabe in EtOH	Zugabe in TEOS
Kohlenstoff	16,5	14,9	6,5	12,3	22,4	13,5	14,4	28,2
Sauerstoff	59,4	56,5	56,9	52,2	59,6	54,6	51,9	52,3
Stickstoff	-	5,1	-	4,6	-	5,3	-	-
Natrium	-	-	0,6	-	-	-	-	-
Aluminium	0,7	0,4	0,1	0,2	0,2	1	0,6	0,6
Silicium	23,4	23,2	35,8	30,8	17,8	25,6	31,2	18,8

Da die Al-Dotierung der Silica-Fasern während der Modellsynthese zu Veränderungen der Partikelmorphologie und zu einer geringen Dotierungseffizienz führte, wurde ein weiterer Dotierungsansatz getestet, bei dem die Silica-Fasern zunächst mit der Modellsynthese hergestellt und im Anschluss für 24 h in einer 1 M-Aluminiumsalz-Lösung hydrothermal bei 200 °C behandelt wurden. Hierzu wurde zunächst überprüft, ob die hohen Temperaturen und der erhöhte Druck während der Hydrothermalbehandlung zu Veränderung der Partikelmorphologie führen. Es konnte gezeigt werden, dass die faserförmige Morphologie der Partikel auch nach der Hydrothermalbehandlung (200 °C, 24 h in Wasser) erhalten bleibt (**Abb. 10 B**). Auch die Hydrothermalbehandlung (200 °C, 24 h) der Silica-Fasern in 1 M  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung führte zu keiner Veränderung der Partikelmorphologie (**Abb. 11 B**). Die EDX-Ergebnisse zeigten, dass die Dotierungseffizienz dieses Ansatzes allerdings maximal bei 1,1 Gew.-% Aluminium liegt (**Tab. 4**).



**Abb. 10:** REM-Aufnahmen der unbehandelten (A) und der hydrothermalbehandelten Silica-Fasern (B, 200 °C, 24 h in Wasser).



**Abb. 11:** REM-Aufnahmen der unbehandelten (A) und der hydrothermalbehandelten Silica-Fasern (B, 200 °C, 24 h in 1 M  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung).



**Tab. 4:** EDX-Ergebnisse der elementaren Zusammensetzung der unbehandelten (**11 A**) und der hydrothermalbehandelten Silica-Fasern (**14 B**, 200 °C, 24 h in 1 M Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Lösung).

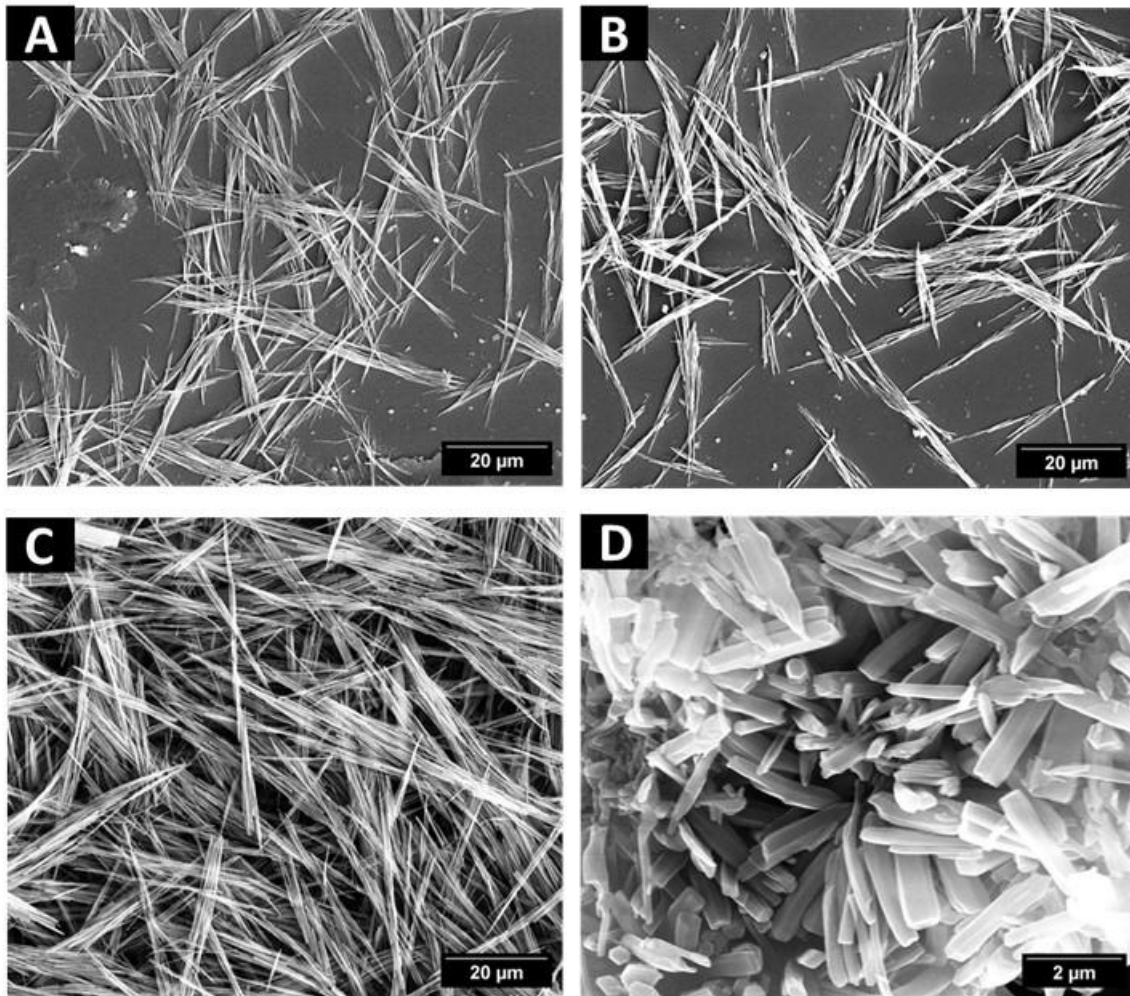
	Gew. %:	
	A	B
<b>Element:</b>		
Kohlenstoff	4,8	1,6
Sauerstoff	47,9	55,3
Silicium	47,3	42,0
Aluminium	-	1,1

**Tab. 5:** EDX-Ergebnisse der elementaren Zusammensetzung von aluminiumdotierten Silica-Partikeln.

Element:	Gew. %:			
	A	B	C	D
Kohlenstoff	8,2	6,5	21,3	10,0
Sauerstoff	58,6	56,9	48,5	54,4
Stickstoff	-	-	6,0	-
Natrium	-	0,6	-	-
Aluminium	<b>0,8</b>	<b>0,1</b>	<b>2,1</b>	-
Silizium	32,5	35,8	22,0	35,6

#### 4.5. Synthese und Charakterisierung von Titandioxid-Fasern

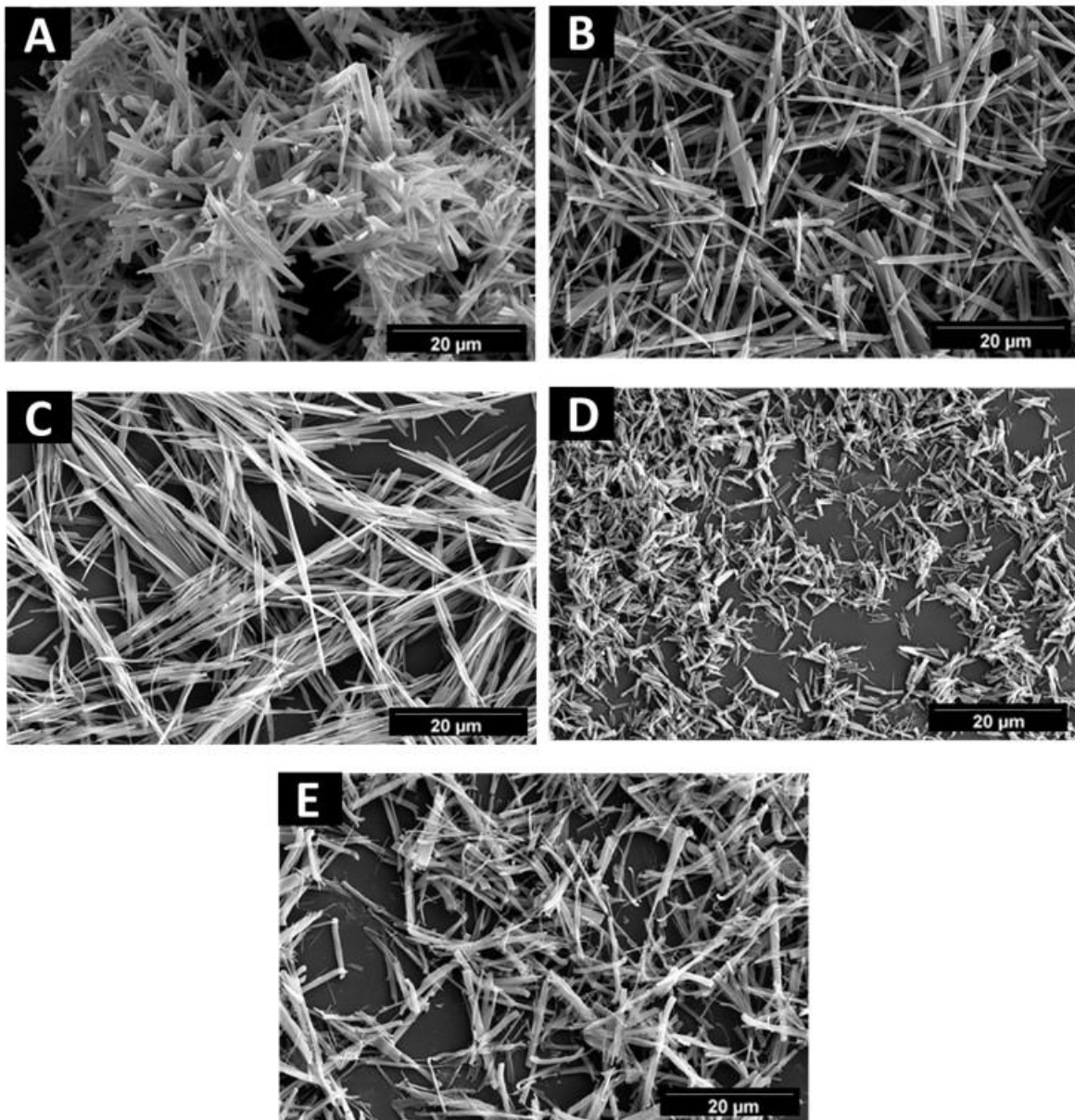
Basierend auf einer leichten Variierung des Syntheseprotokolls konnten unterschiedlich lange Titandioxid-Fasern synthetisiert werden, indem die Reaktionszeit (1 h, 2 h oder 3 h) bzw. die Synthesetemperatur (100 °C, 140 °C oder 180 °C) verändert wurden. Zusätzlich wurde als Präkursor zum einen Titan(IV)isopropoxid und zum anderen Titan(IV)butoxid eingesetzt. Die Redispersion nach der Aufreinigung und anschließender Trocknung der Fasern, erfolgte statt eines Ultraschallbads mit einer 5 mL-Pipette. So wurde das erhaltene Pellet nach dem Zentrifugieren durch langsames Auf- und Abpipettieren dispergiert. Anhand der REM-Aufnahmen (**Abb. 12**) konnten die langen Fasern aller Variationen abgebildet werden.



**Abb. 12:** REM-Aufnahmen der Titandioxid-Fasern die mit verschiedenen Zeiten und Temperaturen mit Titan(IV)isopropoxid als Präkursor synthetisiert wurden. (A) 1 h, 140 °C; (B) 3 h, 140 °C; (C) 2 h, 180 °C und (D) 2 h, 100 °C.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionszeit (1 h, 2 h oder 3 h) keinen Einfluss auf die Länge und Morphologie der Fasern hatte (ca. 26 μm). Bei einer Temperatur von 100 °C konnten jedoch nur kurze kristalline Fasern synthetisiert werden (ca. 3 μm), siehe **Abb. 12 D**.

Zusätzlich wurden die Parameter der Rührzeit und der Temperatur der Polyolsynthese auch mit Titan(IV)butoxid als Präkursor durchgeführt und die Partikel mittels REM analysiert (siehe **Abb. 13**).



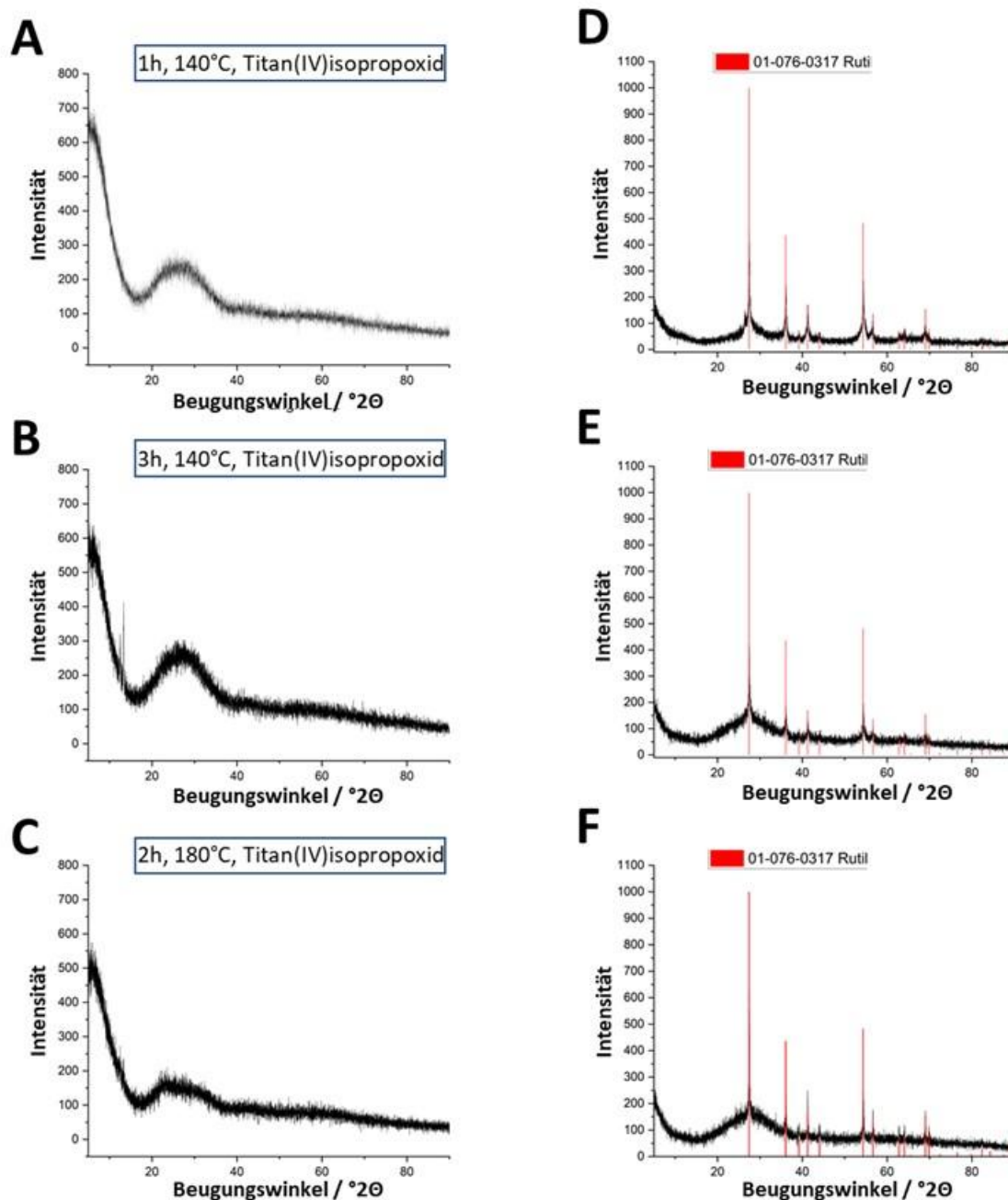
**Abb. 13:** REM-Aufnahmen der Titandioxid-Fasern, die mit verschiedenen Zeiten und Temperaturen mit Titan(IV)butoxid als Präkursor synthetisiert wurden. (A) 1 h, 140 °C; (B) 3 h, 140 °C; (C) 2 h, 180 °C; (D) 2 h, 100 °C und (E) 2 h, 140 °C.

Auch bei diesem Präkursor (Titan(IV)butoxid) als Ausgangsmaterial) konnten gleiche Fasern wie bei dem Präkursor Titan(IV)isopropoxid gefunden werden. Bei einer Temperatur von nur 100 °C konnten die Fasern trotz unterschiedlicher Rührzeiten nicht vollständig wachsen und erreichten nur eine Länge von 3 µm. In **Tab. 6** sind die Längen und Durchmesser sowie die Produktausbeuten der einzelnen Fasern zusammengefasst.

**Tab. 6:** Zusammenfassung der Fasergrößen und Ausbeuten.

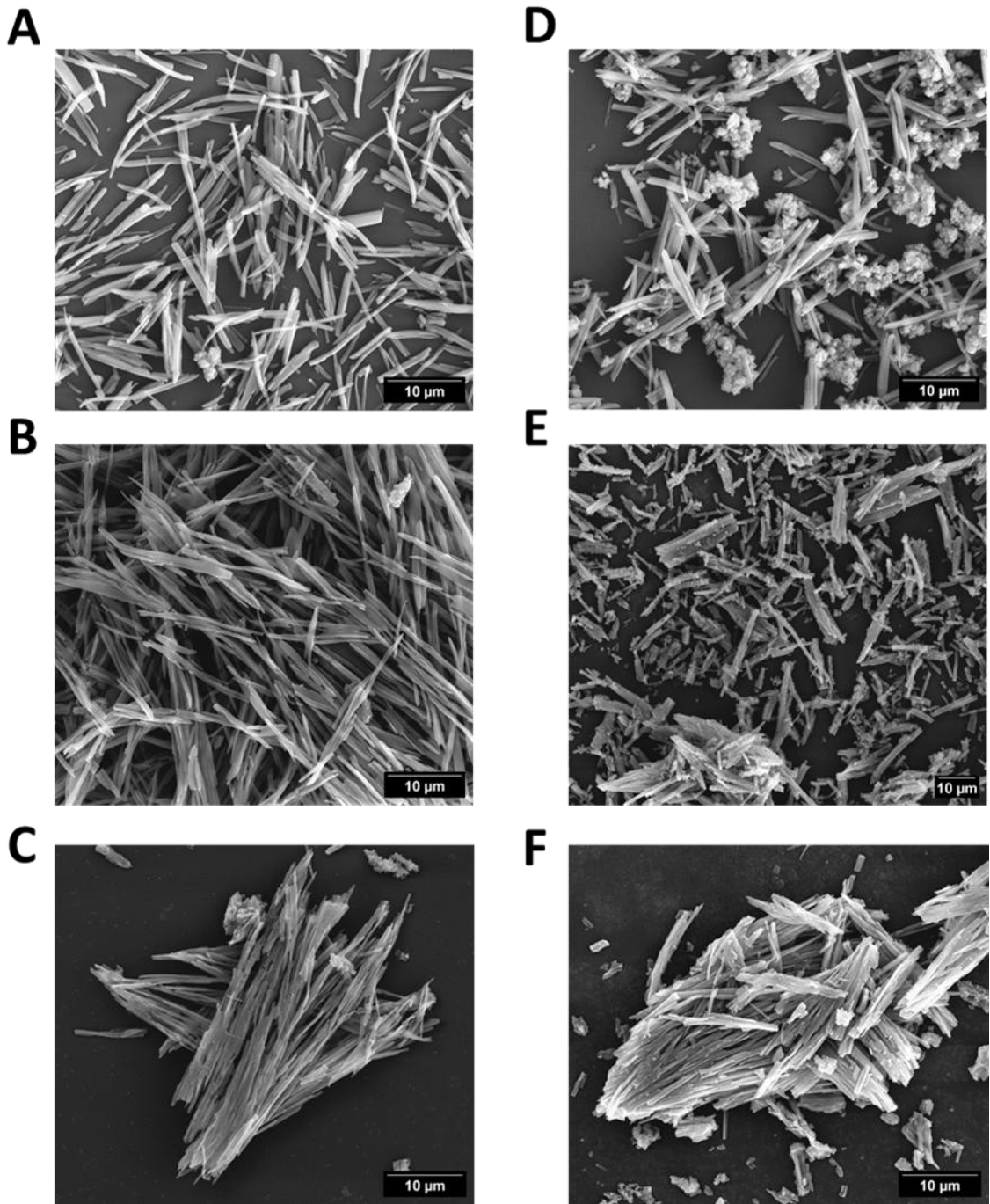
<b>Faserart</b>	<b>Länge / <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Durchmesser / <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Ausbeute / mg</b>
1 h, 140 °C, Titan(IV) isopropoxid	$l = 26 \pm 3 \mu\text{m}$	$d = 0,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$	192
3 h, 140 °C, Titan(IV) isopropoxid	$l = 24 \pm 4 \mu\text{m}$	$d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$	245
2 h, 100 °C, Titan(IV) isopropoxid	$l = 3 \pm 0,3 \mu\text{m}$	$d = 0,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$	290
2 h, 180 °C, Titan(IV) isopropoxid	$l = 28 \pm 6 \mu\text{m}$	$d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$	301
1 h, 140 °C, Titan(IV)butoxid	$l = 14 \pm 3 \mu\text{m}$	$d = 1 \pm 0,1 \mu\text{m}$	158
2 h, 140 °C, Titan(IV)butoxid	$l = 16 \pm 4 \mu\text{m}$	$d = 1 \pm 0,2 \mu\text{m}$	108
3 h, 140 °C, Titan(IV)butoxid	$l = 16 \pm 5 \mu\text{m}$	$d = 2 \pm 0,7 \mu\text{m}$	160
2 h, 180 °C, Titan(IV)butoxid	$l = 18 \pm 6 \mu\text{m}$	$d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$	115
2 h, 100 °C, Titan(IV)butoxid	$l = 3 \pm 0,6 \mu\text{m}$	$d = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$	300

Die Titandioxid-Fasern waren nach der Synthese röntgenamorph, was anhand der PXRD-Analyse verdeutlicht werden konnte (**Abb. 14 A-C**). Erst nach der Erhitzung der Fasern mittels TGA bis auf 1000 °C in Sauerstoffatmosphäre konnte die kristalline Form von Rutil erhalten werden (**Abb. 14 D-F**).



**Abb. 14:** Röntgenpulverdiffraktogramme der Titandioxid-Fasern, die in einer Polyolreaktion mit verschiedenen Zeiten, Temperaturen und Präkursoren synthetisiert wurden. (A) 1 h, 140 °C, Titan(IV)isopropoxid nach der Synthese; (B) 3 h, 140 °C, Titan(IV)isopropoxid nach der Synthese; (C) 2 h, 180 °C, Titan(IV)isopropoxid nach der Synthese; (D) 1 h, 140 °C, Titan(IV)isopropoxid nach der Erhitzung auf 1000 °C in Sauerstoffatmosphäre; (E) 3 h, 140 °C, Titan(IV)isopropoxid nach der Erhitzung auf 1000 °C in Sauerstoffatmosphäre und (F) 2 h, 180 °C, Titan(IV)isopropoxid nach der Erhitzung auf 1000 °C in Sauerstoffatmosphäre.

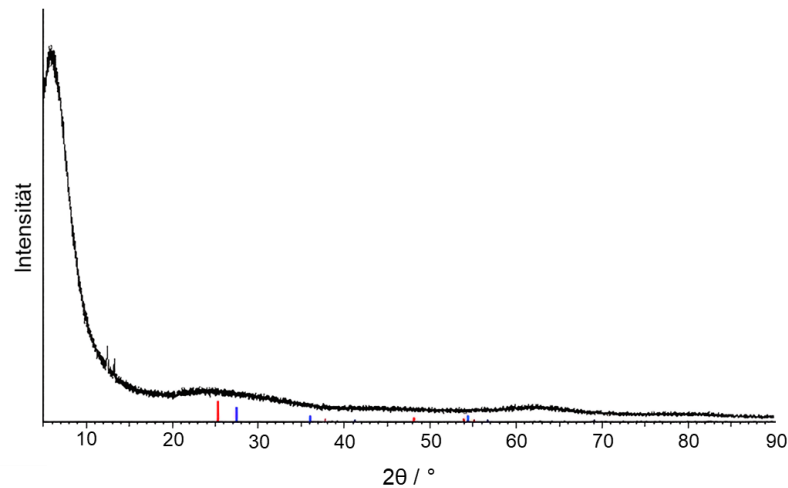
Abschließend wurden mechanische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden die trockenen Titandioxid-Fasern mit Reinstwasser aufgeschlämmt und zum einen mittels Auf- und Abpipettieren redispergiert und zum anderen für 2 min in einem Ultraschallbad belassen. Dabei sollte getestet werden, ob die Fasern durch mechanische Belastung brechen, sich verformen oder ihre Morphologie verändern. Es konnte gezeigt werden, dass die kürzeren Fasern (16-18 µm) ihre Länge und Breite, trotz Ultraschallbad beibehalten. Die sehr langen Fasern (28 µm) brechen jedoch durch die Ultraschallbehandlung, so dass ihre mittlere Länge auf ca. 18 µm abnahm (siehe **Abb. 15**).



**Abb. 15:** Titandioxid-Fasern nach der mechanischen Redispersion mittels Pipettierens (A-C) und mittels eines Ultraschallbades (D-F). (A) 3 h, 140 °C, Titan(IV)butoxid mittels Pipettierens; (B) 2 h, 180 °C, Titan(IV)butoxid mittels Pipettierens; (C) 2 h, 180 °C, Titan(IV)isopropoxid mittels Pipettierens; (D) 3 h, 140 °C, Titan(IV)butoxid nach Ultraschallbad; (E) 2 h, 180 °C, Titan(IV)butoxid nach Ultraschallbad und (F) 2 h, 180 °C, Titan(IV)butoxid nach Ultraschallbad. In **Tab. 7** sind die Dimensionen der Fasern nach der Synthese und nach den beiden Redispersionsmethoden vergleichend dargestellt.

**Tab. 7:** Vergleich der Längen der Fasern nach mechanischer Behandlung.

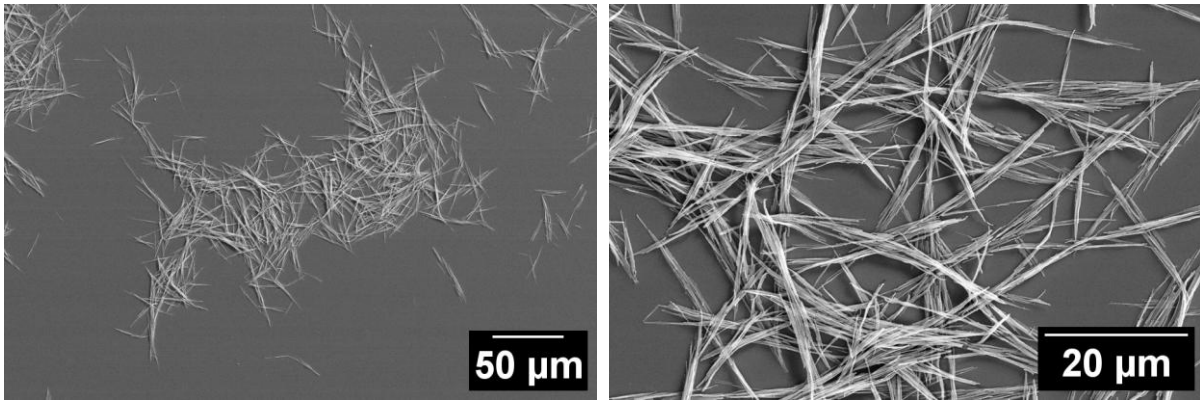
	<b>3 h, 140 °C, Titan(IV)butoxid</b>	<b>2 h, 180 °C, Titan(IV)butoxid</b>	<b>2 h, 180 °C, Titan(IV)isopropoxid</b>
Nach der Synthese	$l = 16 \pm 5 \mu\text{m}$ $d = 2 \pm 0,7 \mu\text{m}$	$l = 18 \pm 6 \mu\text{m}$ $d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$	$l = 28 \pm 6 \mu\text{m}$ $d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$
Redispersion in Wasser mittels Pipettierens	$l = 15 \pm 3 \mu\text{m}$ $d = 1 \pm 0,1 \mu\text{m}$	$l = 19 \pm 2 \mu\text{m}$ $d = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$	$l = 26 \pm 5 \mu\text{m}$ $d = 0,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$
Redispersion in Wasser mittels Ultraschallbad	$l = 16 \pm 3 \mu\text{m}$ $d = 1 \pm 0,1 \mu\text{m}$	$l = 20 \pm 4 \mu\text{m}$ $d = 0,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$	$l = 18 \pm 2 \mu\text{m}$ $d = 0,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$



**Abb. 16:** Typisches Röntgenpulverdiffraktogramm von Titandioxid-Fasern, die in einer Polyolreaktion synthetisiert wurden.

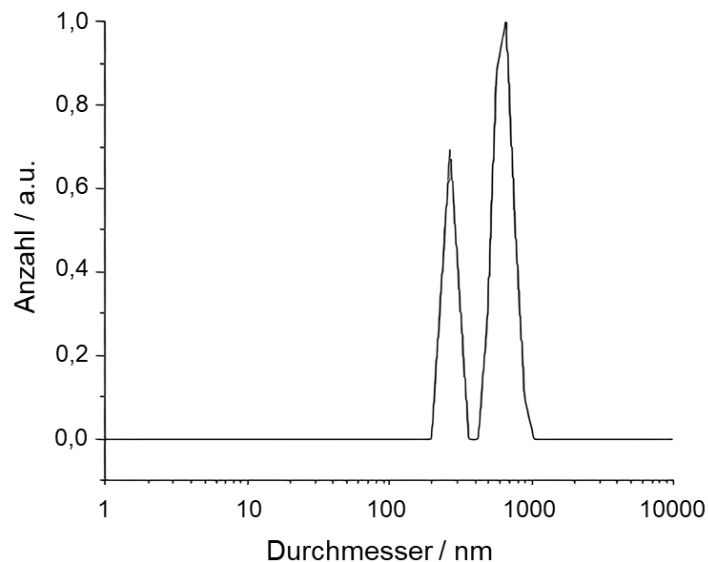
In einer weiteren Synthese der Titandioxid-Fasern wurde die Redispersion verändert, indem statt eines Ultraschallbads eine 5 mL Pipette eingesetzt wurde. Dabei wurde das erhaltene Pellet nach dem Zentrifugieren durch langsames auf- und ab-Pipettieren dispergiert. So konnten längere Titandioxid-Fasern erhalten werden. Anhand der REM-Aufnahmen konnte eine Länge von  $25 \pm 5 \mu\text{m}$  und ein Durchmesser von  $0,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$  erhalten werden (siehe **Abb. 17**).





**Abb. 17:** Typische REM-Aufnahmen der Titandioxid-Fasern nach der modifizierten Redispersionsmethode.

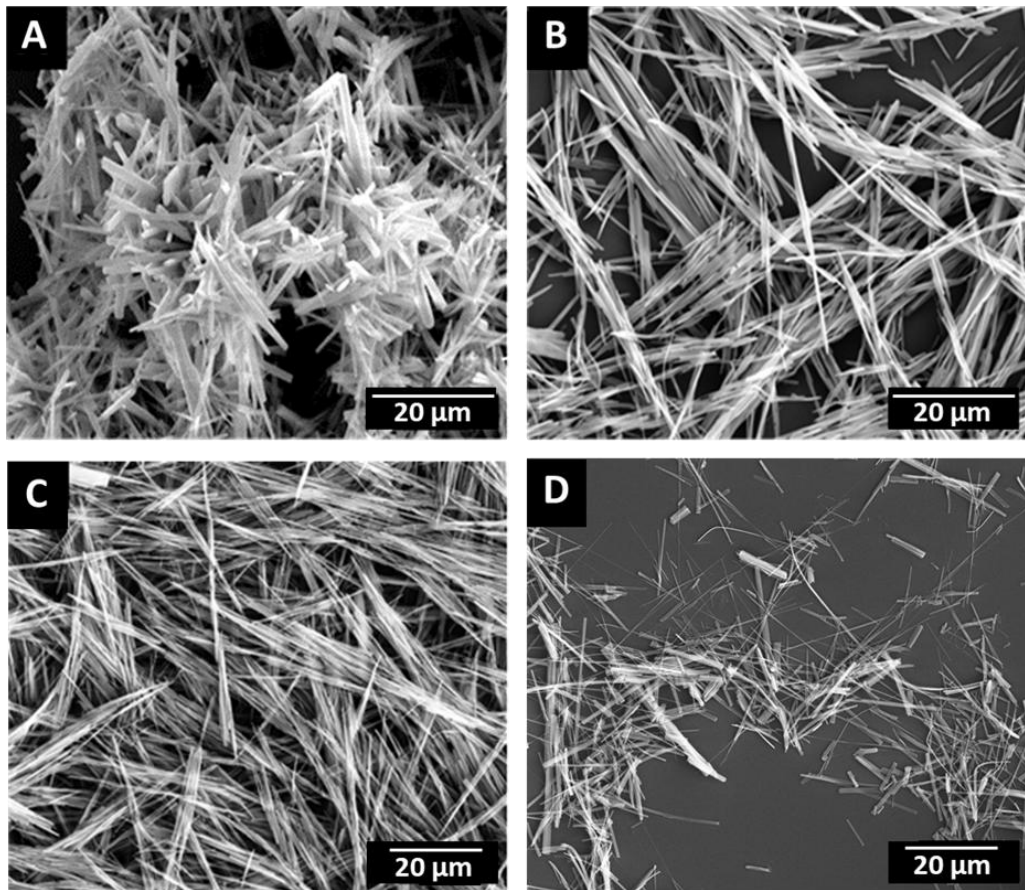
Durch DLS-Messungen konnten zwei hydrodynamische Durchmesser (267 nm und 661 nm) erhalten werden (siehe **Abb. 18**), was auf stäbchenförmige Partikel hindeutet. Mit einem Endotoxin-Test konnte ein Wert von 0,05 EU/mL bestimmt und eine Produktausbeute von ca. 170 mg erhalten werden.



**Abb. 18:** Normierte DLS-Messungen nach der Anzahlverteilung der Titandioxid-Fasern nach der modifizierten Redispersionsmethode.

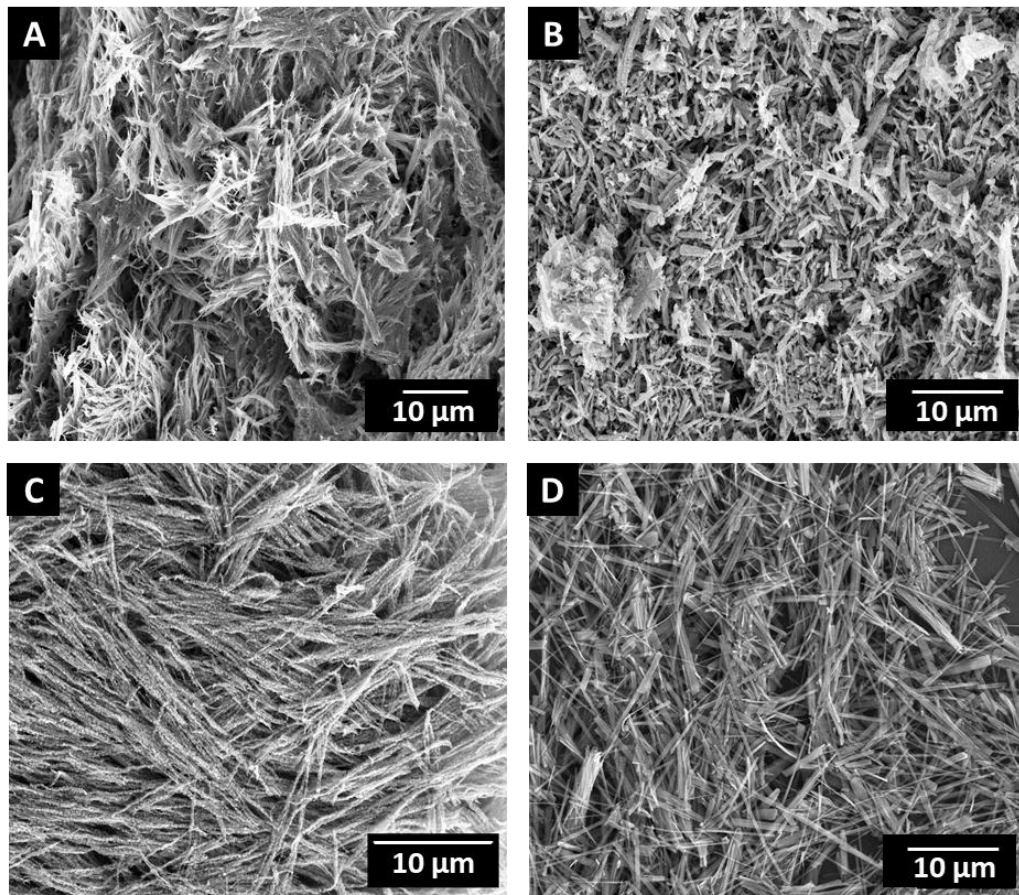
Es konnten über zwei unterschiedliche Synthesewege Titandioxid-Fasern hergestellt werden. Mittels Polyol-Synthese konnten durch die Variation der Reaktionszeit, Temperatur und des eingesetzten Titan-Präkursors lange (Länge:  $28 \pm 6 \mu\text{m}$ ; Durchmesser:  $0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ; Aspektverhältnis: 70:1), mittellange (Länge:  $18 \pm 6 \mu\text{m}$ ; Durchmesser:  $0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ; Aspektverhältnis: 45:1) und kurze (Länge:  $16 \pm 5 \mu\text{m}$ ; Durchmesser:  $2 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ; Aspektverhältnis: 8:1) Fasern hergestellt werden. Über eine Hydrothermalsynthese ausgehend von Titanpulver konnten Titandioxid-Fasern mit einer Länge von  $16 \pm 8 \mu\text{m}$ , einem Durchmesser von  $0,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$  und einem Aspektverhältnis von 35:1 hergestellt werden.





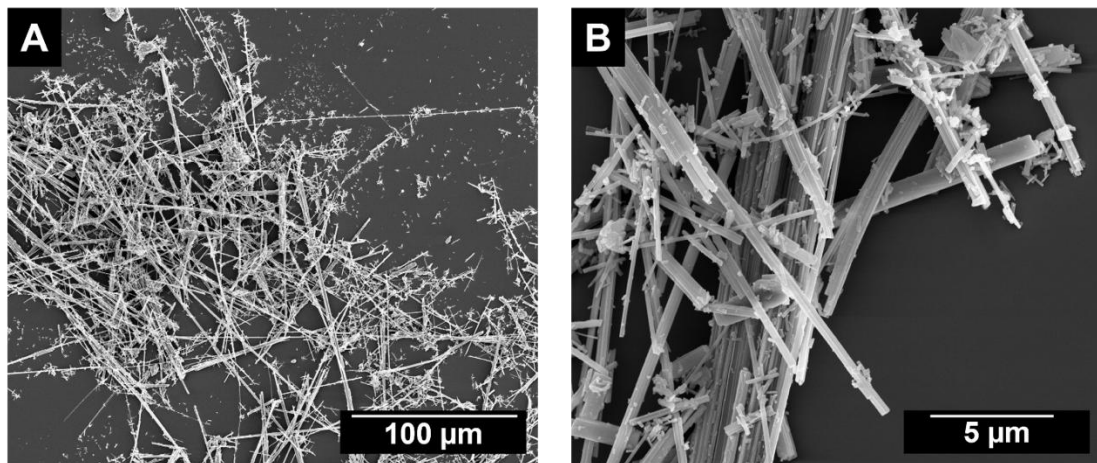
**Abb. 19:** Repräsentative REM-Aufnahmen der Titandioxid-Fasern hergestellt mittels Polyolsynthese mit unterschiedlichen Titan-Präkursoren und Reaktionsbedingungen (**A-C**) und mittels Hydrothermalsynthese (**D**) vor der Kalzinierung.

Die Kalzinierung führte zu einer erheblichen Veränderung der Fasermorphologie (**Abb. 20**).

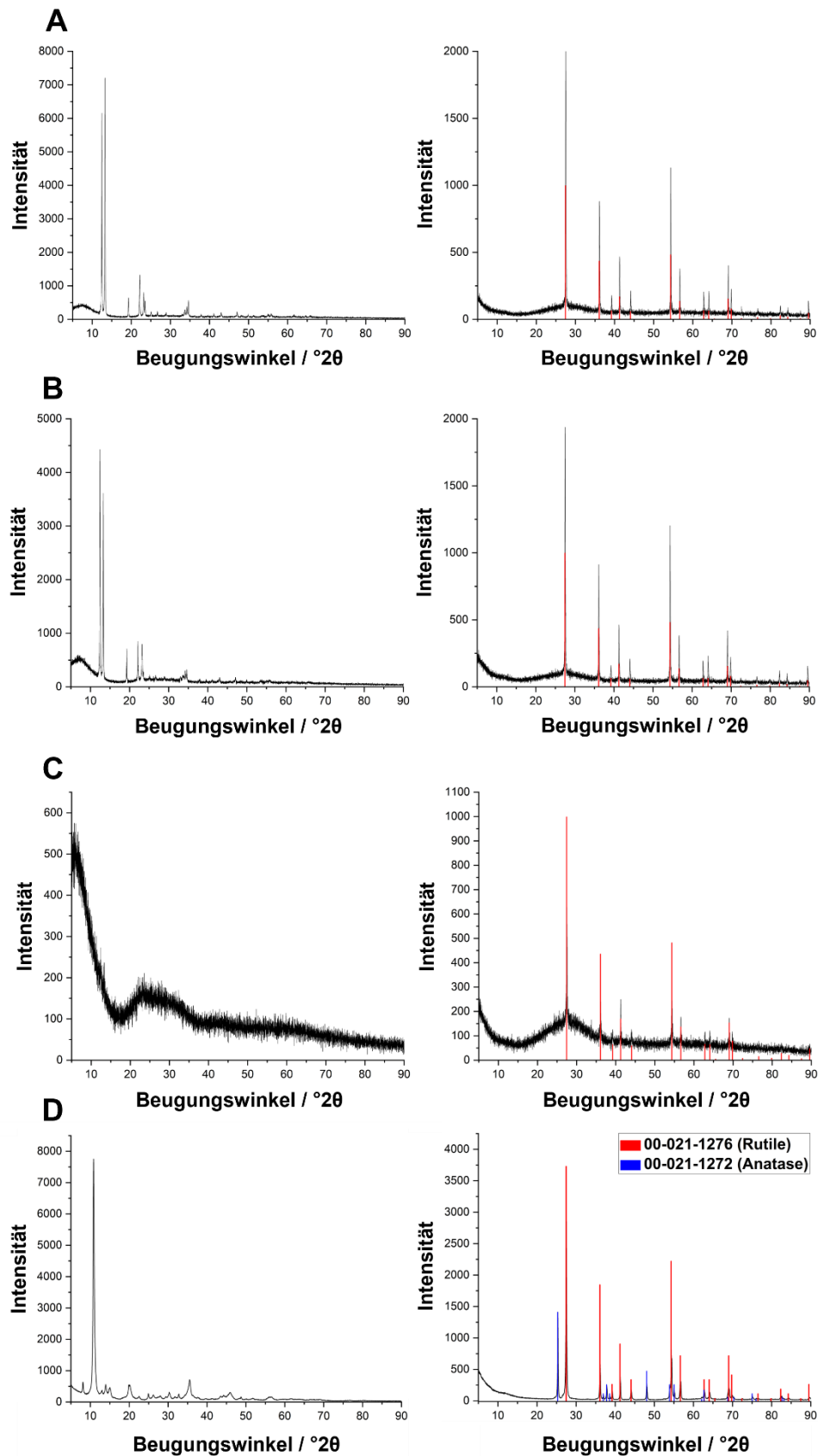


**Abb. 20:** Repräsentative REM-Aufnahmen der Titandioxid-Fasern, synthetisiert mittels Polyolsynthese und kalziniert bei 1000 °C (**A-C**) und hergestellt mittels Hydrothermalsynthese und kalziniert bei 700 °C für 4 Stunden. (**D**)

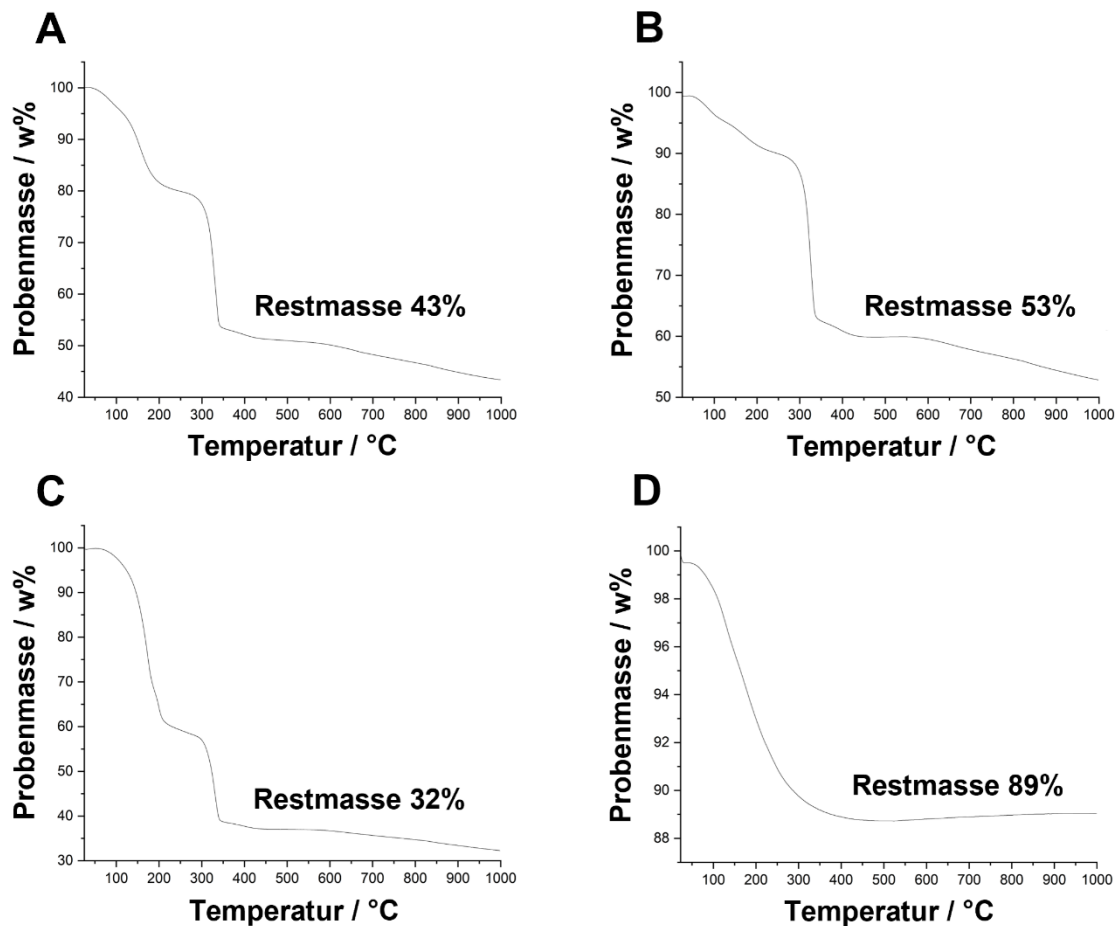
Alle Synthesen der Titandioxid-Fasern waren gut reproduzierbar. Die Titandioxid-Fasern, die mittels Hydrothermalsynthese hergestellt wurden, waren bereits vor der Kalzinierung kristallin (siehe **Abb. 22 D**). Das beobachtete Beugungsmuster konnte jedoch keiner der bekannten Phasen von Titandioxid zugeordnet werden. Es kann angenommen werden, dass die Fasern aus einer Mischphase von Titanoxid und -hydroxid bestehen. Die Kalzinierung bei 700 °C für 4 Stunden führte zu einer Umwandlung in eine Mischphase aus Rutil und Anatas (siehe **Abb. 22 D**).



**Abb. 21:** Repräsentative REM-Aufnahmen der Krokydolith-Asbest-Fasern. (A) 10.000-fache Vergrößerung. (B) 15.000-fache Vergrößerung.



**Abb. 22:** Diffraktogramme der hergestellten Titandioxid-Fasern vor (**links**) und nach (**rechts**) der Kalzinierung. **(A)** Polyol-Synthese 3 h, 140 °C mit Titan(IV)-butoxid vor und nach Kalzinierung bei 1000 °C; **(B)** Polyol-Synthese 3 h, 140 °C mit Titan(IV)-butoxid vor und nach Kalzinierung bei 1000 °C; **(C)** Polyol-Synthese 2 h, 180 °C mit Titan(IV)-isopropoxid vor und nach Kalzinierung bei 1000 °C; **(D)** Hydrothermalsynthese vor und nach der Kalzinierung bei 700 °C für 4 h.



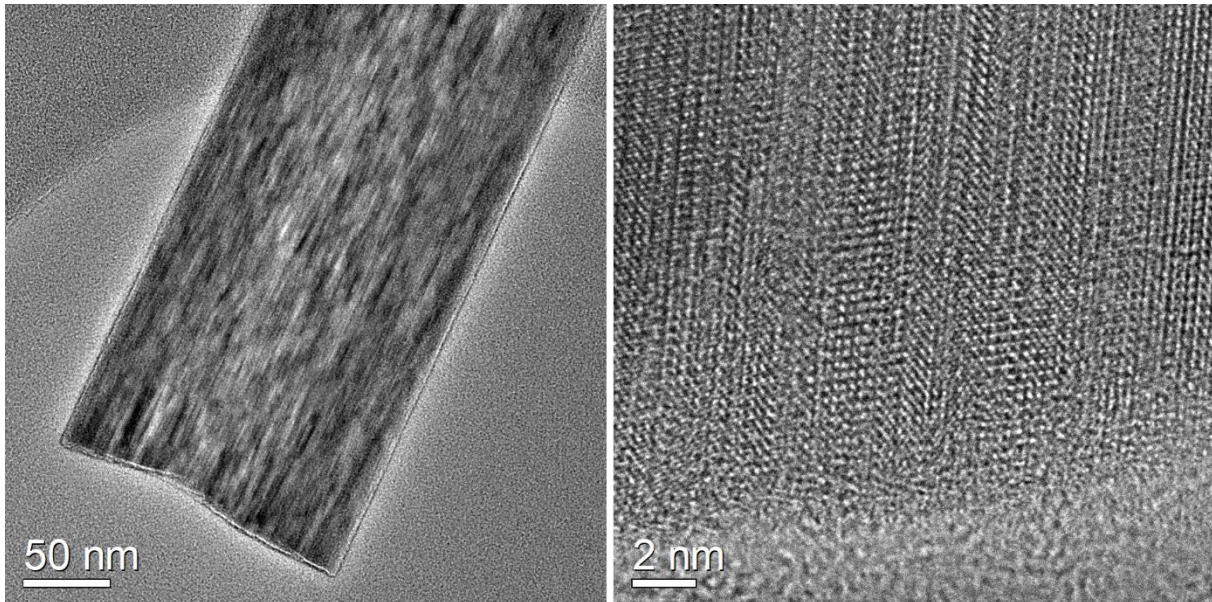
**Abb. 23:** Thermogravimetrie der hergestellten Titandioxid-Fasern. (A) Polyol-Synthese 3 h, 140 °C mit Titan(IV)-butoxid; (A) Polyol-Synthese 3 h, 140 °C mit Titan(IV)-butoxid; (C) Polyol-Synthese 2 h, 180 °C mit Titan(IV)-isopropoxid; (D) Hydrothermalsynthese.

Die chemische Zusammensetzung der Fasern vor der Kalzinierung ist schwer zu beurteilen. Die mittels Polyol-Synthese hergestellten Titandioxidfasern scheinen metallorganischer Natur zu sein und enthalten wahrscheinlich unlösliche Titan-Alkoxide. Das Kalzinieren führte zu einem beträchtlichen Gewichtsverlust bei der Thermogravimetrie, was das Vorhandensein von inkorporiertem Wasser, die gelartige Beschaffenheit der anorganischen Phase und das Vorhandensein von Restkohlenstoff im Fall vermuten lässt. Diese Vermutung konnte durch die Elementaranalyse der Fasern gestützt werden, bei der für alle drei Fasertypen, die mittels Polyol-Synthese hergestellt wurden, vor der Kalzinierung ein Kohlenstoffgehalt von 23 bis 28 Gewichtsprozent ermittelt wurden (siehe **Tab. 8**). Im Gegensatz dazu enthielten die mittels Hydrothermalsynthese hergestellten Titandioxid-Fasern laut Elementaranalyse keine organischen Moleküle und bestanden wahrscheinlich aus Natrium-Titan-Oxid-Hydroxiden. Das Kalzinieren führte hierbei zu einem deutlich geringeren Gewichtsverlust, welcher auf das bei der Umwandlung von Titanhydroxiden zu Oxiden entweichende Wasser, die gelartige Beschaffenheit der anorganischen Phase und das Vorhandensein von Restkohlenstoff im Fall der aus Alkoxiden gewonnenen Titandioxidfasern (**Abb. 23**) zurückzuführen ist.

**Tab. 8:** Parameter der Titandioxid-Fasern, die durch verschiedene experimentelle Ansätze synthetisiert wurden.

	Polyol-Synthese, 3 h, 140 °C "kurz"	Polyol-Synthese, 2 h, 180 °C "mittellang"	Polyol-Synthese, 2 h, 180 °C "lang"	Hydrothermal-synthese
Präkursor	Titan(IV)-butoxid	Titan(IV)-butoxid	Titan(IV)-isopropoxid	Titanpulver
Länge	16 ± 5 µm	18 ± 6 µm	28 ± 6 µm	16 ± 8 µm
Durchmesser	2 ± 0,7 µm	0,4 ± 0,1 µm	0,4 ± 0,1 µm	0,5 ± 0,3 µm
Aspektverhältnis	8 : 1	45 : 1	70 : 1	35 : 1
Kohlenstoffgehalt vor Kalzinierung / wt %	26,3 ± 1,0	23,3 ± 1,0	28,5 ± 1,0	n.n.
Wasserstoffgehalt vor Kalzinierung / wt %	5,3 ± 0,2	5,0 ± 0,2	7,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Kohlenstoffgehalt nach Kalzinierung / wt %	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	n.n.
Wasserstoffgehalt nach Kalzinierung / wt %	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Restmasse laut Thermogravimetrie	43 % (1000 °C)	53 % (1000 °C)	32 % (1000 °C)	89 % (1000 °C)

Eine HRTEM-Analyse der Titandioxid-Fasern, die mittels Hydrothermalsynthese synthetisiert und 4-Stunden einer Wärmebehandlung bei 700 °C ausgesetzt wurden, ergab eine stark verzwilligte kristalline Struktur, die durch das Vorhandensein deutlicher Zwillingsgrenzen im gesamten Material gekennzeichnet war (**Abb. 24**).



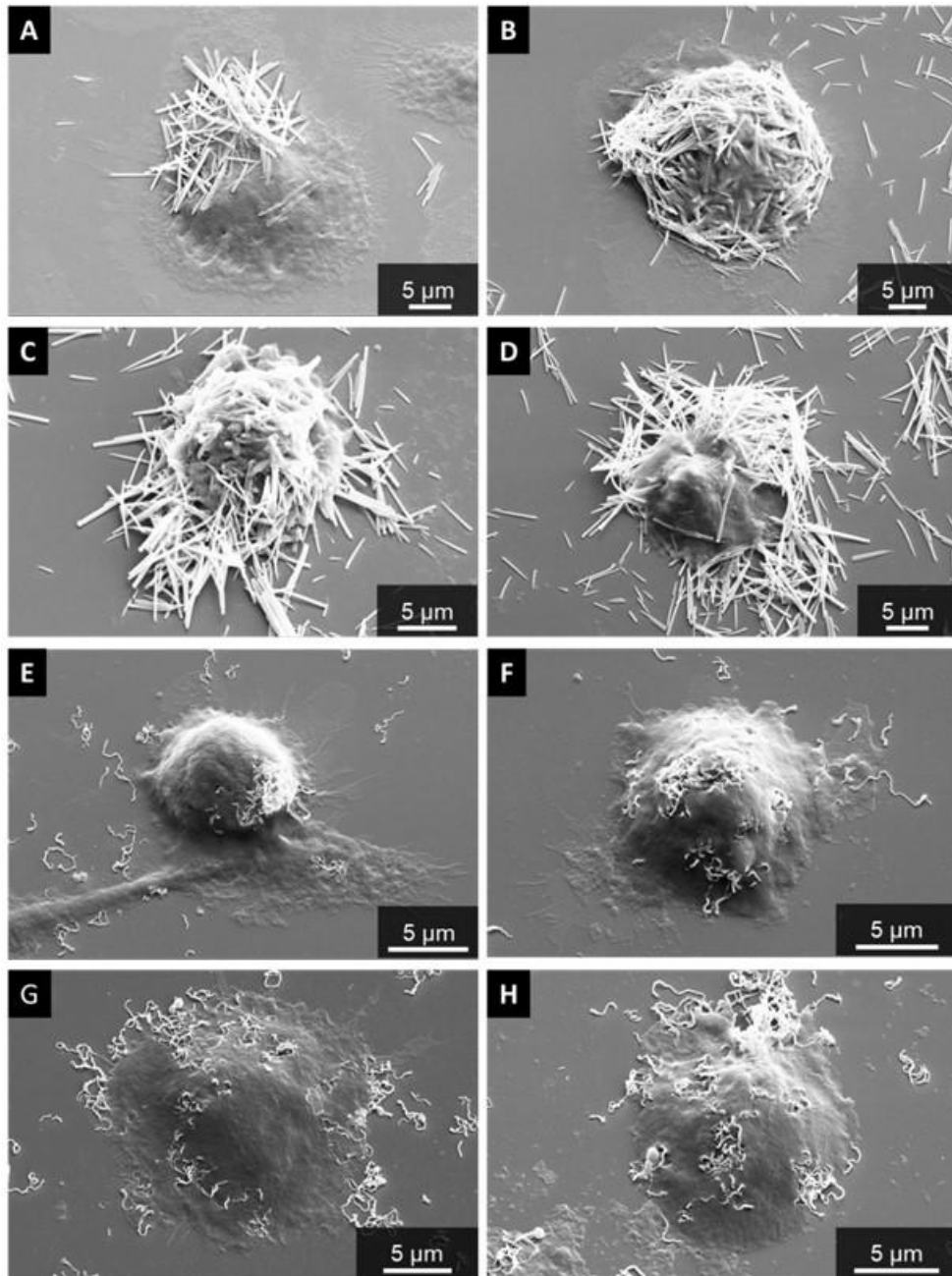
**Abb. 24:** HRTEM-Bilder der Titandioxid-Fasern die mittels Hydrothermalsynthese synthetisiert und nach 4-stündiger Wärmebehandlung bei 700 °C in Sauerstoff behandelt wurden.

## 4.6. Zellbiologische Untersuchung von Silica- und Titandioxid-Fasern

### 4.6.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM) von Silica-Fasern

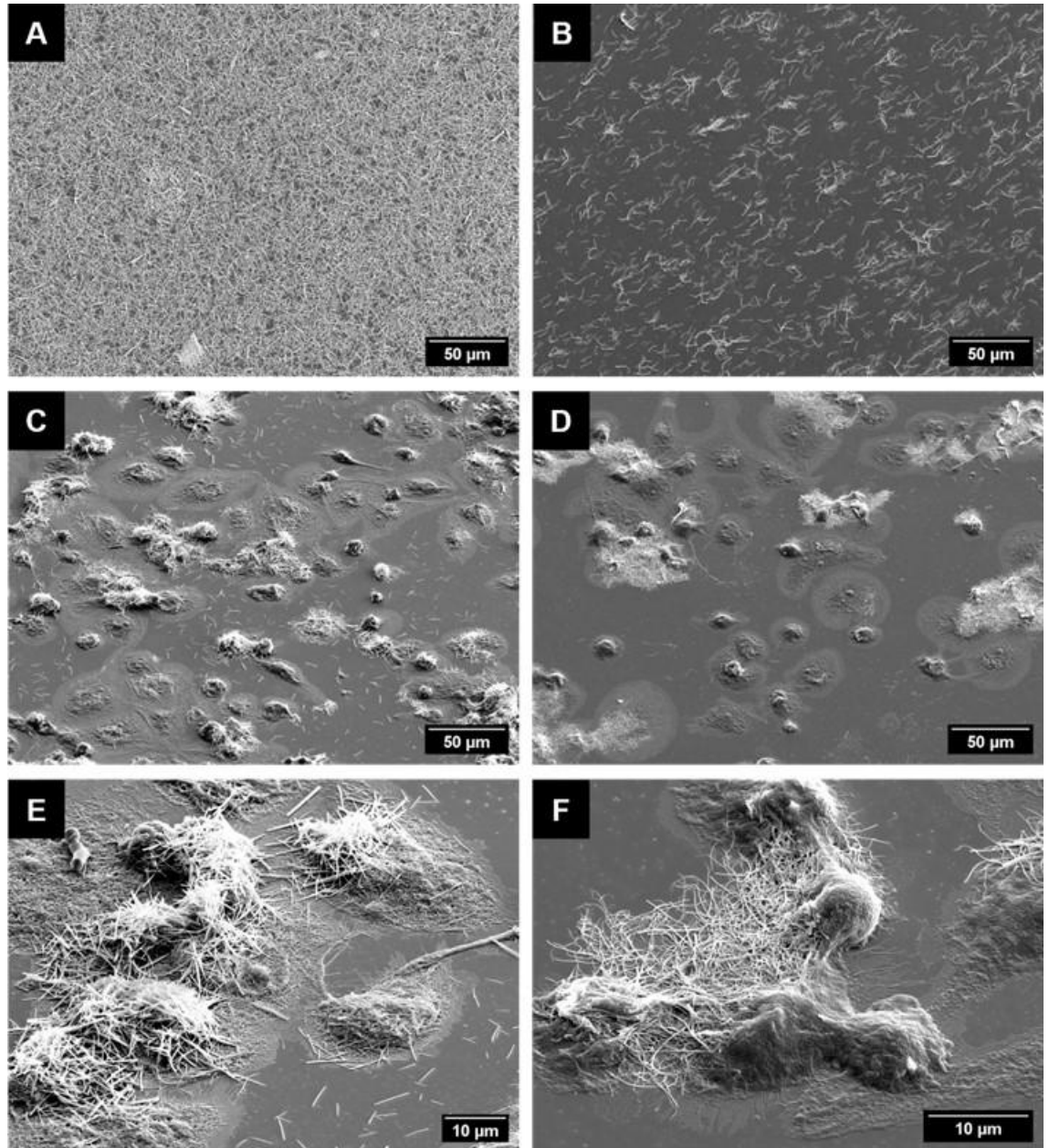
Die Interaktion zwischen Silica-Fasern und THP-1-Zellen wurde mittels REM untersucht. Die Fasern sedimentierten auf das Substrat und die Zellen, wo viele auch nach gründlichem Waschen haften blieben. Nach 24 h Inkubation haben die Zellen sowohl die geraden und dünneren als auch die lockigen Fasern aufgenommen (**Abb. 25**). Eine Aufnahme der Fasern in die Zelle zeigte sich ebenfalls, wenn die Zellen auf den bereits sedimentierten Fasern kultiviert wurden (**Abb. 26**).





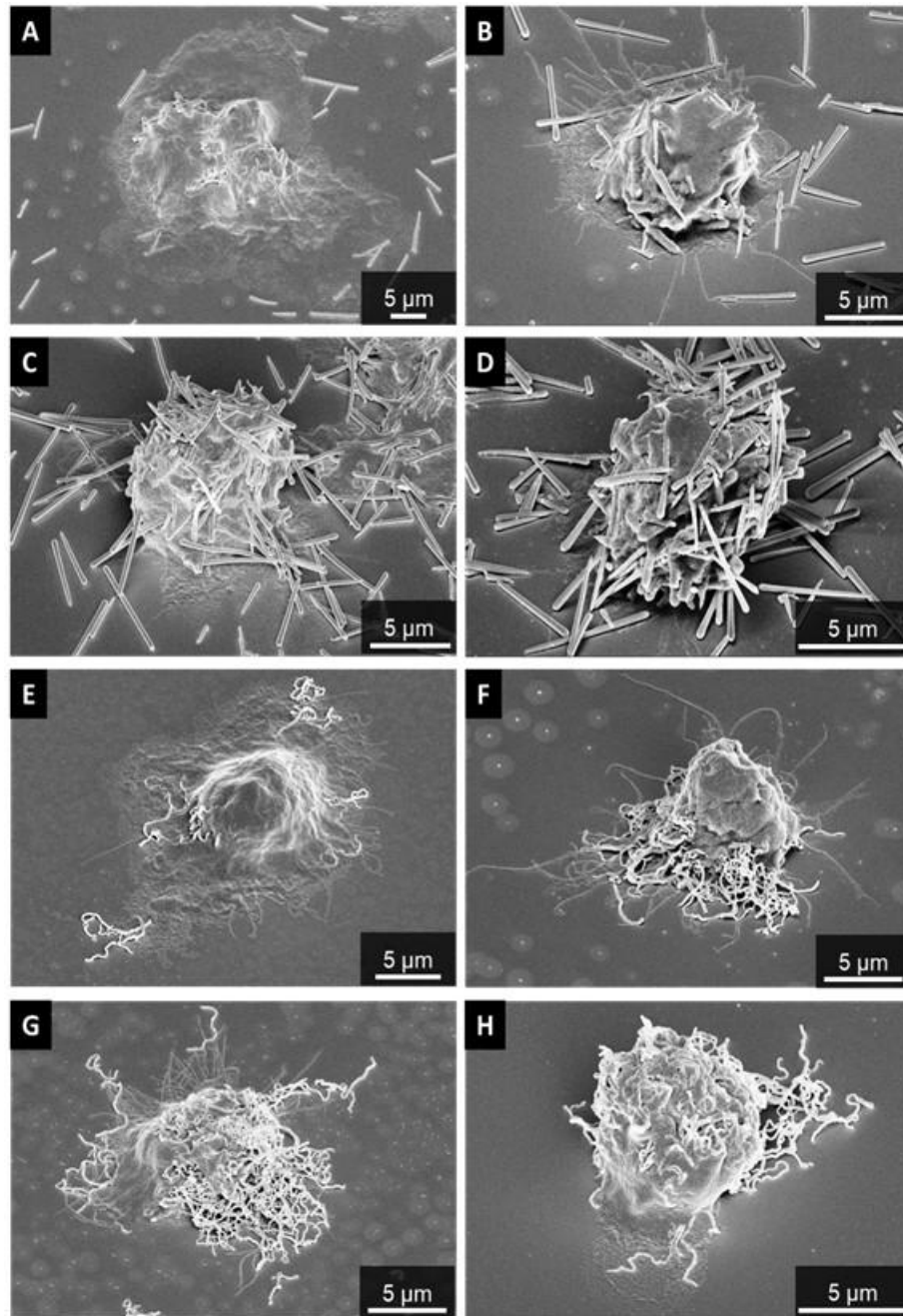
**Abb. 25:** REM-Aufnahmen der mit gerade und dünneren (A-D) und lockigen Silica-Fasern (E- H) inkubierten THP-1-Zellen. Die Zellen wurden für 72 h mit PMA differenziert und anschließend 24 h mit vier verschiedenen Partikel-Konzentrationen  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$  (A/E),  $24 \mu\text{g cm}^{-2}$  (B/F),  $48 \mu\text{g cm}^{-2}$  (C/G) und  $96 \mu\text{g cm}^{-2}$  (D/H) in Medium inkubiert.





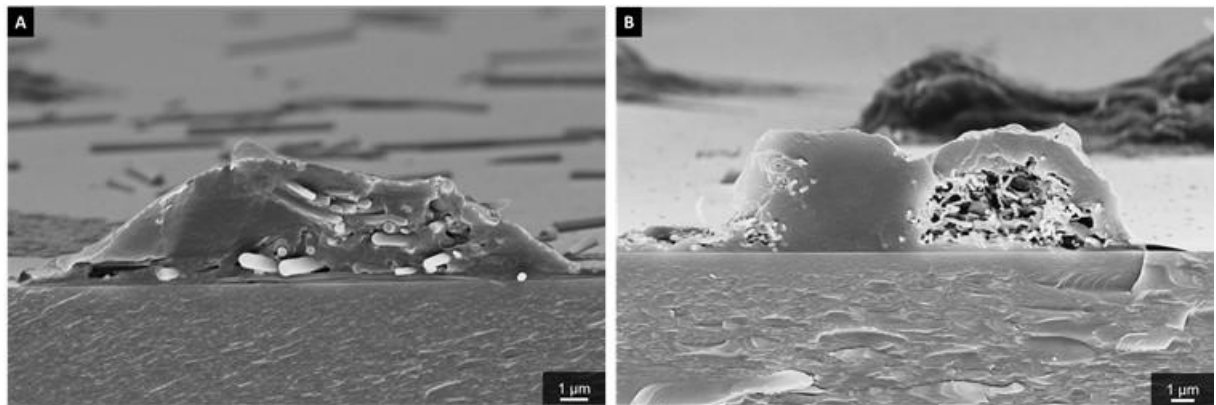
**Abb. 26:** REM-Bilder der auf geraden und dünneren (C/E) und lockigen (D/F) differenzierten THP-1 Zellen. Zunächst wurden nur die Partikel ( $48 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) ins Medium überführt. Nach 24 h wurden die THP-1-Zellen auf die sedimentierten Fasern gegeben und für 72 h mit PMA differenziert. Die oberste Reihe zeigt Silica-Fasern, die nicht mit Zellen inkubiert wurden (A = gerade und dünner; B = lockig).

Die Wechselwirkung von Silica-Fasern mit NR8383-Zellen wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Neben der Sedimentation der synthetisierten Fasern auf den Zellen und dem Substrat ist es offensichtlich, dass sowohl gerade als auch gekrümmte Fasern von den NR8383-Zellen aufgenommen wurden (**Abb. 27**). Trotz gründlichen Waschens nach der Inkubation waren viele Fasern immer noch an der Oberfläche der Zellen und des Substrats adsorbiert.

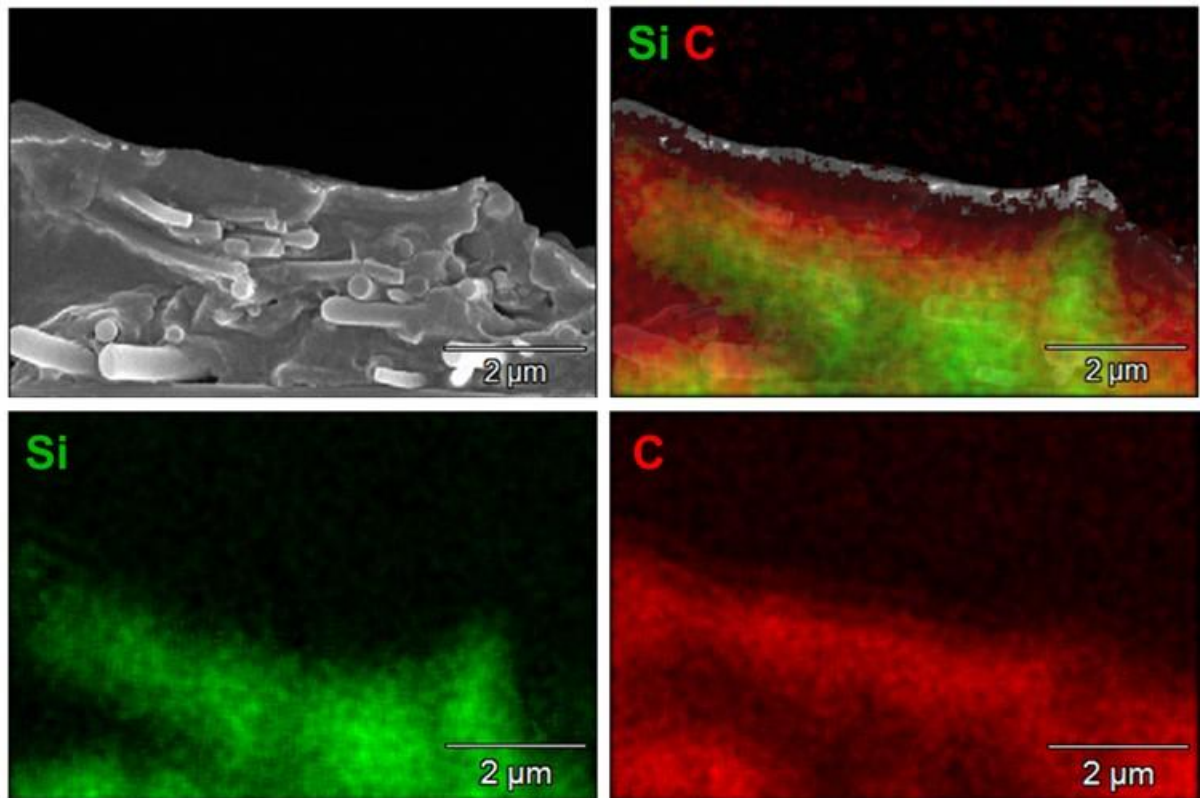


**Abb. 27:** REM-Aufnahmen der mit gerade und dickeren (A-D) und lockigen Silica-Fasern (E- H) inkubierten NR8383-Zellen. Die Zellen wurden 16 h mit den vier verschiedenen Partikel-Konzentrationen  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$  (A/E),  $24 \mu\text{g cm}^{-2}$  (B/F),  $48 \mu\text{g cm}^{-2}$  (C/G) und  $96 \mu\text{g cm}^{-2}$  (D/H) in Medium inkubiert.

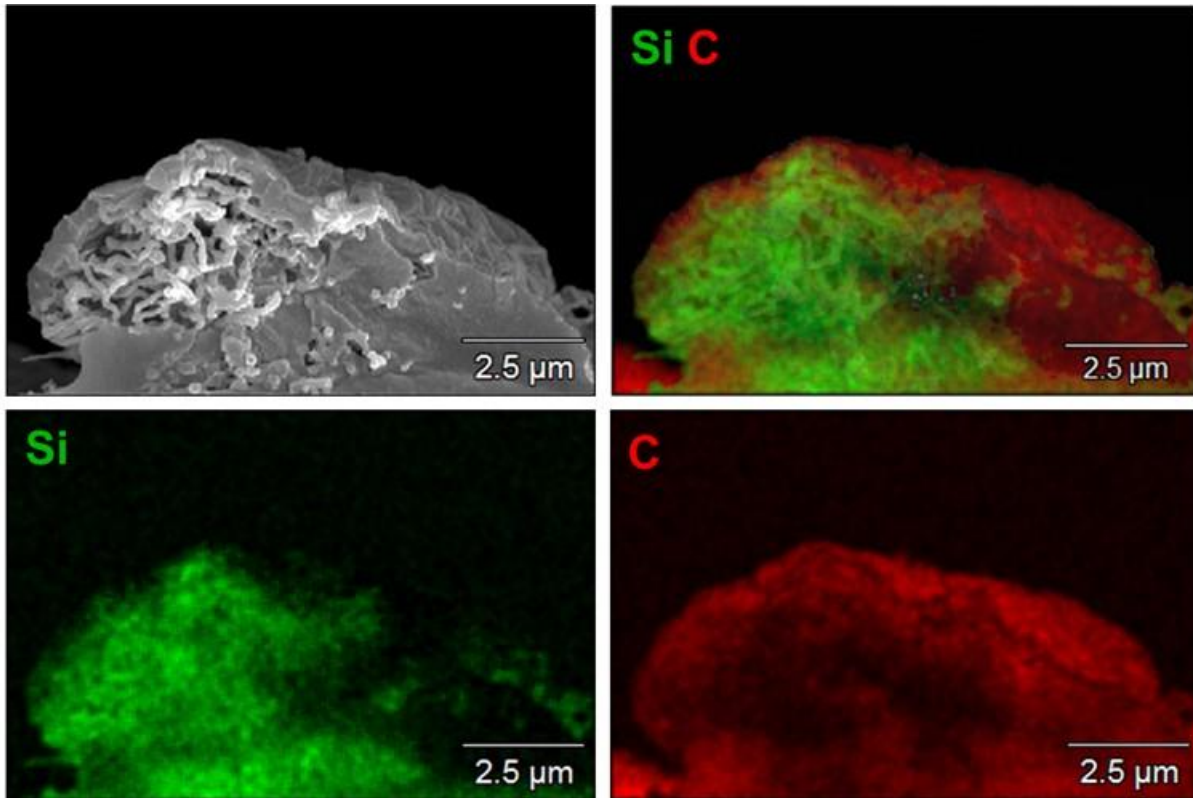
Die effiziente Aufnahme der Fasern wurde auch durch Rasterelektronenmikroskopie in Kombination mit EDX von NR8383-Zellen nach Gefrierbruch gezeigt, was einen Einblick in die Zellen ermöglichte (Abb. 28 bis 30).



**Abb. 28:** Repräsentative REM-Bilder von Silica-Fasern innerhalb von NR8383-Alveolarmakrophagen nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Partikel-Konzentrationen von  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$ . REM-Aufnahmen der mit gerade und dickeren (A) und lockigen Silica-Fasern (B) inkubierten NR8383-Zellen.



**Abb. 29:** Repräsentative EDX-Mapping von Silica-Fasern (gerade und dick) innerhalb von NR8383-Alveolarmakrophagen nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei einer Partikel-Konzentrationen von  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$ .

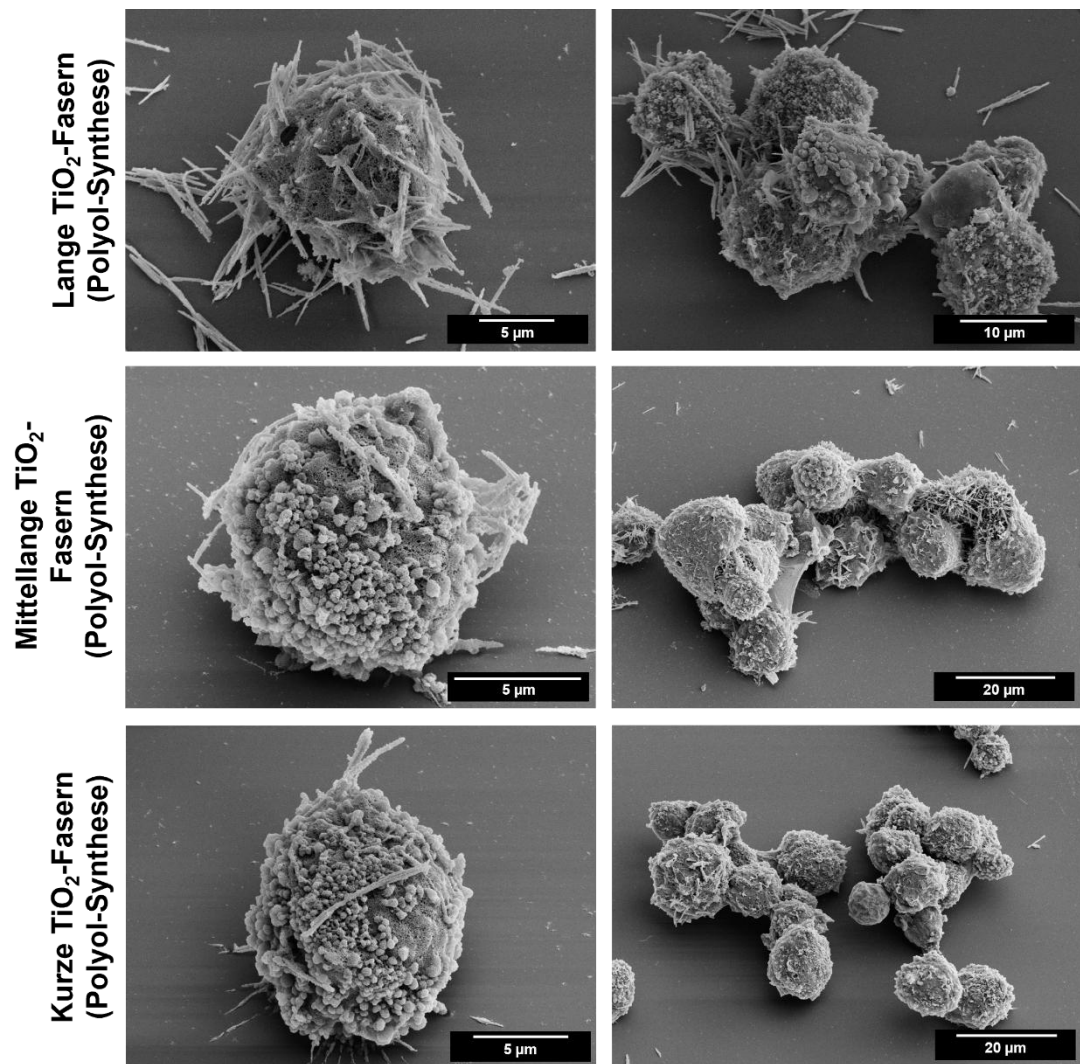


**Abb. 30:** Repräsentative EDX-Mapping von Silica-Fasern (lockigen) innerhalb von NR8383-Alveolarmakrophagen nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei einer Partikel-Konzentrationen von  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$ .

Die Zellmembran beider Arten von Makrophagen wurde durch die Fasern deutlich beschädigt, wie durch hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie gezeigt wurde. Die Fasern wurden nicht vollständig von den Makrophagen umschlossen und drangen teilweise in die Zellwand ein.

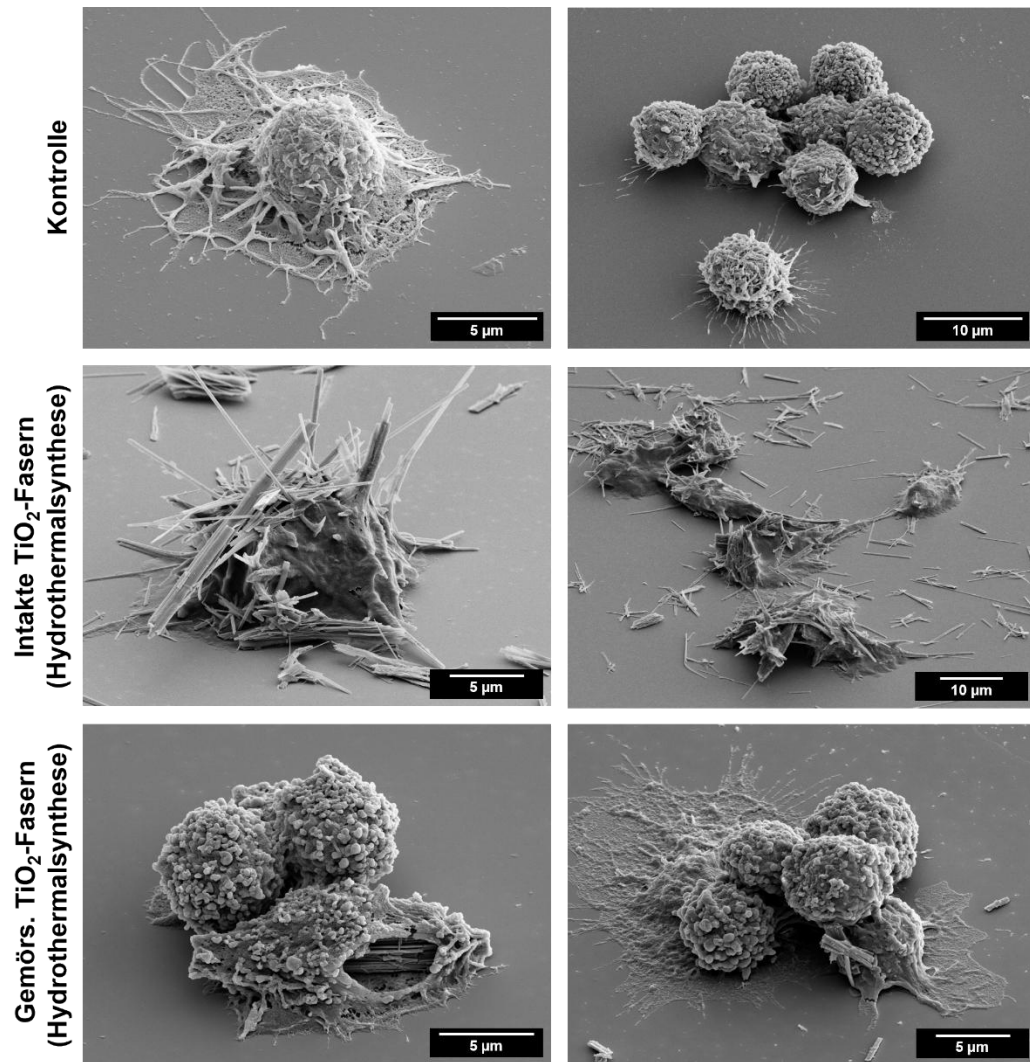
#### 4.6.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM) von Titandioxid-Fasern und Krokydolith-Asbestfasern

Die Wechselwirkung von Titandioxid- und Krokydolith-Asbestfasern mit NR8383-Zellen wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Neben der Sedimentation der synthetisierten und natürlichen Fasern auf den Zellen und dem Substrat ist es offensichtlich, dass alle synthetisierten Fasern zu einem Großteil von den NR8383-Zellen aufgenommen wurden (**Abb. 31 bis 35**). Die REM-Aufnahmen zeigten auch, dass die Membran der mit den langen Fasern der Polyol-Synthese (**Abb. 31**), der intakten Titandioxid-Fasern (**Abb. 32,33 und 34**) und der Krokydolith-Asbestfasern (**Abb.35**) inkubierten Zellen deutlich beschädigt wurden und die Fasern teilweise nicht vollständig von den Zellen umschlossen werden konnten.



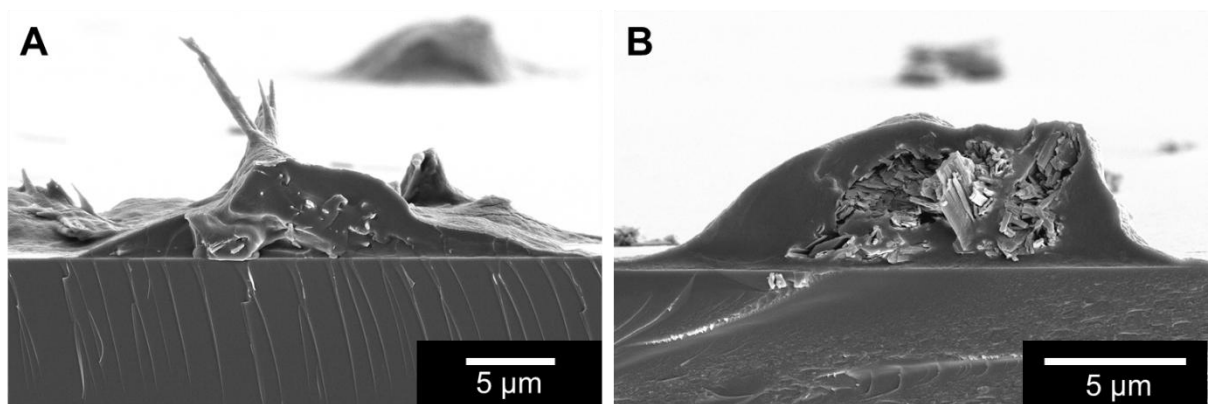
**Abb. 31:** Repräsentative REM-Aufnahmen der NR8383-Alveolarmakrophagen, die 24 Stunden mit 12 µg cm<sup>-2</sup> der langen, mittellangen und kurzen Titandioxid-Fasern (Polyol-Synthese) inkubiert wurden.





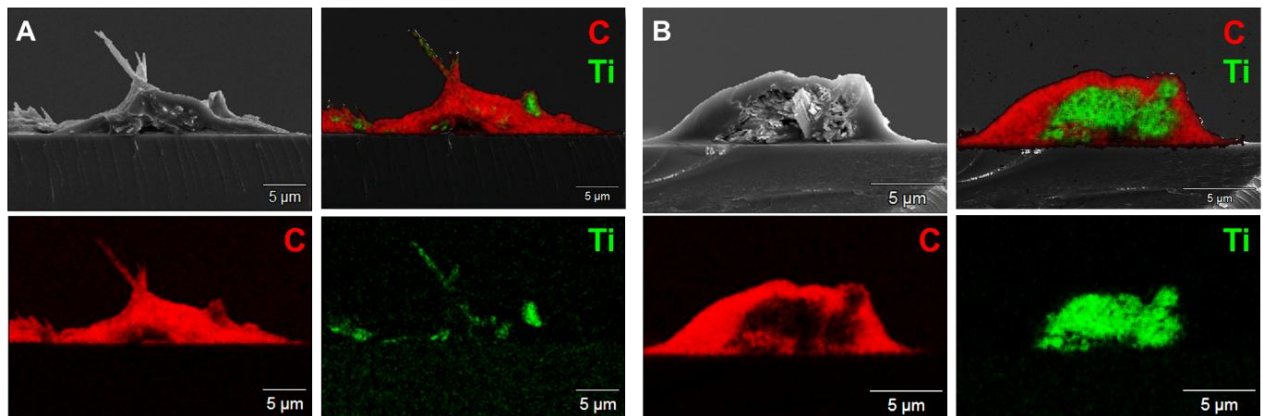
**Abb. 32:** Repräsentative REM-Bilder der NR8383-Alveolarmakrophagen, die 24 Stunden mit  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$  der intakten und gemörserten Titandioxid-Fasern (Hydrothermalsynthese) inkubiert wurden.

Die effiziente Aufnahme der Fasern wurde auch durch Rasterelektronenmikroskopie in Kombination mit EDX von NR8383-Alveolarmakrophagen nach Gefrierbruch gezeigt, was einen Einblick in die Zellen ermöglichte (**Abb. 33 und 34**).

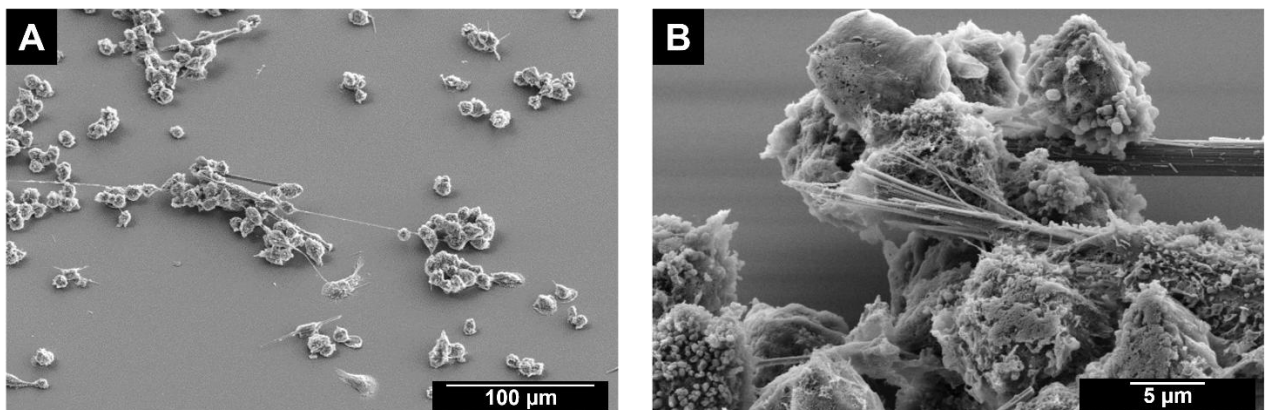


**Abb. 33:** Repräsentative REM-Bilder von Titandioxid-Fasern (Hydrothermalsynthese) innerhalb von gefriergebrochenen NR8383-Alveolarmakrophagen nach einer Inkubationszeit von 24 h bei einer

Partikelkonzentrationen von  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$ . REM-Aufnahmen der mit intakten (A) und gemörserten Titandioxid-Fasern (B) inkubierten NR8383-Zellen.



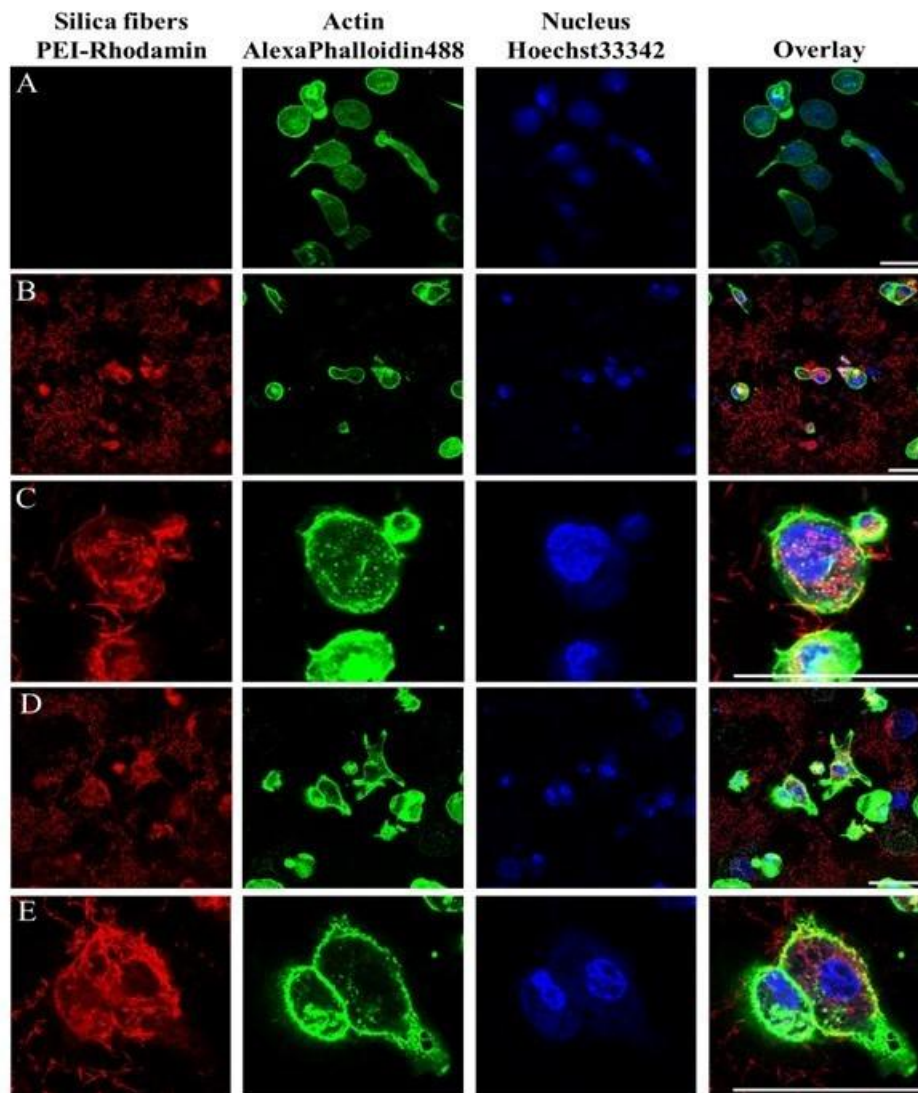
**Abb. 34:** Repräsentatives EDX-Mapping von gefriergebrochenen NR8383-Alveolarmakrophagen, inkubiert mit intakten (A) und gemörserten (B) Titandioxid-Fasern (Hydrothermalsynthese) nach 24-stündiger Inkubation bei einer Partikelkonzentration von  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Titan (Fasern): grün. Kohlenstoff (Zellbestandteile): rot.



**Abb. 35:** Repräsentative REM-Bilder der NR8383-Alveolarmakrophagen, die 24 Stunden mit  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$  der Krokydolith-Asbestfasern inkubiert wurden.

#### 4.6.3. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) von Silica-Fasern

Die CLSM wurde genutzt, um die Zellaufnahme von fluoreszent-markierten Silica-Fasern darzustellen. Im roten Kanal zeigt sich, dass beide Silica-Faser-Typen erfolgreich mit PEI-Rhodamin markiert werden konnte. Das Aktin-Skelett der Zellen wurde mit AlexaPhalloidin488 (grüner Kanal) gefärbt, der Nucleus mit Hoechst33342 (blauer Kanal). Im Overlay zeigt sich, dass sowohl die geraden und dünneren als auch die gelockten Fasern von den Zellen aufgenommen wurden (Abb. 36).

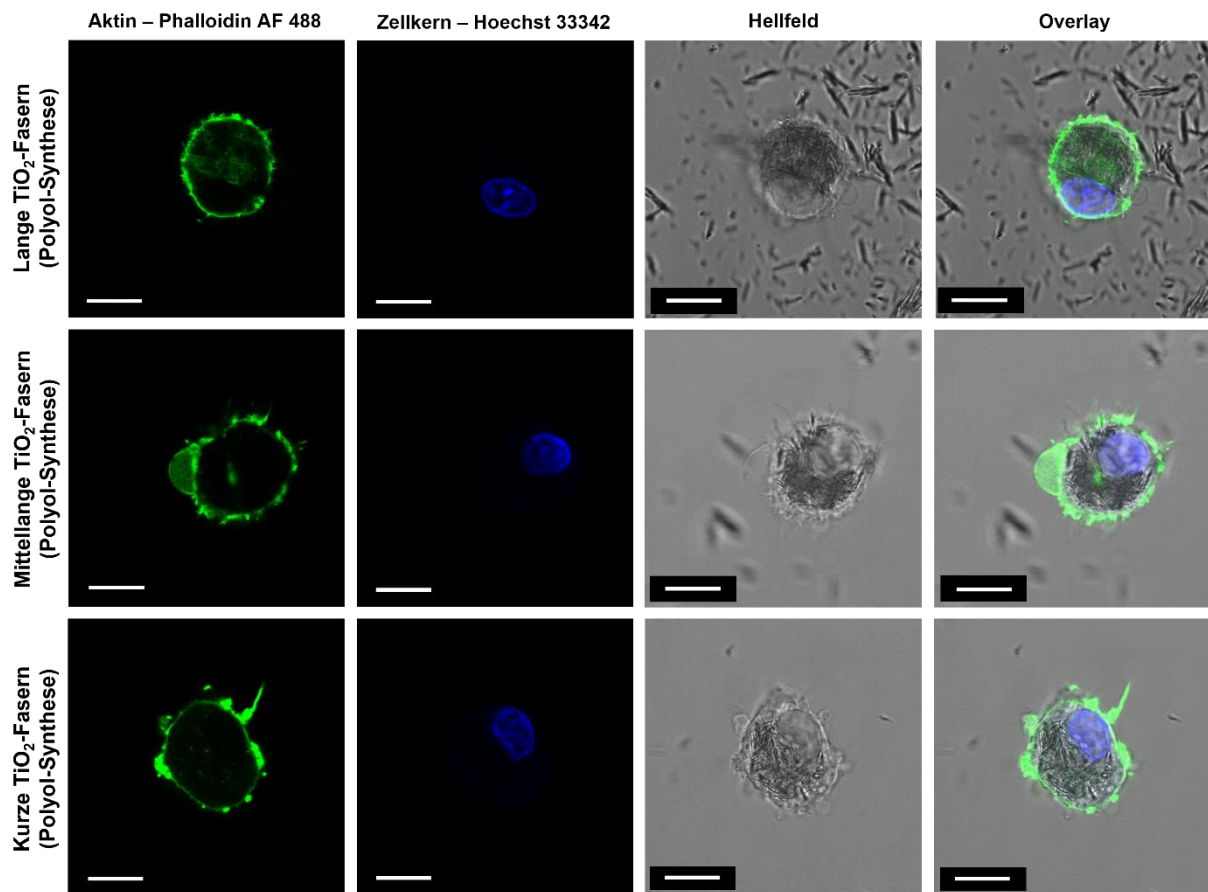


**Abb. 36:** CLSM-Aufnahmen der mit geraden und dünnen (B/C) und lockigen (D/E) Silica-Fasern inkubierten THP-1-Zellen. Die Silica-Fasern wurden zuvor mit PEI-Rhodamin fluorescent markiert. Die Zellen wurden 24 h mit einer Partikelkonzentration von  $48 \mu\text{g cm}^{-2}$  in Medium inkubiert. (A) zeigt die Kontrolle ohne die Inkubation mit Fasern. Der Messbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

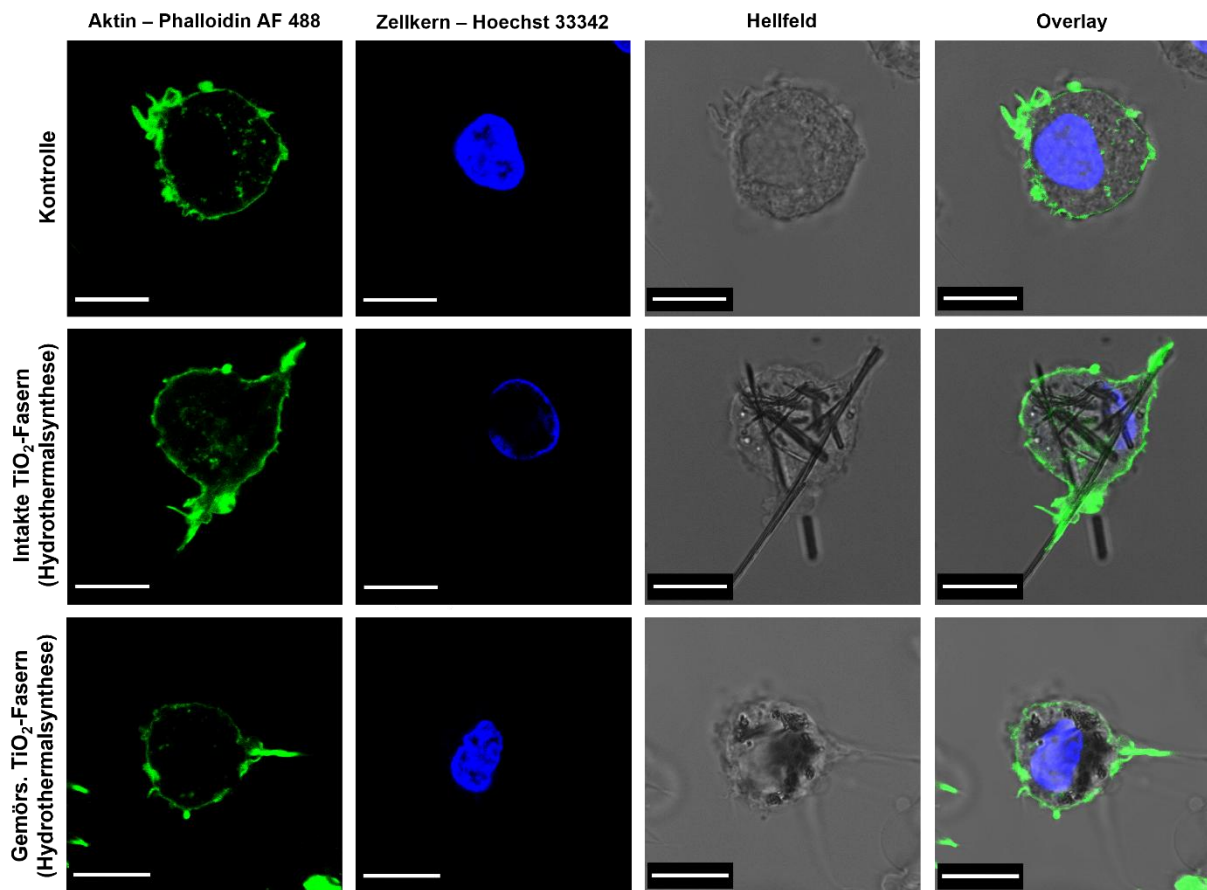
#### 4.6.4. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) von Titandioxid-Fasern und Krokydolith-Asbestfasern

Die CLSM wurde genutzt, um die Zellaufnahme der Titandioxid- und Krokydolith-Asbestfasern darzustellen. Eine Fluoreszenzmarkierung war für keine der Faserarten umsetzbar. Da die Größe der Fasern jedoch im Mikrometerbereich liegen, war es möglich sie mit Hilfe der Hellfeld-Mikroskopie darzustellen. Das Aktin-Skelett der NR8383-Zellen wurde mit AlexaFluor-488-Phalloidin (grüner Kanal) gefärbt, der Zellkern mit Hoechst33342 (blauer Kanal). Im Overlay sind alle Kanäle überlagert dargestellt.

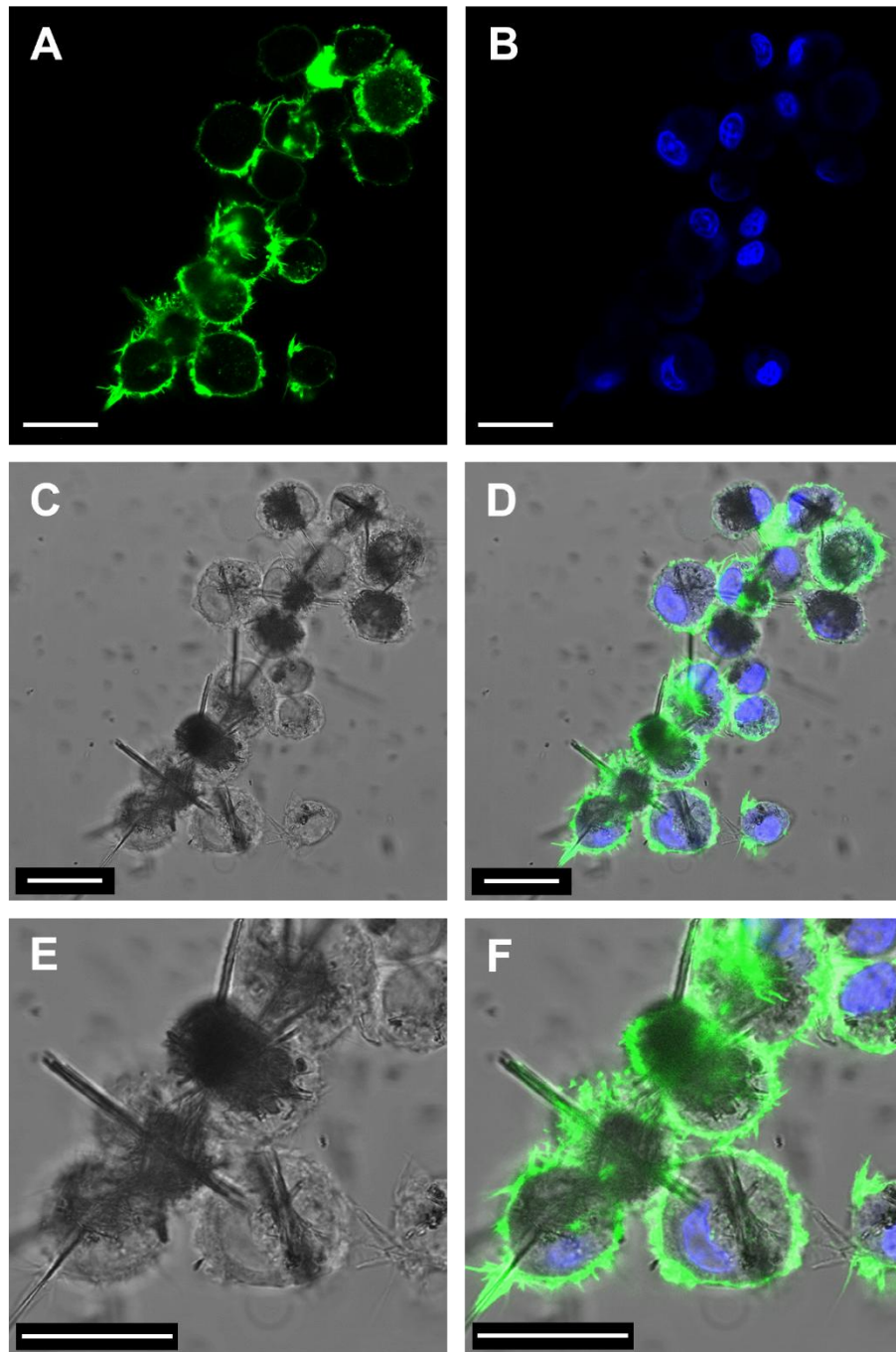




**Abb. 37:** CLSM-Aufnahmen der mit langen, mittellangen und kurzen Titandioxid-Fasern inkubierten NR8383-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden und die Partikelkonzentration  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Der Maßstab beträgt  $10 \mu\text{m}$ .



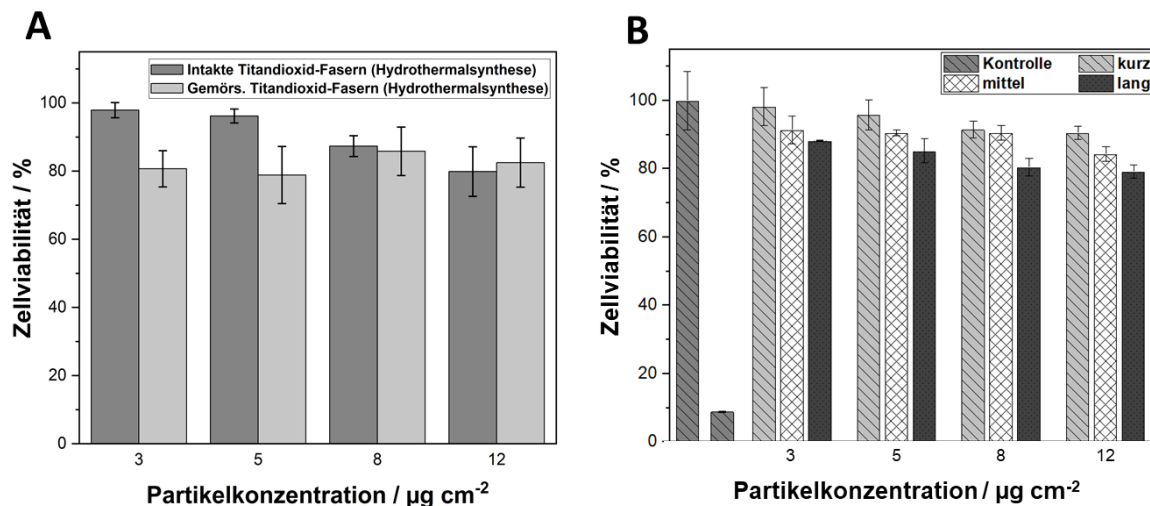
**Abb. 38:** CLSM-Aufnahmen der mit intakten und gemörsterten Titandioxid-Fasern inkubierten NR8383-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden und die Partikelkonzentration  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Der Maßstab beträgt  $10 \mu\text{m}$ .



**Abb. 39:** CLSM-Aufnahmen von Krokydolith-Asbestfasern durch NR8383-Zellen, die 24 Stunden lang mit  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$  inkubiert wurden. (A) Aktin-Färbung mit Phalloidin AF 488. (B) Zellkernfärbung mit Hoechst 33342. (C) Hellfeld-Aufnahme. (D) Überlagerung von A-C. Nahaufnahme mit 2x-Zoom (E-F). Der Maßstab beträgt  $20 \mu\text{m}$ .

#### 4.6.5. MTT-Test

Die intakten und gemahlene Titandioxid-Fasern waren für NR8383-Zellen bis zu  $12 \mu\text{g cm}^{-2}$  nicht toxisch, wie die MTT-Tests zeigten (**Abb. 40**).

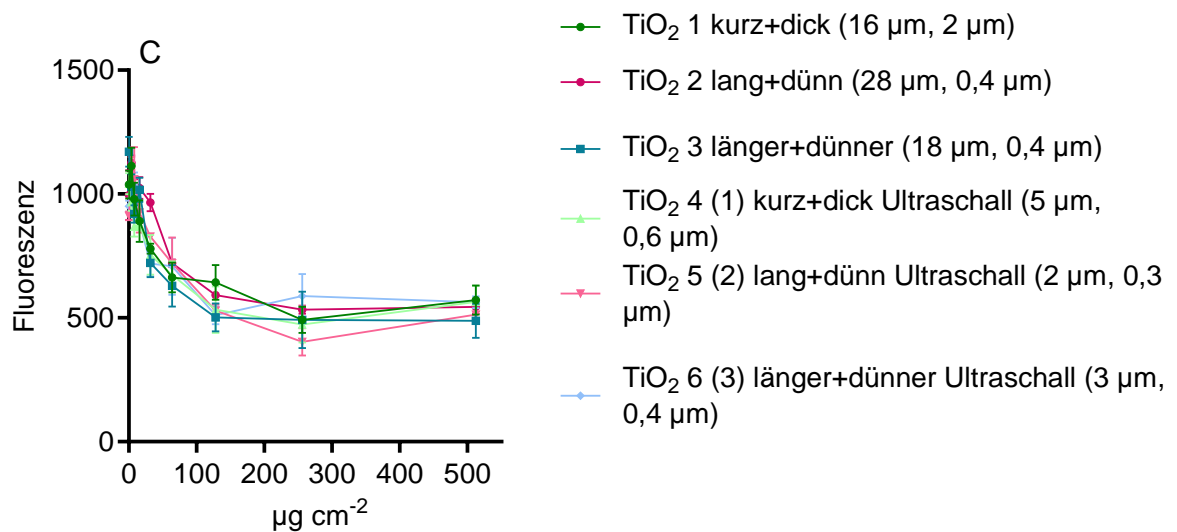
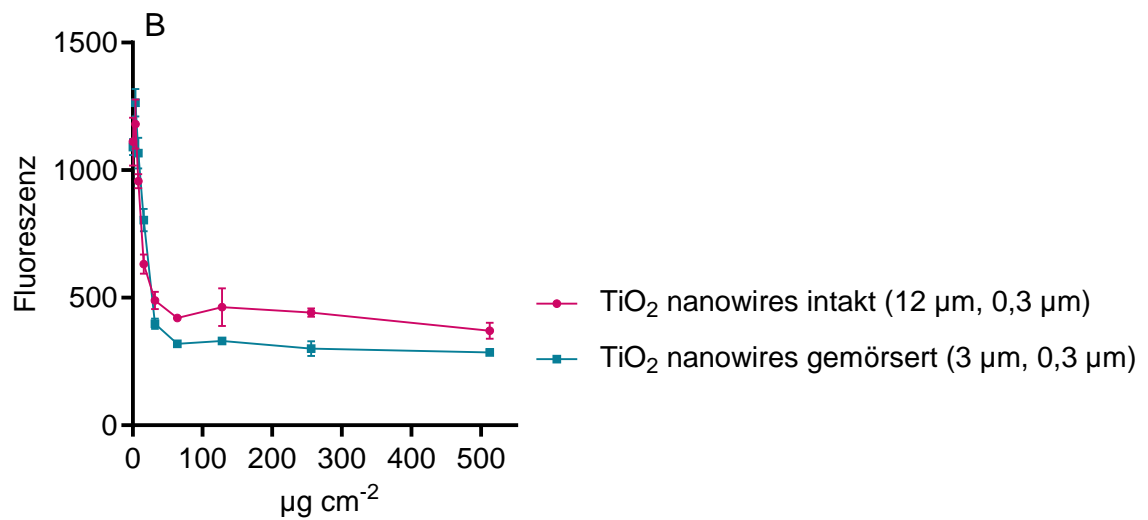
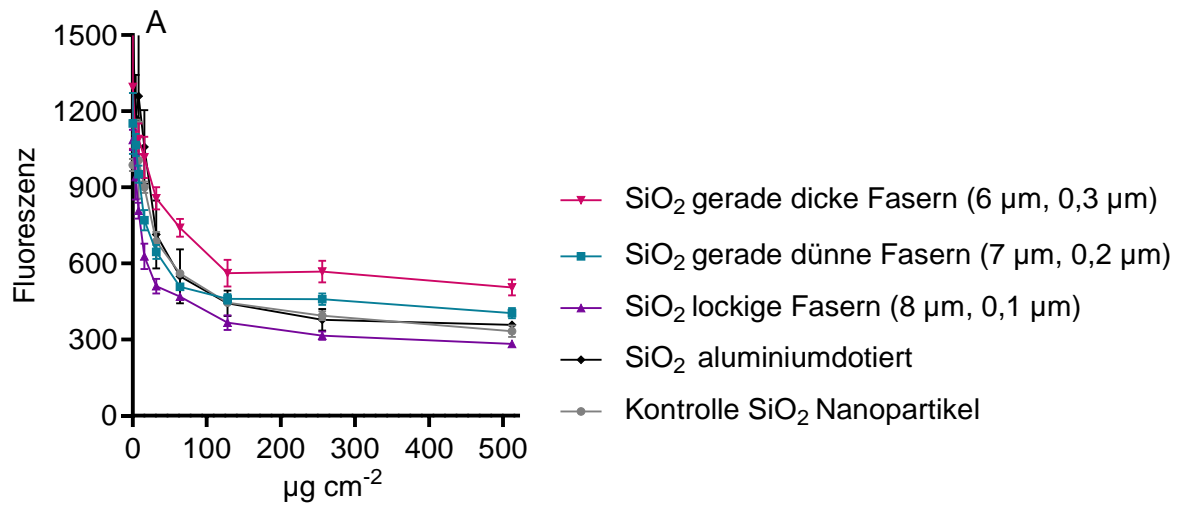


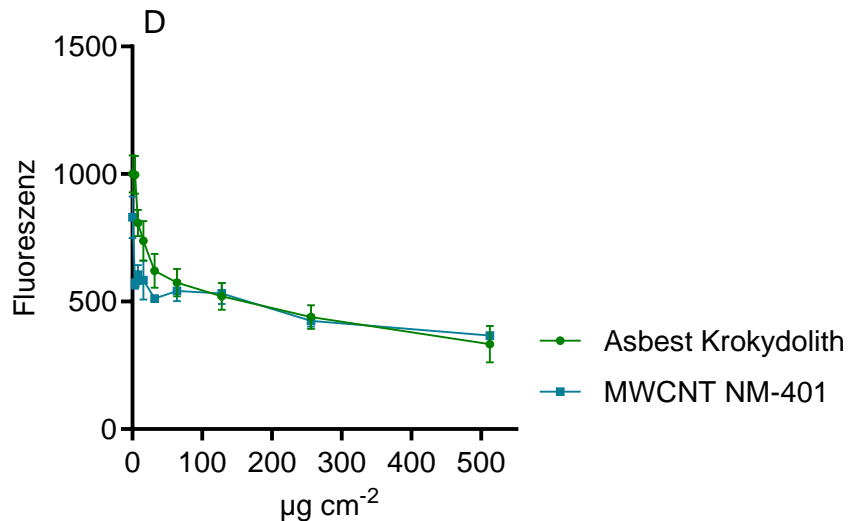
**Abb. 40:** MTT-Test nach 24-stündiger Inkubation von NR8383-Zellen mit (A) intakten und gemörserten Titandioxid-Fasern (Hydrothermalsynthese) und (B) kurzen, mittellangen und langen Titandioxid-Fasern, die mittels Polyol-Synthese hergestellt wurden. Die Daten wurden auf unbehandelte Zellen (100 %) normalisiert und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $N=3$ ).

## 4.7. Zellbiologische Untersuchungen von Silica- und Titandioxid-Fasern (AlamarBlue®-/PICMA-Test)

### 4.7.1. AlamarBlue®-Assay

Die Bestimmung der Zelltoxizität wurde mit dem AlamarBlue-Test bislang an unterschiedlichen Silica- und Titandioxid-Fasern aus unterschiedlichen Synthesen durchgeführt, sowie mit den Kontrollmaterialien mit bekannter krebserzeugender Wirkung, nämlich dem tierexperimentellen Kanzerogen "Multiwalled Carbon Nanotube" (MWCNT) NM401 und dem humankanzerogenen Krokydolith-Asbest. **Abb. 41 A-D** zeigen die vollständigen Versuchsreihen mit jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die stärkste Zelltoxizität der Silica-Fasern zeigten die "lockigen" Silica-Fasern, die die längsten und dünnsten aller bislang synthetisierten Silica-Fasern darstellen. Die Beeinträchtigung der Zellvitalität der synthetisierten Silica-Fasern entspricht in etwa dem Effekt von granulären biobeständigen Partikeln wie Silica-Nanopartikel, die als Kontrolle mitgeführt wurden. Auch die deutlich längeren Titandioxid-Fasern wiesen eine ähnlich geringe Zelltoxizität auf, insbesondere im Vergleich zu MWCNT NM401 und Krokydolith-Asbest. Die stärkste Zelltoxizität der synthetisierten Titandioxid-Fasern wiesen Titandioxid-"nanowires" auf; auch diese allerdings deutlich schwächer als MWCNT NM401 und Krokydolith-Asbest.





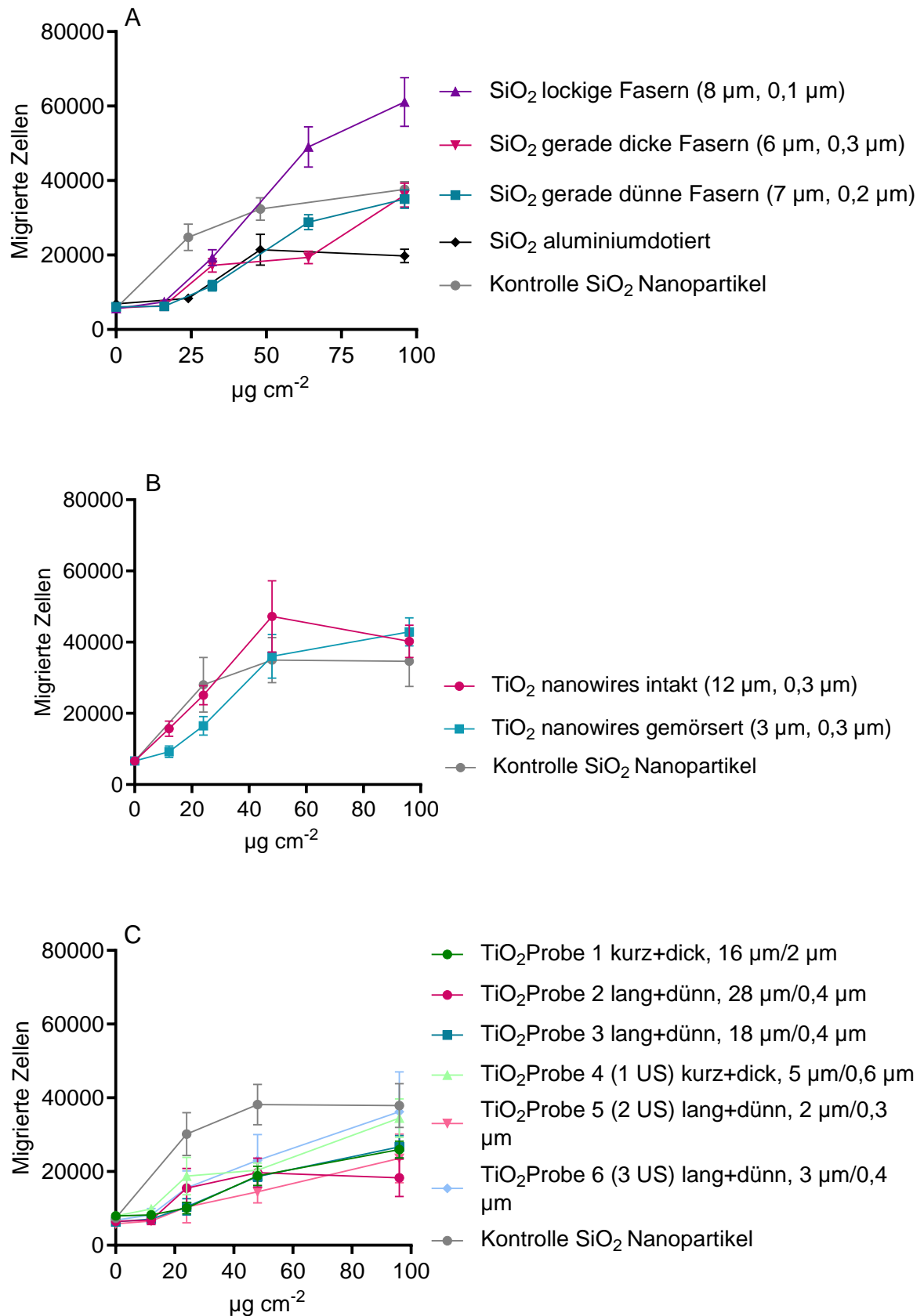
**Abb. 41 A-D:** Zelltoxizität von synthetisierten Fasern unterschiedlicher Länge und Dicke bestimmt mit dem AlamarBlue®-Assay. Für die Testung der Silica-Fasern wurden mehrere Chargen gleicher Morphologie zusammengefasst: gerade dünne Fasern (Chargen 34, 41, 42+43, 58+59), gerade dicke Fasern (Chargen 1, 37), lockige Fasern (Chargen 2, 36). Die Längen der Silica-Fasern betrugen 6-8  $\mu\text{m}$ , die untersuchten Titandioxid-Fasern zeigten Längen von 2-28  $\mu\text{m}$ . Es handelt sich um jeweils drei zeitlich unabhängig durchgeführte Experimente (N=3). Die Fluoreszenz ist gegen die Menge an Fasern ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) aufgetragen, denen die Makrophagen ausgesetzt waren. Der AlamarBlue®-Assay nutzt die Energieladung der Zellen als Schätzung für die Zelltoxizität. Zelltoxizität führt zu einer Abnahme der Energieladung der Zellen. Vitale Zellen reduzieren den Fluoreszenzfarbstoff Resorufin und bewirken so dessen Fluoreszenz. Eine Abnahme dieser Reduktion, bzw. eine Abnahme der Fluoreszenz (sichtbar als Abfall der Kurven) zeigt einen Verlust von Zellvitalität. Die Zelltoxizität der synthetisierten Silica-Fasern entspricht in etwa derer granulärer biobeständiger Partikel wie beispielsweise Silica-Fasern (siehe unten  $\text{SiO}_2$  Kontrolle Nanopartikel).

#### 4.7.2. PICMA

Die Partikel-induzierte Chemotaxis (hier bestimmt mit dem "Particle Induced Chemotaxis Assay"; PICMA) dient als Schätzer entzündlicher Reaktionen. Entzündungsreaktionen weisen Akkumulationen von Entzündungszellen (neutrophilen Granulozyten) auf, die von belasteten Makrophagen zum Ort der Entzündung gelockt werden. **Abb. 42 A-C** zeigen Versuchsreihen mit jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

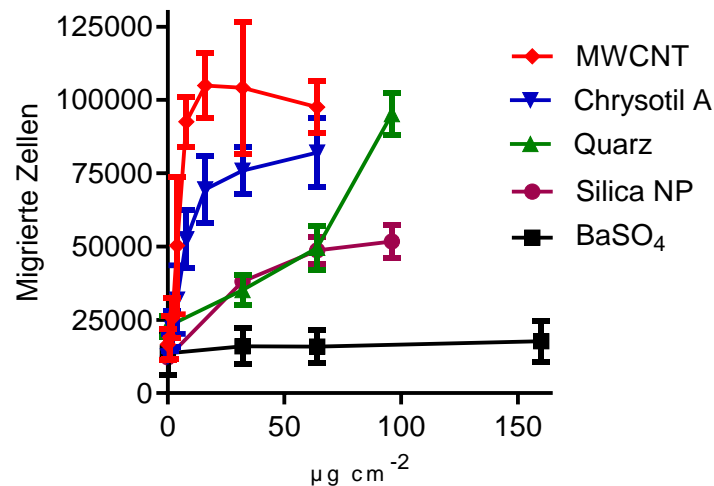
Den deutlich stärksten Anstieg der Induktion migrierter differenzierter HL-60 Zellen (migrierte Zellen) zeigten die "lockigen" Silica-Fasern, die die längsten und dünnsten aller bislang synthetisierten Silica-Fasern sind. Diese Chargen wiesen auch die stärkste Zelltoxizität auf (siehe oben, **Abb. 41**). Die Fehlerbalken dieser Proben überlappen nicht mit denen der anderen Proben, so dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um eine zufällige Abweichung handelt. Die synthetisierten Titandioxid-Fasern bewirkten - unabhängig von ihrem Durchmesser und ihrer teils beträchtlichen Länge von bis zu 28  $\mu\text{m}$  - ebenfalls geringe Induktion von Zellmigration im Vergleich zu historischen Kontrollen. Bei deutlich geringeren Konzentrationen (bis 20  $\mu\text{g/cm}^2$ ) bewirkte das hoch-toxische "MWCNT NM-401" und Asbestfasern (Chrysotil B) einen sehr steilen Anstieg, während granuläres Silica und Quarz deutliche schwächere Wirkungen aufweisen und das inerte Bariumsulfat keine (siehe zum Vergleich **Abb. 43**: historische Kontrollen). Es sind jeweils Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen gezeigt.





**Abb. 42 A-C:** PICMA mit den hergestellten Silica- und Titandioxid-Fasern. Silica-Nanopartikel dienen als Kontrolle, zur besseren Vergleichbarkeit. Für die Testung der Silica-Fasern wurden mehrere Chargen gleicher Morphologie zusammengefasst: gerade dünne Fasern (Chargen 34, 41, 42+43, 58+59), gerade dicke Fasern (Chargen 1, 37), lockige Fasern (Chargen 2, 36). Die Längen der Silica-Fasern betrugen 6-8  $\mu\text{m}$ , die untersuchten Titandioxid-Fasern

zeigten Längen von 2-28  $\mu\text{m}$ . Es handelt sich um jeweils drei zeitlich unabhängig voneinander durchgeführte Experimente ( $N=3$ ). Die Anzahl migrierter Zellen ist gegen die Menge an Fasern ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) aufgetragen, denen die Makrophagen ausgesetzt sind. Die induzierte Chemotaxis entspricht in etwa derer granulärer biobeständiger Partikel wie beispielsweise Silica-Fasern (Kontrolle).



**Abb. 43:** Historische Kontrollen (*Multiwalled Carbon Nanotubes*; MWCNT), Chrysotil B, Quarz, Silica-Nanopartikel und Bariumsulfat.

#### 4.7.3. Genexpressionsanalysen

Für die Genexpressionsanalyse wurde die RNA aus NR8383-Zellen, die gegen gerade, dicke und lockige  $\text{SiO}_2$  Fasern in jeweils zwei Konzentrationen ( $16 \mu\text{g cm}^{-2}$  und  $32 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und gegen intakte, gemörserte und lange und dünne  $\text{TiO}_2$  Fasern in jeweils zwei Konzentrationen ( $24 \mu\text{g cm}^{-2}$  und  $48 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) exponiert wurden, erfolgreich isoliert. Als Kontrolle wurde jeweils die RNA aus nicht-exponierten NR8383-Zellen isoliert. Die Ergebnisse der RNA-Isolation sind in **Tab. 9** dargestellt.

**Tab. 9:** RNA-Konzentration und RNA Integrity Number (RIN) der isolierten RNA aus exponierten und nicht-exponierten (Kontrolle) NR8383-Zellen.

Probe	Exposition	RNA Konzentration (ng/ $\mu$ l)	RIN
Kontrolle (SiO <sub>2</sub> )	-	2088,19	9,8
SiO <sub>2</sub> gerade und dicke Fasern	16 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	591,44	9,4
	32 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	370,58	9,7
SiO <sub>2</sub> gelockte Fasern	16 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	359,93	9,6
	32 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	315,68	9,9
Kontrolle (TiO <sub>2</sub> )	-	951,04	10,0
TiO <sub>2</sub> intakte Fasern	24 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	306,4	9,0
	48 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	168,77	9,6
TiO <sub>2</sub> gemörserte Fasern	24 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	255,78	10,0
	48 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	226,67	10,0
TiO <sub>2</sub> lange und dünne Fasern	24 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	416,95	10,0
	48 $\mu$ g cm <sup>-2</sup>	438,58	10,0

Die RNA-Ausbeute war bei den exponierten Zellen aufgrund der Zelltoxizität zwar erwartungsgemäß niedriger als bei der nicht-exponierten Kontrollen, aber dennoch war die gewonnene RNA-Menge durchgehend ausreichend. Die Qualität der isolierten RNA war ausgesprochen gut, dies zeigte sich anhand der hohen RNA Integrity Number (RIN). Die RIN ist ein Maß für die Qualität der RNA und reicht von 1 (vollständig degradiert) bis 10 (vollständig intakt). Somit war zusammenfassend betrachtet die isolierte RNA von guter Qualität und Quantität und demzufolge für die anschließende Genexpressionsanalyse vollumfänglich geeignet.

Die Genexpressionsanalyse wurde mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführt, bei der parallel 84 Chemokine und Zytokine bestimmt wurden. Dabei zeigte sich, dass ein Teil der Gene eine statistisch signifikante Veränderung der Expression nach Exposition gegen die SiO<sub>2</sub> als auch TiO<sub>2</sub>-Fasern im Vergleich zu der nicht-exponierten Kontrolle aufwiesen. Eine Ausnahme stellen dabei die langen und dünnen TiO<sub>2</sub>-Fasern dar, die zu kaum einer Veränderung der Genexpression führen. Für insgesamt 26 Gene zeigte sich eine veränderte Expression nach Exposition sowohl gegen SiO<sub>2</sub> als auch gegen TiO<sub>2</sub>. Die Ergebnisse für die veränderten Chemokine und Zytokine infolge der Exposition sind in **Tab. 10** dargestellt.

**Tab. 10:** Statistisch signifikante Hoch- (grün) und Runterregulation (rot) von Chemokinen und Zytokinen nach Exposition von NR8383-Zellen gegen SiO<sub>2</sub> und TiO<sub>2</sub> Fasern unter Angabe des Fold change. Ein Fold change von <0,5 (Herunterregulation) bzw. >2,0 (Hochregulation) ist als statistisch signifikant definiert.

Gen	SiO <sub>2</sub>						TiO <sub>2</sub>			
	gerade und dicke Fasern		gelockte Fasern		intakte Fasern		gemörserte Fasern		lange und dünne Fasern	
	(16 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(32 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(16 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(32 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(24 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(48 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(24 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(48 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(24 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>	(48 $\mu$ g cm <sup>-2</sup> ) <sup>2)</sup>
<i>Ccl12</i>	0,38	0,51	1,12	2,47	0,38	0,85	0,26	0,34	0,84	0,72
<i>Ccl17</i>	1,51	1,27	1,65	2,13	2,12	2,72	1,66	1,90	0,86	0,86
<i>Ccl2</i>	2,25	105,9	233,81	363,54	5,80	12,76	2,19	4,98	1,13	1,18
<i>Ccl22</i>	2,86	4,00	2,88	4,37	2,88	1,60	2,19	2,81	0,64	0,76

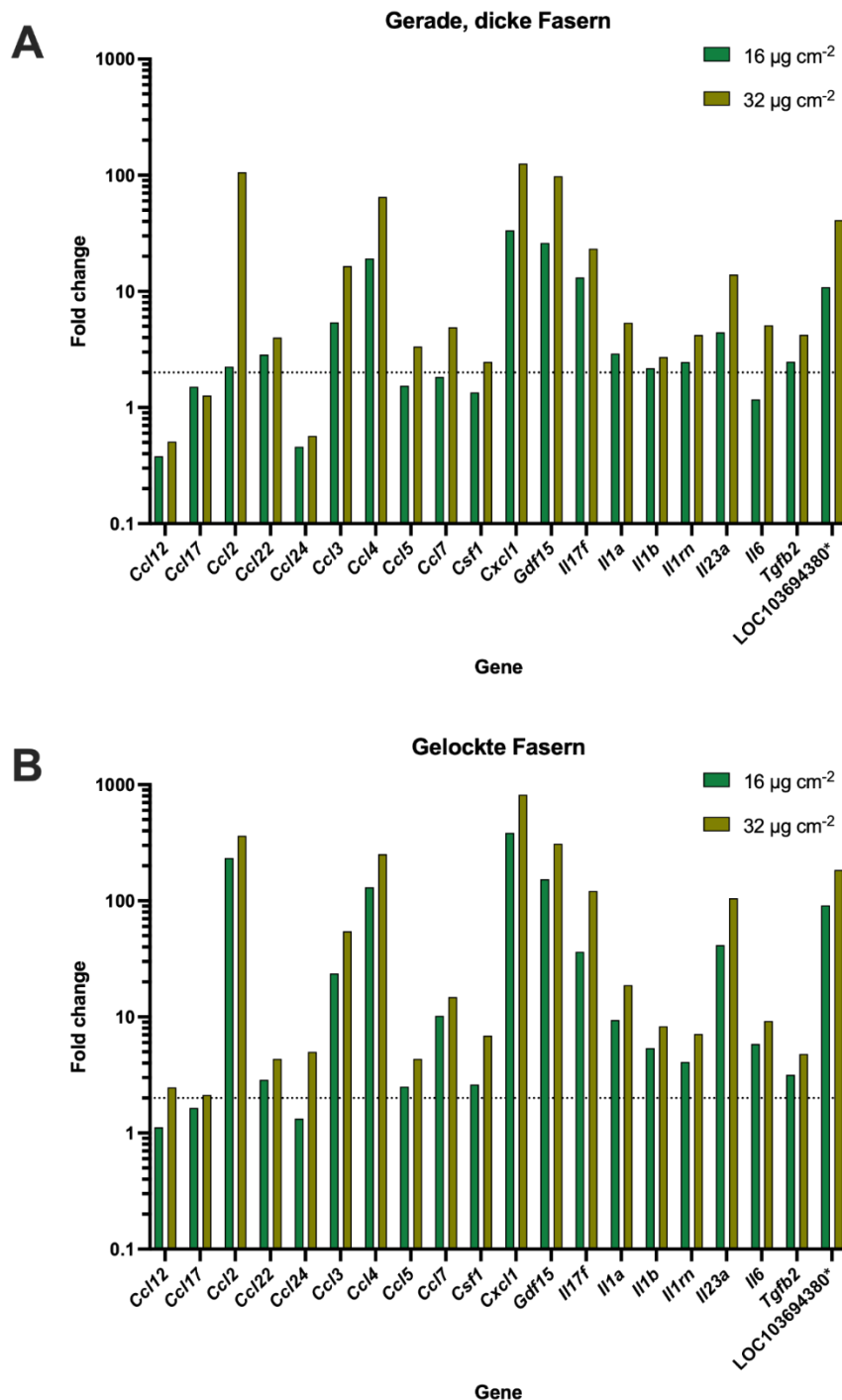
<i>Ccl24</i>	0,46	0,57	1,33	5,01	0,36	-	-	-	-	0,62
<i>Ccl3</i>	5,41	16,48	23,75	54,71	10,32	20,18	3,14	8,24	0,58	1,01
<i>Ccl4</i>	19,19	65,24	130,9	251,8	24,95	48,97	6,50	4,97	1,04	1,50
<i>Ccl5</i>	1,54	3,35	2,51	4,36	3,10	5,14	1,93	3,30	1,10	0,92
<i>Ccl7</i>	1,84	4,91	10,21	14,84	3,08	3,82	1,69	2,01	1,42	1,43
<i>Cd40lg</i>	0,36	0,28	0,35	0,35	-	-	0,30	-	0,44	0,42
<i>Cd70</i>	-	-	-	-	5,48	3,87	2,84	3,58	-	1,83
<i>Csf1</i>	1,35	2,47	2,62	6,88	-	-	-	-	-	-
<i>Ctf1</i>	0,54	0,43	0,43	0,39	-	-	-	-	-	-
<i>Cxcl1</i>	33,61	125,9	385,25	820,07	-	-	-	-	-	-
<i>Cxcl10</i>	0,61	0,45	0,73	0,68	0,38	0,22	0,46	0,40	0,53	0,61
<i>Cxcl16</i>	1,00	0,94	0,94	0,78	0,60	0,24	0,52	0,48	0,65	0,61
<i>Gdf15</i>	26,18	97,98	153,52	311,46	98,12	198,06	27,73	81,92	1,81	3,00
<i>Gpi</i>	0,9	0,75	0,71	0,53	0,61	0,39	0,67	0,63	0,83	0,80
<i>Il15</i>	0,62	0,36	0,43	0,18	0,30	0,24	0,53	0,30	0,84	0,79
<i>Il16</i>	0,98	0,22	0,22	-	0,12	-	0,33	0,09	1,71	0,68
<i>Il17f</i>	13,15	23,38	36,49	121,38	65,84	123,03	10,28	34,04	1,20	1,24
<i>Il1a</i>	2,91	5,36	9,42	18,75	4,97	6,14	1,66	1,98	0,62	0,83
<i>Il1b</i>	2,18	2,72	5,39	8,3	3,03	4,94	1,82	1,47	0,99	1,12
<i>Il1rn</i>	2,46	4,21	4,11	7,13	1,77	3,79	1,62	3,69	0,09	0,80
<i>Il23a</i>	4,44	13,95	41,65	105,32	5,88	13,46	1,75	5,53	1,01	1,57
<i>Il6</i>	1,18	5,1	5,86	9,23	-	-	-	-	-	-
<i>Il7</i>	0,94	0,59	0,52	0,27	0,68	0,37	0,78	0,78	0,82	0,87
LOC103694381	0,54	0,34	0,43	0,23	0,29	0,16	0,39	0,31	0,94	0,73
<i>Osm</i>	0,59	1,67	-	2,90	22,29	45,96	6,05	17,48	1,19	1,47
<i>Spp1</i>	1,46	2,37	1,82	3,89	2,38	2,08	1,30	1,86	0,79	1,13
<i>Thpol1</i>	0,85	0,79	0,71	0,59	0,86	0,47	0,63	0,76	0,61	0,54
<i>Tgfb2</i>	2,48	4,23	3,17	4,8	-	-	-	-	-	-
LOC103694380*	10,86	41,1	91,41	184,26	31,55	38,42	3,95	18,90	0,62	0,93
<i>Tnfsf10</i>	0,42	0,08	0,11	0,07	0,12	0,08	0,18	0,13	0,60	0,41

\*LOC103694380 ist bekannt als Tnfr

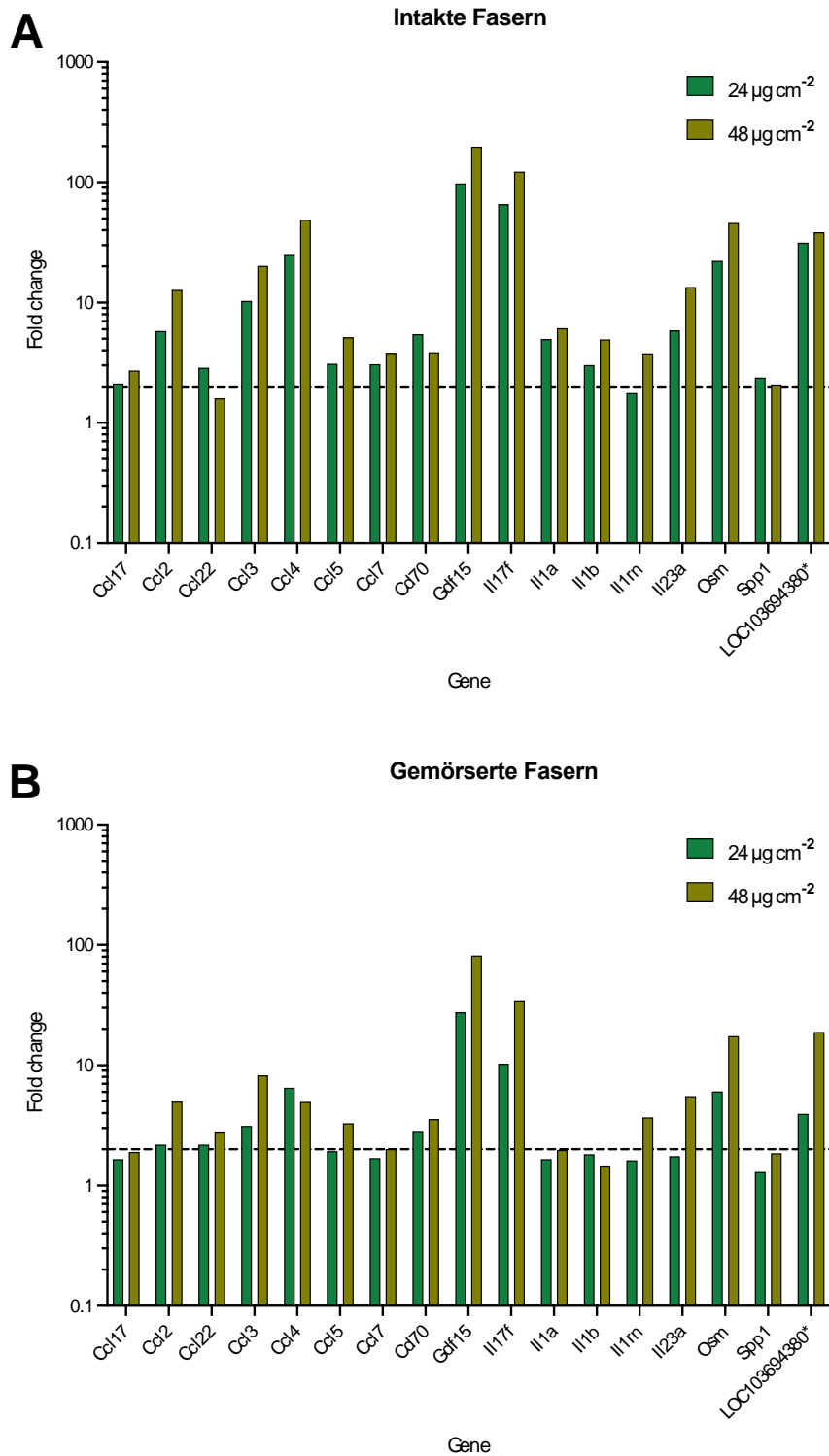
Insgesamt betrachtet zeigte sich für die Mehrzahl der veränderten Gene eine Hochregulation nach Exposition gegen die unterschiedlichen Fasern. Diese Induktion von Genen zeigte zudem nahezu durchgehend eine Dosis-Abhängigkeit. So war insgesamt betrachtet die Induktion nach SiO<sub>2</sub> Exposition bei der höheren Konzentration von

32  $\mu\text{g cm}^{-2}$  größer als bei der niedrigeren Konzentration von 16  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Dies zeigte sich sowohl bei der Exposition gegen gerade dicke  $\text{SiO}_2$  Fasern (**Abb. 44 A**) als auch gegen gelockte  $\text{SiO}_2$  Fasern (**Abb. 44 B**).

Gleiches gilt für die  $\text{TiO}_2$  Exposition, auch dabei zeigte sich eine stärkere Induktion der Chemokine und Zytokine nach Expositionen mit 48  $\mu\text{g cm}^{-2}$  im Vergleich zu 24  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , sowohl bei einer Exposition gegen intakte Fasern (Abb. 45A) als auch gegen gemörserte Fasern (Abb. 45B).



**Abb. 44:** Dosis-abhängige Änderung der Expression von induzierten Genen nach Exposition von NR8383-Zellen gegen gerade, dicke  $\text{SiO}_2$  Fasern (A) und gelockte  $\text{SiO}_2$  Fasern (B). Die gestrichelte Linie zeigt den statistisch signifikanten Fold change  $>2$  (\*LOC103694380 ist als *Tnfa* bekannt).



**Abb. 45:** Dosis-abhängige Änderung der Expression von induzierten Genen nach Exposition von NR8383-Zellen gegen intakte TiO<sub>2</sub> Fasern (A) und gemörserte TiO<sub>2</sub> Fasern (B). Die gestrichelte Linie zeigt den statistisch signifikanten Fold change >2 (\*LOC103694380 ist als *Tnfa* bekannt).



## 4.8. Bisherige Projektveröffentlichungen

Die Ergebnisse wurden auf drei arbeitsmedizinisch einschlägigen Tagungen vorgestellt:

- 90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Zusammenarbeit mit der ASTOX, APHAR und der AGAH, München, 13.-15.03.2024, G. Westphal, M. Breisch, M. Olejnik, K. Loza, O. Prymak, N. Rosenkranz, J. Bünger, C. Sengstock, M. Köller, M. Eppe, "Influence of particle size and -surface on toxicological and inflammatory effects in vitro"
- 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (DGAUM), München, 13.-16.03.2024, D. Weber, N. Bialas, G. Westphal, A. Brik, N. Rosenkranz, K. Szafranski, K. Loza, K. Kostka, A. Winter, J. Bünger, M. Eppe, G. Johnen, T. Brüning, "Proof of Concept: Analyse der Genexpression von Chemokinen und Zytokinen nach Exposition gegenüber synthetischen Mineralfasern zur Identifikation von Biomarkern der inflammatorischen Wirkung"
- 10th German Pharm-Tox Summit / 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Hannover, 25.-28.03.2025, N. Rosenkranz, N. Bialas, D.G. Weber, K. Kostka, G. Johnen, A. Winter, A. Brik, K. Loza, K. Szafranski, M. Eppe, G. Westphal, "Synthesis and biological effects in vitro of silica- and titanium dioxide fibers of different length, diameter and shape"

Ein Manuskript wurde in der Zeitschrift *Particle and Fibre Toxicology* (Impact Factor 10,0) publiziert:

- N. Bialas, N. Rosenkranz, D.G. Weber, K. Kostka, G. Johnen, A. Winter, A. Brik, K. Loza, K. Szafranski, T. Brüning, J. Bünger, G. Westphal, M. Eppe, "Synthetic silica fibers of different length, diameter and shape: synthesis and interaction with rat (NR8383) and human (THP-1) macrophages in vitro, including chemotaxis and gene expression profile", *Particle and Fibre Toxicology* 21 (2024) 23.

Derzeit wird an einem umfangreichen Manuskript gearbeitet, das die Ergebnisse zu den Titandioxid-Fasern und den Asbest-Fasern zusammenfasst. Hierzu werden gerade letzte Ergebnisse eingearbeitet.

## **5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen**

Hinsichtlich der bearbeiteten Forschungsthematik wurden unseres Wissens nach keine Schutzrechte angemeldet oder erteilt. Auf dem Gebiet der biologischen Wirkung von Fasern gibt es selbstverständlich Veröffentlichungen, wie dies auch nicht anders zu erwarten war. Bezüglich der Synthese künstlicher Mineralfasern sind uns keine relevanten neuen Publikationen bekannt, die unsere Forschungsergebnisse direkt berühren. Die Kombination von Synthese sowie zellbiologischer und inflammatorischer Wirkung ist unseres Wissens weiterhin durchaus einzigartig.

## **6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen**

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von langen Mikrofasern aus Silica und Titandioxid möglich ist. Eine Dotierung mit Fremdionen wie Aluminium oder Eisen gelang nicht, so dass keine synthetischen Asbestfasern erhalten werden konnten. Gleichwohl zeigten sich deutliche pro-inflammatorische Effekte der synthetisierten Fasern, die von Länge und Morphologie (z.B. gerade gegenüber gelockt) abhingen. Diese konnten mit bekannten inflammatorisch aktiven Stoffen (Asbest und Carbon Nanotubes) korreliert werden, was die Anwendbarkeit des PICMA-Tests zur in-vitro-Abschätzung einer subtoxischen Wirkung bestätigt. Insofern konnten die Projektziele in vollem Umfang erreicht werden, auch wenn das chemische System gewechselt wurde (Titandioxid statt Silikat). Letztlich ist die Fasermorphologie von größerer Bedeutung als die chemische Zusammensetzung, sofern es sich um unlösliche Fasern handelt. Es wird jedoch auch deutlich, dass die synthetisierten Fasern die Stärke der biologischen Wirkungen von Krokydolith-Asbestfasern nicht erreichen. Die vergleichende elektronenmikroskopische Analyse zeigt, dass Krokydolith-Asbest zu einer Membranschädigung führt, indem die aufgespleißten Faserenden die Membranen durchstechen. Eine solche nadelförmige Wirkung erzielen die synthetisierten Silica- und Titandioxidfasern nicht. Neben Länge und Dicke bzw. dem Verhältnis beider wirkt sich demnach der nadelförmige Charakter der Fasern deutlich aus.

## **7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan**

Es besteht kein Plan für die weitere Umsetzung und Verwertung (insbesondere wirtschaftlicher Natur). Allerdings werden die Forschungsergebnisse sowohl publiziert als auch auf wissenschaftlichen Tagungen präsentiert. Ganz wichtig ist für uns der direkte Kontakt zu regulatorischen Gremien, um die Erkenntnisse auch in den Bereich des Unfall- und Arbeitsschutzes sowie der Arbeitsmedizin zu tragen. Dies ist durch die Einbindung der Projektpartner vom IPA Bochum, die in zahlreichen derartigen Gremien und Ausschüssen tätig sind, in exzellenter Weise gewährleistet.