

## Toxische Wirkung von Nanopartikeln aus Biomassenverbrennung II



W. Fr. Dreher<sup>1</sup>, S. Apel<sup>2</sup>, G. Baumbach<sup>3</sup>, J. Klostermann<sup>2</sup>, S. Mülhopt<sup>4</sup>, H.-R. Paur<sup>4</sup>, Ch. Schlager<sup>4</sup>  
M. Struschka<sup>3</sup>, C. Warres<sup>1</sup>, E. Houas<sup>1</sup>, F. Weise<sup>2</sup>, P. Winter<sup>3</sup>

*1 Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut, Reutlingen (NMI), Grenzflächen- / Mikrostrukturanalytik  
2 Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut, Reutlingen (NMI), Virale Screeningsysteme  
3 Institut für Feuerungs- und Kraftwerkstechnik der Universität Stuttgart (IFK), Reinhaltung der Luft  
4 Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Technische Chemie - Bereich Thermische Abfallbehandlung (ITC-TAB)*

Projekträger: FNR  
Projektdauer: 05.05. 2011 - 31.10. 2013  
Berichtszeitraum: 05.05. 2011 - 30.09. 2014  
FKZ: 22011210

Fachagentur Nachwachsende  
Rohstoffe e.V. (FNR)  
Hofplatz 1  
18276 Gülzow-Prüzen

## INHALT

<b>1</b>	<b>Projekt-Ziele</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Arbeitspakete</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Das Expositionssystem</b>	<b>5</b>
3.1	Zielsetzung und Aufgabenstellung	5
3.2	Erhöhung der Abscheiderate im Expositionssystem	7
3.3	Inbetriebnahme mit Verbrennungsaerosol	15
3.4	Bereitstellung des Expositionssystems am Versuchsstand	16
3.5	Zusammenfassung „Erhöhung der Abscheiderate“	17
<b>4</b>	<b>Betrieb der Öfen und des Expositionssystems /</b>	<b>18</b>
4.1	Zielsetzung und Aufgabenstellung	18
4.2	Bereitstellung der Öfen und Erarbeitung stabiler Verbrennungsparameter	18
4.3	Betrieb des Expositionssystems und Begasung der Zellen	30
4.4	Auswertung der Verbrennungsmesswerte	33
<b>5</b>	<b>Partikelanalytik sowie Darstellung der Zellen</b>	<b>54</b>
5.1	Zielsetzung und Aufgabenstellung	54
5.2	Analysekontrolle zur Optimierung des Expositionssystems	54
5.3	Darstellung unbegaster Zellreferenzproben	60
5.4	Online Messversuche zur Partikelanalytik	61
5.5	Partikelanalytik und Darstellung der Zellkulturen in der Übersicht und im Querschnitt	68
<b>6</b>	<b>Zellbiologie</b>	<b>83</b>
6.1	Etablierung der Zellkulturen und Optimierung der Stabilität der Referenzproben	83
6.2	Bereitstellung der Zelllinien für die Nanopartikelexposition	90
6.3	Auswertung der biochemischen Reaktionen der Zellkulturen auf die Feinstaubapplikationen	92
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>118</b>

## 1 Projekt-Ziele

In dem Vorhaben sollen die bei der Verbrennung von nachwachsenden Rohstoffen entstehenden Nanopartikel auf ihre Toxizität hin untersucht werden. Dabei soll der Verbrennungsprozess nachgestellt werden, wie er durch Benutzung von Kleinfeuerungsanlagen im privaten Haushalt durch den durchschnittlichen Verbraucher erwartet werden kann, d.h. es werden sowohl optimale als auch suboptimale Verbrennungsbedingungen gewählt, um eine möglichst realitätsnahe Nanopartikelemission zu erreichen.

Mit diesen Verbrennungsparametern soll die toxische Wirkung nach Inhalation anhand eines Modellsystems untersucht werden, in welchem die Nanopartikel *in vitro* auf kultivierte menschliche Lungenzellen geleitet werden. Epidemiologische Studien zeigen eine Assoziation zwischen dem Anstieg von Feinstaub und der verursachten Mortalität [1]. Je kleiner die Partikel werden, umso tiefer können Sie in den menschlichen Atemtrakt eindringen und dort Ihre schädliche Wirkung entfalten [2]. Die dadurch ausgelöste Schädigung und Reaktion der Zellen wird anhand biologischer Parameter klassifiziert.

Hierbei soll der Zusammenhang zwischen dem Brenngut (Stückholz / Holzpellet), der chemischen Zusammensetzung der Staubemission (Nanopartikel) und der Toxizität unter Berücksichtigung unterschiedlicher Betriebsparameter untersucht werden. Ziel des Vorhabens ist es, zur Aufklärung des Toxizitätspotenzials von Nanopartikeln beizutragen und somit eine Grundlage für technologische Innovationen zu schaffen, die der Optimierung des Feuerungsprozesses und der Verminderung der Generierung von Verbrennungsrückständen dienen.

Mit dem Messaufbau inkl. des darin verwendeten Expositionssystems soll ein Instrumentarium geschaffen werden, das es möglich macht, den in der menschlichen Lunge stattfindenden Prozess der Partikelinhalation zu simulieren um damit die Wirkung der Partikel auf das Zellsystem besser verstehen zu können. Das Meßsystem kann dann mit entsprechenden Anpassungen für die Untersuchung eines breiten Spektrums an Partikelquellen eingesetzt werden.

## 2 Arbeitspakete

Die Gliederung des Projektes in die verschiedenen Arbeitspakete ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Hierbei sind die geplanten Arbeitspakete je nach durchführendem Projektpartner farblich codiert.

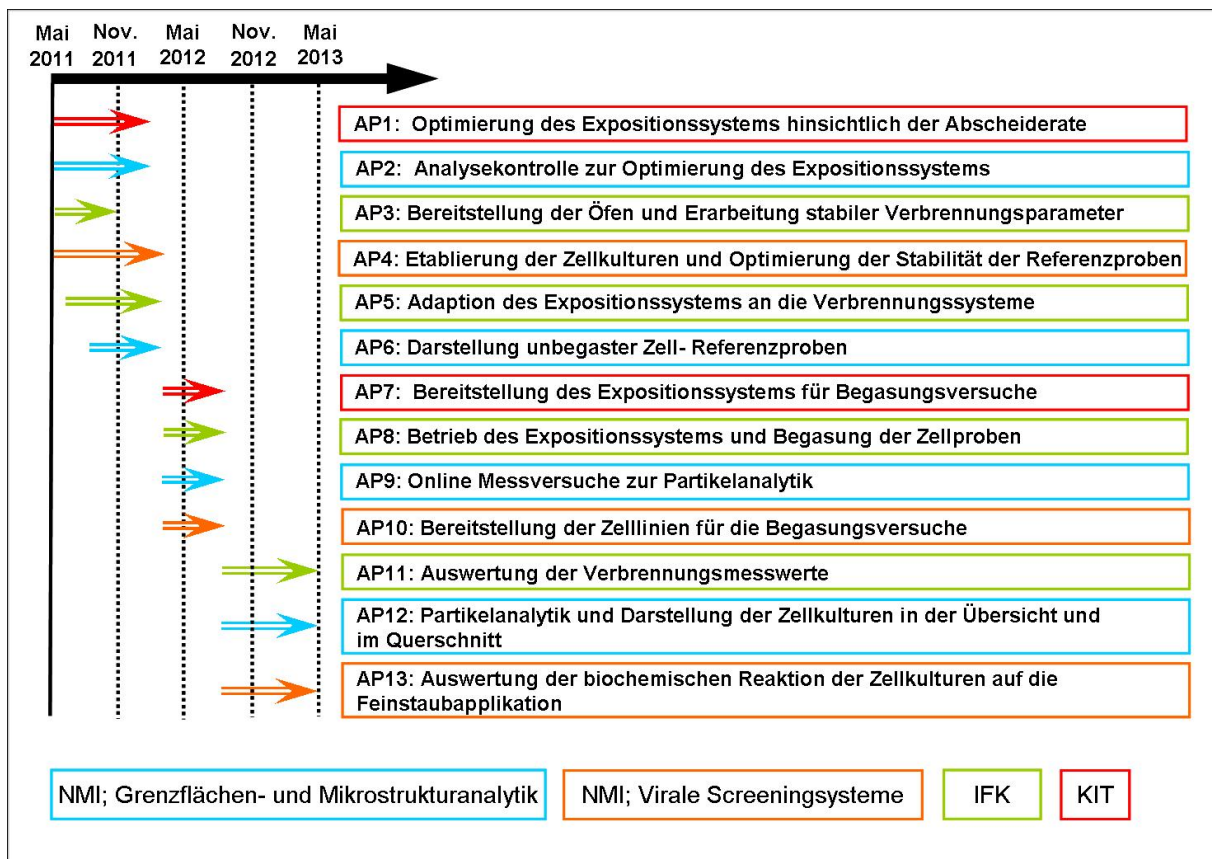


Abbildung 2.1: Übersicht der Arbeitspakete

Aufgrund von technischen Schwierigkeiten während der Messkampagne wurden gemäß Aufstockungsbescheid vom 16.10.2012 weitere Messversuche durchgeführt (siehe Abb.2 / Arbeitspakete).

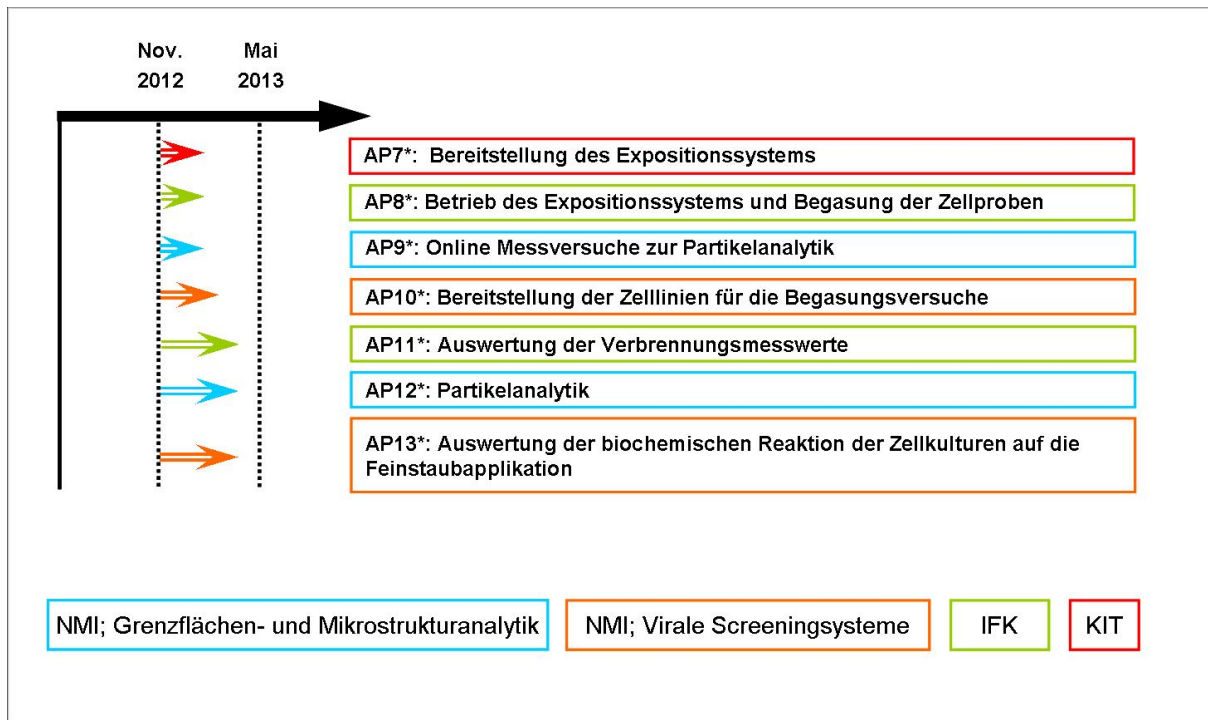


Abbildung 2.2: Übersicht der Arbeitspakete (\* Zusätzliche Messkampagne gemäß Aufstockungsbescheid vom 16.10.2012)

## 3 Das Expositionssystem

### 3.1 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Um die Zellkulturen an der ALI (engl. *air liquid interface*, kurz ALI) mit einem unveränderten Aerosol direkt aus Holzfeuerungen exponieren zu können, wurde das Karlsruher Expositionssystem verwendet.

Die biologische Wirksamkeit von gasgetragenen Feinst- und Nanopartikeln wird im Karlsruher Expositionssystem durch einen Bioassay realitätsnah quantifiziert [4, 5]. Hierbei werden standardisierte Kulturen humaner Lungenzellen den gasgetragenen Partikeln an der Gas-Flüssigkeitsgrenzschicht ausgesetzt (Abb. 3.1). Das Aerosol wird aus der Abluft der Verbrennungsöfen angesaugt, passiert einen gröÙenselektiven Einlass und wird auf 37°C und 85% relative Feuchte konditioniert. Das Gas strömt dann über die Oberfläche der Zellen und die durch Diffusion deponierten Partikeln induzieren eine dosisabhängige Wirkung wie zum Beispiel Entzündungsvorgänge oder oxidativen Stress [6].

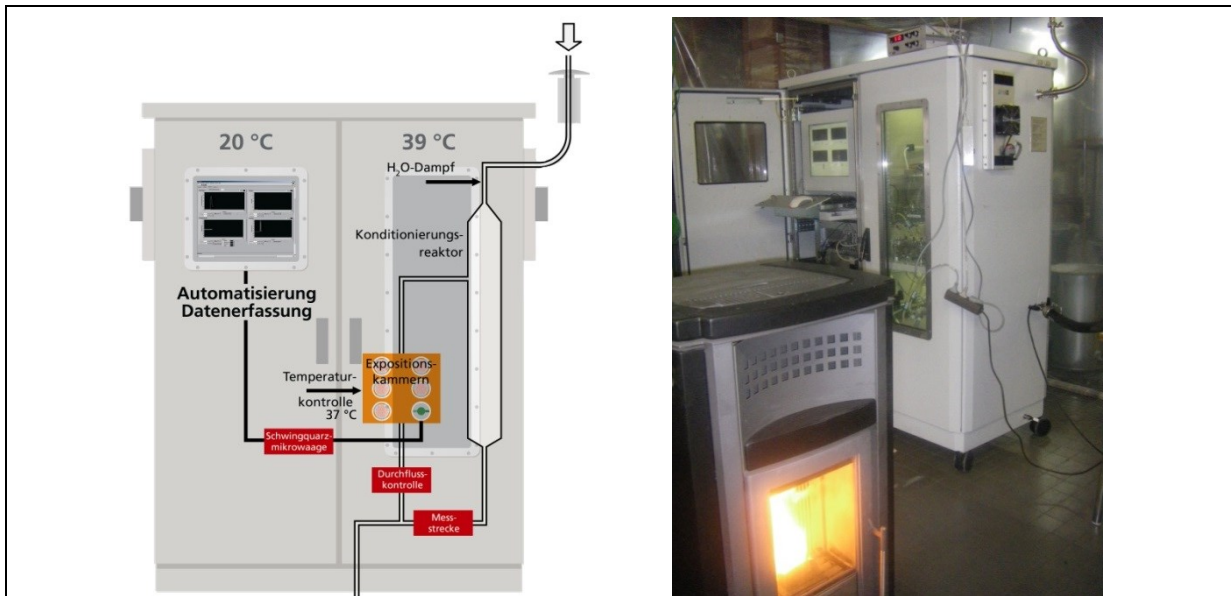


Abbildung 3.1: Das Karlsruher Expositionssystem: das Fließschema des Systems und die Anlage während einer Toxizitätsbestimmung am Pelletofen im Technikum des IFK.

Die biologischen Endpunkte werden im biochemischen Labor gemessen und mit der deponierten Partikeldosis korreliert. Die exakte Bestimmung der deponierten Partikeldosis pro Flächeneinheit durch eine integrierte Schwingquarzmikrowaage ermöglicht die Bestimmung der Toxizität von Feinstpartikeln auf der Basis von Dosis-Wirkungsbeziehungen [7]. Mit diesem *In-vitro*-Verfahren werden in dem hier berichteten Projekt die Zusammenhänge zwischen Feuerungszustand, Einsatzstoff und biologischer Wirkung der abhängig davon entstehenden Partikeln ermittelt.

Im Rahmen des Projekts Nanotox I [3] zeigte sich bei der Beprobung von optimierten Holzfeuerungsanlagen mit dem Karlsruher Expositionssystem, dass der Versuchsaufbau zur Messung vermuteter toxischer Effekte des Holzverbrennungsaerosols hinsichtlich der zu applizierenden Dosis optimiert werden sollte. Im Rahmen der Submersuntersuchungen konnte eine toxisch wirkende Dosis von ca. 40 µg/cm<sup>2</sup> abgeschätzt werden, die auf den exponierten Zellkulturen erzielt werden sollte, um die biologischen Wirkungen detektieren zu können. Für die Deposition solcher Partikeldosen aus dem Aerosol der zu untersuchenden Quellen musste eine Steigerung um den Faktor 10 erreicht werden [8]. Für das Erreichen dieser Dosissteigerung wurde in den Expositionskammern des Karlsruher Expositionssystems ein elektrisches Feld installiert, um neben der Diffusion auch die elektrostatische Kraft zur Abscheidung der Partikeln auf der Zellkulturoberfläche zu nutzen. Hierzu wurden im Rahmen des hier berichteten Projekts Nanotox II folgende Teilaufgaben bearbeitet:

- Auslegung und Aufbau der elektrostatischen Partikeldeposition in den Expositionskammern
- Bestimmung der Depositionseffizienz mittels Fluoreszein-Natrium-Dosimetrie am Technikum AE-OLA
- Installation des Karlsruher Expositionssystems am Versuchsstand des IFK, Universität Stuttgart

## 3.2 Erhöhung der Abscheiderate im Expositionssystem

### 3.2.1 Auslegung und Aufbau der elektrostatischen Partikeldeposition in den Expositionskammern

Für die Erhöhung der während eines Experiments zu applizierenden Partikeldosis in den Kammern des Karlsruher Expositionssystems wurde ein Air-Liquid-Interface-Expositionsmodul mit integrierter elektrostatischer Partikeldeposition entwickelt. Als Bewertungskriterium wird die Depositionseffizienz herangezogen, die den Quotienten aus abgeschiedener und angebotener Partikelmasse darstellt:

$$\text{Depositionseffizienz} = \frac{\text{deponierte Partikelmasse auf der Membran } [\mu\text{g}]}{\text{angebotene Partikelmasse in der Aerosolphase } [\mu\text{g}]} \cdot 100\%$$

Vorversuche im Rahmen des Projekts NANO-SYNCC im DFG-Schwerpunktprogramm SPP1313 zeigten, dass die Depositionseffizienz von Metalloxid-Nanopartikeln im VITROCELL-Expositionsmodul durch das Anlegen von moderaten elektrischen Feldern (ca. 700 V/mm) um eine Größenordnung gesteigert werden kann (Abb. 3.2, [9, 10]). Bei den vorläufigen Tests wurden jedoch keine Einflüsse durch Nährmedium oder Zellen berücksichtigt, wofür im Rahmen dieses Projekts konstruktive Anpassungen durchgeführt wurden. Die Einflüsse von elektrischen Feldern auf die in diesem Projekt verwendeten Bioassays mussten quantifiziert werden, wobei die Verträglichkeit solcher Felder für menschliche Zellkulturen bereits von Savi et al. [11] gezeigt wurde.

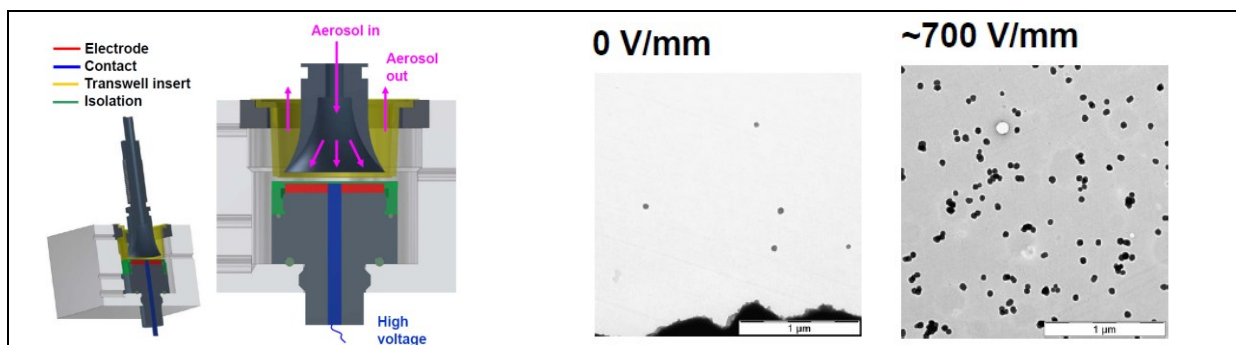


Abbildung 3.2: Expositionskammer mit Elektrode zur Erhöhung der Depositionseffizienz. Die TEM-Aufnahmen zeigen 50 nm-SiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln auf der Membran, deponiert ohne und mit einem elektrischen Feld von ~700 V/mm.



Im Jahre 2011 wurde durch KIT-ITC eine den F+E-Aufgaben entsprechende Hochspannungsversorgung (Abb. 3.3) spezifiziert und beschafft. Sie weist folgende Eigenschaften auf:

- 5 unabhängig regelbare Ausgangskanäle mit linearem Regelbereich von 360 – 1.730 VDC mit Präzisions-10-Gang-Potentiometern
- jeder Kanal mit separat umschaltbarer Polarität, eigener Ausgangsspannungsanzeige und Hochspannungs-Ausgangsbuchse BNC Typ 317603

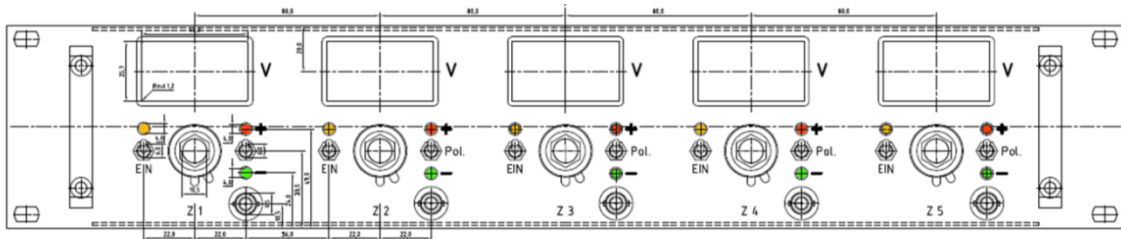


Abbildung 3.3: Frontpanel der Hochspannungsversorgung für die Elektroden.

Vorteil dieser sehr umfangreichen Ansteuerung der elektrischen Felder im Karlsruher Expositionssystem ist neben der Sicherheit für den Betreiber die Flexibilität bei der Durchführung der Experimente. Es besteht die Möglichkeit, den Einfluss der Feldparameter wie unterschiedliche Feldstärken und Polarität im direkten Vergleich untereinander zu untersuchen. Insbesondere bei den Verbrennungsaerosolen, die nur mit einer eingeschränkten Genauigkeit zu reproduzieren sind, ist es besser, in einem Versuch direkt positives mit negativem Feld miteinander zu vergleichen als Serienversuche durchzuführen.

Die ersten Tests mit Nährmedium zeigten, dass das Nährmedium einen Kurzschluss zum geerdeten Edelstahlmodul verursachen kann. Infolgedessen wurden die Isolator Durchführungen, die isolierenden Becher und die Halteringe für die Transwelleinsätze neu konstruiert und in ein durchgehendes Bauteil überführt (Abb. 3.4).

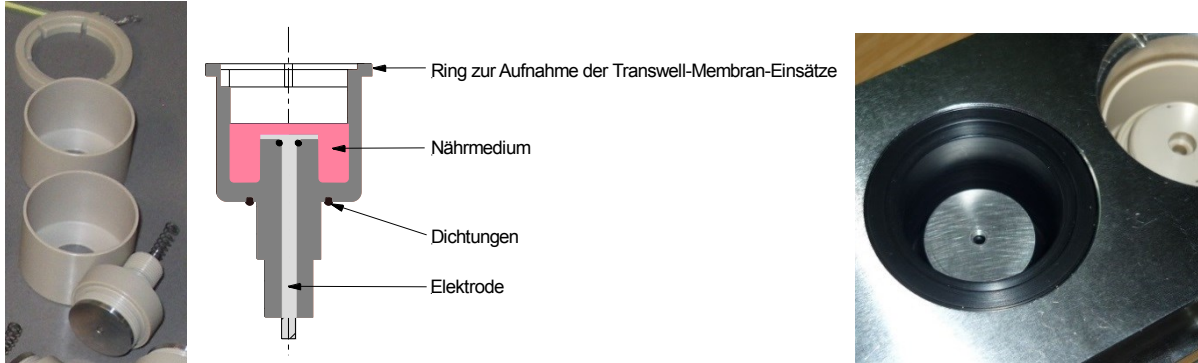


Abbildung 3.4: Konstruktive Zusammenführung der drei isolierenden Bauteile von den Einzelteilen zu einem durchgehenden Isolator Becher. Im linken Foto sind die 3 Einzelteile der ursprünglichen Lösung zu sehen: Der Aufnahmering für die Transwell-Membran-Einsätze, der Becher für das Nährmedium und die Elektrodendurchführung mit Elektrode (von oben nach unten). In der Mitte ist die Konstruktionsskizze dargestellt. Im rechten Foto ist der neue Isolator Becher mit Elektrode in eingebauten Zustand zu sehen.

### 3.2.2 Bestimmung der Depositionseffizienz mittels Fluoreszein-Natrium-Dosimetrie und Bildanalyse am Technikum AEOLA

Das mit neuen Elektroden (Abb. 3.4) und Hochspannungsversorgung ausgerüstete Karlsruher Expositionssystem wurde zunächst am Teststand AEOLA (Abb. 3.5) mit einem definierten Aerosol aus Fluoreszein-Natrium getestet und kalibriert. Mit dem stark fluoreszierenden Fluoreszein-Natrium-Aerosol können die Depositionseffizienz sowie die Verluste auf anderen Flächen durch Fluoreszenzspektrometrie quantifiziert werden [5]. Die untere Nachweisgrenze für deponiertes Fluoreszein-Natrium liegt bei dieser Methode bei  $2 \text{ ng/cm}^2$ .

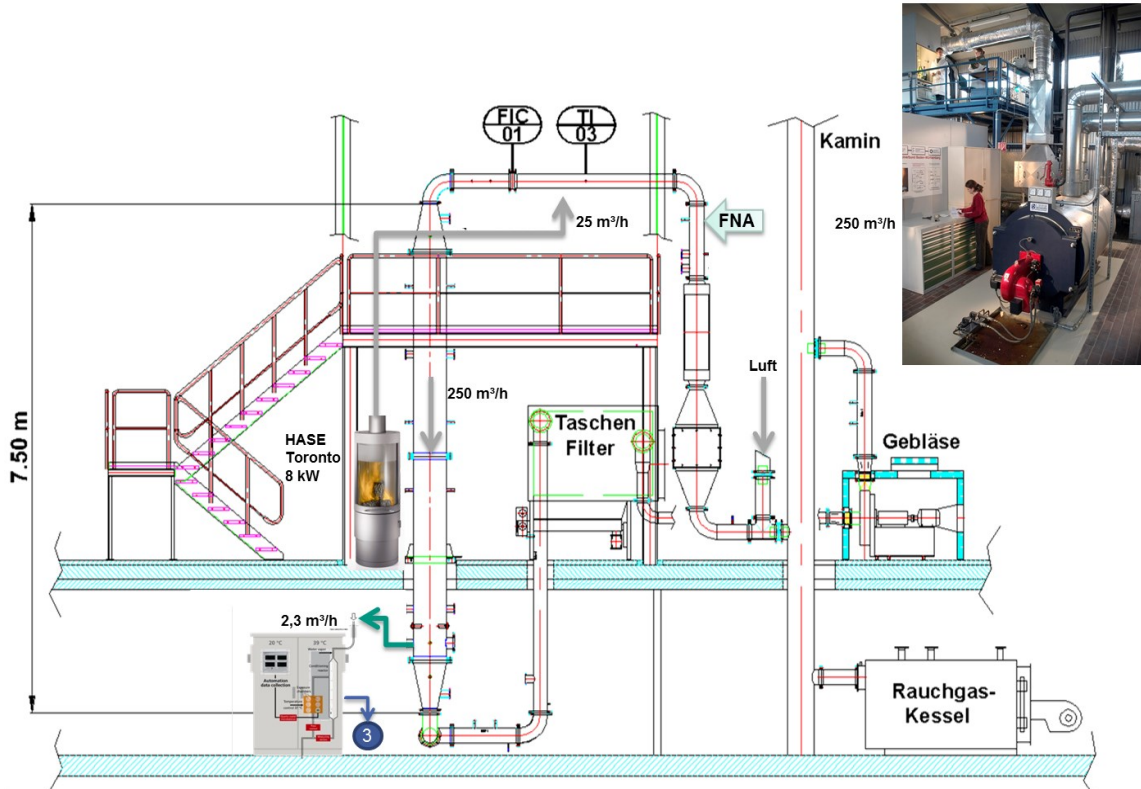


Abbildung 3.5: Technikumsanlage AEOLA [12], [13] zur Erzeugung definierter Aerosole. Es können wässrige Lösungen wie zum Beispiel Fluoreszein-Natrium oder Suspensionen eingedüst sowie trockene Stäube dosiert werden. Als Verbrennungsaerosol aus Biomassefeuerungen kann Rauch aus einem Kaminofen eingeleitet werden. Nach der Stabilisierung des Aerosols im 8 m langen Reaktor können Aerosolproben entnommen und dem Karlsruher Expositionssystem oder Messtechniken zugeführt werden.

Die Masse an angebotenem Fluoreszein-Natrium wird aus der mit SMPS gemessenen Anzahlgrößenverteilung (Abb. 3.6) und dem durch die Kammern geleiteten Volumen berechnet.

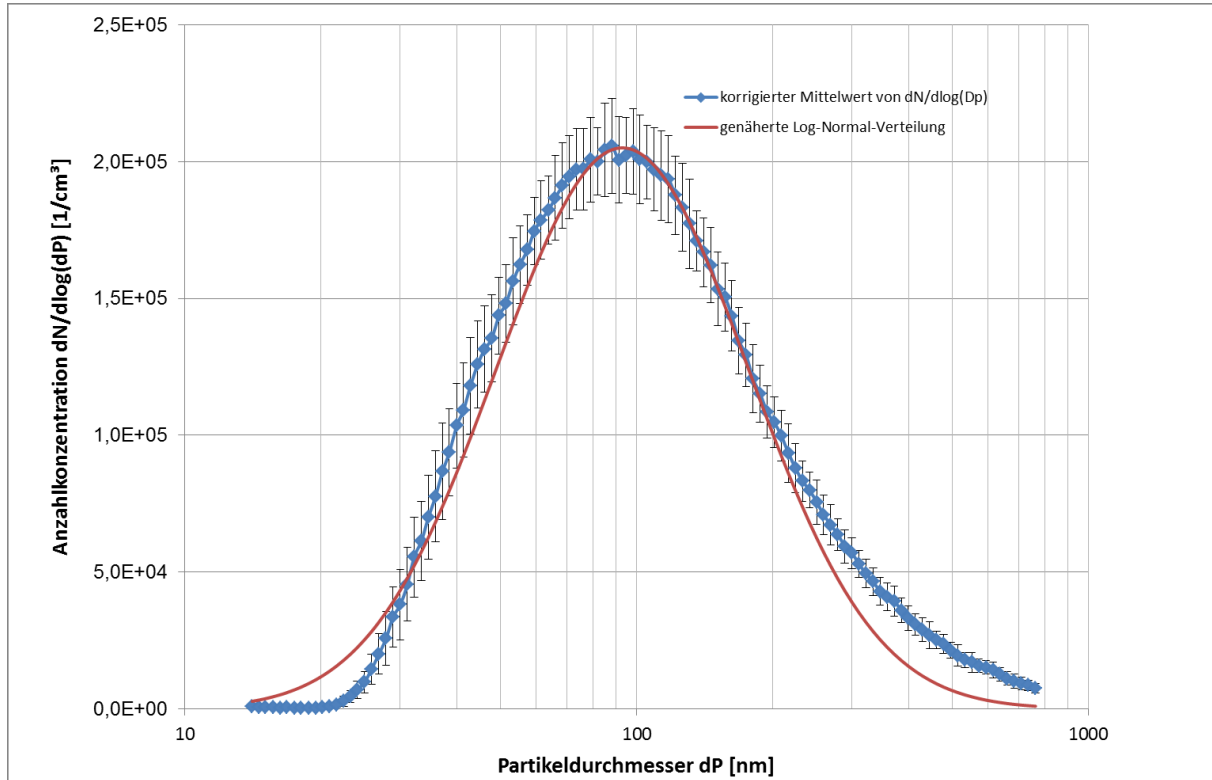


Abbildung 3.6: Anzahlgrößenverteilung von Fluoreszein-Natrium-Aerosol aus der AEOLA, gemessen im Reaktor des Expositionssystems mit SMPS (DMA3071 mit CPC3022A, TSI GmbH, Aachen). Die Log-Normal-Verteilung weist einen Modalwert von  $x_M = 93$  nm mit einer Standardabweichung von 1,9 nm auf.

Die ersten Experimente zur Bestimmung der Depositionseffizienz von Fluoreszein-Natrium zeigen wie in Tab. 3.1 dargestellt, dass ab einer angelegten Spannung von 1000 V eine deutliche Erhöhung der deponierten Masse auf den Membranen zu detektieren ist. Dabei ist eine deutlich höhere Steigerung durch das negative Feld zu erzielen, als durch das positive. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die gezielte Abscheidung der geladenen Partikeln auf der Membranoberfläche die Verluste an den Wänden der Transwell-Membran-Inserts deutlich reduziert werden können.

Spannung Volt	Membran $\mu\text{g}$	Wand $\mu\text{g}$
0	$1,50 \pm 0,32$	$3,87 \pm 2,64$
+ 500	$1,57 \pm 0,41$	$1,59 \pm 1,42$
+ 1000	$2,01 \pm 0,70$	$0,44 \pm 0,15$
- 1000	$6,03 \pm 0,90$	$0,88 \pm 0,39$

Tabelle 3.1: Vergleich der deponierten Massen in Abhängigkeit von Polarität und Höhe der angelegten Spannung

Aufgrund der höchsten Steigerung der deponierten Masse wurde als Einstellung für alle folgenden Experimente das negative Potential mit -1000 Volt gewählt. Das entspricht bei der verwendeten Geometrie und einem Abstand von 3 mm einer Feldstärke von 333 V/mm.

Zur genaueren Beschreibung des Depositionsverhaltens an der Grenzschicht wurden Probenträgernetzchen (C-Film auf Kupfer 200 mesh Grids, Plano, Wetzlar) für die Transmissionselektronenmikroskopie gegenüber Fluoreszein-Natrium exponiert. Dabei wurden je Transwell-Kulturschale 3 Grids an definierten Positionen auf der Membran verteilt um die Gleichverteilung der Partikeln zu untersuchen (Abb. 3.7): es wurden das Zentrum, der Rand und die Zone dazwischen untersucht.

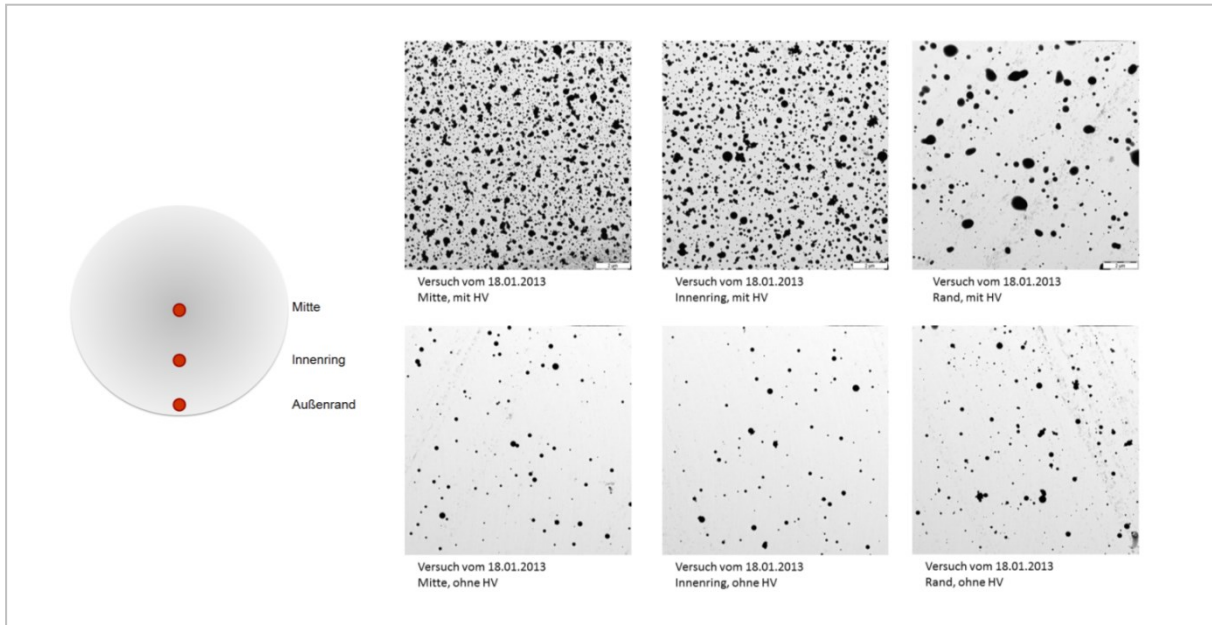


Abbildung 3.7: Deponierte Fluoreszein-Natriumpartikeln in den Transwell-Kulturschalen. Links: Positionen der TEM-Grids in einer Transwell-Membran in der Aufsicht. Rechts: TEM-Aufnahmen an drei verschiedenen Positionen der Membran je mit (oben) und ohne (unten) elektrisches Feld von -1000 V.

Nach dem Expositionsexperiment wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 109T, Oberkochen) je Grid eine Übersichtsaufnahme und 10 Bilder mit gleicher Auflösung (Vergrößerung 10.000) aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Software ImageJ bezüglich der Flächenbeladung und der Partikelgröße ausgewertet. Mit der Näherung, dass alle Partikeln kugelförmig mit dem mittleren Durchmesser vorliegen wird über Volumen, Partikeldichte und Partikelanzahl die deponierte Masse abgeschätzt (Abb. 3.8).

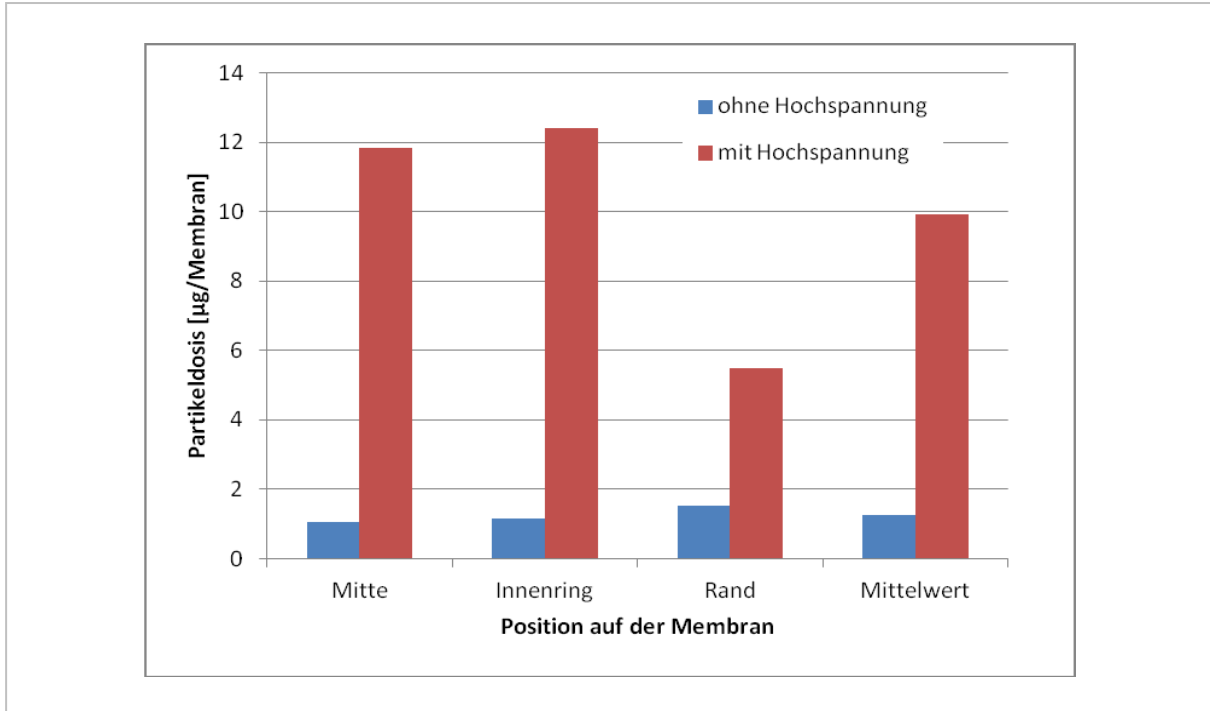


Abbildung 3.8: Deponierte Partikelmasse je Flächeneinheit, mathematisch genähert aus den TEM-Aufnahmen der Grids. Vergleich von unterschiedlichen Positionen in der Transwell-Membran unter dem Einfluss der Hochspannung.

Es wurde deutlich, dass nur am Rand der Transwell-Membranen ein deutlicher Abfall der Partikeldosis zu beobachten ist, während auf dem größten Teil der Fläche kaum ein Gradient messbar ist. Die Steigerung der Dosis durch das angelegte elektrische Feld ist sowohl in den Bildern gut zu erkennen als auch in der Auswertung mit einem Faktor 8 bestimmt worden. Ein Vergleich der ermittelten Dosen zeigt gute Übereinstimmung zwischen Fluoreszenz-Messung (Tab. 3.1) mit 1,5 µg/Membran und der Näherungsrechnung aus der Bildauswertung (Abb. 3.8) mit 1,25 µg/Membran ohne Hochspannung und 6,0 zu 9,9 µg/Membran mit Hochspannung.

Insgesamt beträgt die Depositionseffizienz ca. 2 % ohne Hochspannung und ca. 18 % mit Hochspannung.

### 3.3 Inbetriebnahme mit Verbrennungsaerosol

Das Karlsruher Expositionssystem wurde nach der Optimierung sowie Dosisbestimmung mit Fluoreszein-Natrium an AEOLA mit einem realen Verbrennungsaerosol getestet. Als Aerosolquelle stand ein Kaminofen des Typs Toronto (Firma HASE) mit einer Leistung von 8 kW zur Verfügung, der mit Buchenscheitholz befeuert wurde. Während der Expositionsexperimente wurde im Reaktor des Expositionssystems die Anzahlgrößenverteilung des Aerosols mit SMPS bestimmt. In Abb. 3.9 sind die Anzahlgrößenverteilungen über die Zeit des 4-Stunden-Experiments zu sehen.

Die über die Farbskala dargestellte Partikelkonzentration zeigt den deutlichen Einfluss beim Nachlegen von Holz im Kamin, wenn durch das Öffnen des Frontschiebers kurzfristig eine starke Verdünnung und Abkühlung im Brennraum auftritt und anschließend im ruhigen Brennverlauf der Partikeldurchmesser und die Konzentration wieder ansteigen.

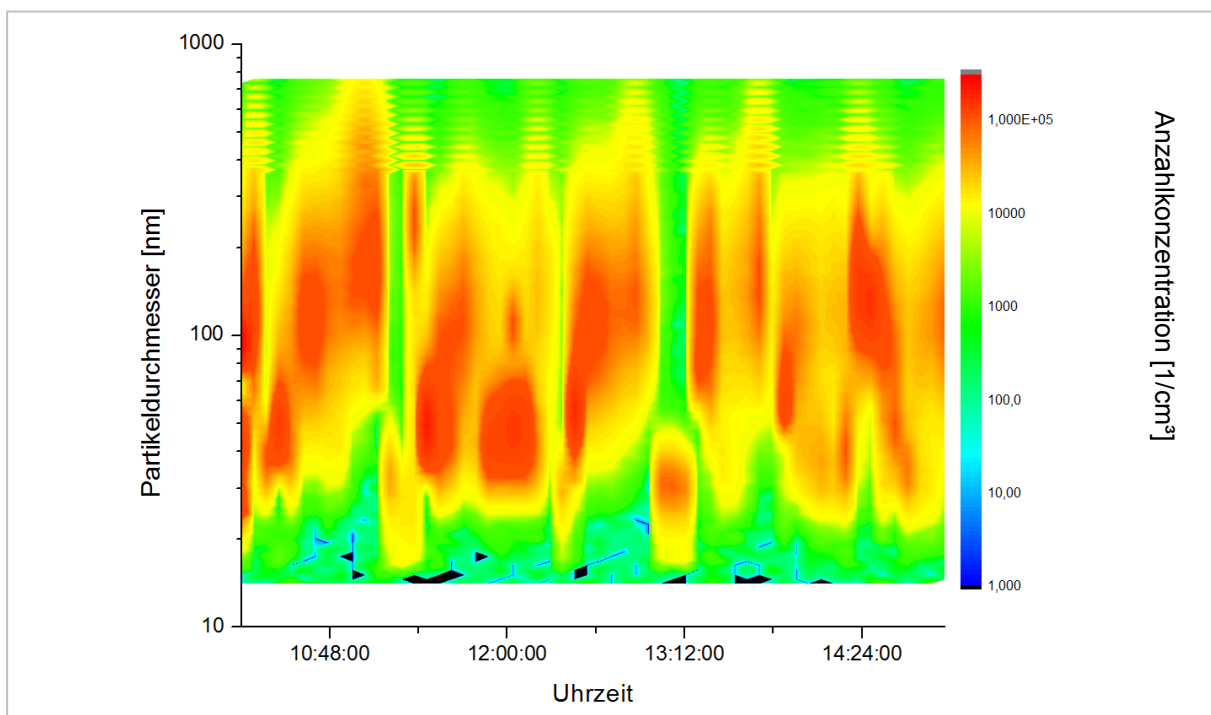


Abbildung 3.9: Aufzeichnung der Anzahlgrößenverteilungen im Expositionssystem mit SMPS während eines Expositionsexperiments an der Technikanlage AEOLA mit Scheitholz-Kaminofen Toronto als Aerosolquelle.



Da der Steigerungsfaktor durch das elektrische Feld vom Ladungszustand des Aerosols abhängt und damit für die Partikel aus dem Flammenprozess anders ausfallen kann als das durch Sprühen erzeugte Fluoreszein-Natrium-Salz, wurde auch im Rahmen dieser Expositionsexperimente TEM-Netzchen für die Transmissionselektronenmikroskopie mit Partikeln unter verschiedenen elektrischen Feldern exponiert. Diese Netzchen wurden nach der Exposition an das NMI gesandt und dort bezüglich der Beladung ausgewertet. Es konnte auch für die Partikel aus der Verbrennung eine deutliche Dosissteigerung für eine angelegte Spannung von -1000 V erzielt werden (siehe Kapitel 5.2 / Arbeitspaket 2). Im Rahmen eines 4h-Expositionsexperiments nahmen KIT und NMI teil, um die gesamte Routine eines Expositionsexperiments im Vorfeld zur Kampagne am IFK zu begleiten.

### 3.4 Bereitstellung des Expositionssystems am Versuchsstand

Das optimierte Karlsruher Expositionssystem wurde im Rahmen zweier Messkampagnen an das Technikum des IFK in Stuttgart gebracht und dort von IFK mit zwei verschiedenen Verbrennungsaerosolquellen betrieben. Das KIT begleitete diese Versuche und nahm auch die dort gewonnenen Betriebserfahrungen für Messungen an Verbrennungsöfen in die Weiterentwicklung des Systems auf.



Abbildung 3.10: Das Karlsruher Expositionssystem während einer Messkampagne am Technikum des IFK, Uni Stuttgart.

### 3.5 Zusammenfassung „Erhöhung der Abscheiderate“

In dem hier berichteten Projekt war es Ziel, die Emissionen von verschiedenen Biomassefeuerungen bezüglich ihrer biologischen Wirksamkeit auf menschliche Lungenzellen zu bewerten. Hierfür wurde vom KIT das Karlsruher Expositionssystem mit einer elektrostatischen Abscheidung für die Partikeln ausgerüstet um die deponierte Partikelmasse je Expositionsversuch und damit die applizierte Dosis zu erhöhen. Die Verbesserung der Depositionseffizienz wurde mittels eines Kalibrier-aerosols quantitativ bestimmt und das System auf Holzfeuerungs-aerosol angewandt. Abschließend wurde das System für Messkampagnen zur Untersuchung der biologischen Wirksamkeit mit Bioassays des NMI am Technikum des IFK eingesetzt.

Die Integration des elektrischen Felds über der Zellkultur wurde erfolgreich durchgeführt. Durch die Neukonstruktion der Isolator Becher konnte neben einer zuverlässigeren Isolation auch eine bessere Dichtigkeit erzielt werden. Insgesamt hat sich auch während der Messkampagnen die Dichtigkeit der Expositionsmodule als größtes Risiko herausgestellt, eine Messung zu verfälschen oder gar eine Zellkultur durch den Falschlufteintrag zu verlieren. In Zukunft wird über die Steuerung des Karlsruher Expositionssystems vor und nach jeder Messung eine interne Dichtigkeitsprüfung durchgeführt, die den Nutzer frühzeitig warnt, um so das Risiko von Fehlexperimenten zu minimieren.

Mittels der Validierungsexperimente mit Fluoreszein-Natrium konnte die Wirksamkeit der elektrostatischen Abscheidung sowohl durch die Spektrometrie als auch über die Bildauswertung der TEM-Grids nachgewiesen werden. Es konnten abhängig von der Polarität der angelegten Hochspannung bzw. der Stärke des elektrischen Felds sowie der Aerosolart bzw. -quelle Steigerungen der Depositionseffizienz bis zu einem Faktor 8 erzielt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Karlsruher Expositionssystem durch die Integration des elektrischen Felds deutlich höhere Depositionseffizienz erzielen kann. Damit kann die Partikeldosis je Expositionsexperiment erhöht werden und die Anwendungsmöglichkeiten werden deutlich zu Quellen mit geringeren Partikelemissionen erweitert. Die in diesem Rahmen darüber hinaus verbesserten Komponenten und Steuerungskonzepte bringen zusätzliche Betriebssicherheit. Damit steht in Zukunft eine verlässliche Technik zur toxikologischen Bewertung von Partikelemissionen aus Verbrennungsprozessen zur Verfügung.

## **4 Betrieb der Öfen und des Expositionssystems / Durchführung der Expositionsversuche**

### **4.1 Zielsetzung und Aufgabenstellung**

Zu den Aufgaben des IFK gehörten die Bereitstellung der Verbrennungsöfen sowie der technische Aufbau des Versuchsstandes. Eine weitere Aufgabe bestand in der Erarbeitung von stabilen Verbrennungsparametern, um definiert unterschiedliche Verbrennungszustände einstellen zu können. Hierbei wurden an den Kleinfeuerungsanlagen Feinstaubemissionen aus der Pellet- und Stückholzfeuerung erzeugt. Es wurden nahezu vollständige Verbrennungen bzw. unvollständige Verbrennungen durchgeführt. Während der Expositionsversuche wurden verschiedene Verbrennungsmesswerte erfasst und ausgewertet.

Die Beaufschlagung der menschlichen Lungenzellen mit den Verbrennungspartikeln zur Untersuchungen der toxischen Wirkung des Feinstaubes wurde im Technikum des Instituts für Feuerungs- und Kraftwerkstechnik (IFK) der Universität Stuttgart über einen Zeitraum von Oktober 2011 bis Mitte Dezember 2012 durchgeführt.

### **4.2 Bereitstellung der Öfen und Erarbeitung stabiler Verbrennungsparameter**

#### **4.2.1 Beschreibung der ausgewählten Holzfeuerungsanlagen**

##### **Kaminofen**

Der für die Untersuchungen eingesetzte Kaminofen (siehe Abb. 4.1 (linkes Bild), technische Daten siehe Tab. 4.1) ist mit einem Wasserwärmetauscher ausgestattet und wurde folglich an einen Kühlwasserkreislauf angeschlossen. Der Füllraum wird manuell mit Scheitholz bestückt. Händisch kann die Primärluft und die Sekundärluft über Drehregler variiert werden. Tab. 4.2 enthält eine Übersicht zum eingesetzten Brennstoff beim Kaminofen.



Abbildung 4.1: Buderus Scheitholzkaminofen (links) / Buderus Pelletofen (rechts)

<b>Technische Daten Kaminofen</b>	
Hersteller	Buderus BBT Thermotechnik GmbH, Wetzlar
Typ	blueline 4W
Nennwärmeleistung	8 kW davon 5,6 kW an Wasserheizkreis
Baujahr	2007
Kesselwasserinhalt	19,8 l

Tabelle 4.1: Technische Daten des eingesetzten Kaminofens

<b>Brennstoff Parameter</b>	<b>Wassergehalt w in %</b>	<b>Beladung je Abbrand in kg</b>	<b>Anzahl Holzscheite je Abbrand</b>
Buche trocken	15,3 / 11,5 *	1,25	2

Tabelle 4.2: Angaben zum eingesetzten Brennstoff beim Kaminofen (\* Messungen im Dezember 2012)

## Pelletofen

Der eingesetzte Pelletofen (Abb. 4.1 rechtes Bild) gibt seine Wärme über Konvektion und Strahlung an den umgebenden Raum ab. Aus dem Vorratsbehälter werden die Pellets über eine Förderschnecke bis zur Öffnung einer Fallstrecke gefördert, über welche sie in die Brennschale gelangen. Die Zündung erfolgt mit einem Heißluftgebläse. Die Verbrennungsluft wird als Primärluft in den Brennerkopf zugeführt. Die Heizleistung des Gerätes kann in vier Stufen (1-kleinste Leistung bis 4-maximale Leistung) variiert werden (technische Daten siehe Tab. 4.3). Jeder Leistungsstufe liegt ein fest eingestellter Wert für Verbrennungsluft- und Brennstoffmenge zugrunde.

Der Pelletofen wurde mit handelsüblichen DINplus Pellets mit einem Wassergehalt von  $w = 7,6\%$  befeuert.

<b>Technische Daten Pelletofen</b>	
Hersteller	Buderus BBT Thermotechnik GmbH, Wetzlar
Typ	blueline Pellet 1
Nennwärmeleistung	2,9 kW – 7,6 kW
Baujahr	2006
Inhalt Pellet Tank	41 l = 26,5 kg Pellets

Tabelle 4.3: Technische Daten des eingesetzten Pelletofens

## 4.2.2 Versuchsaufbau

Eine Übersicht der Versuchsanordnung gibt Abb. 4.2, eine ausführliche Beschreibung der wichtigsten Komponenten folgt in den nächsten Kapiteln.

Das aus dem Rohgas abgesaugte Teilvolumen durchläuft zuerst die Verdünnungsstufe, in der vorge-wärmte synthetische Luft zugeführt wird, sodass in der nachfolgenden Kühlstufe über den Taupunkt des unverdünnten Abgases abgekühlt werden kann (Verdünnungsverhältnis ca. 1:3). Die Absaugung erfolgt nur im Mittel isokinetisch, da sich die Abgasgeschwindigkeiten und die Abgastemperaturen im Verbrennungsverlauf ändern, während der Sondendurchmesser unverändert und der geförderte Pro-bengasstrom konstant bleiben. Vor und nach der Verdünnung und Kühlung befinden sich Messstellen für Temperatur und CO<sub>2</sub>-Gehalt. Die Temperatur am Eingang der Expositionseinheit (Sollwert ca. 37°C) ist die wichtige Zielgröße für die Steuerung des Kühlkreises. Die gemessene CO<sub>2</sub>-Konzentration liefert die tatsächliche Verdünnungsrate, die ausgehend von den schwankenden Rohgastemperaturen und einer gewissen Trägheit des Systems zwischen ca. 2,5 und 3,5-facher Verdünnung variiert. Die Verdünnung wird über die Anpassung des Vordrucks der zugeführten synthetischen Luft eingestellt und am CO<sub>2</sub>-Verhältnis des unverdünnten gegenüber dem verdünntem Probengasvolumen abgelesen.

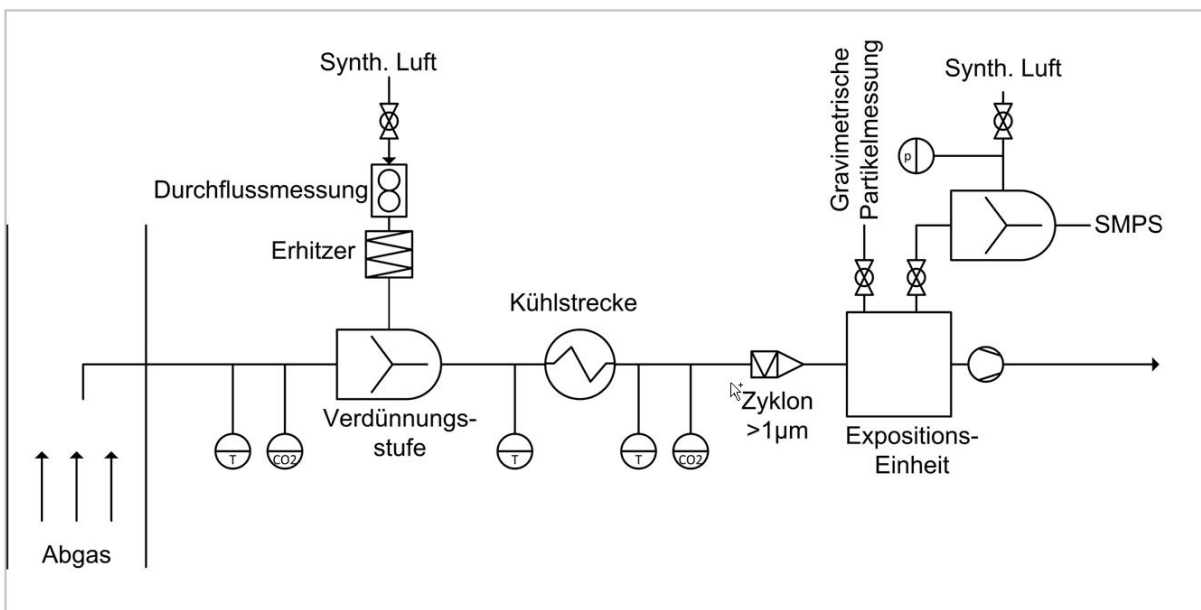


Abbildung 4.2: Schematische Anordnung der Abgasaufbereitung und der Messstellen

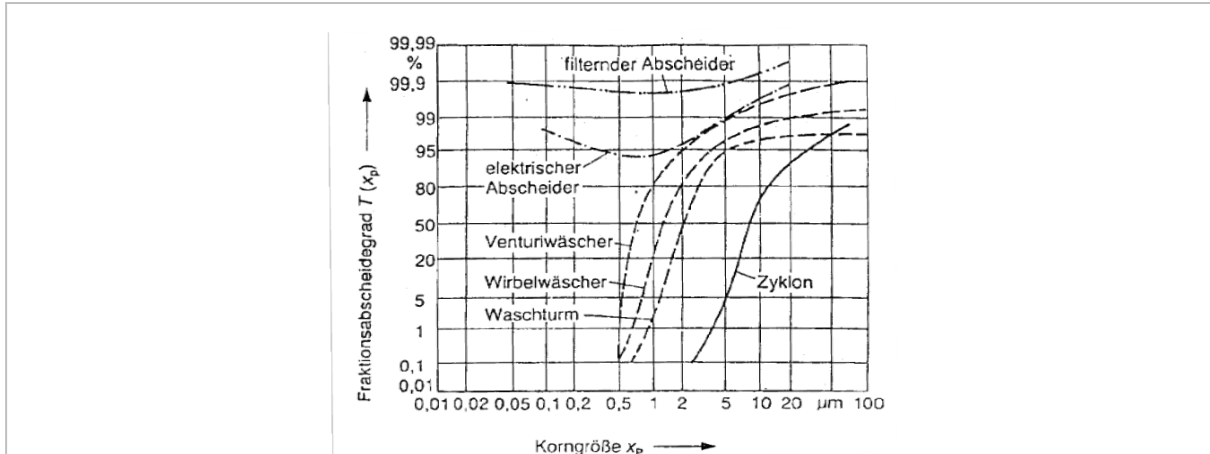


Abbildung 4.3: Zusammenhang von Fraktionsabscheidegrad und Korngröße verschiedener Partikelabscheider

Bevor das aufbereitete Aerosol ins Expositionssystem geführt wird, sollen in einem vorgeschalteten Zyklon Partikel größer 1  $\mu\text{m}$  abgeschieden werden. Der typische Zusammenhang von Fraktionsabscheidegrad und Korngröße eines Zyklons ist in Abb. 4.3 gezeigt.

Partikel mit einer Korngröße von ca. 5  $\mu\text{m}$ , werden mit einem Abscheidegrad von 5% abgeschieden, Partikel mit 10  $\mu\text{m}$  Korngröße werden zu ca. 70% abgeschieden.

Das Expositionssystem aus Abb. 4.4 [14] und [15], besteht aus zwei Schrankhälften. In der rechten Schrankhälfte befindet sich die temperierte Expositionseinheit zur Beaufschlagung der Lungenzellen mit dem Aerosol, in der linken die Datenerfassung und die Regel- und Steuereinheit.

#### linke Schrankhälfte

- Datenerfassung
- Regel- und Steuereinheit



#### rechte Schrankhälfte

- Temperierte Expositionseinheit
- Messfühler für Regelung

Abbildung 4.4: Das Karlsruher Expositionssystem

Ein PC mit einer LabVIEW basierten Datenerfassung zeichnet die Signale der Messfühler kontinuierlich auf. Nachfolgende Tab. 4.4 und das Fließbild in Abb. 4.5 geben eine Übersicht der kontinuierlich erfassten und geregelten bzw. gesteuerten Parameter.

Erfasste und geregelte Parameter	
Temperatur im Reaktor	erfasst / geregelt
Probenahmevolumenstrom	erfasst / geregelt
Feuchte im Reaktor	erfasst / geregelt
Schranktemperaturen	erfasst / geregelt
Außentemperatur	erfasst
Expositions volumenstrom	erfasst / geregelt
Unterdruck im System	erfasst
abgeschiedene Staubmasse	erfasst (Mikrowaage)

Tabelle 4.4: Erfasste und geregelte Parameter des Expositionssystems

Um die exponierten Lungenzellen in ihrer Vitalität nicht zu beeinträchtigen, wird der aerosolbeladene Probengasstrom auf 37°C temperiert und mittels eines Befeuchtungssystems auf mindestens 80 % rel. Feuchte eingestellt.

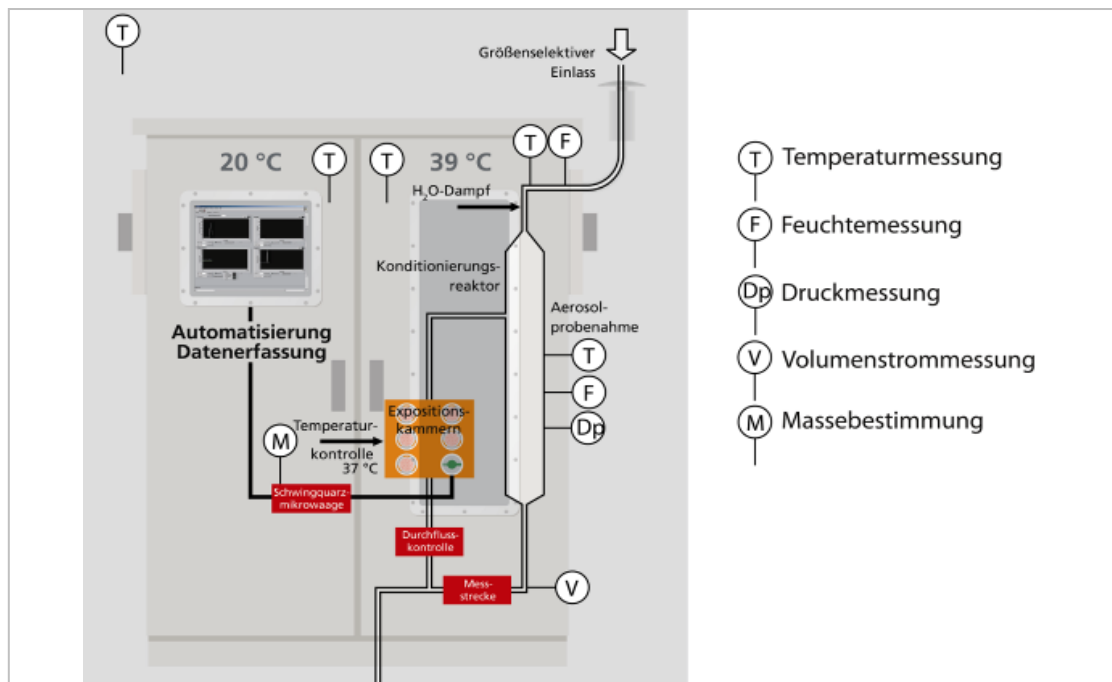


Abbildung 4.5: Fließbild und Messstellen des Expositionssystems [Mülhopt 2009]



Außerdem wird die komplette rechte Schrankhälfte auf 37°C gehalten, um eine Wasserdampfkondensation an kühleren Bauteilen zu vermeiden. Insgesamt beträgt der geregelte Probengasvolumenstrom 2,3 m<sup>3</sup>/h, wovon ein Teilvolumenstrom aus dem Konditionierungsreaktor (auch in Kurzform als Reaktor bezeichnet) in die einzelnen Zellexpositionskammern (siehe Abb. 4.6; VITROCELL Module) gelangt und dort über die Oberfläche der Lungenzellkulturen strömt, wo die größeren Partikel durch Impaktion und die kleineren Partikel unter Umständen durch Diffusion aufgenommen werden. Während der Exposition befinden sich die Lungenzellen in Transwell-Schalen auf einer durchlässigen Membran und haben Kontakt zu einem Nährmedium. In Tab. 4.5 sind die wichtigsten verfahrenstechnischen Parameter des Expositionssystems zusammengefasst.

Verfahrenstechnische Parameter	
Temperatur im Reaktor	37°C
Probenahme Volumenstrom	2,3 m <sup>3</sup> /h
Feuchte im Reaktor	min. 80% rel. Feuchte
Schranktemperatur	37°C
Zellexpositionskammern	5 Stück (in einer Kammer ist eine Mikrowaage eingebaut)
Expositionsvolumenstrom je Expositionskammer	0,1 NI/min

Tabelle 4.5: Verfahrenstechnische Parameter des Expositionssystems

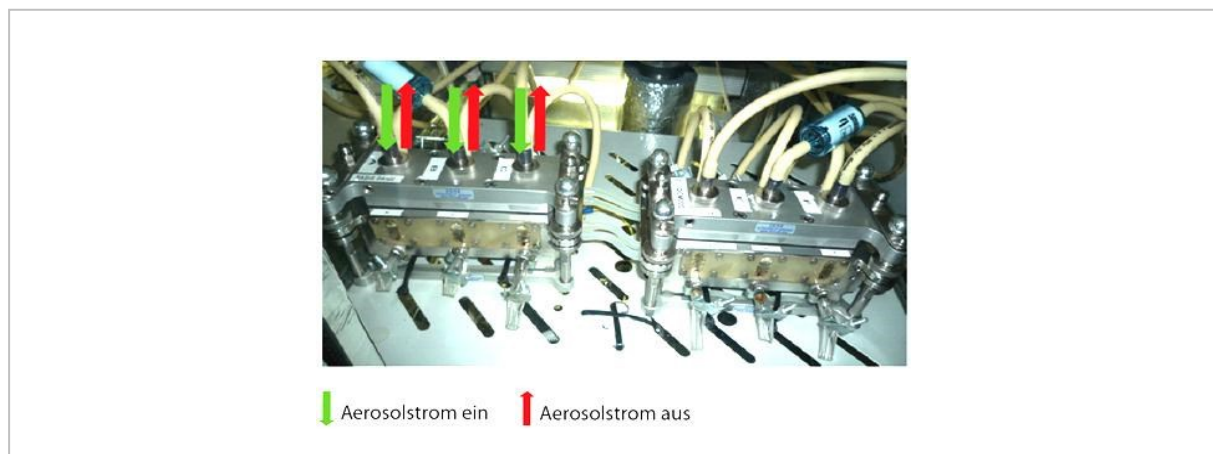


Abbildung 4.6: Zwei VITROCELL Module mit je 3 Expositionskammern

In Erweiterung zum vorangegangenen Projekt Nanotox I [3] sind die 5 Messkammern inzwischen mit Elektroden versehen, die durch Anlegen einer Hochspannung ein elektrisches Feld in der Expositionskammer erzeugen. Hierdurch wird Abscheiderate für Partikel erhöht (siehe Arbeitspaket 1). Während den Versuchen wurde eine Spannung von -1.000 Volt angelegt, die in der linken Schrankseite eingestellt und geregelt wird.

Aus dem Konditionierungsreaktor der Expositionseinheit wird Probengas für das SMPS-Messgerät (SMPS: Scanning Mobility Particle Sizer) und die gravimetrische Staubmessung nach VDI-Richtlinie 2066 Blatt 1 [16] entnommen. Der Probengasstrom für das SMPS wird aufgrund des Messbereichs noch weiter verdünnt.

#### 4.2.3 Beschreibung der eingesetzten Messtechnik

Zur Charakterisierung der Verbrennungsprozesse wurden wichtige Gaskonzentrationen im Abgas kontinuierlich erfasst. Die verwendeten Messgeräte und Messprinzipien, sowie die bei der Gerätekalibrierung verwendeten Prüfgaskonzentrationen sind in Tabelle 4.6 zusammengestellt.

Messgröße	Messgerät	Messprinzip	Prüfgas	Messbereich
CO <sub>2</sub> [Vol%]	Binos / Rosemont	nicht dispersive Infrarotabsorption	12,1 Vol%	0-20 Vol%
CO [ppm]	EL3020 / ABB	nicht dispersive Infrarotabsorption	798 ppm	0-3.000 ppm
CO [Vol%]	Binos / Rosemont	nicht dispersive Infrarotabsorption	0,706 Vol%	0-3 Vol%
O <sub>2</sub> [Vol%]	EL3020 / ABB	Paramagnetismus	8,1 Vol%	0-25 Vol%
VOC [ppm]	FID 123 / Testa	Flammenionisation	799 ppm	0-1.000 bzw. 0-10.000 ppm
CO <sub>2</sub> [Vol%] (verdünnte Abgasprobe)	Binos / Leybold-Heraeus	nicht dispersive Infrarotabsorption	12,1 Vol%	0-20 Vol%

Tabelle 4.6: Messgrößen, Messgerätetypen und Messprinzipien sowie verwendete Prüfgaskonzentrationen

Weitere kontinuierlich erfasste aber im Bericht nicht dargestellte Messgrößen sind:

- Unterdruck im Schornstein
- Probengastemperatur vor und nach der Kühlstrecke
- Wassertemperatur des Kühlkreises vor und nach der Kühlstrecke
- diverse Oberflächentemperaturen der Probengasstrecke zur Expositionseinheit (z.B. zwischen Zyklon und Expositionssystem).

Zur Charakterisierung der Partikel im Aerosol des Konditionierungsreaktors des Expositionssystems wurden folgende Größen bestimmt:

- Gesamtstaubkonzentration (gravimetrisch)
- Partikelgrößenverteilung und Partikelanzahlkonzentration (SMPS).

Zur Bestimmung der Gesamtstaubkonzentration wurde mit einem Planfilterkopfgerät Abgas aus dem Konditionierungsreaktor des Expositionssystems abgesaugt und die Partikelmasse über Wägung bestimmt. Die Messungen wurden in Anlehnung an die VDI-Richtlinie 2066, Blatt 1 [16] durchgeführt, der Messaufbau ist schematisch in Abb. 4.7 und als Foto in Abb. 4.8 links dargestellt.

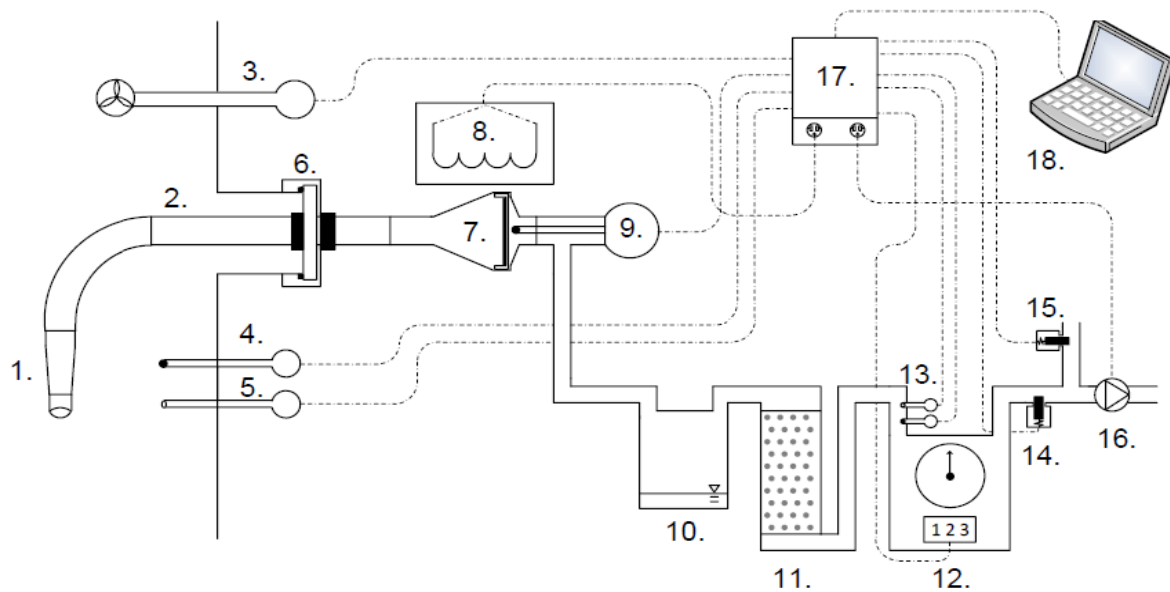


Abbildung 4.7: Schematischer Messaufbau zur Bestimmung der Gesamtstaubkonzentration nach Axalis [17]

- |                              |  |                                     |
|------------------------------|--|-------------------------------------|
| 1. Düse der Sonde            | 8. Filterkopfheizung                     | 14. Magnetventil (Teilvolumenstrom) |
| 2. Probenahme Vorrichtung    | 9. Thermoelement (Filter)                | 15. Magnetventil (Bypass)           |
| 3. Flügelrad                 | 10. Tropfenabscheider                    | 16. Pumpe                           |
| 4. Thermoelement (Abgas)     | 11. Trockenturm mit Silikagel            | 17. Schaltschrank                   |
| 5. Druckdose                 | 12. Gaszähler mit Counter                | 18. Laptop                          |
| 6. Sondenhalterung           | 13. Thermoelement und Druckdose (Gasuhr) |                                     |
| 7. Filterkopf mit Planfilter |  |                                     |

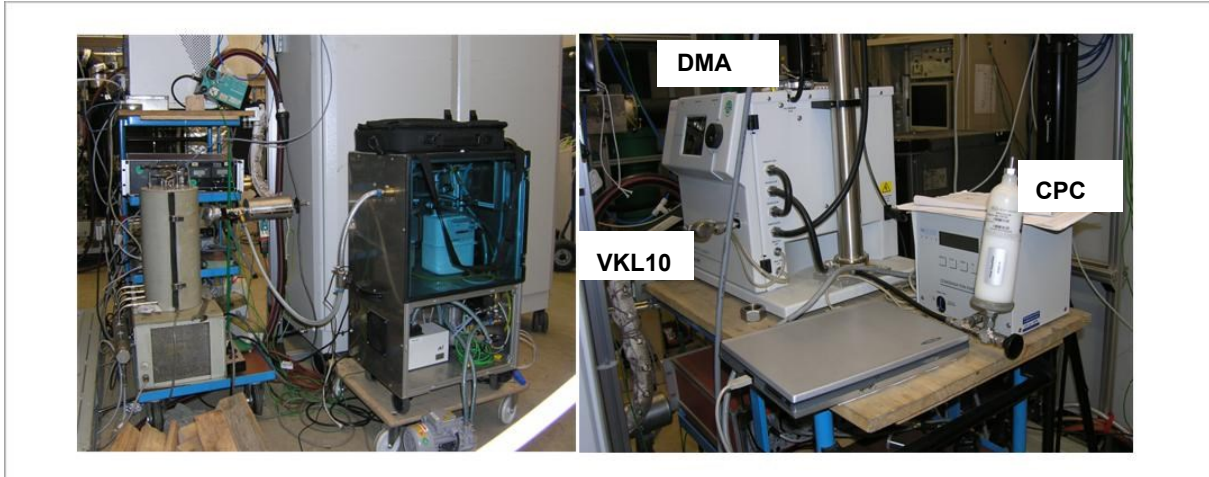


Abbildung 4.8: links: Aufbau der Staubmessung mit Planfilterkopfgerät in Heizmanschette, montiert am Probengasausgang des Expositionssystems, rechts Gasuhr, Trockenturm, Pumpe  
rechts: SMPS bestehend aus DMA (Differential Mobility Analyzer), CPC (Condensable Particle Counter), Verdünnungsstufe VKL10 und Laptop zur Datenerfassung und Programmsteuerung

Die im Probenweg befindlichen Partikelablagerungen wurden nicht, wie in der VDI-Richtlinie vorgesehen, durch Spülung bestimmt und sind deshalb auch nicht berücksichtigt. Außerdem erfolgt eine Aufbereitung der Abgasprobe für die Expositionseinheit, die aus Verdünnung mit synthetischer Luft, Abkühlung auf ca. 37°C und Befeuchtung auf ca. 90% relative Luftfeuchte besteht. Aus diesen Gründen können sich die Partikelkonzentrationen im Abgas von den am Probengasausgang (Absaugung aus Konditionierungsreaktor) der Expositionseinheit gemessenen Konzentrationen unterscheiden.

Zur Ermittlung der Partikelanzahlkonzentration in Abhängigkeit der Partikelgröße im Konditionierungsreaktor des Expositionssystems wurde ein Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS, siehe Abb. 4.8 rechts) eingesetzt. Um eine Wasserdampfkondensation und Messbereichsüberschreitungen zu verhindern, war dem SMPS eine weitere Verdünnungsstufe (Palas, VKL10) vorgeschaltet, die das bereits verdünnte Probengas nochmals um ca. den Faktor 10 verdünnt. Die SMPS Messungen wurden quasi-kontinuierlich in Intervallen von 6 Minuten in einem Messbereich für die Partikelgröße von 9,82 nm bis 300 nm durchgeführt.

## 4.2.4 Erarbeitung stabiler Verbrennungsparameter

### Kaminofen

Um je Betriebszustand reproduzierbare Verbrennungen am Kaminofen zu erhalten, wurde standardisiert vorgegangen. Festgelegt wurden in Vorversuchen die Anzahl der Holzstücke und deren Form und Größe (Oberfläche), die Nachlegezeitpunkte (CO<sub>2</sub>-Konzentration), die Art der Holzeinlage (Ausrichtung, Masse, definiertes Schüren) sowie die Verbrennungslufteinstellungen (Primärluft PL / Sekundärluft SL) für die jeweiligen Betriebszustände. Der Schornsteinzug wurde immer so eingestellt, dass im Ausbrand 12 Pa erreicht wurden. Die Dauer eines Abbrandes beträgt bei guter Verbrennung ca. 40 min und ca. 55 min. bei schlechter Verbrennung. Die Holzaufgabemenge betrug 1.250 g je Abbrand. Nach einem Abbrand wurde beim Erreichen einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 3,0 Vol% wieder die gleiche Menge Holz nachgelegt. Grundsätzlich wurde erst nach einer Erwärmung des Ofens auf eine mittlere Betriebstemperatur mit den Expositionsversuchen gestartet. Die genauen Stellungen der Schieberegler sind in Tab. 4.7 dargestellt, wobei 1 einem maximal geöffneten und 0 der minimalen Reglerstellung entspricht.

Parameter	Betriebszustand - Verbrennungsqualität		
	gut	schlecht	sehr schlecht
Stellung Regler für Primärluft 0-1	2/3	2/3	1
Stellung Regler für Sekundärluft 0-1	1	1/3	0
mittlere O <sub>2</sub> -Konzentration im Abgas in Vol%	14,2	13,6	11,8

Tabelle 4.7: Einstellung der Verbrennungsregler beim Kaminofen für die unterschiedlichen Betriebszustände

## Pelletofen

Am Pelletofen wurden nahezu konstanten Verbrennungsbedingungen und Leistungsstufe 4 (Wärmeleistung 7,6 kW) eingestellt. Die Verbrennung verläuft kontinuierlich, es gibt keinen Phasenabbrand wie bei der chargenweisen Beschickung im Scheitholzofen.

Die normierten Dimensionen und der homogene Wassergehalt der Pellets, sowie die automatisierte Beschickung sorgen für geringe Streubreiten bei den Wiederholungen. Die Reproduzierbarkeit ist dementsprechend besser als bei Messungen am Kaminofen. Die Lufteinstellungen können über das Saugzuggebläse des Ofens und die Fördermenge pro Zeit über das eingestellte Intervall der Förderschnecke geändert werden. Bei den Versuchen wurde nur die Lufteinstellung variiert, die Pelletförderung wurde nicht verändert. Eine schlechtere Verbrennung mit verschlechterten Sauerstoffbedingungen wurde somit bei gleich viel Brennstoff hervorgerufen, siehe Tab. 4.8. Der Schornsteinzug wurde über das Hallengebläse konstant gehalten (~ 12 Pa).

Der Pelletofen wurde vor den jeweiligen Expositionsversuchen mindestens 20 Minuten vorgeheizt.

Parameter	Betriebszustand - Verbrennungsqualität	
	gut	schlecht
Abgasgebläse	75 ± 5 Pa	60 ± 5 Pa
Förderzeit pro Intervall der Schnecke	6,3 (= NWL)	6,3 (= NWL)
mittlere O <sub>2</sub> -Konzentration im Abgas in Vol%	9,7	12,9

Tabelle 4.8: Einstellung der Verbrennungsgüte durch Veränderung der Verbrennungsluftmenge und der Brennstofffördermenge (NWL = Nennwärmeleistung)

### 4.3 Betrieb des Expositionssystems und Begasung der Zellen

Die Holzfeuerungsanlagen wurden mit unterschiedlichen Betriebsparametern bei guten und schlechten Verbrennungsbedingungen durchgeführt, so dass eine große Bandbreite der praxisüblichen Partikelemissionen generiert werden konnte. Abb. 4.9 zeigt die beim Kamin- und Pelletofen eingestellten Verbrennungszustände und beschreibt die Unterschiede der Verbrennungszustände.

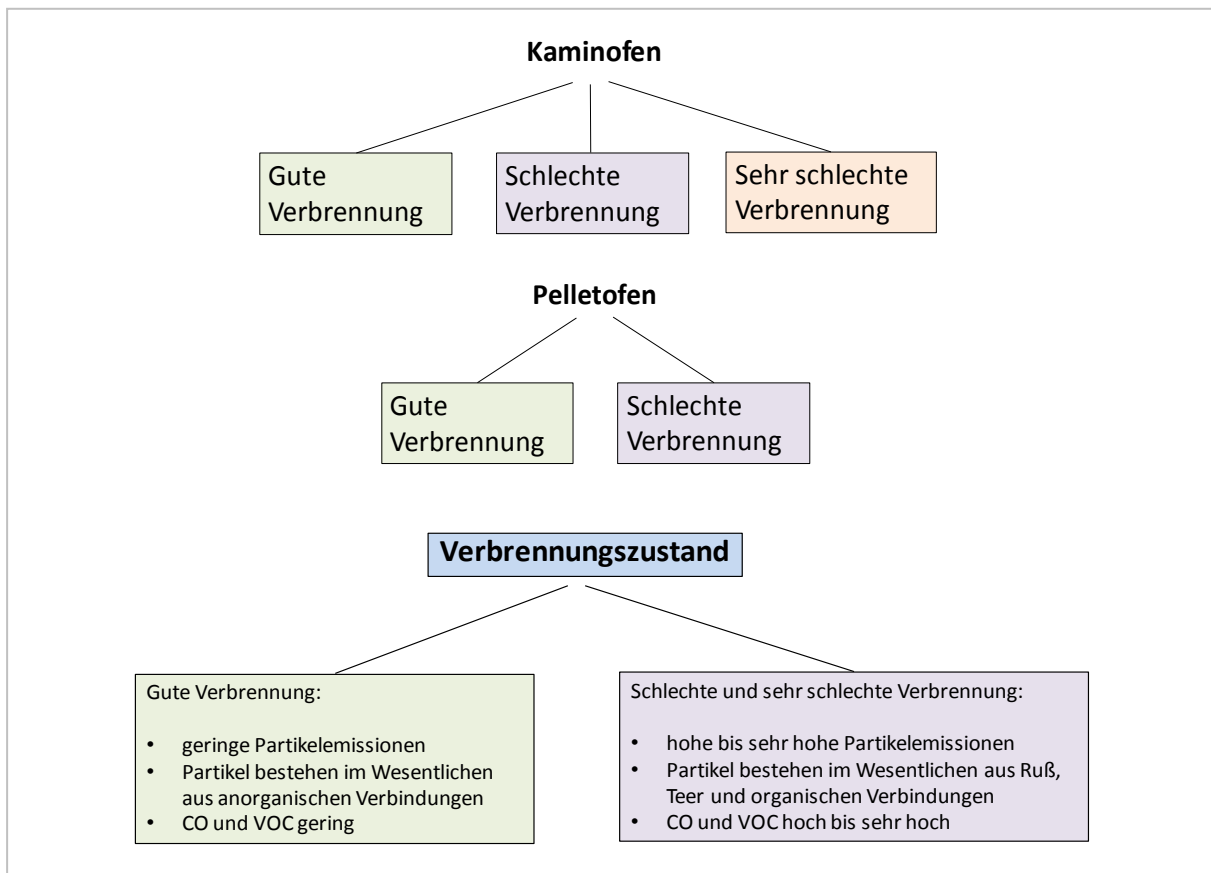


Abbildung 4.9: Untersuchte Verbrennungszustände beim Kamin- und Pelletofen und Charakterisierung des Verbrennungszustandes

Bei jedem Zellexpositionsversuch wurden insgesamt 5 Expositionskammern, welche mit Lungenzellen bzw. TEM-Grids bestückt waren, gleichzeitig mit dem Probengasstrom beaufschlagt. Die Belegung der einzelnen Expositionskammern ist in Tab. 4.9 exemplarisch für einen Versuch dargestellt.



Abbildung 4.10: TEM- Grids in den Transwell-Schalen

In einigen Begasungsversuchen wurden jeweils in den Vitrocell-Kammern parallel zu den Zellmembranen TEM-Grids (TEM: Transmissions-Elektronen-Mikroskop) gegenüber dem Aerosol exponiert. Unter einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop können die auf den TEM-Grids abgeschiedenen Agglomerate optisch ausgewertet werden (siehe Arbeitspaket 12). Abb. 4.10 zeigt die verwendeten TEM-Grids in der Expositionseinheit.

<b>linkes Modul</b>		
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
gefiltertes Rohgas SK-MES	ungefiltertes Rohgas SK-MES	Quarz Mikrowaage

<b>rechtes Modul</b>		
<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
gefiltertes Rohgas A549	ungefiltertes Rohgas A549	ungefiltertes Rohgas TEM-Grid

Tabelle 4.9: Beispiel für eine Belegung der einzelnen Expositionskammern in den beiden VITROCELL Modulen

Bei den Versuchen wurden 2 unterschiedliche Zelllinien eingesetzt, zuerst die Zelllinie A549 und dann die robustere Zelllinie SK-MES. Tab. 4.10 gibt einen Überblick der durchgeführten Zellexpositionsversuche und der Betriebseinstellungen.



Nr.	Expositions-Versuch			Holzfeuerung	Verbrennungszustand
	Datum	Versuchszeit	Dauer		
1	26.06.2012	11:13 – 15:13	4 h	Kaminofen	gute Verbrennung
2	26.06.2012	15:31 – 17:31	2 h	Kaminofen	gute Verbrennung
3	27.06.2012	10:10 – 12:10	2 h	Kaminofen	gute Verbrennung
4	27.06.2012	14:33 – 18:33	4 h	Kaminofen	gute Verbrennung
5	28.06.2012	9:59 – 11:59	2 h	Kaminofen *	gute Verbrennung
6	28.06.2012	12:30 – 16:30	4 h	Kaminofen	gute Verbrennung
7	03.07.2012	9:38 – 11:48	2 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
8	03.07.2012	12:27 – 16:27	4 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
9	04.07.2012	9:18 – 11:18	2 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
10	04.07.2012	11:53 – 15:53	4 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
11	05.07.2012	09:44 – 10:48	2,5 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
12	05.07.2012	12:24 – 16:24	4 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
13	24.07.2012	10:50 – 12:50	2 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
14	24.07.2012	13:32 – 15:32	2h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
15	25.07.2012	09:34 – 11:34	2 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
16	25.07.2012	12:23 – 16:23	4 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
17	26.07.2012	9:50 – 11:50	2 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
18	26.07.2012	13:00 – 15:00	2 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
19	25.03.2009	15:27 – 17:27	2 h	Kaminofen	schlechte Verbrennung
20	31.07.2012	9:24 – 11:24	2 h	Pelletofen	gute Verbrennung
21	31.07.2012	11:48 – 14:48	3 h	Pelletofen	gute Verbrennung
22	01.08.2012	8:42 – 10:42	2 h	Pelletofen	schlechte Verbrennung
23	01.08.2012	10:53 – 14:53	4 h	Pelletofen	schlechte Verbrennung
24	02.08.2012	09:01 – 13:01	4 h	Pelletofen	gute Verbrennung
25	02.08.2012	13:15 – 17:15	4 h	Pelletofen	schlechte Verbrennung
26	05.12.2012	12:25 - 14:25	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
27	05.12.2012	14:55 - 16:55	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
28	06.12.2012	10:08 - 12:08	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
29	06.12.2012	12:30 - 14:30	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
30	07.12.2012	10:00 - 12:00	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
31	07.12.2012	12:23 - 14:23	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
32	10.12.2012	10:18 - 12:18	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
33	10.12.2012	12:37 - 14:37	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
34	10.12.2012	15:35 - 16:40	65 min	Kaminofen**	sehr schlechte Verbrennung
35	11.12.2012	11:32 - 13:32	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
36	11.12.2012	13:15 - 17:15	4 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
37	12.12.2012	10:40 - 12:40	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung
38	12.12.2012	13:06 - 15:06	2 h	Kaminofen	sehr schlechte Verbrennung

Tabelle 4.10: Durchgeführte Zellexpositionsversuche am Kamin- und Pelletofen

## 4.4 Auswertung der Verbrennungsmesswerte

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Messungen für die untersuchten gasförmigen Abgasbestandteile der verschiedenen Feuerungen bei den unterschiedlichen Betriebszuständen beschrieben.

### 4.4.1 Messergebnisse der gasförmigen Emissionen aus der Holzfeuerungen

Die Abgaskonzentrationen von Sauerstoff, Kohlenmonoxid, Kohlendioxid und leicht flüchtigen organischen Kohlenwasserstoffen (VOC) wurden während der durchgeführten Expositionsversuche kontinuierlich erfasst. Die CO und VOC-Konzentrationen stellen ein Maß für die Vollständigkeit der Verbrennungen dar. Als Produkte unvollständiger Verbrennung steigen die CO- und VOC-Konzentrationen im Verbrennungsverlauf bei schlechten Betriebsbedingungen oft gleichzeitig an.

Die Gaskonzentrationen wurden direkt im Abgasrohr bestimmt. Das in die Expositionskammern geleitete Aerosol wurde hingegen ca. 3-fach verdünnt und in der Expositionseinheit zusätzlich mit einem Luftstrom befeuchtet. Dadurch entspricht es nur einen Anteil der Gaskonzentrationen wie sie im Abgasrohr bestimmt wurden.

Lediglich die CO<sub>2</sub>-Konzentration wurde, um das Verdünnungsverhältnis überprüfen und ggf. nachregeln zu können, aus dem verdünnten Abgas bestimmt.

#### **Gasförmige Emissionen aus dem Kaminofen**

Sowohl bei guter als auch bei schlechter oder sehr schlechter Verbrennung steigen beim Kaminofen die CO-Konzentrationen im Ausbrand an. Die VOC- und CO-Konzentrationen haben einen charakteristischen Höhepunkt beim Anbrand, beide Emissionen sinken bei guter Verbrennung in der Hauptverbrennungsphase, wohingegen das mittlere Niveau beider Stoffe bei unvollständiger Verbrennung auch hier hoch bleibt.

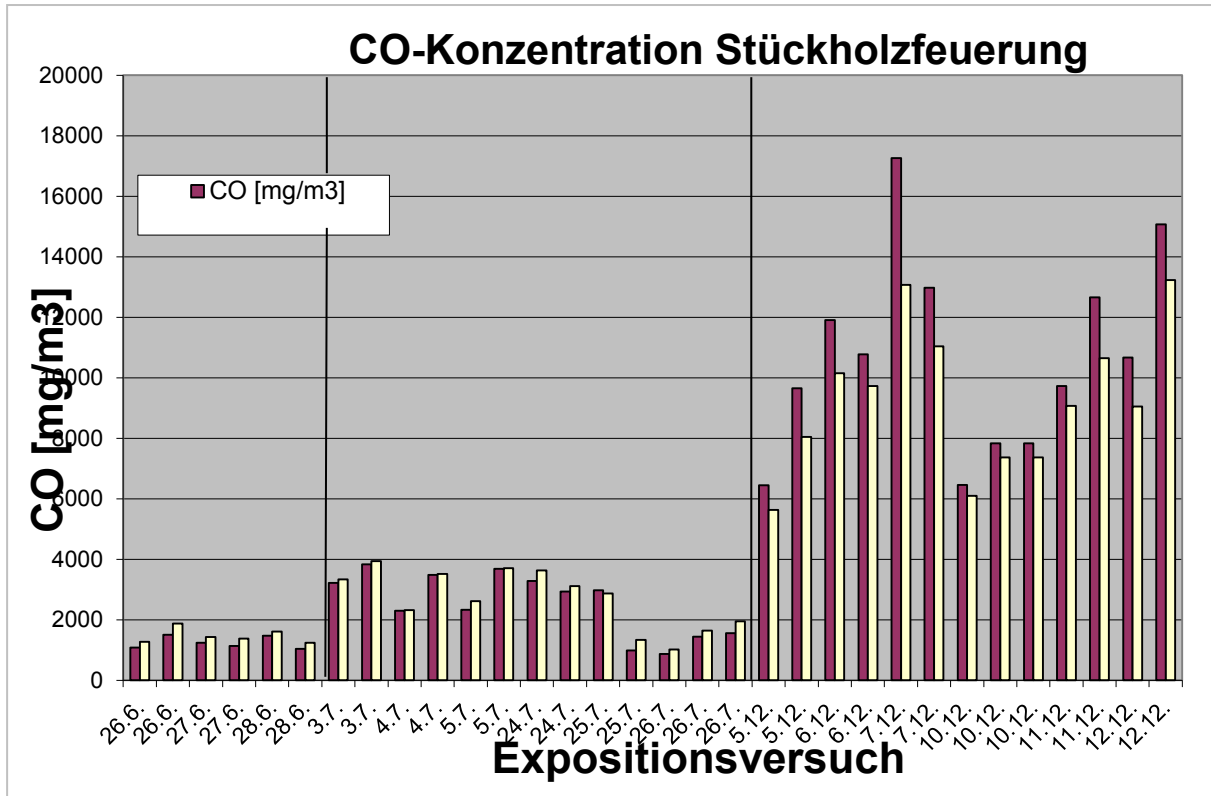


Abbildung 4.11: Mittlere CO-Konzentrationen bei den einzelnen Expositionsversuchen: gute Verbrennung / schlechte Verbrennung / sehr schlechte Verbrennung am Kaminofen

Bei der schlechten Verbrennung liegen die CO-Konzentrationen des Kaminofens im Bereich von 3.000 mg/m<sup>3</sup>, das Minimum liegt bei 1.013 mg/m<sup>3</sup>, siehe Abb. 4.11.

Durch eine stärkere Reduzierung der Sekundärluft lässt sich die Verbrennungsgüte noch weiter verschlechtern. Bei sehr schlechter Verbrennung liegen die CO - Konzentrationen beim Kaminofen im Maximum bei 13.070 mg/m<sup>3</sup> (bei 13 Vol% O<sub>2</sub>).

Die mittlere VOC-Emission bei den Expositionsversuchen mit guter Verbrennung liegt maximal bei 143 mg/m<sup>3</sup>, siehe Abb. 4.12.

Bei den Expositionsversuchen mit schlechter Verbrennung am Kaminofen liegt das Maximum der mittleren VOC-Emission bei 284 mg/m<sup>3</sup> (bei 13 Vol% O<sub>2</sub>).

Die VOC-Konzentrationen der sehr schlechten Verbrennung mit einem Maximum bei 1.026 mg/m<sup>3</sup> (bei 13 Vol% O<sub>2</sub>) zeigen eine deutliche Erhöhung gegenüber der schlechten Verbrennung.

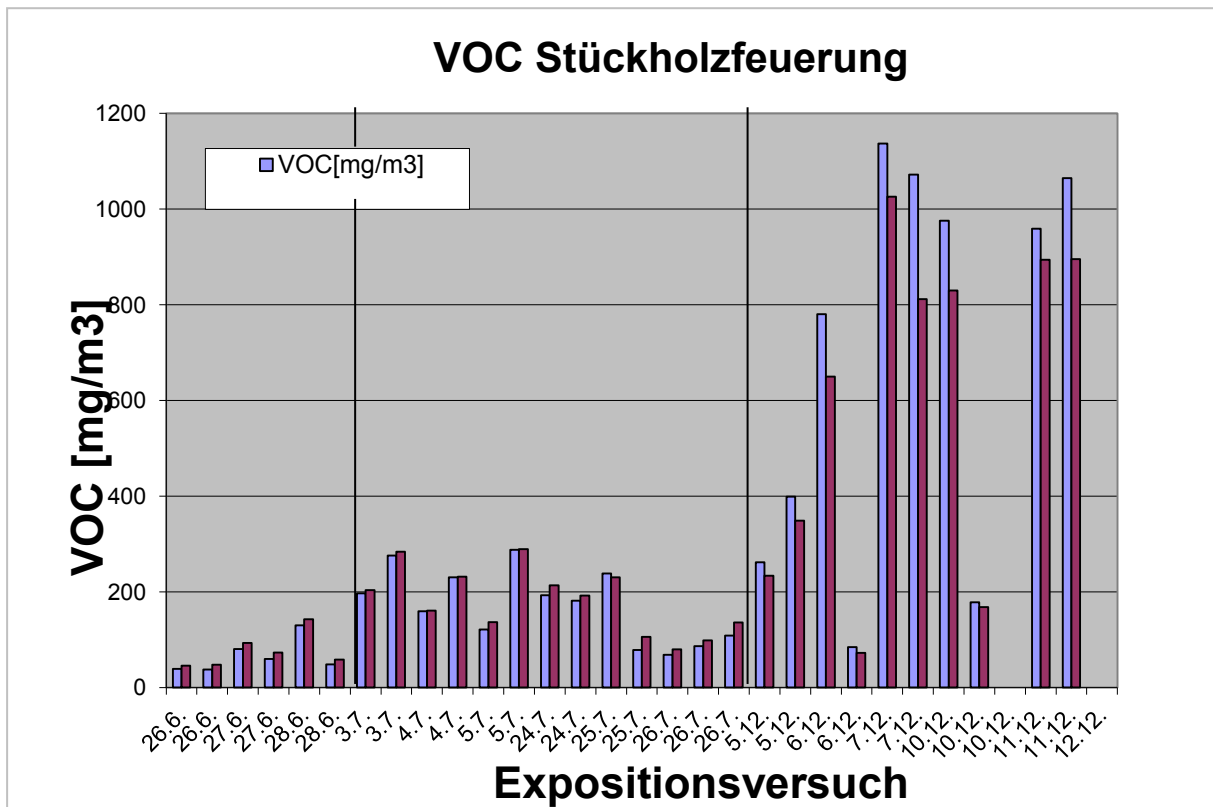


Abbildung 4.12: Mittlere VOC-Konzentrationen bei den einzelnen Expositionsversuchen : gute Verbrennung / schlechte Verbrennung / sehr schlechte Verbrennung am Kaminofen

Der Verlauf der gemessenen CO-, VOC- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei guter Verbrennung ist in Abb. 4.13 am Beispiel des Versuchs Nr. 3 am Kaminofen dargestellt. Es lassen sich die einzelnen Char- genabbrände, mit Anbrandphase, Hauptverbrennung und Ausbrandphase gut erkennen. In der Haupt- verbrennung sind die CO- und VOC-Konzentrationen relativ lange in einem stationären niedrigen Be- reich, was eine nahezu vollständige Verbrennung kennzeichnet. Die CO<sub>2</sub>-Konzentrationen befinden sich im Mittel des Gesamtabbrandes bei knapp über 6 Vol% (siehe Tab. 4.11), wobei die CO<sub>2</sub>-Maxima zwischen 11,5 und 13 Vol% liegen.

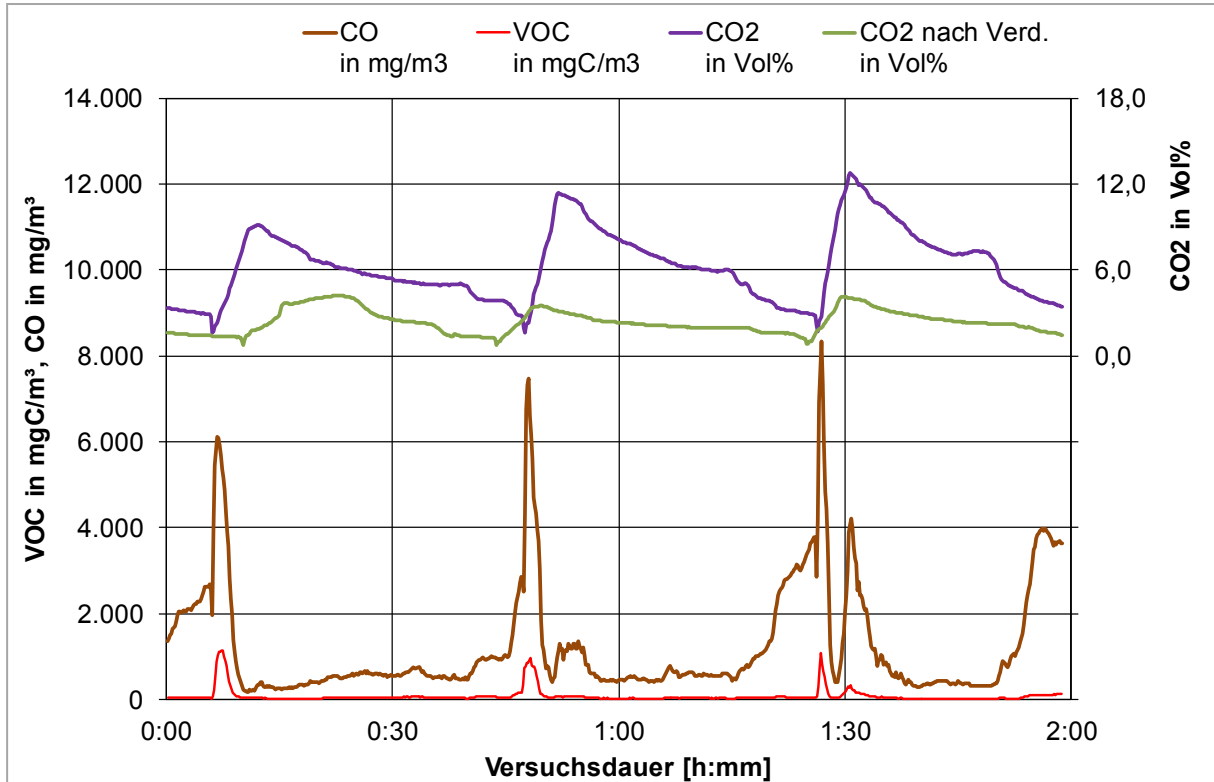


Abbildung 4.13: Verlauf der gemessenen CO-, VOC- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei guter Verbrennung am Kaminofen beispielhaft für Expositionsversuch Nr. 3 vom 27.6.2012

Expositionsversuch Nr.	O <sub>2</sub> [Vol%]	bei 13 Vol% O <sub>2</sub>		CO <sub>2</sub> [Vol%]	Abgastemperatur [°C]
		CO [mg/m <sup>3</sup> ]	VOC [mgC/m <sup>3</sup> ]		
1	14,2	1.274	46	6,3	197
2	14,6	1.877	48	5,9	191
3	14,1	1.435	93	6,3	193
4	14,4	1.377	73	5,9	191
5	13,7	1.614	143	6,9	209
6	14,3	1.243	58	6,2	201

Tabelle 4.11: Mittelwerte von Gaskonzentrationen und Abgastemperaturen für die Chargenabbrände der Expositionsversuche beim Kaminofen mit guter Verbrennung

Der Verbrennungsverlauf für die Einstellung schlechte Verbrennung ist in Abb. 4.14 dargestellt. Die  $\text{CO}_2$ -Konzentration ist im Maximum für die einzelnen Chargenabbrände wie auch im Mittel der Expositionsversuche höher als bei der guten Verbrennung, die CO- und VOC-Konzentrationen sind ebenfalls meist höher, was auf lokale Luftmangelsituationen hinweist. Der Vergleich der auf 13 Vol%  $\text{O}_2$  bezogener CO-Konzentrationen zeigt, dass die schlechte Verbrennung meist wesentlich schlechter ist als die gute Verbrennung. Der feuerungstechnische Wirkungsgrad ist dabei ähnlich, denn die Abgastemperaturen liegen mit rund  $190^\circ\text{C}$  bis  $195^\circ\text{C}$  fast gleich. Es treten signifikante VOC-Konzentrationen während der Hauptverbrennungsphase auf, die CO-Konzentration erreicht maximal über  $15.000\text{ mg/m}^3$ , gegenüber maximal  $8.500\text{ mg/m}^3$  bei gutem Abbrand.

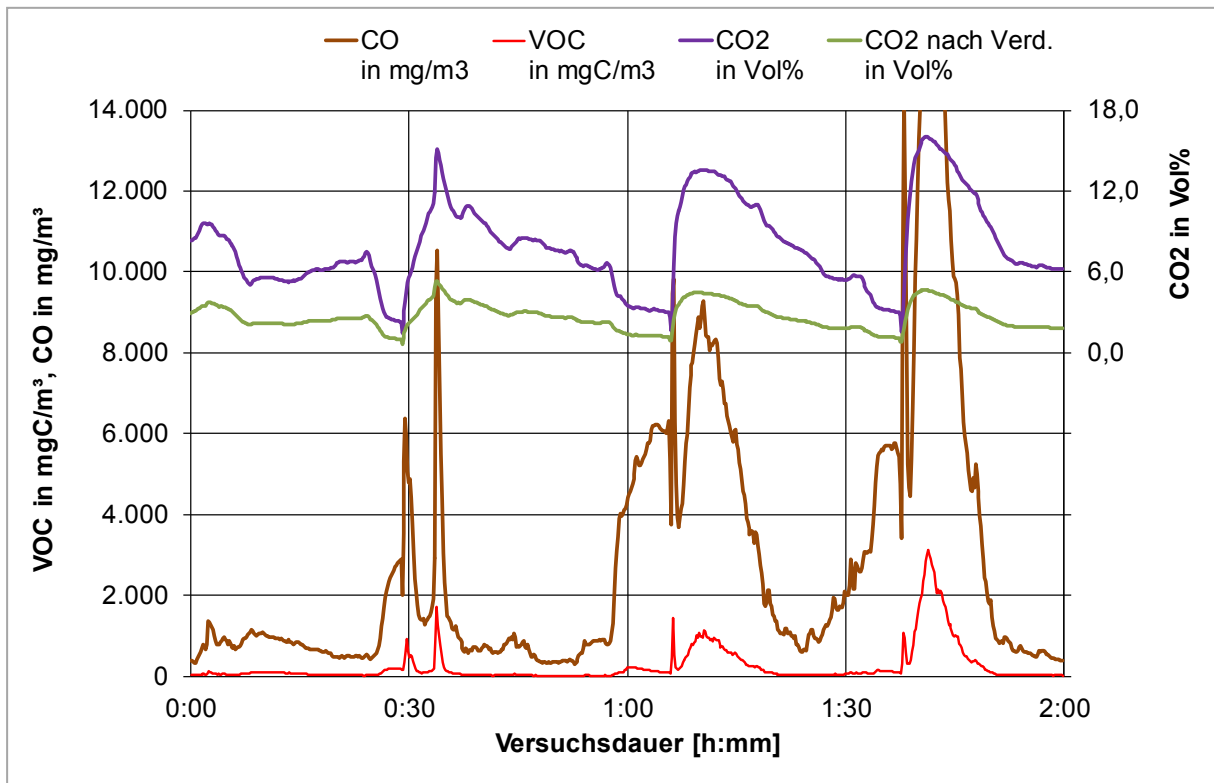


Abbildung 4.14: Verlauf der gemessenen CO-, VOC und  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen bei schlechter Verbrennung am Kaminofen beispielhaft für Expositionsversuch Nr.15 vom 25.7.2012

Die Mittelwerte der gemessenen Gaskonzentrationen und Abgastemperaturen für die Chargenabbrände der Expositionsversuche beim Kaminofen mit schlechter Verbrennung sind in Tab. 4.12 dargestellt.

Expositions- versuch Nr.	O <sub>2</sub> [Vol%]	CO bei 13 Vol% O <sub>2</sub> [mg/m <sup>3</sup> ]	VOC [mgC/m <sup>3</sup> ]	CO <sub>2</sub> [Vol%]	Abgastemperatur [°C]
7	13,3	3.337	204	7,3	194
8	13,2	3.935	276	7,4	191
9	13,1	2.323	161	7,5	194
10	13,1	3.510	232	7,4	196
11	13,9	2.620	137	6,7	178
12	13,0	3.706	289	7,5	183
13	13,8	3.629	214	7,0	179
14	13,5	3.109	193	7,2	185
15	12,7	2.873	231	7,9	175
16	15,1	1.330	106	5,6	197
17	14,1	1.013	80	6,4	184
18	14,0	1.637	99	6,5	185
19	14,6	1.949	136	5,8	185

Tabelle 4.12: Mittelwerte von Gaskonzentrationen und Abgastemperaturen für die Chargenabbrände der Expositionsversuche beim Kaminofen mit schlechter Verbrennung

Abb. 4.15 zeigt den Verlauf der gemessenen CO-, VOC- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei sehr schlechter Verbrennung am Beispiel vom Versuch Nr. 30.

Die CO-Konzentrationen sinken nur für sehr kurze Zeit während der Hauptverbrennung auf ihr niedrigstes Level, maximal treten Spitzenwerte von 40.000 mg/m<sup>3</sup> auf. Die CO<sub>2</sub>-Konzentrationen liegen in der Hauptverbrennung im Bereich von 14 Vol%.

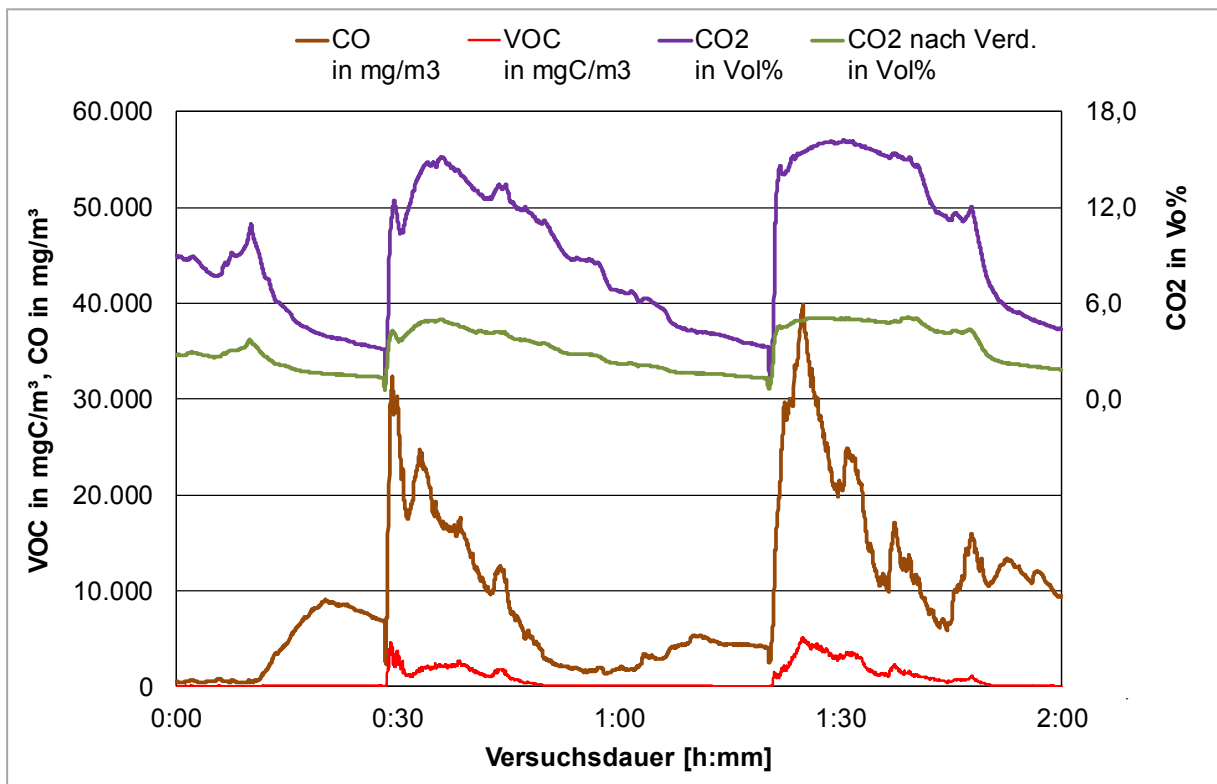


Abbildung 4.15: Verlauf der gemessenen CO-, VOC und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei sehr schlechter Verbrennung am Kaminofen beispielhaft für Expositionsversuch Nr.30 vom 6.12.2012



Die Mittelwerte der gemessenen Gaskonzentrationen und Abgastemperaturen für die Char-  
 genabbrände der Expositionsversuche beim Kaminofen mit sehr schlechter Verbrennung sind in Tab.  
 4.13 dargestellt. Die Verbrennungszustände beim Kaminofen sind eindeutig unterscheidbar und konn-  
 ten mit akzeptabler Streubreite reproduziert werden.

Expositions- versuch Nr.	O <sub>2</sub> [Vol%]	CO	VOC	CO <sub>2</sub> [Vol%]	Abgastemperatur [°C]
		bei 13 Vol% O <sub>2</sub> [mg/m <sup>3</sup> ]	[mgC/m <sup>3</sup> ]		
26	12,0	5.613	234	8,5	133
27	11,8	5.627	349	8,6	131
28	11,4	8.042	650	9,2	142
29	11,6	10.156	*	8,7	138
30	12,1	9.723	1.026	7,8	140
31	10,4	13.070	812	9,7	142
32	11,6	11.044	830	8,7	146
33	12,5	6.096	168	8,0	136
34	12,5	7.364	*	7,9	139
35	12,4	9.069	894	8,2	135
36	11,5	10.651	896	8,9	140
37	11,6	9.050	*	8,8	146
38	11,9	13.230	*	8,1	143

Tabelle 4.13: Mittelwerte von Gaskonzentrationen und Abgastemperaturen für die Chargenabbrände der Expositionsversuche beim Kaminofen mit sehr schlechter Verbrennung (\* Messgeräteausfall)

## Gasförmige Emissionen aus dem Pelletofen

Für die durchgeführten Expositionsversuche mit dem Pelletofen liegt das Maximum der CO-Konzentration für die gute Verbrennung bei  $142 \text{ mg/m}^3$  (bei 13 Vol%  $\text{O}_2$ ), siehe Abb. 4.16. Bei schlechter Verbrennung ergab sich eine maximale CO-Konzentrationen von  $662 \text{ mg/m}^3$  (bei 13 Vol%  $\text{O}_2$ ), siehe Abb. 4.16. Beim Versuch vom 01.08, dem ersten mit schlechter Verbrennungseinstellung, kam es zu einer kurzzeitigen Notabschaltung des Pelletofens wegen zu geringem Unterdruck im Schornstein, wodurch sich sehr hohe CO- und VOC- Werte ergaben. Der nächst höhere Wert der schlechten Verbrennungseinstellung liegt bei einer Konzentration von  $205 \text{ mg/m}^3$  CO (bei 13 Vol%  $\text{O}_2$ ). Die CO-Emissionswerte der Pelletfeuerung liegen somit stark unter den Werten der Stückholzfeuerung. Ebenso sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der guten und schlechten Verbrennung erkennbar.

Die mittleren VOC-Konzentrationen bei guter Verbrennung (Maximum bei  $3 \text{ mg/m}^3$ ) liegen nahe an den Werten für die schlechte Verbrennung (Maximum bei  $5 \text{ mg/m}^3$ ). Ausgenommen wurde der erste Wert der schlechten Verbrennung (Versuch vom 1.08), welcher wegen technischer Probleme des Ofens stark erhöht war.

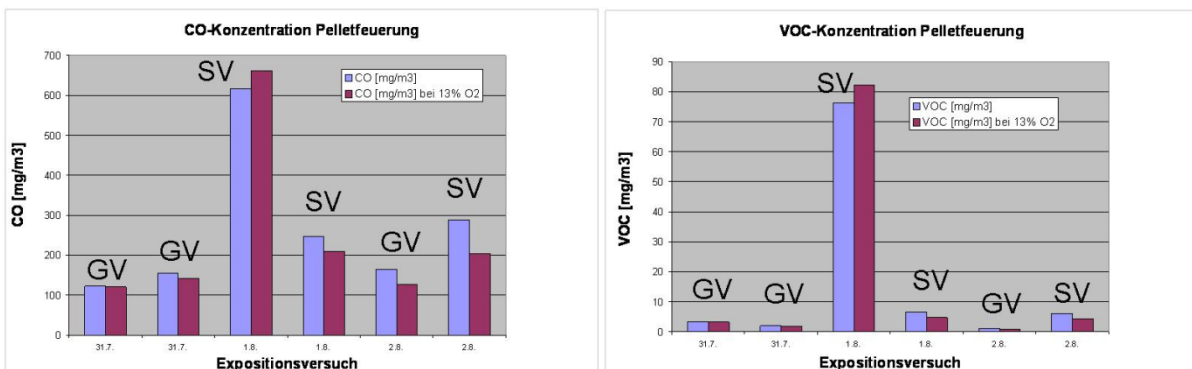


Abbildung 4.16: Mittlere CO-Konzentrationen (links) und VOC-Konzentrationen (rechts) bei den einzelnen Expositionsversuchen am Pelletofen (GV= gute Verbrennung / SV= schlechte Verbrennung)

Die einzelnen Messwerte der CO- und VOC-Konzentrationen streuen relativ stark um ihren Mittelwert, siehe Verbrennungsverlauf in Abb. 4.17.

Bei den Untersuchungen von Nanotox I war ein deutlicher Anstieg der mittleren CO- und VOC-Konzentrationen mit zunehmender Betriebsdauer zu beobachten, was auf eine Verschlackung der Brennerschale und dem dadurch verursachten Luftmangel zurückzuführen war. Dieser Effekt blieb diesmal nahezu aus. Die Mittelwerte der gemessenen Gaskonzentrationen und Abgastemperaturen für die Expositionsversuche beim Pelletofen mit guter Verbrennung zeigt Tab. 4.14.

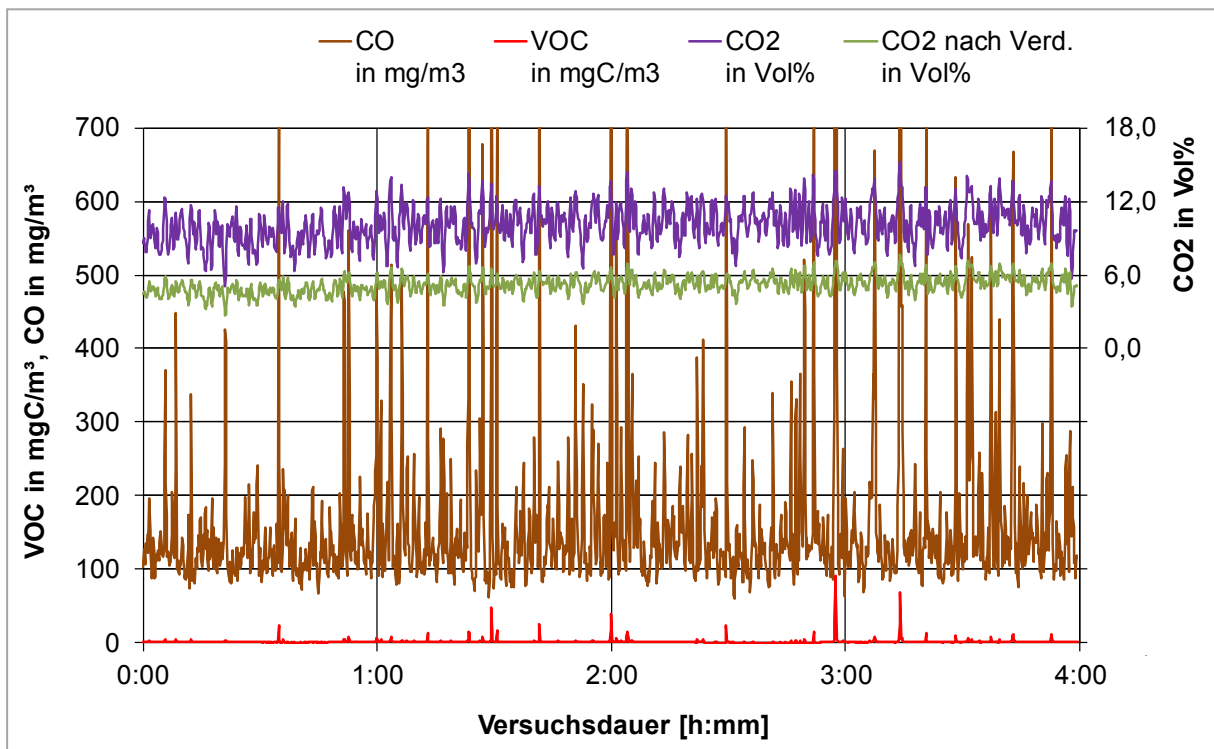


Abbildung 4.17: Verlauf der gemessenen CO-, VOC und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei guter Verbrennung am Pelletofen beispielhaft für Expositionsversuch Nr.24 vom 2.8.2012

Expositionsversuch Nr.	O <sub>2</sub> [Vol%]	CO	VOC	CO <sub>2</sub> [Vol%]	Abgastemperatur [°C]
		bei 13 Vol% O <sub>2</sub> [mg/m <sup>3</sup> ]	bei 13 Vol% O <sub>2</sub> [mgC/m <sup>3</sup> ]		
20	12,9	121	3	7,8	133
21	12,2	142	2	8,5	164
24	10,6	126	1	10,1	193

Tabelle 4.14: Mittelwerte von Gaskonzentrationen und Abgastemperaturen für die Expositionsversuche beim Pelletofen mit guter Verbrennung

Abb. 4.18 zeigt den Verbrennungsverlauf von Messung Nr.22 bei schlechter Verbrennungseinstellung am Pelletofen. Das angestrebte hohe CO-Niveau ließ sich nach dem Neustart des Pelletofens nach ca. einer Stunde nur durch Änderung der Lufteinstellung in etwa wieder erreichen, trotzdem liegt der CO-Mittelwert etwas niedriger als vor der Abschaltung. Aufgrund des ebenfalls leicht gesunkenen CO<sub>2</sub>-Niveaus konnte die Verdünnung leicht zurückgefahren werden, woraus sich der erhöhte CO<sub>2</sub>-Wert nach der Verdünnung ergibt. Die VOC-Spitzen sind nach der Umstellung nur noch sehr schwach sichtbar. Die nachfolgenden beiden Versuche mit schlechter Verbrennung führten zu einem CO- und VOC-Konzentrationsverlauf wie zwischen Stunde eins und zwei, sind jedoch trotzdem signifikant schlechter als bei guter Verbrennung.

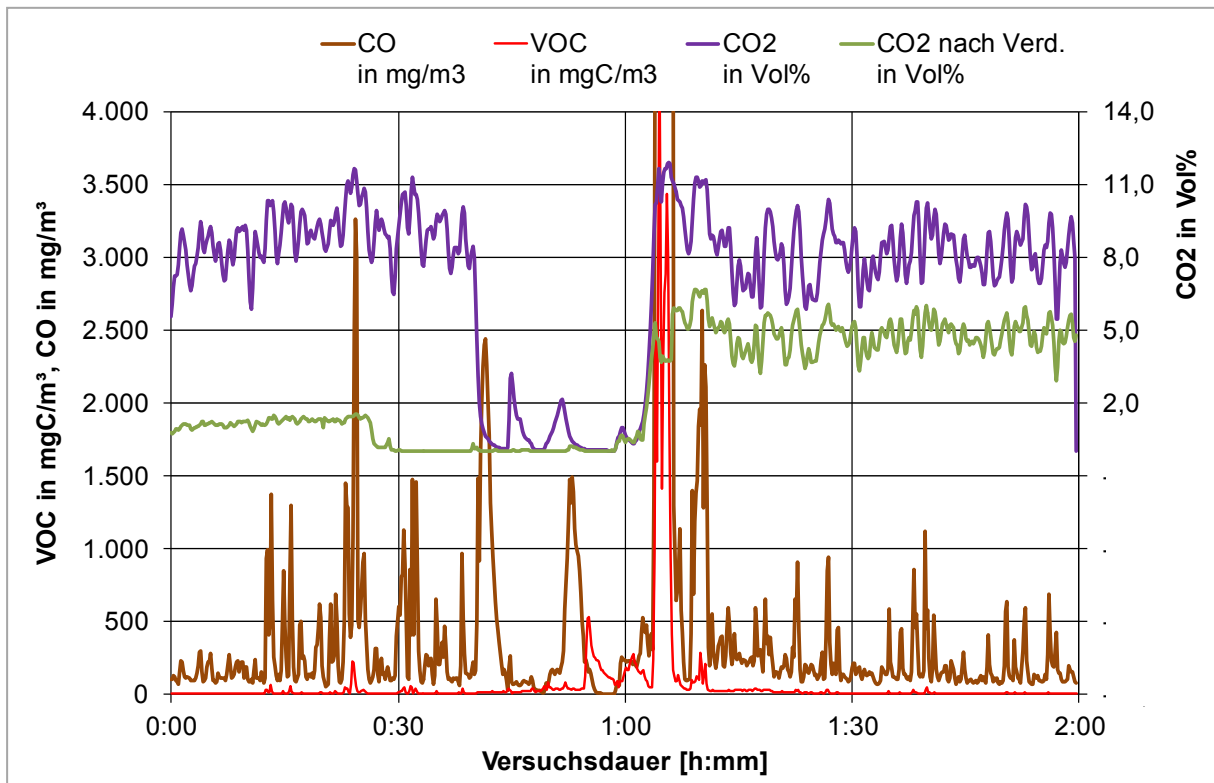


Abbildung 4.18: Verlauf der gemessenen CO-, VOC und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei schlechter Verbrennung am Pelletofen beispielhaft für Expositionsversuch Nr.22 vom 1.8.2012

Tab. 4.15 zeigt die Mittelwerte der einzelnen Versuche bei schlechter Verbrennung im Pelletofen. Gegenüber der guten Verbrennung ist die O<sub>2</sub>-Konzentration etwas niedriger und dementsprechend die CO<sub>2</sub>-Konzentration etwas höher, mit Ausnahme von Versuch 22 aufgrund des Ab- und Anschaltens des Ofens.

Expositionsversuch Nr.	O <sub>2</sub> [Vol%]	CO	VOC	CO <sub>2</sub> [Vol%]	Abgastemperatur [°C]
		bei 13 Vol% O <sub>2</sub> [mg/m <sup>3</sup> ]	[mgC/m <sup>3</sup> ]		
<b>22</b>	<b>13,6</b>	<b>662</b>	<b>82</b>	<b>7,1</b>	<b>140</b>
<b>23</b>	<b>10,0</b>	<b>180</b>	<b>5</b>	<b>10,5</b>	<b>153</b>
<b>25</b>	<b>9,7</b>	<b>205</b>	<b>4</b>	<b>10,7</b>	<b>189</b>

Tabelle 4.15: Mittelwerte von Gaskonzentrationen und Abgastemperaturen für die Expositionsversuche beim Pelletofen mit schlechter Verbrennung

Beim Abschalten erfolgt für knapp zwanzig Minuten eine programmierte Abkühlphase mit schwacher bis überhaupt keiner Verbrennung, die auch durch den Neustart nicht sofort abgebrochen werden konnte. Nach zwei Neustarts ging der Pelletofen gleich wieder auf Störung und schaltete sich aufgrund zu geringen Unterdrucks ab. Da die Begasung der Zellmembranen nicht abgebrochen wurde, mussten diese Zeiten mit geringen oder keinen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei der Mittelwertbildung miteinbezogen werden.

#### 4.4.2 Messergebnisse der partikelförmigen Emissionen der Holzfeuerungen

Für die spätere biologische Interpretation der Expositionsversuche ist es von großer Bedeutung, die Verbrennungsaerosole, welche auf den Zellen deponiert werden, physikalisch und chemisch möglichst genau zu charakterisieren. Hierzu wurden zahlreiche Messungen am Konditionierungsreaktor des Expositionssystems durchgeführt. Mögliche Partikelbildungspfade bei der Holzverbrennung sind in Abb. 4.19 [18] dargestellt.

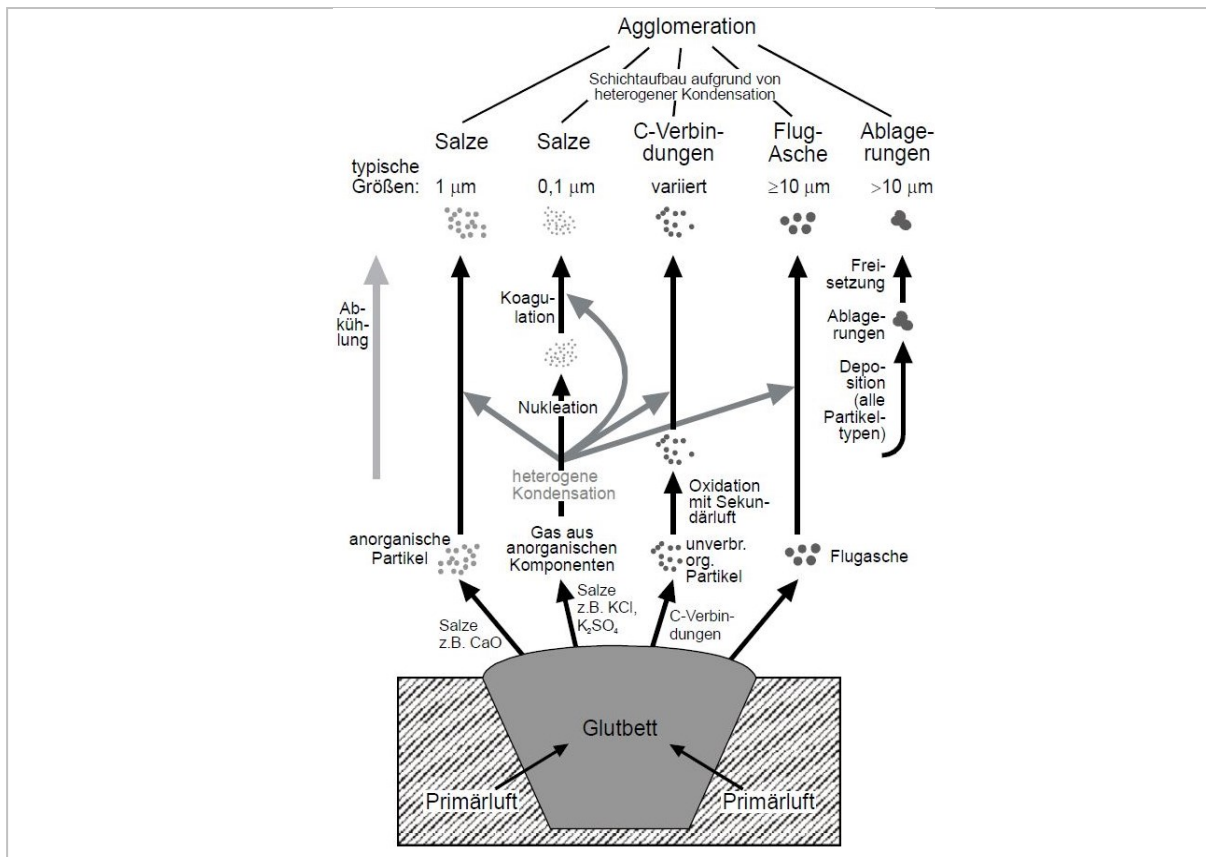


Abbildung 4.19: Aerosolbildungswege bei Holzfeuerungen nach Kaltschnitt und Hartmann [18]

Bei unvollständiger Verbrennung kondensieren und agglomerieren organische Verbindungen zum Teil mit anderen Verbindungen, zu Partikeln mit aerodynamischen Durchmessern meist  $< 1 \mu\text{m}$ . Bei annähernd vollständiger Verbrennung bilden gasförmige Sulfate, Chloride und Oxide (z.B. von K, Na, S, Cl, Zn und Pb) durch Nukleation und Koagulation Partikel, die im Bereich von  $0,1 \mu\text{m}$  oder darunter liegen. Außerdem können nach dem Festpartikelpfad bestehende Partikel durch Kondensation gasförmiger Verbindungen zu Partikeln von  $1 \mu\text{m}$  und größer anwachsen. Ein großer Teil der Gesamtstaubemission besteht aus Agglomeration von Salzen und Kohlenstoffverbindungen. Nicht relevant für lungengängige Partikel ist der Flugasche- und Ablagerungspfad, denn diese Partikel sind typischerweise größer als  $10 \mu\text{m}$ .

Bei den eingestellten Verbrennungszuständen wurden quasikontinuierliche Partikelgrößenbestimmungen und Partikelzählungen durchgeführt (SMPS mit CPC) und die Staubmasse kumuliert über die Expositionszeit gravimetrisch bestimmt. Die Ergebnisse der SMPS-Messungen werden im Arbeitspaket 9 / Kapitel 5.4 behandelt.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Gesamtstaubmessungen näher erläutert. Die Probenahme für die Gesamtstaubmessungen erfolgte aus dem Konditionierungsreaktor der Expositionseinheit, d.h. das Probengas lag hier verdünnt (Verdünnung mit synthetischer Luft vor dem Eingang in die Expositionseinheit und in geringem Maße mit Wasserdampf beladenen Umgebungsluft, die zur Befeuchtung der Abgasprobe benötigt wird) vor.

Bei der Abschätzung der Staubkonzentration im unverdünnten Abgas wurde die geringe zusätzliche Verdünnung durch die wasserdampfhaltige Umgebungsluft nicht berücksichtigt. Basis für die Rückrechnung auf die Verhältnisse im unverdünnten Abgas sind die gemessenen Staubkonzentrationen wie sie im Konditionierungsreaktor vorliegen. D.h. aufgrund der Probenaufbereitung (Abkühlung, Verdünnung, Befeuchtung sowie des Zyklon am Eingang der Expositionseinheit) können sich die im unverdünnten Abgas tatsächlich vorliegenden Staubkonzentrationen von den Abschätzungen unterscheiden.

### **Partikelförmige Emissionen aus dem Kaminofen**

Für die Verbrennung von Stückholz am Kaminofen sind die mittleren Staubkonzentrationen im Konditionierungsreaktor und die abgeschätzten Staubkonzentration im unverdünnten Abgas (berechnet aus gemessener Staubkonzentration im Konditionierungsreaktor multipliziert mit dem Verdünnungsverhältnis bei der Verdünnung mit synthetischer Luft) bei den einzelnen Expositionsversuchen in Abb. 4.20 dargestellt. Die Staubmittelwerte für die gute Verbrennung weisen eine relativ geringe Streubreite auf und liegen im Bereich von  $15$  bis  $23 \text{ mg/m}^3$ . Entsprechend dem Verdünnungsverhältnis von ca. 3-fach ergeben sich für das unverdünnte Abgas Staubkonzentrationen im Bereich von  $48$  bis  $63 \text{ mg/m}^3$ . Für den ersten Versuch vom 28.6 liegt ein zu geringer Staubwert vor, da es zu Beginn der Staubmessung zu einer kurzen Rückströmung im Planfilterkopfgerät kam und hierdurch der Staubfilter aus der Halterung gezogen wurde.

Die im Konditionierungsreaktor gemessenen Staubkonzentrationen bei der schlechten Verbrennung, lagen im Mittel für die jeweiligen Expositionsversuche zwischen 16 und 69 mg/m<sup>3</sup> und weisen damit eine deutlich höhere Streuung auf als bei guten Verbrennungsbedingungen. Bei einigen Expositionsversuchen wurden, trotz den Einstellungen und der Vorgehensweise für schlechte Verbrennungsbedingungen, Staubkonzentrationen in der Größenordnung von guten Verbrennungsbedingungen gemessen.

Bei sehr schlechten Verbrennungsbedingungen am Kaminofen steigt die mittlere Staubkonzentration für die Expositionsversuche (siehe Abb. 4.20) gegenüber der schlechten Verbrennung nicht weiter an, obwohl die CO- und VOC-Konzentrationen nochmals deutlich zugenommen haben.

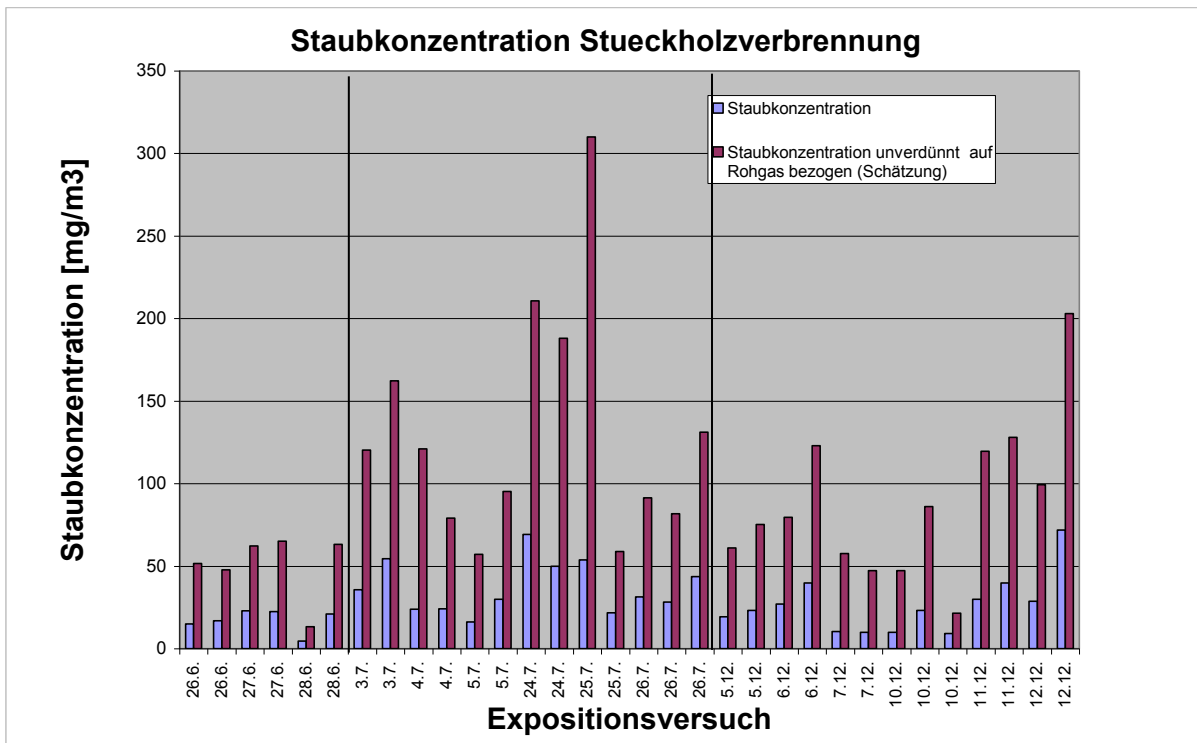


Abbildung 4.20: Mittlere Staubkonzentrationen im Konditionierungsreaktor und abgeschätzte Staubkonzentration im unverdünnten Abgas bei den einzelnen Expositionsversuchen am Kaminofen: guter Verbrennung / schlechte Verbrennung/ sehr schlechte Verbrennung



### Partikelförmige Emissionen aus dem Pelletofen

Die folgende Abb. 4.21 zeigt die am Pelletofen gemessenen Staubkonzentrationen sowie die über die Verdünnungsrate abgeschätzte Staubkonzentration im unverdünnten Abgas.

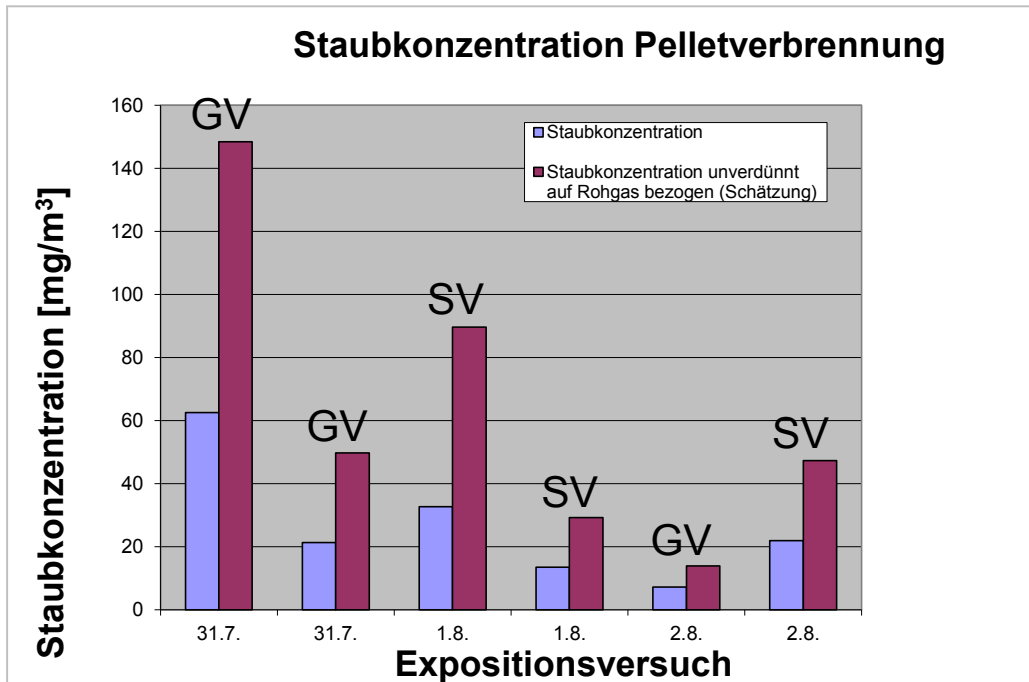


Abbildung 4.21: Mittlere Staubkonzentrationen im Konditionierungsreaktor und abgeschätzte Staubkonzentration im unverdünnten Abgas bei den einzelnen Expositionsversuchen am Pelletofen: GV = gute Verbrennung / SV = schlechte Verbrennung

Die Staubkonzentrationen der Pelletverbrennung zeigen keinen Trend für die Versuchseinstellungen der guten bzw. der schlechten Verbrennung. Der höchste Feinstaubwert wurde am 31.7 gemessen (Einstellung gute Verbrennung), obwohl die CO-Werte und VOC-Werte an diesem Tag wie erwartet niedrig lagen.

#### 4.4.3 Abschätzung der auf die Zellen deponierten Staubmasse

Um eine biologische Reaktion der Zellen festzustellen, muss genügend Feinstaub auf sie abgeschieden werden. Aus Submersversuchen mit Verbrennungspartikeln wurde eine Dosis von ca. 40 µg pro Transwell mit Zellkultur abgeschätzt, um eine messbare biologische Reaktion zu erzielen.

Zur Abschätzung der deponierten Staubmasse auf den Zellkulturen (Membrandosis) wurden die gemessenen Staubkonzentrationen im Konditionierungsreaktor des Expositionssystems herangezogen. Ausgehend von der im Reaktor vorliegenden Staubkonzentration wird die geschätzte deponierte Masse berechnet: Bei einem Expositionsvolumenstrom an den Zellen von 6 L/h und einer berücksichtigten Depositionseffizienz von 6% (Steigerung um 4% durch elektrisches Feld gegenüber 2% im Projekt Nanotox I [14]), lässt sich die je Transwell deponierte Staubmasse abschätzen.

##### **Staubmassen beim Stückholzkamin**

In Abb. 4.22 sind für die Stückholzfeuerung die deponierten Staubmassen entsprechend dem Verbrennungszustand dargestellt.

Bei der guten Verbrennung wurde an keinem Tag eine Staubkonzentration von über 40 µg abgeschieden, somit sind messbare Reaktionen der Zellen unwahrscheinlich. Der besonders niedrige Staubwert am ersten Tag (28.6.) stellt eine Fehlmessung dar.

Der schlechte Verbrennungszustand lieferte drei Expositionsversuche mit Staubkonzentrationen über 40 µg. Die sehr schlechte Verbrennung lieferte lediglich an zwei Tagen Staubkonzentrationen über 40 µg.

Um die Partikeldosis deutlich zu steigern, wurden jedoch bei der sehr schlechten Verbrennung dieselben Lungenzellen, unter Wahrung einer 24-stündigen Regenerationszeit, jeweils bei drei Expositionsversuchen eingesetzt. Diese derart kumulierten deponierten Staubmassen liegen dementsprechend deutlich höher als bei den Einzelversuchen. Insgesamt wird hier mit rund 111 µg deponierter Staubmasse der höchste Wert von allen Expositionsversuchen erreicht (siehe Abb.4.22 rechts unten).

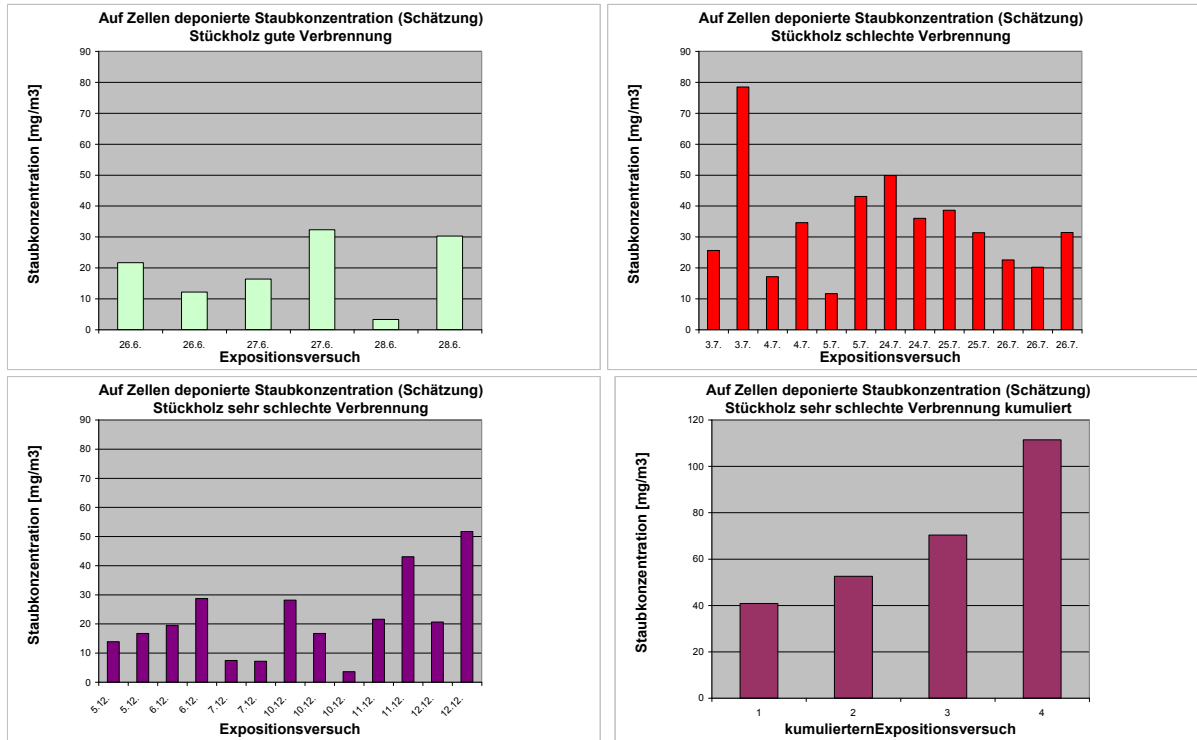


Abbildung 4.22: Auf Zellen deponierte Abgeschätzte Staubkonzentration aus der Stückholzverbrennung

Tab. 4.16 zeigt, bei welchen Expositionsversuchen die einzelnen Zellen kumulierend eingesetzt wurden. Insgesamt wurden 4 Begasungsexperimente mit jeweils 3 Expositionsversuchen über jeweils 2 h bei sehr schlechten Verbrennungsbedingungen durchgeführt.

Kumulierter Expositionsversuch	1	2	3	4
Expositionsversuch Nr.	26 / 28 / 30	27 / 29 / 31	32 / 35 / 37	33 / 36 / 38

Tabelle 4.16: Auflistung der zusammengefassten Einzelversuche für kumulierte Exposition bei sehr schlechter Stückholzverbrennung

### **Staubmassen beim Pelletofen**

Die Abb. 4.23 zeigt die errechnete deponierte Masse je Expositionskammer bei den Expositionsversuchen mit dem Pelletofen.

Eine eindeutige Klassifizierung der Verbrennungszustände gut / schlecht war aus den Emissionsmesswerten nicht möglich. Lediglich an einem Tag wurde eine wirkungsrelevante Partikeldosis von über 40 mg Beaufschlagung auf die Zellen erreicht. Statistische Aussagen zur Wirkung der Verbrennungspartikel können daraus nicht gewonnen werden.

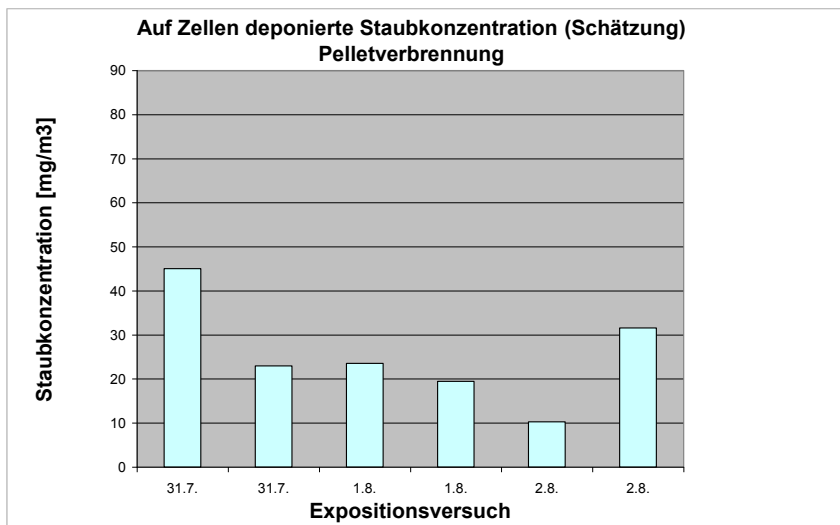


Abbildung 4.23: Auf Zellen deponierte, rechnerisch abgeschätzte Staubkonzentration bei der Pellet Verbrennung

#### 4.4.4 Messdatenerfassung an der Expositionseinheit

Während der durchgeführten Expositionsversuche wurden die verfahrenstechnischen Parameter des Expositionssystems messtechnisch erfasst, zum Teil geregelt und aufgezeichnet. Diese geben Aufschluss darüber, wie stabil die geregelten Parameter eingehalten werden konnten. Von besonderer Bedeutung sind die Parameter, welche in direktem Zusammenhang mit der Vitalität der Zellen stehen:

- Feuchte des Probengasstroms im Konditionierungsreaktor (Soll-Wert: 85% rel. Feuchte)
- Temperatur des Probengasstroms im Konditionierungsreaktor (Soll-Wert: 37°C)

Für die Durchführung der Messungen ist außerdem ein ausreichender Volumenstrom des Aerosols (Messgasdurchsatz) Voraussetzung, der im Wesentlichen vom Unterdruck im Expositionssystem abhängt.

Folgende Abb. 4.24 zeigt für alle Expositionsversuche die wichtigsten Parameter als Mittelwerte der einzelnen Versuche.

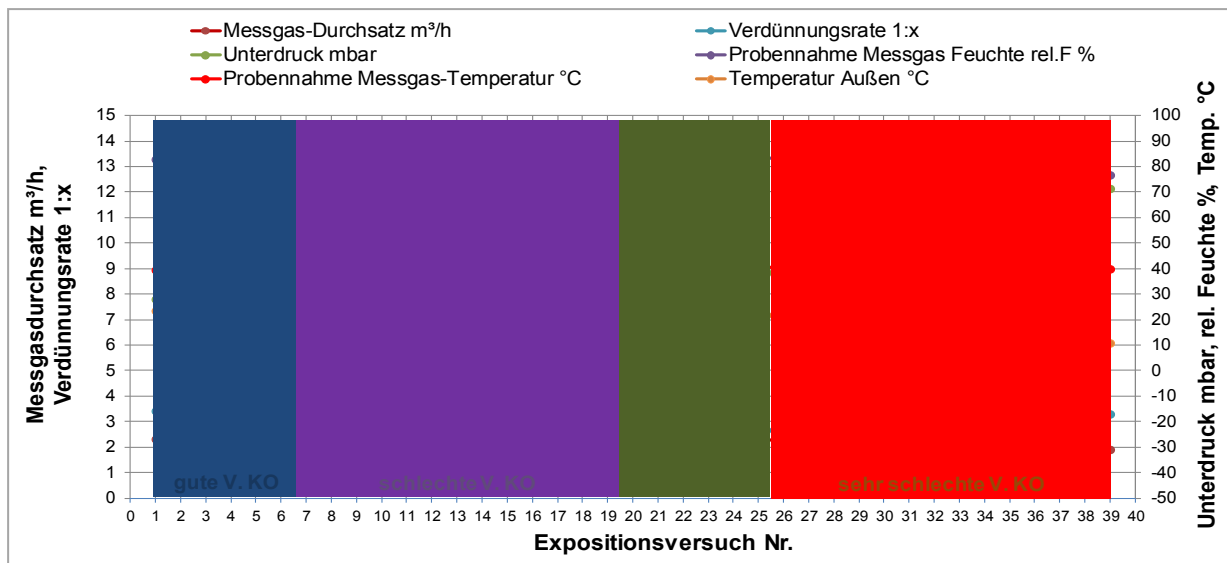


Abbildung 4.24: Verfahrenstechnische Parameter des Expositionssystems (Mittelwerte für die einzelnen Expositionsversuche) (KO: Kaminofen) (Versuch Nr.39 nur Testlauf ohne Zellen)

Farbig hinterlegt sind die verschiedenen Feuerungseinstellungen in die die Expositionsversuche untergliedert wurden. Die Feuchte und die Temperatur des Probengasstroms sind relativ homogen. Weiterhin wird ein Temperaturabfall von der Einstellung gute Verbrennung über schlechte Verbrennung bis zur sehr schlechten Verbrennung am Kaminofen beobachtet.

#### 4.4.5 Zusammenfassung „Verbrennungsmesswerte“

Zu den Aufgaben des IFK gehörten die Erarbeitung von stabilen Verbrennungszuständen und die Beaufschlagung der Zellen mit den Verbrennungsaerosolen.

Folgende Verbrennungseinstellungen wurden vorgenommen:

- Stückholz / Kaminofen:  
gute Verbrennung / schlechte Verbrennung / sehr schlechte Verbrennung
- Pelletofen:  
gute Verbrennung / schlechte Verbrennung

Während den Beaufschlagungen wurden die Messwerte der Emissionen aufgezeichnet. Entscheidend für die Beaufschlagung der Zellen sind hohe Partikelkonzentrationen.

Die schlechte Stückholzfeuerung führte im Mittel zu einer höheren Staubkonzentration als die gute Verbrennung. Die sehr schlechte Verbrennung hingegen, konnte keine weitere Steigerung der Partikelkonzentration im Mittel gegenüber der schlechten Verbrennung aufzeigen.

Bei den CO- und VOC-Werten konnten für die Stückholzfeuerung hingegen deutliche Zunahmen der Konzentrationen von der guten Verbrennung über die schlechte Verbrennung bis zur sehr schlechten erzielt werden.

Die verschiedenen Verbrennungszustände am Kaminofen konnten somit gut durch die Reduzierung der Verbrennungsluft eingestellt werden, da dieser weder mit einer Verbrennungsregelung noch mit einer Nachbrennkammer (Sekundärluftzufuhr) ausgestattet ist.

Beim Pelletofen konnten keine signifikant unterscheidbaren Einstellungen zwischen guter und schlechter Verbrennung vorgenommen werden. Aufgrund der Feuerungs- und Regelungstechnik des eingesetzten Pelletofens war eine schlechte Betriebsweise dieser Feuerung nur schwer realisierbar. Eine weitere Betrachtung der Verbrennungszustände unter Berücksichtigung der SMPS-Werte erfolgt in Kapitel 5.4.

Um grundsätzlich die Vitalität der Lungenzellen sicherzustellen, musste der aerosolbeladene Proben-gasstrom im Expositionssystem den Bedingungen im menschlichen Atemtrakt angepasst werden. Die wichtigsten Parameter waren hierbei die Temperatur und Feuchte im Konditionierungsreaktor, welche möglichst genau auf 37 C bzw. 85% rel. Feuchte eingeregelt werden mussten. Dies war bei den Versuchen mit dem Pelletofen problemlos möglich, beim Kaminofen bei sehr schlechter Verbrennung war dies anspruchsvoller, aufgrund des erhöhten Verschmutzungsanfalls im Probengassystem und den geringeren Außentemperaturen (Raumtemperatur im Technikum). Die wichtigen Größen konnten aber auch hier auf einen den Anforderungen entsprechenden Bereich eingestellt werden, sodass der reibungslose Betrieb immer sichergestellt war.

Zum Teil problematisch waren die Spannungsüberschläge in den Expositionskammern, da diese nicht schnell behoben werden können. Sie konnten nicht sicher vermieden werden. Eine Verbesserung lassen hier sicherlich durch fest verschweißte Gittertrompeten oder den Verzicht auf die Gitter erwarten.

## 5 Partikelanalytik sowie Darstellung der Zellen

### 5.1 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Die Hauptaufgabe der Analytik am NMI bestand in der Charakterisierung der Verbrennungspartikel und deren Zuordnung zu den eingestellten Verbrennungszuständen. Im Vorfeld der Messkampagne sollte die Abscheideeffizienz des Expositionssystems für Partikel in Zusammenarbeit mit dem KIT überprüft werden. Dazu wurden spezielle Probenträger für die Elektronenmikroskopie vorbereitet und in das Expositionssystem integriert.

Während der Messkampagne wurden, mittels LM / SEM / STEM bis zur hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskopie, sowohl die Morphologie als auch die elementare Zusammensetzung der Partikel bewertet. Zur Aufzeichnung der größenabhängigen Partikelanzahlkonzentrationen wurden parallel zu den Zellbeaufschlagungen SMPS-Messungen durchgeführt und ausgewertet.

Zusätzlich zur Partikelanalytik sollten auch mit Verbrennungsaerosolen beaufschlagte Zellen dargestellt werden. Dazu ist für die Elektronenmikroskopie eine aufwändige Vorpräparation erforderlich. Ziel der Zellpräparation war es, Erkenntnisse über das Verhalten der Verbrennungspartikel an der Oberfläche der Zellmembranen zu erhalten.

### 5.2 Analysekontrolle zur Optimierung des Expositionssystems

Die Erhöhung der Partikelabscheideeffizienz gegenüber der Versuchsanordnung von Nanotox I wurde am KIT durch die Entwicklung eines Expositionsmoduls mit integrierter elektrostatischer Partikeldeposition erfolgreich durchgeführt. Anhand der Abscheidung von Fluoreszein-Natriumpartikeln wurde eine Steigerung der Partikeldosis gegenüber der Versuchsanordnung ohne elektrisches Feld um den Faktor 8 bestimmt (siehe Kapitel 3.3.2 / Arbeitspaket 1).

Um die Abscheideoptimierung möglichst nahe an den realen Versuchsbedingungen zu bewerten, wurden zusätzlich zu den Versuchen mit Fluoreszein-Natrium innerhalb von Arbeitspaket 1, Expositionen mit Partikeln aus der Scheitholzverbrennung durchgeführt. Weiterhin wurde der Einfluss von 2 verschiedenen Trompetenöffnungen am Air-Liquid-Interface der Expositionseinheit untersucht.

## 5.2.1 Durchführung

Innerhalb des Expositionssystems wurden mit TEM-Grids (Cu-Grid mit Kohlenstoffträgerfolie) belegte Transwell eingebaut und pro Versuchseinstellung jeweils 4 h mit Verbrennungspartikeln aus der Stückholzfeuerung beaufschlagt.

Folgende Einstellungen wurden am Expositionssystem eingestellt:

1. ohne elektrisches Feld
2. -1000 Volt elektrisches Feld mit Gitteröffnung an Trompete
3. -1000 Volt offene Trompete

Der Einbau der TEM-Grids erfolgte radial mittig innerhalb der Transwells, da durch die Versuche in Arbeitspaket 1 (Kapitel 3.3.2) belegt wurde, dass lediglich die Randbereiche eine geringere Belegung aufweisen und somit die restliche Transwellfläche als homogen belegt angenommen werden kann.

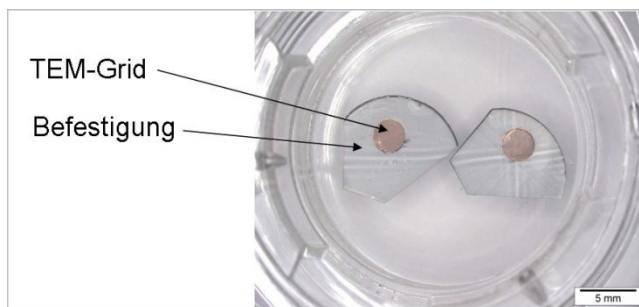


Abbildung 5.1: TEM-Grid in Transwellschale für Beaufschlagungsversuche mit Verbrennungsaerosolen (Anordnung der Grids: radial mittig)

Die analytische Auswertung der Proben wurde am NMI durchgeführt. Dazu wurden die exponierten Grids im Transmissionselektronenmikroskop (Jeol FX 2000) bei gleichbleibender Vergrößerung dargestellt (pro Probenzustand wurden jeweils 6 Abbildungen ausgewertet). Die Abbildungen wurden jeweils mittig innerhalb des TEM-Grids aufgenommen. Anschließend erfolgte die Abschätzung der beaufschlagten Partikeldosen durch bildanalytische Auswertungen in ImageJ. Die aus den TEM-Abbildungen ermittelten Flächenbelegungen wurden auf die Gesamtfläche des Transwells hochgerechnet.



## 5.2.2 Ergebnisse und Bewertung

In Abb. 5.2 sind die Binärabbildungen der TEM-Aufnahmen dargestellt, wie sie für die Bildanalyse in ImageJ verwendet wurden. Bereits mit dem Auge ist eine deutliche und reproduzierbare Steigerung der Partikelexposition der Einstellungen mit elektrischem Feld (-1000 Volt) gegenüber der Einstellung ohne elektrisches Feld erkennbar.

Die anschließende bildanalytische Auswertungen der Abbildungen am NMI konnte belegen, dass durch Variation des elektrischen Feldes eine bis zu 6-fach erhöhte Abscheiderate erzielt werden kann (siehe Diagramm Abb. 5.3).

Neben dem Einfluss des elektrischen Feldes wurden ebenfalls verschiedene Trompetenöffnungen an der Gas-Flüssigkeits-Grenze innerhalb des Expositionsystems bewertet.

Die Versuchsanordnung mit Gitteröffnung an der Trompete zeigt tendenziell höhere Abscheideraten, jedoch ist der Unterschied aufgrund der Standardabweichung nicht signifikant.

Die Erhöhung der Partikelabscheideeffizienz gegenüber der im Projekt Nanotox I verwendeten Versuchsanordnung wurde am KIT durch die Entwicklung eines Expositionsmoduls mit integrierter elektrostatischer Partikeldeposition somit erfolgreich durchgeführt.

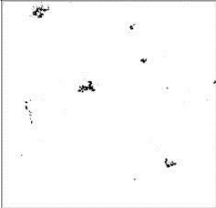





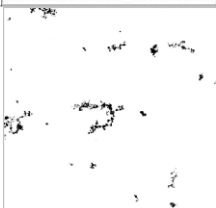

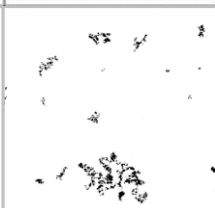
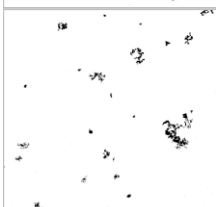
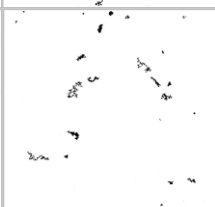


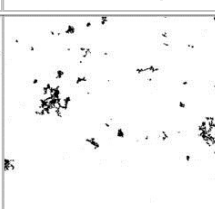

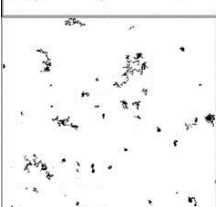
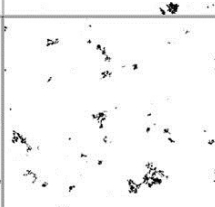
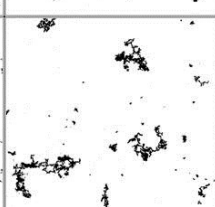
					<b>O V freie Trompete</b>
					
					<b>-1000 V freie Trompete</b>
					
					<b>-1000 V Gitteröffnung Trompete</b>
					

Abbildung 5.2: In Binärbilder umgewandelte TEM-Abbildungen für verschiedene Einstellungen bei der Partikelbeaufschlagung an der Expositionseinheit

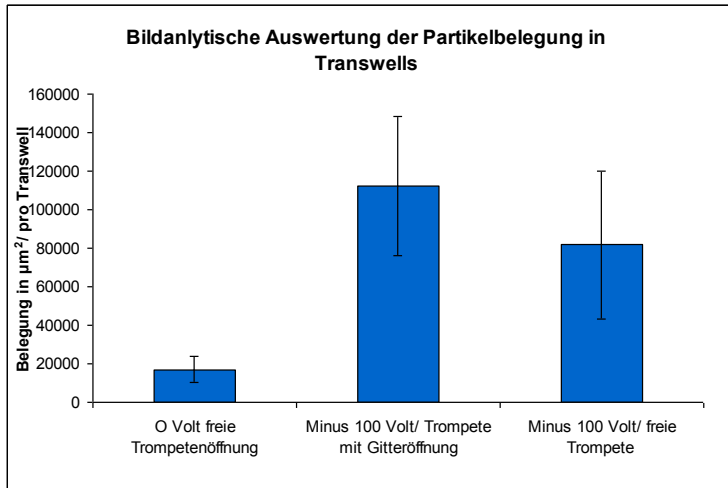


Abbildung 5.3: Bildanalytische Auswertung der TEM-Abbildungen bzw. daraus erzeugten Binärabbildungen von Nanopartikeln aus der Scheitholzverbrennung

Bei der Auswertung der Verbrennungspartikel aus der Stückholzfeuerung wurde eine geringfügig schwächere Erhöhung der Partikelbelegung (um Faktor 6) als in den Versuchen mit Fluoreszei-Natriumpartikeln (bis Faktor 8) festgestellt (siehe Kapitel 3.3.2 Arbeitspaket 1).

Wie aus Abb. 5.4 ersichtlich ist, neigen die Verbrennungspartikel aus der Stückholzfeuerung zur Agglomeratbildung, die Fluoreszei-Natriumpartikel hingegen liegen größtenteils als Einzelpartikel vor. Durch die Projektion der dreidimensionalen Agglomerate auf zweidimensionale Abbildungen für die bildanalytische Auswertung ergeben sich Verluste im Vergleich zu der Auswertung von Einzelpartikeln. Als Fazit spiegelt somit die Auswertung der Verbrennungspartikel eher eine angenommene Mindestbelegung wider.

Weiterhin ist für die Abscheiderate im elektrischen Feld der Ladezustand der Aerosolpartikel von Entscheidung. Von Unterschieden in der Aufladung der Partikel aus einem Verbrennungsprozess gegenüber den gesprühten Fluoreszei-Natriumpartikeln ist daher auszugehen.

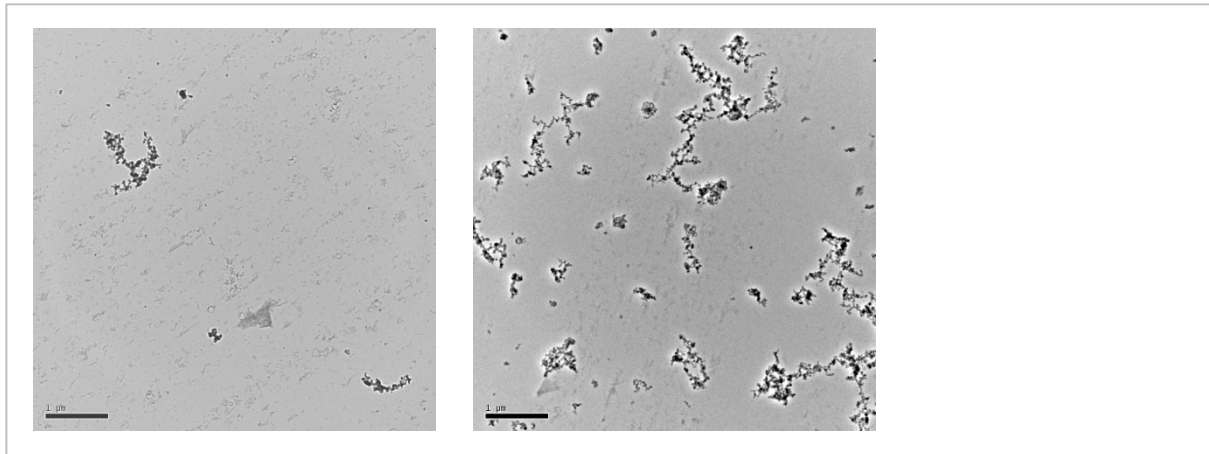


Abbildung 5.4: TEM-Abbildungen von Nanopartikeln auf TEM-Grids mit Trägerfolie abgeschieden (Kaminofen / Scheitholzfeuerung, Expositionsexperimenten an der Technikanlage AEOLA) links: 0 Volt freie Trompete / rechts: -1000 Volt Gittertrompete

### 5.3 Darstellung unbegaster Zellreferenzproben

Zur Darstellung der Zellen auf den Membranoberflächen, wie sie innerhalb der Transwelleinsätze in der Expositionseinheit vorliegen, wurde ein Rasterelektronenmikroskop (Zeiss XB1540) benutzt. Dazu wurden die Zellen im Vorfeld chemisch fixiert und mit einer Alkoholreihe sowie mit Kritischer-Punkt-Trocknung entwässert.

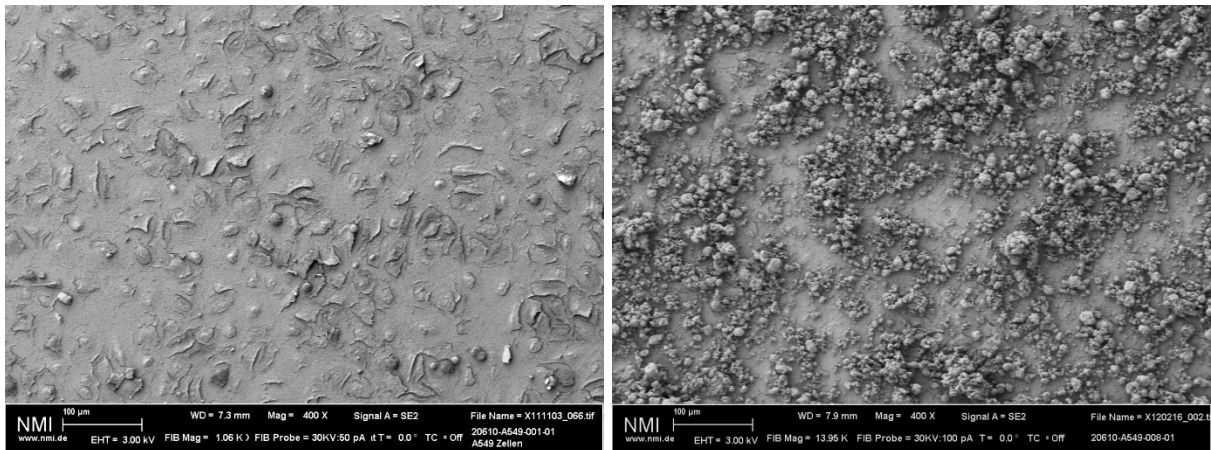


Abbildung 5.5: links: SEM-Abbildung A549 - Lungenzellen unbelastet / rechts: A549 - Lungenzellen nach hoher Dosis Printex-Partikel

In Abb. 5.5 sind A549 - Zellen, wie sie nach einer biologischen Vorpräparation für die Elektronenmikroskopie vorliegen, dargestellt. In der linken Abbildung sind Zellen ohne Partikelbeaufschlagung erkennbar. Die Zellen scheinen in einem vitalen Zustand fixiert worden zu sein, sie bilden einen nahezu konfluenten Monolayer auf der darunterliegenden Membran aus.

Die Zellen aus Abb. 5.5 rechts hingegen wurden mit hohen Dosen von Printexpartikeln beaufschlagt. Sie weisen eher abgerundete Zellen als Reaktion auf den Stress durch Printex auf.

## 5.4 Online Messversuche zur Partikelanalytik

Zur Charakterisierung der verschiedenen Verbrennungszustände wurden während der gesamten Messkampagne die Anzahlkonzentrationen der Verbrennungspartikel mittels SMPS-Messungen (Scanning Mobility Particle Sizer) kontinuierlich gemessen.

Dabei wurden die Konzentrationen der Nanopartikel aus der Biomassefeuerung entsprechend ihrem elektrischen Mobilitätsdurchmesser bestimmt.

Erfasst wurden Partikel mit einem Mobilitätsdurchmesser von ca. 10 - 300 nm. Als Faustregel gilt: Je kleiner die Partikel, umso tiefer können sie in den Atemtrakt eindringen [1]. Um Wechselwirkungen der Lungenzellen bzw. Lungenzellmembranen mit Nanopartikeln zu beobachten, sind hohe Konzentrationen an ultrafeinen Partikeln daraus folgernd bei der Exposition erwünscht.

### 5.4.1 Durchführung

In Abb. 5.6 ist der Versuchsaufbau während der Messkampagne im Technikum des IFK dargestellt. Das Proben-aerosol für das SMPS-Messgerät wird aus dem Konditionierungsreaktor der Expositionseinheit entnommen. Aufgrund des Messbereichs des SMPS-Gerätes wird das Aerosol vor dem Eintritt in die Messeinrichtung um den Faktor 1:10 verdünnt.

Nach der gröÙenselektiven Trennung der Partikel im elektrischen Feld und der Aufkondensation mit Butanol (SMPS 3080 von TSI) werden die Partikel in einem Kondensationspartikelzähler (CPC 3010 von TSI) gezählt.

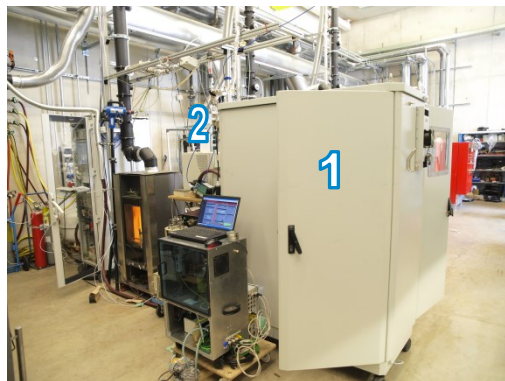


Abbildung 5.6: 2 Verschiedene Perspektiven des Versuchsaufbaus am Technikum des IFK während der Messkampagne mit dem Kaminofen (Nummerierungen: 1. Expositionseinheit; 2. SMPS; 3. CPC)

Die SMPS-Werte der Expositionsversuche wurden den einzelnen Verbrennungszuständen zugeordnet und grafisch dargestellt. Als Kontrollwerte für „gute“ und „schlechte“ Verbrennungszustände wurden sowohl die CO-Werte als auch zum Vergleich die gravimetrischen Messungen auf Filterproben herangezogen (vergleiche Messungen in Kapitel 4.4 / Arbeitspaket 11). Bei schlechten Verbrennungszuständen sind sowohl hohe CO-Werte als auch erhöhte Partikelmassen zu erwarten.

## 5.4.2 Ergebnisse und Bewertung der Online Messversuche

In den Schaubildern von Abb. 5.7 sind die Partikelanzahlkonzentrationen aus der Pellet- und Stückholzfeuerung über den Größenbereich von ca. 10 - 300 nm (elektrischer Mobilitätsdurchmesser) aufgetragen. Es wurden nur die Expositionsversuche dargestellt für welche auch SMPS-Messwerte aufgenommen wurden. Die einzelnen Expositionsversuche sind innerhalb der Legende nach dem Versuchsdatum aufgeschlüsselt. Das Balkendiagramm zeigt die gravimetrisch ermittelten Massen an den jeweiligen Versuchstagen.

Die Aerosolprobe für die gravimetrische Massenbestimmung wurde analog zu den SMPS-Messungen ebenfalls aus dem Konditionierungsreaktor der Expositionseinheit entnommen.

Die gravimetrisch bestimmten Partikel weisen im Vergleich zu den mittels SMPS bestimmten Partikeln einen weiteren Größenbereich auf. Alle Partikel welche nicht von dem Vorabscheider (Zyklon) abgesondert wurden, also  $< 1 \mu\text{m}$  sind, werden auf dem Filter abgeschieden.

Aus der Abb. 5.7 lässt bei der Stückholzverbrennung eine Korrelation zwischen hohen Partikelanzahlkonzentrationen (SMPS-Werte) und hohen gravimetrischen Messwerten aufzeigen. Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Partikelgrößenbereich von 10 - 300 nm bei den Einstellungen der Verbrennungsparameter maßgeblich beeinflusst wird. Für die Beaufschlagung der Lungenepithelzellen sind hohe Konzentrationen an feinen Partikeln erwünscht, denn nur diese haben eventuell das Potential in die Zellen einzudringen.

Die Pellet Feuerung liefert keine eindeutige Zuordenbarkeit der SMPS-Werte (Abb. 5.7 / oben links) zu den gravimetrisch bestimmten Massen. Ebenso wenig konnten eindeutig bestimmbar Unterschiede zwischen guten und schlechten Verbrennungseinstellungen mittels SMPS bestimmt werden.

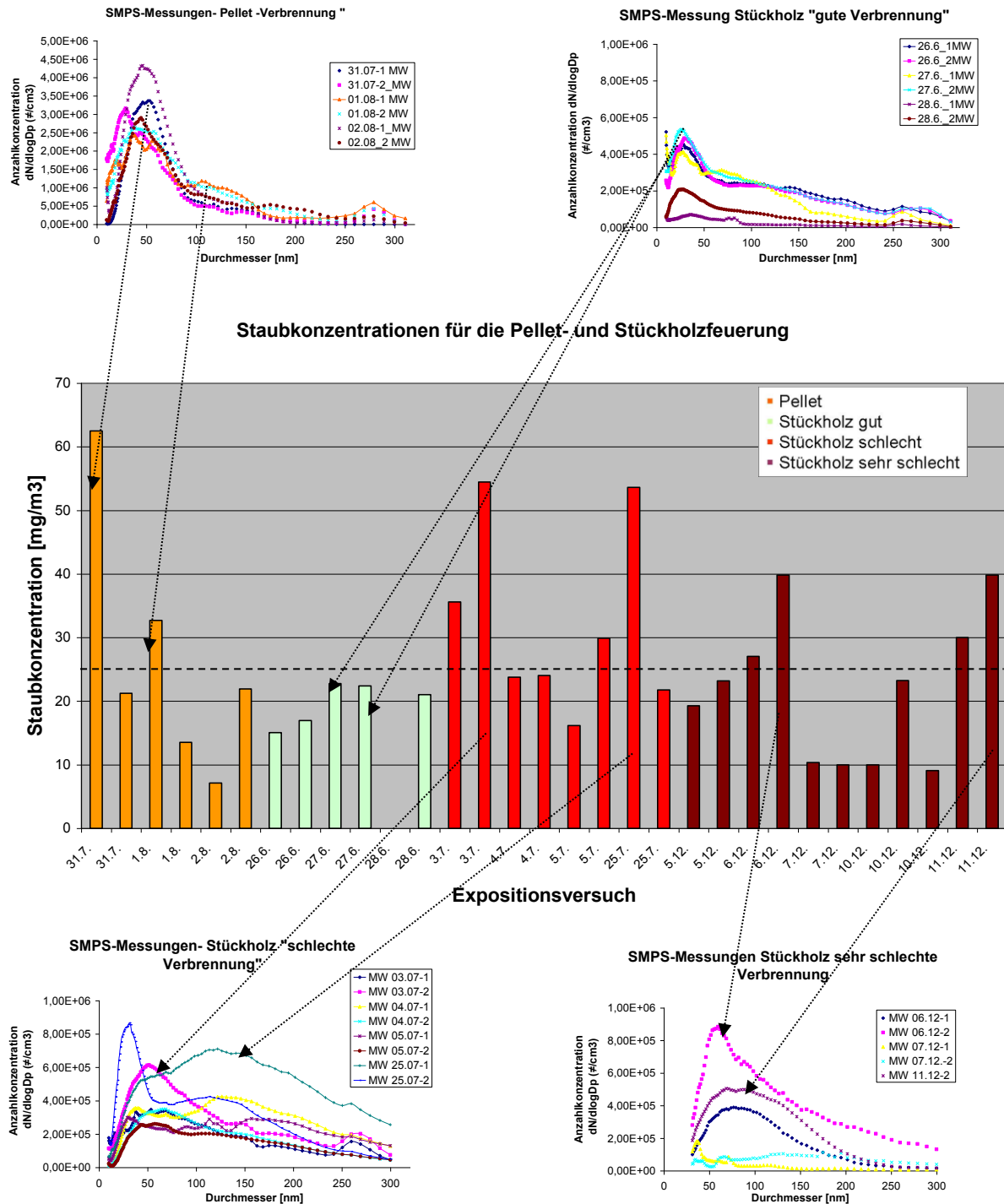


Abbildung 5.7: Das Balkendiagramm zeigt die gravimetrisch bestimmten Massen aller Verbrennungszustände, darüber sind die SMPS-Werte (von links nach rechts) Pellet Verbrennung / Stückholz gut, darunter die SMPS-Werte Stückholz schlecht / Stückholz sehr schlecht dargestellt. Jede SMPS-Kurve stellt einen Messversuch dar.



Da die erhaltenen Partikelkonzentrationen und -massen (vgl. Abb. 5.7 Balkendiagramm) nicht wie beabsichtigt während der Messperioden eindeutig den guten oder schlechten Verbrennungszuständen zugeordnet werden konnten, ist die Festlegung von Grenzwerten zur Unterscheidung der Verbrennungszustände erforderlich.

Als erstes Kriterium für eine schlechte Verbrennung wurden die gravimetrischen Auswertungen der Stückholzverbrennung herangezogen, da diese unterscheidbare Einstellungen aufzeigten.

Um einen signifikanten Unterschied zwischen den Zuständen zu erhalten, wurde die Standardabweichung aller „guten“ Verbrennungszustände (siehe Balkendiagramm Abb. 5.7) bestimmt und zu dem höchsten Wert aus der „guten“ Verbrennung addiert. Als Grenzwert für eine „gute“ Verbrennung wurden somit  $26 \text{ mg/m}^3$  ( $3 \text{ mg/m}^3$  (Standardabw.) +  $23 \text{ mg/m}^3$  (höchster Wert der guten Stückholzverbrennung)) festgelegt.

Der daraus erhaltene Grenzwert für eine gute Verbrennung wurde in das Diagramm (Abb. 5.8) als gestrichelte Linie eingezeichnet. Alle Werte, die über der Linie liegen, werden als schlechte Verbrennungszustände definiert. Eine weitere Unterteilung der Verbrennungszustände schlecht zu sehr schlecht ist aufgrund der gravimetrischen Daten nicht möglich, da keine eindeutige Steigerung der Partikelmasse bei der sehr schlechten Verbrennung erzielt wurde.

Als zweites Kriterium für eine schlechte Verbrennung wurden die CO-Messungen der Stückholzverbrennung analog zu den gravimetrischen Daten ausgewertet (Abb. 5.8). Der höchste Wert aus der Einstellung „Stückholz, gute Verbrennung“ ( $1.501 \text{ mg/m}^3$ ) + die Standardabweichung ( $199 \text{ mg/m}^3$ ) aller guten Werte wurde als Grenzwert ( $1.700 \text{ mg/m}^3$ ) für den Übergang zu schlechten Verbrennungszuständen festgelegt. Alle Werte, welche in Abb. 5.8 über dem Grenzwert (gestrichelte Linie) liegen werden als schlechte Verbrennung eingestuft.

Die SMPS-Messungen werden im Folgenden, entsprechend der beiden festgelegten Kriterien, den Verbrennungszuständen zugeordnet.

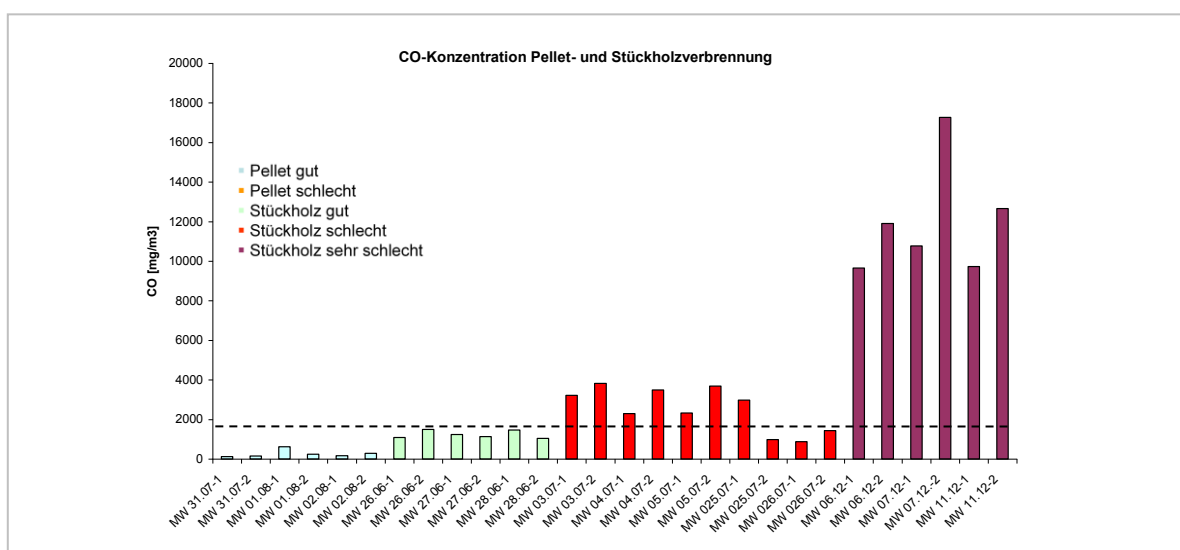


Abbildung 5.8: Balkendiagramm der CO-Konzentrationen für verschiedene Verbrennungszustände (aus unverdünntem Gastrom gemessen)

## Ergebnisse der Pellet Feuerung

Die Pellet Feuerung zeigt lediglich an zwei Tagen gravimetrische Werte, die laut Definition als schlechte Verbrennung deklariert werden können (Abb. 5.7). Somit sind für eine statistische Aussage zu wenige Versuchstage mit hoher Partikelkonzentration vorhanden. Auffallend sind zudem die sehr niedrigen CO-Werte über die Versuchstage (Abb. 5.8).

Die Einstellung von schlechten Verbrennungsparametern wurde folglich bei der Pellet Feuerung nicht erreicht. Die Ursachen dafür liegen sowohl in der Auswahl des Brenngutes als auch in der schwierigen Regelbarkeit des Ofens hin zu schlechten Verbrennungsbedingungen. Eine genauere Beschreibung der Pellet Verbrennung kann Kapitel 4 entnommen werden.

Die Zusammenfassung der SMPS-Messwerte aus den einzelnen Versuchstagen ist in Abb. 5.9 dargestellt. Das erste Maximum der Anzahlkonzentration liegt bei einem Mobilitätsdurchmesser von ca. 40 nm. Das zweite Maximum befindet sich bei ca. 280 nm.

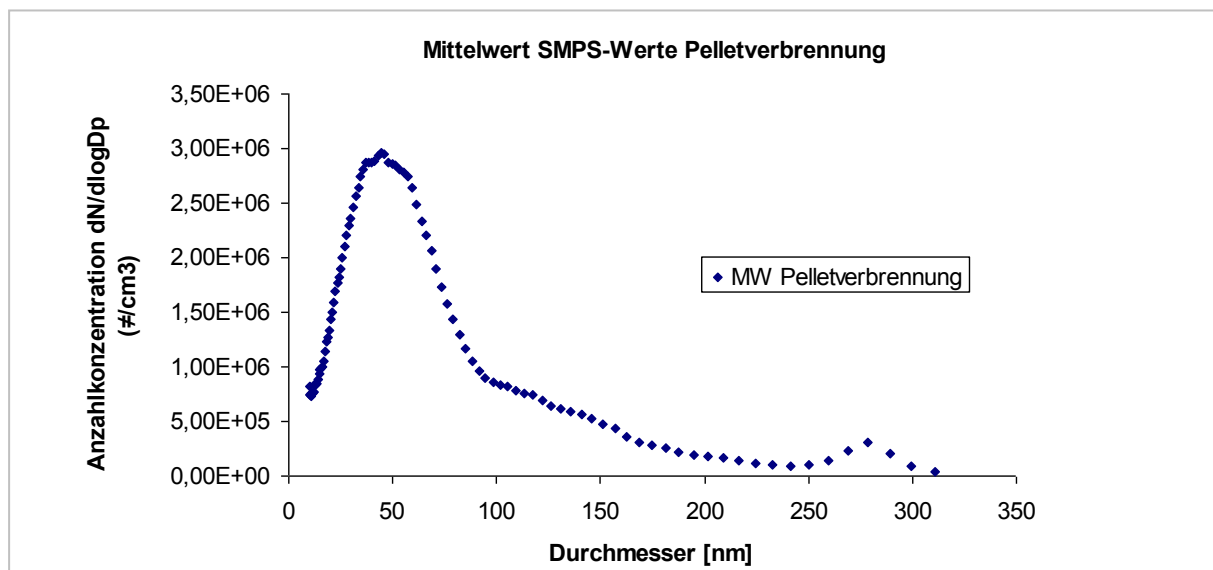


Abbildung 5.9: Grafische Darstellung Mittelwerte Partikelanzahlkonzentrationen aus SMPS-Messungen für die Pellet Verbrennung (die Verbrennungszustände gut / schlecht konnten nicht unterschieden werden)

## Ergebnisse der Stückholzfeuerung

Im Vergleich zu den gravimetrischen Ergebnissen konnte der CO-Wert für die Stückholzfeuerung größtenteils definiert für die Verbrennungszustände eingestellt werden (Abb.5.8). Bei der schlechten Verbrennung wurde der CO-Gehalt gegenüber guten Verbrennungszuständen an den meisten Versuchstagen gesteigert. Bei der sehr schlechten Verbrennung wurden die CO-Werte an allen Versuchstagen sogar um ein Vielfaches der schlechten Verbrennung erhöht. Somit wurde das Ziel, nämlich eine deutliche Steigerung des schlechten Verbrennungszustandes einzustellen, erreicht.

Gerade bei der sehr schlechten Verbrennung wird eine hohe Diskrepanz zwischen der Gravimetrie und den CO-Werten ersichtlich. Während die CO-Werte gesteigert werden konnten, wurde bei der Massenbestimmung keine signifikante Erhöhung von schlechter zu sehr schlechter Verbrennung beobachtet (siehe Balkendiagramm Abb.5.7). Theoretisch sollten die Massen an Verbrennungspartikeln jedoch entsprechend den verschlechterten Verbrennungsbedingungen zunehmen.

Die Ursache für die unterschiedlichen Verläufe der gravimetrischen Massebestimmung und den CO-Werten könnte in den unterschiedlichen Orten der Probenentnahme liegen.

Während der Gasvolumenstrom für die SMPS-Messungen und die gravimetrischen Auswertungen aus dem Konditionierungsreaktor der Expositionseinheit entnommen wird, erfolgt die Bestimmung des CO-Wertes direkt aus dem unverdünnten Aerosolstrom.

Weiterhin könnten sich insbesondere bei der sehr schlechten Verbrennung verstärkt größere Agglomerate bilden. Diese würden durch den Vorabscheider (ab einer Agglomeratgröße  $> 1 \mu\text{m}$ ) aus dem Gasstrom entfernt werden und tragen folglich nicht mehr zu den gravimetrischen Werten bei.

In Abb. 5.10 sind die SMPS-Werte der einzelnen Verbrennungszustände entsprechend den beiden festgelegten Kriterien für die Verbrennungszustände zusammenfassend dargestellt.

Bei dem Verbrennungszustand "Stückholz gut" liegt das erste Maximum der Anzahlkonzentration bei einem Durchmesser von ca. 30 nm. Das zweite Maximum ist deutlich schwächer ausgeprägt und liegt bei ca. 260 nm.

Die schlechte Stückholzverbrennung zeigt über den gesamten Messbereich einen deutlichen Zuwachs der Partikelanzahl. Das erste Maximum der Anzahlkonzentration liegt ähnlich dem der guten Verbrennung bei ca. 40 nm Partikeldurchmessern. Das zweite Maximum liegt, ebenfalls vergleichbar dem der guten Verbrennung, bei ca. 260 nm, ist jedoch deutlich ausgeprägter. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine häufig auftretende Agglomeratgröße, da bei den TEM-Abbildungen in Arbeitspaket 12 keine entsprechende Anzahl von Primärpartikeln dieser Größenordnung nachgewiesen wurde.

Bei der Einstellung „Stückholz sehr schlechte Verbrennung“ liegt das erste Maximum bei ca. 60 - 70 nm. Insgesamt verläuft die Verteilung um das Maximum breitgipfliger als bei den vorherig beschriebenen Verbrennungszuständen. Dies könnte mit der vermehrten Bildung von Agglomeraten zusammenhängen, welche aufgrund der Rußbildung bei schlechteren Verbrennungsbedingungen verstärkt auftreten. Das zweite Maximum ist innerhalb des Messbereichs nicht ausgeprägt.

Die Anzahlkonzentration an Partikeln im Messbereich wurde im Vergleich zur guten Verbrennung gesteigert, jedoch nicht im Vergleich zur sehr schlechten Verbrennung. Als Ursache für die Diskrepanz kann - ähnlich wie bei den gravimetrisch bestimmten Werten - argumentiert werden, dass wahrscheinlich vermehrt größere Rußagglomerate außerhalb des Messbereichs des SMPS gebildet wurden.

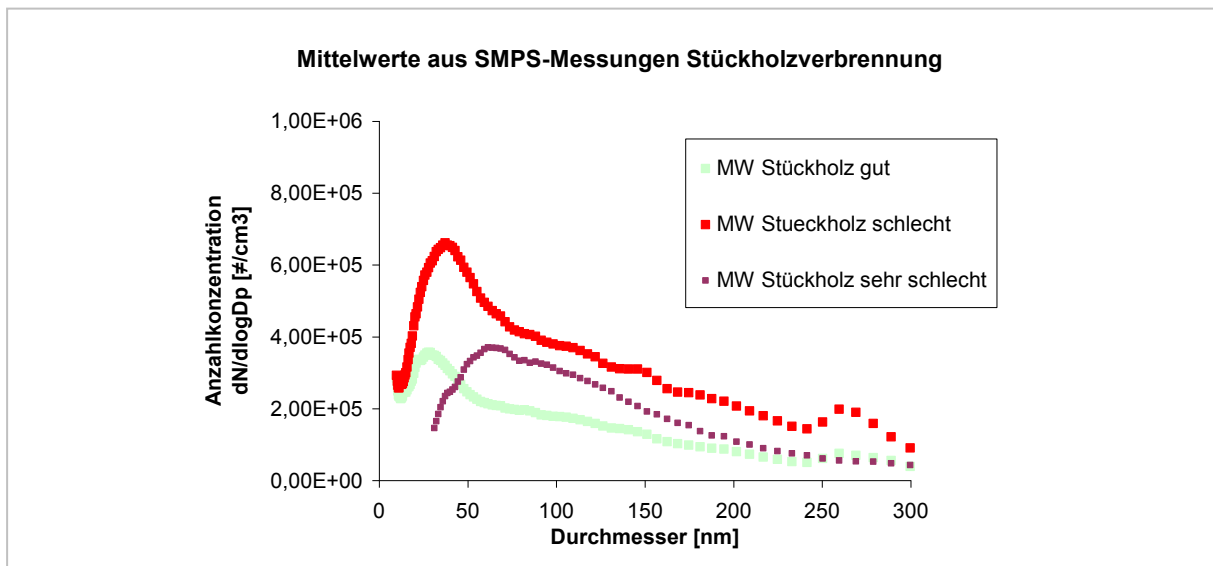


Abbildung 5.10: Grafische Darstellung Mittelwerte Partikelanzahlkonzentrationen aus SMPS-Messungen für die Verbrennungszustände Stückholz gut / Stückholz schlecht / Stückholz sehr schlecht

## 5.5 Partikelanalytik und Darstellung der Zellkulturen in der Übersicht und im Querschnitt

### 5.5.1 Analytik an Partikeln auf Durchflußfiltern:

Ein Teil des Partikelstromes aus dem Konditionierungsreaktor des Expositionssystems wurde jeweils bei den Expositionsversuchen auf Durchflußfilter abgeschieden. Die Filter wurden anschließend gravimetrisch am IFK in Stuttgart ausgewertet.

Ausgewählte Filter wurden am NMI im Rasterelektronenmikroskop (Zeiss XB 1540) bezüglich der Morphologie und elementaren Zusammensetzung der Partikel charakterisiert.

Bei der Holzfeuerung wurden mittels EDX folgende Elemente detektiert: **C, O, Na, K, S, Cl** (siehe Abb. 5.11). Insbesondere **K** gilt als Tracer-Element für die Holzfeuerung und stammt hauptsächlich aus Salzverbindungen. Die Kalium-Konzentration im Abgas ist vom Brenngut, den genutzten Verbrennungsöfen sowie von den Verbrennungsbedingungen Abhängig [19]. Vollständige bzw. „gute“ Verbrennungen führen zu hohen Kaliumkonzentrationen, schlechte Verbrennungen hingegen führen zu hohen **C**-Werten

In Abb. 5.11 sind beispielhaft für die Verbrennungszustände die Partikel aus dem Abgas dargestellt. Die Pellet Feuerung zeigt im Gegensatz zu der Stückholzfeuerung deutlich mehr Salze. Diese lassen sich an der Teils kantigen Form erkennen. Weiterhin spielen vermutlich auch hohe Ascheanteile im Nanobereich eine Rolle.

Im EDX-Spektrum der Pelletverbrennung ist ein geringerer C-Anteile und deutlich mehr K und O als bei der Stückholzfeuerung erkennbar. Wie bereits in Arbeitspaket 9 aufgezeigt wurde, konnte der Verbrennungszustand Pellet schlecht nicht in ausreichendem Maße ausgeführt werden.

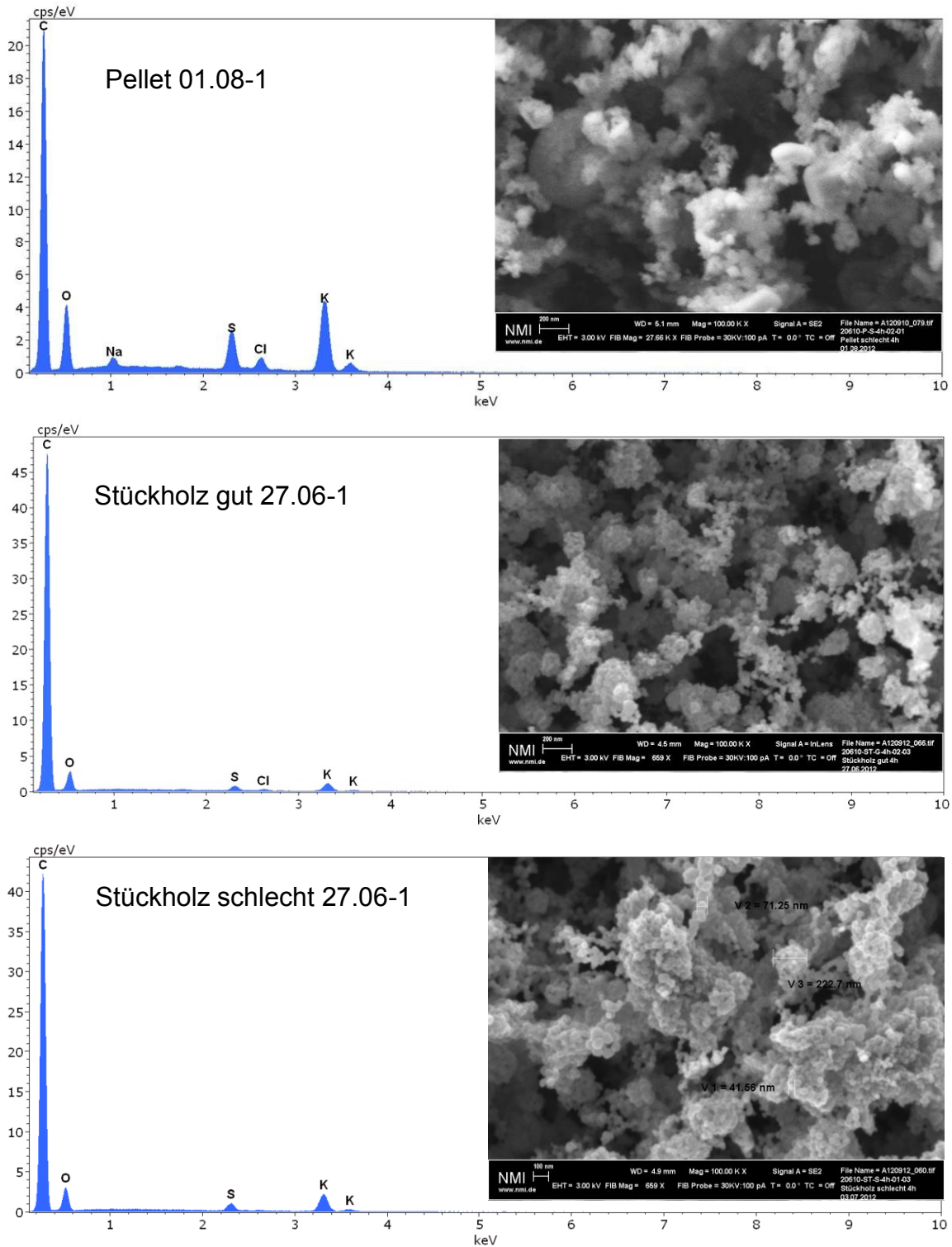


Abbildung 5.11: Beispielhafte EDX-Spektren und SEM-Abbildungen (von oben nach unten) : Pellet Verbrennung / Stückholz gut / Stückholz schlecht

Die Stückholzfeuerung hingegen, weist hohe Anteile an Kohlenstoff auf (ca. 80%). Bei dem Kohlenstoff handelt es sich wahrscheinlich hauptsächlich um Rußpartikel. Diese lassen sich morphologisch an der Partikelgröße, ovalen Form sowie der Agglomeratbildung erkennen.

Die Primärpartikel liegen hauptsächlich im Größenbereich von ca. 30 - 50 nm Durchmesser. Weiterhin sind Agglomerate im Bereich von ca. 200 - 400 nm häufig erkennbar. Das 2. Maximum der Partikelanzahlkonzentration aus den SMPS-Messungen liegt bei ca. 260 nm, in den SEM-Abbildungen der Stückholzverbrennungen (Abb. 5.11) sind keine Primärpartikel der entsprechenden Größenordnung auffindbar. Die SMPS Messungen (Abb. 5.9 und 5.10) zeigen somit, dass die Agglomerate sich nicht vollständig auf dem Filter erst gebildet haben, sondern bereits im Aerosol vorlagen.

Quantitative EDX-Aussagen zur Unterscheidung der Verbrennungszustände Stückholz gut und Stückholz schlecht konnten aus den Filterproben nicht gewonnen werden. Da die Filter aus Papierfasern bestehen, könnten sie bei der quantitativen EDX-Auswertung zu den C- und O-Gehalten ebenfalls beitragen. Bei den EDX-Messungen wurde zwar versucht auf stark belegten Filterbereichen zu messen, jedoch sind die Faseranordnungen unter dem Partikelteppich und ihr Beitrag zu den Messungen nicht immer ersichtlich.

## 5.5.2 Analytik an Partikeln auf TEM-Grids

Zeitgleich mit den Lungenepithelzellen wurden mit TEM-Grids bestückte Transwelleinsätze exponiert. Im Unterschied zu Probenahmen auf Durchflussfiltern unter Kapitel 3.5.1 erfolgen hier die Probenahmen der Partikel direkt am Ort der Zellexposition.

Die anschließende elektronenmikroskopische Auswertung der TEM-Grids liefert hauptsächlich qualitative Aussagen über die exponierten Partikel.

Die Berechnung der exponierten Partikelmengen über bildanalytische Auswertung wie in Arbeitspaket 2, ist aufgrund der teils zu starken Belegung der Probenträger nur bei vereinzelt Expositionsversuchen möglich. Der dreidimensionale Charakter der Agglomerate würde bei der Umrechnung auf eine zweidimensionale Größe bei stark belegten Probenträgern einen zu hohen Fehler liefern.

Die TEM-Grids in Abb. 5.12 wurden jeweils 2 h mit den Verbrennungsprodukten exponiert. Bereits mit dem Auge lassen sich je nach Verbrennungszustand unterschiedliche Schwärzungen des Transwelleinsatzes feststellen, wobei die schlechte Verbrennung die intensivsten Schwärzungen aufweist. Im hochauflösenden Elektronenmikroskop werden je nach Schwärzungsgrad unterschiedlich stark belegte Oberflächen der Probenträger sichtbar.

Die Primärpartikel der Stückholzverbrennung weisen in beiden Verbrennungszuständen ähnliche Größenverteilungen auf. Sie sind hauptsächlich um ca. 30 - 50 nm im Durchmesser (siehe Abb. 5.12). Nur in Ausnahmen sind Primärpartikel einzeln auffindbar. Sie schließen sich hauptsächlich zu Agglomeraten im Größenbereich von ca. 200 - 500 nm zusammen. In den EDX-Analysen wurden bei der Stückholzfeuerung folgende Elemente nachgewiesen (siehe Abb.5.13): **C, O, Si, S, K**.

Das Element Kupfer in den EDX-Analysen wird durch Fluoreszenz am Probenträgermaterial (Cu-Grid) verursacht.

Bei der guten Verbrennung wurden häufiger als bei der schlechten Verbrennung Salzpartikel, hauptsächlich aus Kaliumsulfat, nachgewiesen. Diese sind teilweise über 1 µm groß (siehe Abb. 5.14). Neben den Salzen dominieren Agglomerate, welche hauptsächlich aus C-haltigen Partikeln (Ruß) bestehen.



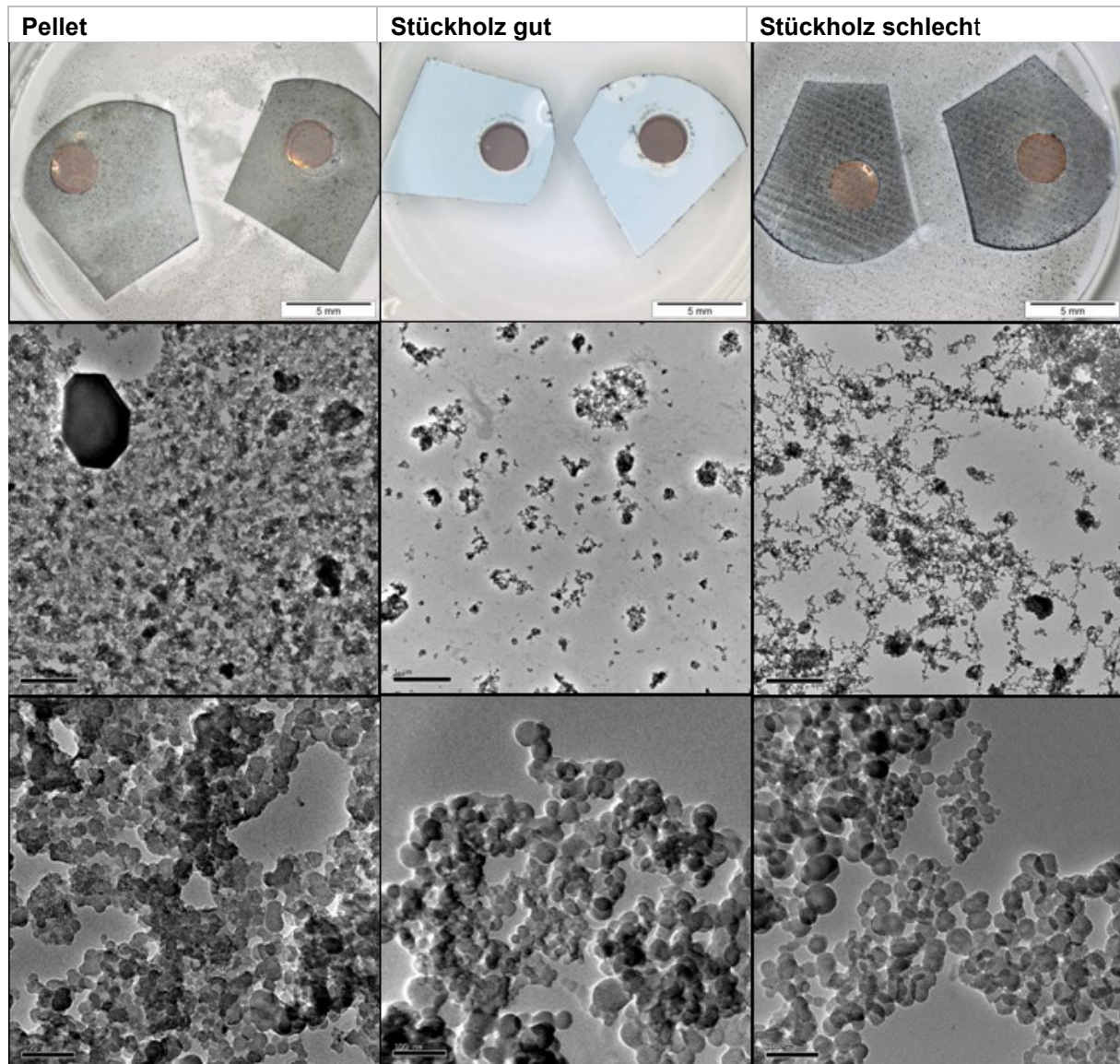


Abbildung 5.12: Spalte 1: Pellet Verbrennung / Spalte 2: Stückholzverbrennung gut / Spalte 3: Stückholzverbrennung schlecht. In der oberen Abbildung sind jeweils die in Transwells befestigten TEM-Grids dargestellt, darunter die Partikel im TEM mit verschiedenen Vergrößerungen

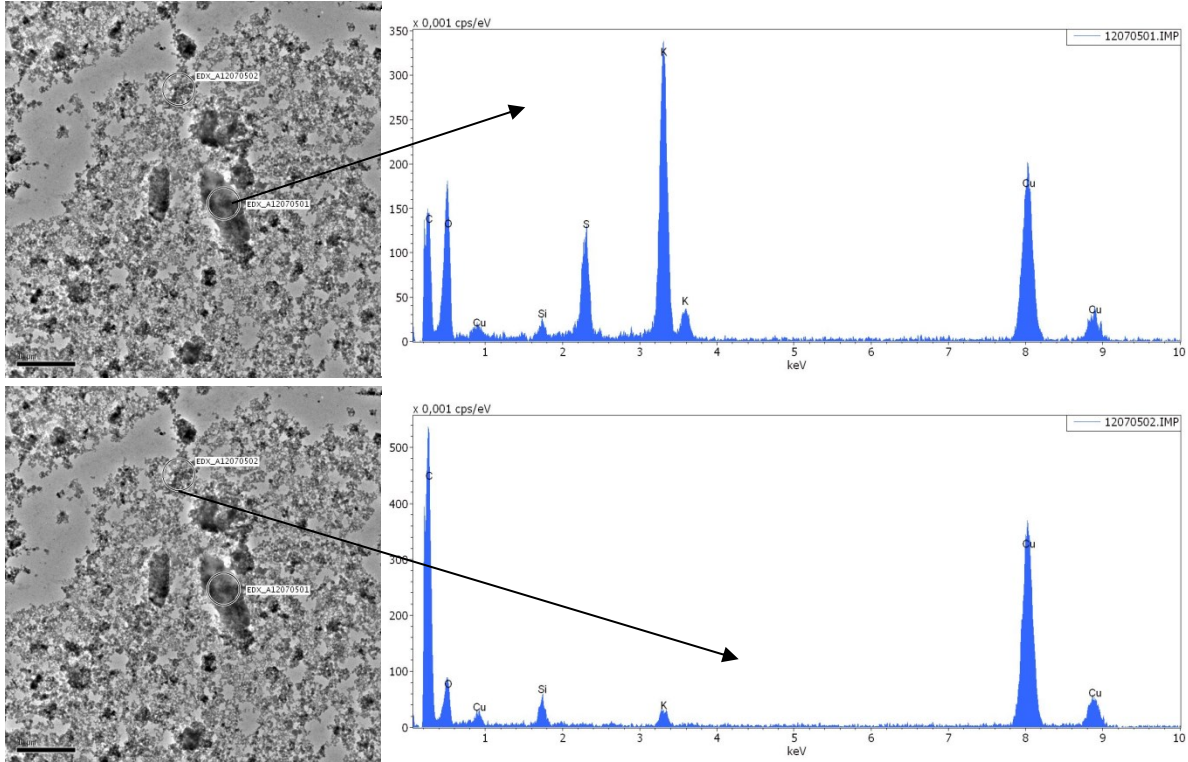


Abbildung 5.13: links: TEM-Abbildungen Stückholzfeuerung gut (4h Beaufschlagung) / oben rechts: EDX-Messung an KSO<sub>4</sub>-Salz / unten rechts EDX-Messung an Agglomerat (Cu von Fluoreszenzstrahlung an TEM-Grid)

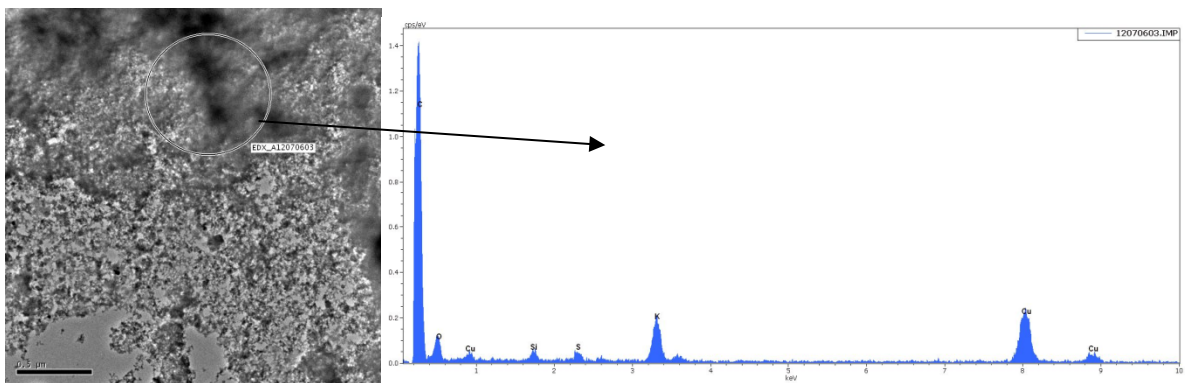


Abbildung 5.14: links: TEM-Abbildung Agglomerate Stückholzfeuerung schlecht / rechts EDX-Messung (Cu von Fluoreszenzstrahlung an TEM-Grid)

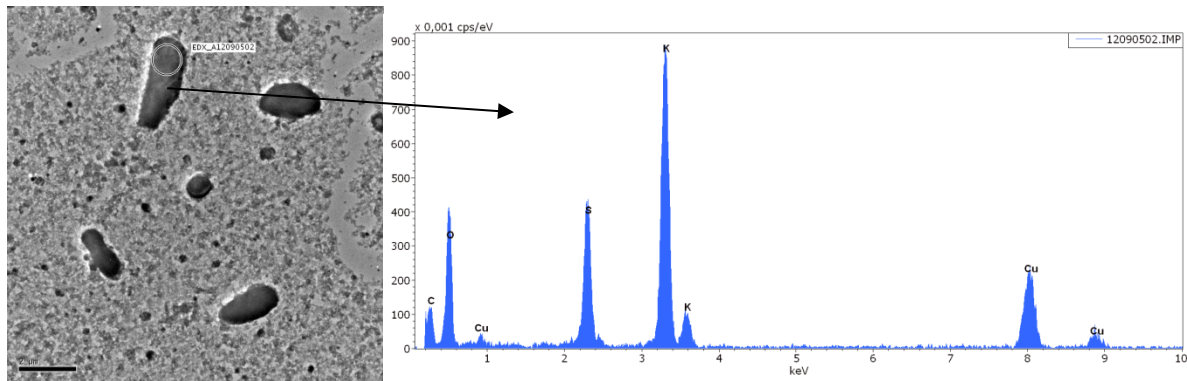


Abbildung 5.15: links: TEM-Abbildung Pelletfeuerungspartikel / rechts EDX-Messung (Cu von Fluoreszenzstrahlung an TEM-Grid)

Bei der Pellet Verbrennung sind einzelne, große kristalline Partikel um ca. 1 - 2  $\mu\text{m}$  Größe erkennbar. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Kaliumsulfat-Salze (siehe Abb. 5.15).

Die Primärpartikel sind häufig stark verbacken (siehe Abb. 5.12) und die Belegung ist hoch. Durch diese Umstände können die Agglomeratgrößen nicht wie bei der Stückholzverbrennung bestimmt werden.

### Bestimmung der beaufschlagten Partikelmassen aus TEM-Abbildungen

In Kapitel 4.4.3 erfolgte die rechnerische Abschätzung der auf die Zellen deponierten Verbrennungspartikel aus den gravimetrisch bestimmten Staubmassen.

Zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse wurden TEM-Abbildungen bildanalytisch ausgewertet. Die TEM-Grids wurden parallel zu den Zellen in der Expositionseinheit beaufschlagt, während die gravimetrische Abscheidung der Partikel auf Filtern außerhalb der Expositionskammern stattfand. Die erzeugten Partikelmassen wurden anhand von TEM-Abbildungen aus der Einstellung „Stückholz gute Verbrennung“ (Versuch vom 27.6 über 2h) überprüft. Die elektronenmikroskopischen Abbildungen aus der schlechten Verbrennung waren wegen zu starker Belegung nicht sinnvoll bildanalytisch auswertbar. In Abb. 5.16 sind die binären Abbildungen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, wie sie für die Bildanalyse vorbereitet wurden, dargestellt. Darunter ist das Vorgehen bei der rechnerischen Abschätzung der deponierten Partikelmassen dargestellt.

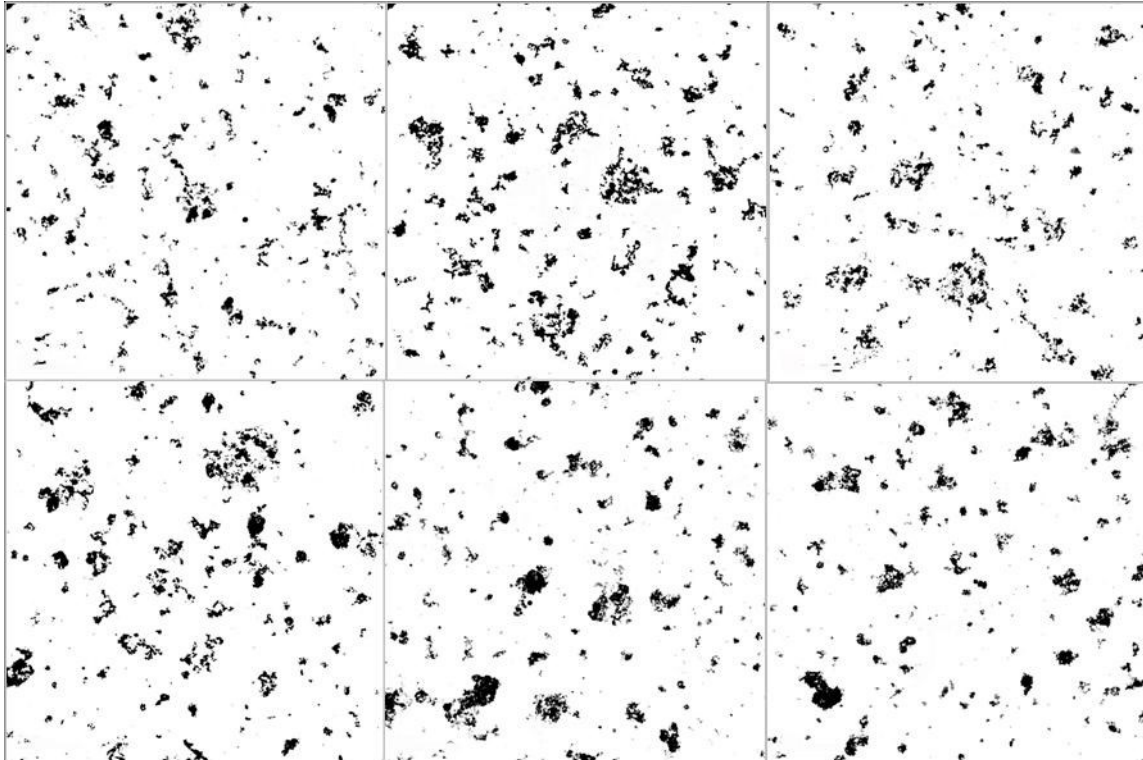


Abbildung 5.16: Binärbilder von TEM-Abbildungen Expositionsversuch Stückholz gute Verbrennung vom 27.06 (2h Versuch)

Rechnerische Abschätzung der deponierten Masse an Verbrennungspartikeln (aus Bildanalyse):

Fläche einer TEM-Abbildung:  $40,96 \mu\text{m}^2$   
Fläche Transwell:  $4908738,52 \mu\text{m}^2$

MW Belegung aus Bildanalyse:  $2,49 \mu\text{m}^2$   
MW Belegung Transwell:  $297768,98 \mu\text{m}^2$

Annahme:

mittlerer Partikeldurchmesser  $0,040 \mu\text{m}$   
mittlere Partikeldichte:  $2 \mu\text{g}/1000\mu\text{m}^3$

Formel:

MW Belegung in Transwell x Partikeldurchmesser x Partikeldichte = Partikelmasse

Berechnete Masse aus Bildanalyse: **23,82  $\mu\text{g}$**

Zum Vergleich Berechnete Masse aus Gravimetrie: **22,8  $\mu\text{g}$**

Die rechnerische Abschätzung aus der Bildanalyse zeigt ein um ca. 4% höheres Ergebnis als die Abschätzung aus den gravimetrischen Werten. Im Rahmen der Messschwankungen unterscheiden sich die Abschätzungen somit nicht signifikant.

Der angenommene mittlere Durchmesser und die Partikeldichte sind Schätzwerte und können von den realen Werten der Partikel abweichen. Weiterhin wurde das Volumen der Partikel Flächen füllend mit einer Höhe von 40 nm eingebracht. Auch hier kann der Unterschied zu den realen Partikeldurchmessern bzw. Formen eine Abweichung liefern.

### 5.5.3 Darstellung der exponierten Zellen

Direkt nach der Exposition der Zellen gegenüber den Partikeln aus der Biomassefeuerung wurden diese an Ort und Stelle chemisch fixiert. Dadurch wurden transportbedingte Stressreaktionen der Zellen verhindert. Nach dem Transport an das NMI wurde ein Teil der Zellen ohne zeitliche Verzögerung für die Elektronenmikroskopie präpariert. Dazu mussten die fixierten Zellen in mehreren Arbeitsschritten kontrastiert und entwässert werden. Nach der Einbettung der Zellproben in Kunstharz wurden mit dem Ultramikrotom dünne Querschnitte durch die Zellen hergestellt.

Ziel der Präparationen war die Darstellung der Interaktion zwischen der Zellmembran und den exponierten Partikeln und die Beantwortung der Frage, ob sich Partikel finden, welche von den Zellen aufgenommen wurden.

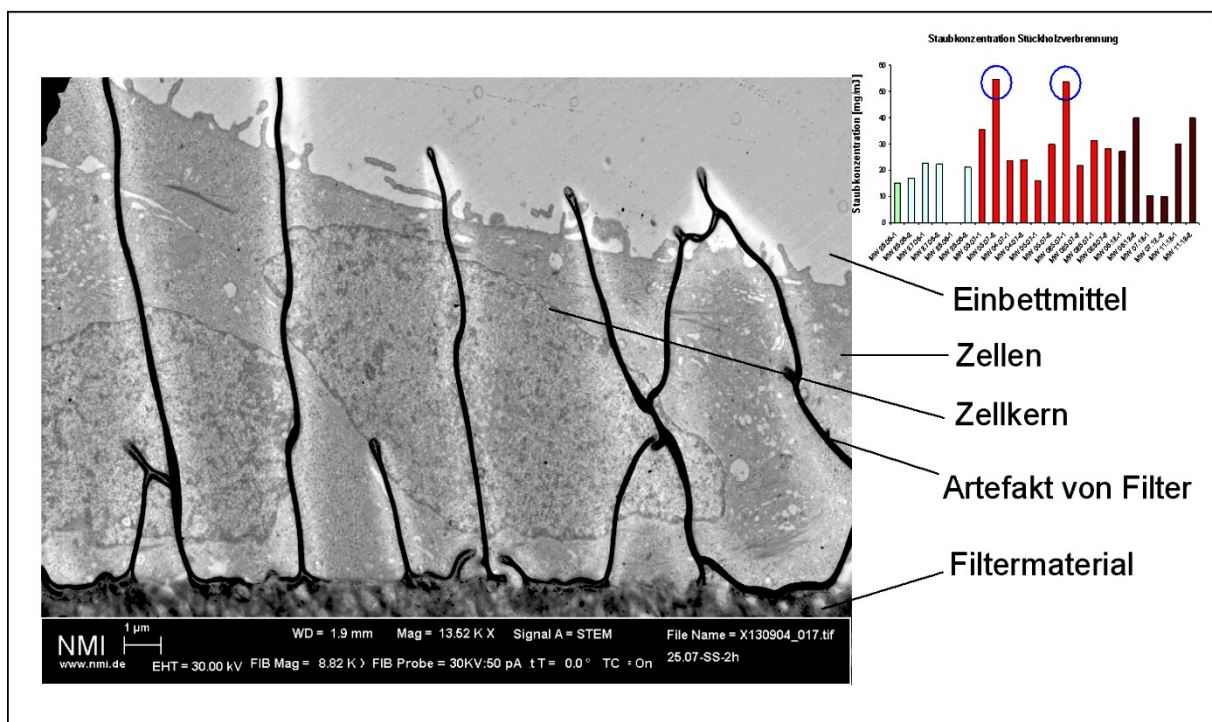


Abbildung 5.17: TEM-Abbildung Dünnschnitt von Zellen auf Membran / oben rechts: gravimetrische Massenbestimmung für die Stückholzverbrennung

Die eingekreisten Tage (Balkendiagramm) der „Stückholzverbrennung schlecht“ aus Abbildung 5.17 wurden für die Zellpräparation ausgewählt (03.07-2 und 25.07-1). Versuche dieser Tage zeichnen sich durch hohe Partikelkonzentrationen aus. In der gleichen Abbildung ist der Dünnschnitt durch eine Zellprobe im Elektronenmikroskop dargestellt (Zeiss XB 1540). Die Zellen sind dicht auf dem Filtermaterial angewachsen. Durch die Präparation bedingt haben sich Teile der Filteroberfläche über das Präparat gelegt (dunkle, feine Strukturen). Innerhalb der Zellen sind Zellkerne erkennbar. Direkt über der Zelle befindet sich das Einbettmittel (Kunstharz).

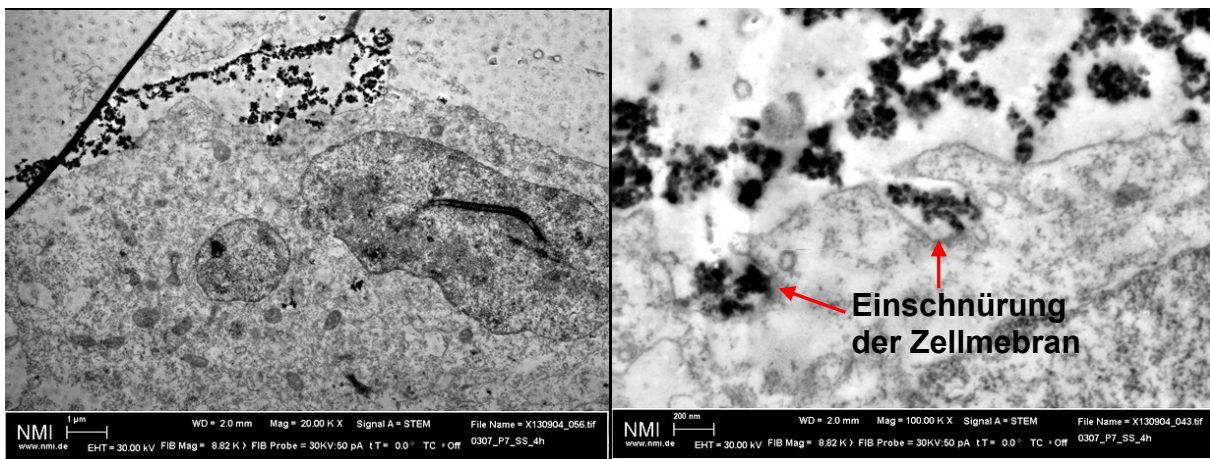
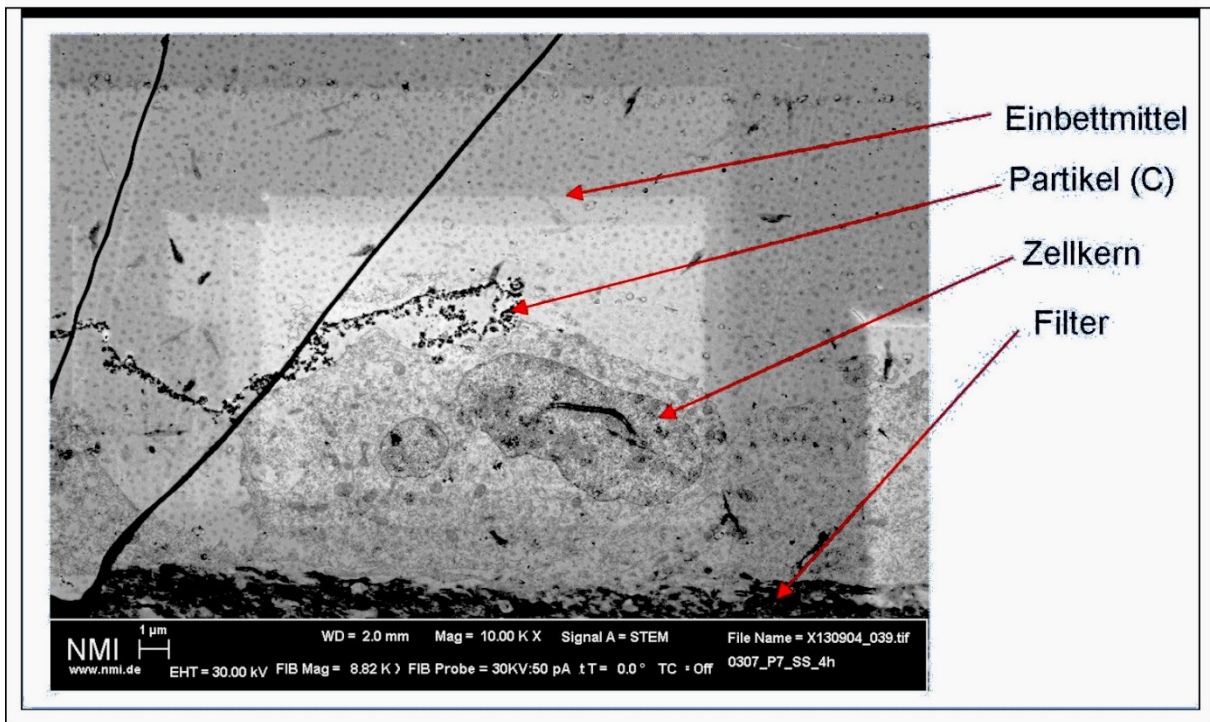


Abbildung 5.18: elektronenmikroskopische Abbildungen von Dünnschnitten A549 - Zellen mit Verbrennungspartikeln exponiert

Die Präparate in Abb. 5.18 und in Abb. 5.19 zeigen Partikel an der Oberfläche der Zellen. Die Partikel entsprechen von ihrer Morphologie und Primärpartikelgröße den Verbrennungspartikeln (siehe Kapitel 5.5.2).

Es wurden fast ausschließlich Partikelagglomerate an den Zelloberflächen nachgewiesen. Diese können somit aufgrund Ihrer Größe nicht direkt die Zellmembran durchdringen, wozu einzelne Nanopartikel fähig sein könnten.

Bei den Partikeln handelt es sich um Rußagglomerate. Die Salzpartikel aus der Verbrennung wurden größtenteils im Fixierungsschritt (Formaldehyd in Wasser) gelöst und sind somit nicht mehr darstellbar.

Die Zellmembran ist in den abgebildeten Präparaten intakt. Die Partikel liegen stellenweise auf der Zellmembran, sind aber nicht in das Zellinnere eingedrungen. Innerhalb der hochauflösenden Abbildungen der Zellen (siehe Abbildung 5.18 und 5.19) sind stellenweise Einschnürungen der Zellmembran um Partikelansammlungen erkennbar. Inwieweit die eingeschnürten Partikel letztendlich von der Oberfläche abtransportiert oder mittels Endozytose in das Zellinnere gebracht werden, ist aus den Abbildungen nicht ersichtlich.

Die präparierten Zellen zeigen teilweise Vesikelbildungen in ihrem Inneren. Diese sind als Zeichen der beginnenden Apoptose (programmierter Zelltod) zu betrachten. Inwieweit die Verbrennungspartikel zur Schädigung der Zelle geführt haben oder andere Ursachen vorliegen, kann durch die zu geringe Anzahl an biologischen Präparaten nicht beantwortet werden. Die Aufnahmen verdeutlichen jedoch, dass die Zellmembran durchaus eine Reaktion auf die Verbrennungspartikel zeigt, indem sie versucht diese einzukapseln.

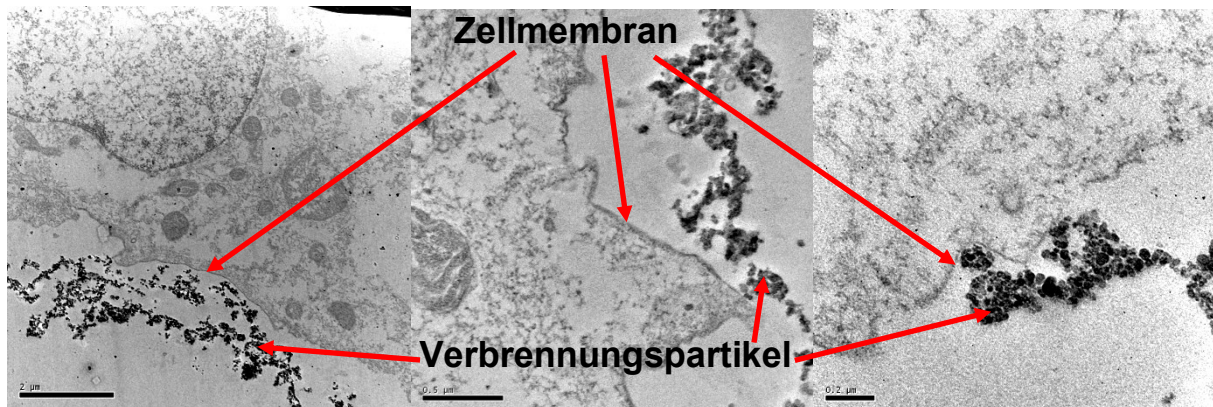


Abbildung 5.19: elektronenmikroskopische Abbildungen von Dünnschnitten A549-Zellen mit Verbrennungspartikeln exponiert



## 5.6 Zusammenfassung Partikelanalytik und Darstellung der Zellen

Die Analysekontrolle zur Optimierung des Expositionssystems ergab eine bis zu 6-fach erhöhte Abscheiderate durch die Einstellung eines negativen elektrischen Feldes innerhalb der Expositionseinheit. Die Erhöhung der Partikelabscheideeffizienz gegenüber der im Projekt Nanotox I verwendeten Versuchsanordnung wurde somit erfolgreich am KIT durchgeführt.

Eine Hauptaufgabe der Analytik während der Projektdurchführung, lag in der Charakterisierung der Verbrennungspartikel und deren Zuordnung zu den eingestellten Verbrennungszuständen. Mittels SMPS-Messungen wurden die Anzahlkonzentration der Verbrennungspartikel bestimmt. Die Morphologie und elementare Zusammensetzung der Aerosole wurde elektronenmikroskopisch bewertet. Zusätzlich zur Partikelanalytik sollten auch mit Verbrennungsaerosolen beaufschlagte Zellen dargestellt werden.

### Charakterisierung der Stückholzverbrennung

Bei dem Verbrennungszustand „Stückholz gut“ liegt das erste Maximum der Anzahlkonzentration bei einem Durchmesser von ca. 30-50 nm. Das zweite Maximum ist deutlich schwächer ausgeprägt und liegt bei ca. 260 nm.

Mittels EDX wurden bei der Stückholzfeuerung folgende Elemente nachgewiesen: **C, O, S, Cl, K**. Bei der guten Verbrennung treten häufiger Salzpartikel (hauptsächlich aus Kaliumsulfat) als bei der schlechten Verbrennung auf. Diese sind teilweise bis zu 1 µm groß. Neben den Salzen dominieren Agglomerate, welche größtenteils aus amorphen Kohlenstoff-haltigen Partikeln (Ruß) bestehen. Der Ruß lässt sich morphologisch an der Partikelgröße, ovalen Form sowie der Agglomeratbildung erkennen.

Die schlechte Stückholzverbrennung zeigt über den gesamten Messbereich einen deutlichen Zuwachs der Partikelanzahl. Das erste Maximum der Anzahlkonzentration liegt ähnlich dem der guten Verbrennung bei ca. 40 nm Partikeldurchmessern. Das zweite Maximum liegt, ebenfalls vergleichbar dem der guten Verbrennung, bei ca. 260 nm, ist jedoch deutlich ausgeprägter.

Bei der Einstellung „Stückholz sehr schlechte Verbrennung“ liegt das erste Maximum bei ca. 60 - 70 nm. Insgesamt ist die Verteilung um das Maximum „breitgipfliger“ als bei den zuvor beschriebenen Verbrennungszuständen.

Die Anzahlkonzentration an Partikeln im Messbereich wurde im Vergleich zur guten Verbrennung gesteigert, jedoch nicht im Vergleich zur sehr schlechten Verbrennung.

Die Ergebnisse der SMPS-Messungen korrelieren mit den Massebestimmungen über die Gravimetrie der Filterbelegung. Auch hier konnte keine signifikante Steigerung der Partikelmasse der sehr schlechten Verbrennung gegenüber der schlechten Verbrennung erzielt werden. Als Ursache für die Diskrepanz kann angenommen werden, dass vermutlich vermehrt größere Rußagglomerate gebildet wurden, welche durch den Vorabscheider aus dem Aerosol entfernt wurden und dadurch außerhalb des Messbereichs des SMPS liegen.

Die CO-Konzentrationen liefern hingegen signifikant unterscheidbare Werte für die einzelnen Verbrennungseinstellungen. Angefangen bei der guten Verbrennung über die schlechte Verbrennung bis zur sehr schlechten Verbrennungseinstellung wurden die CO-Werte jeweils signifikant gesteigert.

### **Charakterisierung der Pellet Verbrennung**

Die Pellet Feuerung zeigt lediglich an 2 Tagen Partikelemissionen (gravimetrisch bestimmt), die laut Definition als schlechte Verbrennung deklariert werden konnten. Somit sind für eine statistische Aussage zu wenige Versuchstage mit hoher Partikelkonzentration vorhanden. Auffallend sind zudem die sehr niedrigen CO-Werte über die Versuchstage. Die Einstellung von schlechten Verbrennungsparametern wurde daraus folgernd bei der Pellet Feuerung nicht erreicht. Ursachen liegen sowohl in der Auswahl des Brenngutes, der kontinuierlichen Bestückung, als auch in der erschwerten Regelbarkeit des Ofens, hin zu schlechten Verbrennungsbedingungen.

Das erste Maximum der Anzahlkonzentration liegt bei einem Mobilitätsdurchmesser von ca. 40 nm. Das zweite Maximum befindet sich bei ca. 280 nm.

Mittels EDX wurden bei der Pellet Feuerung folgende Elemente nachgewiesen: **C, O, S, Cl, K.**

Die Pellet Feuerung zeigt im Gegensatz zu der Stückholzfeuerungen deutlich mehr Salze. Im EDX-Spektrum der Pelletverbrennung ist ein geringerer C-Anteil und deutlich mehr K und O als bei der Stückholzfeuerungen erkennbar. Die Salzpartikel lassen sich an der teils kantigen Form erkennen und sind um ca. 1 - 2 µm Größe. Die kleineren Primärpartikel sind häufig stark verbacken und die Belegung ist hoch.

### **Darstellung von mit Verbrennungspartikeln beaufschlagten Zellen**

Es wurden fast ausschließlich Partikelagglomerate an den Zelloberflächen nachgewiesen. Diese können somit aufgrund Ihrer Größe nicht direkt die Zellmembran durchdringen, wozu einzelne Nanopartikel fähig sein könnten.

Bei den Partikeln handelt es sich um Rußagglomerate. Die Salzkpartikel aus der Verbrennung wurden größtenteils gelöst und sind somit nicht mehr darstellbar.

Die Zellmembranen sind in den abgebildeten Präparaten intakt. Die Partikel sind stellenweise auf der Zellmembran erkennbar, sind aber nicht in das Zellinnere eingedrungen. An manchen Stellen sind Einschnürungen der Zellmembran um Partikelansammlungen erkennbar. Ob die eingeschnürten Partikel letztendlich von der Zelloberfläche abtransportiert oder in das Zellinnere zum Abbau gebracht werden, ist aus den Abbildungen nicht ersichtlich.

Die präparierten Zellen zeigen teilweise Vesikelbildungen in ihrem Inneren. Die Aufnahmen verdeutlichen jedoch, dass die Zellmembran durchaus eine Reaktion auf die Verbrennungspartikel zeigt indem sie diese versucht einzuschnüren.

## 6 Zellbiologie

### 6.1 Etablierung der Zellkulturen und Optimierung der Stabilität der Referenzproben

Die Aufgabe des Arbeitspaketes 4 bestand darin, neben der Lungenkarzinomzelllinie A549 eine weitere Zelllinie für Begasungsversuche auszuwählen. Dazu wurden fünf weitere Kandidatenzelllinien in Hinblick auf ihre Antwort auf Exposition gegenüber Printex® 90 getestet. Am Ende wurde als weitere Zelllinie die Linie SK-MES-1 ausgewählt.

#### 6.1.1 Auswahl einer weiteren Zelllinie anhand der Antwort auf Exposition gegenüber Printex® 90

Für das Projekt sollte eine weitere Zelllinie neben der A549-Linie für die Begasungsversuche eingesetzt werden. Von der Verwendung zweier Zelllinien versprechen wir uns eine bessere Repräsentation der genetischen Variabilität in der Bevölkerung, als es bei der Beschränkung auf ausschließlich eine Zelllinie möglich ist.

Um eine geeignete Zelllinie festlegen zu können, wurden fünf weitere Lungentumorzellen hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Stimulation durch Printex® 90 untersucht, die anderen Lungengewebetypen entstammen als die A549-Zellen. Wie bereits zuvor die A549-Zellen wurden diese Zellen von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

Die A549-Linie ist eine humane Lungenadenokarzinom - Zelllinie, sie stammt aus Alveolarepithelzellen, (Pneumozyten des Typs 2). Dieser Zelltyp findet sich in den Alveolen oder Lungenbläschen.

NCI-H226 und SK-MES-1 sind humane Schwammzellkarzinomlinien (*squamous cell cancer lines*). Dieser Typ des Lungenkarzinoms entsteht meist aus Zellen, die die Luftwege auskleiden und wird oft im Zentrum der Lunge in einer der Hauptbronchien gefunden.

NCI-H460 ist eine humane großzellige Lungenkarzinomlinie (*large cell cancer line*). Die Zellen dieses Karzinomtyps zeichnen sich durch großes und rundes Aussehen unter dem Mikroskop und schnelles Wachstum des Tumors aus.

NCI-H358 ist eine bronchioalveolare Karzinomlinie aus peripheren Lungenbereichen, NCI-H69 ist eine kleinzellige Lungenkarzinomlinie (*small cell lung cancer line/oat cell cancer line*).

Für A549-Zellen und die fünf neuen Linien wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt, mithilfe derer die Expression der drei inflammatorischen Marker IL-8, IL-6 und ICAM in Abhängigkeit von der Konzentration des in Suspension angebotenen Printex® 90 dargestellt wurde (s. Abb. 6.1 bis Abb. 6.3). Die NCI-H69-Zelllinie zeigte allerdings zum einen keine nachweisbare IL-6-Expression und reagierte zum anderen in dem untersuchten Konzentrationsbereich eher mit einer Abnahme der IL-8- und der ICAM-Expression, so dass sie im Folgenden nicht weiter behandelt wird.

Die Expression von IL-8 als Antwort auf die Exposition gegenüber Printex® 90 zeigte im Falle von A549-Zellen und SK-MES-1-Zellen den sigmoidalen Verlauf klassischer Dosis-Wirkungskurven, aus denen IC<sub>50</sub>-Werte von 5,5 µg/ml ermittelt werden konnten (s. Abb. 6.1 A und 6.1 C). Bemerkenswert ist dabei der viel stärkere Anstieg der Expressionshöhe in den SK-MES-1-Zellen auf das ca. 30-Fache im Vergleich zu den A549- und den NCI-H226-Linien (vgl. Abb. 6.1 A, 6.1 B und 6.1 C), die nur einen Anstieg auf das 5-6-Fache zeigten. Im Falle der NCI-H226-Zellen ist der sigmoidale Kurvenverlauf weniger ausgeprägt, der IC<sub>50</sub>-Wert liegt mit 7,1 µg/ml leicht höher. Die NCI-H358-Zellen wiesen nur einen moderaten Anstieg der IL-8-Expression auf das ca. 4-Fache auf (s. Abb. 6.1 E), und bemerkenswerter Weise reagierte die NCI-H460-Zelllinie auf die Exposition nicht mit vermehrter IL-8-Expression (s. Abb. 6.1 D).

Die Expression von IL-6 als Antwort auf die Exposition gegenüber Printex® 90 fiel in allen fünf Linien schwächer aus als die IL-8-Expression (s. Abb. 6.2): Bei den A549-, NCI-H226-, NCI-H460- und NCI-H358-Zellen wurde innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches nur ein Anstieg der Expression auf das 2-4-Fache beobachtet, und bei den SK-MES-1-Zellen auf das 6-Fache (s. Abb. 6.2 C).

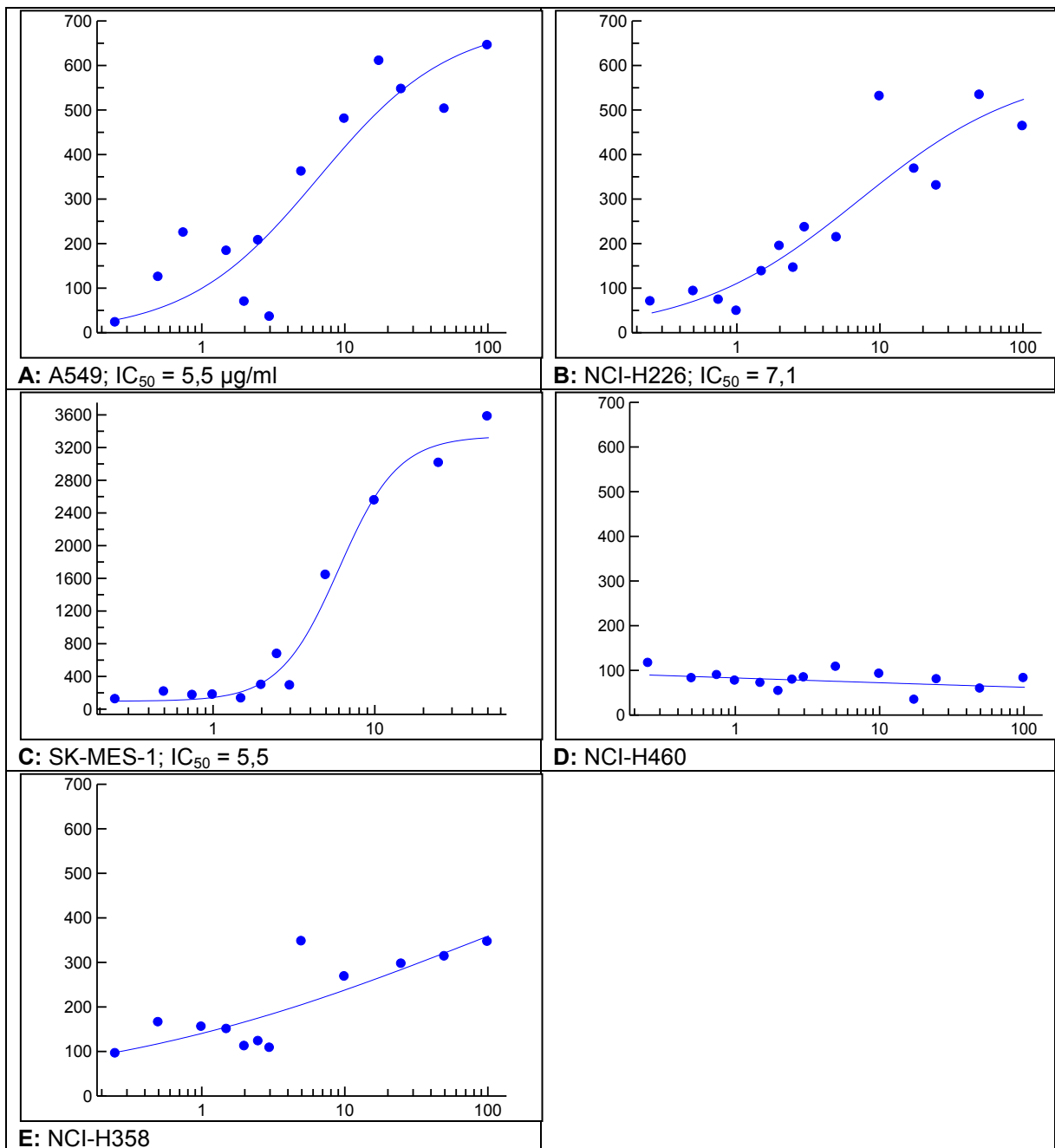


Abb. 6.1: Dosis-Wirkungskurven zur Stimulation der IL-8-Expression

**Legende zu Abb. 6.1 - 6.3:**

Aufgetragen ist jeweils die relative Expressionshöhe in Abhängigkeit von der Printex® 90-Konzentration in µg/ml. Für die Expressionsanalyse wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen je Kavität einer 6-Loch-Platte ausgesät und anderntags für 24 h einer Printex® 90-Suspension in Zellkulturmedium ausgesetzt. Printex® 90-Stammlösungen wurden in PBS (phosphat-gepufferte Salzlösung) resuspendiert und ultraschallbehandelt. Für die Applikation auf die Zellen wurden die Stammlösungen 1:10 mit Kulturmedium verdünnt. Als Kontrolle diente eine 1:10 in Kulturmedium verdünnte PBS-Lösung ohne Printex® 90.

Nach Beendigung der Exposition wurde das Printex® 90-haltige Medium angesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen, RNeasy kit) lysiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription (M-MuLV reverse Transkriptase, New England Biolabs) gemäß Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben, die wiederum für die quantitative Echtzeit-PCR als Matrize diente. Die Expressionshöhen von IL-8, IL-6 und ICAM wurden auf die Expression der GAPDH normiert; die Expressionshöhe der Kontrollzellen wurde gleich 100 gesetzt.

Die Berechnung der sigmoidalen Kurven und die Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte mithilfe der XL Fit 5 Software (idbs).

Von den fünf untersuchten Zell-Linien wick die SK-MES-1-Linie in ihrem Verhalten am stärksten von der A549-Linie ab, so dass diese Zell-Linie als Vergleichslinie für die A549-Zellen in die Begasungsexperimente einbezogen werden wird.

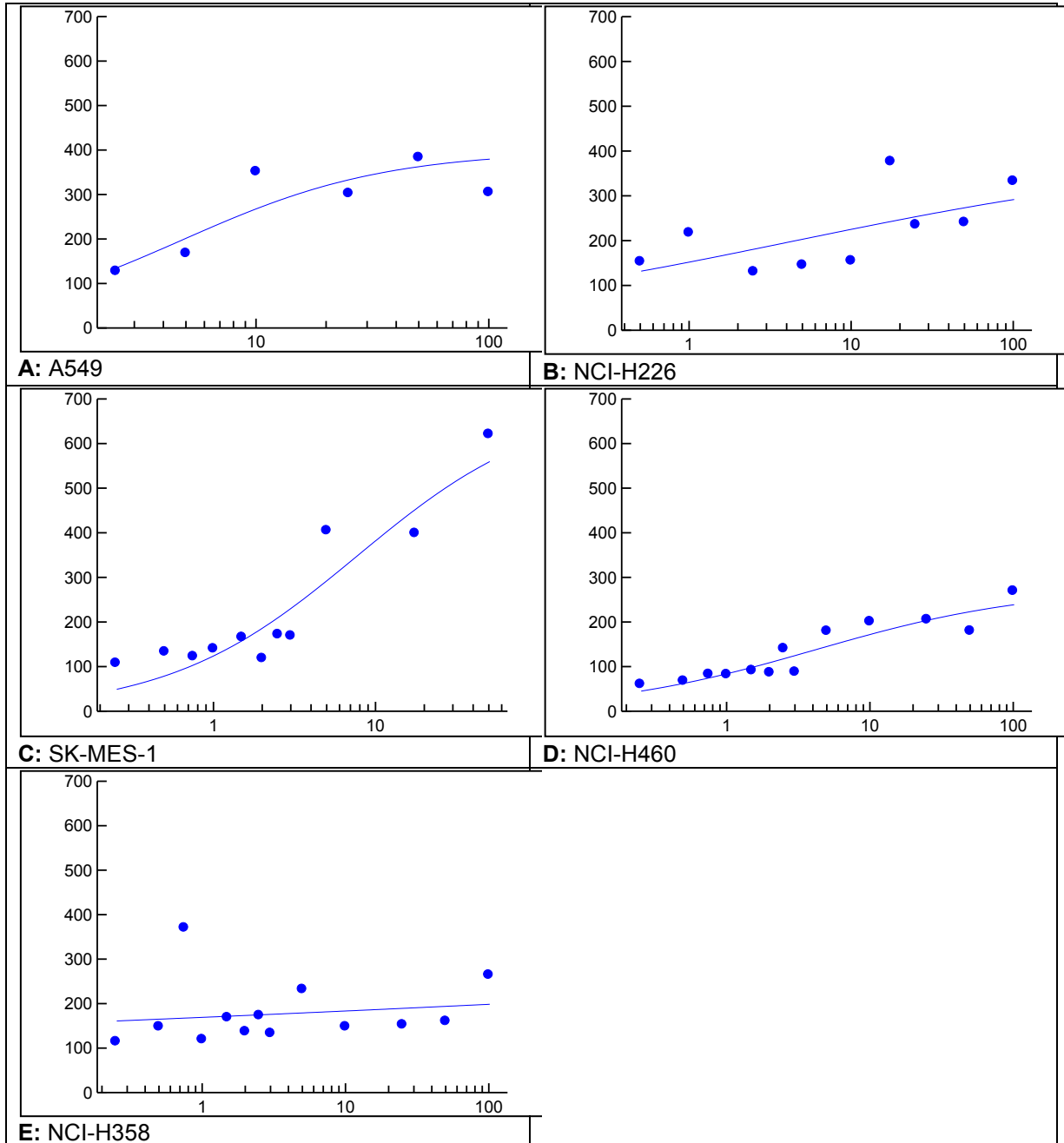


Abb. 6.2: Dosis-Wirkungskurven zur Stimulation der IL-6-Expression

Die schwächste Antwort wurde im Falle der ICAM-Expression beobachtet (s. Abb. 6.3): Die A549-, die NCI-H226-, und die SK-MES-1-Zellen zeigten gerade einmal das ca. 2,5-Fache der ICAM-Expression ohne Stimulation, die NCI-H460- und die NCI-H358-Zellen hingegen zeigten keinen signifikanten Anstieg der ICAM-Expression.



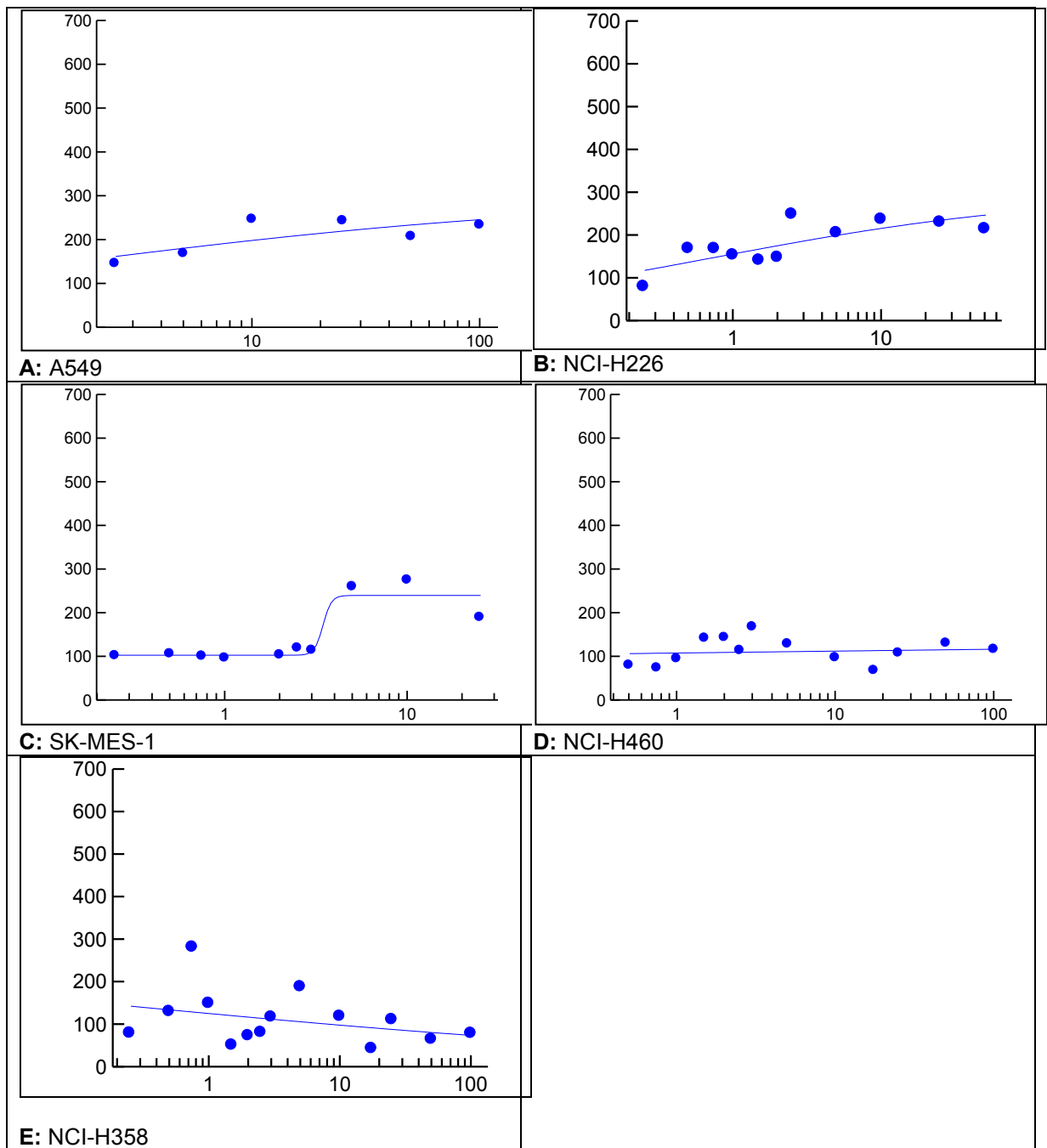


Abb. 6.3: Dosis-Wirkungskurven zur Stimulation der ICAM-Expression

### 6.1.2 Submers Versuche mit Printex® 90 in Abhängigkeit von PBMCs

Zur Erhöhung der Aussagekraft der *In-Vitro*-Lungenzellkultur wurden A549-Zellen mit Makrophagen (peripheral blood monocytes, PBMCs) co-kultiviert (vgl. Lenz *et al* [20] und Müller *et al* [21]). Die PBMCs wurden aus dem Blut humaner Spender mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert, für die Expositionsversuche wurden  $4 \times 10^5$  A549-Zellen/Kavität in Gegenwart oder Abwesenheit von  $1,5 \times 10^6$  PBMCs/Kavität ausgesät und für 24 h gegenüber Printex® 90 (25 µg/ml) submers exponiert. Die Expression der Entzündungsmarker ICAM (*intercellular adhesion molecule 1*), IL-8 (Interleukin-8) und IL-6 (Interleukin-6) wurde 72 Stunden später auf RNA-Ebene über quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) untersucht (s. Abb. 6.4).

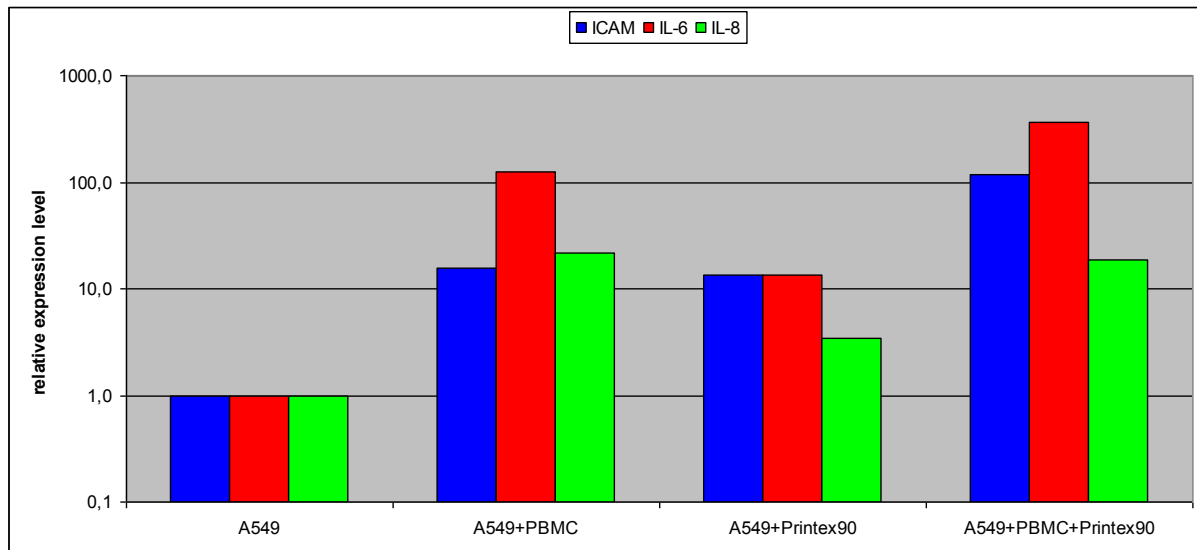


Abb. 6.4: Genexpression von ICAM, IL-8 und IL-6 nach submerser Exposition verschiedener Kulturen gegenüber Printex® 90

Die Expression wurde normiert auf diejenige unbehandelter A549-Zellen ohne PBMCs. Durch die Gegenwart der PBMCs erfolgte eine deutliche Stimulation der Expression von ICAM und IL-8 um ca. das 15- bis 20-fache, bei IL-6 sogar um ca. das 100-fache. Diese Stimulation war etwas stärker als diejenige, die durch die Exposition gegenüber Printex® 90 erzielt wurde: Printex® 90 rief eine ca. 10-fache Erhöhung der ICAM- und der IL-8-Expression sowie eine ca. dreifache Erhöhung der IL-8-Expression hervor.

Wurden A549-Zellen in Gegenwart von PBMCs gegenüber Printex® 90 exponiert, so erfolgte nochmals eine Steigerung der ICAM-Expression gegenüber der Situation mit entweder PBMCs oder Printex® 90 um ca. das 10-fache, so dass ca. das 120-fache der ICAM-Expression unbehandelter A549-Zellen erzielt wurde. Die Expression von IL-6 war nur noch um gut das Doppelte auf das 360-fache der Expression unbehandelter A549-Zellen steigerbar.

Die Expression von IL-8 hingegen erwies sich unter diesen Bedingungen nicht weiter steigerbar und verblieb auf dem 20-fachen der Grundexpression unbehandelter A549-Zellen.

### 6.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die genetischen Unterschiede in der Bevölkerung sollen durch die Aufnahme der SK-MES-1-Linie als zusätzliche Zelllinie für die Begasungsversuche besser berücksichtigt werden, die sich von allen untersuchten Linien am stärksten von der A549-Linie abhebt.

Die Exposition der A549-Zellen in Gegenwart von PBMCs führte zu einer erheblichen Verstärkung der Genexpression von ICAM und IL-6, nicht aber der von IL-8.

Da die PBMCs im Gegensatz zu den Lungenepithelzellen nicht an der Gas-Flüssigkeits-Interphase exponiert werden können und empfindlich auf Veränderungen reagieren, wie sie beim Transport vom Zellkulturlabor in Tübingen zur Exposition in Stuttgart unvermeidlich sind, sollten sie ausschließlich für die Studien mit submers dargereichten Verbrennungspartikeln eingesetzt werden. Für die Durchführung von drei Versuchen stand allerdings nicht ausreichend Spenderblut zur Verfügung, so dass in Arbeitspaket 13 ersatzweise die periphere Blutmonozytenlinie THP-1 eingesetzt wurde.

## 6.2 Bereitstellung der Zelllinien für die Nanopartikelexposition

Die Aufgabe des Arbeitspaketes 10 bestand darin, die im Arbeitspaket 4 ausgewählten Zelllinien A549 und SK-MES-1 zu kultivieren und an den Messtagen (1. Versuchsreihe: 26.6. - 3.8. 2012; 2. Versuchsreihe: 4.-12.12. 2012) bereitzustellen. Darüber hinaus wurden die Negativkontrollen betreut: Zum einen Zellen, die den Transport aus dem Zellkulturlabor zum eigentlichen Versuchsaufbau durchliefen, aber dort nicht exponiert wurden (im Folgenden mit „Kontr.“ bezeichnet); zum anderen Zellen, die gefiltertem Verbrennungsabgas ausgesetzt wurden (um evtl. Einflüsse toxischer chemischer Verbindungen zu bestimmen). Für diese Filtration wurden Glas-Mikrofaserfilter mit 0,3 µm Porengröße (Whatman, Katalog-Nr. 6723-5000) eingesetzt.

Bei der ersten Versuchsreihe erfolgte eine Exposition der Zellen für zwei bzw. vier Stunden. Für die Messung der zellulären Antwort wurden die Zellen unmittelbar nach der Exposition in das Zellkulturlabor zurücktransportiert und dort einen Tag lang weiterkultiviert, um ihnen Zeit zu geben, auf die Belastung zu reagieren. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Genexpression von vier Markerproteinen mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht (s. Arbeitspaket 13). Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (s. Arbeitspaket 12) wurden die Zellen unmittelbar nach der Exposition chemisch fixiert, um die Partikelverteilung möglichst originalgetreu zu erhalten.

Da bei dieser ersten Versuchsreihe kein signifikanter Unterschied zwischen den unfiltriert und den filtriert exponierten Proben festgestellt werden konnte (s. Arbeitspaket 13), wurde in der zweiten Versuchsreihe eine kumulativ sechsstündige Exposition, aufgeteilt in zweistündige Expositionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen, vorgenommen. Somit wurden, wie in Tab. 6.1 schematisch dargestellt, je Woche der Versuchsreihe drei Versuchsdurchläufe durchgeführt, wofür an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils drei Expositionen hintereinander vorgenommen und an den beiden folgenden Tagen wiederholt wurden:

Exposition	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	1	Probe 1			Probe 1			Probe 1	
2		Probe 2			Probe 2			Probe 2	
3			Probe 3			Probe 3			Probe 3

Tabelle 6.1: Schematische Darstellung der Expositionen dreier Zellkulturen

Auch während dieser Versuchsreihe wurden die Zellen für die Messung der zellulären Antwort jeweils unmittelbar nach der Exposition in das Zellkulturlabor zurücktransportiert und dort bis zur erneuten Exposition am Folgetag weiterkultiviert. Nach Abschluss der letzten Exposition wurden die Zellen für einen weiteren Tag kultiviert, um ihnen Zeit zu geben, auf die Belastung zu reagieren.

## 6.3 Auswertung der biochemischen Reaktionen der Zellkulturen auf die Feinstaubapplikationen

Für die Messung der zellulären Antwort wurden die Zellen der ersten Versuchsreihe unmittelbar nach der Exposition in das Zellkulturlabor zurücktransportiert und dort einen Tag lang weiterkultiviert, um ihnen Zeit zu geben, auf die Belastung zu reagieren (vgl. Arbeitspaket 10). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Expression von vier Markerproteinen mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) untersucht.

In der zweiten Versuchsreihe, bei der die Exposition kumulativ über drei Tage erfolgte, wurden die Zellen nach der letzten Exposition gleichfalls für einen weiteren Tag kultiviert, ihnen Zeit für die Ausbildung der zellulären Antwort auf die Belastung einzuräumen.

Die vier untersuchten Markerproteine und ihre wichtigsten Eigenschaften sind in Tab. 6.2 wiedergegeben:

<p><b>IL-8 (Interleukin-8; CXCL8)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- proinflammatorisches Zytokin</li> <li>- wird u.a. von Epithelzellen sezerniert</li> <li>- Indikator u.a. für oxidativen Stress</li> <li>- bis 40-fache Induktion der Expression auf mRNA-Ebene beschrieben (Lenz <i>et al</i> [20].)</li> </ul>	<p><b>ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1; CD54)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- proinflammatorisches Glykoprotein der Zelloberfläche</li> <li>- bindet Makrophagen u. Leukozyten</li> <li>- bis 30-fache Induktion der Expression auf mRNA-Ebene beschrieben (Gojova <i>et al</i>. [23]; Lakshminarayanan <i>et al</i> [24].)</li> </ul>
<p><b>HSP72 (heat shock protein 72; HSPA1A)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- verbessert das Zellüberleben unter Stress durch Inhibieren der Apoptose</li> <li>- bis 80-fache Induktion der Expression auf mRNA-Ebene beschrieben (Gál <i>et al</i>. [22])</li> </ul>	<p><b>HMOX1 (heme oxygenase 1; HO-1)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- bekämpft oxidativen Stress durch ihre antioxidativen Eigenschaften</li> <li>- bis 40-fache Induktion der Expression auf mRNA-Ebene beschrieben (Lenz <i>et al</i> [20].)</li> </ul>

Tabelle 6.2: Charakteristika der vier untersuchten Markerproteine

### 6.3.1 Ergebnisse der ersten Versuchsreihe: Stückholzverbrennung

Insgesamt konnten für die Auswertung der ersten Versuchsreihe 12 Expositionen, die an 6 Tagen durchgeführt wurden, herangezogen werden. Von diesen erfolgten 11 Expositionen parallel an A549 und an SK-MES-1-Zellen. Die Ergebnisse dieser parallelen Expositionen sind im Folgenden dargestellt.

Es wurden sieben Expositionen unter suboptimalen Verbrennungsbedingungen („schlechte Verbrennung“) unter Verwendung des Stückholzkessels durchgeführt, davon sechs von 2-stündiger und eine (Versuch 4) von 4-stündiger Dauer.

Die ursprünglich als "Stückholz gut" durchgeführten Experimente vom 26.07. mussten nach Auswertung der Partikelmessungen als "Stückholz schlecht" eingestuft werden und sind als solche unter den Versuchsnummern 5, 6, und 7 im Abschlussbericht dargestellt.

Die Bestimmung der Genexpression der Markerproteine ist in Abb. 6.5 wiedergegeben:

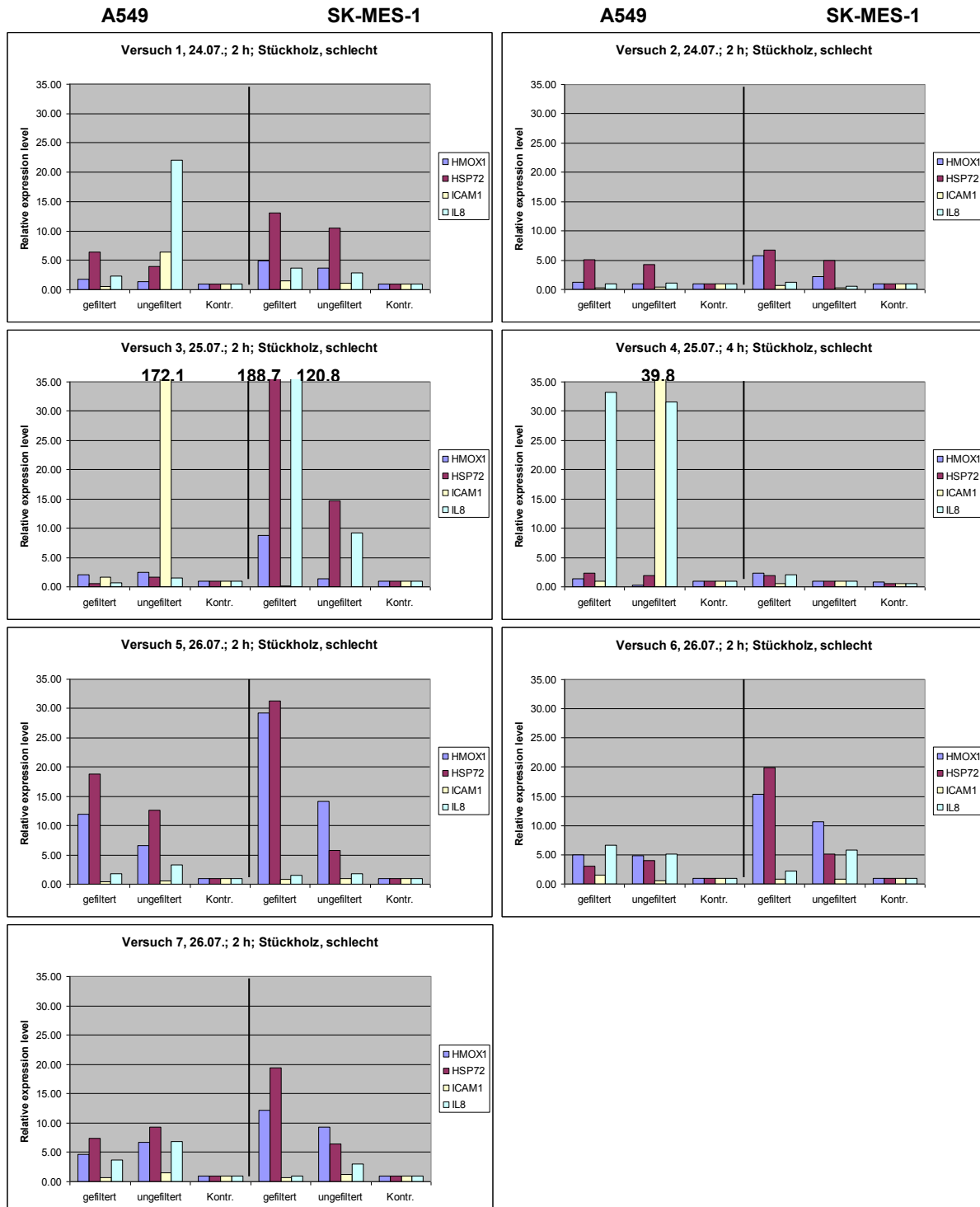


Abb. 6.5: Expression der vier Marker in sieben Expositionsversuchen  
 Jeweils linke Hälfte: A549-Zellen; jeweils rechte Hälfte: SK-MES-1-Zellen. Die Expressionsniveaus wurden auf das jeweilige Expressionsniveau des untersuchten Markers bei den nicht-exponierten Kontrollzellen normiert (Expressionsniveau = 1).

### Expression von HMOX1:

Die Expression von HMOX1 nach der Exposition war bei beiden Zelllinien nahezu durchgängig erhöht, wobei das beobachtete Expressionsniveau für HMOX bei A549 in den ersten vier Versuchen bis zum 2,5-fachen der Kontrollzellen betrug, während es bei den letzten drei Versuchen zwischen dem 4,5- und dem 12-fachen lag (Mittelwert  $\pm$  SD:  $3,7 \pm 3,2$ ). Dabei lagen die Werte für die mit gefilterten Gas exponierten Zellen (Mittelwert  $\pm$  SD:  $4,0 \pm 3,8$ ; s. Tab. 6.3) leicht über denen der ungefiltert exponierten Zellen ( $3,3 \pm 2,7$ ).

Für die SK-MES-1-Zellen lag die Expression (mit Ausnahme des vierten Versuches, bei dem keine signifikant erhöhte Expression festgestellt wurde) zwischen dem 4,9- und dem 29,3-Fachen für die filtrierte exponierten Zellen und zwischen dem 1,4- und dem 14,1-Fachen für die unfiltriert exponierten Zellen.

Somit lässt sich zwischen den filtrierte exponierten Zellen und den unfiltriert exponierten Zellen kein deutlicher Unterschied erkennen, vielmehr sind in den meisten Fällen die Expressionsniveaus bei den filtrierte exponierten Zellen höher als bei den unfiltriert exponierten Zellen. Im Einklang mit der in Arbeitspaket 4 beobachteten stärkeren Empfindlichkeit der SK-MES-1-Zellen sind die bei diesen Zellen beobachteten Zunahmen der Exposition stärker als bei den A549-Zellen.

Exposition	HMOX1		HSP72		IL-8	
	A549	SK-MES-1	A549	SK-MES-1	A549	SK-MES-1
<b>Gefiltert</b>	$4,0 \pm 3,8$	$13,5 \pm 9,0$	$7,2 \pm 6,0$	$42,8 \pm 70,2$	$9,5 \pm 13,3$	$20,1 \pm 48,6$
<b>Ungefiltert</b>	$3,3 \pm 2,7$	$6,9 \pm 5,2$	$6,0 \pm 4,1$	$7,9 \pm 3,9$	$13,8 \pm 12,5$	$3,9 \pm 3,1$

Tabelle 6.3: Mittelwerte der HMOX1-, HSP72- und IL-8-Expression nach schlechter Stückholzverbrennung

### Expression von HSP72 und IL-8:

Die Expression von HSP72 und IL-8 entspricht tendenziell dem bei HMOX1 gewonnenen Bild, wobei die Expression von IL-8 stärkeren Schwankungen unterlag.

Das beobachtete Expressionsniveau für HSP72 betrug bei den mit gefiltertem Gas exponierten A549-Zellen zwischen dem 2- und dem 19-Fachen (mit Ausnahme des dritten Versuches, bei dem keine signifikant erhöhte Expression festgestellt wurde) und für unfiltriert exponierte Zellen zwischen dem 2- und dem 13-Fachen.

Für die SK-MES-1-Zellen schwankten die HSP72-Expressionsniveaus zwischen dem 7- und dem 31-Fachen für die gefiltert exponierten Zellen (mit einem Extremwert im 3. Versuch: 188-fache Expression). Für die ungefiltert exponierten SK-MES-1-Zellen schwankten die Niveaus zwischen dem 5- und dem 15-Fachen.

Für IL-8 schwankte das beobachtete Expressionsniveau bei A549-Zellen zwischen dem 2- und dem 33-Fachen (gefiltert) bzw. dem 3- und dem 32-Fachen (mit Ausnahme des zweiten und dritten Versuches, bei dem keine signifikant erhöhte Expression festgestellt wurde). Bei den SK-MES-1-Zellen schwankte die IL-8-Expression bei den gefiltert exponierten Proben zwischen dem 1- und dem 4-Fachen (mit einem Extremwert im 3. Versuch: 121-fache Expression). Bei den ungefiltert exponierten Proben schwankte die Expression zwischen dem 1- und dem 9-Fachen.

### **Expression von ICAM-1:**

Die Expression von ICAM-1 war, von zwei Ausreißern bei den Versuchen 3 und 4 bei A549-Zellen abgesehen, in allen Proben vergleichbar und zeigte keinen deutlichen Einfluss der Exposition.



### 6.3.2 Ergebnisse der ersten Versuchsreihe: Pellet Verbrennung

Unter Verwendung des Pelletofens wurden drei Expositionen unter optimalen Verbrennungsbedingungen („gute Verbrennung“) und eine zweistündige Exposition unter suboptimalen Verbrennungsbedingungen („schlechte Verbrennung“) durchgeführt. Von den „guten“ Verbrennungen war eine von zweistündiger, eine von dreistündiger und eine von vierstündiger Dauer. Die Expression ist in Abb. 6.6 graphisch wiedergegeben:

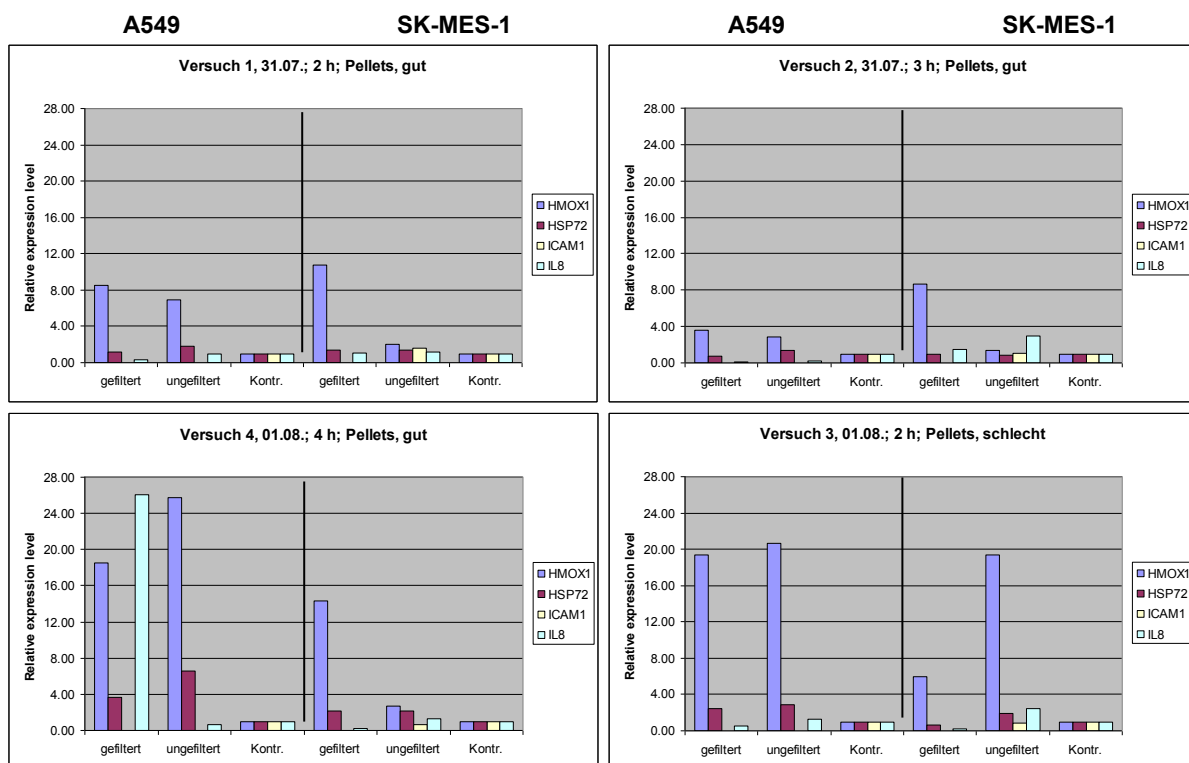


Abb. 6.6: Jeweils linke Hälfte: A549-Zellen; jeweils rechte Hälfte: SK-MES-1-Zellen. Die Expressionsniveaus wurden auf das jeweilige Expressionsniveau des untersuchten Markers bei den nicht-exponierten Kontrollzellen normiert (Expressionsniveau = 1).

#### Expression von HMOX1:

Die Expression von HMOX1 nach der Exposition war bei A549-Zellen durchgängig deutlich erhöht, und zwar auf das 3- bis 26-Fache, während bei den SK-MES-1-Zellen deutlich erhöhte Werte vor allem bei den gefiltert exponierten Zellen auftraten, und zwar auf das 6- bis 14-Fache. Nur bei der „schlechten“ Verbrennung zeigten auch die ungefiltrert exponierten SK-MES-1-Zellen einen deutlichen Anstieg der Expression, sie erreichten mit dem 19-Fachen den höchsten bei diesen Zellen verzeichneten Anstieg bei der Pellet Verbrennung.

Bemerkenswerterweise traten bei den A549-Zellen die höchsten Werte bei den vier Stunden lang bei optimalen Verbrennungsbedingungen exponierten Zellen auf; diese Werte waren vergleichbar denen der zwei Stunden bei suboptimalen Verbrennungsbedingungen exponierten Zellen.

#### **Expression von HSP72, IL-8 und ICAM-1:**

Mit der Ausnahme eines Extremwertes von IL-8 (26-fache Expression bei A549-Zellen in Versuch 4) zeigen die Expressionsmuster von HSP72, IL-8 und ICAM-1 kaum Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen.

### **6.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe**

Sowohl bei der Stückholzverbrennung als auch bei der Pellet Verbrennung zeigten sich bei einigen Markern eine deutliche Zunahme der Expression bei exponierten Zellen, wobei bei der Stückholzverbrennung die Expressionszunahme bei HSP72 und HMOX1 am deutlichsten ausfiel, während sie bei der Pellet Verbrennung weitgehend auf HMOX1 beschränkt blieb.

Erwartungsgemäß schlug sich die in Versuchen mit submerser Darbietung von Printex® 90 festgestellte höhere Empfindlichkeit der SK-MES-1-Zellen (vgl. Arbeitspaket 4) auch in einer stärkeren Expressionszunahme im Vergleich zu den A549-Zellen nieder.

Der Vergleich von an filtriertem Gas exponierten Zellen und ungefiltert exponierten Zellen zeigte in etlichen Versuchen eine nicht erwartete stärkere Zunahme der Expression bei den filtriert exponierten Proben, während in den restlichen Fällen keine signifikanten Unterschiede auftraten - mit einer einzigen Ausnahme: Bei der schlechten Pellet Verbrennung war die stärkere Zunahme bei den ungefiltert exponierten Zellen zu verzeichnen.

### 6.3.4 Zweite Versuchsreihe: Markergenexpression nach kumulativer Exposition über 6 h

Als Konsequenz aus den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe wurde für die zweite Versuchsreihe zum einen eine kumulative Exposition über 6 h durchgeführt, um die Zellen gegenüber einer höheren Partikelanzahl exponieren zu können, ohne gleichzeitig den Stress durch Austrocknungseffekte zu erhöhen. Des Weiteren wurden die Versuche auf die schlechte Stückholzverbrennung beschränkt, da hier die höchste Partikelausbeute zu erwarten war.

Es wurden jeweils drei Versuche ausgewertet. Mit Ausnahme der Bestimmung der IL-8-Konzentration bei den SK-MES-1-Zellen, von der nur zwei Versuche auswertbar waren.

Die Expression der vier Markergene HMOX1, HSP72, IL-8 und ICAM-1 wurde über quantitative Echtzeit-PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.7 wiedergegeben:

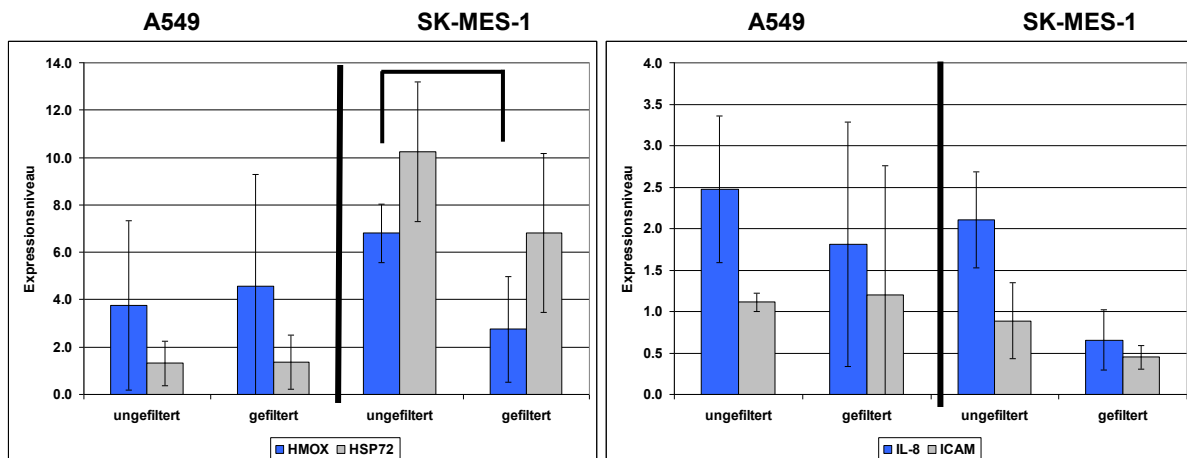


Abb. 6.7: Expression der vier Markergene in A549- und in SK-MES-1-Zellen  
 Jeweils linke Hälfte: A549-Zellen; jeweils rechte Hälfte: SK-MES-1-Zellen. Die Expressionsniveaus wurden auf das jeweilige Expressionsniveau des untersuchten Markers bei den nicht-exponierten Kontrollzellen normiert (Expressionsniveau = 1).

### Expression von HMOX1 und HSP72:

Die Expression von HMOX1 nach der Exposition an der Gas-Flüssigkeits-Phasengrenze war bei beiden Zelllinien nahezu durchgängig erhöht: Das beobachtete Expressionsniveau für HMOX betrug bei A549 bis zum 4-fachen der Kontrollzellen, wobei aufgrund der hohen Standardabweichung kein Unterschied zwischen den ungefiltert exponierten Zellen (Mittelwert  $\pm$  SD:  $3,8 \pm 3,6$ ) und den gefiltert exponierten Zellen ( $4,6 \pm 4,7$ ) feststellbar war. Bei den SK-MES-1-Zellen hingegen ließ sich zum ersten Mal im Rahmen dieses Projektes ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,05$ ) zwischen der HMOX-Expression ungefiltert exponierter Zellen ( $6,8 \pm 1,2$ ) und der gefiltert exponierter Zellen ( $2,7 \pm 2,2$ ) verzeichnen. Auch bei der HSP72-Expression zeigten die ungefiltert exponierten SK-MES-1-Zellen eine leicht erhöhte Expression ( $10,2 \pm 2,9$ ) gegenüber den gefiltert exponierten Zellen ( $6,8 \pm 3,4$ ), die aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht signifikant war ( $p = 0,19$ ).

Eine vergleichende Übersicht über die Mittelwerte der HMOX1-, HSP72-, IL-8- und ICAM-Expression beider Versuchsreihen findet sich in Tabelle 6.4:

	2. Versuchsreihe		1. Versuchsreihe	
	HMOX1		HMOX1	
	A549	SK-MES-1	A549	SK-MES-1
<b>ungefiltert</b>	$3,8 \pm 3,6$	$6,8 \pm 1,2$	$3,3 \pm 2,7$	$6,9 \pm 5,2$
<b>gefiltert</b>	$4,6 \pm 4,7$	$2,7 \pm 2,2$	$4,0 \pm 3,8$	$13,5 \pm 9,0$

	HSP72		HSP72	
	A549	SK-MES-1	A549	SK-MES-1
	<b>ungefiltert</b>	$1,3 \pm 0,9$	$10,2 \pm 2,9$	$6,0 \pm 4,1$
<b>gefiltert</b>	$1,4 \pm 1,1$	$6,8 \pm 3,4$	$7,2 \pm 6,0$	$42,8 \pm 70,2$

	IL-8		IL-8	
	A549	SK-MES-1	A549	SK-MES-1
	<b>ungefiltert</b>	$2,5 \pm 0,9$	2,1	$13,8 \pm 12,5$
<b>gefiltert</b>	$1,8 \pm 1,5$	0,7	$9,5 \pm 13,3$	$20,1 \pm 48,6$

Tabelle 6.4: Mittelwerte der HMOX1-, HSP72-, IL-8- und ICAM-Expression im Vergleich mit schlechter Stückholzverbrennung der ersten Versuchsreihe

### **Expression von IL-8 und ICAM-1:**

Die Expression von IL-8 wies gegenüber den Kontrollzellen nur eine leichte Erhöhung auf etwa das Doppelte auf. Bei den A549-Zellen ergab sich kein Unterschied zwischen den ungefiltert und gefiltert exponierten Zellen, während bei den SK-MES-1-Zellen in zwei auswertbaren Versuchen die Expression in den ungefiltert exponierten Zellen mit dem 1,7- und 2,5-Fachen der Kontrollzellexpression über der Expression der gefiltert exponierten Zellen, die das 0,4- bzw. 0,9-Fache betrug, lag. Eine Standardabweichung und ein p-Wert ließen sich, da nur zwei Messungen auswertbar waren, nicht errechnen.

Es wurde festgestellt, dass die Reaktion der Zellen im Karlsruher Expositionssystem auf den filtrierten Gasstrom teilweise höher als auf Gasstrom mit Nanopartikeln ist.

In der Tab. 6.4 zusammengestellten Ergebnisse zeigen für die 2. Versuchsreihe bei den SK-MES-1-Zellen durchgängig eine höhere Expression der ungefiltert exponierten Zellen im Vergleich zu den gefiltert exponierten Zellen auf.

Bei den A549-Zellen hingegen gab es zwischen den beiden Expositionen keine signifikanten Unterschiede. Von daher erweisen sich die SK-MES-1-Zellen als deutlich empfindlicher und damit für das Testsystem geeigneter als die A549-Zellen.

Die Tatsache, dass in der ersten Versuchsreihe bei den gefiltert exponierten SK-MES-1-Zellen höhere Werte, als bei den ungefiltert exponierten Zellen gefunden wurden, die allerdings auch zum Teil sehr große Standardabweichungen aufwiesen, ist vermutlich auf die zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Messungen noch nicht hinreichend optimierten technischen Abläufe zurückzuführen.

Die Expression von ICAM-1 zeigte keine Veränderung gegenüber den unbegasteten Kontrollzellen.

Insgesamt gesehen wiesen sich die Expressionsdaten der zweiten Versuchsreihe gegenüber denen der ersten Versuchsreihe durch eine deutliche Verringerung der Standardabweichung aus, was vermutlich der Verbesserung der technischen Abläufe geschuldet ist.

### **6.3.5 Zweite Versuchsreihe: Submerse Exposition**

Für die Untersuchung des Einflusses der bei der Verbrennung freigesetzten Nanopartikel bei submerse Darbietung wurden diese während der Expositionsversuche auf eine Membran abgeschieden und für die Versuche in destilliertem Wasser in Suspension gebracht. Von einer in destilliertem Wasser vorbereiteten Verdünnungsreihe wurden jeweils 200 µl zu 1,8 ml Zellkulturmedium gegeben und für die Exposition eingesetzt, so dass die Zellen über einen Konzentrationsbereich von 0,1 µg/ml bis 400 µg/ml exponiert wurden. Die Expositionszeit betrug 48 h. Als Vergleich erfolgte eine Exposition gegenüber Printex 90.

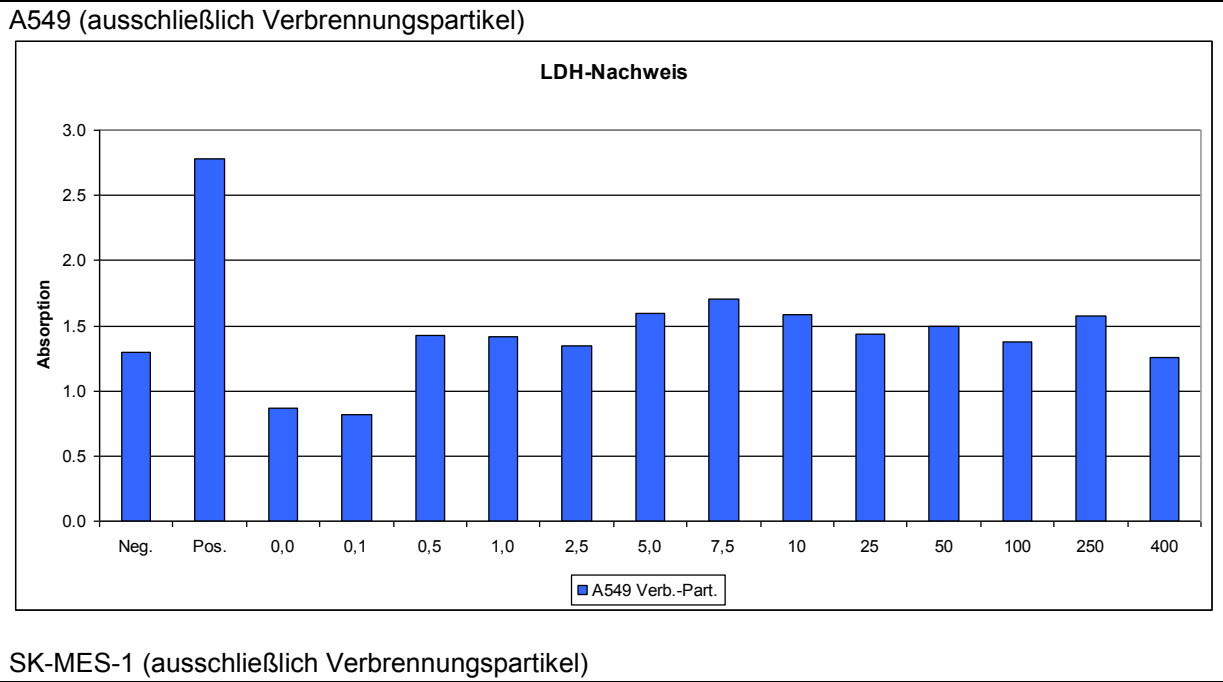
Zunächst wurde untersucht, ob die submerse Exposition zu einer Beeinträchtigung der Zellintegrität führte.

### Integrität der Zellmembran nach submerser Exposition

Für die Untersuchung wurde die Aktivität des üblicherweise zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand der exponierten Zellen gemessen. Katalytische Aktivität im Kulturüberstand, also außerhalb der Zellen, ist ein Hinweis auf lysierte Zellen und damit letale Schädigungen.

Die Probenahme erfolgte jeweils unmittelbar nach der 48-stündigen Exposition, wobei die Proben sofort auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bis zur Analyse bei -20°C gelagert wurden. Wie aus Abb. 6.8 bis Abb. 6.10 ersichtlich ist, konnte in drei Versuchen kein Hinweis auf eine erhöhte LDH-Aktivität im Kulturüberstand der gegenüber den Verbrennungspartikeln exponierten Zellen gefunden werden: Die gemessenen LDH-Aktivitätswerte lagen alle im Bereich der Negativkontrolle; als Positivkontrolle dienten lysierte Zellen.

In zwei Versuchen wurden ergänzend Printex 90-Partikel untersucht; auch bei diesen ergab sich kein Hinweis auf Membranläsionen (vgl. Abb. 6.9 und 6.10).



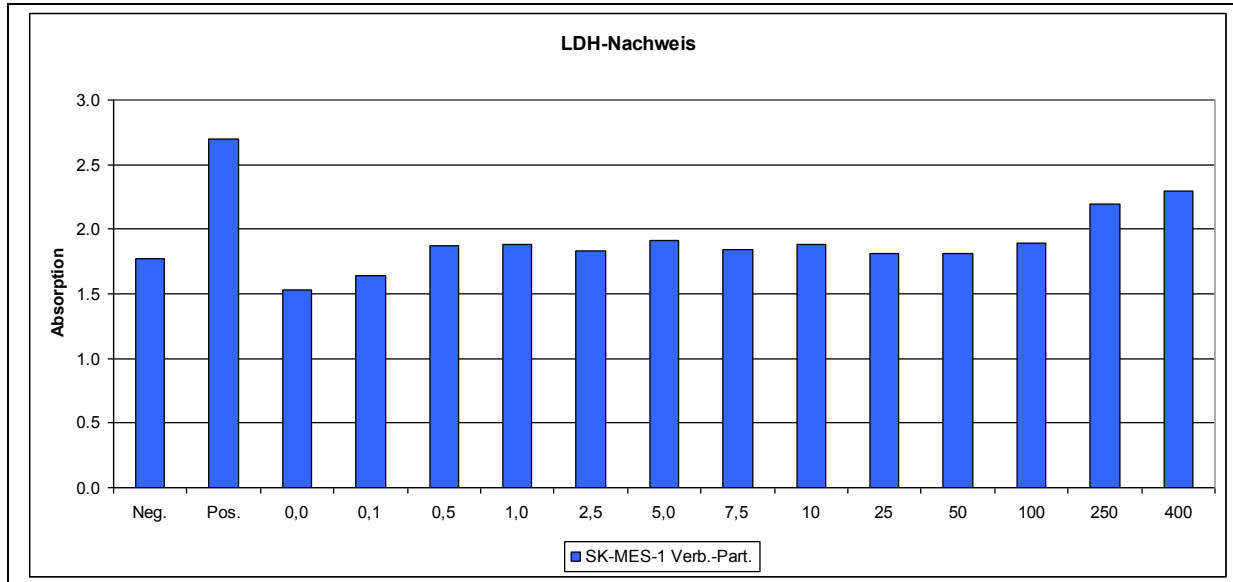
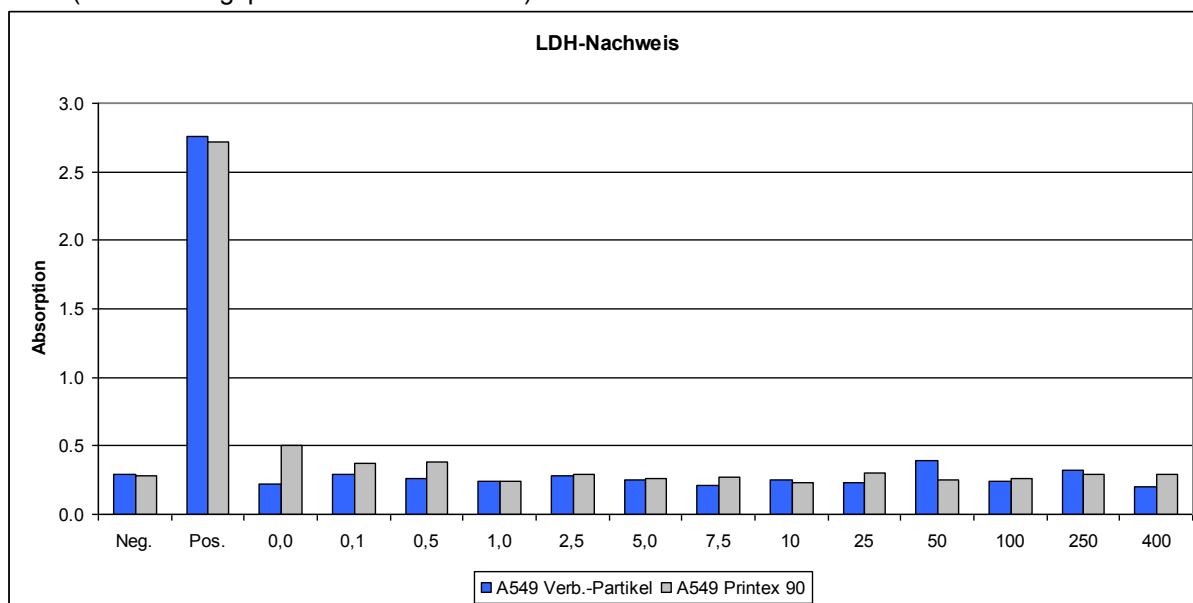


Abb. 6.8: LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Exposition, Versuch 1

**A549 (Verbrennungspartikel bzw. Printex 90)**



**SK-MES-1 (Verbrennungspartikel bzw. Printex 90)**

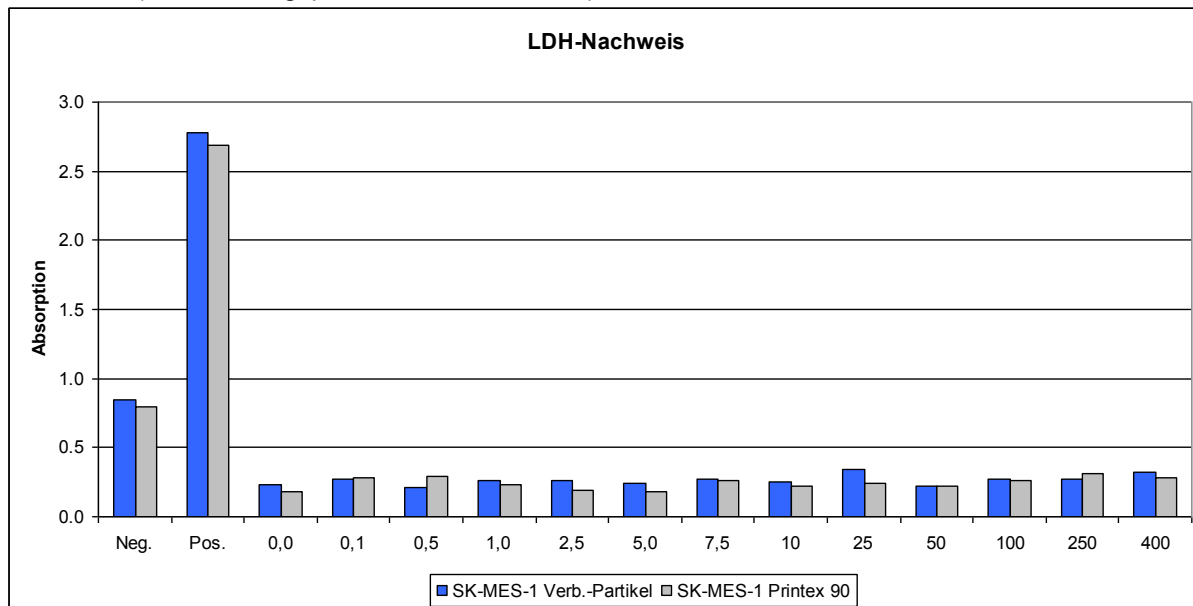
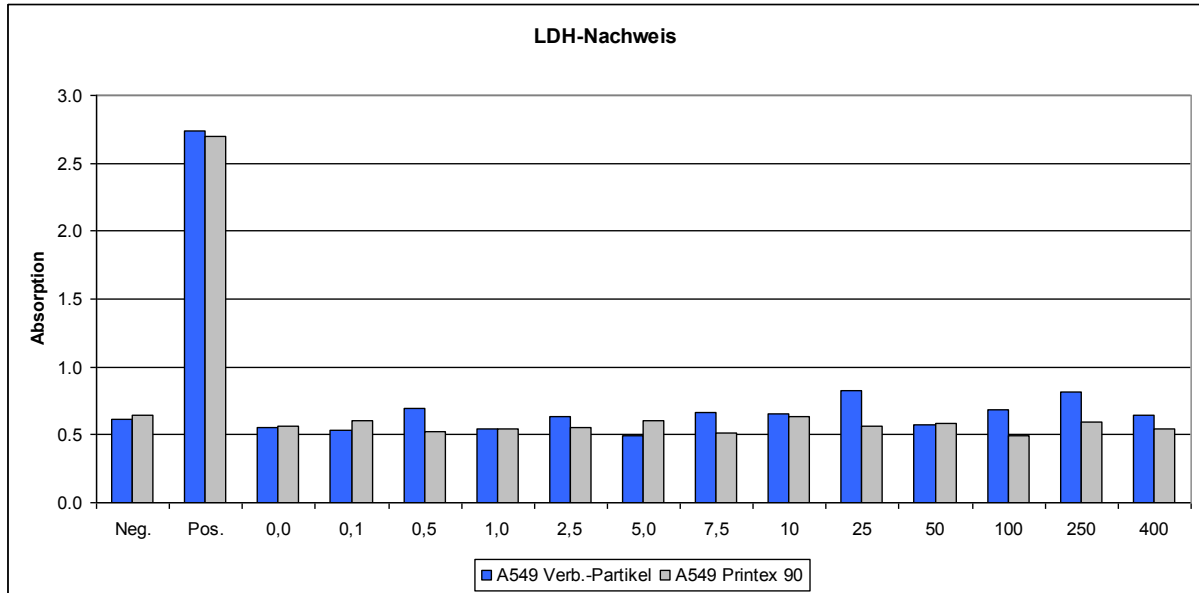


Abb. 6.9: LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Exposition, Versuch 2



**A549 (Verbrennungspartikel bzw. Printex 90)**



**SK-MES-1 (Verbrennungspartikel bzw. Printex 90)**

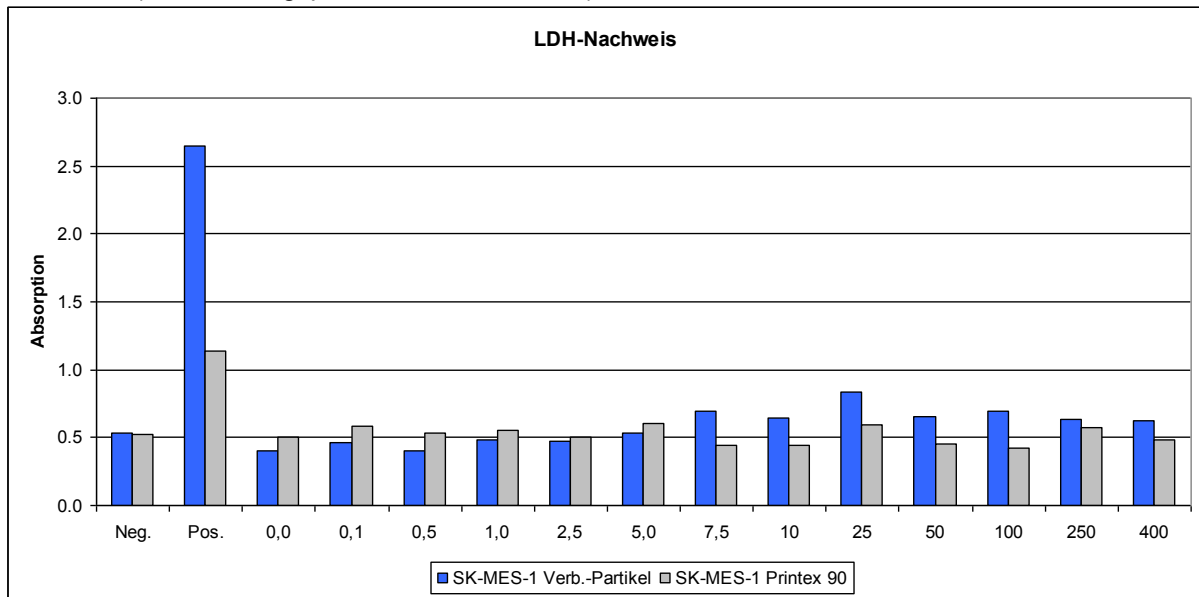


Abb. 6.10: LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Exposition, Versuch 3

Im folgenden Abschnitt wurde die Reaktion der Zellen nach submerser Applikation der Nanopartikel (Verbrennungspartikel bzw. Printex 90) untersucht: Da sich die Expression von ICAM-1 nach Exposition gegenüber den Verbrennungspartikeln in der Gasphase nicht verändert hat (vgl. Abb. 6.7) und auch bei den Vorversuchen zur Festlegung der Zelllinien (vgl. Arbeitspaket 4)

keine deutliche Zunahme der Expression nach submerser Exposition beobachtet worden war, wurde stattdessen der Inflammationsmarker IL-6 untersucht, dessen Expression in diesen Vorversuchen eine deutlichere Zunahme zeigte.

### Markergenexpression auf der mRNA-Ebene nach submerser Exposition

Die Expression der vier Markergene HMOX1, HSP72, IL-6 und IL-8 wurde anhand der quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt. Wie im Falle des LDH-Nachweises erfolgte die Probennahme nach 48-stündiger Exposition.

In Abb. 6.11 und Abb. 6.12 sind die Expressionsniveaus in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration der Nanopartikel für die beiden Zelltypen wiedergegeben:

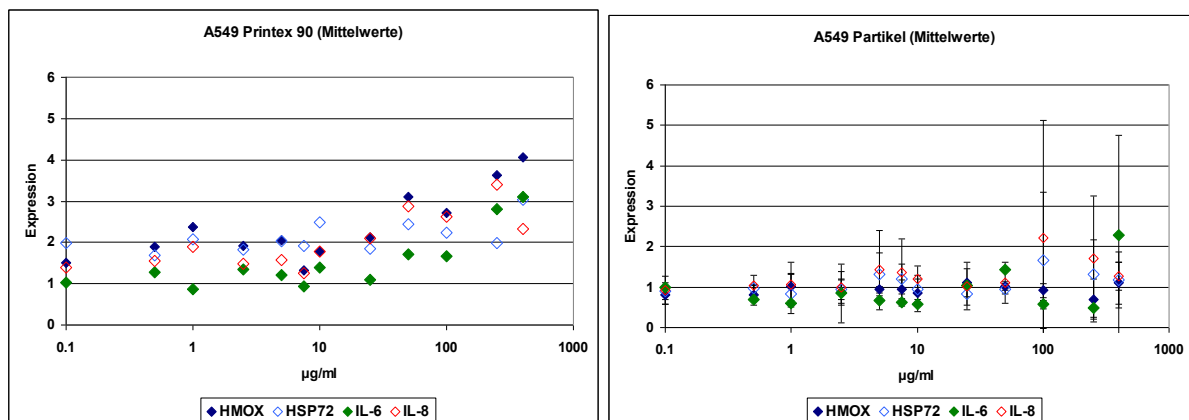


Abb. 6.11: Expression von HMOX1, HSP72, IL-6 und IL-8 in A549-Zellen

Linkes Diagramm: Mittelwerte der Expression nach submerser Exposition gegenüber Printex 90 (zwei Versuche)

Rechtes Diagramm: Mittelwerte der Expression nach submerser Exposition gegenüber den Verbrennungspartikeln (drei Versuche). Die Expressionsniveaus wurden auf das jeweilige Expressionsniveau des untersuchten Markers bei nicht-exponierten Kontrollzellen normiert (Expressionsniveau = 1).

Die Expression der Marker HMOX, IL-6 und IL-8 zeigte in A549-Zellen nach Exposition gegenüber Printex 90 eine leicht Zunahme mit zunehmender Konzentration: Die Expression von HMOX nahm um das Vierfache, die von IL-6 bzw. von IL-8 um das ca. Dreifache zu. Diese Werte sind vergleichbar mit den in den Vorversuchen zur Festlegung der Zelllinien beobachteten Werten für IL-6 und IL-8 (vgl. Arbeitspaket 4).

Die Expressionszunahme war im Falle der Verbrennungspartikel deutlich schwächer und uneinheitlicher, wie an den mit der Konzentration zunehmenden Standardabweichungen erkennbar ist. Für HSP72 konnte keine signifikante Zunahme der Expression beobachtet werden.

Wie aus den Vorversuchen zur Festlegung der Zelllinien bekannt, war die Reaktion der SK-MES-1-Zellen deutlich ausgeprägter als die der A549-Zellen (s. Abb. 6.12):

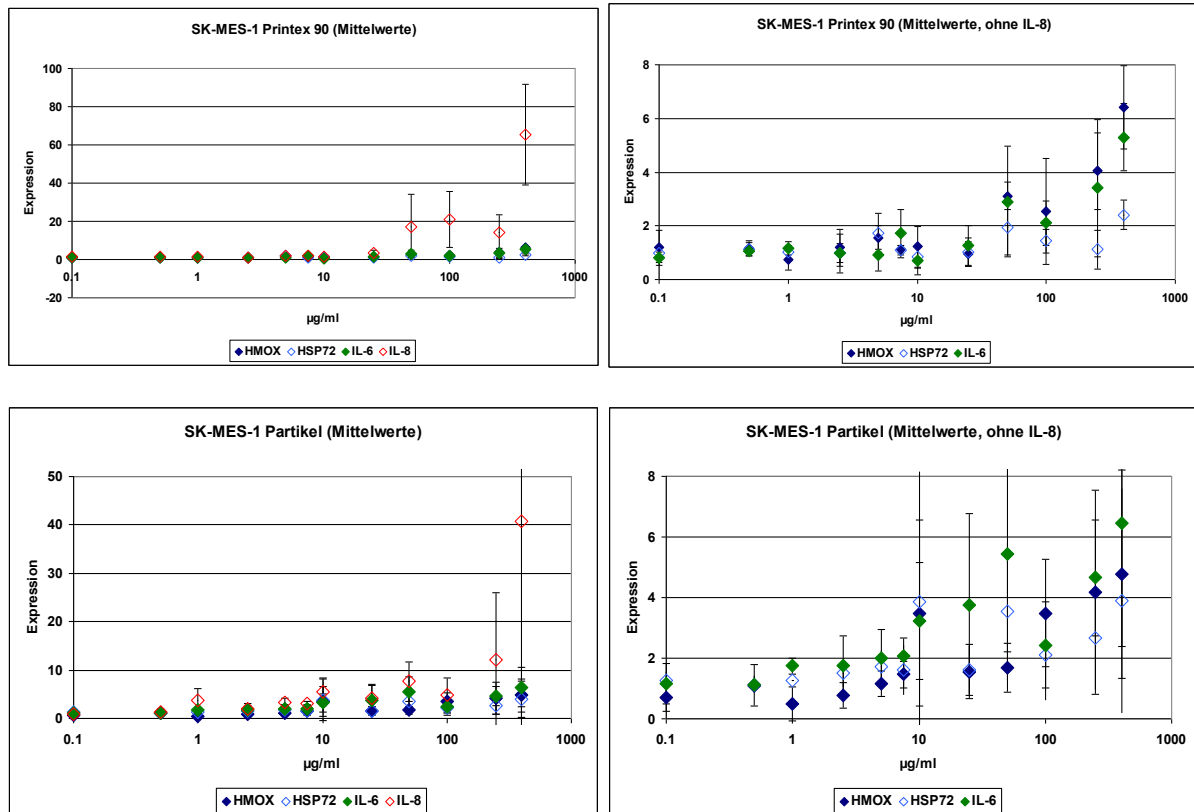


Abb. 6.12: Expression von HMOX1, HSP72, IL-6 und IL-8 in SK-MES-1-Zellen

Obere Diagramme: Mittelwerte der Expression nach submerser Exposition gegenüber Printex 90.

Untere Diagramme: Mittelwerte der Expression nach submerser Exposition gegenüber den Verbrennungspartikeln. Die Expressionsniveaus wurden auf das jeweilige Expressionsniveau des untersuchten Markers bei nicht-exponierten Kontrollzellen normiert (Expressionsniveau = 1).

Da die Expression von IL-8 stark zunahm, wurden die Expressionsniveaus der anderen drei Marker im rechten Teil nochmals gesondert in einem anderen Maßstab dargestellt.

Die Reaktion der Zellen auf die beiden Nanopartikel war weitgehend vergleichbar: Während die Expression von HMOX und IL-6 bei der maximal eingesetzten Konzentration an Partikeln bis auf das Sechsfache zunahm, lag die für HSP72 beobachtete Zunahme beim Zwei- bis Vier-Fachen. Deutlich hob sich davon die Expressionszunahme für IL-8 ab, die um das 40- bis 60-Fache zunahm. Für IL-8 zeigte sich bei Printex 90 auch eine leichte Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve gegenüber der Kurve bei den Verbrennungspartikeln, was auf eine stärkere Wirkung des Printex 90 im Vergleich zu den Verbrennungspartikeln hinweist.

Diese Werte sind vergleichbar mit den in den Vorversuchen zur Festlegung der Zelllinien beobachteten Werten für IL-6 und IL-8 nach Exposition gegenüber Printex 90 (vgl. Arbeitspaket 4).

Bemerkenswerterweise unterschied sich die Reaktion der Zellen bezüglich der Änderungen im Expressionsniveau nach submerser Darbietung deutlich von der Reaktion nach Exposition an der Gas-Flüssigkeits-Interphase: Bei letzterer war die Zunahme der Expression bei HSP72 und HMOX1 am prägnantesten, während die Expression von IL-8 kaum zunahm. Im Falle der submersen Exposition hingegen nahm gerade die Expression von IL-8 erheblich zu, während die Expressionszunahme bei HMOX1 und HSP72 schwächer war als nach Exposition an der Gas-Flüssigkeits-Interphase.

### **Markergenexpression von SK-MES-1-Zellen auf der mRNA-Ebene nach submerser Exposition und Ko-Kultur mit THP1-Zellen**

Um das *In-vitro*-Zellkulturmodell etwas näher an die physiologischen Gegebenheiten im menschlichen Körper anzupassen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die SK-MES-1-Zellen nach 24-stündiger submerser Exposition gegenüber den Nanopartikeln weitere 24 h mit der peripheren Blut-Monozytontumorlinie THP-1 kokultiviert wurden, um eine Interaktion der beiden Zelltypen miteinander zu erlauben.

In einem Vorversuch waren bereits primäre periphere mononukleäre Zellen des Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) eingesetzt worden, wobei eine nahezu 10-fache Steigerung der Expression verzeichnet wurde (vgl. Arbeitspaket 4). Da für die benötigte Menge an PBMCs für drei Experimente nicht genug Spender zur Verfügung standen, wurde für diese Versuche auf die Tumorzelllinie THP-1 zurückgegriffen.

Die Analyse der Expression erfolgte wie zuvor mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Wie aus Abb. 6.13 ersichtlich ist, vermochte die Gegenwart von THP-1-Zellen die durch Printex 90 hervorgerufene Expressionsantwort von SK-MES-1-Zellen zu steigern:

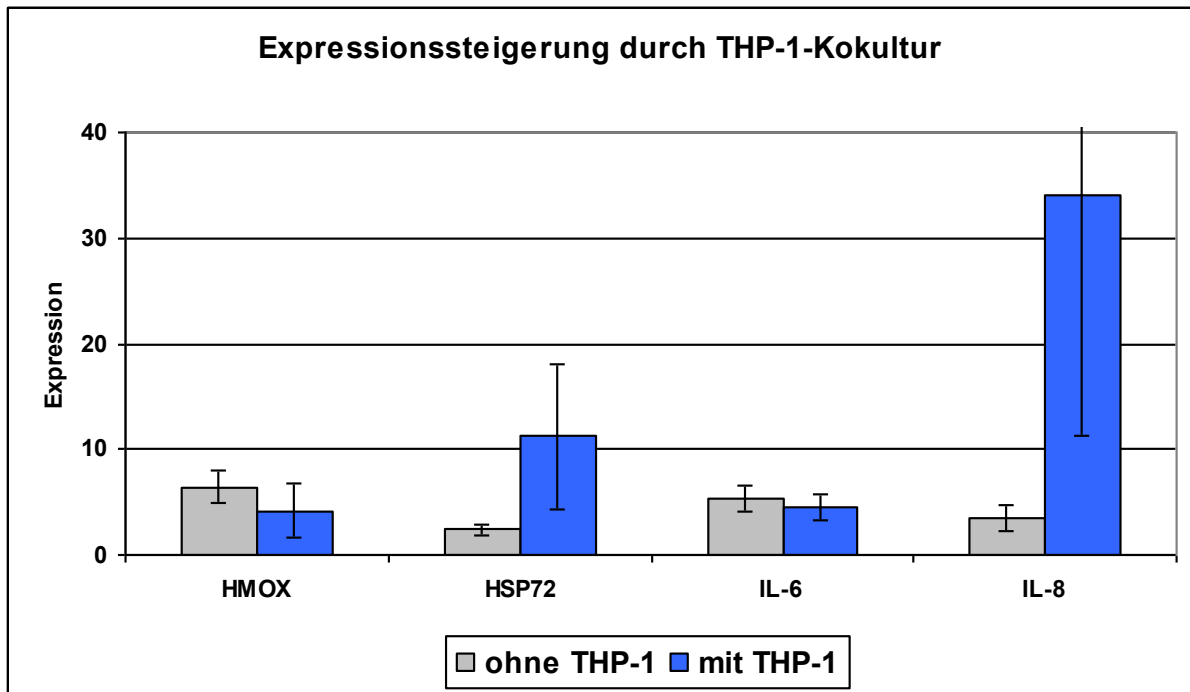


Abb. 6.13: Expressionsteigerung in SK-MES-1-Zellen in Gegenwart von THP-1-Monozyten nach submerser Exposition gegenüber Printex 90  
 Dargestellt sind die Steigerungen der Expression in Gegenwart von 400 µg/ml Printex 90 (HMOX, HSP72, IL-8) bzw. in Gegenwart von 25 µg/ml Printex 90 (IL-8) gegenüber unbehandelten Zellen (Expressionsniveau = 1). Die Genexpression von IL-8 erreichte bereits bei geringeren Konzentrationen an Printex 90 ein Plateau, weshalb der Vergleich bei einer Konzentration von 25 µg/ml erfolgte.

Die THP-1-bedingte Expressionssteigerung wirkte sich allerdings nicht global, sondern recht spezifisch aus: So blieb die Steigerung der Expression von HMOX und IL-6 in Gegenwart von Printex 90 zwischen dem Vier- bis Sechsfachen, während die Expression von HSP72 vom ca. 2,4-Fachen auf das 11-Fache in Gegenwart von THP-1-Monozyten zunahm, und die Expression von IL-8 vom 3,4-Fachen auf das 33-Fache.

In der folgenden Abb. 6.14 sind die Expressionsdaten für die SK-MES-1-Zellen nach Exposition gegenüber Printex 90 bzw. den Verbrennungspartikeln und anschließender Kokultur mit THP-1-Monozyten wiedergegeben:

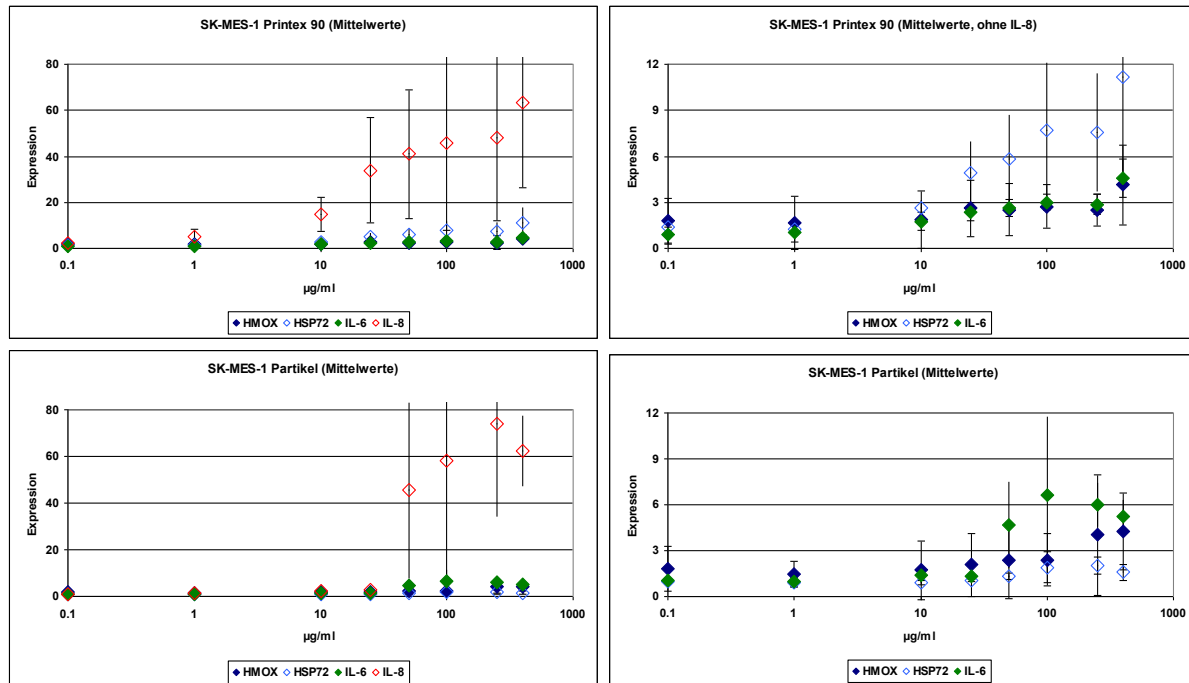


Abb. 6.14: Expression von HMOX1, HSP72, IL-6 und IL-8 in SK-MES-1-Zellen

Obere Diagramme: Mittelwerte der Expression nach submerser Exposition gegenüber Printex 90.

Untere Diagramme: Mittelwerte der Expression nach submerser Exposition gegenüber den Verbrennungspartikeln. Die Expressionsniveaus wurden auf das jeweilige Expressionsniveau des untersuchten Markers bei nicht-exponierten Kontrollzellen normiert (Expressionsniveau = 1).

Da die Expression von IL-8 stark zunahm, wurden die Expressionsniveaus der anderen drei Marker im rechten Teil nochmals gesondert dargestellt.

Nach der Kokultur mit den THP-1-Monozyten zeigten die SK-MES-1-Zellen eine Zunahme der IL-8-Expression sowohl nach Exposition gegenüber Printex 90 als auch nach Exposition gegenüber den Verbrennungspartikeln, wobei die Dosis-Wirkungskurve in beiden Fällen gegenüber der Kultivierung ohne THP-1-Zellen nach links (also zu geringerer Partikelkonzentration hin) verschoben war: Die absolute Steigerung der Expression auf das ca. 60- bis 80-Fache blieb erhalten, nur wurde sie in Gegenwart von THP-1-Zellen bereits bei einer Partikelkonzentration von 50 µg/ml statt bei 400 µg/ml beobachtet.

Die Expression von HMOX und IL-6 hingegen wurde durch die Kokultivierung mit THP-1-Monozyten nicht weiter gesteigert, während hingegen die Expression von HSP72 nach Exposition gegenüber Printex 90 markant gesteigert wurde und nunmehr eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit aufweist (vgl. Abb. 6.14 oben rechts mit Abb. 6.12 oben rechts). Dieser Effekt trat nach der Exposition gegenüber den Verbrennungspartikeln hingegen nicht zutage.

Nachdem die Genexpression der vier Marker auf der Ebene der mRNA eingehend untersucht worden war, wurde im folgenden Abschnitt die Expression von IL-8 bei SK-MES-1-Zellen, bei der auf der mRNA-Ebene die größte Zunahme verzeichnet wurde, noch auf der Proteinebene näher beleuchtet.

### Markergenexpression auf der Protein-Ebene nach submerser Exposition

Für die Analyse der IL-8-Sekretion wurden nach der submersen Exposition Zellkulturüberstände gesammelt und mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (human CXCL8/IL-8, R&D Systems, Katalog-Nr. DY208) analysiert. In Abb. 6.15 sind die Ergebnisse der ELISA-basierten Analyse wiedergegeben:

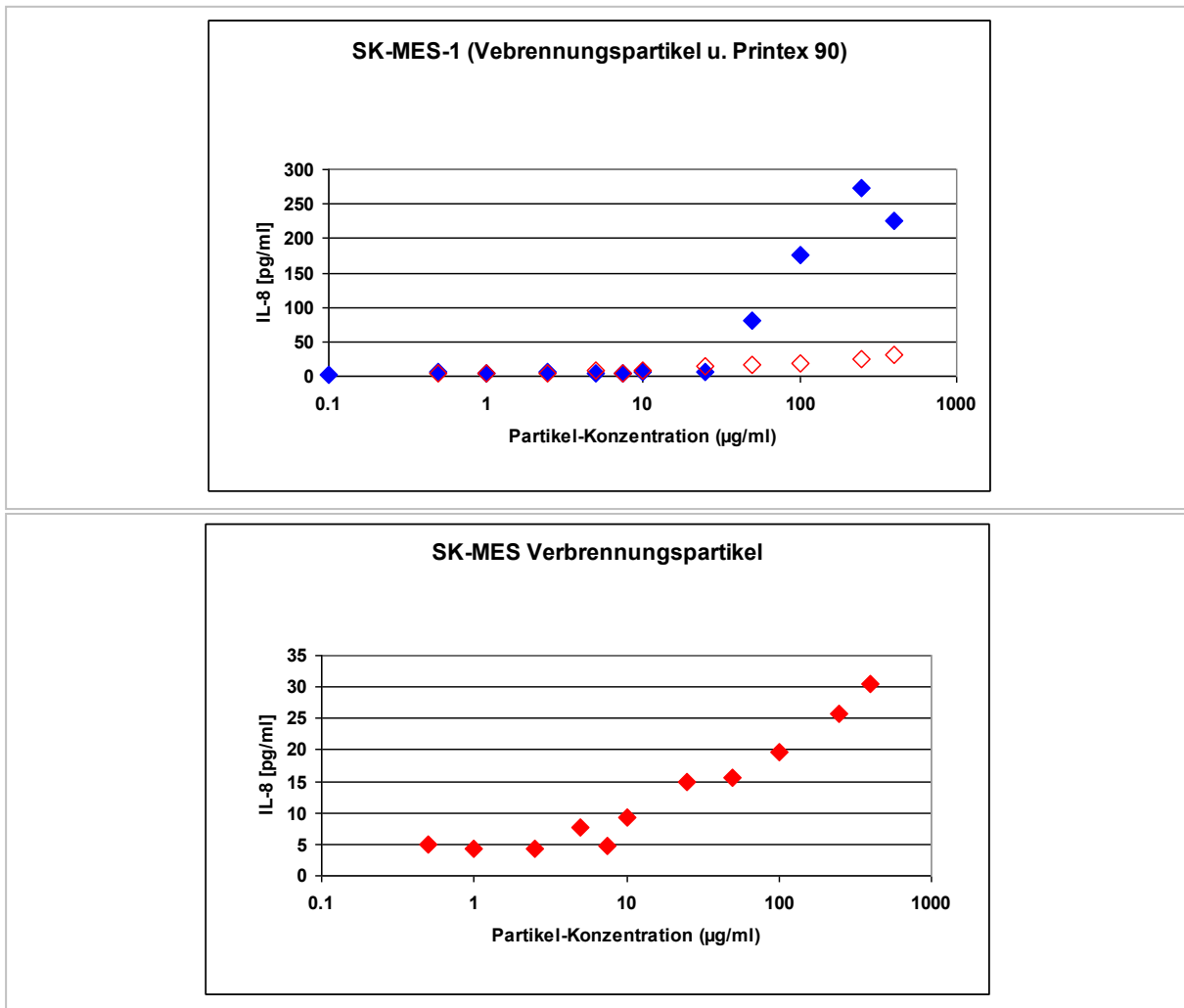


Abb. 6.15: IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von SK-MES-1-Zellen

Oberes Diagramm: Vergleich der IL-8-Sekretion nach submerser Exposition gegenüber Printex 90 (blaue Rauten) und Verbrennungspartikeln (rote Rauten)

Unteres Diagramm: IL-Sekretion nach submerser Exposition gegenüber Verbrennungspartikeln in geänderten Maßstab.

Auf der Proteinebene treten die Unterschiede in der Wirkung der beiden Partikelarten noch deutlicher zutage als auf der mRNA Ebene (vgl. Abb. 6.12): Während die Verbrennungspartikel bei der höchsten angewandten Konzentration von 400 µg/ml eine Sekretion von ca. 30 pg/ml IL-8 erwirkten, erreichte die Sekretion nach Exposition gegenüber Printex 90 bei 200 - 400 µg/ml ein Plateau von etwa 250 pg/ml IL-8: Die Printex-90-Partikel erwirkten also eine Steigerung der Sekretion auf etwa das Achtfache; Printex 90 ist also hinsichtlich der Induktion einer inflammatorischen IL-8-Antwort ca. achtmal potenter als die Verbrennungspartikel.

### 6.3.6 Zusammenfassung der biochemischen Reaktionen der Zellkulturen auf die Nanopartikelexposition

Die Exposition von Zellen mit den bei der suboptimalen Verbrennung im Stückholzkessel gebildeten Nanopartikeln an der Gas-Flüssigkeits-Phasengrenze zeigte im Falle der SK-MES-1-Zellen eine deutliche Zunahme der Expression zweier inflammatorischer Markergene, HMOX (auf das Siebenfache) und IL-8 (auf das Doppelte) auf der Ebene der mRNA. Zwei weitere untersuchte Markergene, HSP72 und ICAM-1, zeigten keine signifikante Änderung der Expression. Im Falle der A549-Zellen konnte keine signifikante Änderung der Expression der vier Markergene auf der Ebene der mRNA beobachtet werden.

Nach submerser Exposition gegenüber den Verbrennungspartikeln zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der Expression der vier Marker HMOX1, HSP72, IL-6 und IL-8 in SK-MES-1-Zellen auf der Ebene der mRNA, die für die drei Marker HMOX1, HSP72 und IL-6 vergleichbar mit der Wirkung von Printex 90 (amorphem Kohlenstoff) war. Bemerkenswerterweise war die Steigerung der IL-8-Expression (auf das 60- bis 80-Fache) erheblich höher als die Steigerung der Expression der anderen drei Marker, die um das 4- bis 6-Fache zunahm. Hierin unterscheiden sich die Ergebnisse der submersen Exposition von der Exposition an der Gas-Flüssigkeits-Interphase.

Auf der Proteinebene erwies sich Printex 90 in der Steigerung der IL-8-Expression im Vergleich zu den Verbrennungspartikeln als potenter, so dass es eine etwa achtfach höhere IL-8-Sekretion erwirkte als diese.

Es konnte nur einmalig (2. Versuchsreihe, SK-MES-1 für HMOX1) ein signifikanter Unterschied in der Zellreaktion zwischen ungefiltertem und gefiltertem Gasstrom festgestellt werden.

Der Befund ist erstmalig in diesem Projekt aufgetreten, nicht jedoch einmalig, da der mittlere HMOX1-Expressionsunterschied von  $6,8 \pm 1,2$  bei ungefiltert exponierten Zellen gegenüber  $2,7 \pm 2,2$  bei gefiltert exponierten Zellen auf drei Experimente zurückgeht, bei denen sich die Expressionsniveaus von ungefiltert:gefiltert wie folgt verhielten:

Versuch	ungefiltert	gefiltert
1	6,00	0,95
2	8,23	2,04
3	6,18	5,25



Somit ist die stärkere Reaktion auf den ungefilterten Partikelstrom auch jeweils in den drei Einzelexperimenten aufgetreten und nicht das Ergebnis der arithmetischen Mittelwertbildung. Auch bei der IL-8-Expression zeigen die zwei ausgewerteten Versuche eine einheitliche Richtung, nämlich eine erhöhte Expression bei ungefiltert exponierten Zellen gegenüber den gefiltert exponierten Zellen:

Versuch	ungefiltert	gefiltert
1	1,70	0,40
2	2,51	0,91

Es wäre sicherlich zu früh, auf dieser Basis profunde Aussagen über die toxische Wirkung der applizierten Nanopartikel treffen zu wollen, doch zeigen die Ergebnisse, dass das System in der Lage ist, biologische Antworten auf Umweltreize zu messen. Es ist aber sicherlich nicht ausgeschlossen, dass es bessere (weil empfindlichere) Marker gibt als HMOX1 und IL-8, auch ist es wünschenswert, weitere Marker einzubeziehen, um ein runderes Bild zu erhalten. Eine breitere Analyse diverser zellulärer Stressmarker ist daher sicherlich geboten, um das System zu optimieren. Der Vergleich mit der Antwort der submers angebotenen Partikel zeigt, dass die biologische Antwort auf die beiden Darreichungsformen durchaus unterschiedlich ausfallen kann, so dass die submerse Darreichung, obwohl technisch in höherem Durchsatz durchführbar, nicht unbedingt hilfreiche Hinweise darauf geben dürfte, welche Marker für eine Analyse an der Gas- Flüssigkeitsphase zu bevorzugen wären.

## 7 Zusammenfassung

Feinstaubbelastungen haben besonders in Ballungsräumen epidemiologisch nachgewiesene Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen. Ihre Reduzierung wird über Maßnahmen wie Filtereinsatz bei Emissionsquellen (z.B. KFZ-Partikelfilter), Emissionsminderung durch Verbrauchsoptimierung der Feinstaubquellen (z.B. Industrieanlagen) angestrebt.

Durch die verstärkte Förderung der Nutzung regenerativer Energien werden zunehmend Holz und Pellets als Brennstoff zur Wärmeerzeugung vor allem in Wohngebieten eingesetzt. Dadurch erhöht sich die Partikelemission durch zunehmende Anzahl und verstärkte Nutzung der Kleinfeuerungsanlagen und trägt so wesentlich zur Erhöhung der Feinstaubimmission in diesen Orten bei.

In diesem Vorhaben wurde der Anteil der Feinstaubemission von Kleinfeuerungsanlagen unter die Lupe genommen, der aufgrund der Partikelgröße PM 1 (Particulate Matter: Partikel mit einem Durchmesser von 1 µm und kleiner) und der daraus resultierenden Gefährlichkeit für das menschliche Atmungssystem unter Gesundheitsaspekten von großer Bedeutung ist. Dieser Partikelfraktion der Emission wird wegen seiner Größe, der hohen Anzahl und der dadurch bedingten Lungengängigkeit sehr große Bedeutung beigemessen.

Im ersten Teil des Projektes wurde zunächst die auch im vorigen Vorhaben Nanotox I (FK 22015507) benutzte Expositionseinheit bzgl. Abscheidegrad auf die Zellkulturen optimiert und eine Dosissteigerung (bis zu Faktor 6) erreicht. Im Vorhaben Nanotox I konnte keine signifikante Zellreaktion beobachtet werden.

Die Verbrennung wurde an Stückholz- und Pelletöfen simuliert, und die Wirkung der dabei entstehenden Feinstaubemission PM1 an Lungenzellen in Kultur getestet.

Die Entnahme aus dem Abgas war so realisiert, dass nur Emissionspartikel kleiner als 1 Mikrometer Durchmesser aus dem Abgas entnommen, auf die Lungenepithelzellen gelenkt und durch Impaktion und Diffusion deponiert wurden. Dabei wurden Temperatur und Feuchte den Bedingungen in der menschlichen Lunge angepasst (37° C und 90% rel. Luftfeuchtigkeit).

In den hier beschriebenen Expositionsversuchen liegt die Partikelkonzentrationen der Emission in einem extrem hohen Bereich: Als Vergleich sei der Immissionsgrenzwert (EU-Feinstaubgrenzwert PM10; Partikel <10µm) herangezogen, welcher bei 50 µg/m<sup>3</sup> liegt (Tagesmittelwert).

Die Zellen wurden mit PM1 (aerodynamischer Partikeldurchmesser <1µm) belastet und dabei mit einer Konzentration von durchschnittlich 50 mg/ m<sup>3</sup> (also dem mehr als 1000-fachen) in einem Partikelstrom über den Zeitraum von mehreren Stunden ausgesetzt.

Zum einen ist also die Massekonzentration über 1000-fach höher als der EU-Grenzwert der Immissionsschutzverordnung, darüber hinaus ist auch die Anzahlkonzentration um ein Vielfaches höher.

Als Maß für den Grad der Reaktion der Zellen auf die Partikelbelastung wurden biochemische Reaktionen (4 Markerproteine) der Zellkulturen herangezogen. Aus der Höhe der jeweiligen Markerproteinexpression konnte so ein Maß für die Belastung abgeleitet werden. Darüber hinaus wurden die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Partikel bestimmt.

Zum Erreichen einer hohen Partikeldosis der aus dem Abgas entnommenen Emissionspartikel PM<sub>1</sub>, mussten die verwendeten Öfen mit neuem Stückgut immer wieder beladen werden. Es entstehen bei der angestrebten „schlechten Verbrennung“ somit immer wieder auch Phasen „guter“ Verbrennungszustände des Ofens, und dadurch eine gemischte Emission. Beim Pelletofen gelang das Erreichen jeweils eines der beiden angestrebten Verbrennungszustände „gut“ oder „schlecht“ kontinuierlicher nur für den „guten“ Verbrennungszustand, ein kontinuierlicher schlechter Verbrennungszustand konnte jedoch nicht eingestellt werden, was besonders deutlich auch an der (im Rohgas gemessenen) CO-Emission abgelesen werden kann.

Entsprechend unterschiedlich war das Ergebnis der Partikelanalyse. Der Anteil der löslichen Salze, besonders der von Kaliumsulfat, war bei der Pellet Verbrennung deutlich höher. Auch konnte bestätigt werden, dass der Anteil der kohlenstoffhaltigen Partikel bei schlechter Verbrennung deutlich höher war.

Die SMPS-Messung (Mobilitätswertmesser) der Aerosole ergab ein Anzahl-Maximum der Emissionspartikel bei 30-50 nm, wobei generell bei schlechter Verbrennung eine Verschiebung des Maximums hin zu größerem Durchmesser beobachtet wurde. Außerdem stellte sich ein zweites Maximum bei größerem Durchmesser (ca. 260 nm) ein, was mit zunehmender Agglomeration der Nanopartikel erklärt werden kann.

An den für die Elektronenmikroskopie präparierten Zellen aus den Expositionsversuchen (Ultradünnschnitte) konnten Partikel gefunden werden, die der Dimension von Primärpartikeln entsprechen, wie sie mit Hilfe des SMPS bestimmt wurden. Sie liegen an der Zellmembran an, teilweise sind leichte Einstülpungen der Zellmembran erkennbar. Ein Eindringen der Partikel ins Zellinnere konnte an den hergestellten Ultradünnschnitten nicht beobachtet werden. Es handelt sich um amorphe, kohlenstoffhaltige Partikelagglomerate, welche sehr wahrscheinlich im Brennraum in Zonen schlechter Verbrennung entstanden sein können.

Die bei guter Verbrennung hauptsächlich entstehenden Salze sind an den Zellpräparaten nicht gefunden worden. Sie dürften aufgrund ihrer Löslichkeit im Zuge der Präparation entfernt worden sein.

Die Erhöhung der Dosis bewirkte bei der Stückholzverbrennung im Falle der neu in diesem Vorhaben verwendeten SK-MES-1-Zellen eine deutliche Zunahme der Expression zweier inflammatorischer Markergene: Auf der Ebene der mRNA gemessen stieg die HMOC-Expression auf das 7-Fache und die Expression von IL-8 auf das Doppelte. Die beiden Markergene HSP72 und ICAM-1 zeigten keine signifikante Änderung der Expression.

Bei submerser Exposition der Zellen gegenüber Partikeln, die nach Beaufschlagung auf einen Filter in Suspension gebracht wurden, konnte eine dosisabhängige Wirkung von drei der vier untersuchten Marker (HMOX1, HSP72 und IL-6) festgestellt werden. Die Wirkung war vergleichbar mit den Ergebnissen der Exposition der Zellen gegenüber Printex 90 (Standardpartikel: amorpher Kohlenstoff). Auffallend war, dass die Expression von IL-8 um das 60-80-Fache höher war als die der anderen drei Marker.

Zur Frage des Grades der Stressantwort im Zusammenhang von möglicher Schädigung der verwendeten Zellsysteme sei folgendes angemerkt.

Die von untersuchten Stressmarker sind Komponenten der inflammatorischen Zellreaktion. Grundsätzlich ist bei inflammatorischen Reaktionen zu unterscheiden zwischen einer akuten (d.h. durch ein

einmaliges Schadereignis ausgelöst) und einer chronischen (durch eine lang anhaltende Präsenz eines Schädigungsverursachers ausgelöst) Inflammation. Die in den Versuchen durchgeführte dreimalige Schädigung dürfte daher eher dem ersten Reaktionstyp zuzuordnen sein, bei der nach einer Erholungsphase der Zellen wieder ein Normalzustand eintritt.

Vielleicht hilft an dieser Stelle ein Vergleich mit Zigarettenrauch: Die darin enthaltenen polyzyklischen Aromaten sind mutagen und können somit das Erbgut schädigen, was ab einer gewissen Konzentration (es gibt Reparaturmechanismen in den Zellen, die die Schäden beheben) die Wahrscheinlichkeit dauerhafter und nicht wieder rückgängig zu machen der Schäden erhöht, weil die Zelle nicht alle Schäden rechtzeitig beheben kann. Somit kann also der Genuss einer einzigen Zigarette Lungenkrebs auslösen. Solche Schäden sind durch die untersuchten (chemisch eher inerten) Nanopartikel nicht zu erwarten, wohl aber ist es so, dass eine chronische Inflammation selbst einen auch nach Entfernen des ursprünglichen Auslösers nicht mehr (ohne therapeutische Maßnahmen) rückgängig zu machen den Krankheitszustand darstellt, der weitere gesundheitliche Komplikationen nach sich zieht. Von daher ist grundsätzlich zu sagen, dass eine auch nur moderate Reizung, sofern sie länger persistiert, erhebliche gesundheitliche Konsequenzen haben kann.

Wie unter 6) angedeutet ist die Einbeziehung des potentiellen (vielleicht anfangs auch nur theoretisch zu erwartenden) Wirkmechanismus der zu untersuchenden Abgaspartikel von entscheidender Bedeutung für eine Bewertung: Die von uns zur Bewertung der toxischen Eigenschaften der Verbrennungs-Nanopartikel herangezogenen Marker sind grundsätzlich andere als die, die wir gewählt hätten, wenn wir mit nennenswerten Rußbestandteilen (Stichwort polyzyklische Aromaten) oder volatilen organischen Substanzen zu rechnen hätten. Würden wir beispielsweise die Wirkung des oben genannten Zigarettenrauches (Frage 6) mit unseren in diesem Projekt eingesetzten Markern abfragen, kämen wir zwar zu einer Aussage über die inflammatorische Stressantwort, würden aber die gesundheitlich viel schwerwiegendere kanzerogene Wirkung völlig außer Acht lassen.

Selbstverständlich wäre das Karlsruher Expositionssystem geeignet, die Wirkung von Zigarettenrauch zu untersuchen, wir würden allerdings andere zelluläre Parameter abfragen.

Im Rahmen des Vorhabens wurden drei Expositionssysteme getestet:

1) das Karlsruher Expositionssystem zur Abscheidung von Feinstaubpartikeln aus dem Gasstrom auf Zellkulturproben, 2) die submerse Exposition und 3) die submerse Exposition unter Einbeziehung von Makrophagen.

Das Karlsruher Expositionssystem ist gegenüber den unter 2) und 3) genannten Systemen mit Abstand das relevanteste, da es der tatsächlichen Expositionssituation am ehesten entspricht: Die Partikel erreichen die Zellen über den Luftweg, so dass es keine sekundären physikalischen Effekte gibt, wie sie durch das Einbringen der Partikel in das Zellkulturmedium, also eine proteinreiche wässrige Lösung, verursacht werden (z.B. Adsorption an Serumproteine, sekundäre Agglomeration). Die Flüssigkeitsmenge, die im Karlsruher Expositionssystem noch auf den Zellen befindlich ist, dürfte der Situation in der Lunge weitgehend ähneln. Unter 6) und 7) wurde bereits auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen verschiedenster Abgase hingewiesen. Das Karlsruher Expositionssystem spielt seine Vorteile nur bei solchen Abgasen aus, die den inerten Nanopartikeln weitgehend nahe kommen, sowie bei volatilen Substanzen oder Gasen, die schlecht in submerser Form dargereicht werden können,

weil sie z.B. nur bedingt wasserlöslich sind. Für gut wasserlösliche Schadstoffe ist die submerse Exposition aufgrund ihrer viel einfacheren Handhabung dem Karlsruher Expositionssystem vorzuziehen.

Entsprechend der Zielsetzung des Vorhabens ist es gelungen, durch eine Dosissteigerung deutliche Reaktionen auf der Zellebene zu erreichen. Dies war jedoch nur möglich, indem die Zellen dem Partikelstrom der Verbrennung in kumulierten Expositionsversuchen (drei Versuche über 2 h) an drei aufeinanderfolgenden Tagen) ausgesetzt waren.

Erschwerend kam dazu, dass die Aufrechterhaltung eines „idealen“ schlechten Verbrennungszustands nicht über große Zeiträume möglich war, was zu einer gewissen Mischung von optimalen und suboptimalen Verbrennungszuständen und Emissionen führte.

Nach unserer Einschätzung ist das verwendete Modellsystem (Karlsruher Expositionssystem in Kombination mit Zellsystemen) praktisch einsetzbar.

Allerdings mit der Einschränkung, da es sich weitgehend um ein Unikat handelt, dass dessen Benutzung einer gewissenhaften Einarbeitung und Schulung der Bediener bedarf.

Wie unter 4) erläutert wäre noch zu untersuchen, ob die Auswahl der untersuchten Marker durch geeignete weitere Marker zu erweitern und zu verbessern ist.

Auf die technischen Schwierigkeiten am Expositionssystem (Dichtigkeit der Kammern) ist in diesem Vorhaben reagiert worden.

Das eingesetzte „Sensorsystem“ zur Bewertung von Nanopartikelemissionen PM<sub>1</sub>, bestehend aus Expositionseinheit, Öfen und dem Zellkultursystem hat sich als geeignet erwiesen. Die Schwelle, bei welcher die Zellen eine Reaktion zeigen erscheint sehr hoch, was auf eine geringe toxische Wirkung besonders der Partikelemission bei der Pellet Verbrennung schließen lässt.

Eine vergleichende Bewertung mit anderen Emissionsquellen ist zurzeit nicht möglich, da noch keine Werte mit diesem System (Expositionseinheit, Zellen) vorliegen.

Hier könnte sicherlich der Vergleich mit Motoremissionen (Bsp.: Biodiesel) wichtige Referenzwerte liefern und eine Bewertungsgrundlage für diese beiden Emissionsquellen darstellen.

## 8 Danksagung

Wie schon im ersten Vorhaben Nanotox I (FK 22015507) gilt ein besonderer Dank den beiden Partnern des Projekts:

1. IFK Institut für Feuerungs- und Kraftwerkstechnik der Universität Stuttgart, Reinhaltung der Luft (G. Baumbach, M. Struschka, P. Winter)
2. KIT Karlsruher Institut für Technologie, ITC-TAB Institut für Technische Chemie - Bereich Thermische Abfallbehandlung (H.-R. Paur, S. Mülhopt, Ch. Schlager).

Hervorzuheben ist die gute kooperative Zusammenarbeit der Mitarbeiter der 3 beteiligten Institute IFK, KIT und NMI, die mit ihrer Fachkompetenz wesentlich zum Gelingen dieses Vorhabens beigetragen haben.

Besten Dank für die vertrauensvolle Zusammenarbeit mit dem Projektträger, der das Projekt durch Herrn Stanev und Frau Hausmann sehr positiv begleitet hat.

## 9 Literatur

1. Pope, C.A., III and D.W. Dockery, Health Effects of Fine Particulate Air Pollution: Lines that Connect. Journal of Air & Waste Management Association, 2006. 56: p. 709-742.
2. Dang Sheng Su, Annalucia Serafino, Jens-Oliver Müller, Rolf. E. Jentoft, Robert Schlögl, and Silvana Fiorito; Cytotoxicity and Inflammatory Potential of Soot Particles of Low-Emission Diesel Engines Environmental Science & Technology online, 25. Januar 2008.
3. Dreher, W.F., et al., Toxische Wirkung von Nanopartikeln aus Biomassenverbrennung. 2011.
4. Paur, H.-R., et al., In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung - a dialogue between aerosol science and biology. Journal of Aerosol Science, 2011. 42: p. 668-692.
5. Paur, H.R., et al., In Vitro Exposure Systems and Bioassays for the Assessment of Toxicity of Nanoparticles to the Human Lung. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2008. 3: p. 319-329.
6. Diabaté, S., et al. In vitro exposure of human lung cells at the air-liquid interface to combustion derived ultrafine particles. in European Aerosol Conference. 2008. Thessaloniki.
7. Mülhopt, S., et al., Lung toxicity determination by in vitro exposure at the air liquid interface with an integrated online dose measurement. Journal of Physics: Conference Series, 2009. 170: p. S.012008/1-4.
8. Paur, H.R., et al. In-vitro cell exposure studies for the assessment of UFP-toxicity from wood combustion. in EFCA International Symposium. 2011. Brussels.
9. Comouth, A., Kontrollierte Deposition synthetischer Nanopartikel auf Lungenzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht für toxikologische Untersuchungen. 2012, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Heidelberg. p. 148.
10. Comouth, A., et al. Deposition of engineered nanoparticles on human lung cells via the air liquid interface. in Frühjahrstagung DPG, Fachverband Biologische Physik. 2009. Dresden.
11. Savi, M., et al., A Novel Exposure System for the Efficient and Controlled Deposition of Aerosol Particles onto Cell Cultures. Environmental Science and Technology, 2008. 42: p. 5667-5674.
12. Becker, B., Gas-/Partikelwechselwirkung chlorierter Aromaten bei der Rauchgasreinigung von Müllverbrennungsanlagen, in Fakultät für Maschinenbau. 2003, Universität Stuttgart: Stuttgart. p. 214.

13. Mülhopt, S., et al., In vitro testing of inhalable fly ash at the air liquid interface, in Advanced Environmental Monitoring, Y.J. Kim and U. Platt, Editors. 2007, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 402-414.
14. S. Mülhopt, H.-R. Paur, H. Seifert; Expositionsverfahren für ein lungenspezifisches Bioassay zur Bewertung industrieller Feinstpartikel – Emissionen; Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 02.03. und 03.03.2004 im Forschungszentrum Karlsruhe. Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Technische Chemie, Bereich Thermische Abfallbehandlung (2004).
15. S. Mülhopt; Betrieb, Bedienung und Wartung des Karlsruher Expositionssystems, Standardarbeitsanweisung; Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Technische Chemie, Bereich Thermische Abfallbehandlung (2009).
16. VDI- Richtlinie 2066 Blatt 1; Messen von Partikeln, Staubmessung in strömenden Gasen. Gravimetrische Bestimmung der Staubbelastung; Beuth Verlag Berlin (2006).
17. A. Axarlis; Untersuchungen zur isokinetischen Probenahme bei Staubmessungen an Feuerungsanlagen für feste Brennstoffe; Diplomarbeit Nr.3007; Institut für Feuerungs- und Kraftwerkstechnik; Universität Stuttgart (2011).
18. M. Kaltschmitt und H. Hartmann Energie aus Biomasse. Grundlagen, Technik und Verfahren; Springer Verlag, Heidelberg (2009)
19. LUBW Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg; Bestimmung des Beitrags der Holzfeuerung zum PM10-Feinstaub. 2010.
20. Anke Gabriele Lenz, Erwin Karg, Bernd Lentner, Vlad Dittrich, Christina Brandenberger, Barbara Rothen-Rutishauser, Holger Schulz, George A Ferron, and Otmar Schmid A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles; Particle and Fibre Toxicology 2009, 6:32.
21. Loretta Müller, Michael Riediker, Peter Wick, Martin Mohr, Peter Gehr and Barbara Rothen-Rutishauser; Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways; J. R. Soc. Interface 2010 7:27-40.
22. Krisztina Gál, Áron Cseh, Balázs Szalay, Krisztina Rusai, Ádám Vannay, József Lukácsovits, Uwe Heemann, Attila J. Szabó, György Losonczy, Lilla Tamási, Veronika Müller; Effect of cigarette smoke and dexamethasone on Hsp72 system of alveolar epithelial cells; Cell Stress and Chaperones 2011, 16:369–378



Seite 120 von 121

- 23     Andrea **Gojova**, Bing Guo, Rama S. Kota, John C. Rutledge, Ian M. Kennedy, and Abdul I. Barakat; *Induction of Inflammation in Vascular Endothelial Cells by Metal Oxide Nanoparticles: Effect of Particle Composition*; *Environmental Health Perspectives* 2007, 115:403-409
- 24     Venkatesh **Lakshminarayanan**, David W. A. Beno, Robert H. Costa, and Kenneth A. Roebuck; *Differential Regulation of Interleukin-8 and Intercellular Adhesion Molecule-1 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Endothelial and Epithelial Cells*; *J. Biol. Chem.* 1997, 27:32910–32918

----- Ende des Berichtes -----