
Summary of the doctoral thesis

Alveolar *in vitro* models: a tool for respiratory toxicology

PhD Student **Ionel Fizeșan**

Scientific supervisor Prof.dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
REVIEW OF THE LITERATURE	
1. In vitro models used in the respiratory toxicology	19
1.1. Introduction	19
1.2. Structure and function of the respiratory system	20
1.3. Required characteristics for cell culture models used in inhalation toxicology	22
1.4. Types of epithelial cells used in respiratory toxicology	22
1.4.1. Primary epithelial cells	22
1.4.2. Cell lines	23
1.4.3. Induced pluripotent stem cells	25
1.5. Complex cellular models	25
1.6. Concluding remarks	28
2. The respiratory toxicity of particulate matter (PM)	29
2.1. Introduction	29
2.2. Epidemiological evidence	30
2.3. Mechanisms of toxicity	31
2.3.1. Induction of oxidative stress	31
2.3.2. Pulmonary inflammation	32
2.3.3. Activation of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	33
2.3.4. Lung cancer	34
2.4. Concluding remarks	34
3. The respiratory toxicity of silver nanomaterials (AgNMs)	37
3.1. Introduction	37
3.2. Mechanisms of toxicity	38
3.2.1. Induction of oxidative stress	38
3.2.2. Pulmonary inflammation	39
3.2.3. Shape-specific toxic effects: Frustrated phagocytosis	41
3.3. Concluding remarks	42
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Aims	45
2. General methodology	47
2.1. The assembly of the 3D tetra-cellular model representative for the alveolar barrier	47
3. Study 1. Responsiveness assessment of a 3D tetra-culture alveolar model exposed to diesel exhaust particulate matter	53
3.1. Introduction	53
3.2. Aims	55
3.3. Material and Methods	56
3.3.1. Influence of the airflow on cellular viability - a prerequisite before testing DEPM	56

3.3.2. DEPM characterization – Extraction and fractionation of adsorbed organic constituents	56
3.3.3. Aerosol exposure	57
3.3.4. Dosimetry approach for DEPM	58
3.3.5. Cytotoxicity assay – Lactate Dehydrogenase assay	58
3.3.6. Cytokine measurement from cell culture supernatants	59
3.3.7. Measurement of heme oxygenase-1 from cell culture supernatants	59
3.3.8. Real-time qRT-PCR of pro-inflammatory and stress response markers	59
3.3.9. Cell labelling and Confocal Microscopy	60
3.3.10. Statistics	61
3.4. Results	62
3.4.1. Influence of the airflow on cellular viability	62
3.4.2. DEPM characterization	63
3.4.3. Quantification of membrane deposited DEPM	63
3.4.4. Influence of DEPM exposure on cellular viability	66
3.4.5. Cytokine measurement from cell culture supernatants	67
3.4.6. Measurement of HMOX-1 from cell culture supernatants	67
3.4.7. Gene expression analysis	68
3.4.7. Nuclear translocation of transcription factors in the alveolar model	75
3.5. Discussion	78
3.6. Concluding remarks	82
4. Study 2. <i>In vitro</i> exposure of a 3D tetra-culture representative for the alveolar barrier at the air-liquid interface to silver particles and nanowires	83
4.1. Introduction	84
4.2. Aims	85
4.3. Material and Methods	85
4.3.1. Particle Characterization and Preparation of Dispersions	85
4.3.2. Release of silver ions after sonication, and after the incubation with alveolar surfactant (Curosurf®)	87
4.3.3. Exposures at air-liquid interface to aerosols of AgNMs	88
4.3.4. Validation of the exposure system. Trial for the implementation of quartz balances as dosimetry instrumentals.	88
4.3.5. Characterization of the deposited AgNMs	89
4.3.6. Cytotoxicity and metabolic impairment	90
4.3.7. Generation of reactive oxygen species	91
4.3.8. The biological impact of ROS on reduced and oxidized glutathione ratio	91
4.3.9. Real-time RT-PCR of pro-inflammatory and stress response markers	91
4.3.10. Cytokine and Chemokine secretion	92
4.3.11. Confocal microscopy	93
4.3.12. Statistics	93
4.4. Results	93
4.4.1. Characterization of ENMs in liquid suspension	93
4.4.2. Trial for the implementation of quartz balances as dosimetry instrumentals.	94
4.4.3. Characterization of the deposited AgNMs	96

4.4.4. Cytotoxicity and metabolic impairment	99
4.4.5. Oxidative stress response	100
4.4.6. Gene expression of the pro-inflammatory and stress response elements.	101
4.4.7. Cytokine and Chemokine secretion	111
4.4.8. Nuclear translocation of the transcription factor NF-kB	113
4.5. Discussion	116
4.6. Concluding remarks	121
5. General discussions	123
6. General conclusions	127
7. Originality and innovative contributions of the thesis	129
REFERENCES	131

Introduction

The effects elicited by the respiratory exposure to either engineered nanomaterials (ENMs) or atmospheric particles resulted after combustion processes are intensely studied by academia. The reason for this interest stems from the observable effects of particulate matter (PM) and diesel exhaust particle matter (DEPM) on human health. Exposure to PM was associated with an increased morbidity and mortality of respiratory and cardiovascular cause. According to new estimates released by the World Health Organization (WHO), air pollution (indoor and outdoor exposure) may be responsible for up to 7 million premature deaths in 2012 worldwide. Furthermore, in 2013 the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified the outdoor air pollution and particulate matter from outdoor air pollution as carcinogenic to humans (group1). Moreover, these evidences were further hypothesized to be applicable for other types of potentially airborne particulates including ENMs, thus promoting a thorough characterization of new nanomaterials. In contrast with PM, ENMs are deliberately engineered at the nanoscale, as at this size they exhibit technological advantages compared with the bulk material from which they are produced.

Even though in regulatory fields many types of materials and chemicals were classified as hazardous to human health based on studies conducted on animals, this method of testing cannot be successfully applied to the large body of ENMs developed each year. Besides the high number of new developed nanomaterials, this encountered limitation stems also from the unique characteristics of each type of ENMs, these characteristics being dictated not only by the bulk material from which they are formed, but also by other characteristics such as size, shape, surface chemistry.

The development of complex cellular *in vitro* models which would encompass the limitations experienced with the classical 2D models and the low-throughput of animal studies was proposed as a possible solution for this major inconvenient. Moreover, in the current context where use of animals in toxicology assessment is strictly regulated and ethically questioned, the development of alternative *in vitro* models to replace the above-mentioned animal studies is highly desired by regulatory affairs and in general by the public.

Aims

In this context, the current thesis aimed to evaluate the utility of *in vitro* alveolar models in the toxicity assessment of DEPM and three different silver nanomaterials (AgNMs). The models composed of four different cell lines (A549, Ea.hy 926, HMC-1 and THP-1) mimic the architecture and the functionality of the alveolar barrier. By coupling these *in vitro* models with state-of-the-art exposure systems, which allow a direct exposure at air-liquid interface, the evaluation of the possible hazardous effects was conducted in order to mimic as closely as possible real-life exposure scenarios.

Before evaluating the biological effects, the establishment of a proper dosimetry in terms of efficiency and reproducibility after exposure with the Vitrocell Palas System in case of DEPM and after exposure with the Vitrocell Cloud System in case of AgNMs was necessary. Different biological endpoints related to the three-tiered oxidative stress concept were chosen to describe the biological effects elicited by the exposure to DEPM and AgNMs, respectively. In the second study where different shape- and size- AgNMs were tested, the influence of these characteristics was studied.

Responsiveness assessment of a 3D tetra-culture alveolar model exposed to diesel exhaust particulate matter

Aim

Moderate to high doses of DEPM were selected to verify the responsiveness of the 3D tetra-culture alveolar model over the fully expected dynamic range of biological effects, to extend beyond to a previous study in which only mild biological effects were observed due to the low concentrations of DEPM applied. In addition to the characterization of the endothelial side of the 3D *in vitro* model, which was the main focus of a previous study by our group, the biological responses occurring at the endothelial and epithelial side have now been evaluated in more details to obtain a more complete characterization of the alveolar model and its responses. Relevant biological endpoints were evaluated in accordance with the three-tiered oxidative stress concept.

Results and discussion

The results obtained subscribe that the alveolar model used is able to respond to the stress elicited after exposure to DEPM by inducing a plethora of effects, which can be modeled in accordance with the three-tiered oxidative stress concept. The activation of potent anti-oxidant defense mechanism was present and included the nuclear translocation of Nrf2, increased expression of genes encoding proteins with anti-oxidant functions and increased secretion of the anti-inflammatory and anti-oxidant protein HMOX-1. In the second tier, a strong pro-inflammatory effect was observed after exposure to DEPM at earlier time points and included NF-kB translocation, increased transcription of genes coding pro-inflammatory molecules and increased secretion of IL-6 and IL-8. In agreement with the current literature which emphasizes the auto-

regulatory nature of the acute pro-inflammatory processes, a strong down-regulation of the pro-inflammatory genes was observed at the later time point studied. Representative for the third tier of the hierarchical oxidative stress concept, exposure to DEPM increased in a dose-dependent manner the extracellular release of LDH due to membrane leakage or possibly necrosis. Furthermore, an early increased transcription of *FAS* and *CASP7* genes encoding pro-apoptotic effectors was observed at 12 h post-exposure, suggesting that apoptosis could occur as a consequence of DEPM exposure. Overall, the results reported confirm that the 3D alveolar model directly exposed to DEPM responds in a reproducible way according to the three-tiered oxidative stress concept.

***In vitro* exposure of a 3D tetra-culture representative for the alveolar barrier at the air-liquid interface to silver particles and nanowires**

Aim

The second study aimed to evaluate the potential differences in the biological effects of two types of spherical silver particles of 20 and 200 nm (Ag20 and Ag200), and of uncoated silver nanowires (AgNWs) with a diameter of 50 nm and length up to 50 μm , using a complex 3D model representative for the alveolar barrier cultured at ALI. The alveolar model was exposed to 0.05, 0.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of test compounds at ALI using a state-of-the-art exposure system (Vitrocell™Cloud System). Endpoints related to the oxidative stress induction, anti-oxidant defense mechanisms, pro-inflammatory responses and cellular death were selected to evaluate the biocompatibility of silver particles and nanowires (AgNMs) and to further ascribe particular biological effects to the different morphologic properties between the three types of AgNMs evaluated.

Results and discussion

Significant cytotoxic effects were observed for all three types of AgNMs at the highest tested doses. The increased transcription of the pro-apoptotic gene *CASP7* suggests that apoptosis may occur after exposure to AgNWs. All three types of AgNMs induced the transcription of the anti-oxidant enzyme HMOX-1 and of the metal-binding anti-oxidant MTs, with AgNWs being the most potent inducer. Even though all types of AgNMs induced the nuclear translocation of NF- κB , only AgNWs induced the gene expression of pro-inflammatory mediators. The pro-inflammatory response elicited by AgNWs was further confirmed by the increased secretion of the 10 evaluated interleukins. The results obtained endorse that the hypothesis of more pronounced toxicological effects of high-aspect ratio nanomaterials (HARN) in comparison with spherical NPs of the same material is also true for Ag-based materials. The results from the second study demonstrate that the direct exposure of a complex tetra-culture alveolar model to different types of AgNMs at ALI induces shape- and size-specific biological responses. From the three AgNMs tested, AgNWs were the most potent in inducing biological alterations. Starting from 50 ng/cm^2 , a dose representative

for an acute exposure in a high exposure occupational setting, AgNWs induced prominent changes indicative for a pro-inflammatory response. Even though the acute responses towards a dose representative for a full-life time exposure were also evaluated, chronic exposure scenarios at low dose are still unquestionably needed to reveal the human health impact of AgNMs during realistic conditions.

General conclusions

Based on the studies included in the present thesis valuable information regarding the applicability of complex cellular models in respiratory toxicology is provided. The evaluation of the possible hazardous effects of DEPM and the three different AgNMs was conducted in order to mimic as closely as possible real-life exposure scenarios. By combining a relevant *in vitro* model which has been previously shown to bear relevance for the evaluation of respiratory irritants and sensitizers with state-of-the-art exposure systems, the suitability of *in vitro* cellular techniques was evaluated.

Traditionally, the toxic potential of DEPM was evaluated based on animal and classical *in vitro* cell culture. Although these studies provided important knowledge regarding the mechanisms of toxicity, the majority of effects were observed at extremely large doses that were often representative for the cumulative dose during one lifetime or more.

Even though the doses used in study 1 to assess the acute toxic potential of DEPM were also high, they are considerably lower (at least one order of magnitude lower) than in studies conducted under submerged conditions on mono-culture of cells, providing additional information regarding the superiority of complex cellular models. The effects elicited by the exposure to DEPM were predictable and in agreement with the three-tiered oxidative stress concept.

In the second study done, the ability of the alveolar model to develop a particular response dependent on the type of stimuli was tested. For this, the biocompatibility of three different AgNMs with different shapes or sizes was evaluated. AgNMs are widely used in industry and medicine, being the most widespread type of nanomaterials, thus offering another argument for their selection. From the three AgNMs tested, AgNWs induced prominent pro-inflammatory responses, which occurred at a dose representative for an acute exposure in occupation settings. These findings reiterate the crucial contribution of shape and size when it comes about the toxicity of nanomaterials.

As stated previously, differently from animal experimentation where improvements can be hardly done due to inherent differences between species, *in vitro* cellular cultures can be further improved to meet the necessary requirements and demands as models in toxicology. This versatility, combined with new advances in other domains such as bio-engineering hold the promise for an improved way of testing inhalable toxicants in the future.

Overall, the results obtained in both studies confirm that complex cellular models can be successfully used in the toxicity assessment of inhalable toxicants. Further evaluation and benchmarking against currently used *in vivo* models is still needed to confirm its suitability, and to serve in the future as an alternative for *in vivo* studies

Rezumatul tezei doctorale

Modele alveolare *in vitro* utilizate în toxicologia respiratorie

Doctorand **Ionel Fizeșan**

Conducător științific Prof.dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Utilizarea modelelor <i>in vitro</i> în toxicologia respiratorie	19
1.1. Introducere	19
1.2. Structura și fiziologia sistemului respirator	20
1.3. Modele celulare utilizate în toxicologia respiratorie	22
1.4. Tipuri de celule epiteliale folosite în toxicologia respiratorie	22
1.4.1. Celule epiteliale primare	22
1.4.2. Linii celulare imortalizate	23
1.4.3. Celule stem pluripotente induse	25
1.5. Modele celulare complexe	25
1.6. Concluzii	28
2. Toxicitatea respiratorie a particulelor atmosferice (PM)	29
2.1. Introducere	29
2.2. Date epidemiologice referitoare la toxicitate	30
2.3. Mecanismul acțiunii toxice	31
2.3.1. Inducerea stresului oxidativ	31
2.3.2. Inducerea proceselor pro-inflamatorii la nivel pulmonar	32
2.3.3. Activarea receptorului pentru hidrocarburi aromatice (AhR)	33
2.3.4. Inducerea cancerului pulmonar	34
2.4. Concluzii	34
3. Toxicitatea respiratorie a nanomaterialelor de argint (AgNMs)	37
3.1. Introducere	37
3.2. Mecanismul acțiunii toxice	38
3.2.1. Inducerea stresului oxidativ	38
3.2.2. Inducerea proceselor pro-inflamatorii la nivel pulmonar	39
3.2.3. Inducerea unor efecte toxice dependente de forma nanomaterialelor: Fagocitoza incompletă	41
3.3. Concluzii	42
CONTRIBUȚII PERSONALE	
1. Obiective	45
2. Metodologie generală	47
2.1. Obținerea modelului 3D tetra-celular reprezentativ pentru bariera alveolară	47
3. Studiul 1. Evaluarea răspunsului unei tetra-culturi 3D, reprezentativă pentru bariera alveolară, după expunerea la particule diesel (DEPM)	53
3.1. Introducere	53
3.2. Obiective	55
3.3. Materiale și Metode	56
3.3.1. Influența fluxului de aer asupra viabilității celulare	56

3.3.2. Caracterizarea DEPM - Extracția și fracționarea componentelor organice adsorbite	56
3.3.3. Expunerea la aerosol	57
3.3.4. Evaluarea cantității de DEPM depusă la suprafața inserturilor	58
3.3.5. Testarea citotoxicității - Testul lactat dehidrogenazei	58
3.3.6. Cuantificarea citokinelor pro-inflamatorii din mediul de cultură	59
3.3.7. Cuantificarea HMOX-1 din mediul de cultură	59
3.3.8. Evaluarea expresiei genelor ce codifică proteine cu rol pro-inflamator și de modulare a stresului celular	59
3.3.9. Evaluarea translocării factorilor de transcripție Nrf2, NF-κB și AhR	60
3.3.10. Evaluarea statistică	61
3.4. Rezultate	62
3.4.1. Influența fluxului de aer asupra viabilității celulare	62
3.4.2. Caracterizarea DEPM	63
3.4.3. Evaluarea cantității de DEPM depusă la suprafața inserturilor	63
3.4.4. Influența expunerii la DEPM - evaluarea viabilității celulare	66
3.4.5. Cuantificarea citokinelor pro-inflamatorii din mediul de cultură	67
3.4.6. Cuantificarea HMOX-1 din mediul de cultură	67
3.4.7. Evaluarea expresiei genelor	68
3.4.7. Evaluarea translocării factorilor nucleari de transcripție	75
3.5. Discuții	78
3.6. Concluzii	82
4. Expunerea unui model tetra-celular 3D reprezentativ pentru bariera alveolară la particule și nanofibre de argint (AgNMs) la interfața aer-lichid	83
4.1. Introducere	84
4.2. Obiective	85
4.3. Materiale și Metode	85
4.3.1. Caracterizarea particulelor și prepararea dispersiilor	85
4.3.2. Eliberarea ionilor de argint după sonicare și după incubare cu surfactant alveolar (Curosurf®)	87
4.3.3. Expunerea la AgNMs	88
4.3.4. Validarea sistemului de expunere. Implementarea balanțelor de cuarț ca instrumente de dozimetrie	88
4.3.5. Caracterizarea calitativă și cantitativă a AgNMs depuse	89
4.3.6. Citotoxicitatea și afectarea metabolică	90
4.3.7. Generarea de specii reactive de oxigen (ROS)	91
4.3.8. Impactul biologic al ROS asupra raportului între glutationul redus și oxidat	91
4.3.9. Evaluarea expresiei genelor ce codifică elemente de stres și proteine pro-inflamatorii	91
4.3.10. Cuantificarea citokinelor pro-inflamatorii din mediul de cultură	92
4.3.11. Microscopia confocală	93
4.3.12. Evaluarea statistică	93
4.4. Rezultate	93
4.4.1. Caracterizarea AgNMs în suspensie lichidă	93
4.4.2. Implementarea balanțelor de cuarț ca instrumente de dozimetrie	94
4.4.3. Caracterizarea calitativă și cantitativă a AgNMs depuse	96
4.4.4. Citotoxicitatea și afectarea metabolică	99

4.4.5. Generarea de specii reactive de oxigen	100
4.4.6. Evaluarea expresiei genelor ce codifică elemente de stres și proteine pro-inflamatorii	101
4.4.7. Cuantificarea citokinelor pro-inflamatorii din mediul de cultură	111
4.4.8. Translocarea nucleară a factorului de transcripție NF-kB	113
4.5. Discuții	116
4.6. Concluzii	121
5. Discuții generale	123
6. Concluzii generale	127
7. Originalitatea și contribuția inovatoare a tezei	129
REFERINȚE	131

Introducere

Efectele biologice apărute după expunerea respiratorie la nanomateriale fabricate și/sau particule atmosferice rezultate în urma proceselor de combustie reprezintă o arie de interes atât pentru comunitatea științifică, cât și pentru organismele internaționale ce se ocupă de monitorizarea și de reglementarea expunerilor la nanoparticule. Interesul crescut pentru acest subiect este o consecință a efectelor nocive observate în urma expunerii la particule atmosferice, în special la particulele rezultate în urma arderii motorinei. Expunerea respiratorie la particule atmosferice a fost asociată cu o creștere a morbidității și mortalității de natură respiratorie și cardiovasculară. Potrivit noilor estimări publicate de Organizația Mondială a Sănătății, poluanții atmosferici sunt responsabili pentru aproximativ 7 milioane de decese premature în 2012 la nivel mondial. În 2013, Agenția Internațională pentru Cercetare în domeniul Cancerului a clasificat poluarea atmosferică și particulele atmosferice ca fiind cancerigene pentru om. Efectele nocive observate au pus sub semnul întrebării siguranța altor tipuri de particule, inclusiv a nanomaterialelor fabricate, fiind necesară astfel o caracterizare mai amănunțită a acestora.

Spre deosebire de particulele atmosferice, nanomaterialele fabricate sunt proiectate în mod deliberat la scară nanometrică, acestea prezentând la această dimensiune avantaje tehnologice în comparație cu materialul din care sunt produse. Chiar dacă studiile *in vivo* au fost și rămân utile pentru caracterizarea multor substanțe chimice din punct de vedere al siguranței, numărul mare de nanomateriale dezvoltate anual a condus la dezvoltarea unor metode de studiu alternative. Din cauza numărului mare de noi nanomateriale dezvoltate și a caracteristicilor unice ale fiecărui tip de nanomaterial, testarea folosind modele *in vivo* nu mai este fezabilă.

Performanța scăzută a testelor *in vivo* și necesitatea de a depăși limitele experimentale întâlnite în cazul utilizării modelelor clasice celulare 2D au favorizat dezvoltarea modelelor celulare complexe. În contextul actual, în care utilizarea animalelor în testarea toxicologică este reglementată strict și pusă sub semnul întrebării din punct de vedere etic, dezvoltarea unor modele alternative *in vitro* este necesară și cerută atât de organismele de reglementare, cât și de publicul general.

Obiective

În acest context, teza doctorală a avut ca scop evaluarea utilității modelelor celulare *in vitro* în evaluarea toxicității particulelor rezultate în urma combustiei motorinei și a trei nanomateriale pe bază de argint. Modelele compuse din patru linii celulare diferite (A549, Ea.hy 926, HMC-1 și THP-1) imită arhitectura și funcționalitatea barierei alveolare. De asemenea, pentru a simula cât mai fidel situația reală, s-au folosit sisteme care au permis o expunere directă a modelelor celulare la materialul de testat la interfața aer-lichid. Versatilitatea și flexibilitatea tehnicilor *in vitro* reprezintă avantaje importante care permit îmbunătățiri continue ale modelelor. Acest aspect a fost exploatat în studiul 2, unde modelul celular a fost reconfigurat de la godeuri cu 6 inserturi, la godeuri cu 24 de inserturi permițând astfel creșterea numărului experimentelor biologice efectuate. De asemenea, compoziția celulară a fost adaptată în continuare pentru a crește relevanța modelului.

Evaluarea răspunsului unei tetra-culturi 3D, reprezentative pentru bariera alveolară, după expunerea la particule diesel (DEPM)

Obiectivul studiului

În primul studiu au fost selectate doze de DEPM medii spre mari pentru a examina capacitatea modelului celular de a răspunde pe un domeniu cât mai larg. De asemenea, acest studiu a vizat extinderea informațiilor legate de capacitatea modelului celular de a răspunde la stimuli întrucât într-un studiu anterior, folosind același model celular, expunerea la doze mici de DEPM a fost asociată doar cu instalarea unor efecte biologice minore. Pentru a avea o imagine de ansamblu au fost caracterizate atât partea epitelială, direct expusă la DEPM, cât și partea endotelială a modelului, expusă indirect. Markerii biologici au fost selecționați și evaluați raportat la conceptul de stres oxidativ pe trei niveluri.

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute confirmă faptul că modelul alveolar utilizat este capabil să răspundă la stresul provocat prin inducerea unor efecte multiple care pot fi atribuite conceptului de stres oxidativ pe trei niveluri. Activarea apărării antioxidante a fost prezentă și a inclus translocarea nucleară a factorului de transcripție Nrf2, creșterea transcripției genelor care codifică proteine cu funcții antioxidante și secreția crescută a proteinei HMOX-1. Corespunzător celui de-al doilea nivel, s-a observat un efect puternic proinflamator acut la 12 h post-expunere, fiind observate translocarea nucleară a factorului de transcripție NF-kB, transcripția crescută a genelor care codifică molecule proinflamatorii și secreția crescută de citokine proinflamatorii (IL-6 și IL-8). În concordanță cu literatura actuală care atestă capacitatea de auto-reglare a proceselor inflamatorii acute, a fost observată o puternică scădere în expresia genelor proinflamatorii la 24 h post-expunere. Corespunzător celui de-al treilea nivel al conceptului ierarhic al stresului oxidativ, expunerea la DEPM a crescut într-o manieră dependentă de doză eliberarea extracelulară a lactat dehidrogenzei în urma lezării membranare sau a necrozei celulare. Suplimentar, la 12 ore după expunere s-a observat o transcripție crescută a genelor *FAS* și *CASP7* care codifică efectori din

cascada apoptozei, sugerând că acest proces ar putea apărea ca o consecință a expunerii la DEPM. Per ansamblu, rezultatele obținute confirmă faptul că modelul alveolar 3D expus direct la DEPM răspunde într-un mod reproductibil în conformitate cu conceptul de stres oxidativ pe trei niveluri.

Expunerea unui model tetra-celular 3D reprezentativ pentru bariera alveolară la particule și nanofibre de argint la interfața aer-lichid

Obiectivul studiului

Al doilea studiu a urmărit să evalueze toxicitatea a două tipuri de particule de argint sferice cu dimensiunea de 20 și 200 nm (Ag20 și Ag200), respectiv a unor nanofibre de argint neacoperite (AgNWs) cu un diametru de 50 nm și o lungime de până la 50 μm . În acest scop s-a folosit un model celular alveolar asemănător celui folosit în evaluarea toxicității particulelor diesel, cultivat la interfața aer-lichid. Modelul alveolar a fost expus la doze de 0,05, 0,5 și 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Ag20, Ag200 și AgNWs folosind un sistem de expunere de ultimă oră (Vitrocell™ Cloud System).

Rezultate și discuții

Markerii biologici evaluați au fost selecționați pentru a urmări inducerea stresului oxidativ, mecanismele de apărare antioxidantă, răspunsurile proinflamatorii și moartea celulară. Un interes special a fost dedicat stabilirii unei posibile relații între proprietățile fizice ale nanomaterialelor și inducerea unor efecte biologice particulare. Pentru toate cele trei tipuri de nanomateriale au fost observate efecte citotoxice semnificative. Transcripția crescută a genei pro-apoptotice *CASP7* a sugerat că inducerea apoptozei este un posibil mecanism de manifestare a citotoxicității în urma expunerii la AgNWs. Expunerea la toate cele trei tipuri de nanomateriale a condus la creșterea expresiei genice a enzimei antioxidante HMOX-1 și a metalotioneinelor, cel mai puternic inductor al acestor gene fiind AgNWs. Chiar dacă toate tipurile de nanomateriale au indus într-o oarecare măsură translocarea nucleară a factorului de transcripție NF- κ B, doar expunerea la AgNWs a indus expresia genică a mediatorilor proinflamatori selecționați. Răspunsul proinflamator indus de AgNWs a fost confirmat prin cuantificarea a 10 interleukine solubile din mediul celular. Rezultatele obținute susțin faptul că AgNWs induc efecte toxice mai pronunțate comparativ cu nanomaterialele sferice la aceleași doze.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu demonstrează că expunerea directă a modelului alveolar tetra-celular la diferite tipuri de nanomateriale induce răspunsuri biologice dependente de proprietățile fizice ale acestor nanomateriale. În cazul expunerii la AgNWs au fost observate efecte proinflamatorii importante începând cu cea mai mică doză de 50 ng/cm^2 , reprezentativă pentru o expunere acută în mediu profesional. Chiar dacă au fost evaluate și răspunsurile acute la o doză reprezentativă pentru o expunere pe toată durata vieții, scenarii cronice de expunere folosind doze mici sunt indiscutabil necesare pentru a evalua impactul asupra sănătății umane în urma expunerii la aceste nanomateriale.

Concluzii generale

Pe baza studiilor incluse în teza doctorală sunt furnizate informații valoroase privind aplicabilitatea modelelor celulare complexe în toxicologia respiratorie. Evaluarea efectelor biologice induse de particulele diesel și de nanomaterialele de argint a fost efectuată folosind sisteme și modele celulare care să reproducă expunerea respiratorie nativă. Evaluarea aplicabilității acestor modele a fost realizată prin folosirea unor sisteme de expunere de ultimă generație care permit expunerea directă a sistemului biologic la aerosolul de testat.

Cu toate că în ultimele decenii impactul expunerii la particulele diesel a fost intens studiat, mecanismul complet al acțiunii toxice nu este pe deplin înțeles. În mod tradițional, potențialul toxic al particulelor diesel a fost evaluat prin folosirea modelelor celulare simple și a modelelor animale. Deși aceste studii au furnizat informații importante, majoritatea efectelor au fost observate la doze extrem de mari, care erau adesea reprezentative pentru doza cumulată în timpul unei vieți. Cu toate că dozele utilizate în studiul 1 au fost de asemenea ridicate, ele sunt considerabil mai mici decât dozele raportate în literatura de specialitate. Studiul aduce informații suplimentare în ceea ce privește superioritatea modelelor celulare complexe. Efectele nocive rezultate în urma expunerii la particulele diesel au fost predictibile și în concordanță cu conceptul ierarhic al stresului oxidativ.

În al doilea studiu prezentat a fost testată capacitatea modelelor alveolare complexe de a dezvolta un răspuns biologic dependent de tipul de stimul. Această evaluarea a fost făcută prin testarea a trei nanomateriale de argint diferite ca formă și dimensiune. Nanomaterialele de argint sunt utilizate pe scară largă în industrie și medicină, oferind astfel un argument în selecția lor. Dintre cele trei tipuri de nanomateriale de argint testate, AgNWs au indus răspunsuri pro-inflamatorii importante, acestea fiind observate la o doză reprezentativă unei expuneri acute în mediu profesional. Aceste rezultate reafirmă contribuția majoră a proprietăților fizico-chimice în ceea ce privește toxicitatea nanomaterialelor.

Comparativ cu studiile toxicologice pe animale, unde ajustări majore nu pot fi realizate din cauza diferențelor inerente dintre specii, culturile celulare *in vitro* permit ajustări continue care să conducă în final la îndeplinirea cerințelor necesare pentru utilizarea ca modele în toxicologia respiratorie. Această versatilitate, combinată cu noi progrese în alte domenii, cum ar fi bio-ingineria, deschid perspective de testare adecvată și superioară a substanțelor toxice inhalabile în viitor.