

Untersuchungen zur Toxizität
unterschiedlicher Nanomaterialien auf
verschiedene Zelllinien, mesenchymale
Stammzellen und 3D-Gewebestrukturen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Stefanie Wagner

geboren am 08.05.1979, in Hofgeismar

2012

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: Prof. Dr. Cornelia Kasper
Department für Biotechnologie
Universität für Bodenkultur (BOKU)
Wien, Österreich

Tag der Promotion: 16.01.2012

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im November 2011

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper, Frau Prof. Dr. Cornelia Kasper und Herrn Prof. Dr. Detlef Bahnemann für die Möglichkeit am Institut für Technische Chemie meine Promotion anfertigen zu können und für die Bereitstellung des interessanten, hochaktuellen Themas.

Frau Prof. Dr. Cornelia Kasper und Herrn Prof. Dr. Detlef Bahnemann danke ich besonders für die tatkräftige Unterstützung und Förderung während der Promotion sowie den Möglichkeiten zur Teilnahme an zahlreichen Tagungen und Workshops.

Für die Bereitstellung der Abdominoplastik zur Isolation der mesenchymalen Stammzellen danke ich Frau Dr. Birgit Weyand (Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover).

Herrn Dr. Renat R. Khaydarov danke ich für die Bereitstellung der Silbernanopartikel (Institute of Nuclear Physics, Tashkent, Usbekistan) und Frau Dr. Hanan H. Mohammed für das Überlassen der synthetisierten Titandioxidnanopartikel (Institut für Technische Chemie).

Herrn Dr. Armin Bieser danke ich für die Hilfestellung und anregenden Diskussionen bei der Auswertung der ECIS-Spektren.

Niklas Möhle, Olaf Krischenowski und Frau Prof. Dr. Michaela Aufderheide danke ich für die Möglichkeit und Hilfestellung bei den Messungen mit dem Cultex[®]RFS.

Anne Christel danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der DLS-Messungen und Clarissa Baumanis für die REM-Aufnahmen.

Weiterhin danke ich allen Partnern des BMBF Projektes HelioClean (Projektnummer: 03X0069F) für die sehr gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen und Hilfestellungen.

Ich danke meinem Masteranden Jonathan Bloh, meiner Diplomandin Helena Dillmann, meinen Schwerpunktpraktikanten Dag Heinemann, Elisabeth Bludau und Caroline Schneider-Barthold für ihre Arbeiten und damit zu meiner Arbeit geleisteten Beiträge.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Technische Chemie für die sehr gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit am Institut. Ganz besonders den Mitarbeitern der Zellkultur, Sonja Kress, Antonina Lavrentieva, Anne Neumann, Rebecca Bongartz.

Ich danke Class Haake, Johanna Walter und Estabraq Abdulkarim für die sehr angenehme und entspannte Büroatmosphäre. Ganz besonders danke ich Johanna Walter für die aufbauenden Worte, die Motivation und das sehr gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung während des gesamten Zeitraumes der Arbeit, besonders meinem Opa August Hügel, meiner Mutter Heike Wagner, meiner Tante Jutta Hügel, Nadine Seisselberg, Fabian Schulz, Elias Tauchert und Anne Neumann für die motivierenden Worte und die Geduld.

Inhalt

1	Einleitung	5
2	Aufgabenstellung	7
3	Theoretische Grundlagen	8
3.1	Nanotechnologie	8
3.2	Anwendungen der untersuchten Partikel	10
3.2.1	Titandioxid	10
3.2.2	Silber	11
3.2.3	Zinkoxid	12
3.3	Nanotoxikologie	12
3.4	Umweltbelastungen durch Nanomaterialien	16
3.5	Gesundheitsrisiken durch Nanomaterialien	18
3.5.1	<i>In-vitro</i> -Studien zur Toxizität von TiO ₂ -, ZnO- und Silber-Nanopartikeln	19
3.5.2	<i>in vivo</i> -Studien Zur Toxizität von TiO ₂ -, ZnO- und Silber-Nanopartikeln	22
3.6	Zellbasierte Assay	24
3.6.1	Verwendung von 3D-Kulturen	24
3.6.2	Impedanzmessungen adhärenter Zellen	30
3.6.2.1	Grundlagen der Impedanzspektroskopie	30
3.6.2.2	Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing	33
3.6.3	Zelltod	38
4	Experimenteller Teil	42
4.1	Auswahl der Zelllinien	42
4.2	Untersuchte Partikel	43
4.3	Bestimmung der Partikelgröße	44
4.4	Viabilität	48

4.4.1	Silber	48
4.4.2	Zinkoxid	53
4.4.3	Titandioxid	62
4.4.4	Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing	68
4.4.5	Vergleich Expositionsroueten (Aerosol/Suspension)	78
4.4.6	Vergleich 3D-Mikrogewebe mit 2D-Zellkulturen	85
4.5	Bestimmung von ROS	95
4.6	Bestimmung des Zelltodes.....	97
4.6.1	LDH-Test	97
4.6.2	Caspase 3/7-Aktivität	104
4.6.3	Durchflusszytometrische Methoden.....	106
4.7	DNA-Schädigung	108
4.7.1	Komet-Assay.....	108
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	114
6	Anhang	120
6.1	Statistik	120
6.2	Verwendete Zellen.....	120
6.2.1	Kultivierung von Zellen	120
6.2.2	Isolation von Zellen.....	126
6.2.2.1	Nabelschnur	126
6.2.2.2	Fettgewebe	126
6.2.3	Kryokonservierung von Zellen.....	127
6.3	Dynamic Light Scattering.....	127
6.4	Rasterlektronenmikroskopie	128
6.5	MTT.....	129
6.6	Dosis-Wirkungs-Kurven.....	131
6.7	Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing.....	133

6.8	Cultex [®] Radial Flow System	134
6.9	3D-Kulturen	136
6.9.1	Hanging-Drop-Technik	136
6.9.2	Oxygen Bisensor System	137
6.10	Bestimmung von ROS	138
6.11	LDH-Freisetzung	138
6.12	Caspase3/7-Aktivität	140
6.13	Durchflusszytometrische Methoden	141
6.14	Komet-Assay	142
6.15	Abkürzungsverzeichnis	145
6.16	Geräte und Laborausstattung	150
6.17	Verbrauchsmaterialien	151
6.18	Reagenzien und Kits	153
7	Literaturverzeichnis.....	156

Abbildungsverzeichnis

3-1: Schema: Lebenszyklus von Nanomaterialien (adaptiert aus [63]).....	13
3-2: Wege zur Risikobewertung von Nanomaterialien.	14
3-3: Biokinetik von Nanopartikeln, Darstellung bereits nachgewiesener sowie hypothetischer Translokationswege, Akkumulation und Retention [136].....	19
3-4: Schematische Darstellung der Sphäroid Bildung [177] mit Aggregationsphase (A), Verzögerungsphase (B), Sphäroidverdichtungsphase (C).....	26
3-5: Schematische Darstellung eines Tumorsphäroids [177].....	26
3-6: Methoden Zur Herstellung multizellulärer Sphäroide	29
3-7: Darstellung der komplexen Impedanz $ Z $ in einer Gausschen Zahlenebene.....	32
3-8: Schematische Darstellung des ECIS-Messprinzips. Arbeits- und Gegenelektrode sind zur Messung der Impedanz über das Medium verbunden [198].	34
3-9: Schematische Darstellung der mit ECIS möglichen gemessenen Parameter [200].	35
3-10: Impedanzspektrum einer ECIS-Elektrode mit und ohne Zellen. Die durchgezogene Linie repräsentiert die angepasste Übertragungsfunktion [198].	37
3-11: Schematische Darstellung der Ersatzschaltung einer Zellschicht auf Goldelektroden basierend auf dem Model von Giaever and Keese (1991). Mit: R_{bulk} = Widerstand der Elektrolytlösung, α = Impedanzelement zur Beschreibung des frequenzabhängigen Impedanzbeitrags aus dem Zell-Substrat-Kontakt, C_m = Kapazität der Plasmamembran, R_m = Membranwiderstand, CPE = konstantes Phasenelement.....	37
3-12: Vergleich von Apoptose und Nekrose.	41
4-1: DLS-Messungen von Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm in Wasser (A) und in einer Konzentration von 10 ppm in DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S (B).	45
4-2: DLS-Messungen von ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm in Wasser (A) und in einer Konzentration von 50 ppm in DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S (B).	46
4-3: REM-Aufnahmen von ZnO Partikeln (A), ZnO Partikeln dotiert mit 2 % Co (B), dotiert mit 2 % Mn (C), dotiert mit 3 % Ag (D), dotiert mit 5 % Ag (E), dotiert mit 3 % Sb (F) and dotiert mit 7 % Al (G).....	47

- 4-4: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet. 49
- 4-5: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen kultiviert mit Silber-Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet. 49
- 4-6: Dosis-Wirkungs-Kurven, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D) kultiviert mit Silbernanopartikeln und Silberionen. 50
- 4-7: Dosis-Wirkungs-Kurven von uc-MS(A) und ad-MS(B) kultiviert mit Silbernanopartikeln und Silberionen. 52
- 4-8: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet. 54
- 4-9: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen kultiviert mit Zn^{2+} -Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet. 54
- 4-10: Dosis-Wirkungs-Kurven von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E), CACO-2-Zellen (F) kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln und Zn^{2+} -Ionen. 55
- 4-11: Dosis-Wirkungs-Kurven von uc-MS(A), ad-MS(B) kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln und Zn^{2+} -Ionen. 56
- 4-12: Dosis-Wirkungs-Kurven von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E), CACO-2-Zellen (F) kultiviert mit verschieden dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn^{2+} -Ionen. 57
- 4-13: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E), CACO-2-Zellen (F) kultiviert mit TiO_2 -Partikeln (2 nm) in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet. 63

4-14: Dosis-Wirkungs-Kurve, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit TiO ₂ -Nanopartikeln, (A) und Dosis-Wirkungs-Kurven von NIH-3T3-, A-549-, HEP G2-, PC-12-, HELA- und CACO-2-Zellen kultiviert mit TiO ₂ -Nanopartikeln (B).....	64
4-15: Dosis-Wirkungskurven, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C) und CACO-2-Zellen (D) kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ / 1,6 %.....	66
4-16: ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm über einen Zeitraum von 85 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium und zellfreien Elektroden, als Referenz bei einer Frequenz von 4000 Hz.	69
4-17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A-549-Zellen auf einer Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing Elektrode (8W1E) in normalen Kulturmedium (A) und 48 h nach Zugabe von Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm (B).	70
4-18: ECIS-Spektrum von HELA-, und CACO-2-Zellen kultiviert mit ZnO- und mit Mn (2 %) und Co (2 %) dotierten ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm über einen Zeitraum von 63 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium bei einer Frequenz von 4000 Hz.	71
4-19: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer ECIS Elektrode (8W1E) besiedelt mit HELA-Zellen in Kulturmedium (A) 48 h nach Kultivierung mit 50 ppm ZnO-Partikeln im Medium (B) und 48 h nach Kultivierung mit 2 % Mn dotierten ZnO-Partikeln im Medium (C).	72
4-20: ECIS-Spektrum von HEP-G2-, und NIH-3T3-Zellen kultiviert mit ZnO- und mit Mn (2 %) und Co (2 %) dotierten ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm über einen Zeitraum von 95 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium bei einer Frequenz von 4000 Hz.	72
4-21: Schema der Messung der Impedanz bei niedrigen Frequenzen (62,5- 8.000 Hz) (A) und bei Messung der Kapazität bei hohen Frequenzen (24.000 -60.000 Hz) (B).	73
4-22: ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO- und mit Al (7 %) und Ag (5 %) dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm über einen Zeitraum von 125 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium bei einer Frequenz von 4.000 Hz.	75
4-23: ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO- und mit Al (7 %) und Ag (5 %) dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm über einen Zeitraum von 125 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium bei einer Frequenz von 64.000 Hz.	75
4-24: ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert verschiedenen Konzentrationen an Silbernanopartikeln und Silberionen und in Normalmedium über einen Zeitraum von 160 h bei 4.000 Hz.....	76

4-25: ECIS-Messungen von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn ²⁺ -Ionen über einen Zeitraum von 180 h bei einer Frequenz von 8.000 Hz, ohne Elektroporation (A), mit Elektroporation (B) und beide Messungen zusammengefasst (C).	78
4-26: REM-Aufnahmen von ZnO-Partikeln (A) nach dem Pressen (B) und nach dem Pressen und Abschaben (C).	79
4-27: Ergebnisse der Messungen von A-549-Zellen mit dem Cultex [®] Radial Flow System mit 2 Modulen. Die Zellen in den Transwells des Modul 1 wurden mit dem ZnO-Nanopartikel-Aerosol benebelt, die Zellen in Modul 2 wurden mit Raumluft behandelt. Die Viabilitäten sind auf 1 normiert (Zellen im Inkubator in Normalmedium = 1). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler.	80
4-28: Viabilitäten von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln als Aerosol mit dem Cultex [®] Radial Flow System in Abhängigkeit der Benebelungszeit und der daraus resultierenden Masse an Partikeln. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler.	81
4-29: Dosis-Wirkungs-Kurven, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO Nanopartikeln als Aerosol und als Suspension. Für die Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurve der Partikel als Aerosol wurden 2 Formeln angewandt: ZnO Aerosol (theor) = $y = 1 - (1/(1+e^{-bx}))$ [Formel 6.1] und ZnO Aerosol (theor_1) = $y = ae^{-bx}$ [Formel 6.2]	82
4-30: LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln als Aerosol (Modul 1), mit Luft (Modul 2) von Zellen kultiviert in Normalmedium (Kontrolle Inkubator) über einen Zeitraum von 30h. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler.....	83
4-31: LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert mit unterschiedlichen Konzentrationen an ZnO-Nanopartikeln zugeführt als Suspension im Medium (A) und als Aerosol (B). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler.....	84
4-32: Viabilitäten von 3D-strukturierten, über die Hanging-Drop-Methode hergestellten A-549-Zellen in Abhängigkeit verschiedener Ausgangszellzahlen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler.	86
4-33: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HEP-G2-Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A), als Hanging-Drop (B), (C), und auf einer silikonbeschichteten Oberfläche (D).	87
4-34: Lichtmikroskopische Aufnahmen von CACO-2-Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A), auf einer mit Silikon beschichteten Oberfläche (B), als Hanging-Drop (D) und fluoreszenz eingefärbte CACO-2-Zellen kultiviert als Hanging-Drop (C).	88
4-35: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A-549-Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A) und als Hanging-Drop nach 24 h (B) und nach 48 h (C).	88

4-36: Lichtmikroskopische Aufnahmen von NIH-3T3 Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A) und als Hanging-Drop (B) (C).	89
4-37: Viabilitäten von 3D-strukturierten, über die Hanging-Drop-Methode hergestellten und mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen kultivierten A-549 (A), NIH-3T3 (B), HEP-G2 (C), CACO-2 (D)-Zellen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.	90
4-38: Dosis-Wirkungs-Kurven sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von HEP-G2-Zellen als 3D ₁ und 2D-Kultur kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen.	91
4-39: Dosis-Wirkungskurven sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von CACO-2-Zellen als 3D ₁ und 2D-Kultur kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen.	92
4-40: Viabilitäten von 2D- und auf einer silikonbeschichteten Oberfläche hergestellten 3D-Kulturen ₂ von A-549 (A), NIH-3T3 (B), HEP-G2 (C), CACO-2 (D) kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.	93
4-41: Dosis-Wirkungs-Kurven, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von, über silikonbeschichtete Platten hergestellten 3D-Kulturen ₂ von A-549 (A)-, NIH-3T3 (B)-, HEP-G2 (C)- und CACO-2 (D)-Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen.	94
4-42: Lichtmikroskopische Aufnahmen des, mit dem Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Kit gefärbten NIH-3T3-Zellen kultiviert in normalen Medium (A) mit <i>tert</i> -butylhydroperoxid, als Positivkontrolle (B) mit 10 ppm Ag^+ -Ionen im Medium (C) mit 10 ppm Silbernanopartikeln im Medium (D) mit 50 ppm Zn^{2+} -Ionen im Medium (E) mit 50 ppm ZnO-Nanopartikeln im Medium (F) und mit 500 ppm TiO_2 -Partikeln (2 nm) im Medium.	96
4-43: Freisetzung von LDH im Kulturmedium von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm und 10 ppm und mit ZnO Mikropartikeln in einer Konzentration von 50 ppm als Referenz über einen Zeitraum von 6-55 h. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.	98
4-44: Freisetzung von LDH im Kulturmedium von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm und 5 ppm und mit Silber-Mikropartikeln in einer Konzentration von 10 ppm als Referenz über einen Zeitraum von 6-55 h. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.	99
4-45: Freisetzung von LDH im Kulturmedium, relativ zur Kontrolle (Zellen kultiviert in Normalmedium) von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E) und CACO-2-Zellen (F) kultiviert über 30 h mit verschiedenen dotierten ZnO-Nanopartikeln, sowie undotierten ZnO Partikeln und Zn^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm im Medium. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.	100

4-46: LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert mit Medium mit 10 und 5 ppm Silbernanopartikeln und mit 10 ppm Ag ⁺ -Ionen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler.	102
4-47: LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert mit Medium mit 10 und 50 ppm Silbernanopartikeln und mit 50 ppm Zn ²⁺ -Ionen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler.	103
4-48: Caspase 3/7 Aktivität von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 und 5 ppm und mit Silberionen in einer Konzentration von 50 ppm im Vergleich zu Zellen kultiviert in Normalmedium über einen Kultivierungszeitraum von 20 h.	105
4-49: Caspase 3/7 Aktivität von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 und 10 ppm und mit Zn ²⁺ -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm im Vergleich zu Zellen kultiviert in Normalmedium über einen Kultivierungszeitraum von 20 h.	105
4-50: Durchflusszytometrische Messungen von A-549-Zellen kultiviert in Medium (A) und mit 15 ppm Silbernanopartikel im Medium nach 24 h (B).	107
4-51: Durchflusszytometrische Messungen von A-549-Zellen kultiviert in Medium (A) und mit 20 ppm ZnO-Nanopartikel im Medium nach 24 h (B).	108
4-52: Einteilung der Kometen in die unterschiedliche Klassen: ungeschädigte Zellen, Klasse 0 (A), Klasse 1 (B), Klasse 2 (C), Klasse 3 (D), Klasse 4 (E) und am stärksten geschädigte Zellen, Klasse 5 (F) [223].	109
4-53: Komet-Assay A-549-Zellen in Normalmedium.	110
4-54: Komet-Assay von A-549-Zellen kultiviert mit 50 ppm ZnO Nanopartikeln.	111
4-55: Komet-Assay von A-549-Zellen kultiviert mit Zn ²⁺ -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm.	111
4-56: Komet-Assay von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm.	112
4-57: Komet-Assay von A-549-Zellen kultiviert mit Ag ⁺ -Ionen in einer Konzentration von 10 ppm.	112
6-1: Reduktion von MTT zu Formazan.	130
6-2: Foto eines Cultex [®] Radial Flow Systems (A) und eines Moduls für 3 Transwells (B).	135
6-3: Terasaki [®] -Platte (A), Schematische Darstellung zur Herstellung von Hanging-Drop-Kulturen mit der Terasaki-Platte (B).	136
6-4: Spaltung von Carboxy-H2DCFDA über zelluläre Esterasen zu Carboxy-DCFH und anschließende Umsetzung von Carboxy-DCFH durch ROS zu Carboxy-DCF.	138

6-5: Reduktion von Resazurin zu Resorufin durch die Freisetzung von LDH in Anwesenheit des Katalysators Diaphorase.	139
6-6: Spaltung des nicht fluoreszierenden Caspase Substrat Z-DEVD-R110 zu dem fluoreszierendem Rhodamin R-110 durch Caspase3/7.....	140
6-7: Schematische Darstellung von mit AnnexinV und Propidiumiodid gefärbten Zellen und deren Bezeichnung.....	141

Tabellenverzeichnis

3-1: Übersicht über einige Anwendungen der Nanotechnologie in ausgewählten Industriezweigen	9
4-1: Verwendete Zellen und deren Ursprung.	43
4-2: Hydrodynamische Durchmesser [nm] der Silbernanopartikel in einer Konzentration von 10 ppm in den angegebenen Lösungen.	45
4-3: Hydrodynamische Durchmesser und über REM bestimmte Partikelgrößen der undotierten ZnO-, sowie der dotierten ZnO-Nanopartikel (angegeben in nm) in einer Konzentration von 50 ppm in den angegebenen Lösungen.	46
4-4: NOAEC, IC ₅₀ , und TLC für A-549-, NIH-3T3-, HEP-G2- und PC-12-Zellen kultiviert mit Silber-Nanopartikeln und Silberionen.	51
4-5: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von mesenchymalen Stammzellen kultiviert mit Silbernanopartikeln und Silberionen.	52
4-6: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von mesenchymalen Stammzellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen.	56
4-7: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen.	59
4-8: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen.	60
4-9: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von HEP-G2-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen.	60
4-10: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von PC-12-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen.	60
4-11: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von HELA-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen.	61
4-12: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von CACO-2-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn ²⁺ -Ionen.	61
4-13: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von A-549-, NIH-3T3-, HEP-G2-, PC-12-, HELA-, und CACO-2-Zellen kultiviert mit TiO ₂ -Nanopartikeln (2 nm).	64

4-14: NOAEC, IC ₅₀ , TLC von A-549-Zellen kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ / 1,6 % .	66
Tabelle 4-15: NOAEC, IC ₅₀ , TLC von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ / 1,6 % .	66
4-16: NOAEC, IC ₅₀ , TLC von HEP-G2-Zellen kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ / 1,6 % .	67
4-17: NOAEC, IC ₅₀ , TLC von CACO-2-Zellen kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ / 1,6 % .	67
4-18: NOAEC, IC ₅₀ und TLC für A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln als Aerosol und als Suspension.	83
4-19: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von HEP-G2-Zellen als 2D und 3D-Kultur ₁ kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn ²⁺ -Ionen	91
4-20: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von CACO-2-Zellen als 2D und 3D-Kultur ₁ kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn ²⁺ -Ionen.	92
4-21: NOAEC, IC ₅₀ und TLC von, über silikonbeschichtete Platten hergestellten 3D-Kulturen ₂ von A-549-, NIH-3T3-, HEP-G2- und CACO-2-Zellen.	94
6-1: Verwendete Zelllinien.	120
6-2: Kulturmedienzusammensetzung der verwendeten Zellen.	121
6-3: Verwendete Medien und Puffer und ihre Zusammensetzung.	122
6-4: Zusammensetzung von DMEM	122
6-5: Zusammensetzung von MEM	123
6-6: Zusammensetzung von MEM alpha	124
6-7: Anzahl der Ausplattierten Zellen pro Well einer 96-Wellplatte.	130

Zusammenfassung

Zurzeit werden eine Vielzahl unterschiedlicher Nanomaterialien mit verschiedenen Eigenschaften synthetisiert, die für ihren möglichen Einsatz in vielen Industriezweigen getestet werden. Da mehr und mehr nanotechnologische Produkte für Konsumenten erhältlich sind, kommen Bedenken bezüglich der Harmlosigkeit und möglichen toxischen Potentiale solcher Produkte auf. Aus diesem Grund ist ein neues wissenschaftliches Teilgebiet der Nanotechnologie entstanden, das Nanotoxikologie genannt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden Silber-, Zinkoxid- und Titandioxidnanopartikel, sowie Ag^+ - und Zn^{2+} -Ionen auf ihre toxische Wirkung auf unterschiedliche Zelllinien und Stammzellen, als auch auf über zwei verschiedene Methoden kultivierte 3D-Gewebestrukturen getestet. Die Bestimmung der Viabilität der Zellen nach Kultivierung mit Partikeln und Ionen ergab, dass Silber- und ZnO-Nanopartikel einen erheblichen toxischen Effekt auf die Zellen hatten, während Titandioxidnanopartikel als nicht-toxisch eingestuft werden konnten. Die Testung der Partikel und Ionen mit den Gewebestrukturen ergab, dass große Sphäroide mit einem Durchmesser von 1000 μm wesentlich unempfindlicher gegenüber der untersuchten Partikel und Ionen waren, als kleinere Sphäroide mit einem Durchmesser zwischen 250- 550 μm , die sich eher wie ihre 2D-Analoga verhielten. Nanopartikel, die den Zellen als Aerosol, anstatt im Medium suspendiert vorliegend, zugeführt wurden hatten in wesentlich geringeren Konzentrationen einen toxischen Effekt. Die Bestimmung von auf die Zellen ausgelösten oxidativen Stress durch Kultivierung mit Partikeln ergab, dass sowohl Titandioxid, -Zinkoxid- und Silberpartikel als auch die Zn^{2+} -Ionen oxidativen Stress auslösten, die Silberionen jedoch nicht. Bestimmungen der Art des Zelltodes über LDH-Freisetzung, Caspase3/7-Aktivität, sowie durchflusszytometrische Messungen von mit FITC-AnnexinV und Propidiumiodid gefärbten Zellen zeigten gute Übereinstimmungen. Die mit Silbernanopartikel kultivierten Zellen wiesen eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen auf, wohingegen die mit Zinkoxidnanopartikeln sowie mit Ag^+ - und Zn^{2+} -Ionen kultivierten Zellen zum größten Teil nekrotisch waren. Die Bestimmung der DNA-Schädigung über den Komet-Assay ergab, dass

Zellen kultiviert mit Silber- und Zinkionen und ZnO-Partikel im Gegensatz zu mit Silbernanopartikel kultivierten Zellen DNA-Schäden aufwiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Silberionen selbst den toxischen Effekt auf die untersuchten Zellen auslösten und dieser nicht von herausgelösten Ag^+ -Ionen verursacht wurde, da die Art des hervorgerufenen Zelltodes von Partikeln und Ionen unterschiedlich sind. Da ZnO-Partikel, sowie Zn^{2+} -Ionen Nekrose auslösen konnte der toxische Effekt der Zinkoxidnanopartikel nicht eindeutig den Partikeln zugeschrieben werden.

Schlagworte: Zinkoxidnanopartikel, Titandioxidnanopartikel, Silbernanopartikel, Zytotoxizität, 3D-Gewebestrukturen, ECIS, Apoptose, Nekrose

Abstract

Currently, a wide range of nanoparticles of different types and different properties are synthesized, which need to be examined concerning their suitability for various industrial applications. As a constantly increasing amount of technological products become available to the customers, concerns have been raised regarding the harm and the potential health risk of these materials. For this reason, a new subdiscipline of nanotechnology namely nanotoxicology emerged.

In this work silver-, zinc oxide-, and titanium dioxide nanoparticles as well as Ag^+ and Zn^{2+} -ions have been examined regarding their toxic effect on different cell lines and stem cells as well as on 3D-tissue-structures. Determination of the cell viability after cultivation with particles and ions revealed a considerable toxic effect of silver- and zinc oxide particles, whereas the titanium dioxide particles were non-toxic.

Cultivation in 3D-structures revealed an influence on sensitivity depending on sphere diameter. The 3D-structures with diameters about 1000 μm were significantly more immune to the tested particles and ions than the 3D-structures with diameters about 250-550 μm , which behave rather like their 2D-analogues. Nanoparticles applied the cells as aerosol instead of suspended in the medium were in considerably lower concentrations toxic. The oxidative stress determination of cells exposed to particles showed that as well titanium dioxide-, zinc oxide- silver nanoparticles as Zn^{2+} -ions caused oxidative stress contrary to the silver ions. Identification of cell death by LDH-release, caspase3/7 activity as well as cytometric flow measurements of cells labeled with FITC-AnnexinV and propidium iodide showed good correlations to each other. Cells exposed to silver nanoparticles showed a high number of apoptotic cells, whereas cells cultivated with zinc oxide particles, Ag^+ - and Zn^{2+} -ions were mostly necrotic. Determination of DNA-damage via the Comet-Assay showed that cells cultivated with silver- and zinc ions as well as zinc oxide nanoparticles caused DNA-damage contrary to silver nanoparticles.

It could be shown that silver ions have a toxic effect on the tested cells. This effect is not related to solved Ag^+ -ions as the kind of cell death caused by particles differ from that caused by ions. Zinc oxide particles as well as Zn^{2+} -ions caused necrosis. For this reason it was not possible to definitively attribute the toxic effect of the ZnO-particles to the particles themselves.

keywords: zinc oxide nanoparticles, titanium dioxide nanoparticles, silver nanoparticles, cytotoxicity, 3D-tissue structures, ECIS, apoptosis, necrosis

1 Einleitung

Nanomaterialien, Teilchen mit einem Durchmesser unterhalb von 100 nm gewinnen immer mehr an Bedeutung. Partikel, die in ihrer Nanoform vorliegen, verändern ihre physikalischen, optischen, magnetischen, elektrischen, sowie chemischen Eigenschaften und haben bezogen auf ihr Volumen eine extrem hohe Oberfläche. Diese Materialeigenschaften lassen sich gezielt für die unterschiedlichsten Anwendungen nutzen. Verschiedene Nanomaterialien werden schon in fast allen Industriezweigen eingesetzt. Die Anwendung von nanostrukturierten Materialien im medizintechnischen Bereich ist in den letzten Jahren immer bedeutender geworden. So können Materialien als Träger für Wirkstoffe eingesetzt werden, um diese im Körper ortsgenau zu transportieren (*target delivery*). Titandioxidnanopartikel sind die am häufigsten eingesetzten Nanomaterialien. Sie werden bereits Sonnencremes als UV Adsorber beigemischt. Aufgrund ihrer photokatalytischen Aktivität finden Titandioxidnanomaterialien Anwendung im Bereich der selbstreinigenden Oberflächen und der Reinigung von Luft und Abwasser. Zinkoxidmaterialien finden ebenfalls häufige Verwendung, in der Textilindustrie werden sie als antimikrobieller und geruchshemmender Zusatz benutzt. Aufgrund der guten elektrischen Leitfähigkeit und ihrer Transparenz können Zinkoxidpartikel als Frontkontakt für Solarzellen eingesetzt werden. Die Anwendung von Silbernanopartikel besteht hauptsächlich im medizintechnischen Bereich, wo sie als antibakterielle Beschichtungen für Instrumente und Implantatmaterialien eingesetzt werden.

Die Häufigkeit der eingesetzten Materialien macht deutlich, dass eine Bewertung des Gesundheitsrisikos bei Einsatz dieser Materialien notwendig ist. In den letzten Jahren hat sich deshalb ein neues Forschungsgebiet entwickelt, was sich ausschließlich mit den Umwelteinflüssen von Nanomaterialien und der Gefährdung von Organismen beschäftigt sowie mit den Wechselwirkungen solcher Materialien mit biologischen und ökologischen Systemen und der Vermeidung und Minimierung von durch Nanomaterialien hervorgerufenen negativen Effekten. Die Bewertung der Toxizität von Nanomaterialien erweist sich, durch die Eigenschaftsänderungen der Partikel im Vergleich zu ihrem Bulkmaterial als schwierig. Da die Nanotoxikologie ein sehr

junges Forschungsgebiet ist, gibt es bisher keine standardisierten Tests zur Bewertung dieser Materialien, was einen Vergleich der publizierten Ergebnisse erschwert.

Durch die Testung solcher Materialien mit Zelllinien als Testsysteme kann nur begrenzt Aussage über die toxische Wirkung auf Mensch und Tier gemacht werden. Um Tierversuche zu reduzieren kommen vermehrt 3D-Gewebestrukturen, zur Testung von Wirkstoffen und Nanomaterialien zum Einsatz. Diese 3D-Strukturen können über verschiedenen Methoden aus nahezu allen Zellen hergestellt werden und spiegeln die *in-vivo* herrschenden Bedingungen wesentlich besser wider, als ihre 2D-Zellkulturen.

2 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Toxizität von Silber, Titandioxid- und unterschiedlich dotierten Zinkoxidnanopartikel, sowie Silber- und Zink-Ionen auf unterschiedliche Säugerzelllinien, Stammzellen, sowie auf Organmodelle getestet werden. Das Ziel ist es, Effekte von Nanomaterialien auf biologische Systeme unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen zu untersuchen und zu beschreiben.

Die als Testsysteme dienenden Sphäroide sollen über zwei Methoden hergestellt werden: die Hanging-Drop-Technik und über, mit einem Fluorophor beschichtete Platten. Die, für die Untersuchung verwendeten mesenchymalen Stammzellen werden aus Nabelschnur (uc-MSC), bzw. Fettgewebe (ad-MSC) isoliert. Die Nanopartikel sollen den Zellen über direkte Zugabe in das Kulturmedium zugeführt werden. Um den Einfluss des Kulturmediums auf die Partikelgröße zu bestimmen, sollen *Dynamic Light Scattering* (DLS) Messungen mit im Medium und in Wasser suspendierten Partikeln durchgeführt, sowie REM-Aufnahmen der Partikel gemacht werden. Aus den, über den MTT-Test ermittelten Viabilitäten sollen Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und *No Observed Adverse Effect Concentration* (NOAEC), *Inhibitory Concentration 50 %* (IC₅₀) und *Total Lethal Concentration* (TLC) berechnet werden. Um den Einfluss der Expositionsrouten auf den toxischen Effekt der Partikel zu bestimmen, sind Messungen mit dem Cultex[®] Radial Flow System geplant, bei dem die Partikel den Zellen als Aerosol, und nicht im Medium suspendiert zugeführt werden. Des Weiteren sollen unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Zelltodes angewandt werden: 1.) Die Freisetzung an LDH, im mit Partikeln kultivierten Zellkulturüberstand, welche Aufschluss über die Membranintegrität der Zellen und somit über nekrotische Zellen gibt, 2.) Die Bestimmung der Caspase3/7-Aktivität von Zellen, welche auf Apoptose hindeutet, 3.) Durchflusszytometrische Messungen von mit FITC-AnnexinV und Propidiumiodid gefärbten Zellen, welche den prozentualen Anteil an lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen einer Zellkultur detektieren. Es ist ebenfalls eine Bestimmung der ROS und somit, des auf die Zelle ausgeübten oxidativen Stresses, geplant sowie die Bestimmung der DNA-Schädigung, der mit Partikeln und Ionen kultivierten Zellen über den alkalischen Komet-Assay.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Nanotechnologie

Die Nanotechnologie beschäftigt sich mit Materialien die einen Durchmesser unterhalb von 100 nm haben [1]. Aufgrund seines im Jahre 1959 gehaltenen Vortrags: *There's Plenty of Room at the Bottom*, auf der Jahresversammlung der *American Physical Society* am *California Institute of Technology* (Caltech), wird Richard Feynman¹ als Vater der Nanotechnologie bezeichnet [2]. Der eigentliche Begriff Nanotechnologie wurde jedoch erstmals 1974 von Norio Taniguchi² gebraucht [3].

Durch die Nanotechnologie können Materialeigenschaften und Materialfunktionen gezielt beeinflusst werden, da Partikel, die in Nanoform vorliegen, ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften im Vergleich zum makroskopischen Material gravierend ändern [4]. Nanomaterialien besitzen bezogen auf ihr Volumen eine extrem hohe Oberfläche. In der Größenordnung von Nanopartikeln werden neuartige Effekte, Eigenschaften und Funktionen beobachtet. Die mechanischen, optischen, magnetischen, elektrischen und chemischen Eigenschaften hängen in diesem Bereich nicht mehr allein von der Natur des Ausgangsmaterials ab, sondern in hohem Maße von der Größe und Gestalt des Partikels. Es entstehen neue Phänomene, die nicht mehr mit den Gesetzen der klassischen Physik, die für Festkörper im makroskopischen Bereich (200 - 2.000 nm) gelten, zu erklären sind. Teilweise spielen bei sehr kleinen Nanopartikeln Masseneffekt und Quanteneffekte eine Rolle.

Nanopartikel können über die *Top-down*- und die *Bottom-up*-Methode hergestellt werden [5]. Bei dem *Top-down*-Prozess werden nanoskalige Materialien durch Verkleinerung eines beliebigen Ausgangsmaterials hergestellt, wie z.B. bei der Laserablation. Diese werden dann zu komplexeren Systemen zusammengebaut oder anderen Materialien zur Modifizierung derer Eigenschaften beigemischt. Dieser Ansatz dominiert in der Physik und physikalischen Technik. Der *Top-down*-Ansatz stellt für die Erzeugung von Nanopartikeln einen recht energieaufwändigen, Abfall produzierenden und Ressourcen verschwendenden Prozess dar [5], [6].

¹ Richard Phillips Feynman (11.05.1918 - 15.02.1988), amerikanischer Physiker, erhielt 1965 den Nobelpreis für Physik

² Norio Taniguchi (1912-1999), Professor an der Universität in Tokyo

Bei dem *Bottom-up*-Prozess hingegen werden nanostrukturierte Materialien durch das Zusammenfügen von Atomen bzw. Molekülen hergestellt. Dieser Ansatz wird in der Chemie und Biologie angewandt. Einer der daraus resultierenden und vielversprechendsten Ansätze ist das Wachstum durch Selbstorganisation [7], [8]. In Anlehnung an die Natur versucht man auf diesem Wege effizient neuartige Materialien und Werkstoffe herzustellen. Die Materialien werden meistens durch Gasphasenabscheidung oder Kristallisation aus Lösungen gewonnen. Typische Beispiele von Materialien, die über den *Bottom-up*-Prozess hergestellt werden, sind *Carbon Nanotubes* und nanokristalline Zeolithe [9], [10]. Der *Bottom-up*-Prozess und die Selbstorganisation lassen sich in nahezu jedem Maßstab nutzen, was diesen Prozess zu einer äußerst leistungsfähigen Methode macht.

Potentiale für die Anwendung der Nanotechnologie bestehen in fast allen Industriezweigen (siehe Tabelle 3-1) [11], [12].

Tabelle 3-1: Übersicht über einige Anwendungen der Nanotechnologie in ausgewählten Industriezweigen

Industriezweig	Anwendungen
Chemie	Lacke [13], Katalysatoren [14], [15], Wasserstoffspeicher [16]
Automobilbau	Reifenfüllstoffe, Antireflexschichten [17], kratzfeste Lacke, Brennstoffzellen, Kraftstoffzusatz
Optik	weiße LED, OLED, Ultrapräzisionsoptiken, Quantenpunktlaser [18], photonische Kristalle
Medizintechnik und Gesundheit	Implantatmaterialien [19], [20], <i>drug delivery</i> , [21], [22], <i>Functional Foods</i> [23], Kosmetikartikel, Fluoreszenz-Label [24], Detektion von Pathogenen [25] und Proteinen [26], Hyperthermie [27], antibakterielle Oberflächen [13]
Umwelttechnik	Abwasserbehandlung [28], Abgasbehandlung, Solarenergie [29], [30]
Informations- und Kommunikationstechnik	Prozessoren [31]

3.2 Anwendungen der untersuchten Partikel

In der vorliegenden Arbeit werden mögliche zytotoxische Eigenschaften von Titandioxidpartikeln, Zinkoxidpartikel und Silberpartikeln untersucht, weshalb im folgenden Abschnitt auf die Anwendungen dieser Partikel genauer eingegangen wird.

3.2.1 Titandioxid

Titandioxid ist aufgrund seiner hohen Brechungszahl das bedeutendste Weißpigment und findet Anwendung in der Farb-, Kunststoff- und Papierindustrie [32]. Als Pigment wird meist die Rutilstruktur benutzt, da diese einen höheren Brechungsindex als die Anatas- und Brookitstruktur besitzt (Anatas: 2,55; Rutil: 2,75) und die geringste photokatalytische Aktivität aufweist [33]. Weiterhin wird TiO_2 als Trübungsmittel für Emaille sowie in der Elektro-Industrie für den Bau von Kondensatoren genutzt, wo es als Dielektrikum eingesetzt wird [34]. Weitere Anwendungsbereiche von Titandioxid sind mittlerweile auch Arznei- und Lebensmittelverpackungen. Es wird zudem in Kosmetikartikeln, wie Sonnencreme und Zahnpasta verwendet. TiO_2 hat in den letzten Jahren im Bereich der Nanotechnologie stark an Bedeutung gewonnen.

Durch die photokatalytische Aktivität wird Titandioxid im Bereich der selbstreinigenden Oberflächen angewandt. Darüber hinaus sorgt die hydrophile Eigenschaft der mit TiO_2 beschichteten Oberflächen dafür, dass Wassertropfen „abperlen“. Die photokatalytischen Eigenschaften der TiO_2 -Photokatalysatoren sind eng mit ihrer Darstellung verbunden. Partikelgröße, spezifische Oberfläche, Porosität und Phasenzusammensetzung beeinflussen die photokatalytische Aktivität und sind deshalb im Darstellungsverfahren besonders zu berücksichtigen [35] [36].

Neben dem Effekt der Selbstreinigung besitzen solche Oberflächen einen antibakteriellen- und aufgrund der hohen Hydrophilie einen Anti-Beschlag-Effekt. Die Einsatzgebiete dieser Oberflächen sind vielseitig, so werden sie z.B. für Fliesen, Dachziegeln, Spiegel, Brillen, Fensterscheiben, Kfz-Scheiben und Leuchten eingesetzt. Die antibakterielle Wirkung der mit TiO_2 beschichteten Oberflächen ist die durch UV-Licht induzierte Bildung von Hydroxylradikalen zu erklären. Diese Radikale oxidieren die Lipide der Phospholipidmembran, von sich anheftenden

Mikroben und töten damit die Zellen ab [37]. Mit TiO₂ können Abwässer und Umweltchemikalien photokatalytisch behandelt und Schadstoffe somit abgebaut werden [38], [39]. TiO₂ in Form als Nanomaterial wird für Wasseraufbereitungsanlagen verwendet, wie z.B. für Deponiesickerwässer und Abwässer aus der Textilverarbeitenden Industrie.

3.2.2 Silber

Silber ist schon lange für seine antibakterielle Wirkung bekannt [40]. Im antiken Griechenland, Rom und Mazedonien wurde Silber bereits zur Kontrolle von Infektionen und zur Desinfektion von Trinkwasser eingesetzt. Noch bis in die Neuzeit wurde niedrig dosierte Silbernitratlösung als antibakterielle Substanz bei Augenentzündungen verwendet. Im medizinischen Bereich wird Silber zur Behandlung von Wunden, wie Brandwunden, und Hauttransplantationen verwendet und zur Bekämpfung von pathogenen Keimen eingesetzt [41]. Seit einigen Jahren werden medizinische Materialien, wie Katheder, Nahtmaterial, orthopädische Implantate und Herzklappen erfolgreich mit Silbernanopartikeln beschichtet [42], [43], [44]. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass mit Silber beschichtete Wundverbände, Silbernanopartikel wieder freisetzen [45]. In der Biomedizin werden Silbernanopartikel als Träger für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung (*target delivery*) [46], [47] und in der Krebs- und Gentherapie eingesetzt [48]. Heutzutage wird Silber für viele verschiedene antibakterielle Anwendungen der Wasserreinigung und als Pflanzenschutzmittel benutzt [49]. Andere Anwendungsgebiete von Silber sind unter anderem Katalyse [50], Optik [51] und Elektronik [52]. Die effektivste Anwendung von Silber ist auch heute noch die Nutzung als antibakterieller, antifungaler Zusatz [53]. Die Herstellung von bakteriziden Baumwollfasern durch den Zusatz von Silbernanopartikeln ist von großem Interesse [54], [55], da gewöhnliche Baumwollgewebe einen sehr guten Nährboden für Bakterien bieten [13]. Weitere Anwendungsgebiete für Silbernanomaterialien sind Farben, die mit Zusatz an Silbernanopartikel Algenwachstum verhindern sollen.

3.2.3 Zinkoxid

Zinkoxid fördert als Zusatz den Vulkanisierungsprozess in der Gummiherstellung für Autoreifen und erhöht durch seine gute Wärmeleitfähigkeit die Abfuhr der entstehenden Wärme. Außerdem wird ZnO als Zuschlag Zement beigemischt, die Anwesenheit des Zinkoxids macht den Zement gegen Wasser beständiger und erhöht seine Verarbeitungszeit. Des Weiteren wird Zinkoxid als Weißpigment für Malerfarben verwendet. Seit den 60er Jahren wird ZnO für die Schweinefutterproduktion verwendet und dient heutzutage sogar als Nahrungsergänzungsmittel für Menschen.

Aufgrund seiner Halbleitereigenschaften wird Zinkoxid auch als Katalysator in der Photochemie und für den Bau von Gassensoren eingesetzt [56] Zinkoxid wirkt antimikrobiell und geruchshemmend, deshalb wird es in der Textilindustrie für Sportkleidung verwendet [57].

Aufgrund der hohen Absorption von ultraviolettem Licht findet Zinkoxid Verwendung in Sonnenschutzmitteln. Mit Aluminium, Indium oder Gallium dotiertes Zinkoxid ist ein guter elektrischer Leiter und zudem transparent, weshalb mit diesen Elementen dotiertes ZnO in Solarzellen als Frontkontakt eingesetzt wird. Aufgrund des Reflexionsvermögens für IR-Strahlung werden solche Dotierungen auch in beschichteten Wärmeschutzgläsern verwendet [56]. In der Zukunft wäre der Einsatz in der Elektronik und Optoelektronik möglich, wenn eine erfolgreiche p-Dotierung des Zinkoxids gelingen würde [56].

3.3 Nanotoxikologie

Zurzeit wird eine Vielzahl unterschiedlicher Nanomaterialien mit verschiedenen Eigenschaften synthetisiert, die für ihren möglichen Einsatz in vielen Industriezweigen getestet werden. Da mehr und mehr nanotechnologische Produkte für Konsumenten erhältlich sind, kommen Bedenken bezüglich der Harmlosigkeit und möglichen toxischen Potential solcher Produkte auf [58], [59], [60]. Jedes neu in den Markt eingeführte, technologische Produkt benötigt eine gründliche Untersuchung auf dessen Risikopotential und Nachhaltigkeit. Aus diesem Grund zeichnet sich die

Entstehung eines neuen wissenschaftlichen Teilgebiets der Nanotechnologie, das Nanotoxikologie genannt wird, ab [61], [62].

Nanotoxikologie wurde zunächst als Wissenschaft beschrieben, die sich, ausgehend von der Toxikologie von ultrafeinen, natürlich vorkommenden Partikeln, mit der Auswirkung von synthetisierten Nanomaterialien auf lebende Organismen beschäftigt [61]. Wird die Definition von Toxikologie auf Nanomaterialien angewandt, kann Nanotoxikologie als Wissenschaft beschrieben werden, die sich mit den Umwelteinflüssen von Nanomaterialien und Gefährdung von Organismen beschäftigt, sowie mit den Wechselwirkungen solcher Materialien mit biologischen und ökologischen Systeme und der Vermeidung und Minimierung von durch Nanomaterialien hervorgerufenen negativen Effekten [60].

Bei der Untersuchung von toxischen Effekten von Nanomaterialien entstehen eine Vielzahl neuer Probleme und Schwierigkeiten, da sich nanostrukturierte Materialien verglichen mit den entsprechenden Bulkmaterialien durch die Eigenschaftsveränderungen im Nanobereich anders verhalten.

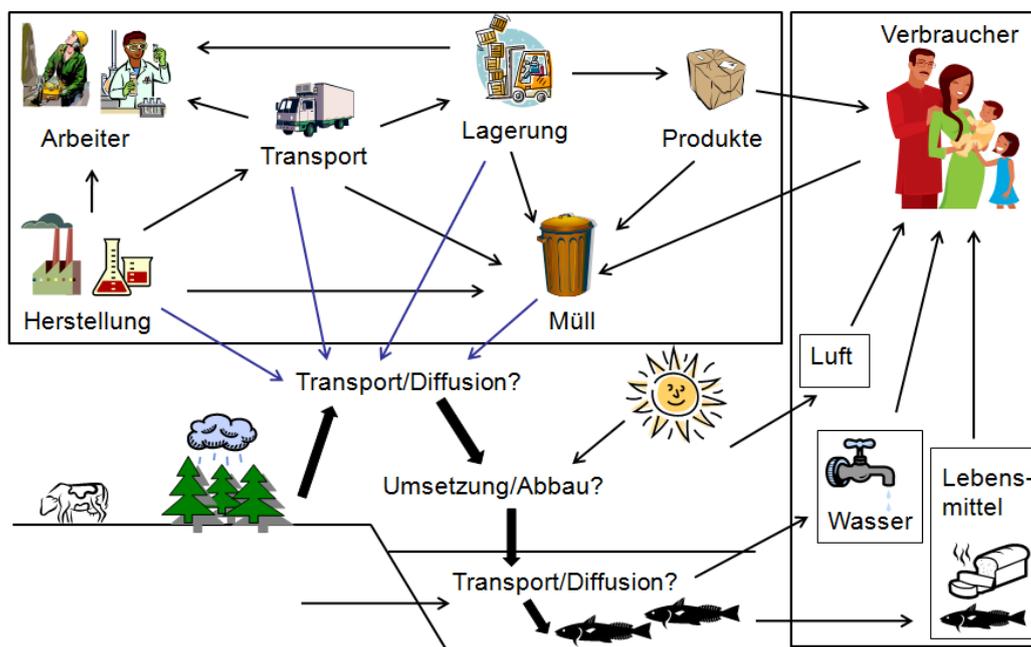


Abbildung 3-1: Schema: Lebenszyklus von Nanomaterialien (adaptiert aus [63]).

Ein wichtiger Faktor in der Nanotoxikologie ist die mögliche Exposition von Nanopartikeln und der Lebenszyklus solcher Materialien (siehe Abbildung 3-1). Das

Hauptproblem in der Bestimmung der möglichen Exposition von Nanomaterialien besteht im Fehlen der Kennzeichnung von Produkten die bereits nanostrukturierte Materialien enthalten. Des Weiteren erweist sich die Bestimmung der bereits in der Natur vorhanden Nanopartikel als schwierig. Der erste Schritt in diesem Forschungsgebiet muss demnach die Messung von Partikelkonzentrationen und Dosen in der Umwelt und am Arbeitsplatz sein, um Aussagen über mögliche Gefährdungen treffen zu können. Nanopartikel, die bereits in der Natur vorhanden sind erschweren die Bestimmung der vom Menschen verursachten Partikel zusätzlich. Es gibt einige Ansätze die Zahl der Nanopartikel in einer gegebenen Umgebung zu bestimmen, zu berechnen oder zu messen [64], [65], [66], [67]. [68]. Um Konsumenten und Arbeiter zu schützen, werden derzeit Diskussionen geführt, um eine Kennzeichnungspflicht von Produkten die nanostrukturierte Substanzen erhalten. Um eine mögliche Gefährdung von Nanomaterialien identifizieren zu können, werden *in-vitro* und *in-vivo* Toxizitätstests durchgeführt und Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt.

Weil Risiko eine Funktion von Gefährdung und Exposition {Risiko = f (Gefährdung, Exposition)} ist, besteht der Ansatz darin, diese beiden Komponenten in ein Paradigma zu bringen. Hierfür ist das Erkennen möglicher Gefährdungen wichtig, woraus Dosis-Wirkungs- und Aufnahme-Bewertungen von Nanomaterialien folgen können. An die vorangegangenen Bewertungen kann sich als letzter Schritt die Risikobewertung von Nanomaterialien anschließen (siehe Abbildung 3-2) [69], [70].

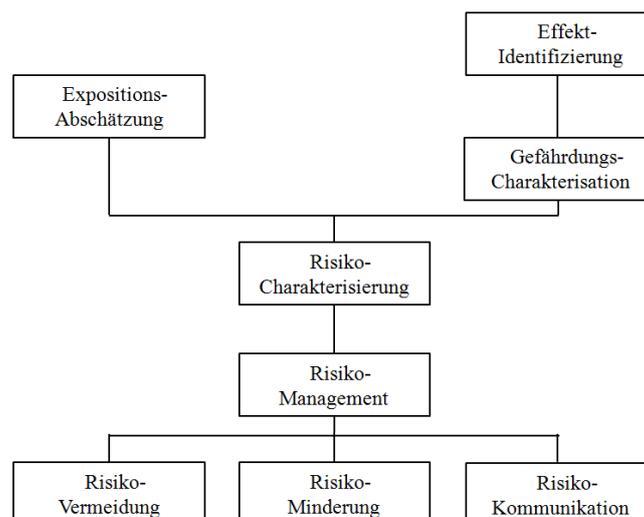


Abbildung 3-2: Wege zur Risikobewertung von Nanomaterialien.

Die physiochemischen Eigenschaften der Nanomaterialien, wie die chemische Struktur, Form, Größe, Größenverteilung, Aggregation/Agglomeration, Stabilität, Löslichkeit in verschiedenen Medien, Oberflächeneigenschaften (Größe/Porosität, Reaktivität, Beschichtungen/Verunreinigungen, Defekte), Zusammensetzung und Kristallstruktur spielen eine sehr wichtige Rolle, was eine Charakterisierung der Materialien enorm wichtig macht.

Diese Eigenschaften können sich je nach Produktion, Herstellungsprozess, Lagerung und Aufbewahrung in verschiedenen physiologischen Medien ändern. Die Größe der Nanopartikel ist ein wichtiger Faktor für die Aufnahmewege, Effektivität und die Verteilung der Partikel im Organismus, wohingegen die Oberflächenladung eine Rolle bei möglichen Interaktionen der Partikel mit Molekülen spielt.

Nanopartikel können aufgrund ihrer kleinen Größe leicht in den Organismus aufgenommen werden. Der am meisten untersuchte Aufnahmeweg ist der über den Atmungstrakt. Unterschiedliche Studien beschäftigen sich mit den möglichen Gefährdungen von über den Atmungstrakt aufgenommenen Nanopartikeln [71], [72], [73], [74]. Inhalationsstudien zeigen, dass die Aufnahme, Lokalisierung und mögliche Eliminierung von Partikeln in der Lunge von deren Größe, Form, Aggregation und Oberfläche abhängt [75], [76], [77], [78]. Eine Vielzahl von Studien beschäftigen sich mit der Toxizität von bei Verbrennung entstehender Nanopartikel, wie Dieseleruß [76], [77] Schweißrauch [78], Ruß [79] und Flugasche [80]. Ein weiterer möglicher Aufnahmeweg von Nanopartikeln in den Organismus ist der über die Haut [81]. Forschungsarbeiten, die sich mit diesem Aufnahmeweg beschäftigen, ergaben bisher, dass ein Eindringen von Nanopartikeln durch gesunde Haut nicht möglich ist. Die Partikel sind in den Hornhautschichten lokalisiert und nur wenige in Sonnencreme verwendete Partikel, wie TiO_2 und ZnO , sind in der Lage in tiefere Hautschichten zu dringen [82], [83], [84], [85]. Mortensen et al. hingegen zeigten, dass Quantum dots in der Lage sind, durch Hautschichten zu dringen [86].

Neben den „natürlichen“ Aufnahmewegen von Nanopartikeln in den Organismus gibt es das beabsichtigte Einbringen von Nanopartikeln in den Körper, wie z.B. intravenös, [87] oder durch die Freisetzung von Partikeln von mit Nanomaterialien beschichteten Implantaten [19], [20]. Sind Nanopartikel auf einem der oben genannten Wege in den Organismus gelangt, können sie sich aufgrund ihrer geringen Größe frei bewegen. Verschiedene Studien zeigen, dass die Lokalisation und die Eliminierungsmechanismen der Partikel im Körper von dem Aufnahmeweg sowohl

von ihrer Größe und Form abhängen [88], [89], [90], [91]. Die Translokation und Toxizität hängen von spezifischen zellulären Interaktionen und Eigenschaften der Nanomaterialien ab, wie ihrer biochemischen Stabilität und ihren Potentials Zur Bildung von reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [92]. ROS verursachen oxidativen Stress, welcher zu einer höheren Zytotoxizität der Materialien führt [93], [94], [95], [96]. Des Weiteren können Nanopartikel mit unterschiedlichen biologischen Molekülen wie Proteinen interagieren [31], [97] und sind in der Lage, durch Zellmembranen zu dringen, mit DNA zu reagieren und diese somit zu schädigen [98]. Die Penetration der Blut-Hirn-Schranke von Nanomaterialien wurde ebenfalls in Studien nachgewiesen [81], [99], sowie eine damit zusammenhängende Neurotoxizität [100], [101].

Weil die Möglichkeit der Reaktion von Nanopartikeln mit Proteinen besteht, wird die Partikelgröße sowie die Aggregation/Agglomeration in den für Zellkulturtests verwendeten biologischen Medium zu bestimmen [102]. Unterschiedliche Studien zeigen, dass sich die Partikel in biologischen Medien anders verhalten als in wässriger Lösung. Einige werden durch die Proteine stabilisiert, wohingegen andere in salzhaltigen Lösungen aggregieren [103], [104], [105], [106], [107].

Deutlich wird, dass im Bereich der Nanotoxikologie bisher keine einheitlichen Konzepte für die Untersuchungen der Aufnahme und der Toxizität von Nanomaterialien vorhanden sind. Nanotoxikologie ist ein neu aufkommendes Forschungsgebiet, in dem eine Vielzahl widersprüchlicher Literatur aufgrund noch nicht standardisierter Testmethoden existiert.

3.4 Umweltbelastungen durch Nanomaterialien

Durch Nanopartikel hervorgerufene Umweltbelastungen werden im Zusammenhang mit der Feinstaubdiskussion und -Regulierung häufig erwähnt. Eine wichtige Rolle zur Bestimmung des potentiellen Risikos von Nanomaterialien spielen die Mobilität und der Lebenszyklus dieser Partikel. Des Weiteren ist eine Unterscheidung zwischen Partikeln die bei technischen Prozessen entstehen und Partikeln die zufällig entstehen und unbeabsichtigt in die Umwelt freigelassen werden, wie bei Verbrennungsprozessen entstehende Partikel (Dieselruß, Schweißrauch, Ruß, Flugasche) von bedeutender Wichtigkeit. Natürlich vorkommende Partikel

unterscheiden sich sehr stark in ihrer Form, Größe und Zusammensetzung, wohingegen künstlich Partikel sich nicht so stark unterscheiden, da sie für bestimmte Anwendungen synthetisiert wurden. Abhängig von ihrer Herstellung und Produktion können Nanopartikel in die Luft oder das Wasser emittiert werden und entsprechend das Grundwasser oder Oberflächengewässer erreichen. Die kontinuierlich steigende Verkehrsbelastung führt zu einem drastischen Anstieg an ultrafeinen Partikel in der Luft. Untersuchungen zu bei Verbrennungsprozessen entstehenden Partikeln lassen Bewertungen zu dem Verhalten und der Gefährdung von in die Umwelt gelangten Partikeln zu. Die von Dieselmotoren produzierten ultrafeinen Partikel werden aufgrund ihrer Fähigkeit zu agglomerieren und sedimentieren nach einer bestimmten Zeit aus der Luft entfernt. Künstliche, synthetisch hergestellte Nanopartikel hingegen sind häufig, z.B. durch Core-Shell-Systeme, stabilisiert, aggregieren nicht, bleiben länger in der Umwelt und können somit weitere Strecken zurücklegen.

Aufgrund ihrer großen Oberfläche können Nanopartikel Verunreinigungen und toxische Substanzen, wie Pestizide, Schwermetalle und Dünger binden und diese über weite Strecken transportieren und verteilen [108]. Da Nanopartikel sehr reaktiv sind besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass sie Substanzen zu möglicherweise toxischen Substanzen umsetzen. Des Weiteren könnte der bakterizide Effekt einiger Nanomaterialien die mikrobielle Zusammensetzung in Wasser und Boden ändern. Um die von Nanomaterialien ausgehenden Umweltbelastungen bewerten zu können, untersuchen viele Studien die toxische Wirkung von Nanopartikeln auf Bakterien und Wasserorganismen. Die toxische Wirkung von TiO_2 wurde bereits an Bakterienstämmen, wie *Escherichia coli* [109], [110], [111], [112], *Lactobacillus acidophilus* [113], *Saccharomyces cerevisiae* [113], *Lactobacillus helveticus* [114], *Pseudomonas aeruginosa* [115], *Pseudomonas stutzeri* [116], *Bacillus pumilus* [117], sowie für die Hygiene relevanten Bakterienstämme *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, und *Candida albicans* [118] untersucht. ZnO Nanopartikel wurden ebenfalls in vielen Studien bereits auf ihre toxische Wirkung auf Mikroorganismen wie *Escherichia coli* [119], [120], [121], *Bacillus subtilis* [122], *Streptococcus agalactiae* [123] und *Staphylococcus aureus* [123] untersucht. Die Untersuchung der toxischen Wirkung auf Wasserorganismen ist zur Einschätzung der möglichen Umweltschädigung durch Nanopartikel von Interesse. Die Wirkung von TiO_2 wurde u.a. auf Organismen wie *Daphnia magna* [124], [125], *Vibrio fischeri* [126], *Pseudokirchneriella subcapitata* [127], [128] und *Thamnocephalus platyurus*

[129] intensiv untersucht. ZnO Partikel wurden ebenfalls auf ihre toxische Wirkung auf verschiedene Wasserorganismen, wie *Vibrio fischeri* [129], *Daphnia magna* [129], sowie unterschiedliche Phytoplankton Arten (*Thalassiosira pseudomona*, *Skletonema marinoi*, *Dunaliella*, *Isochrysis galbana*) [130], [131] getestet.

Die toxische Wirkung von Silbernanopartikeln auf verschiedene Bakterien wurden von vielen Arbeitsgruppen untersucht [132], [133]. Sotiriou et al. fanden heraus, dass der toxische Effekt von Silber-Nanopartikeln auf *Escherichia coli* von gelösten Silberionen verursacht wurde und nicht von den Nanopartikeln selbst [132]. Der Einfluss von Silber-Nanopartikel auf verschieden Wasserorganismen wurde ebenfalls in zahlreichen Studien untersucht [134], [135].

Insgesamt wiesen die Studien sehr unterschiedliche Ergebnisse auf, während einige einen, durch die Partikel hervorgerufenen, toxischen Effekt auf die Organismen feststellten, fanden andere keine Beeinflussung der Organismen in den untersuchten Konzentrationsbereichen.

3.5 Gesundheitsrisiken durch Nanomaterialien

Die Aufnahme von Nanopartikeln in den Organismus kann über den Atmungstrakt, den Magen-Darm-Trakt und teilweise über die Haut erfolgen. In dem Organismus gelangte Partikel können sich frei bewegen und durch Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke dringen. Über den Blutkreislauf können sie sich in Organen, wie Leber, Niere und Herz anreichern. Sie sind ebenfalls in der Lage, mit verschiedenen Proteinen und Zellkomponenten zu interagieren. Aus diesem Grund werden eine Vielzahl von *in-vitro* und *in-vivo* Studien mit Nanomaterialien durchgeführt. In Abbildung 3-3 sind die möglichen Aufnahmewege, Akkumulationen und Retentionswege von Nanomaterialien angegeben.

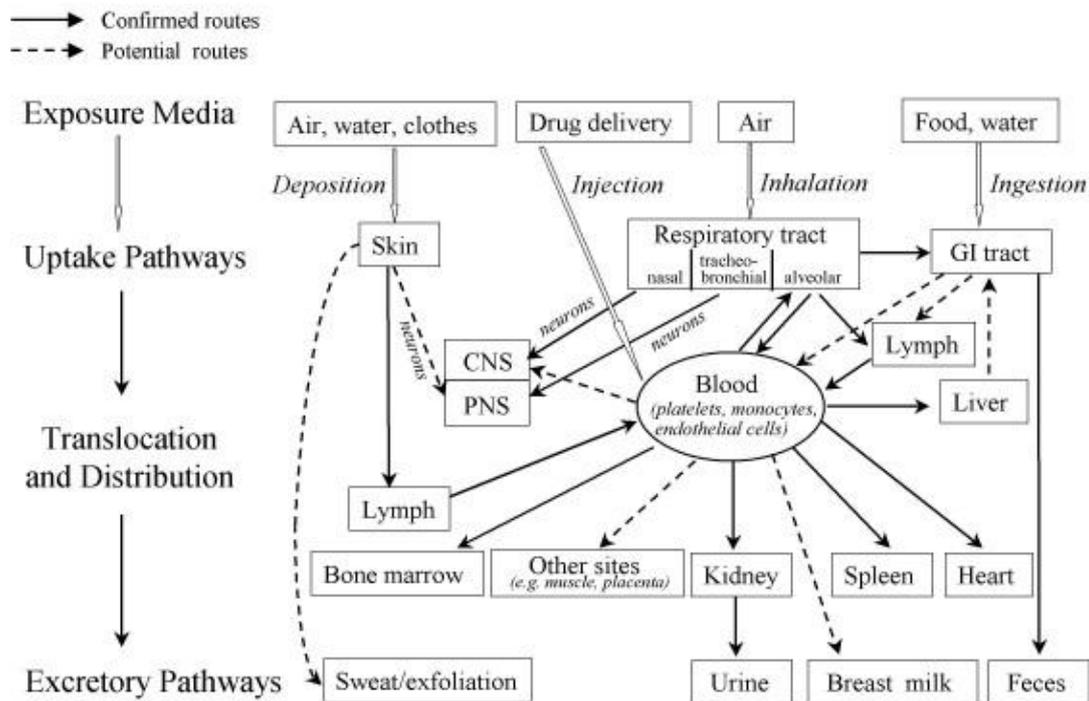


Abbildung 3-3: Biokinetik von Nanopartikeln, Darstellung bereits nachgewiesener sowie hypothetischer Translokationswege, Akkumulation und Retention [136].

3.5.1 *In-vitro*-Studien zur Toxizität von TiO₂-, ZnO- und Silber-Nanopartikeln

TiO₂

Der Effekt von TiO₂ Nanopartikeln unterschiedlicher Form, Größe und Oberflächenbeschichtungen wurde auf viele verschiedene Zelllinien, wie HaCaT Zellen [137], einer Mäusefibroblasten-Zelllinie [138], HeLa-Zellen [139], [140], PC-12-Zellen [141], [142], [143], A-549-Zellen [143], [142], NIH-3T3-Zellen [142], [143] und HEP-G2-Zellen [142], [143] untersucht. Erste Studien zur Untersuchung des toxischen Effekts von TiO₂ Nanopartikeln wurden bereits 1992 von Cai et al. durchgeführt [139]. Sie stellten fest, dass HeLa-Zellen nach Kultivierung mit photoaktivierten (10 min/ 550 W Hg-Lampe) TiO₂ Nanopartikeln (P25) in einer Konzentration von 50 ppm keine Viabilität mehr zeigten [139]. Mit TiO₂ Partikeln

(P25) im Konzentrationsbereich zwischen 1-100 $\mu\text{g/mL}$ kultivierte PC-12 Zellen zeigten eine signifikante Abnahme ihrer Viabilität im Kultivierungszeitraum zwischen 6-48 h [144]. Chen et al. untersuchten die Zytotoxizität von verschiedenen Anatas-Strukturen, 0D, 2D, 3D, auf HeLa-Zellen und fanden heraus, dass 0D-strukturierte Anatas-Partikel in einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/mL}$ eine Verminderung der Zellviabilität auf 80 % bewirkte, wohingegen die Kultivierung der Zellen mit gleichen Konzentrationen an 2D und 3D Anatas-Partikel die Viabilität der Zellen nicht beeinflusste [140]. Bei ein-minütiger Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht (8 mW/cm^2) sank die Viabilität der Zellen. Dieser Effekt könnte auf die Unterschiede der Aufnahmemöglichkeiten von modifizierten und geometrisch unterschiedlichen Strukturen in die Zellen zurückzuführen sein [140]. Die Studien von Jin et al. zeigten eine signifikante Toxizität von Anatas-Nanopartikeln mit einer durchschnittlichen Größe von unter 100 nm in Konzentrationen zwischen 30-600 $\mu\text{g/mL}$ auf L929-Zellen [138]. Oxidativer Stress und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies sind wesentliche Folgen der Partikelaufnahme, die von den Zellen teilweise ausgeglichen wird. TiO_2 Nanopartikel induzieren durch die Störung des Gleichgewichts zwischen Oxidant- und Antioxidant-Prozessen intrazellulären oxidativen Stress [145].

Es gibt entgegengesetzt auch Studien die zeigen, dass TiO_2 -Nanopartikel keinen toxischen Einfluss auf Zellen haben. Es wurden neun unterschiedliche Pulver und drei unterschiedliche Suspensionen, bestehend aus TiO_2 -Nanopartikeln auf ihre Toxizität auf A-549-, HEP-G2-, NIH-3T3- und PC-12-Zellen untersucht. Die Partikel unterschieden sich in ihrer BET-Oberfläche, der Größe und der Kristallstruktur. In dem in dieser Studie getesteten Konzentrationsbereich der Partikel zwischen 100-1000 ppm konnte kein toxischer Effekt der Partikel auf die untersuchten Zelllinien festgestellt werden [143]. Eine weitere Studie zeigt, dass einige Zelllinien sensitiver auf die Zugabe von Nanopartikeln zum Kulturmedium reagierten. Die Sensitivität der getesteten Zelllinien wurde zu: NIH-3T3 > A-549 > PC-12 > HEP-G2 bestimmt, wobei die NIH-3T3-Zellen die waren, die am sensitivsten reagierten. In dieser Studie wurde ebenfalls der Einfluss von photokatalytisch aktivierten TiO_2 Partikeln (UV_A -Bestrahlung) im Vergleich zu unaktivierten Partikeln auf Zellen getestet und kein signifikanter Unterschied in der Viabilität der Zellen festgestellt [142].

ZnO

Viele Studien untersuchen den toxischen Effekt von ZnO-Nanopartikeln auf unterschiedliche Zellen, wie MSTO-Zellen und 3T3-Zellen [146], SMMC-7721-Zellen [147], HeLa und L929-Zellen [148], PBMC-Zellen [149] und humane Hautfibroblasten [150]. Brunner et al. untersuchten die Toxizität von ZnO-Nanopartikeln (40 nm) auf MSTO-Zellen und Fibroblasten (3T3) und fanden nach 3-tägiger Exposition mit ZnO-Partikeln in der Konzentration von 15 ppm keine viablen Zellen mehr. Die Abnahme der Viabilität der Zellen wurde mit dem toxischen Effekt von gelöstem Zn^{2+} -Ionen begründet und nicht einem toxischen Effekt der ZnO-Partikel zugeschrieben [146]. In einer Studie von Lin et al. wurde der toxische Effekt von ZnO-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe (70 und 420 nm) auf A-549-Zellen untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass beide getesteten ZnO-Partikel eine Zeit- und Dosis-abhängige Toxizität auf die Zellen aufweisen. Die Ursachen für die toxischen Effekte der ZnO-Partikeln wurden auf oxidativen Stress, Lipidperoxidation, Zellmembranzerstörung und oxidative DNA-Schädigung zurückgeführt. Weder freie Zn^{2+} -Ionen noch Metallverunreinigungen schienen Hauptverursacher der ROS-Induzierung zu sein, womit die Ergebnisse denen zu Brunner et al. widersprechen [151].

Decksakulthorn et al. ermittelten den IC_{50} -Wert von ZnO-Partikeln (durchschnittliche Partikelgröße von 70 nm), der bei 50 ppm für A-549-Zellen lag, im Gegensatz zu dem ermittelten IC_{50} -Wert von TiO_2 (durchschnittliche Partikelgröße von 70 nm), der bei 2700 ppm lag. [150]. Studien von Hanley zeigten, dass ZnO-Partikel eine zelltypspezifische Toxizität verursachten, welche von der Affinität der Partikel zur Zellmembran, der Möglichkeiten der Phagozytose und der zellulären Kapazität zur ROS Produktion abhing. Monozytische Zellen zeigten die größte Empfindlichkeit und intrazelluläre ROS Produktion nach ZnO Partikel Exposition, gefolgt von NK-Zellen und Lymphozyten, welche die höchste Resistenz bei Kultivierung mit ZnO Partikeln aufwiesen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Mechanismus der Toxizität von ZnO Partikeln auf Zellen die Produktion von ROS ist, und diese von der Größe der Partikel abhängt, da kleinere Partikel einen stärkeren toxischen Effekt auf die Zellen hatten [149]. Lin et al., die auch Studien zur größenabhängigen Toxizität von ZnO Partikeln im Bereich von 20-100 nm auf SMMC-7721-Zellen durchführten, fanden hingegen keinen Zusammenhang zwischen Partikelgröße und toxischen Effekt [147].

Die Proliferationsaktivität von L929-Zellen sank stark bei 24- und 48-stündiger Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von ZnO-Partikeln (20 nm) und ein Anstieg an nekrotischen und apoptotischen Zellen war zu erkennen [148].

Ag

In unterschiedlichen Studien konnte der toxische Effekt von Silbernanopartikeln auf unterschiedliche Zelllinien nachgewiesen werden [152], [153], [154], [155], [156], [157], [158], [159]. Bei Kultivierung mit Silbernanopartikeln konnte eine verminderte Viabilität und die Freisetzung von LDH bei Ratten-Leber-Zellen [154], bei Mäuse-Stammzellen [153], bei humanen Fibroblasten [156] und bei Ratten-Nebennierenzellen [157] beobachtet werden. Kawata et al. untersuchten den toxischen Effekt von Silbernanopartikeln in einem Größenbereich von 7-10 nm auf HEP-G2-Zellen und verglichen diesen mit dem von Silberionen und Polystyrol-Partikeln, die als Referenz für nicht-toxische Partikel verwendet wurden. Sie fanden heraus, dass der toxische Effekt sowohl von den Partikeln selbst, als auch z.T. von herausgelösten Silberionen verursacht wurde [158]. Die Ergebnisse der Studien von Asharani et al., die den Effekt von Silber-Nanopartikeln auf humane Zellen untersuchten, zeigten eine DNA-Schädigung der Zellen, die sowohl durch eine Störung der mitochondrialen Funktion, als auch durch die Produktion von ROS verursacht wurde [153]. Braydrich-Stolle et al. untersuchten den toxischen Effekt von 15 nm großen Silber-Nanopartikeln und einer Silbersalzlösung (Silbercarbonat) auf C18-4-Zellen und bestimmten die EC₅₀-Werte zu 8,75 ppm für die Nanopartikel und zu 408 ppm für die Silberionen.

3.5.2 *in vivo*-Studien Zur Toxizität von TiO₂-, ZnO- und Silber-Nanopartikeln

TiO₂

Der toxische Effekt von verschiedenen TiO₂-Partikeln auf Hamster, Mäuse und Ratten nach oraler Aufnahme und Einflößung [160], [161], [162], [163], [164], [165], [166], Injektion [167], [168] und Inhalation [161], [169], [170], [171] wurde in vielen Studien untersucht.

Inhalationsstudien mit Ratten zeigten Entzündungsreaktionen abhängig von den Partikeleigenschaften. Lee et al. stellten fest, dass Mäuse nach Inhalation von TiO_2 Partikeln zwischen $0\text{-}250\text{ mg/m}^3$ über eine Dauer von 6 Stunden am Tag, 5 Tage die Woche über 2 Jahre, keine erhöhte Mortalität sowie Gewichtsänderungen und abnormale klinische Veränderungen aufwiesen, allerdings war ein leichter Anstieg von Lungenentzündungen, Schnupfen, Husten, und Leberschäden sowie Schädigung der Niere bei weiblichen Mäusen erkennbar [168].

Die über Inhalation aufgenommenen TiO_2 Partikeln lagerten sich überwiegend in der Leber, Niere, Milz und Lunge ab [169]. Aufgrund von Studien bei denen Ratten einer sehr hohen Konzentration (250 mg/m^3) dauerhaft ausgesetzt waren, kann die Lungentumorbildung durch Inhalation von TiO_2 Partikeln auch bei Menschen so gut wie ausgeschlossen werden [169], [172]. Warheit et al. zeigten, dass die toxische Wirkung von TiO_2 Partikeln auf die Lunge von der Zusammensetzung und Oberflächenbehandlung der Partikeln abhing [161]. Einige Studien schließen einen Zusammenhang zwischen Lungentumorbildung und TiO_2 - Partikelaufnahme über Inhalation aus [170], wohingegen andere einen kanzerogenen Effekt der inhalierten Partikel nicht ausschließen und starke Lungenschäden feststellen konnten [171]. Es konnte gezeigt werden, dass sich auch oral aufgenommene TiO_2 Partikel im Körper verteilen und in Leber, Milz, Niere und Lunge anreicherten, was indiziert, dass die Partikel über den gastrointestinalen Trakt im gesamten Körper verteilt werden können [160], [164]. Die Verteilung der über Inhalation aufgenommenen TiO_2 Partikeln im Körper war gleich gegenüber der oral aufgenommenen, was andeutet, dass der Aufnahmeweg der Partikel nicht im Zusammenhang mit deren Verteilung im Körper zu stehen scheint [162]. Die Ergebnisse von Hohn et al. deuten darauf hin, dass die Toxizität von TiO_2 Partikeln auf die Lunge von deren Oberfläche und nicht von ihrer Größe abhängt [163], im Gegensatz zu den Ergebnissen von Warheit et al., die einen Zusammenhang zwischen Größe der Partikel und dadurch hervorgerufenen Lungenschäden postulierten [166]. Nach Injektion von hohen Dosen von TiO_2 in Mäuse (150 mg/kg) wurden erhebliche Schäden an Leber, Niere und Herzmuskel, sowie Entzündungsreaktionen und ein Ungleichgewicht von Blutzucker und Fett festgestellt [167].

ZnO

Akute Toxizität von ZnO Partikeln in verschiedenen Größen (10, 30, 100 nm) und Konzentrationen (0,05 und 0,5 g/kg Körpergewicht) nach Injektion in männliche Mäuse konnte ebenfalls festgestellt werden [173]. Nach Injektionen von ZnO Partikeln in die Lunge zeigten pathologische Untersuchungen eine Partikelanreicherung in Lunge, Milz, Bauchspeicheldrüse, Knochen und Leber. In kleinen Dosen verursachten 30 und 100 nm große Partikel wenige Schäden, wohingegen 10 nm große ZnO Partikel erhebliche Lungen- und Leberschäden auslösten. In hohen Konzentrationen wirkten die 30 nm großen ZnO Partikel sehr toxisch und führten zu erheblichen Lungen- Leber und Bauchspeicheldrüsenschäden [173]. Nach oraler Aufnahme von hohen Dosen (5 g/kg Körpergewicht) an ZnO Partikeln (120 nm) wurden Partikel sowohl in Organen wie in Niere und Bauspeicheldrüse gefunden, als auch in den Knochen. Ebenfalls wurde eine Erhöhung der Blutviskosität festgestellt [174].

3.6 Zellbasierte Assay

In der vorliegenden Arbeit werden Titandioxid- Zinkoxid- und Silbrenanopartikel auf ihre toxische Wirkung auf unterschiedliche Zelllinien untersucht. Im Folgenden werden einige der zellbasierten Assay ausführlich beschrieben

3.6.1 Verwendung von 3D-Kulturen

Da 2D-Monolayer-Zellkulturen limitiert sind und 3D-Zellkulturen die *in-vivo* Bedingungen und Funktionen weitaus besser reflektieren [175], [176], [177], werden momentan vermehrt Ansätze und Forschungsarbeiten zur Kultivierung von 3D-Zellkulturen, sowie der anschließenden Testung von Wirkstoffen, verfolgt.

In 3D-Zellkulturen sind die Zellen von anderen Zellen umgeben und wachsen in einer organisierten Matrix, wodurch das Verhalten der einzelnen Zelle von Interaktionen mit benachbarten Zellen und durch die extrazelluläre Matrix (ECM), beeinflusst wird. Die Verknüpfung dieser Signale entscheidet über Differenzierung, Proliferation, sowie Zelltod. Im Gegensatz zu 3D-Kulturen fehlt bei 2D-Kulturen diese komplexe Signalstruktur, sodass sich deutliche Unterschiede in der Morphologie der Zellen

[178], ihrer Differenzierung [176], [178] und Genexpressionen [176], [179] sowie der Wirkstoffsensitivität ergeben. Tiermodelle können die Eigenschaften humaner Tumore, wie Wirkstoffsensitivität, Autoimmunkrankheiten und Stammzell-differenzierung nicht widerspiegeln. Demzufolge bieten 3D-Kulturen einen vielversprechenden neuen Ansatz zur weiteren Reduzierung von Tierversuchen [175]. Durch den Einsatz von 3D-Kulturen ist die Möglichkeit einer besseren *in-vitro* Untersuchung von Differenzierung, Zellverhalten, intrazellulären Interaktionen gegeben, sowie der Nachbildung komplexer Gewebestrukturen [180], [181].

3D-Zellkulturen können aus vielen verschiedenen Zellen unterschiedlicher Quellen gebildet und werden, wie Stammzellen, primären Zellen und Zelllinien. Wichtige Forschungsbereiche für die Anwendung von 3D-Zellkulturen stellen das *Tissue Engineering* und die Krebsforschung dar. 3D-Kulturen von Fibroblasten, Endothelzellen, mesenchymalen Stammzellen, sowie Hepatozyten sind bereits intensiv erforscht worden. Im Bereich des *Tissue Engineering*, der Grundlagenforschung, sowie der Wirkstofftestung werden große Auswirkungen und Fortschritte über den Einsatz von 3D-Zellkulturen erwartet [182].

Die Anwendungsgebiete von 3D-Kulturen lassen sich in den Bereich der Onkologie und Toxikologie einteilen. Im Bereich der Onkologie war die Entwicklung von Wirkstoffen aufgrund eines fehlenden präklinischen Modellsystems bislang schwierig. Die Testung der Antitumoraktivität erfolgte bisher an 2D-Kulturen, wobei die Eigenschaft von Tumoren, bestehend aus Tumorzellen, Bindegewebszellen, Entzündungszellen, sowie Endothelzellen nicht berücksichtigt werden können. Eine Übertragung der Wirkstofftestung mit 2D-Kulturen auf die *in-vivo* Bedingungen ist daher nicht ausreichend möglich [178].

Eine im Bereich der Tumorbiologie seit 25 Jahren angewandte 3D-Kultur sind multizelluläre Tumorsphäroide (MCTS), da sie die natürliche Umgebung von Tumoren gut imitieren [183], [179]. Eine Vielzahl sphäroidbasierter Kokultursysteme wurde entwickelt, die die zelluläre Heterogenität von Tumoren widerspiegeln sollen.

Die Bildung eines MCTS aus einzelnen Zellen kann in drei Schritten beschrieben werden: (A) Über Integrine werden die multiplen RGD-Motive (Arginin-Glycin-Aspartat) der langkettigen ECM-Fasern erkannt und das intrazelluläre Zytoskelett der Zellen mit der ECM verknüpft (Aggregationsphase). (B) Durch hochregulierte Expression von Cadherinen werden die Zell-Zell-Kontakte stabilisiert (Verzögerungsphase) (C). Durch homophile Cadherin-Cadherin Bindung zwischen

zwei Zellen entsteht eine starke Zelladhäsion wodurch sich ein Sphäroid ausbildet (Sphäroidverdichtungsphase) [177]. Die Bildung eines Sphäroids ist in Abbildung 3-4 schematisch dargestellt.

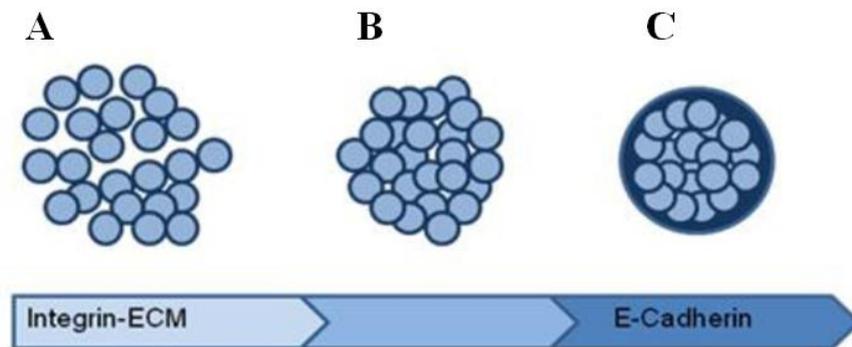


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Sphäroid Bildung [177] mit Aggregationsphase (A), Verzögerungsphase (B), Sphäroidverdichtungsphase (C).

Eine Simulation des Nährstoff-, Sauerstoff- und Metabolittransports in MCTS über verschiedene mathematische Modelle deutet darauf hin, dass diese ein ähnliches Verhalten zu avaskulären Gewebe, bzw. Tumoren aufweisen. Es wurde eine Diffusionslimitierung ab einer Sphäroidgröße von 150 -200 μm beobachtet und die Ausbildung eines nekrotischen Kerns ab einem Sphäroiddurchmesser von 500 μm (siehe Abbildung 3-5) [177].

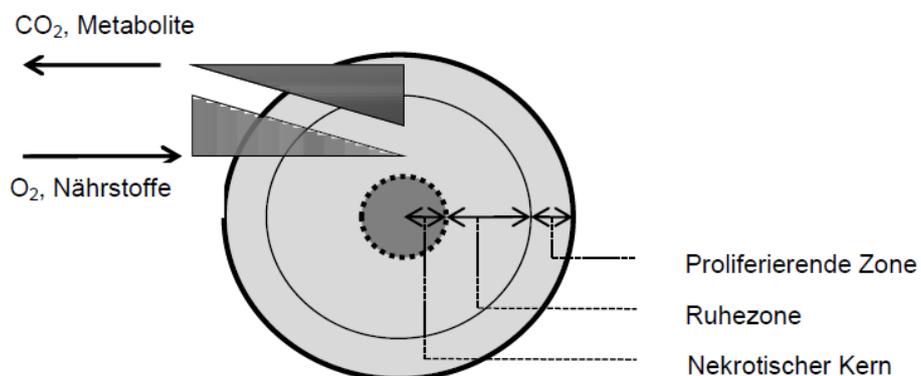


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung eines Tumorsphäroids [177].

Die Anwendung von Sphäroiden brachte neue Erkenntnisse in der Regulation der Invasion und Metastasierung, Angiogenese, sowie in der Kinetik des Zellzyklus.

Sphäroide können zur Untersuchung neuer Hypoxie-Marker, sowie für die Entwicklung neuer Therapieansätze und die Umsetzung multizellulär vermittelter Wirkstoffresistenz und Bestrahlung eingesetzt werden [183].

Im Bereich der Toxikologie ist für die Untersuchung und Entwicklung von Medikamenten und Wirkstoffen die frühe Erkennung von Lebertoxinen nötig, da der Lebermetabolismus eine zentrale Rolle beim Abbau von Medikamenten und Giftstoffen im Körper spielt [184]. Bisher wurden klassische 2D-Hepatozyten für die Bestimmung lebertoxischer Nebenwirkungen von Medikamenten eingesetzt. Diese können allerdings die Lebertoxizität nicht sensitiv genug widerspiegeln, nur knapp 50% der Lebertoxine können auf diese Weise erkannt werden [184], [185], [186]. Daher ist auch in diesem Bereich die Entwicklung eines *in-vitro* Hepatozyten-Modells in Form einer 3D-Kultur nötig [187]. Der Vergleich der Genexpressionen in 2D- und 3D-Kulturen zeigte einen drastischen Abfall der Genexpressionen für die leberspezifischen Funktionen in Monolayer-Kulturen während in Hepatozytensphäroiden die leberspezifischen Funktionen in deutlichem Maß nachzuweisen sind [186].

Mikrogewebe können über sieben verschiedene Methoden gebildet werden (siehe Abbildung 3-6): (1) über Zellkultureinsätze, (2) über Mikropatterning, (3) über 3D-Gerüstsubstanzen, (4) über Hydrogele, (5) über Zellaggregation, (6) über Template oder (7) über Hanging-Drop.

Zellkultureinsätze

Die Kultivierung von 3D-Kulturen über Zellkultureinsätze gewährleistet eine optimale Sauerstoffversorgung der Zellen, da die Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze erfolgt. Diese Methode der 3D-Mikrogewebe Herstellung findet aus diesem Grund hauptsächlich Anwendung in der Entwicklung von Hautmodellen [188], Lungenmodellen [189], sowie bei Untersuchungen von Atemwegserkrankungen [190].

Mikropatterning

Beim Mikropatterning werden Zellen auf einem planaren Substrat, bestehend aus einem Kollagenarray oder Fibronectinpunkten immobilisiert. Das Substrat ermöglicht die Adhäsion der Zellen, und die Topographie des Substrats hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zellfunktionalität [177].

3D-Gerüstsubstanzen

Im Bereich des *Tissue Engineerings* werden poröse 3D-Gerüstsubstanzen eingesetzt, um Gewebestrukturen zu kultivieren [189]. Diese Gerüstsubstanzen stellen eine Unterstützung für die Anordnung und Funktion der Zellen dar und fördern die Ausbildung eigener ECM und 3D-Strukturen [191].

Hydrogele

Wie auch die 3D-Gerüstsubstanzen dienen Hydrogele der Organisation der Zellen in dreidimensionale Strukturen, da sie strukturell der ECM vieler Gewebe ähneln. Im Unterschied zu Scaffolds, bei denen die Zellanlagerung auf der Oberfläche stattfindet, schließen Hydrogele die Zellen ein [176], [192]

Zellaggregation

Einige Zelltypen zeigen in Suspensionskulturen spontane Aggregation sobald keine Oberflächenabsorption möglich ist. Durch spezielle Oberflächenchemie bzw. Topographie kann die Adhäsion von Zellen verhindert werden und dieses Verhalten zur Bildung von Sphäroiden genutzt werden. Über Kulturparameter, wie Zelltyp, Zellkonzentration, Mediumkomponenten, können die Uniformität, Größe und Form der gebildeten Sphäroide beeinflusst werden. Die über diese Methode hergestellten Sphäroide weisen generell eine ungleichmäßigere Größenverteilung als die durch anderen Methoden gebildeten Mikrogewebe auf [177].

Template

Die multizelluläre Aggregation kann über Mikrostrukturen beeinflusst werden. Strukturen definierter Größe werden über Mikroformpressen in nichtadhäsive Materialien, wie z.B. Agarose oder PEG, eingestanz. Die Zellen gelangen über Gravitations- und hydrodynamische Kräfte aus der Suspension in die ausgestanzten Hohlräume, in denen geringere Scherkräfte wirken. Nach Immobilisierung der Zellen,

werden weitere Zellen gewaschen und die verbleibenden Zellen bilden Sphäroide gut kontrollierbarer Größe, Zellzusammensetzung und Form aus [177], [191].

Hanging-Drop

Eine weitere Methode Sphäroide herzustellen, stellt die Hanging-Drop-Technik dar. Die Zellen bilden hierbei im Meniskus eines Tropfens ein Sphäroid aus. Bei dieser Methode lassen sich Parameter wie Größe, Zellzahl und Zusammensetzung kontrollieren [177], [193].

In Abbildung 3-6 sind die verschiedenen Methoden zur Sphäroidherstellung schematisch dargestellt.

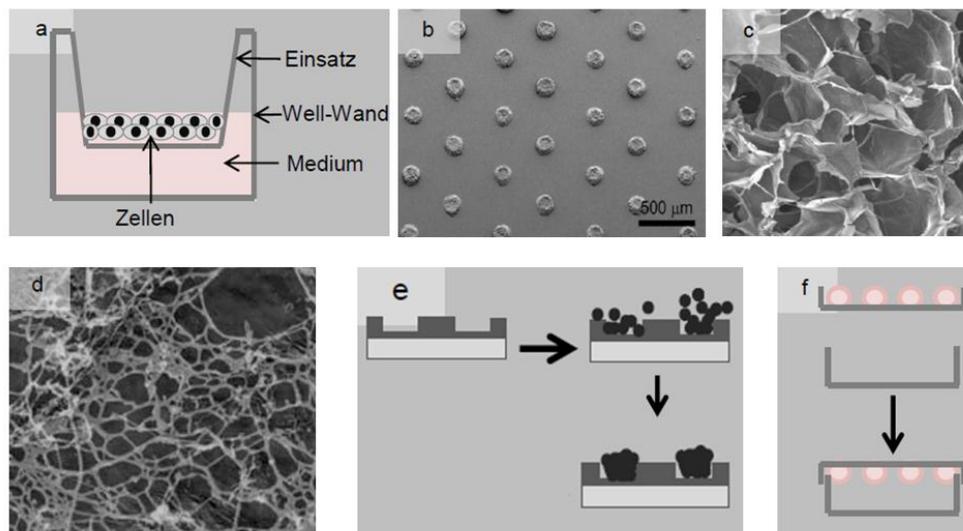


Abbildung 3-6: Methoden Zur Herstellung multizellulärer Sphäroide

- (a) Schematische Darstellung der Zellkultureinsätze
- (b) elektronenmikroskopische Aufnahme von HT-29 Zellen kultiviert auf einem PDMS Film (Mikropatterning)
- (c) elektronenmikroskopische Aufnahme der Poren (100 µm) einer natürlichen Scaffoldsubstanz (Chitosan-Alginat-Komplex) [194]
- (d) elektronenmikroskopische Aufnahme eines Peptid-Hydrogels
- (e) schematische Darstellung der Templat basierenden Zellaggregation [195],
- (f) schematische Darstellung der Hanging-Drop-Methode.

3.6.2 Impedanzmessungen adhärenter Zellen

Eine weitere Methode zur Testung toxischer Effekte von Substanzen auf Zelllinien sind Impedanzmessungen von Zellen. In den folgenden Abschnitten wird zunächst eine Einleitung in die Impedanzspektroskopie gegeben und anschließend die, in der Arbeit verwendete Methode: *Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing* (ECIS) beschrieben.

3.6.2.1 Grundlagen der Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie (IS) ermöglicht es, Informationen über die passiven elektrischen Eigenschaften verschiedener Materialien zu erhalten. Grenz- und Oberflächen können, über das Anlegen einer in ihrer Frequenz variierenden Wechselspannung untersucht werden. In Abhängigkeit des Erregersignals wird der frequenzabhängige Widerstand einer Probe gemessen [196]. Das elektrochemische System wird zur Auswertung der Daten durch ein Ersatzschaltbild, bestehend aus Reihen- und Parallelschaltungen von Impedanzelementen, wie z.B. Ohmscher Widerstand und Kondensator, so gut wie möglich beschrieben. Bei Eignung des gewählten Ersatzschaltbildes zur Beschreibung des Systems werden durch die Anpassung der theoretischen Übertragungsfunktionen an die experimentellen Daten, Parameter erhalten, bei denen die Abweichung zwischen dem frequenzabhängigen Impedanzverhalten des Ersatzschaltbildes und dem des zu untersuchenden Systems minimiert sind. Den Impedanzelementen werden physikalische Eigenschaften im System zugeordnet, wodurch die Parameter des Ersatzschaltbildes zur Charakterisierung des elektrochemischen Systems und zur Berechnung systemspezifischer Größen herangezogen werden können [197], [198].

Impedanzspektren können durch zwei unterschiedliche Verfahren aufgenommen werden, dem *continuous wave*- und dem *fourier transform*-Verfahren, welche beide die Frequenzabhängigkeit der elektrischen Impedanz des Systems untersuchen.

Das *continuous-wave*-Verfahren wird im Folgenden erläutert. Bei diesem Verfahren wird als Erregersignal ein sinusförmiger Wechselstrom oder eine Wechselspannung mit einer kleinen, konstanten Amplitude verwendet. Die erhaltene Impedanz, in Abhängigkeit der verwendeten Frequenz des Erregersignals, kann aus dem resultierenden Spannungsabfall, bzw. dem resultierenden Strom ermittelt werden. Der

resultierende Wechselstrom wird bei jeder Frequenz separat detektiert, die Impedanz berechnet und in einem Impedanzspektrum zusammengetragen. Bei gegebener Frequenz ändert ein sinusförmiger Wechselstrom seine Polarität zwischen einem positiven und negativen Maximalwert (Amplitude). Analog zum Ohmschen Gesetz für Gleichströme ist die Impedanz definiert als der Quotient der anliegenden Wechselspannung durch den resultierenden Wechselstrom. Die Kirchhoffschen Regeln behalten auch für den Wechselstromkreis ihre Gültigkeit. In einem Schaltkreis der ausschließlich Ohmsche Widerstand enthält schwingen die momentane Spannung und der momentane Strom stets in Phase. Im Gegensatz dazu eilt der Momentanwert des Stromes dem Momentanwert der Spannung in einem Stromkreis, der ausschließlich einen Kondensator enthält, voraus. Es kommt zu einer Phasenverschiebung. Bei einer Kombination von Bauteilen muss ebenfalls mit einer Phasenverschiebung gerechnet werden, weshalb es sinnvoll ist, für eine formale Betrachtung die Spannung (U), den Strom (I) und die Impedanz (Z) als komplexe Zahlen darzustellen.

Für die Wechselspannung $U(t)$ gilt bei einer Frequenz ω :

$$U(t) = U_0 e^{i\omega t} \quad (\text{Formel 4.1})$$

mit $U(t)$ = Momentanwert der Spannung

U_0 = Spannungsamplitude

ω = Kreisfrequenz ($2\pi f$)

t = Zeit

$i = \sqrt{-1}$

Für den resultierenden Strom folgt:

$$I(t) = I_0 e^{i(\omega t - \varphi)} \quad (\text{Formel 4.2})$$

mit $I(t)$ = Momentanwert der Stromstärke

I_0 = Stromamplitude

φ = Phasenverschiebung zwischen Spannung $U(t)$ und Stromstärke $I(t)$

Die Impedanz ist definiert als Quotient aus Spannung und Stromstärke:

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0 e^{i\omega t}}{I_0 e^{i(\omega t - \varphi)}} = \frac{U_0}{I_0} \cdot e^{i\varphi} = |Z| \cdot e^{i\varphi} \quad (\text{Formel 4.3})$$

Die Impedanz kann in einer Gausschen Zahlenebene dargestellt werden (Abbildung 3-7). Auf der Abszisse befindet sich der Realwert Z' , auch Wirkwiderstand genannt und auf der Ordinate befindet sich der Imaginärteil Z'' , auch Blindwiderstand genannt. Die komplexe Impedanz $|Z|$ entspricht der Länge des Zeigers, während die Phasenverschiebung φ dem Winkel zwischen Zeiger und realer Achse entspricht. Der Zusammenhang zwischen $|Z|$, φ , Z' und Z'' in einer Gausschen Zahlenebene ist in Abbildung 3-7 dargestellt.

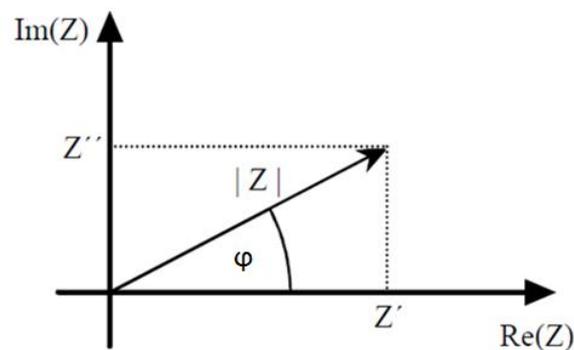


Abbildung 3-7: Darstellung der komplexen Impedanz $|Z|$ in einer Gausschen Zahlenebene.

In einem kartesischen Koordinatensystem lassen sich der Realteil Z' und der Imaginärteil Z'' folgendermaßen ausdrücken:

$$Z = Z' + iZ'' \quad (\text{Formel 4.4})$$

Damit ergeben sich für den Betrag $|Z|$ und die Phasenverschiebung φ folgende Zusammenhänge:

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad (\text{Formel 4.5})$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) \quad (\text{Formel 4.6})$$

3.6.2.2 *Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing*

Theoretischer Hintergrund und Anwendungen

Impedanzmessungen mit adhärenen Zellen können mit dem ECISTM-Model 1600R der Firma Applied BioPhysics durchgeführt werden. *Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing* (ECIS) ist eine automatisierte Methode mit der das Zellverhalten in Echtzeit beobachtet und aufgenommen werden kann. Giaever und Keese haben dieses Verfahren bereits 1984 etabliert [199], [200]. Die Messung beruht auf der Änderung des Wechselstromwiderstandes einer mit Zellen besiedelten, goldbeschichteten Elektrode.

Die zu untersuchenden Zellen werden direkt auf einer Goldelektrode kultiviert, die sowohl als Kultursubstrat als auch als Elektrode für die elektrochemischen Messungen dient. Die dadurch erreichte unmittelbare Nähe zwischen Zellen und Elektrode, ist der Grund für die hohe Sensitivität des Verfahrens. Um die Messungen durchführen zu können, ist ein geschlossener Stromkreis nötig, d.h. zwei Elektroden müssen über das Medium leitend miteinander verbunden sein. Die Impedanz der Gegenelektrode ist hierbei deutlich kleiner als die der Arbeitselektrode und deshalb vernachlässigbar. In Abbildung 3-8 ist das ECIS-Messprinzip schematisch dargestellt.

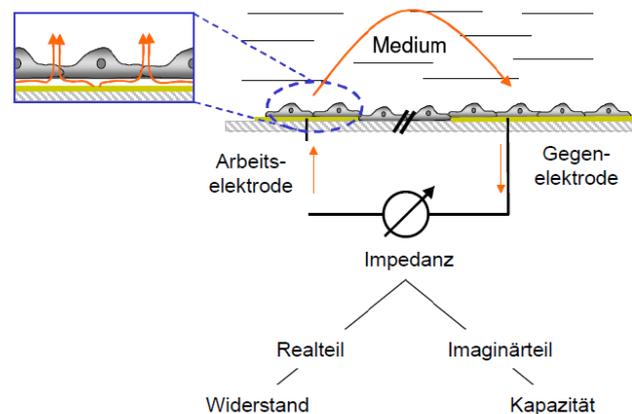


Abbildung 3-8: Schematische Darstellung des ECIS-Messprinzips. Arbeits- und Gegenelektrode sind zur Messung der Impedanz über das Medium verbunden [198].

Die Erhöhung der elektrischen Impedanz einer mit Zellen besiedelten Elektrode im Vergleich zu einer unbesiedelten Elektrode kommt dadurch zustande, dass sich die Zellen auf der Elektrode wie Isolatorpartikel verhalten und den Strom zwingen, um den Zellkörper herumzufließen. Durch die Messung der frequenzabhängigen Impedanz kann zwischen Beiträgen durch Zell-Zell-Kontakt und Zell-Substrat-Kontakt unterschieden werden, da der Strom bei unterschiedlichen Frequenzen auf unterschiedlichen Wegen durch den Zelllayer tritt.

Es können drei Parameter gemessen werden (in Abbildung 3-9 veranschaulicht):

R_b = Der Grenzschichtwiderstand, welcher zwischen 0 und ungefähr $100 \Omega^2$ liegen kann und ein wichtiger Parameter für die Studien von Endothel- und Epithelzellen ist.

α = Der Strom, der zwischen der Zellschicht und der Elektrode fließt.

C_m = Der Wert, der Durchschnittskapazität der Zellplasmamembranen auf einer konfluent mit Zellen besiedelten Elektrode.

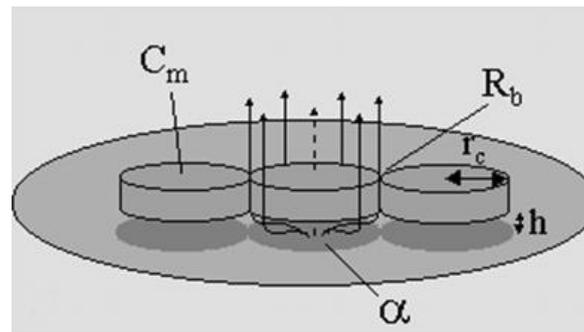


Abbildung 3-9: Schematische Darstellung der mit ECIS möglichen gemessenen Parameter [200].

ECIS kann für viele verschiedene zellbasierende Tests angewandt werden. Es können Zellproliferations- und Migrationstudien [201], [202] sowie Anhaftung und Spreizung von Zellen auf ECM Proteinen gemessen werden [203]. Des Weiteren können Wundheilungs- und Elektroporationen [201], [204] und toxikologische Screenings durchgeführt werden [205]. Eine weitere mit ECIS bestimmbare Größe ist der mögliche zellschädigende Effekt von viralen Infektionen, sowie die Messung des metastatischen Potentials von Tumorzellen [206], [207].

Signal-Transduktionen und *G-protein coupled receptor* screenings (GPCR-screenings) sind ebenfalls schon von einigen Arbeitsgruppen mit Hilfe von ECIS durchgeführt worden [208], [209].

Auswertung der ECIS-Spektren

Zur Auswertung der mit der ECIS-Technik aufgenommenen Impedanzspektren wird das Modell von Giaever und Keese angewandt [200].

Wie schon beschrieben setzen sich die Impedanzbeiträge der Zellschicht aus den drei Parametern α , R_b und C_m zusammen. R_b beschreibt den Widerstand zwischen den Zellen. α drückt die frequenzabhängige Impedanz innerhalb des Zell-Substrat-Kontaktes aus und ist definiert als:

$$\alpha = r_c \left(\frac{\rho}{h} \right)^{0,5} \quad (\text{Formel 4.7})$$

mit r_c = Radius der Zelle

ρ = spezifischer Elektrolytwiderstand im Spalt zwischen Zelle und Substrat

h = Abstand zwischen Zellen und Substrat

C_m ist die spezifische Kapazität der Zellmembran und wird durch deren dielektrischen Eigenschaften und Morphologie beschrieben. Nach Giaever und Keese kann die Impedanz zellbedeckter Goldelektroden wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{1}{Z_{total}} = \frac{1}{Z_n} \cdot \left\{ \frac{Z_n}{Z_n + Z_m} + \frac{\frac{Z_m}{Z_n + Z_m}}{\frac{\gamma r_c}{2} \cdot \frac{I_0(\gamma r_c)}{I_1(\gamma r_c)} + R_b \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \right\} \quad (\text{Formel 4.8})$$

mit $\gamma = \frac{\alpha}{r_c} \cdot \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}}$

mit $Z_m = \frac{1}{i\omega C_m}$

mit Z_n = Impedanz der Elektrode ohne Zellen

Z_m = Impedanz der Plasmamembran

I_0 = modifizierte Besselfunktion erster Art der Ordnung 0

I_1 = modifizierte Besselfunktion erster Art der Ordnung 1

Die iterative Anpassung der Übertragungsfunktion an die gemessenen Impedanzmessungen zur Bestimmung der Parameter R_b , α und C_m erfolgt nach dem Verfahren von Wegener et al. [198]. Die gute Übereinstimmung der experimentell ermittelten Daten und der nach dem Modell angepassten Übertragungsfunktion ist in Abbildung 3-10 dargestellt.

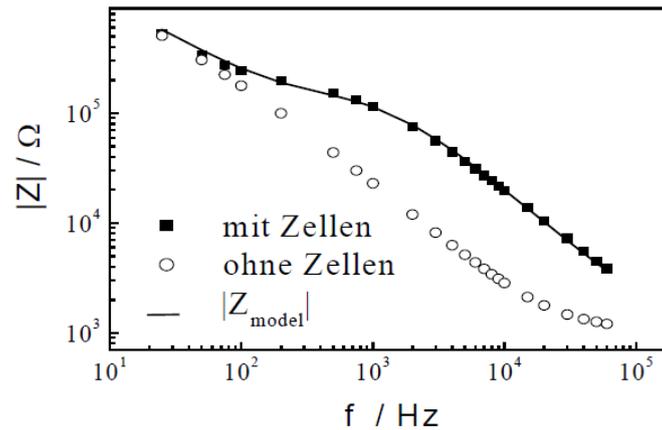


Abbildung 3-10: Impedanzspektrum einer ECIS-Elektrode mit und ohne Zellen. Die durchgezogene Linie repräsentiert die angepasste Übertragungsfunktion [198].

Wie schon beschrieben wird für die quantitative Auswertung eines Impedanzspektrums ein Ersatzschaltbild erstellt, welches anhand von klassischen Bauteilen die elektrischen Eigenschaften des Systems so genau wie möglich beschreibt.

Aus den Parametern R_b , α und C_m des ECIS-Modells und einigen zusätzlichen elektrischen Komponenten, welche die elektrischen Eigenschaften der Elektrode und des Mediums berücksichtigen, lässt sich für das ECIS-Modell eine veranschaulichte Ersatzschaltung erstellen (siehe Abbildung 3-11).

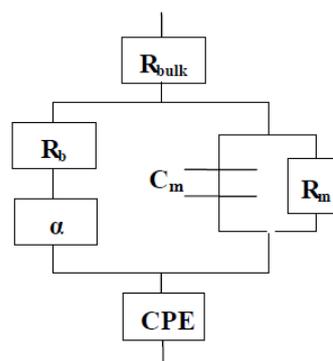


Abbildung 3-11: Schematische Darstellung der Ersatzschaltung einer Zellschicht auf Goldelektroden basierend auf dem Modell von Giaever and Keese (1991). Mit: R_{bulk} = Widerstand der Elektrolytlösung, α = Impedanzelement zur Beschreibung des frequenzabhängigen Impedanzbeitrags aus dem Zell-Substrat-Kontakt, C_m = Kapazität der Plasmamembran, R_m = Membranwiderstand, CPE = konstantes Phasenelement.

Die Ersatzschaltung besteht im wesentlichen aus vier Elementen: (1) den Ohmschen Widerständen mit der Impedanz R und einer Phasenverschiebung von 0 , (2) den Kondensatoren C mit der Impedanz $1/i\omega C$ und einer Phasenverschiebung von $-\pi/2$, (3) den nicht idealen Impedanzbeiträgen durch das konstante Phasenelement CPE und (4) dem Impedanzbeitrag α des Zell-Substrat-Kontaktes.

Das CPE beschreibt die Impedanz an der Grenzfläche der Goldelektrode und der Elektrolytlösung und ist gegeben durch:

$$Z(CPE) = \frac{1}{(i\omega)^n A} \quad (\text{Formel 4.9})$$

Für die Phasenverschiebung φ gilt dementsprechend:

$$\varphi(CPE) = -n \frac{\pi}{2} \quad (\text{Formel 4.10})$$

mit $n = [0,1]$

Die Frequenzabhängigkeit der Impedanz wird entscheidend vom Parameter n bestimmt und liegt zwischen dem eines Ohmschen Widerstands ($n = 0$, $R = 1/A$) und eines idealen Kondensators ($n = 1$, $C = A$). Die elektrischen Eigenschaften des Kulturmediums werden durch R_{bulk} beschrieben und die elektrischen Eigenschaften der Zellmonolayer werden durch den Kondensator mit der Kapazität C_m , dem Ohmschen Widerstand R_b und durch die frequenzabhängige Konstante α dargestellt.

3.6.3 Zelltod

Über *Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing* kann eine Aussage über lebende und tote Zellen gemacht werden, aber nicht ohne weiteres die Unterschiede des Zelltodes bestimmt werden. Im Folgenden werden die Mechanismen des Zelltodes erläutert.

Der Zelltod ist ein irreversibler Prozess der Zelle, welcher sich durch das Erlöschen des Stoffwechsels, sowie der morphologischen Integrität der Zelle auszeichnet. Dabei wird zwischen zwei Formen des Zelltods unterschieden: der Apoptose, dem programmiertem Zelltod und der Nekrose, dem „zufälligen“ Zelltod.

Die Apoptose ist ein programmierter und geregelt ablaufender Prozess. Sie wurde erstmals 1972 von Kerr et al. beschrieben [210]. Bei der Apoptose verändert die Zelle ihre Morphologie. Zunächst separiert sich die Zelle aus dem Zellverband, was zu einer Verringerung des Zytoplasmas führt und eine Schrumpfung des Zellkerns bedingt. Durch Kondensation von Chromatin im Zellkern kommt es zur systematischen Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen. Anschließend zerfällt die Zelle durch Ausstülpungen an der Zytoplasmamembran, in kleine membranumhüllte Vesikel, *apoptotic bodies* genannt. Im Gegensatz zur Nekrose entstehen bei der Apoptose keine zusätzlichen Schädigungen des umliegenden Gewebes, da die *apoptotic bodies* durch Phagozytose beseitigt werden.

Die Induzierung von Apoptose kann über zahlreiche Wege erfolgen, man unterscheidet jedoch grundsätzlich zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Weg. Beim extrinsischen Weg wird die Apoptose durch die Bindung eines spezifischen Liganden an einen der sogenannten Todesrezeptoren ausgelöst [211]. Bindet einer dieser Liganden an einen Rezeptor, kommt es zur Oligomerisierung des Rezeptors wodurch Brückenproteine, wie z.B. FADD, an die intrazelluläre Todesdomäne des Rezeptors binden können. Es kommt zur Spaltung von Procaspase-8 in ihre aktive Caspase-8-Form, an den aus Brückenprotein und Todesdomäne gebildeten Komplexen, auch DISC (*death inducing signaling complex*) genannt [212]. Durch Entstehung aktiver Caspase-8 wird die Caspase-Kaskade ausgelöst, deren zentrales Enzym die Effektorcaspase ist, und die anschließend über die Aktivierung verschiedener Faktoren in einer DNA-Fragmentierung und morphologischer Änderung resultiert.

Wird die Apoptose über den intrinsischen Weg ausgelöst, lösen Apoptosestimuli verschiedener zellinterner Ursprünge den Austritt von Cytochrom c und einigen anderen Molekülen aus den Mitochondrien aus. Zusammen mit dem Protein APAF-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*), ATP und Procaspase-9 bildet Cytochrom c das Apoptosom, welches für die Aktivierung von Caspase-9 und die daraus resultierende Aktivierung der Caspase 3. Zusätzlich wird die Aktivität von Apoptose inhibierenden Proteinen (IAP) durch die Freisetzung des Smac/Diablo-Komplexes (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pl*) aus den Mitochondrien verhindert [213], [214].

Eine weitere Möglichkeit zur Auslösung von Apoptose kann auf Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER), z.B. eine Störung des Calciumgehaltes einer

Zelle, zurückzuführen sein [215], [216]. Bei ER-Stress kommt es zu einer Anhäufung von falsch gefalteten Proteinen, was zu einer Verringerung der Proteinsynthese, sowie der erhöhten Produktion von Chaperonen führt. Bei nicht ausreichendem Ausgleich dieser Fehlfaltungen durch die Zelle kommt es am ER durch Homodimerisierung und anschließender proteolytischer Spaltung zur Aktivierung von Procaspase-12 [217]. Anschließend wird durch Caspase-12 Caspase-9 aktiviert und somit der gleiche Apoptoseweg wie bei der Mitochondrien-vermittelten Apoptose eingeschlagen [218]. Das finale Stadium der Apoptose wird durch die proteolytische Aktivität der Caspase-3, sowie weiterer Effektorcaspasen gestartet. Durch Caspase-3 wird die caspaseabhängige DNase, die für die Fragmentierung der DNA zuständig ist durch die Spaltung von ICAD, dem Inhibitor von CAD, aktiviert. Die Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerase (PARP), welche für die Initiierung von DNA Reparaturvorgängen nötig ist, wird ebenfalls durch Caspase-3 gespalten. Die Aktivität der Caspase trägt durch die Spaltung der Proteine Laminin A und C, welche für die Stabilität der Kernmembran wichtig sind, zur Destabilisierung des Zellkerns bei [219]. Diese Vorgänge, sowie eine Reihe weiterer komplexer Abläufe führen zum Abbau der nuklearen DNA und zur Abschnürung von Vesikeln, die charakteristisch für die Apoptose sind.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose zum Anschwellen des Zellkerns und der Zelle selbst und einer darauffolgenden Entzündungsreaktion. Die Ursache für Nekrose ist pathologisch, sie wird z.B. durch starke letale Toxizität oder ein Zelltrauma, wie Nähr- oder Sauerstoffmangel verursacht. Es folgt eine Zerstörung der Zellorganellen, sowie der Zellmembran, wohingegen an der Zelloberfläche keine Veränderungen stattfinden. Es kommt zu einer Zerstörung der DNA und dem Verlust der Regulation der Ionenhomeostase. In Abbildung 3-12 ist der Vergleich zwischen Apoptose und Nekrose schematisch dargestellt.

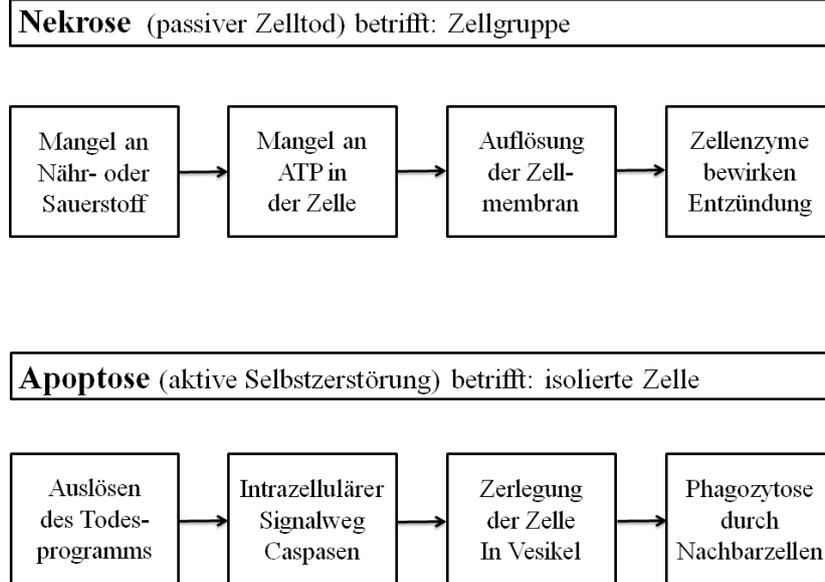


Abbildung 3-12: Vergleich von Apoptose und Nekrose.

4 Experimenteller Teil

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Titandioxid-, Zinkoxid- und Silbernanopartikel auf ihre Toxizität auf unterschiedliche Zelllinien sowie Primärzellen untersucht. Um den hervorgerufenen Effekt der Partikel auf die Zellen den Partikeln selbst und nicht eventuell herausgelösten Ionen zuzuschreiben werden Zn^{2+} und Ag^+ -Ionen in der gleichen Konzentrationen getestet. Dazu wurden zunächst die Größen der Partikel über DLS-Messungen und REM-Aufnahmen bestimmt (Abschnitt 4.3). Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen nach Kultivierung mit Partikeln wurde der MTT-Test angewandt. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und NOAEC (*No Observed Adverse Effect Concentration*), TLC (*Total Lethal Concentration*) und IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50 %*) berechnet (Abschnitt 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3). Des Weiteren wurden *Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing* Messungen der mit Partikeln kultivierten Zellen durchgeführt (Abschnitt 4.4.4). Um den Einfluss der Exposition von Partikeln als Suspension oder Aerosol zu bestimmen wurden Zellkulturuntersuchungen mit dem Cultex[®] Radial Flow System durchgeführt (Abschnitt 4.4.5). Der Vergleich der Toxizität der Partikel auf 2D, bzw. 3D-strukturierte Zellkulturen wurde ebenfalls untersucht (Abschnitt 4.4.6). Es wurde der durch Partikel ausgelöste oxidative Stress der Zellen bestimmt (Abschnitt 4.5). Zur Bestimmung der Art des Zelltodes der mit Partikeln kultivierten Zellen wurde die Freisetzung von LDH (Abschnitt 4.6.1), die Caspase3/7-Aktivität bestimmt (Abschnitt 4.6.2) sowie durchflusszytometrische Methoden angewandt (Abschnitt 4.6.3). Die DNA-Schädigung von Zellen inkubiert mit Partikeln wurde über den Komet-Assay bestimmt (Abschnitt 6.14).

4.1 Auswahl der Zelllinien

Aufgrund der möglichen Aufnahmewege von Nanomaterialien in den Organismus über die Lunge, den Magen-Darm-Trakt und die Haut, und der möglichen Anreicherungen von in den Körper aufgenommenen Nanopartikeln in der Niere und in der Leber wurden für die Toxizitätsuntersuchungen folgende Zelllinien und Primärzellen ausgewählt: A-549, NIH-3T3, CACO-2, HEP-G2, PC-12, HELA, MSC aus Nabelschnur (uc-MSC) und Fett (ad-MSC). Die Herkunft der Zelllinien, sowie die

Medienzusammensetzung und Kultivierung ist in Abschnitt 6.2 beschrieben. Die verwendeten MSC wurden nach den Protokollen in Abschnitt 6.2.2.1 aus Nabelschnur und in Abschnitt 6.2.2.2 aus Fettgewebe isoliert.

Tabelle 4-1: Verwendete Zellen und deren Ursprung.

Zelle	Ursprung
NIH-3T3	Haut
A-549	Lunge
HEP-G2	Leber
PC-12	Niere
CACO-2	Darm
HELA	Eierstock
Stammzellen	Fettgewebe (im Folgenden mit ad-MSC bezeichnet) Nabelschnur (im Folgenden uc-MSC bezeichnet)

4.2 Untersuchte Partikel

Silbernanopartikel

Die Silbernanopartikel wurden am Institute of Nuclear Physics in Tashkent, Usbekistan, synthetisiert. Die Generation von Silberionen aus reinen Silberelektroden erfolgt bei 12 V [220] und über eine Elektroreduktion in 3 Phasen erhält man eine wässrige kolloidale Silberlösung [221]. Die Bestimmung der Partikel- und Ionenkonzentration der Lösung erfolgte über Neutronenaktivierungsanalyse (NAA) [222].

ZnO-Nanopartikel

Die undotierten ZnO-Partikel sowie die mit 2 % Co, 2 % Mn, 3 % Ag, 5 % Ag, 3 % Sb und 7 % Al dotierten ZnO-Partikel wurden von der Firma IBUtec im Rahmen des BMBF- Projektes HelioClean (Projektnummer: 03X0069F) synthetisiert. Die Partikel sollen Anwendungen in der Bau- und Farbindustrie als Zusatz zu Farben und Zement sowie als Beschichtung für Dachziegel Einsatz finden. Die Dotierungen sollen die

Bandlücke der ZnO-Partikel verschieben und diese photokatalytisch aktiver machen, bzw. Photokatalyse im sichtbaren Bereich ermöglichen.

TiO₂-Nanopartikel

Die Titandioxidpartikel wurden von Hanan Mohammed im Rahmen ihrer Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Bahnemann am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover synthetisiert und charakterisiert. Es handelt sich um Partikel, die als reine Anatas-Struktur vorliegen und eine Größe von 2 nm besitzen [223], [224].

Die unterschiedlichen Lösungen 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6 % TiO₂ sind ebenfalls im Rahmen des BMBF Projektes HelioClean (Projektnummer: 03X0069F) synthetisierte Lösungen und wurden schon in ersten Vorversuche für die Beschichtung von Dachziegeln angewandt. Sie basieren auf wässrigen Lösungen und die jeweils angegebene Prozentzahl steht für die Zugabe der Substanz in Form von Nanopartikeln.

4.3 Bestimmung der Partikelgröße

Die Partikelgrößen der untersuchten Nanopartikel wurden mittels REM-Aufnahmen (Beschreibung in Abschnitt 6.4) und die hydrodynamischen Durchmesser mit *Dynamic Light Scattering* Messungen (DLS) (Beschreibung in Abschnitt 6.3) bestimmt. Die DLS-Messungen wurden in Wasser und in der gleichen Partikelkonzentration im entsprechenden Medium der jeweiligen Zelllinie durchgeführt.

Silber

In Abbildung 4-1 sind die Ergebnisse der DLS-Messungen von Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm in Wasser (A) und in einer Konzentration von 10 ppm in DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S (B) gezeigt. Auf die graphische Darstellung der DLS-Messungen von Silbernanopartikeln in den anderen verwendeten Zellkulturmedien wurde verzichtet. In Tabelle 4-2 sind die hydrodynamischen Durchmesser [nm] der Silbernanopartikel in einer Konzentration von 10 ppm in den

entsprechenden Zellkulturmedien und Zusätzen aufgelistet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel im Medium (6 ± 2 nm) wesentlich geringer sind als die in reinem Wasser (110 ± 10 nm), wobei der Medienzusatz keinen Einfluss auf die Größe hat. Die im Medium enthaltenen Proteine stabilisieren die Partikel, indem sie eine Hülle um die Partikel ausbilden und somit eine Aggregation und Agglomeration verhindern.

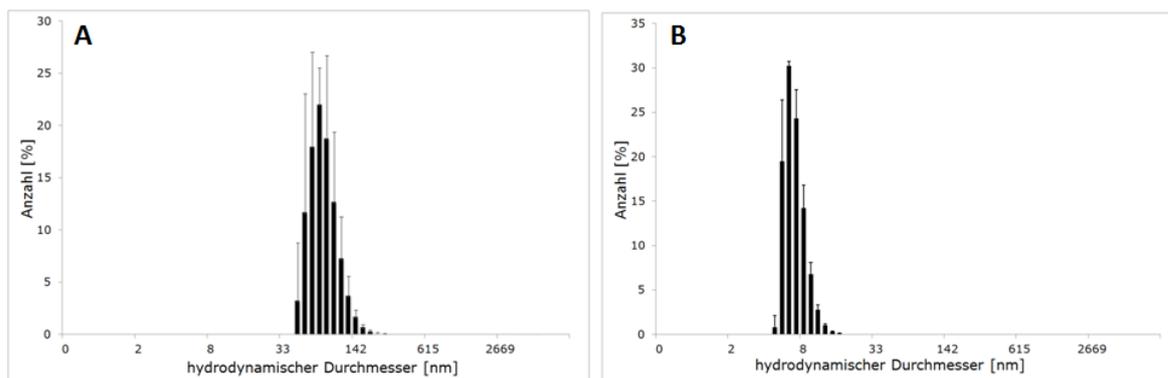


Abbildung 4-1: DLS-Messungen von Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm in Wasser (A) und in einer Konzentration von 10 ppm in DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S (B).

Tabelle 4-2: Hydrodynamische Durchmesser [nm] der Silbernanopartikel in einer Konzentration von 10 ppm in den angegebenen Lösungen.

	Wasser	10 % FKS	10 % NKS	10 % HOS	MEM
				5 % FKS	20 % FKS
hydrodynamischer Durchmesser [nm]	110 ± 10	6 ± 2	6 ± 2	6 ± 2	5 ± 1

Zinkoxid

Die Ergebnisse der DLS-Messungen von ZnO-Partikeln in einer Konzentration von 50 ppm in Wasser (A) und in einer Konzentration von 50 ppm in DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S (B) sind in Abbildung 4-2 dargestellt. Auch hier wurde auf die graphische Darstellung aller DLS-Messungen der ZnO-Partikel und dotierten ZnO-Partikel in den verwendeten Medien und Zusätzen verzichtet. Die Ergebnisse in Tabelle 4-3 aufgelistet. Die Partikel werden auch hier von den im Medium enthaltenen Proteinen stabilisiert, wobei die verschiedenen Seren keinen Einfluss auf den hydrodynamischen

Durchmesser haben. Reine, undotierte ZnO-Partikel weisen in Wasser den kleinsten hydrodynamischen Durchmesser auf (14 ± 3 nm), wohingegen die mit 2 % Mn dotierten ZnO-Partikel in Wasser mit einem Durchmesser von 34 ± 6 nm den größten Durchmesser besitzen. Die Dotierung scheint einen Einfluss auf die hydrodynamischen Durchmesser in reinem Wasser zu haben, wobei ein Einfluss der Dotierung auf die Durchmesser im Medium nicht erkennbar ist.

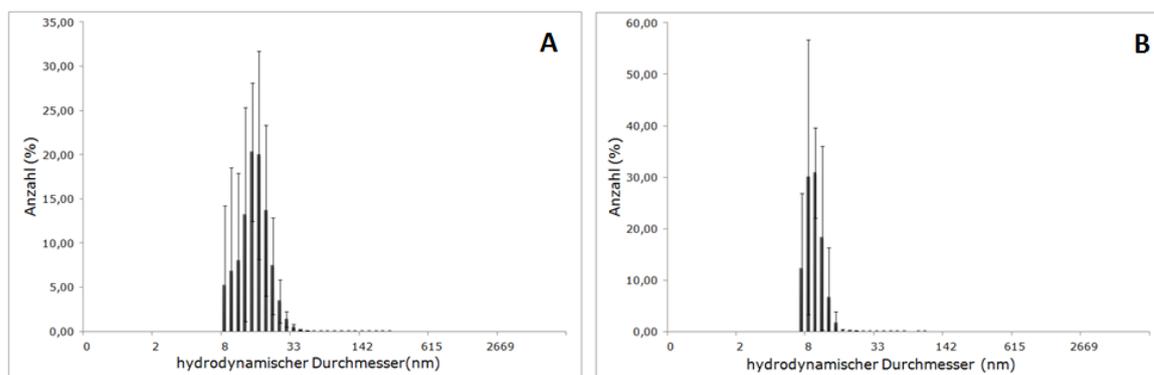


Abbildung 4-2: DLS-Messungen von ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm in Wasser (A) und in einer Konzentration von 50 ppm in DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S (B).

Tabelle 4-3: Hydrodynamische Durchmesser und über REM bestimmte Partikelgrößen der undotierten ZnO-, sowie der dotierten ZnO-Nanopartikel (angegeben in nm) in einer Konzentration von 50 ppm in den angegebenen Lösungen.

	REM	Wasser	10 % FKS	10 % NKS	10 % HOS 5 % FKS	MEM 20 % FKS
ZnO	16 ± 3	14 ± 3	9 ± 2	9 ± 2	7 ± 3	7 ± 2
ZnO (2 % Co)	12 ± 2	21 ± 3	9 ± 2	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1
ZnO (2 % Mn)	12 ± 2	34 ± 6	7 ± 2	9 ± 2	6 ± 1	6 ± 1
ZnO (5 % Ag)	14 ± 3	25 ± 2	8 ± 2	8 ± 2	7 ± 1	7 ± 1
ZnO (3 % Ag)	14 ± 3	27 ± 3	9 ± 2	9 ± 2	7 ± 1	7 ± 1
ZnO (3 % Sb)	11 ± 2	31 ± 4	8 ± 2	8 ± 2	7 ± 1	7 ± 1
ZnO (7 % Al)	10 ± 2	22 ± 3	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 2	6 ± 2

In Abbildung 4-3 sind REM-Aufnahmen von ZnO-Partikeln (A), ZnO-Partikeln dotiert mit 2 % Co (B), mit 2 % Mn (C), mit 3 % Ag (D), 5 % Ag (E), 3 % Sb (F) und mit 7 % Al (G) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Partikelgrößen im gleichen Bereich liegen und die Partikel wenig agglomeriert und aggregiert vorliegen. Die aus den REM-Aufnahmen bestimmten Partikelgrößen sind ebenfalls in Tabelle 4-3 aufgelistet. Hier zeigt sich, dass die reinen undotierten ZnO-Partikel größer sind als die dotierten ZnO-Partikel, im Gegensatz zu dem über DLS-Messungen bestimmten hydrodynamischen Durchmesser. Die dotierten, sowie undotierten ZnO-Partikel liegen im Größenbereich zwischen 8 und 19 nm.

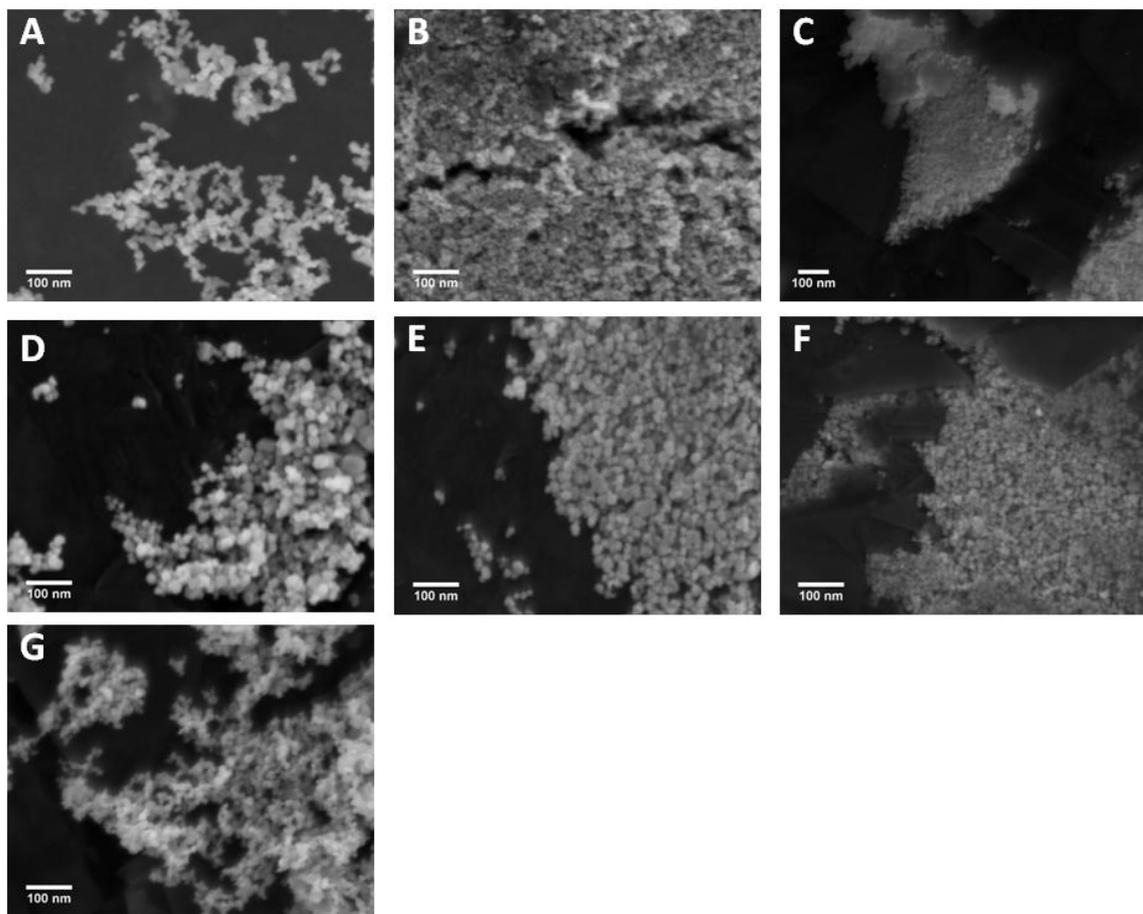


Abbildung 4-3: REM-Aufnahmen von ZnO Partikeln (A), ZnO Partikeln dotiert mit 2 % Co (B), dotiert mit 2 % Mn (C), dotiert mit 3 % Ag (D), dotiert mit 5 % Ag (E), dotiert mit 3 % Sb (F) and dotiert mit 7 % Al (G).

4.4 Viabilität

Der toxische Effekt der unterschiedlichen Nanopartikel auf die verschiedenen Zellen wurde über die Bestimmung der Viabilität der Zellen nach Nanopartikelzugabe im Vergleich zur Viabilität von Zellen kultiviert in Normalmedium bestimmt.

Die Viabilitäten wurden über den MTT-Test ermittelt. Die Durchführung ist in Abschnitt 6.5 beschrieben. Jedes Einzelerperiment wurde hier 3-mal, jeweils in einer 5-fach-Bestimmung durchgeführt. Aus den aus dem MTT-Test erhaltenen Ergebnissen werden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und *No Observed Adverse Effect Concentration* (NOAEC), *Inhibitory Concentration (50)* (IC₅₀), und *Total Lethal Concentration* (TLC) nach den in Abschnitt 6.6 beschriebenen Formeln berechnet. Die NOAEC wurde definiert als Konzentration, bei der noch 95 % der Zellen viabel sind, die TLC als Konzentration bei der noch 5 % der Zellen viabel sind und die IC₅₀ als die Konzentration bei der 50 % der Zellen viabel sind.

Die Berechnung der Dosis-Wirkungskurven erfolgte jeweils mit Gleichungen. Die über die Formel 6.2 berechneten Kurven zeigten jedoch keine sehr guten Übereinstimmungen mit den experimentell ermittelten Viabilitäten (Darstellung nicht gezeigt). Formel 6.1 stimmte für alle untersuchten Nanopartikel und Ionen auf alle Zelllinien besser mit den experimentellen Daten überein und wurde deshalb für die Berechnungen verwendet. Die IC₅₀ ergab sich aus der Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven, und die NOAEC wurden mit Formel 6.3 und die TLC entsprechend mit Formel 6.5 berechnet. In den folgenden Diagrammen wurde auf die Darstellung der mit Formel 6.2 berechneten Kurven verzichtet und nur die mit Formel 6.1 extrapolierten Werte gezeigt.

4.4.1 Silber

In Abbildung 4-4 sind die Viabilitäten von A-549-Zellen kultiviert mit verschiedenen Konzentrationen an Silbernanopartikeln im Medium dargestellt. Die Viabilitäten sind auf 1 (Viabilität der Zellen in Normalmedium) normiert. Bei Zugabe von 10, 20 und 25 ppm an Silbernanopartikel im Medium weichen die Viabilitäten der Zellen signifikant von der der Zellen kultiviert in Medium ohne Partikelzusatz ab.

Bei Kultivierung von A-549-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Silberionen im Medium weichen nur die Viabilitäten der Zellen, die mit 25 und 50 ppm versetzt wurden signifikant von der Referenz (Zellen kultiviert in Normalmedium) ab (Abbildung 4-5).

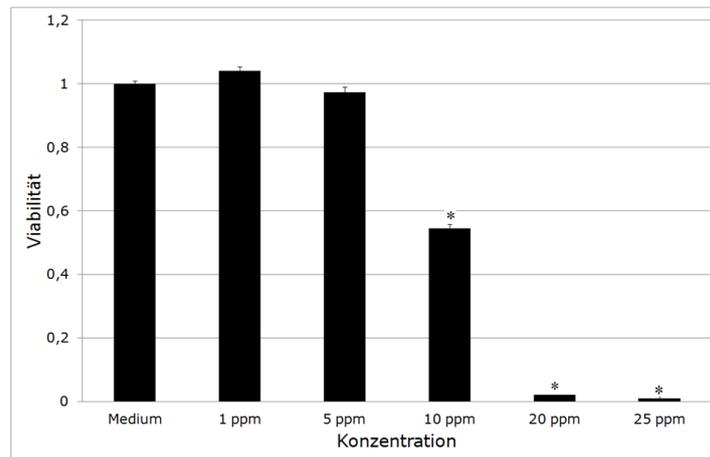


Abbildung 4-4: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet.

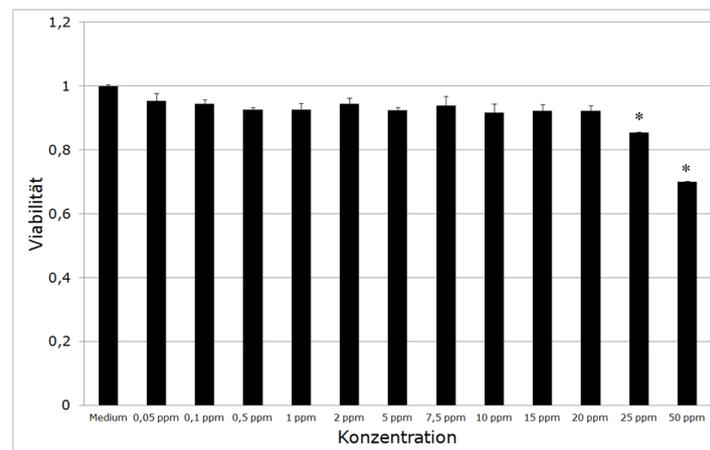


Abbildung 4-5: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen kultiviert mit Silber-Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet.

Die aus Abbildung 4-4 und Abbildung 4-5 ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurven von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln und Silberionen sind in Abbildung 4-6 (A) gezeigt. Auf die graphische Darstellung der Viabilitäten von NIH-3T3-Zellen, HEP-G2-Zellen und PC-12-Zellen kultiviert mit Silberpartikeln und Silberionen als im Säulendiagramm wurde verzichtet und nur die daraus ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven in Abbildung 4-6 dargestellt. Es ist deutlich, dass die mit Formel 6.1 berechneten Dosis-Wirkungs-Kurven eine sehr gute Übereinstimmung zu den experimentell bestimmten Viabilitäten zeigen.

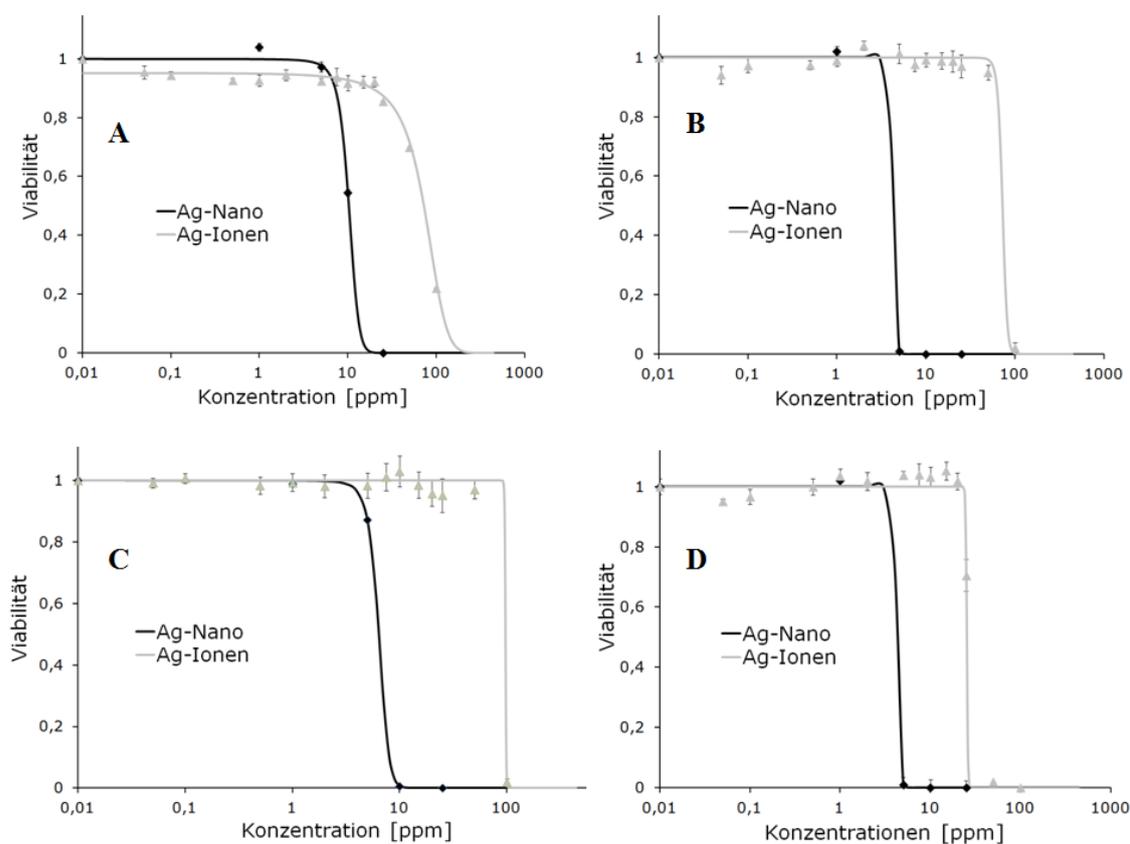


Abbildung 4-6: Dosis-Wirkungs-Kurven, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D) kultiviert mit Silbernanopartikeln und Silberionen.

Die aus den Dosis-Wirkungs-Kurven berechneten NOAEC, IC_{50} und TLC von A-549-, NIH-3T3-, HEP-G2- und PC-12-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln und Silberionen sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst. Aus den Kurven in Abbildung 4-6 und anhand der berechneten Werte in Tabelle 4-4 ist erkennbar, dass Silbernanopartikel auf alle Zelllinien in geringeren Konzentrationen toxisch wirken

als Silberionen. PC-12-Zellen und NIH-3T3-Zellen zeigen den größten Effekt bei Kultivierung mit Silbernanopartikeln, die TLC liegen bei 5 ppm, wohingegen die TLC für HEP-G2-Zellen bei 9 ppm und für A-549-Zellen bei 14 ppm liegen. Am empfindlichsten auf den Zusatz von Silberionen im Medium reagieren die PC-12-Zellen, hier liegt die TLC bei 26 ppm. Am wenigsten empfindlich reagieren die HEP-G2 Zellen (TLC = 144 ppm).

Tabelle 4-4: NOAEC, IC₅₀, und TLC für A-549-, NIH-3T3-, HEP-G2- und PC-12-Zellen kultiviert mit Silber-Nanopartikeln und Silberionen.

	Silbernanopartikel			Silberionen		
	NOAEC	IC ₅₀	TLC	NOAEC	IC ₅₀	TLC
A-549	6 ppm	10 ppm	14 ppm	19 ppm	72 ppm	144 ppm
NIH-3T3	3 ppm	4 ppm	5 ppm	59 ppm	72 ppm	86 ppm
HEP-G2	4 ppm	6 ppm	9 ppm	94 ppm	97 ppm	99 ppm
PC-12	3 ppm	4 ppm	5 ppm	24 ppm	25 ppm	26 ppm

Kultiviert man primäre Zellen mit Silbernanopartikeln und Silberionen als Zusatz im Medium zeigt sich ein ähnliches Ergebnis. Die Dosis-Wirkungs-Kurven von uc-MSK (A) und ad-MSK (B) sind in Abbildung 4-7 gezeigt. Die Kurvenverläufe der mit Partikeln und Ionen kultivierten Nabelschnurzellen zeigen eine sehr ähnlichen Verlauf, wie die der Zelllinien (Abbildung 4-6), während der Kurvenverlauf der ad-MSK zeigt, dass die Ionen in geringeren Konzentrationen eine toxische Wirkung auf die Zellen haben als die Partikel. Dieses Ergebnis wird durch die berechneten NOAEC, IC₅₀ und TLC, gezeigt in Tabelle 4-5, bestätigt. Die TLC für die uc-MSK kultiviert mit Partikeln liegt bei 26 ppm und für die ad-MSK bei 9 ppm. Die TLC für die mesenchymalen Stammzellen kultiviert mit Silberionen liegen jedoch nicht in der gleichen Größenordnung, 61 ppm für uc-MSK und 6 ppm für die ad-MSK.

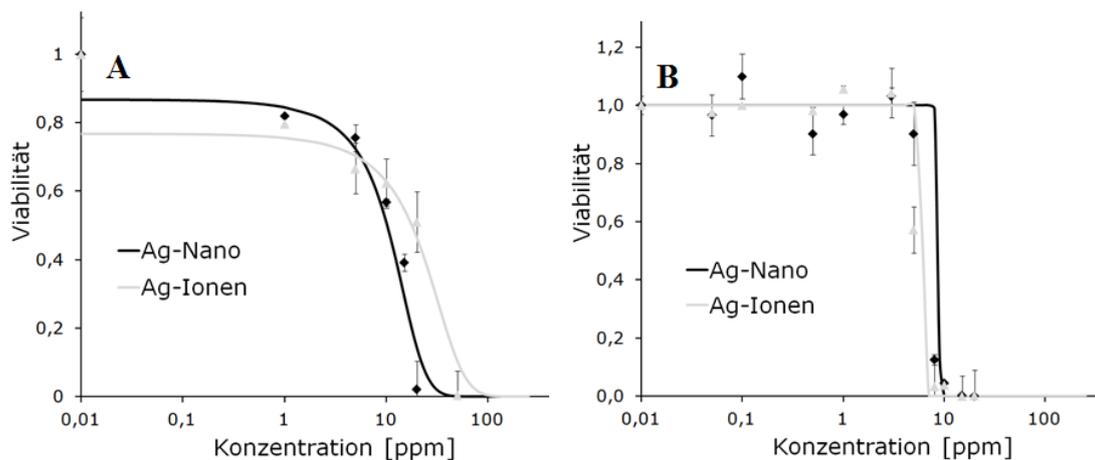


Abbildung 4-7: Dosis-Wirkungs-Kurven von uc-MSC(A) und ad-MSC (B) kultiviert mit Silbernanopartikeln und Silberionen.

Tabelle 4-5: NOAEC, IC₅₀ und TLC von mesenchymalen Stammzellen kultiviert mit Silbernanopartikeln und Silberionen.

	Silbernanopartikel			Silberionen		
	NOAEC	IC ₅₀	TLC	NOAEC	IC ₅₀	TLC
uc-MSC	6ppm	10 ppm	26 ppm	10 ppm	18 ppm	61 ppm
ad-MSC	7 ppm	8 ppm	9 ppm	4 ppm	5 ppm	6 ppm

Fazit:

Die Silbernanopartikel hatten auf alle untersuchten Zelllinien in geringeren Konzentrationen eine toxische Wirkung als die Silberionen. Es lässt sich eine folgende Abstufung in der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Partikel aufstellen: NIH-3T3, PC-12 (TLC = 5 ppm) > HEP-G2 (TLC = 9 ppm) > A-549 (TLC = 14 ppm).

Die Abstufungen in der Empfindlichkeit gegenüber Ag⁺-Ionen auf die Zelllinien ergibt sich zu: PC-12 (TLC = 20 ppm) > NIH-3T3 (TLC = 86 ppm) > HEP-G2 (TLC = 99 ppm) > A-549 (TLC = 144 ppm). Das bedeutet, dass die Partikel auf die PC-12-Zellen 5-mal, auf die A-549- und HEP-G2-Zellen 10-mal und auf die NIH-3T3-Zellen 17 –mal toxischer wirken als Ag⁺-Ionen.

Die toxische Wirkung der Partikel auf die uc-MSC ist 2-3-mal höher, als die der Ionen, wobei die Zellen nicht wie erwartet empfindlicher als die Zelllinien auf Zugabe von Partikeln und Ionen reagieren, sondern bei Zugabe von Partikeln höhere TLC zeigen. Auf die ad-MSC haben die Partikel und Ionen etwa in der gleichen Konzentration einen toxischen Effekt. Die TLC liegt bei Zugabe von Partikeln bei 9 ppm und bei Zugabe von Ionen sogar etwas niedriger bei 6 ppm. Die ad-MSC reagierten von allen untersuchten Zelltypen wesentlich empfindlicher auf die Kultivierung mit Silberionen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Zellen kultiviert mit den Partikeln nicht aufgrund von herausgelösten Ionen aus den Partikeln sterben, sondern die Partikel selbst den toxischen Effekt auslösen.

4.4.2 Zinkoxid

Ebenso wie für die Silberpartikel und Silberionen wurden auch für die ZnO-Partikel und Zn^{2+} -Ionen die Viabilitäten der Zellen nach Kultivierung mit Partikel und Ionen bestimmt.

In Abbildung 4-8 sind die Viabilitäten von A-549-Zellen kultiviert mit unterschiedlichen Konzentrationen an ZnO-Nanopartikeln dargestellt. Bei Zugabe ab Konzentrationen von 15 ppm und höher sind die Viabilitäten signifikant niedriger als die von Zellen kultiviert in Normalmedium (normiert auf 1). Bei Zugabe von Partikeln in Konzentrationen ab 30 ppm im Medium sind keine viablen Zellen mehr erkennbar. Ebenfalls signifikant geringere Viabilitäten weisen die Zellen kultiviert mit Konzentrationen von 0,01 und 0,1 ppm an ZnO-Partikeln im Medium auf, wobei dieses auf einen Fehler beim Ausplattieren der Zellen oder auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sein muss.

Die Viabilitäten von A-549-Zellen kultiviert mit unterschiedlichen Zn^{2+} -Ionen im Kulturmedium sind in Abbildung 4-9 gezeigt. Ab einer Zugabe von Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen von 50 ppm im Medium sind keine viable Zellen mehr zu erkennen und bei Zugabe von 30 ppm Zn^{2+} ist die Viabilität signifikant geringer als die der Referenz. Die signifikant geringeren Viabilitäten der Zellen bei Kultivierung mit 0,1 und 0,5 ppm im Vergleich zur Referenz müssen auch hier auf Schwankungen der Zellzahl beim Besiedeln der Platten oder auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sein.

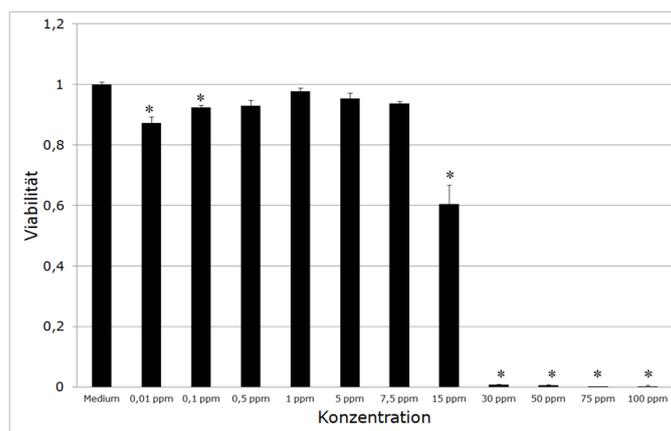


Abbildung 4-8: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet.

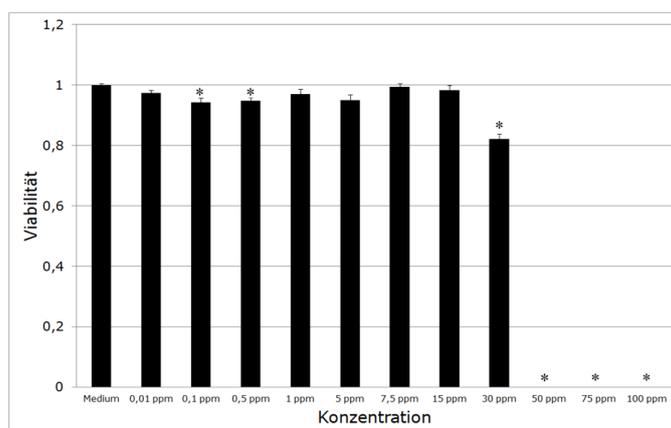


Abbildung 4-9: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen kultiviert mit Zn^{2+} -Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet.

Aus den Ergebnissen des MTT-Tests der A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln (Abbildung 4-8) und mit Zn^{2+} -Ionen (Abbildung 4-9) lassen sich Dosis-Wirkungs-Kurven berechnen, welche in Abbildung 4-10 (A) gezeigt sind. Auf die Darstellung der Ergebnisse des MTT-Test von NIH-3T3-, HEP-G2-, PC-12-, HELA- und

CACO-2-Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen mit unterschiedlichen Konzentrationen im Säulendiagramm wurde verzichtet und lediglich die daraus ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven in Abbildung 4-10 (B-F) aufgetragen. Anhand der Kurven lässt sich erkennen, dass die ZnO-Partikel auf alle verwendeten Zelllinien in geringeren Konzentrationen toxisch wirken als die Zn^{2+} -Ionen und dieser Effekt am deutlichsten bei den NIH-3T3-Zellen zu beobachten ist.

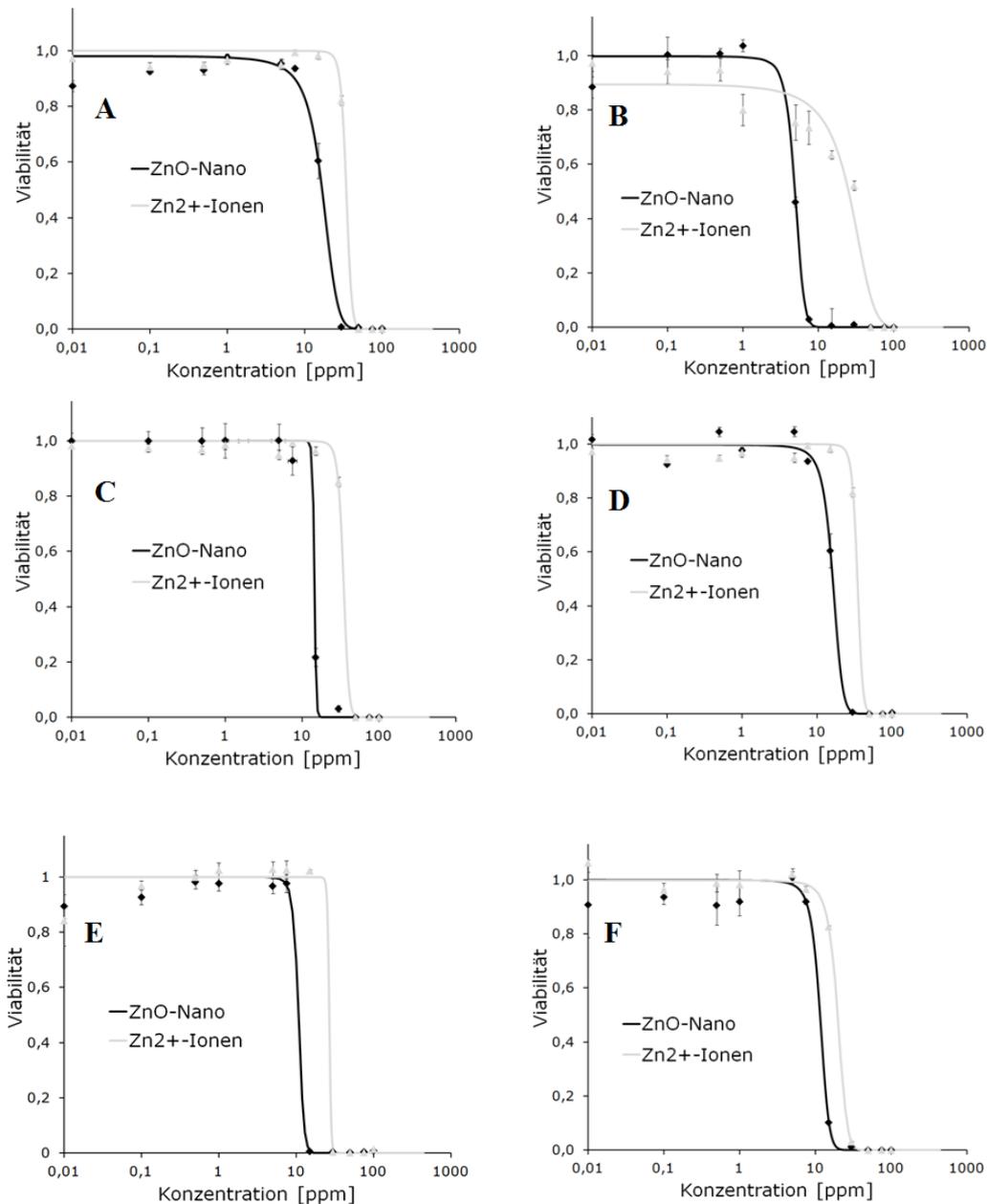


Abbildung 4-10: Dosis-Wirkungs-Kurven von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E), CACO-2-Zellen (F) kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln und Zn^{2+} -Ionen.

In Abbildung 4-11 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von uc-MSC (A) und ad-MSC (B) kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen gezeigt. Der Kurvenverlauf zeigt, dass die Partikel auch auf die Nabelschnurzellen und die ad-MSC einen stärkeren toxischen Effekt haben als die Zn²⁺-Ionen.

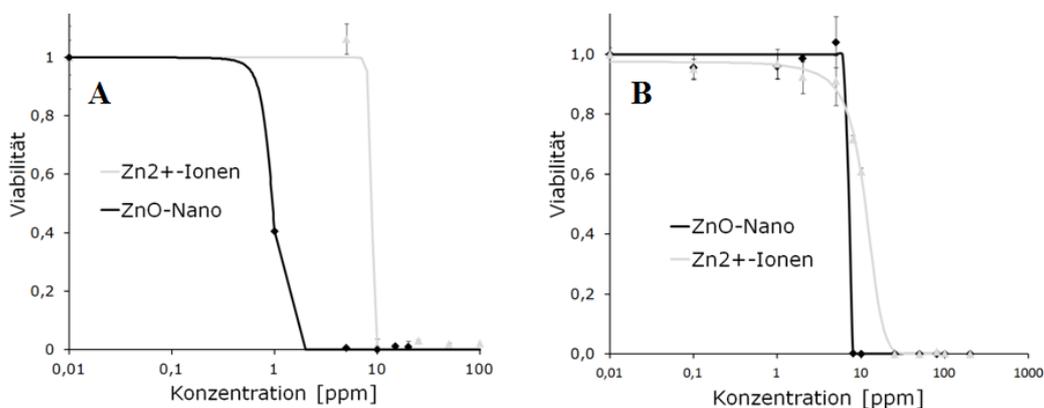


Abbildung 4-11: Dosis-Wirkungs-Kurven von uc-MSC (A), ad-MSC (B) kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

Anhand der berechneten Konzentrationen, gezeigt in Tabelle 4-6, wird deutlich, dass die ZnO-Partikel etwa 10-mal toxischer auf die Nabelschnurzellen wirken als die Zn²⁺-Ionen. Bei Kultivierung von ad-MSC mit ZnO-Partikeln zeigt sich, dass die IC₅₀ (7 ppm) etwas geringer ist als die der Zellen kultiviert mit Zn²⁺-Ionen (11 ppm), die TLC (8 ppm) im Vergleich zu (20 ppm) ebenfalls geringer ist, die NOAEC für Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln (6 ppm) aber höher ist als die von Zellen versetzt mit Zn²⁺-Ionen (2 ppm). Der toxische Schwellenbereich für ZnO-Partikel liegt demnach enger als der von Zn²⁺-Ionen.

Tabelle 4-6: NOAEC, IC₅₀ und TLC von mesenchymalen Stammzellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

	ZnO-Nanopartikel			Zn ²⁺ -Ionen		
	NOAEC	IC ₅₀	TLC	NOAEC	IC ₅₀	TLC
uc-MSC	0,6 ppm	1 ppm	1,3 ppm	8 ppm	9 ppm	10 ppm
ad-MSC	6 ppm	7 ppm	8 ppm	2 ppm	11 ppm	20 ppm

In Abbildung 4-12 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von A-549 (A)-, NIH-3T3 (B)-, HEP-G2 (C)-, PC-12 (D)-, HELA (E)- und CACO-2 (F) -Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln, Zn²⁺-Ionen und mit 2 % Co, 2 % Mn, 5 % Ag, 3 % Ag, 3 % Sb und 7 % Al dotierten ZnO-Partikeln gezeigt.

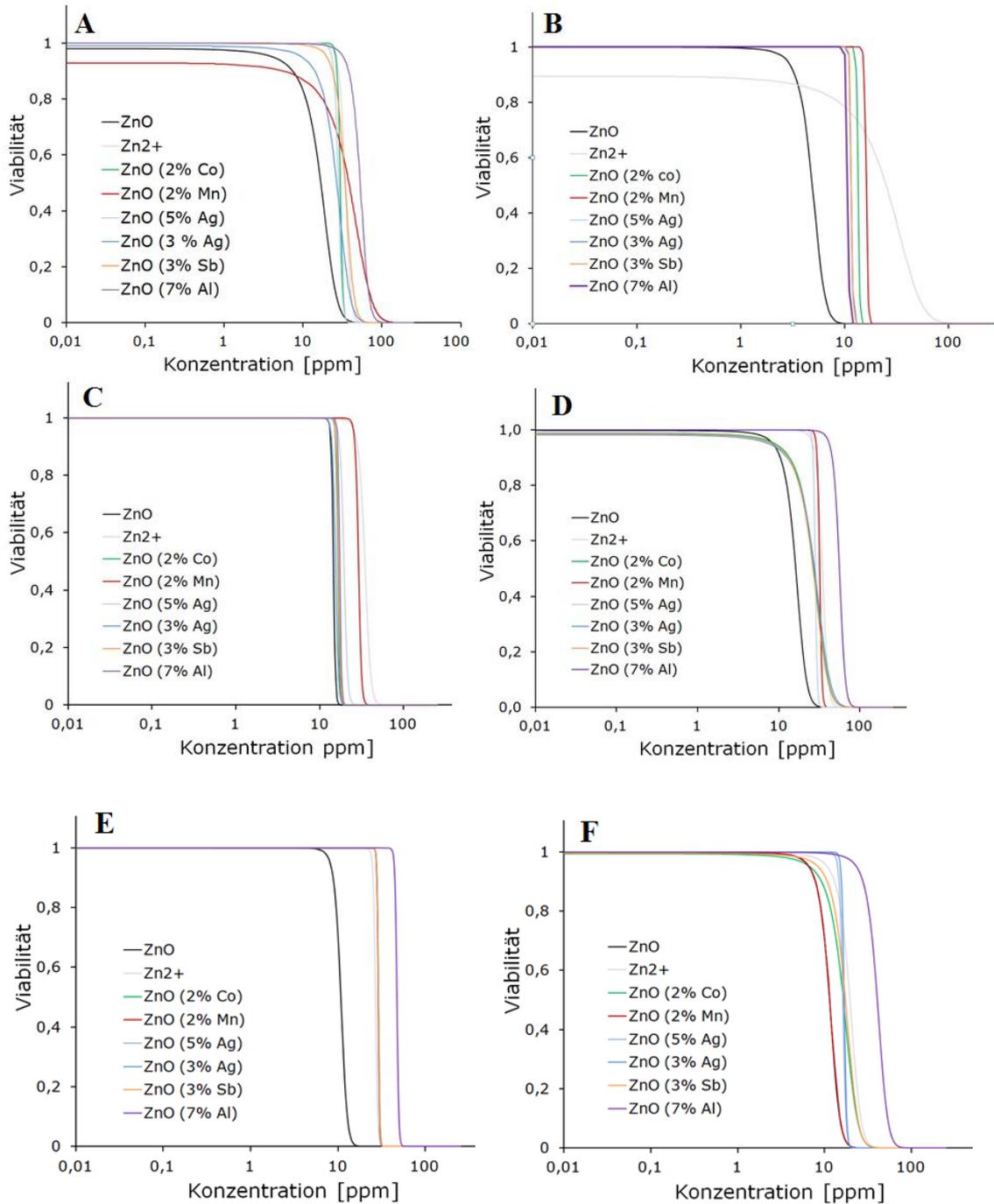


Abbildung 4-12: Dosis-Wirkungs-Kurven von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E), CACO-2-Zellen (F) kultiviert mit verschiedenen dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

A-549-Zellen

Vergleicht man die TLC von A-549-Zellen kultiviert mit reinen ZnO-Partikeln und mit dotierten ZnO-Partikeln, sowie Ionen, gezeigt in Tabelle 4-7, ist erkennbar, dass undotierte ZnO-Partikel den größten Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben und die mit 2 % Mn dotierten ZnO-Partikel den geringsten Effekt auf A-549-Zellen haben. Bei einigen Partikeln, wie denen mit 2 % Co dotierten ZnO, ist der toxische Schwellenbereich kleiner (NOAEC = 25 ppm, TLC = 32 ppm) als bei anderen, wie z.B. mit 7 % Al dotierten ZnO-Partikeln (NOAEC = 33 ppm, TLC = 74 ppm).

NIH-3T3-Zellen

In Tabelle 4-8 sind die aus den Dosis-Wirkungs-Kurven berechneten NOAEC, IC₅₀ und TLC für NIH-3T3-Zellen bei Kultivierung mit ZnO-Partikeln, Zn²⁺-Ionen, sowie der dotierten ZnO-Partikel angegeben. Den stärksten Effekt auf NIH-3T3-Zellen haben die reinen, undotierten ZnO-Partikel (TLC = 7 ppm) und den am geringsten die Zn²⁺-Ionen (TLC = 60 ppm). Die TLC der dotierten ZnO-Partikel liegen alle bei 12 ppm, nur der Wert für die mit 2 % Mn dotierten Partikel liegt bei 16 ppm. Es ist kein Einfluss der Dotierung auf den toxischen Effekt zu erkennen.

HEP-G2-Zellen

Der Einfluss der Dotierung von ZnO auf den toxischen Effekt ist bei den HEP-G2-Zellen ebenfalls nicht erkennbar. Aus den in Tabelle 4-9 gezeigten Werten, lässt sich entnehmen, dass die Ionen auch hier den geringsten Effekt auf die Zellen haben, gefolgt von den mit 2 % Mn dotierten ZnO-Partikeln. Allerdings haben die undotierten Partikel, sowie die mit Co, Ag, Sb und Al dotierten ZnO-Partikel alle einen sehr ähnlichen Effekt auf die HEP-G2-Zellen.

PC-12-Zellen

Die in Tabelle 4-10 aufgelisteten NOAEC, IC₅₀ und TLC für PC-12 Zellen zeigen, dass auch auf die PC-12-Zellen die reinen ZnO-Partikel den größten Effekt auf die Viabilität haben, und die mit 7 % Al dotierten Partikel den geringsten Effekt.

HELA-Zellen

Undotierte ZnO-Partikel sind auf HELA-Zellen in niedrigeren Konzentrationen toxisch (TLC = 13 ppm) als die dotierten Partikel, wobei die mit 7 % Al dotierten Partikel (TLC = 50 ppm) im Gegensatz zu den mit Co, Mn, Ag und Sb dotierten Partikel (TLC = 26-28 ppm) den geringsten Effekt haben (Tabelle 4-11).

CACO-2-Zellen

Die in Tabelle 4-12 zusammengefassten NOAEC, IC₅₀ und TLC von CACO-2-Zellen zeigen, dass die undotierten ZnO-Partikel, sowie mit 2 % Mn dotierte Partikel die Viabilität der Zellen bereits in einer geringeren Konzentration beeinflusst (TLC = 16 ppm) als die dotierten ZnO-Partikel, bei denen die TLC von 17 ppm für die mit 5 % Ag dotierten und 58 ppm für die mit 7 % Al dotierten Partikel liegen.

Tabelle 4-7: NOAEC, IC₅₀ und TLC von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
ZnO	4 ppm	17 ppm	29 ppm
Zn ²⁺	26 ppm	34 ppm	43 ppm
ZnO (2 % Co)	25 ppm	29 ppm	32 ppm
ZnO (2 % Mn)	5 ppm	38 ppm	82 ppm
ZnO (5 % Ag)	23 ppm	28 ppm	33 ppm
ZnO (3 % Ag)	10 ppm	27 ppm	44 ppm
ZnO (3 % Sb)	20 ppm	35 ppm	48 ppm
ZnO (7 % Al)	33 ppm	53 ppm	74 ppm

Tabelle 4-8: NOAEC, IC₅₀ und TLC von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
ZnO	3 ppm	5 ppm	7 ppm
Zn ²⁺	9 ppm	25 ppm	60 ppm
ZnO (2 % Co)	11 ppm	12 ppm	13 ppm
ZnO (2 % Mn)	14 ppm	15 ppm	16 ppm
ZnO (5 % Ag)	10 ppm	11 ppm	12 ppm
ZnO (3 % Ag)	10 ppm	11 ppm	12 ppm
ZnO (3 % Sb)	10 ppm	11 ppm	12 ppm
ZnO (7 % Al)	10 ppm	11 ppm	12 ppm

Tabelle 4-9: NOAEC, IC₅₀ und TLC von HEP-G2-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
ZnO	13 ppm	14 ppm	16 ppm
Zn ²⁺	26 ppm	34 ppm	43 ppm
ZnO (2 % Co)	14 ppm	15 ppm	16 ppm
ZnO (2 % Mn)	24 ppm	28 ppm	31 ppm
ZnO (5 % Ag)	15 ppm	18 ppm	21 ppm
ZnO (3 % Ag)	13 ppm	15 ppm	17 ppm
ZnO (3 % Sb)	14 ppm	16 ppm	17 ppm
ZnO (7 % Al)	15 ppm	16 ppm	17 ppm

Tabelle 4-10: NOAEC, IC₅₀ und TLC von PC-12-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
ZnO	8 ppm	16 ppm	24 ppm
Zn ²⁺	26 ppm	34 ppm	43 ppm
ZnO (2 % Co)	9 ppm	27 ppm	45 ppm
ZnO (2% Mn)	28 ppm	31 ppm	34 ppm
ZnO (5% Ag)	25 ppm	27 ppm	29 ppm
ZnO (3% Ag)	8 ppm	27 ppm	47 ppm
ZnO (3% Sb)	8 ppm	26 ppm	44 ppm
ZnO (7% Al)	41 ppm	56 ppm	70 ppm

Tabelle 4-11: NOAEC, IC₅₀ und TLC von HELA-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
ZnO	8 ppm	11 ppm	13 ppm
Zn ²⁺	23 ppm	26 ppm	28 ppm
ZnO (2 % Co)	27 ppm	28 ppm	29 ppm
ZnO (2 % Mn)	26 ppm	28 ppm	29 ppm
ZnO (5 % Ag)	26 ppm	28 ppm	29 ppm
ZnO (3 % Ag)	26 ppm	28 ppm	29 ppm
ZnO (3 % Sb)	26 ppm	28 ppm	29 ppm
ZnO (7 % Al)	42 ppm	46 ppm	50 ppm

Tabelle 4-12: NOAEC, IC₅₀ und TLC von CACO-2-Zellen kultiviert mit ZnO-, dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn²⁺-Ionen.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
ZnO	7 ppm	11 ppm	16 ppm
Zn ²⁺	11 ppm	20 ppm	28 ppm
ZnO (2 % Co)	7 ppm	17 ppm	26 ppm
ZnO (2 % Mn)	7 ppm	11 ppm	16 ppm
ZnO (5 % Ag)	13 ppm	15 ppm	17 ppm
ZnO (3 % Ag)	14 ppm	16 ppm	18 ppm
ZnO (3 % Sb)	9 ppm	17 ppm	26 ppm
ZnO (7 % Al)	23 ppm	41 ppm	58 ppm

Fazit:

Die ZnO-Partikel sind auf alle untersuchten Zelllinien, sowie auf die uc-MSK und ad-MSK in geringeren Konzentrationen toxisch als die Ionen.

Für die Toxizität der Partikel auf die Zellen ergibt sich folgende Abstufung: uc-MSK (TLC = 1,3 ppm) > NIH-3T3 (TLC = 7 ppm) > ad-MSK (TLC = 8 ppm) > HELA (TLC = 13 ppm) > CACO-2, HEP-G2 (TLC = 16 ppm) > PC-12 (TLC = 24 ppm) > A-549 (TLC = 29 ppm). Und für die Toxizität der Ionen ergibt sich: uc-MSK (TLC = 10 ppm) > ad-MSK (TLC = 20 ppm) > HELA, CACO-2 (TLC = 28 ppm) > A-549, HEP-G2, PC-12 (TLC = 43 ppm) > NIH-3T3 (TLC = 60 ppm).

Die Dotierungen scheinen die toxische Wirkung der Partikel herabzusetzen. Auf alle untersuchten Zelllinien haben reine, undotierte ZnO-Partikel in geringeren

Konzentrationen einen toxischen Effekt als die unterschiedlichen dotierten Partikel, wobei dieser Effekt bei einigen Zelltypen sehr gering ist.

4.4.3 Titandioxid

Für die Titandioxid-Partikel und Suspensionen wurden die gleichen Untersuchungen, die auch schon für die Silberpartikel und Ag^+ -Ionen sowie für die ZnO-Partikel und Zn^{2+} -Ionen durchgeführt wurden, gemacht.

In Abbildung 4-13 sind die Viabilitäten von A-549-, NIH-3T3-, HEP-G2-, PC-12-, HELA- und CACO-2-Zellen kultiviert mit unterschiedlichen TiO_2 -Partikelkonzentrationen aufgetragen. Es ist erkennbar, dass nur sehr hohe Konzentrationen von 500 ppm an Partikeln im Medium die Viabilität der A-549-Zellen signifikant verringert (A). Die Zugabe von TiO_2 ins Kulturmedium von NIH-3T3-Zellen hat schon in geringeren Konzentrationen ab 300 ppm einen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen (B).

Die HEP-G2-Zellen weisen schon bei Kultivierung mit 20 ppm TiO_2 -Partikeln geringere Viabilitäten als die Referenz auf, allerdings ist bei Kultivierung mit 50 und 80 ppm kein Unterschied zur Kontrolle zu erkennen, was die Vermutung nahe legt, dass es sich hier um Schwankungen in der Zellzahl oder um Messungenauigkeiten handelt (C). Ab einer Konzentration von 100 ppm und höher haben alle Zellen eine geringere Viabilität als die Referenz, Zellen kultiviert in Normalmedium ohne Partikelzusatz.

Die PC-12-Zellen zeigen ein ähnliches Verhalten wie die A-549-Zellen. Erst die Zugabe von 500 ppm an TiO_2 -Partikeln im Kulturmedium hat einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, (D). In Abbildung 4-13 (E) sind die Ergebnisse des MTT-Tests von HELA-Zellen kultiviert mit TiO_2 -Partikeln gezeigt. Die Zugabe von TiO_2 ins Medium der Zellen hat in dem untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, wohingegen die CACO-2-Zellen bereits bei Zugabe von Konzentrationen ab 200 ppm geringere Viabilitäten als die der Referenz aufweisen (F).

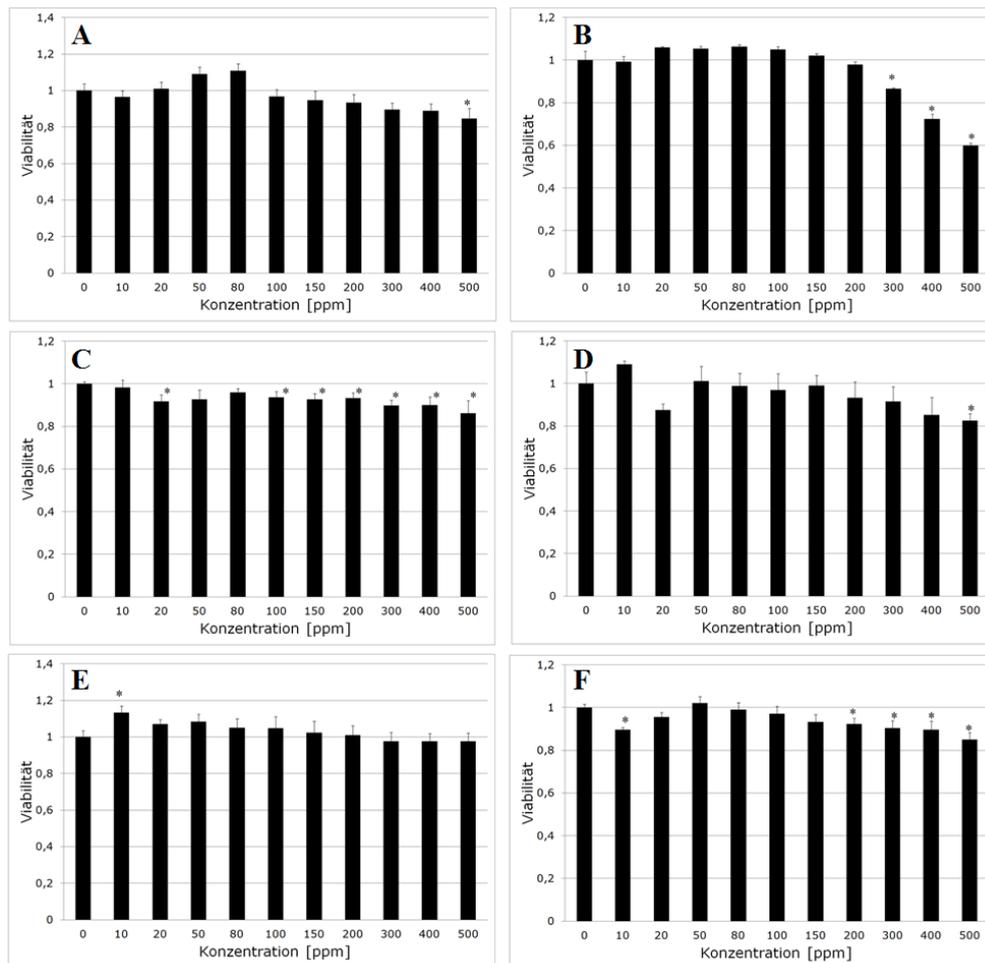


Abbildung 4-13: Auf 1 normierte Viabilitäten (Viabilität von Zellen kultiviert in Kulturmedium = 1) von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E), CACO-2-Zellen (F) kultiviert mit TiO₂-Partikeln (2 nm) in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet.

Die aus den Messungen ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurve, sowie die experimentell bestimmten Viabilitäten von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit TiO₂-Partikeln sind in Abbildung 4-14 (A) gezeigt. Die über den MTT-Test bestimmten Viabilitäten der Zellen stimmen gut mit der theoretisch berechneten Kurve überein.

Auf die Auftragung der experimentell bestimmten Viabilitäten wurde für die A-549-, HEP-G2-, PC-12-, HELA- und CACO-2-Zellen der Übersichtlichkeit wegen verzichtet und nur die theoretisch berechneten Kurven in Abbildung 4-14 (B) aufgetragen.

Die Kurven zeigen, dass die NIH-3T3-Zellen am empfindlichsten auf die Zugabe von TiO_2 im Kulturmedium reagieren, während die HEP-G2-Zellen am unempfindlichsten reagieren. Die in

Tabelle 4-13 zusammengetragenen NOAEC, IC_{50} und TLC von TiO_2 Partikeln für die untersuchten Zelllinien bestätigen dieses. Es zeigt sich, dass die Partikel auf die NIH-3T3-Zellen den ausgeprägtesten toxischen Effekt haben (TLC = 818 ppm) gefolgt von HELA-Zellen (TLC = 954 ppm), A-549-Zellen (TLC = 1211 ppm), PC-12-Zellen (TLC = 1268 ppm), CACO-2-Zellen (TLC = 1822 ppm) und den HEP-G2-Zellen (TLC = 2382 ppm).

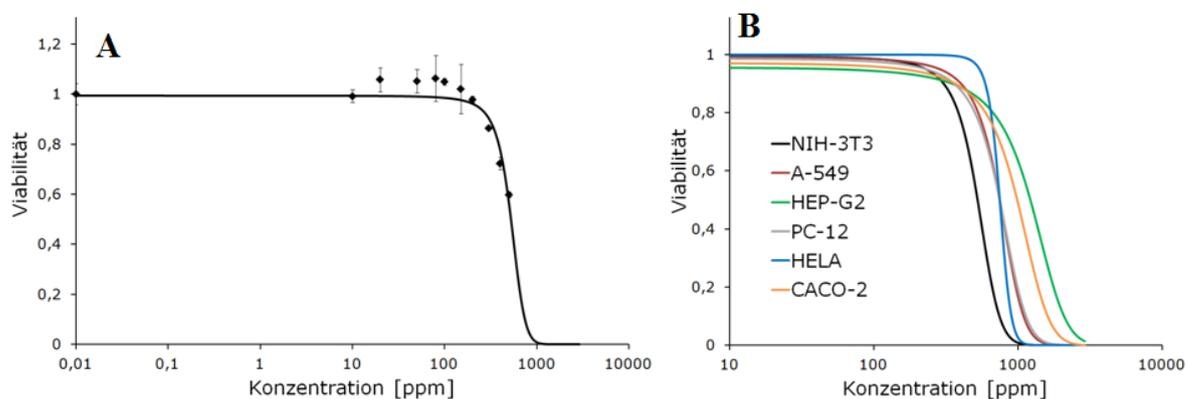


Abbildung 4-14: Dosis-Wirkungs-Kurve, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit TiO_2 -Nanopartikeln, (A) und Dosis-Wirkungs-Kurven von NIH-3T3-, A-549-, HEP-G2-, PC-12-, HELA- und CACO-2-Zellen kultiviert mit TiO_2 -Nanopartikeln (B).

Tabelle 4-13: NOAEC, IC_{50} und TLC von A-549-, NIH-3T3-, HEP-G2-, PC-12-, HELA-, und CACO-2-Zellen kultiviert mit TiO_2 -Nanopartikeln (2 nm).

	NOAEC	IC_{50}	TLC
A-549	284 ppm	748 ppm	1211 ppm
NIH-3T3	232 ppm	525 ppm	818 ppm
HEP-G2	59 ppm	1220 ppm	2382 ppm
PC-12	228 ppm	748 ppm	1268 ppm
HELA	541 ppm	748 ppm	954 ppm
CACO-2	154 ppm	988 ppm	1822 ppm

In Abbildung 4-15 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven, sowie die experimentell ermittelten Viabilitäten bei Kultivierung mit verschiedenen Konzentrationen an 0,75 % AlO(OH), 0,75% AlO(OH) / 3 % SiO₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6 % TiO₂ von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C) und CACO-2-Zellen (D) dargestellt. Die unterschiedlichen Suspensionen werden in der folgenden Diskussion mit Lösung 1 [0,75 % AlO(OH)], Lösung 2 [0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂] und Lösung 3 [0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6% TiO₂] bezeichnet.

Anhand der in Tabelle 4-14 gezeigten Werte wird deutlich, dass die Suspensionen alle einen ähnlichen Effekt auf die A-549-Zellen haben, wobei Lösung 2 in geringeren Konzentrationen einen toxischen Effekt (TLC = 4869 ppm) als Lösung 1 (TLC = 5679 ppm) und Lösung 3 (TLC = 5742 ppm) hat. Den ausgeprägtesten Effekt auf die NIH-3T3-Zellen hat Lösung 1 mit einer TLC von 4832 ppm (Vgl. Tabelle 4-15), die auch mit einer TLC von 2519 ppm den stärksten Effekt auf HEP-G2-Zellen hat (Tabelle 4-16). Die TLC der Lösungen auf CACO-2-Zellen, gezeigt in Tabelle 4-17, sind alle sehr ähnlich und liegen zwischen 2380 ppm (Lösung 1) und 2553 ppm (Lösung 3). Allerdings ist die IC₅₀ von Lösung 2 mit 1276 ppm wesentlich geringer als die von Lösung 1 und 3, was einen schmalen toxischen Schwellenbereich von Lösung 2 und 3 auf die CACO-2-Zellen bedeutet.

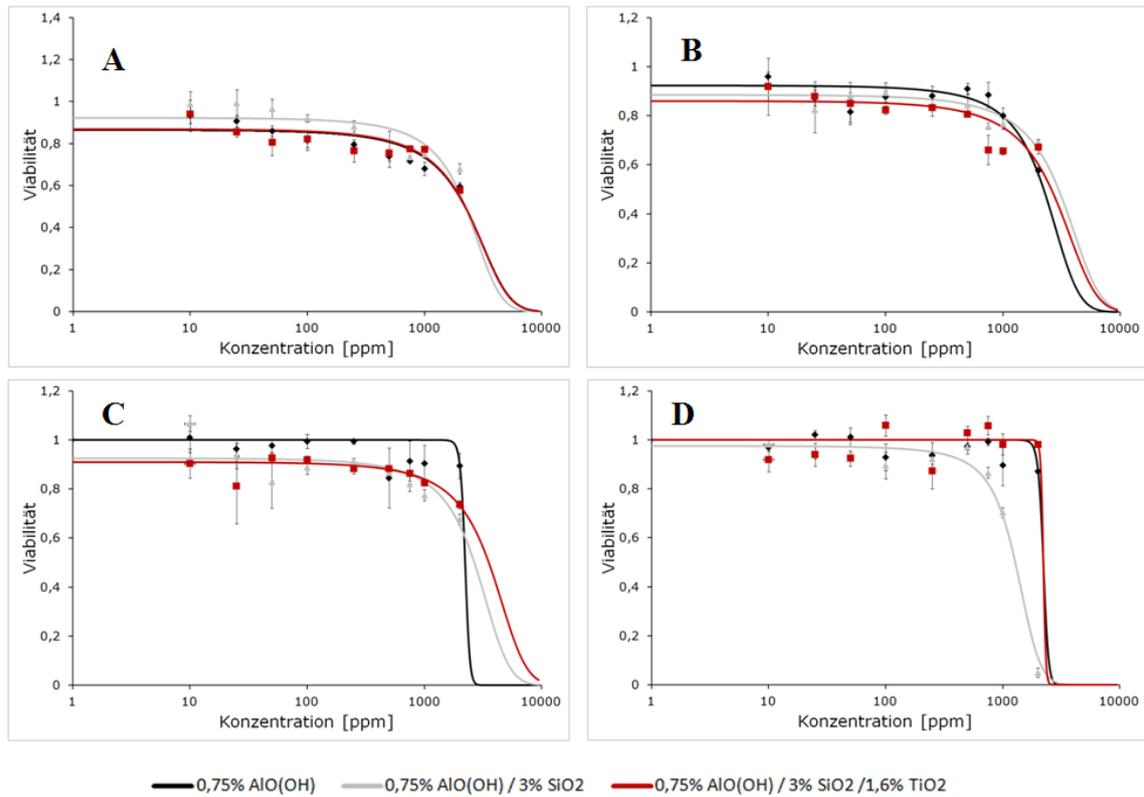


Abbildung 4-15: Dosis-Wirkungskurven, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C) und CACO-2-Zellen (D) kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6 % TiO₂.

Tabelle 4-14: NOAEC, IC₅₀, TLC von A-549-Zellen kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6 % TiO₂.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
0,75 % AlO(OH) [1]	1305 ppm	2218 ppm	5742 ppm
0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ [2]	432 ppm	2218 ppm	4869 ppm
0,75 % AlO(OH) / 3% SiO ₂ / 1,6 % TiO ₂ [3]	1242 ppm	2218 ppm	5679 ppm

Tabelle 4-15: NOAEC, IC₅₀, TLC von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6 % TiO₂.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
0,75 % AlO(OH) [1]	395 ppm	2218 ppm	4832 ppm
0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ [2]	1301 ppm	2669 ppm	7240 ppm
0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ / 1,6 % TiO ₂ [3]	1611 ppm	2576 ppm	6764 ppm

Tabelle 4-16: NOAEC, IC₅₀, TLC von HEP-G2-Zellen kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6 % TiO₂.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
0,75 % AlO(OH) [1]	1916 ppm	2218 ppm	2519 ppm
0,75 % AlO(OH) / 3% SiO ₂ [2]	457 ppm	2658 ppm	5774 ppm
0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ / 1,6 % SiO ₂ [3]	953 ppm	3531 ppm	8016 ppm

Tabelle 4-17: NOAEC, IC₅₀, TLC von CACO-2-Zellen kultiviert mit 0,75 % AlO(OH), 0,75 % AlO(OH) / 3% SiO₂ und 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6 % TiO₂.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
0,75 % AlO(OH) [1]	1882 ppm	2218 ppm	2553 ppm
0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ [2]	256 ppm	1276 ppm	2296 ppm
0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO ₂ / 1,6 % TiO ₂ [3]	2055 ppm	2218 ppm	2380 ppm

Fazit:

Die TLC der 2 nm großen TiO₂-Partikel auf die untersuchten Zelllinien liegen zwischen 818 ppm für die NIH-3T3-Zellen und 2382 ppm für die HEP-G2-Zellen. Es ergibt sich folgende Abstufung in der Toxizität der Partikel auf die Zelllinien: NIH-3T3 (TLC = 818 ppm) > HELA (TLC = 954 ppm) > A-549 (TLC = 1211 ppm) > PC-12 (TLC = 1268 ppm) > CACO-2 (TLC = 1822 ppm) > HEP-G2 (TLC = 2382 ppm).

Die 0,75 % ige AlO(OH)-Suspension, sowie die 0,75 % AlO(OH) / 3% SiO₂ und die 0,75 % AlO(OH) / 3 % SiO₂ / 1,6 % TiO₂ haben erst in sehr hohen Konzentrationen einen toxischen Effekt auf die untersuchten Zelllinien. Für Lösung [1] ergibt sich die Abstufung der Toxizität wie folgt: HEP-G2 (TLC = 2519 ppm) > CACO-2 (TLC = 2553 ppm) > NIH-3T3 (TLC = 4832 ppm) > A-549 (TLC = 5742 ppm). Für Lösung [2] ist die Toxizität auf die CACO-2 Zellen mit einer TLC von 2296 ppm am höchsten, gefolgt von den A 549-Zellen (TLC = 4869 ppm), HEP-G2-Zellen (TLC = 5774 ppm) und den NIH 3T3-Zellen (TLC = 7240 ppm). Lösung [3] wirkt in geringeren Konzentrationen toxisch auf die CACO-2-Zellen (TLC = 2380 ppm) und

hat erst in hohen Konzentrationen einen Einfluss auf die Viabilität von HEP-G2-Zellen (TLC = 8016 ppm).

4.4.4 Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing

Eine weitere Methode zur Bestimmung der toxischen Wirkung der Partikel auf die Zellen ist *Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing*. Die Theorie der Methode ist ausführlich in 3.6.2.2 beschrieben und beruht auf der Impedanzänderung einer Zellschicht bei morphologischer Änderung der Zellen. Um die Änderung der Impedanz einer Zellschicht messen zu können werden die Zellen auf speziellen mit goldbeschichteten Elektroden kultiviert und die Impedanz über den gesamten Zeitraum der Messung aufgezeichnet.

Dazu wurden die Elektroden zunächst über Nacht mit Zellkulturmedium inkubiert anschließend das Medium entfernt und die Elektroden in frischem Medium mit Zellen besiedelt. Nach Erreichen eines stabilen Impedanzsignals wurden im Medium suspendierten Nanopartikel zu den Zellen gegeben.

In Abbildung 4-16 ist die ECIS-Messung von mit A-549-Zellen besiedelten Elektroden kultiviert mit Silbernanopartikeln und in Normalmedium, sowie zweier zellfreier Elektroden, eine mit Medium, eine mit Silbernanopartikeln im Medium, bei einer Frequenz von 4000 Hz gezeigt.

Als Konzentration wurde die in Abschnitt 3.2.2 bestimmte IC_{50} von 10 ppm gewählt (Abbildung 4-6 (A) und Tabelle 4-4). Das ECIS-Spektrum zeigt zunächst bei Inkubation der Elektroden mit Medium einen Anstieg der Impedanz, da sich Proteine aus dem Medium auf die Oberfläche der Elektrode lagern. Bei Besiedelung mit A-549-Zellen steigt die Impedanz schwach an, bleibt aber dann konstant. Gibt man die Silbernanopartikel in einer Konzentration von 10 ppm im Medium zu den Zellen fällt das Impedanzsignal sofort und stetig ab. Das Signal, der nur mit Zellen im Medium besiedelten Elektroden steigt stetig an. Die Signale der zellfreien Elektroden, mit Medium und Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm im Medium blieben weiterhin konstant. Das bedeutet, dass der Abfall der Impedanz der mit Zellen besiedelten und mit Silbernanopartikel versetzten Elektrode nicht auf einen Einfluss der Silbernanopartikel auf die Impedanz zurückzuführen ist, sondern mit einem

Ablösen der Zellen von der Elektrode und somit auf eine toxische Wirkung der Silbernanopartikel auf die Zellen begründet ist. Diese Vermutung konnte auch lichtmikroskopisch bestätigt werden. In Abbildung 4-17 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von mit A-549-Zellen besiedelten ECIS-Elektroden gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Elektrode besiedelt mit A-549-Zellen kultiviert in Normalmedium eine konfluente Zellschicht aufweist, was mit einem hohen Impedanzsignal gleichzusetzen ist. Die Elektrode besiedelt mit A-549-Zellen kultiviert für 48 h mit 10 ppm Silbernanopartikeln im Medium weist deutlich weniger adhärenente Zellen auf, was mit einem niedrigen Impedanzsignal gleichzusetzen ist.

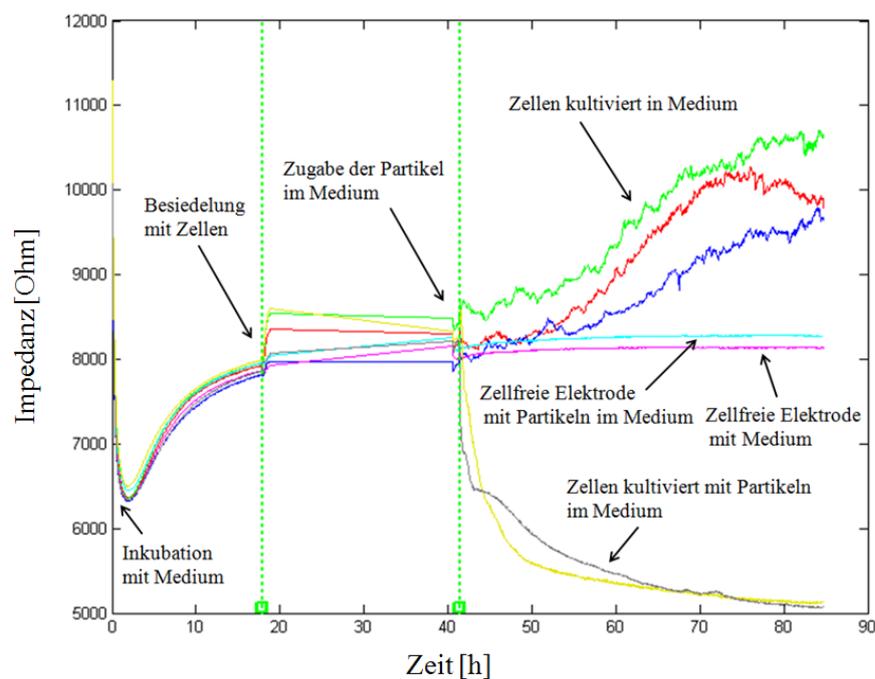


Abbildung 4-16: ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm über einen Zeitraum von 85 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium und zellfreien Elektroden, als Referenz bei einer Frequenz von 4000 Hz.

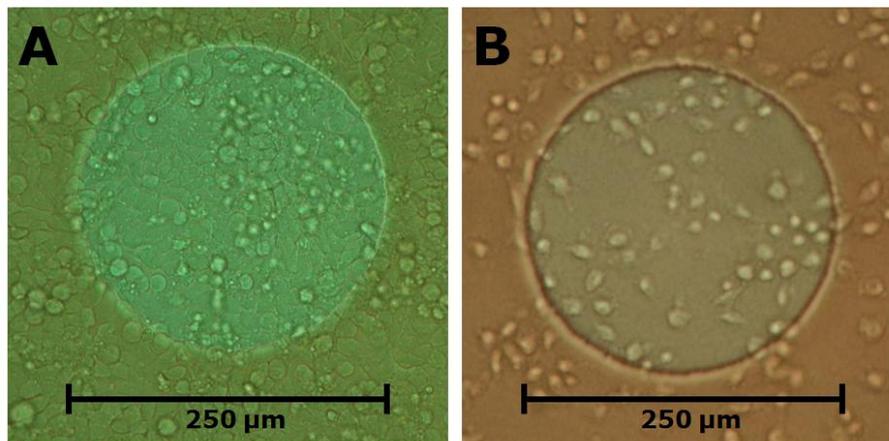


Abbildung 4-17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A-549-Zellen auf einer Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing Elektrode (8W1E) in normalen Kulturmedium (A) und 48 h nach Zugabe von Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm (B).

In Abbildung 4-18 ist die ECIS-Messung von mit HELA- und CACO-2-Zellen besiedelten Elektroden kultiviert mit 50 ppm ZnO-Partikeln, sowie mit 50 ppm 2 % Co dotierten und mit 50 ppm 2 % Mn dotierten ZnO-Partikeln und mit Medium bei einer Frequenz von 4000 Hz gezeigt.

Auch hier wurden die Elektroden zunächst über Nacht mit Medium inkubiert und anschließend vier Elektroden mit CACO-2- und vier Elektroden mit HELA-Zellen besiedelt. Die Aufzeichnung der Messung wurde erst bei Besiedelung der Elektroden mit den Zellen gestartet. Bei stabilem Impedanzsignal wurden die Nanopartikelsuspensionen zu den Zellen gegeben. Jeweils eine mit HELA, bzw. CACO-2-Zellen besiedelte Elektrode verblieb als Referenz und wurde in Normalmedium weiterkultiviert. Es ist erkennbar, dass die Impedanzsignale der Elektroden, welche mit Nanopartikelsuspensionen versetzt wurden sinken, allerdings erst nach ein paar Stunden und nicht wie bei Zugabe der Silbernanopartikel sofort.

Die Impedanzsignale der beiden mit HELA- und CACO-2-Zellen besiedelten Elektroden in Normalmedium sind sehr ähnlich, und auch die Änderung der Impedanz nach Zugabe der verschiedenen Nanopartikelsuspensionen verhält sich gleich. Die Impedanzsignale der Elektroden der beiden Zelllinien kultiviert mit den gleichen Partikeln liegen jeweils sehr eng nebeneinander.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von HELA-Zellen kultiviert auf einer ECIS-Elektrode bestätigen, dass es sich bei der Änderung des Impedanzsignals um ein

Ablösen der Zellen von der Elektrode handelt. Die in Normalmedium kultivierten HELA-Zellen (Abbildung 4-19 (A)) bilden eine konfluente Schicht auf der Elektrodenoberfläche aus, das zugehörige Impedanzsignal ist hoch, während HELA-Zellen kultiviert mit Konzentrationen von 50 ppm ZnO-Partikeln im Medium (B) und mit 50 ppm 2 % Mn dotierten ZnO-Partikeln im Medium (C) sich von der Elektrode ablösen, das zugehörige Impedanzsignal ist niedriger. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von auf der Elektrode kultivierten HELA-Zellen nach Zugabe von 50 ppm 2 % Co dotierten ZnO-Partikeln, sowie auf die Aufnahmen der CACO-2-Zellen kultiviert auf den Elektroden wurde verzichtet. Sie zeigen aber sehr ähnliche Tendenzen.

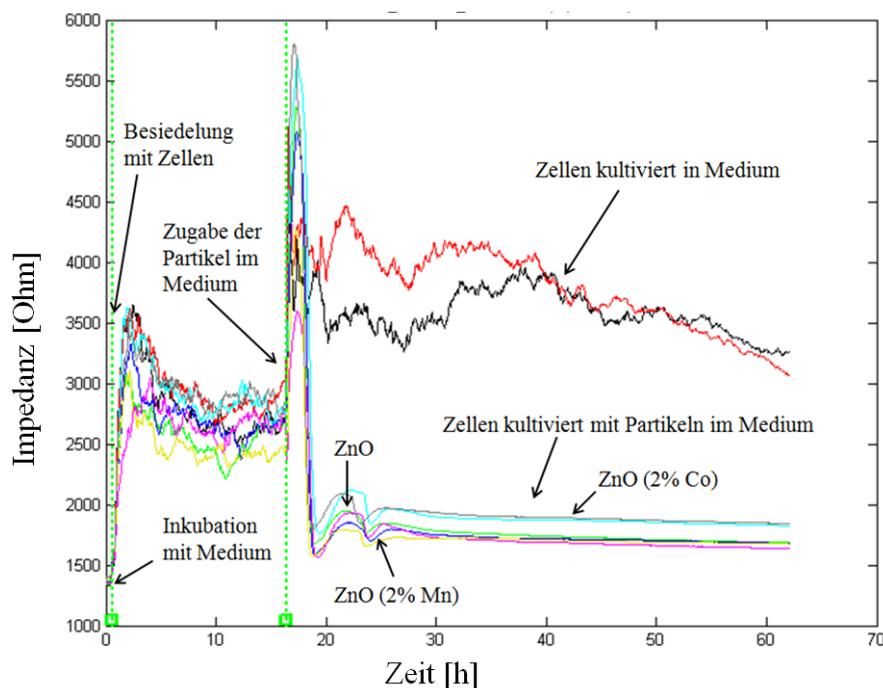


Abbildung 4-18: ECIS-Spektrum von HELA-, und CACO-2-Zellen kultiviert mit ZnO- und mit Mn (2 %) und Co (2 %) dotierten ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm über einen Zeitraum von 63 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium bei einer Frequenz von 4000 Hz.

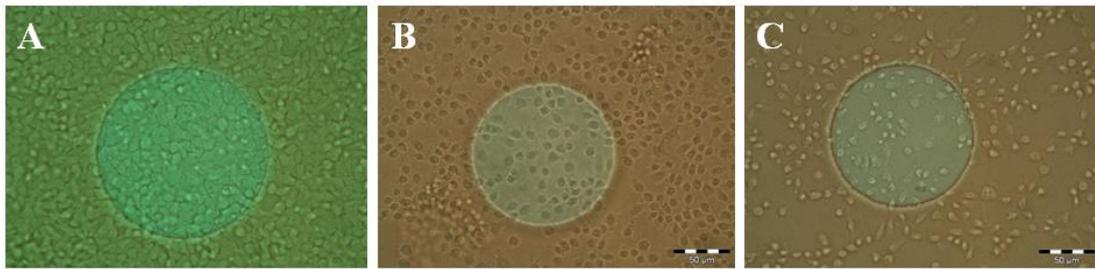


Abbildung 4-19: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer ECIS Elektrode (8W1E) besiedelt mit HELA-Zellen in Kulturmedium (A) 48 h nach Kultivierung mit 50 ppm ZnO-Partikeln im Medium (B) und 48 h nach Kultivierung mit 2 % Mn dotierten ZnO-Partikeln im Medium (C).

Abbildung 4-20 zeigt die ECIS-Messung von HEP-G2- und NIH-3T3-Zellen kultiviert in Normalmedium und nach Zugabe von ZnO- und mit 2 % Co und 2 % Mn dotierten ZnO-Partikeln (50 ppm) auf Elektroden bei einer Frequenz von 4000 Hz.

Es zeigt sich, dass auch bei dieser Messung die Impedanz der Elektroden, welche mit den Nanopartikelsuspensionen versetzt wurden, im Gegensatz zu denen kultiviert in Normalmedium sinkt.

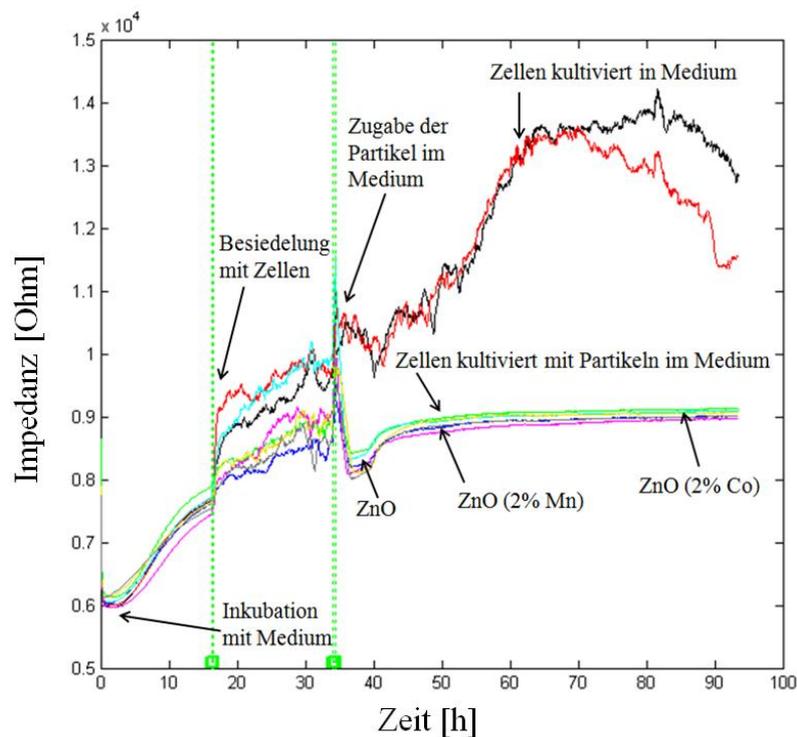


Abbildung 4-20: ECIS-Spektrum von HEP-G2-, und NIH-3T3-Zellen kultiviert mit ZnO- und mit Mn (2 %) und Co (2 %) dotierten ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm über einen Zeitraum von 95 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium bei einer Frequenz von 4000 Hz.

Über ECIS kann nicht nur über die Messung der Impedanz bei niedrigen Frequenzen von 62,5 – 8000 Hz über die Konfluenz der Zellschicht eine Aussage gemacht werden, sondern auch über die Belegung der Elektrode mit Zellen über die Messung der Kapazität bei hohen Frequenzen von 24.000 – 60.000 Hz. Die schematische Darstellung der unterschiedlichen Messmethoden ist in Abbildung 4-21 gezeigt. Bei der Messung der Impedanz bei niedrigen Frequenzen fließt der Strom zwischen den Zellen durch und kann Aufschluss über Zell-Zell-Kontakte und somit über die Konfluenz einer Zellschicht geben (A). Ist das erhaltene Impedanzsignal niedrig, ist die Konfluenz der Zellschicht gering. Bei Messung der Kapazität bei hohen Frequenzen von 24.000 – 60.000 Hz fließt der Strom durch die Zellschichten hindurch, wodurch auf die Belegung der Elektrode mit Zellen geschlossen werden kann (B). Bei hoch gemessenen Kapazitäten ist die Belegung der Elektrode hoch und bei niedrig gemessenen Kapazitäten ist die Belegung der Elektrode dementsprechend niedrig.

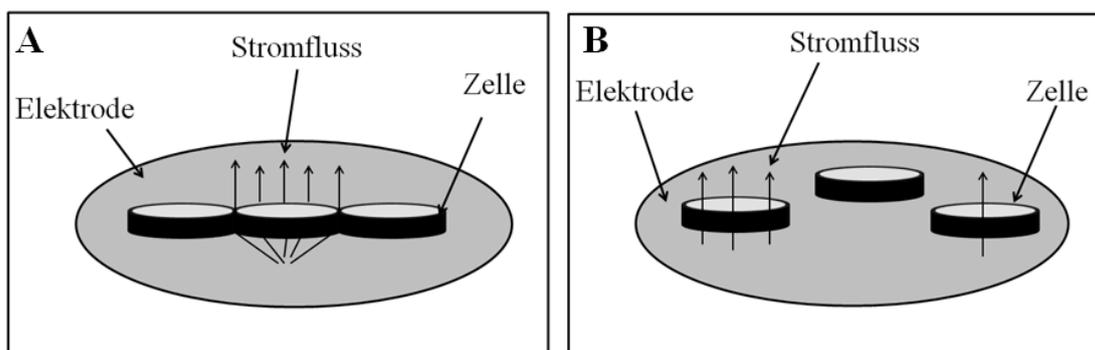


Abbildung 4-21: Schema der Messung der Impedanz bei niedrigen Frequenzen (62,5- 8.000 Hz) (A) und bei Messung der Kapazität bei hohen Frequenzen (24.000 -60.000 Hz) (B).

In Abbildung 4-22 ist die ECIS-Messung von A-549-Zellen kultiviert in Normalmedium, sowie nach Zugabe von jeweils 50 ppm an reinen ZnO-Partikeln und mit 5 % Ag und 7 % Al dotierten ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen bei einer Frequenz von 4000 Hz gezeigt. Als Referenz wurde die Impedanz von zellfreien Elektroden mit Medium und Partikeln gemessen. Es ist zu erkennen, dass die Signale der Elektroden, die mit Zellen im Medium und 50 ppm ZnO-Partikeln dotiert mit 7 % Al besiedelt und kultiviert wurden über den Zeitraum der Messung stabil bleiben und nicht sinken, wobei das Signal der Elektrode mit 7 % Al dotierten Partikeln etwas niedriger ist. Die

Zellen lösen sich nicht von der Elektrode, was die über den MTT-Test ermittelte Viabilität der Zellen nach Zugabe von ZnO (7 % Al)-Partikeln bestätigt. Die TLC wurde zu 73 ppm bestimmt (Tabelle 4-7), was bedeutet, dass nur ein geringer Anteil der Zellen bereits bei 50 ppm nicht mehr viabel ist und somit die Elektrode weiterhin mit Zellen besiedelt ist. Die berechneten TLC der undotierten ZnO- sowie der mit 5 % Ag dotierten ZnO-Nanopartikel und die der Zn^{2+} -Ionen liegen alle unter 50 ppm (Vgl. Tabelle 4-7, (TLC ZnO = 29 ppm, TLC ZnO / 5 % Ag = 33 ppm, TLC ZnO / 3 % Ag = 44 ppm, TLC Zn^{2+} = 43 ppm) weshalb sich die Zellen von der Elektrode lösen und das Impedanzsignal sinkt. Die zellfreien Elektroden versetzt mit Medium und den Partikelsuspensionen und Ionen zeigen, dass die Impedanz der Partikel und Ionen geringfügig höher ist als die von reinem Medium, was allerdings für die Änderungen der Impedanz der mit Zellen besiedelten Elektroden zu vernachlässigen ist. Die Impedanzsignale der Elektroden besiedelt mit Zellen und kultiviert mit Zn^{2+} -Ionen sinken etwas schneller als die, der mit Zellen in Partikelsuspensionen kultivierten Elektroden.

Abbildung 4-23 zeigt ebenfalls das ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert in Normalmedium, sowie nach Zugabe von jeweils 50 ppm an reinen ZnO-Partikeln und mit 5 % Ag und 7 % Al dotierten Partikeln und Zn^{2+} -Ionen. Allerdings wurde hier die Kapazität bei einer Frequenz von 64.000 Hz gegen die Zeit aufgetragen. Über die Messung der Kapazität der Elektroden bei hohen Frequenzen können Rückschlüsse auf die Belegung der Elektroden gemacht werden. Bei gering gemessenen Kapazitäten ist die Belegung der Elektrode höher als bei niedrigen gemessenen Kapazitäten. Es zeigt sich praktisch das gleiche Bild wie schon in Abbildung 4-22, nur das hier bei niedrigen Signalen die Elektroden vollständig mit einer konfluenten Zellschicht bedeckt sind.

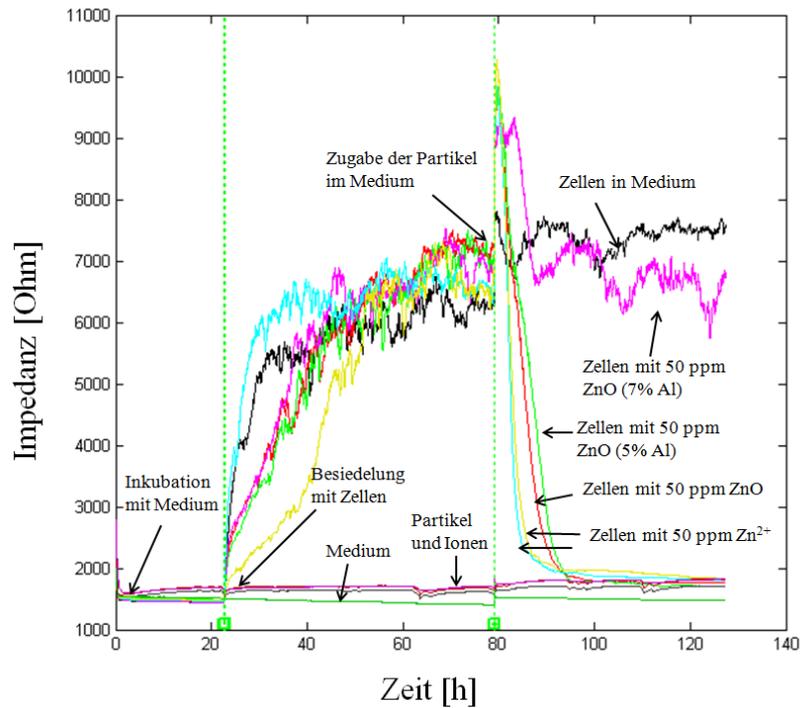


Abbildung 4-22: ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO- und mit Al (7 %) und Ag (5 %) dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm über einen Zeitraum von 125 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium bei einer Frequenz von 4.000 Hz.

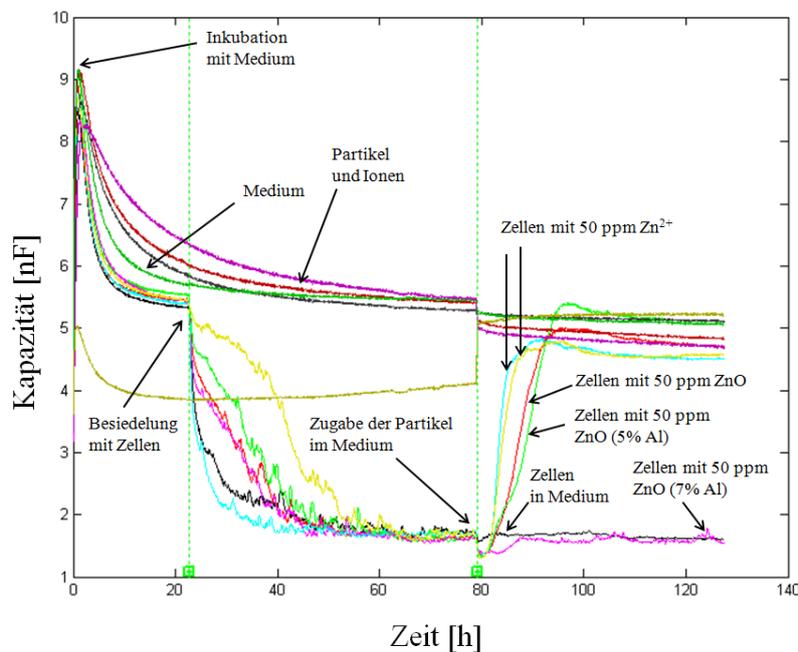


Abbildung 4-23: ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO- und mit Al (7 %) und Ag (5 %) dotierten ZnO-Nanopartikeln und Zn^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm über einen Zeitraum von 125 h, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium bei einer Frequenz von 64.000 Hz.

Um die Sensitivität der ECIS-Methode zu überprüfen, wurden Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der gleichen Partikel und Ionen durchgeführt. In Abbildung 4-24 ist die ECIS-Messung mit A-549-Zellen besiedelten Elektroden bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Silbernanopartikeln und Silberionen, sowie Zellen kultiviert in Normalmedium gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Impedanzsignale mit zunehmender Konzentration an Partikeln und Ionen sinken. Die gemessenen Signale stimmen gut mit den TLC der über den MTT-Test bestimmten Viabilitäten überein (Vgl. Tabelle 4-4). Die TLC von Ag-Nanopartikeln auf A-549-Zellen ist 14 ppm, und bei Zugabe von 15 ppm zu den Zellen ist das Impedanzsignal der Elektrode sehr niedrig. Die bei dieser Messung zugegebenen Konzentrationen an Ag^+ -Ionen zu den Zellen verändern zwar das Impedanzsignal, aber nicht so stark wie die Zugabe der Partikel. Die gewählten Konzentrationen der zugegebenen Ag^+ -Ionen liegen alle über den, in Abschnitt 4.4.1 bestimmten, IC_{50} der Ionen auf A-549-Zellen ($\text{IC}_{50} = 72 \text{ ppm}$, $\text{TLC} = 144 \text{ ppm}$), sodass hier noch über 50 % der Zellen viabel sind und das Signal nicht so stark sinkt wie bei der zugegebenen TLC bei den Partikeln.

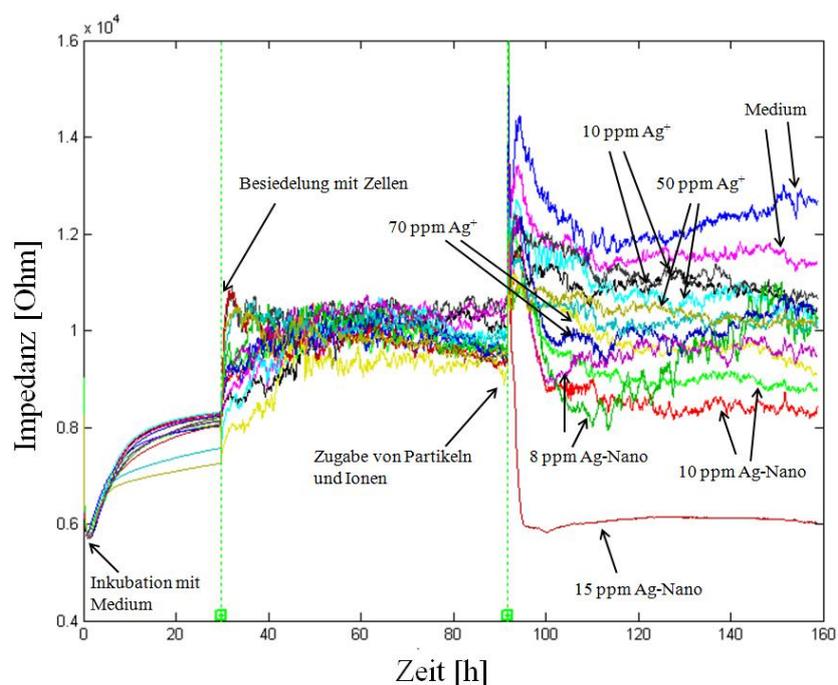


Abbildung 4-24: ECIS-Spektrum von A-549-Zellen kultiviert verschiedenen Konzentrationen an Silbernanopartikeln und Silberionen und in Normalmedium über einen Zeitraum von 160 h bei 4.000 Hz.

Um zu überprüfen, ob direkt in die Zelle gelangte Partikel einen toxischeren Effekt haben oder um eventuell festzustellen, ob die Partikel auch von alleine in die Zellen gelangen, wurden Elektroporationen der mit Nanopartikeln kultivierten Zellen durchgeführt. Über die Elektroporation wird die Membran der Zellen über definierte Pulse für einen kurzen Moment durchlässig gemacht, sodass im Medium enthaltene Partikel in die Zelle geschleust werden können.

In Abbildung 4-25 sind ECIS-Messungen von mit ZnO-Partikeln und mit Zn^{2+} -Ionen kultivierten Zellen über einen Zeitraum von 180 h bei einer Frequenz von 8000 Hz ohne Elektroporation (A), mit Elektroporation (B) und beide Messungen zusammengefasst (C) gezeigt. Bei Zugabe der Partikel in allen verwendeten Konzentrationen (10, 50, 100 ppm), sowie bei Zugabe der Ionen in Konzentrationen von 50 und 100 ppm sinken die Impedanzsignale der elektroporierten, sowie der nicht elektroporierten Zellen im gleichen Ausmaß. Die Impedanzsignale der Elektroden kultiviert mit 10 ppm Zn^{2+} -Ionen, elektroporiert und nicht elektroporiert, sinken zunächst auf die gleichen Werte wie die der Elektroden mit Partikeln und 50 und 100 ppm kultivierten Ionen. Allerdings steigen diese nach einiger Zeit auf die Werte der Signale der mit im Normalmedium kultivierten Zellen an. Trägt man die beiden Messungen zusammen in einer Abbildung auf (C) wird deutlich, dass das Signal der elektroporierten mit 10 ppm Zn^{2+} -Ionen versetzten Zellen jedoch etwas schneller wieder ansteigt, als das der nicht elektroporierten mit der gleichen Konzentration an Zn^{2+} -Ionen kultivierten Zellen. Dieses und auch die Abnahme der Impedanzsignale von elektroporierten und nicht elektroporierten Zellen kultiviert mit jeweils den gleichen Konzentrationen an Partikeln und Ionen lassen vermuten, dass ein gezieltes Einbringen der Partikel in die Zellen, den toxischen Effekt nicht erhöhen. Eine weitere Vermutung, die sich anstellen lässt ist, dass die Zellen auch ohne einen angelegten Puls für die Nanopartikel durchlässig sind.

Anhand der Messungen konnte jedoch keine Aussage über das Eindringen der Partikel in die Zellen gemacht werden. Um dieses zu überprüfen müssten Kryoschnitte der Zellen und anschließende TEM-Aufnahmen der mit Nanopartikelsuspensionen versetzten und elektroporierten Zellen gemacht werden, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

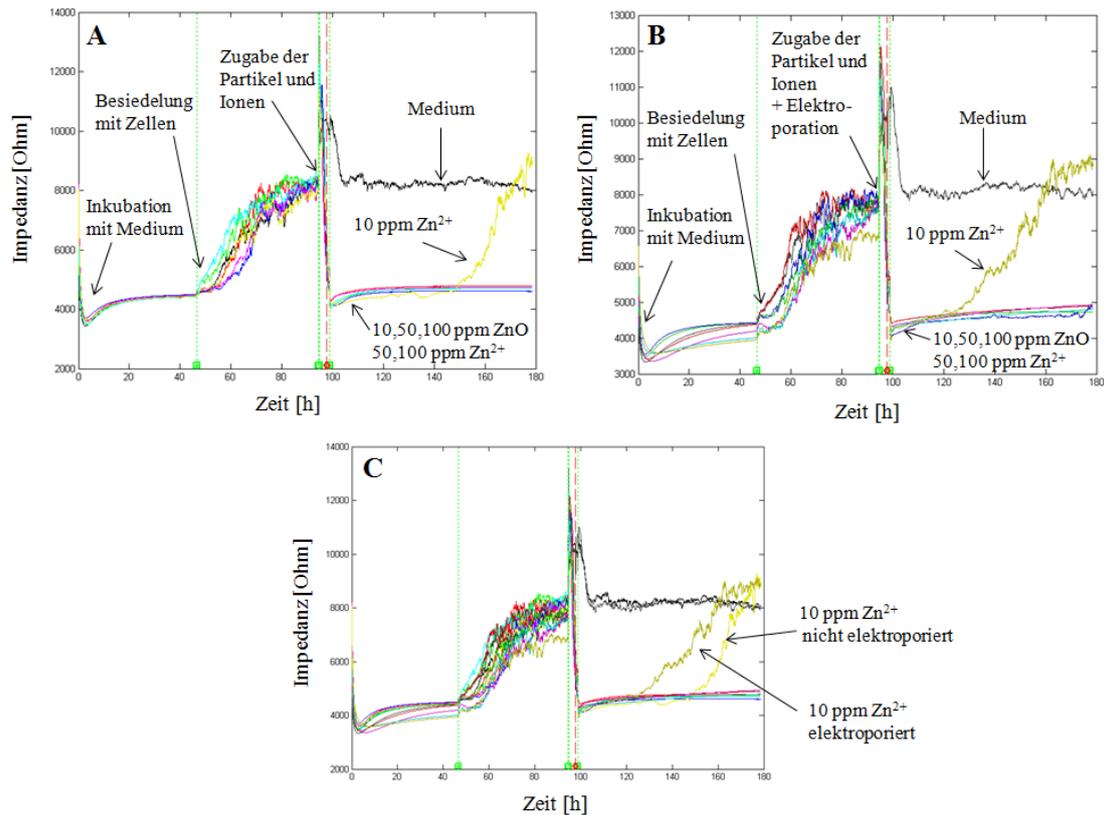


Abbildung 4-25: ECIS-Messungen von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen über einen Zeitraum von 180 h bei einer Frequenz von 8.000 Hz, ohne Elektroporation (A), mit Elektroporation (B) und beide Messungen zusammengefasst (C).

4.4.5 Vergleich Expositionsrouen (Aerosol/Suspension)

Außer als im Medium suspendiert vorliegend können Nanopartikel den Zellen auch als Aerosol zugeführt werden. Hierzu werden die Zellen auf speziellen Zellkultureinsätzen kultiviert und nur von unten mit Medium versorgt. Die auf den Transwells kultivierten Zellen können dann mit einem generierten Nanopartikel-Aerosol benebelt werden. Die Partikel kommen auf diese Weise nicht mit dem Zellkulturmedium in Kontakt

Um den Einfluss der Expositionsrouen zu vergleichen wurden mit dem Cultex[®] Radial Flow System Messungen durchgeführt (Abschnitt 6.8). Hier werden die Partikel den Zellen als Aerosol an der Flüssig-Gas-Phasengrenze zugeführt. Dazu werden die als Pulver vorliegenden Partikel gepresst und über eine *Dust Feeder* nach Wright (1950) ein Partikel-Aerosol generiert [225]. Hierzu werden die Partikel gepresst, mit einem

Drehmesser abgeschabt und über einen Luftstrom auf die Zellen geleitet. Bei den bisherigen Untersuchungen der toxischen Wirkung der Partikel auf die Zellen wurden den Zellen diese als Suspension im Medium zugeführt. Durch die Zugabe der Partikel als Suspension werden diese in ihrer Form verändert, es bilden sich Hydrathüllen, die die Partikel stabilisieren (Vgl. Abschnitt 4.3). Bei Zuführung der Partikel über das Cultex[®] Radial Flow System kommen die Partikel nicht mit Medium in Kontakt und lagern sich direkt auf der Zellschicht ab. Der genaue Aufbau des Systems ist in Abschnitt 6.8 beschrieben.

Die Messungen wurden mit ZnO-Partikeln und A-549-Zellen durchgeführt. Um zu kontrollieren, ob das Pressen und Abschaben der ZnO-Partikel einen Einfluss auf die Größe der Partikel hat, wurden REM-Aufnahmen der Partikel gemacht. In Abbildung 4-26 sind die REM-Aufnahmen der ZnO-Partikel vor dem Pressen und Abschaben (A) nach dem Pressen (B) und nach dem Pressen und Abschaben (C) dargestellt. Es zeigt sich, dass das Pressen sowie das Abschaben keinen Einfluss auf die Größe der ZnO-Partikel haben.

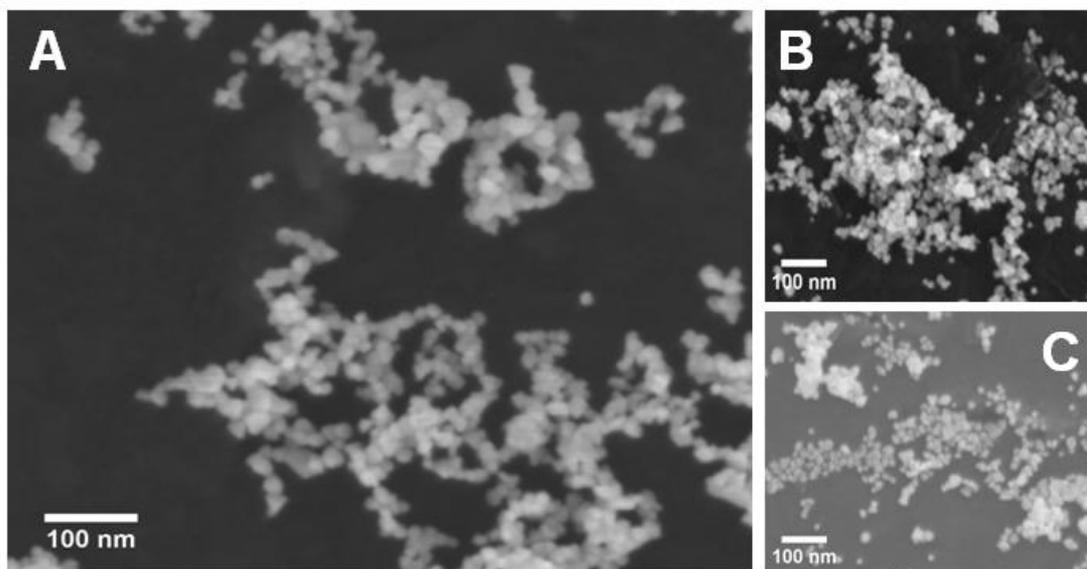


Abbildung 4-26: REM-Aufnahmen von ZnO-Partikeln (A) nach dem Pressen (B) und nach dem Pressen und Abschaben (C).

Um auszuschließen, dass bei der Zuführung des ZnO-Partikel-Aerosols zu den Zellen, die reine Raum- und Umgebungsluft schon einen Einfluss auf die Zellen hat, wurden den Zellen als Vergleich reine Raumluft in den gleichen Zeiträumen wie das ZnO-

Aerosol zugeführt. Die Zellen, die sich in dem Modul befinden über welches das Aerosol zugeführt wurde, wurden zunächst auch für 60 Minuten mit Raumluft behandelt. Als Kontrolle dienten A-549-Zellen die für den gesamten Zeitraum der Messung im Inkubator gelagert wurden.

In Abbildung 4-27 sind die Ergebnisse des MTT-Tests von A-549-Zellen nach Behandlung mit ZnO-Partikeln und Raumluft, sowie der Kontrolle (A-549-Zellen ohne Behandlung) gezeigt, die Abkürzungen WS und RL stehen hierbei für Wirkstrom (ZnO-Aerosol) und für Raumluft.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Viabilität der Zellen sinkt, je länger diese mit dem Aerosol benebelt wurden. Die reine Raumluft scheint keinen erheblichen Einfluss auf die Viabilität der Zellen zu haben, lediglich die Zellen die für 5 und 15 Minuten mit Raumluft behandelt wurden weisen niedrigere Viabilitäten auf, was aber im Rahmen der Standardfehler liegt und keine signifikante Abweichung darstellt.

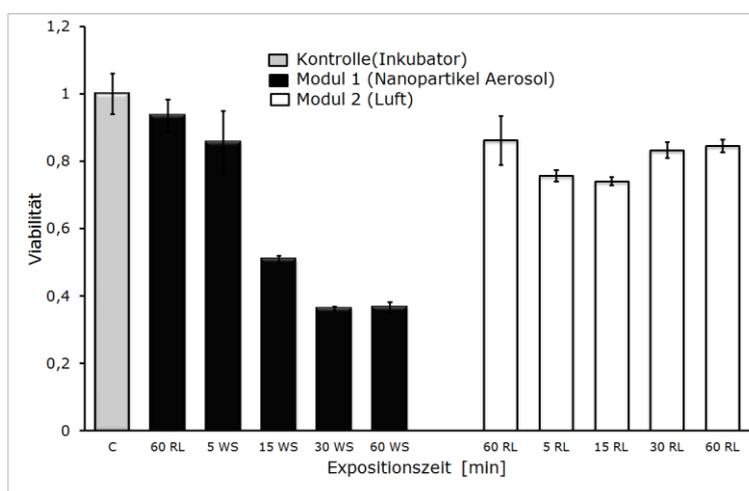


Abbildung 4-27: Ergebnisse der Messungen von A-549-Zellen mit dem Cultex[®] Radial Flow System mit 2 Modulen. Die Zellen in den Transwells des Modul 1 wurden mit dem ZnO-Nanopartikel-Aerosol benebelt, die Zellen in Modul 2 wurden mit Raumluft behandelt. Die Viabilitäten sind auf 1 normiert (Zellen im Inkubator in Normalmedium = 1). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Da der Einfluss der Raumluft auf die A-549-Zellen zu vernachlässigen ist, wurde dieser in den weiteren Darstellungen nicht mehr berücksichtigt. Über die Drehgeschwindigkeit des Messers sowie der zugeführten Luftströme in die

Aerosolkammer können die in den definierten Nebelungszeiträumen abgelagerten Massen an Partikeln berechnet werden.

In Abbildung 4-28 sind die Viabilitäten der A-549-Zellen nach Nebelung mit ZnO-Partikeln in Abhängigkeit der Expositionsdauer und der daraus resultierenden Masse an Partikeln dargestellt. Die Kontrolle, 0 μg , stellen die A-549-Zellen kultiviert bei Normalbedingungen ohne ZnO-Zusatz dar.

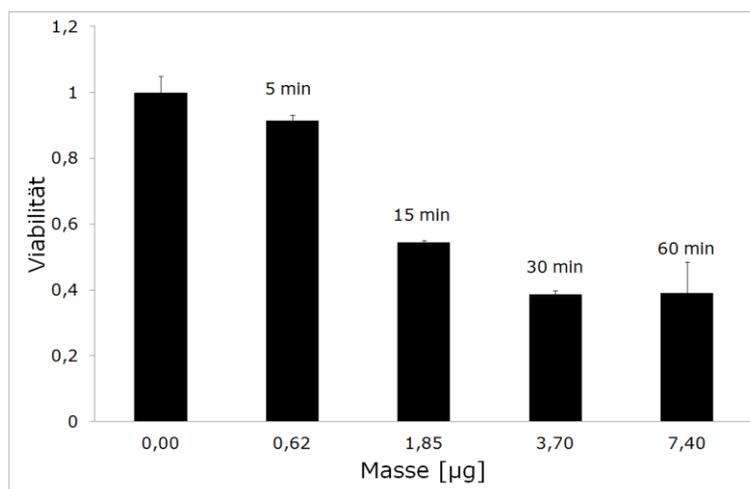


Abbildung 4-28: Viabilitäten von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln als Aerosol mit dem Cultex[®] Radial Flow System in Abhängigkeit der Nebelungszeit und der daraus resultierenden Masse an Partikeln. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Aus den gemessenen Viabilitäten bei Zugabe bestimmter Konzentrationen an ZnO-Partikeln lässt sich eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellen. Diese kann dann mit der Dosis-Wirkungs-Kurve von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln als Suspension im Medium verglichen werden (Abbildung 4-10 (A)), welche in Abschnitt 4.4.2 bestimmt wurde, sodass man einen direkten Vergleich der Toxizität der Partikel in Abhängigkeit der Expositionsrouten der Partikel hat.

In Abbildung 4-29 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln als Suspension und als Aerosol, sowie die experimentell bestimmten Viabilitäten aufgetragen. Für die Berechnung der Dosis-Wirkungskurve von ZnO-Partikeln zugeführt als Aerosol wurden zunächst auch hier beide zur Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven üblichen Formeln (Formel 6.1 und Formel 6.2) angewandt.

Für die Berechnung der Kurven bei Zugabe der Partikel als Suspension zeigte Formel 6.1 bessere Übereinstimmungen mit den experimentell ermittelten Viabilitäten (Vgl. Abschnitt 4.4). Für die theoretische Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurve von ZnO-Partikel zugeführt als Aerosol, zeigte Formel 6.2 eine bessere Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Die Anwendung der Formel 6.2 zur Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven und der NOAEC, IC₅₀ und TLC hat keine große Bedeutung für die Berechnung der IC₅₀ und TLC, allerdings für die Berechnung der NOAEC, welche sich mit der Formel 6.2 nicht berechnen ließ.

Es ist deutlich erkennbar, dass die Expositionsroute einen erheblichen Einfluss auf die Toxizität der ZnO-Partikel hat. Die als Aerosol zugeführten Partikel haben einen stärkeren toxischen Effekt auf die A-549-Zellen, als die im Medium zugeführten Partikel. Aus den Werten in Tabelle 4-18 wird deutlich, dass die TLC für ZnO-Partikel, die den Zellen als Aerosol zugeführt werden etwa 12-mal höher ist, als die der über das Medium zugeführten Partikel. Die berechneten NOAEC, die IC₅₀ und der daraus resultierende Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung machen deutlich, dass bei Exposition der Zellen mit den Nanopartikeln im Medium, der toxische Schwellenbereich viel enger gefasst ist als bei Exposition der Partikel als Aerosol.

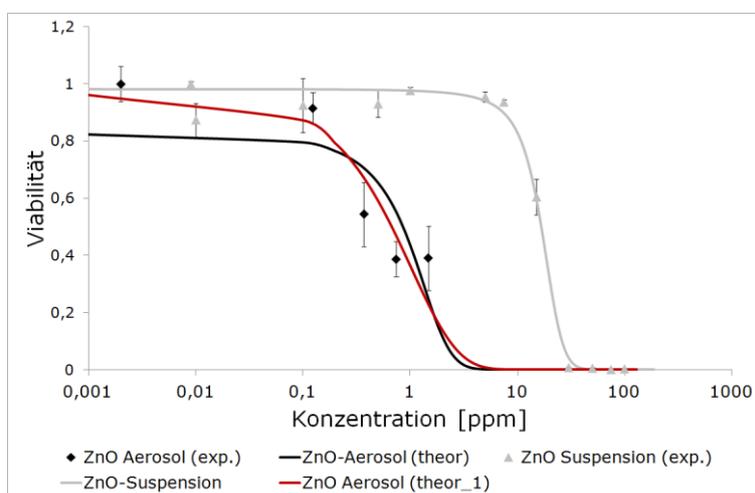


Abbildung 4-29: Dosis-Wirkungs-Kurven, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO Nanopartikeln als Aerosol und als Suspension. Für die Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurve der Partikel als Aerosol wurden 2 Formeln angewandt: ZnO Aerosol (theor) = $y = 1 - (1 / (1 + e^{-bx}))$ [Formel 6.1] und ZnO Aerosol (theor_1) = $y = ae^{-bx}$ [Formel 6.2]

Tabelle 4-18: NOAEC, IC₅₀ und TLC für A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln als Aerosol und als Suspension.

	NOAEC	IC ₅₀	TLC
Aerosol [Formel 6.1]	n.b.	0,9 ppm	2,5 ppm
Aerosol [Formel 6.2]	0,05 ppm	0,7 ppm	3 ppm
Suspension	4 ppm	17 ppm	29 ppm

Um eine mögliche Aussage über die Art des Zelltods zu machen, wurde die Membranintegrität der Zellen über die Freisetzung von LDH ins Kulturmedium bestimmt, die als erstes Anzeichen für Nekrose steht.

In Abbildung 4-30 ist die Freisetzung von LDH ins Kulturmedium der mit dem Aerosol und der mit Raumluft behandelten Zellen, sowie der Zellen der Kontrollprobe gezeigt.

Auch hier stehen WS und RL für Wirkstrom, bzw. für Raumluft. Es ist deutlich zu sehen, dass die Zellen, die der Raumluft ausgesetzt waren keine LDH-Freisetzung ins Medium im Vergleich zu den Zellen der Kontrollprobe kultiviert im Inkubator zeigen. Die Zellen, die dem Nanopartikel-Aerosol ausgesetzt waren zeigen eine erhebliche LDH-Freisetzung, wobei hier die Zellen, die den ZnO-Partikel für 30 Minuten ausgesetzt waren die höchste Freisetzung zeigen.

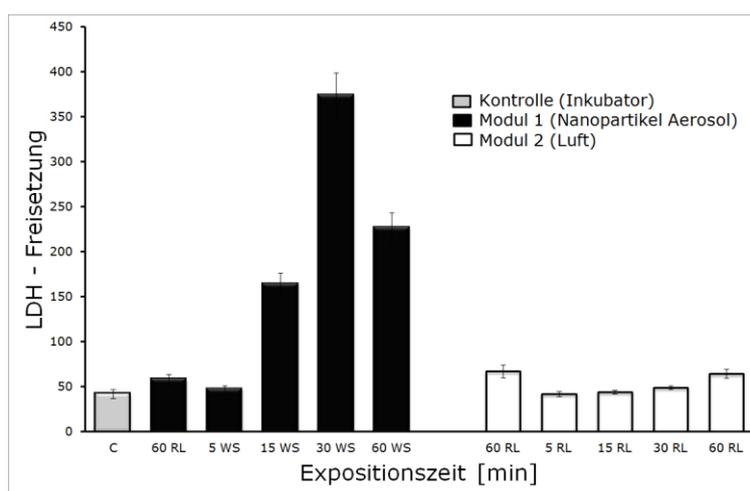


Abbildung 4-30: LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln als Aerosol (Modul 1), mit Luft (Modul 2) von Zellen kultiviert in Normalmedium (Kontrolle Inkubator) über einen Zeitraum von 30h. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen ± Standardfehler.

Vergleicht man die LDH-Freisetzung der Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikel-Aerosol und ZnO-Suspensionen, dargestellt in Abbildung 4-31, ist zu erkennen, dass die Zellen kultiviert mit dem Aerosol im Vergleich zu den Zellen der Kontrollprobe mehr LDH freisetzen, als Zellen kultiviert mit den Suspensionen im Vergleich zu den Zellen der Kontrollprobe.

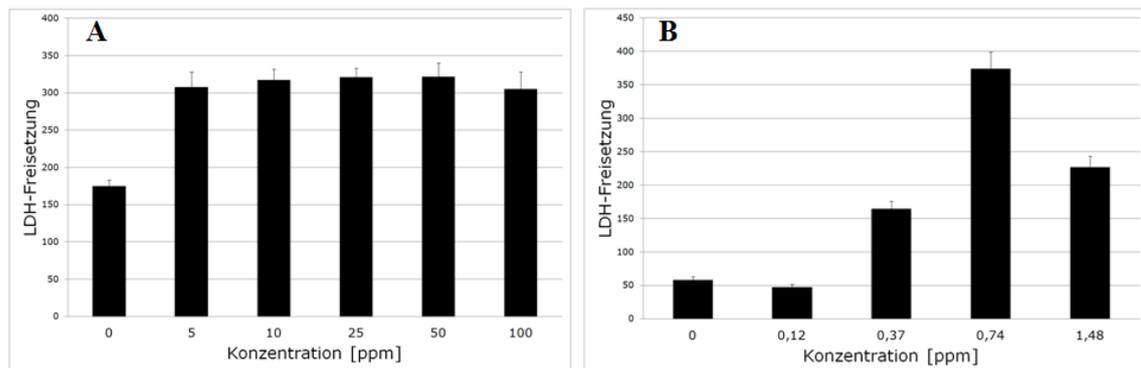


Abbildung 4-31: LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert mit unterschiedlichen Konzentrationen an ZnO-Nanopartikeln zugeführt als Suspension im Medium (A) und als Aerosol (B). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Fazit:

Die Expositionsroute von ZnO Nanopartikeln spielt eine wichtige Rolle und hat einen großen Einfluss auf die Toxizität der Partikel. Die, als Aerosol an der Flüssig-Fest-Phasengrenze zugeführten ZnO-Partikel zeigten einen erheblich stärkeren toxischen Effekt auf die A-549-Zellen als die als Suspension im Medium vorliegenden Partikel (etwa 11-mal höher).

Der toxische Schwellenbereich, der in Suspension vorliegenden Partikel, ist wesentlich enger gefasst als bei den, als Aerosol vorliegenden Partikel. Die Berechnung erfolgte für die Aerosol-Partikel mit einer anderen Formel als für die Suspension, was jedoch nur einen Einfluss auf die Berechnung NOAEC hatte und sich kaum auf die IC_{50} und TLC auswirkte, die mit der sonst verwendeten Formel nicht zu berechnen war.

4.4.6 Vergleich 3D-Mikrogewebe mit 2D-Zellkulturen

Bisher wurde in der vorliegenden Arbeit die toxische Wirkung von Nanopartikeln lediglich mit Hilfe von 2D-Zellkulturen bestimmt. Dies gibt jedoch nicht unbedingt ein realistisches Bild für die *in-vivo* Bedingungen in denen die Zellen in 3D-Gewebestrukturen wachsen.

In Abschnitt 3.6.1 ist der Vorteil von 3D-Kulturen zur Testung von Wirkstoffen im Vergleich zu 2D-Kulturen beschrieben. Um einen Vergleich der Toxizität der Partikel auf 2D und 3D-Kulturen zu haben, wurden Sphäroide der verwendeten Zelllinien hergestellt, diese dann mit den Nanopartikeln versetzt und die Viabilität der Zellen bestimmt. Zur Herstellung der Sphäroide wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt, die Hanging-Drop-Methode über Terasaki[®]-Platten (Abbildung 6-3 A)) und die Kultivierung auf mit Silikon beschichteten Platten. Die Viabilität der Sphäroide wurde ebenfalls über den MTT-Test bestimmt.

Um eine geeignete Zellzahl für die Herstellung der Sphäroide über die Hanging-Drop-Methode zu ermitteln, welche in der folgenden Diskussion mit dem Index 1 versehen wurden (Sphäroide₁), wurden zunächst Sphäroide aus unterschiedlichen Ausgangszellzahlen hergestellt, diese für drei Tage kultiviert und die Viabilität über den MTT bestimmt. Für die Herstellung der Sphäroide auf den silikonbeschichteten Platten, im Folgenden mit dem Index 2 (Sphäroide₂) benannt, wurden die Zellen für drei Tage auf den Platten kultiviert.

In Abbildung 4-32 ist die Viabilität der A-549-Sphäroide₁, hergestellt aus unterschiedlichen Zellzahlen, gezeigt. Die aus 4000 Zellen kultivierten Sphäroide weisen die höchste Viabilität auf und wurden aus diesem Grund für die weiteren Untersuchungen verwendet.

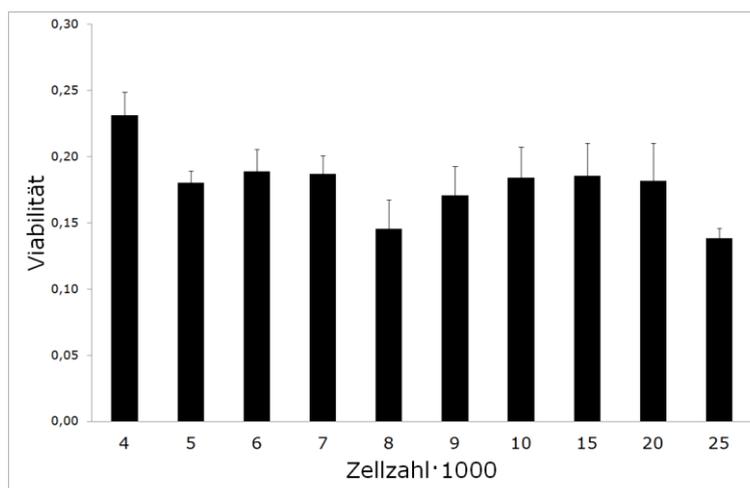


Abbildung 4-32: Viabilitäten von 3D-strukturierten, über die Hanging-Drop-Methode hergestellten A-549-Zellen in Abhängigkeit verschiedener Ausgangszellzahlen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

In Abbildung 4-33 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der HEP-G2-Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A), als Hanging-Drop in der Terasaki-Platte (B) und (C), und auf der silikonbeschichteten Oberfläche gezeigt (D). Die 2D-Monolayerkultur von HEP-G2-Zellen zeigt eine leichte Agglomeration der Zellen, jedoch keine offensichtlichen 3D-Strukturen. Die über Hanging-Drop kultivierten Zellen zeigen die Ausbildung eines Sphäroids₁ mit einem Durchmesser von etwa 1000 μm . Bei Kultivierung der Zellen auf den silikonbeschichteten Platten bildeten sich mehrere kleinere Sphäroide₂ mit durchschnittlichen Größen zwischen 350 und 550 μm aus. Abbildung 4-34 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von CACO-2-Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A), auf einer silikonbeschichteten Oberfläche (B), in Hanging-Drop (D) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eingefärbten über die Hanging-Drop-Methode kultivierten Zellen (C). CACO-2-Zellen agglomerieren schon auf einer normalen Zellkulturoberfläche, weisen allerdings keine 3D-Strukturen auf, sondern wachsen als Monolayer. Die über die Silikonbeschichtung hergestellten Sphäroide₂ besitzen eine durchschnittliche Größe von 250 -350 μm . Im Gegensatz zu den HEP-G2-Zellen, bei denen sich über die Kultivierung in Hanging-Drop ein großer Sphäroid₁ ausbildete, entstehen bei der Kultivierung der CACO-2 Zellen in Tropfen, mehrere kleinere 3D-strukturierte Zellaggregate (C) und (D). Die in Abbildung 4-35

gezeigten lichtmikroskopischen Aufnahmen von A-549-Zellen, kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A) und in Hanging-Drop nach 24 h (B) und nach 48 h (C) zeigen, dass sich nach 48 h ein größeres Sphäroid₁ ausbildet. Nach 24 h sind schon leichte Zellaggregate zu erkennen, die sich nach 48 h zu einer 3D-Struktur mit einem Durchmesser von etwa 1000 μm zusammenlagern. Die in Hanging-Drop kultivierten NIH-3T3-Zellen bilden ebenfalls nach 48 h einen größeren Sphäroid₁ mit einem Durchmesser von 1000 μm aus (Abbildung 4-36).

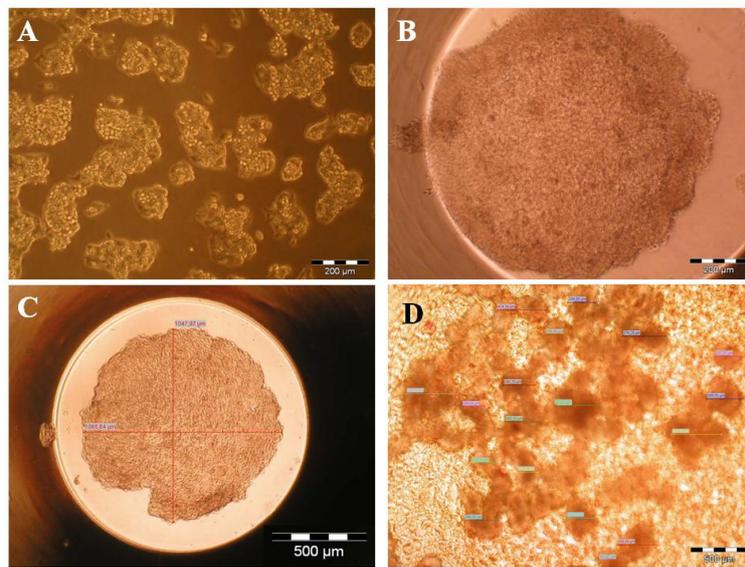


Abbildung 4-33: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HEP-G2-Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A), als Hanging-Drop (B), (C), und auf einer silikonbeschichteten Oberfläche (D).

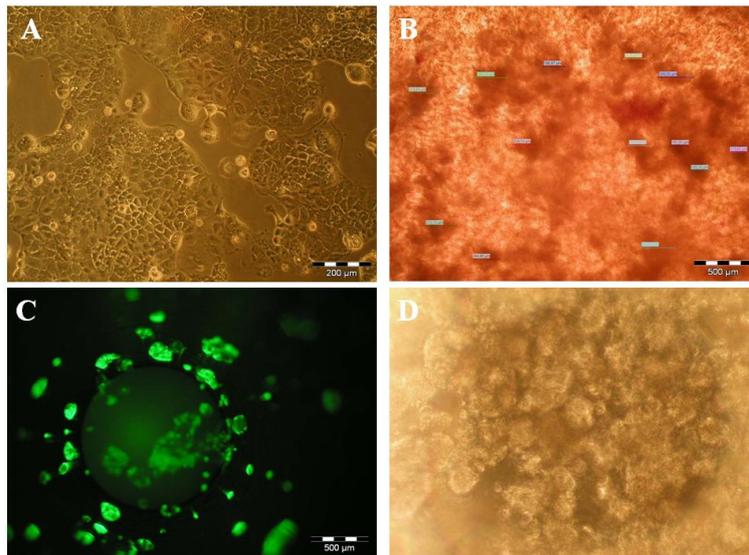


Abbildung 4-34: Lichtmikroskopische Aufnahmen von CACO-2-Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A), auf einer mit Silikon beschichteten Oberfläche (B), als Hanging-Drop (D) und fluoreszenz eingefärbte CACO-2-Zellen kultiviert als Hanging-Drop (C).

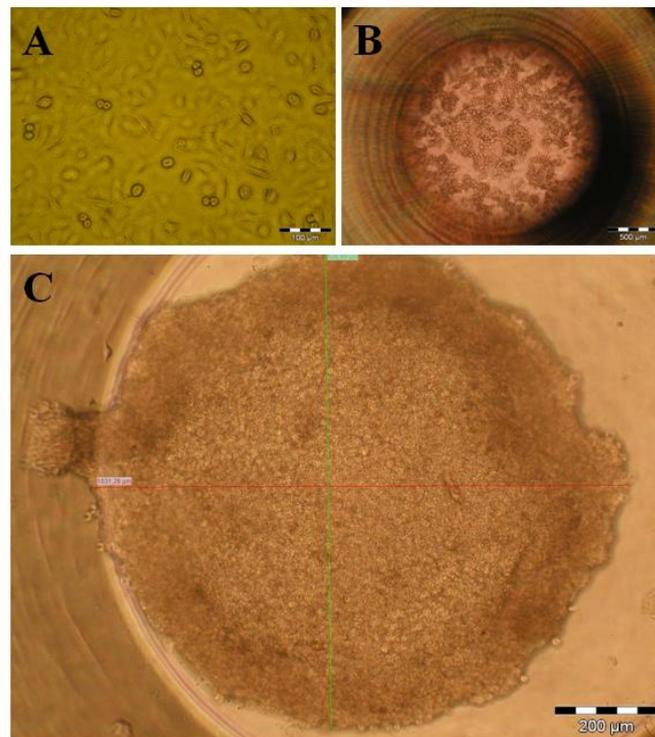


Abbildung 4-35: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A-549-Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A) und als Hanging-Drop nach 24 h (B) und nach 48 h (C).

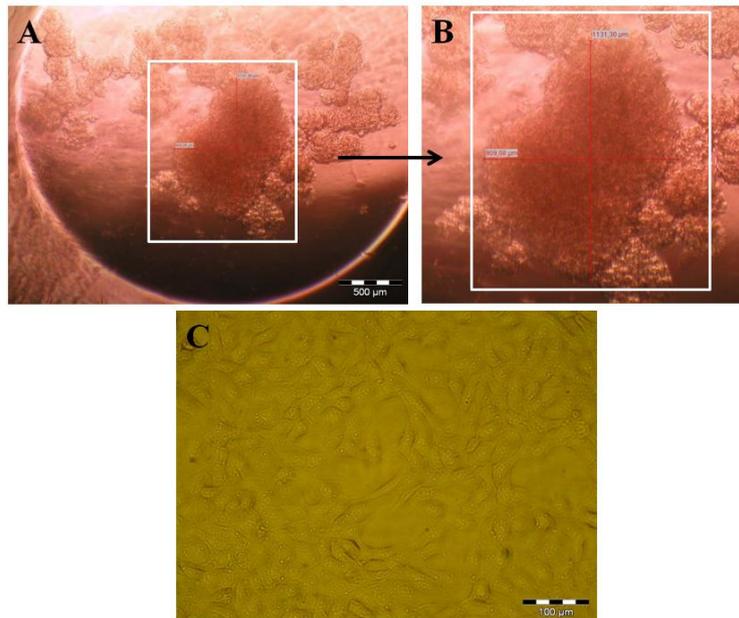


Abbildung 4-36: Lichtmikroskopische Aufnahmen von NIH-3T3 Zellen kultiviert auf einer normalen Zellkulturoberfläche (A) und als Hanging-Drop (B) (C).

Nachdem die Kultivierung von Sphäroiden optimiert wurde, wurden diese zur Bestimmung der Toxizität von Nanopartikeln eingesetzt.

In Abbildung 4-37 sind die Viabilitäten von 3D-Kulturen₁ der A-549- (A), NIH-3T3- (B), HEP-G2- (C) und CACO-2-Zellen (D) kultiviert mit unterschiedlichen Konzentrationen an ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen dargestellt.

Aus den Ergebnissen für die A-549-Zellen und HEP-G2-Zellen können keine Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt werden, da die Konzentrationen im untersuchten Bereich keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben. Die Viabilitäten der A-549-Zellen und HEP-G2-Zellen kultiviert mit Partikeln und Ionen weichen zwar signifikant von der Viabilität der Zellen kultiviert in Normalmedium ab, zeigen aber untereinander keine signifikanten Unterschiede. Ein eindeutiger toxischer Effekt der Partikel und Ionen im untersuchten Konzentrationsbereich von 5 -100 ppm auf die, über die Hanging-Drop-Methode hergestellten 3D-Kulturen₁ von A-549 und HEP-G2-Zellen konnte somit nicht festgestellt werden.

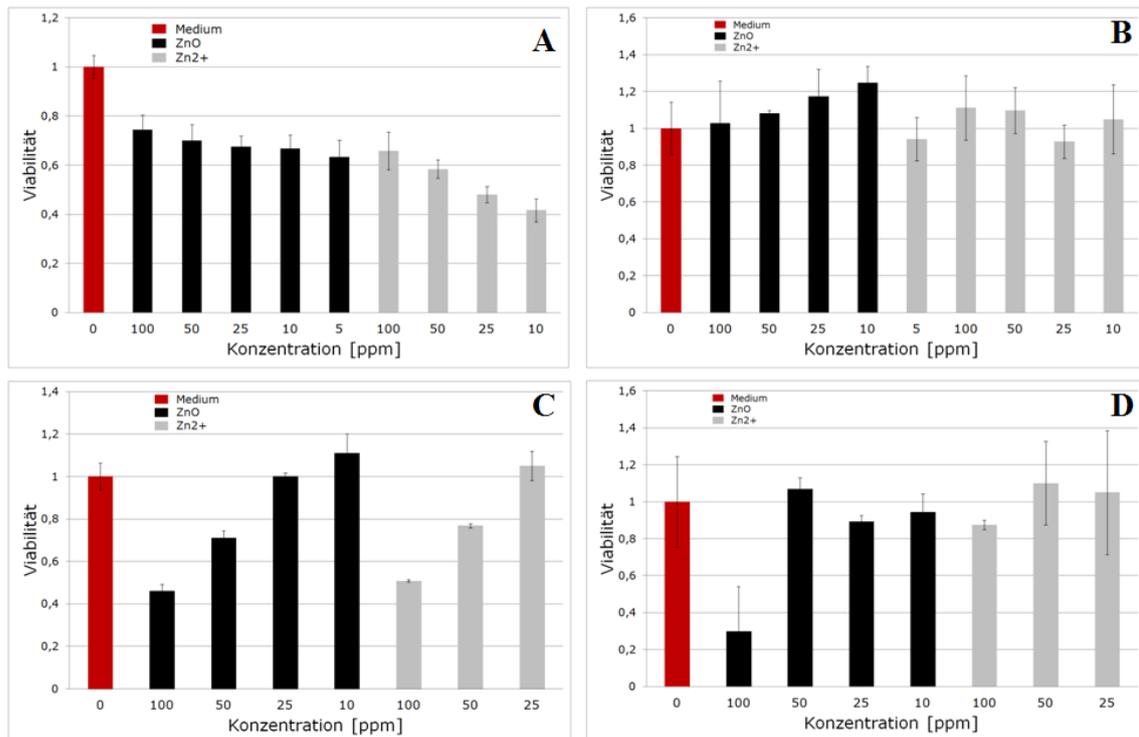


Abbildung 4-37: Viabilitäten von 3D-strukturierten, über die Hanging-Drop-Methode hergestellten und mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen kultivierten A-549 (A), NIH-3T3 (B), HEP-G2 (C), CACO-2 (D)-Zellen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Für die HEP-G2- und CACO-2 Zellen lassen sich Dosis-Wirkungskurven der 3D-Kulturen₁ kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen berechnen. In Abbildung 4-38 sind die Dosis-Wirkungskurven von HEP-G2-Zellen als 2D- und 3D-Kultur kultiviert mit Partikel und Ionen, sowie die experimentell bestimmten Viabilitäten gezeigt.

Die Partikel und Ionen haben einen wesentlich stärkeren toxischen Effekt auf die 2D-Kulturen als auf die als Sphäroide₁ der HEP-G2-Zellen. Die Werte in Tabelle 4-19 zeigen, dass die Partikel 10-mal toxischer auf die 2D-Kulturen, als auf die 3D-Kulturen₁ sind und die Ionen eine 5-mal stärker toxische Wirkung auf die 2D-Kultur haben. Die Tendenz, dass die Partikel stärker toxisch als die Ionen sind bleibt auch bei den 3D-Kulturen₁ erhalten, allerdings sind die Unterschiede in der Toxizität wesentlich weniger stark ausgeprägt als bei den 2D-Kulturen.

Die in Abbildung 4-39 dargestellten Dosis-Wirkungs-Kurven als 2D- und 3D₁ strukturierten und mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen behandelten CACO-2-Zellen zeigen das gleiche Ergebnis wie die HEP-G2-Zellen. Auch auf die CACO-2 Zellen wirken die Partikel und die Ionen auf die 2D-Kultur erheblich stärker toxisch als auf

die 3D-Kultur₁. Die Tendenz, der höheren Toxizität der Partikel im Gegensatz zu den Ionen bleibt bei den 3D-Kulturen₁ erhalten, aber wie schon bei den HEP-G2-Zellen weniger stark ausgeprägt.

Aus den in Tabelle 4-20 berechneten Werten ist erkennbar, dass die ZnO-Partikel eine 8-mal toxischere Wirkung und die Zn²⁺-Ionen eine 4-mal stärker toxische Wirkung auf die 2D-Kultur von CACO-2-Zellen im Vergleich zur die 3D-Kultur₁, haben.

Tabelle 4-19: NOAEC, IC₅₀ und TLC von HEP-G2-Zellen als 2D und 3D-Kultur₁ kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen

	ZnO			Zn ²⁺		
	NOAEC	IC ₅₀	TLC	NOAEC	IC ₅₀	TLC
2D	13 ppm	14 ppm	16 ppm	26 ppm	34 ppm	43 ppm
3D ₁	17 ppm	93 ppm	169 ppm	19 ppm	99 ppm	179 ppm

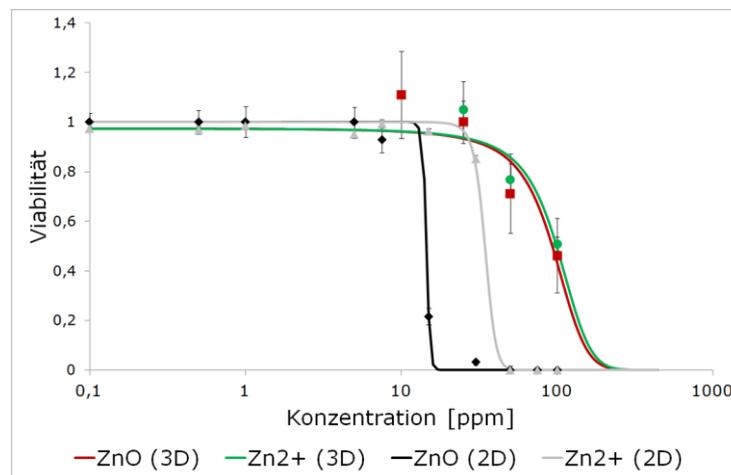


Abbildung 4-38: Dosis-Wirkungs-Kurven sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von HEP-G2-Zellen als 3D₁ und 2D-Kultur kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen.

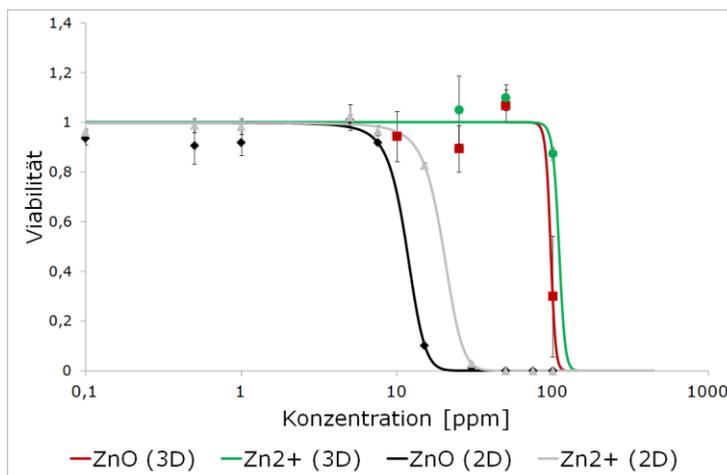


Abbildung 4-39: Dosis-Wirkungskurven sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von CACO-2-Zellen als 3D₁ und 2D-Kultur kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen.

Tabelle 4-20: NOAEC, IC₅₀ und TLC von CACO-2-Zellen als 2D und 3D-Kultur₁ kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen.

	ZnO			Zn ²⁺		
	NOAEC	IC ₅₀	TLC	NOAEC	IC ₅₀	TLC
2D	8 ppm	11 ppm	13 ppm	11 ppm	20 ppm	28 ppm
3D ₁	87 ppm	97 ppm	107 ppm	95 ppm	110 ppm	124 ppm

Die über die silikonbeschichteten Platten hergestellten Sphäroide₂ wurden ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen an ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen kultiviert und anschließend die Viabilität bestimmt. Die ermittelten Viabilitäten der A-549-Sphäroide₂ (A), der NIH-3T3-Sphäroide₂ (B), der HEP-G2-Sphäroide₂ (C) und der CACO-2-Sphäroide₂ (D) nach Zugabe von ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen sind in Abbildung 4-40 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Partikel und Ionen im untersuchten Konzentrationsbereich auf alle Sphäroide₂ einen toxischen Effekt haben.

Die über Formel 6.1 ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven der A-549 (A)- NIH-3T3 (B), HEP-G2 (C)- und CACO-2-Sphäroide₂ kultiviert mit Partikeln und Ionen, dargestellt in Abbildung 4-41, machen deutlich, dass die Zn²⁺-Ionen auf alle Sphäroide₂ eine toxischere Wirkung als die Partikel haben. Die in Tabelle 4-21

gezeigten Werte bestätigen diese Aussage. Die TLC für die Zn^{2+} -Ionen sind für alle Sphäroide₂ höher als die der Partikel, allerdings sind die Unterschiede nicht sehr ausgeprägt. Die IC_{50} der Zn^{2+} -Ionen auf die HEP-G2-Sphäroide₂ ist höher als die der Partikel, was bedeutet, dass der toxische Schwellenbereich der Partikel enger liegt als für die Ionen. Die am empfindlichsten auf Partikel und Ionenzugabe reagierenden Sphäroide₂ stellen die NIH-3T3-Sphäroide₂ dar, hier liegt die TLC der Partikel bei 8 ppm und die der Ionen bei 16 ppm. Am unempfindlichsten auf die Kultivierung mit ZnO-Nanopartikeln und Zn^{2+} -Ionen reagieren die A-549-Sphäroide₂ (TLC der Partikel = 37 ppm, TLC der Ionen = 48 ppm).

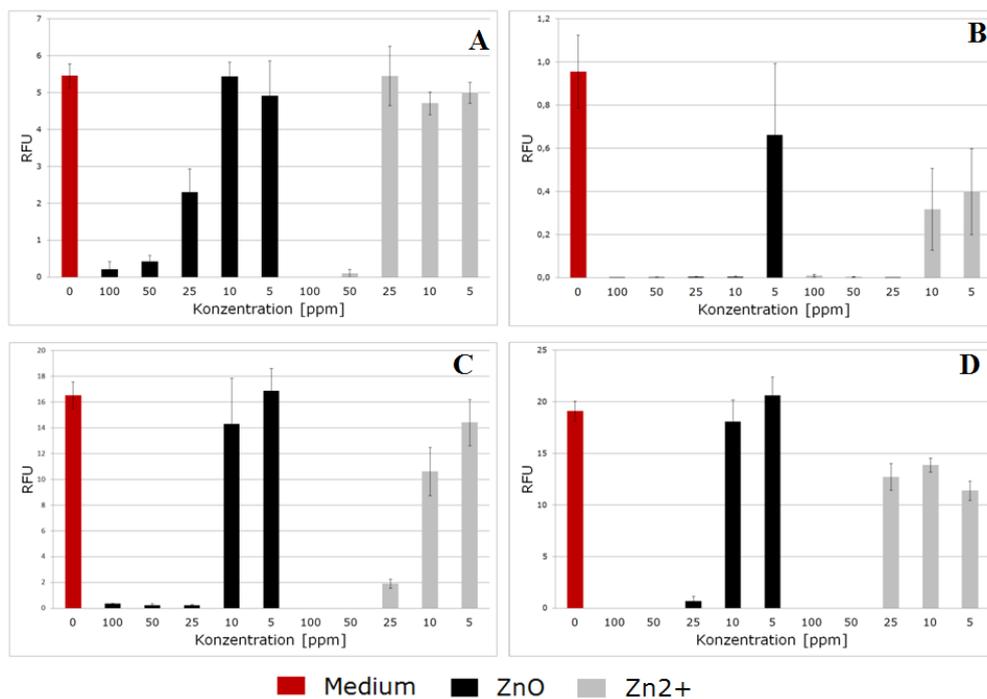


Abbildung 4-40: Viabilitäten von 2D- und auf einer silikonbeschichteten Oberfläche hergestellten 3D-Kulturen₂ von A-549 (A), NIH-3T3 (B), HEP-G2 (C), CACO-2 (D) kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

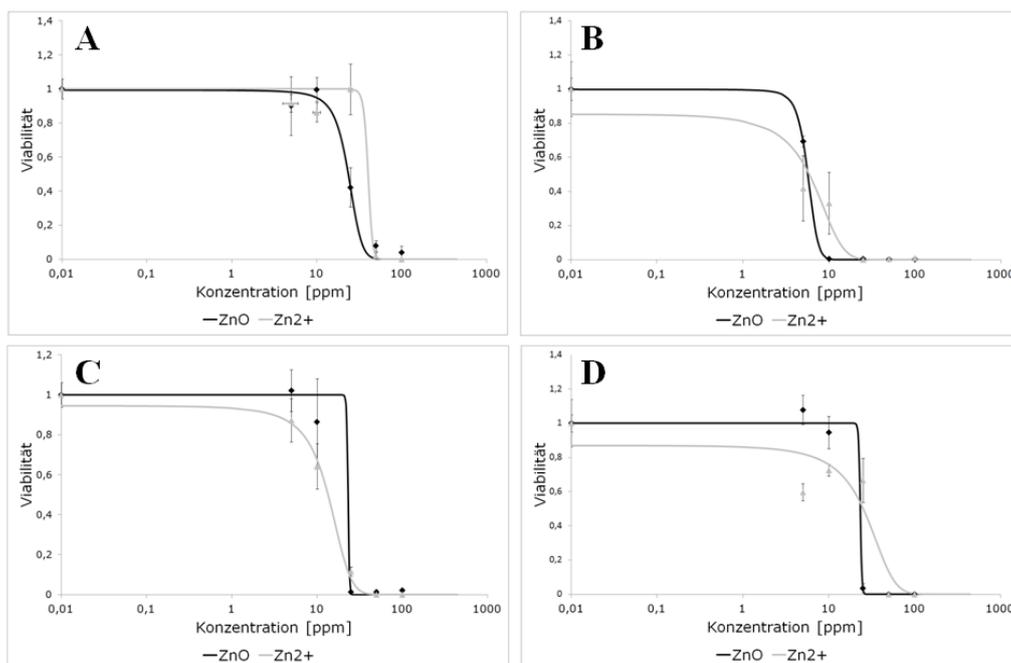


Abbildung 4-41: Dosis-Wirkungs-Kurven, sowie experimentell bestimmte Viabilitäten von, über silikonbeschichtete Platten hergestellten 3D-Kulturen₂ von A-549 (A)-, NIH-3T3 (B)-, HEP-G2 (C)- und CACO-2 (D)-Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen.

Tabelle 4-21: NOAEC, IC₅₀ und TLC von, über silikonbeschichtete Platten hergestellten 3D-Kulturen₂ von A-549-, NIH-3T3-, HEP-G2- und CACO-2-Zellen.

	ZnO			Zn ²⁺		
	NOAEC	IC ₅₀	TLC	NOAEC	IC ₅₀	TLC
A-549	10 ppm	24 ppm	37 ppm	33 ppm	40 ppm	48 ppm
NIH-3T3	3 ppm	6 ppm	8 ppm	n.b.	6 ppm	16 ppm
HEP-G2	22 ppm	23 ppm	24 ppm	n.b.	14 ppm	27 ppm
CACO-2	22 ppm	23 ppm	24 ppm	n.b.	25 ppm	64 ppm

Fazit:

Bei Kultivierung der Zelllinien als Hanging-Drop-Kultur weisen diese nach bereits 24 h 3D-strukturierte Zellaggregate auf, die sich nach 48 h zu einem großen Sphäroid mit Durchmessern von etwa 1000 µm zusammenschließen. Kultiviert man die Zelllinien auf silikonbeschichteten Platten bilden sich nach 3 Tagen mehrere kleine

Sphäroide₂ mit Durchmessern zwischen 250 -550 µm aus. Die Partikel haben auf die 3D-Kulturen₁ der Zellen eine toxischere Wirkung als die Ionen. Die Toxizität der ZnO-Partikel und der Zn²⁺-Ionen ist bei den HEP-G2-Zellen 10, bzw. 5 mal niedriger und bei den CACO-2-Zellen 8, bzw. 4 mal niedriger als bei den über die Hanging-Drop-Methode kultivierten Sphäroide₁ der Zelllinien.

Die Sphäroide der Zelllinien, die über die silikonbeschichteten Platten hergestellt wurden, zeigen ein ähnliches Verhalten wie die 2D-Strukturen der Zellen. Es ist zwar anhand der berechneten TLC erkennbar, dass die ZnO-Partikel auf die 2D-Strukturen toxischer als auf die Sphäroide₂ wirken, diese Unterschiede sind aber kaum relevant.

Die Empfindlichkeiten der unterschiedlichen Zellen auf die Partikelzugabe bleiben erhalten. Sowohl auf die 2D-Kultur auch als auf die 3D-Kultur₂ reagieren die NIH-3T3-Zellen am empfindlichsten (TLC_{2D} = 7 ppm, TLC_{3D(2)} = 8 ppm), gefolgt von den HEP-G2 und den CACO-2-Zellen (TLC_{2D} = 16 ppm, TLC_{3D(2)} = 24 ppm) und den A-549-Zellen (TLC_{2D} = 29 ppm, TLC_{3D2} = 37 ppm).

Die Sphäroide₂ mit einem Durchmesser zwischen 250 und 550 µm verhalten sich eher wie die 2D-Strukturen, während die Sphäroide₁ mit Durchmessern von 1000 µm ein anderes Verhalten als die 2D-Zellkulturen zeigen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Nanopartikel, die im Inneren des Sphäroids liegende Zellen nicht erreichen und deshalb einen weniger toxischen Effekt ausüben.

4.5 Bestimmung von ROS

Um den, auf die durch die Partikel ausgelösten oxidativen Stress, auf die Zellen zu bestimmen, wurde der Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Kit, beschrieben in Abschnitt 6.10, verwendet. Dazu wurden die NIH-3T3-Zellen 3 Tage in 96-Platten kultiviert und anschließend mit 10 ppm Silbernanopartikel und Ag⁺-Ionen, 50 ppm ZnO-Nanopartikel, Zn²⁺-Ionen und 500 ppm Titandioxidnanopartikel (2 nm) versetzt. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich Zellen mit *tert*-butylhydroperoxid, welches nachweislich oxidativen Stress in Zellen auslöst kultiviert. 20 Minuten nach Zugabe der Partikel, Ionen sowie von *tert*-butylhydroperoxid wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. In Abbildung 4-42 sind mikroskopische Aufnahmen nach Zugabe von Carboxy-H₂DCFDA von NIH-3T3-Zellen in Normalmedium (A) mit *tert*-butylhydroperoxid als

Positivkontrolle (B), 10 ppm Ag^+ -Ionen (C), 10 ppm Silbernanopartikeln (D), 50 ppm Zn^{2+} -Ionen (E), 50 ppm ZnO-Nanopartikeln und 500 ppm TiO_2 -Partikeln (2 nm) gezeigt.

Es ist zu erkennen, dass die in Normalmedium kultivierten Zellen (A) keinem oxidativen Stress ausgesetzt sind. Auch die Zellen, kultiviert mit 10 ppm Ag^+ -Ionen, zeigen kaum ROS (C), wohingegen die mit 10 ppm kultivierten Zellen größerem oxidativen Stress ausgesetzt sind (D). Auch bei den Zellen, kultiviert mit 50 ppm ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen sowie 500 ppm TiO_2 , sind diese oxidativem Stress ausgesetzt. Die Konzentrationen der zu den NIH-3T3-Zellen gegebenen Zn^{2+} -Ionen (TLC = 60 ppm) und TiO_2 -Partikeln (TLC = 818 ppm) lagen unter den in Abschnitt 4.4.2 und 4.4.3 ermittelten TLC. Das bedeutet, dass die Zellen zwar oxidativem Stress ausgesetzt sind, dieser aber keinen toxischen Effekt hat und die Zellen den Stress ausgleichen können.

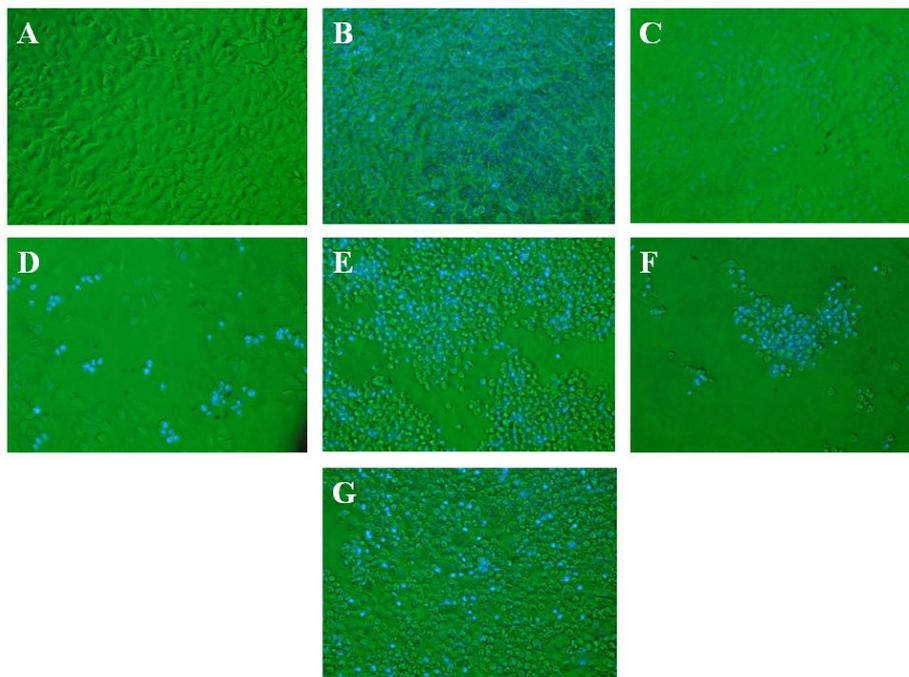


Abbildung 4-42: Lichtmikroskopische Aufnahmen des, mit dem Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Kit gefärbten NIH-3T3-Zellen kultiviert in normalen Medium (A) mit *tert*-butylhydroperoxid, als Positivkontrolle (B) mit 10 ppm Ag^+ -Ionen im Medium (C) mit 10 ppm Silbernanopartikeln im Medium (D) mit 50 ppm Zn^{2+} -Ionen im Medium (E) mit 50 ppm ZnO-Nanopartikeln im Medium (F) und mit 500 ppm TiO_2 -Partikeln (2 nm) im Medium.

4.6 Bestimmung des Zelltodes

Um die Art des Todes von Zellen nach Kultivierung mit Nanopartikel und Ionen bestimmen zu können wurden unterschiedliche Methoden angewandt. Der Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose ist in Abschnitt 3.6.3 beschrieben.

Um den Zelltod bestimmen zu können, muss man die Zellen mit Konzentrationen an Partikeln und Ionen kultivieren, bei denen man vorher über den MTT-Test ermittelt hat, dass diese auf die Zellen eine toxische Wirkung haben. Für die Zelltoduntersuchungen wurden aus diesem Grund Konzentration von 50 ppm ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen eingesetzt und 10 ppm Silberpartikel und Ag^+ -Ionen.

4.6.1 LDH-Test

Um die Membranintegrität der Zellen nach Zugabe von Partikeln und Ionen zu bestimmen, welche ein Anzeichen von Nekrose ist, wurde LDH im Überstand der Zellkultur gemessen. Die des Tests zugrunde liegende Reaktion, sowie die Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 4.6.1 beschrieben.

Zunächst wurde über eine Kinetik der geeignete Zeitpunkt der Messung bestimmt. Dafür wurden NIH-3T3-Zellen 55 Stunden mit ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm und 10 ppm und als Referenz mit ZnO-Mikropartikeln (2 μm) in einer Konzentration von 50 ppm kultiviert. Die Messung an freigesetztem LDH im Kulturüberstand der Zellen erfolgte nach 6, 24, 30, 49 und 55 Stunden, dargestellt in Abbildung 4-43. Die mit Partikeln kultivierten NIH-3T3-Zellen zeigen eine deutlich höhere Freisetzung von LDH als die Zellen kultiviert in Normalmedium. Nach 30 h ist die LDH-Konzentration im Medium, der mit Partikel versetzten Zellen, am höchsten, weshalb im Folgenden für die Bestimmung der LDH im Medium von Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln eine Inkubationszeit mit Partikeln und Ionen von 30 h gewählt wurde.

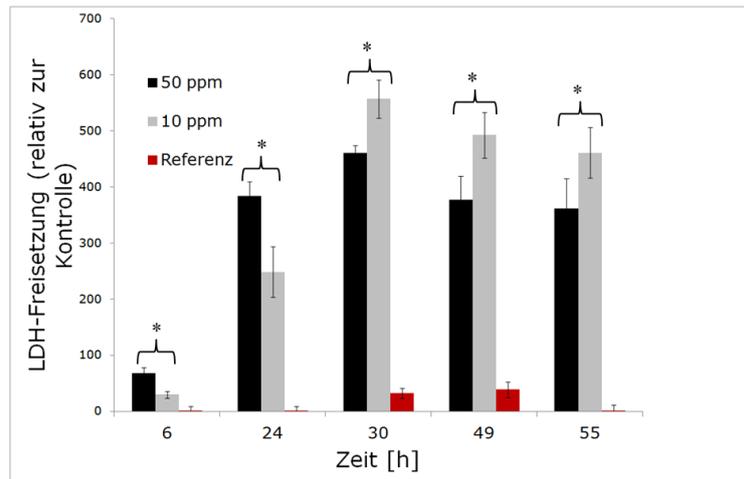


Abbildung 4-43: Freisetzung von LDH im Kulturmedium von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 ppm und 10 ppm und mit ZnO Mikropartikeln in einer Konzentration von 50 ppm als Referenz über einen Zeitraum von 6-55 h. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Für die Bestimmung der LDH im Kulturüberstand von NIH-3T3-Zellen, kultiviert mit Silbernanopartikeln, Silbermikropartikeln ($1 \mu\text{m}$) und Ag^+ -Ionen, wurde die gleiche Kinetik aufgestellt. In Abbildung 4-45 ist die Freisetzung an LDH ins Kulturmedium von NIH-3T3 Zellen kultiviert mit einer Konzentration 5 und 10 ppm Silbernanopartikeln und 10 ppm Silbermikropartikeln nach 6, 24, 30, 49 und 55 h gezeigt. Alle NIH-3T3-Zellen kultiviert mit den Partikeln und Ionen gaben LDH ins Kulturmedium ab, wobei auch hier nach 30 h ein Maximum erreicht wurde. Für die folgenden Messungen der Bestimmung von LDH im Kulturüberstand, von mit Silberpartikeln und Silberionen kultivierten Zellen wurde, ebenfalls eine Inkubationszeit mit Partikeln und Ionen von 30 h gewählt.

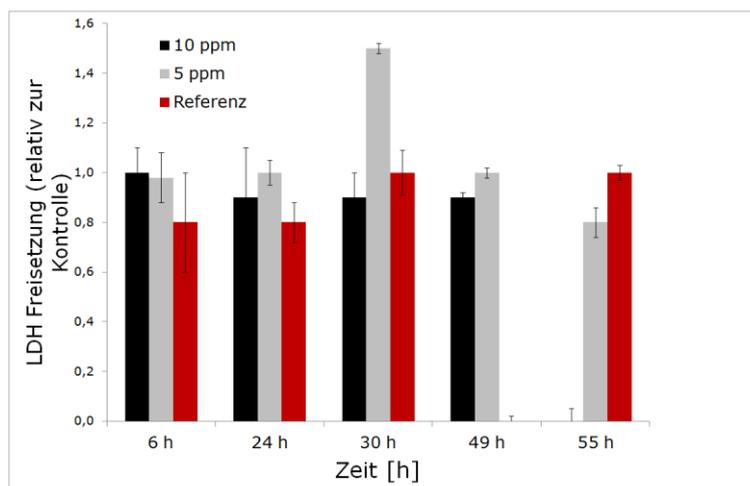


Abbildung 4-44: Freisetzung von LDH im Kulturmedium von NIH-3T3-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm und 5 ppm und mit Silber-Mikropartikeln in einer Konzentration von 10 ppm als Referenz über einen Zeitraum von 6-55 h. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

In Abbildung 4-45 ist die LDH-Freisetzung von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E) und CACO-2-Zellen (F) kultiviert über 30 h mit verschiedenen dotierten ZnO-Nanopartikeln, sowie undotierten ZnO Partikeln und Zn^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm im Medium, relativ zur Kontrolle, Zellen kultiviert in Normalmedium, gezeigt.

Es ist zu erkennen, dass bei Kultivierung von A-549-Zellen mit den dotierten und undotierten ZnO-Partikeln sowie der Zn^{2+} -Ionen in Konzentrationen von 50 ppm, die Freisetzung bei Kultivierung mit 7 % Al, 3 % Sb, 3 % Ag dotierten Partikel am höchsten ist. Die geringste Freisetzung war bei Zellen inkubiert mit 2 % Mn dotierten ZnO-Partikeln zu messen. Die LDH-Freisetzung von Zellen versetzt mit 50 ppm Zn^{2+} -Ionen war höher als die der Zellen versetzt mit 50 ppm ZnO-Partikel.

Auch bei Kultivierung von NIH-3T3-Zellen mit 7 % Al, 3 % Sb sowie mit Ag dotierten Partikeln war die höchste LDH zu messen, während Zellen kultiviert mit 2 % Mn dotierten ZnO keine LDH freisetzten. Zn^{2+} -Ionen in Konzentrationen von 50 ppm setzten mehr LDH frei als 50 ppm ZnO als Zusatz zu NIH-3T3-Zellen. Nur die Kultivierung mit silberdotierten Partikeln und Zn^{2+} -Ionen setzte LDH ins Kulturmedium von HEP-G2-Zellen frei, wohingegen bei Kultivierung von PC-12 Zellen mit den Partikeln und Ionen, bei allen Partikeln sowie den Zn^{2+} -Ionen eine LDH-Abgabe ins Medium zu messen war. Die größere Menge an LDH gaben auch

hier Zellen nach Zugabe Zn^{2+} -Ionen im Gegensatz zu den Zellen nach Zugabe von ZnO-Partikeln ab. Nur die mit 2 % Co dotierten HELA-Zellen setzen LDH ins Kulturmedium frei. CACO-2-Zellen mit 7 % Al dotierten Partikeln wiesen die höchste LDH-Freisetzung ins Medium auf, die mit 2 % Mn dotierten am wenigsten, wobei bei allen mit Partikeln kultivierten HELA-Zellen LDH im Zellkulturüberstand zu messen war.

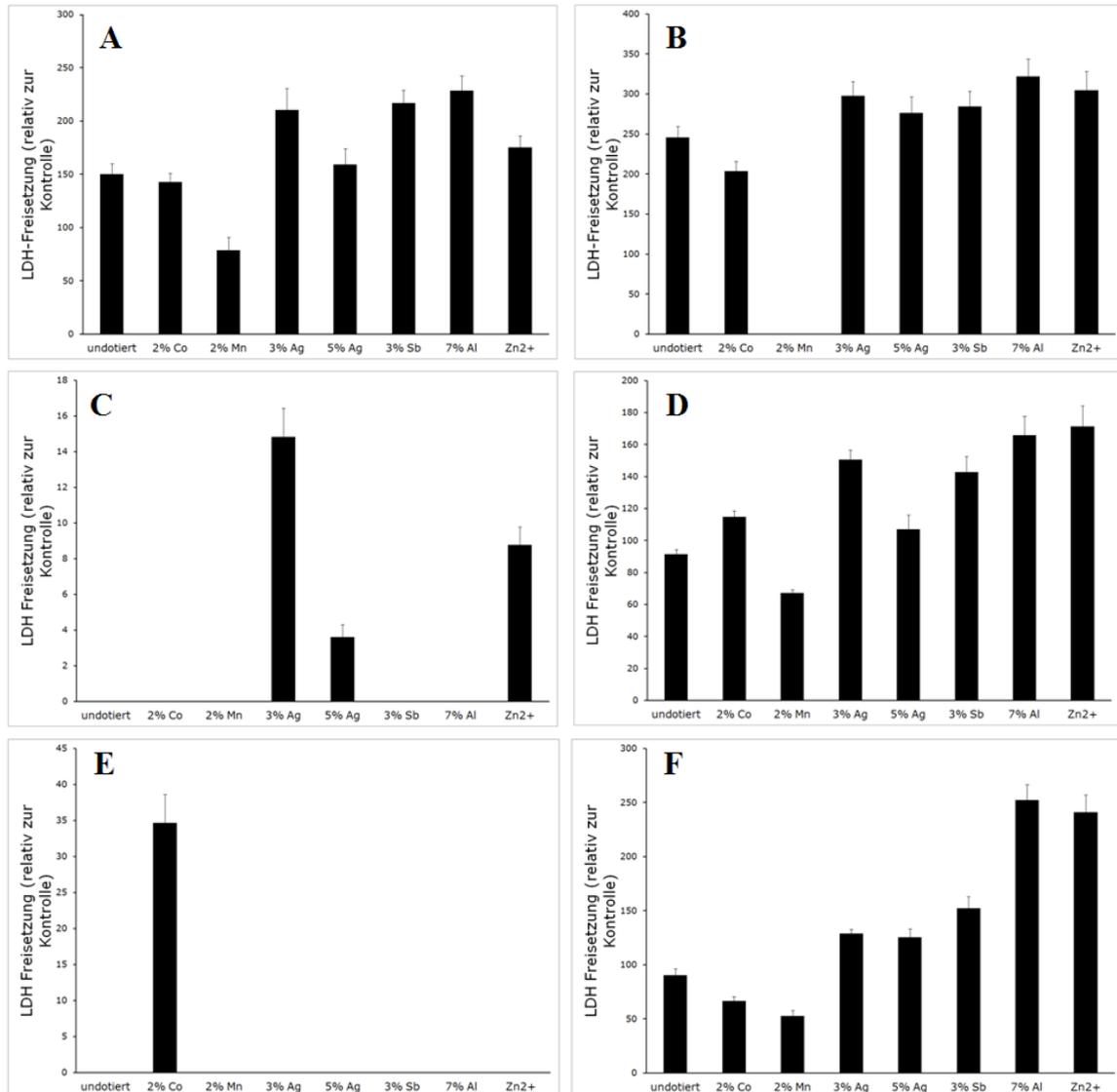


Abbildung 4-45: Freisetzung von LDH im Kulturmedium, relativ zur Kontrolle (Zellen kultiviert in Normalmedium) von A-549-Zellen (A), NIH-3T3-Zellen (B), HEP-G2-Zellen (C), PC-12-Zellen (D), HELA-Zellen (E) und CACO-2-Zellen (F) kultiviert über 30 h mit verschieden dotierten ZnO-Nanopartikeln, sowie undotierten ZnO Partikeln und Zn^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm im Medium. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Die A-549-Zellen kultiviert mit 50 ppm 7 % Al dotierten ZnO-Partikeln verursachen die höchste LDH-Freisetzung ins Kulturmedium, besitzen aber im Gegensatz zu den anderen Partikeln eine niedrige TLC von 74 ppm (berechnet in 4.4.2 und gezeigt in Tabelle 4-7). Auch die höhere Freisetzung von LDH der mit Zn^{2+} -Ionen kultivierten Zellen im Gegensatz zu Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln, steht nicht im Zusammenhang mit den berechneten TLC ($ZnO = 29$ ppm, $Zn^{2+} = 43$ ppm).

Deutlicher wird dieses noch bei der LDH-Freisetzung der mit Partikeln kultivierten CACO-2-Zellen. Hier setzten nur mit 2 % Co-dotierte ZnO-Partikel LDH frei, wohingegen die TLC der anderen Partikel teilweise niedriger oder im gleichen Bereich liegen. Die Messung an freigesetzter LDH im Zellkulturüberstand von Zellen kann also nicht gleich der Viabilität der Zellen gesetzt werden. Es können lediglich Aussagen über die Membranintegrität gemacht werden, was einen ersten Beweis für nekrotische Zellen darstellt. Die Todesarten der Zellen kultiviert mit den unterschiedlichen Partikeln scheinen sich demnach zu unterscheiden, da alle Partikel in dem untersuchten Konzentrationen von 50 ppm die Viabilität der Zellen deutlich beeinflussten, aber nicht alle Zellen eine Freisetzung an LDH zeigten.

Um die Membranintegrität der Zellen kultiviert mit Silbernanopartikel und Ionen zu bestimmen und somit eventuelle Rückschlüsse auf Unterschiede in der Art des Todes machen zu können, wurden A-549-Zellen mit Silberpartikeln und Ionen kultiviert und nach 30 h die LDH-Freisetzung bestimmt.

In Abbildung 4-46 ist die LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert in Normalmedium, mit 10 und 5 ppm Silbernanopartikeln im Medium und mit 10 ppm Ag^+ -Ionen nach 30 h gezeigt. Es ist zu erkennen, dass Zellen kultiviert in Normalmedium LDH freisetzen, da von einigen Zellen die Membranintegrität auch in einer normalen Zellkultur nicht mehr vorhanden ist. Die mit einer Konzentration von 10 ppm Silbernanopartikel kultivierten Zellen zeigen keine Unterschiede in der LDH-Freisetzung, obwohl hier nur noch rund 50 % der Zellen viabel sind ($IC_{50} = 10$ ppm). Auch die mit 5 ppm kultivierten Silbernanopartikel weisen keine erhöhte Konzentration an LDH im Kulturüberstand auf. Die mit 10 ppm Ag^+ -Ionen kultivierten Zellen zeigen eine deutlich erhöhte Freisetzung von LDH ins Kulturmedium. Die NOAEC von Silberionen auf A-549-Zellen, also die Konzentration bei der nach Definition noch rund 95 % der Zellen viabel sind, beträgt 19 ppm. Das bedeutet, dass weniger als 5 % tote Zellen einen höhere Schädigung der

Membran hervorrufen als rund 50 % tote Zellen bei Kultivierung mit den Silberpartikeln.

Das Ergebnis lässt vermuten, dass die Zellen bei Kultivierung mit Ionen nekrotisch und bei Kultivierung mit Partikeln apoptotisch sind.

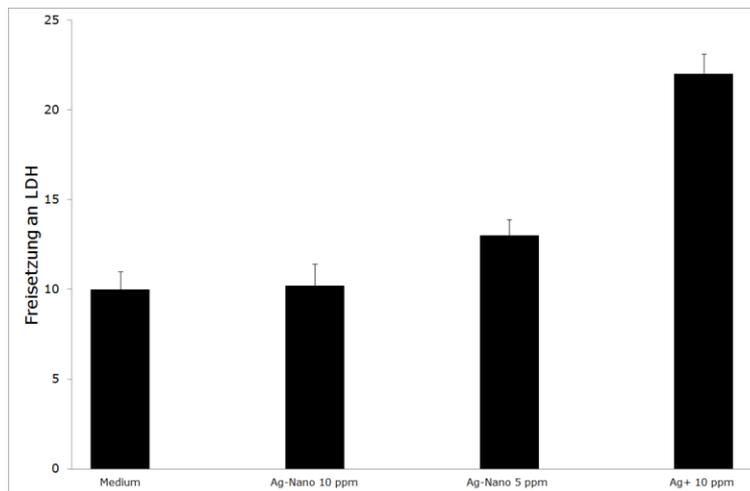


Abbildung 4-46: LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert mit Medium mit 10 und 5 ppm Silbernanopartikeln und mit 10 ppm Ag^+ -Ionen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

In Abbildung 4-47 ist die LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert in Normalmedium, mit 10 und 50 ppm ZnO-Nanopartikeln im Medium und mit 50 ppm Zn^{2+} -Ionen nach 30 h gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Zellen kultiviert mit Partikeln und Ionen eine höhere Freisetzung an LDH ins Kulturmedium aufweisen als Zellen kultiviert in Normalmedium. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Zellen kultiviert mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen Nekrose unterliegen.

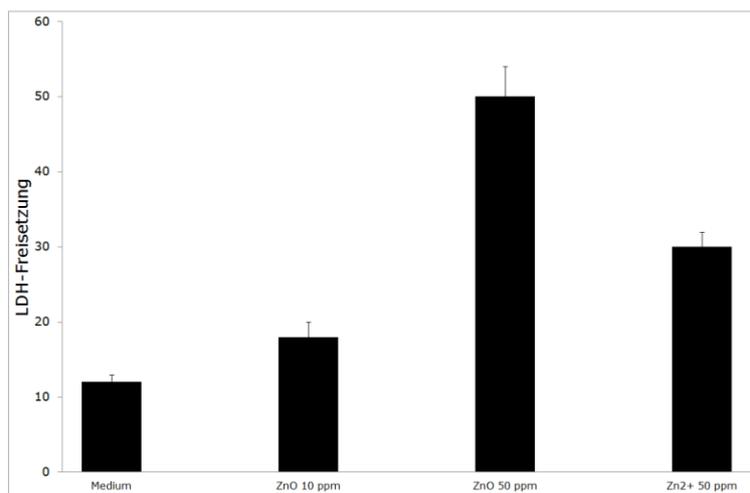


Abbildung 4-47: LDH-Freisetzung von A-549-Zellen kultiviert mit Medium mit 10 und 50 ppm Silbernanopartikeln und mit 50 ppm Zn^{2+} -Ionen. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Fazit:

Über eine Kinetik der LDH-Freisetzung von Zellen kultiviert mit Silbernano- und Mikropartikeln, sowie ZnO-Nano- und Mikropartikel, über einen Zeitraum von 6-55 h wurde aufgrund der höchsten LDH-Freisetzung nach 30 h für die folgenden Versuche eine Inkubation der Zellen mit Partikel und Ionen von 30 h gewählt. Alle Zelllinien zeigten bei Kultivierung mit dotierten ZnO-Partikeln eine sehr unterschiedliche Freisetzung an LDH ins Medium. Bei HELA-Zellen war nur nach Zugabe von 2 % Co dotierten ZnO-Partikeln und bei HEP-G2-Zellen nur bei Kultivierung mit den silberdotierten Partikeln und Ionen, LDH im Kulturüberstand nachzuweisen.

Bei Kultivierung von NIH-3T3-Zellen mit Silberpartikeln und Ag^+ -Ionen, setzten die mit den Ionen kultivierten Zellen LDH frei, bei den mit Partikeln kultivierten Zellen zeigten diese keine LDH-Freisetzung ins Medium.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die ZnO-Partikel, Zn^{2+} -Ionen und die Ag^+ -Ionen Nekrose auslösen, wohingegen die Silbernanopartikel vermutlich Apoptose auslösen. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssen jedoch weitere Untersuchungen zu dem Zelltodmechanismus durchgeführt werden.

4.6.2 Caspase 3/7-Aktivität

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Zelltods ist die Messung der Caspase3/7-Aktivität von Zellen.

Um Apoptose bestimmen zu können wurde die Caspase3/7-Aktivität der mit Partikeln und Ionen kultivierten Zellen gemessen. Die zugrunde liegende Reaktion, sowie Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 4.6.2 beschrieben.

In Abbildung 4-48 ist die Messung der Caspase3/7-Aktivität von A-549-Zellen kultiviert mit 5 und 10 ppm Silbernanopartikeln im Medium, 10 ppm Ag^+ -Ionen und in Normalmedium über einen Zeitraum von 20 h gezeigt. Es wird deutlich, dass die Caspase 3/7-Aktivität von Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln deutlich höher ist, als die der Zellen kultiviert in Normalmedium. Die Zellen nach Zugabe von 10 ppm Partikelkonzentration im Medium zeigten eine höhere Aktivität als die mit Konzentrationen von 5 ppm kultivierten A-549-Zellen. Die mit 10 ppm an Ag^+ -Ionen versetzten Zellen zeigten die gleiche Aktivität an Caspase3/7 wie die in Normalmedium kultivierten Zellen. Anhand dieser Messung wird das Ergebnis der Messung der LDH-Freisetzung ins Medium von mit Partikeln und Ionen kultivierten Zellen aus Abschnitt 4.6.1 bestätigt, dass es sich um unterschiedliche Arten des Zelltodes bei Kultivierung mit Partikeln im Gegensatz zu Ionen handelt. Die Zellen die mit Silbernanopartikelzusatz im Medium kultiviert wurden wiesen apoptotische Zellen auf, wohingegen bei die mit Ag^+ -Ionen kultivierten Zellen keine apoptotischen Zellen über die Bestimmung der Caspase3/7-Aktivität zu erkennen waren. Allerdings muss erwähnt werden, dass die eingesetzte Konzentration an Ag^+ -Ionen von 10 ppm im Medium weit unter der TLC von 144 ppm lag. Da diese aber in Konzentrationen von 10 ppm LDH ins Medium freisetzen, ist davon auszugehen, dass Silberionen Nekrose und Silberpartikel Apoptose in Zellen auslösen.

In Abbildung 4-49 ist die Messung der Caspase3/7-Aktivität von A-549-Zellen bei Kultivierung in Normalmedium, mit 10 und 50 ppm ZnO-Partikel und 50 ppm Zn^{2+} -Ionen im Medium gezeigt. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Caspase 3/7-Aktivität von Zellen kultivierten Normalmedium und mit Zusatz an Partikeln und Ionen zu erkennen. Die TLC von ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen auf A-549-Zellen liegen bei 29 ppm, bzw. 43 ppm, sodass ein Großteil der für die Messung verwendeten Zellen nicht mehr viabel waren. Die Ergebnisse der Messung der LDH-Freisetzung im

Medium der mit den Partikeln und Ionen versetzten Zellen, in der gleichen Konzentration, zeigten eine deutliche LDH-Freisetzung. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen keine Apoptose sondern Nekrose auslösen.

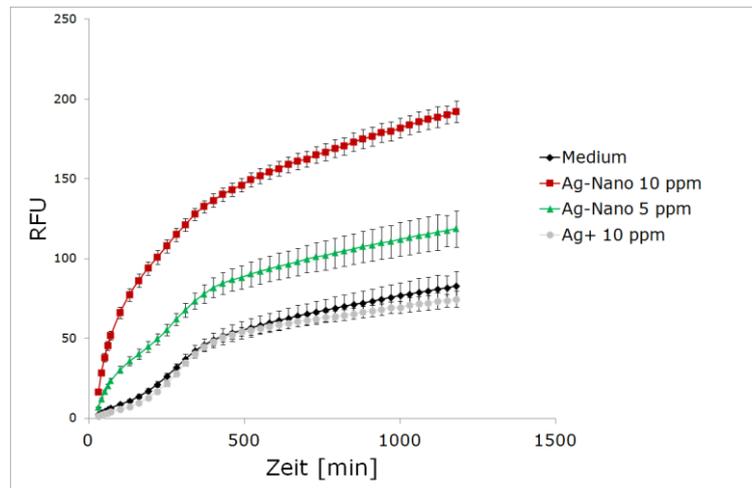


Abbildung 4-48: Caspase 3/7 Aktivität von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 und 5 ppm und mit Silberionen in einer Konzentration von 50 ppm im Vergleich zu Zellen kultiviert in Normalmedium über einen Kultivierungszeitraum von 20 h.

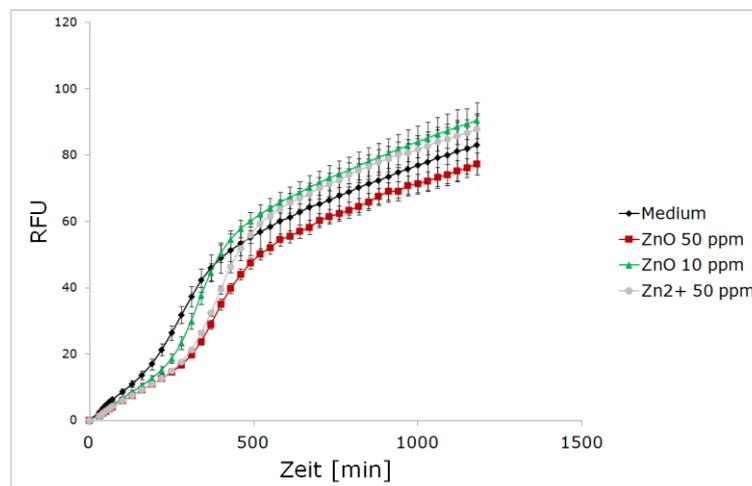


Abbildung 4-49: Caspase 3/7 Aktivität von A-549-Zellen kultiviert mit ZnO-Nanopartikeln in einer Konzentration von 50 und 10 ppm und mit Zn^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm im Vergleich zu Zellen kultiviert in Normalmedium über einen Kultivierungszeitraum von 20 h.

Fazit:

Die mit Silbernanopartikel kultivierten A-549-Zellen zeigten eine deutlich höhere Caspase3/7-Aktivität als die der Referenzzellen kultiviert in Normalmedium. Die mit Ag^+ -Ionen kultivierten Zellen zeigten, ebenso wie die mit ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen kultivierten Zellen keine erhöhte Aktivität von Caspase3/7 im Vergleich zur Referenz. Dieses Ergebnis bestätigt das über die Messung der LDH-Freisetzung erhaltene Ergebnis, dass Silbernanopartikel Apoptose auslösen, wohingegen die Kultivierung von Zellen mit Ag^+ -Ionen und ZnO-Partikeln und Zn^{2+} -Ionen zur Nekrose der Zellen führt.

4.6.3 Durchflusszytometrische Methoden

Um die in Abschnitt 4.6.1 und 4.6.2 erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen wurde eine weitere Methode zur Bestimmung des Zelltodes durchgeführt. Über die durchflusszytometrische Messung von mit FITC/AnnexinV und Propidiumiodid gefärbten Zellen kann eine Aussage über die prozentuale Anzahl, der in einer Zellkultur vorliegenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen gemacht werden. Die zugrunde liegende Reaktion und die Versuchsdurchführung sind in Abschnitt 6.13 beschrieben.

Die Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, die mit Konzentrationen an 10 ppm Silbernanopartikeln und 20 ppm ZnO-Partikel kultiviert wurden. Dazu wurden die Zellen 24 h mit den Lösungen inkubiert, anschließend mit den Farbstoffen versetzt und am Zytometer gemessen. Als Referenz dienten hierbei jeweils in Normalmedium kultivierte Zellen. In Abbildung 4-50 sind die durchflusszytometrischen Messungen der im Normalmedium (A) sowie für 24 h mit 15 ppm Silbernanopartikeln im Medium (B), kultivierten A-549-Zellen gezeigt.

Die Zellen, die sich im linken unteren Quadranten (Q_1) befinden sind AnnexinV und Propidiumiodid negativ, also lebende Zellen, die im rechten unteren Quadranten (Q_2) sind AnnexinV positiv und Propidiumiodid negativ, also apoptotische Zellen und die im rechten oberen Quadranten (Q_3) sind AnnexinV positiv und Propidiumiodid positiv, also nekrotische (früh apoptotische) Zellen.

Es ist zu erkennen, dass bei Kultivierung der Zellen in Normalmedium 85 % der Zellen leben, 7,8 % der Zellen nekrotisch und 3,1 % der Zellen apoptotisch sind. In einer unter Standardbedingung kultivierten Zellkultur sind also auch schon apoptotische und nekrotische Zellen vorhanden. In der Zellkultur, die für 24 h einer Konzentration von 15 ppm Silbernanopartikeln ausgesetzt war, befinden sich noch 4,3 % lebende Zellen, was eine gute Übereinstimmung zu der berechneten TLC (Zellen bei der nur noch 5 % der Zellen viabel sind) von 14 ppm darstellt (Vgl. Tabelle 4-4). Es konnten 51,9 % apoptotische und 42,9 % nekrotische Zellen nach Kultivierung mit Silbernanopartikeln detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussagen der Messung der LDH-Freisetzung und Messung an Caspase 3/7-Aktivität, der mit Partikeln kultivierten Zellen, dass die Partikel Apoptose auslösen.

In Abbildung 4-51 sind durchflusszytometrische Messungen von, mit FITC-AnnexinV und PI gefärbten Zellen, in Normalmedium (A) und nach 24-stündiger Inkubation mit einer Konzentration von 20 ppm an ZnO-Nanopartikeln im Medium (B) gezeigt. Nach Kultivierung mit 20 ppm ZnO-Partikeln im Medium sind noch 36,2 % der Zellen als viabel detektierbar, was auch hier einen gute Übereinstimmung mit der berechneten TLC von 29 ppm in und der IC_{50} von 17 ppm darstellt (Vgl. Tabelle 4-7). Die prozentuale Anzahl der apoptotischen Zellen in einer mit 20 ppm ZnO-Partikeln kultivierten A-549-Zellkultur beträgt 2,7 % und der Anteil der nekrotischen Zellen 56,8 %.

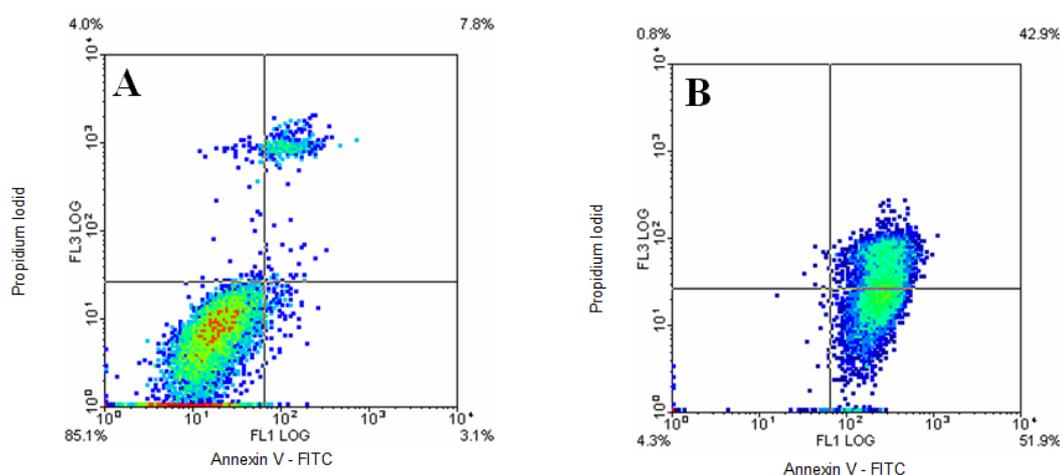


Abbildung 4-50: Durchflusszytometrische Messungen von A-549-Zellen kultiviert in Medium (A) und mit 15 ppm Silbernanopartikel im Medium nach 24 h (B).

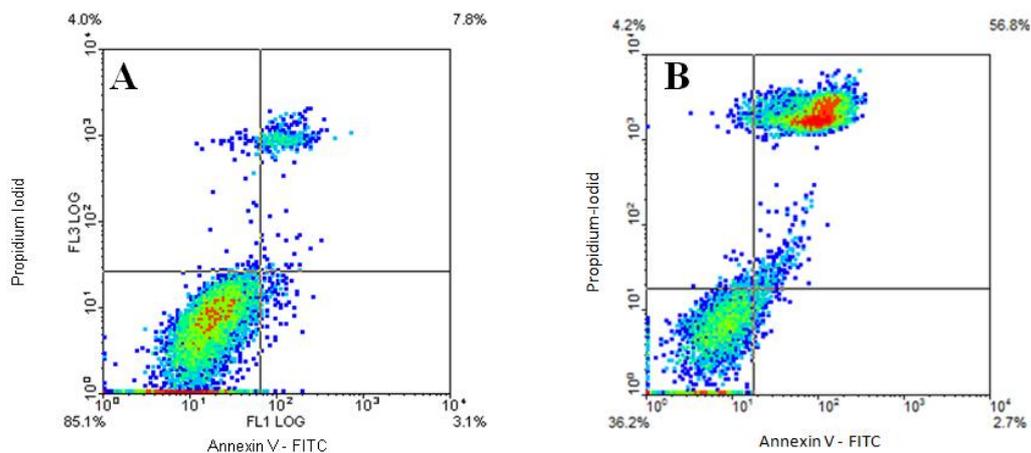


Abbildung 4-51: Durchflusszytometrische Messungen von A-549-Zellen kultiviert in Medium (A) und mit 20 ppm ZnO-Nanopartikel im Medium nach 24 h (B).

Fazit:

Die Zellkultur, die für 24 h mit einer Konzentration von 15 ppm an Silbernanopartikeln kultiviert wurden wies 51,9 % apoptotische Zellen auf, wohingegen der Anteil der apoptotischen Zellen ,der mit einer Konzentration von 20 ppm ZnO-Partikeln kultivierten Zellkultur nur bei 2,7 % lag. Es wird somit bestätigt, dass die Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln Apoptose unterliegen, während mit ZnO-Partikeln kultivierten Zellen aufgrund von Nekrose sterben.

4.7 DNA-Schädigung

Die Schädigung der DNA von Zellen kann über verschieden Methoden bestimmt werden. Die Methode, die in dieser Arbeit angewandt wurde ist der Komet-Assay.

4.7.1 Komet-Assay

Über den Komet-Assay können DNA-Schäden auf Einzelzellebene bestimmt werden. Dafür werden die Zellen mit den zu untersuchten Partikel kultiviert, und anschließend auf, mit Agarosegel beschichtete Objektträger aufgebracht. Nach der sich

anschließenden Lyse der Zellen folgen die Elektrophorese, die Neutralisation und anschließend das Färben der Zellen. Im angelegten elektrischen Feld der Gelelektrophorese kann nur fragmentierte DNA wandern, intakte DNA ist dafür zu hochmolekular. Das Wandern der DNA äußert sich visuell als eine Ausbildung eines Kometenschweifens. Zur Auswertung des Komet-Assay können drei Verfahren angewandt werden: 1.) die Messung des Kometen auf einem Mikrofilm, 2.) die visuelle Auswertung am Mikroskop, 3.) die computergestützte Bildanalyse.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Auswertung der Ergebnisse die visuelle Methode am Mikroskop verwendet. Hierfür wurden jeweils repräsentative Bildausschnitte der Mikroskopaufnahmen gewählt, Teilausschnitte vergrößert und die Ausbildung der Kometen bewertet. Die Kometen wurden in 5 Klassen unterteilt, wobei Klasse 0 keinem DNA-Schaden entspricht und Klasse 5 die höchste DNA-Schädigung darstellt (Abbildung 4-52).

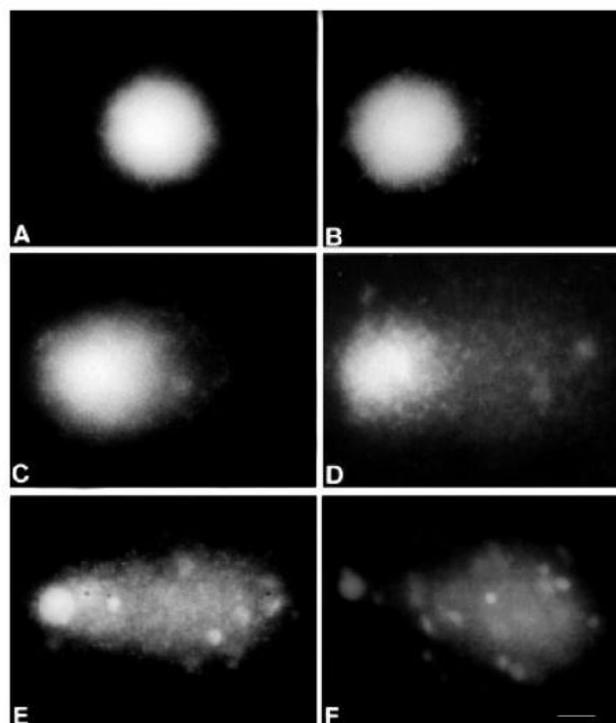


Abbildung 4-52: Einteilung der Kometen in die unterschiedliche Klassen: ungeschädigte Zellen, Klasse 0 (A), Klasse 1 (B), Klasse 2 (C), Klasse 3 (D), Klasse 4 (E) und am stärksten geschädigte Zellen, Klasse 5 (F) [226].

In den Abbildung 4-53 - Abbildung 4-57 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen kultiviert in Normalmedium und mit ZnO-Partikeln, Zn^{2+} -Ionen,

Silbernanopartikel und Ag^+ -Ionen gezeigt. Die Ausschnitte des linken Bildes wurden, jeweils vergrößert, rechts daneben dargestellt. Die in Normalmedium kultivierten Zellen dienen als Referenz für Zellen, die keine DNA-Schädigung aufweisen und wurden der Klasse 0 zugeordnet (Abbildung 4-53). Die Kometen, die von der DNA der Zellen kultiviert mit 50 ppm ZnO-Partikeln, gebildet wurden, lassen sich in Kometen der Klasse 1 einteilen (Vgl. Abbildung 4-54), wobei der in Abschnitt D gezeigte Komet eher der Klasse 2 zugeordnet werden kann. Die Einteilung der DNA-Schädigung von A-549-Zellen kultiviert mit Zn^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 50 ppm erfolgte anhand von Abbildung 4-55, in die Klasse 2, wobei der Bildausschnitt D einen Kometen zeigt, der eher in Klasse 3 als 2 einzuordnen ist. In Abbildung 4-56 sind Ergebnisse des Komet-Assay von A-549 Zellen inkubiert mit 10 ppm an Silbernanopartikeln gezeigt. Eine einheitliche Einteilung der Kometen in eine Klasse erweist sich als schwierig, da die Kometen unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die Kometen in Ausschnitt A, B, C und G können der Klasse 2 und die Kometen in Ausschnitt D, E, F, H und J der Klasse 1 zugeordnet werden.

In Abbildung 4-57 sind Kometen von A-549-Zellen nach Kultivierung mit 10 ppm Ag^+ -Ionen und Durchführung der Gelelektrophorese dargestellt. Hier lassen sich alle gebildeten Kometen in Klasse 2 einordnen bis auf den in Ausschnitt F gezeigten, der sich in Klasse 4 einordnen lässt.

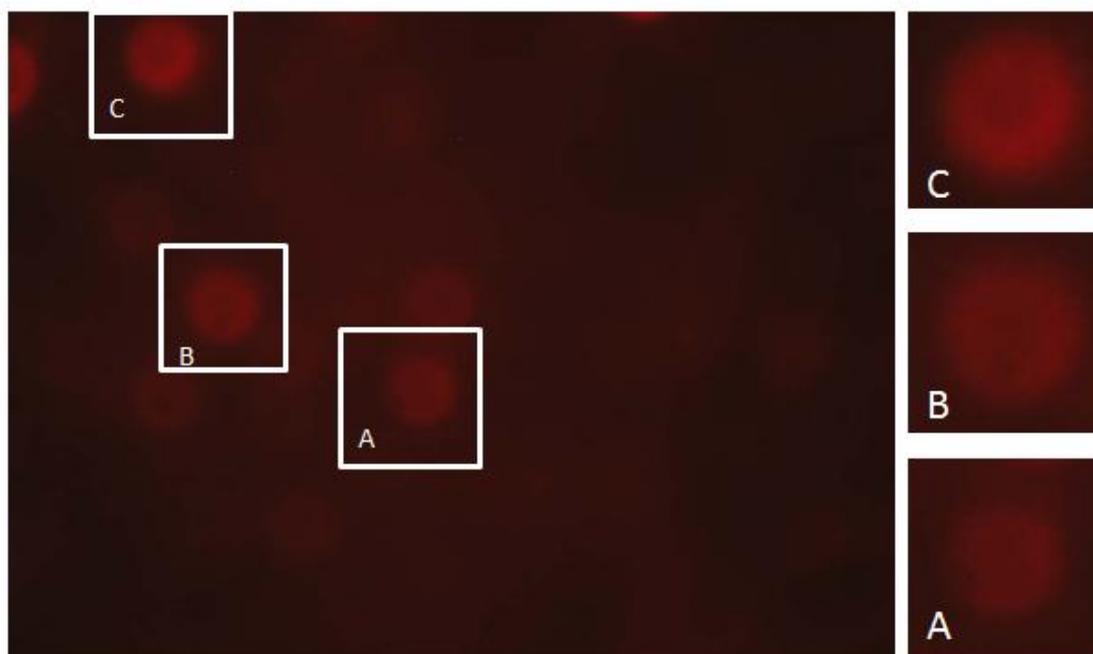


Abbildung 4-53: Komet-Assay A-549-Zellen in Normalmedium.

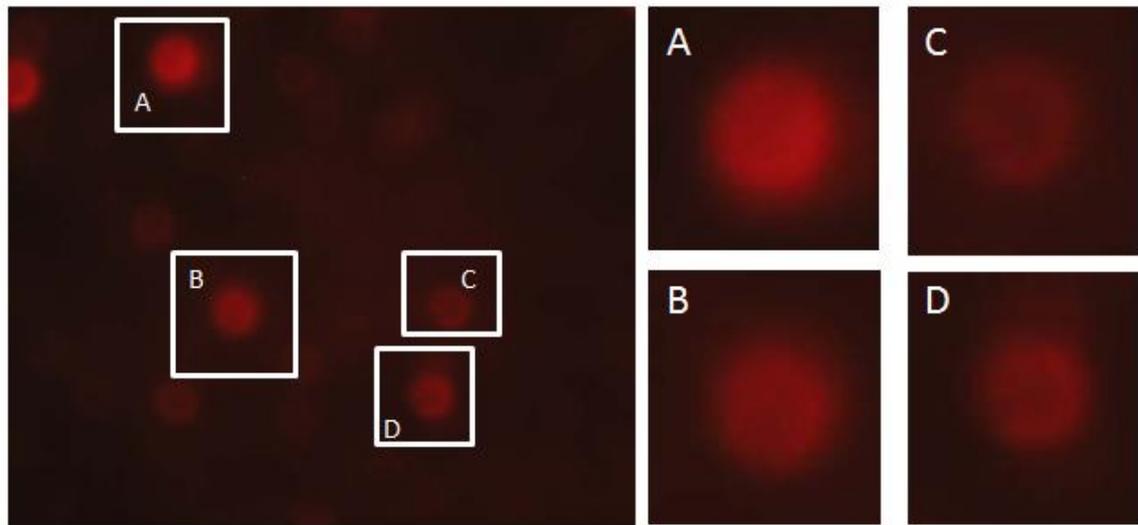


Abbildung 4-54: Komet-Assay von A-549-Zellen kultiviert mit 50 ppm ZnO Nanopartikeln.

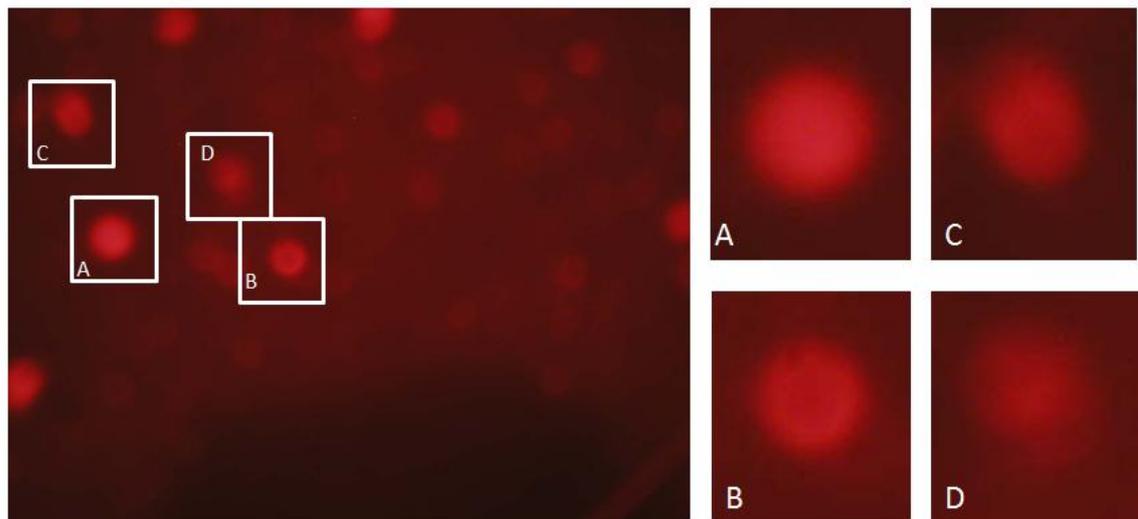


Abbildung 4-55: Komet-Assay von A-549-Zellen kultiviert mit Zn^{2+} Ionen in einer Konzentration von 50 ppm.

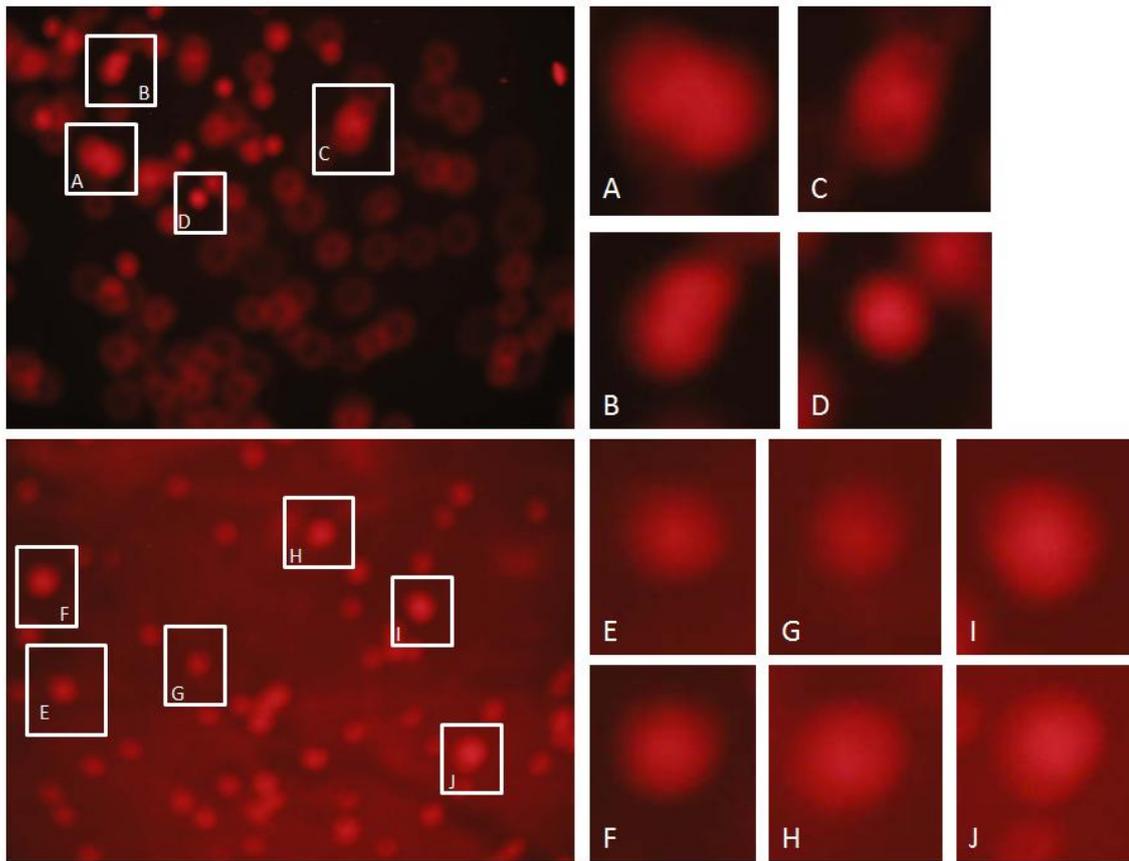


Abbildung 4-56: Komet-Assay von A-549-Zellen kultiviert mit Silbernanopartikeln in einer Konzentration von 10 ppm.

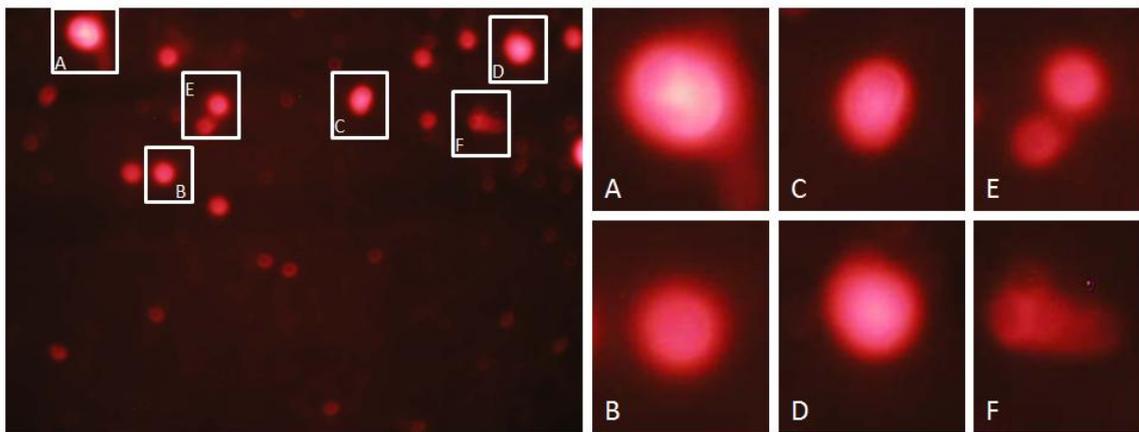


Abbildung 4-57: Komet-Assay von A-549-Zellen kultiviert mit Ag^+ -Ionen in einer Konzentration von 10 ppm.

Fazit:

Die größte DNA-Schädigung zeigten die A-549-Zelle kultiviert mit Ag^+ -Ionen, obwohl die für den Komet-Assay eingesetzte Konzentration von 10 ppm weit unter der TLC von 144 ppm liegt (Vgl. Tabelle 4-4). Die Zn^{2+} -Ionen hatten in einer Konzentration von 50 ppm (TLC = 43 ppm) ebenfalls eine DNA-schädigende Wirkung. Die Silbernanopartikel schädigten die DNA in einer Konzentration von 10 ppm (TLC = 14 ppm) geringfügig mehr als die ZnO-Partikel in einer Konzentration von 50 ppm (TLC = 29 ppm). Die Ionen hatten jeweils eine DNA-schädigendere Wirkung als die Partikel, was vermuten lässt, dass die Partikel nicht in so großem Ausmaß wie die Ionen in die Zelle dringen können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Derzeit finden immer mehr Nanomaterialien Einsatz in vielen verschiedenen Industriezweigen. In dem Größenbereich unterhalb von 100 nm hängen die mechanischen, elektrischen, magnetischen, optischen sowie chemischen Eigenschaften nicht mehr allein von der Zusammensetzung des Ausgangsmaterials ab, sondern auch von der Größe und Gestalt der vorliegenden Partikeln. Da Nanopartikel bezogen auf ihr Volumen eine extrem große Oberfläche besitzen, werden im Vergleich zum makroskopischen Material neuartige Effekte, Funktionen und Eigenschaften beobachtet. So können bei sehr kleinen Partikeln Masseneffekte und Quanteneffekte eine tragende Rolle spielen. Potentielle Anwendungen für Nanopartikel bestehen in fast allen Industriezweigen. Im medizintechnischen Bereich haben Nanopartikel in den letzten Jahren wesentlich an Bedeutung gewonnen. So werden unter Verwendung von Nanopartikeln, als Beschichtung oder Zusatz, beispielsweise biokompatible Materialien und Oberflächen hergestellt, die als Implantate nutzbar sind. Des Weiteren können Wirkstoffe mittels eines nanopartikulären Trägers, im Körper ortsgenau transportiert werden (*target delivery*) und die Verfügbarkeit bioaktiver Substanzen erhöht werden (*functional foods*). Ein vielversprechender Ansatz ist die selektive Tumorzerstörung mit Nanomaterialien über Hitze (Hyperthermie).

Die Anwendungsgebiete, der in der vorliegenden Arbeit auf ihre Toxizität untersuchten Materialien sind sehr vielfältig. Titandioxid ist das am häufigsten eingesetzte nanotechnologische Produkt. So werden Titandioxidnanopartikel Kosmetikartikeln, wie Sonnencreme und Zahnpasta zugesetzt. Die photokatalytische Aktivität von TiO_2 -Partikeln ermöglicht außerdem die Anwendung im Bereich von selbstreinigenden Oberflächen sowie den Einsatz dieser Partikel zur Wasser- sowie Luftreinigung. Die Anwendung von Silbernanopartikeln beruht häufig auf ihrem antibakteriellen Effekt, so werden diese Partikel im medizinischen Bereich, als Beschichtung medizinischer Materialien sowie als antibakterieller und antifungaler Zusatz, eingesetzt. Zinkoxid wird wie auch Titandioxid als Absorber für ultraviolettes Licht in Sonnencremes eingesetzt. Des Weiteren finden Zinkoxidnanopartikel Anwendung in der Textilindustrie, als antimikrobieller und geruchshemmender

Zusatz. Aufgrund der guten elektrischen Leitfähigkeit werden dotierte ZnO-Partikel zudem als Frontkontakt in Solarzellen eingesetzt.

Da Nanomaterialien eine immer häufigere Anwendung finden, ist die gründliche Untersuchung ihrer toxischen Wirkung wichtig. So zeichnet sich die Entstehung der Nanotoxikologie als neuem Forschungsgebiet ab. Die Untersuchung der toxischen Effekte von Nanomaterialien erweist sich aufgrund der Eigenschaftsänderung von, in Nanoform vorliegenden Partikel im Vergleich zu dem entsprechenden Bulkmaterial als schwierig. Wegen ihrer geringen Größe besteht die Möglichkeit, dass sich in den Körper aufgenommene Nanopartikel frei bewegen, durch Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke dringen, und sich in verschiedenen Geweben und Organen anreichern können.

In der vorliegenden Arbeit wurde der toxische Effekt von Titandioxid- Silber- und verschieden dotierten Zinkoxidnanopartikeln untersucht. Die Zytotoxizität der Partikel wurde aufgrund der möglichen Aufnahmewege in den Körper über die Lunge, die Haut und den Magen-Darmtrakt und der möglichen Anreicherung von in den Körper aufgenommenen Partikeln in Niere und Leber auf folgende Zelllinien untersucht: NIH-3T3-Zellen (Haut), A-549-Zellen (Lunge), CACO-2-Zellen (Darm), HEP-G2-Zellen (Leber) und PC-12-Zellen (Niere). Des Weiteren wurden die Partikel mit HELA-Zellen, welche häufig für Biokompatibilitätsstudien eingesetzt werden, untersucht. Da aus Tumorgewebe stammende Zelllinien meistens resistenter gegenüber toxischer Substanzen sind wurden zur Testung ebenfalls mesenchymale Stammzellen (MSC) eingesetzt, die aus Nabelschnur (uc-MSC) und Fettgewebe (ad-MSC) isoliert wurden.

Um die toxische Wirkung der zu untersuchenden Partikel zu bestimmen wurden den Zellen die Partikel als Suspension im Medium zugeführt. Um zu überprüfen, ob das biologische Medium einen Einfluss auf die Partikelgröße hat wurden zunächst *Dynamic Light Scattering* (DLS) Messungen der in Wasser und im Medium suspendierten Partikel durchgeführt. Es zeigte sich, dass die hydrodynamischen Durchmesser der im Medium vorliegenden Partikel insgesamt alle geringer waren, als die, der im Wasser suspendierten Nanopartikel. Die Partikel wurden von den im Medium enthaltenen Proteinen stabilisiert was eine Aggregation der Partikel verhindert.

Um den Einfluss der Partikel auf die Zellen zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen von, im Medium suspendierten Partikeln kultiviert und die Viabilität über den MTT-Test bestimmt. Aus den gemessenen Daten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und *No Observabel Adverse Effect Concentrations* (NOAEC, entspricht der Konzentration bei der 95 % der Zellen viabel sind), *Inhibitory Concentration 50 %* (IC₅₀, entspricht der Konzentration bei der 50 % der Zellen viabel sind) und *Total Lethal Concentrations* (TLC, entspricht der Konzentration bei der 5 % der Zellen viabel sind) bestimmt. Um zu bestimmen, ob der toxische Effekt der Partikel von den Partikeln selbst oder durch sich aus dem Partikel herauslösende Ionen verursacht wurde, wurden ebenfalls die entsprechenden Ionen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellen untersucht.

Die durch die Kultivierung mit Silbernanopartikeln im Medium hervorgerufene toxische Wirkung ist auf alle untersuchten Zellen höher, als die von Silberionen in der gleichen Konzentration. Die Partikel hatten auf die PC-12-Zellen eine 5-mal, auf die A-549- HEP-G2-Zellen eine 10-mal auf die NIH-3T3-Zellen sogar eine 17-mal stärker toxische Wirkung als die Silberionen. Die uc-MSC reagierten auf die Kultivierung mit Silberpartikeln ebenfalls empfindlicher als auf die Kultivierung mit Ag⁺-Ionen, allerdings war die toxische Wirkung insgesamt nicht wie erwartet höher als bei den Zelllinien. Die ad-MSC zeigten bei Kultivierung mit Partikeln und Ionen ein ähnliches Verhalten, die TLC von Silber in Form von Nanopartikeln lag in derselben Größenordnung wie der Ionen. Aufgrund der Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die toxische Wirkung von Silbernanopartikeln nicht durch herausgelöste Ionen ausgelöst wird, sondern von den Partikeln selbst.

Auch die Zinkoxidnanopartikel haben eine stärkere zytotoxische Wirkung als Zn²⁺-Ionen in der gleichen Konzentration. Am empfindlichsten auf die Kultivierung sowohl mit Zinkoxidpartikeln als auch mit Zinkionen reagierten die uc-MSC mit einer TLC von 1,3 ppm für die Partikel und einer TLC von 10 ppm für die Ionen. Die ad-MSC zeigten kein sensitiveres Verhalten auf die Zugabe von ZnO-Partikeln und Zn²⁺-Ionen als die untersuchten Zelllinien. Die Dotierungen der Zinkoxidpartikel schienen die toxische Wirkung der Partikel herabzusetzen, wobei dieser Effekt unterschiedlich stark ausgeprägt und bei einigen Zelltypen sehr gering war. Es lässt sich auch hier vermuten, dass die toxische Wirkung der ZnO-Partikel nicht durch sich herauslösende Zn²⁺-Ionen sondern durch die Nanopartikel selbst verursacht wird. Allerdings beruhen

die Annahmen darauf, dass sich pro Silber- und ZnO-Partikel nur jeweils ein Ag^+ , bzw. Zn^{2+} -Ion herauslöst.

Die toxische Wirkung der 2 nm großen Titandioxidpartikel, sowie der Titandioxid-, Siliziumdioxid- und Aluminiumhydroxid enthaltenen wässrigen Suspensionen war auf alle Zelllinien sehr gering, die TLC lagen zwischen 818 und 8018 ppm. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Silbernanopartikel und die Zinkoxidpartikel eine ähnlich starke toxische Wirkung auf die verwendeten Zellen und MSC haben und die Titandioxidpartikel als nicht toxisch eingestuft werden können. Für die weiteren Experimente zur Unterscheidung des Zelltodes wurden die Titandioxidpartikel daher nicht weiter untersucht.

Eine weitere Methode, die zur Untersuchung der Zytotoxizität der Partikel angewandt wurde ist *Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing* (ECIS). Hier wurden die Zellen auf speziellen goldbeschichteten Elektroden kultiviert, eine Wechselspannung angelegt und die Änderung der Impedanz über den gesamten Zeitraum der Messung aufgezeichnet. Die durchgeführten Messungen bestätigen die über den MTT-Test erhaltenen Ergebnisse. Mit ECIS wurden zudem Elektroporationen von mit Partikeln kultivierten Zellen durchgeführt, wobei vergleichende Messungen mit nicht elektroporierten Zellen mit Nanopartikelzusatz im Medium durchgeführt wurden. Diese Methode wurde angewandt um zu ermitteln, ob in die Zelle gelangten Partikel einen toxischeren Effekt haben, oder ob die Partikel auch ohne Elektroporation in die Zelle gelangen. Die Ergebnisse des Versuchs zeigten keine Unterschiede in der Änderung des Impedanzsignals, was darauf hinweist, dass die Nanopartikel auch ohne Elektroporation in die Zellen gelangen. Allerdings wurde hier nicht anhand von REM-Aufnahmen überprüft, ob die Partikel über den angelegten Puls in die Zellen gelangten.

In den bisher beschriebenen Versuchsanordnungen wurden die Partikel, den Zellen im Medium suspendiert zugeführt. Um den Einfluss der Expositionsrouten von Nanopartikeln zu untersuchen wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, bei denen den Zellen die Partikel als Aerosol zugeführt wurden. Dazu wurden Messungen mit dem Cultex[®] Radial Flow System durchgeführt. Hier werden die Zellen auf speziellen Zellkultureinsätzen kultiviert und nur von unten mit Medium versorgt. Aus den in Pulverform vorliegenden gepressten Partikeln wurde über eine *Dust Feeder* nach Wright(1950) ein Partikel-Aerosol generiert und über Druckluft auf die Zellen

geleitet. Die Partikel lagern sich somit direkt auf den Zellen ab und kommen nicht mit Medium in Kontakt.

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass die Partikel, die den Zellen als Aerosol zugeführt wurden, eine 11-mal höher toxische Wirkung, als die gleichen im Medium suspendierten Partikel hatten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass im Medium enthaltene Partikel nicht alle bei den Zellen ankommen, da in der Flüssigkeit Diffusion herrscht, wohingegen bei direkter Ablagerung des Partikel-Aerosols jeder Partikel zu den Zellen gelangt. Außerdem wurde über die DLS-Messungen der im Medium suspendiert vorliegenden Partikel gezeigt, dass sich die Größe der Partikel durch die mögliche Anlagerung von Proteinen an der Partikeloberfläche ändert, was eventuell den toxischen Effekt der Partikel herabsetzt.

Da sich von Untersuchungen, die unter Verwendung von 2D-Gewebekulturen erstellt wurden, nur bedingt Rückschlüsse auf die *in-vivo* Bedingungen ziehen lassen, wurden zudem 3D-Gewebekulturen als Testsysteme eingesetzt.

Dazu wurden Sphäroide der verwendeten Zelllinien kultiviert und ebenfalls als Testsysteme für die zu untersuchenden Partikel eingesetzt. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Herstellung von 3D-Gewebestrukturen angewandt: 1. die Herstellung über die Hanging-Drop-Technik und 2. die Kultivierung von Zellen auf mit einem Fluorophor beschichteten Platten. Die in Hanging-Drop kultivierten Zellen bildeten Sphäroide mit Durchmesser bis zu 1000 μm auf, wohingegen die auf dem Fluorophor hergestellten Sphäroide Durchmesser zwischen 250-550 μm aufwiesen. Die Testung der Partikel an den hergestellten Sphäroiden ergab, dass sich kleinere Sphäroide ähnlich wie die 2D-Strukturen verhalten, während größere Sphäroide wesentlich unempfindlicher auf die Kultivierung mit Partikeln und Ionen reagierten. Die Untersuchungen von dem auf die Zellen ausgelösten oxidativen Stress (ROS) ergaben, dass, Silbernanopartikel im Gegensatz zu Silberionen oxidativen Stress in Zellen auslösen. Zinkoxidnanopartikel und Zinkionen lösten im gleichen Maß oxidativen Stress aus. Auch die als nicht toxisch eingestuft Titandioxidnanopartikel (2 nm) generierten ROS.

Die Untersuchungen des Zelltodes zeigten alle eine sehr gute Übereinstimmung. Über die Messung an freigesetzter LDH ins Medium wurde der über die Zinkpartikel und Zn^{2+} -Ionen, sowie Silberionen ausgelöste Zelltod als Nekrose eingestuft und der durch Silberionen ausgelöste Tod dem Mechanismus der Apoptose zugeschrieben.

Die Messung der Caspase3/7-Aktivität lieferte das gleiche Ergebnis. Hier zeigten die Zellen bei Kultivierung mit Silbernanopartikeln eine stark erhöhte Aktivität von Caspase 3/7 wohingegen die Zellen kultiviert mit ZnO-Partikel, Zn^{2+} - und Ag^+ -Ionen keine messbare Aktivität von Caspase3/7 zeigten. Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse wurden durchflusszytometrische Messungen von mit FITC-AnnexinV und Propidiumiodid gefärbten Zellen durchgeführt. Hier wurde ebenfalls bestätigt, dass es sich bei dem Mechanismus des Zelltodes der von Silbernanopartikeln ausgelöst wird um Apoptose handelt und bei den Zellen die mit Zinkoxidnanopartikeln kultiviert wurden Nekrose auftritt.

Zum Abschluss wurde die durch Partikel und Ionen hervorgerufene DNA-Schädigung der Zellen bestimmt. Hierzu wurde der Komet-Assay durchgeführt. Die Auswertung des Tests erfolgte visuell am Mikroskop. Die Ergebnisse zeigen, dass die mit Silberionen kultivierten Zellen die größte DNA-Schädigung aufwiesen, gefolgt von den mit Zn^{2+} -Ionen, Silbernanopartikeln und ZnO-Partikeln versetzten Zellen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Partikel in geringerem Ausmaß in den Zellkern dringen können als die Ionen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die toxische Wirkung der Silbernanopartikel nicht durch sich herauslösende Ionen sondern die Partikel selbst verursacht wird, da die Zelltoduntersuchungen ergaben, dass sich die Mechanismen des Todes für Partikel und Ionen unterscheiden. Die Vermutung, dass es sich bei der durch Zinkoxidnanopartikel hervorgerufenen toxischen Wirkung nicht durch herausgelöste Ionen handelt konnte mit über die Zelltoduntersuchungen nicht eindeutig bestätigt werden, da es sich in diesem Falle um die gleiche Art des Zelltodes handelt.

Die vorliegende Arbeit macht deutlich, dass sich bei der toxischen Bewertung von Nanopartikeln eine Vielzahl von Problemen ergeben. Es müssen die Expositionsrouten von Partikel berücksichtigt werden, da im Medium zugeführte Partikel, Diffusion unterliegen und die Partikel durch den Kontakt mit, im Medium enthaltenen Proteinen ihre Oberflächeneigenschaften ändern. Des Weiteren muss der durch Ionen ausgelöste toxische Effekt berücksichtigt werden. Es wurde weiterhin deutlich, dass 2D-Zellkulturen die *in-vivo* herrschenden Bedingungen nicht ausreichend widerspiegeln und der Einsatz von 3D-Gewebekulturen als Testsystemen eine immer größer werdende Bedeutung beim Ersatz von Tierversuchen spielen wird.

6 Anhang

6.1 Statistik

Die Messergebnisse der einzelnen Messreihen wurden mittels t-test statistisch überprüft. Über den t-test wird der Wahrscheinlichkeitswert p bestimmt. Dieser gibt an mit welcher Wahrscheinlichkeit die Mittelwerte zweier unabhängiger Messreihen gleich sind. Bei $p < 0,05$ ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Mittelwerte zweier Messreihen signifikant unterscheiden bei 95 %.

6.2 Verwendete Zellen

Tabelle 6-1: Verwendete Zelllinien.

Name	Zellen
HEP-G2	humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie (DSMZ-Nr. ACC-180)
NIH-3T3	Mäusefibroblastenzelllinie (DSMZ-Nr. ACC-59)
A-549	humane Lungenkarzinomzelllinie (DSMZ-Nr. ACC-107)
PC-12	Rattennebennierentumorzelllinie (DSMZ-Nr. ACC-159)
CACO-2	humane Darmkrebszelllinie(DSMZ-Nr. ACC-169)
HELA	humane Eierstockkrebszelllinie (DSMZ-Nr. ACC-57)
ad-MSC	selbstisoliert aus Fettgewebe
uc-MSC	selbstisoliert aus Nabelschnur

6.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden in den in Tabelle 6-2 angegebenen Medien in 75 cm²-Flaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Kultivierung der PC-12-Zellen wurden die Zellkulturflaschen zunächst mit 0,5 mg/mL Poly-L-Lysin beschichtet, um die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche zu verbessern, da diese nur schwach an Polystyroloberflächen adhäreren. Bei Erreichen von etwa 80 % Konfluenz wurden

die Zellen passagiert. Zum Passagieren wurde zunächst das Medium vollständig entfernt, der Zellrasen einmal mit PBS gespült und anschließend mit 2 mL Trypsin/EDTA (0,2 % (w/v) Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS), bzw. Accutase (bei den CACO-2-Zellen und Primärzellen) inkubiert, bis sich die Zellen vollständig vom Boden der Flasche gelöst hatten (3-10 min). Die in Trypsin gelösten Zellen wurden in 8 mL des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen, resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in einer neuen Zellkulturflasche weiterkultiviert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer und mit dem Zellcounter der Firma BioRad. Für eine Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer wurden 10 µL der Zellsuspension in die Kammer gefüllt, vier Großquadrate ausgezählt und der Durchschnitt eines Quadrats berechnet. Um die Anzahl der Zellen pro mL zu erhalten, wurde die Anzahl der Zellen pro Großquadrat mit dem Faktor 10^4 multipliziert.

Tabelle 6-2: Kulturmedienzusammensetzung der verwendeten Zellen.

Zellen	Medium
HEP-G2	DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S
NIH-3T3	DMEM, 10 % NKS, 1 % P/S
A-549	DMEM, 10% FKS, 1% P/S
PC-12	DMEM, 10 % HOS, 5% FKS, 1 % L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat, 1 % P/S
CACO-2	MEM, 20 % FKS, 1 % P/S
HELA	DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S
Nabelschnur	αMEM, 10 % Humanserum, 50 µg/mL Gentamycin, 2,5 µg/mL Amphotericin B
Fettstammzellen	αMEM, 10 % Humanserum, 50 µg/mL Gentamycin, 2,5 µg/mL Amphotericin B

Alle verwendeten Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (ARIUM, Sartorius AG, Göttingen) hergestellt, welches im Folgenden als dd H₂O bezeichnet wird.

Tabelle 6-3: Verwendete Medien und Puffer und ihre Zusammensetzung.

Medium/Puffer	Bestandteile
DMEM	10 L dd H ₂ O
	134,7 g DMEM-Pulver
	37 g NaHCO ₃
	pH = 7,2
PBS	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	7,2 mM Na ₂ HPO ₄
	14,7 mM KH ₂ PO ₄
	pH = 7,4
MEM	10 L dd H ₂ O
	96,1 g MEM-Pulver
	22 g NaHCO ₃
	pH = 7,2
αMEM	10 L dd H ₂ O
	100,8 g MEM alpha-Pulver
	22 g NaHCO ₃

Zusammensetzung der Medien

Tabelle 6-4: Zusammensetzung von DMEM

Komponente	Masse [g/L]
L-Arginin · HCl	0,084
L-Cystin · 2HCl	0,0626
L-Glutamin	0,584
Glycin	0,03
L-Histidin · HCl · H ₂ O	0,042
L-Isoleucin	0,105
L-Leucin	0,105
L-Lysin · HCl	0,146
L-Methionin	0,03
L-Phenylalanin	0,066

L-Serin	0,042
L-Threonin	0,095
L-Tryptophan	0,016
L-Tryosin 2Na · 2H ₂ O	0,10379
L-Valin	0,094
Cholinchlorid	0,004
Folsäure	0,004
Myoinositol	0,0072
Nicotinamid	0,004
D-Pantothensäure	0,004
Pyridoxal · HCl	0,004
Riboflavin	0,0004
Thiamin · HCl	0,004
Calciumchlorid	0,2
Eisennitrat · 9H ₂ O	0,0001
Magnesiumsulfat	0,09767
Kaliumchlorid	0,4
Natriumchlorid	6,4
Natriumhydrogenphosphat	0,109
Glukose	4,5
Phenolrot · Na	0,0159
Brenztraubensäure · Na	0,11

Tabelle 6-5: Zusammensetzung von MEM

Komponente	Masse [mg/L]
Glycin	7,5
L-Alanin	8,9
L-Argininhydrochlorid	126
L-Asparagin · H ₂ O	15
L-Asparaginsäure	13,3
L-Cystin · 2HCl	31,28
L-Glutaminsäure	14,7
L-Glutamin	292
L-Histidinhydrochloride · H ₂ O	42
L-Isoleucin	52

L-Leucin	52
L-Lysinhydrochlorid	72,5
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	32
L-Prolin	11,5
L-Serin	10,5
L-Threonin	48
L-Thryptophan	10
L-Tryosin	51,9
L-Valin	46
Cholinchlorid	1
D-Calciumpantothenat	1
Folsäure	1
Nicotinamid	1
Pyridoxalhydrochlorid	1
Riboflavin	0,1
Thiaminhydrochlorid	1
i-Inositol	2
Natriumhydrogenphospat	0,109
Calciumchlorid	200
Magnesiumsulfat	97,67
Kaliumchlorid	400
Natriumhydrogenphospat · H ₂ O	140
D-Glukose	1000
Phenolrot	10

Tabelle 6-6: Zusammensetzung von MEM alpha

Komponente	Masse [mg/L]
Glycin	50
L-Alanin	25
L-Arginin	105
L-Asparagin · H ₂ O	50
L-Asparaginsäure	30
L-Cystinhydrochlorid · H ₂ O	100
L-Cystin · 2HCl	24

L-Glutaminsäure	75
L-Glutamin	292
L-Histidin	31
L-Isoleucin	52,4
L-Leucin	52,4
L-Lysin	58
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	32
L-Prolin	40
L-Serin	25
L-Threonin	48
L-Thryptophan	10
L-Tryosin	52
L-Valin	46
Ascorbinsäure	50
Biotin	0,1
Cholinchlorid	1
D-Calciumpantothenat	1
Folsäure	1
Nicotinamid	1
Pyridoxalhydrochlorid	1
Riboflavin	0,1
Thiaminhydrochlorid	1
Vitamin B12	1,36
i-Inositol	2
Calciumchlorid	200
Magnesiumsulfat	97,67
Kaliumchlorid	400
Natriumchlorid	6800
Natriumhydrogenphospat · H ₂ O	140
D-Glukose	1000
Liponsäure	0,2
Natriumpyruvat	110
Phenolrot	10

6.2.2 Isolation von Zellen

6.2.2.1 Nabelschnur

Die uc-MSC wurden aus dem Gewebe einer Nabelschnur isoliert. Zur Isolation wurde die Nabelschnur mit einer Schere zerkleinert und in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Nach 10 Tagen konnte das Auswachsen adhärenter Zellen aus dem Nabelschnurgewebe beobachtet werden. Nach 2 Wochen wurden die Gewebstücke entfernt und die Zellen mit Accutase abgelöst.

Medium: α MEM, 10 % Humanserum, 50 μ g/mL Gentamycin, 2,5 μ g/mL Amphotericin B

6.2.2.2 Fettgewebe

Die adulten mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Fettgewebe einer Abdominoplastik gewonnen. Zur Isolation wurde zunächst die Haut mit einem Skalpell vom Fettgewebe getrennt und dieses anschließend mit einer Schere vom Bindegewebe getrennt und zerkleinert. Das stark zerkleinerte Fettgewebe wurde anschließend mit Kollagenase-Lösung versetzt und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach Homogenisierung der Suspension wurde diese auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und mit Waschpuffer I auf 50 mL aufgefüllt. Anschließend wurde 5 min bei 150 g zentrifugiert, der Fettüberstand abgegossen, die mittlere, wässrige Phase abgenommen, das im Zentrifugenröhrchen verbliebene Pellet mit dem Überstand vereinigt und mit Waschpuffer II auf 50 mL aufgefüllt. Es wurde erneut 10 min bei 540 g zentrifugiert, Fett und Überstand abgegossen und das Pellet in Waschpuffer II aufgenommen und ebenfalls 10 min bei 450 G zentrifugiert. Anschließend wurde der wässrige Überstand abgenommen, das Pellet im Kulturmedium gelöst, in T-175-Flaschen gegeben, 24 h inkubiert und anschließend das Medium gewechselt, um Bindegewebsrückstände zu entfernen.

Waschpuffer I:	500 mL Hanks`Buffer
Waschpuffer II:	500 mL Hanks`Buffer
Kollagenase-Lösung:	20 mg Kollagenase I in 10 ml Waschpuffer I
Medium:	α MEM, 10 % Humanserum, 50 μ g/mL Gentamycin, 2,5 μ g/mL Amphotericin B

6.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C . Dazu wurden die Zellen in Zellkulturmedium, welches 10 % DMSO und 80 % Serum enthält eingefroren. Das DMSO dient dazu eine Kristallbildung und somit eine Schädigung der Zellmembran zu vermeiden. Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst mit Trypsin gelöst, im Medium resuspendiert und für 5 min bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in dem hergestellten Kryomedium aufgenommen, sodass eine Zelldichte von 1 Millionen Zellen pro mL gegeben war. In jedes Kryoröhrchen wurden je 1 mL Zellsuspension überführt und die Zellen für 24 h bei -80°C gelagert. Anschließend erfolgt die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen der Zellen werden diese aus dem mit Stickstoff befülltem Kryotank genommen und schnellstmöglich aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche überführt und mit kaltem Zellkulturmedium versetzt. Um das, im Kryomedium enthaltene, DMSO zu entfernen, welches als Zellgift wirkt, wurde nach 12 h das Medium gewechselt

6.3 Dynamic Light Scattering

Um die Größe der Nanopartikel in Suspension und im Zellkulturmedium zu bestimmen, wurden DLS Messungen durchgeführt. Die Dynamische Lichtstreuung ist

eine Methode zur Bestimmung der hydrodynamischen Radien von Molekülen und Partikeln. Trifft ein Laserstrahl auf ein Teilchen wird er in alle Richtungen gestreut. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung sind die Partikel in ständiger Bewegung und es kommt zu konstruktiven und destruktiven Interferenzen des Streulichtes und zur Fluktuation in der Streuintensität. Mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion wird die Diffusionsgeschwindigkeit unter Berücksichtigung des Zusammenhangs zwischen der Zeit und der Streuintensität berechnet.

Der hydrodynamische Radius kolloid-disperser Partikel lässt sich über die Stokes-Einstein-Beziehung errechnen:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

mit D: Diffusionskoeffizient
k_B: Boltzmann-Konstante
η: Viskosität des Dispersionsmittels
r: hydrodynamischer Partikelradius
T: absolute Temperatur

Die DLS-Messungen wurden mit einem Malvern Zetasizer Nano-ZS durchgeführt.

6.4 Rasterlektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird die Oberflächentopographie einer Probe stark vergrößert abgebildet. Dabei wird die Oberfläche mit einem gebündelten, hochenergetischen Elektronenstrahl abgerastert. Hierzu werden die Elektronen thermisch emittiert, gebündelt und über eine angelegte Spannung im Kilovoltbereich beschleunigt. Trifft dieser erzeugte Elektronenstrahl (Primärelektronen) auf die zu untersuchende Oberfläche auf, wird durch Wechselwirkungen mit der Materialoberfläche ein Spektrum von Elektronen unterschiedlicher Energie emittiert. Es entstehen Sekundärelektronen, die aus der dünnen Oberflächenschicht der Probe stammen und deren Energie unterhalb von 50 eV liegt und Rückstreuelektronen aus tiefer liegenden Schichten der Probe mit einer Energie oberhalb von 50 eV.

Für die Bildgebung sind beide Elektronenarten verantwortlich, die Rückstreuelektronen geben eine Auskunft über den Materialkontrast und die Sekundärelektronen über die Oberflächentopographie einer Probe. Um Wechselwirkungen zwischen dem erzeugten Elektronenstrahl und in der Luft vorkommenden Molekülen und Atomen zu vermeiden, findet der Prozess der Rasterelektrodenmikroskopie im Hochvakuum statt.

Für die Messungen der Partikelgröße der Nanopulver, wurden diese zunächst per Gefriertrocknung getrocknet und anschließend auf die Probenträger aufgebracht. Die Messung erfolgte in einem Rasterelektronenmikroskop (Joel JSM-6700F) bei 2 kV.

6.5 MTT

Neben der direkten Bestimmung der Zellzahl, wie z.B. durch die Neubauer Zählkammer oder die elektronische Zellzählung, gibt es eine Reihe photometrischer Verfahren. Als Endpunkte solcher photometrischer Verfahren dienen die Umsetzung oder die Bindung eines Farbstoffes. Der MTT-(3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Test ist solch eine photometrische Methode, mit der die Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen werden kann. Er wurde erstmals 1983 von Mosman beschrieben [227]. Hierbei werden die Zellen mit MTT versetzt. Das MTT reagiert hierbei in den Mitochondrien der Zellen mit NADH zu einem blauen Formazansalz (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylformazan), welches bei 570 nm sein Absorptionsmaximum besitzt und mit dem Plattenleser, nach Auflösen der gebildeten Kristalle mit einer SDS-Lösung, gemessen werden kann. Eine Referenzmessung erfolgt bei 630 nm um Nebeneffekte durch Medienbestandteile auszuschließen. Die endgültige optische Dichte berechnet sich aus der Differenz der beiden Messungen. Die Reduktion von MTT ist ein Maß für den Redox-Status einer Zellpopulation und kann als Lebensfähigkeit (Viabilität) oder metabolische Aktivität wiedergegeben werden. In Abbildung 6-1 ist Reduktion des gelben MTTs zu dem blauen wasserunlöslichen Formazan-Komplex abgebildet. Die Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien brechen den Tetrazoliumring des MTTs auf, es entsteht Formazan, das sich in den Zellen anreichert und mit SDS-Lösung freigesetzt wird.

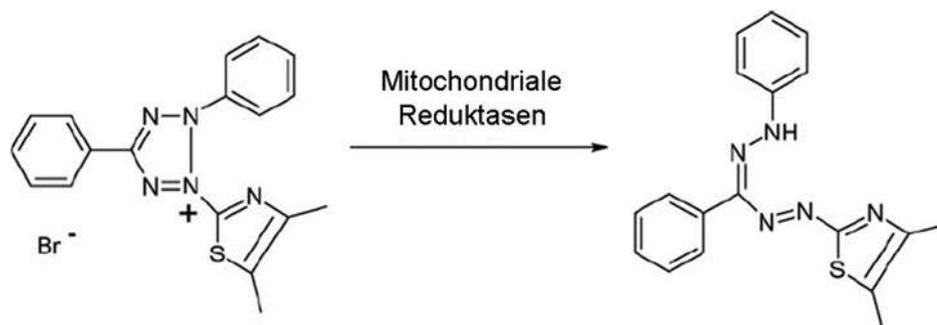


Abbildung 6-1: Reduktion von MTT zu Formazan.

Tabelle 6-7: Anzahl der Ausplattierten Zellen pro Well einer 96-Wellplatte.

Zelle	Anzahl der Zellen pro Well einer 96-Wellplatte
HEP-G2	10.000
NIH-3T3	6.000
A-549	8.000
PC-12	10.000
CACO-2	8.000
HELA	8.000
uc-MSC	6.000
ad-MSC	6.000

96-Well-Platten werden mit 100 μ L pro Well und der in Tabelle 6-7 angegebenen Anzahl an Zellen besiedelt. Nach Adhäsion der Zellen auf der Zellkulturoberfläche werden 100 μ L Medium pro Well zugegeben und für 4 Tage im Brutschrank inkubiert. An Tag 4 wird das Medium der Wells abgesaugt und je 200 μ L der verschiedenen Nanopartikel-Suspensionen in verschiedenen Konzentrationen pro Well zugegeben. Pro Konzentration wird eine 4-fach-Bestimmung durchgeführt und ein Blindwert (Suspension ohne Zellen) berücksichtigt. Es wird für weitere 3 Tage im Brutschrank inkubiert und anschließend der MTT-Test durchgeführt.

Um den MTT durchführen zu können wurde zunächst das Medium der mit Zellen besiedelten 96-Lochplatten abgesaugt, 110 μ L einer 10 %igen MTT-Lösung (5 mg/mL PBS) im Medium zu jeden Well pipettiert und für 4 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden zum Auflösen der Formazan-

Kristalle 100 µL Solubilisierungslösung (1 g SDS in 10 mL 0,01 M HCl) pro Well zugeben und für 12 h inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Absorption des Formazans beim lokalen Absorptionsmaximum von 570 nm gegen 630 nm als Referenzsignal im Plattenleser gemessen. Das erhaltene Signal wurde als relatives Maß für die Viabilität von Zellen eingesetzt.

6.6 Dosis-Wirkungs-Kurven

Aus den aus dem MTT-Test erhaltenen Ergebnissen werden Dosis-Wirkungskurven ermittelt und NOAEC (*No Observed Adverse Effect Concentration*), IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*) und TLC (*Total Lethal Concentration*) berechnet. Hierfür wird die auf 1 normierte Viabilität der Zellen (Viabilität der Zellen kultiviert in Kulturmedium ohne Partikelzusatz) als Funktion gegen den Logarithmus der Partikel- bzw. Ionenkonzentration aufgetragen.

Die theoretisch erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven können über zwei Gleichungen berechnet werden:

1.)

$$y = 1 - \frac{1}{1 + e^{(b-x)}} \quad (\text{Formel 6.1})$$

mit a = Steigung

b = IC₅₀-Wert

x = Konzentration

y = Viabilität

2.)

$$y = a \cdot e^{-(b \cdot x)} \quad (\text{Formel 6.2})$$

mit a = normierte Viabilität b = Steigung x = Konzentration y = Viabilität

Die NOAEC wurde festgelegt als Konzentration, bei der noch 95 % der Zellen viabel waren und für die mit Formel 6.1. berechneten Dosis-Wirkungs-Kurven mit folgender Gleichung berechnet:

$$NOAEC = b - \frac{\ln 19}{a} \quad (\text{Formel 6.3})$$

und für die über Formel 6.2 berechneten Dosis-Wirkungs-Kurven mit folgender Gleichung:

$$NOAEC = \frac{\ln \frac{100}{95}}{b} \quad (\text{Formel 6.4})$$

Die TLC-Werte wurden festgelegt als Konzentration, bei der noch 5 % der Zellen viabel waren und wurden für die aus Formel 6.1 erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven dementsprechend mit folgender Formel berechnet:

$$TLC = b - \frac{\ln \frac{1}{19}}{a} \quad (\text{Formel 6.5})$$

und für die über Formel 6.2 berechneten Dosis-Wirkungs-Kurven mit:

$$TLC = \frac{\ln \frac{100}{5}}{b} \quad (\text{Formel 6.6})$$

Die IC_{50} für die mit Formel 6.2 berechneten Dosis-Wirkungs-Kurven ergibt sich wie folgt:

$$IC_{50} = \frac{\ln \frac{a}{5}}{b} \quad (\text{Formel 6.7})$$

6.7 Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing

Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing (ECIS) ist eine automatisierte Methode zur Bestimmung der morphologischen Änderungen von Zellen in Echtzeit. Die Theorie der Messungen wurde bereits in Abschnitt 3.6.2.2 beschrieben.

Um die ECIS Messungen durchzuführen wurde zunächst eine ECIS-Elektrode (8W1E, 8 Wells, 1 Elektrode) mit je 400 μ L pro Well gefüllt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und jedes Well mit 125.000 Zellen in 400 μ L besiedelt, wobei 2 Elektroden unbesiedelt blieben, nur mit Medium befüllt wurden und als Referenzwert verblieben. Nach Erreichen eines stabiles Impedanzsignals, was mit dem Erreichen der Konfluenz der Zellen auf der Elektrode gleichzusetzen ist, würde das Medium entfernt und die Nanopartikel, bzw. die Salzlösungen, als Suspension im Medium zu den Wells gegeben (400 μ L pro Well). Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt, sowie als Referenzwert zwei Wells mit Kulturmedium ohne Partikelzusatz berücksichtigt. Die Änderung der Impedanz wird nun solange aufgenommen bis sich das Signal nicht mehr ändert und anschließend ausgewertet.

Elektroporation:

Zur Durchführung der Elektroporationsversuche von Zellen mit ECIS werden zunächst auch 8W1E-arrays über Nacht mit Medium inkubiert und 125.000 Zellen besiedelt. Bei stabilem Impedanzsignal wird das Medium der Zellen abgenommen und Elektroporationspuffer zugegeben. Die zu testenden Nanopartikel und Ionen wurden ebenfalls in den gewünschten Konzentrationen mit in 400 μL Elektroporationspuffer auf die Elektroden gegeben. Es wird für 200 ms ein Puls mit einer Frequenz von 100 kHz und einer Amplitude von 3 V die Elektroden angelegt und das Impedanzsignal weiter aufgenommen.

Elektroporationspuffer:	88 mM NaCl
	12,5 mM HEPES
	6 mM NaHCO ₃
	5,5 mM KCl
	0,7 mM NaH ₂ PO ₄
	0,6 mM MgSO ₄
	0,5 mM KH ₂ PO ₄

6.8 Cultex® Radial Flow System

Für die Untersuchungen der ZnO-Nanopartikel als Aerosol wurde das Cultex® Radial Flow System benutzt, welches in Abbildung 6-2 gezeigt ist. Mit diesem System können Zellen direkt an der Luft-Flüssig-Phasengrenze mit Nanopartikel „benebelt“ werden. Die Generation des Partikel-Aerosols erfolgt über eine *Dust-Feeder* nach Wright [225]. Dazu wurde das verwendete ZnO-Nanopartikelpulver bei 1000 kg gepresst und anschließend in die *Dust-Feeder* gebracht. Ein Messer schabt die gepressten Partikel ab. Über einen Luftstrom werden die Partikel in eine

Aerosolkammer gesammelt und von da auf die Zellen geleitet. Die Zellen befinden sich auf Transwells in dicht abgeschlossenen Modulen (B).

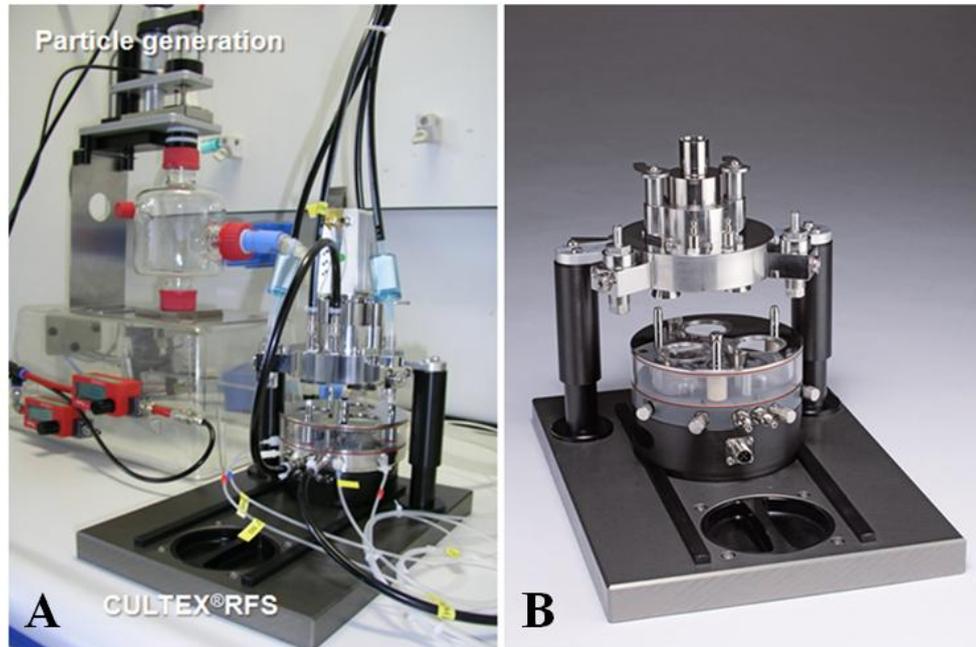


Abbildung 6-2: Foto eines Cultex® Radial Flow Systems (A) und eines Moduls für 3 Transwells (B).

Um die Untersuchungen durchzuführen wurden $5 \cdot 10^4$ A-549-Zellen auf Transwells in 6-Lochplatten für 36 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Exposition der Zellen mit dem ZnO-Partikel-Aerosol. Um das Aerosol zu generieren, wurde das ZnO-Pulver in einen Zylinder gepresst und mit einem Messer abgeschabt. Mit Druckluft wurde das Aerosol zu den Zellen geleitet.

Es wurden zunächst beide Module des System (6 Transwells) 60 Minuten mit Raumluft behandelt. Anschließend wurden 3 Transwells 60 Minuten, 30 Minuten, 15 Minuten und 5 Minuten dem ZnO-Nanopartikel-Aerosol ausgesetzt (WS). Als Kontrolle wurden jeweils 3 Transwells für die gleiche Zeit mit dem Raumluftgemisch behandelt (RL). Nach der Behandlung wurden die Zellen 24 h inkubiert und anschließend der MTT-Test bzw. der LDH-Test durchgeführt.

6.9 3D-Kulturen

6.9.1 Hanging-Drop-Technik

Durch die Hanging-Drop-Methode ist es möglich, Mikrogewebe zu kultivieren, die sich unabhängig von der Oberfläche der Platte bilden. Es kommt zu keiner Adhäsion der Zellen an die Platte, da die Zellen aufgrund der Schwerkraft an der Spitze des Tropfens zusammenkommen. Durch diese geografische Trennung von Zellen und Platte wird die Adhäsion verhindert und die Zellen haben nur die Möglichkeit Bindungen zu Nachbarzellen einzugehen und somit für ein Zellaggregat zu sorgen. Um Zellen als Hanging Drop kultivieren zu können, wurden Terasaki[®]-Platten verwendet, gezeigt in Abbildung 6-3 (A). Die Terasaki[®]-Platte besitzt kleine Vertiefungen und ist speziell für die Kultur von 3D-Geweben ausgelegt. In die Vertiefungen wird die Zellsuspension pipettiert und anschließend invertiert. Das Invertieren führt zu einer hängenden Kultur der Zellen in den Tropfen der Zellsuspension (Abbildung 6-3 (B)).

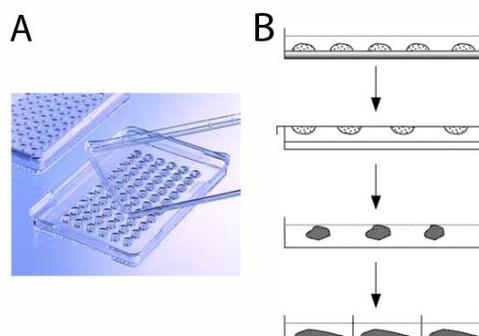


Abbildung 6-3: Terasaki[®]-Platte (A), Schematische Darstellung zur Herstellung von Hanging-Drop-Kulturen mit der Terasaki-Platte (B).

Zunächst wurden für die Herstellung der Sphäroide unterschiedliche Zellzahlen getestet. Dafür wurden jeweils 4·, 5·, 6·, 7·, 8·, 9·, 10·, 15·, 20·, 25· 10⁴ A-549-Zellen in je 35 µL Medium in die Vertiefungen der Terasaki[®] pipettiert, diese invertiert und für 3 Tage kultiviert. An Tag 2 wurden jeweils 10 µL Medium zu den Tropfen gegeben. Die Viabilitäten der hergestellten Sphäroide wurden an Tag 3 über den MTT-Test bestimmt. Hierzu wurden die Tropfen abgeschlagen und die Sphäroide in

96-Lochplatten überführt und mit 110 μL 10 %iger MTT-Lösung versetzt. Nach 4-stündiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 110 μL SDS-Lösung und nach 24 h das Auslesen im Plattenleser bei 570 -630 nm.

Nach Bestimmung der optimalen Zellzahl, von 4000 Zellen, zur Kultivierung von viablen Sphäroiden wurden von allen Zelllinien Sphäroide kultiviert. Dazu wurden 4000 Zellen in 35 μL Medium in die Vertiefungen der Platten pipettiert, diese invertiert und an Tag 2, aufgrund der hohen Verdunstung im Inkubator, 10 μL frisches Medium zupipettiert. An Tag 3 wurden die zu untersuchten Konzentrationen an Partikeln und Ionen in 10 μL Medium zu den jeweiligen Tropfen gegeben und für weitere 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Tropfen abgeschlagen, in 96-Loch-Platten überführt und der MTT-Test durchgeführt.

6.9.2 Oxygen Biosensor System

Petrischalen oder Mikrotiterplatten mit einer nicht-haftenden Oberfläche können ebenfalls für die Kultur von dreidimensionalem Mikrogewebe verwendet werden. Gegebenenfalls kann die Oberfläche durch Beschichtung mit verschiedenen Substanzen nicht-haftend gemacht werden. Da die Zellen nicht an der Oberfläche adhären können, bilden sich Zellaggregate um eine gewisse Struktur zu erreichen. Diese Methode bietet meist eine gewisse Varianz in der Größe der Sphäroide. (*recent advances*). In der vorliegenden Arbeit wurden die mit einem Fluorophor beschichteten Platten von BD Bioscience zur Herstellung von Sphäroiden verwendet. Dazu die Wells mit 4000 Zellen in 200 μL Medium besiedelt über 3 Tage kultiviert und an Tag 4 die Nanopartikel und Ionen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Zwar kann hier die Bestimmung der Viabilität über die Messung des Sauerstoffverbrauchs durch Fluoreszenzmessungen bestimmt werden, es wurde jedoch um einen Vergleich zu den, über Hanging-Drop hergestellten Sphäroide zu haben die Viabilität auch hier über den MTT-Test bestimmt. Zur Bestimmung der Viabilität wurden die Sphäroide in eine neue 96-Well-Platte überführt und der MTT-Test durchgeführt.

6.10 Bestimmung von ROS

Zur Bestimmung des auf die Zellen ausgeübten oxidativen Stresses wird der Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit verwendet. Die dem Test zugrunde liegende Reaktion ist in Abbildung 6-4 dargestellt.

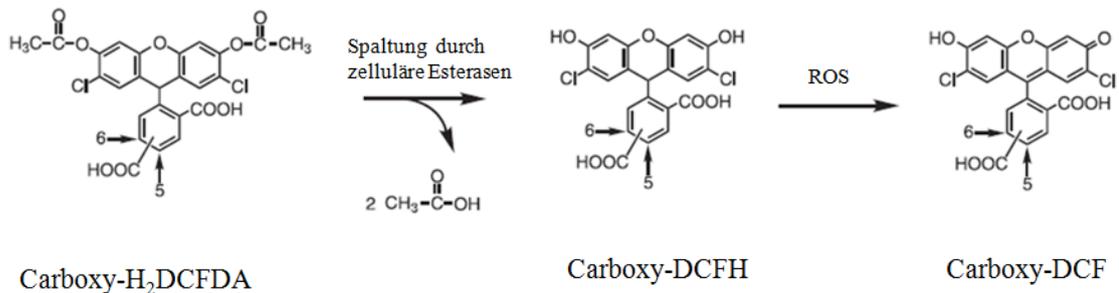


Abbildung 6-4: Spaltung von Carboxy-H₂DCFDA über zelluläre Esterasen zu Carboxy-DCFH und anschließende Umsetzung von Carboxy-DCFH durch ROS zu Carboxy-DCF.

6.11 LDH-Freisetzung

Die Membranintegrität von Zellen kann über die Freisetzung von LDH, welches als zytosolisches Enzym, im Inneren von Säugerzellen präsent ist, bestimmt werden. Über die Messung von freigesetztem LDH kann also auf die Schädigung der Zellmembran zurückgeschlossen werden.

Der CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay von Promega beruht auf der Reduktion von Resazurin zu Resorufin. Wird aus einer Zelle LDH freigesetzt wird zunächst Laktat zu Pyruvat oxidiert, während das Coenzym NAD⁺ durch die Übertragung des Wasserstoffs vom Laktat zu NADH reduziert wird. Ein Katalysator (Diaphorase) überträgt dann das Wasserstoff vom NADH auf Resazurin, wodurch dieses zu Resorufin reduziert wird. Das Reaktionsprodukt ist fluoreszent und kann bei einer Extinktion von 560 nm und bei einer Emission von 590 nm detektiert werden. Das gemessene Signal ist proportional zur freigesetzten Menge LDH und somit auch zur Anzahl geschädigter Zellen. LDH wird nur von Zellen mit geschädigter Zellmembran freigesetzt, was ein Anzeichen für Nekrose ist (Vgl. Abschnitt 3.6.3),

weshalb dieser Test als erster Hinweis zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose dienen.

In Abbildung 6-5 ist die des CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay zugrunde liegende Reaktion dargestellt.

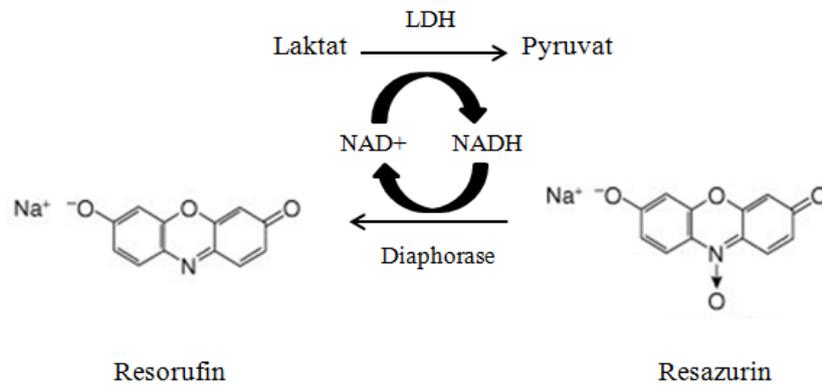


Abbildung 6-5: Reduktion von Resazurin zu Resorufin durch die Freisetzung von LDH in Anwesenheit des Katalysators Diaphorase.

Zur Durchführung des LDH-Tests werden 96-Well-Platten mit Zellen besiedelt. Dafür wird die gewünschte Zellzahl in 100 µL Suspension zu jeden Well gegeben, nach Adhäsion der Zellen 100 µL Medium zugegeben und für 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der Zellen pro Well war aufgrund der unterschiedlichen Verdopplungszahlen der Zellen verschieden und ist für jede Zelle in

Tabelle 6-7 angegeben. An Tag 4 wurden je 200 µL der im Medium suspendierten Nanopartikel, sowie der zu untersuchenden Salzlösungen zugegeben. Nach definierten Zeitabständen wurde nun die Bestimmung von ins Medium freigesetzter LDH durchgeführt. Dazu wurden je 100 µL Zellkulturüberstand pro Well abgenommen, in eine 96-Wellplatte pipettiert, mit jeweils 100 µL Substratlösung versetzt und für 20 min bei 22°C inkubiert. Anschließend wurden in jedes Well 50 µL der Stopp-Lösung gegeben und schnellstmöglich die Fluoreszenz im Fluoreszenzplattenleser bei einer Extinktion von 544 nm und einer Emission von 590 nm detektiert.

6.13 Durchflusszytometrische Methoden

Zur Bestimmung des Zelltods wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die eine hohe Anzahl von Zellen in geringer Zeit in Bezug auf verschiedene Parameter, wie z.B. Volumen, Fluoreszenz, Absorption, erfassen kann. Die Zellen in einer Suspension werden hydrodynamisch fokussiert und passieren einzeln einen Laserstrahl.

Die Bestimmung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen einer Zellkultur erfolgt über die Färbung der Zellen mit FITC-AnnexinV und Propidiumiodid.

Phosphatidylserin (PS) befindet sich bei einer normalen Zelle auf der Innenseite der Zellmembran. Während der Apoptose wird kommt es zur Translozierung von PS auf die Außenseite der Membran und AnnexinV bindet daran. Bei der Nekrose wird die Membran der Zellen durchlässig, bzw. teilweise zerstört und FITC-AnnexinV kann an die Innenseite PS an der Membran binden. Eine Färbung der Zellen nur mit AnnexinV reicht demnach zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose nicht aus. Durch kombinierte Färbung der Zellen von FITC-AnnexinV mit Propidiumiodid (PI), welches nur in Zellen mit durchlässiger Membran eindringt (nekrotische Zellen) und dort bindet, kann zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden.

Daraus ergibt sich, dass lebende Zellen sowohl AnnexinV- und PI-negativ sind, apoptotische Zellen AnnexinV-positiv und nekrotische Zellen AnnexinV- und PI-positiv sind.

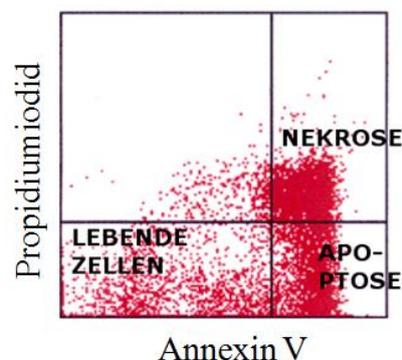


Abbildung 6-7: Schematische Darstellung von mit AnnexinV und Propidiumiodid gefärbten Zellen und deren Bezeichnung.

Um die durchflusszytometrischen Messungen durchführen zu können, werden 6-Well-Platten mit 60.000 Zellen in 3 mL pro Well besiedelt. Die Platten werden 3 Tage im Brutschrank inkubiert und an Tag 4 werden 3 mL der Partikelsuspensionen, bzw. der Salzlösungen zu den mit Zellen besiedelten Wells gegeben. Nach definierten Zeitabständen wird der Überstand der Wells in Zentrifugenröhrchen pipettiert, die Zellen mit 0,5 mL Trypsinierlösung abgelöst, in Medium aufgenommen und in die jeweiligen Zentrifugenröhrchen mit dem Zellkulturüberstand pipettiert.

Anschließend wird 5 min bei 200 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, 500 µL APO-Puffer zugegeben, erneut für 5 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Das Pellet wird in 200 µL Puffer resuspendiert, die Zellen gezählt und auf $1 \cdot 10^6$ Zellen pro mL verdünnt. In jedes Probengläschen des Zytometers werden 100 µL, jeweils 5 µL von jedem Farbstoff, AnnexinV und Propidiumiodid, gegeben, 15 min im Dunkeln gelagert und 400 µL Puffer gegeben. Die Proben werden in den Autosampler des Zytometers gestellt, das gewünschte Protokoll geöffnet und die Messung gestartet.

6.14 Komet-Assay

Mit dem Komet-Assay können DNA-Schäden auf Einzelzellebene detektiert werden. Die Methode wurde 1984 erstmals von Östling und Johanson beschrieben [228].

Der unter starken alkalischen Bedingungen durchgeführte Komet-Assay dient dazu, eine Entwindung der DNA vor der Elektrophorese zu erreichen. Während der Elektrophorese bilden sich Kometen aus, die Rückschlüsse auf die Fragmentierung der DNA liefern, da intakte DNA zu hochmolekular ist um im elektrischen Feld zu wandern. Die über den alkalischen Komet-Assay detektierten Schäden können auf Einzelstrangbrüche (ESB), Doppelstrangbrüche (DSB) zurückzuführen sein.

Die Auswertung der aus den Komet-Assay erhaltenen Ergebnisse kann 1.) über die Messung der Schweiflänge auf einen Mikrofilm, 2.) am Mikroskop, durch visuelle Einschätzung der Kometen und Einteilung in 5 verschiedene Klassen, wobei Klasse 0 ungeschädigter DNA und Klasse 5 stark geschädigter DNA entspricht, und 3.) über computergestützte Bildanalyse. Die hier verwendete Auswertung der Kometen erfolgte visuell am Mikroskop.

Zur Durchführung des Komet-Assay wurden zunächst Objektträger mit 0,5 % normal schmelzender Agarose beschichtet (NMA). Dazu wurde die Agarose nach kurzem Aufkochen bei 50-60°C gehalten. Zur Beschichtung der Objektträger wurden 50 µL der Agarose auf den Objektträger gebracht und mit einem Spatel gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt. Nach Antrocknen der ersten Schicht wurden erneut 100 µL Agarose auf den Objektträger aufgebracht und ebenfalls verstrichen, dabei ist eine Bläschenbildung zu vermeiden und auf eine gleichmäßige Verteilung der Agarose auf dem Objektträger zu achten. Bis zur Verwendung wurden die beschichteten Objektträger im Kühlschrank gelagert.

$2 \cdot 10^5$ NIH-3T3-Zellen wurden in T-25 Flaschen kultiviert und an Tag 3 mit den zu untersuchenden Nanopartikel versetzt und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 900 G für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 80 µL niedrig schmelzender Agarose aufgenommen und auf die vorbereiteten Objektträger gebracht. Auf die Objektträger wurden Deckgläschen aufgebracht, um ein gleichmäßiges Verteilen der Agarose auf den Trägern zu gewährleisten. Zum Auspolymerisieren wurden die Objektträger für 10 min im Kühlschrank gelagert, anschließend die Deckgläschen entfernt, erneut 100 µL 0,75 %ige LMA auf dem Objektträger verteilt und ein neues Deckgläschen aufgelegt. Nach weiteren 10 min im Kühlschrank wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger für 3 h in 200 mL Lyselösung gelegt. Anschließend erfolgte die Elektrophorese. Dazu wurden die Objektträger in direkten Kontakt zueinander in die Elektrophoresekammer gelegt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer befüllt, sodass die Objektträger vollständig mit Puffer bedeckt waren. Bevor eine Spannung angelegt wurde, blieben die Objektträger zum Entwinden 20 min im Elektrophoresepuffer liegen. Die angelegte Spannung betrug 1 V/cm und wurde über die Zugabe an Puffer auf Stromstärken von 300-310 mA eingestellt. Die Elektrophoresezeit betrug 20 min.

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger 3-mal mit Tris-Puffer gespült und anschließend zum Färben in Ethidiumbromidlösung gelegt. Die Auswertung der gebildeten Kometen erfolgte am Mikroskop.

Puffer und Lösungen:

Normal schmelzende Agarose 0,5 % (NMA): 150 mg/30 mL PBS

Niedrig schmelzende Agarose 0,75 % (LMA): 225 mg/30 mL PBS

Lyselösung: 8 g NaOH
1,2 g Tris-Base
37,2 g EDTA
146,1 g NaCl
10 g Triton X-100
100 mL DMSO
mit H₂O auf 1 L aufgefüllt.

Elektrophoresepuffer: 0,75 g EDTA
24 g NaOH
mit H₂O aufgefüllt auf 2 L.

Tris-Puffer: 48 g Tris-Base
aufgefüllt mit H₂O auf 1 L und eingestellt auf pH 7,4

6.15 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
0D	0-dimensional
1-D	1-dimensional
2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
8W1E	<i>8-well-1-electrode</i>
A-549	humane Lungenkarzinomzelllinie
ad	<i>adipose</i> Körperfett
Ag	Silber
Al	Aluminium
APAF	<i>apoptosis protease-activating factor</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
C18-4	Colon transversum
CACO-2	humane Darmkrebszelllinie
CAD	caspasenabhängige DNase
Caltech	<i>California Institute of Technology</i>
Co	Kobalt
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	<i>constant phase element</i> konstantes Phasenelement
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DISC	<i>death inducing signaling complex</i> Tod-induzierender Signal-Komplex
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagles Medium</i> Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribunuclein-acid</i>

	Desoxyribunucleinsäure
DNase	Desoxyribunuclease
DSB	Doppelstrangbrüche
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ECIS	<i>Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESB	Einzelstrangbrüche
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
eV	Elektronenvolt
f	Funktion
FADD	FAS-associated death domain protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HaCaT	Humane Keratinozytenzelllinie
HCl	Salzsäure
HELA	humane Eierstockkrebszelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HEP-G2	humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie
Hg	Quecksilber
HOS	<i>Horse serum</i>
	Pferdeserum
HT-29	Humane Kolonkarzinomzelllinie
Hz	Hertz
I	Stromstärke
IAP	Apoptose inhibierende Proteine
IC ₅₀	<i>half maximal (50%) inhibitory concentration</i>

	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAD	Inhibitor der caspasenabhängigen DNase
IR	Infrarot
IS	Impedanzspektroskopie
k_B	Boltzmann-Konstante
Kfz	Kraftfahrzeug
L	Liter
L929	Mäusebindegewebszelllinie
LDH	<i>lactat dehydrogenase</i> Laktatdehydrogenase
LED	<i>light-emitting diode</i> Leuchtdiode
LMA	<i>low melting agarose</i> niedrig schmelzende Agarose
ln	Logarithmus naturalis
M	Molar
MCTS	<i>multicellular tumor spheroids</i> multizelluläre Tumorsphäroide
MEM	<i>Minium essential medium</i>
Mn	Mangan
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i> mesenchymale Stammzellen
MSTO	humane Lungentumorzelllinie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n.b.	nicht bestimmbar
NAA	Neutronenaktivierungsanalyse
NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NIH-3T3	Mäusefibroblastenzelllinie
NK	natürliche Killerzelle
NKS	Neugeborenes Kälberserum
NMA	<i>normal melting agarose</i> normal schmelzende Agarose

NOAEC	<i>No Observed Adverse Effect Concentration</i> höchste Testkonzentration ohne beobachtete Wirkung
O ₂	Sauerstoff
OLED	<i>organic light emitting diode</i> organische Leuchtdiode
p	Wahrscheinlichkeitswert
P/S	Penicillin/Streptomycin
P25	Titandioxidnanopartikelpulver (Evonik)
PARP	Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerase
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> phosphatgepufferte Salzlösung
PC-12	Rattennebennierentumorzelllinie
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
ppm	<i>parts per million</i> 1 Millionstel
PS	Phosphatidylserin
r	Radius
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RL	Raumluft
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> Umdrehungen pro Minute
Sb	Antimon
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> Natriumdodecylsulfat

SERS	<i>surface enhanced raman scattering</i> Oberflächenverstärkte Ramanstreuung
Smac/Diablo	<i>second-mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pl</i>
SMMC-7721	humane Leberkrebszelllinie
T	absolute Temperatur
TiO ₂	Titandioxid
TLC	<i>Total Lethal Concentration</i> letale Konzentration
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung
uc	<i>umbilical cord</i> Nabelschnur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vgl.	Vergleiche
W	Watt
WS	Wirkstrom
Z	Impedanz
ZnO	Zinkoxid
η	Viskosität
φ	Phasenverschiebung
ω	Kreisfrequenz
Ω	Ohm

Für Längen-, Massen-, Stoffmengen- und Zeitangaben wurden SI-Einheiten verwendet sowie Vorsilben für dezimale Vielfache und Teile der SI-Einheiten nach DIN 1301.

6.16 Geräte und Laborausstattung

Gerät	Typ, Hersteller, Ort
Autoklav	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Brutschrank	Heracell 240, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Digitalkamera	Camedia C-4040 Zoom Olympus, Puchheim, Deutschland
Dynamic Light Scattering	Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom
Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX 50, Olympus Corporation, Tokio, Japan
Fluoreszenzplattenlesegerät	Fluoroskan Acent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gelelektrophorese	Classic ISSU1224, Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
Impedanzmessgerät	ECIS TM Model 1600R, Applied BioPhysics, Inc., Troy, USA
Lichtmikroskop	Axiopot, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Olympus BX 41, Olympus Corporation, Tokio, Japan
pH-Elektrode	Checker [®] , Hanna Instruments, USA
Pipetten	Research: 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100- 1000 µL Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte GmbH &Co.KG, Eberstadt, Deutschland Accu-Jet Pro, Brands GmbH & Co.KG, Wertheim, Deutschland

Plattenlesegerät	Microplate Reader Benchmark, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland Multiskan Spectrum, Thermo LabSystems Vertriebs-GmbH, Dreieich, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	JSM-6700F, Jeol Ltd., Tokio, Japan
Sterilbank	Technoflow 2F150-II GS, Integra Biosciences AG, Zürich, Schweiz HERAsafe KS, Kendro Laboratory Products, Boston, USA
Vortex-Mixer	VM-300, NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Arium, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zählkammer	Blaubrand®, nach Neubauer, Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3s, Heraeus, Hanau, Deutschland
Zytometer	Epics XL/MCL, Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Cultex® RFS	Radial Flow System, Cultex Laboratories, Hannover, Deutschland

6.17 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Ort
Combitips	Biopur, 5, 10 mL, Omnilab, Bremen, Deutschland
ECIS-slides	8W1E,

	ibidi, Martinsried, Deutschland
Einmalhandschuhe	Semperguard, Semperit AG Holding, Wien, Österreich
Einmalpipetten	Serologische Pipetten: 2, 5, 10, 25, 50 mL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Hütchen	Reagiergefäße: 1,5 mL, 2 mL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Omnilab, Bremen, Deutschland
Objektträger	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, Deutschland
Oxygen Biosensor System Microplates	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Spitzentyp A, B, C, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reagenz-und Zentrifugenröhrchen	15, 50 mL, Omnilab, Bremen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Minisart 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Terasaki®-Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Transwells	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Vakuumfilter	Filtropur S, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen	T-75-, T-175-Flaschen, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten	6-, 96-Lochplatten, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen	5 mL, 10 mL, Terumo Europe NV, Leuven, Belgien

6.18 Reagenzien und Kits

Reagenz	Hersteller, Ort
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Amphotericin B	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
AnnexinV	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Apo-One® Homogenous Caspase3/7 Assay Caspase3/7	Promega, Mannheim, Deutschland
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
Dinatriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs
DMEM (Pulver)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
FITC	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
FKS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Hanks-Puffer I	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Hanks-Puffer II	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
HEPES	PAA Laboratories GmbH, Pasching,

	Österreich
HOS	Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland
Humanserum	Medizinische Hochschule Hannover
Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Kaliumdihydrogencarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Kollagenase	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
MEM	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
MEM alpha	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
MTT	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
niedrig schmelzende Agarose	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, Deutschland
NKS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

normal schmelzende Agarose	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Salzsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Tris-Base	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland

7 Literaturverzeichnis

1. Schmid G. **2005**, Nanotechnology: Key technology of the new century - Metal nanoparticles as single-electron switches. *Chemie in Unserer Zeit*, 39(1): 8-15.
2. Feynman R. **1960**, There's a plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, 23(22-36).
3. Taniguchi N. **1974**, On the Basic Concept of Nano-Technology. *Proc. Intl.Conf.Prod.Eng. Tokyo Part II Japan Society of Precision Engineering*, 18-23.
4. Murray CB, Kagan CR, Bawendi MG. **2000**, Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annual Review of Materials Science*, 30(545-610).
5. van den Berg A, Mijatovic D, Eijkel JCT. **2005**, Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up - a review. *Lab on a Chip*, 5(5): 492-500.
6. Ziaie B, Wang MF, Raghunathan N. **2007**, A nonlithographic top-down electrochemical approach for creating hierarchical (micro-nano) superhydrophobic silicon surfaces. *Langmuir*, 23(5): 2300-2303.
7. Leung KC, Mendes PM, Magonov SN, Northrop BH, Kim S, Patel K, Flood AH, Tseng HR, Stoddart JF. **2006**, Supramolecular self-assembly of dendronized polymers: reversible control of the polymer architectures through acid-base reactions. *J Am Chem Soc*, 128(33): 10707-15.
8. Grevin B, Rannou P. **2004**, Electrochemistry: arrays of polymer nanowires. *Nat Mater*, 3(8): 503-4.
9. Zhai L, Liu JH, Zou JH. **2009**, Bottom-up Assembly of Poly(3-hexylthiophene) on Carbon Nanotubes: 2D Building Blocks for Nanoscale Circuits. *Macromolecular Rapid Communications*, 30(16): 1387-1391.
10. Fan SS, Liu L, Liu M. **2003**, Monitoring the growth of carbon nanotubes by carbon isotope labelling. *Nanotechnology*, 14(10): 1118-1123.

11. Mazzola L. **2003**, Commercializing nanotechnology. *Nature Biotechnology*, 21(10): 1137-1143.
12. Paull R, Wolfe J, Hebert P, Sinkula M. **2003**, Investing in nanotechnology. *Nature Biotechnology*, 21(10): 1144-1147.
13. Vasilev K, Cook J, Griesser HJ. **2009**, Antibacterial surfaces for biomedical devices. *Expert Review of Medical Devices*, 6(5): 553-567.
14. Fujishima A, Rao TN, Tryk DA. **2000**, Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C Photochemistry Reviews*, 1(1-21).
15. Fox MA, Dulay MT. **1993**, Heterogeneous Photocatalysis. *Chemical Reviews*, 93(1): 341-357.
16. Patchkovskii S, Tse JS, Yurchenko SN, Zhechkov L, Heine T, Seifert G. **2005**, Graphene nanostructures as tunable storage media for molecular hydrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30): 10439-10444.
17. Zhang XT, Fujishima A, Jin M, Emeline AV, Murakami T. **2006**, Double-layered TiO₂-SiO₂ nanostructured films with self-cleaning and antireflective properties. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(50): 25142-25148.
18. Klimov VI, Mikhailovsky AA, Xu S, Malko A, Hollingsworth JA, Leatherdale CA, Eisler HJ, Bawendi MG. **2000**, Optical gain and stimulated emission in nanocrystal quantum dots. *Science*, 290(5490): 314-317.
19. Ma J, Wong HF, Kong LB, Peng KW. **2003**, Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. *Nanotechnology*, 14(6): 619-623.
20. de la Isla A, Brostow W, Bujard B, Estevez M, Rodriguez JR, Vargas S, Castano VM. **2003**, Nanohybrid scratch resistant coatings for teeth and bone viscoelasticity manifested in tribology. *Materials Research Innovations*, 7(2): 110-114.

21. Sanchez-Martin RM, Alexander L, Muzerelle M, Cardenas-Maestre JM, Tsakiridis A, Brickman JM, Bradley M. **2009**, Microsphere-mediated protein delivery into cells. *Chembiochem*, 10(9): 1453-6.
22. Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand JP, Muller S, Prato M, Bianco A. **2003**, Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry & Biology*, 10(10): 961-966.
23. Hirai S, Takahashi N, Goto T, Lin S, Uemura T, Yu R, Kawada T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators Inflamm*, 2010(367838).
24. Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. **1998**, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 281(5385): 2013-2016.
25. Edelstein RL, Tamanaha CR, Sheehan PE, Miller MM, Baselt DR, Whitman LJ, Colton RJ. **2000**, The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosensors & Bioelectronics*, 14(10-11): 805-813.
26. Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. **2003**, Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*, 301(5641): 1884-1886.
27. Shinkai M, Yanase M, Suzuki M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. **1999**, Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194(1-3): 176-184.
28. Malato S, Fernandez-Ibanez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W. **2009**, Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147(1): 1-59.
29. Oregan B, Gratzel M. **1991**, A Low-Cost, High-Efficiency Solar-Cell Based on Dye-Sensitized Colloidal TiO₂ Films. *Nature*, 353(6346): 737-740.
30. Rensmo H, Keis K, Lindstrom H, Sodergren S, Solbrand A, Hagfeldt A, Lindquist SE, Wang LN, Muhammed M. **1997**, High light-to-energy

- conversion efficiencies for solar cells based on nanostructured ZnO electrodes. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(14): 2598-2601.
31. Klein J. **2007**, Probing the interactions of proteins and nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7): 2029-2030.
 32. Hashimoto K, Irie H, Fujishima A. **2005**, TiO₂ photocatalysis: A historical overview and future prospects. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1- Regular Papers Brief Communications & Review Papers*, 44(12): 8269-8285.
 33. Szczyrbowski J, Brauer G, Ruske M, Schilling H, Zmelty A. **1999**, New low emissivity coating based on TwinMag (R) sputtered TiO₂ and Si₃N₄ layers. *2nd International Conference on Coatings on Glass, Iccg*, 368-373.
 34. Es-Souni M, Oja I, Krunk M. **2004**, Chemical solution deposition of thin TiO₂-anatase films for dielectric applications. *Journal of Materials Science- Materials in Electronics*, 15(6): 341-344.
 35. Arai Y. Chemistry of powder production. London, Chapman and Hall, 1996.
 36. Schwarz JA, Contescu C, Contescu A. **1995**, Methods for Preparation of Catalytic Materials. *Chemical Reviews*, 95(3): 477-510.
 37. Maness PC, Smolinski S, Blake DM, Huang Z, Wolfrum EJ, Jacoby WA. **1999**, Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 4094-4098.
 38. Dillert R, Siemon U, Bahnemann D. **1998**, Photocatalytic disinfection of municipal wastewater. *Chemical Engineering & Technology*, 21(4): 356-+.
 39. Wang R, Hashimoto K, Fujishima A, Chikuni M, Kojima E, Kitamura A, Shimohigoshi M, Watanabe T. **1997**, Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature*, 388(6641): 431-432.
 40. Russell AD, Hugo WB. **1994**, Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem*, 31(351-70).

41. Wilhelmi B. **2008**, Nanosilver: A test for nanotech regulation. *Food and Drug Law Journal*, 63(1): 89-112.
42. Bayston R, Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, Brown PD, Winship PD, Reid HJ. **2004**, Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(6): 1019-1024.
43. Rouillet JB, Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B. **2008**, Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4): 869-876.
44. Tsuchido T, Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S. **2003**, Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7): 4278-4281.
45. Trop M, Novak M, Rodl S, Hellbom B, Kroell W, Goessler W. **2006**, Silver coated dressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, 60(3): 648-652.
46. Lu GQ, Xu ZP, Zeng QH, Yu AB. **2006**, Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*, 61(3): 1027-1040.
47. Breunig M, Bauer S, Goepferich A. **2008**, Polymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting? *Eur J Pharm Biopharm*, 68(1): 112-28.
48. Lee JH, Ahn HH, Kim KS, Lee JY, Kim MS, Lee B, Khang G, Lee HB. **2008**, Polyethyleneimine-mediated gene delivery into rat pheochromocytoma PC-12 cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(5): 288-95.
49. Klasen HJ. **2000**, Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, 26(2): 117-30.
50. Lewis LN. **1993**, Chemical Catalysis by Colloids and Clusters. *Chemical Reviews*, 93(8): 2693-2730.

51. Murphy CJ, San TK, Gole AM, Orendorff CJ, Gao JX, Gou L, Hunyadi SE, Li T. **2005**, Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(29): 13857-13870.
52. Li YN, Wu YL, Ong BS. **2005**, Facile synthesis of silver nanoparticles useful for fabrication of high-conductivity elements for printed electronics. *Journal of the American Chemical Society*, 127(10): 3266-3267.
53. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. **2007**, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4): Mr17-Mr71.
54. Lee HJ, Jeong SH. **2005**, Bacteriostasis and skin innocuousness of nanosize silver colloids on textile fabrics. *Textile Research Journal*, 75(7): 551-556.
55. Lee HJ, Yeo SY, Jeong SH. **2003**, Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. *Journal of Materials Science*, 38(10): 2199-2204.
56. Klingshirn C, Grundmann M., Hoffmann A., Meyer B., Waag A., . **2006**, Zinkoxid-ein alter, neuer Halbleiter. *Physik Journal*, 5(1): 33-39.
57. Sojka-Ledakowicz J, Olczyk J, Walawska A, Laurentowska A, Kolodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T. **2010**, Modification of textile products with nanosized zinc oxide and ZnO-SiO₂ oxide composite. *Przemysl Chemiczny*, 89(12): 1648-1652.
58. Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdorster G, Philbert MA, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle SS, Tran L, Walker NJ, Warheit DB. **2006**, Safe handling of nanotechnology. *Nature*, 444(7117): 267-269.
59. Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, Santamaria AB. **2006**, Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: Risk assessment of nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 89(1): 42-50.
60. Oberdorster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med*, 267(1): 89-105.

61. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. **2005**, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113(7): 823-39.
62. Oberdorster G, Stone V, Donaldson K. **2007**, Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1(1): 2-25.
63. Aitken R. **2004**, RS Report Nanoscience and nanotechnologie.
64. Maynard AD, Aitken RJ. **2007**, Assessing exposure to airborne nanomaterials: Current abilities and future requirements. *Nanotoxicology*, 1(1): 26-41.
65. Seipenbusch M, Binder A, Kasper G. **2008**, Temporal evolution of nanoparticle aerosols in workplace exposure. *Ann Occup Hyg*, 52(8): 707-16.
66. Fujitani Y, Kobayashi T, Arashidani K, Kunugita N, Suemura K. **2008**, Measurement of the physical properties of aerosols in a fullerene factory for inhalation exposure assessment. *J Occup Environ Hyg*, 5(6): 380-9.
67. Han JH, Lee EJ, Lee JH, So KP, Lee YH, Bae GN, Lee SB, Ji JH, Cho MH, Yu IJ. **2008**, Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhalation Toxicology*, 20(8): 741-749.
68. Mitsakou C, Helmis C, Housiadas C. **2005**, Eulerian modelling of lung deposition with sectional representation of aerosol dynamics. *Journal of Aerosol Science*, 36(1): 75-94.
69. Gwinn MR, Tran L. **2010**, Risk management of nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(2): 130-137.
70. Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds JG. **2007**, Particokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicology assessments (vol 95, pg 300, 2007). *Toxicological Sciences*, 97(2): 614-614.
71. Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. **2004**, Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences*, 77(1): 126-134.

72. Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR. **2004**, Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological Sciences*, 77(1): 117-125.
73. Helland A, Wick P, Koehler A, Schmid K, Som C. **2007**, Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Environmental Health Perspectives*, 115(8): 1125-1131.
74. Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J. **1992**, Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 97(193-9).
75. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V. **2005**, Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol*, 2(10).
76. Dybdahl M, Risom L, Bornholdt J, Autrup H, Loft S, Wallin H. **2004**, Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 562(1-2): 119-131.
77. Hirano S, Furuyama A, Koike E, Kobayashi T. **2003**, Oxidative-stress potency of organic extracts of diesel exhaust and urban fine particles in rat heart microvessel endothelial cells. *Toxicology*, 187(2-3): 161-170.
78. McNeilly JD, Heal MR, Beverland IJ, Howe A, Gibson MD, Hibbs LR, MacNee W, Donaldson K. **2004**, Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(1): 95-107.
79. Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. **2004**, Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(5): 442-447.
80. Gilmour MI, O'Connor S, Dick CAJ, Miller CA, Linak WP. **2004**, Differential pulmonary inflammation and in vitro cytotoxicity of size-fractionated fly ash

- particles from pulverized coal combustion. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 54(3): 286-295.
81. Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. **2004**, Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target*, 12(9-10): 635-41.
82. Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. **1999**, Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 12(5): 247-56.
83. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia Y, Guy RH, Fessi H. **2004**, Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 99(1): 53-62.
84. Zvyagin AV, Zhao X, Gierden A, Sanchez W, Ross JA, Roberts MS. **2008**, Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo. *J Biomed Opt*, 13(6): 064031.
85. Cross SE, Innes B, Roberts MS, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P. **2007**, Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(3): 148-154.
86. Mortensen LJ, Oberdorster G, Pentland AP, Delouise LA. **2008**, In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. *Nano Lett*, 8(9): 2779-87.
87. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. **2005**, Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(1): 1-11.
88. Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Warbritton AR, Yu WW, Colvin VL, Walker NJ, Howard PC. **2007**, Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice. *Toxicol Sci*, 98(1): 249-57.

89. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. **2006**, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*, 6(4): 662-8.
90. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, Bawendi MG, Frangioni JV. **2007**, Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology*, 25(10): 1165-1170.
91. Fischer HC, Liu LC, Pang KS, Chan WCW. **2006**, Pharmacokinetics of nanoscale quantum dots: In vivo distribution, sequestration, and clearance in the rat. *Advanced Functional Materials*, 16(10): 1299-1305.
92. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. **2006**, Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761): 622-627.
93. Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL. **2005**, Nano-C-60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials*, 26(36): 7587-7595.
94. Ipe BI, Lehnig M, Niemeyer CM. **2005**, On the generation of free radical species from quantum dots. *Small*, 1(7): 706-709.
95. Lovric J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D. **2005**, Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chemistry & Biology*, 12(11): 1227-1234.
96. Tsay JM, Michalet X. **2005**, New light on quantum dot cytotoxicity. *Chemistry & Biology*, 12(11): 1159-1161.
97. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. **2007**, Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7): 2050-2055.
98. Petkovic J, Zegura B, Stevanovic M, Drnovsek N, Uskokovic D, Novak S, Filipic M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage

- responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology*,
99. Ku S, Yan F, Wang Y, Sun Y, Yang N, Ye L. The blood-brain barrier penetration and distribution of PEGylated fluorescein-doped magnetic silica nanoparticles in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(4): 871-6.
 100. Sharma HS, Sharma A, Hussain S, Schlager J, Sjoquist PO, Muresanu D. **2010**, A New Antioxidant Compound H-290/51 Attenuates Nanoparticle Induced Neurotoxicity and Enhances Neurorepair in Hyperthermia. *Brain Edema Xiv*, 106(351-357).
 101. Sharma HS, Sjoquist PO, Ali SF. **2007**, Drugs of abuse-induced hyperthermia, blood-brain barrier dysfunction and neurotoxicity: Neuroprotective effects of a new antioxidant compound H-290/51. *Current Pharmaceutical Design*, 13(18): 1903-1923.
 102. Meißner T, Potthoff A, Richter V. **2009**, Suspension characterization as important key for toxicological investigations. *Journal of Physics*, Conference Series 170 (Nanosafe 2008)
 103. Allouni ZE, Cimpan MR, Hol PJ, Skodvin T, Gjerdet NR. **2009**, Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 68(1): 83-87.
 104. Buford MC, Hamilton RF, Jr., Holian A. **2007**, A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*, 4(6).
 105. Kuhnel D, Busch W, Meissner T, Springer A, Potthoff A, Richter V, Gelinsky M, Scholz S, Schirmer K. **2009**, Agglomeration of tungsten carbide nanoparticles in exposure medium does not prevent uptake and toxicity toward a rainbow trout gill cell line. *Aquat Toxicol*, 93(2-3): 91-9.
 106. Chen ZP, Xu RZ, Zhang Y, Gu N. **2008**, Effects of Proteins from Culture Medium on Surface Property of Silanes- Functionalized Magnetic Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*, 4(3): 204-209.

107. Ji Z, Jin X, George S, Xia T, Meng H, Wang X, Suarez E, Zhang H, Hoek EM, Godwin H, Nel AE, Zink JI. Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. *Environ Sci Technol*, 44(19): 7309-14.
108. Kan AT, Tomson MB. **1990**, Ground-Water Transport of Hydrophobic Organic-Compounds in the Presence of Dissolved Organic-Matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(3): 253-263.
109. Jacoby WA, Maness PC, Wolfrum EJ, Blake DM, Fennell JA. **1998**, Mineralization of bacterial cell mass on a photocatalytic surface in air. *Environmental Science & Technology*, 32(17): 2650-2653.
110. Coleman HM, Marquis CP, Scott JA, Chin SS, Amal R. **2005**, Bactericidal effects of titanium dioxide-based photocatalysts. *Chemical Engineering Journal*, 113(1): 55-63.
111. Srinivasan C, Somasundaram N. **2003**, Bactericidal and detoxification effects of irradiated semiconductor catalyst, TiO₂. *Current Science*, 85(10): 1431-1438.
112. Chen FN, Yang XD, Xu FF, Wu Q, Zhang YP. **2009**, Correlation of Photocatalytic Bactericidal Effect and Organic Matter Degradation of TiO₂ Part I: Observation of Phenomena. *Environmental Science & Technology*, 43(4): 1180-1184.
113. Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Wake H. **1985**, Photoelectrochemical Sterilization of Microbial-Cells by Semiconductor Powders. *Fems Microbiology Letters*, 29(1-2): 211-214.
114. Liu HL, Yang TCK. **2003**, Photocatalytic inactivation of Escherichia coli and Lactobacillus helveticus by ZnO and TiO₂ activated with ultraviolet light. *Process Biochemistry*, 39(4): 475-481.
115. Armon R, Laot N, Neeman I. **1998**, Photocatalytic inactivation of different bacteria and bacteriophages in drinking water at different TiO₂ concentration with or without exposure to O₂. *Journal of Advanced Oxidation*, 3(145-150).

116. Biguzzi M, Shama G. **1994**, Effect of Titanium-Dioxide Concentration on the Survival of *Pseudomonas-Stutzeri* during Irradiation with near-Ultraviolet Light. *Letters in Applied Microbiology*, 19(6): 458-460.
117. Pham HN, Mcdowell T, Wilkins E. **1995**, Photocatalytically-Mediated Disinfection of Water Using TiO_2 as a Catalyst and Spore-Forming *Bacillus-Pumilus* as a Model. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control*, 30(3): 627-636.
118. Kuhn KP, Chaberny IF, Massholder K, Stickler M, Benz VW, Sonntag HG, Erdinger L. **2003**, Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere*, 53(1): 71-7.
119. Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. **2006**, Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO_2 , SiO_2 , and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40(19): 3527-3532.
120. Zhang LL, Jiang YH, Ding YL, Povey M, York D. **2007**, Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*, 9(3): 479-489.
121. Roselli M, Finamore A, Garaguso I, Britti MS, Mengheri E. **2003**, Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. *Journal of Nutrition*, 133(12): 4077-4082.
122. Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. **2008**, Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *Fems Microbiology Letters*, 279(1): 71-76.
123. Huang ZB, Zheng X, Yan DH, Yin GF, Liao XM, Kang YQ, Yao YD, Huang D, Hao BQ. **2008**, Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*, 24(8): 4140-4144.
124. Hund-Rinke K, Simon M. **2006**, Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO_2) on algae and daphnids. *Environ Sci Pollut Res Int*, 13(4): 225-32.

125. Lovern SB, Klaper R. **2006**, Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*, 25(4): 1132-7.
126. Ruiz MJ, Lopez-Jaramillo L, Redondo MJ, Font G. **1997**, Toxicity assessment of pesticides using the microtox test: application to environmental samples. *Bull Environ Contam Toxicol*, 59(4): 619-25.
127. Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A. **2009**, Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ*, 407(4): 1461-8.
128. Pena-Vazquez E, Perez-Conde C, Costas E, Moreno-Bondi MC. Development of a microalgal PAM test method for Cu(II) in waters: comparison of using spectrofluorometry. *Ecotoxicology*, 19(6): 1059-65.
129. Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A. **2008**, Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7): 1308-16.
130. Miller RJ, Lenihan HS, Muller EB, Tseng N, Hanna SK, Keller AA. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environ Sci Technol*, 44(19): 7329-34.
131. Sunda WG, Price NM, F.M.M M. **2005**, Trace metal ion buffers and their use in culture studies. *Algal Culturing Techniques*, 35-64.
132. Sotiriou GA, Pratsinis SE. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environ Sci Technol*, 44(14): 5649-54.
133. Fabrega J, Fawcett SR, Renshaw JC, Lead JR. **2009**, Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environ Sci Technol*, 43(19): 7285-90.
134. Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R. **2008**, Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol*, 42(23): 8959-64.

135. Zhao CM, Wang WX. Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol*, 44(19): 7699-704.
136. Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H. **2005**, Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*, 2(8).
137. Jin C, Tang Y, Yang FG, Li XL, Xu S, Fan XY, Huang YY, Yang YJ. Cellular Toxicity of TiO₂ Nanoparticles in Anatase and Rutile Crystal Phase. *Biol Trace Elem Res*,
138. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. **2008**, Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9): 1871-1877.
139. Cai RX, Kubota Y, Shuin T, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A. **1992**, Induction of Cytotoxicity by Photoexcited TiO₂ Particles. *Cancer Research*, 52(8): 2346-2348.
140. Chen JY, Zhou HJ, Santulli AC, Wong SS. **2010**, Evaluating Cytotoxicity and Cellular Uptake from the Presence of Various Processed TiO₂ Nanostructured Morphologies. *Chemical Research in Toxicology*, 23(5): 871-879.
141. Lu NH, Zhu ZN, Zhao XQ, Tao R, Yang XL, Gao ZH. **2008**, Nano titanium dioxide photocatalytic protein tyrosine nitration: A potential hazard of TiO₂ on skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370(4): 675-680.
142. Bloh JZ, Wagner S, Bahnemann DW, Scheper T, Kasper C. **2010**, Studies on cytotoxicity of photocatalytic active titanium dioxide nanoparticles. *Chemie Ingenieur Technik*, 82(3): 335-341.
143. Wagner S, Münzer S, Behrens P, Scheper T, Bahnemann DW, Kasper C. **2009**, Cytotoxicity of Titanium and Silicon Dioxide Nanoparticles. *Journal of Physics, Conference Series* 170 (Nanosafe 2008)(

144. Liu SC, Xu LJ, Zhang T, Ren GG, Yang Z. **2010**, Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology*, 267(1-3): 172-177.
145. Gurr JR, Wang ASS, Chen CH, Jan KY. **2005**, Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213(1-2): 66-73.
146. Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark WJ. **2006**, In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 40(14): 4374-4381.
147. Li JY, Guo DD, Wang XM, Wang HP, Jiang H, Chen BA. **2010**, The Photodynamic Effect of Different Size ZnO Nanoparticles on Cancer Cell Proliferation In Vitro. *Nanoscale Research Letters*, 5(6): 1063-1071.
148. Zheng YF, Li RZ, Wang YD. **2009**, In Vitro and in Vivo Biocompatibility Studies of Zno Nanoparticles. *International Journal of Modern Physics B*, 23(6-7): 1566-1571.
149. Hanley C, Thurber A, Hanna C, Punnoose A, Zhang JH, Wingett DG. **2009**, The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction. *Nanoscale Research Letters*, 4(12): 1409-1420.
150. Decksakulthorn F, Hayes A, Bakand S, Joeng L, Winder C. **2007**, In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. *AATEX*, Special Issue (2007)): 397-400.
151. Lin WS, Xu Y, Huang CC, Ma YF, Shannon KB, Chen DR, Huang YW. **2009**, Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1): 25-39.
152. Soto KF, Carrasco A, Powell TG, Garza KM, Murr LE. **2005**, Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research*, 7(2): 145-169.

153. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. **2005**, In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 88(2): 412-419.
154. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. **2005**, In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*, 19(7): 975-983.
155. Grodzik M, Sawosz E. **2006**, The influence of silver nanoparticles on chicken embryo development and bursa of Fabricius morphology. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15(111-114).
156. Wen HC, Lin YN, Jian SR, Tseng SC, Weng MX, Liu YP, Lee PT, Chen PY, Hsu RQ, Wu WF, Chou CP. **2007**, Observation of growth of human fibroblasts on silver nanoparticles. *J Phys (Conf Ser)*, 61(445-449).
157. Hussain SM, Javorina AK, Schrand AM, Duhart HM, Ali SF, Schlager JJ. **2006**, The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci*, 92(2): 456-63.
158. Kawata K, Osawa M, Okabe S. **2009**, In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol*, 43(15): 6046-51.
159. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. **2009**, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *Acs Nano*, 3(2): 279-90.
160. Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. **2007**, Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*, 168(2): 176-85.
161. Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR, Reed KL. **2005**, Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci*, 88(2): 514-24.

162. Cui Y, Gong X, Duan Y, Li N, Hu R, Liu H, Hong M, Zhou M, Wang L, Wang H, Hong F. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *J Hazard Mater*, 183(1-3): 874-80.
163. Hohr D, Steinfartz Y, Schins RP, Knaapen AM, Martra G, Fubini B, Borm PJ. **2002**, The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health*, 205(3): 239-44.
164. Jani PU, Mccarthy DE, Florence AT. **1994**, Titanium-Dioxide (Rutile) Particle Uptake from the Rat Gi Tract and Translocation to Systemic Organs after Oral-Administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 105(2): 157-168.
165. Duan Y, Liu J, Ma L, Li N, Liu H, Wang J, Zheng L, Liu C, Wang X, Zhao X, Yan J, Wang S, Wang H, Zhang X, Hong F. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials*, 31(5): 894-9.
166. Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL. **2006**, Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci*, 91(1): 227-36.
167. Liu H, Ma L, Zhao J, Liu J, Yan J, Ruan J, Hong F. **2009**, Biochemical toxicity of nano-anatase TiO₂ particles in mice. *Biol Trace Elem Res*, 129(1-3): 170-80.
168. Liu H, Ma L, Liu J, Zhao J, Yan J, Hong F. **2010**, Toxicity of nano-anataseTiO₂ to mice: Liver injury oxidative stress. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92(175-186).
169. Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. **1985**, Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol*, 79(2): 179-92.
170. Hext PM, Tomenson JA, Thompson P. **2005**, Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology. *Ann Occup Hyg*, 49(6): 461-72.

171. Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. **2002**, Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci*, 70(1): 86-97.
172. Uragoda CG, Pinto MR. **1972**, An investigation into the health of workers in an ilmenite extracting plant. *Med J Aust*, 1(4): 167-9.
173. Song W, Zhang J. **2010**, Acute toxicological impact of nano-and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *Bioinformatics and Biomedical Engineering 4th International Conference* (1-4).
174. Wang B, Feng WY, Wang M, Wang TC, Gu YQ, Zhu MT, Ouyang H, Shi JW, Zhang F, Zhao YL, Chai ZF, Wang HF, Wang J. **2008**, Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(2): 263-276.
175. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. **2007**, The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10): 839-45.
176. Abbott A. **2003**, Cell culture: biology's new dimension. *Nature*, 424(6951): 870-2.
177. Lin RZ, Chang HY. **2008**, Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*, 3(9-10): 1172-84.
178. Dutta RC, Dutta AK. **2009**, Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnology Advances*, 27(4): 334-339.
179. Hamilton G. **1998**, Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Letters*, 131(1): 29-34.
180. Kunz-Schughart LA, Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W. **2010**, Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, 148(1): 3-15.
181. Timmins NE, Dietmair S, Nielsen LK. **2004**, Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis*, 7(2): 97-103.

182. J. C. **2010**, 3D Cell Culture. *3D Cell Culture easier said than done*, 25-41.
183. Desoize B. **2000**, Contribution of three-dimensional culture to cancer research. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 36(2-3): 59-60.
184. Meng Q. Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6(6): 733-46.
185. Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C. **2008**, Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(10): 1279-94.
186. Sakai Y, Yamagami S, Nakazawa K. Comparative analysis of gene expression in rat liver tissue and monolayer- and spheroid-cultured hepatocytes. *Cells Tissues Organs*, 191(4): 281-8.
187. Dash A, Inman W, Hoffmaster K, Sevidal S, Kelly J, Obach RS, Griffith LG, Tannenbaum SR. **2009**, Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 5(10): 1159-74.
188. Muhlfriedel S, Knebel G. **2007**, The establishment of in vivo-like tissue culture conditions in ThinCert tissue culture products. *Biotechniques*, 43(6): 812-3.
189. Vertrees RA, Zwischenberger JB, Boor PJ, Popov V, McCarthy M, Solley TN, Goodwin TJ. **2008**, Cellular differentiation in three-dimensional lung cell cultures. *Cancer Biol Ther*, 7(3): 404-12.
190. Sharma M, Schoop R, Hudson JB. The efficacy of Echinacea in a 3-D tissue model of human airway epithelium. *Phytother Res*, 24(6): 900-4.
191. Khademhosseini A, Gauvin R. **2011**, Microscale Technologies and Modular Approaches for Tissue Engineering: Moving toward the Fabrication of Complex Functional Structures. *ACS Nano*, 5(6): 4258-4264.
192. Mooney DJ, Drury JL. **2003**, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24): 4337-4351.

193. Zhang MQ, Li ZS, Leung M, Hopper R, Ellenbogen R. **2010**, Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. *Biomaterials*, 31(3): 404-412.
194. Li ZS, Leung M, Hopper R, Ellenbogen R, Zhang MQ. **2010**, Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. *Biomaterials*, 31(3): 404-412.
195. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. **2006**, Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8): 2480-2487.
196. Ende D, Mangold KM. **1993**, Impedance Spectroscopy. *Chemie in Unserer Zeit*, 27(3): 134-140.
197. Janshoff A, Wegener J, Steinem C, Sieber M, Galla HJ. **1996**, Applications of impedance spectroscopy in biochemistry and biophysics. *Acta Biochim Pol*, 43(2): 339-48.
198. Wegener J, Keese CR, Giaever I. **2000**, Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res*, 259(1): 158-66.
199. Giaever I, Keese CR. **1984**, Monitoring Fibroblast Behavior in Tissue-Culture with an Applied Electric-Field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 81(12): 3761-3764.
200. Giaever I, Keese CR. **1993**, A Morphological Biosensor for Mammalian-Cells. *Nature*, 366(6455): 591-592.
201. O'Grady SM, Schiller KR, Maniak PJ. **2010**, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(5): C912-C921.
202. Hung CF, Chan CM, Huang JH, Chiang HS, Wu WB, Lin HH, Hong JY. **2010**, Effects of (-)-epigallocatechin gallate on RPE cell migration and adhesion. *Molecular Vision*, 16(66-69): 586-595.

203. Heijink IH, Brandenburg SM, Noordhoek JA, Postma DS, Slebos DJ, van Oosterhout AJM. **2010**, Characterisation of cell adhesion in airway epithelial cell types using electric cell-substrate impedance sensing. *European Respiratory Journal*, 35(4): 894-903.
204. Giaever I, Wegener J, Keese CR. **2002**, Recovery of adherent cells after in situ electroporation monitored electrically. *Biotechniques*, 33(2): 348-+.
205. Muller J, Thirion C, Pfaffl MW. **2011**, Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) based real-time measurement of titer dependent cytotoxicity induced by adenoviral vectors in an IPI-2I cell culture model. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(5): 2000-2005.
206. Janshoff A, Tarantola M, Marel AK, Sunnick E, Adam H, Wegener J. **2010**, Dynamics of human cancer cell lines monitored by electrical and acoustic fluctuation analysis. *Integrative Biology*, 2(2-3): 139-150.
207. Jiang WG, Davies S. **2010**, ALCAM, Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule, Influences the Aggressive Nature of Breast Cancer Cells, a Potential Connection to Bone Metastasis. *Anticancer Research*, 30(4): 1163-1168.
208. Yuan SY, Sun CX, Wu MH, Guo MZ, Day ML, Lee ES. **2010**, ADAM15 regulates endothelial permeability and neutrophil migration via Src/ERK1/2 signalling. *Cardiovascular Research*, 87(2): 348-355.
209. Hordijk PL, ten Klooster JP, Jaffer ZM, Chernoff J. **2006**, Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *Journal of Cell Biology*, 172(5): 759-769.
210. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. **1972**, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4): 239-57.
211. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. **1998**, Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254(3): 439-59.

212. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. **1996**, FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*, 85(6): 817-27.
213. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. **2001**, Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J*, 20(23): 6627-36.
214. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S. **2002**, Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 277(33): 29803-9.
215. Yuan JY, Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA. **2000**, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765): 98-103.
216. Mehmet H. **2000**, Apoptosis - Caspases find a new place to hide. *Nature*, 403(6765): 29-30.
217. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. **2001**, Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17): 13935-13940.
218. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. **2002**, An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis - Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37): 34287-34294.
219. Earnshaw WC, Ruchaud S, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH. **2002**, Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo Journal*, 21(8): 1967-1977.

220. Khaydaroy RA, Khaydarov RR, Olsen RL, Rogers SE. **2004**, Water disinfection using electrolytically generated silver, copper and gold ions. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua*, 53(8): 567-572.
221. Khaydarov RA, Khaydarov RR, Gapurova O, Estrin Y, Scheper T. **2009**, Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(5): 1193-1200.
222. De Soete D, Gijbels R, Hoste J. **1972**, Neutron Activation Analysis. *Cemical Analysis*, 34(393-444).
223. Mohamed HH, Dillert R, Bahnemann DW. **2011**, Reaction dynamics of the transfer of stored electrons on TiO(2) nanoparticles: A stopped flow study. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 217(1): 271-274.
224. Mohamed HH, Mendive CB, Dillert R, Bahnemann DW. **2011**, Kinetic and Mechanistic Investigations of Multielectron Transfer Reactions Induced by Stored Electrons in TiO(2) Nanoparticles: A Stopped Flow Study. *Journal of Physical Chemistry A*, 115(11): 2139-2147.
225. Wright BM. **1950**, A New Dust-Feed Mechanism. *Journal of Scientific Instruments*, 27(1): 12-15.
226. da Silva J, de Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. **2000**, An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1): 241-245.
227. Mosmann T. **1983**, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.
228. Ostling O, Johanson KJ. **1984**, Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian-Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1): 291-298.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Wagner

Geburtstag: 08.05.1979

Geburtsort: Hofgeismar

Nationalität: Deutsch

Schulbildung:

1985-1986 Grundschule, Sielen

1986-1988 Grundschule, Hümme

1988-1989 Grundschule, Hofgeismar

1989-1991 Förderstufe, Gustav-Heinemann-Schule-Hofgeismar

1991-1995 Gustav-Heinemann-Schule, gymnasialer Zweig, Hofgeismar

1995-1998 Lutherschule, Hannover

Abschluss Abitur

Studium

1998-2007 Studium der Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

2008-2012 Promotion am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Poster

- [1] **Bioperspectives 2008, Hannover, Germany, Stefanie Wagner**, Cornelia Kasper, Thomas Scheper, Detlef Bahnemann, Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles

- [2] **Nanoday 2008, Hannover, Germany, Stefanie Wagner**, Cornelia Kasper, Thomas Scheper, Detlef Bahnemann, Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles

- [3] **Nanosafe 2008, Grenoble, France, Stefanie Wagner**, Detlef Bahnemann, Simon. Münzer, Peter Behrens, Thomas Scheper, Cornelia Kasper, Cytotoxicity of Titanium and Silicon Dioxide Nanoparticles

- [4] **1th NanoImpactNet 2009, Lausanne, Switzerland, Stefanie Wagner**, Detlef Bahnemann, Thomas Scheper, Renat R. Khaydarov, Cornelia Kasper, Characterization of cell death induced by silver nanoparticles using flow cytometry and microarray analysis

- [5] **Nanoday 2009, Hannover, Germany, Stefanie Wagner**, Ralf Dillert, Detlef Bahnemann, Thomas Scheper, Cornelia Kasper, Investigations of the cytotoxic effect of ZnO and Cobalt doped ZnO Nanoparticles using MTT-Test and Electric Cell-Substrate Impedance Sensing

- [6] **TiO₂-14, Niagara Falls 2009, USA, Stefanie Wagner**, Ralf Dillert, Detlef Bahnemann, Thomas Scheper, Cornelia Kasper, Investigations of the cytotoxic effect of ZnO and Cobalt doped ZnO Nanoparticles using MTT-Test and Electric Cell-Substrate Impedance Sensing

-
- [7] **ICONN 2010, Sydney, Australia**, Stefanie Wagner, Clarissa Baumanis, Detlef Bahnemann, Thomas Scheper, Cornelia Kasper, Investigations of the cytotoxic effect of α -Fe₂O₃ Nanoparticles in different sizes and with different concentrations of Platinum using MTT-Test and Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
- [8] **IUTOX 2010, Barcelona, Spain**, Stefanie Wagner, Niklas Möhle, Olaf Krischenowski, Stefanie Röker, Detlef Bahnemann, Thomas Scheper, Michaela Aufderheide, Cornelia Kasper, Comparison between two different exposure methods, via culture medium and exposure at the air liquid interface, of ZnO-nanoparticles to A-549-cells.
- [9] **Nanoday 2010, Hannover, Germany**, Stefanie Wagner, Niklas Möhle, Olaf Krischenowski, Stefanie Röker, Detlef Bahnemann, Thomas Scheper, Michaela Aufderheide, Cornelia Kasper, Comparison between two different exposure methods, via culture medium and exposure at the air liquid interface, of ZnO-nanoparticles to A-549-cells.

Veröffentlichungen

- [1] Stefanie Wagner, Cornelia Kasper, Thomas Scheper, Detlef Bahnemann, Cytotoxicity of Titanium and Silicon Dioxide Nanoparticles, *Journal of Physics: Conference Series* 170 (2009) 012022 (doi:10.1088/1742-6596/170/1/012022)
- [2] Bloh J.Z., Wagner S., Bahnemann D.W., Scheper T., Kasper C., **2010**, Studies on cytotoxicity of photocatalytic active titanium dioxide nanoparticles. *Chemie Ingenieur Technik*, 82(3): 335-341.

- [3] Renat R. Khaydarov, Rashid A. Khaydarov, Yuri Estrin, Svetlana Evgrafova, Seung Y. Cho and Stefanie Wagner, "Antibacterial application of silver nanoparticles: Benefits and human health risks", *Silver Nanoparticles: Properties, Characterization and Applications*, Series: Nanotechnology Science and Technology, Editors: Audrey E. Welles (2010) pp. 327-339, Nova Science Publishers, USA, ISBN: 978-1-61668-690-1
- [4] Stefanie Wagner, Jonathan Bloh, Cornelia Kasper, Detlef Bahnemann, Toxicological issues of nanoparticles employed in photocatalysis, review accepted in *GREEN*, 2011

Workshops

- [1] International School on Advanced Material Science and Technology "G.Occhialini", 10th Course on industrial applications of nanotechnologies, 2008, Jesi, Italy
- [2] Gene Technology, Biosafety and Biosecurity, State-approved Course, §15 GenTSV for Project Leaders and Biosafety Officers, 2008, Hannover Medical School
- [3] Workshop: 1 st ECIS Research Meeting, 2009, University of Regensburg
- [4] Arbeitskreis: Verantwortungsvoller Umgang mit Nanomaterialien, 2011, Laser-Zentrum Hannover e.V.