

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Schick

**Zytotoxische Wirkung von Titandioxidpartikeln auf primäre  
humane respiratorische Epithelzellen der Nasennebenhöhlen  
und der Concha nasalis inferior**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

vorgelegt von  
Claudia Sprau  
geb. am: 01.08.1983 in Zweibrücken

---

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1	GESCHICHTE DER NANOTECHNOLOGIE	5
2.2	NANOPARTIKEL	6
2.2.1	GRUNDLAGEN	6
2.2.2	ENTSTEHUNG UND HERSTELLUNG	8
2.2.3	ANWENDUNGSGEBIETE UND RISIKOBEWERTUNG	9
2.3	TITANDIOXIDNANOPARTIKEL	11
2.3.1	GRUNDLAGEN	11
2.3.2	ANWENDUNGSGEBIETE	12
2.3.3	TOXIZITÄT	13
2.3.3.1	Aufnahme über die Haut	14
2.3.3.2	Aufnahme über den Verdauungstrakt	15
2.3.3.3	Aufnahme über den Respirationstrakt	15
2.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>24</b>
3.1	LÖSUNGEN UND PUFFER	24
3.2	KITS, ZELLKULTURMEDIEN UND SONSTIGE CHEMIKALIEN	26
3.3	ANTIKÖRPER	27
3.3.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	27
3.3.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	27
3.4	LABORGERÄTE UND PROGRAMMSOFTWARE	28
3.5	GEWEBEPROBEN	28
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>29</b>
4.1	ZELLKULTUR	29
4.1.1	PASSAGIEREN VON ZELLEN	29
4.1.2	ZELLZAHLBESTIMMUNG	30
4.2	HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	30

---

4.3	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	32
4.3.1	ENTPARAFFINIERUNG DER SCHNITTE	32
4.3.2	HÄMATOXYLIN-EOSIN-(HE-)-FÄRBUNG	33
4.3.3	ALCIANBLAU-FÄRBUNG	33
4.3.4	MAYERS-HÄMALAUN-FÄRBUNG	34
4.4	IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	34
4.4.1	ENTPARAFFINIERUNG DER SCHNITTE	34
4.4.2	IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNG DES AUSGANGSGEWEBES	34
4.4.3	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG DER PRIMÄRZELLKULTUR	36
4.5	<i>IN VITRO</i> -ASSAYS	37
4.5.1	VORBEREITUNG DER ZELLKULTUR	37
4.5.2	VORBEREITUNG DER PARTIKEL	38
4.5.3	LDH-ASSAY	38
4.5.4	MTT-ASSAY	40
4.6	GRÖßENBESTIMMUNG DER PARTIKEL	42
4.6.1	ZETASIZER	42
4.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	43
<b>5</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>44</b>
5.1	CHARAKTERISIERUNG DES AUSGANGSGEWEBES	44
5.2	ETABLIERUNG VON PRIMÄREN EPITHELZELLKULTUREN	46
5.3	CHARAKTERISIERUNG DER TITANDIOXIDPARTIKEL	52
5.4	<i>IN VITRO</i> -ASSAYS	58
5.4.1	ETABLIERUNG DER <i>IN VITRO</i> -ASSAYS	59
5.4.1.1	Auswahl des Puffers	59
5.4.1.2	Vitalitätsbestimmung der primären Epithelzellkulturen	61
5.4.2	LDH-ASSAY	63
5.4.3	MTT-ASSAY	66
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>69</b>
6.1	PRIMÄRE EPITHELZELLKULTUR	69
6.2	TITANDIOXID-NANOPARTIKEL	71
6.3	<i>IN VITRO</i> -ASSAYS	74

---

6.3.1	MTT-ASSAY TiO <sub>2</sub> -PARTIKEL	74
6.3.2	LDH-ASSAY TiO <sub>2</sub> -PARTIKEL	77
6.3.3	MTT-/LDH-ASSAY KALIUMCHROMAT	78
6.4	FAZIT	80
6.5	AUSBLICK	81
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>82</u></b>
<b>8</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>95</u></b>
8.1	TABELLENANHANG	95
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	109
8.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110
8.4	TABELLENVERZEICHNIS	114
<b>9</b>	<b><u>PUBLIKATION/DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>117</u></b>

# 1 Zusammenfassung/Summary

Die Nanotechnologie hat sich zu einer der weltweit aussichtsreichsten Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts entwickelt. Ihr scheinbar unerschöpfliches Entwicklungspotential beruht auf den veränderten physikalischen, chemischen und biologischen Materialeigenschaften nanoskaliger Strukturen. Genau diese Eigenschaften bergen jedoch auch das Risiko einer veränderten Toxizität. Zum heutigen Zeitpunkt ist das Toxizitätspotential nanoskaliger Materialien noch nicht abschätzbar und daher Gegenstand vieler Forschungsprojekte.

Titandioxid (TiO<sub>2</sub>)-Nanopartikel werden derzeit in den unterschiedlichsten Industriezweigen hergestellt bzw. verwendet. Ein möglicher Expositionsweg stellt hierbei das Einatmen dieser Partikel dar. Während der Inhalation können die nanoskaligen Partikel auf den Epithelzellen der Nasenschleimhaut abgelagert werden. Ob und inwiefern diese Partikel einen Effekt auf die Epithelzellen der Nasenschleimhaut ausüben ist jedoch bislang vollkommen unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmals mit Hilfe von Toxizitätstests (LDH-, MTT-Assay) eine mögliche zytotoxische Wirkung von TiO<sub>2</sub>-Partikel auf primäre humane respiratorische Epithelzellen der Nasennebenhöhlen und der Concha nasalis inferior untersucht. In einem ersten Schritt wurde das verwendete Ausgangsgewebe histologisch und immunhistologisch charakterisiert. Im Anschluss wurde ein Protokoll etabliert, mit dessen Hilfe 15 primäre respiratorische Epithelzelllinien generiert und charakterisiert werden konnten.

In Kooperation mit dem Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlandes wurden anschließend die verwendeten TiO<sub>2</sub>-Partikel mit Hilfe eines Zetasizers hinsichtlich ihrer Größe und dem Auftreten von Agglomeraten vermessen. Hierbei zeigte sich, dass die durchschnittlich Größe der kommerziell bezogenen TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel nicht der Größenangabe des Herstellers von unter 75nm entsprach. Durch unterschiedliche Modifikationen (Ultraschallbehandlung, Verwendung von Krebs-Ringer(KR)-Puffer statt Zellkulturmedium und Zugabe von 1% BSA) konnte die durchschnittliche Größe der

Partikel im Peak 1 Mean, in welchem sich 95% der messbaren Partikel befanden, auf Werte zwischen 280nm (TiO<sub>2</sub> 1µM) und 550nm (TiO<sub>2</sub> 50µM) reduziert werden.

Die im Anschluss durchgeführten ersten Toxizitätsassays deuten an, dass TiO<sub>2</sub>-Partikel einen Einfluss auf humane respiratorische Epithelzellen ausüben. Im MTT-Assay wurde bei einer Partikelkonzentration von 1µM in zwei der untersuchten vier primären Nasenepithelzelllinien eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität beobachtet. Demgegenüber zeigte sich bei einer TiO<sub>2</sub>-Partikelkonzentration von 50µM in drei von vier Zelllinien ein signifikant erhöhter Zellstoffwechsel. Im LDH-Assay konnte eine signifikante Erhöhung der LDH-Ausschüttung, welche den Verlust der Membranintegrität der Zellen aufzeigt, nur für zwei von vier untersuchten primären Nasenepithelzelllinien nachgewiesen werden. Alle anderen Messergebnisse zeigten eine Zunahme der LDH-Ausschüttung, welche statistisch nicht signifikant war.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit erstmals zytotoxische Effekte als Folge einer Inkubation von TiO<sub>2</sub>-Partikel auf primäre Epithelzellen der Nase. Die uneinheitlichen Messergebnisse können damit zusammenhängen, dass zellulären Schäden abhängig von der verwendeten Partikelgröße sind. Die im Rahmen dieser Arbeit erreichte Partikelgröße lag jedoch über der eigentlichen Zielgröße, so dass für die intendierte Partikelgröße von kleiner 75nm keine Aussage erreicht werden konnte. Diese Arbeit bestätigt erneut die bekannte Problematik, dass bislang keine geeigneten, stabilen Nanopartikel für *in vitro* Toxizitätsstudien kommerziell erhältlich sind. Um eine konkrete Aussage über die Toxizität inhalierter TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel treffen zu können sind jedoch Untersuchungen mit stabilen Partikeln in exakt definierten Größen notwendig.

## **Cytotoxic effects of Titanium Dioxide Particles on Human Respiratory Epithelial Cells of the Paranasal Sinuses and the Concha Nasalis Inferior**

In the 21<sup>st</sup> century nanotechnology has developed into one of the most promising key technologies worldwide. Its seemingly inexhaustible development potential is based on the altered physical, chemical and biological properties of nanoscale structures. However it is just these properties which also include the risk of altered toxicity. At the present time the toxicity potential of nanoscale materials is not yet assessable and is the subject of many research projects.

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-nanoparticles are now being manufactured and/or used in the most diverse branches of industry. A possible path of exposure is inhalation of these particles. During inhalation nanoscale particles can be deposited on the epithelial cells of the nasal mucous membranes. Whether, and to what extent, these particles exert an effect on the epithelial cells of the nasal mucous membranes is a question which has been unanswered up to the present time.

In this study, for the first time, a possibly cytotoxic effect of TiO<sub>2</sub>-particles on primary human respiratory epithelial cells of the paranasal sinuses and the concha nasalis has been examined using toxicity tests (LDH- and MTT-assay). As a first step the tissue used was characterized histologically and immunohistologically. Then a protocol was established with the aid of which it was possible to generate and characterize 15 primary respiratory epithelial cell lines.

In cooperation with the Institute for Biopharmacy and Pharmaceutical Technology of the University of the Saarland the TiO<sub>2</sub>-particles used were then measured with a zetasizer to determine their size and the occurrence of agglomerations. It turned out that the average size of the commercially purchased TiO<sub>2</sub>-nanoparticles did not correspond to the details regarding their size - namely under 75µm - as given by the manufacturer. By means of various modifications (ultrasound treatment, use of Krebs-Ringer (KR) buffers instead of cell culture medium and the addition of 1% BSA) it was possible to reduce the average size of the particles in peak 1 mean, in which 95% of the measurable particles were to be found, down to values between 280nm (TiO<sub>2</sub> 1µM) and 550nm (TiO<sub>2</sub> 50µM). The target size of under 75nm was not achieved.

The first toxicity assays which were subsequently carried out indicate that TiO<sub>2</sub>-particles have an influence on human respiratory epithelial cells. In the MTT-assay with a particle concentration of 1µM a significant reduction of metabolic activity was observed in two of the four primary nasal epithelial cell lines. On the other hand with a TiO<sub>2</sub>-particle concentration of 50µM a significantly increased cell metabolism was seen in three out of four cell lines. In the LDH-assay it was possible to demonstrate a significant increase in LDH secretion, which indicates a loss of membrane integrity in the cells, in only two of four primary epithelial cell lines. All the other results showed an increase in LDH secretion which was not significant.

In summary: for the first time this study demonstrates cytotoxic effects as the consequence of incubation of TiO<sub>2</sub>-particles on primary nasal epithelial cells. The non-uniform measurement results could have something to do with the fact, that cellular damage is dependent on the size of the particles used. The actual size of the particles used in this study was, however, greater than the target size, so that no statement could be made about the originally intended particle size of less than 75nm. Once again this study confirms the well-known problem that, to the present day, suitable, stable nanoparticles for *in vitro* toxicity studies cannot be procured commercially. However, if definite statements are to be made about the toxicity of inhaled TiO<sub>2</sub>-nanoparticles, stable particles of an exactly defined size will be a necessary prerequisite.

## 2 Einleitung

### 2.1 Geschichte der Nanotechnologie

Erste Versionen von der Zugänglichkeit der Nano-Dimension für den Menschen entwarf der Physik-Nobelpreisträger Richard Feynman 1959. Seine Rede „There`s Plenty of Room at the Bottom“ wird von der Nanotechnologie gerne als ihre Gründungsschrift angesehen. Wörtlich übersetzt heißt der Titel: „Es gibt sehr viel Platz am unteren Ende“. Mit „unterem Ende“ bezeichnete Feynman das untere Ende der Längenskala. „Ist es möglich die 24 Bände der Encyclopedia Britannica um das 25.000fache zu verkleinern und auf einen Stecknadelkopf zu schreiben?“ Diese Frage stellte Feynman seinem Publikum und war bereits 1959 davon überzeugt, dass dies möglich sein sollte, weil kein ihm bekanntes physikalisches Gesetz dagegen sprach. Zu dieser Zeit fehlten jedoch noch die praktischen Mittel, um Feynmans Version in die Realität umzusetzen.

Erstmals geprägt wurde der Begriff „Nanotechnologie“ 1974 von dem Japaner Norio Taniguchi. Dieser beschrieb die revolutionären Anwendungsmöglichkeiten von Materialien in ultrakleinen Dimensionen von weniger als einem Milliardstel Meter ( $10^{-9}\text{m}$ ). Ein weiterer großer Schritt in Richtung moderne Nanotechnologie erfolgte im Jahre 1981 durch die Erfindung des Rastertunnelmikroskops durch Gerd Binnig und Heinrich Rohrer. Diese Erfindung machte es erstmals möglich, Atome sichtbar zu machen und gezielt zu positionieren. Als eigentliche Geburtsstunde der Nanotechnologie gilt das Jahr 1989. Donald Eigler gelang es zum ersten Mal mit Hilfe eines Rastertunnelmikroskops das Logo seines Unternehmens IBM mit 35 Atomen des Edelgases Xenon in das Halbmetall Nickel zu gravieren. Die größten Visionen und Hoffnungen der Nanotechnologie entwickelte Eric Drexler in seinen Büchern „Engines of Creation“ (1986) und „Unbounding the Future“ (1991). In diesen Werken beschrieb der Wissenschaftler seine Vorstellungen von "Nanofabriken" und "Nanomaschinen", in denen Atome sich selbst vervielfältigen und gezielt nach den Bauplänen der Programmierer wieder zusammensetzen.

Diese Ideen haben bis heute die Meinungen der Öffentlichkeit über Chancen und Risiken der Nanotechnologie entscheidend geformt. (Nanotechnologie - die Zukunft erfinden, <http://www.nmw.nrw.de>; Geschichte der Nanotechnologie, <http://www.nanoproducts.de>).

Seitdem hat sich die Nanotechnologie zu einer der weltweit aussichtsreichsten Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts weiterentwickelt und weist als breite Querschnittstechnologie in fast allen Industriesektoren Innovationspotential auf.

## 2.2 Nanopartikel

### 2.2.1 Grundlagen

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung definiert Nanotechnologie heute folgendermaßen: „Nanotechnologie bezeichnet die Herstellung, Untersuchung und Anwendung von Strukturen, molekularen Materialien, inneren Grenz- und Oberflächen mit mindestens einer kritischen Dimension oder mit Fertigungstoleranzen (typischerweise) unterhalb 100nm. Entscheidend ist dabei, dass allein aus der Nanoskaligkeit der Systemkomponenten neue Funktionalitäten und Eigenschaften zur Verbesserung bestehender oder Entwicklung neuer Produkte und Anwendungen resultieren“ (BMBF Nanotechnologie erobert die Märkte – Deutsche Zukunftsoffensive für Nanotechnologie).

Dementsprechend bezeichnet man Objekte, die in allen äußeren Dimensionen, also in der Länge, Breite oder Höhe, zwischen 1 und 100nm messen als Nanopartikel. Zur Vereinfachung der Kommunikation ist diese Definition seit August 2008 in einer DIN-Norm festgelegt (DIN SPEC 1121 (DIN ISO/TS 27687)) (BMBF-Projekt, Nano Care - Gesundheitsrelevante Aspekte synthetischer Nanomaterialien).

Beim Übergang zu nanoskaligen Strukturen kommt es zu drastischen Änderungen hinsichtlich der physikalischen, chemischen und biologischen Materialeigenschaften. Aufgrund dieser Änderungen weisen Nanopartikel in der

Regel andere Eigenschaften als das gleiche Material in größerer Form auf. Die Veränderung der Materialeigenschaften ist sowohl durch quantenmechanische Effekte nanoskaliger Strukturen, welche auf makroskopischer Ebene nicht vorhanden sind, als auch durch das große Verhältnis von Oberflächen- zu Volumenatomen zu erklären. Bei einem kugelförmigen Nanopartikel bestehend aus 8000 Atomen mit einem Partikeldurchmesser von ca. 6nm beträgt der Anteil der Oberflächenatome etwa 1600 Atome. Im Vergleich dazu beträgt der Anteil der Oberflächenatome bei einem makroskopischen Festkörper bestehend aus  $10^{23}$  Atomen nur  $10^{-7}$ . Dieser Oberflächeneffekt führt zu einer gesteigerten katalytischen Aktivität nanoskaliger Materialien (Ertl et al., 1997). So sind zum Beispiel nanoskalige Goldpartikel sehr reaktionsfreudig, wohingegen makroskopisch sichtbares Gold chemisch sehr träge ist. Des Weiteren wird durch den beschriebenen Oberflächeneffekt eine Erniedrigung des Schmelzpunktes hervorgerufen. Dies hat praktische Bedeutung für Verfahren wie das „co-firing“. In diesem Verfahren werden zum Teil temperaturempfindliche Zweitkomponenten zusammen mit hochschmelzendem Material gesintert (Bickley 1997). Zudem beeinflusst das reduzierte Partikelvolumen die elektrischen, magnetischen und optischen Eigenschaften von Nanopartikel (Shi J. et al., 1996; Junno et al, 1999). Im Gegensatz zu Materialien in größerer Form führt bei Nanopartikeln bereits die Verschiebung eines einzelnen Elektrons zu stark veränderten elektrischen Eigenschaften. Auf Grund der kleinen elektrischen Kapazität kann die Erhöhung der Elektronenzahl um ein Elektron den Zustrom weiterer Elektronen verhindern und somit zum Verschwinden der elektrischen Leitfähigkeit führen (Coulomb Blockade) (Wautelet, Nanotechnologie 2008). Die Änderung der magnetischen Eigenschaften resultiert aus der Veränderung der elektrischen Struktur nanoskaliger Partikel. Als Folge dieser Veränderung kommt es zu einem Übergang vom Ferromagnetismus zum Paramagnetismus. Die optischen Eigenschaften von Nanopartikel beruhen auf dem Quantum Confinement-Effekt. Dieser Effekt führt dazu, dass Nanoteilchen Licht absorbieren und es in einer anderen Farbe reemittieren. Durch Modifikation der Größe dieser Teilchen besteht die Möglichkeit die Farbe der Teilchen in jede gewünschte Wellenlänge zu verändern.

## 2.2.2 Entstehung und Herstellung

Als Teil des Schwebstaubs befinden sich nanoskalige Partikel in unserer Atmosphäre. Die verschiedenen, sich in der Atemluft befindlichen Partikel werden in PM (particular matter) unterteilt und mit verschiedenen Größenangaben versehen. Nach ihrer Größe lassen sich die Staubpartikel in verschiedene Größenklassen (Fraktionen) einteilen. Partikel mit einem Durchmesser größer  $10\mu\text{m}$  werden als Grobstaub bezeichnet. Feinstaub ( $\text{PM}_{10}$ ) bezeichnet die Masse aller im Gesamtstaub enthaltenen Partikel, deren aerodynamischer Durchmesser kleiner als  $10\mu\text{m}$  ist. Eine weitere Fraktion der lufttragenden Partikel bildet der Ultrafeinstaub mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als  $0,1\mu\text{m}$ . Dieser Fraktion werden sowohl ultrafeine Partikel, als auch Nanopartikel zugeordnet. Dennoch gibt es wesentliche Unterschiede zwischen ultrafeinen Partikeln und industriell synthetisierten Nanopartikeln. Ultrafeine Partikel sind unabsichtlich erzeugte, chemisch heterogene Stoffgemische, deren faktische Zusammensetzung je nach Entstehung und Umgebungsbedingung variiert. Ultrafeine Partikel kommen auch in der Natur vor, so entstehen z.B. bei Verwitterungsprozessen tonnenweise nanoskalige Partikel. Diese Verwitterungsprodukte im Nanometermaßstab neigen jedoch dazu, sich zu größeren Teilchen zusammen zu finden. Unbeabsichtigt produzierte nanoskalige Partikel entstehen als Abfall- bzw. Nebenprodukte bei z.B. Verbrennungsprozessen (Evelyn et al., 2003), mechanischen Verschleißvorgängen oder konventionellen industriellen Prozessen.

In Gegensatz zu den ultrafeinen Partikeln liegen beabsichtigt und kontrolliert hergestellte Nanoobjekte zumeist als Reinsubstanz mit einer definierten Größe vor und kommen normalerweise nicht in der Natur vor. Diese Partikel sind meist durch spezielle Überzüge vor einem Zusammenlagern geschützt.

Die industrielle Herstellung von Nanopartikeln kann theoretisch aus jedem Material und allen chemischen Elementen erfolgen. Für die industrielle Herstellung von Nanopartikeln werden prinzipiell zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen gibt es die Möglichkeit des Aufbaus von nanoskaligen Strukturen mittels chemischer Prozesse („Bottom-up-Methode“). Diese Herstellungsverfahren bauen gezielt molekulare bzw. atomare Strukturen auf. Dadurch wird es möglich, sowohl die Partikelgröße und -form als auch die Partikelgrößenverteilung zu kontrollieren.

Zum anderen kann das Ursprungsmaterial durch mechanische Mahlprozesse zerkleinert werden („Top-down-Methode“). Im Vergleich zu den Bottom-up-Methoden ist jedoch die gezielte Kontrolle der Partikelgröße und -form bei der Top-down-Methode nicht möglich (Institut für Technikfolgen - Abschätzung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften. Herstellungsverfahren von Nanopartikeln und Nanomaterialien).

### 2.2.3 Anwendungsgebiete und Risikobewertung

Das Spektrum der Nanotechnologie-Anwendung reicht derzeit von Hightechbereichen wie der Elektronik, der Optik, den Life Sciences bis hin zu klassischen Branchen wie dem Maschinenbau, dem Textil- oder Bauwesen. Auch aus Alltagsprodukten wie Kosmetika, Lebens- oder Haushaltsmitteln sind Nanomaterialien nicht mehr wegzudenken. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist die Medizin. Der Einsatz von Nanotechnologien ermöglicht dort die Neuentwicklung von Medikamenten, Diagnoseverfahren und medizintechnischen Instrumenten.

Das Potential der Nanotechnologie scheint zum jetzigen Zeitpunkt nahezu unerschöpflich. Allerdings müssen neben den genannten Vorteilen und dem Fortschritt der Technik auch die möglichen Gefahren der Nanotechnologie berücksichtigt werden. Es ist zu erwarten, dass die Bedeutung der Nanotechnologie in den kommenden Jahren weiter zunimmt und sich infolgedessen auch die Nanopartikel-Exposition von Arbeitnehmern, Verbrauchern und der Umwelt erhöht. Bislang sind jedoch nur wenige gesicherte Untersuchungsergebnisse bezüglich des Gefahrenpotentials und einer möglichen Toxizität von Nanopartikeln veröffentlicht. (BMBF Nano.DE-Report 2009 - Status Quo der Nanotechnologie in Deutschland). Im Gegensatz dazu ist das toxikologische Potential von Feinstäuben, insbesondere von ultrafeinen Partikeln, hinreichend bekannt (Becker et al., 1996; Mossman and Churg, 1998; Churg and Brauer 2000; Peters A. et al., 2001; Van Eeden et al., 2001; Borm PJ., 2002; Nemmar et al., 2002; Oberdörster G. and Utell, 2002; Suwa et al., 2002; Donaldson and Stone, 2003; Riediker et al., 2004) und könnte Hinweise auf eine ähnliche Toxizität der industriell hergestellten Nanopartikel liefern.

Ein Vergleich zwischen der Toxizität von ultrafeinen Partikeln und Nanopartikeln ist auf Grund der veränderten Materialeigenschaften nanoskaliger Partikel jedoch nur eingeschränkt möglich. Auf Grund des großen Anwendungsspektrums von Nanopartikeln ergibt sich eine Vielzahl von Expositionswegen, was eine genaue Charakterisierung ihres Verhaltens in der Umwelt und im Organismus erschwert (Oberdörster G. and Utell, 2002; Krug und Diabeté, 2003).

Die Wirkung von Nanopartikeln auf Zellen und lebende Organismen ist bislang weitgehend unerforscht. Es ist jedoch bekannt, dass Nanopartikel auf unterschiedliche Weise in die Zellen aufgenommen werden können (Kobzik, 1995; Geiser et al., 2005; Peters A. et al., 2006). Eine Schlüsselrolle bei der Abwehr und Vernichtung körperfremder Pathogene kommt den zu dem zellulären Abwehrsystem gehörenden Makrophagen zu. Die Makrophagen nehmen die Pathogene in den Phagosomen auf, anschließend fusionieren diese mit den Lysosomen und werden unter Freisetzung von Radikalen und Enzymen verdaut (Park JB., 2003). Dies gilt jedoch nur eingeschränkt für Nanopartikel. Eine Metabolisierung organischer Nanoobjekte konnte nachgewiesen werden (Sayes et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigten jedoch andere Studien, dass von Makrophagen aufgenommene anorganische Nanopartikel nicht verdaut werden konnten und bis zu 700 Tagen in den Zellen verblieben (Oberdörster G. et al., 2005). Die Auswirkungen der nicht abgebauten Nanoobjekte auf die Physiologie der Makrophagen ist bislang jedoch weitgehend unklar. Hingegen ist bekannt, dass Makrophagen Partikel effektiver phagozytieren können, wenn diese etwa gleich groß sind wie die Makrophagen selbst. Studien zeigen, dass Partikel mit einer mittleren Größe von 100-200nm von den Makrophagen weniger phagozytiert werden als größere Partikel. Sie treten in den interstitiellen Raum ein und erreichen Epithelzellen bzw. das Lymph- und Blutsystem (Takenaka et al., 2001), wodurch eine systemische Wirkung auf den menschlichen Organismus besteht. Die Eliminierung systemisch aufgenommener Nanopartikel kann über die Nieren erfolgen. Dies konnte für nanoskalige Polyamidoamine gezeigt werden (Nigavekar et al., 2004).

Dringen Nanopartikel in nicht-phagozytierende Zellen ein, können die Partikel mit dem Zytoplasma und den darin befindlichen Proteinen interagieren und zu Zellschäden führen. Experimentell wurden Nanopartikel intrazellulär im Zytoplasma, in den Mitochondrien und innerhalb des Zellkernes nachgewiesen (Li et al., 2003; Garcia-Garcia et al., 2005). Auf Grund der unterschiedlichen Lokalisation der Partikel innerhalb der Zellen, werden unterschiedliche zelluläre Effekte ausgelöst, es konnten sowohl genotoxische Effekte, die Bildung freier Radikale, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, als auch die Produktion von Zytokinen gezeigt werden (Brown et al., 2004; Risom et al., 2007; Kang JL. et al., 2008).

Abschließend muss festgehalten werden, dass die Studienlage bezüglich der Wirkung von Nanopartikel auf Zellen und lebende Organismen zum jetzigen Zeitpunkt unvollständig ist. Eine stetig wachsende Anzahl von Studien belegen die schädigende Wirkung von Nanopartikel im Tierversuch und *in vitro*. Allerdings ist eine Übertragung der Studienergebnisse auf Grund sehr hoher Expositions Dosen im Versuch nicht uneingeschränkt auf die alltägliche Nanopartikelexposition des Menschen möglich. Weitere Forschungsarbeiten sind zum Verständnis der Auswirkungen von Nanopartikeln auf den Menschen notwendig.

## 2.3 Titandioxidnanopartikel

### 2.3.1 Grundlagen

Titan(IV)-Oxid ist ein weißer geruchloser Feststoff, welcher weder brennbar noch wasserlöslich ist. In der Natur liegt Titandioxid in 3 Kristallstrukturen (Rutil, Anatas und Brookit) vor. Die Unterschiede der verschiedenen Kristallstrukturen beruhen auf verschiedenen räumlichen Verknüpfungen der Oktaeder. Sowohl die tetragonale holoedrische Form Anatas, als auch das orthorhombische Mineral Brookit wandeln sich allmählich irreversibel in Rutil um. Das tetragonale Kristall Rutil stellt die stabilste Form des Titanoxids dar. Der Schmelzpunkt liegt bei 1855°C, der Siedepunkt bei 2900°C und der Brechungsindex bei 2,55 (Anatas) bzw. 2,75 (Rutil). Für die industrielle Herstellung von Titandioxidnanopartikel werden prinzipiell zwei verschiedene chemische Verfahren genutzt. Zum einen werden Titan-Alkoxyolate des

Ethanol zu Titanoxidhydratgelen hydrolysiert und diese im Anschluss getempert. Je nach Temperatur kann man mittels dieser Technik Antanas-Rutil-Gemische oder reines Rutil gewinnen. Zum anderen wird Titantetrachlorid mit Wasserdampf zu nanoskaligem Titandioxid umgesetzt. Diese Technik ermöglicht die industrielle Herstellung von reinem Rutil (Stoffgeschichte Titandioxid, <http://www.riskcart1.wzu.uni-augsburg.de>).

### 2.3.2 Anwendungsgebiete

Nanoskaliges Titandioxid reflektiert sichtbares Licht und absorbiert UV-Strahlung, und findet somit Verwendung in Sonnenschutzmitteln. Die hohe Deckkraft ermöglicht den Einsatz in kosmetischen Pudern und dekorativen Kosmetikprodukten. Auf Grund der UV-Beständigkeit, Hitzebeständigkeit und der Beständigkeit gegenüber mechanischer Belastung sowie der antibakteriellen Wirkung steigt die Nachfrage nach nanoskaligen Titandioxidpigmenten insbesondere in der Verpackungsindustrie.

In der Lebensmittelindustrie werden nanoskalige  $\text{TiO}_2$ -Partikel als Farbstoff bei Zuckerguss, Bonbons und Kaugummi verwendet. Des Weiteren finden  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel Anwendung in Verpackungsmaterialien für Lebensmittel. Die speziellen Eigenschaften führen zu einem verminderten Feuchtigkeitsverlust, einer Sauerstoffeintrittsminderung und einem UV-Schutz der verpackten Lebensmittel.

Die photokatalytischen Eigenschaften von  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikeln werden in Verbindung mit der UV-Aktivität sowohl für „selbstreinigende“ Oberflächen (Enrhes, 2009) als auch zur Reinigung von Brauchwasser (Likodimos et al., 2010) genutzt. Auf Grund der Eigenschaft der Oberflächenversiegelung finden nanoskalige  $\text{TiO}_2$ -Partikel Anwendung in Glas- und Keramikreinigern. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet findet sich in der Farb- und Lackindustrie: So werden  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel auf Grund ihrer UV- und korrosionsschützenden Eigenschaften sowie ihrer Kratzfestigkeit in Holzfarben und (Auto)lacken verwendet.

Des Weiteren ist eine bakterizide Wirksamkeit nanoskaliger  $\text{TiO}_2$ -Partikel nachgewiesen (Tuchina und Tuchin, 2010). Diesen Effekt macht sich die

Textilindustrie zu nutzen, indem sie Textilien imprägniert, um somit die Keimbelastung zu minimieren (Parthasarathi et al., 2009).

### 2.3.3 Toxizität

Die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) der WHO stuft TiO<sub>2</sub>-Partikel für den Menschen als möglicherweise karzinogen bei inhalativer Exposition ein (Kategorie II B). Diese Einstufung erfolgte anhand deutlicher Hinweise auf ein karzinogenes Potential im Tierversuch bei jedoch unzureichender epidemiologischer Datenlage (Baan, 2007). Allerdings unterscheidet die IARC-Einstufung nicht zwischen TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln und feinen Partikeln.

In Deutschland erfolgt die Risikoeinschätzung für Nanopartikel durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und das Umweltbundesamt (UBA). Laut BfR und UBA liegen verschiedene Studien bei Versuchstieren vor, welche auf eine möglicherweise krebsauslösende Wirkung von nanoskaligem Titandioxid bei inhalativer Aufnahme hinweisen. Die derzeitige Datenlage ist jedoch nicht ausreichend um diese Materialien mit hinreichender Sicherheit als „potenziell krebserzeugend für den Menschen“ einzustufen. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass die Verabreichung hoher Dosen granulärer, nanoskalierter, biobeständiger Stäube, die als „Bulk“-Material inert eingestuft werden, mit einer erhöhten Tumorzinzidenz verbunden war (Pott und Roller 2003). Bislang ist jedoch unklar, ob es sich um einen primär genotoxischen Effekt der Nanopartikel oder um sekundäre Folgen einer chronischen Entzündung mit Freisetzung freier Radikale handelt. Insbesondere bestehen Zweifel darin, inwieweit sich die im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen, ob es sich um nanospezifische Effekte handelt, oder ob weitere stoffspezifische Eigenschaften wirksam sind („Beurteilung eines möglichen Krebsrisikos von Nanomaterialien und von aus Produkten freigesetzten Nanopartikeln 2010“). In den wenigen *in vivo* Studien konnte bislang kein Zusammenhang zwischen berufsbezogener TiO<sub>2</sub>-Exposition und neoplastischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Garabrant et al., 1987; Fryzek et al., 2003; Boffetta et al., 2004). Allerdings waren diesen Studien laut dem „*National Institute of Occupational Safety and Health*“ sowohl nach epidemiologischen als auch nach

methodischen Gesichtspunkten limitiert (National Institute of Occupational Safety and Health, 2005).

Die Aufnahme von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel aus der Umwelt in den menschlichen Körper kann über verschiedene Wege erfolgen, resorptiv über die Haut und über den Verdauungstrakt, sowie resorptiv und inhalativ über die Atemwege.

### 2.3.3.1 Aufnahme über die Haut

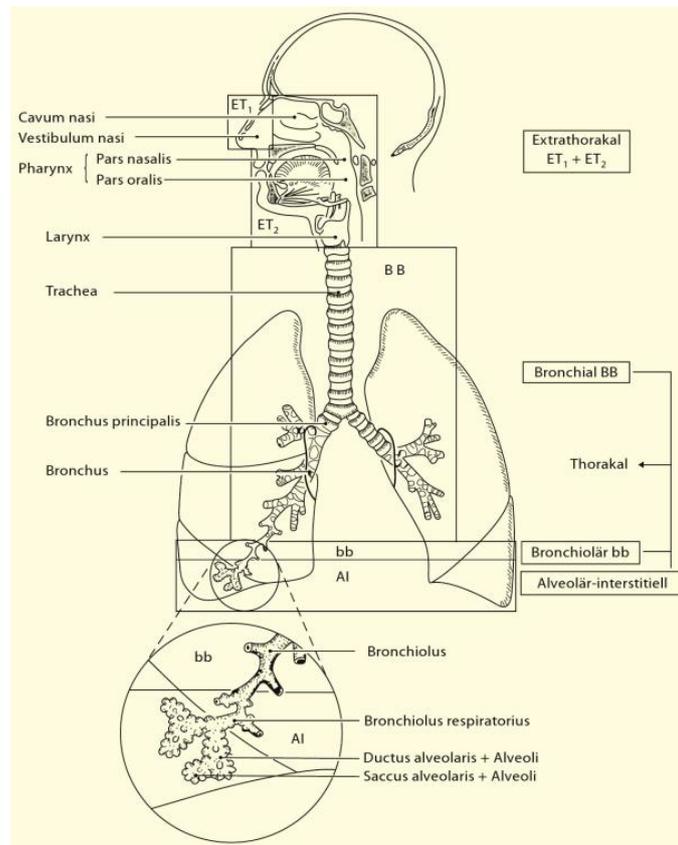
Ein wesentlicher Expositionsweg nanoskaliger Produkte kann die topische Aufnahme über die Haut bedeuten. Der aktuelle Stand der Forschung zeigt jedoch im Hinblick auf eine mögliche Toxizität von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln nach topischer Applikation unterschiedliche Ergebnisse. Zum einen konnten Partikel nach dem Auftragen auf humane Hautbiopsien lediglich auf der Oberfläche des Stratum corneum nachgewiesen werden (Pflücker et al., 2001; Butz, Nanoderm Final Report, 2007). In seltenen Fällen zeigte sich eine geringgradige Permeation in die Epidermis (Mavon et al., 2007). Andere Forschungsergebnisse belegen, dass die topische Applikation von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln auf die Haut von Schweinsohren *in vivo* zu einer Penetration des Stratum corneum führte. Auch konnte in Tierversuchen an Mäusen nach einer 60-tägigen Exposition mit TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln neben Hautveränderungen auch fokale Lebernekrosen und geringgradige Entzündungsinfiltrationen in Herz, Milz und Lunge nachgewiesen werden. Des Weiteren dokumentieren Studien ein zytotoxisches und genotoxisches Potential von TiO<sub>2</sub> Nanopartikeln auf epidermale Zellen (Shukla et al., 2011). Beim Menschen wird eine mögliche Toxizität nach topischer Applikation als geringgradig eingeschätzt, da das intakte Stratum corneum eine Schutzbarriere zur Umwelt darstellt (Kiss et al., 2008; Enrhes, 2009). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass erkrankte oder verletzte Haut ihre Barrierefunktion nicht mehr gewährleisten kann und somit das Eindringen von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln möglich ist (Butz, Nanoderm Final Report, 2007; Kiss et al., 2008).

### 2.3.3.2 Aufnahme über den Verdauungstrakt

Ein weiterer wichtiger Expositionsweg nanoskaliger Partikel kann die orale Aufnahme und die damit möglicherweise verbundene Resorption über den Magen-Darm-Trakt darstellen. Dieser ist mit seiner Resorptionsfläche von ca.  $200\text{m}^2$  für die Aufnahme auch von Nanopartikeln zu beachten. Studien schätzen, dass der Mensch täglich zwischen  $10^{12}$  und  $10^{14}$  Nano- und Mikropartikel oral aufnimmt (Lomer et al., 2002), wobei es sich größtenteils um Silikate und Titandioxid handelt. In Tierversuchen konnte zum einen nachgewiesen werden, dass oral aufgenommene  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel zumeist nicht absorbiert werden, sondern mit der Fäzes ausgeschieden werden (Nordberg, Handbook on the Toxicology of Metals; 2007). Im Gegensatz dazu konnten bei Mäusen oral verabreichte Nanopartikel in Leber-, Milz-, Niere und Lungengewebe nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten sich durch Nanopartikel induzierte Veränderungen der Leberparameter im Blut sowie hepatozelluläre Nekrosen nach hochdosierter oraler Applikation (Wang J. et al., 2007). Weitere Studien zeigten, dass die intraperitoneale Injektion von hochdosierten Titandioxidpartikeln bei Mäusen neben dem Nachweis der Partikel in Herz, Niere, Lunge, Milz und Leber auch zu einer Erhöhung der Leberparameter, Leberfibrose, glomerulären Nierenschäden und interstitielle Pneumonien führte (Chen et al., 2009; Liu H. et al., 2009).

### 2.3.3.3 Aufnahme über den Respirationstrakt

Als respiratorisches System oder Atmungsapparat wird das gesamte System der für die Atmung zuständigen Organe bezeichnet. Eine Einteilung der Atemwege erfolgt zum einen nach topographischen Gesichtspunkten in die oberen und unteren Atemwege. Zu den oberen Atemwegen gehören sowohl die Nasenhöhlen (Cavum nasi) als auch der Rachen (Pharynx) und der Kehlkopf (Larynx). Zu den unteren Atemwegen werden die Luftröhre (Trachea), die Bronchien, die Bronchioli und die Lunge gezählt. Eine weitere Einteilung des Atmungsapparates lässt sich nach funktionellen Gesichtspunkten treffen. Man unterscheidet zwischen luftleitenden Abschnitten (Cavum nasi, Trachea, Bronchien, Bronchiolen) und den gasaustauschenden, respiratorischen Abschnitten (Bronchioli respiratorii, Alveolen).

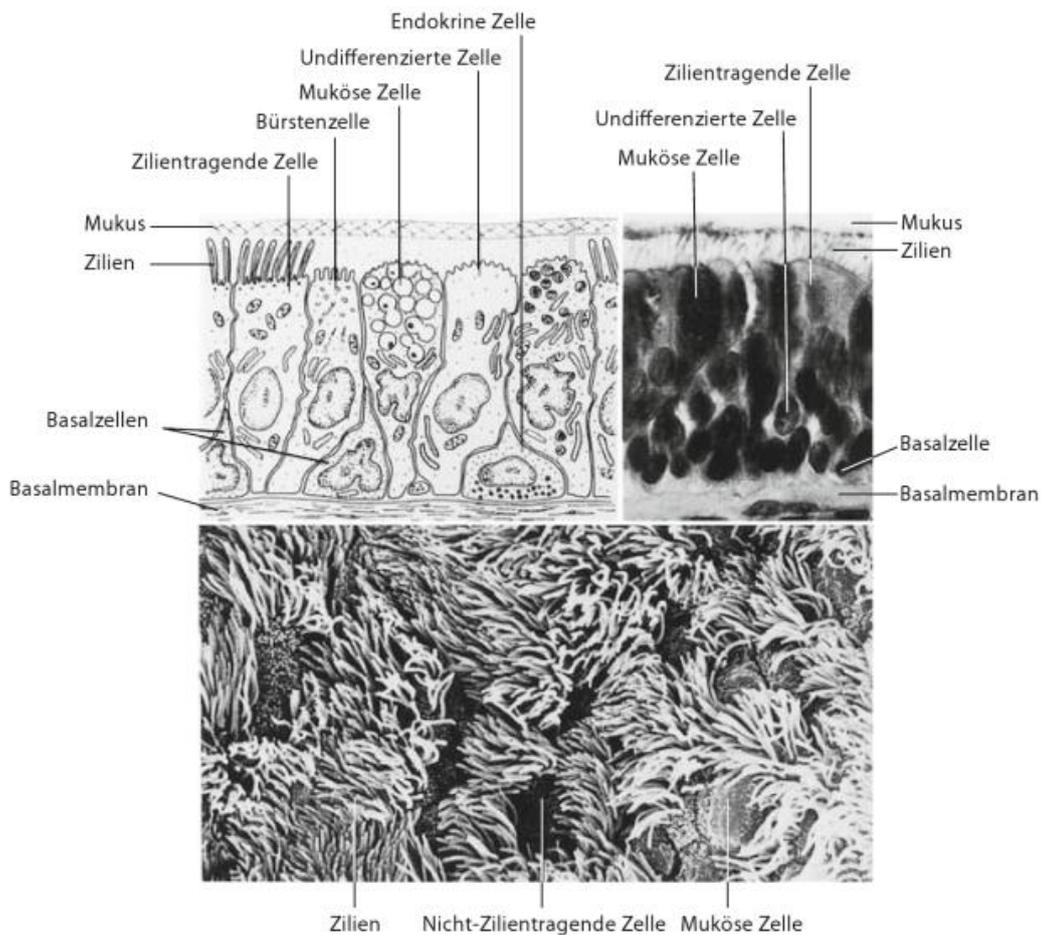


**Abbildung 2.1 Modell des Respirationstrakts (ET: extrathorakale Region; BB: bronchiale Region; bb: bronchiolare Region; Al: alveolär-interstitielle Region). (Quelle: Matthys, Seeger, Klinische Pneumologie, Springer Verlag, 4. Auflage)**

Die luftleitenden Abschnitte des Atmungsapparates dienen sowohl der Kontrolle als auch der Anfeuchtung und Reinigung der Atemluft. Mikroskopisch sind diese mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. Charakteristisch für das respiratorische Epithel ist ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel, welches mit Kinozilien-tragenden Zellen und Becherzellen ausgestattet ist. Die Kinozilien-tragenden Zellen machen den Hauptteil der Zellen des Flimmerepithels aus. Kinozilien sind bewegliche Ausstülpungen der Zellmembran, die durch das Vorhandensein von Mikrotubuli beweglich sind. Sie befördern durch ihr koordiniertes ruderartiges Schlagen Schleim, Flüssigkeiten und unerwünschte Substanzen aus der Lunge heraus. Die Aufgabe der Becherzellen ist die Produktion des Bronchialschleims. Dieser größtenteils aus Glykoproteinen bestehende Schleim bedeckt das Epithel und befeuchtet die vorüberstreichende Atemluft. Durch diese Schleimschicht wird ein direkter Kontakt zwischen eingeatmeten Partikeln und der

Zelloberfläche vermieden und mit Hilfe der Kinozilien ein ständiger Transport aus der Lunge heraus bewerkstelligt (mikroziliäre Clearance). Neben diesen beiden Zellarten verfügt das respiratorische Epithel auch über Basalzellen und Bürstenzellen mit Mikrovilli. Basalzellen sind Vorläuferzellen für Flimmer- und Becherzellen. Sie dienen auch der Befestigung des Epithels an der Basalmembran. Die Bürstenzellen sind in der Lage, Bitterstoffe auf der Schleimhautoberfläche wahrzunehmen und daraufhin den Botenstoff Acetylcholin auszuschütten. Dieser Botenstoff stimuliert Nervenfasern, die zum Gehirn führen. Infolgedessen kommt es zu einer Verlangsamung der Atmung. Dieser Vermeidungsreflex verhindert das Eindringen von potentiell schädigenden Stoffen in tiefer gelegene Abschnitte des Atmungstraktes und stellt somit eine weitere Schutzfunktion dar. Im Bereich der Bronchien enthält das Epithel zusätzlich neuroendokrine Zellen, welche zur Synthese und Abgabe von Hormonen bzw. endokrin wirksamen Stoffen befähigt sind. Des Weiteren enthält das Epithel Sinneszellen, die bei einer Reizung den Husten- oder Niesreflex auslösen. Die Dicke des Flimmerepithels nimmt entlang des Bronchialbaums in Richtung der Alveolen kontinuierlich ab. So weisen die kurz vor den Alveolen liegenden Bronchioli terminales nur noch ein einschichtiges kubisches Flimmerepithel mit eingestreuten Clara-Zellen auf. Das Sekret der Clara-Zellen hat eine schützende Funktion gegenüber oxidativem Stress und Entzündungen.

Für den Gasaustausch der Lunge sind neben den Bronchioli respiratorii vor allem die Alveolen zuständig. Beim Menschen beträgt deren respiratorische Oberfläche ca.  $100 - 120\text{m}^2$ . Ausgekleidet werden die Alveolen von Alveolarepithel, das sich in 2 Zelltypen unterteilen lässt. Alveolarepithelzellen Typ 1 (Pneumozyten Typ 1) sind flache, eine kontinuierliche Schicht bildende Alveolarepithelzellen, welche an der Bildung der Blut-Luft-Schranke beteiligt sind. Die Blut-Luft-Schranke ist für den Gasaustausch zwischen Blut- und Luftraum entscheidend. Sie ermöglicht die rasche Aufnahme von Sauerstoff in das Blut und die Abgabe von Kohlenstoffdioxid in die Atemwege. Alveolarzellen Typ 2 (Pneumozyten Typ 2) sind kubische Zellen, die für die Produktion von Surfactant verantwortlich sind. Dieser Phospholipidfilm trägt wesentlich zur Herabsetzung der Oberflächenspannung der Lungenalveolen bei.



**Abbildung 2.2 Schematische Abbildung des respiratorischen Epithels von Nasenhöhle, Trachea und Bronchien (Quelle: verändert nach: Matthys, Seeger, Klinische Pneumologie, Springer Verlag, 4. Auflage)**

Die gasaustauschenden, respiratorischen Abschnitte des Atmungsapparates verfügen, wie auch die luftleitenden Abschnitte, über Abwehrmechanismen gegenüber mit der Atemluft aufgenommenen, pathogenen Keimen. Die Lunge hat sowohl zelluläre als auch humorale Abwehrmechanismen. Zu den zellulären Abwehrmechanismen zählen z.B. Alveolarmakrophagen. Gelangen Staubpartikel bis in die Alveolen, werden diese von den Alveolarmakrophagen aufgenommen und gespeichert. Im Anschluss daran wandern die „Staubzellen“ in das Bronchialsystem und werden ausgehustet. Des Weiteren gehören mikrobizid wirkende neutrophile Granulozyten sowie für die Bildung des bronchusassoziierten Lymphsystems verantwortliche pulmonale Lymphozyten zu den zellulären Abwehrmechanismen der

Lunge. Die humeralen Abwehrmechanismen bestehen u.a. aus den bakterizid wirkenden Lactoferrin sowie Proteasen und Immunglobulinen, überwiegend IgA. Des Weiteren spielen Komplementfaktoren bei der Opsonierung von Mikroorganismen und der Aktivierung der inflammatorischen Zellen, z.B. Phagozyten oder Lymphozyten, eine bedeutende Rolle. (Basislehrbuch Innere Medizin; Schiebler Anatomie; Krasteva et al., 2011)

Mögliche Folgen einer Inhalation von Nanopartikel sind bislang weitgehend unbekannt. Borm und Mitarbeiter (2006) konnten nachweisen, dass die inhalierten Nanopartikel in den extrathorakalen Atemwegen sowie den Bronchien und Alveolen abgelagert werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl die Art der Atmung (Mund- bzw. Nasenatmung) als auch die Partikelgröße den Ort der Ablagerung der Nanopartikel beeinflusst (Abbildung 2.3).

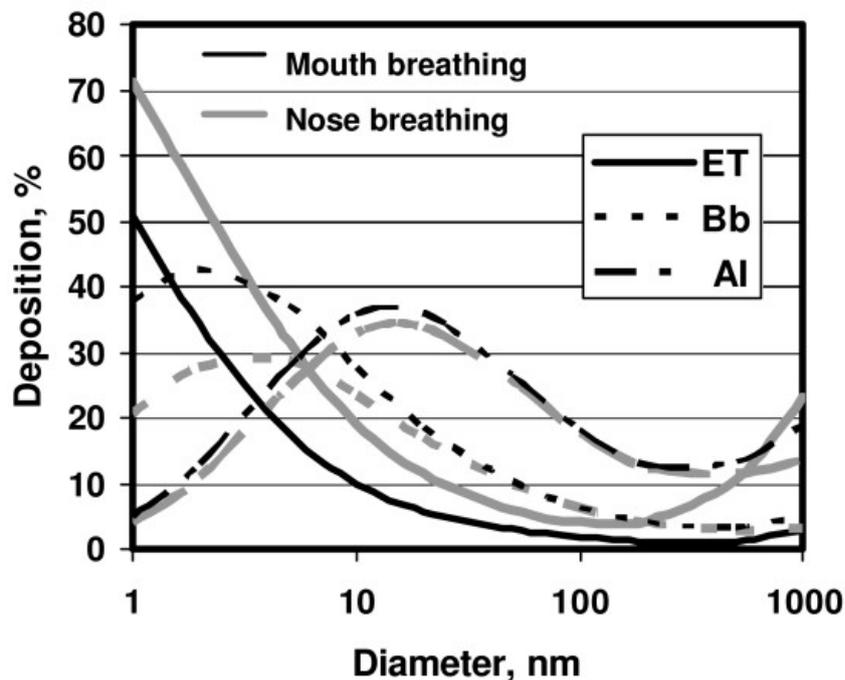


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der unterschiedlichen regionalen Verteilung von inhalierten Nanopartikeln (Durchmesser zwischen 1nm und 1000nm) in den extrathorakalen Atemwege (ET), den Bronchien (Bb) und den Alveolen (Al) bei Nasen- bzw. Mundatmung. (Quelle: Borm et al., 2006)

Die Auswirkungen einer Inhalation von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel sind bislang weitgehend ungeklärt und Gegenstand aktueller Forschungen. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass durch nanoskalige Kohlenstoff-, Polystyrol-, Eisen-, Titan- und Iridiumpartikel Entzündungsreaktionen in den Bronchien und Alveolen ausgelöst werden können (Elder et al., 2000; Semmler et al., 2004). Neben der Größe der Oberfläche sind auch die Oberflächeneigenschaften ausschlaggebend für die Toxizität (Poland et al., 2008). Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass direkt in der Lunge verabreichtes Titandioxid mit einer Größe von 20nm mehr Entzündungsreaktion verursacht als 250nm große Partikel des gleichen Materials (Oberdörster G. et al., 2005). Tierversuche zeigen, dass die Inhalation von TiO<sub>2</sub>-Partikel in hohen Dosen zu einer Erhöhung des Lungengewichtes und einer Verminderung der Partikel-Clearance führen (Creutzenberg et al., 1990). Des Weiteren ist bekannt, dass die Inhalation nanoskaliger TiO<sub>2</sub>-Partikel eine Zunahme der Makrophagenanzahl und dosisabhängig auch eine Zunahme der Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bedingt (Oberdörster G. et al., 1995; Bermudez et al., 2004). Andere Tiermodellstudien zeigten, dass inhalative TiO<sub>2</sub>-Exposition zu chronisch entzündlichen Veränderung des Lungengewebes führen können. Als Folge einer Hochdosis-Exposition konnten sowohl Riesenzellgranulome, interstitielle Fibrosen als auch eine Bronchiolisierung des Alveolarepithels nachgewiesen werden (Oberdörster et al., 1995; Bermudez et al., 2004). Des Weiteren sind Studien veröffentlicht, welche bei einer Langzeitexposition hoher inhalativer TiO<sub>2</sub>-Dosen die Entstehung von Adenomen, Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen aufzeigen (Lee et al., 1985; Heinrich et al., 1995). Die Tumorentstehung als Folge einer TiO<sub>2</sub>-Exposition konnte bislang allerdings nur an Rattentiermodellen nachgewiesen werden, so dass diese wegen des bei Ratten erhöhten proinflammatorischen Lungenmilieus als speziesspezifisch diskutiert wurde (Oberdörster G., 1996; Borm PYA. et al., 2000). Weitere Studien konnten nachweisen, dass die Exposition mit nanoskaligen TiO<sub>2</sub>-Partikeln zu einer Verminderung der Lebensdauer von Makrophagen und Lymphozyten führt (Kim et al., 1999; Kang SJ. et al., 2008).

Eine genotoxische Wirkung von nanoskaligem TiO<sub>2</sub>-Material wird kontrovers diskutiert. Einzelne Forschungsarbeiten belegen, dass es zu einer direkten Anlagerung von Nanopartikeln an die DNA kommt und eine genotoxische Schädigung ausgelöst wird (Wang JJ. et al., 2007; Kang SJ. et al., 2008;

Karlsson et al., 2009). Andere Studien haben jedoch ein gegenteiliges Ergebnis gezeigt (Theogaraj et al., 2007; Wahrheit et al., 2007).

Eine mögliche Aufnahme von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln über den N. olfactorius in das Gehirn bei nasaler Exposition ist ebenfalls Bestandteil aktueller Studien. Da sich in der Nasenhöhle neben dem respiratorischen Epithel auch das olfaktorische Epithel befindet, ist es möglich, dass es während der Atmung zur Aufnahme von Nanopartikel über N. olfactorius in das Gehirn kommen kann. Die Regio olfactoria besteht aus einer Fläche von 4-6cm<sup>2</sup>. Sie ist im mittleren Teil der oberen Nasenmuschel und den gegenüberliegenden Abschnitten des Septum nasi lokalisiert. Mikroskopisch lassen sich primäre Sinneszellen, Stützzellen und undifferenzierte Basal- oder Ersatzzellen unterscheiden. Jede Sinneszelle besitzt ein Axon, welches durch die Lamina cribrosa hindurch zieht und über den Bulbus olfactorius das Riechzentrum erreicht. Die Axone aller Sinneszellen bilden zusammen den N. olfactorius. (Schiebler Anatomie) Es ist bekannt, dass nanoskalige Partikel via Nervenfasern inkorporiert werden können. In Tierversuchen konnte bereits eine Ablagerung im Hippokampus von nasal appliziertem Titanoxid nachgewiesen werden (Wang J. et al., 2008). Die Folgen dieser Inkorporation via Nervenzellen sind bislang unbekannt. Eine Assoziation zwischen nasaler TiO<sub>2</sub>-Nanopartikelexposition und degenerativen Erkrankungen des Gehirns ist bislang nicht bewiesen.

Studien bezüglich des Einflusses von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel an primären respiratorischen Epithelzellen liegen bislang nicht vor. Zahlreiche Studien beziehen sich auf den Einfluss von Titandioxidnanopartikel auf die Epithelzellen von permanenten Zelllinien. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Effekte von nanoskaligen Partikeln auf permanente Zelllinien nicht mit der Reaktion primärer Epithelzellen vergleichbar sind (Zhang et al., 2011). Park und Mitarbeiter (2008) konnten nachweisen, dass die Exposition nanoskaliger Titandioxidpartikel in kultivierten bronchialen (BEAS 2B) Zellen eine Erhöhung der Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Apoptoserate bewirken (Park EJ. et al., 2008). Allerdings konnte an anderen permanenten respiratorischen Epithelzelllinien (A 549) gegenteilige Ergebnisse gezeigt werden (Karlsson et al., 2009). Reaktive Sauerstoffspezies bezeichnen die für den Organismus schädlichen Formen des Sauerstoffes, hierzu zählen sowohl freie Radikale (z.B. Hyperoxid-Anion,

Hydroxyl-Radikal), als auch stabile molekulare Oxidantien (z.B. Wasserstoffperoxid). Charakteristisch für diese freien Radikale ist das Vorhandensein eines ungepaarten oder mehrerer unpaarer Elektronen. Infolgedessen kommt es zu einer Erhöhung der chemischen Reaktivität. Eine Anhäufung von ROS kann u.a. durch Partikel induziert werden. Hierdurch wird das Gleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und ihrer Elimination gestört und es entsteht oxidativer Stress. Angenommen wird, dass oxidativer Stress zu einem Zusammenbruch der Lipide der Zellmembran, einem Ungleichgewicht der intrazellulären Calciumhomöostase und letztendlich zur Apoptose führt (Clutton, 1997; Hiura et al., 1999; Ho et al., 2002; Knaapen et al., 2004). Darüber hinaus reagieren die Zellen auf den Überschuss an freien Radikalen mit der Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren. Dies führt zu einer erneuten Entzündung und somit zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses. Es wurden jedoch auch nachgewiesen, dass ein Vergleich zwischen den Effekten nanoskaliger TiO<sub>2</sub>-Partikel an unterschiedlichen permanenten Zelllinien nicht uneingeschränkt möglich ist (Ekstrand-Hammarström et al., 2011).

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Nanoskaliges Titandioxid wird derzeit in den unterschiedlichsten Industriezweigen hergestellt bzw. verwendet (u.a. Farb- und Lackindustrie, Textilindustrie). Es ist zu erwarten, dass die Bedeutung der Nanotechnologie in den kommenden Jahren weiter zunehmen wird und infolgedessen sowohl eine Erhöhung der Partikelbelastung der Atemluft als auch eine vermehrte Exposition von Arbeitern und Verbrauchern zu erwarten ist. Bislang sind jedoch nur wenige gesicherte Untersuchungsergebnisse bezüglich des Gefahrenpotentials inhalierter Nanopartikel bekannt.

Es liegen zahlreiche Toxizitätsstudien vor, welche sich auf den Einfluss von Titandioxidnanopartikel auf die Epithelzellen von permanenten respiratorischen Zelllinien beziehen. Im Gegensatz dazu sind bislang keine Studien bezüglich des Einflusses von  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel an primären respiratorischen Epithelzellen veröffentlicht. *In vitro* Expositionsstudien an primären nasalen Epithelzellen wurden bislang nur mit ultrafeinen Dieselmotoremissionsgemischen (Diaz Sanchez et al., 2000; Auger et al., 2006), jedoch nicht mit reinen Nanopartikeln durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe von *in vitro* Zellsystemen eine mögliche zytotoxische Wirkung der  $\text{TiO}_2$ -Partikel auf primäre Epithelzellen der Nase untersucht werden. Erstes Ziel dieser Arbeit war die Isolation sowie die Etablierung der Inkulturnahme von primären Epithelzellen der Nasennebenhöhlen und der Concha nasalis inferior, die im Rahmen von Septumplastik, Conchotomie und Nasennebenhöhlenoperationen gewonnen wurden. Im Anschluss sollten die zellulären Reaktionen von  $\text{TiO}_2$ -Partikel auf die Zellviabilität und die Membranintegrität anhand dieser Zellkulturen mittels eines MTT- und eines LDH-Assays in ersten Untersuchungen betrachtet werden.

## 3 Material

### 3.1 Lösungen und Puffer

#### 1% Alcianblaulösung:

1g Alcianblau 8GS (Chroma 10030) gelöst in 100ml 3% Eisessig (Merck 1.00056).  
pH-Wert der Färbelösung 2,5

#### 1%-BSA/0,3%-NP40/PBS(pH7,4)

10g BSA (PAA K41-001); 3ml NP40 (FLUKA 74385) verdünnt in 1l PBS (pH 7,4).

#### Citratpuffer:

9ml 0,1M Citronensäure (Stammlösung A, Merck 244);  
41ml 0,1M Na-Citrat (Stammlösung B, Merck 6432) verdünnt in 450ml H<sub>2</sub>O dest..  
Endkonzentration 0,01M

#### DAB Substratlösung:

DAB (Sigma D5637) gelöst in H<sub>2</sub>O dest. (Endkonzentration 1mg/ml)  
DAB Lösung filtrieren und 2µl Nickelchlorid (13mg/ml: Merck 6717) und 15µl 3%  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 2ml DAB-Lösung hinzufügen.

#### DAPI Stocklösung:

1mg DAPI (Sigma B-1155) gelöst in 20ml 100% Methanol (Merck 6008).  
Endkonzentration 50µg/ml

#### 1% Eosin gelblich:

1g Eosin (Eosin Merck 1345); 1 Tr. Eisessig verdünnt in 100ml H<sub>2</sub>O dest..

#### 0,25% HCl-Alkohol:

10ml 25% HCl (Merck 312) verdünnt in 1l 70% Ethanol (SAV).

#### 0,1% Kernecht-Aluminiumsulfat-Lösung:

0,1g Kernechtrot (Merck 5189) in 100ml 5% wässriger Aluminiumsulfat-Lösung  
(Merck 1042) heiß gelöst und nach Erkalten filtriert.

Krebs-Ringer-Puffer (pH 7,4):

8,3g NaCl (Merck 6400); 0,224g KCl (Merck 4936); 0,343g  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  (Merck 4873); 2,40g HEPES (Sigma H4034); 0,72g D-Glukose (Sigma G7528), 0,156g  $CaCl_2$  (Merck 2378); 0,244g  $MgCl_2$  (Merck 5833) gelöst in 1l  $H_2O$  dest..

4% Paraformaldehyd:

4g Paraformaldehyd (Merck 1.04.005) gelöst in 100ml PBS (pH 7,4).

PBS (pH 7,2-7,4):

8,0g NaCl reinst (Merck 6400); 1,15g  $Na_2HPO_4$  p.a. wasserfrei (Merck 6580); 0,2g KCl p.a. (Merck 4936); 0,2g  $KH_2PO_4$  p.a. (Merck 4873) gelöst in 1l  $H_2O$  dest..

Pronase-Medium:

1ml Protease Type XIV Stocklösung 1mg/ml (Sigma® P 5147);  
1ml Acetat-Puffer (Na-acetat 0,02M (Merck 6267)), Ca-acetat 0,01M (VWR 22268.264) plus 2,5µl Amphotericin B (PAA P11-001) gelöst in 8ml SMEM Medium (Gibco 11380) zuzüglich 1% P/S (PAA P-11-010).

Strept. Avidin-Biotin-Complex (AB-Complex):

10µl Stammlösung A (Dako Cytomation Strept. AB-Complex/ HRP K0377); 10µl Stammlösung B (Dako Cytomation Strept. AB-Complex/ HRP K0377) verdünnt in 1ml 0,05M Tris-Puffer Gebrauchslösung (pH 7,6).

10% Tri-Ethoxy-Silyl-Propylamin:

20ml Tri-Ethoxy-Silyl-Propylamin (Merck 821619) verdünnt in 180ml 100% Aceton (Hedinger).

Tris-Puffer Stammlösung (pH 7,6):

115g Tris HCl (Roth 9090.3) plus 11,7g Tris Base (Sigma T 1503) verdünnt in 1l  $H_2O$  dest..

Endkonzentration 0,5M

Tris-Puffer Gebrauchslösung (pH 7,6):

100ml Tris-Puffer Stammlösung (pH 7,6) plus 14,4g NaCl gelöst in 900ml  $H_2O$  dest..

Endkonzentration 0,05M

## 3.2 Kits, Zellkulturmedien und sonstige Chemikalien

Airway Epithelial Cell Basal Medium (Promo Cell® C-21260)

Airway Growth Factor Supplement (Promo Cell® C-21260)

Antifade Vectachield® (Vector, H-1000)

Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche 1465007)

Cytoscan™-LDH Cytotoxicity Assay Kit (Biosciences 786-210)

Entellan (Merck 1.07961)

Hepes BSS Puffer (Promo Cell® C-40010)

SMEM Medium (Gibco 11380)

TNS (Trypsin Neutralizing Solution) (Promo Cell® C-41110)

Trypsin/EDTA (Promo Cell® C-41010)

Weitere in dieser Arbeit verwendete Chemikalien sind mit ihren Bezugsquellen in Kapitel 4 bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

## 3.3 Antikörper

### 3.3.1 Primärantikörper

Tabelle 3.1 Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Art/Herkunft
CD 31	Dako M0823	Monoklonaler AK/Maus
Collagen 1	Abcam ab 21285	Polyklonaler AK/Kaninchen
Collagen 2	Chemicon MAB 8887	Monoklonaler AK/Maus
Pancytokeratin	Chemicon MAB 3412	Monoklonaler AK/Maus
Vimentin	Dako M0725	Monoklonaler AK/Maus

### 3.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.2 Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
Biotinylierte polyvalente IgG´s	Ultra Tech AP, PN IM 2392, Immunotech
FITC-konjugiert, goat-anti-rabbit IgG	Alexa A11034
TRITC-konjugiert, goat-anti-mouse IgG	Sigma T5393

### 3.4 Laborgeräte und Programmsoftware

Tabelle 3.3 Übersicht der verwendeten Laborgeräte und Programmsoftware

Gerät/Software	Firma	Typ
Sterilbank	Microflow	Biological Safety Cabinet
Mikroskop (invers)	Zeiss	Axiovert 135
Objektive	Zeiss	CP-Achromat
Plattenphotometer	Thermo	Multiscan EX
Zetasizer	Malvern	Nano ZS
Gewebeeinbettautomat	Shandon	Hypercenter XP
Paraffin-Ausgießstation	Shandon	Histocenter 2
Microtom	Leica	SM 2000 R
Fluoreszenzmikroskop	Olympus	BX 61
Fluoreszenzobjektive	Olympus	UPlan FI
CCD Kamera	Jenoptik	ProgRes MF
Software	AnalySiS	Isis V.3.4.0
Software	Metasystems	MetaArchive V.2.2.2

### 3.5 Gewebeproben

Die zur Anlage der Zellkultur verwendeten Schleimhautzellen wurden aus den Nasennebenhöhlen und der Concha nasalis inferior im Rahmen von Septumplastik, Conchotomie und Nasennebenhöhlenoperationen gewonnen. Das unter klinischen Gesichtspunkten entnommene Resektat wurde im Operationssaal der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität des Saarlandes sofort in sterile Gefäße mit SMEM Medium überführt und anschließend an das Forschungslabor weitergeleitet. Bei Eingang in das Labor wurden die Proben pseudonymisiert mit fortlaufenden Schlüsselnummern versehen und unmittelbar in der Zellkultur weiterverarbeitet oder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Eine Einverständniserklärung der Patienten und ein von der Ethikkommission des Saarlandes positiv bewilligter Ethikantrag für die durchgeführten Arbeiten liegen der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde vor.

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Passagieren von Zellen

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit neu etablierten primären Epithelzellkulturen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) über mehrere Wochen in Airways Medium kultiviert. Hierbei erfolgte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel.

Nach Bedarf wurden die Zellen alle 6-8 Tage passagiert (1:2 oder 1:3). Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen das Medium aus einer Petrischale abgesaugt. Im Anschluss daran wurden die Zellen für eine Minute mit 1ml Hepes BSS Puffer gewaschen. Nach dem Absaugen des Hepes BSS Puffers wurden zum Lösen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale die Zellen mit 1ml Trypsin/EDTA für 5 Minuten unter Sichtkontrolle überschichtet. Zur Neutralisierung der Trypsinwirkung wurde anschließend 1ml TNS auf die Zellen gegeben. Danach wurden die gelösten Zellen aus der Petrischale pipettiert und in einem 15ml Gefäß für 3 Minuten bei 1200 U/M zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, 1ml Airways Medium in das Gefäß gegeben und mit einer Pipette durchmischt. Zum Abschluss wurde jeweils die Hälfte bzw. ein Drittel der abtrypsinieren Zellen in neue Petrischalen überführt und in Airways Medium weiter kultiviert.

Um die Zellen für Immunfluoreszenzfärbung und die *in vitro*-Assays zu erhalten, wurden die Zellen entsprechend der Passagierung behandelt.

### 4.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung der Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10µl Zellsuspension mit 10µl Tryphan Blau verdünnt und 10µl dieser Verdünnung auf die Neubauer Kammer aufgetragen. Anschließend wurde die Neubauer-Zählkammer mit einem Deckgläschen (DG) so verschlossen, dass die Newtonschen Ringe sichtbar wurden und die ungefärbten vitalen Zellen unter einem inversen Mikroskop ausgezählt werden konnten. Im Anschluss wurden die gezählten Zellen aller 4 Felder der Neubauerkammer addiert und der Mittelwert gebildet. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Anwendung folgender Formel:

$$\text{Mittelwert aller gezählter Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Nachdem die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt worden war, wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl in neue Zellkulturschalen überführt und in Airwaysmedium unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert.

## 4.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Die im Operationssaal entnommenen Nasenmuschelgewebe wurden in einer Kapsel in einen Hypercenter XP eingelegt. Um die Paraffineinbettung vorzubereiten, wurden die Präparate zunächst in einem Formalinschritt fixiert. Anschließend wurde den Präparaten mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol das Wasser entzogen. Somit konnte das wasserunlösliche Paraffin das Gewebe vollständig durchdringen. Alle im Hypercenter durchgeführten Behandlungsschritte sind in nachfolgender Tabelle 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1 Fixierung und Dehydratation des Nasenmuschelgewebes im Hypercenter zur Vorbereitung auf die Paraffineinbettung**

<b>Lösung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Vakuum</b>	<b>Zeitdauer</b>
<b>4% Formalin/PBS</b>	37°C	+	1h
<b>70% Ethanol</b>	37°C	+	1h
<b>70% Ethanol</b>	37°C	+	2h
<b>70% Ethanol</b>	37°C	+	3h
<b>100% Ethanol</b>	37°C	+	1h
<b>100% Ethanol</b>	37°C	+	2h
<b>100% Ethanol</b>	37°C	+	3h
<b>100% Xylol</b>	37°C	+	1h
<b>100% Xylol</b>	37°C	+	2h
<b>100% Xylol</b>	37°C	+	15 Minuten
<b>Paraffin</b>	60°C	+	2h
<b>Paraffin</b>	60°C	+	1h

Als nächster Schritt folgte die Paraffineinbettung der Präparate, die mit Hilfe eines Histocenter 2 durchgeführt wurde.

An einem SM 2000 R Microtom wurden sowohl für die konventionell-histologischen als auch für die immunhistologischen Untersuchungen 5µm dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten Nasenmuschelpräparate angefertigt und auf silanisierte Objektträger (OT) aufgebracht. Zum Silanisieren der OT wurden saubere und fettfreie OT für 10 Minuten in 10% Tri-Ethoxy-Silyl-Propylamin fixiert. Anschließend wurden die OT je dreimal in 100% Aceton und in H<sub>2</sub>O dest. gespült. Zum Abschluss der Silanisierung wurden die OT über Nacht bei 40-50°C getrocknet. Ziel der Beschichtung mit Silan war es, die Haftung der Schnitte auf der OT-Oberfläche zu erhöhen.

## 4.3 Histologische Färbungen

### 4.3.1 Entparaffinierung der Schnitte

Um die Paraffinschnitte auf die histologische Färbung vorzubereiten, mussten diese entparaffiniert werden. Dazu wurden die Paraffinpräparate über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C inkubiert. Die weitere Entparaffinierung erfolgte in mehreren Schritten in Xylol, einer absteigenden Alkoholreihe und H<sub>2</sub>O dest.. Nachfolgende Tabelle zeigt eine schematische Darstellung der Entparaffinierung.

Tabelle 4.2 Schema der Entparaffinierung

Lösung	Dauer
Xylol	30 Minuten
Xylol	6x eintauchen
Xylol	6x eintauchen
100% Ethanol	6x eintauchen
100% Ethanol	6x eintauchen
100% Ethanol	6x eintauchen
70% Ethanol	6x eintauchen
70% Ethanol	6x eintauchen
70% Ethanol	6x eintauchen
H <sub>2</sub> O dest.	6x eintauchen
H <sub>2</sub> O dest.	6x eintauchen
H <sub>2</sub> O dest.	6x eintauchen

### 4.3.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE-)-Färbung

Die HE-Färbung ist eine histologische Standardfärbung, anhand derer meist die erste Beurteilung eines histologischen Präparates erfolgt. Durch diese Übersichtsfärbung lassen sich die Gewebestrukturen der gefärbten Präparate darstellen.

Zur Anfertigung dieser histologischen Standardfärbung wurden die entparaffinierten Schnitte in einem ersten Schritt mit Hämalaun nach Mayer (Merck, 1.09249.) für 10 Minuten gefärbt. Um überschüssige Farbreste zu entfernen, wurde das Präparat im Anschluss daran mit Brunnenwasser gespült. Die Differenzierung erfolgte in 0,25% HCl-Alkohol. Nach dem 10-minütigen Bläuen in kaltem Brunnenwasser folgte der zweite Färbeschritt mit 1% Eosin gelblich. Es schlossen sich weitere Spülungen in Brunnenwasser an. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (3x 70% Ethanol, 3x 100% Ethanol) und Xylol (3x) wurde dann dem Präparat das Wasser entzogen, um es zum Abschluss mit dem Einschlussmittel Entellan eindecken zu können.

### 4.3.3 Alcianblau-Färbung

Bei der Alcianblau-Färbung handelt es sich um ein Färbeverfahren zum Nachweis saurer Mukosubstanzen. Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst für 30 Minuten mit 1% Alcianblaulösung gefärbt. Zur Entfernung überschüssiger Farbreste folgte ein dreistufiger Waschvorgang in 3% Eisessig und H<sub>2</sub>O dest.. Im Anschluss an eine 5-minütige Gegenfärbung mit Kernechtrot und einer erneuten Spülung in H<sub>2</sub>O dest. wurden die Schnitte vor dem Eindecken mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol, 100% Ethanol) und Xylol entwässert. Zum Abschluss der Färbung wurde das Präparat mit Entellan eingedeckt.

### **4.3.4 Mayers-Hämalaun-Färbung**

Durch die Färbung mit Hämalaun nach Mayers wird eine Blaufärbung der Zellkerne erreicht. Die Färbung wurde in dieser Arbeit als Gegenfärbung von immunhistologischen Färbungen eingesetzt. Dazu wurden die OT für kurze Zeit (3-5 Minuten) in einem Gefäß mit Mayers Hämalaun (Merck 1.09249.0500) gefärbt. Danach wurden die überschüssigen Farbreste mit H<sub>2</sub>O dest. abgewaschen.

## **4.4 Immunhistologische Färbungen**

### **4.4.1 Entparaffinierung der Schnitte**

Um die Paraffinschnitte auf die immunhistologische Färbung vorzubereiten, mussten die Schnitte (wie vor den histologischen Färbungen) entparaffiniert werden (Kapitel 4.3.1). Zum Abschluss der Entparaffinierung wurden die Präparate in PBS (pH 7,4) gespült.

### **4.4.2 Immunhistologische Färbung des Ausgangsgewebes**

Zur Charakterisierung des Ausgangsgewebes wurde eine immunhistologische Färbung an entparaffinierten Schnitten durchgeführt. Hierzu wurden die OT zunächst für 30 Minuten in Citratpuffer (pH 6) auf 95-98°C erhitzt, um eine Antigendemaskierung zu erreichen. Im Anschluss wurden die Präparate 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt und in H<sub>2</sub>O dest. gespült. Es folgte die Hemmung der endogenen Peroxidase mittels 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 Minuten. Nach einer Spülung der Präparate mit H<sub>2</sub>O dest. wurden die Schnitte zur Vermeidung von unspezifischen Färbereaktionen für 30 Minuten bei 37°C mit 1%-BSA/PBS(pH 7,4)/0,3%-NP40 geblockt und die Zellmembranen permeabilisiert. Dadurch wurde den Antikörpern der Zutritt in die Zellen ermöglicht. Nach dem Dekantieren der Blockierungslösung folgte direkt die Zugabe der Primärantikörper auf die Gewebeschnitte. Der monoklonale Pancytokeratin-Antikörper aus der Maus sowie

der monoklonale Mausantikörper Vimentin kamen beide 1:50 verdünnt zur Anwendung. Der monoklonale Mausantikörper gegen Endothelzellen wurde ebenfalls 1:50 verdünnt. Alle Verdünnungen der Primärantikörper-Stammlösungen erfolgten mit Antikörper-Verdünnungsmedium (Dako S 3022). Zur Inkubation wurden die OT für 1 Stunde bei 37°C gelagert. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte zweimal in PBS (pH 7,4) und 1%-BSA/PBS(pH 7,4)/0,3%-NP40 für je 10 Minuten gewaschen. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit polyvalenten, biotinylierten Sekundärantikörpern. Die Präparate wurden 30 Minuten bei 37°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend in PBS (pH 7,4) dreimal für je 10 Minuten gewaschen, um überschüssige Sekundärantikörper zu entfernen. Es folgte die Zugabe des AB-Komplexes. Der AB-Komplex beinhaltet zum einen Avidin, welches an das kovalent an den Sekundärantikörpern gekoppelte Biotin aufgrund seiner hohen Affinität zu Biotin bindet. Zum anderen beinhaltet der Komplex das Enzym Peroxidase, welches während des späteren Detektionsschritts die Umsetzung des zugegebenen DAB-Substrates zu katalysieren vermag. Einem weiteren Waschschrift mit PBS (pH 7,4) folgte die Zugabe des DAB-Substrates. Dieses bildet ein braunes Reaktionsprodukt, welches in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist. Die Entwicklung der DAB-Färbung erfolgte innerhalb von 10 Minuten unter visueller Kontrolle am Mikroskop. Sobald eine spezifische Färbung erkennbar war (zwischen 5 und 10 Minuten) wurde die Detektion mit H<sub>2</sub>O dest. abgestoppt und die Objektträger dreimal in H<sub>2</sub>O dest. gewaschen. Danach wurde die Kernfärbung mit einer Mayers-Hämalaun-Gegenfärbung durchgeführt (Kapitel 4.3.4). Es folgten erneute Spülungen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol, 100% Ethanol) und Xylol. Zum Abschluss der Färbung wurde das Präparat mit Entellan eingedeckt. Unter einem Durchlichtmikroskop wurden die OT ausgewertet und bei entsprechender Vergrößerung mit einer Kamera aufgenommen. Mithilfe des Software-Programms MetaArchive wurden die Bilder anschließend abgespeichert und ausgewertet.

### 4.4.3 Immunfluoreszenzfärbung der Primärzellkultur

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen entsprechend Kapitel 4.1 von den Zellkulturschalen gelöst und unter sterilen Bedingungen auf DG in 6-Well Schalen mit 1ml Airwaysmedium ausgesät. Um eine Kontamination der Zellen zu verhindern, wurden die DG zuvor mit 100% Methanol desinfiziert. Damit die Zellen auf der neuen Oberfläche adhären konnten, folgte ein weiterer Inkubationsschritt über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank unter Standardbedingungen. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und als Vorbereitung auf eine Immunfluoreszenzfärbung mit eiskaltem 100% Methanol für 30 Minuten bei -20°C (Pancytokeratinfärbung) fixiert. Für die anderen in dieser Arbeit beschriebenen, primären Antikörper wurde die Fixierung mit 4% PFA/PBS (pH 7,4) für 30 Minuten bei RT durchgeführt. Nach einem 30-minütigen Blockierungs- und Permeabilisierungsschritt mit 1%-BSA/PBS(pH 7,4)/0,3%-NP40 bei RT auf dem Schüttler folgte die Zugabe der primären Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen: Vimentin, Pancytokeratin und CD 31 (1:100); Doppelfärbung Collagen 1/Collagen 2 (1:100/1:1000). Alle Verdünnungen der Primärantikörper-Stammlösungen erfolgten mit PBS (pH 7,4). Zur Inkubation wurden die DG in einer feuchten Kammer bei 37°C im Wärmeschrank für 45 Minuten gelagert. Um überschüssige, nichtgebundene Primärantikörper zu entfernen, wurden die Präparate anschließend dreimal je 10 Minuten in PBS (pH 7,4) gewaschen. Im Anschluss daran folgte ein erneuter Blockier- und Permeabilisierungsschritt für 20 Minuten in 1%-BSA/PBS(pH 7,4)/0,3%-NP40. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem TRITC-konjugierten goat-anti-mouse IgG-Sekundärantikörper und einem FITC-konjugierten goat-anti-rabbit IgG-Sekundärantikörper. Beide Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von jeweils 1:500 verwendet. Die Verdünnungen erfolgten mit PBS (pH 7,4). Um die überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen, wurden die DG im Anschluss an die Färbung erneut dreimal für je 10 Minuten in PBS (pH 7,4) auf dem Schüttler gewaschen.

Die Kernfärbung wurde danach in Form einer DAPI-Gegenfärbung durchgeführt. Hierzu wurden die DG zunächst mit Methanol gespült und anschließend für 1-2 Minuten bei RT die DAPI-Färbelösungen auf die DG pipettiert. Die DAPI-Stammlösung wurde für die Gegenfärbung in einer Verdünnung von 1:50 in

Methanol verwendet. Nach einer Spülung mit 100% Methanol wurden die Präparate mit Antifade eingedeckt. Alle Präparate wurden bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt, um eine Verringerung der Fluoreszenzeigenschaft zu vermeiden. Die Auswertung der OT erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop und die Bilder wurden bei entsprechender Vergrößerung mit einer Kamera aufgenommen. Diese Kamera war mit einem Computer verbunden, so dass die Bilder in dem Softwareprogramm ISIS abgespeichert und ausgewertet werden konnten.

## **4.5 *In Vitro*-Assays**

### **4.5.1 Vorbereitung der Zellkultur**

Für die Durchführung der *in vitro*-Assays wurden die Nasenmuschelzellen von den Zellkulturschalen trypsiniert (Kapitel 4.1.1) und ihre Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in einer exakt definierten Zellzahl von 15.000 bzw. 20.000 Zellen/Well in jeweils 100µl Airwaysmedium auf einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht im Wärmeschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Für jeden Versuch wurden je nach Verfügbarkeit von Zellen und freien Wells auf der Mikrotiterplatte 3-9 Wells pro Messwert vorgesehen.

### 4.5.2 Vorbereitung der Partikel

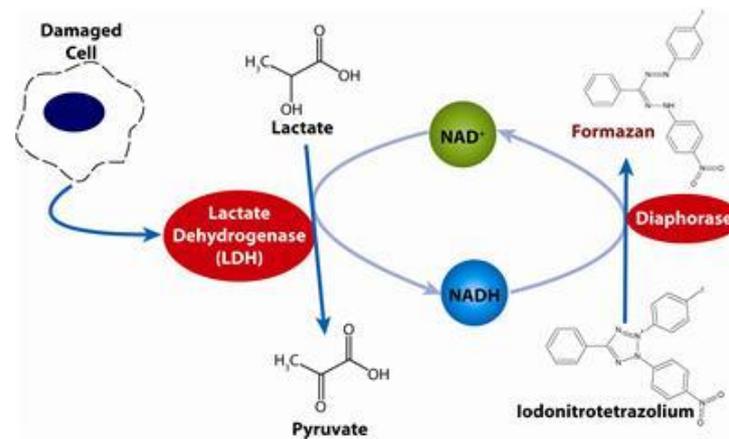
Um eine Kontamination mit Bakterien auszuschließen, wurden die Stammlösungen der Partikel einen Tag vor Testbeginn autoklaviert. Im Anschluss daran wurden Verdünnungsreihen der Noxen erstellt. Von der  $K_2CrO_4$  Stammlösung mit einer Konzentration von 10mM wurden Verdünnungen mit den Konzentrationen 200 $\mu$ M und 20 $\mu$ M hergestellt. Die  $TiO_2$ -Partikel wurden ausgehend von der Stammlösung mit einer Konzentration von 120mM auf 50 $\mu$ M und 1 $\mu$ M verdünnt. Alle Verdünnungen erfolgten mit KR- bzw. PBS-Puffer.

Um eine optimale Partikelgröße zu erreichen, wurden die Partikel im Anschluss für 4 Stunden im Ultraschallbad behandelt.

### 4.5.3 LDH-Assay

Der Laktat-Dehydrogenase-Assay basiert auf der Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand der Zellen. LDH wird aus membranbeschädigten Zellen freigesetzt und ist dann im Überstand nachweisbar. Die freigesetzte LDH-Menge wird indirekt über die LDH-Aktivität mittels eines enzymatischen Tests bestimmt (Abbildung 4.1).

Es finden zwei Redoxreaktionen statt: Im ersten Schritt wird Laktat durch LDH zu Pyruvat oxidiert, gleichzeitig wird das Co-Enzym  $NAD^+$  zu  $NADH/H^+$  reduziert. Im zweiten Schritt transferiert der im Testsystem enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff auf das Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3--[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid). Dieses wird dadurch zu dem rot gefärbten Formazan oxidiert, während das  $NADH/H^+$  zu  $NAD^+$  oxidiert wird. Die Farbstoffbildung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen werden. Je höher der Grad der Zellschädigung bzw. der Verlust der Membranintegrität, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Überstand. Die Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazansalz und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen (Handbuch Cytoscan™-LDH Cytotoxicity Assay Kit, Gbiosciences).

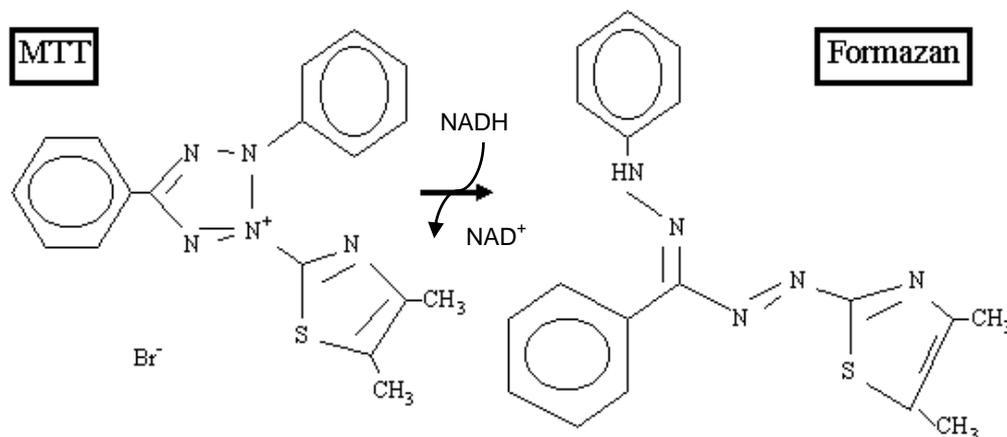


**Abbildung 4.1** Übersicht über die Reaktionsschritte des LDH Assays  
(Quelle: [www.gbiosciences.com/ResearchUploads/ResearchProductIMGFile/633791027872608750.pdf](http://www.gbiosciences.com/ResearchUploads/ResearchProductIMGFile/633791027872608750.pdf))

Nachdem die Zellkultur entsprechend vorbereitet worden war (Kapitel 4.5.1), wurden die Partikel in den zu testenden Konzentrationen auf die Zellen pipettiert. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit wurde aus den 96-Well Platten je 50µl/Well des Überstandes in eine neue 96-Well Platte überführt. Im Anschluss daran wurden pro Well 50µl Substratmix zugegeben, mit einer Pipette sorgfältig durchmischt und die Zellen für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde in jedes Well 50µl der Stopplösung gegeben und die Absorption des sich gebildeten Formazans bei einer Wellenlänge von 490nm mittels eines Plattenphotometers bestimmt. Als Positivkontrolle bzw. als Vergleichswert dienten die Überstände der gleichen Zellkultur und gleicher Zellzahl, die zuvor durch Zugabe von 10µl eines 10x Lysepuffers vollständig lysiert worden waren (Maximalrelease). Die Maximalreleasewerte wurden bei der Auswertung mit dem Spontanrelease der Zellen ohne Partikel bzw. mit Partikel oder Kaliumchromatzugabe verglichen. Ein hoher Spontanrelease Anteil ohne Zugabe von Noxen weist auf eine Vorschädigung bzw. hohe Sterberate der verwendeten Zellen hin. Der Spontanrelease wurde bei der statistischen Auswertung der Messergebnisse als Referenzwert verwendet und die Erhöhung bzw. Verminderung der LDH-Ausschüttung unter dem Einfluss der Noxen in Relation gesetzt.

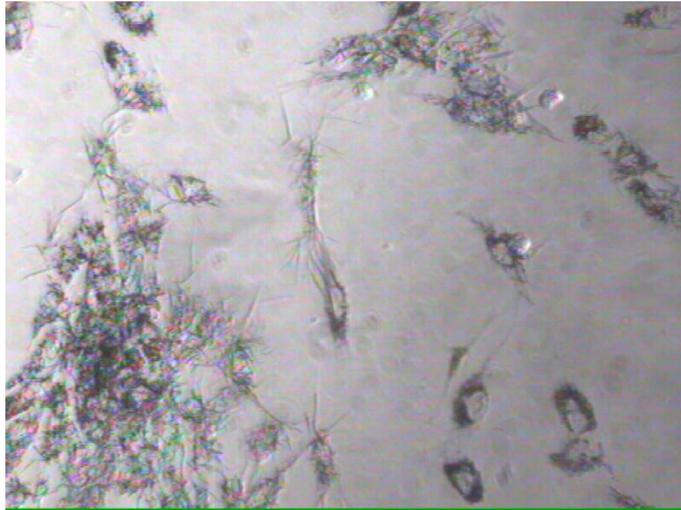
### 4.5.4 MTT-Assay

Der von Mosman (Mosman T., 1983) beschriebene Test beruht auf der Bestimmung der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen, indem die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen wird. Dieser Test basiert auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) zu wasserunlöslichen, violetten Formazankristallen. Das Tetrazoliumsalz wird ausschließlich von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien mittels NADH in einer Succinat-abhängigen-Dehydrogenasen-katalysierten Reaktion zu Formazankristallen reduziert.



**Abbildung 4.2** Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) zu wasserunlöslichen, violetten Formazankristallen (Quelle: verändert nach: [www.e-labdoc.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11465007001\\_en\\_16.pdf](http://www.e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11465007001_en_16.pdf))

Für die photometrische Auswertung werden die Formazankristalle durch die Zugabe einer Solubilisierungslösung während einer Inkubation über Nacht bei 37°C aufgelöst. Die Absorption des löslichen Formazan wird bei 565nm photometrisch bestimmt und korreliert mit der mitochondrialen Aktivität als Index der Vitalität und Stoffwechselaktivität.



**Abbildung 4.3 Mikroskopische Aufnahme von nadelförmigen Formazankristallen während eines MTT-Versuches**

Für diese Arbeit wurden nach der schon beschriebenen Vorbereitung der Zellkultur (Kapitel 4.5.1) die Verdünnungsreihen der Noxen entsprechend dem Belegungsplan auf die Zellen gegeben. Zwei Reihen der Mikrotiterplatte enthielten nur Zellen und Medium und dienten bei der Auswertung als Kontrollwerte (0h MTT- und 4h MTT-Wert). Nach einer 4-stündigen Inkubation der Zellen mit den Nanopartikel bei 37°C im Brutschrank wurde je 10µl 10% MTT-Lösung in alle Wells gegeben. Dies führte zur Bildung der wasserunlöslichen, violetten Formazinkristallen. Nach weiteren 4 Stunden im Brutschrank erfolgte die Inkubation mit 100µl Solubilisierungslösung über Nacht bei 37°C, um die Formazankristalle in ihre wässrige Form zu überführen. Der 4h MTT-Kontrollwert gibt an, wie viel MTT während der 4-stündigen Inkubationszeit durch die mitochondriale Dehydrogenase der unbehandelten, stoffwechselaktiven Zellen zu Formazankristallen reduziert wird. Da es für den 0h MTT-Kontrollwert notwendig ist, die MTT-Reaktion zu verhindern, wurde bei den 0h MTT-Kontrollwells die Solubilisierungslösung unmittelbar im Anschluss an die MTT-Lösung aufgetragen. Der Vergleich der 0h MTT-Werte mit dem entsprechenden 4h MTT-Wert wurde als Maß für die Stoffwechselaktivität der einzelnen verwendeten primären Zellkulturen herangezogen. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 565nm mit Hilfe eines Plattenphotometers bestimmt. Bei der statistischen Auswertung wurde der 4h MTT-Wert der mit Partikel inkubierten Zellen mit dem 4h MTT-Kontrollwert in Relation gesetzt.

## 4.6 Größenbestimmung der Partikel

### 4.6.1 Zetasizer

Die Größenbestimmung der in dieser Arbeit verwendeten  $\text{TiO}_2$ -Partikel wurde in Kooperation mit dem Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlandes (Saarbrücken) an einem Zetasizer (Nano ZS, Malvern) durchgeführt. Der Zetasizer erlaubt die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von Partikeln durch dynamische Lichtstreuung (DLS). DLS ist eine Technik, die es ermöglicht, die Diffusion von Partikeln in Lösung zu bestimmen. Es wird die Brown'sche Bewegung der Partikel gemessen und diese in Relation mit der Partikelgröße gesetzt. Die Brown'sche Bewegung beschreibt die Wärmebewegung von Teilchen in Flüssigkeiten. Jedes Kolloid stößt mit den in der Lösung enthaltenen Molekülen zusammen. Die dadurch auf das Kolloid wirkende Kraft verursacht eine zufällige Bewegung (Random walk) der Partikel. Je größer die Partikel, desto kleiner ist die Brown'sche Bewegung. Kleinere Teilchen bewegen sich hingegen schneller. Die Größe der Partikel wird über den Diffusionskoeffizienten mittels der Stokes-Einstein Gleichung berechnet. Der hydrodynamische Durchmesser lässt sich aus der Geschwindigkeit, mit der sich die Partikel in der Lösung bewegen, ermitteln. Das Prinzip dieser Messung basiert auf der Auswertung des Streulichtes eines Lasers an einer Dispersion. Trifft der Laserstrahl auf kleine, sich in Dispersion befindliche Partikel, wird das Licht in alle Richtungen gestreut (Rayleigh-Streuung). Die sich ändernde Position der Partikel auf Grund der Brown'schen Bewegung verursacht Unterschiede in der Lichtstreuung. Deshalb ergibt die Analyse dieser auftretenden zeitabhängigen Schwankung in der Intensität der Streuung Informationen über die Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel in der Lösung. Durch die Anwendung der Diffusionskonstanten kann der Durchmesser von Nanopartikeln bestimmt werden. (Malvern Technical Note)

Zu Beginn der Messung erfolgte die Kalibrierung des Zetasizers für 120 Sekunden. Die Partikelgrößen wurden anschließend im Automatik-Modus bei  $37^\circ\text{C}$  in speziellen Küvetten ermittelt. Jede Messung wurde dreifach durchgeführt. Als Leerwert diente die Messung des Mediums ohne Partikel, der bei der Auswertung automatisch von den Messergebnissen subtrahiert wurde.

## 4.7 Statistische Auswertung

Die experimentell ermittelten Daten wurden jeweils als Mittelwerte  $\pm$  der Standardabweichungen (SA) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 20 durch den T-Test für verbundene Stichproben.

## 5 Ergebnisse

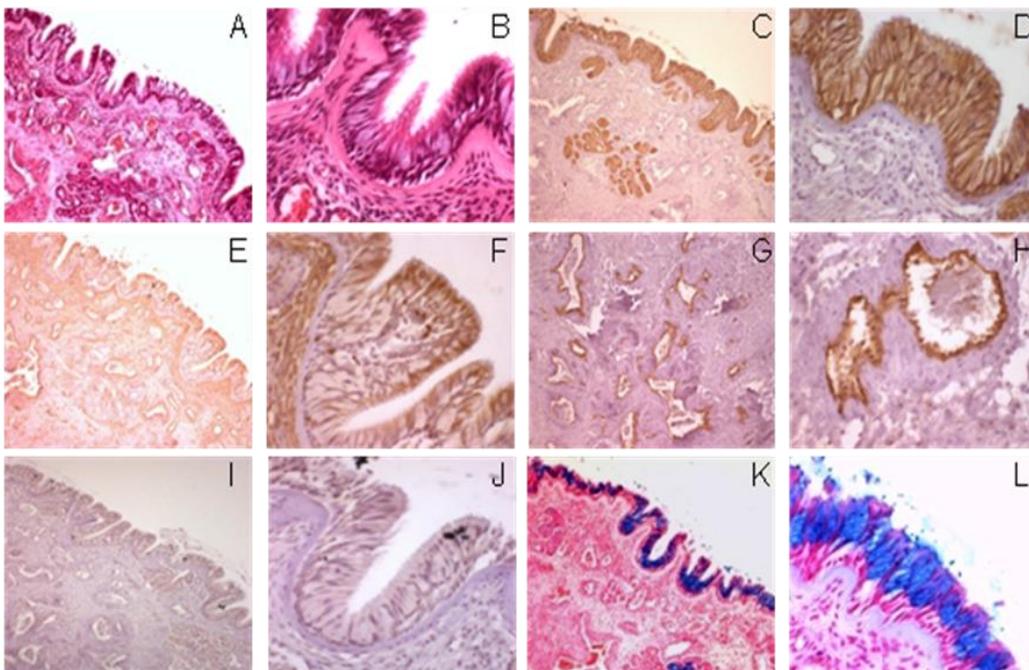
### 5.1 Charakterisierung des Ausgangsgewebes

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Toxizität von Titandioxid-Nanopartikel auf das respiratorische Epithelgewebe der oberen Atemwege *in vitro* untersucht werden. Die Epithelzellschicht der respiratorischen Atemwege besteht aus einem mehrreihigen, hochprismatischen Epithel, welches mit Mucus-produzierenden Becherzellen und Zilien-tragenden Zellen ausgestattet ist. Bei den Becherzellen handelt es sich um einzellige, becherförmige Drüsen, deren Aufgabe die Produktion des Bronchialschleims ist. Die von den Becherzellen sezernierten Muzine bedecken das Epithel und befeuchten somit die vorbei streichende Atemluft. Die Kinozilien des Flimmerepithels bewegen sich in koordinierten ruderartigen Bewegungen und befördern dadurch Schleim und Schmutzstoffe aus der Lunge.

Zur Charakterisierung des in dieser Arbeit verwendeten humanen OP-Materials, das im Rahmen von Septumplastiken, Conchotomien und Nasennebenhöhlenoperationen entfernt wurde, wurde das respiratorische Epithel histologisch sowie immunhistologisch gefärbt. Hierzu erfolgte direkt nach der Operation die Fixierung der humanen Nasenmuscheln in Formalin. In einem weiteren Schritt wurde diese in Paraffin eingebettet und im Anschluss folgte die Herstellung von Paraffinschnitten (Kapitel 4.2). Abbildung 5.1 zeigt die Ergebnisse der danach durchgeführten histologischen und immunhistologischen Färbungen (Kapitel 4.3 und Kapitel 4.4).

Zur Darstellung der Gewebestruktur wurde eine unspezifische Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt, bei der sich alle Zellkerne violett und das Zytoplasma rosa anfärbten. Mithilfe dieser Übersichtsfärbung ließ sich eine heterogene Gewebestruktur deutlich erkennen. Darüber hinaus war die für das respiratorische Epithel typische dicke Basalmembran erkennbar. In der höheren Vergrößerung (40x) wurden die feinen Kinozilien der Flimmerepithelzellen sichtbar. Durch die anschließende immunhistologische Färbung mit einem Pancytokeratin-Antikörper konnten die cytokeratin-positiven Epithelzellen des mehrreihigen respiratorischen Epithels durch eine braune DAB-Färbung nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden die Stromazellen mittels eines anti-Vimentin Antikörpers DAB gefärbt. Endothelzellen konnten mit einem Antikörper gegen das Endothelzellmarkerprotein CD 31 in den Gefäßen des Gewebepräparates ebenfalls braun detektiert werden. Die Präparate der Negativkontrolle wurden ohne Primärantikörper lediglich mit sekundärem Antikörper gefärbt und zeigten keine braune Färbung. Alle immunhistologisch gefärbten Präparate (einschließlich der Negativkontrolle) wurden zusätzlich einer Hämalan nach Mayers-Gegenfärbung unterzogen, um die nicht spezifisch gefärbten Zell- und Gewebestrukturen ebenfalls darzustellen. Mittels einer Alcianblaufärbung wurde das Sekret der Becherzellen blau gefärbt. Durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot erschienen bei dieser Färbung die Zellkerne pink.



**Abbildung 5.1** Histologische und immunhistologische Färbungen von humanen Nasenmuscheln. (A) HE-Färbung 10x Vergrößerung (B) HE-Färbung 40x (C) Cytokeratin 10x (D) Pancytokeratin 40x (E) Vimentin 10x (F) Vimentin 40x (G) CD 31 10x (H) CD 31 40x (I) IHC-Negativkontrolle 10x (J) IHC-Negativkontrolle 40x (K) Alcianblau 10x (L) Alcianblau 40x

Mit den durchgeführten Färbungen konnte somit bestätigt werden, dass es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten OP-Material um respiratorisches Epithelgewebe handelte. Es konnte sowohl das typische mehrreihige, hochprismatische Epithel als auch Mucos-produzierenden Becherzellen und Zilien-tragenden Zellen nachgewiesen werden.

## 5.2 Etablierung von primären Epithelzellkulturen

Das Ziel dieses Projektteils war die Etablierung von Cytokeratin-positiven Epithelzellkulturen aus Nasenmuschelgewebe, um eine mögliche Toxizität von Titandioxid-Nanopartikel an respiratorischen Epithelzellen untersuchen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Ansätze zur Anlage einer primären Epithelzellkultur aus Nasenmuschelgewebe ausgetestet. Der Erfolg der Anzucht der Epithelzellen wurde anhand der Expression des Epithelzellmarkers Cytokeratin, der Isolation von Zilien-tragenden Epithelzellen, der Isolation von Becherzellen sowie der Geschwindigkeit des Zellwachstums gemessen (Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1 Vergleich der Protokolle A-C zur Etablierung primärer nasaler Epithelzellkulturen**

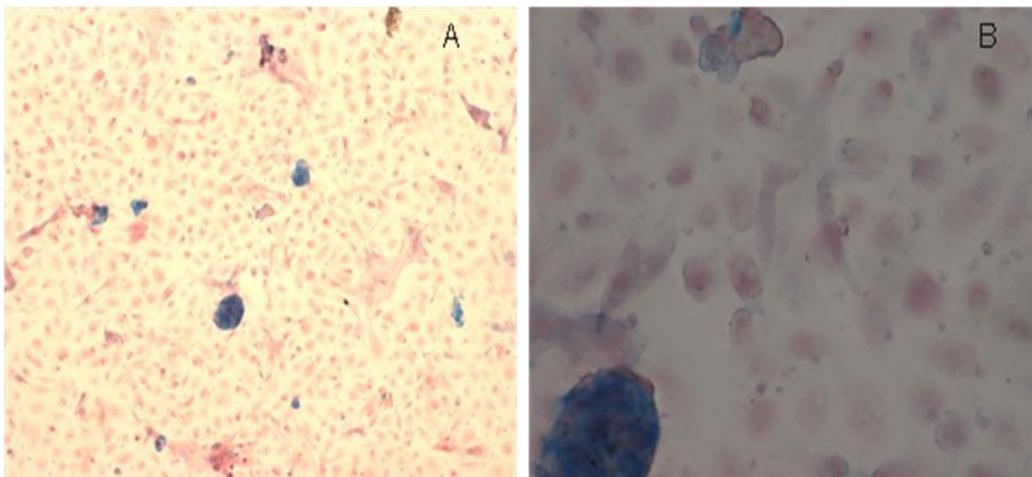
Protokoll	A	B	C
Anzahl etablierter Kulturen	5	10	15
Beginn des Zellwachstums	nach 7 Tagen	nach 7 Tagen	nach 3 Tagen
Isolation Zillien-tragender Zellen	Nein	Nein	Ja
Isolation Becherzellen	Nein	Nein	Ja
Anzahl Cytokeratin-positiver Zellen nach 2-wöchiger Kultur	70%	>70%	100%

Für Protokoll A (n=5) der Etablierung der primären Epithelzellkultur wurde natives Nasenmuschelgewebe (Präparate von 1-3cm Länge) direkt im Anschluss an die operative Entfernung unter sterilen Bedingungen mit einer Schere in zirka 2-4mm<sup>3</sup> große Stückchen geschnitten, in eine Petrischale gegeben und leicht antrocknen gelassen. Sobald die Stückchen nach 1-2 Stunden fest auf dem Boden der Schale saßen, wurden sie vorsichtig mit Airwaysmedium, einem speziellen Epithelzellmedium, welches das Wachstum von Fibroblasten unterdrücken soll, überschichtet. Eine mögliche Kontamination durch Fibroblasten bzw. Bakterien konnte durch eine regelmäßige Überwachung (alle 3 Tage) auf Grund deutlicher Morphologieunterschiede zwischen den respiratorischen Epithelzellen und Fibroblasten ausgeschlossen werden. Nach zirka einer Woche begannen aus einigen Stückchen die ersten Zellen auszuwachsen. Zilien-tragende Zellen sowie Becherzellen konnten unter Anwendung des Protokolls A nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus lösten sich während der ersten Wochen der Kultivierung viele der Gewebestückchen vom Boden der Zellkulturschale. Ohne die zum Anwachsen der Zellen notwendige Bodenhaftung konnten aus diesen Stückchen keine Zellen mehr auswachsen, was zu einer Verringerung der Ausbeute führte. Nach zirka 2-3 Wochen wurden Anteile der ausgewachsenen Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung (Kapitel 4.4.3) unterzogen. Hierbei betrug der Anteil Cytokeratin-positiver Zellen durchschnittlich 70%.

Für Protokoll B (n=10) wurde natives Nasenmuschelgewebe (Präparate von 1-3cm Länge) ebenfalls direkt im Anschluss an die operative Entfernung unter sterilen Bedingungen mit einer Schere in zirka 2-4mm<sup>3</sup> große Stückchen geschnitten. Diese Stückchen wurden im Anschluss für eine Stunde bei RT mit Pronase-Medium behandelt. Das Pronase-Medium bewirkt den Verdau verschiedener Proteine auf der Zelloberfläche, dies führt zu einem Verlust des Zell-Zellkontakts und somit zu einer Auflockerung der zellulären Verbände. Nach der einstündigen Pronase-Behandlung wurden die Zellen/Stückchen bei 1200 U/M für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss daran wurden die gelösten Zellen und die Stückchen in einer Petrischale verteilt, leicht antrocknen gelassen und mit 10ml Airwaysmedium überschichtet. Um mögliche Kontaminationen frühzeitig zu erkennen, erfolgte eine regelmäßige mikroskopische Überwachung der Zellkultur. Unter Anwendung des Protokolls B war es ebenfalls nicht möglich Zilien-tragende Zellen bzw. Becherzellen zu isolieren. Durch dieses Protokoll konnte die

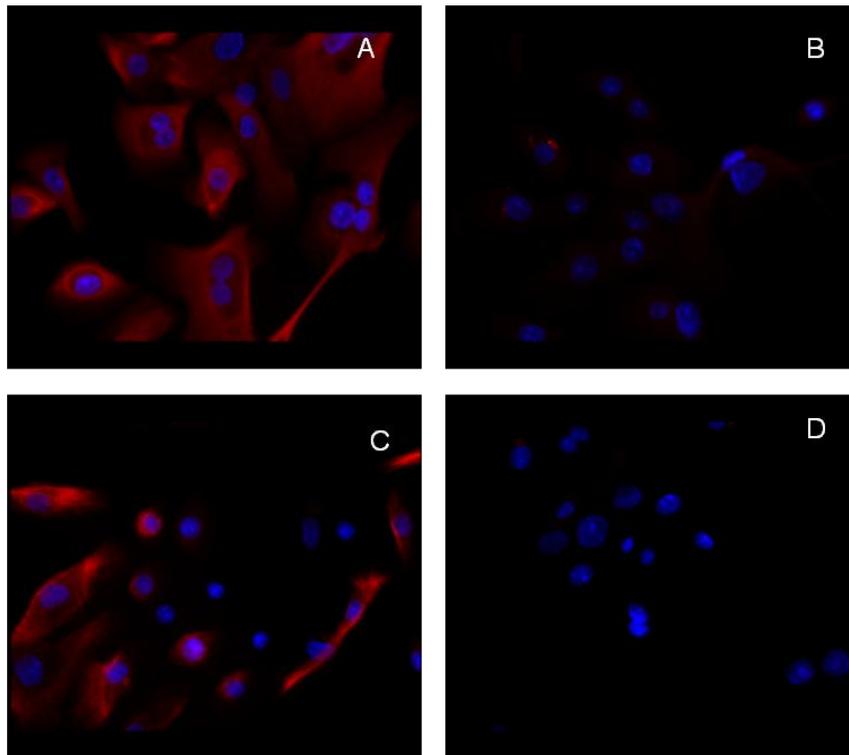
Gesamtausbeute der isolierten Zellen sowie der durchschnittliche Anteil an Cytokeratin-positiver Zellen (>75%) leicht erhöht werden.

Als effizienteste Methode zur Isolation der Epithelzellen stellte sich Protokoll C (n=15) heraus. Das aus dem Operationssaal kommende Nasenmuschelgewebe wurde unter sterilen Bedingungen mit SMEM-Medium gespült und anschließend in ein 50ml Gefäß überführt. Je nach Größe des Materials wurde 1-2ml Pronase-Medium zugegeben und über Nacht bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag konnte die Epithelschicht des Nasenmuschelgewebes abgeschabt werden. Nach einmaligem Waschen in unkonditioniertem SMEM-Medium wurden die abgeschabten kleinen Zellverbände bei 1200 U/M für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die pelletierten Zellverbände in einer Petrischale verteilt, erneut leicht antrocknen gelassen und anschließend mit 10ml Airwaysmedium überschichtet. Da die Zellverbände nach dem Abschaben im Anschluss an den Pronaseverdau, im Vergleich zu den Stückchenkulturen von Protokoll A und B, deutlich kleiner waren, war eine Trockenzeit von wenigen Minuten ausreichend. Um mögliche Kontaminationen frühzeitig zu erkennen, erfolgte eine regelmäßige mikroskopische Überwachung der Zellkultur. In den ersten 4-5 Tagen wurde kein Mediumwechsel vorgenommen. Am 6. Tag jedoch wurde das Medium zu 50% erneuert, um den Zellen neue Nährstoffe zukommen zu lassen. Nach insgesamt 8 Tagen wurden die Zellen einmal in PBS (pH 7,4) gespült, und es folgte ein kompletter Mediumwechsel. Unter Anwendung des in dieser Arbeit neu etablierten Zellkulturprotokolls (Protokoll C) war es erstmals möglich Zilien-tragende Zellen zu isolieren und zu kultivieren (Abbildung 5.4). Das koordinierte, ruderartige Schlagen der Kinozilien konnte über einen Zeitraum von 1-2 Wochen unter dem Mikroskop beobachtet werden. Darüber hinaus wurden mit diesem Protokoll Mukos-produzierenden Becherzellen isoliert und kultiviert. Die Sekrete der Becherzellen konnten mittels Alcianblaufärbung nachgewiesen werden (Abbildung 5.2). Mit zunehmender Kultivierdauer (länger als 2 Wochen) begannen jedoch sowohl die Zilien-tragenden Zellen als auch die Becherzellen abzusterben. Unter Verwendung des neu etablierten Protokolls C, bei dem nur das abgeschabte Epithel und nicht das gesamte Nasenmuschelgewebe in Kultur genommen wurde, konnten somit alle Zelltypen, welche in den immunhistologischen Färbungen der Epithelschicht des Ausgangsgewebes nachgewiesen wurden, isoliert und kultiviert werden.



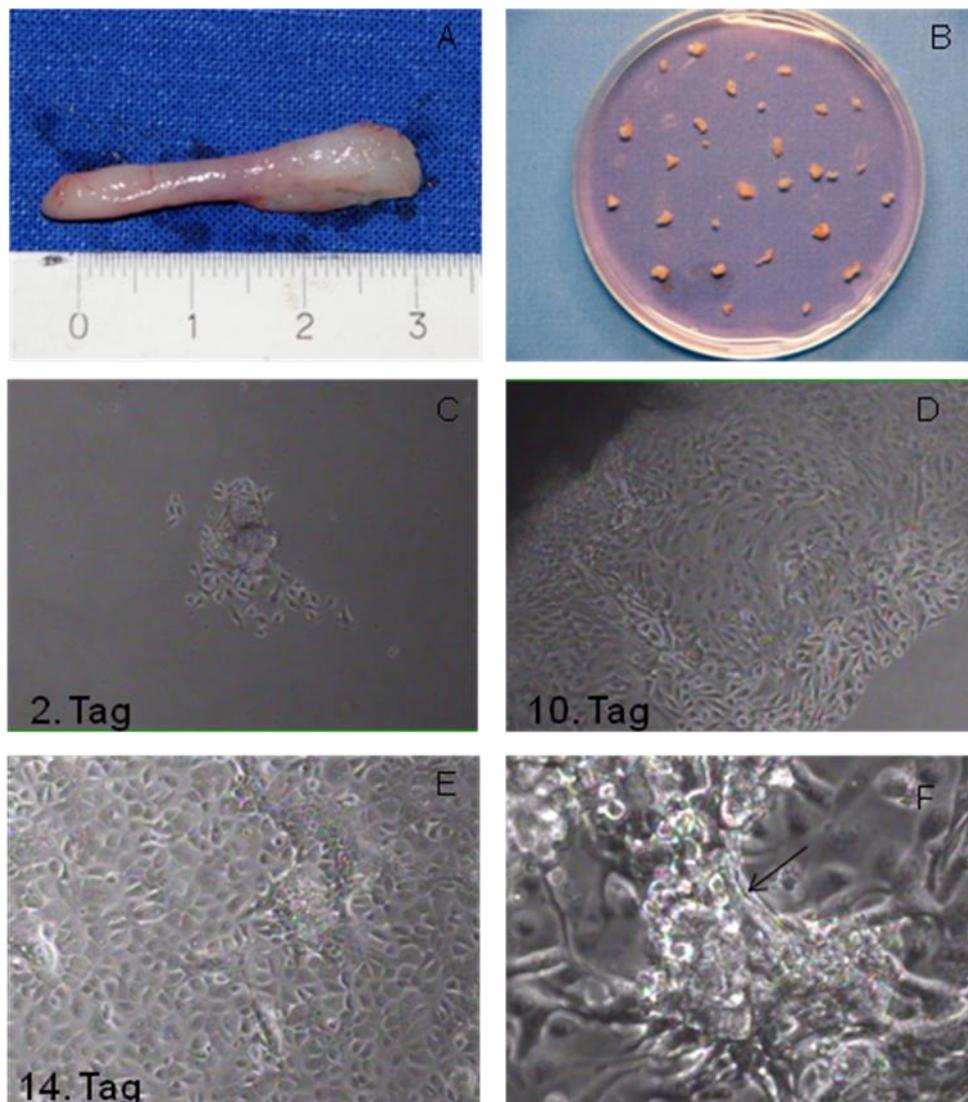
**Abbildung 5.2** Übersicht über Alcianblau-Färbung der Primärzellkultur. (A) Alcianblaufärbung 10x Vergrößerung (B) Alcianblaufärbung 40x

In der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung der Primärzellkultur konnte mit Hilfe des Protokolls C ein Anteil Pancytokeratin-positiver Zellen von 100% erreicht werden. Der Anteil an gleichzeitig Vimentin-positiven Zellen lag bei durchschnittlich 50%. Die Vimentinfärbung wurde ursprünglich zur Kontrolle für Kontaminationen mit Fibroblasten durchgeführt. In den Immunfluoreszenz-Färbungen dieser Arbeit zeigten jedoch auch die isolierten Cytokeratin-positiven Epithelzellen eine Vimentinfärbung, wobei sich die Anzahl an gleichzeitig Cytokeratin- und Vimentin-positiven Zellen über die Kulturdauer erhöhte. Die Beobachtung von gleichzeitig Cytokeratin- und Vimentin-positiven Zellen zeigt eine Übereinstimmung mit den immunhistologischen Färbeargebnissen des Ausgangsgewebes (Kapitel 5.1; Abbildung 5.1), bei dem sich die Epithelzellen ebenfalls mit einem anti-Vimentin Antikörper anfärben ließen. In der Immunfluoreszenzfärbung der Primärzellkultur konnte keine Expression sowohl des Endothelzellmarkers CD 31 als auch des Knochenmarkerprotein Collagen 1 und des Knorpelmarkerproteins Collagen 2 nachgewiesen werden (Abbildung nicht gezeigt). Abbildung 5.3 zeigt repräsentative Beispiele einer Cytokeratin- und Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung einer nach Protokoll C etablierten Primärzellkultur.



**Abbildung 5.3** Vimentin- und Pancytokeratin-Färbungen einer primären Epithelzellkultur. (A) Cytokeratin 60x Vergrößerung (B) Negativkontrolle Pancytokeratinfärbung 60x (C) Vimentin, 60x (D) Negativkontrolle Vimentinfärbung 60x

Abbildung 5.4 zeigt Beispiele der drei verschiedenen Ansätze der Epithelzellkulturetablierung. Das Ausgangsgewebe, eine native Nasenmuschel ist in Bild A dargestellt. Bild B zeigt eine Stückchenkultur (Protokoll A). In Bild C ist das Auswachsen von Zellen aus kleineren Zellverbänden (Protokoll C) dargestellt. Bild D veranschaulicht einen von einem Zellverband auswachsenden Zellrasen mit deutlich erkennbaren epitheloiden (plattenförmigen) Zellformen. In Bild E ist ein komplett geschlossener Zellrasen einer 14 Tage alten primären Zellkultur zu erkennen. Bild F zeigt eine Epithelzellkultur mit Zilien-tragenden Zellen.



**Abbildung 5.4** Beispielhafte Darstellung der Epithelzellkulturetablierung. (A) natives Nasenmuschelgewebe (B) mechanisch zerkleinertes Nasenmuschelgewebe in Zellkulturschale (C) Pronase behandelte abgeschabte Zellkultur nach 2 Tagen (D) Gewebestückchen nach 10 Tagen mit ausgewachsenen Zellrasen (E) geschlossener Zellrasen einer 14 Tage alten primären ZK (F) Bsp. einer Primärzellkultur mit Zilien-tragenden Zellen (Pfeil)

### 5.3 Charakterisierung der Titandioxidpartikel

Die in dieser Arbeit als Nanopartikel für die Toxizitätsversuche getesteten „Titan IV Oxid Nanopartikel“ (Sigma Aldrich 643114) werden laut Hersteller in einer Partikelgröße von kleiner 75nm in einer Suspension mit Wasser angeboten und bestehen aus einer Mischung zwischen der Rutil- und der Anatasform des Titandioxids. Zu Beginn der Versuchsdurchführungen wurden die Wasser-Partikelsuspension in Kooperation mit dem Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlandes (Saarbrücken) mehrfach in verschiedenen Konzentrationen (n=3) an einem Zetasizer vermessen, um die Angaben des Herstellers zu überprüfen (Tabelle 5.2).

Bei den Zetasizer Auswertungen zeigt der Z-Average-Wert (Z-Ave) die durchschnittliche Größe aller Partikel. Der Peak 1 Mean (Pk1 Mean) ist die Darstellung der durchschnittlichen Partikelgröße im 1. Peak, in dem sich bei den durchgeführten Messungen über 95% der messbaren Partikel befanden. Eine hohe Diskrepanz zwischen der durchschnittlichen Größe im 1. Peak und dem Z-Average-Wert zeigt, dass große Agglomerate in der Suspension vorhanden sind, die außerhalb des definierten Messbereiches des Zetasizers liegen. Der definierte Messbereich des in dieser Arbeit verwendeten Zetasizers liegt zwischen 1nm und 10.000nm, wobei optimaler Weise eine Partikelgröße von 1000nm nicht überschritten werden sollte.

Die durchgeführten Messungen (Tabelle 5.2) zeigten, dass die Partikel in der Wassersuspension in einer durchschnittlichen Größe von 185nm vorlagen und damit die Angaben des Herstellers deutlich übertrafen. Größere Unterschiede zwischen der durchschnittlichen Partikelgröße im Peak 1 Mean und dem Z-Average-Wert wurden nicht nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine stabile Partikelsuspension ohne größere Agglomerate vorlag.

Tabelle 5.2 Partikelgröße in dem Medium Wasser am Beispiel einer  $\text{TiO}_2$  Konzentration von  $50\mu\text{M}$ 

	$\text{TiO}_2$ $50\mu\text{M}$	
	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)
<b>Replikate</b>		
<b>1</b>	184,6	185,6
<b>2</b>	190	185,8
<b>3</b>	189,2	182,9
<b>MW</b>	<b>187,93</b>	<b>184,77</b>
<b>SA</b>	2,91	1,62

Die Anwendung der Wasser-Partikelsuspension war auf Grund der osmotischen Wirkung von Wasser auf Zellen jedoch nicht möglich, infolgedessen wurden zur Durchführung der *in vitro*-Toxizitätsassays diese Partikel in dem Zellkulturmedium Airways verdünnt und erneut mit Hilfe des Zetasizers vermessen (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Darstellung der Partikelgröße von  $\text{TiO}_2$   $1\mu\text{M}$  und  $\text{TiO}_2$   $50\mu\text{M}$  in Airways Medium

	$\text{TiO}_2$ $1\mu\text{M}$		$\text{TiO}_2$ $50\mu\text{M}$	
	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)
<b>Replikate</b>				
<b>1</b>	217	2568	952,9	1475
<b>2</b>	68,63	4421	877	1617
<b>3</b>	38,57	4492		
<b>4</b>	54,97	3796		
<b>MW</b>	<b>94,79</b>	<b>3819,25</b>	<b>914,95</b>	<b>1546,00</b>
<b>SA</b>	82,39	890,85	53,67	100,41

Tabelle 5.3 fasst mehrere Replikate einer Messung mit einer Titandioxid-Konzentration von  $1\mu\text{M}$  bzw.  $50\mu\text{M}$  zusammen. Abhängig von den zur Verfügung stehenden Partikelsuspensionen wurden zwischen 2-6 Ansätze pro Versuch vermessen. Die durchschnittliche Größe der Partikel im Peak 1 Mean lag bei  $95\text{nm}$  bzw.  $915\text{nm}$ . Der Z-Average-Wert zeigt, dass die Partikel eine durchschnittliche Gesamtgröße von  $3819\text{nm}$  bzw.  $1546\text{nm}$  besaßen. Die hohe Diskrepanz zwischen der durchschnittlichen Größe der Partikel im Peak 1 Mean und dem Z-Average-Wert zeigt, dass große Agglomerate in der Zellkultursuspension vorhanden waren. Des Weiteren war die teilweise sehr hohe Standardabweichung der Messungen, im folgenden SA abgekürzt, ebenfalls ein Indiz für das Vorhandensein großer Agglomerate mit ungleichmäßiger Verteilung.

Das Zellkulturmedium Airways stellte sich auf Grund der großen und instabilen Partikel in der Airwaysmedium-Partikelsuspension für die Durchführung der *in vitro*-Toxizitätsassay als unbrauchbar dar. Infolgedessen und da die Verdünnung der Partikel in Wasser auf Grund der osmotischen Wirkung auf Zellen nicht möglich war, wurde die Größe der Partikel im Folgenden in Krebs-Ringer (pH 7,4)-Lösung- und PBS (pH 7,4)-Suspensionen bestimmt. Eine weitere Stabilität der Partikel sollte durch das Hinzufügen von 1% BSA in die zu testenden Puffer PBS und Krebs-Ringer (KR) erreicht werden. Der stabilisierende Effekt von BSA und die dadurch resultierende Verringerung der Agglomeration konnte bereits in verschiedenen Studien für Gold-, Aluminiumhydroxid- und polymere Nanopartikel nachgewiesen werden (Lucocq & Baschong, 1986; Deschaume et al., 2006; Cedervall et al., 2007). Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen konnte die stabilisierende Wirkung auf die Partikel durch 1% BSA bestätigt werden (Anhang: Tabelle 8.1, Tabelle 8.2). Die Umstellung des Mediums sowie die Zugabe von 1% BSA führten zu einer deutlichen Abnahme der Gesamtpartikelgröße (Tabelle 5.4).

**Tabelle 5.4 Darstellung der Partikelgröße von TiO<sub>2</sub> 1µM und TiO<sub>2</sub> 50µM in PBS/1%BSA und KR/1%BSA**

	PBS/1%BSA				KR/1%BSA			
	TiO <sub>2</sub> 1µM		TiO <sub>2</sub> 50µM		TiO <sub>2</sub> 1µM		TiO <sub>2</sub> 50µM	
	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)
<b>Replikate</b>								
<b>1</b>	215,5	233,4	622,9	627,7	285,3	1056	778,7	785,2
<b>2</b>	223,1	191,1	617,2	620,7	261,6	1162	752	758,8
<b>3</b>			510,9	519,9	181,8	1447	671,7	770,2
<b>4</b>			440,7	516,2				
<b>MW</b>	<b>219,30</b>	<b>212,25</b>	<b>547,93</b>	<b>571,13</b>	<b>242,90</b>	<b>1221,67</b>	<b>734,13</b>	<b>771,40</b>
<b>SA</b>	5,37	29,91	88,11	61,37	54,22	202,21	55,69	13,24

Der Z-Average-Wert für TiO<sub>2</sub> 50µM konnte in PBS/1%BSA, im Gegensatz zu Airwaysmedium, von 1546nm auf 571nm reduziert werden. Des Weiteren führte die Umstellung des Mediums auf PBS-Puffer plus 1% BSA zu einer Abnahme der Partikelgröße im Peak 1 Mean. Dieser konnte für TiO<sub>2</sub> 50µM von 915nm auf 548nm reduziert werden. Eine deutliche Abnahme sowohl des Z-Average-Wertes als auch des Peak 1 Mean von 1546nm auf 771nm bzw. 915nm auf 734nm konnte für TiO<sub>2</sub> 50µM auch bei KR/1%BSA nachgewiesen werden. Der Z-Average-Wert für TiO<sub>2</sub> 1µM konnte in PBS/1%BSA von 3819nm auf 212nm reduziert werden. Die Messung des Peak 1 Mean zeigte jedoch eine Zunahme von 95nm in Airwaysmedium auf 219nm in PBS/1%BSA. Eine deutliche Abnahme des Z-Average-Wertes von 3819nm auf 1222nm konnte für TiO<sub>2</sub> 1µM auch bei KR/1% BSA nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, zeigte sich bei der Messung des Peak 1 Mean eine leichte Zunahme von 95nm in Airways Medium auf 242nm in KR/1%BSA. Die geringeren Unterschiede zwischen der Partikelgröße des Z-Average und dem Peak 1 Mean weisen darauf hin, dass durch die Umstellung des Mediums und der Zugabe von 1% BSA eine größere Stabilität der Partikel erreicht werden konnte.

Dieser Effekt wird auch durch die im Vergleich zu den Messungen in Airwaysmedium geringere SA sichtbar.

In vier parallel durchgeführten Untersuchungen wurden die Partikel in einem Ultraschallbad für 4 Stunden behandelt und anschließend ihre Größe mittels Zetasizer bestimmt (Tabelle 5.5).

**Tabelle 5.5 Darstellung des Ultraschall- (US) Effektes nach 4h auf die Partikelgröße von  $\text{TiO}_2$   $1\mu\text{M}$  und  $\text{TiO}_2$   $50\mu\text{M}$  am Beispiel von KR/1%BSA**

	<b>KR/1%BSA</b>			
	<b><math>\text{TiO}_2</math> <math>1\mu\text{M}</math></b>		<b><math>\text{TiO}_2</math> <math>50\mu\text{M}</math></b>	
	<b>Pk1 Mean (nm)</b>	<b>Z-Ave (nm)</b>	<b>Pk1 Mean (nm)</b>	<b>Z-Ave (nm)</b>
<b>Replikate</b>				
<b>1</b>	285,3	1056	778,7	785,2
<b>2</b>	261,6	1162	752	758,8
<b>3</b>	181,8	1447	671,7	770,2
<b>MW ohne US</b>	<b>242,90</b>	<b>1221,67</b>	<b>734,13</b>	<b>771,40</b>
<b>SA</b>	54,22	202,21	55,69	13,24
<b>Replikate</b>				
<b>1</b>	297,3	670,8	536,4	613,5
<b>2</b>	270,5	722,6	537,1	619,4
<b>3</b>	267,5	699,7	572,4	610,8
<b>MW mit US</b>	<b>278,43</b>	<b>697,70</b>	<b>548,63</b>	<b>614,57</b>
<b>SA</b>	16,41	25,96	20,59	4,40

Die Messergebnisse am Beispiel von KR/1%BSA (Tabelle 5.5) zeigen, dass durch die Ultraschallbehandlung eine weitere Reduktion der Partikelgröße erreicht werden konnte. Der Z-Average-Wert für  $\text{TiO}_2$   $1\mu\text{M}$  konnte durch die Ultraschallbehandlung von 1222nm auf 698nm bzw. für  $\text{TiO}_2$   $50\mu\text{M}$  von 771nm auf 615nm reduziert werden. Die Partikelgröße im Peak 1 Mean konnte durch die Ultraschallbehandlung bei einer  $\text{TiO}_2$ -Konzentration von  $50\mu\text{M}$  von 734nm auf 549nm reduziert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer Partikelkonzentration von  $1\mu\text{M}$  eine leichte Erhöhung der Partikelgröße im Peak 1 Mean von 243nm ohne Ultraschallbehandlung auf 278nm mit Ultraschallbehandlung. Auch anhand der SA lässt sich erkennen, dass durch die Ultraschallbehandlung eine höhere Stabilität der Partikelgröße erreicht werden konnte. Die Messung des  $\text{TiO}_2$   $1\mu\text{M}$  zeigte jedoch nach der Ultraschallbehandlung noch immer einen deutlichen Unterschied zwischen der Partikelgröße im Peak 1 Mean (278,43nm) und im Z-Average (697,70nm). Dies deutet darauf hin, dass auch nach der Ultraschallbehandlung noch einige wenige, größere Aggregate vorhanden waren, die außerhalb des Größenmessbereichs des Zetasizers lagen.

Die durchgeführten Langzeitmessungen bis zu 30 Stunden nach 4 stündiger Ultraschallbehandlung (n=6) zeigten sowohl in KR/1%BSA als auch in PBS/1%BSA eine verbesserte Stabilität der Partikelgröße (Daten nicht gezeigt).

Bei allen Partikelmessungen konnte insgesamt kein deutlicher Unterschied der Größe der Partikel in PBS/1%BSA bzw. KR/1%BSA ausgemacht werden, so dass die Entscheidung zwischen den beiden Medien aufgrund der nachfolgenden Ergebnisse der MTT- und LDH-Versuche getroffen wurde.

## 5.4 *In vitro*-Assays

Zum Nachweis eines möglichen Einflusses von Titandioxidpartikel auf die Vitalität bzw. Membranintegrität der Zellen wurden zwei verschiedene Vitalitätstests durchgeführt.

Der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assay basiert auf der Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand der Zellen. LDH wird aus Membranbeschädigten Zellen freigesetzt und ist somit im Überstand nachweisbar. Die LDH-Aktivität wird indirekt mittels eines enzymatischen Tests photometrisch bestimmt. Je höher der Grad der Zellschädigung bzw. des Verlusts der Membranintegrität, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Überstand (Kapitel 4.5.3).

Durch den MTT-Assay wird die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen bestimmt, indem die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen gemessen wird. Stoffwechselaktive Zellen reduzieren das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenylterazoliumbromid) zu wasserunlöslichen violetten Formazankristallen, diese werden durch Zugabe der Solubilisierungslösung aufgelöst. Die Absorption des löslichen Formazan wird ebenfalls photometrisch bestimmt und korreliert mit der mitochondrialen Aktivität als Index der Vitalität und Stoffwechselaktivität (Kapitel 4.5.4).

Bei sichtbaren Kontaminationen (z.B. Bakterien, Verschmutzungen) wurden einzelne Wells in allen Versuchen aus der nachfolgenden Auswertung ausgeschlossen.

## 5.4.1 Etablierung der *in vitro*-Assays

### 5.4.1.1 Auswahl des Puffers

Im Folgenden wurden LDH- und MTT-Assays sowohl mit PBS/1%BSA als auch mit KR/1%BSA (Tabelle 5.6 und Tabelle 5.7) durchgeführt, um eine Entscheidung darüber treffen zu können, welcher der in Kapitel 5.3 ausgewählten Puffer für die Durchführung der *in vitro*-Assays am besten geeignet ist.

Als Auswahlkriterium bei den Vorversuchen des LDH-Assays wurde der Vergleich des Maximalrelease (MR) mit dem Spontanrelease (SR) der Zellen einer Zelllinie herangezogen. Als Maximalrelease dienten dabei die Überstände von Zellen, die zuvor durch Zugabe eines Lysepuffers vollständig lysiert worden waren. Ein hoher Spontanreleaseanteil weist auf eine Schädigung oder eine hohe Sterberate der verwendeten Zellen hin. Ein hoher Spontanreleaseanteil kann zum einen durch den bei der Versuchsdurchführung verwendeten Puffer während der Inkubationszeit verursacht werden oder ein Hinweis darauf sein, dass die Zellen unabhängig von den Versuchen bereits vorgeschädigt waren.

**Tabelle 5.6 LDH-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 490nm zwischen den Puffer PBS/1%BSA und KR/1%BSA am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 289 mit jeweils 20.000 Zellen/Well (MR: Maximalrelease (100%); SR:Spontanrelease). (Rohdaten: Anhang Tabelle 8.3)**

	PBS/1%BSA		KR/1%BSA	
	MR	SR	MR	SR
<b>MW</b>	<b>3,22</b>	<b>2,52</b>	<b>2,72</b>	<b>1,73</b>
<b>SA</b>	0,04	0,06	0,09	0,00
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MR</b>	<b>100%</b>	<b>78%</b>	<b>100%</b>	<b>54%</b>

Der LDH-Assay zeigte im Vergleich zum Maximalrelease, welcher als 100% gesetzt wurde, bei PBS/1%BSA einen Spontanrelease von 78%. Bei der Messung in KR/1%BSA konnte in den Vorversuchen ein Spontanrelease von 54% nachgewiesen werden (Tabelle 5.6). Der hohe Spontanrelease und die gemessenen Unterschiede lassen vermuten, dass bereits beide Puffer während der Versuchsdauer zu einer Schädigung der Zellen führen. Jedoch zeigten die Ergebnisse mit KR/1%BSA Puffer geringfügig bessere Werte als mit PBS/1%BSA-Puffer.

Als Auswahlkriterium bei den Vorversuchen des MTT-Assays wurde der Vergleich der 0h und 4h MTT-Werte herangezogen. Der 4h MTT-Wert gibt an, wie viel MTT während der 4-stündigen Inkubationszeit durch die mitochondriale Dehydrogenase der stoffwechselaktiven Zellen zu wasserunlöslichen, violetten Formazankristallen reduziert wird. Der 0h MTT-Wert dient als Ausgangswert. Ist die Differenz zwischen dem 4h-Wert und dem 0h-Wert gering, weist dies auf einen geringen Stoffwechsel hin, dieser Effekt wird bei geschädigten Zellen beobachtet. Umgekehrt lässt eine große Differenz zwischen dem 0h- und dem 4h-Wert auf eine hohe Stoffwechselaktivität und gesunde Zellen schließen.

**Tabelle 5.7 MTT-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 565nm zwischen den Puffern PBS/1%BSA und KR/1%BSA am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 289, mit jeweils 20.000 Zellen/Well. (Rohdaten: Anhang Tabelle 8.4)**

	PBS/1%BSA		KR/1%BSA	
	4h MTT	0h MTT	4h MTT	0h MTT
<b>MW</b>	<b>0,10</b>	<b>0,04</b>	<b>0,17</b>	<b>0,04</b>
<b>SA</b>	0,02	0,00	0,01	0,00
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MTT 4h Wert</b>	<b>100%</b>	<b>39%</b>	<b>100%</b>	<b>23%</b>

Der MTT-Assay zeigte bei PBS/1%BSA einen 0h MTT-Wert von 39% in Relation zu dem 4h MTT-Wert (100%). Bei der Messung in KR/1%BSA konnte in den Vorversuchen ein 0h MTT-Wert von 23% nachgewiesen werden (Tabelle 5.7).

Sowohl der LDH- als auch der MTT-Assay zeigten, dass der KR/1%BSA-Puffer für die *in vitro*-Assays besser geeignet ist als der PBS/1%BSA-Puffer.

#### **5.4.1.2 Vitalitätsbestimmung der primären Epithelzellkulturen**

Die Ergebnisse des LDH- bzw. MTT-Assays (Kapitel 5.4.1.1) legten die Vermutung nahe, dass die in dieser Arbeit getesteten primären Epithelzellen eine geringe Vitalität aufwiesen. Des Weiteren lassen die erhobenen Daten jedoch auch einen toxischen Effekt durch die Inkubation der Zellen in KR/1%BSA während der Versuchsdauer vermuten. Zur Bestätigung dieser Vermutung, wurde der Spontanrelease der Zelllinie NM 429/30, der im LDH-Versuch (Kapitel 5.4.2) 71% (KR/1%BSA) betrug, zusätzlich im Zellkulturmedium Airways bestimmt (Tabelle 5.8). Hierbei zeigte sich eine deutlich geringere Spontanreleaserate von 25% in Relation zum Maximalrelease. Dieses Ergebnis bestätigt die zellschädigende Wirkung des Puffers während der Versuchsdauer und weist darauf hin, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit neu etablierten Zelllinien, um gesunde stoffwechselaktive Zellkulturen handelt.

**Tabelle 5.8 LDH-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 490nm zwischen Airwaysmedium und KR/1%BSA-Puffer am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 429/30 mit jeweils 15.000 Zellen/Well (MR: Maximalrelease (100%); SR:Spontanrelease). (Rohdaten: Anhang Tabelle 8.5)**

	Airwaysmedium		KR/1%BSA	
	MR	SR	MR	SR
<b>MW</b>	<b>1,16</b>	<b>0,30</b>	<b>0,98</b>	<b>0,69</b>
<b>SA</b>	0,22	0,04	0,24	0,04
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MR</b>	<b>100%</b>	<b>25%</b>	<b>100%</b>	<b>71%</b>

In einem weiteren Versuch wurde die Stoffwechselaktivität einer 2 Wochen alten NM-Kultur (NM 412) in Airwaysmedium im Vergleich zu zwei permanenten Zelllinien (MCF 7 und H 1299) mittels MTT-Assay untersucht.

Dieser Versuch zeigte bei den primären NM 412-Zellen einen 0h MTT-Wert von 12% in Relation zu dem 4h MTT-Wert. Die Messung der permanenten Bronchialkarzinomzelllinie H 1299 ergab einen 0h MTT-Wert von 13% und bei den permanenten Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF 7 konnte ein 0h MTT-Wert von 4% nachgewiesen werden (Tabelle 5.9). Die vergleichbar große Differenz zwischen den 0h- und 4h MTT-Werten von NM 412 und H 1299 zeigt, dass die primären Epithelzellkulturen in Airwaysmedium eine ähnlich hohe Stoffwechselaktivität wie permanente Zellen besitzen und in ihrer Stoffwechselaktivität nicht limitiert sind.

**Tabelle 5.9** Vergleich der Vitalität zwischen primärer und permanenter Tumorzelllinie in Airwaysmedium (NM 412: 2 Wochen alt, 15.000 Zellen/Well; H1299: 10.000 Zellen/Well; MCF 7: 20.000 Zellen/Well). (Rohdaten: Anhang Tabelle 8.6)

	NM 412		H 1299		MCF 7	
	4h MTT	0h MTT	4h MTT	0h MTT	4h MTT	0h MTT
<b>MW</b>	<b>0,30</b>	<b>0,04</b>	<b>0,49</b>	<b>0,06</b>	<b>1,06</b>	<b>0,04</b>
<b>SA</b>	0,02	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MTT 4h Wert</b>	<b>100%</b>	<b>12%</b>	<b>100%</b>	<b>13%</b>	<b>100%</b>	<b>4%</b>

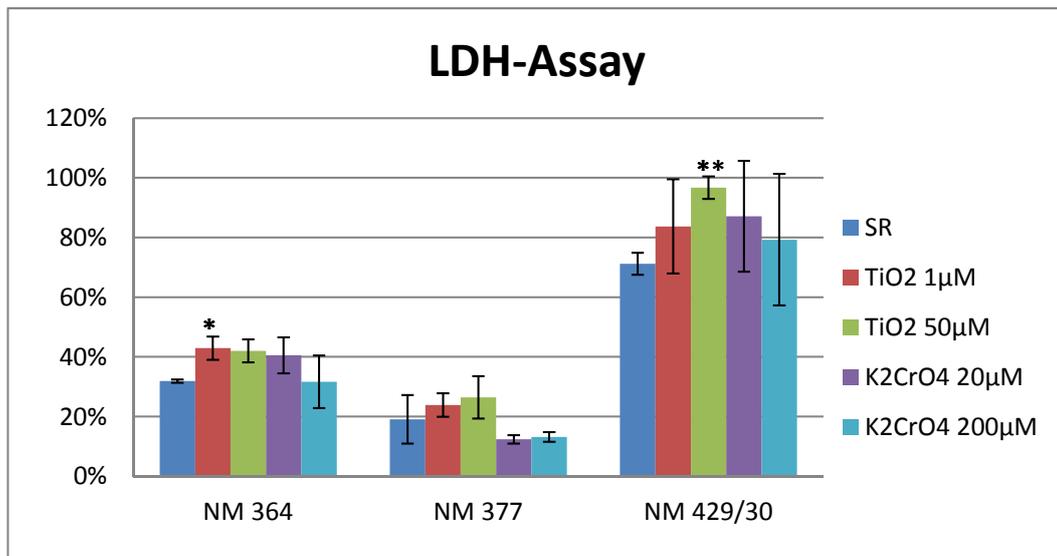
### 5.4.2 LDH-Assay

Die Auswirkung von Titandioxid-Partikel auf die Membranintegrität der kultivierten Zellen wurde anhand mehrerer voneinander unabhängigen LDH-Assays unter in dieser Arbeit standardisierten Bedingungen in KR/1%BSA-Puffer untersucht. Mit KR/1%BSA-Puffer wurde zuvor eine deutlich kleinere Gesamtpartikelgröße im Vergleich zum Zellkulturmedium Airways (Kapitel 5.3) und eine geringere Schädigung der Zellen während des Versuchs im Vergleich zu PBS/1%BSA-Puffer (Kapitel 5.4.1.1) nachgewiesen.

Die Toxizitätsassays wurden parallel zu der Versuchsreihe mit TiO<sub>2</sub>-Partikel mit Kaliumchromat durchgeführt, da eine genotoxische Wirkung von Kaliumchromat auf humane bronchiale Epithelzellen bereits in der Literatur beschrieben ist (Xia et al., 2011; Caglieri et al., 2008; Russo et al., 2005; Singh et al., 1999).

Zum Erreichen einer Vergleichbarkeit der Versuchsreihen und einer möglichst geringen Vorschädigung bzw. Schädigung der Zellen während der Inkubation in KR/1%BSA-Puffer, wurden nur primäre Epithelzelllinien verwendet, welche maximal 1-2 Wochen alt waren. Alle Zellkulturen sind zuvor nach dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll C isoliert und kultiviert worden (Kapitel 5.2). Folgende Grafik (Abbildung 5.5) zeigt die Absorptionsmessergebnisse des LDH-Assays der primären Epithelzelllinien NM 364, NM 377 und NM 429/30 bei einer Wellenlänge von 490nm. Alle Zellen wurden in einer exakt definierten Zellzahl von 15.000 (NM 377; NM 429/30) bzw. 20.000 (NM 364) Zellen/Well, abhängig von der jeweils zur Verfügung stehenden Zellzahl, ausgesät. Eine Messreihe der Grafik setzt sich aus 3-8 gemessenen Wells pro Zelllinie (n=3) mit Zugabe von TiO<sub>2</sub>-Partikel bzw. Kaliumchromat zusammen. Die Messwerte des Spontan- bzw. Maximalrelease wurden in 3-8 Wells pro Zelllinie (n=3) ohne die Zugabe von Noxen bestimmt. Je höher der Grad der Zellschädigung bzw. des Verlusts der Membranintegrität desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Überstand. Bei der statistischen Auswertung der Testergebnisse wurde die spontane LDH-Ausschüttung der Zellen (Spontanrelease) ohne den Einfluss von Noxen mit der Erhöhung bzw. Verminderung der LDH-Ausschüttung unter Einfluss der Noxen verglichen. Für die Auswertung wurde die gemessene LDH-Ausschüttung auf den Maximalreleasewert der einzelnen Zelllinien bezogen und in Prozent graphisch dargestellt.

Abbildung 5.5 zeigt in den drei untersuchten Zelllinien, dass die Inkubation der Zellen mit TiO<sub>2</sub> Partikel (1µM und 50µM) zu einer Erhöhung der LDH-Ausschüttung in allen Nasenmuscheln (NM)- Zelllinien führt. Eine signifikante Erhöhung der LDH-Ausschüttung im Vergleich zum Spontanrelease ohne Noxen lässt sich jedoch nur für die Zelllinie NM 364 mit TiO<sub>2</sub> 1µM und die Zelllinie NM 429/30 mit TiO<sub>2</sub> 50µM nachweisen. Durch die Inkubation mit Kaliumchromat wurde eine Erhöhung der LDH-Ausschüttung ausgehend vom Spontanrelease nur für die Zelllinien NM 364 und NM 429/30 gemessen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer Zelllinie NM 377 eine Reduktion der LDH-Ausschüttung als Folge der Inkubation mit Kaliumchromat. Eine signifikante Erhöhung bzw. Verminderung der LDH-Ausschüttung durch K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.5 LDH Assay: Primäre Nasenmuschelepithelzellen wurden für 4h mit verschiedenen Konzentrationen von TiO<sub>2</sub> Partikeln (1µM, 50µM) bzw. Kaliumchromat (20µM, 200µM) in KR/1%BSA-Puffer inkubiert und die gemessene LDH-Ausschüttung bezogen auf den Maximalrelease (MR) in Prozent graphisch dargestellt.**  
**Signifikanzberechnung: Mittelwerte ± SA der mit Noxen inkubierten Zellen im Vergleich zum SR-Wert der unbehandelten Kontrolle [\* p ≤ 0.05; \*\* p ≤ 0.01; \*\*\* p ≤ 0.001]**

Bereits bei den noxenunabhängig gemessenen Spontanreleaseanteilen konnten große Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien beobachtet werden. So zeigte die Zelllinie NM 364 in Relation zum Maximalrelease einen Spontanrelease von 32%, die Zelllinie NM 377 einen ähnlich hohen Spontanrelease von 19%. Im Gegensatz dazu zeigte die Zelllinie NM 429/30 einen vergleichsweise sehr hohen Spontanrelease von 71%. Die Zelllinien NM 364 und NM 429/30 waren zwei Wochen alt und die Zelllinie NM377 eine Woche alt. Die detaillierten Ergebnisse der einzelnen Messreihen sowie die Berechnung der Spontanreleaseanteile können dem Anhang (Tabelle 8.7 - Tabelle 8.15) entnommen werden.

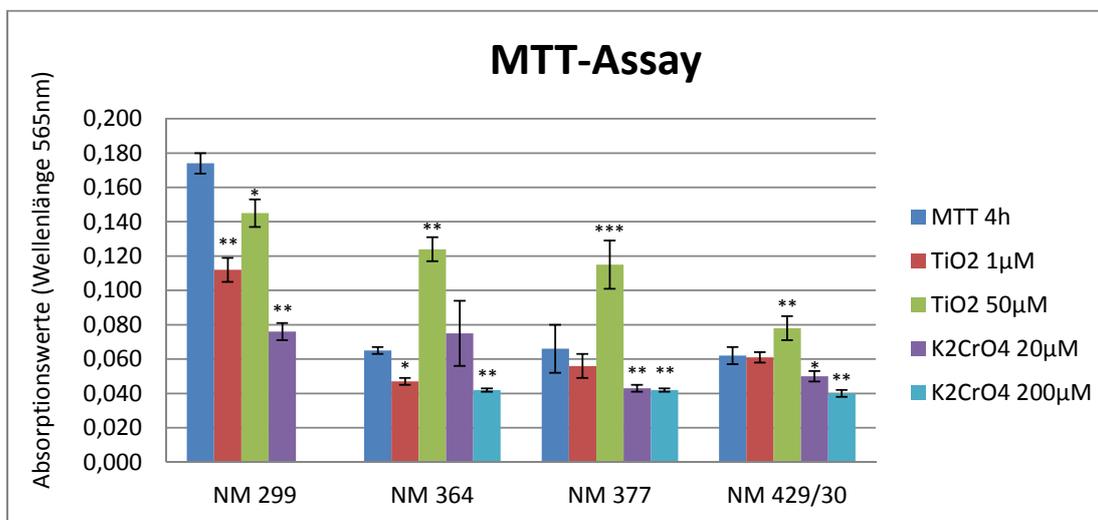
### 5.4.3 MTT-Assay

Zur Messung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen kultivierter Zellen wurden mehrere voneinander unabhängige MTT-Assays unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Analog zu den durchgeführten LDH-Assays (Kapitel 5.4.2) wurde KR/1%BSA-Puffer zur Versuchsdurchführung verwendet und Kaliumchromat parallel zu der Versuchsreihe mit TiO<sub>2</sub>-Partikel ausgetestet.

Eine Vergleichbarkeit der Versuchsreihen wurde dadurch angestrebt, dass nur maximal 1-2 Wochen alte, primäre Epithelzelllinien verwendet wurden, welche nach dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll C isoliert und kultiviert worden waren. Die folgende Grafik (Abbildung 5.6) zeigt die Absorptionsergebnisse des MTT-Assays der primären Epithelzelllinien NM 299, NM 364, NM 377 und NM 429/30 bei einer Wellenlänge von 565nm. Die Epithelzelllinien wurden in einer exakt definierten Zellzahl von 15.000 (NM 377; NM 429/30) bzw. 20.000 (NM 299; NM 364) Zellen/Well ausgesät. Eine Messreihe der Grafik setzt sich aus 3-8 Messpunkten pro Zelllinie (n=4) und TiO<sub>2</sub>-Partikel bzw. Kaliumchromat zusammen. Die Messwerte des 0h bzw. 4h MTT-Werts wurden in 3-8 Wells pro Zelllinie (n=4) ohne die Zugabe von Noxen bestimmt. Der 4h MTT-Wert der unbehandelten Kontrolle gibt an, wie viel MTT während der 4-stündigen Inkubationszeit durch die mitochondriale Dehydrogenase der stoffwechselaktiven Zellen zu wasserunlöslichen, violetten Formazankristallen reduziert wird. Der 4h MTT-Wert der mit Noxen inkubierten Zellen zeigt, wie hoch die Stoffwechselaktivität innerhalb von 4h unter dem Einfluss der Noxen ist. Vergleicht man den 4h MTT-Wert der mit den unterschiedlichen Noxen inkubierten Zellen mit dem 4h MTT-Wert der unbehandelten Kontrolle lässt sich erkennen, ob der Einfluss der Noxen zu einer Zunahme oder Abnahme der mitochondrialen Aktivität und somit auch der Vitalität der Zellen geführt hat. Für die Auswertung wurden die gemessenen Absorptionswerte im Vergleich zu unbehandelten Zellen (MTT4h-Werte) der einzelnen Zelllinien graphisch dargestellt.

In den bislang vier getesteten Zelllinien zeigte sich als Folge einer Inkubation der Zellkultur mit TiO<sub>2</sub> 1µM in allen getesteten Zelllinien eine Stoffwechselabnahme, diese war jedoch nur bei den Zellen der NM 299 und NM 364 signifikant. Durch die Inkubation der Zellkultur mit TiO<sub>2</sub> 50µM konnte sowohl eine signifikante Erhöhung der mitochondrialen Aktivität in den Zelllinien NM 364, NM 377 und NM 429/30, als auch eine signifikante Verminderung der mitochondrialen Aktivität (NM 299)

nachgewiesen werden. Die Inkubation der Zelllinien mit Kaliumchromat zeigte bei einer Konzentration von 200µM eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Aktivität in allen drei getesteten Zellreihen (die Zelllinie NM 299 wurde nur mit einer Kaliumchromatkonzentration von 20µM getestet). Im Gegensatz dazu wurde bei einer Kaliumchromatkonzentration von 20µM sowohl eine Zunahme (NM 364) als auch eine signifikante Verminderung der mitochondrialen Aktivität gemessen (NM 299, NM 377, NM 429/30).



**Abbildung 5.6 MTT-Assay:** Primäre Nasenmuschelepithelzellen wurden für 4h mit unterschiedlichen Konzentrationen von TiO<sub>2</sub> Partikeln (1µM, 50µM) bzw. Kaliumchromat (20µM, 200µM) in KR/1%BSAPuffer inkubiert und die gemessene Absorptionswerte im Vergleich zu unbehandelten Zellen (MTT4h-Werte) graphisch dargestellt. Signifikanzberechnung: Mittelwerte ± SA der mit Noxen inkubierten Zellen im Vergleich zum 4h MTT-Wert der unbehandelten Kontrolle [\* p ≤ 0.05; \*\* p ≤ 0.01; \*\*\* p ≤ 0.001]

Analog zum LDH-Assay (Kapitel 5.4.2) zeigte auch der MTT-Assay noxenunabhängige Unterschiede im Stoffwechsel der verwendeten Zelllinien. Die Zelllinien NM 364, NM 377 und NM 429/30 wiesen in diesem Versuch jedoch geringe Unterschiede zwischen den 0h MTT-Werten (0,038 – 0,042) und entsprechenden 4h MTT-Werten (0,062 – 0,066) auf. Im Gegensatz dazu zeigte die Zelllinie NM 299 eine deutlich größere Differenz zwischen dem 0h MTT-Wert (0,041) und dem 4h MTT-Wert (0,174). Dies weist auf eine deutlich höhere Stoffwechselaktivität der Zelllinie NM 299 im Vergleich zu den anderen getesteten

Zelllinien hin. Die detaillierten Ergebnisse der einzelnen Messreihen können dem Anhang (Tabelle 8.16 - Tabelle 8.27) entnommen werden.

## 6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolierung und Kultivierung von primären humanen respiratorischen Epithelzellen der Nasennebenhöhlen und der Concha nasalis inferior etabliert. Die Charakterisierung des Ausgangsgewebes als auch der Primärzellkultur erfolgte mittels histologischer und immunhistologischer Färbungen. In einem weiteren Schritt wurde anhand der etablierten Zellkulturen die zellulären Reaktionen nach TiO<sub>2</sub>-Partikelinkubation auf die Zellviabilität und die Membranintegrität mittels eines MTT-, bzw. LDH-Assays untersucht.

### 6.1 Primäre Epithelzellkultur

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es einen möglichen Einfluss von TiO<sub>2</sub>-Partikeln an primären respiratorischen Epithelzellkulturen nachzuweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Kultivierung primärer Epithelzellen, trotz der bekannten Nachteile primärer Zellkulturen (u.a. Schwierigkeiten in der Anzucht, geringere Zellausbeute, die mit Kulturdauer zunehmende Dedifferenzierung), etabliert werden. Bislang kamen bei Studien, welche den Einfluss von Nanopartikeln an respiratorischen Epithelzellen zeigen, vor allem Zelllinien eines Adenokarzinoms der Lunge (A 549) zum Einsatz (Pulskamp et al., 2007; Shi Y. et al., 2010; Hsiao et al., 2011). Permanente Zelllinien weisen, im Gegensatz zu primären Zelllinien, eine hohe Wachstumsrate auf und stehen somit in ausreichend großen Mengen für unterschiedliche Versuche nahezu unbegrenzt zur Verfügung. Außerdem lassen sie sich zeitlich unbegrenzt kultivieren, weisen eine hohe Zellhomogenität auf und die Methoden zur Kultivierung der Zellen sind seit Jahren etabliert. Der große Nachteil ist jedoch, dass sich Lungenkarzinomzellen grundlegend von natürlicherweise mit Nanopartikeln exponierten gesunden Zielzellen unterscheiden.

Die Isolierung der primären humanen respiratorischen Zellen sollte zu einer möglichst hohen Zellanzahl führen, wobei eine Kontamination durch andere Zellen wie z. B. Fibroblasten verhindert werden sollte. In der Frühphase der Etablierung

wurden die Zellen mittels der Explantattechnik (Wiesel et al., 1983) aus dem Gewebeverband isoliert (Kapitel 5.2, Protokoll A). Aus einigen Stückchen begannen die ersten Zellen erst nach zirka einer Woche auszuwachsen. Darüber hinaus lösten sich während der ersten Wochen der Kultivierung viele der Gewebestückchen vom Boden der Zellkulturschale. Diese Nachteile der Explantattechnik wurden bereits von Wu und Mitarbeitern (1985) beschrieben. In der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung der Zellkultur betrug der Anteil Cytokeratin-positiver Zellen durchschnittlich nur 70%.

Als effizienteste Methode zur Isolation der Epithelzellen stellte sich die Behandlung des Materials mit Pronase heraus (Kapitel 5.2, Protokoll C). Das Pronase-Medium bewirkt den Verdau verschiedener Proteine auf der Zelloberfläche. Dies führt zu einem Verlust der Zell-Zellkontakte und somit zu einer Auflockerung der zellulären Verbände. Der Vorteil dieser enzymatischen Isolationstechnik ist die große Zellausbeute (Merkle et al., 1998). Die mittels Protokoll C im Rahmen dieser Arbeit isolierten und in *Airway Epithelial Cell Basal Medium* kultivierten humanen respiratorischen Epithelzellen ließen sich gut in Monolayerkulturen vermehren. Das *Airways Epithelial Cell Basal Medium* bietet in Kombination mit *Airways Growth Factor Supplement* optimale Wachstumsbedingungen für humane respiratorische Epithelzellen. Die respiratorischen Epithelzellen besaßen die typische „kopfsteinpflasterartige“ Form (Hanamure et al., 1994). Wie bereits in der Literatur beschrieben, verloren die Epithelzellen in der Monolayerkultur im Laufe der Kultivierung ihre Zillien (Jorissen et al., 1989; Rautiainen et al., 1993). Mit Hilfe des Protokolls C konnte in der im Anschluss durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung ein Anteil Cytokeratin-positiver Zellen von 100% erreicht werden. Der Anteil an gleichzeitig Vimentin-positiven Zellen lag bei durchschnittlich 50%, wobei sich die Anzahl der gleichzeitig Cytokeratin- und Vimentin-positiven Zellen über die Kulturdauer erhöhte. Die Beobachtung von gleichzeitig Cytokeratin- und Vimentin-positiven isolierter Epithelzellen ist in der Literatur beschrieben (De Jong et al., 1993) und kein Nachweis einer möglichen Kontamination durch Fibroblasten. Eine mögliche Kontamination durch Fibroblasten konnte durch eine regelmäßige Überwachung auf Grund deutlicher Morphologieunterschiede zwischen den respiratorischen Epithelzellen und Fibroblasten ausgeschlossen werden.

## 6.2 Titandioxid-Nanopartikel

Die in dieser Arbeit als Nanopartikel für die Toxizitätsversuche getesteten „Titan IV Oxid Nanopartikel“ werden, laut Hersteller, in einer Partikelgröße von kleiner 75nm in einer Suspension mit Wasser angeboten und bestehen aus einer Mischung zwischen der Rutil- und der Anatasform des Titandioxids. Die durchgeführten Zetasizermessungen (Kapitel 5.3) zeigten jedoch, dass die  $\text{TiO}_2$ -Partikel bereits in der Wassersuspension in einer durchschnittlichen Größe von 185nm vorlagen und damit die Angaben des Herstellers deutlich übertrafen. Diese Diskrepanz zwischen der vorgegebenen Größenangabe des Herstellers und den Ergebnissen der durchgeführten Zetasizermessungen konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Bihari et al., 2008; Jin et al., 2008; Trouiller et al., 2008).

Die Anwendung der Wasser-Partikelsuspension war auf Grund der osmotischen Wirkung von Wasser auf Zellen jedoch nicht möglich. Zur Durchführung der *in-vitro*-Toxizitätsassays wurden die  $\text{TiO}_2$ -Partikel in Airwaysmedium verdünnt. Das Zellkulturmedium Airways stellte sich auf Grund der großen und instabilen Partikel in der Airwaysmedium-Partikelsuspension (Z-Average 3819nm ( $\text{TiO}_2$  1 $\mu\text{M}$ ) bzw. 1546nm ( $\text{TiO}_2$  50 $\mu\text{M}$ ) als unbrauchbar dar (Kapitel 5.3). Infolgedessen wurde die Partikelgröße in Krebs-Ringer-Lösung (KR) und PBS-Puffer bestimmt. Eine weitere Stabilität der Partikel konnte durch die Zugabe von 1% BSA in die zu testenden Puffer PBS und KR und eine anschließende 4-stündige Ultraschallbehandlung erreicht werden. Durch diese Maßnahmen konnte die durchschnittliche Größe der Partikel im Peak 1 Mean, in welchem sich 95% der messbaren Partikel befanden, auf Werte zwischen 280nm ( $\text{TiO}_2$  1 $\mu\text{M}$ ) und 550nm ( $\text{TiO}_2$  50 $\mu\text{M}$ ) reduziert werden. Die Ergebnisse der Zetasizermessungen zeigen, dass trotz verschiedener Modifikationen keine  $\text{TiO}_2$ -Partikel im Nanobereich (< 100nm) hergestellt werden konnten. Die Problematik bezüglich zu großer Partikel in Zellkulturmedium bzw. Puffer ist bekannt und in der Literatur mehrfach beschrieben.

Bihari und Mitarbeiter (2008) beispielsweise verwendeten in ihrer Studie sowohl „anatas Titanium(IV) oxide nanopowder 99,7%“ (Sigma Aldrich, Deutschland) mit einer laut Hersteller durchschnittlichen Größe von kleiner 25nm, als auch „rutil Titanium(IV) oxide nanopowder 99,5%“ (Sigma Aldrich, Deutschland) mit einer laut Hersteller durchschnittlichen Größe von kleiner 100nm. In Wassersuspension lagen

jedoch auch diese TiO<sub>2</sub>-Partikel in einer durchschnittlichen Größe von 641nm (Rutil) bzw. 890nm (Anatas) vor. In PBS-Puffer lag die durchschnittliche Größe der rutilen TiO<sub>2</sub>-Partikel bei 641nm. Um eine signifikante Reduktion der Partikelgröße zu erreichen, wurden die TiO<sub>2</sub>-Partikel von Bihari und Mitarbeitern zunächst in destilliertem Wasser einer einminütigen Ultraschallbadbehandlung bei 7W unterzogen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von humanem Serumalbumin und PBS-Puffer. Durch diese Maßnahmen konnten Bihari und Mitarbeiter eine durchschnittliche Partikelgröße in Wasser von 160nm sowie kleiner 290nm für rutilen TiO<sub>2</sub> in PBS-Puffer erreichen. Im Gegensatz zu Bihari und Mitarbeitern konnten die in unserem Labor verwendeten TiO<sub>2</sub>-Partikel, nach der Ultraschallbehandlung in Puffer und der Zugabe von 1% BSA, lediglich auf durchschnittliche Größe der Partikel im Peak 1 Mean zwischen 280 und 550nm reduziert werden.

Trouiller und Mitarbeiter (2008) verwendeten in ihrer Studie „Aeroxide“ P25 TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel (Evonik Industries, Deutschland). „Aeroxide“ P25 TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel bestehen aus einer Mischung zwischen der Rutil- und der Anatasform des Titandioxids und besitzen laut Hersteller eine durchschnittliche Größe von kleiner 21nm. Die Partikel wurden von Trouiller und Mitarbeitern in Trinkwasser gelöst und im Anschluss einer 15 minütigen Ultraschallbehandlung unterzogen. Im Anschluss lag die durchschnittliche Größe der TiO<sub>2</sub>-Partikel bei 160nm.

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien gelang es Jin und Mitarbeitern (2008) durch verschiedene Modifikationen Partikelsuspensionen mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von kleiner 100nm herzustellen. Jin und Mitarbeiter verwendeten TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel in reiner Anatasform mit einer laut Hersteller (Sunrise Chemical Co., Shanghai, China) durchschnittlichen Partikelgröße von 5nm. Die Nanopartikel wurden in Wasser, PBS-Puffer sowie *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) gelöst und im Anschluss für 5 Minuten einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Partikel wurden ebenfalls an einem Zetasizer vermessen und die durchschnittliche Größe der Partikel betrug 94nm in Wasser, 86nm in PBS-Puffer und 100nm in DMEM. Die Zetasizermessungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten hingegen eine deutlichere Differenz zwischen der durchschnittlichen Partikelgröße in Airwaysmedium und den Puffern KR bzw. PBS (Kapitel 5.3). Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse auf die

verschiedenen Zusammensetzungen des Airwaysmediums bzw. DMEM zurückzuführen. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung dieser Arbeit war die oben genannte Studie noch nicht veröffentlicht. Rückblickend wäre es empfehlenswert, diese Arbeit sowohl mit TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel der Firma Sunrise Chemical Co als auch nach dem Protokoll von Jin und Mitarbeiter erneut durchzuführen.

Borm und Mitarbeiter (2006) haben jedoch gezeigt, dass die Exposition der nasalen Epithelzellen vor allem durch Nanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe um 10nm erfolgt. Um nach Borm und Mitarbeiter optimale Versuchsbedingungen zu erhalten, müssten dementsprechend die Nanopartikel für die Toxizitätsassays in einer durchschnittlichen Größe von kleiner 10nm vorliegen. Kommerzielle Titandioxidnanopartikel sind laut Hersteller ab einer durchschnittlichen Größe von 5nm zu erwerben, jedoch konnte auch in Studien, welche diese Partikel verwendet haben, in Suspension lediglich eine durchschnittliche Partikelgröße von 100nm erreicht werden (Jin et al., 2008). Dies verdeutlicht die Problematik der Toxizitätsforschung mit Nanopartikeln. Die für die nanotoxikologischen Studien verwendeten Nanopartikel sollten in einer exakt definierten Größe vorliegen, in Zellkulturmedien stabil bleiben und keine Agglomerate bilden. Zum derzeitigen Stand der Forschung ist dies jedoch nicht möglich, so dass auf Grund der durch die Zetasizer ermittelten Partikelgrößen in Erwägung gezogen werden muss, dass die durchgeführten Toxizitätsassays nicht den Einfluss von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln zeigen, sondern Ausdruck der Wechselwirkung mit der mikroskaligen Form der TiO<sub>2</sub>-Partikel sind. Es konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, dass Nanopartikel toxischer sind als das gleiche Material in größerer Form (Rennwick et al., 2004). Es gibt jedoch auch Studien, die diese These für TiO<sub>2</sub>-Partikel widerlegen (Karlsson et al., 2009). Einige Studien besagen, dass beim Vorliegen größerer Agglomerate die primäre Partikelgröße nicht mehr als praktische Größe zur Abschätzung der Toxizität gewertet werden darf (Adams et al., 2006). Andere Studien belegten, dass die durchschnittliche Größe der Partikel den Grad der Toxizität bestimmt (Kato et al., 2009; Pauluhn, 2009). Allerdings zeigen Inhalationsstudien mit TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel, dass die Oberflächenverbindungen von Nanopartikelagglomeraten schwach sind. Dieser Effekt führt zu einer Auflösung größerer Agglomerate sobald sich die Partikel auf dem Lungengewebe ablagern, so dass möglicherweise die Nanopartikel ihre Wirkung doch entfalten können (Oberdörster G. et al., 1994).

## 6.3 *In vitro*-Assays

In dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität von TiO<sub>2</sub>-Partikel mit verschiedenen Partikelkonzentrationen (1µM, 50µM) an primären humanen respiratorischen Epithelzellen bewertet. Zur Beurteilung einer möglichen zytotoxischen Wirkung wurden sowohl ein LDH- als auch ein MTT-Assay durchgeführt. Mit Hilfe des MTT-Assays wird die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen bestimmt, indem die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen gemessen wird. Der LDH-Assay basiert auf der Bestimmung der Laktatdehydrogenasemenge (LDH) im Überstand der Zellen. Je höher der Grad der Zellschädigung bzw. der Verlust der Membranintegrität desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH.

### 6.3.1 MTT-Assay TiO<sub>2</sub>-Partikel

Die Ergebnisse des MTT-Assays (Kapitel 5.4.3) deuten an, dass TiO<sub>2</sub>-Partikel einen Einfluss auf humane respiratorische Epithelzellen ausüben. In dieser Arbeit zeigte sich in den vier getesteten Zelllinien eine Stoffwechselabnahme bei einer TiO<sub>2</sub>-Konzentration von 1µM. Diese war bei den Zelllinien NM 299 und NM 364 signifikant. Durch die Inkubation der Zelllinien mit TiO<sub>2</sub> 50µM konnte eine signifikante Erhöhung der Stoffwechselaktivität in den Zelllinien NM 364, NM 377 und NM 429/30 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Zelllinie NM 299 eine signifikante Reduktion der mitochondrialen Aktivität als Folge einer TiO<sub>2</sub>-Exposition (50µM). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die TiO<sub>2</sub>-Partikel in der Konzentration von 1µM potenter in der Zellschädigung waren, während Partikel in der 50µM Konzentration in dem Untersuchungszeitrahmen von 4 Stunden zunächst nur zellulären Stress auslösten, der sich in vorgeschädigten Zellen in einer Erhöhung der Stoffwechselaktivitätsrate zeigte. Eine Erklärung könnte in der sich deutlich unterscheidenden Partikelgröße (TiO<sub>2</sub> 1µM: 280nm; TiO<sub>2</sub> 50µM: 550nm) der beiden eingesetzten Partikelkonzentrationen liegen (Kapitel 5.3). Möglicherweise können die TiO<sub>2</sub>-Partikel (50µM) aufgrund der Partikelgröße nicht mit den Zellen interagieren und somit keine signifikanten Zellschäden verursachen. Der Verdacht, dass vor allem kleine Partikel (Durchmesser ≤500nm) eine Reduktion der

Stoffwechselaktivität bewirken, konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Jin et al., 2008; Liu S. et al., 2010).

Jin und Mitarbeiter (2008) zeigten mit Hilfe eines 24h-MTT-Assays, dass die Inkubation von L929-Zellen mit TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel (durchschnittlichen Partikelgröße 100nm in DMEM) in allen getesteten Konzentrationen (37,5 - 7550µM) eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität bedingt. Des Weiteren konnte in dieser Studie eine Abhängigkeit zwischen dem Ausmaß der Reduktion der Stoffwechselaktivität und der Inkubationszeit nachgewiesen werden (48h MTT-Assay > 24h MTT-Assay). Die Studie von Jin und Mitarbeitern wurde jedoch im Gegensatz zu dieser Arbeit mit TiO<sub>2</sub>-Partikel in reiner Anatasform durchgeführt.

Liu S. und Mitarbeiter (2010) konnten in ihrer Studie ebenfalls nachweisen, dass die Exposition mit TiO<sub>2</sub>-Partikel eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität bedingt. Zur Versuchsdurchführung wurden TiO<sub>2</sub>-Partikel in reiner Anatasform mit einer durchschnittlichen Größe von 370nm in RPMI-1640 Medium verwendet. Eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität konnte nach 6h lediglich bei hoher Partikelkonzentration (1250µM) nachgewiesen werden. Mit Verlängerung der Versuchsdauer (≥12h) zeigte sich eine signifikante Abnahme auch bei niedrigeren Partikelkonzentrationen (≥125µM).

Die wenigen veröffentlichten Studien, in denen eine mögliche zytotoxische Wirkung von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel an respiratorischen Epithelzellen getestet wurde, sind im Gegensatz zu dieser Arbeit an permanenten Zelllinien durchgeführt worden (Hsiao et al., 2011; Wadhwa et al., 2011). Hsiao und Mitarbeiter (2011) verwendeten in ihrer Studie „Aeroxide“ P25 TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel (Evonik Industries, Deutschland), ST-21 TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel (Ishihara Sangyo Kaisha, Japan) sowie amorphe TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel. „Aeroxide“ P25 TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel bestehen aus einer Mischung zwischen der Rutil- und der Anatasform des Titandioxids und besitzen laut Hersteller eine durchschnittlichen Größe von kleiner 21nm. ST-21 TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel bestehen hingegen aus der reinen Anatasform des Titandioxids. Die Partikel wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) gelöst und im Anschluss einer 5 minütigen Ultraschallbehandlung unterzogen. Durch diese Maßnahmen konnten Hsiao und Mitarbeiter eine Partikelgröße von durchschnittlich 1814nm („Aeroxide“ P25), 1843nm (ST-21) bzw. 1054nm (Amorphe TiO<sub>2</sub>-Partikel) erreichen. Die Auswertung des 12h MTT-Assays zeigte bei den TiO<sub>2</sub>-Partikeln ST21 bzw.

„Aeroxide“ P25 in den getesteten Konzentration (78µM – 625µM) eine leichtgradige Erhöhung der mitochondrialen Aktivität. Bei den amorphen TiO<sub>2</sub>-Partikeln konnte im Gegensatz dazu eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit (72h) konnte eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität als Folge einer Exposition mit ST21 bzw. „Aeroxide“ P25 TiO<sub>2</sub>-Partikel erreicht werden.

Den oben genannten Studien ist gleich, dass signifikante Ergebnisse vor allem bei längerer Versuchsdauer (≥ 24h) nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz zu dieser Arbeit, wurde in den genannten Studien die MTT-Toxizitätsassays mit Zellkulturmedium (DMEM bzw. RPMI-1640) durchgeführt. Die Verwendung des Zellkulturmediums ermöglichte eine derartige Verlängerung der Inkubationszeiten. In dieser Arbeit wurde jedoch, auf Grund der nach 4-stündiger Inkubationszeit beobachteten partikelunabhängigen Toxizität, durch die Inkubation in KR/1%BSAPuffer (Kapitel 5.4.1.2) von längeren Inkubationszeiten Abstand genommen. Rückblickend wäre es daher empfehlenswert, sowohl die Vitalität der primären Epithelzellen als auch die Partikelgröße in DMEM auszutesten und die Toxizitätsassays unter diesen Bedingungen erneut durchzuführen.

Die Datenlage zeigt, dass zwischen den einzelnen Studien sowohl die durchschnittliche Partikelgröße (100-1800nm), die TiO<sub>2</sub>-Konzentration (12,5 - 7500µM) als auch die Zeitintervalle der MTT-Assays (6h - 72h) erheblich variieren. Des Weiteren erfolgt die Versuchsdurchführung in verschiedenen Medien sowie mit TiO<sub>2</sub>-Partikel verschiedener Kristallstruktur. Insgesamt ist auf Grund der erheblichen dieser Differenzen ein Vergleich der verschiedenen Studien nur schwer möglich. Die Ergebnisse der bislang veröffentlichten Studien weisen jedoch darauf hin, dass eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Zellschädigung, der durchschnittlichen Partikelgröße, der Partikelkonzentration, der Expositionsdauer, sowie der Kristallstruktur der TiO<sub>2</sub>-Partikel besteht. Die Abhängigkeit zwischen der Kristallstruktur nanoskaliger TiO<sub>2</sub>-Partikel und dem Ausmaß des zellschädigenden Potentials konnte bereits nachgewiesen werden. Sayes und Mitarbeiter (2006) konnten in ihrer Studie belegen, dass die Anatasform ein größeres Toxizitätspotential aufweist als TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel in reiner Rutilform.

### 6.3.2 LDH-Assay TiO<sub>2</sub>-Partikel

Die Ergebnisse des LDH-Assays (Kapitel 5.4.2) zeigten in den drei untersuchten Zelllinien eine Erhöhung der LDH-Ausschüttung als Folge der Exposition mit TiO<sub>2</sub>-Partikeln. Jedoch konnte eine signifikante Erhöhung der LDH-Ausschüttung lediglich in der Zelllinie NM 364 (TiO<sub>2</sub> 1µM) und der Zelllinie NM 429/30 (TiO<sub>2</sub> 50µM) nachgewiesen werden. Möglicherweise lassen sich diese Ergebnisse dadurch begründen, dass durch den Puffer bereits eine Vorschädigung bzw. Schädigung der unbehandelten primären Epithelzellen vorlag (Kapitel 5.4.1.2) und der Effekt einer zusätzlichen Schädigung durch die Nanopartikel nur noch schwer messbar war.

Studien, welche eine mögliche zytotoxische Wirkung von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel an respiratorischen Epithelzellen mittels LDH-Assay nachweisen, sind bislang nicht veröffentlicht. Ahamed (2011) konnte an einer permanenten epithelialen Lungenzelllinie (A549) jedoch nachweisen, dass Nickelnanopartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 60-80nm eine Erhöhung der LDH-Ausschüttung bewirken. Die LDH-Erhöhung war in Partikelkonzentrationen von 33µM - 417µM sowohl im 24h als auch im 48h LDH-Assay signifikant.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Yin und Mitarbeiter (2012) an Keratinozyten der menschlichen Haut eine Erhöhung der LDH-Ausschüttung als Folge einer Exposition mit TiO<sub>2</sub>-Partikel nachweisen. Zur Versuchsdurchführung *A25 TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel* (Anatas) mit einer durchschnittlichen Größe von 25nm sowie *R100 TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel* (Rutil) der Firma Sigma Chemical Co., USA verwendet. Die Partikel wurden ebenfalls an einem Zetasizer vermessen und die durchschnittliche Größe der Partikel betrug 431nm (Mischform) und 514nm (reine Rutilform). Die Ergebnisse des LDH-Assays zeigten, dass eine signifikante Erhöhung der LDH-Ausschüttung insbesondere durch die TiO<sub>2</sub>-Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 431nm verursacht wurde.

Den oben genannten Studien ist, analog zu den MTT-Assay Studien, gleich, dass signifikante Ergebnisse vor allem bei längerer Versuchsdauer (≥ 24h) nachgewiesen werden konnten. In dieser Arbeit wurde jedoch, auf Grund der nach 4-stündiger Inkubationszeit beobachteten partikelunabhängigen Toxizität, durch die Inkubation in KR/1%BSAPuffer (Kapitel 5.4.1.2) von längeren Inkubationszeiten Abstand genommen. Rückblickend wäre es daher empfehlenswert sowohl die Vitalität der

primären Epithelzellen als auch die Partikelgröße in DMEM auszutesten und die Toxizitätsassays unter diesen Bedingungen erneut durchzuführen.

Die Ergebnisse weisen jedoch analog zu den Ergebnissen der MTT-Assays darauf hin, dass eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Zellschädigung, der durchschnittlichen Partikelgröße, der Partikelkonzentration, der Expositionsdauer, sowie der Kristallstruktur der TiO<sub>2</sub>-Partikel besteht.

### 6.3.3 MTT-/LDH-Assay Kaliumchromat

Die Toxizitätsassays wurden parallel mit TiO<sub>2</sub>-Partikel und Kaliumchromat durchgeführt, da im Vorfeld eine Wirkung auf die Membranintegrität sowie die Stoffwechselaktivität als Folge einer Kaliumchromatexposition erwartet wurde. Eine genotoxische Wirkung von Kaliumchromat auf humane bronchiale Epithelzellen war bereits in der Literatur beschrieben (Xia et al., 2011; Caglieri et al., 2008; Russo et al., 2005; Singh et al., 1999).

Durch die Inkubation der primären Zelllinien mit Kaliumchromat konnte in dem durchgeführten MTT-Assay (Kapitel 5.4.3) eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Aktivität der Zelllinien NM 299 (20µM), NM 364 (200µM), NM 377 (20µM und 200µM) und NM 429/30 (20µM und 200µM) gemessen werden. Die Zelllinie NM 364 zeigte bei einer Kaliumkonzentration von 20µM eine Zunahme der mitochondrialen Aktivität. Im Gegensatz dazu konnte als Folge der Inkubation mit Kaliumchromat (200µM) eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden. Möglicherweise ist auch hier die Erhöhung der Stoffwechselaktivität durch geringgradigen Zellstress bedingt. Dies weist darauf hin, dass durch die Erhöhung der Kaliumchromatkonzentration der Zellstress zunimmt und infolgedessen eine Reduktion der Stoffwechselaktivität der Zellen nachweisbar wird.

Bislang sind jedoch keine vergleichbaren Studien, welchen den Effekt von Kaliumchromat auf die Stoffwechselaktivität humaner nasaler Epithelzellen mittels MTT-Assay nachweisen, veröffentlicht. An humanen Hepatoblastom-Zellen (HepG2) wurde in Übereinstimmung mit den Resultaten dieser Arbeit gezeigt, dass Kaliumchromat eine Abnahme der Stoffwechselrate im MTT-Assay verursacht

(Patlolla et al., 2009). Patlolla und Mitarbeiter (2009) konnten eine Abnahme der Stoffwechselaktivität in allen getesteten Kaliumchromatkonzentrationen (3,12 – 25µM) nach 24h bzw. 48h nachweisen. Eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Aktivität, sowohl bei einer 24-stündigen, als auch bei einer 48-stündigen, konnte jedoch nur durch eine Inkubation mit Kaliumchromatkonzentration von 25µM erreicht werden.

Eine Zunahme der mitochondrialen Aktivität als Effekt einer Kaliumchromatinkubation konnte von Bagchi und Mitarbeitern (2002) an einer Makrophagenzelllinie (J774A.1) nachgewiesen werden. Die Auswertung des 24h MTT-Assays zeigte eine Erhöhung der Stoffwechselaktivität um 7% (0,4µM) bzw. um 19% (0,6µM). Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigte die Auswertung des MTT-Assay jedoch eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität in den getesteten Konzentrationen. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass der zunächst geringgradige Zellstress durch die Verlängerung der Versuchsdauer zunimmt und somit zu einer Reduktion der Stoffwechselaktivität führt.

Die Ergebnisse des LDH-Assays (Kapitel 5.4.2) zeigten in den getesteten Zelllinien NM 364 und NM 429/30 eine Erhöhung der LDH-Ausschüttung als Folge einer Kaliumchromatexposition. Die auf Grund der mehrfach nachgewiesenen genotoxischen Wirkung erwartete signifikante Erhöhung der LDH-Ausschüttung durch  $K_2CrO_4$  konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie NM 377 konnte im Rahmen dieser Arbeit sogar eine Verminderung der LDH-Ausschüttung (20µM und 200µM) nachgewiesen werden. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung dadurch begründen, dass einige Zelllinien in ihrer Membranintegrität widerstandsfähiger sind.

Vergleichbare Studien, welche den Effekt von Kaliumchromat auf die Membranintegrität mittels des LDH-Assays bewerten, liegen derzeit nicht vor.

Rückblickend ist die Durchführung einer Versuchsreihe mit Kaliumchromat als Positivkontrolle für die durchgeführten Toxizitätsassays als kritisch zu bewerten. Aufgrund der bekannten genotoxischen Wirkung wurde rückgefolgt, dass Kaliumchromat auch andere toxische Effekte auf Zellen ausübt. Dies konnte mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Toxizitätsassays jedoch nur eingeschränkt gezeigt werden.

## 6.4 Fazit

Die Toxizitätsforschung mit Nanopartikeln lässt derzeit bezüglich einer potentiell zytotoxischen Wirkung nanoskaliger Partikel viele Fragen unbeantwortet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolierung und Kultivierung von primären humanen respiratorischen Epithelzellen der Nasennebenhöhlen und der Concha nasalis inferior etabliert. Mit Hilfe der durchgeführten LDH- und MTT-Assays konnten nun erstmals zytotoxische Effekte von  $\text{TiO}_2$ -Partikel auf primäre Nasenmuschelepithelzellen gezeigt werden. Jedoch hat diese Arbeit auch erneut teilweise bereits bekannte Probleme der Nanotoxizitätsforschung aufgezeigt.

Um optimale Versuchsbedingungen zu erhalten, sollten die Nanopartikel in einer exakt definierten Größe kleiner 100nm vorliegen, in Zellkulturmedien stabil bleiben und keine Agglomerate bilden. Im Rahmen dieser und anderer Arbeiten waren diese optimalen Versuchsbedingungen durch die zur Verfügung stehenden Partikel jedoch nicht gegeben.

Auch die Wahl der Methoden muss teilweise kritisch bewertet werden. In dieser Arbeit wird die Toxizität von Nanopartikeln anhand des MTT- und LDH-Assays gemessen. Neueste Studien zeigen jedoch, dass der LDH-Assay als Toxizitätsassay um den Effekt von  $\text{TiO}_2$ -Nanopartikel darzustellen nicht geeignet ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass  $\text{TiO}_2$ -Partikel die LDH-Moleküle inaktivieren. Dies führt zu Modifikationen innerhalb der Redoxreaktionen des LDH-Assays und infolgedessen zu Verfälschungen der Ergebnisse (Han et al., 2011). Dementsprechend stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit neuer zuverlässiger Testmethoden, welche die Toxizität von Nanopartikel direkt nachweisen können.

## 6.5 Ausblick

Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Studienergebnisse bezüglich der Aufnahme von TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln aus der Umwelt und einer möglichen Wirkung auf zellulärer und molekularer Ebene sehr vielförmig. Eine stetig wachsende Anzahl von Studien belegt die schädigende Wirkung von nanoskaligem TiO<sub>2</sub> *in vitro*. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass die derzeit angewandten Nanopartikel und Toxizitätsassays nicht uneingeschränkt zum Nachweis eines möglichen zytotoxischen bzw. genotoxischen Effekts von Nanomaterial geeignet sind. Es ist somit von großer Bedeutung, dass die Versuchsmodelle der Zukunft verbessert werden, um das Risiko von Nanopartikel besser abschätzen zu können und somit verlässliche Aussagen über deren Toxizität treffen zu können. Optimalerweise sollte in Zukunft eine mögliche Toxizität nanoskaliger Partikel anhand eines realitätsnahen, kompletten Modell-System der Nasenepithelschicht, inklusive dem mehrreihigen hochprismatischen mit Flimmerepithel und Mucusfilm durchgeführt werden. Des Weiteren wäre es erstrebenswert, die nanoskaligen Partikel in einer definierten Größe als Aerosolpartikel zu verwenden und die Partikel-/Luft-Dispersion für ein bestimmtes Zeitintervall auf das komplette Nasenschleimhautmodell einwirken zu lassen. Anschließend sollte die Beurteilung über eine mögliche zelluläre Aufnahme und Auswirkung der phagozytierten Partikel auf das Gesamtsystem der Zellkommunikation und Organisation erfolgen.

## 7 Literaturverzeichnis

Adams LK, Lyon DY, McIntosh A, Alvarez PJ. Comparative toxicity of nano-scale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> and ZnO water suspensions. *Water Sci Technol.* 2006; 54(11-12):327-34.

Ahamed M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro.* 2011; 25(4):930-6.

Auger F, Gendron MC, Chamot C, Marano F, Dazy AC. Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: role of the epithelium in airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 215(3):285-94.

Baan RA. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal. Toxicol.* 2007; 19(s1):213-228.

Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology.* 2002; 30;180(1):5-22.

Basislehrbuch Innere Medizin. Elsevier Verlag. 4. Auflage. 2008. S.438-40.

Becker S, Soukup JM, Gilmour MI, Devlin RB. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 141(2):637-48.

Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* 2004; 77(2):347-57.

Beurteilung eines möglichen Krebsrisikos von Nanomaterialien und von aus Produkten freigesetzten Nanopartikeln. Stellungnahme des Bundesinstituts für Risikobewertung und des Umweltbundesamtes vom 15. April 2010. <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/4068.pdf>.

Bickley Remmey G. *Firing Ceramics* (Advanced series in Ceramics, Vol.2). American Ceramic Society, 1997.

Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, Coester C, Tuomi T, Rehberg M, Krombach F. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre Toxicol.* 2008; 5:14.

Boffetta P, Soutar A, Cherrie JW, Granath F, Andersen A, Anttila A, Blettner M, Gaborieau V, Klug SJ, Langard S, Luce D, Merletti F, Miller B, Mirabelli D, Pukkala E, Adami HO, Weiderpass E. Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer Causes Control.* 2004; 15(7):697-706.

Borm PYA, Costa D, Castranova V, Donaldson K, Driscoll K, Dungworth D, Green F, Greim H, Harkema J, Jarabek A, Kane AB, Kuempel ED, Mauderly JL, Mccunney RJ, Miller F, Morgan D, Mossman B, Muhle H, Nauss K, Nikula K, Oberdorster G, Olin SS, Pepelko W, Pinkerton KE, Schultz M, Utell MJ, Vallyathan V, Vu V, Warheit DB, Witschi H. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. ILSI Risk Science Institute Workshop Participants. *Inhal Toxicol.* 2000; 12(1-2):1-17.

Borm PJ. Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. *Inhal Toxicol.* 2002; 14(3):311-24.

Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol.* 2006; 3:11.

Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286(2):L344-53.

Bundesministerium für Bildung und Forschung Nano.DE-Report 2009-Status Quo der Nanotechnologie in Deutschland. [http://www.bmbf.de/pub/nanode\\_report\\_2009.pdf](http://www.bmbf.de/pub/nanode_report_2009.pdf).

Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF-Projekt, Nano Care-Gesundheitsrelevante Aspekte synthetischer Nanomaterialien. [http://www.nanopartikel.info/files/content/dana/Dokumente/NanoCare/Publikationen/NanoCare\\_Broschuere.pdf](http://www.nanopartikel.info/files/content/dana/Dokumente/NanoCare/Publikationen/NanoCare_Broschuere.pdf).

Bundesministerium für Bildung und Forschung, Nanotechnologie erobert die Märkte–Deutsche Zukunftsoffensive für Nanaotechnologie. [http://www.bmbf.de/pub/zukunftsoffensive\\_nanotechnologie.pdf](http://www.bmbf.de/pub/zukunftsoffensive_nanotechnologie.pdf).

Butz T, Reinert T, Pinheiro T, Moretto P, Pallon J, Kiss AZ, Stachura J, Dabros W, Stachur Z, Lekki J, Lekka M, Hunyadi J, Biro T, Sticherling M, Van Vaeck L, Van Royen P, Surleve-Bazeille JE. Nanoderm Final Report-Quality of skin as a barrier to ultra-fine particles 2007. [http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/Downloads/Nanoderm\\_Final\\_Report.pdf](http://www.uni-leipzig.de/~nanoderm/Downloads/Nanoderm_Final_Report.pdf).

Caglieri A, Goldoni M, De Palma G, Mozzoni P, Gemma S, Vichi S, Testai E, Panico F, Corradi M, Tagliaferri S, Costa LG. Exposure to low levels of hexavalent chromium: target doses and comparative effects on two human pulmonary cell lines. *Acta Biomed.* 2008; 79:Suppl 1:104-15.

Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggård T, Donnelly SC, Cagney G, Linse S, Dawson KA. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007; 46(30):5754-6.

Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol.* 2009; 29(4):330-7.

Churg A, Brauer M. Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastruct Pathol.* 2000; 24(6):353-61.

Clutton S. The importance of oxidative stress in apoptosis. *Br Med Bull.* 1997; 53(3):662-8.

Creutzenberg O, Bellmann B, Heinrich U, Fuhst R, Koch W, Muhle H. Clearance and retention of inhaled diesel exhaust particles, carbon-black, and titanium-dioxide in rats at lung overload conditions. *Journal of Aerosol Science.* 1990; 21:455-8.

De Jong PM, van Sterkenburg MA, Kempenaar JA, Dijkman JH, Ponec M. Serial culturing of human bronchial epithelial cells derived from biopsies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993; 29A(5):379-87.

- Deschaume O, Shafran KL, Perry CC. Interactions of bovine serum albumin with aluminum polyoxocations and aluminum hydroxide. *Langmuir*. 2006; 22(24):10078-88.
- Diaz-Sanchez D, Jyrala M, Ng D, Nel A, Saxon A. In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines rantes, MIP-1alpha, and MCP-3 in humans. *Clin Immunol*. 2000; 97(2):140-5.
- Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita*. 2003; 39(3):405-10.
- Ekstrand-Hammarström B, Akfur CM, Andersson PO, Lejon C, Osterlund L, Bucht A. Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology*. 2011. Epub ahead of print.
- Elder AC, Gelein R, Finkelstein JN, Cox C, Oberdörster G. Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin. *Inhal Toxicol*. 2000; 12:Suppl 4:227-46.
- Enrhes. European Commission-Coordination & Support Action (CSA), Project Coordinator: V. Stone (2009): Engineered nanoparticles - Review of health and environmental safety. <http://www.nanowerk.com/nanotechnology/reports/reportpdf/report133.pdf>.
- Ertl G, Knözinger H, Weitkamp J. *Handbook of Heterogeneous Catalysis*. Wiley VCH Verlag. 2. Auflage. 2008.
- Evelyn A, Mannick S, Sermon PA. Unusual carbon-based nanofibres and chains among diesel-emitted particles. *Nano. Lett*. 2003; 3(1):63-4.
- Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK, Blot WJ. A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *J Occup Environ Med*. 2003; 45(4):400-9.
- Garabrant DH, Fine LJ, Oliver C, Bernstein L, Peters JM. Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers. *Scand J Work Environ Health*. 1987; 13(1):47-51.

Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Kim HR, Le Doan T, Desmaële D, D'Angelo J, Taran F, Georgin D, Couvreur P. A methodology to study intracellular distribution of nanoparticles in brain endothelial cells. *Int J Pharm.* 2005; 298(2):310-4.

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(11):1555-60.

Geschichte der Nanotechnologie. <http://www.nanoproducts.de/index.php?mp=info&file=nanotechnologie&OSSID=d666ea50f11bb7eae54f8d993fc9e697>.

Han X, Gelein R, Corson N, Wade-Mercer P, Jiang J, Biswas P, Finkelstein JN, Elder A, Oberdörster G. Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology.* 2011; 287(1-3):99-104.

Hanamure Y, Deguchi K, Ohyama M. Ciliogenesis and mucus synthesis in cultured human respiratory epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1994; 103(11):889-95.

Handbuch Cytoscan™-LDH Cytotoxicity Assay Kit, Gbiosciences. <http://www.gbiosciences.com/ResearchUploads/ResearchProductIMGFile/633791027872608750.pdf>.

Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K. Chronic inhalation exposure of wistar rats and 2 different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicology.* 1995; 7(4):533-56.

Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol.* 1999; 163(10):5582-91.

Ho YS, Liou HB, Lin JK, Jeng JH, Pan MH, Lin YP, Guo HR, Ho SY, Lee CC, Wang YJ. Lipid peroxidation and cell death mechanisms in pulmonary epithelial cells induced by peroxyxynitrite and nitric oxide. *Arch Toxicol.* 2002; 76(8):484-93.

Hsiao IL, Huang YJ. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ.* 2011; 409(7):1219-28.

Institut für Technikfolgen-Abschätzung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften. Herstellungsverfahren von Nanopartikeln und Nanomaterialien, <http://www.epub.oeaw.ac.at/ita/nanotrust-dossiers/dossier006.pdf>.

Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21(9):1871-7.

Jorissen M, Van der Schueren B, Van den Berghe H, Cassiman JJ. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Arch Otorhinolaryngol*. 1989; 246(5):308-14.

Junno T, Magnusson MH, Carlsson SB, Deppert K, Malm JO, Montelius L, Samuelson L. Single-electron devices via controlled assembly of designed nanoparticles. *Microelectronic Engineering*. 1999; 47(1-4):179-83.

Kang JL, Moon C, Lee HS, Lee HW, Park EM, Kim HS, Castranova V. Comparison of the biological activity between ultrafine and fine titanium dioxide particles in RAW 264.7 cells associated with oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A*. 2008; 71(8):478-85.

Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Chung HW. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*. 2008; 49(5):399-405.

Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009; 188(2):112-8.

Kato H, Suzuki M, Fujita K, Horie M, Endoh S, Yoshida Y, Iwahashi H, Takahashi K, Nakamura A, Kinugasa S. Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23(5):927-34.

Kim JK, Lee WK, Lee EJ, Cho YJ, Lee KH, Kim HS, Chung Y, Kim KA, Lim YJ. Mechanism of silica- and titanium dioxide-induced cytotoxicity in alveolar macrophages. *Toxicol Environ Health A*. 1999; 58(7):437-50.

- Kiss B, Bíró T, Czifra G, Tóth BI, Kertész Z, Szikszai Z, Kiss AZ, Juhász I, Zouboulis CC, Hunyadi J. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp Dermatol.* 2008; 17(8):659-67.
- Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer.* 2004; 109(6):799-809.
- Kobzik L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J Immunol.* 1995; 155(1):367-76.
- Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(23):9478-83.
- Krug HF, Diabaté S. Ultrafeine Partikel: Gesundheitsrisiko versus Therapiechance!?. *Umwelt-medizin-gesellschaft.* 2003; 16:250-55.
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985; 79(2):179-92.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(4):455-60.
- Likodimos V, Dionysiou DD, Falaras P. Clean Water: water detoxification using innovative photocatalysts. *Environmental Science and Biotechnology.* 2010; 9:87-94.
- Liu H, Ma L, Zhao J, Liu J, Yan J, Ruan J, Hong F. Biochemical toxicity of nano-anatase TiO<sub>2</sub> particles in mice. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 129(1-3):170-80.
- Liu S, Xu L, Zhang T, Ren G, Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology.* 2010; 267(1-3):172-7.

Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc.* 2002; 61(1):123-30.

Lucocq JM, Baschong W. Preparation of protein colloidal gold complexes in the presence of commonly used buffers. *Eur J Cell Biol.* 1986; 42(2):332-7.

Malvern. Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 Minutes. DLS technical note, Malvern Instruments. <http://www.malvern.com/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf>.

Mavon A, Miquel C, Lejeune O, Payre B, Moretto P. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacology and Physiology.* 2007; 20:10-20.

Merkle HP, Ditzinger G, Lang SR, Peter H, Schmidt MC. In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998; 29(1-2):51-79.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.

Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157(5 Pt 1):1666-80.

Nanotechnologie-die Zukunft erfinden. <http://www.nmw.nrw.de/diezukunfterfinden>

National Institute of Occupational Safety and Health. Evaluation of health hazard and recommendations for occupational exposure to titanium dioxide. NIOSH Current Intelligence Bulletin. Cincinnati: National Institute of Occupational Safety and Health, DHHS publication; 2005.

Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 2002; 105(4):411-4.

Nigavekar SS, Sung LY, Llanes M, El-Jawahri A, Lawrence TS, Becker CW, Balogh L, Khan MK. 3H dendrimer nanoparticle organ/tumor distribution. *Pharm Res.* 2004; 21(3):476-83.

Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L. Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier Verlag. 3 Auflage. 2007. Seite 863-65.

Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect.* 1994; 102:Suppl 5:173-9.

Oberdörster G, Gelein RM, Ferin J, Weiss B. Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles?. *Inhal Toxicol.* 1995; 7(1):111-24.

Oberdörster G. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol.* 1996; 8:Suppl 73-89.

Oberdörster G, Utell M.J. Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract -- and beyond?. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(8):A440-1.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(7):823-39.

Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.* 2008; 180(3):222-9.

Park JB. Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med.* 2003; 35(5):325-35.

Parthasarathi V, Thilagavathi G. Synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles and their applications to textiles for microbe resistance. *Journal of Textile and Apparel, Technology and Management.* 2009; 6:1-8.

Patlolla AK, Barnes C, Hackett D, Tchounwou PB. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health.* 2009; 6(2):643-53.

- Pauluhn J. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. *Toxicol Sci.* 2009; 109(1):152-67.
- Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Gers-Barlag H. The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001; 14:Suppl 1:92-7.
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W, Donaldson K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.* 2008; 3(7):423-8.
- Pott F, Roller M. Untersuchung zur Kanzerogenität granulärer Stäube an Ratten. 2003. <http://www.baua.de/fors/f1843htm>.
- Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett.* 2007; 168(1):58-74.
- Rautiainen M, Matsune S, Yoshitsugu M, Ohyama M. Degeneration of human respiratory cell ciliary beat in monolayer cell cultures. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993; 250(2):97-100.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med.* 2004; 61(5):442-7.
- Riediker M, Cascio WE, Griggs TR, Herbst MC, Bromberg PA, Neas L, Williams RW, Devlin RB. Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169(8):934-40.
- Risom L, Lundby C, Thomsen JJ, Mikkelsen L, Loft S, Friis G, Møller P. Acute hypoxia and reoxygenation-induced DNA oxidation in human mononuclear blood cells. *Mutat Res.* 2007; 625(1-2):125-33.

Russo P, Catassi A, Cesario A, Imperatori A, Rotolo N, Fini M, Granone P, Dominioni L. Molecular mechanisms of hexavalent chromium-induced apoptosis in human bronchoalveolar cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 33(6):589-600.

Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Colvin VL. The differential cytotoxicity of watersoluble fullerenes. *Nano Letters.* 2004; 4:1881–7.

Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2006; 92(1):174-85.

Schiebler TH, Schmidt W. *Anatomie.* Springer Verlag. 8. Auflage. 2011. S. 423-6, 489-506.

Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling WG. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol.* 2004; 16(6-7):453-9.

Shi J, Gider S, Babcock K, Awschalom DD. Magnetic Clusters in Molecular Beams, Metals, and Semiconductors. *Science.* 1996; 271:937-41.

Shi Y, Yadav S, Wang F, Wang H. Endotoxin promotes adverse effects of amorphous silica nanoparticles on lung epithelial cells in vitro. *J Toxicol Environ Health A.* 2010; 73(11):748-56.

Shukla RK, Kumar A, Pandey AK, Singh SS, Dhawan A. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress-mediated apoptosis in human keratinocyte cells. *J Biomed Nanotechnol.* 2011; 7(1):100-1.

Singh J, Pritchard DE, Carlisle DL, Mclean JA, Montaser A, Orenstein JM, Patierno SR. Internalization of carcinogenic lead chromate particles by cultured normal human lung epithelial cells: formation of intracellular lead-inclusion bodies and induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 161(3):240-8.

Stoffgeschichte Titandioxid. <http://www.riskcart1.wzu.uni-augsburg.de/StoffgeschichteText.php?id=12&studie=NANO&PHPSESSID=51977b577162e58f22defc642adff800#6>.

Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Van Eeden SF. The effect of interleukin-6 on L-selectin levels on polymorphonuclear leukocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283(3):H879-84.

Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect*. 2001; 109:Suppl 4:547-51.

Theogaraj E, Riley S, Hughes L, Maier M, Kirkland D. An investigation of the photoclastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutat Res*. 2007; 634(1-2):205-19.

Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res*. 2009; 69(22):8784-9.

Tuchina ES, Tuchin VV. TiO<sub>2</sub> nanoparticle enhanced photodynamic inhibition of pathogens. *Laser Physics Letters*. 2010; 7:607-12.

Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164(5):826-30.

Volkheimer G. Passage of particles through the wall of the gastrointestinal tract. *Environ Health Perspect*. 1974; 9:215-25.

Wadhwa S, Rea C, O'Hare P, Mathur A, Roy SS, Dunlop PS, Byrne JA, Burke G, Meenan B, McLaughlin JA. Comparative in vitro cytotoxicity study of carbon nanotubes and titania nanostructures on human lung epithelial cells. *J Hazard Mater*. 2011; 191(1-3):56-61.

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. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*. 2007; 168(2):176-85.

- Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology*. 2008; 254(1-2):82-90.
- Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res*. 2007; 628(2):99-106.
- Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology*. 2007; 230(1):90-104.
- Wautelet M. Nanotechnologie 2008. Oldenbourg Wissenschaftsverlag. 1. Auflage. S.61-98, 185-91.
- Wiesel JM, Gamiel H, Vlodaysky I, Gay I, Ben-Bassat H. Cell attachment, growth characteristics and surface morphology of human upper-respiratory tract epithelium cultured on extracellular matrix. *Eur J Clin Invest*. 1983; 13(1):57-63.
- Wu R, Yankaskas J, Cheng E, Knowles MR, Boucher R. Growth and differentiation of human nasal epithelial cells in culture. Serum-free, hormone-supplemented medium and proteoglycan synthesis. *Am Rev Respir Dis*. 1985; 132(2):311-20.
- Xia B, Yang LQ, Huang HY, Pang L, Hu GH, Liu QC, Yuan JH, Liu JJ, Xia YB, Zhuang ZX. Chromium(VI) causes down regulation of biotinidase in human bronchial epithelial cells by modifications of histone acetylation. *Toxicol Lett*. 2011; 205(2):140-5.
- Yin JJ, Liu J, Ehrenshaft M, Roberts JE, Fu PP, Mason RP, Zhao B. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-Generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012; 263(1):81-8.
- Zhang H, Xia T, Meng H, Xue M, George S, Ji Z, Wang X, Liu R, Wang M, France B, Rallo R, Damoiseaux R, Cohen Y, Bradley KA, Zink JI, Nel AE. Differential expression of syndecan-1 mediates cationic nanoparticle toxicity in undifferentiated versus differentiated normal human bronchial epithelial cells. *ACS Nano*. 2011; 5(4):2756-69.

## 8 Anhang

### 8.1 Tabellenanhang

Erläuterungen zum folgenden Tabellenanhang:

MR	Maximalrelease. Durch die Zugabe des Lysepuffers konnte eine maximale LDH-Ausschüttung erreicht werden.
MTT 0h	Der MTT 0h-Wert der unbehandelten Kontrolle diene bei der Auswertung als Kontrollwert.
MTT 4h	Der MTT 4h-Wert gibt an, wie viel MTT während der 4stündigen Inkubationszeit durch die mitochondriale Dehydrogenase der Zellen reduziert wird. Der MTT 4h-Wert der unbehandelten Kontrolle diene bei der statistischen Auswertung als Referenzwert.
MW	Mittelwert
MW(0h)	Mittelwert MTT-Assay 0h
MW(4h)	Mittelwert MTT-Assay 4h
MW(MR)	Mittelwert Maximalrelease
MW(SR)	Mittelwert Spontanrelease
Pk1 Mean	<i>Peak 1 Mean</i>
SA	Standardabweichung
SR	Spontanrelease. Der SR weist die spontane LDH-Ausschüttung der unbehandelten Zellen nach und diene bei der Auswertung als Leerwert. Der SR diene bei der statistischen Auswertung als Referenzwert.
Z-Ave	<i>Z-Average</i>

Tabelle 8.1 Darstellung des BSA-Effektes auf die Partikelgröße in PBS am Beispiel von TiO<sub>2</sub> 50µM

	PBS		PBS/1%BSA	
	TiO <sub>2</sub> 50µM		TiO <sub>2</sub> 50µM	
	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)
<b>Replikate</b>				
1	1266	1484	622,9	627,7
2	1072	1610	617,2	620,7
3	608	708,4	510,9	519,9
4	645,1	763,3	440,7	516,2
<b>MW</b>	<b>897,78</b>	<b>1141,43</b>	<b>547,93</b>	<b>571,13</b>
<b>SA</b>	<b>323,40</b>	<b>471,67</b>	<b>88,11</b>	<b>61,37</b>

Tabelle 8.2 Darstellung des BSA-Effektes auf die Partikelgröße in KR am Beispiel von TiO<sub>2</sub> 50µM

	KR		KR/1%BSA	
	TiO <sub>2</sub> 50µM		TiO <sub>2</sub> 50µM	
	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)	Pk1 Mean (nm)	Z-Ave (nm)
<b>Replikate</b>				
1	884,6	2839	778,7	785,2
2	543,9	3255	752	758,8
3	520,4	3637	671,7	770,2
<b>MW</b>	<b>649,63</b>	<b>3243,67</b>	<b>734,13</b>	<b>771,40</b>
<b>SA</b>	<b>203,83</b>	<b>399,12</b>	<b>55,69</b>	<b>13,24</b>

**Tabelle 8.3 LDH-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 490nm zwischen den Puffer PBS/1%BSA und KR/1%BSA am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 289 mit jeweils 20.000 Zellen/Well**

Well	PBS/1%BSA		KR/1%BSA	
	MR	SR	MR	SR
1	3,194	2,452	2,709	1,741
2	3,244	2,574	2,823	1,725
3		2,543	2,64	1,722
<b>MW</b>	<b>3,219</b>	<b>2,523</b>	<b>2,724</b>	<b>1,729</b>
<b>SA</b>	<b>0,035</b>	<b>0,063</b>	<b>0,092</b>	<b>0,010</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MR</b>	<b>100%</b>	<b>78,38%</b>	<b>100%</b>	<b>53,72%</b>

**Tabelle 8.4 MTT-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 565nm zwischen den Puffern PBS/1%BSA und KR/1%BSA am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 289, mit jeweils 20.000 Zellen/Well**

Well	PBS/1%BSA		KR/1%BSA	
	4h MTT	0h MTT	4h MTT	0h MTT
1	0,12	0,041	0,181	0,041
2	0,086	0,04	0,172	0,04
3	0,106	0,041	0,169	0,041
<b>MW</b>	<b>0,104</b>	<b>0,041</b>	<b>0,174</b>	<b>0,041</b>
<b>SA</b>	<b>0,017</b>	<b>0,001</b>	<b>0,006</b>	<b>0,001</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MTT 4h Wert</b>	<b>100%</b>	<b>39,10%</b>	<b>100%</b>	<b>23,37%</b>

**Tabelle 8.5 LDH-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 490nm zwischen Airwaysmedium und KR/1%BSA-Puffer am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 429/30 mit jeweils 15.000 Zellen/Well**

Well	Airwaysmedium		KR/1%BSA	
	MR	SR	MR	SR
1	1,444	0,289	1,099	0,658
2	1,233	0,293	1,124	0,744
3	0,933	0,246	0,701	0,679
4	1,047	0,354		
<b>MW</b>	<b>1,164</b>	<b>0,296</b>	<b>0,975</b>	<b>0,694</b>
<b>SA</b>	<b>0,224</b>	<b>0,044</b>	<b>0,194</b>	<b>0,037</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MR</b>	<b>100%</b>	<b>25,38%</b>	<b>100%</b>	<b>71,17%</b>

**Tabelle 8.6 Vergleich der Vitalität zwischen primärer und permanenten Tumorzelllinien in Airwaysmedium (NM 412: 2 Wochen alt, 15.000 Zellen/Well; H1299: 10.000 Zellen/Well; MCF 7: 20.000 Zellen/Well)**

Well	NM 412		H1299		MCF 7	
	MTT 4h	MTT 0h	MTT 4h	MTT 0h	MTT 4h	MTT 0h
1	0,299	0,036	0,487	0,063	1,085	0,036
2	0,309	0,036	0,488	0,06	1,023	0,035
3	0,312	0,037	0,482	0,063	1,091	0,039
4	0,266	0,038	0,497	0,061	1,058	0,038
5					1,036	0,042
6					1,038	0,045
<b>MW</b>	<b>0,297</b>	<b>0,037</b>	<b>0,489</b>	<b>0,062</b>	<b>1,055</b>	<b>0,039</b>
<b>SA</b>	<b>0,021</b>	<b>0,001</b>	<b>0,006</b>	<b>0,002</b>	<b>0,028</b>	<b>0,004</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MTT 4h Wert</b>	<b>100%</b>	<b>12,39%</b>	<b>100%</b>	<b>12,64%</b>	<b>100%</b>	<b>3,71%</b>

Tabelle 8.7 LDH-Assay NM 364; 2 Wochen alt, 20.000 Zellen/Well

Well	MR	SR	Well	TiO <sub>2</sub>		K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	
				1µM	50µM	20µM	200µM
1	2,710	0,747	1	1,089	0,967	0,853	0,567
2	2,387	0,723	2	0,976	1,061	1,097	0,666
3	1,836	0,740	3	0,910	0,884	0,859	0,959
<b>MW</b>	<b>2,311</b>	<b>0,737</b>	<b>MW</b>	<b>0,992</b>	<b>0,971</b>	<b>0,936</b>	<b>0,731</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MR</b>	<b>100%</b>	<b>31,91%</b>	<b>Anteile [%] vom jeweiligen MR</b>	<b>42,91%</b>	<b>42,00%</b>	<b>40,52%</b>	<b>31,62%</b>
<b>SA</b>	<b>0,442</b>	<b>0,005</b>	<b>SA</b>	<b>0,039</b>	<b>0,038</b>	<b>0,060</b>	<b>0,088</b>

Tabelle 8.8 LDH-Assay NM 364; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		MW	N	SA	Standardfehler des Mittelwertes
Paare 1	LDH.NM364.SR	,319	3	,005	,003
	LDH.NM364.TiO2.1	,429	3	,039	,023
Paare 2	LDH.NM364.SR	,139	3	,005	,003
	LDH.NM364.TiO2.50	,420	3	,038	,022
Paare 3	LDH.NM364.SR	,139	3	,005	,003
	LDH.NM364.K2CRO4.20	,405	3	,060	,035
Paare 4	LDH.NM364.SR	,139	3	,005	,003
	LDH.NM364.K2CRO4.200	,316	3	,088	,051

Tabelle 8.9 LDH-Assay NM 364; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		Gepaarte Differenzen					T	Df	Sig. 2-seitig
		MW	SA	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
					Untere	Obere			
Paare 1	LDH.NM364.SR - LDH.NM364.TiO2.1	-,110	,037	,021	-,202	-,018	-5,162	2	,036
Paare 2	LDH.NM364.SR - LDH.NM364.TiO2.50	-,101	,042	,024	-,205	,003	-4,193	2	,052
Paare 3	LDH.NM364.SR - LDH.NM364.K2CRO4.20	-,087	,065	,038	-,249	,076	-2,298	2	,148
Paare 4	LDH.NM364.SR - LDH.NM364.K2CRO4.200	,003	,089	,051	-,218	,223	,052	2	,963

Tabelle 8.10 LDH-Assay NM 377; 1 Woche alt, 15.000 Zellen/Well

Well	MR	SR	TiO <sub>2</sub>		K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	
			1µM	50µM	20µM	200µM
1	1,063	0,188	0,336	0,233	0,140	0,142
2	1,199	0,185	0,284	0,247	0,146	0,145
3	1,445	0,195	0,302	0,504	0,165	0,173
4	1,344	0,274	0,291	0,309	0,143	0,142
5	1,148	0,186	0,194	0,276	0,190	0,198
6	1,128	0,472	0,274	0,393	0,150	0,168
7	1,299	0,175	0,351	0,318	0,135	0,178
8	1,255	0,21	0,327	0,332	0,151	0,156
MW	1,235	0,236	0,295	0,327	0,153	0,163
Anteile [%] vom jeweiligen MR	100%	19,08%	23,87%	26,43%	12,35%	13,18%
SA	0,126	0,081	0,040	0,071	0,014	0,016

Tabelle 8.11 LDH-Assay NM 377; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		MW	N	SA	Standardfehler des Mittelwertes
Paare 1	LDH.NM377.SR	,191	8	,081	,029
	LDH.NM377.TiO2.1	,239	8	,040	,014
Paare 2	LDH.NM377.SR	,191	8	,081	,029
	LDH.NM377.TiO2.50	,264	8	,071	,025
Paare 3	LDH.NM377.SR	,191	8	,081	,029
	LDH.NM377.K2CrO4.20	,123	8	,014	,005
Paare 4	LDH.NM377.SR	,191	8	,081	,029
	LDH.NM377.K2CrO4.200	,132	8	,016	,006

Tabelle 8.12 LDH-Assay NM 377; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		Gepaarte Differenzen					T	Df	Sig. 2-seitig
		MW	SA	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
					Untere	Obere			
Paare 1	LDH.NM377.SR - LDH.NM377.TiO2.1	-,048	,096	,034	-,129	,033	-1,409	7	,202
Paare 2	LDH.NM377.SR - LDH.NM377.TiO2.50	-,073	,090	,032	-,148	,002	-2,312	7	,054
Paare 3	LDH.NM377.SR - LDH.NM377.K2CrO4.20	,068	,084	,030	-,003	,138	2,272	7	,057
Paare 4	LDH.NM377.SR - LDH.NM377.K2CrO4.200	,059	,083	,029	-,010	,129	2,010	7	,084

Tabelle 8.13 LDH-Assay NM 429/30; 2 Wochen alt, 15.000 Zellen/Well

Well	MR	SR	Well	TiO <sub>2</sub>		K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	
				1µM	50µM	20µM	200µM
1	1,099	0,658	1	0,782	0,989	0,766	1,013
2	1,124	0,744	2	1,015	0,921	0,669	0,728
3	0,701	0,679	3	0,824	0,906	1,091	0,502
4			4	0,642	0,952	0,871	0,846
<b>MW</b>	<b>0,975</b>	<b>0,694</b>	<b>MW</b>	<b>0,816</b>	<b>0,942</b>	<b>0,849</b>	<b>0,772</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MR</b>	<b>100%</b>	<b>71,18%</b>	<b>Anteile [%] vom jeweiligen MR</b>	<b>83,70%</b>	<b>96,70%</b>	<b>87,13%</b>	<b>79,23%</b>
<b>SA</b>	<b>0,237</b>	<b>0,037</b>	<b>SA</b>	<b>0,158</b>	<b>0,038</b>	<b>0,186</b>	<b>0,220</b>

Tabelle 8.14 LDH-Assay NM 429/30; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		MW	N	SA	Standardfehler des Mittelwertes
Paare 1	LDH.NM429/30.SR	,712	4	,037	,019
	LDH.NM429/30.TiO2.1	,837	4	,158	,079
Paare 2	LDH.NM429/30.SR	,712	4	,037	,019
	LDH.NM429/30.TiO2.50	,967	4	,038	,019
Paare 3	LDH.NM429/30.SR	,712	4	,037	,019
	LDH.NM429/30.K2CrO4.20	,871	4	,186	,093
Paare 4	LDH.NM429/30.SR	,712	4	,037	,019
	LDH.NM429/30.K2CrO4.200	,792	4	,220	,110

Tabelle 8.15 LDH-Assay NM 429/30; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. 2-seitig
		MW	SA	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
					Untere	Obere			
Paare 1	LDH.NM429/30.SR - LDH.NM429.TiO2.1	-,125	,136	,068	-,342	,092	-1,836	3	,164
Paare 2	LDH.NM429/30.SR - LDH.NM429.TiO2.50	-,255	,066	,033	-,360	-,150	-7,707	3	,005
Paare 3	LDH.NM429/30.SR - LDH.NM429.K2CrO4.20	-,160	,206	,103	-,488	,169	-1,546	3	,220
Paare 4	LDH.NM429/30.SR - LDH.NM429.K2CrO4.200	-,081	,234	,117	-,453	,292	-,688	3	,541

Tabelle 8.16 MTT-Assay NM 299; 2 Wochen alt, 20.000 Zellen/Well

Well	MTT 4h	MTT 0h	TiO <sub>2</sub>		K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>
			1µM	50µM	20µM
1	0,181	0,041	0,112	0,144	0,074
2	0,172	0,040	0,105	0,138	0,072
3	0,169	0,041	0,119	0,153	0,081
<b>MW</b>	<b>0,174</b>	<b>0,041</b>	<b>0,112</b>	<b>0,145</b>	<b>0,076</b>
<b>SA</b>	<b>0,006</b>	<b>0,001</b>	<b>0,007</b>	<b>0,008</b>	<b>0,005</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MTT 4h Wert</b>	<b>100%</b>	<b>23,37</b>			

Tabelle 8.17 MTT-Assay NM 299; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		MW	N	SA	Standardfehler des Mittelwertes
Paare 1	MTT.NM299.4h	,174	3	,006	,004
	MTT.NM299.TiO2.1	,112	3	,007	,004
Paare 2	MTT.NM299.4h	,174	3	,006	,004
	MTT.NM299.TiO2.50	,145	3	,008	,004
Paare 3	MTT.NM299.4h	,174	3	,006	,004
	MTT.NM299.K2Cr.20	,076	3	,005	,003

Tabelle 8.18 MTT-Assay NM 299; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. 2-seitig
		MW	SA	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
					Untere	Obere			
Paare 1	MTT.NM299.4h - MTT.NM299.TiO2.1	,062	,010	,006	,036	,088	10,286	2	,009
Paare 2	MTT.NM299.4h - MTT.NM299.TiO2.50	,029	,011	,007	,001	,057	4,422	2	,048
Paare 3	MTT.NM299.4h - MTT.NM299.K2Cr.20	,098	,010	,006	,074	,122	17,725	2	,003

Tabelle 8.19 MTT-Assay NM 364; 2 Wochen alt, 20.000 Zellen/Well

Well	MTT 4h	MTT 0h	TiO <sub>2</sub>		K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	
			1µM	50µM	20µM	200µM
1	0,063	0,041	0,049	0,130	0,087	0,042
2	0,065	0,045	0,048	0,117	0,054	0,041
3	0,066	0,041	0,045	0,124	0,085	0,042
MW	0,065	0,042	0,047	0,124	0,075	0,042
SA	0,002	0,002	0,002	0,007	0,019	0,001
Anteile [%] vom jeweiligen MTT 4h Wert	100%	65,46%				

Tabelle 8.20 MTT-Assay NM 364; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		MW	N	SA	Standardfehler des Mittelwertes
Paare 1	MTT.NM364.4h	,065	3	,002	,001
	MTT.NM364.TiO2.1	,047	3	,002	,001
Paare 2	MTT.NM364.4h	,065	3	,002	,001
	MTT.NM364.TiO2.50	,124	3	,007	,004
Paare 3	MTT.NM364.4h	,065	3	,002	,001
	MTT.NM364.K2Cr.20	,075	3	,019	,011
Paare 4	MTT.NM364.4h	,065	3	,002	,001
	MTT.NM364.K2Cr.200	,042	3	,001	,000

Tabelle 8.21 MTT-Assay NM 364; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. 2-seitig
		MW	SA	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
					Untere	Obere			
Paare 1	MTT.NM364.4h – MTT.NM364.TiO2.1	,017	,004	,002	,009	,026	8,549	2	,013
Paare 2	MTT.NM364.4h – MTT.NM364.TiO2.50	-,059	,008	,004	-,078	-,040	-13,536	2	,005
Paare 3	MTT.NM364.4h – MTT.NM364.K2Cr.20	-,011	,019	,011	-,058	,036	-,976	2	,432
Paare 4	MTT.NM364.4h – MTT.NM364.K2Cr.200	,023	,002	,001	,019	,027	23,000	2	,002

Tabelle 8.22 MTT-Assay NM 377; 1 Woche alt, 15.000 Zellen/Well

Well	MTT 4h	MTT 0h	TiO <sub>2</sub>		K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	
			1µM	50µM	20µM	200µM
1	0,050	0,038	0,046	0,091	0,040	0,041
2	0,056	0,040	0,052	0,103	0,042	0,042
3	0,055	0,040	0,059	0,112	0,042	0,040
4	0,079	0,041	0,047	0,131	0,044	0,041
5	0,079	0,042	0,057	0,123	0,046	0,043
6	0,076	0,041	0,062	0,116	0,043	0,041
7	0,082	0,041	0,065	0,116	0,046	0,044
8	0,050	0,042	0,061	0,131	0,044	0,043
<b>MW</b>	<b>0,066</b>	<b>0,041</b>	<b>0,056</b>	<b>0,115</b>	<b>0,043</b>	<b>0,042</b>
<b>SA</b>	<b>0,014</b>	<b>0,001</b>	<b>0,007</b>	<b>0,014</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MTT 4h Wert</b>	<b>100%</b>	<b>61,67%</b>				

Tabelle 8.23 MTT-Assay NM 377; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		MW	N	SA	Standardfehler des Mittelwertes
Paare 1	MTT.NM377.4h	,066	8	,014	,005
	MTT.NM377.TiO2.1	,056	8	,007	,002
Paare 2	MTT.NM377.4h	,066	8	,014	,005
	MTT.NM377.TiO1.50	,115	8	,014	,005
Paare 3	MTT.NM377.4h	,066	8	,014	,005
	MTT.NM377.K2Cr.20	,043	8	,002	,001
Paare 4	MTT.NM377.4h	,066	8	,014	,005
	MTT.NM377.K2Cr.200	,042	8	,001	,000

Tabelle 8.24 MTT-Assay NM 377; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. 2-seitig
		MW	SA	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
					Untere	Obere			
Paare 1	MTT.NM377.4h – MTT:NM377.TiO2.1	,010	,014	,005	-,002	,022	1,949	7	,092
Paare 2	MTT.NM377.4h – MTT.NM377.TiO1.50	-,050	,015	,005	-,062	-,037	-9,583	7	,000
Paare 3	MTT.NM377.4h – MTT:NM377.K2Cr.20	,023	,013	,005	,012	,033	4,965	7	,002
Paare 4	MTT.NM377.4h – MTT.NM377.K2Cr.200	,024	,014	,005	,012	,036	4,884	7	,002

Tabelle 8.25 MTT-Assay NM 429/30; 2 Wochen alt, 15.000 Zellen/Well

Well	MTT 4h	MTT 0h	TiO <sub>2</sub>		K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	
			1µM	50µM	20µM	200µM
1	0,067	0,038	0,058	0,084	0,048	0,038
2	0,065	0,037	0,065	0,084	0,054	0,041
3	0,060	0,038	0,062	0,070	0,048	0,041
4	0,055	0,039	0,060	0,074	0,051	0,041
<b>MW</b>	<b>0,062</b>	<b>0,038</b>	<b>0,061</b>	<b>0,078</b>	<b>0,050</b>	<b>0,040</b>
<b>SA</b>	<b>0,005</b>	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>	<b>0,007</b>	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>
<b>Anteile [%] vom jeweiligen MTT 4h Wert</b>	<b>100%</b>	<b>61,54%</b>				

Tabelle 8.26 MTT-Assay NM 429/30; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		MW	N	SA	Standardfehler des Mittelwertes
Paare 1	MTT4h.429	,062	4	,005	,003
	TiO2.1.429	,061	4	,003	,001
Paare 2	MTT4h.429	,062	4	,005	,003
	TiO1.50.429	,078	4	,007	,004
Paare 3	MTT4h.429	,062	4	,005	,003
	K2Cr.20.429	,050	4	,003	,001
Paare 4	MTT4h.429	,062	4	,005	,003
	K2Cr.200.429	,040	4	,002	,001

Tabelle 8.27 MTT-Assay NM 429/30; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20)

		Gepaarte Differenzen					T	Df	Sig. 2-seitig
		MW	SA	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
					Untere	Obere			
Paare 1	MTT.NM429/30.4h - MTT.NM429/30.TiO2.1	,001	,006	,003	-,009	,010	,166	3	,879
Paare 2	MTT.NM429/30.4h - MTT.NM429/30.TiO2.50	-,016	,004	,002	-,023	-,009	-7,608	3	,005
Paare 3	MTT.NM429/30. 4h - MTT.NM429/30.K2CrO4.20	,011	,006	,003	,002	,021	3,748	3	,033
Paare 4	MTT.NM429/30. 4h - MTT.NM429/30.K2CrO4.200	,022	,006	,003	,011	,032	6,662	3	,007

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Modell des Respirationstrakts .....	16
Abbildung 2.2 Schematische Abbildung des respiratorischen Epithels von Nasenhöhle, Trachea und Bronchien .....	18
Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der unterschiedlichen regionalen Verteilung von inhalierten Nanopartikeln .....	19
Abbildung 4.1 Übersicht über die Reaktionsschritte des LDH Assays .....	39
Abbildung 4.2 Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5- Diphenylterazoliumbromid) zu wasserunlöslichen, violetten Formazankristallen .....	40
Abbildung 4.3 Mikroskopische Aufnahme von nadelförmigen Formazankristallen während eines MTT-Versuches .....	41
Abbildung 5.1 Histologische und immunhistologische Färbungen von humanen Nasenmuscheln .....	45
Abbildung 5.2 Übersicht über Alcianblau-Färbung der Primäzellkultur .....	49
Abbildung 5.3 Vimentin- und Pancytokeratin-Färbungen einer primären Epithelzellkultur .....	50
Abbildung 5.4 Beispielhafte Darstellung der Epithelzellkulturetablierung .....	51
Abbildung 5.5 LDH Assay .....	65
Abbildung 5.6 MTT-Assay .....	67

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AB	Avidin-Biotin
AK	Antikörper
BfR	Bundesinstitut für Risikoeinschätzung
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSS	<i>Balanced Salt Solution</i>
bzw.	Beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCD	<i>Charge coupled device</i>
CD 31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAPI	4-6-Diamidino-2-Phenylindol
DG	Deckglas
DIHEN	<i>Direct-injection high-efficiency nebulizer</i>
DIN	Deutsche Industrie-Norm
DLS	Dynamische Lichtstreuung

---

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
H <sub>2</sub> O dest.	Destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
ICPMS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
Ig	Immunglobulin
INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	Kaliumchromat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KR	Krebs-Ringer
l	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase

---

M	Molare Masse
max.	Maximal
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MR	Maximalrelease
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
Na	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
NM	Nasenmuschel
NP 40	Nonylphenoethoxylat 40
OD	Optische Dichte
OT	Objektträger
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pk1 Mean	<i>Peak 1 Mean</i>
PM	<i>Particular matter</i>

---

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-1640	<i>Rosswell Park Memorial Institute-1640</i>
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
SMEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
sp.	Spontan
SR	Spontanrelease
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TNS	<i>Trypsin Neutralizing Solution</i>
Tr.	Tropfen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U/M	Umdrehungen pro Minute
UBA	Umweltbundesamt
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	Zum Beispiel
Z-Ave	<i>Z-Average</i>

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Übersicht über die verwendeten Primärantikörper .....	27
Tabelle 3.2 Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.....	27
Tabelle 3.3 Übersicht der verwendeten Laborgeräte und Programmsoftware.....	28
Tabelle 4.1 Fixierung und Dehydratation des Nasenmuschelgewebes im Hypercenter zur Vorbereitung auf die Paraffineinbettung .....	31
Tabelle 4.2 Schema der Entparaffinierung .....	32
Tabelle 5.1 Vergleich der Protokolle A-C zur Etablierung primärer nasaler Epithelzellkulturen .....	46
Tabelle 5.2 Partikelgröße in dem Medium Wasser am Beispiel einer TiO <sub>2</sub> Konzentration von 50µM. ....	53
Tabelle 5.3 Darstellung der Partikelgröße von TiO <sub>2</sub> 1µM und TiO <sub>2</sub> 50µM in Airways Medium .....	53
Tabelle 5.4 Darstellung der Partikelgröße von TiO <sub>2</sub> 1µM und TiO <sub>2</sub> 50µM in PBS/1%BSA und KR/1%BSA.....	55
Tabelle 5.5 Darstellung des Ultraschall- (US) Effektes nach 4h auf die Partikelgröße von TiO <sub>2</sub> 1µM und TiO <sub>2</sub> 50µM am Beispiel von KR/1%BSA.....	56
Tabelle 5.6 LDH-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 490nm zwischen den Puffer PBS/1%BSA und KR/1%BSA am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 289 mit jeweils 20.000 Zellen/Well .....	59
Tabelle 5.7 MTT-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 565nm zwischen den Puffern PBS/1%BSA und KR/1%BSA am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 289, mit jeweils 20.000 Zellen/Well .....	60
Tabelle 5.8 LDH-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 490nm zwischen Airwaysmedium und KR/1%BSA-Puffer am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 429/30 mit jeweils 15.000 Zellen/Well.....	62
Tabelle 5.9 Vergleich der Vitalität zwischen primärer und permanenter Tumorzelllinie in Airwaysmedium. ....	63
Tabelle 8.1 Darstellung des BSA-Effektes auf die Partikelgröße in PBS am Beispiel von TiO <sub>2</sub> 50µM .....	96
Tabelle 8.2 Darstellung des BSA-Effektes auf die Partikelgröße in KR am Beispiel von TiO <sub>2</sub> 50µM .....	96

Tabelle 8.3 LDH-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 490nm zwischen den Puffer PBS/1%BSA und KR/1%BSA am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 289 mit jeweils 20.000 Zellen/Well .....	97
Tabelle 8.4 MTT-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 565nm zwischen den Puffern PBS/1%BSA und KR/1%BSA am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 289, mit jeweils 20.000 Zellen/Well .....	97
Tabelle 8.5 LDH-Assay: Vergleich der Absorptionswerte bei 490nm zwischen Airwaysmedium und KR/1%BSA-Puffer am Beispiel der 2 Wochen alten NM Zelllinie 429/30 mit jeweils 15.000 Zellen/Well.....	98
Tabelle 8.6 Vergleich der Vitalität zwischen primärer und permanenten Tumorzelllinien in Airwaysmedium .....	98
Tabelle 8.7 LDH-Assay NM 364; 2 Wochen alt, 20.000 Zellen/Well .....	99
Tabelle 8.8 LDH-Assay NM 364; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	99
Tabelle 8.9 LDH-Assay NM 364; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	100
Tabelle 8.10 LDH-Assay NM 377; 1 Woche alt, 15.000 Zellen/Well .....	100
Tabelle 8.11 LDH-Assay NM 377; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	101
Tabelle 8.12 LDH-Assay NM 377; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	101
Tabelle 8.13 LDH-Assay NM 429/30; 2 Wochen alt, 15.000 Zellen/Well.....	102
Tabelle 8.14 LDH-Assay NM 429/30; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	102
Tabelle 8.15 LDH-Assay NM 429/30; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	103
Tabelle 8.16 MTT-Assay NM 299; 2 Wochen alt, 20.000 Zellen/Well .....	103
Tabelle 8.17 MTT-Assay NM 299; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	104
Tabelle 8.18 MTT-Assay NM 299; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	104
Tabelle 8.19 MTT-Assay NM 364; 2 Wochen alt, 20.000 Zellen/Well .....	104
Tabelle 8.20 MTT-Assay NM 364; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	105

---

Tabelle 8.21 MTT-Assay NM 364; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	105
Tabelle 8.22 MTT-Assay NM 377; 1 Woche alt, 15.000 Zellen/Well .....	106
Tabelle 8.23 MTT-Assay NM 377; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	106
Tabelle 8.24 MTT-Assay NM 377; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	107
Tabelle 8.25 MTT-Assay NM 429/30; 2 Wochen alt, 15.000 Zellen/Well .....	107
Tabelle 8.26 MTT-Assay NM 429/30; Statistik bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	108
Tabelle 8.27 MTT-Assay NM 429/30; Auswertung T-Test bei gepaarten Stichproben (IBM SPSS Statistics 20).....	108

## 9 Publikation/Danksagung

**Publikationen, die im Zusammenhang mit der Dissertation entstanden sind:**

Zeitschriftenbeiträge:

Aust W, Daum N, Bloching M, Armbrüster V, Jung E, Sprau C, Müller M, Boehm A, Mozet C, Wichmann G, Dietz A. Risiken durch Nanopartikel?. Laryngorhinootologie. 2009; 88(3):162-6.

Ich möchte mich bei allen die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben bedanken, insbesondere:

Herrn *Prof. Dr. med. B. Schick* danke ich dafür, dass er mich nach seiner Ernennung zum Direktor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde als Doktorandin übernommen hat und mir somit das Fertigstellen dieser Arbeit ermöglichte. Des Weiteren möchte ich mich für die Anregungen sowie Korrekturlesungen bedanken.

Frau *Dr. rer. nat. Vivienne Willnecker* danke ich, dass sie mir während meiner Zeit im Labor und auch beim Fertigstellen der Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihre immerwährende Ansprechbarkeit und freundschaftliche Hilfe, auch über große Entfernung, hat entscheidenden Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit. Des weiteren Danke ich ihr für die aufmerksamen und geduldvollen Korrekturlesungen.

*Monika Hoffmann* und *Ulrike Bechtel* danke ich für die Einführung in den Laboralltag, die praktische Betreuung der Arbeit sowie unvergessliche Tage in Berlin.

Ein weiteres Dankeschön geht an das *Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlandes (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lehr)* für die Bereitstellung des Zetasizers. Frau *Dr. rer. nat. Andrea Neumeyer* danke ich für ihre Hilfe beim Durchführen der Zetasizermessungen.

*Dr. med. Wolfram Aust* möchte ich für die Bereitstellung des Themas danken.

*Meinen Eltern und meiner Familie* möchte ich für all die Liebe, Unterstützung und Hilfe danken die sie mir auf meinem bisherigen Lebensweg gegeben haben.

*Thomas Veith* danke ich für seine Geduld und Unterstützung während dem Fertigstellen der Arbeit, insbesondere der Hilfe bei allen computertechnischen Fragen. Aber vor allem dafür, dass er so ist wie er ist.

*Eva Jung* danke dafür, dass sie mich bei den ersten Schritten dieser Arbeit, begleitet hat und somit die Laborzeit zu einer schönen und lustigen Zeit hat werden lassen.

*Katharina Domke-Schmidt* und *Julius Seebach* möchte ich für ihre freundschaftliche Hilfe in sprachlichen sowie computertechnischen Fragen danken.