

## Abschlussbericht zum Vorhaben

# **Die toxische Wirkung von arbeitsmedizinisch relevanten Partikeln: Einfluss der Partikelgröße, der Partikelgeometrie und der Partikeloberfläche**

## **Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV) Forschungsvorhaben FP-0412**

### Laufzeit

01.02.2018 – 30.06.2021 (Epple)  
01.04.2018 – 30.06.2021 (Köller/Sengstock)

### Berichtszeitraum

01.02.2018 – 30.06.2021

Berichtsdatum 06.10.2021

### **Antragsteller**

Prof. Dr. rer. nat. Matthias Epple (Essen)  
Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Christina Sengstock (Bochum)  
Prof. Dr. rer. nat. Manfred Köller (Bochum)  
Prof. Dr. med. Jürgen Bünger (Bochum)  
PD Dr. rer. nat. Götz Westphal (Bochum)

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	2
Kurzfassung deutsch.....	3
Kurzfassung englisch.....	3
1. Problemstellung.....	5
2. Forschungszweck/-ziel.....	5
3. Methodik.....	5
4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens.....	8
5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen.....	52
6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen.....	52
7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan.....	53
8. Anhang/Anhänge.....	53
Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte.....	55

## Kurzfassung deutsch

### Ziele:

Gesundheitsrisiken durch Partikel einschließlich Fasern sind eine vorrangige Herausforderung für den Gesundheitsschutz am Arbeitsplatz. Einerseits verursachen Partikel den weitaus größten Teil der Todesfälle durch Berufskrankheiten. Andererseits werden in jüngster Zeit Partikel mit verschiedensten Parametern für viele neue Anwendungen, insbesondere in der Nanotechnologie, beispielsweise für Oberflächenbeschichtungen oder medizinische und kosmetische Anwendungen, gezielt entwickelt und in den Verkehr gebracht, ohne dass mögliche Gesundheitsgefährdungen in jedem Fall toxikologisch hinreichend untersucht wurden. Eine gezielte Synthese von anorganischen Oxid-Partikeln mittels verschiedenster Synthesestrategien soll es im vorliegenden Projekt erstmals ermöglichen, chemisch identische Partikel, die sich lediglich in Größe, Oberfläche, Form und ggf. in ihrer Kristallinität unterscheiden, eingehend und vergleichend physikalisch-chemisch, biologisch und toxikologisch zu charakterisieren. Somit zielt das Projekt primär auf Parameter, die die Anlockung (Chemotaxis) von Entzündungszellen beeinflussen. Das können gerade spezifische Wirkungen sein, die bereits unterhalb toxischer Partikelkonzentrationen (im subtoxischen Konzentrationsbereich) wirksam werden.

### Aktivitäten/Methoden:

Die für die Arbeitswelt besonders relevanten Partikel-Systeme (Siliciumdioxid: als amorphes Silica und kristalliner Quarz; Zinkoxid; Titandioxid: Anatas und Rutil) werden in verschiedenen Größen (von Nano bis zum Mikrometerbereich) und Formen (Kugeln, Stäbchen) synthetisiert und bezüglich ihrer Reinheit und Stabilität eingehend analytisch charakterisiert. Für die Atemwegsexposition relevante Zellen (Lungenmakrophagen) werden diesen Partikeln *in-vitro* ausgesetzt. Die gebildeten Entzündungsfaktoren werden analytisch gemessen und parallel in einem *in-vitro*-Lungenzellmodell (PICMA) auf die Akkumulation von Entzündungszellen erfasst. Die gewonnenen Daten werden hinsichtlich einer Korrelation zwischen Partikelparameter und Partikeldosis und der Stärke der Reaktionen der Makrophagen (Chemotaxis, Ausschüttung von Biomarkern der Entzündung) getestet.

### Ergebnisse:

Mit Ausnahme von Quarz-Partikel konnten im vorliegenden Projekt verschiedenste Oxid-Partikelsysteme (Silica-, ZnO-, TiO<sub>2</sub>-Partikel) mit definierten Partikelformen, Größen und Kristallinitäten auf dem präparativen Weg erfolgreich synthetisiert werden, die nach anschließender Überprüfung der kolloidalen Partikelstabilität und Partikelreinheit vergleichend innerhalb jeweiliger Partikeltypen toxikologisch untersucht wurden. Die *in-vitro* Analyse der Zellreaktionen von arbeitsmedizinisch besonders relevanten Partikeln aller Partikelarten auf Alveolarmakrophagen (insbesondere der Einfluss von Partikelgröße und Partikelform) ergab im subtoxischen Bereich keine Hinweise auf entzündungsinduzierende Reaktionen, die als frühe Prädiktoren dienen können. Für das Projekt ergaben sich lediglich Hinweise auf eine mögliche Apoptose-induzierende Wirkung durch ZnO-Partikel, sowie eine mögliche Apoptose-inhibierende Wirkung durch TiO<sub>2</sub>-Partikel. Insgesamt konnten nur geringe Risiken und geringfügig signifikante Unterschiede im sub-toxischen Bereich durch synthetisierte Partikel (Silica, TiO<sub>2</sub>, ZnO) bei gleichzeitiger Veränderung ihrer verschiedenster Partikelparameter innerhalb jeweiliger Partikelsysteme festgestellt werden. Erwartungsgemäß wirkten allerdings ZnO-Partikel aufgrund der Freisetzung von Zn<sup>2+</sup>-Ionen in biologischen Medien etwas toxischer als praktisch unlösliche Silica-, und TiO<sub>2</sub>-Partikel.

## Kurzfassung englisch

### Objectives:

Health risks caused by particles and fibers constitute still an important challenge for health protection at the workplace. Although particles are responsible for the majority of deaths

resulting from occupational diseases, particles with a variety of parameters have been recently developed and commercially introduced into the market for many new applications, especially in the field of nanotechnology, for example for surface coating or medical and cosmetic applications, without any toxicological investigations on possible health hazards. A targeted synthesis of inorganic oxide particles, using various synthesis strategies, will enable us to characterize chemically identical particles with different size, surface and shape, in terms of their physicochemical, biological and toxicological effects. The project is focused primarily on particle parameters which lead to an attraction (chemotaxis) of inflammatory cells. These can be specific effects that already occur below toxic particle concentrations (in the sub-toxic range).

#### Methods:

The following particle systems, of particular importance in occupational medicine, will be synthesized in different size and shape: titanium dioxide, silicon dioxide (as crystalline quartz and as amorphous silica) and zinc oxide, and finally characterized in terms of their colloidal stability and purity. Relevant cells from the pulmonary tract (lung macrophages) will be incubated with these particles *in vitro*. Generated inflammation factors are measured analytically and recorded parallel using an *in vitro* lung cell model (PICMA), with regard to the accumulation of inflammatory cells. The obtained data are tested towards correlation between particle size or particle surface and the strength of the immune reactions of macrophages (chemotaxis, release of biomarkers of inflammation).

#### Results:

With the exception of quartz particles, various oxide particle systems (silica, ZnO, TiO<sub>2</sub> particles) with defined particle shape, size and crystallinity have been successfully synthesized using preparative methods. After subsequent examination of colloidal stability and purity, the particles were compared for potential toxicity. The *in vitro* analysis of cell reactions on particles (of all particle types) of alveolar macrophages (in particular the influence of particle size and shape) did not reveal any indications of inflammatory reactions that could serve as early markers of the subtoxic range. For the project, there were only indications of a possible apoptosis-inducing effect, due to ZnO particles, and a possible apoptosis-inhibiting effect, due to TiO<sub>2</sub> particles. Overall, only minor risks and minor significant differences in the sub-toxic range could be determined for synthesized particles (silica, TiO<sub>2</sub>, ZnO) with simultaneous modifications of various particle parameters within the particle systems. As expected, ZnO particles were more toxic than, practically insoluble, silica and TiO<sub>2</sub> particles, due to the release of free Zn<sup>2+</sup> ions into biological media.

# 1. Problemstellung

Gesundheitsrisiken durch Partikel einschließlich Fasern sind eine vorrangige Herausforderung für den Gesundheitsschutz am Arbeitsplatz.

Trotz der ubiquitären Expositionen durch unterschiedlichste Partikel und der langjährigen Forschung auf diesem Gebiet gibt es grundlegende ungeklärte Fragen hinsichtlich der Prävention partikelbedingter Atemwegserkrankungen. Zwei entscheidende offene Fragen betreffen den Einfluss von Partikelgröße/Partikelform (gemeinsam zu betrachten) und Partikeloberfläche/Oberflächenreaktivität auf die biologische Wirkung und mögliche Gesundheitsrisiken.

Das Vorhaben widmete sich daher speziell diesen Fragestellungen, wobei die in der Arbeitswelt besonders relevanten Partikeltypen Titandioxid, Siliciumdioxid (als Quarz und als Silica) und Zinkoxid behandelt wurden. Zinkoxid wurde zudem im IPA in kontrollierten inhalativen Humanstudien untersucht. Eine gezielte Synthese sollte es erstmals ermöglichen, chemisch identische Partikel, die sich lediglich jeweils in ihrer Größe und Oberfläche oder ihrer Form unterscheiden, eingehend vergleichend physikalisch-chemisch, biologisch und toxikologisch zu charakterisieren. Diese Untersuchungen sollten Erkenntnisse erzielen, um die Primärprävention und die arbeitsmedizinisch-toxikologische Bewertung von Gefährdungen durch Partikel grundlegend zu verbessern.

## 2. Forschungszweck/-ziel

Die toxikologische Untersuchung einatembarer Partikel soll an fünf hergestellten Oxid-Partikelsorten ( $\text{SiO}_2$ : Quarz und Silica,  $\text{TiO}_2$ : Rutil und Anatas, ZnO) erfolgen. Deren Wirkung soll systematisch untersucht mit einem etablierten Zellkulturmodell werden, das die Partikel-induzierte Einwanderung von Entzündungszellen in die Lunge abbildet, bestehend aus Lungenmakrophagen (NR8383) und einer Modellzelllinie für neutrophile Granulozyten (dHL-60 Zellen). Dabei fokussiert das Forschungsvorhaben auf die Parameter Partikelgröße und die Form der Partikel bei gleicher chemischer Zusammensetzung und Kristallstruktur. Es wird angenommen, dass für die Partikel eine zelltoxische Wirkung nicht allein von der Menge oder Anzahl abhängt, sondern dass Partikelgröße, Partikelform und Partikeloberfläche entscheidende Einflussfaktoren sind. Es soll auch der Einfluss dieser Parameter auf die Generierung von entzündlichen Botenstoffen (Zytokine und Chemokine) analysiert werden. Speziell soll untersucht werden, ob eine frühe Generierung von Botenstoffen bei nicht zelltoxischen Dosierungen und zu frühen Zeitpunkten identifizierbar ist bzw. sogar ein Netzwerk solcher Botenstoffe als prädiktive Marker subtoxischer Reaktionen vorliegt. Dazu wird zusätzlich eine Korrelation zum Partikel-induzierten Chemotaxis-Assay (PICMA, biologischer Funktionstest) herangezogen.

## 3. Methodik

### Gesetzte Ziele des 1. Jahres:

1. Synthese und Charakterisierung von PVP-ZnO-Partikeln
2. Zellbiologische Untersuchung von PVP-ZnO-Partikeln
  - Aufnahme der Partikel in die Zellen
  - Zelltoxizitätsbestimmung
  - Zellaktivierung: ROS-Bildung und Protein Array
3. PICMA-Test von PVP-ZnO-Partikeln

Die gesetzten Ziele wurden alle im Projektzeitraum der ersten Förderphase erreicht. Darüber hinaus wurden noch zusätzliche ergänzende Untersuchungen durchgeführt bzw. vorgezogen:

1. Synthese und Charakterisierung von amorphen Silica-Partikeln

2. Synthese von fluoreszenzmarkierten Silica-Partikeln
3. Löslichkeitsuntersuchungen von hergestellten PVP-ZnO-Partikeln in verschiedenen Medien (Reinstwasser, Zellkulturmedium, simuliertes „lysosomales“ Medium)
4. Zellbiologische Untersuchung von amorphen Silica-Partikeln
  - Aufnahme der Partikel in die Zellen
  - Zelltoxizitätsbestimmung
  - Aktivierung der Zellen: ROS-Bildung und Protein Array
5. PICMA-Test von Silica-Partikeln

**Gesetzte Ziele des 2. Jahres:**

1. Synthese und Charakterisierung von PVP-ZnO-Partikeln, Silica-Partikeln und Quarz-Partikeln
  - Synthese der PVP-funktionalisierten ZnO-Submikrokugeln
  - Synthese der PVP-Silica-Riesenstäbchen
  - Synthese der kristallinen Quarz-Partikel
2. Zellbiologische Untersuchung von Silica-Partikeln
  - Aufnahme und intrazelluläre Lokalisation der Silica-Partikel
  - Zelltoxizitätsbestimmung
  - Zellaktivierung: Protein Array und ELISA
3. Zellbiologische Untersuchung von PVP-ZnO-Partikeln
  - Messung der intrazellulären Zink-Ionen-Konzentration
  - Zelltoxizitätsbestimmung
  - Apoptosebestimmung
  - Zellaktivierung: ROS-Bildung, Protein Array und ELISA
4. PICMA-Test
  - PICMA-Test von PVP-ZnO-Partikeln
  - PICMA-Test von PVP-Silica-Riesenstäbchen

**Gesetzte Ziele des 3. Jahres:**

1. Synthese und Charakterisierung von kristallinen TiO<sub>2</sub>-Partikeln in zwei definierten Kristallstrukturen (Anatas, Rutil)

Ergänzend zu den gesetzten Zielen im Projekt wurden amorphe TiO<sub>2</sub>-Partikeln als Vergleichspartikel synthetisiert

2. Zellbiologische Untersuchung von TiO<sub>2</sub>-Partikeln (amorph, kristallin)
  - Zelltoxizitätsbestimmung
  - Zellaktivierung: ROS-Bildung, Protein Array und ELISA
3. Zellbiologische Untersuchung von PVP-ZnO-Partikeln
  - Messung der intrazellulären Zink-Ionen-Konzentration
  - Zelltoxizitätsbestimmung
  - Apoptosebestimmung
  - Zellaktivierung: ROS-Bildung, Protein Array und ELISA
4. PICMA-Test
  - PICMA-Test von PVP-ZnO-Partikeln
  - PICMA-Test von PVP-Silica-Riesenstäbchen
  - PICMA-Test von TiO<sub>2</sub>-Partikeln

Tab. 1 zeigt einen Überblick über die Einzelschritte des Arbeitsprogramms. (grau: erfolgreich durchgeführt; grün: präparativ schwer realisierbar; blau: nicht durchgeführt).

	Jahr 1		Jahr 2		Jahr 3	
<b>Arbeitspaket 1: Zinkoxid-Partikel</b>						
Synthese und Charakterisierung von ZnO-Partikeln (Epple)	■	■	■	■	■	
Zellbiologische Untersuchung von ZnO-Partikeln (Köller, Sengstock)	■	■	■	■	■	
PICMA-Test an ZnO-Partikeln (Bünger, Westphal)	■	■	■	■	■	
<b>Arbeitspaket 2: SiO<sub>2</sub>-Partikel (Silica, amorph)</b>						
Synthese und Charakterisierung von SiO <sub>2</sub> -Partikeln (Silica) (Epple)			■	■	■	■
Zellbiologische Untersuchung von SiO <sub>2</sub> -Partikeln (Silica) (Köller, Sengstock)			■	■	■	■
PICMA-Test an SiO <sub>2</sub> -Partikeln (Silica) (Bünger, Westphal)			■	■	■	■
<b>Arbeitspaket 3: SiO<sub>2</sub>-Partikel (Quarz)</b>						
Synthese und Charakterisierung von SiO <sub>2</sub> -Partikeln (Quarz) (Epple)				■	■	■
Zellbiologische Untersuchung von SiO <sub>2</sub> -Partikeln (Quarz) (Köller, Sengstock)					■	■
PICMA-Test an SiO <sub>2</sub> -Partikeln (Quarz) (Bünger, Westphal)					■	■
<b>Arbeitspaket 4: TiO<sub>2</sub>-Partikel (Rutil)</b>						
Synthese und Charakterisierung von TiO <sub>2</sub> -Partikeln (Rutil) (Epple)					■	■
Zellbiologische Untersuchung von TiO <sub>2</sub> -Partikeln (Rutil) (Köller, Sengstock)					■	■
PICMA-Test an TiO <sub>2</sub> -Partikeln (Rutil) (Bünger, Westphal)					■	■
<b>Arbeitspaket 5: TiO<sub>2</sub>-Partikel (Anatas)</b>						
Synthese und Charakterisierung von TiO <sub>2</sub> -Partikeln (Anatas) (Epple)					■	■
Zellbiologische Untersuchung von TiO <sub>2</sub> -Partikeln (Anatas) (Köller, Sengstock)					■	■
PICMA-Test an TiO <sub>2</sub> -Partikeln (Anatas) (Bünger, Westphal)					■	■
<b>Arbeitspaket 6: Bariumsulfat-Partikel</b>						
Synthese und Charakterisierung von BaSO <sub>4</sub> -Partikeln (Kontrolle; Epple)	■	■	■	■	■	■
Zellbiologische Untersuchung von BaSO <sub>4</sub> -Partikeln (Kontrolle; Köller, Sengstock)	■	■	■	■	■	■
PICMA-Test an BaSO <sub>4</sub> -Partikeln (Kontrolle; Bünger, Westphal)	■	■	■	■	■	■
<b>Arbeitspaket 7: Publikationen und Berichte</b>						
Tagungspräsentationen, referierte Publikationen, interne zusammenfassende Berichte			■	■	■	■

## 4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

### 4.1 Ausführliche Darstellung der durchgeführten Forschungsarbeiten

#### 4.1.1 Vorbereitung des Testmaterials

Die Lagerung der synthetisierten Partikelsysteme erfolgte in Pulverform bei 4 °C in dunkler Umgebung. Die als Pulver vorliegenden Partikel wurden mittels Feinwaage in 15 ml Polypropylen-Tubes abgewogen (Mindestmenge 1 mg) und in sterilem Aqua dest. suspendiert. Die Konzentration des Partikelansatzes war abhängig von der Partikellöslichkeit und der Zielkonzentration der Partikel im Testansatz (Tab. 2). Zur Auflösung von Agglomeraten und Bildung einer annähernd monodispersen Lösung wurden die Partikel nach der Zugabe von Aqua dest. zunächst gevortext, um randständige Partikel zu lösen und anschließend für 5 min im Ultraschallbad (Elma Sonic S10, 30 W, 50/60 Hz, 450 ml Volumen) behandelt. Dieses Vorgehen entsprach exakt den Bedingungen, unter welchen die Partikel charakterisiert wurden. Um die Sedimentation der Partikel während der Verwendung zu minimieren, wurden die Partikelansätze vor jedem Pipettivorgang gevortext. Alle Partikel wurden unmittelbar vor der Verwendung angesetzt und nach dieser verworfen, um Alterungsprozess basierte Schwankungen in den Messungen zu verhindern.

**Tab. 2:** Vorratslösungen der Partikel.

Nanopartikel	Konzentration
ZnO-Partikelsorten	1 mg/mL
Silica-Partikelsorten	4 mg/mL
TiO <sub>2</sub> -Partikelsorten	4 mg/ml
BaSO <sub>4</sub> -Submikrokugeln	1 mg/ml

#### 4.1.2 Vorbereitungen der Zellkultur

Für die *in vitro* Testung wurden Zellen der etablierten Zelllinie NR8383 (Ratten-Alveolarmakrophagen, LGC Standards GmbH) in HAM's F-12 mit 15% FCS in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Zellversuche wurden mit 2,4x10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> und einem Inkubationsvolumen von 640 µL in 24-Loch-Platten durchgeführt. Nach Inkubation der Testansätze wurden die teilweise adhärennten NR8383-Zellen mittels Pipette abgelöst und mit nicht-adhäsiven NR8383-Zellen für die folgenden Analysen in 5 mL Rundbodenröhrchen kombiniert.

#### 4.1.3 Aufnahme der Partikel in Zellen

Die Analyse der intrazellulären Aufnahme der unterschiedlichen Partikel in NR8383-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) war aufgrund der geringen Partikeldichte im Vergleich zu BaSO<sub>4</sub> nicht möglich.

Jedoch konnte die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten SiO<sub>2</sub>-Partikeln mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM, LSM700, Zeiss) untersucht werden. Dafür wurden die Zellen auf einer Testplatte ausgesät (2,4x10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>) und unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) mit einer subtoxischen Konzentration der Partikel (100 µg mL<sup>-1</sup>) kultiviert. Für die anschließende Analyse der Lokalisation der Partikel in den Zellen wurden endo-/lysosomale intrazelluläre Organellen mittels Lyotracker angefärbt.

Des Weiteren war eine Untersuchung der SiO<sub>2</sub>-Partikel-Aufnahme ohne Fluoreszenzmarkierung mittels elektronenmikroskopischer Techniken möglich. Mittels Focused-Ion-Beam (FIB)-Milling wurden schrittweise dünne Zellschichten abgetragen und gleichzeitig durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) elektronendichte Strukturen (Partikel) innerhalb der Zellen detektiert. Zusätzlich war es möglich dünne Zelllamellen (ca. 100 nm) herauszulösen und mit Transmissionselektronenmikroskopie und energiedispersiver Röntgenspektroskopie (TEM/EDX) zu analysieren.

Im Falle der ZnO-Partikel war die Analyse der Partikelaufnahme in Zellen mittels konfokaler und elektronenmikroskopischer Techniken aufgrund der schnellen intrazellulären Auflösung der Partikel nicht möglich. Die Aufnahme der Partikel sowie die Auflösung wurden daher indirekt über die intrazelluläre Zink-Ionen-Konzentration bestimmt (vgl. Punkt 3.4).

Zur Untersuchung der intrazellulären Aufnahme von TiO<sub>2</sub>-Partikeln kamen außerdem REM-Analysen zum Einsatz.

#### **4.1.4 Intrazelluläre Zink-Ionen-Konzentration**

Die intrazelluläre Konzentration von Zink-Ionen nach Exposition von NR8383-Zellen mit verschiedenen ZnO-Partikeln wurde mit Hilfe des Zn<sup>2+</sup>-selektiven Indikators FluoZin-3 (Invitrogen) und der Durchflusszytometrie (FACSCalibur, BD Bioscience) untersucht. Dazu wurden die Zellen für 2 h mit ZnO-Partikeln (80, 40, 20 µg mL<sup>-1</sup>) unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend mit 100 µM FluoZin-3 für 30 min bei RT gefärbt. Um avitale Zellen auszuschließen, wurde zusätzlich eine Propidiumiodid-Färbung (vgl. Punkt 3.5) durchgeführt. Pro Testansatz wurden 10.000 Zellen analysiert und die Daten mit der Software CELLQuest 1.2.2 (BD Bioscience) quantifiziert.

#### **4.1.5 Bestimmung der Zytotoxizität**

Die Messung der Zytotoxizität der verschiedenen Partikel erfolgte mittels FACS nach 2 h und 16 h Exposition mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (SiO<sub>2</sub>- und TiO<sub>2</sub>-Partikel: 300, 200, 100, 50, 25 µg mL<sup>-1</sup>; ZnO-Partikel: 80, 40, 20, 10, 5 µg mL<sup>-1</sup>) unter Standard-Zellkulturbedingungen und mit anschließender Markierung toter Zellen mit 50 µg mL<sup>-1</sup> Propidiumiodid (Sigma-Aldrich) für 10 min bei RT. Als Kontrolle für Zink-Ionen wurde zusätzlich eine auf die Gesamtkonzentration von Zink normierte Zinkacetatlösung (40, 20, 10, 5 µg mL<sup>-1</sup>) eingesetzt. Pro Testansatz wurden 10.000 Zellen analysiert und die Daten mit der Software CELLQuest 1.2.2 quantifiziert.

Zusätzlich kam der AlamarBlue®-Assay zum Einsatz, welcher die photometrische Bestimmung der Zellviabilität mittels des wasserlöslichen Farbstoffs Resazurin ermöglicht. Für den Assay wurden die Zellen ebenfalls für 2 h und 16 h unter Standard-Zellkulturbedingungen mit den Partikeln inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Farbstoffes alamarBlue® im Volumenverhältnis 1+10 (64 µL). Nach Zugabe des Farbstoffes wurden die Ansätze weitere 90 min unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend im Photometer gemessen (FLUOstar OPTIMA Microplate Reader).

#### **4.1.6 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)**

Die quantitative Analyse der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in NR8383-Zellen als Maß für den oxidativen Stress erfolgte mittels DCF-Assay und FACS nach 2 h Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Partikeln in unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (vgl. Punkt 3.5). Hierzu wurden die Zellen nach Partikel-Exposition mit 20 µM 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA, Thermo Fisher Scientific) für 30 min bei 37 °C gefärbt. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und avitalen Zellen wurde zusätzlich eine Propidiumiodid-Färbung (vgl. Punkt 3.5) durchgeführt. Pro Testansatz wurden 10.000 Zellen analysiert und die Daten mit der Software CELLQuest 1.2.2 quantifiziert.

Zusätzlich erfolgte die qualitative Analyse der ROS-Bildung nach 2 h Exposition mit 80 µg mL<sup>-1</sup> der verschiedenen ZnO-Partikel mittels CLSM und Färbung der Zellen mit 5 µM CellROX Green (Thermo Fisher Scientific) für 30 min unter Standard-Zellkulturbedingungen. Als Positivkontrolle für erhöhte ROS-Werte dienten NR8383-Zellen, die für 30 min mit 3% (100 µM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurden.

#### **4.1.7 Zytokinfreisetzung**

Die Detektion bioaktiver Faktoren im Zellkulturüberstand erfolgte qualitativ mittels Protein-Microarrays (Profiler Array Rat XL Cytokine Array Kit, Firma R&D), sowie quantitativ mittels Sandwich-ELISA-Kits (R&D Systems Quantikine, Bio-Techne GmbH).

Nach der Inkubation von NR8383-Zellen mit den verschiedenen Partikeln für 16 h unter Standard-Zellkulturbedingungen wurden die Überstände der Testansätze zur Eliminierung von Zellen und zellulären Kleinstbestandteilen bei 300 g für 10 min zentrifugiert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Mit Hilfe der membranbasierten Protein-Microarrays, bestehend aus einer Nitrozellulosemembran, auf der die primären Antikörper (jeweils als Doppel-Spots) aufgebracht waren, wurden insgesamt 79 bioaktive Faktoren durch biotinylierte Sekundär-Antikörper detektiert und mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Nach Anweisungen

des Herstellers wurden die Chemolumineszenz-Signale mittels CCD-Kamera an einem Microarray-Imager (Amersham Imager 600 RGB, GE Healthcare Life Sciences) in Graustufen erfasst. Die semiquantitative Auswertung der Graustufen erfolgte am Computer mit Hilfe der Software ImageQuantTL (GE Healthcare Life Sciences). Dabei wurden die einzelnen Spots auf der Membran zu den Referenz-Spots der gleichen Membran normalisiert. Anschließend wurden 27 Faktoren auf der Grundlage des Proteom-Repertoires von NR8383-Zellen (nach Duhamel et al. 2015<sup>1</sup>) für eine detaillierte Analyse ausgewählt (dargestellt als Heatmap). Zusätzlich wurden vier bioaktive Faktoren (IL-1 $\beta$ , GDF-15, TNF- $\alpha$ , CXCL1) ebenfalls per Sandwich-ELISA-Kits quantifiziert.

Um eine Korrelation der Ergebnisse zu funktionellen PICMA-Assay-Daten zu ermöglichen, wurden für die Protein-Microarrays und die PICMA-Analysen dieselben Zellkultur-Überstände verwendet.

#### **4.1.8 PICMA**

Die Zugabe von Partikeln einschließlich Fasern unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit zur Makrophagenzelllinie NR8383 führt zu deren Aktivierung und Sekretion entzündlicher Botenstoffe in das Kulturmedium. Diese Botenstoffe können weitere Entzündungszellen anlocken [7]. Durch den Vergleich der Stärke des Migrationseffektes mit den Ergebnissen bekannter und auch im Menschen und im Tierexperiment gut untersuchter Partikel (z.B. Quarz) oder Fasern (z.B. Multiwalled Carbon Nanotubes und Asbest, siehe [8]) lassen sich Bewertungen hinsichtlich der Gefährdung der Beschäftigten am Arbeitsplatz bei Exposition gegenüber diesen Stäuben vornehmen. Weiterhin lassen sich Stäube, die bei verschiedenen Verfahren oder aus bestimmten Materialien entstehen, toxikologisch vergleichen und solche mit den geringsten gesundheitlichen Risiken identifizieren.

Die synthetisierten Proben, die von der Anorganischen Chemie erhalten wurden, wurden zunächst für die biologischen Untersuchungen bei 121 °C im Autoklaven hitzesterilisiert und mit Ultraschall im Zellkulturmedium suspendiert. Die Dosisfindung für die Tests erfolgte in Anlehnung an gesetzliche Forderungen für toxikologische Untersuchungen, beispielsweise gemäß REACH oder den OECD-Guidelines. Es wird angestrebt, die Maximal Tolerierte Dosis (MTD) in der höchsten Dosierung zu erreichen, gefolgt von einer intermediären und einer nur gering toxischen Dosierung.

Für den PICMA wurden Rattenmakrophagen (NR8383) in Kulturflaschen mit den Partikelsuspensionen in aufsteigenden Konzentrationen bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> für exakt 16 Stunden inkubiert. Dieser Schritt erfolgte in diesem Projekt durch Mitarbeiter/innen der Chirurgischen Forschung. Die Zellüberstände der Inkubation wurden über eine differentielle Zentrifugation gewonnen und dienten als Lockstoff im Chemotaxis-Assay. Hierzu wurden die Zellüberstände in den unteren Trog einer Boyden-Kammer gegeben. Als Zellen, die angelockt werden sollten, dienten HL-60 Zellen, die zuvor mit *trans*-Retinal differenziert wurden (dHL-60 Zellen). dHL-60 Zellen haben zahlreiche Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten. Die dHL-60 Zellen wurden in ein Insert gegeben, das in die Boydenkammer eingebracht wurde. Am Boden des Inserts befanden sich 3  $\mu$ m-große Löcher, durch die die Zellen in Richtung des Lockstoffs in der unteren Kammer wandern konnten. Das Ausmaß der Zellwanderung korreliert mit der Menge und der Potenz des Lockstoffs in der unteren Kammer und spiegelt die Stärke der entzündungsfördernden Wirkung wider. Als Akzeptanzkriterium für einen erfolgreichen Test waren Ergebnisse mit der Positivkontrolle (Silica Nanopartikel) im Rahmen der historischen Ergebnisse in dem Test. Da die Partikel sich sehr schnell am Boden der Kulturgefäße absetzten, wurden Konzentrationen in  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> angegeben [7].

## **4.2 Synthese und Charakterisierung von ZnO-Partikeln (Wurtzit-Struktur), SiO<sub>2</sub>-Partikeln (Silica (amorph); Quarz (kristallin)) und von TiO<sub>2</sub>-Partikeln (amorph, kristallin (Anatas und Rutil))**

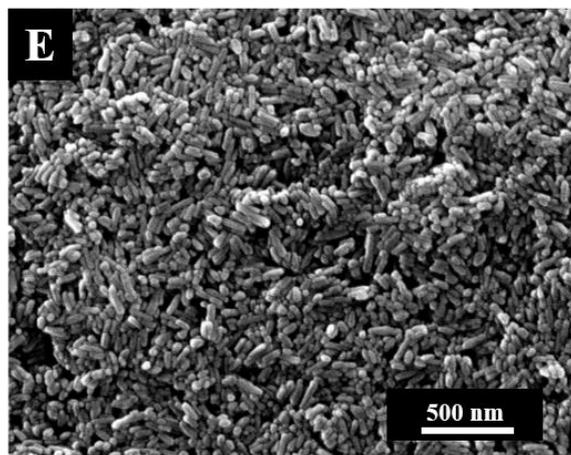
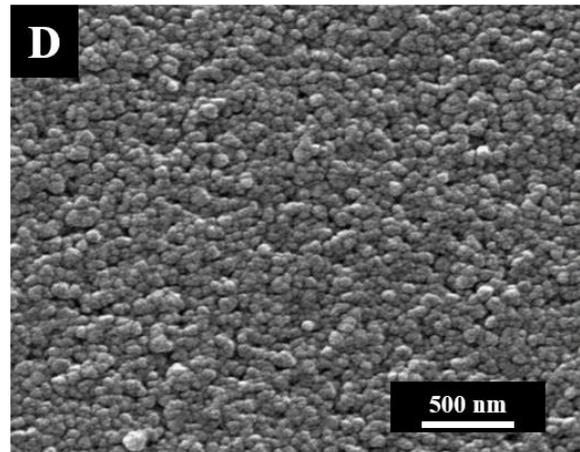
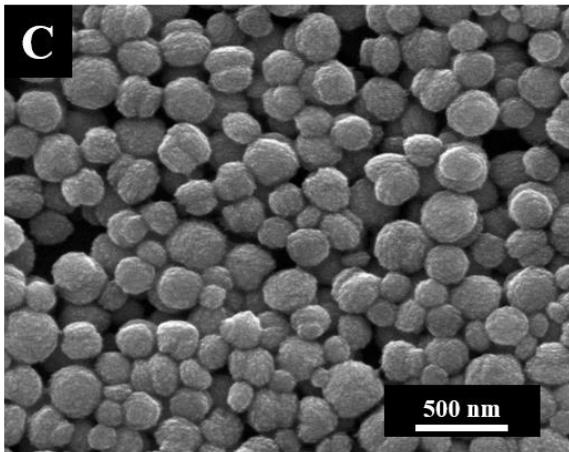
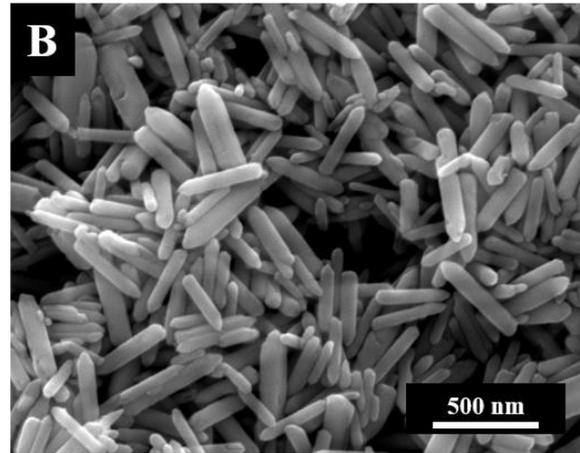
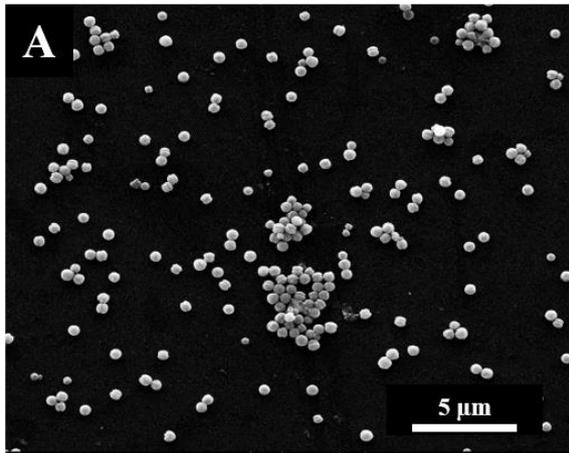
### **4.2.1 Synthese und Charakterisierung PVP-funktionalisierter ZnO-Partikel**

Die Synthese der PVP-funktionalisierten ZnO-Mikropartikel erfolgte in Anlehnung an eine literaturbekannte Solvothermal-synthese. Hierbei konnten in etablierter „Eintopf“-Synthese ausgehend von Zinknitrat in Dimethylformamid (DMF) durch gezielte Variation der Syntheseparameter (u.a. Hydrolyserate, Reaktionszeit, Reaktionstemperatur) einheitliche PVP-ZnO-Mikrokugeln und PVP-ZnO-Mikrostäbchen synthetisiert werden. Der eingesetzte Oberflächenstabilisator Poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP) diente während der Synthese sowohl zur Kontrolle der gewünschten Partikelform als auch zur Sicherstellung der Dispergierbarkeit der Partikel nach anschließender Aufreinigung.

Nach den erfolgreich durchgeführten Synthesen der beiden PVP-ZnO-Partikelsorten (Mikrokugeln, Mikrostäbchen) wurde es im Verlauf der weiteren Arbeiten angestrebt, PVP-ZnO-Submikropartikel (Kugeln (d ~250 nm), Stäbchen (L ~250 nm)) herzustellen. Hierzu mussten zuerst einige präparative Strategien ausgearbeitet werden, um das Wachstum der Partikel während der Synthese bei der gewünschten Partikelgröße anzuhalten. So erfolgte eine reproduzierbare Synthese monodisperser PVP-ZnO-Submikrokugeln erst nach der Variation der Syntheseparameter bei der „Eintopf“-Synthese in DMF ausgehend von Zinknitrat und in Gegenwart von PVP. Das Ausprobieren verschiedener Reaktionsansätze zur Darstellung der PVP-Submikrostäbchen mit einheitlichen Partikellängen von 250 nm führte jedoch zur Bildung abgerundeter und irregulärer Partikel, wodurch nach mehreren Versuchen auf die Darstellung dieser Partikelsorte verzichtet wurde.

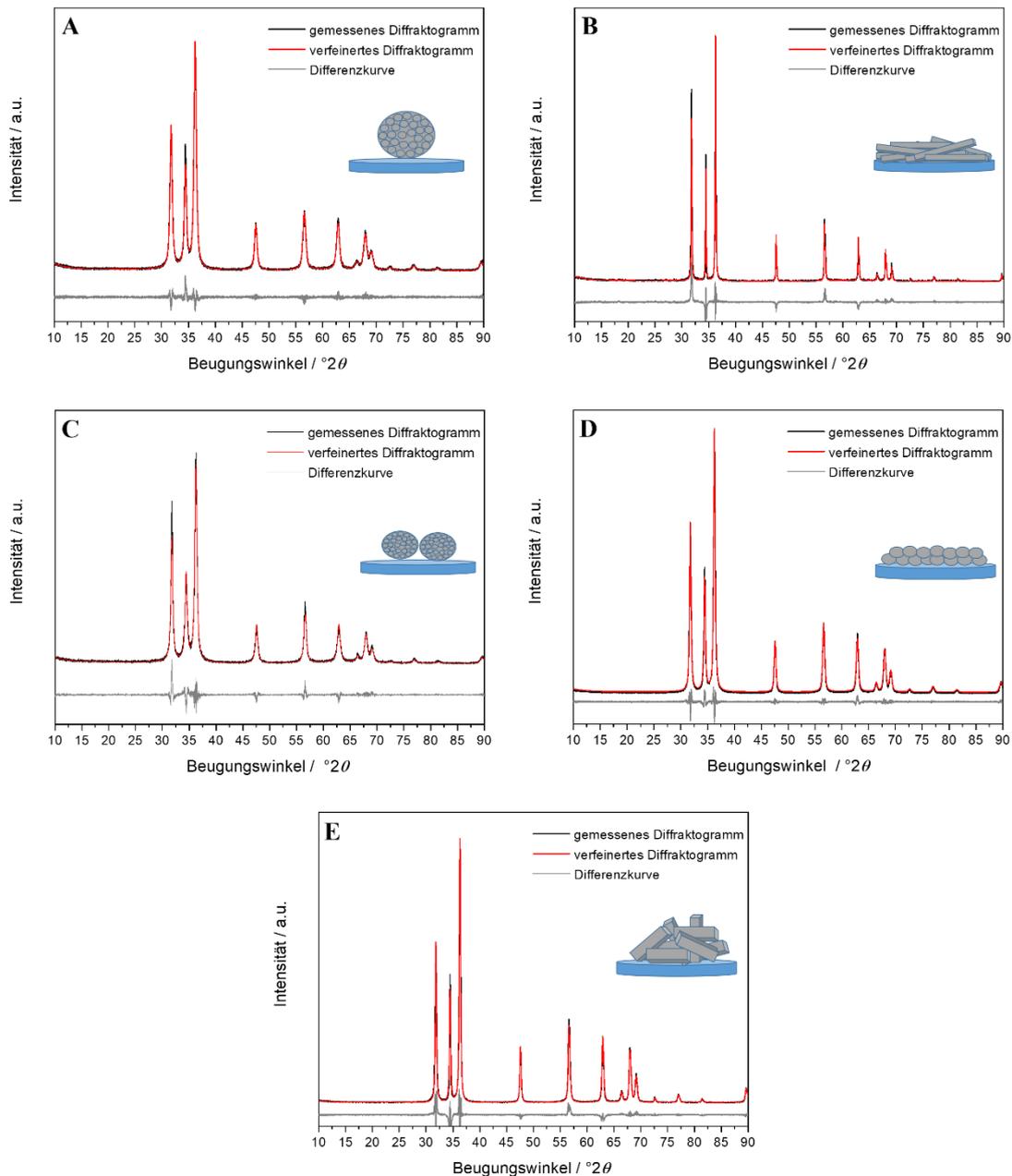
Die Darstellung der deutlich kleineren PVP-ZnO-Nanopartikel (Nanokugeln (d ≤100 nm), Nanostäbchen (L ≤100 nm)) erfolgte nach dem Polyol-Prozess in hochsiedenden Polyol-Lösungsmitteln (Ethylenglycol, Diethylenglycol), in Gegenwart von PVP-Stabilisator und bei deutlich erhöhten Zinksalz-Mengen im Vergleich zu den Synthesen von ZnO-Partikeln im Submikro- und Mikrometerbereich. Dabei kam es zur Bildung der Partikel durch Zersetzung des Zinkacetats bei 180 °C im gewählten Verhältnis von Diethylenglycol bzw. Ethylenglycol zu Wasser.

Nach der Synthese und Aufreinigung aller Partikelsorten (mehrfache Zentrifugation der Partikel in Ethanol und anschließende Partikelrocknung bei 80 °C) schloss sich eine Charakterisierung mittels elektronenmikroskopischer, kolloidchemischer, elementaranalytischer, IR-, UV-spektroskopischer und Röntgenbeugungsmethoden an, wobei der Einsatz der Rasterelektronenmikroskopie (REM) bei Überprüfung des Syntheseerfolgs unerlässlich war. Abb. 1 zeigt repräsentative Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen der erfolgreich hergestellten PVP-ZnO-Partikelsorten (insgesamt fünf Partikelsorten).



**Abb. 1:** Repräsentative REM-Aufnahmen der synthetisierten PVP-stabilisierten ZnO-Partikel mit definierter Größe und Morphologie. **A:** Mikrokugeln (500 nm). **B:** Mikrostäbchen (100 nm-500 nm). **C:** Submikrokugeln (200 nm). **D:** Nanokugeln (40 nm). **E:** Nanostäbchen (40 nm-100 nm).

Die weitere Charakterisierung der hergestellten PVP-ZnO-Partikel hinsichtlich ihrer Kristallstruktur erfolgte mittels Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD) mit anschließender Rietveld-Verfeinerung (Abb. 2). Anhand der PXRD-Daten ließ sich erkennen, dass in allen Diffraktogrammen scharfe Reflexe vorhanden waren und demzufolge die hergestellten ZnO-Proben kristallin waren. Durch den Vergleich der gemessenen Reflexe mit der Literaturdatenbank für die hexagonale Wurtzit-Struktur von ZnO wurde weiterhin nachgewiesen, dass die PVP-ZnO-Partikel die gewünschte Wurtzit-Kristallstruktur annehmen.

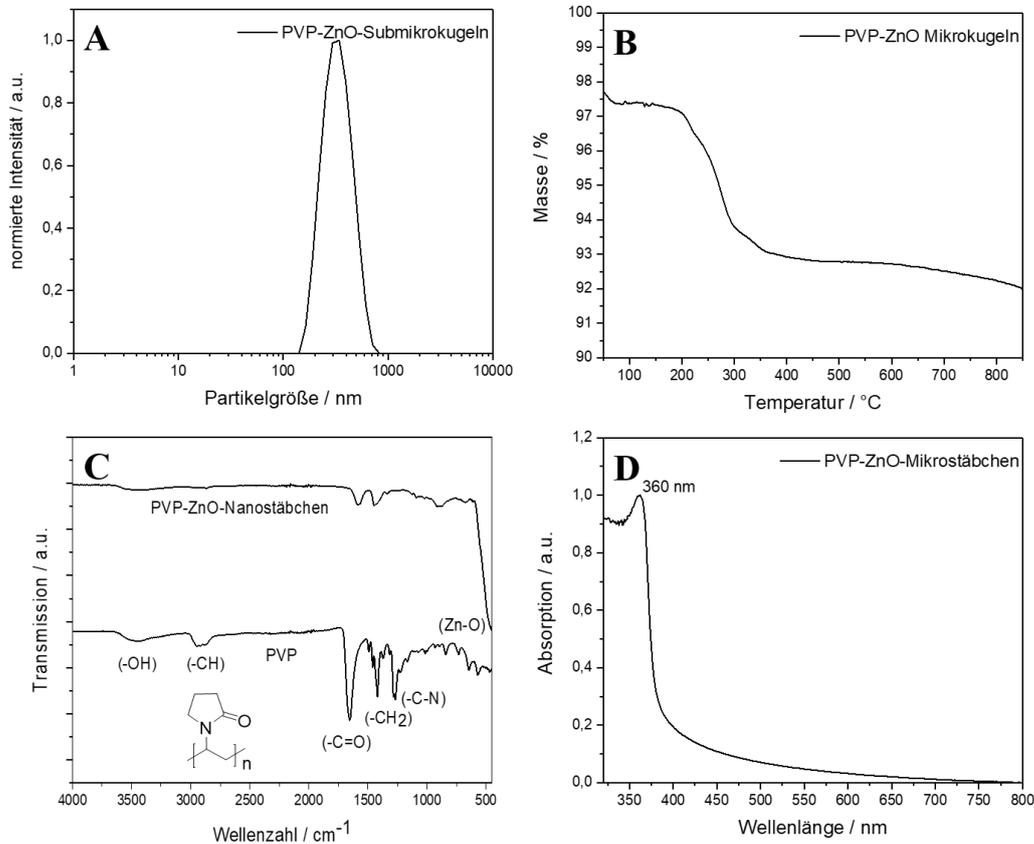


**Abb. 2:** Rietveld-verfeinerte Röntgenpulverdiffraktogramme der synthetisierten PVP-stabilisierten ZnO-Partikel in der Wurtzit-Struktur: Mikrokugeln (**A**), Mikrostäbchen (**B**), Submikrokugeln (**C**), Nanokugeln (**D**), Nanostäbchen (**E**). Inserts: Schematische Darstellung der Vorzugsorientierung der Partikel auf dem Probenträger (Wurtzit: ICDD-Datenbank: # 36-1451).

Die Bestimmung der Partikelgrößen in Dispersionen erfolgte mit der dynamischen Lichtstreuung (DLS). Hierfür wurden die Partikel im Reinstwasser im Ultraschallbad vollständig redispersiert und die Partikeldispersionen mehrfach mit DLS vermessen. Neben der Bestimmung der Partikelgrößen im Reinstwasser konnte eine qualitative Untersuchung der getrockneten Partikel hinsichtlich der Partikelfunktionalisierung mit PVP mittels IR-Spektroskopie verfolgt werden. Zur quantitativen Abschätzung des Zn-Gehalts sowie des PVP-Polymer-Anteils an der Partikeloberfläche wurden die ZnO-Proben mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) und Thermogravimetrie (TG) untersucht. Die optischen Eigenschaften von PVP-ZnO-Partikeln wurden mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie untersucht.

Abb. 3 zeigt exemplarisch die DLS-, TG-, IR-Daten sowie die UV/Vis-spektroskopische Messung für jeweilige PVP-ZnO-Partikelsorten.

Die Tab. 3 fasst die REM-, DLS-, TG-, und AAS-Daten für fünf PVP-ZnO-Partikelsorten zusammen.



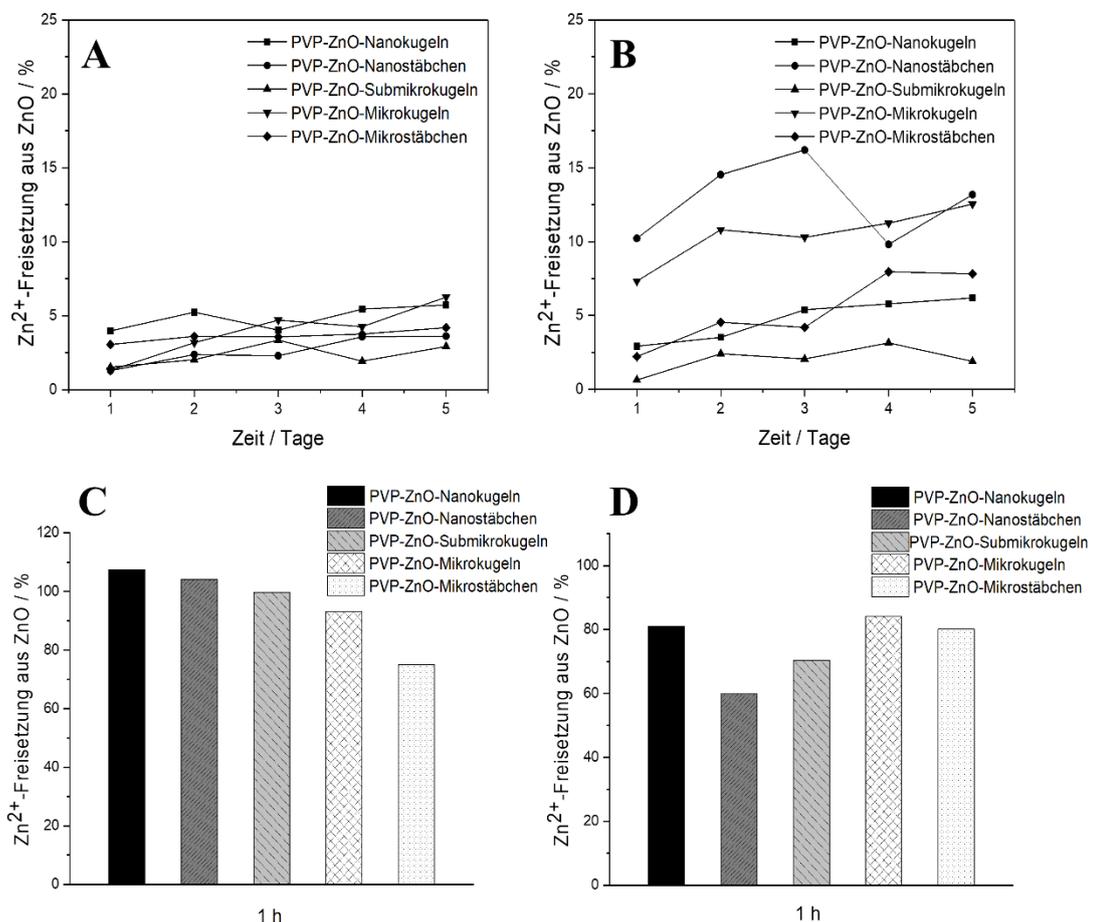
**Abb. 3:** Exemplarische Charakterisierungsdaten von PVP-funktionalisierten ZnO-Partikeln: Dynamische Lichtstreuung (DLS) (A), Thermogravimetrie (TG) (B), IR-Spektroskopie von PVP-funktionalisierten Zinkoxid-Nanostäbchen und von reinem PVP (C) UV/Vis-Spektroskopie (D).

**Tab. 3:** Zusammenfassung der REM-, DLS-, TG-, und AAS-Daten für fünf PVP-ZnO-Partikelsorten.

PVP-ZnO-Partikelsorte	Partikelgröße aus REM / nm	Partikelgröße in DLS / nm	PDI aus DLS	Zeta-Potential aus DLS / mV	Polymer-Anteil bei TG / wt.%	Zink-Gehalt in ZnO bei AAS / wt.%
Nanokugeln	40±10	101	0,35	+23	1,3	77,9
Nanostäbchen	40±5·100±24	130	0,22	-15	0,8	78,9
Submikrokugeln	200±50	254	0,10	+12	2,4	76,5
Mikrokugeln	500±103	525	0,09	-15	3,9	73,9
Mikrostäbchen	100±28·400±113	601	0,22	-10	3,3	77,1

In Ergänzung zu den im Antrag gestellten Projektaufgaben (Synthese und Charakterisierung der ZnO-Partikel) wurden Löslichkeitsuntersuchungen von den hergestellten PVP-ZnO-Partikeln in verschiedenen Medien (Reinstwasser, Zellkulturmedium (RPMI-Medium + 10 % FCS), simulierte lysosomale Lösung, simulierte lysosomale Lösung (Citrat-frei)) durchgeführt (Abb. 4). Das Ziel dieser Untersuchungen war, die Freisetzung der Zn<sup>2+</sup>-Ionen aus den Partikeln quantitativ analytisch zu erfassen, was für die weiteren biologischen Studien und die

Abschätzung der zytotoxischen Wirkung dieser Partikel von großer Bedeutung war. Die Erfassung der Auflösungsrate der ZnO-Partikel in einem simulierten lysosomalen Medium diente dazu, die Freisetzung der  $Zn^{2+}$ -Ionen nach der zellulären Aufnahme in Endolysosomen bei niedrigeren pH-Werten (pH= 4-5) zu simulieren. Hierfür wurde diese Lösung bei einem pH-Wert von 4,5 nach Henderson *et al.* angesetzt, wobei aufgrund der hohen verwendeten Menge an Zitronensäure ( $20,8 \text{ g L}^{-1}$ ) in diesem Puffer vermutlich  $Zn^{2+}$ -Ionen stark durch Komplexbildung gebunden wurden. Daher wurde das Auflösungsexperiment der ZnO-Partikel erneut in acetatgepuffertem Medium (Citrat-frei, keine Komplexbildung) durchgeführt. Anhand der durchgeführten Löslichkeitsuntersuchungen zeigte sich eine leicht erhöhte Freisetzung der  $Zn^{2+}$ -Ionen im Zellkulturmedium gegenüber den Untersuchungen im Reinstwasser (Abb. 4A-B). Wie zu erwarten war, kam es aufgrund des amphoteren Charakters der ZnO-Partikel (Bildung von  $Zn^{2+}$  sowie Bildung von Tetrahydroxidozincat) zur sofortigen Auflösung der Partikel bei den niedrigen pH-Werten in beiden lysosomalen Lösungen (Abb. 4C-D). Damit bewiesen die erhaltenen AAS-Daten, dass die Auflösung aller Partikelsorten rasch stattfand, wobei im Fall der Löslichkeitsuntersuchungen ohne Citrat-Ionen tendenziell etwas kleinere Konzentrationen an  $Zn^{2+}$ -Ionen nach 1 h Untersuchung detektiert wurden.



**Abb. 4:** Zusammenfassung der Löslichkeitsuntersuchungen der hergestellten PVP-ZnO-Partikel. Freisetzung der  $Zn^{2+}$ -Ionen aus den PVP-ZnO-Partikeln: Reinstwasser (A), RPMI-Medium + 10 % FBS (B), in einem simulierten lysosomalen Medium (C), in lysosomalem acetatgepuffertem (Citrat-freiem) Medium (D).

#### 4.2.2 Synthese und Charakterisierung amorpher Silica-Partikel

Durch gezielte Hydrolyse und anschließende Polykondensation von Tetraethylorthosilicat (TEOS) gelang es amorphe, "nackte" (nicht-funktionalisierte) Silica-Partikel mit definierter Größe zu synthetisieren (Stöber-Prozess). Die Partikelgröße und die erwünschte kugelförmige

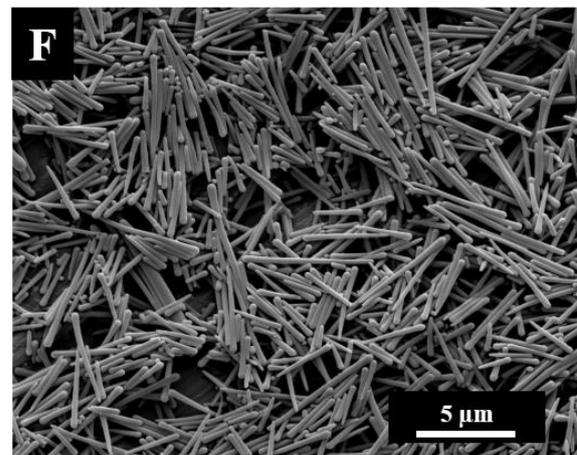
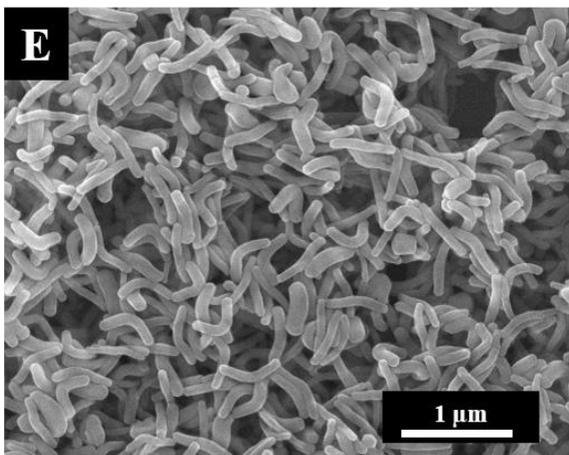
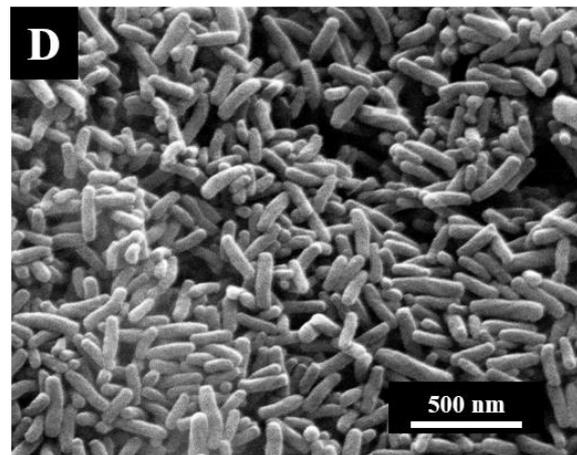
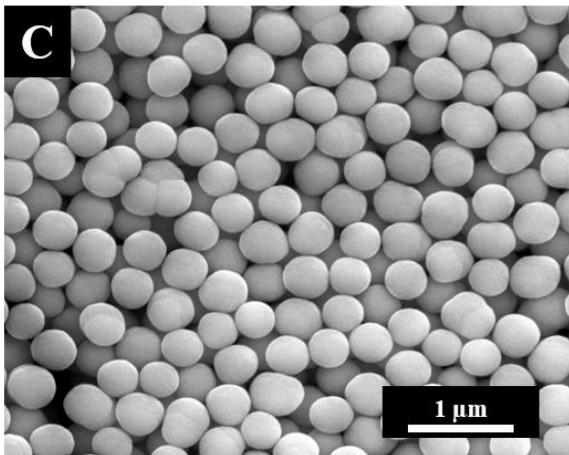
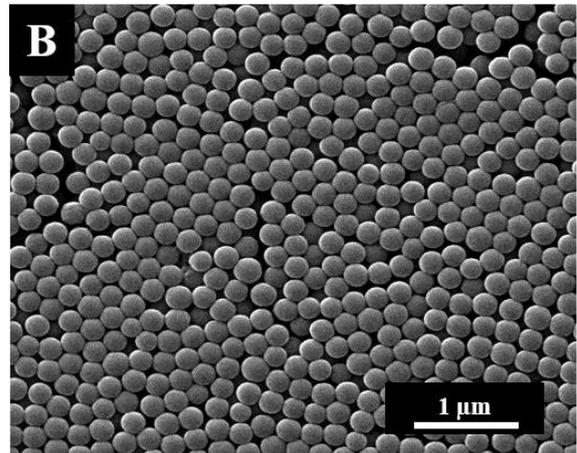
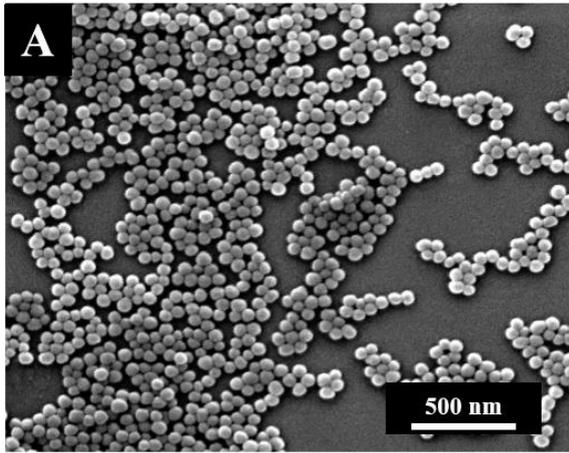
Form dieser Partikel ließen sich dabei über die Konzentration der eingesetzten Edukte sowie über die Reaktionstemperatur einstellen. Nach der Synthese waren die Partikel aufgrund der an der Partikeloberfläche vorhanden OH-Gruppen elektrostatisch stabilisiert und eigneten sich für weitere biologische Untersuchungen.

Für die Synthese der stäbchenförmigen Silica-Partikel mit einstellbarer Partikellänge erwies sich der Einsatz des kationischen Tensids Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) im modifizierten Stöber-Prozess als notwendig, um das gerichtete Wachstum der Partikel zu fördern. Die Partikellänge der Silica-Stäbchen konnte dabei über die Variation der Reaktandenverhältnisse kontrolliert werden. Da CTAB zytotoxisch ist und damit CTAB-funktionalisierte Partikel für weitere biologische Studien ungeeignet sind, wurde im Verlauf eine Strategie ausgearbeitet, um verbleibendes CTAB aus den Partikeln zu entfernen.

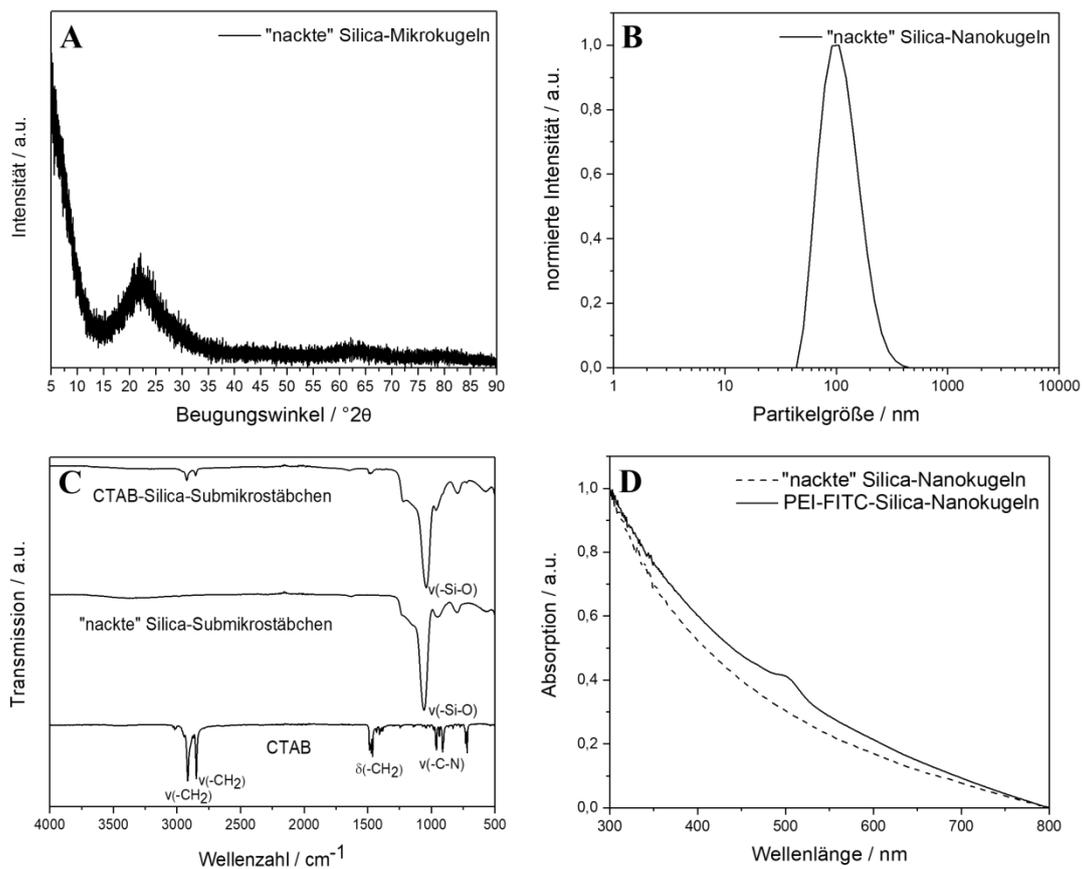
Ergänzend zu den im Antrag gestellten Projektaufgaben (Synthese der Silica-Partikel von Nano- bis zum Mikrometerbereich in der Partikelgrößenordnung bis zu ~500 nm in der Länge oder im Durchmesser) wurden deutlich größere Silica-Stäbchen mit einer durchschnittlichen Partikellänge zwischen 2 und 5 µm (Silica-Riesenstäbchen) hergestellt. Dabei konnte ausgehend von TEOS in einer Emulsion (1-Pentanol/Wasser-Gemisch) und in Gegenwart von PVP das gerichtete Wachstum von PVP-funktionalisierten Silica-Riesenstäbchen präparativ gezielt erreicht werden.

Die auf diese Weise hergestellten "nackte" Silica-Kugeln, "nackte" SiO<sub>2</sub>-Stäbchen und PVP-funktionalisierte Silica-Riesenstäbchen (insgesamt 6 Partikelsorten) wurden mit den Farbstoff-Polymeren (CMC-6-Aminofluorescein (CMC-F) oder PEI-Fluoresceinisothiocyanat (PEI-FITC)) nachfolgend fluoreszenzmarkiert, um die Partikelaufnahme in den Zellen mithilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie (CLSM) zu verfolgen.

Nach der Synthese, Aufreinigung und Trocknung der Silica-Partikelsorten erfolgte ihre Charakterisierung mittels REM, PXRD, DLS, IR-Spektroskopie und UV/Vis-Spektroskopie (Abb. 5-6, Tab. 4). Abb. 5 zeigt die typischen REM-Aufnahmen von den synthetisierten Silica-Partikeln.



**Abb. 5:** Repräsentative REM-Aufnahmen der synthetisierten Silica-Partikel. **A:** "nackte" Nanokugeln (60 nm). **B:** "nackte" Submikrokugeln (230 nm). **C:** "nackte" Mikrokugeln (430 nm). **D:** "nackte" Submikrostäbchen (100 nm-230 nm). **E:** "nackte" Mikrostäbchen (100 nm-600 nm). **F:** PVP-funktionalisierte Silica-Riesenstäbchen (0,27 μm-3,2 μm).



**Abb. 6:** Exemplarische Charakterisierungsdaten der hergestellten Silica-Partikel: Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD) (A), Dynamische Lichtstreuung (DLS) (B), IR-Spektroskopie (IR) (C), UV/Vis-Spektroskopie (D).

**Tab. 4:** Zusammenfassung der REM- und DLS-Daten für sechs Silica-Partikelsorten.

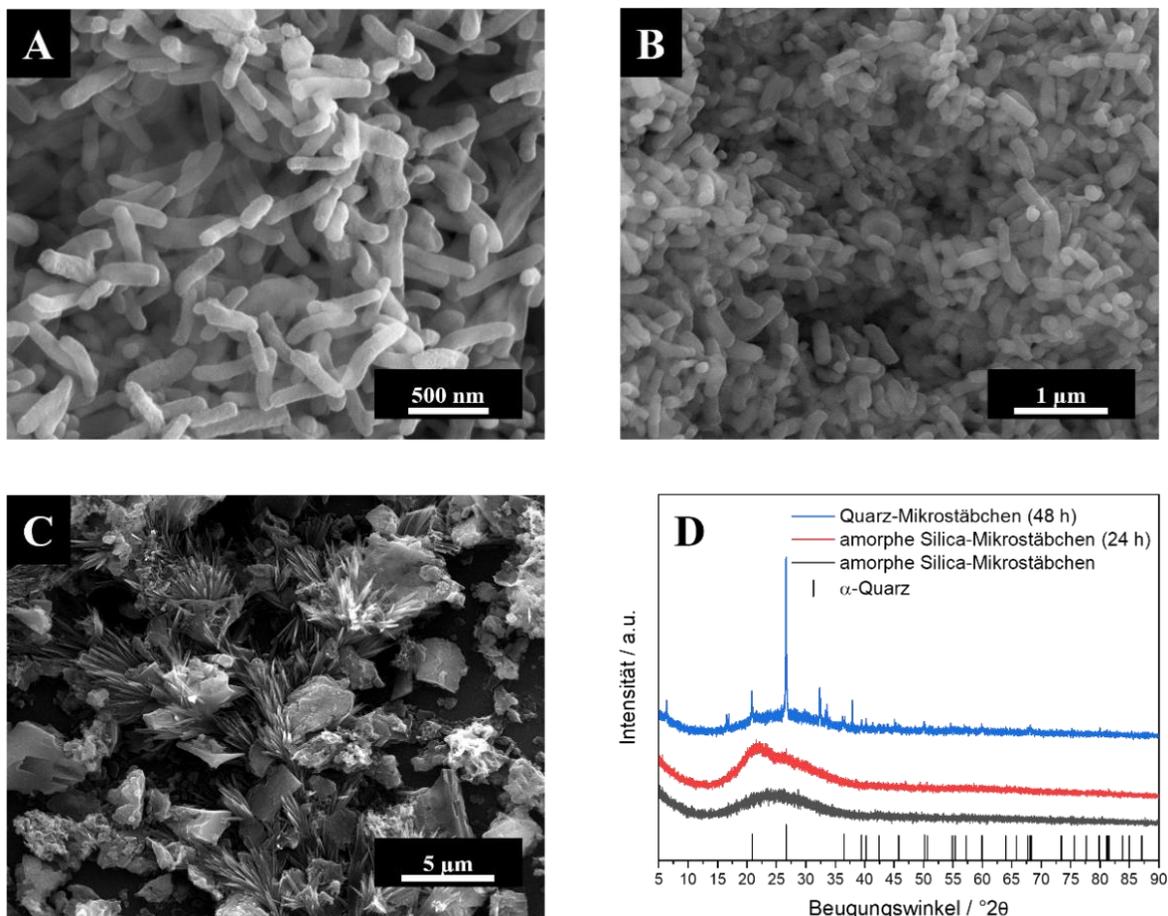
Silica-Partikelsorte	Größe aus REM / nm	Größe in DLS / nm	PDI aus DLS	Zeta-Potential bei DLS / mV	Partikel-Anzahl in 1 g Feststoff	Spezifische Oberfläche S / m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>
"nackte" Silica-Nanokugeln	60±7	117	0,22	-16	4,42·10 <sup>15</sup>	50
"nackte" Silica-Submikrokugeln	230±17	272	0,08	-53	7,85·10 <sup>13</sup>	13
"nackte" Silica-Mikrokugeln	430±60	519	0,15	-28	1,20·10 <sup>13</sup>	7,0
"nackte" Silica-Submikrostäbchen	125±18·230±42	357	0,23	-29	2,77·10 <sup>14</sup>	22
"nackte" Silica-Mikrostäbchen	100±24·600±25	439	0,32	-22	1,06·10 <sup>14</sup>	21
PVP-Silica-Riesenstäbchen	274±45·3200±1500	-	-	-	2,65·10 <sup>12</sup>	7,5

#### 4.2.3 Synthese und Charakterisierung kristalliner Quarz-Partikel

Als Ausgangspunkt für die Darstellung der kristallinen Quarz-Partikel dienen die literaturbekannten Versuchsvorschriften, nach welchen sich die Quarz-Partikel aus amorphen Silica-Partikeln mittels der Hydrothermalsynthese synthetisieren lassen. Bei der Hydrothermalsynthese handelt es sich um eine Reaktion, bei der sich anorganische Materialien (u.a. kristalline Partikel) unter erhöhtem Druck und bei erhöhter Temperatur kristallisieren lassen (Umwandlung amorpher Partikel in kristalline Partikel).

Bei den durchgeführten Hydrothermalsynthesen wurden die Silica-Partikel vollständig in Reinstwasser dispergiert und in einen 20 mL Edelstahl-Autoklav überführt, in welchem die Reaktion bei 200 °C und in Gegenwart der Mineralisatoren (NaCl, NaOH) über mehrere Stunden durchgeführt wurde. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der Literaturvorschriften mussten einige Modifikationen der bekannten Versuchsvorschriften durchgeführt werden, um nicht agglomerierte und vor allem noch redispersierbare kristalline Quarz-Partikel mit definierter Form und Größe zu synthetisieren. Hierfür wurden einige Reaktionsparameter variiert: Silica-Partikelsorten, die Änderung der Silica-Konzentrationen, die Mengen der Mineralisatoren und die Reaktionszeit.

In allen Fällen wurden nach der Synthese die synthetisierten Partikel aufgereinigt und anschließend in Pulverform mittels Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD) hinsichtlich ihrer Kristallinität sowie mittels REM bezüglich der Partikelform untersucht. Die Abb. 7 zeigt exemplarisch die REM-Aufnahmen von Quarz-Partikeln (Abb. 7 A-B) und die PXRD-Daten, die gewonnen wurden, indem amorphe Silica-Mikrostäbchen für 24 h bzw. 48 h unter hydrothermalen Bedingungen behandelt wurden.



**Abb. 7:** REM-Aufnahme der amorphen, synthetisierten Silica-Mikrostäbchen vor Hydrothermalsynthese (A), REM-Aufnahme der amorphen Silica-Mikrostäbchen nach 24 h Hydrothermalsynthese (B), REM-Aufnahme der auskristallisierten  $\alpha$ -Quarz-Partikel nach 48 h Umsetzung (C), Röntgenpulverdiffraktogramme von den  $\text{SiO}_2$ -Partikeln (D). ( $\alpha$ -Quarz: ICDD-Datenbank: # 82-0511)

Das Röntgenpulverdiffraktogramm der Silica-Mikrostäbchen nach der 24-stündigen Hydrothermalsynthese deuteten auf einen noch amorphen Charakter der Partikel hin. Die XRD-Analyse zeigte, dass es erst nach 48 h Reaktionszeit (Abb. 7D; blaue Linie) zur Bildung von  $\alpha$ -Quarz-Partikeln kommt, da erst dann die Reflexe der Probe mit den Referenzreflexen aus der Datenbank für  $\alpha$ -Quarz übereinstimmen. Anhand der erhaltenen REM-Aufnahmen konnte ein eindeutiger Befund bestätigt werden, dass die hergestellten  $\alpha$ -Quarz-Partikel erst

nach 48 h auskristallisieren, neigen allerdings durch die Kristallisationsprozesse zur Bildung von größeren kristallinen SiO<sub>2</sub>-Partikeln. Die weitere Variation der Reaktionsparameter führte ebenfalls zu vergleichbaren Ergebnissen, d.h. die interne Kristallisation der Quarz-Partikel war ohne Änderung der ursprünglicher Partikelform aus den amorphen Silica-Partikeln nicht möglich. Es konnte somit mittels PXRD und REM gezeigt werden, dass die Silica-Partikel erst nach 48 h auskristallisierten, wobei die äußere Partikelform aber nicht erhalten blieb. In den weiterführenden Arbeiten wurde untersucht, ob sich durch Variation der Syntheseparameter ein Erhalt der Partikelform bei interner Kristallisation erreichen lässt. Basierend auf den Daten musste eindeutig festgestellt werden, dass die Darstellung der kristallinen SiO<sub>2</sub>-Partikel mit definierter Größe und Form im Rahmen des vorliegenden Projektes nicht realisierbar war. Aus zeitlichen Gründen musste auch auf noch intensivere Untersuchung der Quarz-Synthesen verzichtet werden.

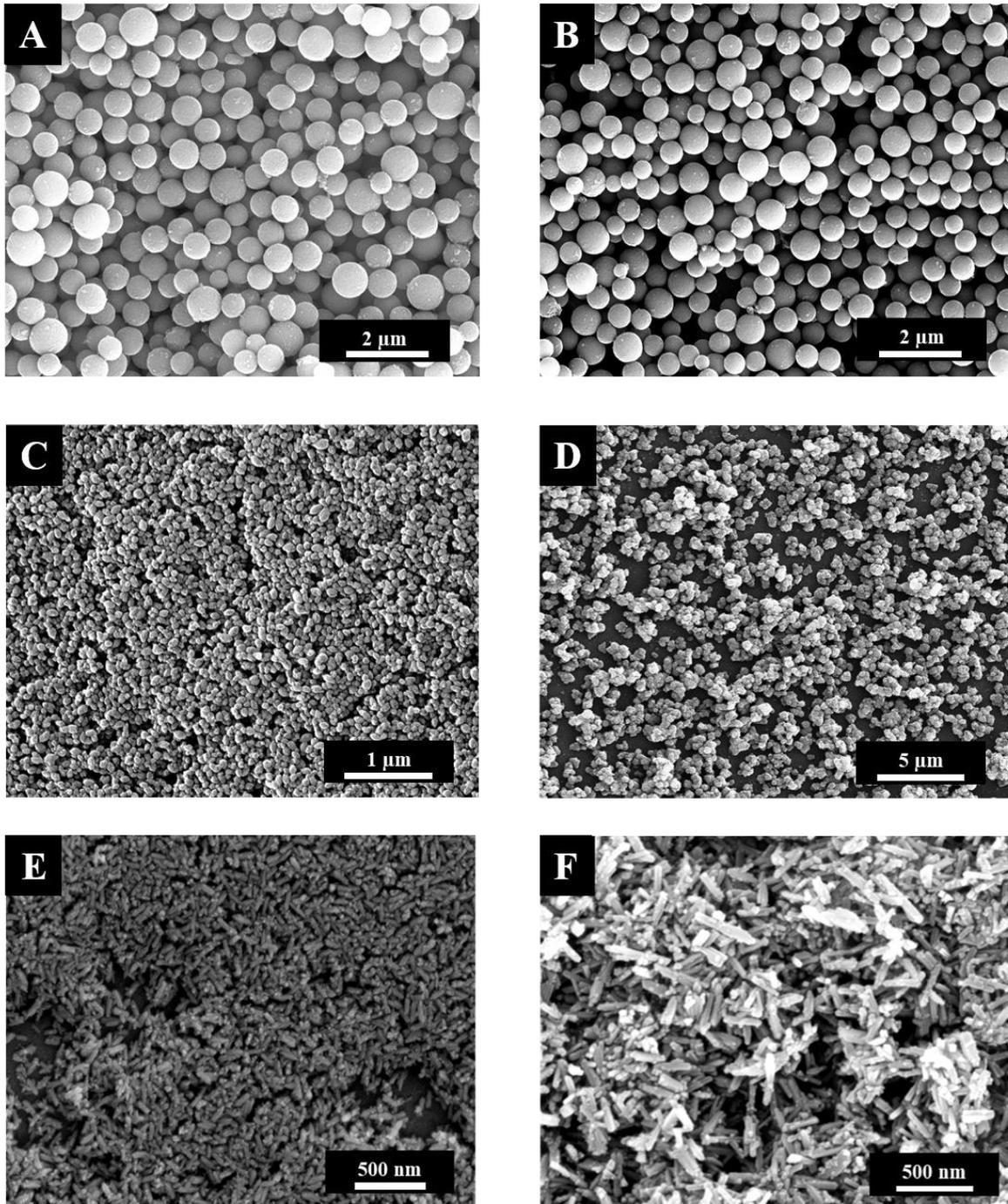
#### **4.2.4 Synthese und Charakterisierung von TiO<sub>2</sub>-Partikeln (amorph, kristallin (Anatas, Rutil))**

Im dritten Forschungsjahr wurden verschiedenste Synthesestrategien erprobt, um TiO<sub>2</sub>-Partikel in definierter Kristallstruktur (Anatas-Phase, Rutil-Phase) bei gleichzeitiger Kontrolle der Partikelform (Kugeln, Stäbchen) und der Partikelgrößenverteilung (Nano-, Submikro-, Mikro) darzustellen. Die Herausforderung dabei lag in der Herstellung der TiO<sub>2</sub>-Partikel zu allen denkbaren Partikelsorten in reiner kristallographischer Phase und mit ausreichender Partikelstabilität (insgesamt 12 Partikelsysteme: Anatas-Nanokugeln, Anatas-Submikrokugeln, Anatas-Mikrokugeln, Anatas-Nanostäbchen, Anatas-Submikrostäbchen, Anatas-Mikrostäbchen, Rutil-Nanokugeln, Rutil-Submikrokugeln, Rutil-Mikrokugeln, Rutil-Nanostäbchen, Rutil-Submikrostäbchen, Rutil-Mikrostäbchen). Viele, jedoch nicht alle Partikelsorten ließen sich mit einem vergleichbaren Aufwand realisieren. In Analogie zu Silica-Partikeln konnten nach dem Sol-Gel-Prozess nicht nur kristalline TiO<sub>2</sub>-Partikel gewonnen werden, sondern auch amorphe TiO<sub>2</sub>-Partikel. Diese wurden in Ergänzung zu kristallinen TiO<sub>2</sub>-Partikeln synthetisiert und biologisch untersucht. In allen Fällen wurden die TiO<sub>2</sub>-Partikel während der Synthese ohne weitere Polymer-Funktionalisierung hergestellt, sodass diese nach der Synthese als "nackte" Partikel gekennzeichnet wurden. Um die Ladung bei allen hergestellten Partikelsorten konstant zu halten, wurden die synthetisierten Partikel mit dem anionischen Polyelektrolyt Carboxymethylcellulose (CMC) nachfunktionalisiert.

Die Darstellung der amorphen TiO<sub>2</sub>-Mikrokugeln erfolgte durch Umsetzung des Tetraisopropylorthotitanats (TTIP) in Methanol unter Zugabe einer wässrigen CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O-Lösung (0,05 M) ("Eintopfsynthese", Sol-Gel-Prozess). Die Kontrolle der Partikelgröße wurde durch eine gezielte Variation der Ionenstärken bei definierten Konzentrationen der CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O-Lösung erreicht werden. Um die amorphen TiO<sub>2</sub>-Partikel in die kristalline Phase (Anatas-Kristallstruktur) zu überführen, wurden getrocknete TiO<sub>2</sub>-Partikel in einen Porzellantiegel platziert und bei 500 °C für 1 h thermisch behandelt (kalziniert). Zur Darstellung der deutlich kleineren Anatas-Nanokugeln (d ≤ 100 nm) wurde, alternativ zu der herkömmlichen Eintopfsynthese aus Ti-Alkoholaten, eine Solvothermalsynthese bei 200 °C für 24 h aus Titanbutoxid (Ti(OBu)<sub>4</sub>) in konzentrierter Essigsäure durchgeführt.

Für nasschemische Synthesen der Rutil-Partikel war der Einsatz der chlorhaltigen Ti-Präkursoren (TiCl<sub>4</sub>, TiCl<sub>2</sub>, TiOCl<sub>2</sub>) oder Zusatz von HCl- oder Chloridlösungen im Reaktionsgemisch erforderlich, um die Rutil-Partikel in phasenreiner Form darzustellen. So konnten beispielsweise Rutil-Nanostäbchen aus Ti(OBu)<sub>4</sub> in einer wässrigen Salzsäure-Lösung (3 M) bereits bei RT nach 24 h erhalten werden, während die Umsetzung derselben Reaktanden unter den hydrothermalen Konditionen das Wachstum der Rutil-Partikel begünstigte. Dadurch bedingt kam es zur Bildung der Rutil-Submikrostäbchen bei 200 °C nach 2 h. Eine Modifizierung der literaturbekannten Synthese ermöglichte hingegen die Darstellung von Rutil-Mikrokugeln. Hierfür erfolgte die Synthese der Partikel unter zusätzlicher Zugabe von HCl zur hydrolysierten Lösung aus TiCl<sub>4</sub> und durch die anschließende Hydrothermalsynthese bei 100 °C für 24 h.

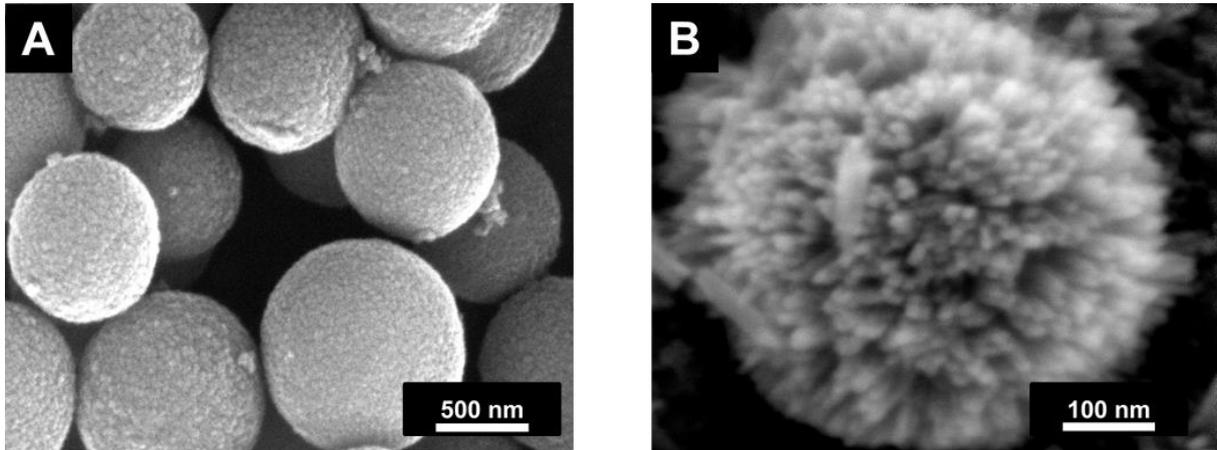
Analog zu den vorigen Partikelsystemen erfolgte die Charakterisierung der Partikel nach ihrer Synthese und Aufarbeitung mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie (Abb. 8).



**Abb. 8:** Repräsentative Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen der synthetisierten, “nackten” TiO<sub>2</sub>-Partikel mit definierter Größe, Form, Kristallinität. **A:** amorphe TiO<sub>2</sub>-Mikrokugeln (620 nm). **B:** Anatas-Mikrokugeln (510 nm). **C:** Anatas-Nanokugeln (100 nm). **D:** Rutil-Mikrokugeln (620 nm). **E:** Rutil-Nanostäbchen (25nm·70 nm). **F:** Rutil-Submikrostäbchen (40nm·190 nm).

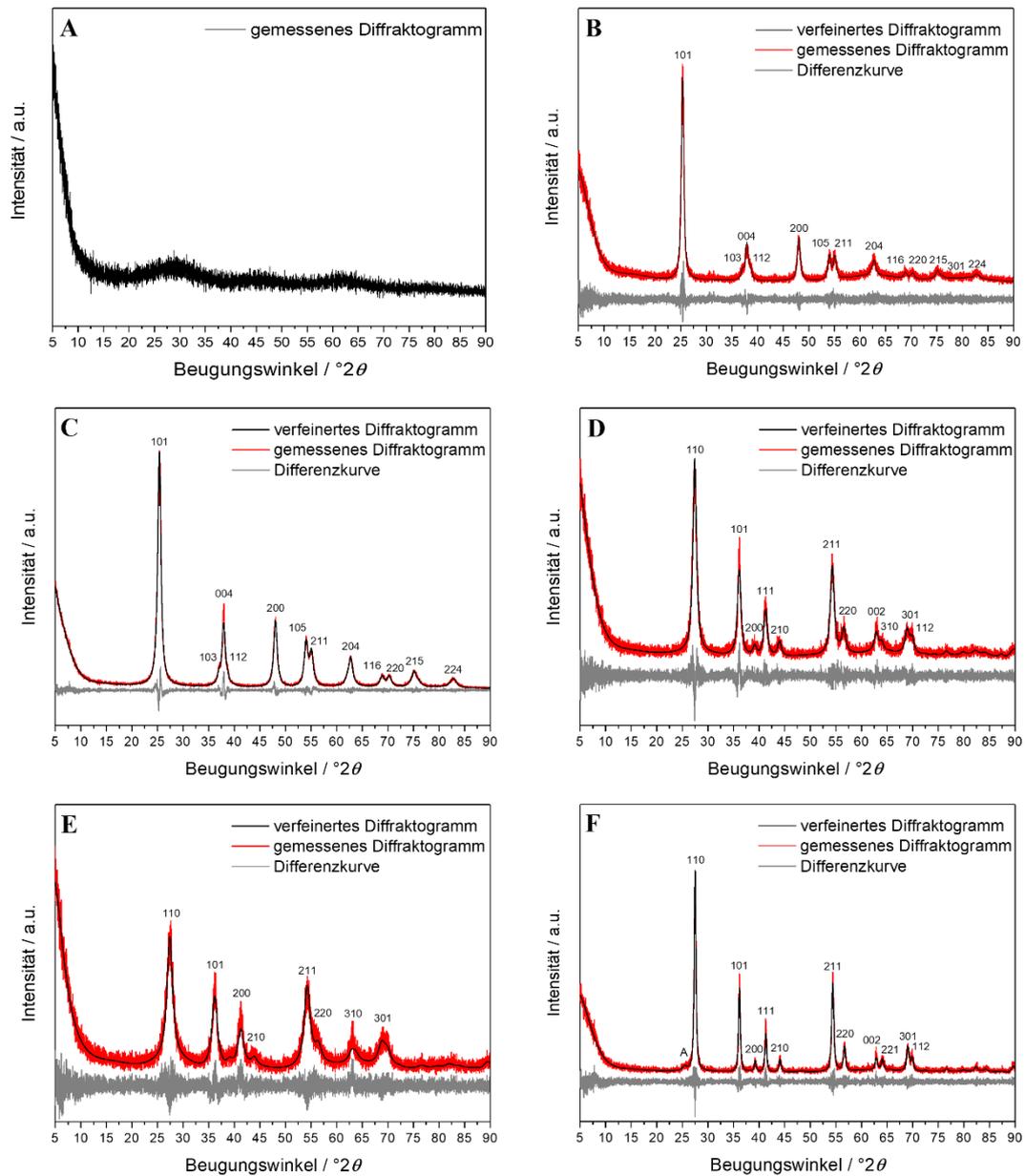
Anhand der REM-Aufnahmen konnte bestätigt werden, dass die Kontrolle der Partikelform (Kugeln, Stäbchen oder stäbchenförmige Partikel) in den drei Partikelgrößenbereichen (Nano-, Submikro-, Mikrometerbereich) durch Variation der Reaktionsparameter realisiert wurde. Auffällig dabei war nur die Tatsache, dass die Anatas-Mikrokugeln (Abb. 9A) aus

kugelförmigen Nanokristalliten aufgebaut waren und eine glatte Oberfläche besaßen, während die Rutil-Mikrokugeln (Abb. 9B) aus übereinander gestapelten Nanostäbchen bestanden und eine raue Partikeloberfläche aufwiesen.



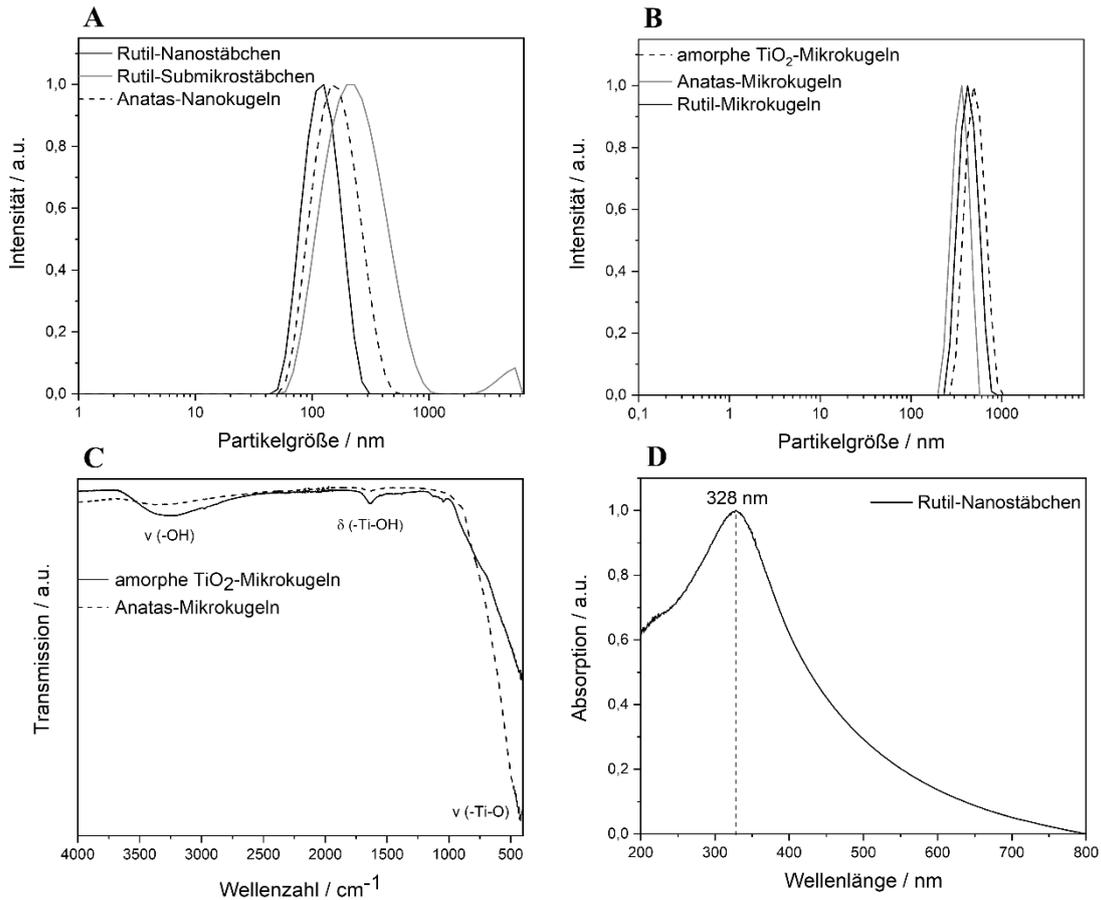
**Abb. 9:** REM-Aufnahmen mit hoher Vergrößerung von unfunktionalisierten TiO<sub>2</sub>-Partikeln: Anatas-Mikrokugeln (A) und Rutil-Mikrokugeln (B).

Die Überprüfung der Partikelkristallinität (amorph vs. kristallin) und der vorliegenden Kristallstrukturen (Anatas vs. Rutil) erfolgte mittels PXRD mit zusätzlicher Rietveld-Verfeinerung der gemessenen Pulverdiffraktogrammen für kristalline Proben (Abb. 10). Der Vergleich der Reflexlagen in den Proben mit den Reflexen aus der Datenbank bestätigte eindeutig, dass die kristallinen TiO<sub>2</sub>-Partikel entweder als Anatas- oder Rutil-Phase auftreten (Abb. 10B-F). Erwartungsgemäß zeigten die amorphen TiO<sub>2</sub>-Mikrokugeln keine Reflexe im gemessenen Diffraktogramm (Abb. 10A).



**Abb. 9:** Röntgenpulverdiffraktogramm der amorphen  $\text{TiO}_2$ -Mikrokugeln (A). Rietveld-verfeinerte Röntgenpulverdiffraktogramme der kristallinen  $\text{TiO}_2$ -Partikel: Anatase-Mikrokugeln (B); Anatase-Nanokugeln (C); Rutil-Mikrokugeln (D); Rutil-Nanostäbchen (E), Rutil-Submikrostäbchen (F). (Anatas: ICDD-Datenbank: # 21-1272; Rutil: ICDD-Datenbank: # 21-1276).

Die weitere Charakterisierung der hergestellten Proben hinsichtlich ihrer Partikelgröße, Zusammensetzung und optischen Eigenschaften erfolgte mittels DLS, IR-Spektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie. Abb. 11 zeigt exemplarische Charakterisierungsdaten zu manchen  $\text{TiO}_2$ -Partikelsorten. Tab. 5 fasst die REM-, und DLS-Daten von allen "nackten"  $\text{TiO}_2$ -Partikelsorten und CMC-nachfunktionalisierten Partikeln zusammen.



**Abb. 11:** Exemplarische Charakterisierungsdaten der hergestellten  $\text{TiO}_2$ -Partikel: Dynamische Lichtstreuung (DLS) (A-B), IR-Spektroskopie (IR) (C), UV/Vis-Spektroskopie (D).

**Tab. 5:** Zusammenfassung der REM- und DLS-Daten für sechs  $\text{TiO}_2$ -Partikelsorten.

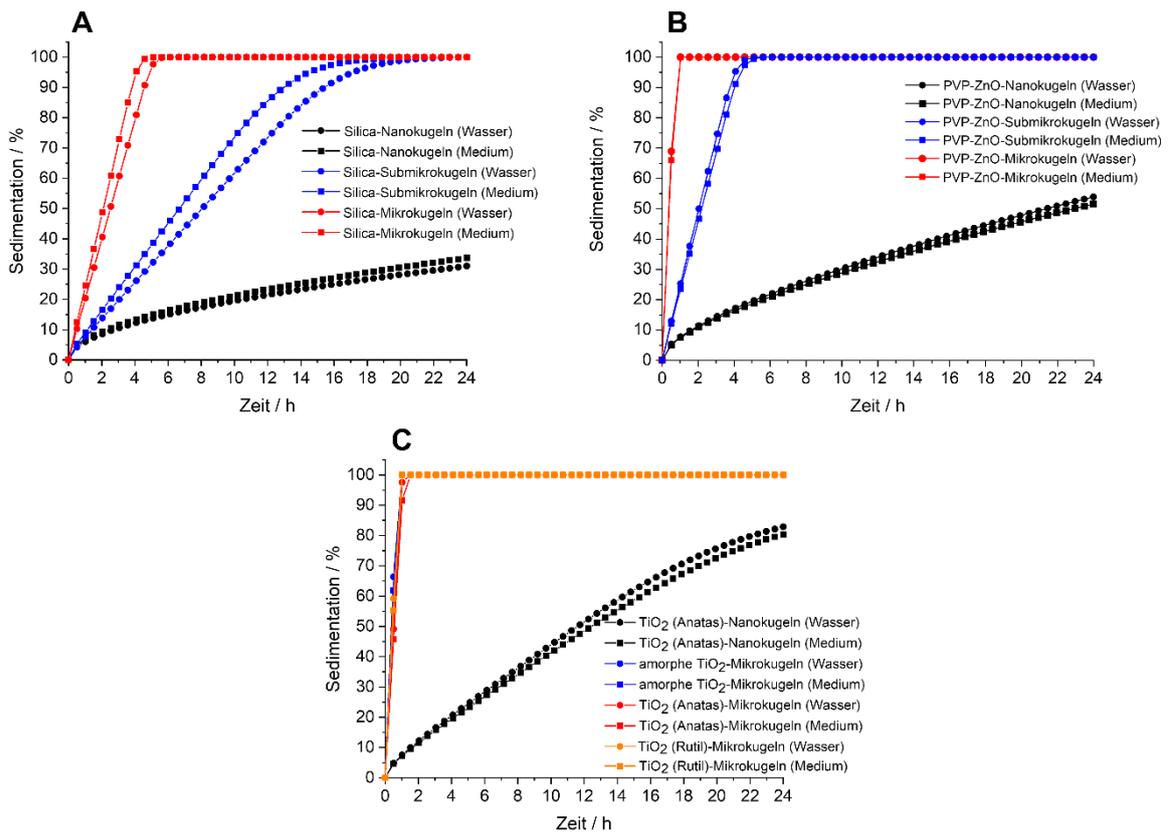
$\text{TiO}_2$ -Partikelsorte	Größe aus REM / nm	Größe in DLS / nm	PDI aus DLS	Zeta potential aus DLS / mV	Größe in DLS / nm		
					unfunktionalisiert	CMC-funktionalisiert	Zeta potential aus DLS / mV
amorphe $\text{TiO}_2$ -Mikrokugeln	620±101	649	0,10	-25	705	0,03	-29
Anatas-Mikrokugeln	510±89	618	0,05	+23	574	0,11	-29
Anatas-Nanokugeln	100±21	143	0,05	+33	161	0,14	-20
Rutil-Mikrokugeln	620±160	509	0,19	+23	650	0,38	-6
Rutil-Nanostäbchen	25±6-70±20	106	0,12	+38	233	0,23	-17
Rutil-Submikrostäbchen	40±10-190±60	207	0,24	+25	209	0,27	-24

#### 4.2.5 Abschätzung des Sedimentationsverhaltens von $\text{ZnO}$ -, Silica- und $\text{TiO}_2$ -Partikeln mittels ISDD-Modells

Ergänzend zur Synthese der  $\text{ZnO}$ -, Silica- und  $\text{TiO}_2$ -Partikel und deren Charakterisierung mittels analytischer Methoden konnte das Sedimentationsverhalten der kugelförmigen Partikel mittels ISDD-Modells (a computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for *in vitro* toxicity studies) rechnerisch abgeschätzt werden. Dabei wurde bei bekannten Parametern (Höhe des Mediums, Gesamtvolumen des Mediums, Viskosität des

Mediums, Dichte des Mediums, Partikelkonzentration, Partikeldurchmesser, Partikeldichte) die Sedimentation der Partikel in Reinstwasser und im Zellkulturmedium nach 24 h Inkubation in 24-Well-Platten berechnet (Abb. 12A-C).

Anhand der modellierten Daten konnte gezeigt werden, dass sich die Mikropartikel in Reinstwasser aufgrund ihrer Größe bereits nach 1 h bis 2 h im Zellkulturgefäß absetzen, während die Submikropartikel mit kleineren Durchmessern, je nach Dichte der Partikel, 4 h bis 10 h benötigen, um an den Boden des Zellkulturgefäßes zu gelangen. Wegen der kleineren Größe der Nanopartikel ist es zu erwarten, dass in diesem Fall auch nach 24 h Inkubation nicht alle Partikel den Boden im Zellkulturgefäß erreichen und damit viel länger in Dispersion bleiben.



**Abb. 12:** Sedimentationsverhalten kugelförmiger Partikel in Reinstwasser und im Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FCS) nach dem ISDD-Modell: kugelförmige Silica-Partikel (A), kugelförmige PVP-ZnO-Partikel (B), kugelförmige TiO<sub>2</sub>-Partikel (C).

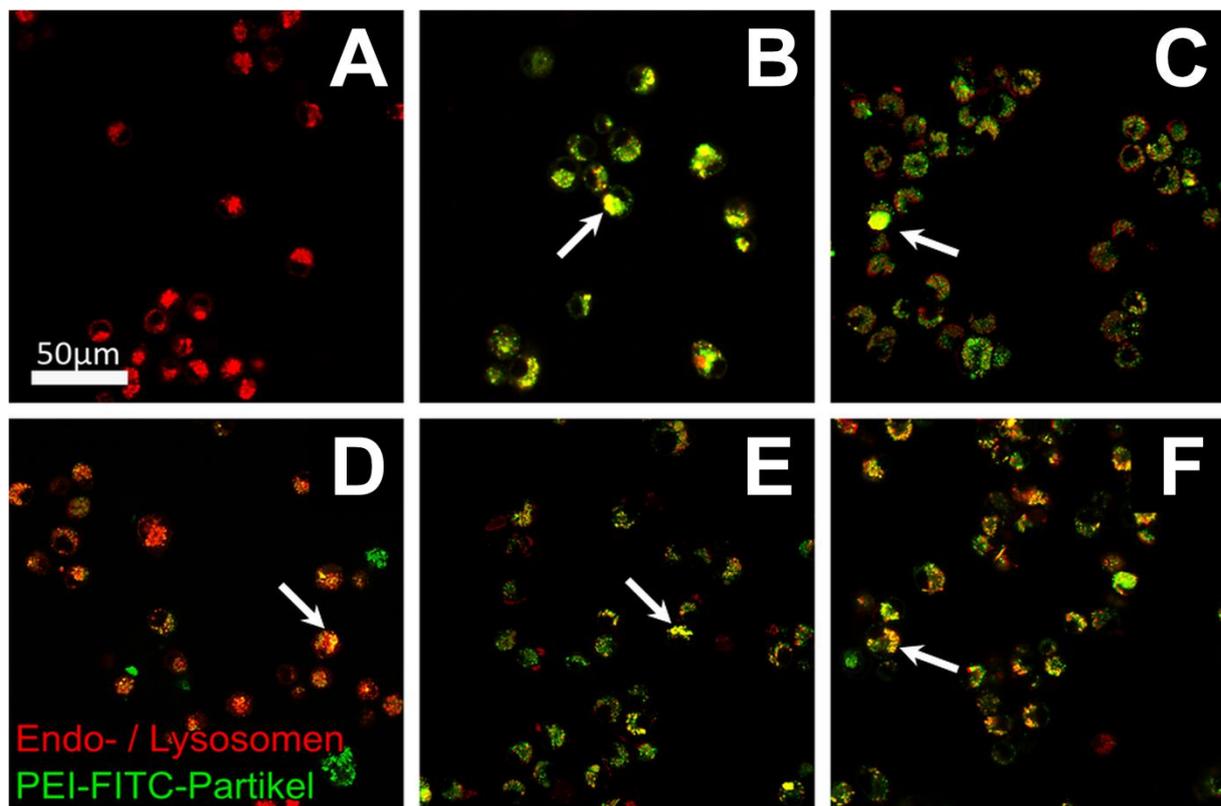
#### 4.2.6 Synthese und Charakterisierung von BaSO<sub>4</sub>-Partikeln

Als Kontrolle für die zellbiologischen Untersuchungen wurden bioinerte BaSO<sub>4</sub>-Submikrokugeln mit einer Größe von 270 nm verwendet. Ihre Synthese und ausführliche Charakterisierung wurden bereits 2016 publiziert (Loza et al. 2016, Barium sulfate micro- and nanoparticles as bioinert reference material in particle toxicology).

### 4.3 Zellbiologische Untersuchungen von SiO<sub>2</sub>-Partikeln in NR8383-Zellen

#### 4.3.1 Aufnahme und Lokalisation von SiO<sub>2</sub>-Partikeln in Zellen mittels CLSM

Die Analyse der intrazellulären Aufnahme und Lokalisation von fluoreszenzmarkierten SiO<sub>2</sub>-Partikeln (PEI-FITC-konjugiert) unterschiedlicher Größe (Nano-, Submikro-, Mikropartikel) und Morphologie (Kugeln und Stäbchen) erfolgte mittels CLSM. Dafür wurden die NR8383-Zellen mit einer subtoxischen Konzentration der SiO<sub>2</sub>-Partikel (100 µg mL<sup>-1</sup>) für 24 h inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt. In Übereinstimmung mit eigenen Vorarbeiten an Silbernanopartikeln (80 nm, Greulich et al. 2011<sup>2</sup>), zeigten auch diese Untersuchungen, dass die verwendeten PEI-FITC-konjugierten SiO<sub>2</sub>-Partikel (grüne Fluoreszenz) unabhängig von Größe und Morphologie in endo- / lysosomalen Strukturen (rote Fluoreszenz) akkumulierten, jedoch nicht im Zellkern lokalisiert waren.



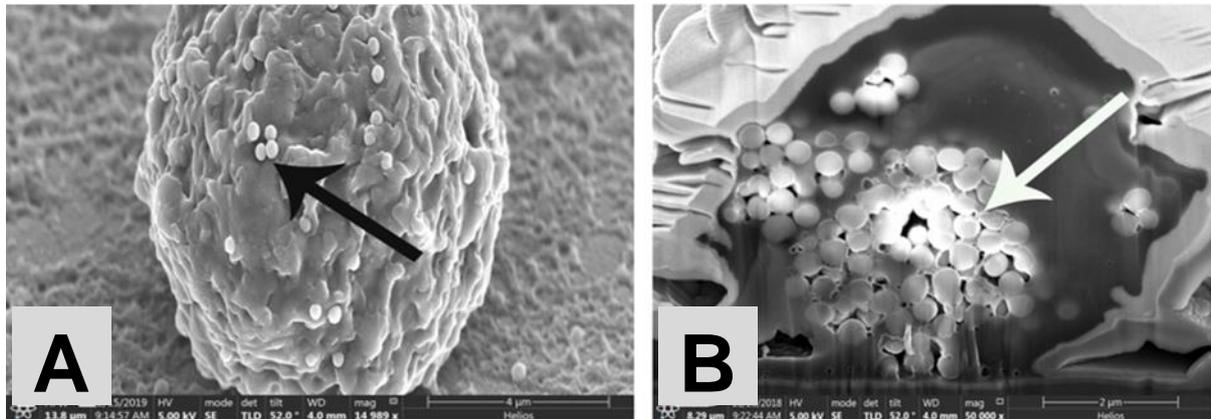
**Abb. 13:** Aufnahme und Lokalisation von SiO<sub>2</sub>-Partikeln in NR8383 Alveolarmakrophagen mittels CLSM. Die Zellen wurden für 24 h mit SiO<sub>2</sub>-Partikeln verschiedener Morphologie (100 µg mL<sup>-1</sup>) inkubiert. Die roten Fluoreszenzsignale stellen Endo-/Lysosomen dar, die mit LysoTracker Red DND-99 angefärbt wurden. Die grünen Signale repräsentieren PEI-FITC-markierte SiO<sub>2</sub>-Partikel. Die Überlagerung der beiden Signale (gelb, weiße Pfeile) zeigt eine Ko-Lokalisation der Partikel in Endo-/ Lysosomen an. Die repräsentativen CLSM-Aufnahmen zeigen: unbehandelte Kontrollzellen (A), sowie Zellen inkubiert mit: Nanokugeln (B), Submikrokugeln (C), Mikrokugeln (D), Submikrostäbchen (E) und Mikrostäbchen (F).

#### 4.3.2 Aufnahme von SiO<sub>2</sub>-Partikel in Zellen mittels FIB/REM und TEM/EDX

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Aufnahme von Partikeln in Zellen ist die FIB-Technik in Kombination mit REM. Dabei werden schrittweise dünne Zellschichten abgetragen (FIB) um elektronendichte Strukturen (Partikel) innerhalb der Zellen mittels REM detektieren zu können (Abb. 14). Zusätzlich kann eine entsprechende Zellschicht in Form einer dünnen Zelllamelle (ca. 100 nm) herausgelöst und mittels TEM/EDX analysiert werden (Abb. 15).

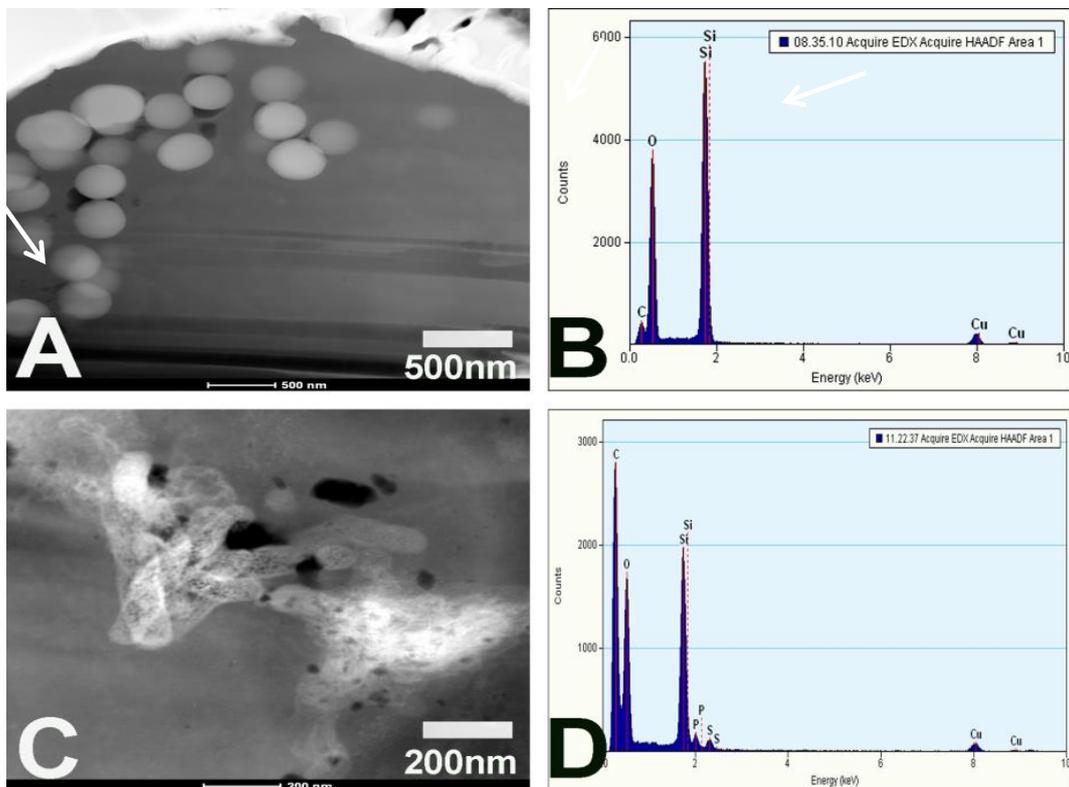
Abb. 14 zeigt die Anwendung der FIB/REM-Technik am Beispiel von SiO<sub>2</sub>-Submikrokugeln. Es ist zu erkennen, dass die Partikel an der Oberfläche der Zellen adhären (Abb. 14A, schwarzer Pfeil). Beim schrittweisen Abtragen dünner Zellschichten konnten aber auch

intrazellulär lokalisierte Partikel als elektronendichte Strukturen beobachtet werden (Abb. 14B, weißer Pfeil).



**Abb. 14:** Aufnahme von  $\text{SiO}_2$ -Partikeln in NR8383 Alveolarmakrophagen. Repräsentative REM- (A) und FIB/REM-Aufnahmen (B). Die Zellen wurden für 1 h mit  $\text{SiO}_2$ -Submikrokugeln ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) inkubiert, für die FIB/REM Technik präpariert und analysiert. Die  $\text{SiO}_2$ -Submikrokugeln sind sowohl auf der Zelloberfläche (A, schwarzer Pfeil) als auch im Zellinnern (B, weißer Pfeil) detektierbar.

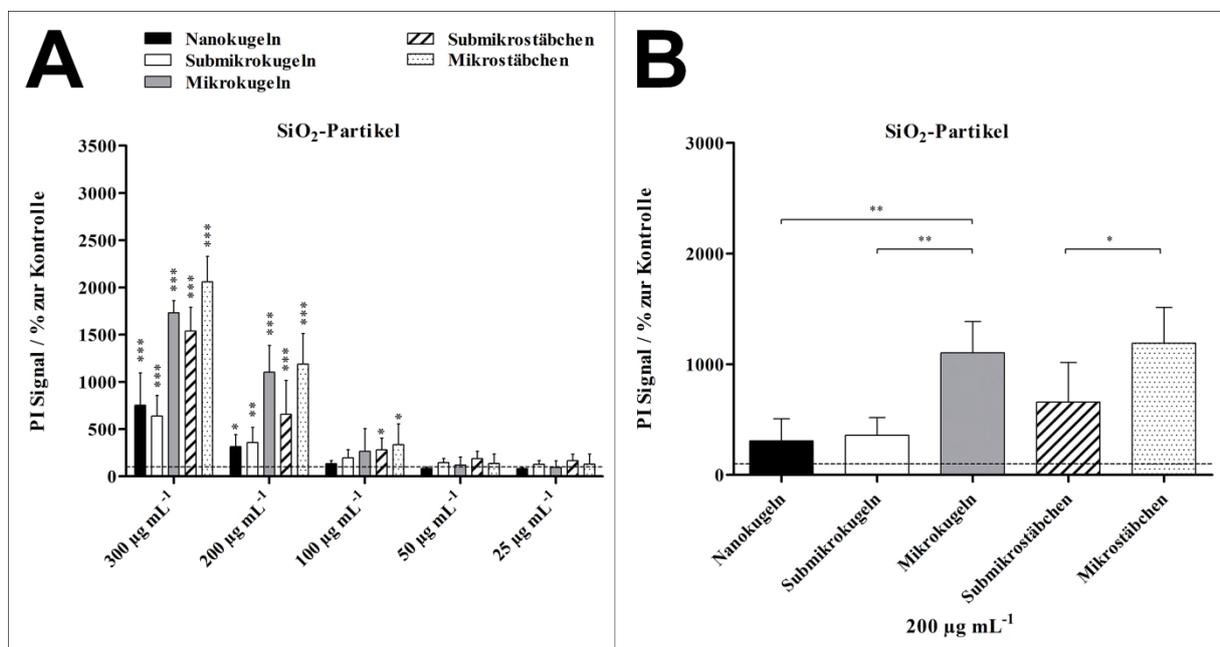
Eine entsprechende Analyse der intrazellulär lokalisierten Partikel mittels TEM/EDX, hier am Beispiel von  $\text{SiO}_2$ -Mikrokugeln (Abb. 15A+B) und  $\text{SiO}_2$ -Mikrostäbchen (Abb. 15C+D) ergab, dass es sich bei den aufgenommenen Partikeln eindeutig um  $\text{SiO}_2$ -Partikel handelte.



**Abb. 15:** Aufnahme von  $\text{SiO}_2$ -Partikeln in NR8383 Alveolarmakrophagen. Repräsentative TEM- (A, C) und EDX-Aufnahmen (B, D). Die Zellen wurden für 1 h mit  $\text{SiO}_2$ -Mikrokugeln (A-B) bzw. -Mikrostäbchen (C-D) ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) inkubiert und die TEM-Lamellen jeweils mittels FIB/REM-Technik generiert. Beide Partikelsorten wurden von den Zellen aufgenommen und wurden als  $\text{SiO}_2$ -Partikel identifiziert.

#### 4.3.3 Zelltoxizität von $\text{SiO}_2$ -Partikeln mittels FACS

Toxische Zellreaktionen nach 2 h und 16 h Partikelexposition von NR8383-Zellen wurden durch unterschiedliche etablierte Analysen bestimmt. Die mitochondriale Enzymaktivität wurde mit dem AlamarBlue-Assay erfasst. Die Anzahl der toten Zellen wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Beide Analysemethoden ergaben quantitative Daten für adverse Reaktionen der Partikel auf die Zellen und waren gut vergleichbar, sodass nachfolgend nur die quantitative Bestimmung mittels Propidiumiodid-Färbung gezeigt ist. Für die SiO<sub>2</sub>-Partikel unterschiedlicher Größe und Morphologie wurden nach 2 h Partikelexposition keine toxischen Effekte auf NR8383-Zellen detektiert. Die Ergebnisse der Zelltoxizitätsbestimmung nach 16 h Partikelexposition sind in Abb. 16 dargestellt. Es konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden (Abb. 16A), wobei hohe Partikelkonzentrationen von über 200 µg mL<sup>-1</sup> eine signifikante Zelltoxizität verursachten, während geringere Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität von NR8383-Zellen hatten. Beim Vergleich verschiedener Größen und Morphologien zeigten sich außerdem partikelgrößenabhängige Effekte (Abb. 16B). Dabei wiesen Mikrokugeln eine im Vergleich zu Nano- und Submikrokugeln signifikant erhöhte Toxizität auf. Beim Vergleich der Stäbchen, war die Toxizität von Mikrostäbchen höher als die von Submikrostäbchen. Beim direkten Vergleich der verschiedenen Morphologien wurde allerdings kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Einflusses der SiO<sub>2</sub>-Partikel auf die Zelltoxizität festgestellt.



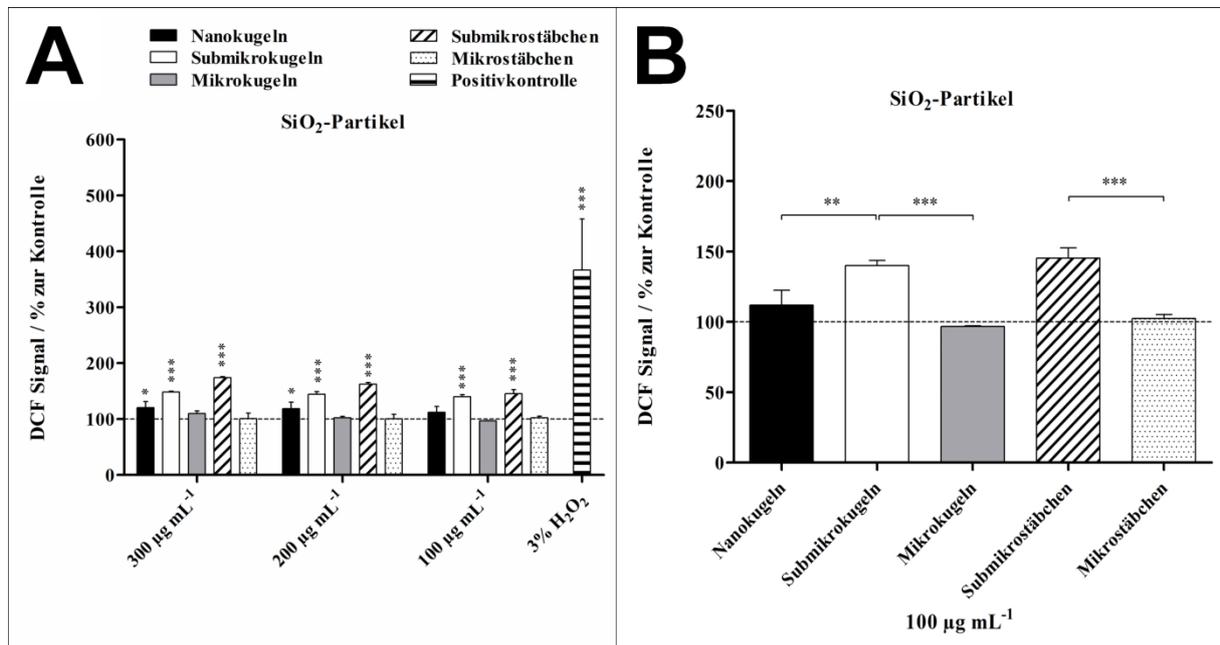
**Abb. 16:** Zellviabilität von NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen SiO<sub>2</sub>-Partikeln. Die Zellviabilität wurde mittels FACS und Propidiumiodid-Färbung avitaler Zellen bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Vergleich der Auswirkungen verschiedener Partikel-Konzentrationen und -Morphologien (A). Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Partikel-Morphologien bei einer Partikel-Konzentration von 200 µg mL<sup>-1</sup> (B). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001).

#### 4.3.4 Zellaktivierung: ROS-Bildung durch SiO<sub>2</sub>-Partikel mittels FACS

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) stellt eine typische pathophysiologische Zellreaktion nach Partikelaufnahme in Lungenzellen dar. Der Einfluss von SiO<sub>2</sub>-Partikeln auf die ROS-Bildung in NR8383 Makrophagen nach 2 h Exposition wurde quantitativ mittels DCF-Assay und FACS untersucht.

Im Vergleich zu nicht mit Partikeln exponierten Zellen wurden nach Exposition mit SiO<sub>2</sub>-Nanokugeln, Submikrokugeln und Submikrostäbchen signifikant erhöhte ROS-Werte detektiert (Abb. 17A), welche mit einer Zellaktivierung in Verbindung gebracht werden können.

SiO<sub>2</sub>-Mikrokugeln und SiO<sub>2</sub>-Mikrostäbchen hatten unabhängig von der eingesetzten Partikelkonzentration keinen Einfluss auf die ROS-Produktion. Die Zellaktivierung war in Anwesenheit von Submikropartikeln (Submikrokugeln und Submikrostäbchen am stärksten ausgeprägt und im Vergleich zu den Nano- und Mikropartikeln signifikant erhöht (Abb. 17B).



**Abb. 17:** Bildung von ROS in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h Exposition mit verschiedenen SiO<sub>2</sub>-Partikeln. Die ROS-Bildung wurde mittels FACS mit Hilfe des ROS-Indikators Dichlorfluorescein (DCF) bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Vergleich der Auswirkungen verschiedener Partikel-Konzentrationen und -Morphologien (A). Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Partikel-Morphologien bei einer Partikel-Konzentration von 20 µg mL<sup>-1</sup> (B). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001).

#### 4.3.5 Zellaktivierung: Zytokinfreisetzung durch SiO<sub>2</sub>-Partikel

##### 4.3.5.1 Qualitative Untersuchungen der Zytokinfreisetzung mittels Protein-Microarrays

Zur Detektion der Freisetzung bioaktiver Faktoren im Zellkulturüberstand von NR8383-Zellen nach 16 h Inkubation mit subtoxischen Konzentrationen verschiedener SiO<sub>2</sub>-Partikel (100 µg mL<sup>-1</sup>) wurde der Proteom-Profiler-Array (Detektionskapazität 79 Proteine) eingesetzt. Zur Gruppierung der 79 detektierten Proteine mittels eines Expressionsprofils wurde eine Heatmap-Darstellung gewählt (Abb. 18). Dafür wurde die relative Expression von 27 repräsentativen Proteinen bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle zusammengefasst und farblich kodiert. Die Grün-Färbung weist hierbei auf eine geringere Expressionsstärke und die Rot-Färbung auf eine höhere Expressionsstärke hin.

Beim Vergleich der verschiedenen Partikelmorphologien zeigten die sphärischen SiO<sub>2</sub>-Partikel (Nano-, Submikro-, Mikrokugeln) einen insgesamt stärkeren Einfluss auf die relative Expression der verschiedenen Proteine (höherer Anteil an Rot-Färbung) als die stäbchenförmigen Partikel (Abb. 18). Ein eindeutiger partikelgrößenabhängiger Effekt konnte aber nicht identifiziert werden. Es bleibt zu beachten, dass diese Form der Analyse die relativen Expressionsstärken aufzeigt und damit lediglich einen qualitativen Vergleich erlaubt. Im Anschluss erfolgte daher die quantitative Analyse von ausgewählten Proteinen mittels ELISA.

$\leq 0.5$	Nanokugeln $100 \mu\text{g mL}^{-1}$	Submikrokugeln $100 \mu\text{g mL}^{-1}$	Mikrokugeln $100 \mu\text{g mL}^{-1}$	Submikrostäbchen $100 \mu\text{g mL}^{-1}$	Mikrostäbchen $100 \mu\text{g mL}^{-1}$
$>0.5 \leq 1.0$					
$>1.0 \leq 2.0$					
$>2.0$					
MCP-1					
MIP-1 $\alpha/\beta$					
RANTES					
MIP-3 $\alpha$					
MDC					
GROB					
Cystatin C					
Galectin-1					
Galectin-3					
G-CSF					
GDF-15					
ICAM-1					
IGF-I					
IGFBP-2					
IL-1 $\alpha$					
IL-1 $\beta$					
IL-1ra					
IL-3					
IL-6					
MMP-3					
MMP-9					
NOV					
Osteopontin					
Prolactin					
RBP4					
Serpin E1					
TNF- $\alpha$					

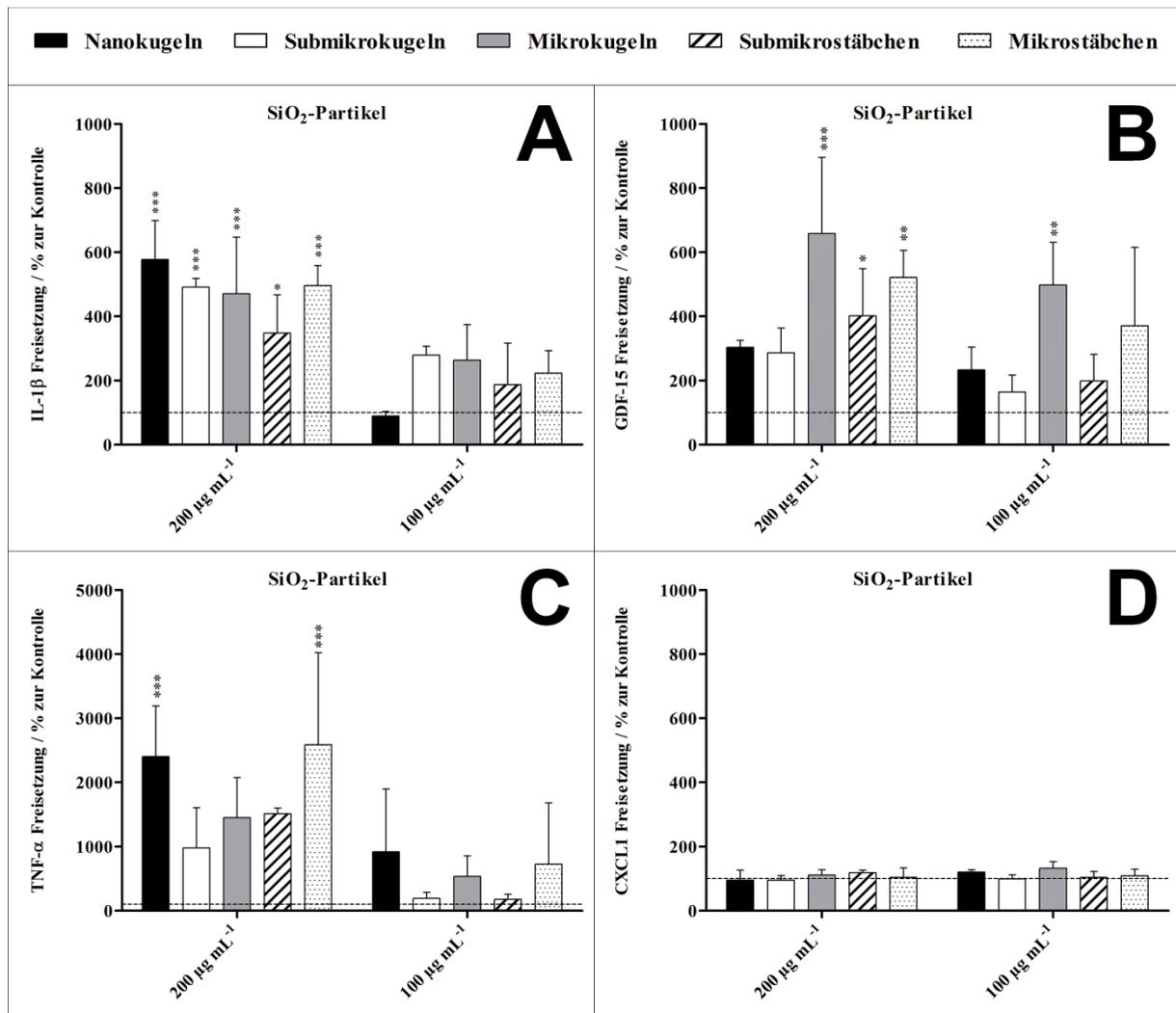
**Abb. 18:** Heatmap der relativen Expression von 27 bioaktiven Faktoren in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen SiO<sub>2</sub>-Partikeln mittels Protein-Mikroarray. Die Heatmap stellt die Expression eines Faktors relativ zu einer unbehandelten Kontrolle dar, was durch die Farbskala (linke obere Ecke) kodiert wird. Die Intensitätsskala der standardisierten Expressionswerte reicht von  $\leq 0.5$  (grün: geringe Expression) bis  $>2$  (rot: hohe Expression).

#### 4.3.5.2 Quantitative Untersuchungen der Zytokinfreisetzung mittels ELISA

Repräsentative Ergebnisse der an die Protein-Microarrays anschließenden quantitativen Analysen der Zytokinfreisetzung durch Sandwich-ELISA-Kits für die bioaktiven Faktoren IL-1 $\beta$ , GDF-15, TNF- $\alpha$  und CXCL1 sind in Abb. 19 dargestellt.

Alle SiO<sub>2</sub>-Partikel führten zur signifikanten Erhöhung der Freisetzung von IL-1 $\beta$  im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle bei einer Partikelkonzentration von  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , was auf eine Freisetzung pro-inflammatorischer Signale hinweist (Abb. 19A). Bei dieser Partikelkonzentration wurde auch die GDF-15-Freisetzung in Gegenwart von Mikrokugeln und den stäbchenförmigen Submikro- und Mikropartikelnverstarkt (Abb. 19B), während die TNF- $\alpha$ -Freisetzung nur durch Nanokugeln und Mikrostabchenverstarkt wurde (Abb. 19C). Hierbei bleibt jedoch zu beachten, dass  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  an SiO<sub>2</sub>-Partikeln mit Zelltoxizität assoziiert waren (Abb. 17).

Bei subtoxischen Partikelkonzentrationen von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  konnte keine signifikante Zellaktivierung durch die verschiedenen untersuchten SiO<sub>2</sub>-Partikel beobachtet werden (Abb. 19A-C), mit Ausnahme der erhöheten GDF-15-Freisetzung in Gegenwart von Mikrokugeln (Abb. 19B). Die Expression von CXCL1 wurde durch die untersuchten SiO<sub>2</sub>-Partikel nicht beeinflusst (Abb. 19D).



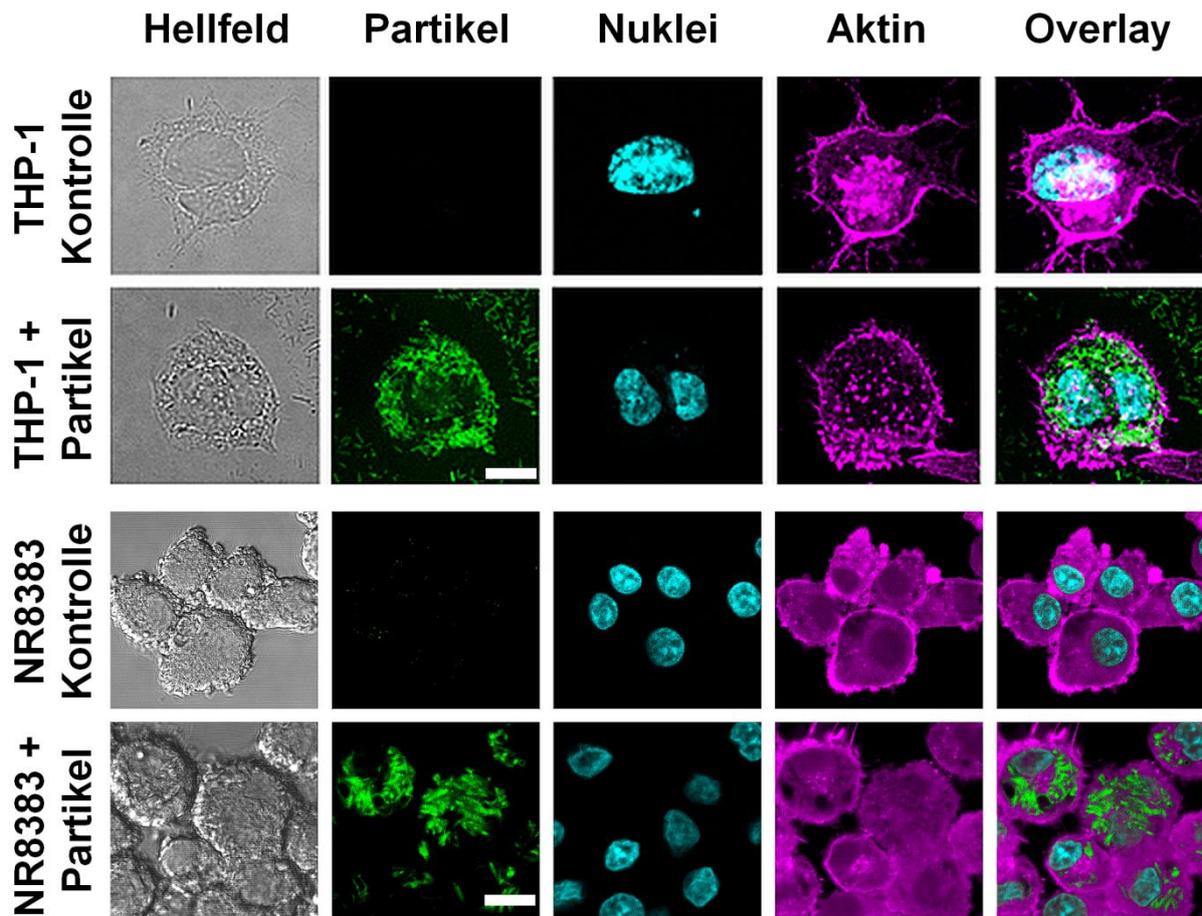
**Abb. 19:** Freisetzung von Zytokinen durch NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen SiO<sub>2</sub>-Partikeln mittels ELISA. Die freigesetzte Menge an IL-1 $\beta$  (A), GDF-15 (B), TNF- $\alpha$  (C) und CXCL1 (D) von Kontrollzellen, welche nicht mit Partikeln exponiert wurden, betrug jeweils 30, 160, 2 und 14 pg mL<sup>-1</sup>. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p $\leq$ 0.05, \*\*p $\leq$ 0.01, \*\*\*p $\leq$ 0.001).

#### 4.3.6 Zellbiologische Untersuchungen von SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen in NR8383-Zellen

Für die *in vitro* Testung der biologischen Effekte von SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen wurde ein Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Makrophagen-Zelllinien angestrebt, sodass neben den NR8383 Alveolarmakrophagen auch THP-1 Monocyten (ATCC TIB-202, LGC Standards, Wesel, Germany; Kultivierung in RPMI1640 mit 10% FCS) zum Einsatz kamen.

##### 4.3.6.1 Aufnahme der SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen in Zellen mittels CLSM

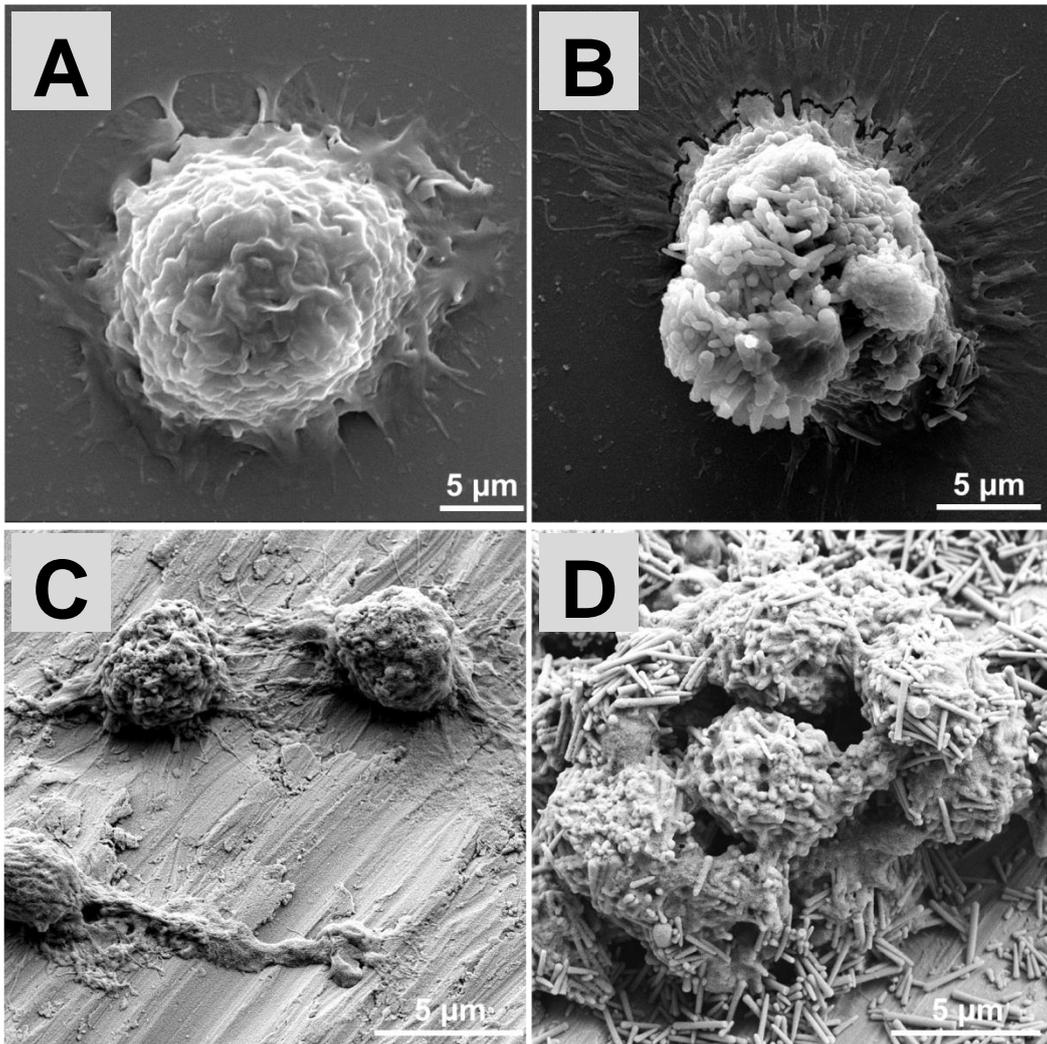
Die Analyse der intrazellulären Aufnahme und Lokalisation von fluoreszenzmarkierten SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen (PEI-FITC-konjugiert) erfolgte mittels CLSM. Nach 24 h Exposition von THP-1- und NR8383-Zellen mit den Partikeln, wurden zur Lokalisierung der Partikel Zellstrukturen angefärbt (Aktin und Zellnuklei). PEI-FITC-markierte SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen wurden sowohl durch THP-1-Zellen (Abb. 20 oben) als auch durch NR8383-Zellen (Abb. 20 unten) internalisiert. Die Partikel waren nicht im Zellkern lokalisiert, jedoch ist eine Lokalisation in endo- / lysosomalen Strukturen, wie sie für andere Partikelsorten vielfach demonstriert wurde, sehr wahrscheinlich (Greulich *et al.* 2011<sup>2</sup>, Kollenda *et al.* 2020<sup>3</sup>).



**Abb. 20:** Aufnahme und Lokalisation von SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen in THP-1 Monozyten (**oben**) und NR8383 Alveolarmakrophagen (**unten**) nach 24 h Partikelexposition (50-100 µg mL<sup>-1</sup>). Die Fluoreszenzsignale repräsentieren PEI-FITC-markierte SiO<sub>2</sub>-Partikel (grün), Aktinfilamente (magenta) und Zellnuklei (cyan). Maßstab = 10 µm (für alle Abbildungen).

#### 4.3.6.2 Aufnahme von SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen in Zellen mittels REM und EDX

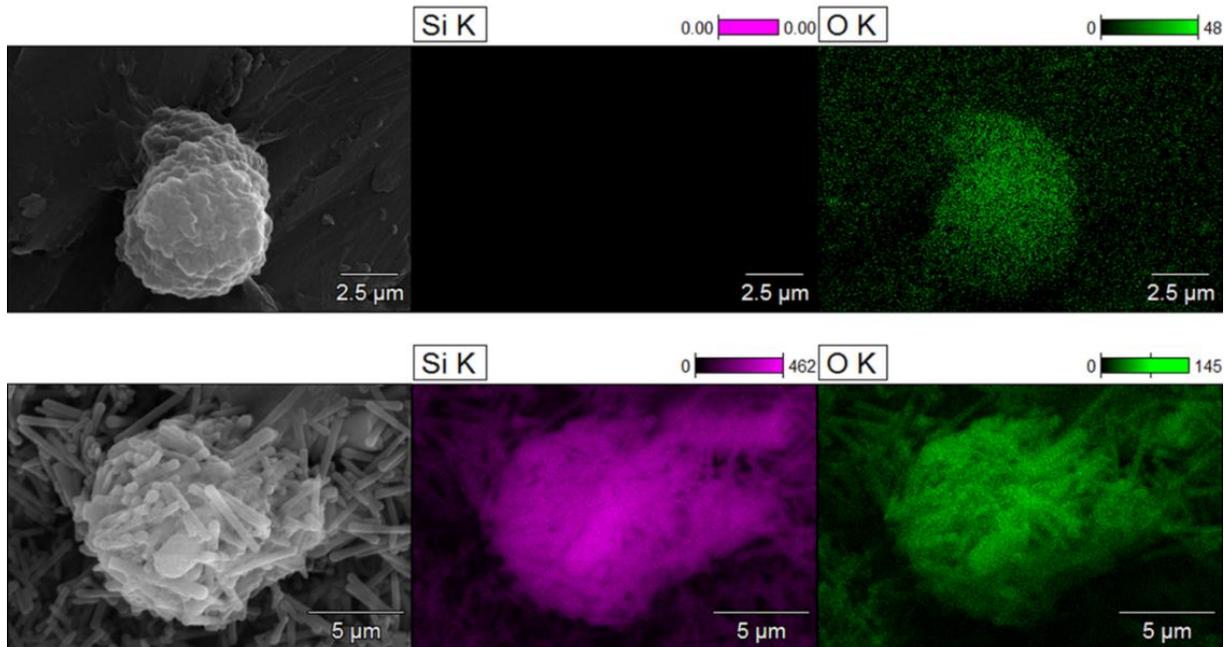
Die Aufnahme von nicht funktionalisierten SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen in THP-1- und NR8383-Zellen wurde durch REM-Untersuchungen mit anschließender EDX-Analyse vervollständigt. Repräsentative REM-Aufnahmen sind in Abb. 21 gezeigt. Die Morphologie der Zellen deutet darauf hin, dass beide Zellarten die Partikel aufgenommen haben. Die Menge der aufgenommenen Partikel war dabei beträchtlich, insbesondere bei hohen Partikelkonzentrationen (bis zu 100 µg mL<sup>-1</sup>). Es ist zu beachten, dass die Riesenstäbchen schnell auf den Zellen sedimentieren, was zu einer hohen lokalen Konzentration an der Zelloberfläche führt (Abb. 12).



**Abb. 21:** Aufnahme von SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen in Makrophagen nach 24 h Partikelexposition. Repräsentative REM-Aufnahmen von nicht exponierten THP-1-Zellen (A) und NR8383-Zellen (C) sowie von mit SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen exponierten THP-1-Zellen (50 µg mL<sup>-1</sup>) (B) und NR8383-Zellen (100 µg mL<sup>-1</sup>) (D). Die Zellen wurden vor der Fixierung gründlich gewaschen, sodass die detektierten Partikel sich entweder innerhalb der Zellen befinden oder fest an diesen adhären müssen.

Zusätzlich zu den REM-Messungen wurde ein EDX-Mapping durchgeführt, um die Aufnahme der SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen in NR8383 Makrophagen anhand der Verteilung von Silizium (Si) und Sauerstoff (O) in den Zellen nachzuweisen. Wie erwartet, zeigten die exponierten Zellen starke Signale für Si und O, während in den unbehandelten Zellen kein Si nachweisbar war, wodurch das Vorhandensein von SiO<sub>2</sub>-Partikeln in den exponierten Zellen eindeutig bestätigt wurde (Abb. 22).

Es ist allgemein anerkannt, dass sehr kleine Partikel von Säugetierzellen über die Wege der Endo- und Pinozytose internalisiert werden, abhängig vom Zelltyp sowie von den physikalisch-chemischen Partikeleigenschaften (Messerschmidt et al.<sup>4</sup>). Die Aufnahme von µm-großen Riesenstäbchen in einem so großen Umfang ist jedoch vermutlich auf Phagozytose zurückzuführen. Die Siliziummenge in den NR8383-Zellen wurde mittels EDX halbquantitativ bestimmt und betrug 13 Gew.-% bei einer anfänglichen Faserkonzentration von 100 µg mL<sup>-1</sup> und 8 Gew.-% bei einer anfänglichen Faserkonzentration von 25 µg mL<sup>-1</sup> (bezogen auf das Trockengewicht der Probe).

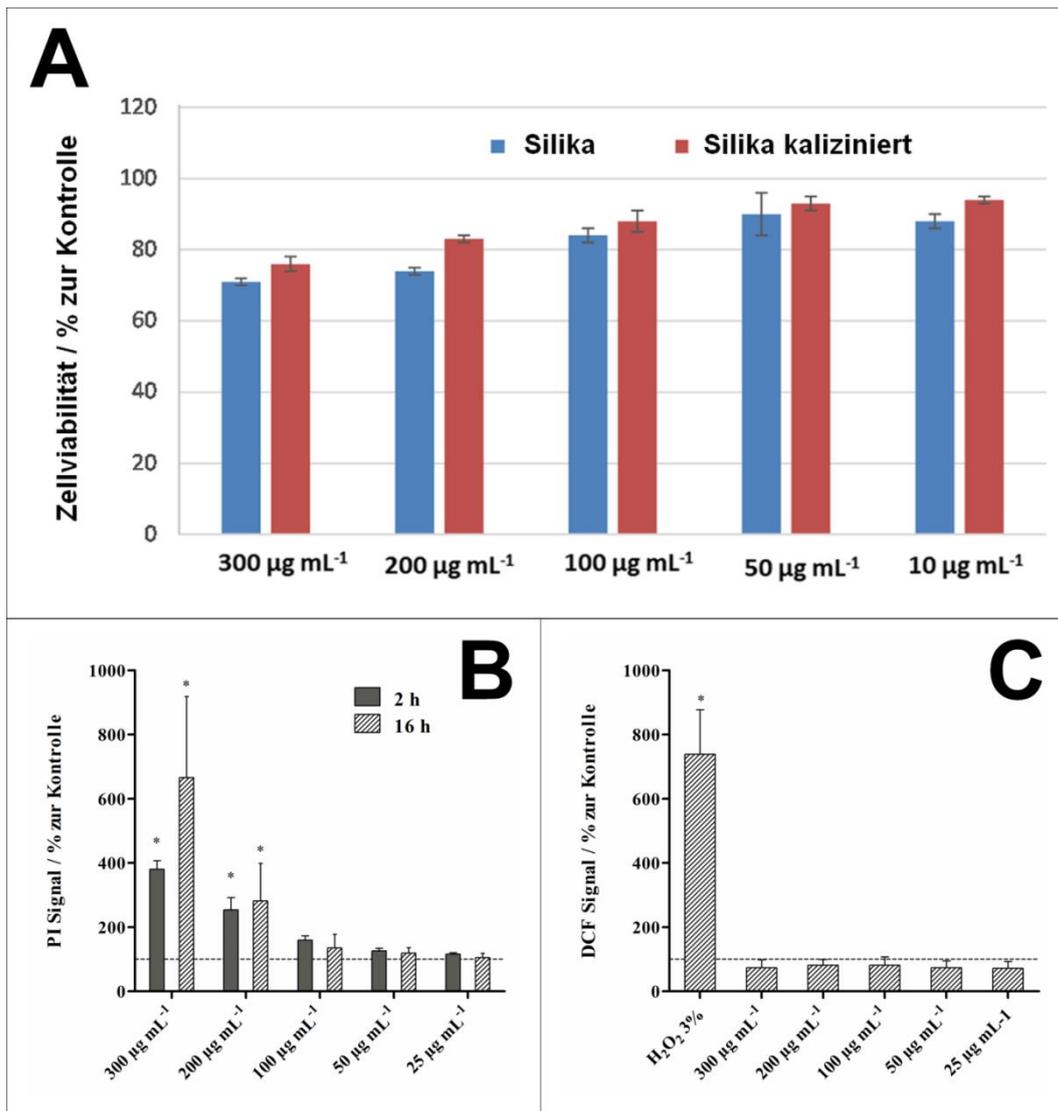


**Abb. 22:** Aufnahme von SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen in Makrophagen nach 24 h Partikelexposition. Repräsentatives EDX-Mapping von nicht exponierten NR8383-Zellen (**oben**) sowie von mit SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen exponierten NR8383-Zellen (100 µg mL<sup>-1</sup>) (**unten**).

#### 4.3.6.3 Zelltoxizität und ROS-Bildung durch SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen

Die Viabilität von THP-1-Zellen nach 24 h Inkubation mit den SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen sowie mit auf 1000 °C erhitzten (kalzinierten) SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen wurde mit dem MTT Assay getestet (Abb. 23A). Mit zunehmender Partikelkonzentration nahm die Viabilität der Zellen tendenziell ab, signifikante Unterschiede zwischen amorphen und kristallinen Partikeln hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung wurden jedoch nicht beobachtet.

Die Viabilität von NR8383-Zellen nach Exposition mit amorphen SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen wurde durchflusszytometrisch mittels Propidiumiodid-Färbung untersucht und ist in Abb. 23B dargestellt. Trotz der hohen Beladung, die durch CLSM und REM/EDX Analysen (Abb. 21-22) nachgewiesen wurde, waren amorphe SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen für NR8383-Zellen sowohl nach 2 h als auch nach 16 h Exposition nur in sehr hohen Konzentrationen oberhalb von 100 µg mL<sup>-1</sup> signifikant zytotoxisch. Zudem konnte bei keiner der eingesetzten Partikelkonzentration Zellaktivierung in Form von erhöhter ROS-Bildung detektiert werden (Abb. 23C). Die hohe Aufnahme von SiO<sub>2</sub>-Riesenstäbchen durch die Zellen ohne wesentliche negative Auswirkungen ist damit vergleichbar mit der Aufnahme von Bariumsulfat-Mikropartikeln, die ebenfalls biologisch inert sind (Loza *et al.* 2016<sup>6</sup>). Es muss betont werden, dass die hier angegebenen Partikelkonzentrationen nicht sehr repräsentativ sind, da die Riesenstäbchen aufgrund ihrer Größe schnell sedimentieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass alle Riesenstäbchen im Zeitraum des Versuchs auf den Zellen sedimentiert sind (Abb. 12).



**Abb. 23:** Zellviabilität und ROS-Bildung in Anwesenheit von SiO<sub>2</sub>-Riesenzstäbchen in Makrophagen nach Partikelexposition. Zellviabilität von THP-1-Zellen mittels MTT Assay in Gegenwart von SiO<sub>2</sub>-Riesenzstäbchen ( $\alpha$ -Cristobalit, blau) und kalzinierten SiO<sub>2</sub>-Riesenzstäbchen (rot) (A). Zellviabilität von NR8383-Zellen mittels Propidiumiodid-Färbung (mittlere Fluoreszenzintensität) nach 2 h und 16 h Inkubation mit SiO<sub>2</sub>-Riesenzstäbchen (B). ROS-Bildung in NR8383-Zellen mittels DCF-Assay (mittlere Fluoreszenzintensität) nach 2 h Inkubation mit SiO<sub>2</sub>-Riesenzstäbchen (C). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p $\leq$ 0.05).

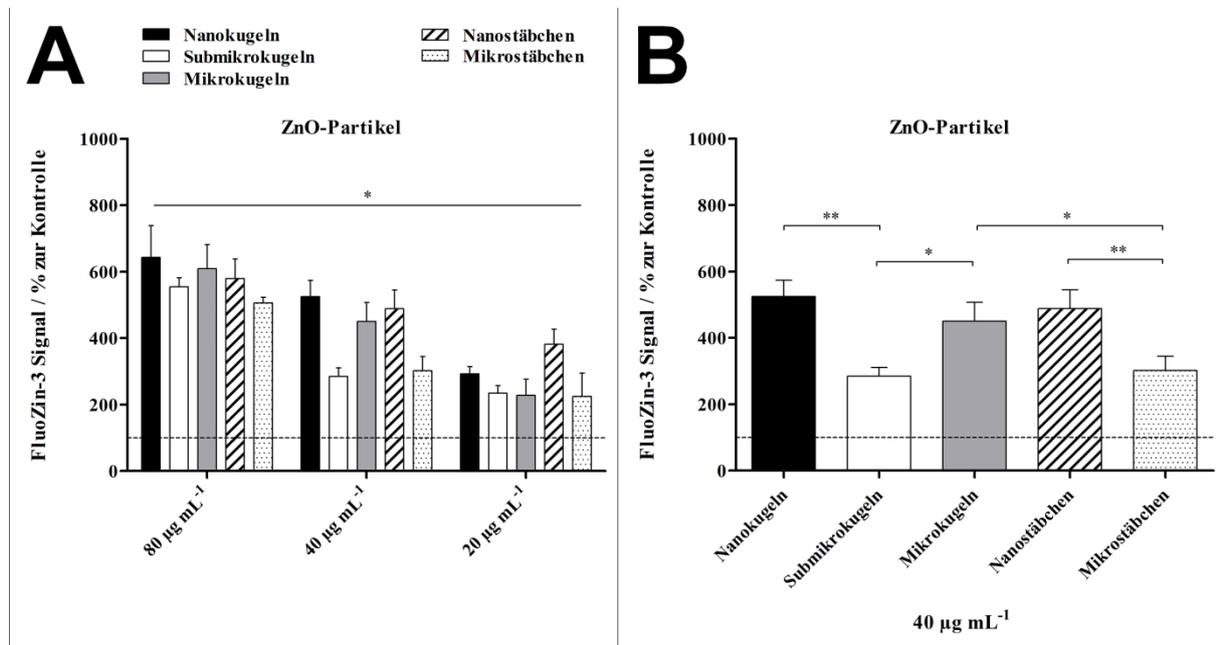
#### 4.4 Zellbiologische Untersuchungen von ZnO-Partikeln in NR8383-Zellen

##### 4.4.1 Intrazelluläre Zink-Ionen-Konzentration

Die quantitative Analyse der Freisetzung von Zink-Ionen aus ZnO-Partikeln in unterschiedlichen zellfreien Medien wurde in Abschnitt 4.1.1 gezeigt. Die indirekte zellbiologische Analyse der Zink-Ionen-Freisetzung wurde anhand der intrazellulären Zink-Ionen-Konzentration von NR8383-Zellen nach 2 h Exposition mit verschiedenen ZnO-Partikeln durchflusszytometrisch mit Hilfe des Zn<sup>2+</sup>-selektiven Indikators FluoZin-3 durchgeführt.

Hierbei konnte für alle Partikeltypen ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden, wobei die intrazelluläre Zink-Ionen-Konzentration erwartungsgemäß mit der Konzentration der Partikel anstieg (Abb. 24A). Ein partikelgrößenabhängiger Effekt zeigte sich für Submikrokugeln, für welche im Vergleich zu Nano- und Mikrokugeln eine signifikant geringere

Zink-Ionen-Konzentration detektiert wurde (Abb. 24B). Auch für Mikrostäbchen zeigte sich im Vergleich zu Nanostäbchen eine signifikante Verringerung (Abb. 24B). Morphologisch bedingte Unterschiede konnten nur für Mikropartikel beobachtet werden, wobei aus Mikrokugeln mehr Zink-Ionen freigesetzt wurden als aus Mikrostäbchen. Im Allgemeinen resultiert die vergrößerte Oberfläche von ZnO-Nanopartikeln im Vergleich zu den Submikro- und Mikropartikeln in einer höheren Reaktivität, und führt damit zu einer effizienteren Auflösung.



**Abb. 24:** Intrazelluläre Zink-Ionen-Konzentration in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h Exposition mit verschiedenen ZnO-Partikeln. Die Zink-Ionen wurden mittels FACS mit Hilfe des Zn<sup>2+</sup>-selektiven Indikators FluoZin-3 nachgewiesen (mittlere Fluoreszenzintensität). Vergleich der Auswirkungen verschiedener Partikel-Konzentrationen und -Morphologien (A). Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Partikel-Morphologien bei einer Partikel-Konzentration von 40 µg mL<sup>-1</sup> (B). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001).

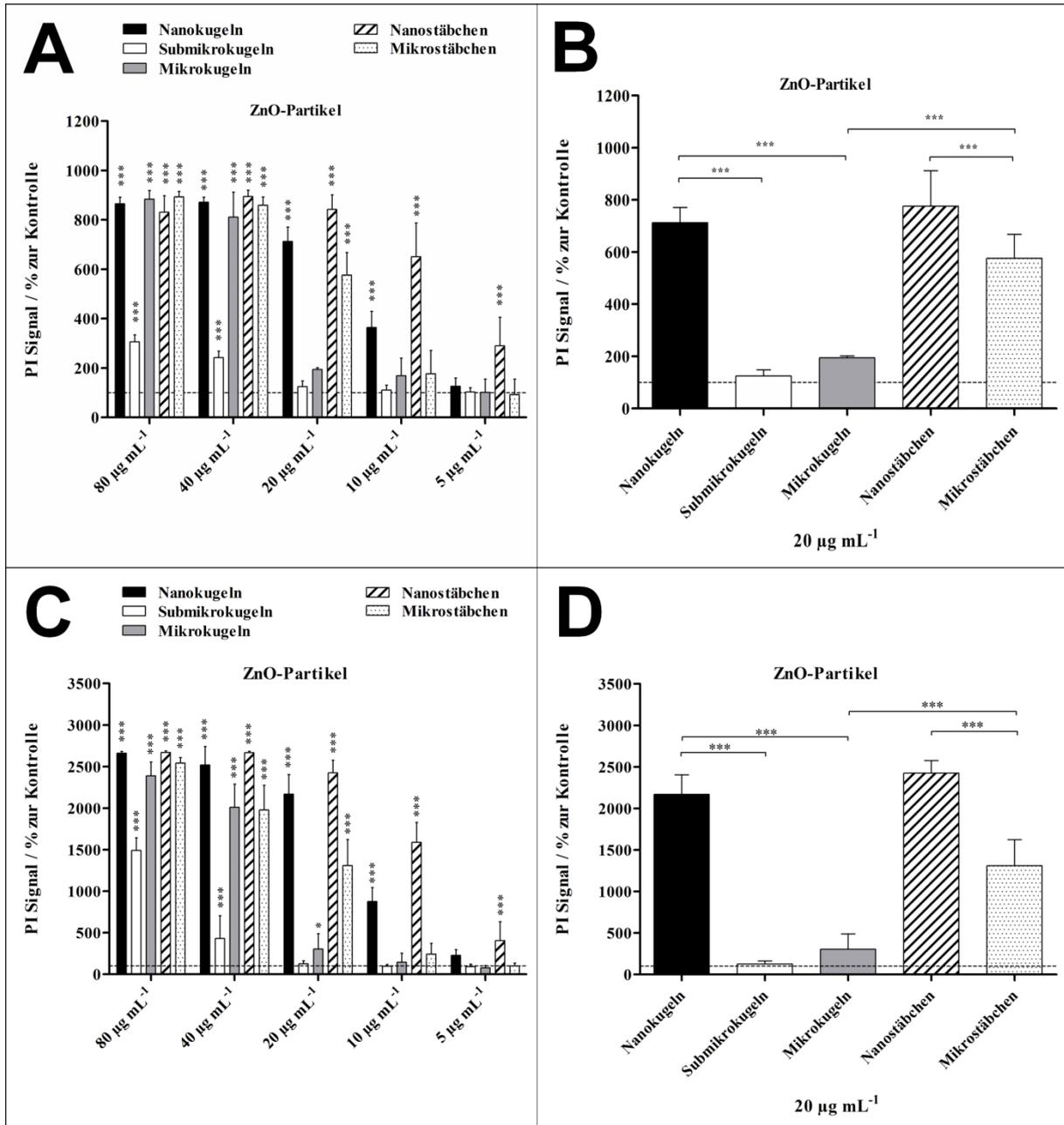
#### 4.4.2 Zelltoxizität von ZnO-Partikeln mittels FACS

Die Bestimmung der zelltoxischen Wirkung der verschiedenen ZnO-Partikel mittels Propidiumiodid-Färbung und FACS ergab sowohl konzentrations- als auch partikelgrößenabhängige zelltoxische Effekte (Abb. 25). Diese Effekte traten bereits nach 2 h Partikelexposition auf (Abb. 25A-B) und nahmen mit zunehmender Dauer der Exposition (16 h) im Hinblick auf ihre Intensität zu (Abb. 25C-D).

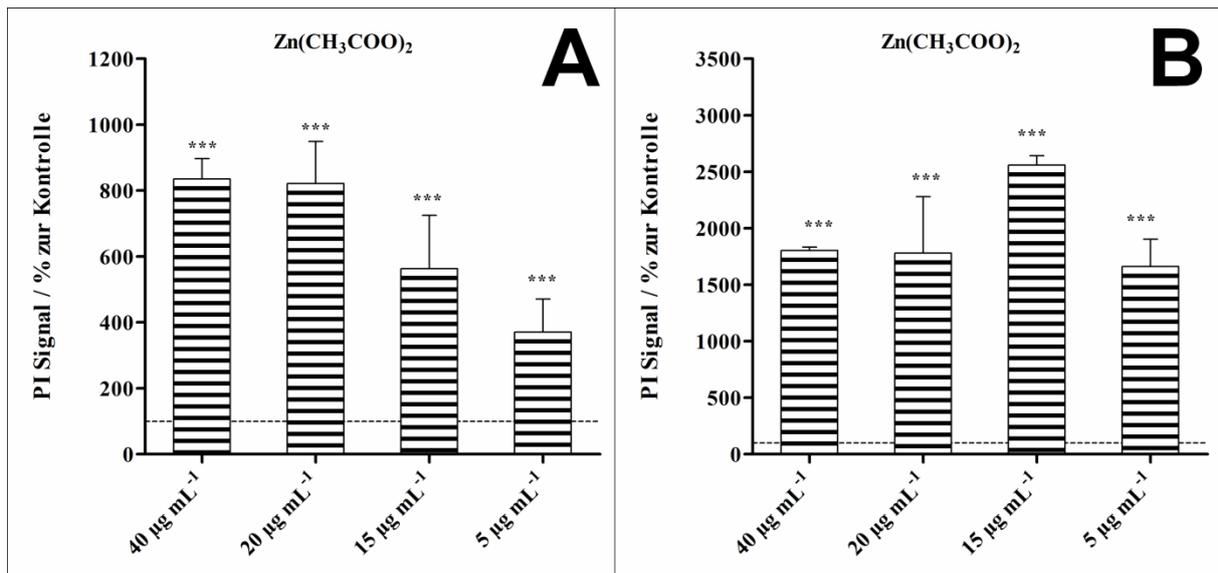
Alle ZnO-Partikeltypen führten in Konzentrationen von 80 und 40 µg mL<sup>-1</sup> zu einem signifikanten Verlust der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 25A+C). Unterhalb von 40 µg mL<sup>-1</sup> zeigten Submikrokugeln keine Zytotoxizität, während Mikrokugeln und Mikrostäbchen unterhalb von 20 µg mL<sup>-1</sup> nicht toxisch waren. Insgesamt zeigten Nanokugeln und Nanostäbchen die höchste Toxizität gegen NR8383-Zellen im Vergleich zu den Submikro- und Mikropartikeln (Abb. 25B+D). Zudem wurden auch morphologieabhängige Effekte beobachtet, da Mikrostäbchen eine signifikant höhere Toxizität im Vergleich zu Mikrokugeln aufwiesen (Abb. 25B+D).

Im Vergleich zu den SiO<sub>2</sub>-Partikeln waren ZnO-Partikel insgesamt deutlich toxischer und zeigten zudem deutlichere partikelgrößen- und morphologieabhängige Effekte, was vermutlich durch Auflösung der ZnO-Partikel und Freisetzung von Zink-Ionen bedingt war (vergleiche 4.1.1 und 4.3.1). Folglich lässt sich die erhöhte Toxizität von ZnO-Nanopartikeln im Vergleich zu den Submikro- und Mikropartikeln auf eine erhöhte Freisetzung von Zink-Ionen

zurückführen. Daher wurden zytotoxische Effekte von ZnO-Nanopartikeln bereits bei Partikelkonzentrationen von 10 und 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , vergleichbar mit einer ionischen Zinkacetatlösung (Abb. 26), beobachtet.



**Abb. 25:** Zellviabilität von NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h (A-B) und 16 h (C-D) Exposition mit verschiedenen ZnO-Partikeln. Die Zellviabilität wurde mittels FACS und Propidiumiodid-Färbung avitaler Zellen bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Vergleich der Auswirkungen verschiedener Partikel-Konzentrationen und -Morphologien (A, C). Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Partikel-Morphologien bei einer Partikel-Konzentration von 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B, D). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

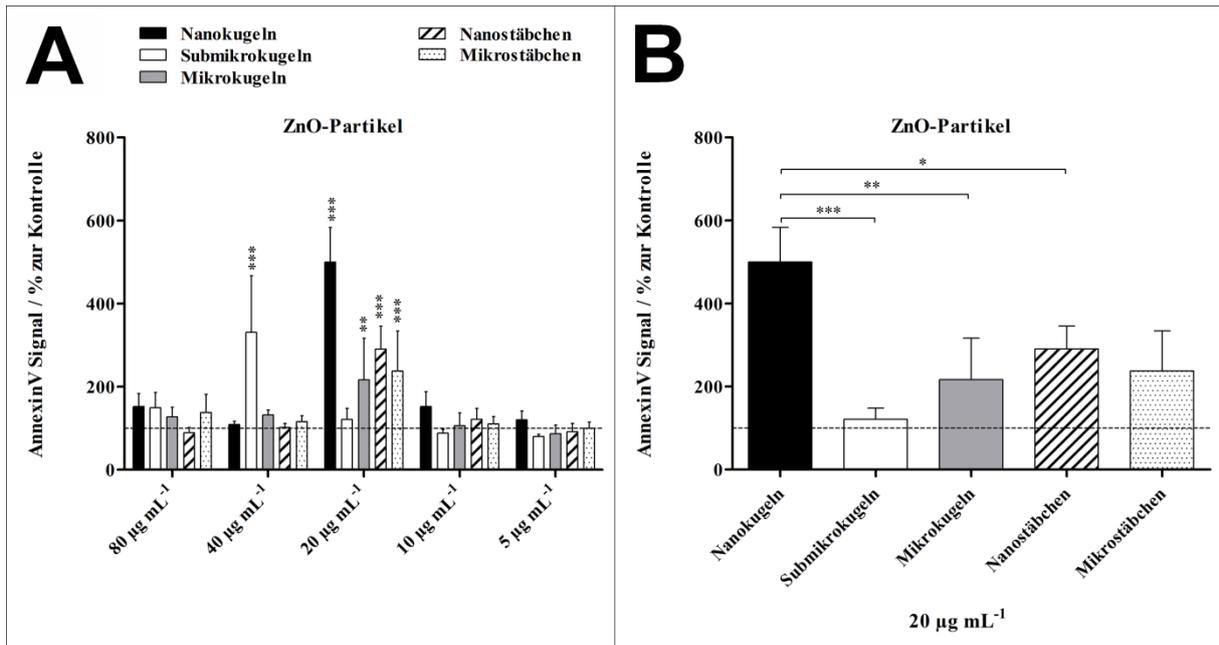


**Abb. 26:** Zellviabilität von NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h (A) und 16 h (B) Exposition mit einer auf den Zinkgehalt normierten Zinkacetatlösung. Die Zellviabilität wurde mittels FACS und Propidiumiodid-Färbung avitaler Zellen bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p $\leq$ 0.05, \*\*p $\leq$ 0.01, \*\*\*p $\leq$ 0.001).

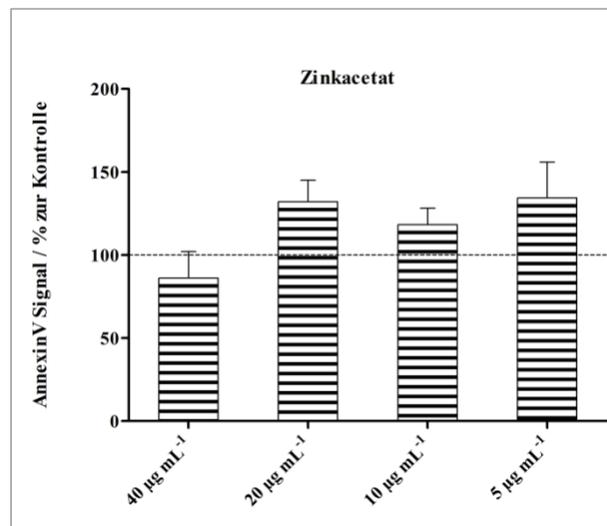
#### 4.4.3 Apoptose-Induktion durch ZnO-Partikel mittels FACS

Zusätzlich zur Zytotoxizitätsuntersuchung wurde die Induktion der Apoptose durch Färbung mit dem FITC-konjugierten AnnexinV, einem Phosphatidylserinmarker, untersucht. In vitalen nicht-apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin hauptsächlich intrazellulär in der Plasmamembran gefunden, während es bei der frühen Apoptose in die äußere Schicht transloziert wird. Um nekrotische Zellen und Zellen der späten Apoptose mit beschädigten Membranen auszuschließen, wurde eine Propidiumiodid-Gegenfärbung durchgeführt.

Die Ergebnisse der Apoptose-Induktion nach 16 h Exposition von NR8383-Zellen mit verschiedenen ZnO-Partikeln sind in Abb. 27 gezeigt. Alle ZnO-Partikeltypen führten zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose bei einer Partikelkonzentration von 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (mit Ausnahme der Submikrokugeln, die die Apoptose bei 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  induzierten) (Abb. 27A). Unter den untersuchten ZnO-Partikeln zeigten Nanokugeln die stärksten Effekte, wie anhand des Vergleichs mit den Submikro- und Mikropartikeln zu sehen ist (Abb. 27B), was zunächst auf einen auf Zink-Ionen basierten Mechanismus schließen lässt. Jedoch zeigte Zinkacetat als ionische Zinklösung keine signifikante Wirkung auf die Apoptoserate von NR8383-Zellen innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs (Abb. 28). Daher muss die beobachtete erhöhte Apoptose-Induktion der ZnO-Partikel bei 40 und 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  vermutlich hauptsächlich auf die Partikelmorphologie zurückgeführt werden.



**Abb. 27:** Induktion der Apoptose in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen ZnO-Partikeln. Zellen der frühen Apoptose wurden mittels FACS mit Hilfe des FITC-konjugierten AnnexinV nachgewiesen (mittlere Fluoreszenzintensität), während nekrotische Zellen und Zellen der späten Apoptose durch eine Propidiumiodid-Färbung ausgeschlossen wurden. Vergleich der Auswirkungen verschiedener Partikel-Konzentrationen und -Morphologien (A). Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Partikel-Morphologien bei einer Partikel-Konzentration von 20 µg mL<sup>-1</sup> (B). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001).



**Abb. 28:** Induktion der Apoptose in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit einer auf den Zinkgehalt normierten Zinkacetatlösung. Zellen der frühen Apoptose wurden mittels FACS mit Hilfe des FITC-konjugierten AnnexinV nachgewiesen (mittlere Fluoreszenzintensität), während nekrotische Zellen und Zellen der späten Apoptose durch eine Propidiumiodid-Färbung ausgeschlossen wurden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen).

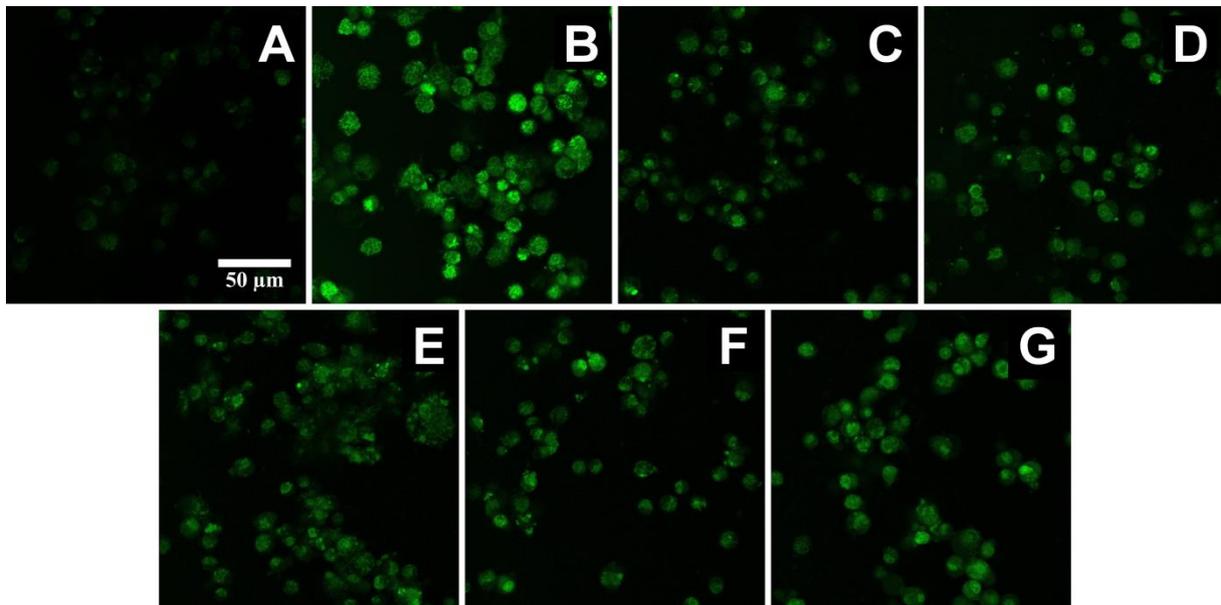
#### 4.4.4 Zellaktivierung: ROS-Bildung durch ZnO-Partikel

##### 4.3.4.1 Qualitative Untersuchungen der ROS-Bildung mittels CLSM

Der Einfluss von ZnO-Partikeln ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) auf die ROS-Bildung in NR8383-Makrophagen nach 2 h Exposition wurde zunächst qualitativ mit dem ROS-Tracker CellROX-Green und CLSM untersucht. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sind in Abb. 29 gezeigt.

Im Vergleich zu einer nicht exponierten Kontrolle (Negativkontrolle, Abb. 29A), wurde nach Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Positivkontrolle, Abb. 29B) ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert (grüne Fluoreszenz), welches mit einer Erhöhung der ROS-Level korreliert.

In Gegenwart aller untersuchten ZnO-Partikel konnte die Bildung von ROS anhand deutlich detektierbarer Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 29C-G). Unterschiede ließen sich in Bezug auf die Partikelgröße beobachten, wobei Nanopartikel (Abb. 29C+E) im Vergleich zu größeren Submikro- und Mikropartikeln (Abb. 29D+F+G) geringere ROS-Level verursachten.



**Abb. 27:** Bildung von ROS in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h Exposition mit verschiedenen ZnO-Partikeln ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Die ROS-Bildung wurde qualitativ mittels CLSM mit Hilfe des ROS-Indikators CellROX Green (grüne Fluoreszenz) nachgewiesen. Die repräsentativen CLSM-Aufnahmen zeigen: Negativkontrolle (unbehandelte Kontrollzellen) (A), Positivkontrolle ( $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ , 30 min) (B), sowie Zellen nach Exposition mit: Nanostäbchen (C), Mikrostäbchen (D), Nanokugeln (E), Submikrokugeln (F) und Mikro-kugeln (G).

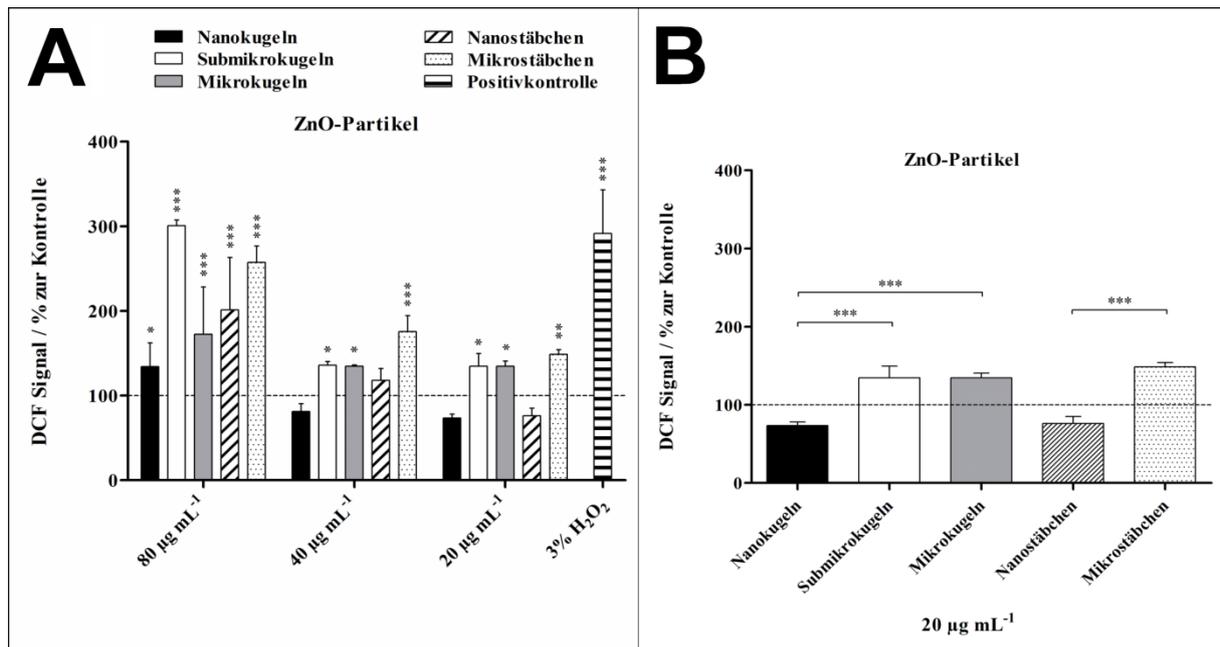
##### 4.4.4.2 Quantitative Untersuchungen der ROS-Bildung mittels FACS

Neben der qualitativen Analyse der ROS-Bildung mittels CLSM, wurden quantitative durchflusszytometrische Untersuchungen mit dem DCF-Assay durchgeführt.

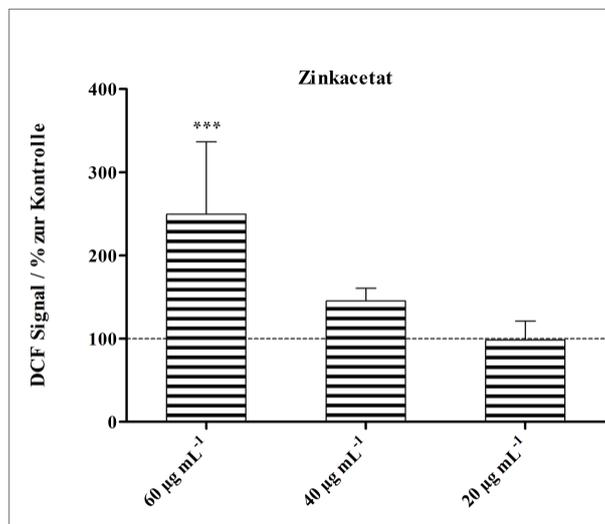
Wie in Abb. 30A dargestellt, wurden nach 2 h Inkubation für alle untersuchten ZnO-Partikel bei einer Partikelkonzentration von  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  signifikant erhöhte ROS-Werte im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet. Unterhalb dieser Konzentration induzierten nur noch Submikrokugeln, Mikrokugeln und Mikrostäbchen signifikant erhöhte ROS-Werte. Dabei wurden die stärksten Effekte durch Mikrostäbchen verursacht, was die im Vergleich zu den Mikrokugeln beobachtete höhere Zytotoxizität erklären könnte (Abb. 25).

Wie im Falle der qualitativen Analyse (Abb. 29), zeigten auch die quantitativen Untersuchungen, dass Nanokugeln und Nanostäbchen im Vergleich zu den Submikro- und Mikropartikeln insgesamt die geringsten Auswirkungen auf die ROS-Bildung hatten (Abb. 30B). Zudem wurde eine verstärkte ROS-Bildung für die als Zink-Ionen-Kontrolle verwendete Zinkacetatlösung erst bei relativ hohen Konzentrationen von  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  beobachtet (Abb. 31). Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Erhöhung der

ROS-Bildung nicht mit der Freisetzung von Zink-Ionen, sondern hauptsächlich mit der Partikelgröße zusammenhängt.



**Abb. 30:** Bildung von ROS in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h Exposition mit verschiedenen ZnO-Partikeln. Die ROS-Bildung wurde mittels FACS mit Hilfe des ROS-Indikators Dichlorfluorescein (DCF) bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Vergleich der Auswirkungen verschiedener Partikel-Konzentrationen und -Morphologien (**A**). Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Partikel-Morphologien bei einer Partikel-Konzentration von 20 µg mL<sup>-1</sup> (**B**). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001).



**Abb. 31:** Bildung von ROS in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h Exposition mit einer auf den Zinkgehalt normierten Zinkacetatlösung. Die ROS-Bildung wurde mittels FACS mit Hilfe des ROS-Indikators Dichlorfluorescein (DCF) bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*\*\*p≤0.001).

#### 4.4.5 Zellaktivierung: Zytokinfreisetzung durch ZnO-Partikel

##### 4.4.5.1 Qualitative Untersuchungen der Zytokinfreisetzung mittels Protein-Microarrays

Wie im Falle der SiO<sub>2</sub>-Partikel, wurde für die Detektion exprimierter Proteine im Zellkulturüberstand von NR8383-Zellen nach 16 h Inkubation mit verschiedenen ZnO-Partikeln (10 µg mL<sup>-1</sup>) der Proteom-Profiler-Array verwendet.

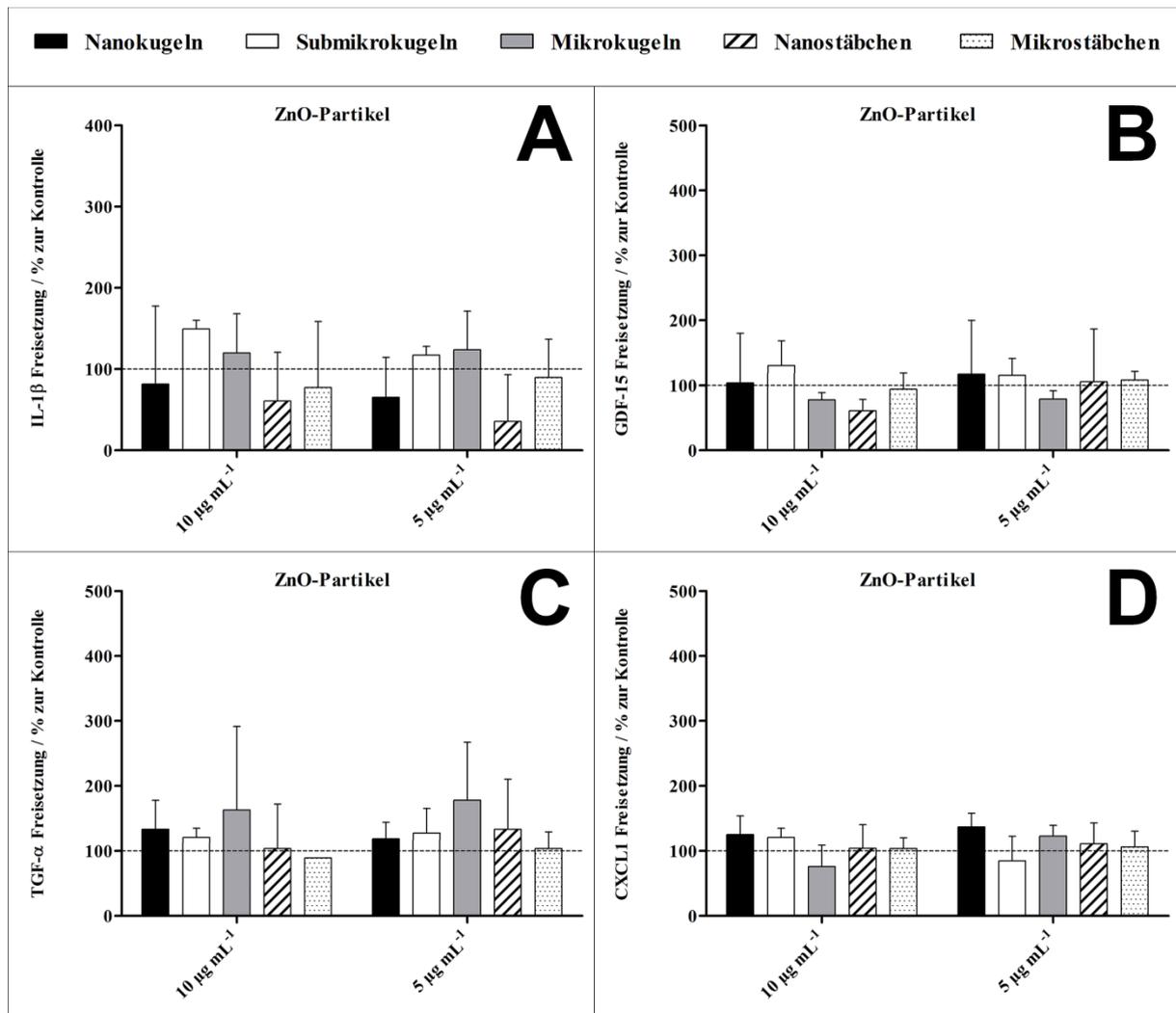
Die erhaltene Heatmap von 27 repräsentativen Proteinen ist in Abb. 32 gezeigt. Insgesamt war die relative Expression der ausgewählten Proteine in Gegenwart der ZnO-Partikel eher gering (geringer Anteil der Rot-Färbung), insbesondere verglichen mit den Effekten von SiO<sub>2</sub>-Partikeln (Abb. 18). Ein eindeutiger morphologieabhängiger Trend konnte nicht beobachtet werden. In Bezug auf die Partikelgröße zeigten Mikrokugeln eine geringfügig höhere Anzahl an hoch exprimierten Proteinen als Nano- oder Submikrokugeln. Ähnliche Ergebnisse wurden für 5 µg mL<sup>-1</sup> einer ionischen Zinklösung detektiert, was auf eine mögliche Beteiligung von Zink-Ionen hindeutet (Abb. 32).

≤ 0,5	Nanokugeln 10 µg mL <sup>-1</sup>	Submikrokugeln 10 µg mL <sup>-1</sup>	Mikrokugeln 10 µg mL <sup>-1</sup>	Nanostäbchen 10 µg mL <sup>-1</sup>	Mikrostäbchen 10 µg mL <sup>-1</sup>	Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> 5 µg mL <sup>-1</sup>
>0.5 ≤ 1.0						
>1.0 ≤ 2.0						
>2.0						
MCP-1						
MIP-1α/B						
RANTES						
MIP-3α						
MDC						
GROB						
Cystatin C						
Galectin-1						
Galectin-3						
G-CSF						
GDF-15						
ICAM-1						
IGF-I						
IGFBP-2						
IL-1α						
IL-1β						
IL-1ra						
IL-3						
IL-6						
MMP-3						
MMP-9						
NOV						
Osteopontin						
Prolactin						
RBP4						
Serpin E1						
TNF-α						

**Abb. 32:** Heatmap der relativen Expression von 27 bioaktiven Faktoren in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen ZnO-Partikeln und einer auf den Zinkgehalt normierten Zinkacetatlösung mittels Protein-Mikroarray. Die Heatmap stellt die Expression eines Faktors relativ zu einer unbehandelten Kontrolle dar, was durch die Farbskala (linke obere Ecke) kodiert wird. Die Intensitätsskala der standardisierten Expressionswerte reicht von ≤0.5 (grün: geringe Expression) bis >2 (rot: hohe Expression).

##### 4.4.5.2 Quantitative Untersuchungen der Zytokinfreisetzung mittels ELISA

Für quantitative Analysen der Zytokinfreisetzung in Gegenwart von ZnO-Partikeln wurden Sandwich-ELISA-Kits verwendet. Abb. 33 zeigt repräsentative Ergebnisse für die gemessenen bioaktiven Faktoren IL-1β, GDF-15, TNF-α und CXCL1, wobei signifikante Effekte auf die Freisetzung der untersuchten Faktoren durch keine der getesteten ZnO-Partikelsorten induziert wurden (Abb. 33A-D).



**Abb. 33:** Freisetzung von Zytokinen durch NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen ZnO-Partikeln mittels ELISA. Die freigesetzte Menge an IL-1 $\beta$  (A), GDF-15 (B), TNF- $\alpha$  (C) und CXCL1 (D) von Kontrollzellen, welche nicht mit Partikeln exponiert wurden, betrug jeweils 30, 160, 2 und 14  $\text{pg mL}^{-1}$ . Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=3$ ) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

## 4.5 Zellbiologische Untersuchungen von TiO $_2$ -Partikeln in NR8383-Zellen

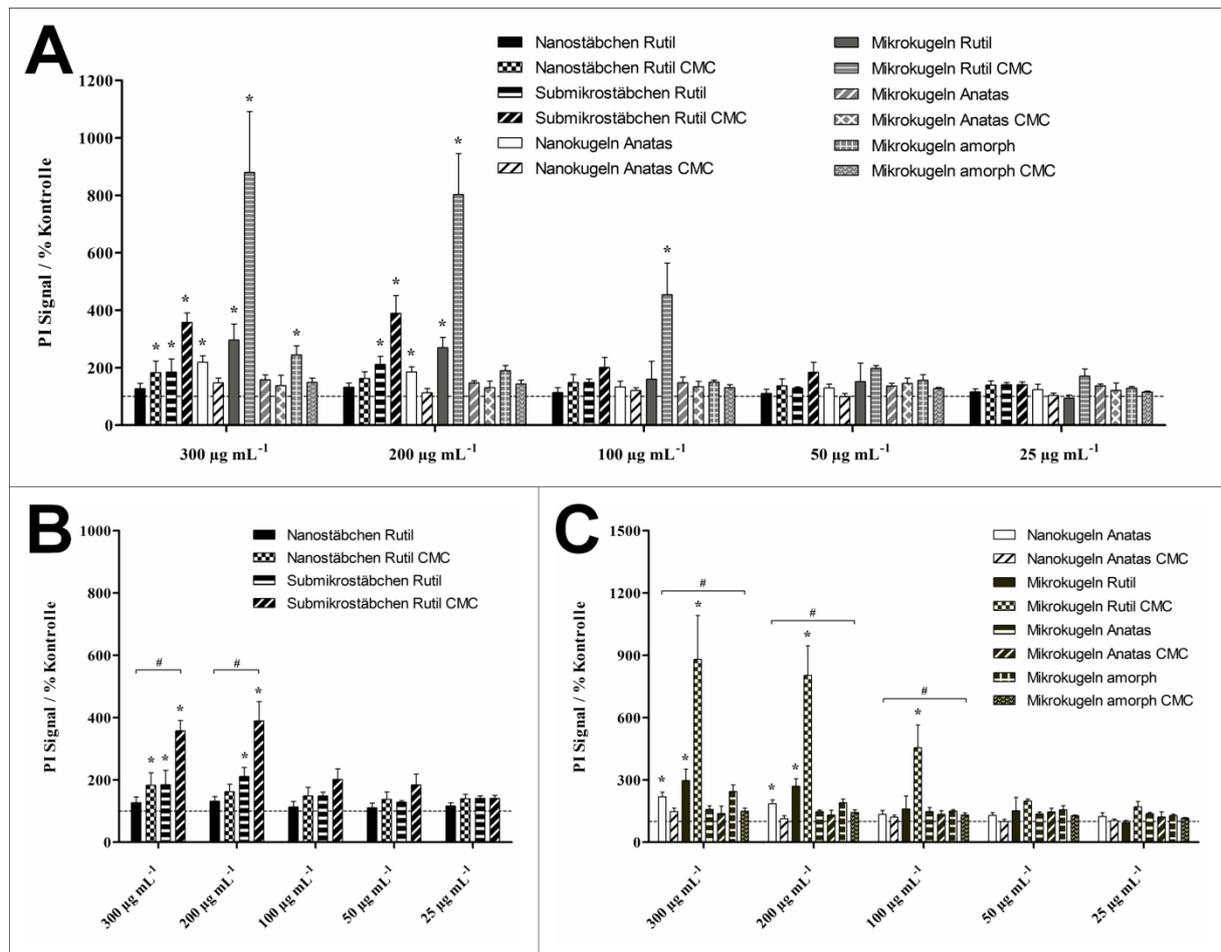
### 4.5.1 Zelltoxizität von TiO $_2$ -Partikeln mittels FACS

Die Zytotoxizität der verschiedenen TiO $_2$ -Partikel auf NR8383-Zellen wurde ebenfalls mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse von Propidiumiodid-markierten Zellen nach 2 h (Abb. 34) und 16 h (Abb. 35) Partikelexposition bestimmt.

Nach 2 h Exposition induzierten alle Rutil-Partikel (Nanostäbchen, Submikrostäbchen, Mikrokugeln) sowie Anatas-Nanokugeln signifikante zytotoxische Effekte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, allerdings nur bei hohen Partikelkonzentrationen von  $\geq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Abb. 34A). Hierbei konnte bei den stäbchenförmigen Partikeln ein größenabhängiger Effekt beobachtet werden, da CMC-funktionalisierte Submikrostäbchen signifikant toxischer waren als die Nanostäbchen (Abb. 34B), was vermutlich auf die schnellere Sedimentationsgeschwindigkeit der größeren Partikel zurückgeführt werden kann (Abb. 12). Bei den kugelförmigen Partikeln induzierten CMC-funktionalisierte Rutil-Mikrokugeln die höchste Toxizität (Abb. 34C). In Bezug auf die Sedimentationsgeschwindigkeit der Rutil-Mikrokugeln muss neben der Größenabhängigkeit auch die höhere Dichte von Rutil berücksichtigt werden.

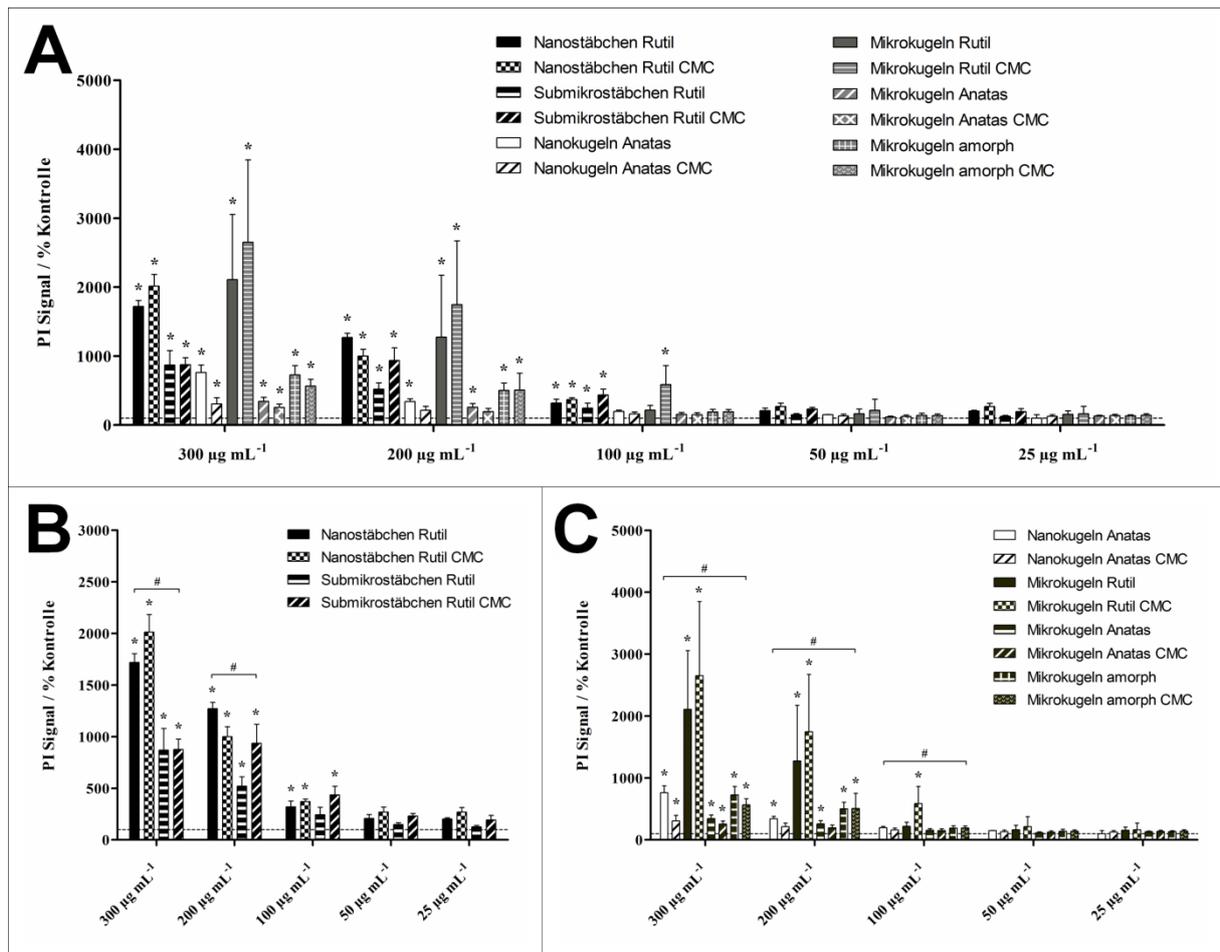
Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Zelltoxizität aller TiO<sub>2</sub>-Partikel zu, was sich in der erhöhten Anzahl Propidiumiodid-positiver Zellen widerspiegelte (Abb. 35). Jedoch wurde selbst nach 16 h Inkubation für keine der untersuchten Partikelarten signifikante Toxizität unterhalb von 100 µg mL<sup>-1</sup> beobachtet (Abb. 35A). Bei den stäbchenförmigen Partikeln nahm die Toxizität der Nanostäbchen deutlich zu, sodass nach 16 h Exposition Nanostäbchen toxischer waren als Submikrostäbchen (Abb. 35B).

Insgesamt wiesen Rutil-Mikrokugeln die höchste zytotoxische Aktivität unter allen getesteten TiO<sub>2</sub>-Partikeln auf (Abb. 35C), was höchstwahrscheinlich mit der rauen Partikeloberfläche zusammenhing, die aus gestapelten Nanostäbchen bestand (Abb. 9).



**Abb. 34:** Zellviabilität von NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h Exposition mit verschiedenen TiO<sub>2</sub>-Partikeln. Die Zellviabilität wurde mittels FACS und Propidiumiodid-Färbung avitaler Zellen bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Vergleich der Auswirkungen verschiedener Partikel-Konzentrationen und -Morphologien (**A**, **C**). Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Partikel-Größen und Kristallstrukturen für Stäbchen (**B**) und Kugeln (**C**). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an; Hashtags (#) zeigen signifikante Unterschiede beim Vergleich der Partikel untereinander (\*/# p≤0.05).

Die CMC-Funktionalisierung hatte keine statistisch signifikante Auswirkung auf die biologische Aktivität von kugelförmigen amorphen und Anatase-Partikeln, aber im Falle von Rutil-Partikeln, vor allem bei Mikrokugeln, waren nicht funktionalisierte Partikel weniger toxisch als CMC-funktionalisierte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die durch die CMC-Funktionalisierung verursachte negative Ladung der Partikel und die Präferenz von Phagozyten zu negativ geladenen Partikeln aufgrund der negativen Ladung bakterieller Pathogene (Fröhlich 2012<sup>6</sup>).

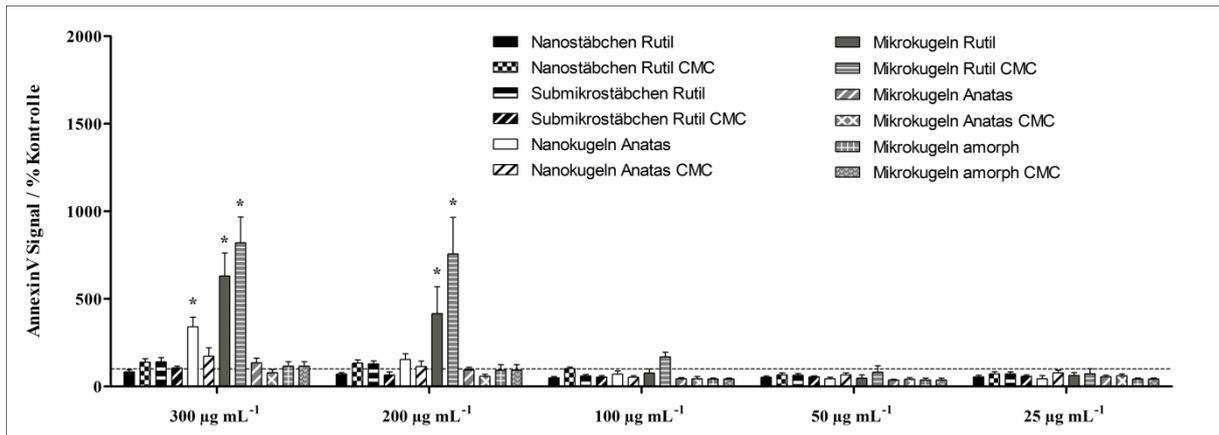


**Abb. 35:** Zellviabilität von NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen  $\text{TiO}_2$ -Partikeln. Die Zellviabilität wurde mittels FACS und der Propidiumiodid-Färbung avitaler Zellen bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Vergleich der Auswirkungen verschiedener Partikel-Konzentrationen und -Morphologien (**A**, **C**). Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Partikel-Größen und Kristallstrukturen für Stäbchen (**B**) und Kugeln (**C**). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=3$ ) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an; Hashtags (#) zeigen signifikante Unterschiede beim Vergleich der Partikel untereinander (\*/#  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.5.2 Apoptose-Induktion durch $\text{ZnO}$ -Partikel mittels FACS

Die Untersuchungen der Apoptose-Rate nach 16 h Exposition von NR8383-Zellen mit verschiedenen  $\text{TiO}_2$ -Partikeln wurden entsprechend den Untersuchungen an  $\text{ZnO}$ -Partikeln mittels AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung und FACS durchgeführt.

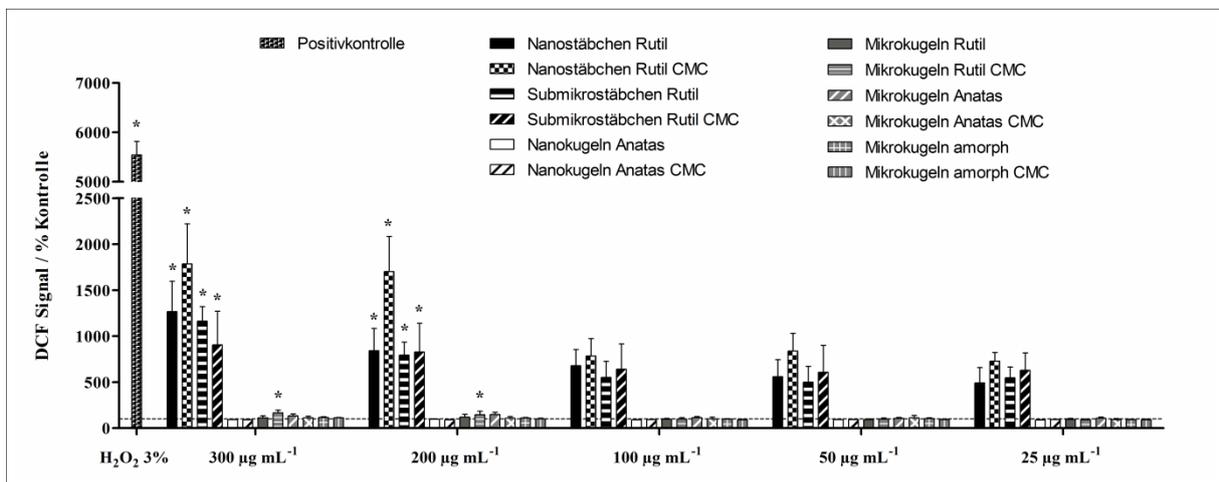
Wie in Abb. 36 zu sehen ist, wurde eine signifikant erhöhte Apoptose-Rate nur in Gegenwart von Anatas-Nanokugeln sowie Rutil-Mikrokugeln beobachtet. Für beide Partikelsorten traten die signifikanten Effekte nur in sehr hohen Partikelkonzentrationen von 300-200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  auf, welche auch mit signifikanten zelltoxischen Effekten assoziiert waren (Abb. 35). Bei moderaten Partikelkonzentrationen konnten allerdings für keine der  $\text{TiO}_2$ -Partikelsorten Apoptose-induzierende oder -inhibierende Effekte beobachtet werden.



**Abb. 36:** Induktion der Apoptose in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen TiO<sub>2</sub>-Partikeln. Zellen der frühen Apoptose wurden mittels FACS mit Hilfe des FITC-konjugierten AnnexinV nachgewiesen (mittlere Fluoreszenzintensität), während nekrotische Zellen und Zellen der späten Apoptose durch eine Propidiumiodid-Färbung ausgeschlossen wurden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p≤0.05).

#### 4.5.3 Zellaktivierung: ROS-Bildung durch TiO<sub>2</sub>-Partikel mittels FACS

Die Ergebnisse der Untersuchung der ROS-Bildung in NR8383 Makrophagen nach 2 h Inkubation mit den verschiedenen TiO<sub>2</sub>-Partikeln mittels DCF-Assay sind in Abb. 37 gezeigt. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen produzierten NR8383-Zellen, die mit 300-200 µg mL<sup>-1</sup> an Rutil-Nano- und Submikrostäbchen exponiert wurden, signifikant erhöhte ROS-Werte, während in Gegenwart der kugelförmigen amorphen sowie Rutil- und Anatas-Partikel nur geringe Auswirkungen auf die ROS-Bildung beobachtet wurden. Insgesamt induzierte bei moderaten Partikelkonzentrationen keine der TiO<sub>2</sub>-Partikelsorten eine mit erhöhten ROS-Werten verbundene Zellaktivierung aus.



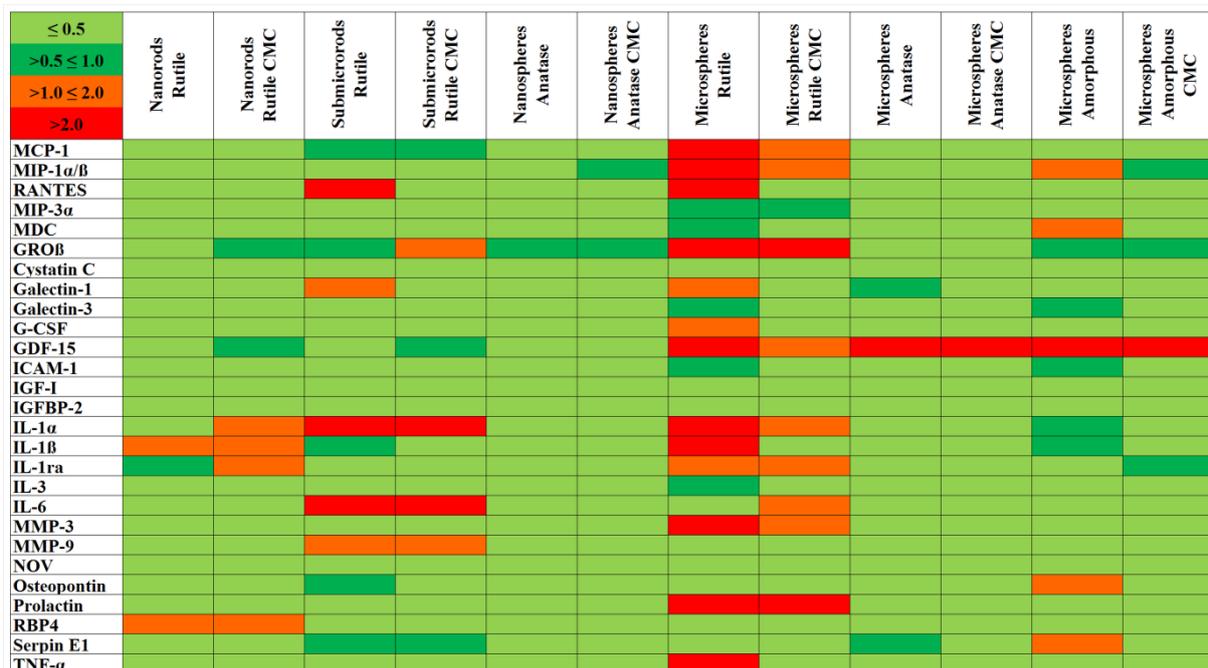
**Abb. 37:** Bildung von ROS in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 2 h Exposition mit verschiedenen TiO<sub>2</sub>-Partikeln. Die ROS-Bildung wurde mittels FACS mit Hilfe des ROS-Indikators Dichlorfluorescein (DCF) bestimmt (mittlere Fluoreszenzintensität). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD (n=3) in % zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Sternchen (\*) zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an (\*p≤0.05).

#### 4.5.4 Zellaktivierung: Zytokinfreisetzung durch TiO<sub>2</sub>-Partikel mittels Protein-Microarrays

Zur weiteren Analyse möglicher zellaktivierender Wirkung der verschiedenen TiO<sub>2</sub>-Partikel wurde die Expression bioaktiver Faktoren aus dem Überstand von NR8383-Zellen nach 16 h Exposition mit 100 µg mL<sup>-1</sup> der Partikel untersucht. Mit Hilfe eines Protein-Microarrays wurden

79 bioaktive Moleküle, darunter Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, gleichzeitig in der jeweiligen Zellüberstandsprobe nachgewiesen. Entsprechend den Untersuchungen an SiO<sub>2</sub>- und ZnO-Partikeln wurden 27 Faktoren für eine detaillierte Betrachtung ausgewählt und sind in der qualitativen Heatmap in Abb. 38 dargestellt.

Ein Anstieg des relativen Expressionsniveaus der ausgewählten bioaktiven Faktoren wurde nur bei Rutil-Submikrostäbchen und Rutil-Mikrokugeln beobachtet, was durch einen insgesamt höheren Rotanteil in der Heatmap angezeigt wird. Rutil-Nanostäbchen sowie amorphe und Anatas-Kugeln (Nano- und Mikrokugeln) zeigten dagegen einen höheren Grünanteil, was auf eine tendenziell verringerte Expression hinweist. Außerdem wurde bei allen Mikrokugeln eine erhöhte Expression von GDF-15 festgestellt. Es ist anzumerken, dass die Proteinarray-Analyse eine qualitative Screening-Methode darstellt, die einen ersten Gesamteindruck von möglichen Zu- oder Abnahmen der Expressionsmuster vermittelt. Die quantitative ELISA-Analyse ergab jedoch keine statistisch signifikanten größen-, morphologie- oder strukturbezogenen Effekte und somit keine Zellaktivierung für die untersuchten TiO<sub>2</sub>-Partikel.



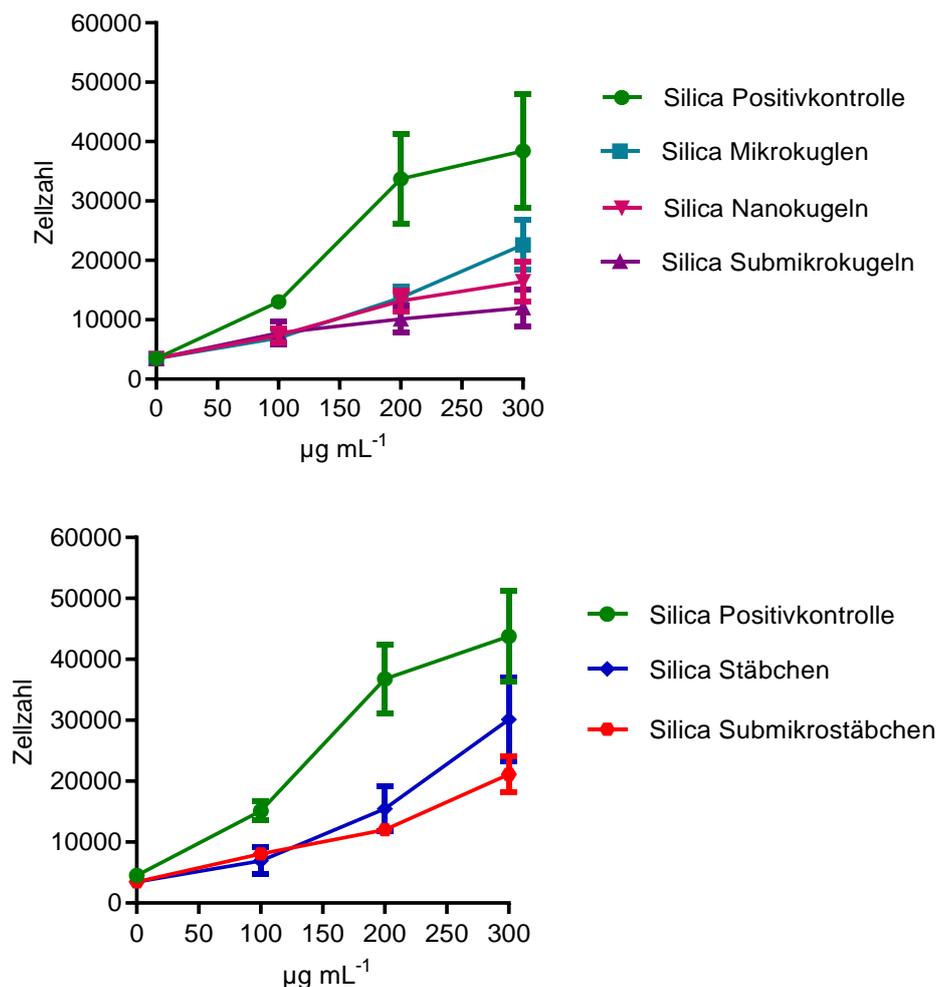
**Abb. 38:** Heatmap der relativen Expression von 27 bioaktiven Faktoren in NR8383 Alveolarmakrophagen nach 16 h Exposition mit verschiedenen TiO<sub>2</sub>-Partikeln und einer auf den Zinkgehalt normierten Zinkacetatlösung mittels Protein-Mikroarray. Die Heatmap stellt die Expression eines Faktors relativ zu einer unbehandelten Kontrolle dar, was durch die Farbskala (linke obere Ecke) kodiert wird. Die Intensitätsskala der standardisierten Expressionswerte reicht von ≤0.5 (grün: geringe Expression) bis >2 (rot: hohe Expression).

## 4.6 PICMA

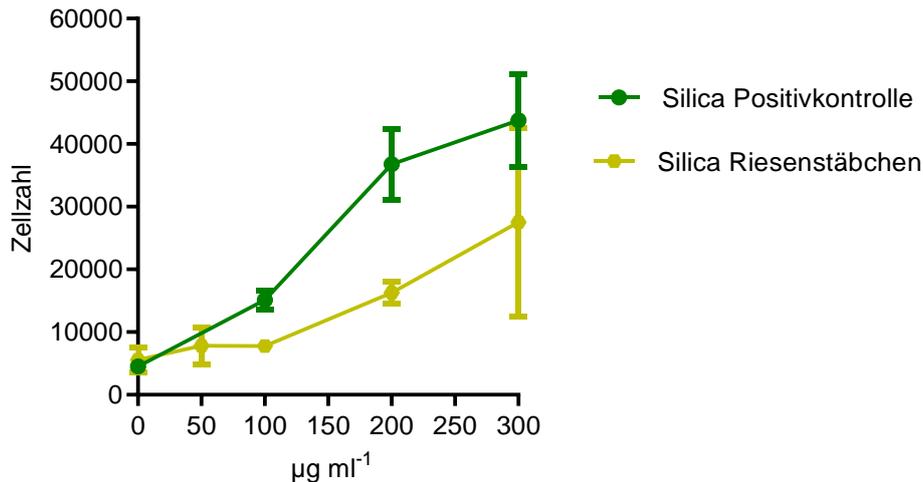
Das Potenzial der Partikel, chemotaktische Faktoren in exponierten NR8383-Zellen zu induzieren, die freigesetzt werden, um dHL-60-Zellen anzulocken (als Modell für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten), wurde mit PICMA analysiert (Abb. 39-43).

### 4.6.1 Chemotaxis induziert durch Silica-Partikel

Alle Arten von neu synthetisierten Silica-Partikeln zeigten geringere Effekte im Vergleich zur Positivkontrolle. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den synthetisierten Partikeltypen (Abb. 39). Auch Silica-Riesenstäbchen wichen in der Wirkstärke nicht nennenswert von den übrigen Silica-Partikeln ab (Abb. 40). Bemerkenswerterweise hatten aber die kommerziell erworbenen Silica-Partikel, die als Positivkontrolle dienten, einen stärkeren Effekt als die neu synthetisierten Silica-Partikel.



**Abbildung 39:** Chemotaxis (Zellzahl) der nicht exponierten dHL-60-Zellen als Reaktion auf NR8383-Zellüberstände, die aus Inkubationen mit Silica-Kugeln (oben) und Silica-Stäbchen (unten) zwischen 100 und 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gewonnen wurden. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar aus je drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ). Als Positivkontrolle dienten handelsübliche Silica-Nanopartikel.

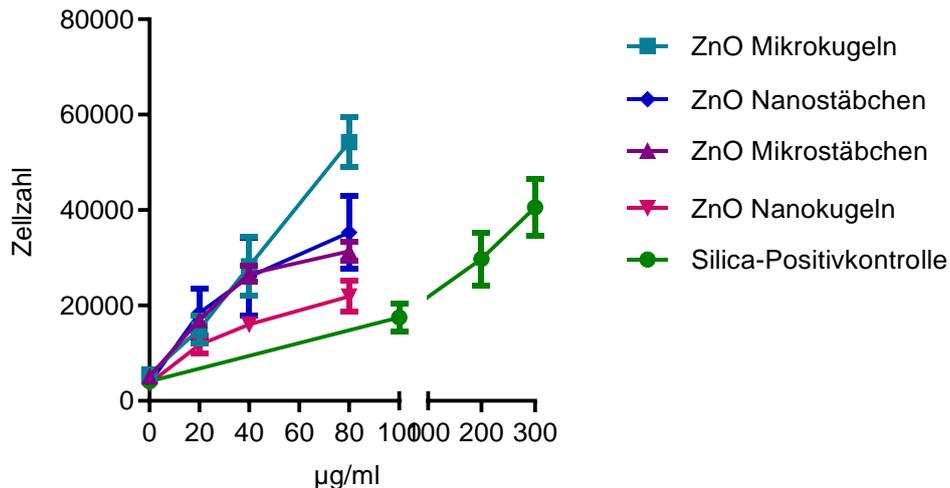


**Abbildung 40:** Chemotaxis (Zellzahl) der nicht exponierten dHL-60-Zellen als Reaktion auf NR8383-Zellüberstände, die aus Inkubationen mit Silica-Riesenstäbchen zwischen 50 und 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gewonnen wurden. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar aus je drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ). Als Positivkontrolle dienten handelsübliche Silica-Nanopartikel.

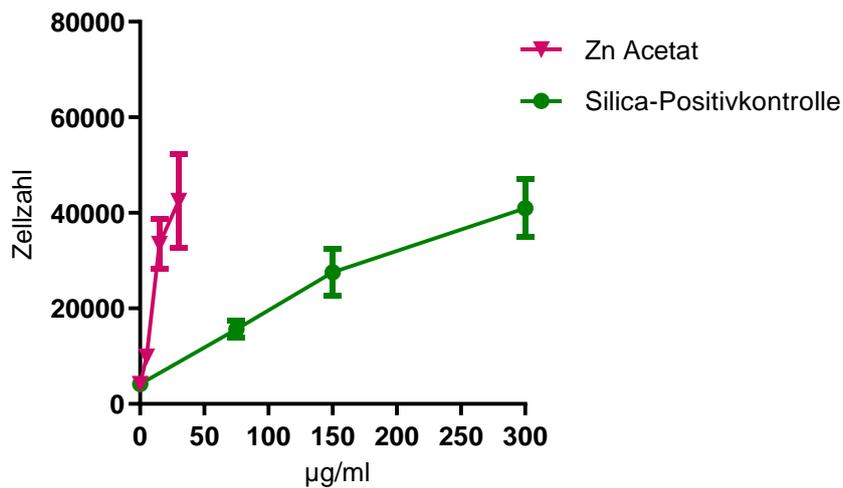
Schlussfolgernd aus diesen Versuchen ist zu bemerken, dass Größe und Form nur wenig Einfluss auf die Wirkstärke der Silica-Partikel haben; auch wenn sie stäbchenförmig sind. Wahrscheinlich sind diese Stäbchen zu kurz und zu dick, um Fasertoxizität zu bewirken. Die Stärkere Wirkung der kommerziellen Silica-Nanopartikel könnten durch deren größere Volumenverdrängung im Verhältnis zur Partikelmasse im Vergleich zu den synthetisierten Partikeln bedingt sein.

#### 4.6.2 Chemotaxis induziert durch ZnO-Partikel

PICMA zeigte leicht unterschiedliche Effekte der verschiedenen ZnO-Partikel. Die stärkste Chemotaxis wurde durch Überstände induziert, die nach einer Inkubation mit ZnO-Mikro-Kugeln erhalten wurden, gefolgt von ZnO-Nanostäbchen, -Mikrostäbchen, -Nanokugeln und -Submikrokugeln. Alle untersuchten ZnO-Partikel wirkten im PICMA stärker als die Silica-Positivkontrolle, mit Ausnahme der ZnO-Submikrokugeln (Abb. 41). Zinkacetat induzierte die stärksten Effekte aller untersuchten Verbindungen, was die Erklärung der Wirkung durch gelöste Zinkionen unterstreicht (Abb. 42).



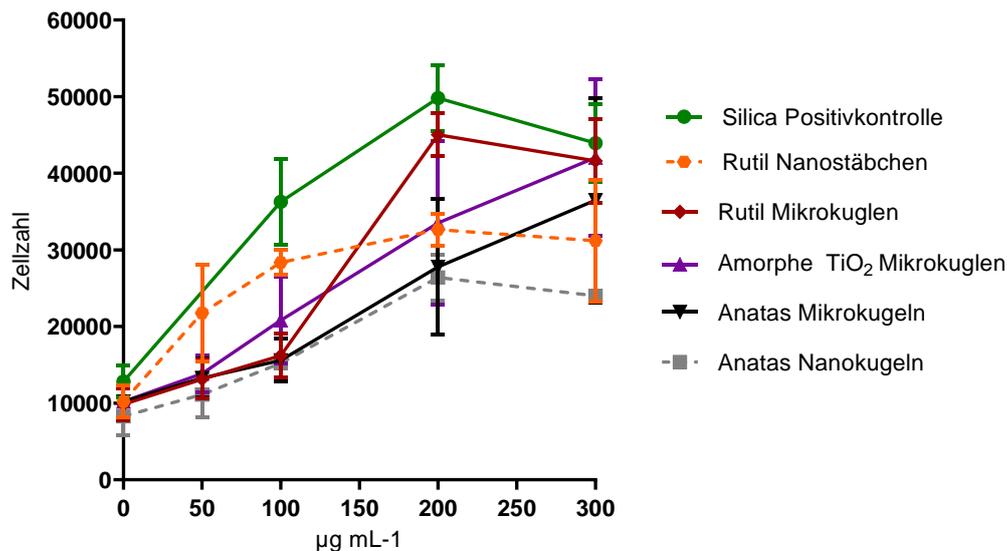
**Abbildung 41** Chemotaxis (Zellzahl) der nicht exponierten dHL-60-Zellen als Reaktion auf NR8383-Zellüberstände, die aus Inkubationen mit steigenden ZnO-Partikel-Konzentrationen gewonnen wurden. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Als Positivkontrolle dienten handelsübliche Silica-Nanopartikel.



**Abbildung 42:** Chemotaxis (Zellzahl) der nicht exponierten dHL-60-Zellen als Reaktion auf NR8383-Zellüberstände, die aus Inkubationen mit steigenden Zink-Acetat-Konzentrationen gewonnen wurden. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Als Positivkontrolle dienten handelsübliches Silica Nanopartikel.

#### 4.6.3 Chemotaxis induziert durch TiO<sub>2</sub>-Partikel

Die Chemotaxis von dHL60-Zellen durch Überstände von TiO<sub>2</sub>-Partikel-exponierten NR8383- ist in Abb. 43 dargestellt. Die Auswirkungen der TiO<sub>2</sub>-Partikel waren im Vergleich zur Silica-Positivkontrolle geringer. Die TiO<sub>2</sub>-Kurven streuten um das amorphe TiO<sub>2</sub> herum und zeigten eine lineare Steigung. Rutil-Nanostäbchen zeigten die steilste Steigung und einen hyperbolischen Verlauf, während Rutil-Mikrokugeln die höchste, aber sigmoide Kurvenform aufwiesen. Anatase Mikro- und Nanosphären zeigten die schwächsten Effekte und nahezu lineare Verläufe. Bei kristallinen Rutil-Nanostäbchen wurde fast kein Effekt beobachtet.



**Abbildung 43:** Chemotaxis (Zellzahl) der nicht exponierten dHL-60-Zellen als Reaktion auf NR8383-Zellüberstände, die durch Inkubation mit TiO<sub>2</sub>-Partikel-Konzentrationen zwischen 50 und 300 µg mL<sup>-1</sup> erhalten wurden. Die Daten sind als Mittelwert ± SD (n = 3) dargestellt. Als Positivkontrolle dienten handelsübliche Silica-Nanopartikel.

Schlussfolgern lässt sich, dass die unterschiedliche Größe und Form keinen Einfluss auf die induzierte Chemotaxis hatten, und somit keine gesonderte Bewertung gesundheitlicher Risiken durch solche Unterschiede erforderlich wäre.

## Literatur

- [1] Duhamel M, Rodet F, Delhem N, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, Pays L, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorski M, Fournier I, Day R, Salzet M; Molecular consequences of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) inhibition in macrophages for application to cancer immunotherapy: A proteomic study. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, 14, 2857-2877.
- [2] Greulich C, Diendorf J, Simon T, Eggeler G, Epple M, Köller M; Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta biomaterialia* **2011**, 7 (1), 347–354.
- [3] Kollenda S, Kopp M, Wens J, Koch J, Schulze N, Papadopoulos C, Pöhler R, Meyer H, Epple M; A pH-sensitive fluorescent protein sensor to follow the pathway of calcium phosphate nanoparticles into cells. *Acta Biomater.* **2020**, 111, 406-17.
- [4] Messerschmidt C, Hofmann D, Kroeger A, Landfester K, Mailänder V, Lieberwirth I; On the pathway of cellular uptake: new insight into the interaction between the cell membrane and very small nanoparticles. *Beilstein J Nanotechnol.* **2016**, 7, 1296-311.
- [5] Loza K, Schremmer I, Bünger J, Westphal GA, Köller M, Epple M, Sengstock C; Barium sulfate micro- and nanoparticles as bioinert reference material in particle toxicology. *Nanotoxicology.* **2016**, 10, 1492-502.
- [6] Fröhlich E; The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* **2012**, 7, 5577-91.
- [7] Westphal GA, Schremmer I, Rostek A, Loza K, Rosenkranz N, Brüning T, Epple M, Bünger J (2015) Particle-induced cell migration assay (PICMA): A new in vitro assay for inflammatory particle effects based on permanent cell lines. *Toxicol In Vitro* 29:997 – 1005.
- [8] Westphal GA, Rosenkranz N, Brik A, Weber D, Föhring I, Monsé C, Kaiser N, Hellack B, Mattenklott M, Brüning T, Johnen G, Bünger J (2019) Multi-walled carbon nanotubes induce stronger migration of inflammatory cells in vitro than asbestos or granular particles but a similar pattern of inflammatory mediators. *Toxicol In Vitro* 58:215-22.

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

### **5.1 Bisherige Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften**

Folgende Publikationen der erzielten Ergebnisse konnten bereits publiziert werden:

M. Kersting, M. Olejnik, N. Rosenkranz, K. Loza, M. Breisch, A. Rostek, G. Westphal, J. Bünger, N. Ziegler, A. Ludwig, M. Köller, C. Sengstock, M. Epple, "Subtoxic cell responses to silica particles with different size and shape", **Scientific Reports** **10** (2020) 21591.

M. Olejnik, M. Breisch, V. Sokolova, K. Loza, O. Prymak, N. Rosenkranz, G. Westphal, J. Bünger, M. Köller, C. Sengstock, M. Epple, "The effect of short silica fibers (0.3 µm·3.2 µm) on macrophages", **Science of the Total Environment** **769** (2021) 144575.

M. Olejnik, M. Kersting, N. Rosenkranz, K. Loza, M. Breisch, A. Rostek, O. Prymak, L. Schürmeyer, G. Westphal, M. Köller, J. Bünger, M. Epple, C. Sengstock, Cell-biological effects of zinc oxide spheres and rods from the nano- to the microscale at sub-toxic levels, **Cell Biology and Toxicology** **37** (2021) 573-593.

In Vorbereitung:

M. Breisch, M. Olejnik, K. Loza, O. Prymak, N. Rosenkranz, J. Bünger, C. Sengstock, M. Köller, G. Westphal, M. Epple, "Cell-biological response and inflammatory effects of titanium dioxide with different size and shape".

### **5.2 Posterbeiträge auf wissenschaftlichen Tagungen**

30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials ESB 2019 in tandem with the 26th Annual Conference of the German Society for Biomaterials (DGBM), 09-13.09.2019, Dresden, M. Olejnik, M. Kersting, C. Sengstock, K. Loza, A. Rostek, M. Köller, G. Westphal, N. Rosenkranz, J. Bünger, M. Epple, "Cell response towards zinc oxide particles: effect of particle size, shape and surface"

Joint Polish-German Crystallographic Meeting 2020, 24-27.02.2020, Breslau, O. Prymak, M. Olejnik, M. Epple, "The crystalline nature of zinc oxide nano- and microparticles with different shape determined by X-ray powder diffraction"

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

Die Fragestellung war, durch gezielte Synthese erstmals zu ermöglichen, chemisch identische Partikel, die sich lediglich jeweils in ihrer Größe und Oberfläche oder ihrer Form unterscheiden, eingehend vergleichend physikalisch-chemisch, biologisch und toxikologisch zu charakterisieren. Diese Untersuchungen sollten Erkenntnisse erzielen, um die Primärprävention und die arbeitsmedizinisch-toxikologische Bewertung von Gefährdungen durch Partikel grundlegend zu verbessern. Sollten die Analysen wesentliche Einflüsse dieser Faktoren auf die Toxizität zeigen, wäre die Grenzwertfindung für Partikel außerordentlich erschwert, da nicht nur deren chemische Identität, sondern auch deren Beschaffenheit berücksichtigt werden müsste. Tatsächlich ist dies für manche Partikel der Fall und zumeist durch unterschiedliche Löslichkeit bedingt oder unterschiedliche Kristallstruktur. Auch faserartige Partikel können toxischer sein als chemisch identische granuläre Partikel. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen aber, dass Größe und Oberfläche oder Form nicht grundsätzlich bedeutend zur Toxizität beitragen, so dass über die geltenden regulatorischen Vorschriften hinaus (insbesondere unterschiedliche Grenzwerte für GBS und nano-GBS) wahrscheinlich keine weiteren

Anstrengungen unternommen werden müssen, um solche physikalischen Größen zu berücksichtigen.

## 7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die erfolgreichen Synthesen der ZnO-Partikel, Silica-Partikel und TiO<sub>2</sub>-Partikel konnten im zeitlichen Rahmen des Projektes realisiert werden. Lediglich die Herstellung der Quarz-Partikel erwies sich als schwieriger als erwartet.

Vor den zellbiologischen Experimenten (Exposition der NR8383-Zellen mit Partikeln) wurde festgestellt, dass viele der Partikel in Wasser und im Zellkultur-Medium agglomerierten. Deswegen wurden noch umfangreiche Untersuchungen zur optimalen Dispergierbarkeit der Partikel durchgeführt. Der Zeitplan ist durch diese Arbeiten jedoch nicht wesentlich verschoben worden.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Analyse der intrazellulären Aufnahme der unterschiedlichen Partikel in NR8383 mittels Durchflusszytometrie (FACS) aufgrund der geringen Partikeldichte im Vergleich zu BaSO<sub>4</sub> nicht möglich war. Jedoch konnte die konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) bei bestimmten Partikelsystemen (SiO<sub>2</sub>) nach Fluoreszenz-Markierung angewandt werden. Des Weiteren war eine Untersuchung der Partikel ohne Fluoreszenzmarkierung (SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>) mittels Focused-Ion-Beam-Milling und Rasterelektronenmikroskopie (FIB/REM) sowie Transmissionselektronenmikroskopie und energiedispersiver Röntgenspektroskopie (TEM/EDX) möglich, wobei elektronendichte Strukturen (Partikel) innerhalb der Zellen detektiert und ihre Zusammensetzung identifiziert werden konnten. Im Falle der ZnO-Partikel konnte keine Fluoreszenz-Markierung realisiert werden, sodass die CLSM-Technik zur Untersuchung der Partikelaufnahme nicht eingesetzt werden konnte. Zudem war auch die FIB/REM + TEM/EDX Methode aufgrund der schnellen Auflösung und der damit verbundenen Toxizität der Partikel nicht geeignet. Somit wurde die ZnO-Partikel-Aufnahme indirekt durch Messung der intrazellulären Zink-Ionen-Konzentration mit Hilfe des Zn<sup>2+</sup>-selektiven Indikators FluoZin-3 untersucht.

Es liegt kein konkreter Verwertungsplan vor. Die Ergebnisse wurden hochrangig publiziert, um sie öffentlich zugänglich zu zitierfähig zu machen, als Voraussetzung dafür, dass diese Ergebnisse von den entsprechenden grenzwertfestsetzenden Gremien zur Kenntnis genommen werden und in zukünftigen Diskussionen zu den Pathomechanismen der Partikelwirkungen in nationalen und internationalen, grenzwertfestsetzenden Gremien Berücksichtigung finden. Da Vertreter des Kooperationspartners IPA auch als ständige Gäste und Mitglieder in der Arbeitsgruppe "Festlegung von Grenzwerten für Stäube", in der „Ständigen Senatskommission der DFG zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe“ und im „Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS)“ des Bundesministeriums für Arbeit und Soziales vertreten sind, sind die Voraussetzungen für eine Berücksichtigung in solchen zukünftigen Diskussionen in jedem Fall gegeben.

## 8. Anhang/Anhänge

Sonderdrucke von

1. M. Kersting, M. Olejnik, N. Rosenkranz, K. Loza, M. Breisch, A. Rostek, G. Westphal, J. Bünger, N. Ziegler, A. Ludwig, M. Köller, C. Sengstock, M. Epple, "Subtoxic cell responses to silica particles with different size and shape", **Scientific Reports** **10** (2020) 21591.
2. M. Olejnik, M. Breisch, V. Sokolova, K. Loza, O. Prymak, N. Rosenkranz, G. Westphal, J. Bünger, M. Köller, C. Sengstock, M. Epple, "The effect of short silica fibers (0.3 µm-3.2 µm) on macrophages", **Science of the Total Environment** **769** (2021) 144575.
3. M. Olejnik, M. Kersting, N. Rosenkranz, K. Loza, M. Breisch, A. Rostek, O. Prymak, L. Schürmeyer, G. Westphal, M. Köller, J. Bünger, M. Epple, C. Sengstock, Cell-biological

## **Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte**

Projektnummer: FP-0412

Titel: Die toxische Wirkung von arbeitsmedizinisch relevanten Partikeln: Einfluss der Partikelgröße, der Partikelgeometrie und der Partikeloberfläche

### **Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten**

Hiermit erklären die Unterzeichnenden, dass der zum 06.10.2021 vorgelegte **Abschlussbericht** mit allen Kooperationspartnern abgestimmt ist.

Prof. M.Epple, Universität Duisburg-Essen

Datum:

Prof. C. Sengstock, Bergmannsheil, Bochum

Datum:

Prof. J. Bünger, IPA, Bochum

Datum